

최 중
연구보고서

버섯에서 혈전분해효소 생산 및 유전자
크로닝

Characterization and Molecular cloning of a
novel fibrinolytic enzyme from medicinal
mushroom

연구기관
조선대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “**버섯에서 혈전분해효소 생산 및 유전자 크로닝**”과제 (세부과제 “**기능성 유망버섯류 선발 및 자실체 및 균사체 인공대량생산**”)의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 8월 19일

주관연구기관명 : 조선대학교

총괄연구책임자 : 김 성 준

세부연구책임자 : 김 성 준

연 구 원 : 송 규 영

연 구 원 : 김 재 성

연 구 원 : 문 성 민

연 구 원 : 박 영 란

연 구 원 : 천 영 일

연 구 원 : 리 미 흥

연 구 원 : 김 지 은

연 구 원 : 정 경 식

협동연구기관명 : 국립익산대학

협동연구책임자 : 김 명 곤

연 구 원 : 윤 숙

연 구 원 : 최 한 석

연 구 원 : 박 효 숙

요 약 문

I. 제 목

버섯에서 혈전분해효소 생산 및 유전자 크로닝

II. 연구 개발의 목적 및 중요성

혈전분해효소는 생체내의 혈관계가 손상을 받게 되면 혈액은 응고현상을 일으켜 지혈되며, 여기서 생성된 혈전은 자연히 분해된다. 이와 같이 혈액중의 응고-분해계는 효소의 작용에 의해 균형을 이루고 있는데 이 균형이 깨어져 혈전의 분해 기능이 저하되면 이로 인해 여러 가지 증상이 유발된다. 최근 식생활의 변화와 함께 혈관장애에 의한 사망자 수가 급증하고 있기 때문에 혈관장애의 주된 요인인 혈전의 치료는 대단히 중요한 과제이다. 또한 세계 항혈전제 시장은 '99년 67억 달러로 추산되며 연평균 약 5%의 성장률로 2005년경 약 93억 달러의 시장을 형성할 것으로 전망되고 있다. 지난 4년 동안 혈전 예방 및 치료제 시장에 상당한 진보가 이뤄졌으며, 특히 저분자 헤파린 개발로 도입된 주사형 항응고제 시장은 기존 표준 치료제인 헤파린을 대체해가고 있다. 뇌졸중 분야의 경우 약효가 뚜렷한 치료제가 개발되지 않아 새로운 혈전 분해제 및 항응고제 개발 수요를 일으키고 있으며 정부의 deep vein thrombosis 예방을 위한 노력이 강화됨에 따라 전체적으로 항혈전제 시장의 동인이 되고 있다. 전체적으로 성장의 동인을 분석하면, 업계의 연구개발 강화, 고령 인구 증가 및 정부의 예방 의학 정책 등이 맞물려 항혈전제 시장은 지속적이고 높은 성장률을 보일 것으로 분석되고 있다. 현재 임상에서 사용되어지고 있는 혈전분해효소제로는 Plasmin, urokinase, streptokinase, hirudin, tPA 등이 개발되어져있으나 발열, 알러지, 국소출혈, 혈전에 대한 비선택성, 고가의 의약품인 점을 감안할 때 생산단가가 저렴하고 분작용을 최소화할 수 있는 새로운 혈전분해효소제의 개발이 요구되어지고 있다.

이를 위하여 본 연구에서는 부작용의 최소화가 가능하며, 저렴한 혈전분해효소제

의 개발을 위하여 예로부터 약용으로 사용되어진 버섯으로부터 혈전분해효소를 정제하고 이를 대량생산하기 위한 유전자 크로닝을 수행하였다.

버섯은 식용, 약용, 건강음료, 기호식품, 화장품, 기타 산업용 등으로 이용되고 있는데 현재 지구상에는 약 15,000종의 버섯이 분류·동정되었는데 그 중 약 50%가 식용 가능한 것으로 알려져 있다. 식생활이 고급화되면서 버섯은 저열량 식품으로서 특유의 향과 맛 그리고 치감이 좋은 식품으로 인기가 높으며, 또한 버섯은 기능적 특성으로서 생체조절, 생체내의 균형유지, 생체리듬의 조절, 질병회복 그리고 암, 뇌졸중, 심장병 등의 성인병에 대한 예방효과와 탈 콜레스테롤, 고지혈장 개선 항 혈전 효과, 혈압강하, 혈당강하, 그리고 노인성 치매증 개선 등에 이르기까지 여러 가지 유효한 기능들이 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서 우수 균주로 선발된 뽕나무버섯은 천마와 함께 예로부터 중국 및 한국에서 진귀한 한약제로 사용되어 왔으며, 노인병 (geriatric patients), 중풍 (palsy), 현기증 (dizziness), 두통 (headache), 신경쇠약 (neurasthenia), 불면증 (insomnia), 사지마비 (numbness in limbs), 소아마비 (infantile convulsion) 간질 (epilepsy) 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

뽕나무 버섯 균사체는 생산 면에서 지금까지 알려져 있는 어떠한 미생물체 보다 높은 균사체 (생체량) 생산 가능성이 확인된 바 있어 이의 영양적 혹은 생리활성적 효능에 착안한다면 식품이나 의약품으로 높은 잠재력을 가지고 있다고 판단된다. 또한 뽕나무 버섯에는 천마에서 나타나는 약리적 활성이 있다는 보고도 있어 3~4년이 소요되는 천마를 대신할 수 있을 뿐만 아니라 배지 조성의 변형에 따라 다양한 기능성 향상을 도모할 수 있으며, 높은 균사체 생산 잠재력을 이용한다면 산업화 가능성이 충분히 있다고 판단되어 안정성이 검증된 천연물 함유 배지로부터 균사체 대량생산의 최적조건을 확립하고 그 기능성을 검토하였다.

따라서 본 연구에서는 혈전분해활성이 우수한 버섯 자원을 발굴하므로서 식·의약용으로 활용 가치를 높이고자 수집 버섯균류의 균사체 및 자실체들을 대상으로 이들 버섯 자원들의 혈전용해활성을 기준으로 우수자원을 발굴함으로서 한국산 버섯을 고부가가치의 새로운 농가 소득원으로 정착시키고자 한다.

Ⅲ. 연구 개발 내용 및 범위

가. 혈전 분해능 우수균 선발

혈전분해 활성이 우수한 버섯 자원을 발굴하므로서 식·의약용으로 활용 가치를 높이고자 14종의 버섯균 균사체와 7종의 인공재배된 자실체를 대상으로 이들 버섯 자원들이 가지고 있는 혈전용해활성을 fibrin plate assay법으로 비교·분석하였다. 버섯의 종류, 버섯 균사체 배양액, 균사체, 자실체 등 각종 단계에서 혈전용해활성을 검토하여 가장 경제성 있는 버섯 자원을 발굴함으로서 한국산 버섯을 고부가가치의 새로운 농가 소득원으로 정착시키고자 하였다.

나. 혈전분해효소의 정제 및 유전자 크로닝

균사체의 대량배양 및 약리효과와 혈전분해효과가 우수한 뽕나무버섯으로부터 혈전분해활성을 검증한 후 순수 분리·정제하여 뽕나무버섯 자실체의 혈전분해효소의 특성을 검토하였다. 분석된 혈전분해효소의 특성을 기초로하여 혈전분해효소의 대량생산 및 국내 유전자원으로 보존하기 위하여 뽕나무버섯 균사체 혈전분해효소 유전자를 분리 후 크로닝하였다.

다. 뽕나무버섯균의 영양요구성, 대량생산 및 가공식품개발

새로운 유용 기능성 버섯 발굴하기 위하여 혈전용해활성이 우수한 균으로 선발된 뽕나무버섯균의 대량생산 시스템을 구축을 위한 균사체 생산조건 최적화와 수율 증진을 위한 배양법을 개발하기 위하여 수집균주에 대한 영양요구성과 배양온도, pH, 배양기간 등 균사체 생산조건 최적화로 선발 균주의 대량생산 조건을 구명하였다. 또한 균사체의 영양성분 분석 및 균사체 기능성 향상을 위한 방안을 확립하였으며, 기능성 식품 개발기술에 접목을 위하여 보조제의 종류 및 적정배합비 선정을 통한 가공식품을 개발하였다.

IV. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

가. 혈전 용해능 우수균 선발

혈전용해 활성이 우수한 버섯 자원을 발굴하기 위하여 14종의 버섯균 균사체와 7종의 인공재배된 자실체를 대상으로 이들 버섯 자원들이 가지고 있는 혈전용해활성을 비교한 결과 버섯 배양 배양액 중의 혈전분해활성은 표고, 노루궁뎅이, 차가버섯을 제외한 대부분의 버섯균들은 대조구인 plasmin 보다 높았으며, 유용 균주로는 잔나비겉상, 새송이, 영지, 운지, *T. plustris*, 만가닥 버섯 등이었으며, 배양 균사체의 경우는 표고, 노루궁뎅이, *T. pulustris*, 운지, 상황버섯 균사체 추출물을 제외하고는 대조구인 plasmin 보다 높았으며, 유용균주로는 영지, 장수, 만가닥, 토끼털송편, 뽕나무, 차가, 느타리버섯 등이었고, 뽕나무버섯 균사체의 경우는 홍삼박 5% 첨가구가 무첨가구에 비하여 단백질 mg당 60% 활성 증대 효과를 보였다.

또한 인공배양 버섯균 자실체의 혈전분해활성은 아귀, 느타리, 새송이버섯 등 느타리과 버섯이 높았다. 혈전분해활성을 기준으로 판단하였을 때 많은 종류의 버섯 자실체, 균사체, 배양여액 등이 활용 가능성이 있으나 생산수율 및 이용 효율성 면에서는 뽕나무버섯 균사체를 활용하는 것이 가장 효율적이었다.

나. 뽕나무버섯 균사체로부터 혈전분해효소 분리정제 및 특성분석

뽕나무버섯 균사체를 균질화하여 에탄올 침전법 (Ethanol precipitation), 이온교환수지크로마토그래피 (Ion-exchange chromatography), Gel-filtration 등을 수행하여 혈전분해효소를 분리하여 SDS-PAGE 및 fibrin-zymography로부터 약 22 kDa의 혈전분해효소를 분리·정제하였다. 분리·정제된 혈전분해효소의 혈전분해활성을 fibrin-plate에서 검증한 결과 형성된 투명대는 정제된 혈전분해효소제인 plasmin의 혈전분해활성에 비하여 약 2배 이상의 혈전분해활성을 나타내었으며, 최적활성온도는 30°C, 최적활성 pH는 6.0으로 확인되었다. 또한 분리·정제된 혈전분해효소는 금속속2가 이온인 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 에 의해서 활성이 증가됨을 확인하였으며, chromogenic

substrate를 이용하여 확인한 결과 chymotrypsine 계열의 단백질 분해효소 및 EDTA에 의해 강력한 효소활성억제효과를 나타냄으로써 metalloprotease임을 확인하였다. 인체 투여 시 혈전분해활성을 Rat의 platelet을 이용하여 혈전분해활성을 확인한 결과 분리·정제된 혈전분해효소는 rat의 적혈구에는 영향을 미치지 않고 혈전을 분해함을 확인하였다.

분리정제된 혈전분해효소의 아미노산 서열을 분석한 결과 MFSLSSRFFLYTL의 아미노산 서열을 확인하였고, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 ACCESSION No. AJ238718 *Armillaria mellea* mp gene for metalloendo-peptidase의 아미노산 서열과 유사함을 확인하였다.

따라서 뽕나무버섯 균사체로부터 분리정제된 단백질분해효소는 혈전분해효소임을 확인하였으며, 향후 뽕나무버섯 균사체를 대량배양함으로써 저렴하고 경제적인 혈전분해효소제의 생산이 가능하리라 사료되어진다.

다. 뽕나무버섯균사체의 혈전분해효소 유전자의 크로닝

NCBI에 등록된 뽕나무버섯 혈전분해효소 유전자와 본 연구팀에 의하여 분리정제된 혈전분해효소의 아미노산서열을 기초로하여 뽕나무버섯 균사체로부터 1,056bp의 혈전분해효소유전자를 크로닝하였으며, 한국기초과학연구 광주분원에 염기서열을 분석의뢰한 결과 NCBI에 등록된 뽕나무버섯 혈전분해효소 유전자와 약 98%의 상동성을 확인하였다.

라. 뽕나무버섯균의 영양요구성, 대량생산 및 가공식품개발

새로운 유용 기능성 버섯 발굴하기 위하여 혈전용해활성이 우수한 균으로 선발된 뽕나무버섯균의 대량생산 시스템을 구축하기 위하여 균사체의 영양 요구성, 균사체 생산조건 최적화와 수율 증진을 위한 연구를 수행하였다. 합성배지 상에서 뽕나무버섯균 균사체 생산을 위한 최적 영양조건으로 각종 탄소원 중 glucose가 균사체 생산에 가장 우수한 탄소원이었고 glucose의 최적 농도는 1.5%이었다. 각종 질소원 중

protease peptone이 균사체 생산에 가장 우수한 질소원이었으며, protease peptone의 최적농도는 0.2%이었다. KH_2PO_4 의 최적농도는 0.15%, MgSO_4 의 최적농도는 0.025%이었다. 기타 무기염류 중 균사체 생산에 가장 영향을 많이 주는 것은 CaCl_2 이었으며, CaCl_2 의 최적농도는 5.55%이었다. 또한 균사체 생산에 가장 효과적인 vitamin은 Thiamine · HCl이었으며, 최적농도는 1000 $\mu\text{g}/\ell$ 이었다.

반합성배지와 천연배지를 이용한 뽕나무 버섯균사체 생산의 최적배지 선정을 위하여 7종의 배지(MCM, YEPD, MEB, Weinhold's, PDB, DSM, GMEB)를 대상으로 실험을 수행한 결과 맥아즙 (GMEB)배지가 뽕나무 버섯 균사체 생산에 적합하였다.

맥아즙 배지에서 뽕나무 버섯균사체 생산을 위한 적정조건은 맥아즙 농도 15 Brix $^\circ$ 이었으며 온도, pH, 배양기간의 조건을 반응표면분석법에 의해서 실험한 결과, 통계적으로 온도 25.9 $^\circ\text{C}$, pH 5.72, 배양기간은 15.22일에서 3.40 g/50 ml의 최대 예측치를 나타내었다.

11 Brix $^\circ$ 맥아즙 배지에 1~5% 농도로 각종 천연물 추출액의 첨가 뽕나무 버섯균사체 생산에 미치는 영향을 살펴본 결과 대부분의 천연물 추출액의 첨가는 균사체 생산에 큰 영향을 주지 않았으나 가시오갈피 가지, 율피 처리시 증식이 약간 억제되었다. 특히, 인삼 첨가구에서는 현저한 증식억제를 보였다. 그러나 배양액에 5% 농도의 각종 천연물 추출물 및 무기물을 첨가한 결과 홍삼박 첨가구에서 혈전용해 활성이 0.72 Plasmin unit/mg protein으로 가장 높은 활성을 보였다.

각종 식용 및 약용버섯의 자실체 및 뽕나무 버섯 균사체에 존재하는 총 vitamin D의 함량은 50~103 mg/ 100 g으로 분포되어 있었으며, 뽕나무버섯 균사체에 함유되어 있는 총 Vitamin D도 102 mg/ 100 g으로 표고버섯 외 3종의 버섯 자실체 보다 높았다. 또한 건조량 기준으로 뽕나무버섯 균사체의 일반성분은 조지방 2.3%, 조섬유 11.6%, 조단백 37.6%, 조회분 3.2%, 탄수화물 48.1%로 탄수화물과 조단백질 함량이 높았다. 기능성 음료 제조를 위한 각종 생약제 및 기호성 식품원료의 종류, 적정 배합 농도는 뽕나무버섯 균사체 추출물 84%, 고과당 15.55%, Citric acid 0.16%, Sodium citrate 0.04%, Vitamin C 0.05%, Sodium benzoate 0.05%, 사과향 0.15%이었다.

마. 건의사항

본 연구팀은 국내 자생 및 재배 중인 버섯류로부터 혈전분해활성 및 기능이 우수하고 대량배양이 가능한 뽕나무버섯을 선별하였으며, 이로부터 뽕나무버섯 균사체로부터 우수한 혈전분해효소를 정제하여 특성과 혈전분해효소 유전자를 크로닝하였다. 또한 혈전분해효소를 대량생산하기 위한 뽕나무버섯 균사체의 최적배양조건 및 기능성음료제조에 대한 가능성을 제시하였다.

따라서 향후 뽕나무버섯 균사체를 이용한 기능성 식음료의 개발 및 체내 혈전 형성 억제 및 혈전분해에 대한 기능성 식품의 개발이 필요할 것으로 사료되어지며, 혈전분해효소의 순수 정제 및 이를 더욱 손쉽게 대량생산이 가능하도록 혈전분해효소 유전자를 크로닝함으로써 임상약학적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료되어진다. 또한 국내 버섯 농가에 본 연구에 의해 돌출되어진 다양한 생리활성기능을 가진 뽕나무버섯 균사체 대량배양에 의한 혈전분해효소제의 원료 공급 및 식품가공에 의한 새로운 고부가가치의 농가 소득원으로 자리매김할 수 있도록 이에 대한 기술이전이 필요할 것으로 사료되어진다.

SUMMARY

I. TITLE

Characterization and Molecular Cloning of a novel fibrinolytic enzyme from medicinal mushroom

II. PURPOSE AND SIGNIFICANCE OF THE STUDY

A. Screening of mushroom sources having fibrinolytic activity

Mushrooms have long been considered as valuable medicine. Actually, the early herbalists were more interested in the medicinal properties of mushrooms than their basic value as a source of food.

Such medical benefits of edible fungi remain largely unexploited. As yet no medical effect has provided a drug for established, contemporary scientific therapy. In this respect, we tried to develop highly valuable nutraceuticals or drug candidate, fibrinolytic agents from artificially cultivated mushroom sources.

B. The fibrinolytic enzyme and molecular cloning of the mushroom

Blood clots are formed through the conversion of fibrinogen into fibrin by the proteolytic action of thrombin, and subsequently, insoluble fibrin clots are formed. The fibrin clots are dissolved by the hydrolytic action of plasmin, which is activated from plasminogen by tissue-type plasminogen activator(tPA). Generally, the hydrolysis of fibrin is called fibrinolysis. The fibrin clot formation and the fibrinolysis are well balanced in the biological system. However, when the fibrin is not hydrolyzed due to any disorder,

thrombosis such as myocardial infarction can occur. Intravenous administration of urokinase (UK), streptokinase (SK), and tPA, which are capable of degrading fibrin, has been widely used for this thrombosis therapy.

Unfortunately, these enzymes have a low specificity for fibrin and are also expensive. Recently, investigations have been conducting conducted on the isolation of fibrinolytic enzyme from natural extract, because the thrombolytic therapy meet the demand of the fibrinolytic proteases having high specificity for fibrin and cutting cost.

Therefore, We purified the fibrinolytic enzyme and cloned the gene to the mushroom, *Armillaria mellea* mycelium in this study.

C. Growth optimization of *A. mellea* mycelial production and development of processed foods using its mycelial mass

Armillaria mellea, honey mushroom is well known as a symbiotic fungus with *Gastodia elata* and is reported that fruit body and mycelium are used to treat geriatric patients with palsy, dizziness, headache, neurasthenia, insomnia, numbness in limbs, cerebral protecting and infantile convulsion.

Because cultivation need not be a limitation when active principles can be derived from mycelial cultures, we performed research to functional properties such as fibrinolytic acivity with *A. mellea* mycelium. Also the conditions of large-scale fermentations and development of processed foods using its mycelium were examined.

