

Screening Test of Wild Mushroom Extracts for Fibrinolytic Activity

Jun Ho Kim[†]

Department of Chemistry, Sangji University

To investigate the fibrinolytic activities of the Korean basidiomycetes, the Extracts of 50 wild mushrooms were tested for their fibrinolytic activities. Extract from *Tricholoma sejunctum* showed 175% increased activity to that of plasmin 1.0 U/ml. *Marasmius siccus* showed 54% of activity, and *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* and *Macrolepiota procera*, 43% and 26% activities, respectively to that of plasmin. But, *Cystoderma amianthinum*, *Lepiota* sp., *Coprinus* sp., *Lycoperdon* sp. were less than 10% of plasmin activity.

Key Words: Fibrin plate assay, Fibrinolytic activity, Wild mushroom

서 론

최근 심혈관계 질환에 의한 사망률이 증가하고 있는 실정이다. 심혈관계 질환 중 혈관계 질환은 혈전에 의해 야기되며 이로 인하여 뇌출혈, 뇌혈전증, 심부전증, 심근경색증 등이 유발된다¹⁾. 이와 같은 질병의 예방에는 혈전의 형성을 억제하는 항응고제와 항혈소판제 등을 사용하는 방법이 있다²⁾. 정상 상태에서는 혈액 응고계와 섬유소 용해계가 균형을 이루고 있어 혈전이 형성되지 않지만 어떠한 원인에 의해 혈전이 형성되면 쉽게 용해가 일어나지 않고 혈관을 따라 흐르며 여러 가지 혈관계 질환을 유발하기 때문에 혈전용해제를 사용하여 혈전을 용해시킴으로써 이와 같은 질병을 치료할 수 있다³⁾.

현재, 널리 사용되고 있는 혈전용해제로는 urokinase와 tPA와 streptokinase가 있는데, 이들은 형성된 혈전을 용해하는 플라즈민(plasmin)을 만드는데 관여할 뿐 아니라 혈소판 응집을 강하게 억제하는 작용도 한다. 그러나 이 혈전용해제들은 혈전에 대한 선택성이 적어 장기간 복용 시 용혈현상이라든가 면역반응과 같은 여러 가지 부작용을 나타내고 있어 혈전만을 선택적으로 제거하는 새로운 혈전용해제의 개발이 필요하게 되었다. 근래에 혈전과 섬유소원을 직접 용해하는 효소를 뱀독³⁾과 지렁이^{20,21,23)}로부터 분리 정제하였다는 보고도 있다.

또한 이런 부작용을 최소화하기 위해 혈전용해 물질을 식

용 가능한 자원 중에서 찾고자 하는 연구가 진행되고 있는데 이는 식품은 반복해서 장시간 섭취하기 때문에 유효성분이 미량이라 하더라도 항상 공급됨으로써 큰 영향을 줄 수 있기 때문이다. 이런 식품으로는 발효식품인 청국장⁴⁾, 된장⁵⁾, 젓갈⁹⁾, 나토²⁶⁾ 등이 있는데 이 식품들로부터 혈전용해 물질을 만들어내는 균주들을 분리하고 그들이 생산한 혈전용해 물질의 분리 정제에 관한 보고도 있었다.

본 연구실에서는 새로운 종류의 혈전용해제를 개발하기 위해 많은 종류의 생리활성 물질을 포함하고 있는 버섯으로부터 혈전용해 물질을 찾고자 하였다. 버섯은 식용버섯과 독을 포함하고 있어 식용이 불가능한 독버섯과 질병 치료에 이용할 수 있는 약용버섯으로 나눌 수 있다. 버섯류는 현재 세계적으로 약 15,000여종이 알려져 있으며, 한국에는 약 1,500여종이 알려져 있다. 한국에 자생하는 야생버섯류 중 식용버섯으로 잘 알려진 것은 송이, 능이, 싸리버섯 등 약 25~30종이 있으며 식용이 가능한 버섯은 약 350~400종으로 알려져 있다. 이중 약용으로 사용 가능한 버섯은 블로초(영지)⁷⁾, 구름버섯, 목질진흙버섯(상황)⁷⁾, 동충하초¹⁰⁾, 복령²⁴⁾ 등 100여종으로 알려져 있다. 이 약용버섯들은 면역능을 증진시키는 효과와 더불어 항균²²⁾과 항암⁸⁾ 효과도 큰 것으로 알려져 있다.

