

## 식물유래 물질이 뿔나무버섯(*Armillaria mellea*) 균사체 성장 및 혈전분해 활성에 미치는 영향

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

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

### Effect of Various Plant Extracts on the Mycelial Growth and Fibrinolytic Activity of *Armillaria mellea*

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

Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

<sup>1</sup>Department of Industrial Crop Production and Processing, Iksan National College, Iksan 570-752, Korea

<sup>2</sup>Department of Agricultural Chemistry, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

<sup>3</sup>Department of Genetic Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

(Received March 30, 2005)

**ABSTRACT:** To increase the fibrinolytic activity and production of mycelium, extracts of 7 plant species were supplemented to the growth media of *Armillaria mellea*, and mycelial growth and enzymatic activity in the mycelium extracts of *A. mellea* were estimated. The mycelial production of *A. mellea* was slightly increased by adding ASH-R, UDVN or RGR extract, whereas KG extract significantly affected the growth. Supplement of ASH-S, UDVN and RGR extracts increased proteolytic activity from 36.8 to 46.1%. Fibrinolytic activity was increased to 50~65% by supplement with RVS, ASH-S and RGR extracts, respectively. Enzyme extracts of the fungus grown with RGR extract supplement degraded all chains of fibrinogen within 2 hours, whereas control was required 3 hours. Degradation of fibrin fragments by the enzyme extracts was also observed through microscopy.

**KEYWORDS:** *Armillaria mellea*, Fibrinolysis, Mycelium, Plant extract, Proteolysis

뿔나무버섯균(*Armillaria mellea*)은 담자균의 일종으로 나무뿌리모양의 균사속을 형성하며(이·홍, 1985), 예로부터 천마와 함께 노인병, 중풍, 현기증, 두통, 신경쇠약, 불면증, 사지마비, 소아마비 및 간질등의 치료제로 사용되어 왔다(Yang *et al.*, 1989). 또한, 항균활성(Obuchi *et al.*, 1990), 대뇌보호 효과(Watanabe *et al.*, 1990), 항암 및 면역촉진 효과(김 등, 1983), 중추신경, 심장혈관 계통 및 고지방혈증에 대한 효과(Junhua *et al.*, 1990) 등 천마와 유사한 생리활성을 가지고 있는 것으로 보고되어 기능성 식품소재로 충분한 가능성을 내포하고 있다.

혈관이 손상되면 출혈이 일어나고 지혈과정이 뒤따르며 손상된 부위의 조직이 재생되면 plasminogen의 활성화제인 urokinase(UK), tissue-type plasminogen activator(tPA), streptokinase(SK) 등의 작용으로 plasmin이 활성화 되어 지혈과정중 생성된 혈전을 용해시킴으로서 생체는 다시 정상상태를 유지하게 된다(김, 2000). 그러나 이러한 기전에 이상이 발생할 경우 체내에 혈전이 증가하게 되어 혈

전증(thrombosis)을 유발할 수 있으며 이로 인하여 인체에 치명적인 손상을 줄 수 있다(최 등, 1999). 현재 임상에서 사용되어지고 있는 혈전 용해제로는 UK, tPA, SK (Reed *et al.*, 1995) 등이 있으나 가격이 매우 높으며, UK를 제외하고는 경구 투여를 할 수 없고 tPA의 경우 반감기가 짧은 단점이 있다(김, 2000). 따라서 최근에는 지렁이(Mihara *et al.*, 1991), 뱀독(Chung and Kim, 1992) 및 각종 발효식품(Fujita *et al.*, 1993; Sumi *et al.*, 1995)으로부터 혈전용해제를 분리하고자 하는 시도가 있었다. 특히 버섯유래의 혈전분해효소를 이용하고자 김 등(1998)은 치악산에서 자생하는 65종의 야생버섯에 대한 혈전분해 효과를 검색하였으며, 최 등(1999)역시 한국에서 자생하는 50여종의 버섯을 수집하여 이의 혈전분해 활성을 보고하기도 하였다. 더욱이 최근에는 뿔나무버섯 자실체에 대한 혈전분해 효과에 대해서 시도된바 있다(김·김, 1998; Kim and Kim, 1999; Healy *et al.*, 1999). 그러나 뿔나무버섯의 자실체를 생산하기 위해서는 3~4개월의 시간이 소요되며 비교적 넓은 공간과 특별한 노력이 필요하다(김 등, 1992). 이에 비해 균사체는 1개월의 비교적 짧은 시간

\*Corresponding author <E-mail: kmyuko@iksan.ac.kr>

과 좁은 공간에서 적은비용으로 대량생산 할 수 있으므로 (김 등, 2003) 상업적으로 더욱 유리하나 썩나무버섯 균사체의 생리활성에 관련된 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 썩나무버섯 균사체의 열전분해효과에 대해 살펴보고자 하였으며 식용 및 약용으로 사용되고 있는 각종식물 유래의 물질을 배양기질에 첨가시킴으로서 썩나무버섯 균사체의 기능적 특성을 증가시키고자 하였다.