III. Results and Recommendation

A. Screening of mushroom sources having fibrinolysis activity

Fourteen species of mushroom were cultured in liquid broth and fibrinolytic activity of the culture media were assayed on fibrin plate. The activity of fibrinolytic enzyme were, for the most part, higher than that of plasmin except *Lentinus edodes*, *Hericiium ernaceus* and *Inontus obliqua*. The valuable mycelia's culture broth were *Elfvigina applanata*, *Pleurotus eryngii*, *Ganoderma lucidum*, *Coriolus vecicolor*, *Tyromyces pulustris* and *Lyopyllum ulmarium* in regular sequence.

In cultured mycelia, 14 different species, of fibrinolytic activity assayed same as the culture broth. The activity of mycelia were higher than that of plasmin except *Tyromyces pulustris*, *Coriolus vecicolor* and *Phellinus linteus*. The valuable mycelia were *Ganoderma lucidum*, *Fomitella fraxinea*, *Lyopyllum ulmarium*, *Trametes trogii*, *Armillaria mellea*, *Inontus obliqua* and *Pleurotus ostreatus*. However, in the case of *Armillaria mellea*, the fibrinolytic activity increased by 20% as a result of adding red ginseng waste in culture broth.

The artificially cultivated fruit bodies were extracted and then fibrinolytic activity was assayed. In result, *Pleurotus ferulae*, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* showed high fibrinolytic activity.

Many species of fruit bodies, mycelia and several kinds of culture broths revealed that they were useful sources as a fibrinolytic agent but *Armillaria mellea* was the best source based on yield and efficiency.

Armillaria mellea showed highest yield (6.8g/100 ml) on germinated malt extract broth. That is 2~5 times higher than mainly mycelia production(1.3~3.4g/100 ml). Although its fibrinolytic activity was low, it was selected for fibrinolytic enzyme source, because it has superior mycelial productivity compare with the others sources.

B. Fibrinolytic enzyme purification and gene cloning

Blood clots are formed through the conversion of fibrinogen into fibrin by

the proteolytic action of thrombin, and subsequently, insoluble fibrin clots are formed. The fibrin clots are dissolved by the hydrolytic action of plasmin, which is activated from plasminogen by tissue-type plasminogen activator (tPA). Generally, the hydrolysis of fibrin is called fibrinolysis. The fibrin clot formation and the fibrinolysis are well balanced in the biological system. However, when the fibrin is not hydrolyzed due to any disorder, thrombosis such as myocardial infarction can occur. Intravenous administration of urokinase (UK), streptokinase (SK), and tPA, which are capable of degrading fibrin, has been widely used for this thrombosis therapy.

Unfortunately, these enzymes have a low specificity for fibrin and are also expensive. Recently, an investigation was conducted on the isolation of fibrinolytic enzyme from natural extract, because the fibrinolytic proteases for thrombolytic therapy has been demanded high specificity for fibrin and are low price.

In this study, we are reported that the fibrinolytic proteases were isolated from medicinal mushrooms such as the *Armillaria mellea* mycelium and these gene was cloned.

Purified fibrinolytic protease from *A. mellea* mycelium showed molecular mass of 22 kDa, both, on SDS-PAGE and in fibrin zymography. It has been isolated and purified using a series of chromatographic column such as anion exchange. The protease from *A. mellea* mycelium showed a level of fibrinolytic activity that was about 2.0 fold higher than 1.0 unit of plasmin.

The optimum pH and temperature for the enzyme activity were pH 6.0 and 30°C, respectively. The enzyme activity was relatively stable at pH 5.0~7.0 and temperature below 30°C. The activity of enzyme was activated by Ca²⁺ and Mg²⁺. In addition, the enzyme activity was significantly inhibited by EDTA, indicating that the enzyme is a metalloprotease. The purified enzyme

had fibrinolytic activity, hydrolyzing α , β and γ - γ chains with preference in this order. It also had fibrinogenolytic activity, rapidly hydrolyzing A α , B β , and γ chains with preference in this order.

Consequently we cloned a fibrinolytic enzyme gene, found that it has a near perfect homology (99%) to the fruiting body's fibrinolytic gene of the mushroom.

These results suggest that the purified enzyme can be a strong candidate of a therapeutic agent for the treatment of thrombotic diseases.

C. Biological efficacy of *Armillaria mellea*

Armillaria mellea (*A. mellea*) honey mushroom, is well known as a symbiotic fungus with *Gastrodia elata* and reported that fruit body and mycelium are used to treat geriatric patients with palsy, dizziness, headache, neurasthenia, insomnia, numbness in limbs, cerebral protecting and infantile convulsion. On these backgrounds, we performed the research of biological activity such as antioxidant (superoxide dismutase ; SOD), neurotrophic factor induction and tyrosine-hydroxylase gene induction.

The mRNA level of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) was markedly increased upon treatments with 20 mg/kg of *A. mellea* mycelium extracts for 2~4 hrs in rat brain. Glial Derived Neurotrophic Factor (GDNF) mRNA level was increased upon treatment with 10 mg/kg of *A. mellea* mycelium extracts in the beginning 2 hrs but decreased at 8 hrs.

In dopamine biosynthesis pathway, the tyrosine-hydroxylase mRNA level was increased upon treatment with 10 mg/kg of *A. mellea* extracts for 4 hrs in rat brain and persisted high level expression at 20~40 mg/kg treatment. Western blot analysis revealed that TH protein level was increased for 4 hrs in rat brain and stomach, respectively, by crude extracts treatments with 10

mg/kg of *A. mellea*.

After treat the rat with *A. mellea* extracts, TH-immunoreactive(TH-IR) neurons were stained by TH immunohistochemistry and TH-positive neurons were counted on microscope. TH-IR neurons in *A. mellea* extracts treated animals were expressed higher levels than in non-treatment tissues in substantia nigra of rat brain. Also, cell body of TH-IR neurons were extended by treatment with *A. mellea* extracts.

In addition, SOD activity of mycelium of *A. mellea* that were grown in media containing plant extracts or inorganic compounds were estimated by using native-PAGE. SOD activity of *A. mellea* was 3~4 folds higher than the others on treated media with 5% *Dioscorea japonica*, *Ulmus davidiana* var. *japonica* etc.

D. Growth optimization of *A. mellea* mycelial production and development of processed foods using its mycelial mass

Nutritional characteristics for the mycelial production of *Armillaria mellea* in synthetic medium were investigated. The most efficient carbon source was glucose and its optimum concentration was 1.5% (w/v). Among the nitrogen sources, proteose peptone was the best and its optimal concentration was 0.2% (w/v). Also the optimal concentrations of KH_2PO_4 and MgSO_4 were 0.15 and 0.02% (w/v), respectively. In several mineral salts, CaCl_2 stimulated the mycelial production and it's optimal concentration was 5.55 mg% (w/v). The most efficient vitamin source was thiamine.HCl and its effective concentration was 100 $\mu\text{g/L}$.

Germinated malt extract broth was excellent medium for mycelial production of *Armillaria mellea* out of the other media (MCM, YEPD, MEB, Weinhold's, PDB, DSM, GMEB).

The optimal broth concentration for mycelial production was 15 Brix°. Also, the optimal conditions which were estimated with response surface methodology under temperature, pH and incubation period were 25.9°C, pH 5.72, 15.22 days, respectively, on GMEB medium having 15 Brix° concentration for mycelial production of *A. mellea*.

The various plant extracts which were added to media by 1~5%(v/v) for mycelial production of *A. mellea* in GMEB medium showed stimulatory effect, but ASH-S, RVS and KG extracts inhibited growth of *A. mellea*. Especially, KG extracts seriously inhibited the mycelial growth of *A. mellea*. However most of plant extracts did not show the inhibitory effect.

Total vitamin D2 contents of fruit bodies or mycelia from edible or pharmaceutical mushroom were 50 to 103 mg/100g. Total vitamin D2 content of *A. mellea* mycelium was 102 mg/100g that was higher than the other mushroom's fruit bodies including *Lentinus edodes*. The chemical compositions of *A. mellea* were crude fat 2.3%, crude fiber 11.6%, crude protein 37.6% and carbohydrates 48.1%.

The fibrinolytic activity of *A. mellea* mycelium which grown on GMEB medium containing extracts of WRG was increased from 0.44 to 0.72 plasmin unit/mg protein by fibrin plate assay.

Optimal blending composition was 84% *A. mellea* mycelial extract, 0.16% high fructose corn syrup, 0.16% citric acid, 0.04% sodium citrate, 0.05% vitamin C, 0.05% sodium benzoate and 0.15% apple flavor, respectively.

In this study, we are obtained 68 g/ℓ mycelial dry weight.

CONTENTS

Summary in Korean	i
Summary in English	viii
Contents in English	xv
List of Tables	xxi
List of Figures	xxiii
Contents in Korean	1
Chapter 1. Outline of Research Development	10
Section 1. The Aim and Necessity of Research Development	10
Section 2. The Aim of Research Development	12
Chapter 2. Present condition of Technology Development in Abroad and Domestic	14
Section 1. Situation of World market	14
Section 2. Research Situation	14
Chapter 3. Results and Contents of Research Development	17
Section 1. Screening of mushroom sources having fibrinolysis activity	17
1. Introduction	17
2. Materials and methods	19
A. Mushrooms sources	19

B. Liquid cultivation	20
C. Extraction of crude enzyme	20
D. Fibrinolytic activity measurement	21
3. Results and Discussion	21
A. The screening of fibrinolytic activity from media	21
B. The screening of fibrinolytic activity from mycelia	22
C. The screening of fibrinolytic activity from fruit bodies	22
D. Mycelial productivity of selected mushroom having functional activity	23
E. Economic benefits of the mycelial uses	23
4. Conclusion	30

Section 2. Purification and Characterization of fibrinolytic enzyme from *Armillaria mellea* mycelium. 31

1. Introduction	31
2. Materials and Methods	34
A. Screening of Proteolysis and Fibrinolysis activity from <i>A. mellea</i> mycelium	34
B. Purification and Characterization of fibrinolytic enzyme from <i>A. mellea</i> mycelium	35
1) Sample	35
2) Coprotein extraction	35
3) Quantity of protein	36
4) Protein Purification	36
A) Ion-exchange chromatography	36
(1) Cation-exchange column chromatography	36
(2) Anion-exchange column chromatography	36

B) Gel filtration	37
5) Collection of active fraction	37
6) Measurement of Fibrinolytic activity	37
7) Determination of molecular mass of fibrinolytic enzyme	38
A) SDS-PAGE	38
B) Fibrin-zymography	38
8) N-terminal sequence analysis	39
9) Analysis of fibrinolysis In vitro and in vivo	39
A) Effects of fibrinolysis In vitro	39
B) Effects of fibrinolysis In vivo	39
10) Characterization of purified fibrinolytic enzyme	40
A) Effects of fibrinolytic activity on metal ions	40
B) Effects of fibrinolytic activity on pH	40
C) Effects of fibrinolytic activity on temperature	41
D) Analysis of amidolytic activity on chromogenic substrate	41
E) Analysis of fibrinolysis and fibrinogenolysis	41
C. Molecular cloning of fibrinolytic enzyme gene in <i>A. mellea</i> mycelium	41
1) Samlpe	41
2) Total RNA 분리	43
3) RT(Reverse Transcriptase)-PCR	43
4) Design of specific primer for molecular colning	43
5) Screening of fibrinolytic enzyme gene in <i>A. mellea</i> mycelium	43
D. Molecular cloning of fibrinolytic enzyme gene	44
E. DNA sequence analysis	46
3. Results and Discussion	48
A. Proteolytic and Fibrinolytic activity of <i>A. mellea</i> mycelium	48
1) Proteolytic activity of <i>A. mellea</i> mycelium	48
2) Screening of fibrinolytic activity of <i>A. mellea</i> mycelium	48

B. Protein concentration and purification from <i>A. mellea</i> mycelium	52
1) Coprotein concentration using Ethanol precipitation	52
2) Purification of fibrinolytic enzyme from <i>A. mellea</i> mycelium	52
C. Characterization of purified fibrinolytic enzyme	59
1) Measurement of fibrinolytic enzyme molecular mass	59
2) Effects of fibrinolytic activity in vitro and in vivo	60
3) Measurement of fibrinolytic activity on metal ions and protease inhibitors	61
4) Measurement of fibrinolytic activity on pH and temperature	61
5) Analysis of amidolytic activity on chromogenic substrats	63
6) Analysis of Fibrinolysis and fibrinogenolysis on SDS-PAGE	63
A) Fibrinolytic characterization of purified enzyme	63
B) Fibrinogenolytic characterization of purified enzyme	69
D. Molecular cloning and DNA sequence analysis of fibrinolytic enzyme gene in <i>A. mellea</i> mycelium	69
1) Molecular cloning of fibrinolytic enzyme gene in <i>A. mellea</i> mycelium	69
2) DNA sequencing analysis of fibrinolytic enzyme gene	71
4. Conclusion	75
 Section 3. physiological activity of <i>A. mellea</i> mycelium	77
 1. Introduction	77
2. Material and Methods	80
A. Sample	80
B. Extraction of <i>A. mellea</i> mycelium	81
C. Experimental animals	81
D. Treatment of <i>A. mellea</i> extracts	81
E. Isolation of Total RNA from Rat tissue	81

F. RT (Reverse transcriptase)-PCR 및 specific primer	82
G. Immunohistochemistry	82
H. Antioxydent activity of <i>A. mellea</i> mycelium	84
3. Results and Discussion	85
A. Induction of Neurotrophic factor mRNA	85
1) Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)	85
2) Tyrosine-Hydroxylase gene(TH) and Glial DERived Neurotrophic Factor(GDNF)	86
3) Immunohistochemical analysis of Tyrosine-Hydroxylase gene expression	92
B. Antioxydent activity of <i>A. mellea</i> mycelium	97
4. Conclusion	99
 Section 4. Growth optimization of <i>A. mellea</i> for mycelial production and development of processed foods using its mycelial mass	101
1. Introduction	101
2. Materials and methods	106
A. Mushrooms strain	106
B. Mycelial production in synthetic media	106
C. Mycelial production in natural media	109
D. Fibrinolytic activity measurement	114
E. Statistical analysis of data	115
3. Results and Discussion	115
A. Nutritional requirement in synthetic media	115
B. Mycelial production from natural media	126
C. Proteolytic and fibrinolytic activity from extract	139
D. Component of mycelium	144
E. Development of functional foods using <i>Armillaria mellea</i>	146

4. Conclusion	149
Chapter 4. Achievement of aim and Contribution of related region	151
Chapter 5. Plan of Practical Production	156
Chapter 6. Collection of foreign science information during research development	161
Chapter 7. Reference	165

LIST OF TABLES

Table 01. Mycelial yields from artificial cultivation of mushroom in liquid media	28
Table 02. Chromogenic substrate	42
Table 03. Time course of fibrinolysis on human fibrin plate	51
Table 04. Purified fibrinolytic enzyme activity yields from <i>A. mellea</i> mycelium	55
Table 05. An alignment of the amino-terminal sequence of purified fibrinolytic enzyme of <i>A. mellea</i> mycelium with metalloendopeptidase of <i>A. mellea</i> fruiting body	57
Table 06. Effects of protease inhibitors on the activity of the fibrinolytic enzyme from <i>A. mellea</i> mycelium	64
Table 07. Effects of metal ions on the activity of the fibrinolytic enzyme from <i>A. mellea</i> mycelium	65
Table 08. Oligonucleotide primers for PCR used in this study	83
Table 09. List of culture media for production of mycelia of <i>A. mellea</i>	109
Table 10. List of plants and inorganic compounds added to GMEB	112
Table 11. Independent variables and the levels of variable chosen for trials ...	113
Table 12. HPLC condition for vitamin D2 analysis	113
Table 13. Effect of carbon sources on the rhizomorph growth of <i>A. mellea</i> ...	117
Table 14. Effect of concentration of glucose on the rhizomorph growth of <i>A.</i> <i>mellea</i>	118
Table 15. Effect of nitrogen sources on the rhizomorph growth of <i>A. mellea</i>	120
Table 16. Effect of proteose peptone concentration on the rhizomorph growth of <i>A. mellea</i>	121

Table 17. Effect of potassium phosphate monobasic concentrations on the rhizomorph growth of <i>A. mellea</i>	123
Table 18. Effect of magnesium sulfate concentrations on the rhizomorph growth of <i>A. mellea</i>	124
Table 19. Effect of calcium chloride concentrations on the rhizomorph growth of <i>A. mellea</i>	125
Table 20. Effect of minor mineral salts on the rhizomorph growth of <i>A. mellea</i>	127
Table 21. Effect of various vitamin source on the rhizomorph growth of <i>A. mellea</i>	128
Table 22. The equation by RSM program for DCW of <i>A. mellea</i> on various GMEB concentration	134
Table 23. The equation by RSM program for DCW of <i>A. mellea</i> for the defined model in Table 11.	136
Table 24. Predicted and experimental value of response surface for mycelial production of <i>A. mellea</i> at the defined condition in Table 11.	137
Table 25. The effect of extract of plant and inorganic compounds, added to media on proteolytic activity of <i>A. mellea</i>	142
Table 26. Nutritional composition of <i>A. mellea</i> (mycelium).	145
Table 27. Vitamin D content of various mushroom sources.	145

LIST OF FIGURERS

Fig. 01. The screening of fibrinolytic activity from mushroom culture medium crude extracts on 2% fibrin agarose plate.	24
Fig. 02. The screening of fibrinolytic activity from cultured mycelium crude extracts on 2% fibrin agarose plate.	25
Fig. 03. The screening of fibrinolytic activity from cultured mushroom fruiting body crude extracts on 2% fibrin agarose plate.	27
Fig. 04. The pathway of thrombosis and fibrinolysis.	33
Fig. 05. Produced PCR product size by oligonucleotides primers.	45
Fig. 06. Cloning strategy of pGEM-T Easy vector with AMMEP gene.	47
Fig. 07. The proteolytic activity of crude extracts on skim milk agarose plate ·	49
Fig. 08. Fibrinolytic activity of crude extracts on human fibrin agarose plate ...	50
Fig. 09. Ion-exchange column chromatography of fibrinolytic enzyme from <i>A. mellea</i> mycelium on CM-cellulose	53
Fig. 10. Gel filtration fibrinolytic enzyme from <i>A. mellea</i> mycelium on Sephadex G-75	54
Fig. 11. PAGE of the fibrinolytic protease from <i>A. mellea</i> mycelium.	56
Fig. 12. The halo formed by fibrinolytic enzymes.	58
Fig. 13. Hydrolytic charaterization of fibrin by fibrinolytic enzyme <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	62
Fig. 14. Effect of pH on the activity of the fibrinolytic enzyme from <i>A. mellea</i> mycelium	66
Fig. 15. Effect of temperature on the activity of the fibrinolytic enzyme from <i>A. mellea</i> mycelium	67
Fig. 16. Aminolytic activity on chromogenic substrate.	68
Fig. 17. Fibrinolysis pattern of fibrin by purified fibrinolytic enzyme from <i>A.</i>	

