

## 치악산 버섯추출물로부터 Fibrin 분해활성의 검색

김준호\* · 이호용<sup>1</sup> · 유관희<sup>1</sup> · 김양선<sup>2</sup> · 석순자<sup>3</sup> · 김양섭<sup>3</sup>

\*상지대학교 이공과대학 화학과, <sup>1</sup>상지대학교 이공과대학 생물과  
<sup>2</sup>세명대학교 교양학부, <sup>3</sup>농촌진흥청 농업과학기술원

## The Screening of Fibrinolytic Activities of Extracts from Mushrooms in Mt. Chiak

Jun-Ho Kim\*, Ho-Yong Lee<sup>1</sup>, Kwan-Hee Yoo<sup>1</sup>, Yang-Sun Kim<sup>2</sup>,  
Soon-Ja Seok<sup>3</sup> and Yang-Sup Kim<sup>3</sup>

Department of Chemistry, Sang Ji University, Wonju 220-702

<sup>1</sup>Department of Biology, Sang Ji University, Wonju 220-702

<sup>2</sup>College of General Education, Semyoung University, Chechon 390-230

<sup>3</sup>National Agricultural Science and Technology Institute, RDA. Suwon 441-707, Korea

**ABSTRACT:** Extracts from 65 species of mushrooms in mount Chiak were screened for their fibrinolytic activities. Extracts from *Armillariella mellea*, *Calocybe* sp., *Lepista nuda* and *Trichaptum abietinum* showed to have almost twice of activity of plasmin 1.5 U/ml, 193%, 213%, 198%, and 193% respectively. *Collybia maculata* showed 98% of activity, and *Coprinus comatus* and *Lepiota* sp. 56% and 58% activities, respectively. Other two, *Agrocybe* sp. and *Stropharia rugosoannulata* were less than 10% of activities.

**KEYWORDS:** Fibrin plate assay, Fibrinolytic activity, Mushrooms, Plasmin.

정상 상태에서는 혈관에 혈액응고계와 섬유소용해계가 균형을 이루고 있어 혈전이 형성되지 않는다. 그러나 여러 가지 원인에 의해 섬유소(fibrin)와 혈소판의 응집으로 형성된 혈전은 혈관벽에 쌓여 동맥경화나 심근경색의 원인이 되거나 혈관을 따라 흐르며 뇌출혈, 뇌혈전증, 심부전증, 심장마비 등을 일으킬 수 있다.

이 혈전에 의한 질병의 예방과 치료약물로는 혈액의 응고를 방지하는 항응고제와 혈소판의 응집을 억제하는 항혈소판제가 있고(Chung, 1991), 형성된 혈전을 용해하는 혈전용해제가 있다. 한번 형성된 혈전은 자연적으로는 좀처럼 용해가 일어나지 않지만 혈전용해제를 사용하면 섬유소의 용해와 혈전의 축소가 일어나 혈전에 의한 질병을 치료할 수 있다.

혈전을 형성하는 섬유소는 혈관 내에서 트롬빈

(thrombin)의 작용을 받아 섬유소원(fibrinogen)으로부터 생기며(Bachmann, 1987) 플라즈미노겐 활성화제(plasminogen activator)에 의해 플라즈미노겐(plasminogen)으로부터 생긴 플라즈민(plasmin)에 의해 용해된다. 현재, 널리 사용되고 있는 혈전용해제로는 urokinase와 tPA(tissue type plasminogen activator)와 streptokinase가 있는데(Kim 등, 1995) 이들은 플라즈미노겐 활성화제(plasminogen activator)로 작용하여 플라즈민(plasmin)을 만드는데 관여할 뿐 아니라 혈소판 응집을 강하게 억제하는 작용도 한다(최, 1992). 그러나 이 혈전 용해제들은 활성은 크지만 섬유소(fibrin)에 대한 선택성이 작아 장기간 복용 시 용혈 현상과 면역반응이 나타나는 것으로 알려져 있고 또한 가격이 매우 높은 단점이 있다. 이런 문제점을 해결하기 위하여 혈전에 대한 선택성이 크고 섬유소용해 활성이 높은 새로운 혈전용해물질에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 유전공학을 이용하

\*Corresponding author

여 만들거나 지렁이(Mihara 등, 1991, 1993)와 배의 독(Bajwa 등, 1980, 1981; Ouyang 등, 1976)으로부터 분리하는 연구 등이 있다.

