

Screening Test of Wild Mushroom Methanol Extracts for Fibrinolytic and α -Glucosidase Inhibitory Activity

Jun-Ho Kim^{1,†}, Kwan-Hee Yoo² and Soon-Ja Seok³

¹Department of Chemistry, ²Department of Life Science, SangJi University, Wonju 220-702, Korea.

³National Institute Agricultural of Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea

We investigated the fibrinolytic and α -glucosidase inhibitory activity of 55 wild mushroom methanol extracts. Among them, 14 mushrooms showed fibrinolytic activity. In particular, *Amanita virgineoides* showed the greatest enzyme activity (3.9 plasmin units/ml) by a fibrin plate assay. The fibrinolytic activities of *Suillus pictus* and *Polyporellus varius* were 3.8 plasmin units, and the activity of *Gomphus fujisanensis* was 2.8 plasmin units. *Leccinum extremorientale* and *Xerocomus nigromaculatus* had the same activity with 2.3 plasmin units. In a α -glucosidase inhibitory activity test, *Lactarius* sp. showed the greatest inhibitory activity at 97.3%. The α -glucosidase inhibitory activities of *Clitocybe odora*, *Xerocomus nigromaculatus*, *Melanoleuca melaleuca*, *Suillus pictus*, and *Gyroporus castaneus* were 84.3%, 77.9%, 74.6%, 68.7%, and 65.4%, respectively. According to the results, because *Suillus pictus* and *Xerocomus nigromaculatus* have strong fibrinolytic and α -glucosidase inhibitory activities, the two mushrooms will be used as materials for the development of new biofunctional food.

Key Words: α -Glucosidase Inhibitory Activity, Fibrinolytic Activity, Wild mushroom

버섯은 탄수화물과 단백질 함량이 다른 대부분의 식품보다 높은 편이며, 지방 함량은 낮지만 인체에 중요한 불포화지방산 함량은 높은 것으로 알려져 있다. 이와 같은 이유로 버섯은 주로 식용으로 이용되어 왔으나, 여러 종류의 약리활성물질이 알려지면서 항암제, 간염치료제, 면역요법제 등의 제약으로 개발되어 다양하게 이용되고 있어, 이제는 점차적으로 식용의 의미 보다는 약용으로의 의미가 더 커지고 있다. 버섯은 성인병인 암 (Kim et al., 1983) 뿐만 아니라, 뇌졸중, 심장병 같은 혈관계질환, 당뇨, 알츠하이머 같은 질병의 치료에 효과를 나타내므로 (Kubo et al., 1983; Kabir and Kimura, 1989), 버섯의 이 같은 생리활성물질은 성인병 예방과 치료를 위한 기능성 식품이나 음료를 개발하는 데 이용할 수 있게 되었다. 2005년도 통계청 자료에 따르면 한국인의 사망 원인 중 암이 차지하는 비율이 가장 높지만, 사망 원인의 2위와 3위인 뇌혈관질환과 심장질환 뿐 아니라 4위인 당뇨와 9위인 고혈압성 질환도 심혈관계질환으로 포함할 수 있

으므로 심혈관계질환의 비율이 가장 높은 것을 알 수 있다. 혈관 내에 출혈로 인해 생기는 지혈과정 중 과응고로 생성된 혈전은 조직의 재생 후에도 완전한 용해가 일어나지 않고 작은 조각으로 혈관을 따라 흐르며 여러 종류의 혈관계질환을 유발한다. 따라서 심혈관계질환의 치료를 위해서는 주로 혈소판과 섬유소의 응고로 구성되어 있는 혈전을 혈전용해물질을 이용하여 완전히 용해 시킴으로서 치료할 수 있다.