**재료 및 방법**

**공시 균주 및 재료**

익산대학 특용작물과 균이학 실험실에서 분리 보관중인 썩나무버섯균(*Armillaria mellea* INC2101)을 제공받아 2.5% malt extract(Difco Co.), pH 6.0으로 조절된 사면배지에 3개월 주기로 계대배양하며 본 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 천연물은 Table 1과 같으며, 홍삼박은 한 국인삼연초연구소로부터 획득하였고 그 외의 각종 천연 물질은 시장에서 구입하여 사용하였다.

**배지의 조제**

전라북도 종자보급소에서 구입한 태백보리 품종을 이용하여 17°C, 상대습도 80%에서 싹이 2 mm될 때까지 발아시켜 천일건조한 것을 배지원료로 하였다. 건조된 엇기름은 4배의 증류수를 첨가하여 60°C에서 6시간 동안 당화한 후 11°Brix, pH 6.0으로 조절하여 사용하였다.

**접종원의 조제 및 배양방법**

사면배지에서 2회 계대배양하여 활성화시킨 썩나무버섯 균사를 멸균된 엇기름 액체배지에 접종하고 25°C에서 7일간 증식된 균을 Homogenizer(Omni mixer, USA)를 이용하여 1,000 rpm에서 무균적으로 균질화 하였다. 16 well plate(Ø16.2 mm×16.8 mm)에 배지 2 ml씩 분주한 후 균질화된 균을 0.5 ml씩 접종하였으며 25°C에서 6일 동안 배양하여 이를 접종원으로 사용하였다. 균체배양을 위해 엇기름 배지를 시험관(Ø21 cm×20 cm)에 50 ml씩 분주하고 살균한 후 각 시험관에 접종원을 1개씩 접종 후 25°C 항온기에서 12일간 배양하였다. 또한, 건조중량은

균체를 회수한 후 증류수에 순차적으로 3번 세척하여 배지성분을 제거한 다음 105°C 건조법으로 산출하였으며 3 반복하여 그 평균값으로 나타내었다.

**천연물의 추출 및 첨가**

천연물중량에 대하여 10배 volume의 증류수를 가한 후 환류냉각장치를 부착하여 80°C에서 6시간 동안 추출하여 상온에서 식힌 후 4°C, 3000×g에서 30분간 원심분리하여 그 상등액을 사용하였다. 각종 식물유래 물질이 균체 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 천연물 추출물은 배지 부피에 대하여 5%까지 1% 단위로 증가시키면서 첨가하였으며, 각종 효소의 변화 및 열전분해 활성의 검토를 위해서는 배지에 5% 농도로 첨가하였다. 또한, 모든 시험구는 최종 배지의 농도를 11°Brix 되게 조절하였다.

**조효소액의 제조**

조단백질 분리는 Healy *et al.*(1999)의 방법에 준하여 분리하였다. 즉, *A. mellea* 균사체 50 g에 동량의 멸균수를 넣고 균질화한 후 4°C, 600×g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 회수하고 95% EtOH(-70°C)을 서서히 가하며 교반 (final EtOH conc. 50%)시킨 후 1시간 동안 4°C에서 교반하며 반응시켰다. 다시 4°C, 600×g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 회수하고 최종 EtOH 농도를 70%로 하여 4°C에서 1시간 교반 후 0°C, 1,200×g에서 원심분리하여 생성된 침전물을 10 mM citrate-NaOH(pH 6.0)완충용액 3 ml에 용해시켜 조효소액으로 사용하였다. 조단백질 정량은 Lowry 방법에 의해 단백질 정량 kit(Pierce Co.)를 사용하여 측정하였으며, bovine serum albumin (Sigma Co.)을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

**단백질분해활성 측정**

1% azocasein(50 mM Tris-HCl, pH 7.0, Sigma Co.) 300 µl에 각 조효소액 100 µg/50 µl를 가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 얼음에서 냉각된 10% (w/v) trichloroacetic acid 600 µl를 넣고 즉시 혼합하였다. 이 시료들은 10분 동안 얼음에 보관하였으며, 4°C, 1,700×g에서 15분 동안 원심분리한 후 상등액을 분리하고 366 nm의 흡광도 값을