본 연구에서는 장기간 복용하여도 부작용이 거의 없으며(Ahn, 1992) 균주를 배양함으로써 대량으로 생산이 가능한 식용버섯으로부터 혈전용해효소를 찾고자 하였다. 근래에는 버섯으로부터 항균성물질(Park 등, 1995)과 항암물질(Kim 등, 1983)에 관한 연구와 함께 단백질 및 효소(Bajorth 등, 1988; Burton 등, 1993)에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 버섯 중 혈전을 분해하는 단백질 분해 효소에 관한 논문은, 식용버섯인 *Flammulina velutipes*(Fr) Sing에 섬유소(fibrin)를 분해하는

단백질 분해효소가 있다는 Gavrilo(1975) 등의 보고 이 외에는 거의 발표되어 있지 않아 체계적인 연구가 필요하게 되었다. 따라서 본 연구실에서는 국내에 자생하는 야생버섯 중 혈전용해효소를 갖고 있으며 활성이 큰 버섯을 찾기 위하여 치악산에 자생하는 버섯 65종을 채집하여 fibrin 분해활성을 검색하였다.

실험에 사용한 버섯시료(자실체)는 1996년 7월 17일과 9월 7일, 1997년 6월 28일과 6월 29일 4회에 걸쳐 강원도 치악산 구룡사 계곡에서 채집하여 분류 동정한 다음 시료로 사용하였으며(Table 1) 시료 처리시 모든 작업은 4°C에서 행하였다.

채집한 버섯 약 5 g를 20 mM Tris-HCl 완충용

**Table 1.** The mushroom Samples for the screening of fibrinolytic activity

	Mushroom		No. of ASIK
Agaricaceae (주름버섯과)	<i>Agaricus subrutilescens</i>	진갈색주름버섯	3666
	<i>Cystoderma</i> sp.		3673
	<i>Cystoderma</i> sp.		3679
	<i>Lepiota clypeolaria</i>	방패갓버섯	3669
	<i>Lepiota</i> sp.		
Amanitaceae (광대버섯과)	<i>Amanita virosa</i>	독우산광대버섯	
Blobitiaceae (소풍버섯과)	<i>Agrocybe</i> sp.		3680
Boletaceae (그물버섯과)	<i>Boletus fraternus</i>		
	<i>Suillus bovinus</i>	황소비단그물버섯	
	<i>Suillus</i> sp.		
	<i>Tylopilus eximius</i>	은빛쓴맛그물버섯	
	<i>Xerocomus chrysenteron</i>	마른산그물버섯	
Coprinaceae (떡물버섯과)	<i>Xerocomus</i> sp.		
	<i>Coprinus comatus</i>	떡물버섯	3678
	<i>Coprinus plicatilis</i>	좁밀떡물버섯	
	<i>Coprinus</i> sp.	떡물버섯속	3646
	<i>Psathyrella velutina</i>	큰눈물버섯	
Cortinariaceae (끈적버섯과)	<i>Psathyrella</i> sp.		
	<i>Inocybe</i> sp.	땀버섯속	3661
Crepidotaceae (귀버섯과)	<i>Crepidotus</i> sp.	귀버섯속	
Rhodophyllaceae (외대버섯과)	<i>Rhodophyllus</i> sp.	외대버섯속	
Russulaceae (무당버섯과)	<i>Lactarius camphoratus</i>	민맛젓버섯	3648
	<i>Lactarius laetissimus</i>		3665
	<i>Russula densifolia</i>	애기무당버섯	
	<i>Russula laurocerasi</i>	밀짚색무당버섯	
	<i>Russula sanguinea</i>	혈색무당버섯	
	<i>Russula vesca</i>	조각무당버섯	
	<i>Russula</i> sp.	무당버섯속	
	<i>Stropharia fasciculare</i>	노란디발버섯	3650
Strophariaceae (독청버섯과)	<i>Pholiota</i> sp.	비늘버섯속	
	<i>Stropharia rugosoannulata</i>	독청버섯아재비	