기존의 혈전용해제 중 urokinase를 제외하고는 경구투여가 힘들며, 장기간 사용 시 전신 출혈이나 면역효과가 나타나는 단점이 있었다. 따라서 혈전에 대한 선택성이 크고 활성이 좋으며 경구투여가 가능한 새로운 혈전용해제의 개발이 필요하게 되었다. 최근에는 식품이나 식용 가능한 물질에서 혈전용해물질을 확인하고, 이를 기능성 식품으로 개발하여 혈관계질환의 예방과 치료를 위한 목적으로 이용하기도 한다. 이런 식품은 주로 발효식품들인데 대표적인 것으로는 청국장 (Kim et al., 1995), 된장 (Kim, 1998), 젓갈 (Kim et al., 1997) 등이 알려져 있으며, 많은 종류의 효소를 함유하고 있는 버섯도 혈전용해효소를 함유하고 있는 것으로 확인되었다 (Kim et al., 1998; Kim et al., 2005).

성인병 중 특히 당뇨병은 사망률이 급격하게 증가하며

*는 문 접수: 2007년 7월 19일

수정 접수: 2007년 8월 1일

†교신저자: 김준호, (우) 220-702 강원도 원주시 우산동 660, 상지대학교 이공과대학 화학과

Tel: 033-730-0423, Fax: 033-730-0403

e-mail: jhokim@sangji.ac.kr

우리나라 국민의 10% 정도가 앓고 있는 심혈관계질환으로, 이 당뇨증상이 오래 지속되면 합병증으로 실명, 뇌졸중, 신증, 다리의 괴저와 같은 심각한 질병이 발생되므로 많은 주목을 받고 있는 성인병이다. 당뇨병은 유전적인 요인과 환경적인 요인에 의해 발생하는 것으로 알려져 있지만, 근본적인 치료방법은 알려져 있지 않다. 따라서 많은 약리활성물질이 확인된 버섯에서 당뇨병의 예방과 함께 치료에 효과가 있는 성분이 확인될 경우, 이 버섯은 성인병 예방에 크게 이용될 수 있을 것이다. 당뇨병의 치료방법에는 환자에게 인슐린을 투여하여 치료하는 방법과 (1형 당뇨병), 경구혈당강하제를 복용하여 혈당을 조절하는 방법이 있다 (2형 당뇨병). 경구혈당강하제에는 설폰요소제, 비구아니드, 그리고 α -글루코시다제 저해제를 주로 사용하는데, α -글루코시다제 저해제는 최근에 개발되어 판매되고 있는 경구 혈당강하제 중 하나로, 소장에서 작용하는 α -글루코시다제의 활성을 조절하여 급격한 혈당상승을 억제하는 혈당조절물질로 이를 사용할 경우 소화가 잘 되지 않고 복부팽만, 설사 등 부작용을 유발하기도 한다. 따라서 이런 문제점을 극복할 수 있는 새로운 α -글루코시다제 저해제의 개발이 필요하다.

성인병 중 암과 관련된 버섯의 성분은 많이 알려져 있지만 (Kim et al., 1983), 혈전용해물질이나 당뇨병 치료에 효과적인 물질은 많이 알려져 있지 않다 (Choi et al., 2000; Matsuura et al., 2002). 따라서 버섯으로부터 혈전용해효과와 당뇨병 치료효과가 큰 물질의 존재를 밝힐 필요가 있으며, 이 두 성분을 함께 함유하고 있는 식용 가능한 버섯을 발견할 경우, 이 버섯은 의약품 개발 및 기능성 식품이나 음료의 개발에도 이용할 수 있어, 성인병의 예방과 치료에 크게 도움이 될 수 있을 것이다. 이에 본 저자들은 야생버섯으로부터 혈전용해물질과 혈당강하물질을 확인하기 위하여 야생에 자생하는 버섯 55종의 메탄올 추출물을 이용하여 혈전용해효과와 α -글루코시다제 저해효과를 관찰하고 그 결과를 발표하게 되었다.

사용한 버섯 시료는 2005년 8월과 9월에 오대산에서 채취하여 분류 동정된 균주로, 50% methanol 용액에서 5일간 방치 후, 여과하여 얻어진 추출물을 asperator를 이용하여 감압 농축시키고, 다시 냉동건조 후 냉동 보관하면서 사용하였다. 사용하기 전 증류수와 DMSO (1:1)의 혼합용액에 녹여 (1 mg/10 μ l) 시료로 사용하였다.