**Table 1.** The list of plants used for this study

Botanical name (abbreviation)	Korean name	Plant part used
<i>Morus alba</i> L. (MAL)	상백피	root bark
<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i> Nak. (UDVN)	유근피	root bark
<i>Dioscorea japonica</i> Thunb. (DJT)	참마	root bark
<i>Rhus verniciflua</i> Stokes (RVS)	옻나무	stem bark
<i>Acanthopanax senticosus</i> Harms. (ASH-S)	가시오가피	stem
<i>Acanthopanax senticosus</i> Harms. (ASH-R)	가시오가피	root
Red Ginseng residue (RGR)	홍삼박	root residue
<i>Angelicae gigantis</i> Radix. (AGR)	당귀	root
Korean Ginseng (KG)	인삼	root

측정하여 단백질분해활성을 구하였다. 1 unit는 위조건 하에서 azocasein으로부터 흡광도 0.1에 상당하는 양으로 정하였다.

#### 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 농량의 2% agarose 5 ml를 첨가하여 혼합한 후 용액에 thrombin(100 NIH unit/ml, Calbiochem Co.) 0.1 ml를 첨가하여 1시간 동안 실온에서 고화시켜 fibrin plate를 조제하였다. Fibrin plate에 지름 5 mm의 구멍을 만들어 각 조효소 추출물 200  $\mu$ g과 대조구로 plasmin 1 unit(Calbiochem Co.)를 점적한 후에 37°C에서 12시간 반응시켜 plasmin 용해면적에 대한 시료의 상대적인 용해면적 비율로 환산하여 산출하였다.

#### 각종 효소활성 측정

Cellulase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucanase의 활성은 각각 최등(1976), 이(1998), Kim *et al.*(1996)의 방법을 변형하여 사용하였으며, amylase 활성은 Somogyi-Nelson(1944)법에 의해 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 천연물이 균사체 성장에 미치는 영향

뽕나무버섯균은 각종 식물체 추출물이 함유된 배지(홍등, 1990) 및 식물체의 대사산물(Garraway, 1970; Cheo, 1982)의 첨가에 의해서 근상균사속(Rhizomorpha)이 잘 형성되는 것으로 알려져 있다. Fig. 1의 결과도 이와 유사하게 식물체의 뿌리 추출물들이 대체적으로 뽕나무버섯 균사체 증식에 양호하였던 반면 가지부위의 추출물에서는 증식억제효과를 보이는 것으로 나타났다. 가시오가피 뿌

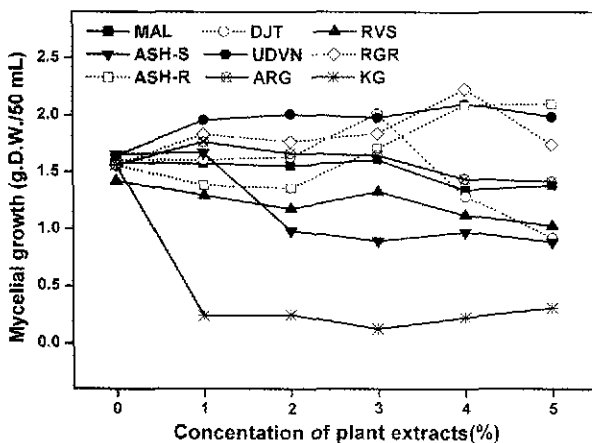


Fig. 1. Effect of various plant extracts on the mycelial growth of *A. mellea*. *A. mellea* was grown at 25°C, pH 6.0 for 12 days. The abbreviation is listed at Table 1.

리(ASH-R, □), 유근피(UDVN, ●), 홍삼박(RGR, ◇) 추출물 첨가에 따라 균사체량이 증가하였으며 당귀(ARG, 1) 및 상백피(MAL, ■) 첨가구는 첨가 농도가 증가하여도 균사체량에 별다른 영향을 미치지 않았다. 그러나 율피(RVS, ▲), 참마(DJT, ○), 가시오가피 가지(ASH-S, ▼) 추출물의 경우 첨가농도에 의존적으로 저해를 받았으며 특히, 인삼(KG, 米) 추출물 첨가에 의해서는 낮은 농도에서도 유의적으로 증식이 억제되었다.

가시오가피 뿌리와 가지, 홍삼박과 인삼의 경우 동일기원 식물체 추출물임에도 불구하고 대조적인 차이를 나타냈는데 가시오가피 뿌리에는 각종 phytosterol과 lignin 및 lignan계의 물질이 함유되어 있는데 반해 가지 및 잎에는 tripen계 화합물들이 주로 함유되어 있어(육, 2001) 이에 의한 증식억제로 추측된다. 또한, 인삼의 tar성분(유, 1986) 및 panaxagin(Ng and Wang, 2001) 성분은 항세균 또는 항진균활성을 가지고 있는 것으로 보고되었다. 홍삼박의 경우 홍삼으로부터 추출가공공정을 거치면서 항균활성물질의 불활성화 또는 제거에 기인하는 것으로 판단된다. Kim *et al.*(1986)은 배양기질에 홍삼박 첨가시 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)과 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)의 증식을 촉진 시키는 것으로 나타나 본 연구와 유사한 경향을 나타내었다. 한편 참마는 탄수화물이 많아(정, 2001) 비교적 영양분이 풍부한 것으로 생각되었으나 첨가에 의해 균의 증식이 억제되는 것으로 나타났는데 이는 아직 명확하지 않다.