<i>mellea</i> mycelium with time	70
Fig. 18. Fibrinogenolysis pattern of fibrinogen by purified fibrinolytic enzyme from <i>A. mellea</i> mycelium with time.	70
Fig. 19. The results of agarose gel electrophoresis of PCR product.	72
Fig. 20. Restriction enzyme digestion of the recombinant <i>A. mellea</i> AMMEP gene	72
Fig. 21. Comparison of AMMEP gene nucleotide sequence from <i>A. mellea</i> KACC (AM1) and <i>A. mellea</i> NCBI(AM2)	73
Fig. 22. Comparison of AMMEP amino acid sequence from <i>A. mellea</i> KACC (AM1) and <i>A. mellea</i> NCBI(AM2)	74
Fig. 23. The pathway of catecholamine biosynthesis	79
Fig. 24. In brain, BDNF expression by dose-dependent.	87
Fig. 25. In rat brain, induction of BDNF mRNA by time-dependent.	88
Fig. 26. In rat brain, induction of TH mRNA by dose-dependent.	89
Fig. 27. In rat brain, induction of TH mRNA by time-dependent.	90
Fig. 28. In rat brain, induction of GDNF mRNA by time-dependent.	91
Fig. 29. Immunohistochemical detection of TH by <i>A. mellea</i> in the substantia nigra after 4 hours(×200)	94
Fig. 30. Immunohistochemical detection of TH in the stomach	95
Fig. 31. The expression of TH-IR cells in muscularis mucosae and gastric glands of stomach by treatment of mycelia of <i>A. mellea</i>	96
Fig. 32. Bioassay of SOD activity from <i>A. mellea</i> mycelium	98
Fig. 33. The morphology of mycelia (A,B) and fruit body (C) of <i>A. mellea</i> in various media.	105
Fig. 34. Growth of <i>A. mellea</i> rhizomorph on stab and plate culture	109
Fig. 35. Time course of mycelial production of <i>A. mellea</i>	129
Fig. 36. Effect of GMEB concentration on the mycelial production of <i>A. mellea</i>	133

Fig. 37. Effect of pH on the mycelial production of <i>A. mellea</i> in GMEB	135
Fig. 38. Response-surface(left) and contour graphic (right) of mycelial production of <i>A. mellea</i> for temperature, pH and incubation period	138
Fig. 39. Effect of various plant extraction added in GMEB on mycelial production.	141
Fig. 40. The effect of extract of plants and inorganic compounds to fibrinolytic activity	143

목 차

국문요약문	i
영문요약문	viii
영문목차	xv
List of Tables	xxi
List of Figures	xxiii
국문목차	1
제 1 장 연구개발과제의 개요	10
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	10
제 2 절 연구개발 목표	12
1. 연구개발 목표와 내용	12
2. 연차별 연구개발 목표와 내용	13
제 2 장 국내외 기술개발 현황	14
제 1 절 세계시장 동향	14
제 2 절 연구동향	14
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	17
제 1 절 혈전용해능 우수 버섯균 선발	17

1. 서 론	17
2. 재료 및 방법	19
가. 공시균주 및 재료	19
나. 군사체 배양	20
다. 조효소 추출	20
라. 혈전용해활성 측정	21
3. 결과 및 고찰	21
가. 버섯균 배양액의 혈전용해활성	21
나. 버섯균 배양 군사체의 혈전용해활성	22
다. 버섯 자실체의 혈전용해활성	22
라. 기능성 버섯류 선발을 위한 버섯균에 따른 군사체 생산능 비교	23
마. 군사체 활용에 따른 경제적 효과	23
4. 적 요	30
가. 버섯균사 배양액을 이용한 혈전분해활성	30
나. 버섯배양 군사체를 이용한 혈전분해활성	30
다. 인공배양 버섯균 자실체를 이용한 혈전분해활성	30
라. 혈전분해활성 유망버섯 선발	30
 제 2 절 뽕나무버섯 군사체로부터 혈전분해효소 정제 및 특성분석	 31
1. 서 론	31
2. 재료 및 방법	34
가. 뽕나무버섯 군사체의 단백질분해활성 및 혈전분해활성 검색	34
나. 뽕나무버섯 군사체로부터 혈전분해효소 정제 및 특성분석	35
1) 시 료	35
2) 조단백질 분리	35
3) 단백질 정량	36
4) 단백질 분리	36

가) Ion-exchange chromatography	36
(1) Cation-exchange column chromatography	36
(2) Anion-exchange column chromatography	36
나) Gel filtration	37
5) 활성 분획 분리	37
6) 혈전분해작용 및 활성 측정	37
7) 혈전분해효소의 분자량 측정	38
가) SDS-PAGE	38
나) Fibrin-zymography	38
8) N-terminal sequence analysis	39
9) In vitro와 in vivo에서 혈전분해효과 검증	39
가) In vitro에서 혈전분해효과	39
나) In vivo에서 혈전분해효과	39
10) 혈전분해효소 특정분석	40
가) 금속이온에 대한 혈전분해효소 활성 측정	40
나) pH에 대한 혈전분해효소 활성 측정	40
다) 온도에 대한 혈전분해효소 활성 측정	41
라) 다양한 기질에 의한 혈전분해 특성 분석	41
마) Fibrin 및 fibrinogen에 대한 혈전분해 특성 분석	41
다. 뽕나무버섯 균사체로부터 혈전분해효소 유전자 크로닝	41
1) 시 료	41
2) Total RNA 분리	43
3) RT(Reverse Transcriptase)-PCR	43
4) 뽕나무버섯혈전분해효소 유전자에 대한 특이적 primer의 제작	43
5) 뽕나무버섯균사체로부터 혈전분해효소 유전자 탐색	43
바. 유전자크로닝	44
사. DNA sequence analysis	46
3. 결과 및 고찰	48

가. 뽕나무버섯 균사체의 단백질분해활성 및 혈전분해활성	48
1) 뽕나무버섯의 단백질분해활성	48
2) 뽕나무버섯의 혈전분해활성 검색	48
나. 뽕나무버섯 균사체로부터 단백질 분리 정제	52
1) 에탄올 침전법에 의한 조단백질의 분리	52
2) 혈전분해효소의 정제	52
다. 정제된 혈전분해효소의 특성분석	59
1) 정제된 혈전분해효소의 분자량 결정	59
2) 분리정제된 혈전분해효소의 in vitro 와 in vivo에서 혈전분해효과 검증	60
3) 금속이온 및 단백질 분해효소 억제제에 대한 혈전분해효소 활성 측정	61
4) pH 및 온도에 대한 혈전분해효소의 활성 측정	61
5) 다양한 기질에 의한 혈전분해효소의 특성 분석	63
6) Fibrin 및 fibrinogen에 대한 혈전분해 특성 분석	63
가) 정제된 효소에 의한 fibrin의 혈전분해 특성	63
나) 정제된 효소에 의한 fibrinogen의 분해특성	69
라. 뽕나무버섯 균사체의 혈전분해효소 유전자 클로닝 및 염기서열분석	69
1) 뽕나무버섯 균사체의 혈전분해효소 유전자 클로닝	69
2) 뽕나무버섯 균사체의 혈전분해효소 유전자 염기서열 분석	71
4. 적 요	75
제 3 절 뽕나무버섯 균사체의 생리활성	77
1. 서 론	77
2. 재료 및 방법	80
가. 시 료	80
나. 버섯추출물 조제	81
다. 실험동물	81
라. <i>A. mellea</i> 추출물의 투여	81

마. Rat tissue 로 부터 total RNA 분리	81
바. RT (Reverse transcriptase)-PCR 및 specific primer	82
사. Immunohistochemistry	82
아. 다양한 배지조성물에 의한 뽕나무버섯의 항산화효과 검증	84
3. 결과 및 고찰	85
가. 신경영양인자 발현 유도 검증	85
1) Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)	85
2) Tyrosine-Hydroxylase gene(TH) 과 Glial DErived Neurotrophic Factor(GDNF)	86
3) 면역조직화학적 방법에 의한 TH의 발현 분석	92
나. 다양한 배지 조성물에 의한 항산화 효과	97
4. 적 요	99
제 4 절 선발균주인 뽕나무버섯균의 영양요구성 및 대량생산	101
1. 서 론	101
2. 재료 및 방법	106
가. 공시균주	106
나. 합성배지를 이용한 균사체 생산	106
1) 배지의 조제	106
가) 종배양용 배지	106
나) 배양용 배지	106
(1) 탄소원	106
(2) 질소원	106
(3) KH ₂ PO ₄	107
(4) MgSO ₄	107
(5) 기타 무기염류의 영향	107
(6) Vitamin	107

2) 배양방법	107
다. 천연배지를 이용한 균사체 생산	108
1) 배지의 조제	108
2) 접종원의 조제	108
3) 천연물 및 무기물의 첨가	110
4) 균사체 생산 최적화	110
5) 균사체의 성분분석	110
가) 일반성분	110
나) Vitamin D 정량	110
라. 혈전용해활성 측정	114
1) 조효소 분리 및 정량	114
2) 단백질 분해활성	114
3) 혈전용해효소 활성	114
마. 데이터 분석	115
3. 결과 및 고찰	115
가. 합성배지 상에서의 영양요구성	115
1) 탄소원의 영향	115
2) Glucose 농도의 영향	116
3) 질소원의 영향	116
4) Proteose peptone 농도의 영향	119
5) 무기염류의 영향	119
가) KH_2PO_4 농도	119
나) MgSO_4 농도	119
다) CaCl_2 농도	122
라) 기타 무기염류	122
7) 비타민의 영향	122
나. 천연성배지를 이용한 균사체 생산	126
1) 최적배지선정	126

2) 군사체 생산배지 최적화	130
3) 천연물 추출물이 군사체 생산에 미치는 영향	132
다. 천연물 추출물이 혈전용해활성에 미치는 영향	139
라. 군사체의 성분	144
1) 일반성분	144
2) 비타민 D	144
마. 뽕나무버섯 군사체를 이용한 기능성 식품 개발	146
1) 원 료	147
2) 제품 배합비	147
3) 제조 공정도	148
4. 적 요	149
가. 합성배지를 이용한 뽕나무버섯 군사속 생산	149
나. 반합성배지와 천연배지를 이용한 군사속의 생산	149
다. 염가 천연배지 상에서의 군사체 대량생산 조건	149
라. 뽕나무버섯 군사체의 혈전용해활성	150
마. 뽕나무버섯 군사체의 영양성분	150
바. 뽕나무버섯 군사체를 이용한 기능성 식품개발	150
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	151
제 1 절 목표달성도	151
1. 1년차 “고기능성 유용균주를 선별하여 혈전분해물질과 생리활성물질 탐색 및 분 리”	151
가. 주관연구기관 조선대학교	151
1) 연구개발목표 : 혈전분해물질과 생리활성물질 탐색	151
2) 연구개발 내용 및 달성도	151
가) 버섯으로부터 신경성장인자 및 생리활성의 탐색	151
나) 혈전분해효소의 분리 및 특성분석	152
다) 혈전분해효소 유전자의 탐색	152

나. 협동연구기관 익산대학교	153
1) 연구목표 : 고기능성 유용균주 선발 및 균주별 영양조건 확립	153
2) 연구개발 내용 및 달성도	153
가) 고기능성 유용균주선발	153
나) 균주별 영양조건 확립	153
2. 2 년차 “혈전분해효소의 대량생산과 실용화 기술개발”	154
가. 주관연구기관 조선대학교	154
1) 연구개발목표 : 혈전분해효소 유전자의 크로닝 및 대량생산과 제품화가능성	154
2) 연구개발 내용 및 달성도	154
가) 뽕나무버섯으로부터 혈전분해효소 유전자의 크로닝	154
나) 혈전분해효소의 상품화 가능성	154
나. 협동연구기관 국립익산대학	154
1) 연구개발목표 : 혈전분해능 우수균 선발 및 버섯균 대량생산 체계화와 실용화 기술개발	154
2) 연구개발 내용 및 달성도	155
가) 혈전 용해능 우수균 선발 버섯균	155
나) 버섯균 대량생산 체계확립 및 실용화 기술개발	155
다) 대량생산방법에 대한 특허출원	155
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	156
제 1 절 제품화 개요	156
1. 제품화 기술의 중요성(필요성)	156
2. 혈전분해제 시장규모	157
3. 제품화 개발시 예상되는 기대효과	157
제 2 절 제품화 목표 및 내용	159

1. 제품화 목표	159
2. 제품화 내용 및 범위	159
3. 기대효과	159
4. 제품화 후 활용방안 및 사업화 추진계획	160
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보	161
제 1 절 관련기술의 국내외 시장현황 및 사업화 전망	161
1. 국내외 연구현황	161
가. 국외 연구현황	161
나. 국내 연구현황	162
다. 문제점	163
제 7 장 참고문헌	165

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

오늘날 많은 종류의 버섯들이 식용, 약용, 건강음료, 기호식품, 화장품, 기타 산업용 등으로 이용되고 있는데 현재 지구상에는 약 15,000종의 버섯이 분류·동정되었는데 그 중 약 50%가 식용으로 추정된다. 이에 비해 독버섯은 10%, 약용이 약 20%, 나머지는 밝혀지지 않는 상태이다. 따라서, 현재 우리가 이용하는 버섯 종류는 극히 일부분임을 감안한다면 개발할 수 있는 버섯 자원은 무한한 상태이다. 국내의 산야에 자생하고 있는 버섯 자원을 조사 수집하여 농업, 임업, 의약등 각 분야에 활용하기 위하여 1973년부터 야생버섯의 분포를 조사한 결과 665종을 분류 동정되었고, 그 중 182종의 미기록 종이 확인되었다. 따라서 분류 동정된 버섯중 이용이 가능하다고 판단되는 버섯 156종은 균주를 수집 보관하면서 육종 및 인공재배의 기초 자료로 활용되고 있다.

최근에 생명공학 기술의 도입으로 많은 버섯이 식품소재 (기능성식품)로서 또는 약품개발소재로서도 이용되고 있다. 이 같은 버섯의 장점때문에 건강식품 (기능식품)의 소재로의 이용방법이 모색되어지고 있으며 식생활이 변하면서 버섯은 저열량 식품으로서 특유의 향과 맛 그리고 치감이 좋은 식품으로 인기가 높다. 또한 버섯이 생리적 특성 (약리효과)으로서 생체조절 (면역활성), 생체내의 균형유지, 생체리듬의 조절, 질병회복 그리고 암, 뇌졸중, 심장병 등의 성인병에 대한 예방과 개선효과가 있는 것이 발견되었다. 그밖에 탈 콜레스테롤, 고지혈장 개선 항 혈전효과, 혈압강하, 혈당강하, 그리고 노인성 치매증 개선 등에까지 여러 가지 유효한 성분이 증명되고 있다.

본 연구는 성인병 예방과 치료에 탁월한 효능이 있는 것으로 알려진 버섯류들을 인공 배양하고 액체종균을 제조하여 농가에 보급할 수 있는 기술을 개발하고, 나아

가 한국산 버섯류로부터 생리활성물질인 혈전치료물질, 신경영양인자 유도물질을 분리하고 효능을 연구·분석하여 이러한 기능에 관여하는 유전자를 크로닝하여 유전공학적인 방법으로 혈전치료물질을 생산하므로서 한국산 버섯을 고부가가치의 새로운 농가 소득원으로 정착시키고자 계획되었다.

가. 기술적 측면

- 1) 우리나라 버섯산업의 규모는 농가수 2만여농가, 생산액 5천억정도로 쌀, 고추, 마늘, 사과 등에 이어 10위권의 큰 비중을 차지하는 농작물이나 느타리버섯, 표고버섯, 팽이버섯, 양송이 등 주로 식용버섯 위주이며 작목이 단순하여 다양한 버섯작목개발이 요구됨
- 2) 세계 각 국에서는 버섯이 갖는 잠재적인 능력 발굴에 전념하고 있으며 다양한 연구진간의 상호 협력으로 공동연구를 수행함으로써 전문성 요구됨
- 3) 버섯균 (뽕나무 버섯)를 이용하여 배양액 1000 ml 당 550 g의 균사체 (생체량) 생산 가능성을 타진한 바 있어 이의 영양적 혹은 생리활성적 효능에 착안하여 식품이나 의약품으로 사용 방안이 확립된다면 국내 버섯 산업에 큰 기여를 할 수 있을 것으로 판단됨.
- 4) 현재 본 연구팀은 버섯류로부터 생리활성물질을 분리하여 그들의 항혈전, 노인성 질병들에 관여하는 Neurotrophic Factor들의 발현유도 등에서 상당한 기술적 진전을 갖고 있음

나. 경제·산업적 측면

- 1) 염가의 농산폐자원을 이용하여 경제적으로 대량생산이 가능함
- 2) 식용버섯은 대부분 생버섯으로 유통되고 있어 선도유지 때문에 외국산 버섯의 수입압력이 적은편임

3) 버섯의 기능성 활용을 위한 산업은 현재 농가 차원에서도 다양한 재배방법이 실용화되어 버섯의 자실체 및 균사체 생산기술이 보편화되어 가고 있기 때문에 신 기능성 자원으로서의 버섯자원 활용방안이 제시된다면 식·의약품 산업 분야의 항혈전, 면역강화, 그리고 노인성 질병 예방 기능을 갖는 기능성 재료 개발로 농가소득증대에 일익을 담당할 수 있음

다. 사회·문화적 측면

1) 버섯은 각종 무기물, 지방, 단백질, 탄수화물, 비타민, 식이섬유 및 기타 생리활성 물질 등을 함유하고 핵산, 아미노산 등 다양한 정미성분을 함유하여 맛, 영양성 및 기능성 성분이 풍부한 식품소재로 잘 인식되고 있으며, 경제성장과 꾸준한 소득수준의 향상에 따른 우리 식생활의 고급화 추세를 배경으로 버섯 산업, 건강식품산업, 의약품산업 등이 각광을 받고 있음

2) 저비용 대량생산기술이 농가현장에 접목되면 약리적효능이 우수한 버섯들이 저렴한 가격으로 유통되어 장기적이고 안정적인 생산체계가 구축될 것임

3) 버섯은 농·임산 부산물과 같은 비교적 값싼 원료를 기질로 재배가 가능하고 다양한 생리활성 기능을 가지고 있기 때문에 건강식품 내지는 의약품의 소재로 고부가가치 창출에 적합함

제 2 절 연구개발 목표

1. 연구개발 목표와 내용

주관연구기관인 조선대학교와 협동연구기관인 국립익산대학에서는 국내에 자생 및 재배 중인 약용·식용버섯류로부터 새로운 유용한 기능성버섯을 발굴하여 이에 대한 균사체 수율 증진을 위한 액체 배양방법을 개발하여 혈진분해효소를 분리정제

후 그 특성을 확인하고 혈전분해효소의 유전자를 탐색 후 크로닝하고자 하였다. 또한 발굴된 유망 기능성버섯으로부터 생리활성을 검증하기 위하여 신경성장인자 및 영양인자, 기능성물질을 탐색 후 이를 식·의약품 산업에 접목하여 농가소득을 증대시키기 위해 유용한 성분의 대량생산 시스템을 구축과 기능성 식품개발을 병행하였다. 본 연구로부터 도출되어진 결과를 토대로 하여 버섯농가에 새로운 기능성버섯의 대량생산 조건 및 기능성식품개발기술을 이전하여 고부가가치의 농가소득원으로 자리매김하고자 한다.