혈전용해활성은 Haverkato-Trass (1974)의 fibrin plate 법에 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 μ l을 잘 섞은 후 이를 petri dish에 부어 fibrin 막을 만들었다. 준비한 버섯 추출물 20 μ l씩 fibrin plate 위에 점적하고, 36°C에서 8시간 방치한 후 용해면적을 측정하여 이들의 넓이를 비교하였으며, 대조구로는 plasmin (1.0 unit/ml)을 사용하였고, 추출액의 혈전용해 활성은 대조구의 용해면적에 대한 시료의 용해면적의 상대적인 비율로 환산하여 계산하였다.

α -Glucosidase에 대한 저해활성은 Watanabe (Watanabe et al. 1997)의 실험방법에 따라 p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside를 기질로 이용하여 측정하였다. 즉 100 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 녹아 있는 효모 기원의 α -Glucosidase (0.7 U, Sigma)를 효소로 사용하고, 같은 완충용액에 5 mM 농도로 준비한 p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside를 기질용액으로 사용하였다. 효소용액 50 μ l에 증류수와 DMSO (1:1)에 녹인 버섯 추출물 (1 mg/10 μ l) 10 μ l와 완충용액 890 μ l을 넣고 섞은 후, 5분 동안 실온에서 preincubation 후 준비한 기질용액 50 μ l를 첨가하고, 다시 5분 동안 incubation 후 UV-visible spectrophotometer (UV-1601PC, Shimadzu, Japan) 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하고, 또한 시료를 첨가하지 않고 대신 완충용액을 첨가한 경우의 흡광도 변화도 측정하여 저해율을 계산하였다. 실험은 3번 시행한 후 평균치를 실험값으로 사용하였다.

저해율 (%) = $(1-A/B) \times 100$. A: 시료 첨가구의 흡광도, B: 시료 무첨가구의 흡광도. (단, A, B 모두 대조구의 흡광도를 제외한 수치임)

야생버섯 55종의 50% 메탄올 추출물을 이용하여 혈전용해활성과 α glucosidase 저해활성을 확인하였다. 실험 결과 14종의 버섯에서 혈전용해활성을 확인하였는데 그중, 흰가시광대버섯 (*Amanita virgineoides*)은 3.9 plasmin units으로 가장 큰 활성을 나타냈으며, 붉은비단그물버섯 (*Suillus pictus*)과 노란대겨울우산버섯 (*Polyporellus varius*)은 3.8 plasmin units의 매우 큰 활성을 나타냈고, 녹변나팔버섯 (*Gomphus fujisanensis*)은 2.8 plasmin units, 곁곁이그물버섯 (*Leccinum extremiorientale*)과 검은산그물버섯 (*Xerocomus nigromaculatus*)은 2.3 plasmin units로 큰 활성을 나타냈으며, 귀신그물버섯 (*Strobilomyces strobilaceus*), 밀버섯 (*Collybia confluens*), 갈대기버섯 (*Clitocybe gibba*) 등은 각각 1.7 plasmin units, 1.3 plasmin units, 1.0 plasmin units의 활성을 나타냈다 (Fig. 1 and Table 1). 그물버섯과에 속하는 야생버섯 중에 혈전용해활성이 큰 버섯들을

Table 1. The mushrooms for the screening of fibrinolytic activity and α -glucosidase inhibitory activity