#### 각종 효소활성에 미치는 영향

각종 천연물질의 첨가에 의한 균체단백질량 및 효소활성의 변화를 Table 1에 나타내었다. 비교적 균체생장에 양호하게 작용하였던 유근피(UDVN), 홍삼박(RGR), 가시오가피 뿌리(ASH-R)의 균체단백질량이 무첨가구와 비슷하거나 다소 낮게 나타났는데 비하여 균체생장에 영향이 없거나 다소 저해적이었던 상백피(MAL)와 마(DJT) 첨가구의 단백질 함량은 무첨가구에 비하여 각각 31%와 9% 정도 높게 나타났다. 한편, 율피(RVS) 첨가구의 단백질량은 47.2 mg으로 다른 시험구에 비하여 유의적으로 낮아 뽕나무버섯 균사체의 단백질함성 대사과정에 좋지 않은 영향을 미치는 것으로 추정된다. Kim *et al.*(1986)은 홍삼박의 첨가가 영지버섯과 느타리버섯 균사체 단백질량에 영향을 미치지 않는다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사하였다.

$\beta$ -glucosidase, cellulase, amylase,  $\beta$ -glucanase 등은 미생물이 에너지를 획득하기 위한 중요한 수단으로 그 활성의 변화를 살펴본 결과, 모든 시험구에서 amylase의 활성이 다른 효소에 비하여 가장 높은 비중을 차지하고 있었다. 이는 맥아를 당화시켜 배양기질로 활용했기 때문에 starch 또는 그 분해산물이 배양액 중에 풍부하여 이들을 이용하기 위한 amylase의 활성이 높았던 것으로 생각된다.

**Table 2.** Protein contents and enzyme activities in the mycelial extracts of *A. mellea* grown on malt extract media supplemented with different plant extracts

Plant extracts	Mycelium extract					50~70% EtOH eluate	
	Protein contents (mg)	Enzyme activity (unit/each ml)					Protein contents (mg)
		$\beta$ -glucosidase	Celluase	Amylase	$\beta$ -glucanase	Protease	
Control	314.6	n.d.	3.27	3.53	1.60	0.28	48.0
MAL	412.6	1.62	1.40	3.21	0.98	0.56	70.1
DJT	342.7	0.92	1.45	3.72	0.74	0.52	35.7
RVS	47.2	0.56	0.71	2.34	0.48	0.32	49.8
ASH-S	293.2	0.99	1.33	3.15	1.09	0.28	51.0
UDVN	245.2	n.d.	1.01	2.75	1.13	0.37	35.6
RGR	276.5	1.22	2.51	3.55	1.08	0.51	32.4
ASH-R	329.0	0.52	1.21	2.94	0.65	0.39	52.1

n.d. means no detected.

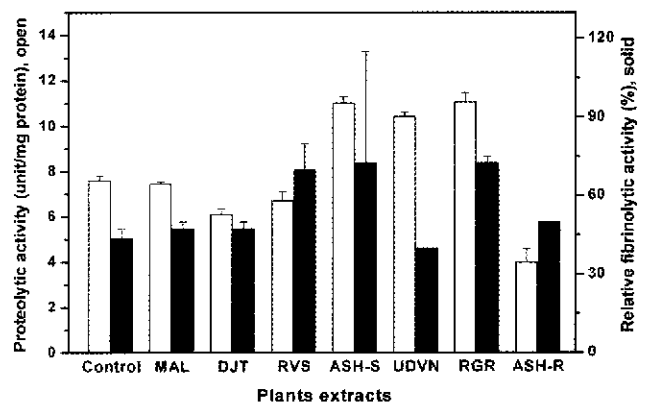
Each plant extract was added by 5% (v/v) to the fungal growth medium before inoculation.