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2001년)	주관연구기관 :조선대 <ul style="list-style-type: none"> • 혈전분해물질 탐색/분리 • 생리활성물질탐색/분리 	<ul style="list-style-type: none"> • 다양한 버섯으로부터 신경성장인자의 탐색 • 혈전분해능 물질분리 특성조사 • 혈전분해물질유전자 탐색 및 크로닝
	협동연구기관 : 익산대 <ul style="list-style-type: none"> • 고기능성 유용균주 선발 • 균주별 영양조건 확립 	<ul style="list-style-type: none"> • 균주 및 자료수집 • 기능성 및 대량생산 유망버섯 선발 • 균사체 생산을 위한 영양요구성 검토 • 효소 생산능 검정 • 균사체의 영양성 분석 • 분비효소계를 이용한 유용물질 생산 • 대량생산을 위한 적정 배양방법 구명
2차 년도 (2002년)	주관연구기관 : 조선대 <ul style="list-style-type: none"> • 혈전분해물질의 대량생산 및 제품가능성 시험 	<ul style="list-style-type: none"> • 탐색된 기능성 버섯으로부터 혈전제의 대량생산 • 혈전분해물질의 순수대량분리를 위한 시스템화 • 분리된 혈전제의 상품화 가능성 test • 대량생산방법 특허출원
	협동연구기관 : 익산대 <ul style="list-style-type: none"> • 버섯균 대량생산 체계확립 및 실용화 기술개발 	<ul style="list-style-type: none"> • 버섯균의 대량생산 생산 방법의 실용화 기술 개발 • 균사체 활용에 따른 경제성 분석 • 시작품 제작

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 세계시장 동향

세계 항혈전제 시장은 '99년 67억 달러로 추산되며 연평균 약 5%의 성장률로 2005년경 약 93억 달러의 시장을 형성할 것으로 전망되고 있다. 지난 4년 동안 혈전 예방 및 치료제 시장에 상당한 진보가 이뤄졌으며, 특히 저분자 헤파린 개발로 도입된 주사형 항응고제 시장은 기존 표준 치료제인 헤파린을 대체해가고 있다. 뇌졸중 분야의 경우 약효가 뚜렷한 치료제가 개발되지 않아 새로운 혈전 분해제 및 항응고제 개발 수요를 일으키고 있으며 정부의 Deep vein thrombosis 예방을 위한 노력이 강화됨에 따라 전체적으로 항혈전제 시장의 동인이 되고 있다. 전체적으로 성장의 동인을 분석하면, 업계의 연구개발 강화, 고령 인구 증가 및 정부의 예방 의학 정책 등이 맞물려 항혈전제 시장은 지속적이고 높은 성장률을 보일 것으로 분석되고 있다. 미국은 항응고제와 혈전분해제가 항혈전제 시장 성장을 주도하는 반면, 유럽권은 항응고제 및 항혈소판제가 시장 성장을 주도하고 있다. 미국의 항응고제 시장은 '99년 기준 약 9억 달러로 추산되며 경구형 항응고제와 저분자 헤파린 개발로 심근경색, 앵기나 등 치료 범위를 확대하면서 시장 성장의 동인이 되고 있다. 항혈소판제제의 시장은 약 5억 달러로 추산되며 주로 허혈성 뇌졸중 치료제로 사용되고 있으며, 고령 인구의 급격한 증가는 항혈소판제제의 시장 전망을 밝게 하고 있다. 유럽권의 항혈전제 시장은 '99년 12억 4천만 달러이며 2005년경 약 23억 4천만 달러의 시장을 형성하며 연평균 25%의 성장률을 보일 것으로 분석되고 있다.

제 2 절 연구동향

혈전분해효소는 생체내의 혈관계가 손상을 받게 되면 혈액은 응고현상을 일으켜

지혈되며, 여기 생성된 혈전은 자연히 분해된다. 이와 같이 혈액중의 응고-분해계는 효소의 작용에 의해 균형을 이루고 있는데 이 균형이 깨어져 혈전의 분해 기능이 저하되면 이로 인해 여러 가지 증상이 유발된다. 최근 식생활의 변화와 함께 혈관장애에 의한 사망자 수가 급증하고 있기 때문에 혈관장애의 주된 요인인 혈전의 치료는 대단히 중요한 과제이다.

혈전분해효소는 작용 기전에 따라 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, 첫째 혈전에 직접 작용하여 Fibrin을 용해시키는 단백분해 효소제와 둘째, 인체의 혈액 분해계를 활성화시키는 효소제로 나눌 수 있다. 단백분해효소제로는 Brinase, Papain, Ochrace, Trypsin, Plasmin 등이 있으나 이러한 단백분해효소제들은 정맥 주사로 주입 시 무작위적인 단백분해효과로 혈전 외에 혈전생성인자들까지 파괴하여 출혈을 일으킬 수 있어 매우 독성이 강해 거의 쓰이지 않고 있으며, 대신 인체의 혈전 분해를 촉진시키는 효소제인 Streptokinase, Urokinase 등이 일반적으로 사용되고 있다.

혈전 내에 생긴 fibrin이 용해하여 혈전이 용해되는 현상은 혈장중의 Plasmin의 작용에 의한다. Plasmin은 일종의 Serine protease이며, 혈액 중에는 존재하지 않고 불활성전구체 형태인 Plasminogen으로서 혈장 중에 함유되어 있다. 혈전 용해는 위와 같은 기작에 의해서 일어나는데 실제로는 plasmin inhibitor 등에 의한 혈전 방해 등의 문제가 있다. 또 Plasmin이 Fibrin에만 작용하도록 하지 않으면 출혈 등의 부작용을 일으킬 수도 있다. 따라서 Plasminogen activator가 fibrin에 흡착하여 여기서 Plasmin이 생기게 하면 매우 이상적이기 때문에 혈전 용해에 Plasminogen activator를 사용하는 경우가 점점 늘어나고 있다. 이러한 Plasminogen activator 활성을 가진 것으로는 Streptokinase, Urokinase, Single chain prourokinase, Trypsin, Staphylokinase, tPA 등이 있다.

중요한 혈전분해효소의 예로는, Streptokinase(SK)는 Hoechst-Roussel과 Kabi에 의해 제조된 것으로 용혈성 연쇄상 구균의 배양액에서 발견된 효소로서 Plasminogen을 직접 활성화시키며, Plasmin으로 변화시킨다. SK는 본래 외래성 물질이기 때문에 인체 내에서 항원성을 가지고 있어 인체에 투여할 경우 발열, 알레르기, 저혈

압 유발 등의 부작용을 일으키게 된다. 그러나 SK는 대량 생산이 용이하고 가격이 Urokinase나 tPA보다 훨씬 저렴하며, 현재 항원성이 있는 부분을 없애거나 아실화하는 연구가 진행되고 있어 장래 혈전을 용해하는 치료제로서 기대되고 있다.

Urokinase는 1964년 일본의 녹십자에 의해 인노로부터 처음 공업화되었는데 최근 태아 콩팥세포의 조직배양으로 생산하는데서 최근은 유전자조작에 의해서 대량생산이 가능하게 되었으며, 국내에서는 녹십자 등에 의해 생산되고 있다. Urokinase는 인체의 콩팥 세포에 의해 만들어져 노중에 배출되며, 항원성이 없고 발열의 부작용이 없다. Urokinase는 일종의 Serine protease이며, Plasminogen에 특이적 친화력을 가지고 활성화하는 인자로 저분자형 (M.W. 33,000)과 고분자형 (M.W. 54,000)이 있으며 고분자형의 활성이 높다. Tissue Plasminogen Activator (tPA)는 분자량 72,000의 Serine protease의 일종으로 Two-chain polypeptide로 구성되어 있다.

tPA는 Fibrin에 특이적으로 반응하여 Plasminogen과 Complex를 형성하여 강력한 혈전 용해 작용을 나타내기 때문에 Urokinase보다 출혈 등의 부작용이 적다. tPA는 이미 구미에서 유전공학적 방법에 의해 대량생산되고 있으며 또한 광범위한 임상실험이 진행되고 있는 등 혈전증치료에 각종 각광을 받고 있다. 크게 혈전분해제 개발은 미국권, 유럽권, 아시아권으로 분류할 수 있다. 미국은 항응고제와 혈전분해제가 항혈전제 시장 성장을 주도하는 반면, 유럽권은 항응고제 및 항혈소판제가 시장 성장을 주도하고 있다. 아시아권에서는 주로 천연추출물로 혈전분해효소를 정제하여 직접 투여할 수 있는 혈전분해제를 개발하고 있다. 특히 한국, 일본, 중국 등 전통적으로 발효식품이 발달한 곳에서는 미생물인 *Bacillus* sp. 로부터 혈전분해효소를 정제하였고, 거머리, 독사의 독, 버섯류, 녹조류 등으로부터 혈전분해효소를 정제하여 보고하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 혈전용해능 우수 버섯균 선발

1. 서 론

오늘날 많은 종류의 버섯들이 식용, 약용, 건강음료, 기호식품, 화장품, 기타 산업용 등으로 이용되고 있는데 현재 지구상에는 약 15,000종의 버섯이 분류·동정되었는데 그 중 약 50%가 식용으로 추정된다. 이에 비해 독버섯은 10%, 약용이 약 20%, 나머지는 밝혀지지 않은 상태이다. 따라서, 현재 우리가 이용하는 버섯 종류는 극히 일부분임을 감안한다면 개발할 수 있는 버섯 자원은 무한한 상태이다. 그러나 버섯에 관한 연구는 주로 버섯의 생리·생태 및 재배에 관한 연구가 주를 이루었으나 최근 들어 버섯의 기능성에 관한 연구가 많이 이루어져 버섯의 소비 촉진에도 많은 기여를 하고 있고 더 나아가 이를 이용한 각종 버섯 가공식품들의 개발이 다양화되고 있는 추세이다.

노루궁뎅이 버섯 (*Hericium erinaceus*)은 오래전 부터 식용 및 약용버섯으로 이용되는 버섯으로 Kawagishi 등 (1996)은 노루궁뎅이버섯에서 생리활성물질을 추출하여 구조를 밝혀냈으며 그 물질은 nerve growth factor (NGF)로 중추신경 재생과 치매병의 치료제로서의 이용 가능성을 시사한 바 있고, Mizuno (1995)는 노루궁뎅이버섯이 고급요리 및 건강증진식품으로 손색이 없으며 의학적으로도 매우 잠재성이 높은 버섯이라고 보고한 바 있다.

느타리버섯 (*Pleurotus ostreatus*)은 우리나라에서 가장 많이 생산되는 버섯 (76.9%)이며, 일반채소류나 일부버섯에 비하여 높은 영양가와 향미를 가지고 있고, 항암활성, 고혈압 및 당뇨병 예방효과 (Chang and Miles, 1989) 등 약리활성이 있다고 보고되어 건강식품으로 수요가 증가 추세에 있고, 팽이버섯 (*Flammulina velutipes*)은 씹는 맛이 좋으며, 단백질 함량이 높고 혈중 cholesterol 저하효과 등이 인정되어 (Komatsu 등, 1963; Lin 등 1974; 박, 1997) 생산과 소비가 급격히 증가한

버섯이다. 표고버섯 (*Lentinus edodes*)은 우리나라에서도 이조시대 허준 (1613)의 동의보감과 정약용 (1790)의 산림경제에 기록이 있는 것으로 보아 약용이나 식용으로 널리 이용되어 왔음을 알 수 있다.

또한 버섯은 생리적 특성 (약리효과)으로서 생체조절 (면역활성), 생체내의 균형 유지, 생체리듬의 조절, 질병회복 그리고 암, 뇌졸중, 심장병 등의 성인병에 대한 예방과 개선효과와 탈 콜레스테롤, 고지혈증 개선 항 혈전효과, 혈압강하, 혈당강하, 그리고 노인성 치매증 개선 등에 이르기까지 여러 가지 유효한 성분들이 함유되어 있는 것이 증명되고 있다.

혈관이 손상되면 출혈이 일어나고 지혈과정에서 형성된 혈소판과 섬유소의 응집체인 혈전은 지혈과정이 완료되고 손상된 부위의 조직이 재생되면 Plasminogen 활성화제인 Urokinase (UK), Tissue plasminogen activator (tPA), Streptokinase (SK)에 의해 Plasminogen이 활성화된 Plasmin에 의해 용해되어 혈관의 혈액은 다시 정상상태를 유지하게 된다. 그러나 생성된 혈전이 체내에 과도하게 축적되거나 혈전용해기작이 원활하게 작동하지 못할 경우 혈전증을 유발하여 인체에 치명적인 손상을 줄 수도 있다. 이 혈전은 혈관을 따라 흐르면서 뇌혈전증, 뇌출혈, 심부전증, 심장마비와 같은 혈관계 질환을 유발하는데 현대인의 사망원인 중 혈관계 질환에 의한 사망이 39%로 알려지고 있어 이 혈관계 질환의 주원인 중 하나인 혈전을 용해하는 혈전 용해제에 관한 관심이 점점 더 커지고 있다 (정, 1991).

현재 임상에서 사용되어지고 있는 혈전 용해제로는 UK, tPA, SK (Reed 등, 1995) 등이 있으나 UK를 제외하고는 경구 투여를 할 수 없고 tPA의 경우 반감기가 짧은 단점이 있다. 이 용해제들은 투여 시 혈전에 대한 선택성이 적어 전신출혈이 발생할 수도 있으며, Fibrin에 대한 선택성이 작아 장기간 복용시 용혈현상과 면역거부반응이 나타나는 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라 가격이 매우 높은 단점이 있어 혈전을 직접 용해하는 새로운 대체 혈전 용해제들이 필요한 실정이다.

최 등 (1999)은 국내에 자생하는 버섯인 때죽도장버섯 (*Daedaeopsis styracina*), 기와웃솔버섯 (*Trichaptum abietium*), 구름버섯 (*Coriolus versicolor*), 모래밭버섯 (*Pisolithus tinctorius*) 등의 자실체에서 혈전분해 활성이 있음을 보고하였고, 또한

Kim 등 (2000, 1998)에 의해 식용버섯인 활미송이버섯 (*Tricholoma saponaceum*), 먹물버섯 (*Coprinus comatus*), 주름버섯 (*Agaricus campestris*), 점박이애기버섯 (*Coprinus disseminatus*), 민자주방망이버섯 (*Lepista nuda*) 등의 자실체에서도 단백질 분해 및 혈전분해 활성이 있음이 밝혀져 있으나, 이외의 버섯류에 대한 연구는 없는 실정이며, 균사체를 대상으로 한 혈전분해 활성에 관한 연구는 전무한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 혈전용해 활성이 우수한 버섯 자원을 발굴하므로서 식·의약용으로 활용 가치를 높이고자 수집 버섯균류의 균사체 및 자실체들을 대상으로 이들 버섯 자원들의 혈전용해활성을 기준으로 우수자원을 발굴함으로서 한국산 버섯을 고부가가치의 새로운 농가 소득원으로 정착시키고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시균주 및 재료

1) 버섯균

Coriolus versicolor (운지), *Lentinus edodes* (표고), *Pleurotus eryngii* (새송이), *Phellinus linteus* (상황), *Fomitella fraxinea* (장수버섯), *Lyomyllum ulmarium* (만가닥), *Hericiium ernaceus* (노루궁뎅이), *Elfvvingia applanata* (잔나비결상), *Ganoderma lucidum* (영지), *Pleurotus ostreatus* (느타리), *Trametes trogii* (토끼털송편버섯), *Tyromyces pulustris*, *Inonotus obliqua* (차가버섯), *Armillaria mellea* (뽕나무 버섯) 등 14종 익산대학 식량환경과 균이학 실험실에서 보관중인 균주를 사용하였다.

2) 자실체

Flammulina velutipes (팽이), *Lentinus edodes* (표고), *Agaricus bisporus* (양송이), *Pleurotus ostreatus* (느타리)는 시중에서 구입하여 사용하였고, *Pleurotus eryngii* (새송이), *Hericium ernaceus* (노루궁뎅이), *Pleurotus ferulae* (아위) 버섯 자실체는 톱밥배지에서 병재배에 의해 생산한 것을 시료로 이용하였다.

나. 균사체 배양

각종 버섯 균사체 배양은 pH 6.5, 11 Brix° 농도의 맥아즙 액체배지를 500 ml 삼각 플라스크에 200 ml 씩 분주하고 25°C로 조절된 배양기에서 10 일간 진탕배양한 배양여액 및 균사체를 시료로 사용하였다.

다. 조효소 추출

pH 6.5, 11 Brix° 농도의 맥아즙 액체배지 상 (200 ml)에서 진탕배양한 배양여액 10 ml에 3 배량의 에탄올 (-70°C)을 서서히 가하며 교반시킨 하룻밤 냉장고에 방치하였다. 다시 8,000×g, 4°C에서 30 분간 원심분리하여 침전물을 10 mM Citrate-NaOH (pH 6.0) 완충용액 0.5 ml에 용해시켜 불용성물질을 제거한 후 배양액 조효소액으로 사용하였고, 균사체 내 혈전용해효소 조효소액은 Flask 당 회수된 균사체에 동량의 멸균수를 가하여 Homogenizer로 균질화한 후 냉장고에서 하룻밤 추출하고 원심분리를 행하고, 원심분리 후 상등액에 3배량의 에탄올을 가하여 효소단백질을 침전한 것을 이용하였다. 이 침전물은 소량의 멸균수 (균사체 생체 대비 5%)로 용해·여과하여 균사체 혈전용해효소 조효소액으로 사용하였다.

버섯균의 자실체 중의 혈전용해효소 추출은 생체 50 g에 대하여 동량의 멸균수를 가하여 Homogenizer로 1분간 마쇄 후 냉동원심분리하고, 상등액에 3배량의 에탄올을 가하여 효소단백질을 침전하였으며, 이 침전물은 소량의 멸균수 (자실체 생체 대비 5%)로 용해·여과하여 혈전용해효소 조효소액으로 사용하여 비교실험을 행하였다.

라. 혈전용해활성 측정

0.15 M NaCl 함유 50 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에 Fibrinogen을 최종농도 0.3% 되도록 완전히 용해시킨 용액 5 ml에 동량의 2% agarose 5 ml을 첨가하여 혼합한 후 용액에 Thrombin (100NIH unit/ml) 0.1 ml을 첨가하여 1시간 동안 실온에서 고화시켜 Fibrin plate를 조제하였다. fibrin plate에 지름 5 mm의 구멍을 만들어 각 조효소 추출물 200 µg과 대조구로 정제된 혈전효소인 Plasmin 1 unit (Calbiochem. co.)를 점적한 후에 37°C에서 12시간 반응시켜 Plasmin 용해면적에 대한 시료의 상대적인 용해면적 비율로 환산하여 산출하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 버섯균 배양액의 혈전용해활성

Coriolus versicolor (운지), *Lentinus edodes* (표고), *Pleurotus eryngii* (새송이), *Phellinus linteus* (상황), *Fomitella fraxinea* (장수버섯), *Lyopyllum ulmarium* (만가닥), *Hericium ernaceus* (노루궁뎅이), *Elfvigina applanata* (잔나비겉상), *Ganoderma lucidum* (영지), *Pleurotus ostreatus* (느타리), *Trametes trogii* (토끼털송편버섯), *Tyromyces pulustris*, *Inonotus obliqua* (차가버섯), *Armillaria mellea* (뽕나무 버섯) 등 14종의 균주를 pH 6.5, 11 Brix° 농도의 맥아즙 액체배지 상(200 ml)에서 진탕배양하고 배양여액 10 ml에 3배량의 에탄올 (-70°C)을 서서히 가하며 교반시킨 후 하룻밤 냉장고에 방치하였다. 다시 8,000×g, 4°C에서 30분간 원심분리하여 침전물을 10 mM Citrate-NaOH (pH 6.0) 완충용액 0.5 ml에 용해시켜 불용성 물질을 제거한 후 조효소액으로 사용하여 혈전분해활성을 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. *Lentinus edodes*, *Hericium ernaceus*, *Inonotus obliqua*을 제외한 대부분의 버섯균들은 대조구인 plasmin 보다 배양액 내에 혈전분해효소를 생산하는 것으로 나타났다. 배양여액을 이용한 혈전분해효소의 생산은 *Elfvigina applanata*, *Pleurotus eryngii*, *Ganoderma lucidum*, *Coriolus versicolor*, *Tyromyces plustris*, *Lyopyllum ulmarium* 순으로 높아 *Elfvigina applanata*, *Pleurotus eryngii*,

*Ganoderma lucidum*의 배양액을 활용하는 것이 적당하였다.