	Mushroom	Fibrinolytic activity (plasmin unit)	α -Glucosidase inhibitory activity (%)	
Agaricaceae	<i>Agaricus subrutilescens</i>	n.d	-8.3	
	<i>Agaricus</i> sp.	n.d	-8.7	
	<i>Cystoderma amianthinum</i>	n.d	32.8	
Amanitaceae	<i>Amanita fulva</i>	n.d	18.7	
	<i>Amanita hemibaph</i> ssp.	n.d	21.5	
	<i>Amanita vaginata</i>	n.d	22.0	
	<i>Amanita virgineoides</i>	3.9	10.7	
Boletaceae	<i>Boletus laetissimus</i>	n.d	20.3	
	<i>Boletus obscurecoccineus</i>	n.d	37.8	
	<i>Boletus pulveruntus</i>	n.d	8.5	
	<i>Boletus</i> sp.	n.d	8.1	
	<i>Gyroporus castaneus</i>	n.d	65.4	
	<i>Leccinum extremiorientale</i>	2.3	34.5	
	<i>Strobilomyces strobilaceus</i>	1.7	9.2	
	<i>Suillus granulatus</i>	n.d	48.0	
	<i>Suillus pictus</i>	3.8	68.7	
	<i>Tylopilus neofelleus</i>	n.d	47.8	
	<i>Xanthoconium affine</i>	0.6	34.9	
	<i>Xerocomus chrysenteron</i>	n.d	31.4	
	<i>Xerocomus nigromaculatus</i>	2.3	77.9	
	<i>Xerocomus</i> sp.	0.9	6.6	
	Cortinariaceae	<i>Cortinarius</i> sp.	n.d	32.0
	Russulaceae	<i>Lactarius camphoratus</i>	n.d	-10.3
<i>Lactarius chrysorhrus</i>		n.d	28.9	
<i>Lactarius gerardii</i>		n.d	21.1	
<i>Lactarius hatsudake</i>		n.d	6.5	
<i>Lactarius subvellereus</i>		n.d	4.7	
<i>Lactarius uvidus</i>		n.d	-10.5	
<i>Lactarius volemus</i>		n.d	21.7	
<i>Lactarius</i> sp.		n.d	97.3	
<i>Russula virescens</i>		0.6	7.6	
Strophariaceae	<i>Pholiota lenta</i>	n.d	-29.5	
	<i>Pholiota</i> sp.	n.d	50.9	
	<i>Stropharia aeruginascens</i>	n.d	-1.6	
Tricholomataceae	<i>Clitocybe fragrans</i>	n.d	10.3	
	<i>Clitocybe gibba</i>	1.0	20.7	
	<i>Clitocybe hydrogramma</i>	n.d	-7.9	
	<i>Clitocybe odora</i>	n.d	84.3	
	<i>Clitocybe</i> sp.	n.d	38.7	
	<i>Collybia butyracea</i>	n.d	-19.9	
	<i>Collybia confluens</i>	1.3	2.4	
	<i>Collybia dryophila</i>	n.d	-22.4	
	<i>Collybia peronate</i>	n.d	-42.6	
	<i>Laccaria vinaceoavellanea</i>	n.d	29.3	
	<i>Marasmiellus ramealis</i>	0.3	-0.6	
	<i>Marasmius</i> sp.	n.d	-2.9	
	<i>Melanoleuca melaleuca</i>	n.d	74.6	
	<i>Mycena pura</i>	n.d	-23.1	

Table 1. The mushrooms for the screening of fibrinolytic activity and α -glucosidase inhibitory activity

	Mushroom	Fibrinolytic activity (plasmin unit)	α -Glucosidase inhibitory activity (%)
Polyporaceae	<i>Polyporellus varius</i>	3.8	20.0
Gomphaceae	<i>Gomphus fujiisanensis</i>	2.8	12.8
Lycoperdaceae	<i>Bovista</i> sp.	n.d	20.5
	<i>Lycoperdon perlatum</i>	n.d	0.5
Ganodermataceae	<i>Ganoderma lucidum</i>	n.d	29.4
Ramariaceae	<i>Ramaria gracilis</i>	0.3	2.1
	<i>Ramaria</i> sp.	n.d	9.2