다. Cellulase는 홍삼박 첨가구를 제외한 모든 첨가구에서 무첨가구에 비하여 유의적으로 낮은 활성을 보여준데 반해  $\beta$ -glucosidase의 활성은 모든 첨가구에서 무첨가구에 비하여 높게 나타났다. 이는 각종 추출물의 첨가에 의해 긴 chain의 에너지원보다는 짧은 chain의 에너지원을 더욱 선호하는 것으로 추정되며 식물체 추출시 열에 의한 polymer물질들의 분해에 의해 저분자 물질들이 배지 내에 상대적으로 많기 때문인 것으로 판단된다. 균사체 추출물의 단백질분해 활성은 균체성장이 양호하면서 균체단백질 함량이 높았던 상백피, 마, 홍삼박 첨가구가 무첨가구 보다 약 2배 이상 높게 나타났는데 이는 왕성한 대사활동에 의한 것으로 추정된다. 또한, 50~70% 에탄올 침전법으로 획득한 조효소액의 단백질 함량은 균사체 추출물의 단백질 함량에 비례하여 증가하였으나 단백질 함량이 유의적으로 낮았던 율피 첨가구가 에탄올 침전에 의해 큰 폭으로 상승된 반면 참마추출물 첨가구에서는 낮아진 것으로 미루어 각종 천연물 추출물에 의해서 단백질의 합성뿐만 아니라 단백질 분자량분포 경향에도 큰 영향을 미치는 것으로 추정된다.

**혈전분해 활성에 미치는 영향**

50~70% 에탄올 침전법으로 획득한 조효소액을 이용하여 뽕나무버섯 균사체 배양 중 각종 식물유래 추출물에 의한 단백질분해 활성 및 혈전분해 활성을 살펴본 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 가시오가피 가지(ASH-S), 유근피(UDVN) 및 홍삼박(RGR)첨가구의 단백질분해활성(Fig. 2)은 각각 11.0, 10.4, 11.1 unit/100  $\mu$ g protein으로 무첨가구의 7.6 unit/100  $\mu$ g protein 비하여 36.8~46.1% 정도 specific activity가 증가되었던 반면 조효소액중 단백질 함량이 가장 높았던 가시오가피 뿌리(ASH-R)추출물의 첨가구의 단백질 분해활성은 무첨가구에 비하여 47% 정도 감소되는 것으로 드러났다.

혈전분해 활성은 대부분의 시험구에서 단백질분해활성



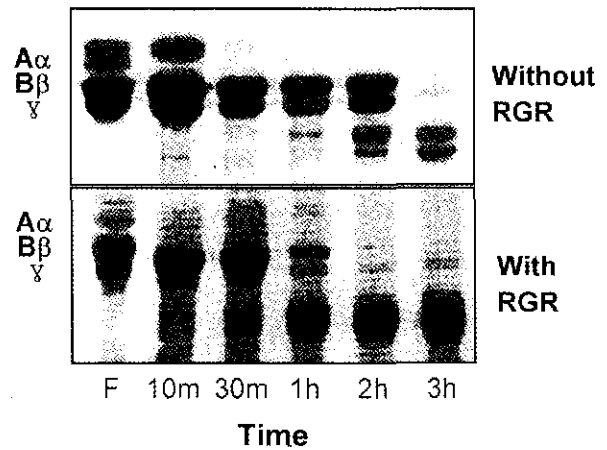
**Fig. 2.** Proteolytic and fibrinolytic activity in the mycelial extracts of *A. mellea* grown on malt extract media supplemented with different plant extracts. For the enzyme assays, enzyme extracts obtained through EtOH (final conc. 50~70%) precipitation from each mycelial extracts were used. Fibrinolytic activity was assayed by fibrin agarose plate at 37°C for 24 hours and 200  $\mu$ g of protein/10  $\mu$ l was employed for the assay.

과 비례적인 경향을 보여줬으나 율피(RVS)첨가구의 혈전 분해활성은 단백질 분해활성보다 높게 나타났으며, 유근 피첨가구의 활성은 단백질분해활성에 비하여 유의적으로 낮았다. 한편, 무첨가구의 혈전분해활성은 0.44 plasmin unit/200  $\mu$ g protein이었으며 율피, 가시오가피 가지, 홍삼 박첨가구의 활성은 각각 0.70, 0.71, 0.73 plasmin unit/200  $\mu$ g protein으로 무첨가구에 비하여 59~65% 높게 나타났다. 이 등(1997)은 인삼의 ginsenoside Rg<sub>3</sub> 성분의 혈소판응집 억제효과에 대하여 Matsuda *et al.*(1989)은 chikusetsusaponin성분의 혈전분해효과에 대해 보고하였는데 Kim *et al.*(1986)은 홍삼박의 물추출물에도 saponin 이 검출 가능한 농도로 존재한다고 하였다. 따라서 이러한 성분들이 균체내부에 흡수되었거나 식물체 추출물에

의한 대사과정의 변화로 혈전분해 활성을 증가시켰을 것으로 추정한다. 또한, 김·김(1998)은 *A. mellea* 자실체의 혈전분해 활성은 ammonium sulfate(30~80%) 분획에서는 0.41 plasmin unit/mg protein, FPLC를 이용하여 정제하였을 경우 17 plasmin unit/mg protein의 활성을 나타낸다고 보고하였다. 따라서 동일 단백질량으로 비교하여 보았을 때 본 연구의 EtOH 분획물의 활성이 상기 보고된 ammonium sulfate분획물의 효소활성보다 5배 정도 높았으며 홍삼박의 첨가는 균사체 생산 및 혈전분해효소활성 증가에 긍정적요소가 될 것으로 기대한다.