나. 버섯균 배양 균사체의 혈전용해활성

액체배지 상에서 *Coriolus versicolor*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus eryngii*, *Phellinus linteus*, *Fomitella fraxinea*, *Lyopyllum ulmarium*, *Hericiium ernaceus*, *Elfvngia applanata*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes trogii*, *Tyromyces pulustris*, *Inonotus obliqua*, *Armillaria mellea* 등의 14종의 균주를 pH 6.5, 11 Brix° 농도의 맥아즙 액체배지 상 (200 ml)에서 진탕배양하고 원심분리하여 균사체를 회수하였다. Flask 당 회수된 균사체에 동량의 멸균수를 가하여 Homogenizer로 균질화한 후 냉장고에서 하룻밤 추출하고 원심분리를 행하였다. 원심분리 후 상등액에 3배량의 에탄올을 가하여 효소단백질을 침전하였다. 이 침전물은 소량의 멸균수 (균사체 생체 대비 5%)로 용해.여과하여 균사체 혈전용해효소 조효소액으로 사용하여 비교실험을 행하였다. 이 자실체의 조효소액을 대상으로 효소활성을 검토한 결과는 Fig. 2와 같다. *Lentinus edodes*, *Hericiium ernaceus*, *Tyromyces pulustris*, *Coriolus versicolor*, *Inonotus obliqua* 균사체 추출물을 제외하고는 대조구인 plasmin 보다 높은 활성을 보였다. 균사체 추출물의 혈전분해효소활성은 *Ganoderma lucidum*, *Fomitella fraxinea*, *Lyopyllum ulmarium*, *Trametes trogii*, *Armillaria mellea*, *Inonotus obliqua*, *Pleurotus ostreatus* 순으로 높은 활성을 보였고, *Armillaria mellea* 균사체의 경우는 홍삼박 5% 첨가구가 무첨가구에 비하여 혈전용해활성이 단백질 mg당 60% 증대 효과를 보였다.

다. 버섯 자실체의 혈전용해활성

인공배양된 *Flammulina velutipes*, *Lentinus edodes*, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Hericiium ernaceus*, *Pleurotus ferulae* 버섯균의 자실체 생체 50 g에 대하여 동량의 멸균수를 가하고 Homogenizer로 1분간 마쇄 후 냉동원심분리하여 상등액에 3배량의 에탄올을 가하여 효소단백질을 침전하였다. 이 침전물은 소량의 멸균수 (자실체 생체 대비 5%)로 용해·여과하여 혈전용

해효소 조효소액으로 사용하여 비교실험을 행하였다. 이 조효소액을 대상으로 효소 활성을 검토한 결과는 Fig. 3과 같다.

본 실험에서 사용한 모든 버섯의 자실체에서 대조구인 plasmin 보다 혈전용해활성이 높게 나타났다. 자실체의 혈전용해활성은 *Pleurotus ferulae*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Lentinus edodes*, *Flammulina velutipes*, *Agaricus bisporus*, *Hericium ernaceus* 순으로 *Pleurotus* sp.에서 공히 높은 활성을 보였다.

라. 기능성 버섯류 선발을 위한 버섯균에 따른 균사체 생산능 비교

특정 물질 생산을 위해서는 배양기간이 많이 소요되고 배양관리가 까다로운 자실체를 이용하는 것 보다 균사체를 이용하는 것이 시간적으로나 경제적으로 훨씬 유리하다. 따라서 엇기름 배지상에서 각종 버섯균의 균사체 생산력 (g/100 ml)을 비교한 결과는 Table 1과 같이 뽕나무버섯균의 균사 생산능 (6.8 g/100 ml)이 가장 높았으며, 대부분의 버섯균들 (1.3~3.4 g/100 ml) 보다 균사체 생산능력이 2~5배 정도로 월등히 높았다. 본 실험에 사용한 버섯 자실체 및 균사체의 혈전분해활성 비교한 결과 자실체의 경우 1.17~3.17 Plasmin unit/g 범위를 보였고 균사체의 경우는 활성을 전혀 보이지 않는 노루궁뎅이, *T. pulustris*, 표고, 운지, 상항버섯균을 제외하고는 대부분의 균사체에서 1.33~2.00 Plasmin unit/g 범위로 나타나 비록 균사체가 자실체보다 혈전분해활성은 약간 낮지만 유용자원 생산능력이 월등히 높기 때문에 혈전분해활성과 균사체 수율측면을 고려하여 혈전분해효소 생산용 우수한 균주로 뽕나무버섯균을 선정하였다.

마. 균사체 활용에 따른 경제적 효과

뽕나무버섯 균사체의 활용가치를 높이기 위하여 뽕나무버섯 균사체로부터 혈전용해효소의 생산성을 증대시키기 위하여 각종 생리활성이 있는 생약제를 대상으로 첨가하여 이들의 효과를 검토한 결과 가시 오갈피와 홍삼박 첨가구가 control에 비하여 mg 단백질당 혈전분해활성이 60% 이상의 활성증대효과를 보였다. 또한 각 첨가

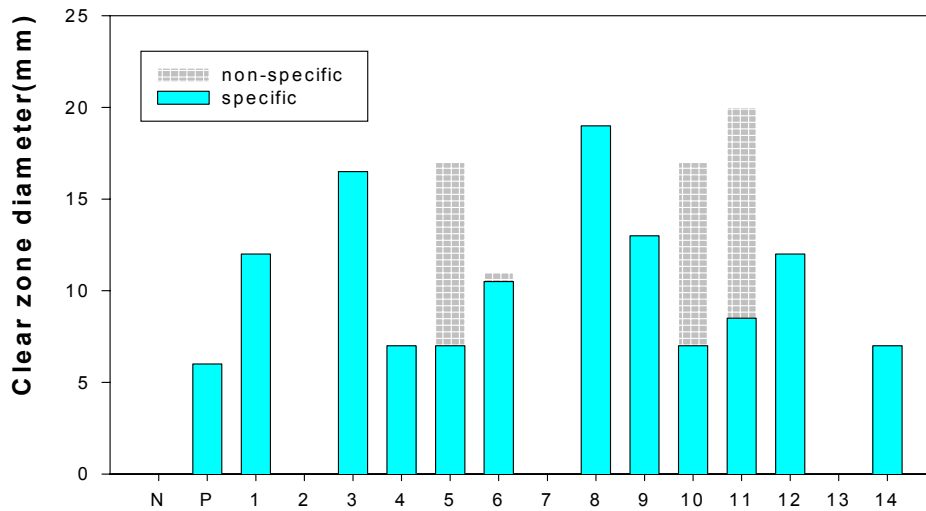
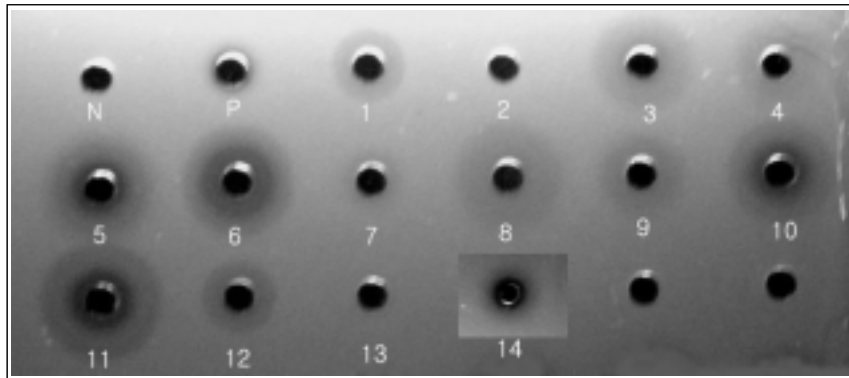


Fig. 1. The screening of fibrinolytic activity from mushroom culture medium crude extracts on 2% fibrin agarose plate. N; Autoclaved 3rd D.W as negative control, P; plasmin (10 μ g) as positive control, 1; *Coriolus versicolor*, 2; *Lentinus edodes*, 3; *Pleurotus eryngii*, 4; *Phellinus linteus*, 5; *Fomitella fraxinea*, 6; *Lyopyllum ulmarium*, 7; *Hericiium ernaceus*, 8; *Elfvigina applanata*, 9; *Ganoderma lucidum*, 10; *Pleurotus ostreatus*, 11; *Trametes trogii*, 12; *Tyromyces pulustris*, 13; *Inonotus obliqua*, 14; *Armillaria mellea*. It was incubated for 12 hrs at 37°C in 2% fibrin agarose plate.

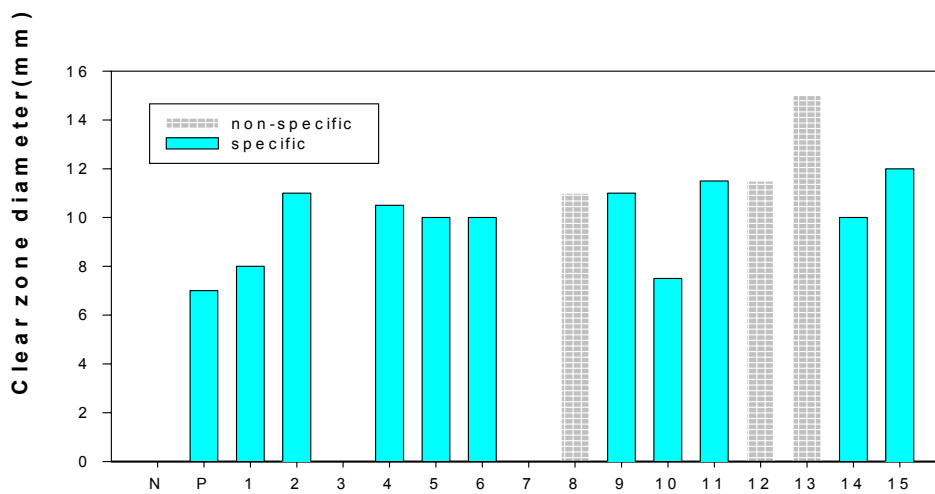
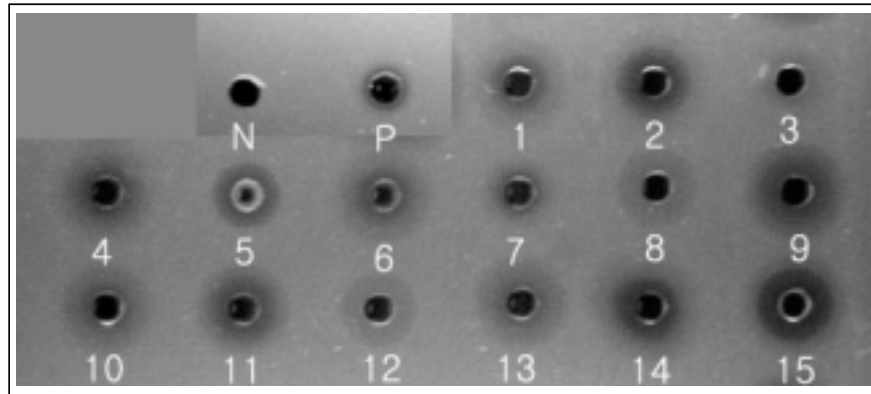


Fig. 2. The screening of fibrinolytic activity from cultured mycelium crude extracts on 2% fibrin agarose plate. N; Autoclaved 3rd D.W as negative control, P; plasmin (10 μ g) as positive control, 1; *Elfvigia applanata*, 2; *Fomitella fraxinea*, 3; *Lentinus edodes*, 4; *Trametes trogii*, 5; *Inonotus obliqua*, 6; *Pleurotus ostreatus*, 7; *Hericius ernaceus*, 8; *Tyromyces pulustris*, 9; *Lyopyllum ulmarium*, 10; *Pleurotus eryngii*, 11; *Ganoderma lucidum*, 12; *Coriolus versicolor*, 13; *Phellinus linteus*, 14; *Armillaria mellea* (control). 15; *Armillaria mellea*. (5% red ginseng waste). It was incubated for 12 hrs at 37°C in 2% fibrin agarose plate.

구별로 500 ml 배양액 중 균사체에서 생산 가능한 단백질 양을 기준으로 경제적 가치를 환산한 결과 가시오갈피, 상백피, 홍삼 첨가구 순으로 경제성이 높은 것으로 나타났다으나 옷피는 식품첨가물에 있어서 고려의 대상이 되며 오갈피 첨가구는 단백질 mg당 혈전분해 활성이 낮아 다량을 투여해야하는 문제점을 가지고 있다. 따라서 두 가지 요건을 충족하는 홍삼 첨가구를 활용하는 것이 타당하리라 사료된다.

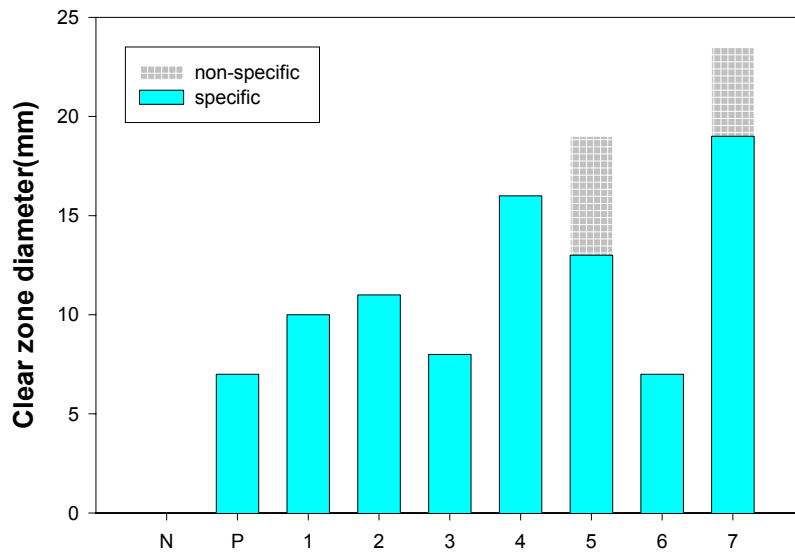
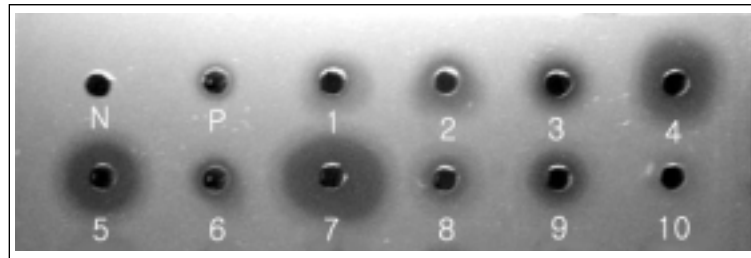


Fig. 3. The screening of fibrinolytic activity from cultured mushroom fruiting body crude extracts on 2% fibrin agarose plate. N; Autoclaved 3rd D.W as negative control, P; plasmin (10 μ g) as positive control, 1; *Flammulina velutipes*, 2; *Lentinus edodes*, 3; *Agaricus bisporus*, 4; *Pleurotus ostreatus*, 5; *Pleurotus eryngii*, 6; *Hericiium ernaceus*, 7; *Pleurotus ferulae*.

Table 1. Mycelial Yields from artificial cultivation of mushroom in liquid media.

Strain	Dry weight of mycelium (g/100 ml)
<i>Ganoderma lucidum</i>	2.37
<i>Hericiium ernaceus</i>	1.65
<i>Elfvindingia applanata</i>	3.46
<i>Tyromyces pulustris</i>	1.42
<i>Fomitella fraxinea</i>	2.41
<i>Lyopyllum ulmarium</i>	2.91
<i>Pleurotus eryngii</i>	2.18
<i>Pleurotus ostreatus</i>	2.46
<i>Phellinus linteus</i>	1.61
<i>Inonotus obliqua</i>	1.45
<i>Lentinus edodes</i>	1.31
<i>Coriolus versicolor</i>	1.70
<i>Trametes trogii</i>	2.40
<i>Armillaria mellea</i>	6.80

<균사체 활용에 따른 경제적 효과>

	Protein 양		혈전분해활성		경제적 가치	
	a	b	c	d	원	달러(\$)
Control	11.996	46.092	0.44	20.17	927,602	713.54
5% 상백피	17.537	59.755	0.48	28.38	1,305,647	1004.34
5% 마	9.311	35.775	0.48	17.172	721,224	554.79
5% 옷피	12.453	31.52	0.70	22.06	1,014,944	780.73
5% 가지	12.738	27.735	0.71	19.55	899,446	691.88
5% 유근피	8.912	43.564	0.40	17.43	801,578	616.60
5% 홍삼	8.111	34.756	0.73	25.20	1,159,113	891.63
5% 뿌리	13.023	67.291	0.50	33.65	1,547,693	1190.53
Ge 100ppm	4.227	16.13	0.55	8.88	372,778	286.75
Se 50ppm	3.708	14.21	0.56	7.96	334,471	207.21

a: Protein (mg, 50~70% Ethanol)/ 50 g 생체량.

b: 동일한 배양액에서 생산 가능한 protein (mg, 50~70% Ethanol)/ 500 ml 배양액 중 균사체량.

c: mg 단백질당 혈전분해활성(plasmin unit/mg protein)

d. 500 ml 배양액에서 생산 가능한 혈전분해활성(plasmin unit/total protein in mycelium on produced 500 ml broth).

4. 적 요

가. 버섯균사 배양액을 이용한 혈전분해활성

14종의 버섯균을 액체배지 상에서 배양하고 배양여액의 혈전분해활성을 검토한 결과 표고, 노루궁뎅이, 차가버섯을 제외한 대부분의 버섯균들은 대조구인 Plasmin 보다 높았으며, 유용 균주로는 잔나비겉상, 새송이, 영지, 운지, *T. plustris*, 만가닥 버섯 등이었다.

나. 버섯 배양 균사체를 이용한 혈전분해활성

14종의 균주를 액체배지 상에서 배양하고 배양 균사체에서 혈전분해효소 활성을 검토한 결과 표고, 노루궁뎅이, *T. pulustris*, 운지, 상황버섯 균사체 추출물을 제외하고는 대조구인 Plasmin 보다 높았으며, 유용균주로는 영지, 장수, 만가닥, 토끼털송편, 뽕나무, 차가, 느타리버섯 등이었고, 뽕나무버섯 균사체의 경우는 홍삼박 5% 첨가구가 무첨가구에 비하여 60% 활성 증대 효과를 보였다.

다. 인공배양 버섯균 자실체를 이용한 혈전분해활성

인공배양된 버섯균의 자실체로부터 혈전분해 조효소를 추출하고 이 추출물을 대상으로 효소활성을 검토한 결과 아위, 느타리, 새송이버섯에서 높았다.

라. 혈전분해활성 유망버섯 선발

혈전분해활성을 기준으로 판단하였을 때 많은 종류의 버섯 자실체, 균사체, 배양여액 등이 활용 가능성이 있으나 생산수율 및 이용 효율성 면에서는 뽕나무버섯 균사체를 활용하는 것이 가장 효율적이었다.