n.d: not detected

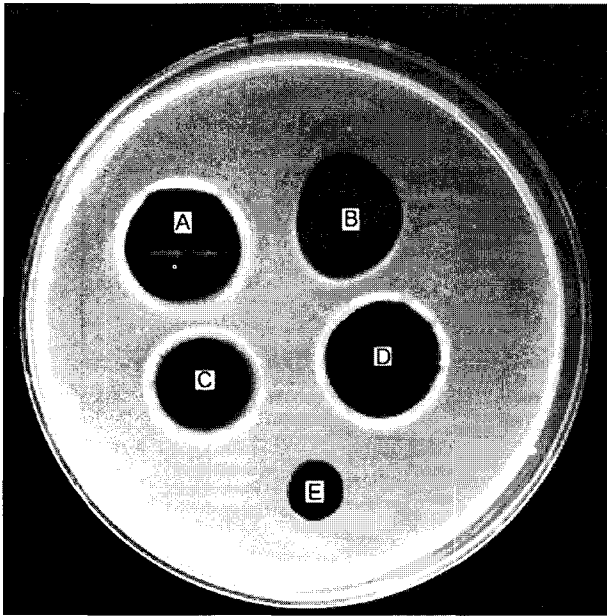


Fig. 1. Fibrinolytic activity of each mushroom extracts and plasmin. A, *Polyporellus varius*; B, *Suillus pictus*; C, *Gomphus fujiisanensis*; D, *Amanita virgineoides*; E, plasmin (1.0 units/ml).

많이 볼 수 있었으나 주름버섯과, 말불버섯과, 불로초과 버섯에서는 활성을 확인하지 못했다. 또 다른 보고에 의하면 때죽도장버섯, 옷솔버섯, 구름버섯, 모래밭버섯, 장식술버섯 등의 메탄올 추출물의 혈전용해활성도 큰 것으로 알려져 있다 (Choi et al., 1999). 그러나 지금까지 버섯의 혈전용해활성은 주로 효소의 형태로 확인된 경우가 대부분이었기 때문에 메탄올 추출물의 경우와는 직접적인 비교가 힘들다. 버섯의 메탄올 추출물에서 생리 활성을 나타내는 물질들은 주로 효소가 아니라 단백질 다당체로 알려져 있다. 메탄올 추출물은 제약으로 사용할 경우 효소에 비해 경구투여가 가능한 혈전용해제로 사용할 수 있으므로 큰 장점을 갖고 있다.

버섯 시료들의 α -glucosidase 저해효과를 확인한 결과, 56개의 버섯 중 50% 이상의 α -glucosidase 저해효과를 나

타낸 버섯은 7종으로 확인되었으며, *Lactarius* sp.가 97%의 가장 높은 저해율을 나타냈으며, 하늘색갈대기버섯 (*Clitocybe odora*)은 84.3%, 검은산그물버섯 (*Xerocomus nigromaculatus*)은 77.9%, 잔디배꼽버섯 (*Melanoleuca melaleuca*)은 74.6%, 붉은비단그물버섯 (*Suillus pictus*)은 68.7%, 흰둘레그물버섯 (*Gyroporus castaneus*)은 65.4%, *Pholiota* sp.는 50.9%의 높은 저해율을 각각 나타냈다. 이보다는 작지만 높은 저해율을 나타내는 버섯으로는 젓비단그물버섯 (*Suillus granulatus*)과 제주쓴맛그물버섯 (*Tyloporus neofelleus*)이 48%와 47.8%의 저해율을 나타냈으며, 참낭피버섯 (*Cystoderma amianthinum*) 등 7종이 30%대의 저해율을 나타냈고, 달걀버섯 (*Amanita hemibapha* ssp. *hemibapha*) 등 11종이 20%대의 저해율을 나타냈다. 50% 이상의 높은 저해율을 나타내는 버섯 중 3종이 그물버섯과의 버섯이었으며 2종도 48%로 50%에 가까웠다. 대체로 그물버섯과 버섯들의 저해율이 높은 것으로 나타났다. 버섯 중에는 오히려 α -glucosidase의 활성을 증가시켜 주는 버섯들도 있는데 그중에서도 가랑잎애기버섯 (*Collybia peronate*)이 가장 크게 α -glucosidase 활성을 증가시켜 주었다. 높은 저해율을 나타내는 하늘색갈대기버섯 (*Clitocybe odora*)은 식용이 가능하며 효소 추출액의 혈전용해효과도 크게 나타났다 (미발표 논문). 잎새버섯에서 분리한 α -glucosidase 저해물질은 D-(+)-trehalose로서 2×10^{-3} M의 농도에서 45%의 활성을 나타냈으며 (Matsuura, 2002), 석이에서 확인된 저해물질은 아미노당으로 추정되었다 (Choi et al., 2000).