식용버섯인 *Flammulina velutipes* (Fr) Sing에 섬유소(fibrin)를 분해하는 단백질 분해효소가 있다는 Gavrilova 등의 보고⁹⁾ 이후 팽이버섯²⁵⁾, 뽕나무버섯^{13,14)}과 할미송이버섯¹¹⁾으로부터 혈전용해 물질의 분리 정제에 관한 보고가 있지만 이외에는 거의 발표되어 있지 않아 버섯으로부터 혈전용해 물질의 개발에 관한 체계적인 연구가 필요하게 되었다. 특히 할미송이버섯과 뽕나무버섯으로부터 분리한 효소는 활성이 크고 혈전에 대한 선택성이 큰 것으로 나타났다. 또한 실험 결과에 따르면 버섯은 장기간 복용 시에도 부작용이 나타나지 않는

*논문 접수: 2002년 9월 5일
수정재접수: 2002년 9월 30일

[†]별책 요청 저자: 김준호, (우) 220-702 강원도 원주시 우산동 660, 상지대학교 이공과대학 화학과
Tel: 033-730-0423, Fax: 033-730-0403
e-mail: jhokim@chiak.sangji.ac.kr

Table 1. The mushroom samples for the screening of fibrinolytic activity

Mushroom		
Agaricaceae (주름버섯과)	<i>Agaricus</i> sp. <i>Cystoderma amianthinum</i> <i>Cystoderma</i> sp. <i>Lepiota</i> sp. <i>Macrolepiota procera</i> <i>Phaeolepiota aurea</i>	참나뽕버섯 갓버섯 턱받이금버섯
Amanitaceae (광대버섯과)	<i>Amanita citrina</i> <i>Amanita vaginata</i> var. <i>fulva</i>	애광대버섯 고동색우산버섯
Boletaceae (그물버섯과)	<i>Boletus pseudocalopus</i> <i>Pulveroboletus ravenelii</i> <i>Suillus grevillei</i>	산속그물버섯야재비 갓그물버섯 큰비단그물버섯
Coprinaceae (먹물버섯과)	<i>Coprinus</i> sp.	
Cortinariaceae (끈적버섯과)	<i>Cortinarius</i> sp. <i>Descolea flavoannulata</i>	노란털돌버섯
Paxillaceae (우단버섯과)	<i>Paxillus corrugatus</i>	
Rhodophyllaceae (외대버섯과)	<i>Rhodophyllus crassipes</i>	외대털버섯
Gonphidiaceae (못버섯과)	<i>Chroogomphus rutilus</i> <i>Gomphidius</i> sp.	못버섯
Hygrophoraceae (벚꽃버섯과)	<i>Hygrophorus russula</i>	다색벚꽃버섯
Russulaceae (무당버섯과)	<i>Lactarius chrysorheus</i> <i>Lactarius hygrophoroides</i> <i>Russula flavidia</i> <i>Russula</i> sp.	노란젓버섯 넓은갓젓버섯 노랑무당버섯

장점과 인공재배를 하거나 균주를 배양할 경우 필요 물질을 대량으로 생산할 수 있는 장점도 갖고 있다¹⁾. 따라서 본 연구실에서는 국내에 자생하는 야생버섯 중 혈전용해효소를 갖고 있으며 활성이 큰 버섯을 찾기 위하여 1차로 치악산에 자생하는 버섯 65종을 채집하여 fibrin 분해활성을 검색 후 발표한 바 있지만²⁾, 더 많은 버섯의 활성을 알아보기 위해 원주 근교에서 또 다른 버섯을 채집하고 혈전용해활성을 조사한 후 그 결과를 발표하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서 사용한 총 50종의 버섯 시료(자실체)는 2001년 8월부터 10월 사이 원주 근교 포복산, 봉화산, 현계산에서 채집하여 분류 동정한 다음 시료로 사용하였다. 시약으로 사용한 fibrinogen, plasmin (P 4895, 3 units), thrombin, bovine serum albumin, agarose, glycine는 Sigma 제품을 사용하였다.