제 2 절 뽕나무버섯 균사체로부터 혈전분해효소 정제 및 특성분석

1. 서 론

혈관이 손상되면 출혈이 일어나고 지혈과정이 뒤따르며 이 과정에서 형성된 혈소판과 섬유소 (Fibrin)의 응집체인 혈전 (Thrombus)은 지혈과정이 완결되고 손상된 부위의 조직이 재생되면 Plasminogen 활성화제인 Urokinase (UK), Tissue plasminogen activator (tPA), Streptokinase (SK)에 의해 Plasminogen이 활성화된 Plasmin에 의해 용해되어 혈관의 혈액은 다시 정상상태를 유지하게 된다. 만약 생성된 혈전이 체내에 과도하게 축적되거나 혈전용해 기작이 원활하게 작동하지 못할 경우 혈전증 (Thrombosis)을 유발하여 인체에 치명적인 손상을 줄 수도 있다. 이 혈전은 혈관을 따라 흐르며 뇌혈전증, 뇌출혈, 심부전증, 심장마비와 같은 혈관계 질환을 유발하는데 현대인의 사망원인 중 혈관계 질환에 의한 사망이 39 %를 차지하고 있어 혈관계 질환의 주원인 중 하나인 혈전을 분해하는 혈전분해제에 관한 관심이 점점 더 커지고 있다(Fig. 4).

임상에서 사용되어지고 있는 혈전분해제로는 UK, tPA, SK 등이 있으나 UK를 제외하고는 경구 투여를 할 수 없고 tPA의 경우 반감기가 짧은 단점이 있다. 이 분해제들은 투여 시 혈전에 대한 선택성이 적어 전신출혈이 발생하며 또한 가격이 비싼 단점이 있다. 기존에 사용되고 있는 UK를 제외한 혈전분해제들은 체내 Plasminogen 활성화시킴으로써 Plasmin으로 전환시키는 간접적인 방법으로 혈전을 용해하기 때문에 혈전을 직접 용해하는 새로운 혈전 분해제들이 요구되어지고 있다. 경제적이고 경구투여가 가능한 혈전증 치료제에 대한 연구가 다양하게 시도되고 있으며, 현재 경구투여가 가능한 혈전분해제로 지렁이(*Lumbricus lubellus*)이로부터 6가지의 혈전분해효소를 분리하였으며, 혈전을 직접 분해하는 효소를 뱀독으로부터 분리하였다 (Chai 등, 1995). 또한 한국과 일본을 중심으로 한 발효식품에서의 혈전

분해효소의 연구는 직접 섭취가 가능한 식품을 대상으로 하였다 (Park 등, 1995; Kim 등, 2000; Kim 등, 1999). 일본의 전통대두 발효식품인 Natto (Nattokinase)와 절임식품인 Shiokara (Katsuwokinase)에서 혈전분해효소 생산 균주를 분리하고 효소를 정제하였으며, 이의 경구투여 시 생체내의 혈전분해능을 높일 수 있다고 보고하였다. 우리나라에서도 일본의 Natto와 유사한 콩을 원료로 한 전통발효식품인 청국장에서 혈전분해능을 가진 *Bacillus* sp.로부터 혈전분해효소 분리 및 정제에 대한 많은 연구가 진행되었으며, 전통대두 발효식품인 된장으로부터 Natto와 청국장에서 분리한 균주에 비해 2~3 배 이상의 높은 혈전분해효소를 생산하는 균주를 분리하여 보고하였다 (Kim 등, 1996).

한편 버섯의 경우 간단한 요리로 직접섭취가 가능하므로 이에 대한 행되고 있으나, 주로 Metalloprotease (Doonana 등, 1999)와 항진균활성에 관한 연구 (Lee 등, 2000)가 많이 되었다. 한국산 버섯은 약 990여종이 분류되어 있으며, 이 중 100여종이 식용 가능한 버섯으로 확인되었고, Fibrin plate와 Fibrin zymography (Leber 등, 1997; Kim 등, 1998)을 이용하여 혈전분해능을 가진 버섯을 선발하고 활성의 특이성을 연구하였다.

현재 임상적으로 사용되어지고 있는 혈전분해제인 UK, SK, tPA 등은 Plasminogen 활성화제로 작용하여 Plasmin을 만드는데 관여할 뿐 아니라 혈소판응집을 강하게 억제하는 작용도 한다. 그러나 이 혈전분해제들은 활성은 크지만 Fibrin에 대한 선택성이 낮아 장기간 복용 시 용혈현상과 면역반응이 나타나는 것으로 알려져 있고 또한 가격이 매우 높은 단점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 버섯의 자실체 및 균사체로부터 혈전에 대한 선택성이 크고 Fibrin 분해활성이 높은 새로운 혈전분해물질에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 버섯류의 균사체 배양은 직접 섭취가 가능하고, 가격이 저렴하며, 대량생산할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

본 장에서는 협동연구기관인 익산대학으로부터 선정된 기능성 후보 약용버섯 중 균사배양이 우수하며, 혈전분해효과 및 생리활성 효과가 뛰어난 뽕나무버섯으로부터 혈전분해효소를 분리정제 후 특성을 분석하고자 한다. 본 장의 연구자료는 국내 약용버섯으로부터 혈전분해효소 유전자를 분리하여 이를 분자생물학적 방법을 이용

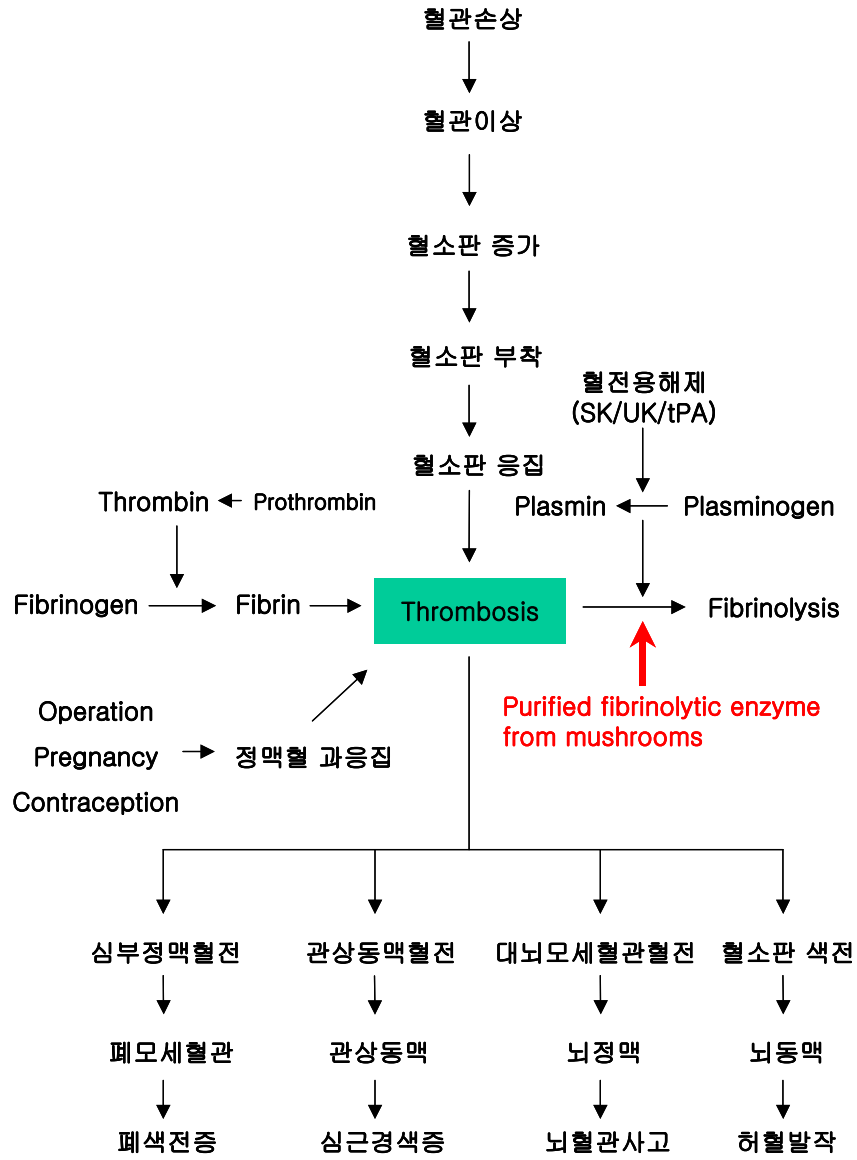


Fig. 4. The pathway of thrombosis and fibrinolysis

하여 대량생산으로 인한 저렴한 가격의 혈전분해제 및 체내 혈전예방제를 개발하기 위한 기초자료로 이용하고자 한다.

2. 재료 및 방법

가. 뽕나무버섯 균사체의 단백질분해활성 및 혈전분해활성 검색

1) 조추출물 조제

각 버섯 10 g을 동일한 양의 멸균수에 균질화하여 600×g에서 원심분리 후 상층액을 회수하여 조추출물로 사용함.

2) 단백질 분해활성 및 혈전분해활성 검색

가) 단백질분해활성 검색

멸균수에 0.3% skim milk 용액 5 ml에 동량의 2% Agarose 용액 5 ml을 첨가하여 혼합하여 1시간 동안 실온에서 고화시켜 Skim milk agarose plate를 제조하였다. 단백질 분해작용을 검색하기 위하여 Skim milk agarose plate에 지름 5 mm의 구멍을 만들어 각 버섯의 조추출물 10 μ g을 침적하고 37°C에서 12시간 반응시켜 생성된 투명대로 확인하고, 이때 효소 1 unit는 위의 반응조건에서 10 mm²의 투명대를 생성시키는 효소량으로 하였다.

나) Azocasein assay

혈전분해효소 활성측정은 Azocasein으로부터 Acid-soluble material 양을 측정함으로써 결정. 1% Azocasein (50 mM Tris-HCl, pH 7.0) 300 μ l에 각 분획 50 μ l를 넣고 37°C에서 20분간 배양시킨 후 ice-cold 10% (W/V) Trichloroacetic acid 600

μ 를 넣고 즉시 혼합하였다. 이 시료들을 10분 동안 얼음에 보관시킨 후 15,000 rpm, 4°C, 15분 동안 원심분리 시킨 후 상층액을 분리하여 OD₃₆₆에서 측정하여 단백질분해활성을 가지는 분획을 분리하였고, 혈전분해능을 확인하기 위하여 분리된 분획을 2% Fibrin agarose plate에 침적하여 혈전분해활성을 검색하였다.

다) 혈전분해활성 검색

Fibrinogen을 0.3%가 되도록 TN 완충용액 (50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.4)에 용해시킨 용액 5 ml에 동량의 2% Agarose 용액 5 ml을 첨가하여 혼합한 후, Thrombin (100 NIH unit/ml) 0.1 ml을 첨가하여 1시간 동안 실온에서 고화시켜 Fibrin agarose plate를 제조하였다. 혈전분해활성을 위해 Fibrin agarose plate에 지름 5 mm의 구멍을 만들어 각 버섯 추출액 시료 10 μ g를 침적하고 37°C에서 12 시간 반응하여 형성된 투명대를 확인함으로써 검색하였다.

나. 뿔나무버섯 균사체로부터 혈전분해효소 정제 및 특성분석

1) 시료

본 연구에 사용되어진 재료는 협동연구기관인 국립의산대학 식량자원학과 연구팀에 의해 우수한 균주로 선정된 뿔나무버섯균 (*Armillaria mellea*)의 균사체를 맥아 배지상에서 대량배양한 것을 시료로 사용하였다.

2) 조단백질 분리

뿔나무버섯균사체 (*Armillaria mellea* mycelium) 100 g을 동일한 양의 멸균수로 균질화하여 5,000 rpm, 4°C에서 원심분리 후 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액에 -70°C로 처리된 동량의 100% 에탄올을 천천히 가하며 최종적으로 에탄올 농도를 50%로 적정하여 1시간 동안 4°C에서 교반하여 5,000 rpm, 0°C에서 30분간 원심분리 후 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액에 -70°C로 처리된 동량의 100% 에탄올을

천천히 가하며 최종적으로 에탄올 농도를 75%로 적정하여 1시간 동안 4℃에서 교반하여 10,000 rpm, 0℃에서 30 분간 원심분리 후 형성된 침전물을 10 mM Citrate-NaOH pH 6.0 완충용액에 현탁하고, 불순물을 제거하기 위하여 10,000 rpm, 0℃, 10분간 원심분리하여 상층액을 회수 후 시료로 사용하였다.

3) 단백질 정량

효소의 단백질 정량은 Lowry 등 (1951)의 방법에 의해 BCA 단백질정량 kit (Pierce co.)를 사용하여 UV/Vis-spectrophotometer (Pharmacia co.)를 이용하여 OD₅₆₂에서 측정하였으며, 표준시료로는 Bovine Serum Albumin (BSA)을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

4) 단백질 분리

가) Ion-exchange column chromatography

(1) Cation-exchange column chromatography

CM-cellulose를 0.1 N HCl과 0.1 N NaCl로 활성화를 시킨 후 10 mM Citrate-NaOH (pH 6.0) 완충용액으로 평형화시켜 지름 7×15 cm의 Column에 충전시킨 후 시료를 주입시켜 10~500 mM Citrate-NaOH (pH 6.0)의 농도구배를 형성하여 0.5 ml/min의 속도로 분획을 수집하였다.

(2) Anion-exchange column chromatography

FPLC system (Pharmacia co.)을 이용하여 DEAE-sephacel을 5×20 cm의 Column에 충전시켜 10 mM Citrate-NaOH (pH 6.0)완충용액으로 평형화시킨 후 각 버섯단백질을 주입시켜 0~1 M NaCl의 농도구배를 형성시켜 0.5 ml/min의 속도로 분획

을 수집하였다.

나) Gel filtration

Sephadex G-75 (Pharmacia co.)를 이용하여 1.5×120 cm의 Column에 충전시켜 10 mM Citrate-NaOH (pH 6.0) 완충용액으로 평형화시킨 후 활성분획 주입시켜 0.15 M NaCl이 포함되어있는 10 mM Citrate-NaOH (pH 6.0) 완충용액으로 0.5 ml/min의 속도로 분획을 수집하였다.

5) 활성 분획 분리

혈전분해효소 활성측정은 Azocasein으로부터 Acid-soluble material 양을 측정함으로써 결정하였다. 1% Azocasein (50 mM Tris-HCl, pH 7.0) 300 μ l에 각 분획 50 μ l를 넣고 37°C에서 20분간 배양시킨 후 ice-cold 10% (W/V) Trichloroacetic acid (TCA) 600 μ l를 넣고 즉시 혼합시켜 10분 동안 얼음에 보관시킨 후 15,000 rpm, 4°C, 15분 동안 원심분리 시킨 후 상층액을 분리하여 OD₃₆₆에서 측정하여 단백질분해활성을 가지는 분획을 분리하였고, 혈전분해능을 확인하기 위하여 분리된 분획을 2% Fibrin agarose plate에 침적하여 혈전분해활성을 검색하였다.

6) 혈전분해작용 및 활성 측정

단백질분해활성을 나타내는 분획을 50 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.4, 0.15 M NaCl포함)에 Fibrinogen을 최종농도 0.3%가 되도록 완전히 용해시킨 용액 5 ml에 동량의 2% Agarose 5 ml을 첨가하여 혼합하였다. 혼합한 용액에 Thrombin (100NIH unit/ml) 0.1 ml을 첨가하여 충분히 혼합한 후 1시간 동안 실온에서 고화시켜 Fibrin plate를 제조하여 Fibrin plate에 지름 5 mm의 구멍을 만들어 각 분획을 첨가하여 투명대가 형성된 분획을 취하여 10 K centricon (Amicon co.)으로 농축하였다. 농축된 각 시료를 단백질 정량을 하여 Fibrin plate에 첨가시키고 대조구로 정제된 혈전용해효소인 Plasmin 1 unit (Calbiochem co.)을 사용하였다. 추출액의 혈전분

해활성은 대조구의 용해면적에 대한 시료의 용해면적의 상대적인 비율로 환산하여 산출하였다.

7) 혈전분해효소의 분자량 측정

가) SDS-PAGE

정제된 뽕나무버섯 혈전분해단백질은 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 수행하여 분자량을 분석하였다. 12% Separating gel과 5% Stacking gel로 이루어진 SDS-PAGE에 활성분획 20 μ g과 5× Sample 완충용액 (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% Glycerol, 2% SDS, 14.4 mM β -mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol blue)과 혼합하여 100°C에서 5분간 중탕하여 전기영동을 수행하였으며, Pre-stained protein marker (BMA co.)를 사용하여 분자량을 확인하였고, 전기영동 된 Gel은 Coomassie blue R-250로 염색하였다.

나) Fibrin-zymography

SDS-fibrin zymography는 Fibrinogen 농도가 0.12% (W/V)가 되게 Polyacrylamide 용액에 혼합한 후 즉시 Thrombin (1 NIH unit/ml)을 첨가하여 제조한 12% Fibrin-polyacrylamide gel에서 수행하였다. 각 Lane에 시료 10 μ g의 단백질을 Loading한 후 10 mA의 일정한 전류를 걸어 전기영동을 실시한 다음 SDS에 의해 불활성화된 효소를 재활성화 시키기 위하여 gel을 2.5% Triton X-100을 포함한 Tris-HCl (50 mM, pH 7.4)에 gel을 30분간 침적하여 단백질을 활성화시킨 후 Triton X-100을 제거하기 위하여 멸균수로 15분씩 2회 세척을 하였다. 분획된 단백질의 혈전분해활성은 활성반응 완충용액 (200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃가 포함된 30 mM Tris-HCl pH 7.4)에 gel을 침적하여 37°C 항온기에서 12~15 시간 반응을 시켰다. Fibrin 분해능을 지닌 단백질 분획은 활성염색법에 의해 gel상의 fibrin을 분해하여 Coomassie blue R-250 염색결과 형성된 투명대로 활성을 확인

하였다 (Beber 등. 1997; Kim 등. 1998).

8) N-terminal Sequence analysis

정제된 뽕나무버섯 균사체 혈전분해효소는 SDS-PAGE 전기영동 후 PVDF membrane으로 transfer시킨 후 기초과학지원연구소 광주분소에 의뢰하여 N-terminal sequencing analysis를 수행하였다. Hewlett Packard(USA)사의 hewlett Packard hp241 protein sequencer (N+C)로 reading하여 단백질 아미노산서열을 분석하였다.

N-terminal sequence는 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BLAST에 등록되어있는 *Armillaria mellea* metalloendopeptidase (AMMEP) 아미노산 서열과 비교하였다.

9) *In vitro* 와 *in vivo*에서 혈전분해효과 검증

가) *In vitro*에서 혈전분해효과

Well plate에 50 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.4, 0.15 M NaCl포함)에 용해되어 있는 1 mg Fibrinogen과 Thrombin 1 unit를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 고화시킨 후 정제된 뽕나무버섯 혈전분해효소 10 μ g을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 5시간 동안 반응시킨 후 400배의 현미경하에서 관찰하였다.

나) *In vivo*에서 혈전분해효과

Diethyl ether로 Rat을 마취시키고, 복부 대동맥으로부터 채혈을 하였다. 채혈 시 항응고제로 ACD용액 (12.5 g Trisodium citrate dihydrate, 7.5 g Citric acid monohydrate, 10 g Glucose and up to 100 ml Water)을 사용하고 혈액과 1 : 6의 비율로 혼합한 후 150 \times g 에서 10분간 원심분리 후 상층의 혈소판풍부혈장 (PRP,

platelet rich plasma)를 취하여 다시 500×g에서 10분간 원심분리하여 혈소판 침전물을 얻어 세척완충용액 (11.9 mM NaHCO₃, 0.33 mM NaH₂PO₄, 163.3 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂, 11.2 mM α-D-Glucose, 2.0 mM EDTA, 0.35% Bovine serum albumin, pH 7.4)로 세척한 후 침전물을 현탁완충용액 (11.9 mM NaHCO₃, 0.33 mM NaH₂PO₄, 163.3 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂, 11.2 mM α-D-Glucose, 2.0 mM EDTA, pH 7.4)에 최종밀도를 5×10⁸/ml로 부유시킨 후 thrombin 1 unit를 첨가하여 실온에서 고화시킨 후 정제된 뽕나무버섯 혈전분해효소 10 μg을 첨가하여 37℃ 항온기에서 5시간 동안 반응시켜 400배의 현미경하에서 관찰하였다.