그물버섯과의 붉은비단그물버섯과 검은산그물버섯은 혈전용해활성과 함께 α -glucosidase 저해활성도 큰 것으로 나타났다. 두 종류의 버섯 중 붉은비단그물버섯은 α -glucosidase 저해활성과 혈전용해활성이 크므로 더 효용 가치가 있을 것으로 판단된다. 붉은비단그물버섯은 식용 가능한 버섯으로 가을에 잣나무 밑의 땅위에 단생 또는 군생하는 것으로 지름이 5~10 cm로 둥근 형태를 띠고

있으며, 한국, 일본, 중국, 북미에 주로 자생하는 것으로 알려져 있다. 검은산그물버섯도 식용 가능 버섯으로 여름에서 가을까지 활엽수 또는 침엽수림 내에 군생하며 지름이 2~7 cm로 자라며 주로 한국과 일본에 자생하는 것으로 알려져 있다. 이 두 종류의 버섯으로부터 혈전용해물질과 α -glucosidase 저해물질을 분리 정제하고, 더 많은 임상 실험을 통해 기존의 제약보다 더 많은 장점을 갖고 있다면, 새로운 혈관계 치료제와 당뇨병 치료제를 개발하는데 이용할 수 있을 것이며, 또한 성인병 관련 기능성 식품이나 음료를 개발하는데도 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2006년도 상지대학교 교내 연구비의 지원으로 이루어진 것에 감사드립니다.

REFERENCES

- Choi HJ, Kim NJ, Kim DH. Inhibitory effect of GE974 isolated from *Gyrophora esculenta* on α -glucosidase. *Kor J Pharmacogn.* 2000. 31: 196-202.
- Choi NS, Seo SY, Kim SH. Screening of mushrooms having fibrinolytic activity. *Kor J Sci Technol.* 1999. 31: 553-557.
- Haverkate F, Traas DW. Dose-response curves in the fibrin plate assay. fibrinolytic activity of protease. *Thromb Haemost.* 1974. 32: 356-365.
- Kabir Y, Kimura S. Dietary mushrooms reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR). *J Nutr Sci Vitaminol.* 1989. 35: 91-94.
- Kim BK, Kim JS, Choi EC, Kim HR, Lee KL, Lee CO, Chung KS, Shim MJ. Studies on constituents of the higher fungi of Korea (XXVII). *Kor J Mycol.* 1983. 11: 151-157.
- Kim HK, Kim GT, Kim DK, Choi WA, Park SH, Jeong YK, Kong IS. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus sp.* KA38 originated from fermented fish. *J Ferment Bioeng.* 1997. 84: 307-312.
- Kim JH, Lee HY, Yoo KH, Kim YS, Seok SJ, Kim YS. The screening of fibrinolytic activities of extracts from mushrooms in Mt. Chiak. *Kor J Mycol.* 1998. 26: 589-593.
- Kim JH, Yoo KH, Seok SJ, Kim YS. Screening of fibrinolytic activities of extracts from wild mushrooms collected in Mt. Chilgap of Korea. *Kor J Mycol.* 2005. 33: 18-21.
- Kim SH. New trends of studying on potential activities of Doen-Jang. *Kor Soybean Digest* 1998. 15: 8-15.
- Kim YT, Kim WK, Oh HS. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from ChungKook-jang. *Kor J Microbiol Biotechnol.* 1995. 23: 1-5.
- Kubo M, Tatsuda H, Nogami M, Arichi S, Takahashi T. Studies on the *Ganoderma lucidum* (IV), effects on the disseminated intravascular coagulation. *Yakugaku Zasshi* 1983. 103: 871-877.
- Matsuura H, Asakawa C, Kurimoto M, Mizutani J. α -Glucosidase inhibitors from the seeds of Balsam Pear (*Momordica charantia*) and the fruit bodies of *Grifola frondosa*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002. 66: 1576-1578.
- Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H, Niki R. Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from Tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). *Biosci Biotechnol Biochem.* 1997. 61: 177-178.