Table 1. Continue

Mushroom		
Tricholomataceae (송이과)	<i>Amanita abruputa</i> <i>Amanita subjunguilla</i> <i>Amanita</i> sp. <i>Clitocybe</i> sp. <i>Clitocybula familia</i> <i>Collybia</i> sp. <i>Laccaria amethystea</i> <i>Laccaria laccata</i> <i>Lyophyllum fumosum</i> <i>Marasmius siccus</i> <i>Oudemansiella radicata</i> <i>Tricholoma inamoenum</i> <i>Tricholoma muscarium</i> <i>Tricholoma psammopus</i> <i>Tricholoma sejunctum</i>	광대버섯 개나리광대버섯 애기무리버섯 자주줄각버섯 줄각버섯 연기색만가닥버섯 애기낙엽버섯 민긴뿌리버섯 향기송이버섯 독송이 족재비송이버섯 쓴송이버섯
Polyporaceae (구멍장이버섯과)	<i>Coriolus consors</i> <i>Coriolus</i> sp. <i>Laetiporus sulphureus</i> var. <i>miniatus</i> <i>Lenzites betulina</i> <i>Tyromyces</i> sp.	송곳니주름버섯 붉은덕다리버섯 조개껍질버섯
Lycoperdaceae (말뚝버섯과)	<i>Lycoperdon pyriforme</i> <i>Lycoperdon</i> sp.	좀말뚝버섯
Ganodermataceae (불로초과)	<i>Ganoderma lucidum</i>	불노초
Ramariaceae (싸리버섯과)	<i>Ramaria obtusissima</i> <i>Ramaria</i> sp.	도가머리싸리버섯
Geoglossaceae (콩나물버섯과)	<i>Spathularia clavata</i>	넓적콩나물버섯

2. 시료 준비

시료 처리 시 모든 작업은 4°C에서 행하였다. 채집한 버섯 5 g를 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.0)에 넣고 homogenizer로 잘게 부순 후 gauze로 걸러내고, 용액을 4°C, 10,000×g에서 60분간 원심분리한 후 농도를 2.2 mg/ml로 맞추고 시료로 사용하였다.

3. 단백질의 농도 측정¹⁸⁾

단백질의 농도는 Lowry법을 이용하여 측정하였고 bovine serum albumin을 사용하여 표준곡선을 그렸다.

4. 혈전용해 물질의 활성도 측정 방법⁶⁾

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

Table 2. Fibrinolytic activities of extracts from mushroom samples

Mushroom		Fibrinolytic activity (%)
Agaricaceae	<i>Cystoderma amianthinum</i>	3
	<i>Lepiota sp.</i>	5
	<i>Macrolepiota procera</i>	26
Coprinaceae	<i>Coprinus sp.</i>	3
Tricholomataceae	<i>Marasmius siccus</i>	54
	<i>Tricholoma sejunctum</i>	175
Polyporaceae	<i>Laetiporus sulphureus var. miniatus</i>	43
Lycoperdaceae	<i>Lycoperdon sp.</i>	7
Plasmin (1.0 units)		100

섞은 후 이를 petri dish에 부어 fibrin막을 만든 다음 시료로 처리된 용액을 20 µl 씩 fibrin plate 위에 점적한 후 37°C에서 8시간 방치하고 fibrin막이 용해되면 용해면적을 측정하여 활성을 비교하였다. 대조구로는 혈전용해효소인 plasmin (1.0 U/ml)을 사용하였으며, 다음과 같은 방법으로 혈전용해활성을 산출하였다.

Fibrin 분해활성 (%) = (시료의 용액면적 / plasmin의 용해면적) × 100

결 과

50종의 버섯추출물에서 혈전용해능을 검색하였고 (Table 1), 결과는 Table 2과 같이 8종에서 활성이 나타났는데, 이 중 주름버섯과의 참낭피버섯 (*Cystoderma amianthinum*)과 *Lepiota sp.* 먹물버섯과의 *Coprinus sp.* *Lycoperdon sp.*는 plasmin (1.0 U/ml)의 3~7%에 해당되는 아주 작은 활성을, 주름버섯과의 갯버섯 (*Macrolepiota procera*)는 plasmin (1.0 U/ml)의 약 26%의 작은 활성을, 구멍장이버섯과의 붉은덕다리버섯 (*Laetiporus sulphureus var. miniatus*)은 43%, 송이과의 애기낙엽버섯 (*Marasmius siccus*)은 54%의 활성을 나타낸 반면, 같은 송이과의 쓴송이버섯은 175%로 매우 큰 활성을 나타냈다 (Fig. 1).

그러나 광대버섯과, 그물버섯과, 끈적버섯과, 우단버섯과, 외대버섯과, 못버섯과, 벚꽃버섯과, 무당버섯과, 불로초과, 싸리버섯과, 콩나물버섯과 버섯은 모두 활성을 나타내지 않았다.