10) 혈전분해효소 특성분석

가) 금속이온에 대한 혈전분해효소 활성 측정

정제한 효소의 활성에 대한 금속이온의 영향을 알아보기 위해 CaCl₂, CoCl₂, ZnCl₂, CuSO₄, MgCl₂, FeCl₂, EDTA, PMSF를 각각 2 mM이 되도록 20 mM Tris-HCl (pH 7.0)에 첨가한 뒤, 같은 부피의 효소용액과 섞은 후 1시간 동안 37℃ 항온기에서 반응을 시킨 후 azocasein assay와 fibrin agarose plate를 수행하여 활성을 비교하였다.

나) pH에 대한 혈전분해효소 활성 측정

효소반응의 최적 pH를 검토하기 위해 정제된 혈전용해효소를 각 pH 완충용액에 가하여 37℃에서 1시간 반응시킨 후 효소활성을 비교하였다. 이때 사용한 완충용액은 혈전분해활성에 대한 영향을 최소화하기 위하여 0.5 M Glycin-HCl (pH 2~3), 0.5 M Acetate (pH 4~5), 0.5 M Tris-HCl (pH 6~8), 0.5 M Glycine-NaOH (pH 9~10) 완충용액을 사용하였으며, Azocasein assay와 Fibrin agarose plate를 수행하여 pH에 대한 혈전분해효소의 활성을 측정하였다.

다) 온도에 대한 혈전분해효소 활성 측정

분리된 단백질의 열안정성을 알아보기 위하여 효소액 0.1 ml을 30~80℃에서 1 시간 반응시킨 후 Azocasein assay와 Fibrin agarose plate를 수행하여 온도에 대한 혈전분해효소의 활성을 측정하였다.

라) 다양한 기질에 의한 혈전분해 특성 분석

단백질분해효소의 특성을 분석하기 위하여 다양한 Chromogenic substrate (Chromogenix co.)을 이용하여 Amidolytic activity를 측정하였다. 사용되어진 chromogenic substrate로는 Table 2와 같다.

활성화측정은 0.5 mM chromogenic substrate 에 정제된 혈전분해효소 1 μ g을 첨가하여 37℃에서 5 분간 반응시킨 후 ELISA Leader를 사용하여 405 nm에서 방출되어진 p-nitroaniline의 양을 측정하였다.

마) Fibrin 및 fibrinogen에 대한 혈전분해 특성분석

정제된 혈전분해효소의 Fibrin 및 Fibrinogen에 대한 혈전분해 특성을 분석하기 위하여 10 μ g의 Fibrinogen 및 10 μ g Fibrinogen에 Thrombin 0.1 unit를 처리하여 고화시킨 Fibrin에 정제된 혈전분해효소 10 μ g을 첨가하여 일정한 시간적 간격을 두고 37℃에서 반응시킨 후 SDS-PAGE를 이용하여 분해특성을 비교하였다.

다. 뽕나무버섯 균사체로부터 혈전분해효소 유전자 크로닝

1) 시 료

주관연구기관인 조선대학교 및 협동연구기관인 국립익산대학에서 균사체 대량배양 및 항혈전성이 우수한 균주로 선정된 뽕나무버섯균 (*Armillaria mellea*)의 균사체를 맥아배지상에서 대량배양한 것을 시료로 사용하였다.

Table 2. Chromogenic substrate

Chromogenic substrate	amino acid sequence	characteristics
S-2222	Bz-Ile-Glu-(OR)-Gly-Arg-pNA	for factor Xa
S-2288	H-D-Ile-Pro-Arg-pNA	for t-PA
S-2238	H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	for thrombin
S-2251	H-D-Val-Leu-Lys-pNA	for plasmin and streptokinase-activated plasminogen
S-2444	pyroGlu-Gly-Arg-pNA	for urokinase
S-2586	MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA • HCl	for chymotrypsin
S-2765	Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA • 2HCl	for factor Xa

2) Total RNA의 분리

Total RNA를 분리하기 위하여 모든 시약과 초자기구류는 DEPC (diethylpyrocarbonate)를 처리하였고, RNA는 TriZol reagent를 이용하여 분리하였다. 뽕나무버섯 균사체 50~100 mg에 TriZol reagent 1 ml을 첨가시키고 5~10분간 반응시켜 균질화한 후 0.2 ml Chloroform을 처리 후 혼합하여 실온에서 5분간 반응시켜 12,000×g로 4℃에서 15분간 원심분리한다. 상층액은 새로운 eppendorf tube에 옮겨 0.5 ml의 isopropyl alcohol을 처리 후 실온에서 10분간 반응시켜 12,000×g로 4℃에서 10분간 원심분리한 후, 75% 에탄올 1 ml을 첨가해 혼합하고 7,500×g로 원심분리하여 RNA pellet을 얻었다. 이 RNA pellet을 speed vacuum에서 건조시켰으며, RNase free-water에 녹여 -20℃에 보관하여 cDNA 합성에 이용하였다.

3) RT(Reverse Transcriptase) - PCR

뽕나무버섯 균사체로부터 추출된 RNA 2 µg을 사용하여 역전사 반응용액 [2 mM dNTPs, 10 units RNase inhibitor, 1 µl Oligo-dT (100 pmol), 3 units MMLV Reverse transcriptase]에서 역전사반응을 하였다.

4) 뽕나무버섯혈전분해효소 유전자에 대한 특이적 primer의 제작

NCBI에 등록되어있는 유전자은행을 검색하여 뽕나무버섯자실체 혈전유전자의 염기서열과 뽕나무버섯 균사체로부터 분리되어진 혈전분해효소의 N-terminal sequence를 비교분석하여 개시코돈 부위부터 종결 코돈 부위까지 PCR 수행할 수 있도록 각각 2부분으로 Primer를 제작하여 Bioneer 에 Primer합성 의뢰하였다(Fig. 5).

5) 뽕나무버섯균사체로부터 혈전분해효소 유전자 탐색

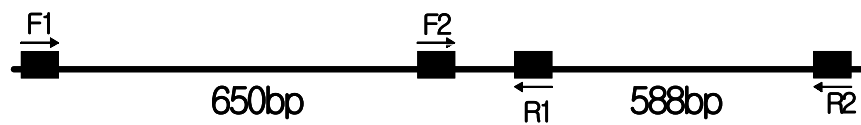
RT-PCR을 수행하여 획득되어진 cDNA는 제작한 Primer를 이용하여 94℃에서 5분간 반응시킨 후 Denaturation은 94.0℃에서 1분, Annealing은 52.0~63.0℃에서 1분, extension은 72.0℃에서 1분 30초간 35~40회 반복하여 72.0℃에서 5분간 반

응시켜 PCR을 수행한 후, PCR product는 1.0% Agarose gel에 전기영동하여 Ethidium-bromide (EtBr)로 염색한 후 확인하였다.

바. 유전자크로닝

Ligation은 Promega Co. (USA)의 방법에 따라 수행하였다. Ligation 반응액 10 μ l 내에 fresh PCR product, 2 \times ligation 완충용액(250 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 4 mM ATP) 5 μ l, pGEM-T easy vector(25 ng/ μ l) 1 μ l, T4 DNA ligase (3.0 Weiss units) 1 μ l, 멸균수를 첨가한 후 잘 혼합하여 실온에서 1시간 반응 후 혼합액을 형질전환 시켜 X-gal과 IPTG가 포함된 LB 배지에 도말하고 얻어진 clone를 LB 배지에 배양하여 제한효소를 통해 확인하였다 (Fig. 6).

형질전환은 Hanahan (1985) 방법에 의하여 숙주인 *E.coli* DH5a를 사용하였다. 적합세포 (competent cell)를 준비하기 위해 종 배양한 *E.coli* DH5a를 새로운 SOB 액체배지(2% bacto tryptone, 0.5% bacto yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, pH 6.8~7.0) 30~100 ml/l 플라스크에 접종하여 600 nm에서 OD가 0.3~0.5가 될 때까지 37°C에서 진탕 배양하였다. 배양액을 4°C에서 1,000 \times g로 15분 동안 원심분리하여 세포들을 모은 후 RF1용액(100 mM KCl, 50 mM MnCl₂ · 4H₂O, 30 mM KOAc, 10 mM CaCl₂ · 2H₂O, 15% glycerol, pH 5.8)의 1/3에 현탁시키고 15분 동안 얼음에 정치한 후 다시 4°C에서 1,000 \times g로 15분 동안 원심분리 하였다. 침전물에 RF2용액 (10 mM MOPS, 10 mM KCl, 75 mM CaCl₂ · 2H₂O, 15% glycerol, pH 6.8)의 1/12.5로 현탁시켜 15분 동안 얼음에 정치한 후 1.5



F1	5'-ATGTTCTCCCTCTCCTCTCGCTTCTTCTTG-3'
F2	5'-GACACGCAGCAGCATACCACTAAGATCAGC-3'
R1	5'- GACGAGAGGTAGTTATAAAGAGCTTTGGGCG-3'
R2	5'-AGATACATTTAAGACTGCGCAGGGTTGTTC-3'

Fig. 5. Produced PCR product size by oligonucleotides primers.

ml microfuge tube에 적당량을 분주한 후 액체질소나 dry ice/ethanol에서 신속하게 얼린 다음 -70℃에 보관하면서 형질전환에 사용하였다. Ligation 혼합액 10 μ l와 적합세포 100 μ l를 혼합하여 잘 섞은 후 30 분 동안 얼음에 정치하고 42℃에서 90 초 동안 heat shock 하였다. 곧바로 2~3 분 동안 얼음에 방치한 후 세포벽의 재생을 위하여 LB 액체배지 400 μ l를 가하여 수평으로 37℃에서 1시간 동안 225 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양한 세포를 50 μ g/ml Ampicillin, X-gal (20 mg/ml) 30 μ l, IPTG (20 mg/ml) 30 μ l가 함유된 LB 고체배지에 도말하여 37℃에서 하룻밤 동안 배양하여 흰색집락을 선별하였다.

형질전환체를 확인하기 위하여 선별한 흰색 집락을 50 μ g/ml Ampicillin이 함유된 LB 액체배지에 하룻밤 동안 배양한 후 배양액 1.5 ml을 집균하여 Alkaline lysis 방법 (Maniatis et al, 1989)에 의하여 재조합 플라스미드 DNA를 분리하였다. Vector에 삽입된 DNA가 정확히 삽입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 제한효소 *EcoR* I 으로 절단한 후 이것을 EtBr이 함유된 1.0% agarose gel에 전기영동 시킨 후 자외선을 조사하여 관찰하였다.

사. DNA Sequence analysis

클로닝된 vector는 T7 primer를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석은 기초과학지원연구소 광주분소에 의뢰하여 수행하였다. Perkin elmer (USA)사의 Automatic DNA sequencer (모델명:ABI PRISM 377)로 Reading하여 염기서열 해석 소프트웨어 SequencerTM (Gene Codes Inc. USA와 Hitachi software engineering Co., Ltd. Japan)을 이용하여 해석하였다. 염기서열 분석 결과는 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BLAST에서 *Armillaria mellea* metalloendo-peptidase (AMMEP) 염기서열과 비교하였다.

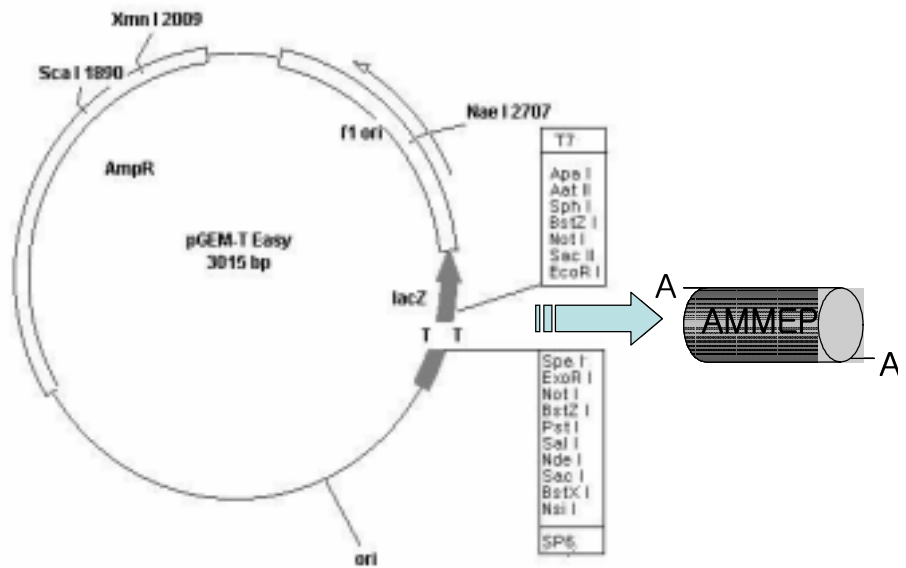


Fig. 6. Cloning strategy of pGEM-T Easy vector with AMMEP gene.

3. 결과 및 고찰

가. 뽕나무버섯 균사체의 단백질분해활성 및 혈전분해활성

1) 뽕나무버섯의 단백질분해활성

2% Skim milk agarose plate에 정량한 각 버섯추출물 10 μg 과 양성대조군으로 trypsin 10 μg 을 침적하고 37°C에서 12시간 동안 반응시켜 형성된 투명대로 단백질분해활성을 검색하였다. 이때 효소 1 unit는 위의 반응조건에서 10 mm²의 투명대를 생성시키는 효소량으로 하였다. 침적된 각 버섯추출물은 12시간 반응 후 투명대를 형성하였다. 따라서 이들 버섯추출물 내에 단백질 분해효소가 존재함을 확인하였고, 정제된 단백질 분해효소인 Trypsin은 0.5 unit/ μg , 0.48 unit/ μg 의 단백질분해활성을 나타내 단백질분해활성이 존재함을 확인하였다 (Fig. 7).

2) 뽕나무버섯의 혈전분해활성 검색

혈전분해효소는 단백질분해계열의 효소로 혈전분해활성을 검증하기 위해서는 단백질분해활성 검증이 선행되어야한다. 따라서 정량된 각 버섯단백질 추출물로부터 더욱 명확한 단백질분해활성을 검증하기 위하여 Azocasein assay를 수행하여 단백질분해활성을 검증한 결과 Fig. 7에서와 동일한 결과를 확인하였으며 (Fig. 8), 혈전형성의 주원인인 혈액 내 Fibrin에 대한 혈전분해작용을 검색하고자 정제된 Human fibrin을 이용하여 Fibrin agarose plate assay를 수행하였다. 각 버섯추출물 10 μg 을 침적시킨 후 12시간동안 37°C 항온기에서 반응하였으며, 혈전분해반응시간을 확인하기 위하여 1시간 별로 활성을 확인한 결과 Table 3에서 처럼 뽕나무버섯 추출물은 3시간 후에 투명대를 형성하여 Fibrin에 대한 특이적 분해능을 확인하였다. 따라서 버섯추출물을 가공하여 혈전증예방에 대한 기능성 식품 및 건강보조식품으로 개발이 가능할 것으로 사료된다.

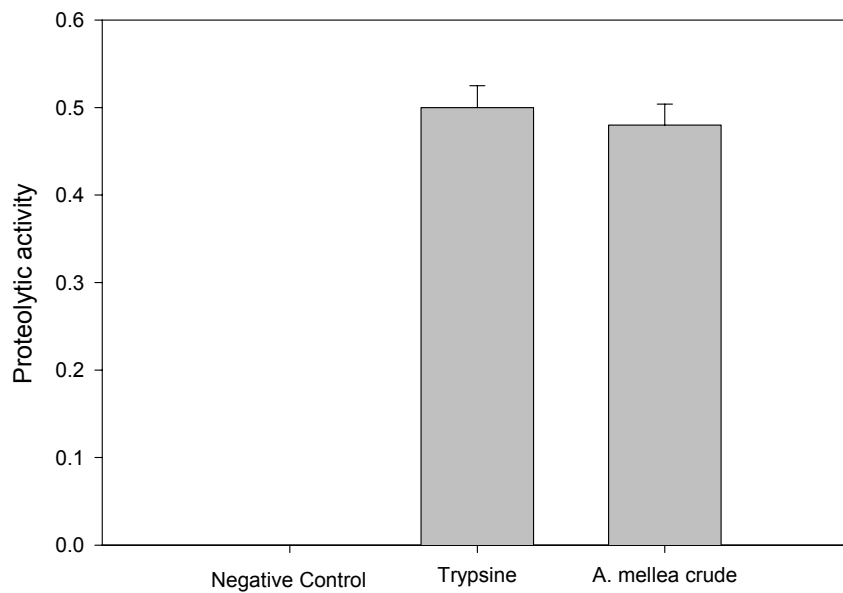


Fig. 7. The proteolytic activity of crude extracts on Skim milk agarose plate. Lane 1, Autoclaved 3rd D.W as negative control; lane 2, trypsin (10 μ g) as positive control; lane 3. *A. mellea* crude extract (10 μ g). It was incubated for 12 hrs at 37°C on Skim milk plate.

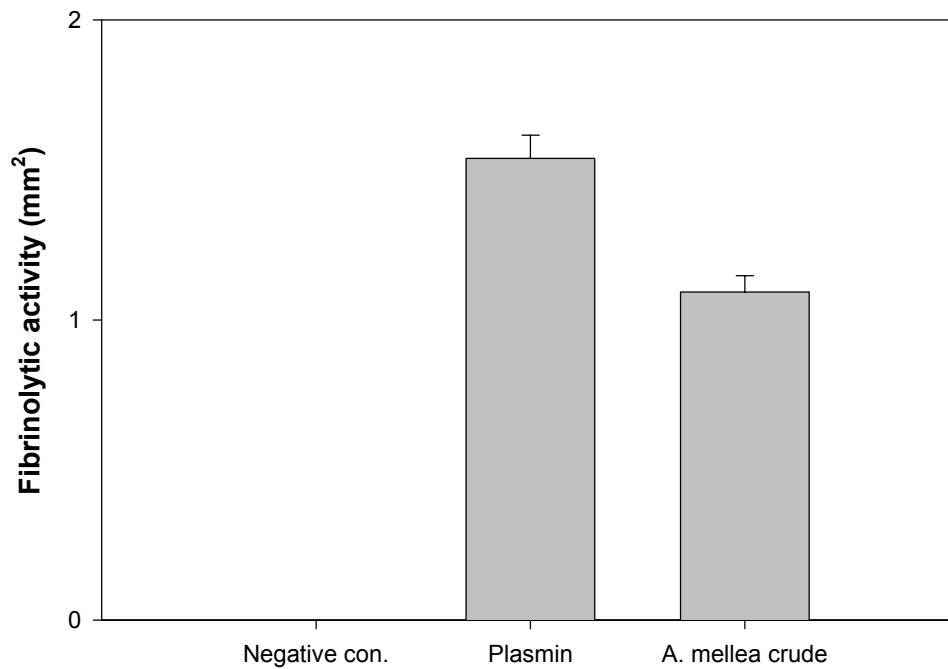


Fig. 8. Fibrinolytic activity of crude extracts on human fibrin agarose plate. Lane 1, Autoclaved 3rd D.W as negative control ; lane 2, Plasmin (1 unit) as positive control; lane 3. *A. mellea* crude extract (10 μ g). It was incubated for 12 hrs at 37°C on human fibrin agarose plaste.