Table 1. Continued

	Mushroom		No. of ASIK
Tricholomataceae (송이과)	<i>Armillariella mellea</i>	뿔나무버섯	
	<i>Calocybe</i> sp.		
	<i>Clitocybe</i> sp.		
	<i>Collybia confluens</i>	밀버섯	
	<i>Collybia dryophila</i>	굽은애기버섯	3657
	<i>Collybia maculata</i>	점박이애기버섯	3652
	<i>Collybia</i> sp.	애기버섯속	3656
	<i>Cyptotrampa asprata</i>	등색가시비너버섯	
	<i>Laccaria laccata</i>	줄각버섯	
	<i>Lepista nuda</i>	민자주방망이버섯	3642
	<i>Marasmius maximus</i>	큰낙엽버섯	
	<i>Marasmius siccus</i>	애기낙엽버섯	
	<i>Mycena pura</i>	맑은애주름버섯	
	<i>Mycena stylobates</i>		
	<i>Mycena</i> sp.		
	<i>Oudemansiella mucida</i>	끈적끈뿌리버섯	
	<i>Oudemansiella platyphylla</i>	넓은술버섯	
	<i>Panellus stipticus</i>	부채버섯	
	<i>Tricholomopsis rutilans</i>	술버섯	3671
Cantharellaceae (피꼬리버섯과)	<i>Cantharellus</i> sp.		
Hydnaceae (턱수염버섯과)	<i>Hydnum repandum</i> var. <i>album</i>	흰턱수염버섯	
Polyporaceae (구멍장이버섯과)	<i>Coriolus versicolor</i>	구름버섯	
	<i>Gloeophyllum tricolor</i>		
	<i>Polyporellus alveolarius</i>		
	<i>Polyporellus arcularius</i>		
	<i>Trichaptum abietinum</i>	웃술버섯	
Dacryomycetaceae (붉은목이과)	<i>Calocera cornea</i>	아교빨버섯	
	<i>Dacryomyces palmatus</i>	손바닥붉은목이	
Lycoperdaceae (말뭉치버섯과)	<i>Calvatia craniiformis</i>	말뭉치버섯	3655
	<i>Lycoperdon perlatum</i>	말뭉치버섯	
Helvellaceae (안장버섯과)	<i>Helvella lacunosa</i>	안장버섯	
Humariaceae (접시버섯과)	<i>Aleuria aurantia</i>	돌주발버섯	
Sphaeriaceae (콩꼬투리버섯과)	<i>Daldinia concentrica</i>	콩버섯	
Geoglossaceae (콩나물버섯과)	<i>Spathularia flavida</i>	황금넓적콩나물버섯	3670

ASIK: Agricultural Science and Technology Institute Kim(Yang-Sup Kim).

액(pH 7.0)에 넣고 homogenizer로 잘게 부순 후 gauze로 걸러내고, 용액을 4°C, 10000×g에서 60분간 원심분리 한 후 농도를 2.2 mg/ml로 맞추고 시료로 사용하였으며 단백질의 농도는 Lowry법 (Lowry, 1951)을 이용하여 측정하였고 bovine serum albumin을 사용하여 표준곡선을 그렸다. Fibrin 분해활성의 측정(Fibrin plate assay)은 Haverkate-Trass의 fibrin plate법(Haverkate 등, 1974)에 따라 2% gelatin 용액에 녹인 0.7% (W/V) fibrinogen 용액 10 ml와 0.05 M Barbital

완충용액(pH 7.5)에 녹인 thrombin(100 NIH units) 50 µl을 잘 섞은 후 이를 petri dish에 부어 fibrin막을 만든 다음 시료로 처리된 용액을 20 µl 씩 fibrin plate 위에 점적 한 후 37°C에서 6시간 방치하고 fibrin막이 용해되면 용해면적을 측정하여 활성을 비교하였다. 대조구로는 혈전용해효소인 plasmin (1.5 U/ml)을 사용하였으며, 다음과 같은 방법으로 혈전용해활성을 산출하였다.