고 찰

본 실험의 결과 사용된 50종의 야생버섯 중 혈전의 주성분인 fibrin을 분해하는 버섯 자실체는 8종이었으며 그 중 송이과의 쓴송이버섯이 가장 큰 활성을 나타냈다. 지금까지 발

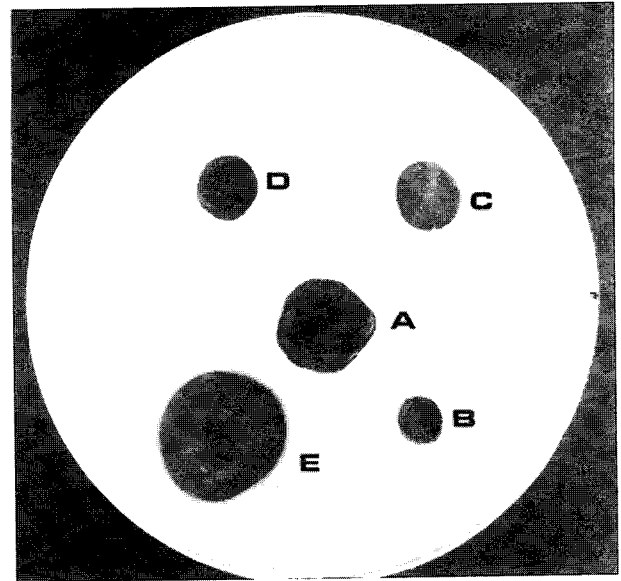


Fig. 1. Fibrinolytic activity of each mushroom extracts and plasmin. A. plasmin (1.0 unit), B. *Macrolepiota procera*, C. *Marasmius siccus*, D. *Laetiporus sulphureus var. miniatus*, E. *Tricholoma sejunctum*.

표된 버섯 중 뽕나무버섯과 할미송이버섯은 야생버섯이었지만, 대부분의 다른 버섯들은 주로 재배된 버섯들이었다²⁹. 이 쓴송이버섯 추출액의 비활성 (0.81 U/mg protein)은 할미송이버섯¹¹⁾ (0.95 U/mg protein) 경우보다는 작은 활성을 나타냈지만 뽕나무버섯^{13,14)} (0.17 U/mg protein)의 경우나 발효식품인 청국장¹⁶⁾, 된장¹⁵⁾, 젓갈⁹⁾, 나토²⁶⁾ 등의 경우보다는 큰 활성을 나타냈다. 이 세 종류의 야생버섯과 재배한 팽이버섯 중 팽이버섯²⁹⁾이 가장 활성이 작았고 할미송이버섯¹¹⁾이 가장 큰 활성을 나타냈다. 그러나 가장 큰 활성을 나타내는 할미송이버섯¹¹⁾은 식용이 가능하지 않고 약간의 독성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 반면 야생버섯인 뽕나무버섯은 식용이 가능할 뿐 아니라 약용으로도 사용되고 있지만 실험의 결과와 같이 쓴송이버섯보다는 활성이 작게 나타났다. 큰 활성을 나타내는 쓴송이버섯은 식용이 가능하며 주로 가을에 활엽수림의 낙엽 사이의 땅 위에 군생하고 균모 지름이 4~10 cm로 표면은 황색 바탕에 암록색부터 흑록색의 방사성 섬유무늬로 덮여 있다. 따라서 이 버섯도 인공재배에 성공하고, 대량 생산이 가능할 경우 식용 뿐 아니라 약용으로도 이용할 수 있을 것이다. 본 연구 결과를 토대로 큰 혈전용해활성을 나타내는 쓴송이버섯의 버섯추출물로부터 혈전용해성분을 분리 정제 후 혈전에 대한 선택성과 생화학적 특성을 연구하고 좀더 많은 임상 실험을 거쳐 새로운 혈전용해제를 개발하면 기존의 혈전용해제들이 갖고 있는 단점인 고가의 제품 대신 저가의 새로운 혈전용해제의 개발이 가능할 것으로 기대된다. 또한 이 효소의 구조를 밝히면 이를 이용한 또 다른 혈전용