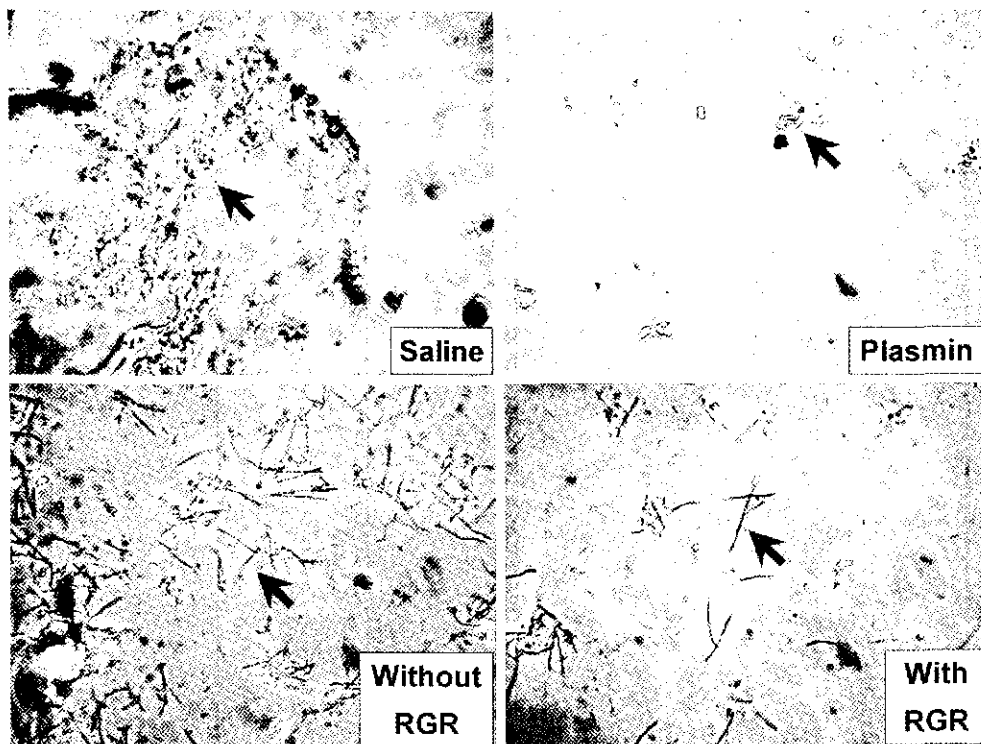
**조효소액의 fibrinogen 및 fibrin의 분해특성**

뽕나무버섯 균사체로부터 추출한 혈전분해 효소의 시간 경과별 fibrinogen분해 양상은 Fig. 3에 광학적 방법을 이용한 fibrin 응집유무의 관찰은 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 3에서 무첨가구의 경우 반응 10분 후부터 fibrinogen이 분해되기 시작하여 반응 30분 경과시 A $\alpha$ -chain이 완전히 분해되었고 30분 후 부터는 B $\beta$  및  $\gamma$ -chain이 분해되기 시작하여 3시간 후 이들은 완전 분해되었다. 이에 비해서 홍삼박 첨가구는 반응 10분 경과시 이미 A $\alpha$ -chain이 분해되었으며 2시간 후 모든 단위체가 분해되어 무첨가구보다 높은 분해활성을 나타내었다. 또한, A $\alpha$ -chain에 대한 높은 분해특성을 가지고 있었으며 fibrinogen subunit의 분자량 순으로 분해하는 것으로 나타났다.



**Fig. 3.** Time course degradation of fibrinogen by fibrinolytic enzyme present in the mycelial extracts of *A. mellea* grown on malt extract media with and without RGR supplement. The enzymes (10  $\mu$ g/10  $\mu$ l) were loaded to 10  $\mu$ l of fibrinogen and incubated at 37°C. Lane F was treated with autoclaved saline instead of the fungal enzyme extracts. Fibrinogen degradation products were separated on a 12% SDS-PAGE gel.