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

Table 2. Fibrinolytic activities of extracts from mushroom Samples

	Mushroom	Fibrinolytic activity(%)
Agaricaceae	<i>Lepiota</i> sp.	58
Bolbitiaceae	<i>Agrocybe</i> sp.	5
Coprinaceae	<i>Coprinus comatus</i>	56
Strophariaceae	<i>Stropharia rugosoannulata</i>	5
Tricholomataceae	<i>Armillariella mellea</i>	193
	<i>Calocybe</i> sp.	213
	<i>Collybia maculata</i>	95
	<i>Lepista nuda</i>	198
Polyporaceae	<i>Trichaptum abietinum</i>	193
Plasmin (1.5 unit)		100

Fibrin 분해활성을 검색한 결과 Table 2에서와 같이 주름버섯과의 *Lepiota* sp.와 먹물버섯과의 *Coprinus comatus*는 각각 plasmin 1.5 unit의 58%와 56%에 해당하는 fibrin 분해활성을 나타낸 반면(Fig. 1) 소풍버섯과의 *Agrocybe* sp.와 독청버섯과의 *Stropharia rugosoannulata*는 작은 활성을 나타냈다. 송이버섯과의 *Armillariella mellea*와 *Calocybe* sp.와 *Lepista nuda*는 plasmin 1.5 unit보다 약 2배의 fibrin 분해활성을 보였다

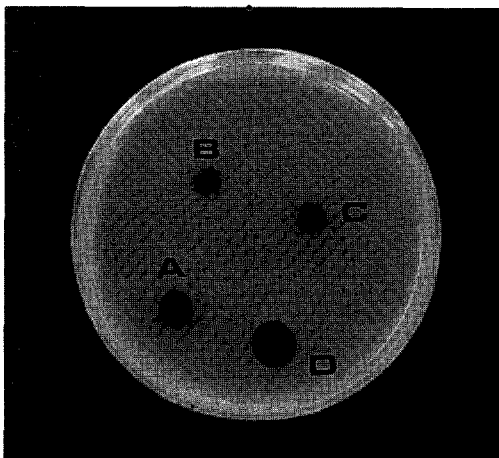


Fig. 1. Fibrinolytic activity of each mushroom extract and plasmin. A. plasmin (1.5 unit), B. *Coprinus comatus*, C. *Lepiota* sp., D. *Armillariella mellea*.

*Collybia maculata*는 plasmin과 거의 같은 활성을 보였다. 또한 구멍장이버섯과의 *Trichaptum abietinum*은 plasmin 1.5 unit의 1.93배의 fibrin 분해활성을 나타냈다. 그러나 광대버섯과, 그물버섯과, 끈적버섯과, 귀버섯과, 외대버섯과, 무당버섯과, 피꼬리버섯과, 턱수염버섯과, 붉은목이과, 말불버섯과, 안장버섯과, 접시버섯과, 콩꼬투리버섯과 및 콩나물버섯과의 버섯은 모두 활성을 나타내지 않았다.

즉, 65종의 버섯 중 fibrin 분해활성이 있는 자실체는 9종이었으며, 송이과 버섯이 4종으로 가장 많았고 또한 활성도 매우 커 버섯 중 송이과 버섯이 혈전용해효소 함유비율이 높은 것으로 나타났다. 활성이 큰 먹물버섯, 뽕나무버섯, 점박이애기버섯, 민자주방망이버섯은 식용버섯으로 여름과 가을에 쉽게 발견할 수 있고 또한 많은 양의 채집이 가능한 버섯들이다. 특히 봄부터 가을까지 활엽수와 침엽수의 그루터기나 마른 가지 혹은 살아있는 나무의 밑동에서 채집할 수 있는 뽕나무버섯은 그 동안 야생버섯만을 채취하여 식용과 약용으로 이용하였는데 지금은 재배에 성공하여 대량생산이 이루어지고 있어 다양한 식생활과 의약품 개발에 사용이 가능해졌다. 따라서 Gavrilova(1975) 등의 논문에서 언급한 바와 같이 식용버섯에 fibrin 분해물질이 존재함을 알 수 있었으며, 활성이 높은 버섯의 종류를 검색하여 구별할 수 있었다. 이 버섯들이 갖고있는 fibrin 분해효소가 혈전에 대한 선택성이 크고 또한 이 버섯들이 대량 재배가 가능할 경우 기존의 혈전용해제들이 갖고있는 단점인 고가의 제품 대신 저가의 새로운 혈전용해제의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