해제의 개발에 모델 화합물로 사용할 수도 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 상지대학교 교내 연구비의 지원으로 이루어졌음을 밝히며 감사드립니다. 또한 버섯을 분류 동정해 주신 농촌진흥청 농업과학기술원의 석순자 연구원님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Ahn DK (1992): Medical fungi in Korea. *Kor J Mycol*, **20**: 154-166.
- 2) Chung KH (1991): In Proceeding of the 2nd symposium on the biochemical methodology for the R&D of the bioactive substances. *Biochem Soc*, pp. 53.
- 3) Chung KH and Kim DS (1992): Fibrinolytic and Cogulation Activities of Korean Snake Venoms. *Kor Biochem J*, **25**: 696-701.
- 4) Daka MD and Semba CP (1995): Thrombolytic therapy in venous occlusive disease. *J Vasc Interv Radiol*, **6** (suppl): 73-77.
- 5) GavriloVA VP and Falina NN (1975): (Russ) Proteolytic enzyme isolated from a fungus, *Flammulina velutipes* (Fr) Sing. *Mikol Fitopatol*, **9**: 431-433.
- 6) Haverkate F and Traas DW (1974): Dose-response curves in the fibrin plate assay. Fibrinolytic activity of protease. *Thromb Haemost*, **32**: 356-365.
- 7) Ikekawa J, Nakamishi M, Uehara N, Chihara G and Fukuoka F (1968): Antitumor action of some basidiomycetes especially *Phellinus linteus*. *Gann*, **59**: 155-157.
- 8) Kim BK, Kim JS, Choi EC, Kim HR, Lee KL, Lee CO, Chung KS and Shim MJ (1983): Studies on constituents of the Higher Fungi of Korea (XXXVII). *Kor J Mycol*, **11**: 151-157.
- 9) Kim HK, Kim GT, Kim DK, Choi WA, Park SH, Jeong YK and Kong IS (1997): Purification and Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus* sp. KA38 Originated from Fermented Fish. *J of Fermentation and Bioengineering*, **84**(4): 307-312.
- 10) Kim HW, Kim YH, FU CX, Nam KS, Lee SJ, AN HS, Jeong EH, Yun SH, Sung SK, Lee SJ and Hyun JW (2001): *In vitro* Antitumor activity of Ergosterol Peroxide isolated from *Cordyceps militaris* on cancer cell lines from Korea patients. *Kor J Mycol*, **28**(1): 61-66.
- 11) Kim JH (2000): Purification and characterization of fibrinolytic enzymes from *Tricholoma saponaceum*. *Kor J Mycol*, **28**(1): 60-65.
- 12) Kim JH, Lee HY, Yoo KH, Kim YS, Seok SJ and Kim YS (1998): The Screening of fibrinolytic activities of extracts from Mushrooms in Mt. Chiak. *Kor J Mycol*, **26**: 589-593.
- 13) Kim JH and Kim YS (1998): Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from *Armillariella mellea*. *Kor J Mycol*, **26**(4): 583-588.
- 14) Kim JH and Kim YS (1999): A fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Armillariella mellea*. *Biosci Biotech Biochem*, **63**(12): 2130-2136.
- 15) Kim SH (1998): New trends of studying on potential activities of Doen-Jang. *Korea Soybean Digest*, **15**(1): 8-15.
- 16) Kim YT, Kim WK and Oh HS (1996): Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus* sp. Strain CK 11-4 Screened from *ChungkookJang*. *Appl Environm Microbiolo*, 2482-2488.
- 17) Lee JW, Baek SJ, Bang KW, Kim YS, Kim KS and Chun UH (2001): Immunomodulatory activities by difference in molecular size of the proteoglycan extracted from *Ganoderma lucidum* IY009. *Kor J Mycol*, **29**: 15-21.
- 18) Lowry OH, Rosenbrough NJ and Randall AJ (1951): Protein Measurement with the folin Phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**: 265-275.
- 19) Marks D, Marks A and Smith C (1996): Basic medical biochemistry. Baltimore, William & Wilkins P 107.
- 20) Mihara H, Nakajima N and Sumi H (1993): Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci Biotech Biochem*, **57**(10): 1730.
- 21) 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*. *Jpn J Physiol*, **41**: 461.
- 22) Park SS, Lee KD and Min TJ (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.
- 23) Park YD, Kim JW, Min BG, Seo JW and Jeong JM (1998): Rapid purification and biochemical characteristics of *Lumbrakinase III* from earthworm for use as a fibrinolytic agent. *Biotechnol Lett*, **20**(2): 169-172.
- 24) Rhee SD, Cho SM, Park JS, Han SB, Jeon YJ, Kim HM and Kim GP (1999): Chemical composition and biological activities of immunostimulants purified from alkali extract of *Poria cocos* sclerotium. *Kor J Mycol*, **27**: 293-298.
- 25) Shin HH and Choi HS (1998): Purification and Partial Cha-

racterization of a Metalloprotease in *Flammulina velutipes*. *J Microbiolo*, **36**: 20-25.

26) Sumi H, Hamada H, Tsushima H, Mihara H and Muraki HA

(1987): A noble fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*, **43**: 1110-1111.