Fig. 4는 fibrinogen 용액과 thrombin을 반응시켜 생성된 fibrin에 12시간 동안 조효소용액을 반응시킨 결과로 saline을 처리한 음성 대조군에는 Blinc *et al.*(2000)이 보고한 fibrin의 현미경 사진과 동일하게 그물모양의 섬유소



**Fig. 4.** Microscopic observation of the hydrolysis of fibrin by the mycelial enzyme extract of *A. mellea* ( $\times 400$ ). Saline (20  $\mu$ l), plasmin 1 unit solution (20  $\mu$ l) or crude enzyme extracts of *A. mellea* (10  $\mu$ g/20  $\mu$ l) grown on malt extract media with and without RGR supplement was applied to fibrin and incubated at 37°C for 12 hours. The arrow indicates fibrin fragment.

가 존재함이 확인되었으며, plasmin을 처리한 시료는 fibrin이 대부분 용해되었으나 분해되지 못한 섬유소의 일부가 남아있었다. 또한, 각 뽕나무버섯 균사체의 조효소를 처리한 실험구에서도 plasmin에 비하여 활성이 다소 약하기는 하나 fibrin의 용해가 관찰되었으며 섬유소의 분해는 혈전분해효소의 활성에 따라 차이가 있는 것으로 확인되었다.

Fibrinogen은 thrombin에 의하여 fibrin으로 전환되어지며, 혈전에 의해 유발된 질병의 치료 및 예방은 직접 fibrin을 가수분해 시키거나 fibrin의 전구체인 fibrinogen 및 cofactor인 thrombin의 불활성화 또는 체내 plasmin의 활성화에 의해서 달성될 수 있다. 뽕나무버섯 균사체는 대량생산이 가능하고 회수기간이 짧을 뿐만 아니라 식용으로 직접 섭취가 가능하다는 장점이 있으며 균사체의 조효소는 혈전의 전구체인 fibrinogen뿐만 아니라 fibrin을 직접가수분해 시키는 것으로 나타나 혈전증 예방을 위한 기능성 식품소재로 충분히 가능성이 있다고 판단된다.

## 적 요

뽕나무버섯 균사체의 생산 및 혈전분해활성을 증대시키기 고자 배양기질에 7종의 식물체추출물을 첨가하여 증식시킨 결과 가시오가피 뿌리, 유근피, 홍삼박추출물의 첨가가 균사체 증식에 양호하였으나 인삼추출물 첨가에 의해서 유의적으로 증식이 억제되었다. 또한 가시오가피 가지, 유근피, 홍삼박추출물 첨가에 의하여 단백질분해 활성이 무첨가구보다 36.8~46.1% 정도 증가되어졌으며 율피, 가시오가피 가지, 홍삼박 첨가구의 혈전분해 활성은 각각 0.70, 0.71, 0.73 plasmin unit/200  $\mu$ g protein으로 무첨가구의 0.44 plasmin unit/200  $\mu$ g protein에 비하여 59~65% 증가시킬 수 있었다. 뽕나무버섯 균사체의 조효소는 fibrinogen의 A $\alpha$ -chain에 대해 높은 분해특성을 가지고 있었을 뿐만 아니라 무첨가구가 fibrinogen의 모든 단위체를 완전 분해시 까지 3시간이 소요되었던 반면 홍삼박 첨가구는 2시간 후 모든 단위체가 분해되어 대조구보다 높은 활성을 나타내었다. 현미경을 통한 관찰에서 역시 홍삼박 추출물첨가구가 무첨가구보다 높은 분해 활성을 보였다.

## 감사의 글

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

## 참고문헌

김명곤, 최한석, 박효숙, 김성준. 2003. 뽕나무버섯(*Armillaria mellea*) 균사체 생산의 최적화. *한국균학회지* 31: 187-191.