## 적 요

치약산에 자생하는 야생버섯 65종에서 fibrin 분해활성을 검색하였으며, 그 결과 9종의 버섯이 활성을 나타냈다. *Agrocybe* sp.와 *Stropharia rugosoannulata*는 작은 활성률을 보였으며, *Lepiota* sp.와 *Coprinus comatus*는 plasmin 1.5 unit의 56%~58%의 fibrin 분해활성을 보인 반면 *Collybia maculata*는 plasmin 1.5 unit와 거의 같은 활성을 보였고 *Armillariella mellea*와 *Calocybe* sp.

와 *Lepista nuda*와 *Trichaptum abietinum*은 plasmin 1.5 unit의 약 2배의 fibrin 분해활성을 나타냈다.

### 감사의 말씀

본 연구는 1997년도 상지대학교 교내연구비의 지원으로 이루어졌음을 밝히며 감사드립니다.

### 참고문헌

- 최 진. 1992. 병리학. 壽文社. 47-55
- Ahn, D. K. 1992. Medical Fungi in Korea. *Kor. J. Mycol.* 20: 154-166.
- Bachmann, F. 1987. in *Thrombosis and Haemostasis*, p. 227, Leuven University Press, Leuven
- Bajorth, J., Saenger, W. and Pal, G. P. 1988. Autolysis and inhibition of proteinase K, a subtilisin-related serine proteinase isolated from the fungus *Tritirachium album Limber*. *Biochim Biophys Acta* (NETHERLANDS) 954(2): 176-82.
- Bajwa, S. S., Markland, F. S. and Russell, F. E. 1980. Fibrinolytic enzyme(s) in western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. *Toxicon* 18(3), 285.
- Bajwa, S. S., Markland, F. S. and Russell, F. E. 1981. Fibrinolytic and fibrinogen clotting enzymes present in the venoms of western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*, eastern diamondback rattlesnake, *Crotalus adamanteus*, and southern Pacific rattlesnake, *Crotalus viridis helleri*. *Toxicon* 19(1), 53.
- Burton, K. S., Wood, D. A., Thurston, C. F. and Barker, P. J. 1993. Purification and characterization of a serine proteinase from senescent sporophores of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1379-1386.
- Chung, K. H. 1991. in Proceedings of the 2nd Symposium on the Biochemical Methodology for the R&d of the Bioactive Substances, p. 53, Biochem. Soc. Republic of Korea.
- 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, B. K., Kim, J. S., Choi, E. C., Kim, H. R., Lee, K. L., Lee, C. O., Chung, K. S. and Shim, M. J. 1983. Studies on constituents of the Higher Fungi of Korea (XXXVII). *Kor. J. Mycol.* 11: 151-157.
- Kim, Y. T., Kim, W. K. and Oh, H. S. 1995. Screening and Identification of the Fibrinolytic Bacterial Strain from ChungKookJang. *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.
- Mihara, H., Nakajima, N. and Sumi, H. 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotech. Biochem* 57: 10, 1730.
- Mihara, H., Sumi, H., Yoneta, T., Mizumoto, H., Ikeda, R., Seiki, M. and Maruyama, M. 1991. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Japanese journal of Physiology.* 41: 461.
- Ouyang, C. and Teng, C. M. 1976 Fibrinolytic enzymes of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *Biochim. Biophys. Acta* 420(2): 298.
- Park, S. S., Lee, K. D. and Min, T. J. 1995. Study on the Screening and Development of Antibiotics in the Mushrooms. - The Screening of Bacterial Antibiotics in Basidiomycetes (I). *Kor. J. Mycol.* 23(1): 28-36.