- 김준호. 2000. 할미송이버섯으로부터 혈전용해효소의 정제 및 특성 연구. *한국균학회지* 28: 60-65.
- \_\_\_\_\_, 김양선. 1998. 뽕나무버섯으로부터 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, 최용철, 김해령, 이종길, 이정옥, 정경수, 심미자, 김병각. 1983. 한국산 고등 균류의 성분 연구(제37보); 뽕나무버섯의 항암 성분. *한국균학회지* 11: 151-157.
- 김현중, 고민규, 이창근, 성재모. 1992. 뽕나무버섯의 인공 균사체배. *한국균학회지* 20: 273-276.
- 유중열. 1986. 인삼 Tar의 항균작용에 관한 연구. *경희대약대논문집* 14: 89-92.
- 육창주. 2001. 약용오가피. 도서출판 경원미디어.
- 이소라, 박정일, 최강주, 김낙두. 1997. Ginsenoside Rg<sub>3</sub>의 혈소판 응집 억제효과 및 그 작용기전에 관한연구. *고려인삼학회지* 21: 132-140.
- 이용익. 1998. 내열성  $\alpha$ -glucosidase를 생산하는 호열성 *Bacillus* sp. 균주의 분리 및 특성. *한국생명과학회지* 8: 387-394.
- 이지열, 홍순우. 1985. *한국농식물도감*; 제28권 고등균류편(버섯류). 문교부.
- 정금주. 2001. 식품성분표(제6개정판). 농촌진흥청 농촌생활연구소.
- 최낙식, 서승엽, 김승호. 1999. 혈전용해능을 갖는 버섯류의 탐색. *한국식품과학회지* 31: 553-557.
- 최명자, 김영민, 김은수. 1976. Cellulase 활성에 대한 몇가지 금속이온의 영향. *한국미생물학회지* 14: 75-83.
- 홍재식, 김명곤, 이재홍, 김형무. 1990. 알코올 및 휘발성 유기산류가 뽕나무버섯의 균사속 생산에 미치는 영향. *한국균학회지* 18: 158-163.
- Blinic, A., Magdic J., Musevic, I. and Fric, J. 2000. Atomic force microscopy of fibrin networks and plasma clots during fibrinolysis. *Fibrinolysis Proteolysis* 14: 288-299.
- Cheo, P. C. 1982. Effect of tannic acid on rhizomorph production by *Armillaria mellea*. *Phytopathol.* 72: 676-679.
- Chung, K. H. and Kim, D. S. 1992. Fibrinolytic and coagulation activities of Korean snake venoms. *J. Korean Biochem.* 25: 696-701.
- Fujita, M., Nomura, K., Hong, K., Ito, Y., Asada, A. and Nishimuro, S. 1993. 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.
- Garraway, M. O. 1970. Rhizomorph inhibition and growth in *Armillaria mellea* promoted by o-amino benzoic acid and p-amino benzoic acid. *Phytopathol.* 60: 861-865.
- Healy, V., O'Connell, J., McCarthy, T. V. and Doonan, S. 1999. 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.
- Junhua, H., Dechao, Y., Xianyu, C., Zemin, H. and Xiaozhang, F. 1990. Effect of Mi Huan Jun (*Armillaria mellea*) on central nervous and vascular system. *Fitoterapia* 61: 207-214.
- Kim, G. N., Kil, J. O., Kim, S. H. and Park, I. S. 1996. Factors affecting production of  $\beta$ -1,3-glucanase from *Bacillus* sp. *Food Sci. Biotechnol.* 5: 26-29.
- Kim, J. H. and Kim, Y. S. 1999. A fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Armillaria mellea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 2130-2136.
- Kim, S. D., Do, J. H. and Lee, K. S. 1986. Effect of ginseng resi-

- due on the growth of *Ganoderma lucidum*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 279-283.
- Matsuda, H., Shiimoto, H., Chun-ning, T., Samukawa, K., Kubo, M. and Fukuda, S. 1989. Studies of *Panax japonicus* fibrinolysis. *Planta Med.* **55**: 4.
- 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 fubellus*. *Jap. J. Physiol.* **41**: 461-468.
- Nelson, N. 1944. A spectrophotometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380.
- Ng, T. B. and Wang, H. 2001. Panaxagin, a new protein from Chinese ginseng possesses anti-fungal, anti-viral, translation-inhibiting and ribonuclease activities. *Life Sci.* **68**: 739-749.
- Obuchi, T., Kondoh, H., Watanabe, N., Tamai, M., Omura, S., Yang, J. S. and Liang, X. 1990. Armillaric acid, a new antibiotic produced by *Armillaria mellea*. *Planta Med.* **56**: 198-201.
- Reed, G. L., Lin, L. F., Parham-Seren, B. and Kussie, P. 1995. Identification of plasminogen binding region in streptokinase that is necessary for the creation of streptokinase-plasminogen activator complex. *Biochem.* **34**: 10266-10271.
- Sumi, H., Nakajima, N. and Yatagai, C. 1995. A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack "Shiokara" a Japanese traditional fermented food. *Comp. Biochem. Physiol.* **112B**: 543-547.
- Watababe, N., Obuchi, T., Tamai, M., Araki, H., Omura, S., Yang, J. S., Yu, D., Liang, X. and Huan, J. 1990. A novel N6-substituted adenosine isolated from Mi Huan Jun (*Armillaria mellea*) as a cerebral-protecting compound. *Planta Med.* **56**: 48-52.
- Yang, J. S., Chen, Y. W., Feng, X. Z., Yu, D. Q., He, C. H., Zheng, Q. T., Yang, J. and Liang, X. T. 1989. Isolation and structure elucidation of Armillaricin. *Planta Med.* **55**: 564-565.