Table 3. Time course of fibrinolysis on human fibrin plate.

Time (h)	Negative control	Plasmin	<i>A. mellea</i> curde
1	-	+	-
2	-	++	+/-
3	-	++	+
4	-	++	++

Human fibrinolysis by the *A. mellea* crude extracts with time. (-), no hydrolysis; (+/-), slight hydrolysis; (+), intermediate hydrolysis; (++) , full hydrolysis

나. 뽕나무버섯 균사체로부터 단백질 분리 정제

1) 에탄올 침전법에 의한 조단백질의 분리

모든 정제 과정은 4℃에서 수행하였으며, 안정적인 혈전분해효소 활성을 유지시키기 위하여 에탄올추출을 수행하였다. 혈전분해효소가 분리되어지는 에탄올 농도를 측정하기 위하여 50%, 70%, 85%로 에탄올 농도를 점진적으로 증가시켜서 분리된 단백질을 10 mM Citrate-NaOH (pH 6.0) 완충용액에 현탁하여 Azocasein assay 및 Fibrinolysis assay를 수행하였고, 단백질분해활성 1 unit는 OD₃₆₆에서 0.1의 값으로 정하였다. 뽕나무버섯의 혈전분해효소는 약 50~75% 에탄올 농도분획에서 4,124 unit로 가장 높은 수준의 단백질분해활성을 나타내었다 (Table 4). 따라서 에탄올 농도가 50~75% 사이에서 분획되어지는 침전물을 시료로 사용하였다.

2) 혈전분해효소의 정제

Anion-exchange chromatography를 수행하기 위하여 DEAE-sephadex를 이용하여 10 mM Citrate-NaOH (pH 6.0)으로 평형화한 후 0~1 M NaCl의 농도구배를 형성시켜 0.5 ml/min으로 분획하였으나, 결합이 이루어지지 않아 Cation-exchange chromatography를 수행하였다. CM-cellulose를 이용하여 뽕나무버섯균사체의 혈전분해효소를 정제하기 위하여 10~500 mM Citrate-NaOH (pH 6.0)의 농도구배를 형성하여 0.5 ml/min으로 분획을 수집하였으며, UV/Vis-spectrophotometer (Pharmacia co.)를 이용하여 OD₂₈₀에서 분광하여 단백질농도를 분석 후 각 분획의 혈전분해효소활성을 확인하기 위하여 Human fibrin plate에 각 분획을 점적하여 혈전분해활성을 확인하였다.

Fig. 9에 의한 결과로 뽕나무버섯 균사체의 혈전분해효소는 약 100~200 mM Citrate의 농도에서 분획되어짐을 확인하였고, 활성분획을 수집하여 Freezing-dry시킨 후 10 mM Citrate-NaOH (pH 6.0) 완충용액에서 투석 후 Gel filtration을 수행하였다. Sephadex G-75 column을 이용하여 뽕나무버섯 균사체로부터 혈전분해효

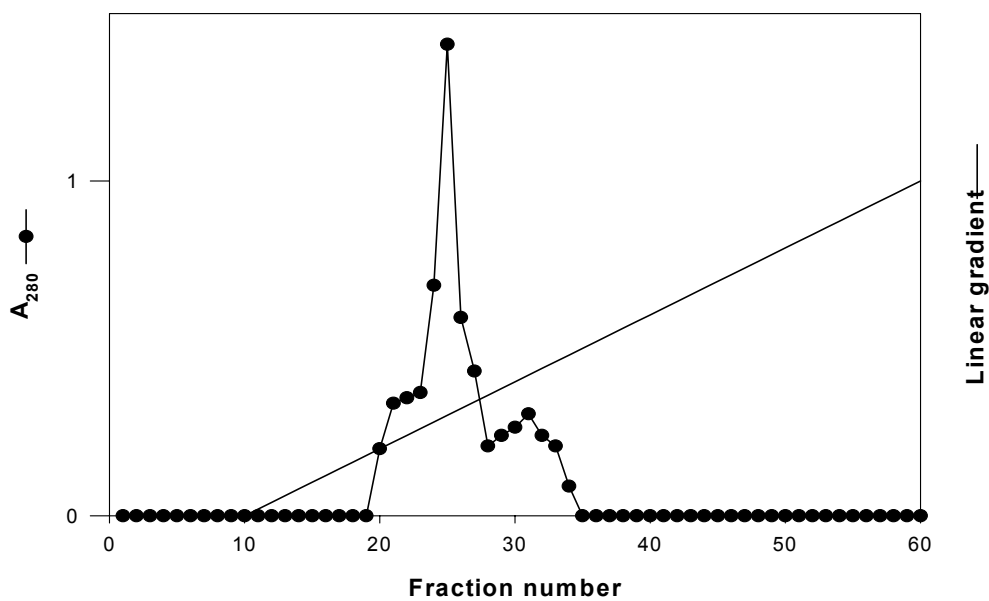


Fig. 9. Ion-exchange column chromatography of fibrinolytic enzyme from *A. mellea* mycelium on CM-cellulose. The protein sample was applied to the column (7×15 cm) equilibrated with 10 mM Citrate-NaOH buffer (pH 6.0). The protein was eluted with 10~500 mM Citrate-NaOH (pH 6.0) linear gradient at the flow rate of 0.5 ml/min at 4°C. The fraction volume was 5 ml.

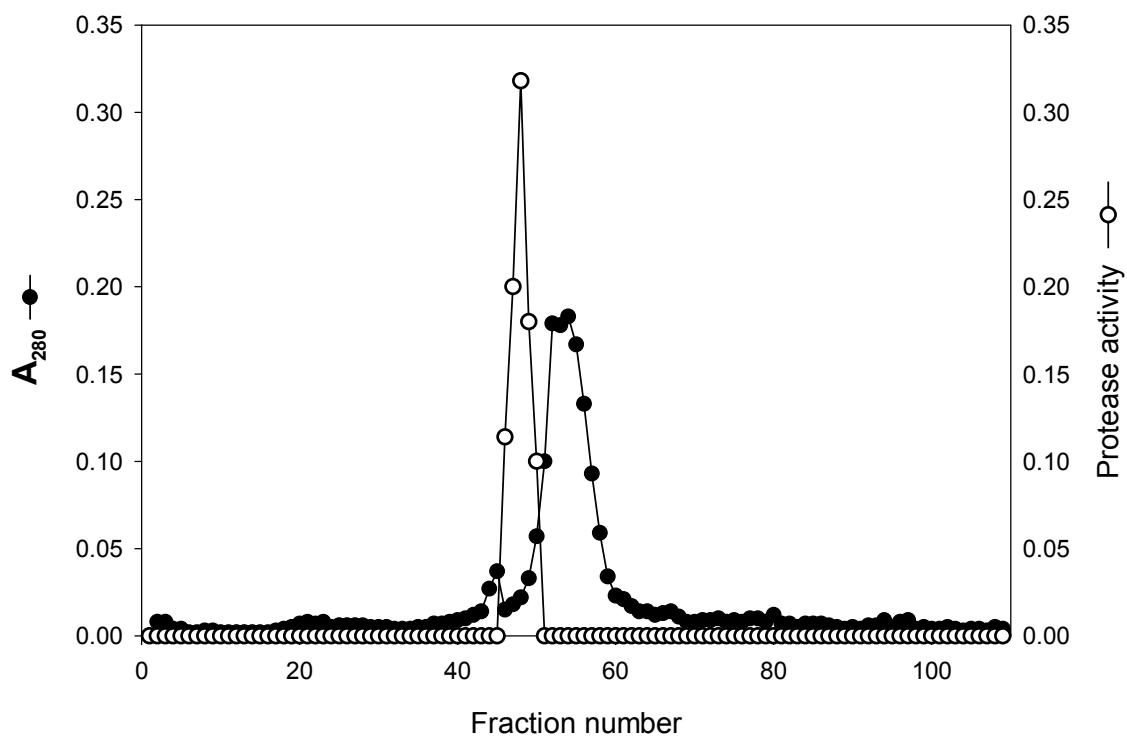


Fig. 10. Gel filtration of fibrinolytic enzyme from *A. mellea* mycelium on Sephadex G-75. The protein was eluted through the column (1.5×120 cm) equilibrated with 10 mM Citrate-NaOH (pH 6.0) buffer at the flow rate of 0.5 ml/min at 4°C. The fraction volume was 5 ml.

Table 4. Purified fibrinolytic enzyme activity yields from *A. mellea* mycelium

Step	Volume (ml)	Protein (mg)	Proteinase activity (units)	Specific activity (units/mg)	Recovery (%)	fold
Homogenate	624	n.d.	n.d.	-	-	-
Crude extract	400	4,141	7,247	1.75	(100)	(1)
Pellet	56	9.6	4,124	430	57	246
CM23 elute	15.6	4.08	1,848	453	25.5	259
Sepadex G-75 elute	3	0.96	812	846	11.2	483

Note. N.d., not determined. Proteinase activity was measured using the azocasein assay as described under Materials and Methods.

The enzyme assay for the fibrinolysis was carried out with 1% azocasein solution at 37°C for 20 min. The reaction was stopped by 10% trichloroacetic acid and stood for 10 min in ice. Then, it was centrifuged at 15,000×g for 10 min. The absorbance of the reaction mixture was measured at 366 nm. The enzyme unit was defined as the amount required to produce enough acid-soluble material from azocasein to yield an absorbance of 0.1 at 366 nm following a incubation at 37°C for 20 min.

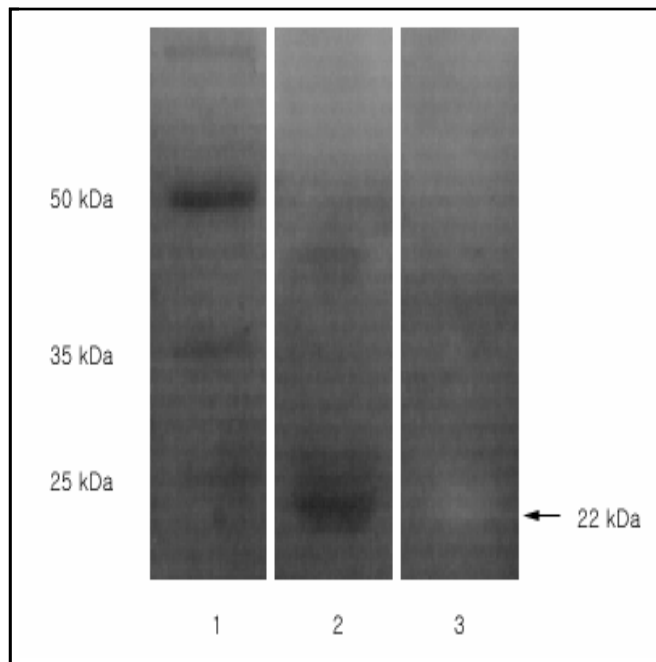


Fig. 11. PAGE of the fibrinolytic protease from *A. mellea* mycelium.

(A) SDS-electrophoresis was carried out in 10.5 % polyacrylamide gel. The protein in the gel was stained with Coomassie brilliant blue G-250.

(B) Fibrin-zymography was carried out in 10.5 % polyacrylamide gel containing 0.12 % fibrin. After immersion of the gel plate in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) to grade the fibrin, the fibrinolytic activity in the gel was revealed as a colorless band with blue background by Coomassie brilliant blue G-250. Lane 1 is protein standard marker, lane 2 is purified fibrinolytic protease from *A. mellea* mycelium, lane 3 is purified fibrinolytic protease on fibrin-zymography

Table 5. An alignment of the amino-terminal sequence of purified fibrinolytic enzyme of *A. mellea* mycelium with metalloendopeptidase of *A. mellea* fruiting body

<i>A. mellea</i> ¹⁾	M F S L S S R F F L Y T* L C L S A V A V
<i>A. mellea</i> ²⁾	M F S L S S R F F L Y S L C L S A V A V

1), Iksan National college

2), The comparison was carried out using Blast in National center for Biotechnology Information(NCBI). The amino acid sequence data reported in this report will appear in the amino acid sequence database under Accession No. AJ238718

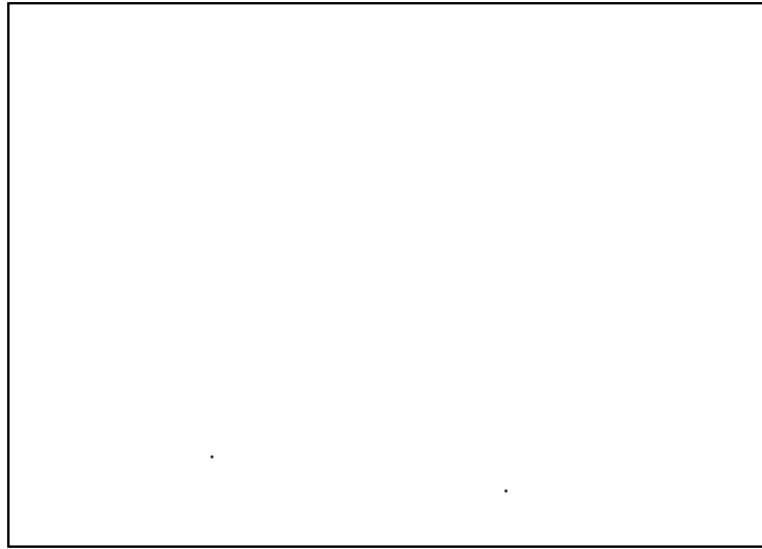


Fig. 12. The halo formed by fibrinolytic enzymes.

1, Plasmin 1 NIH unit ; 2, Purified fibrinolytic enzyme from *A. mellea* mycelium
10 μ g

소를 정제하여 약 483배의 효소량을 정제하였다(Fig. 10, Table 4).

정제후 혈전분해효소와 Plasmin 1 unit 활성을 비교하였다. 정제된 뽕나무버섯 균사체의 혈전분해효소 10 μ g을 human fibrin plate에 점적하여 혈전분해효소활성을 비교한 결과 약 2배의 혈전분해효소활성을 나타내고 있음을 확인하였다 (Fig. 12).

다. 정제된 혈전분해효소의 특성 분석

1) 정제된 혈전분해효소의 분자량 결정

뽕나무버섯 균사체로 분리정제된 혈전분해효소의 분자량을 측정하기 위하여 SDS-PAGE 및 Fibrin-zymography를 수행하였다. 뽕나무버섯 균사체로부터 분리정제된 혈전분해효소는 SDS-PAGE에서 약 22 kDa의 분자량을 나타내었으며, Fibrin-zymography에서도 약 22 kDa에서 투명대를 형성하였다(Fig. 11). 또한 정제되어진 뽕나무버섯 균사체의 혈전분해효소의 N-terminal sequence는 한국기초과학연구소광주분소에 의뢰하여 아미노산염기서열을 분석 후 미국 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에 등록되어있는 뽕나무버섯 자실체로부터 분리되어진 Metalloendopeptidase (AMMEP)의 아미노산 염기서열과 거의 일치함을 확인하였다 (Table 5). Metalloendopeptidase는 Lys 특이적 단백질 분해효소로 혈전분해효과를 가지고 있는 것으로 보고되었다. 따라서 뽕나무버섯 균사체에서 정제한 혈전분해효소가 뽕나무버섯 자실체에서 정제한 혈전분해효소와 동일한 혈전분해효소임을 확인하였으며, 차후 자실체의 생산보다 균사체를 이용한 혈전분해제의 대량생산이 가능하리라 사료되어진다.

위의 결과는 S. Doonan 등 (1999) 에 의하여 밝혀진 뽕나무버섯 자실체의 혈전분해효소가 약 18~20 kDa를 나타내는 것과는 약간 다른 결과를 나타내었다. 또한 혈전분해효소가 Fbrin-zymography와 SDS-PAGE 상에서 동일한 분자량을 나타냄에 따라 뽕나무버섯 균사체로부터 분리정제되어진 혈전분해효소는 단량체(Monomer)임을 확인하였다. 기존에 보고된 뱀독으로부터 정제된 혈전분해효소는 약 51 kDa

(Chung 등, 1992), 할미송이버섯 (84 kDa) 이외의 5종의 버섯으로부터 분리한 혈전 분해효소의 분자량이 54~61 kDa 사이로 뱀독 및 기타 버섯으로부터 분리된 혈전 분해효소와는 다른 효소임을 확인하였다. 특히 위의 결과에서 저 분자량의 혈전 분해효소는 분자량이 큰 혈전 분해효소에 비하여 임상학적으로 이용 시 peptide 성 단백질로 분류되어 구강투여가 가능하다는 장점을 가지고 있기 때문에 체내 혈전형성 예방 및 임상학적 혈전 분해제로의 개발이 가능하리라 사료되어진다.

2) 분리정제된 혈전 분해효소의 *in vitro* 와 *in vivo*에서 혈전 분해 효과 검증

In vitro 와 *in vivo*에서 혈전 분해 효과 검증하기 위하여 Fibrin 분해 작용을 검증하기 위한 *in vitro* test로서 Fibrinogen 용액 1 mg에 Thrombin 1 unit를 첨가하여 고화시킨 후 정제된 혈전 분해효소 10 μ g을 처리하여 37°C 항온기에서 5 시간 동안 반응시켜 Fibrin 응집 유무를 현미경 하에서 관찰하였다. Saline을 처리한 음성 대조군에는 Blinc 등 (2000)이 보고한 Fibrin의 현미경적 사진과 동일하게 그물모양으로 존재하였으며 (Fig. 13. I.A), Plasmin을 처리한 시료는 Fibrin이 용해되었다 (Fig. 13. I.B). 정제된 혈전 분해효소를 처리한 Lane에서는 Plasmin과 동일하게 Fibrin이 용해되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 13. I.C). 따라서 정제된 효소는 혈전에 의해 유발되어지는 질병 및 혈전형성 예방을 위한 기능성 식품 개발 가능성을 제시해 주고 있다.

또한 생체 내에 혈전 분해효소 투여 시 적혈구의 용혈 반응을 유발시킬 수 있다. 따라서 정제된 혈전 분해효소가 체내 투여 시 적혈구 용혈 반응 유무 및 특이적으로 혈전을 분해시키는지 여부를 확인하기 위하여 *in vivo* test를 위해 Rat의 혈액으로부터 분리한 PRP에 Thrombin을 처리하여 고화시킨 후 음성 대조군으로 Saline, 양성 대조군으로 Plasmin, 정제된 혈전 분해효소를 처리하여 혈전 분해 작용을 검증하였다. Saline을 처리한 음성 대조군에서는 적혈구와 Fibrin이 엉켜 혈전이 형성되었으며 (Fig. 13. II.A), Plasmin을 처리한 양성 대조군에서는 Fibrin이 용해되어 적혈구만 확인되어 Blinc 등 (2000)이 보고한 Plasma clot에서 혈전 분해와 동일한 결과를 확인할 수 있었다 (Fig. 13. II.B).

*in vitro*에서와 동일하게 정제된 혈전 분해효소제인 Plasmin은 혈액의 용혈 반응 없

이 체내 Fibrin에 대하여 특이적으로 분해되어짐을 확인 할 수 있었으며(Fig. 13. II.C), 뽕나무버섯 균사체로부터 분리정제한 혈전분해효소도 동일한 결과를 나타내고 있음을 확인하였다. 따라서 정제된 효소들은 섭취 및 투여 시 체내에서 일어날 수 있는 부작용 중의 하나인 국소적인 용혈현상을 최소화 할 것으로 사료된다.

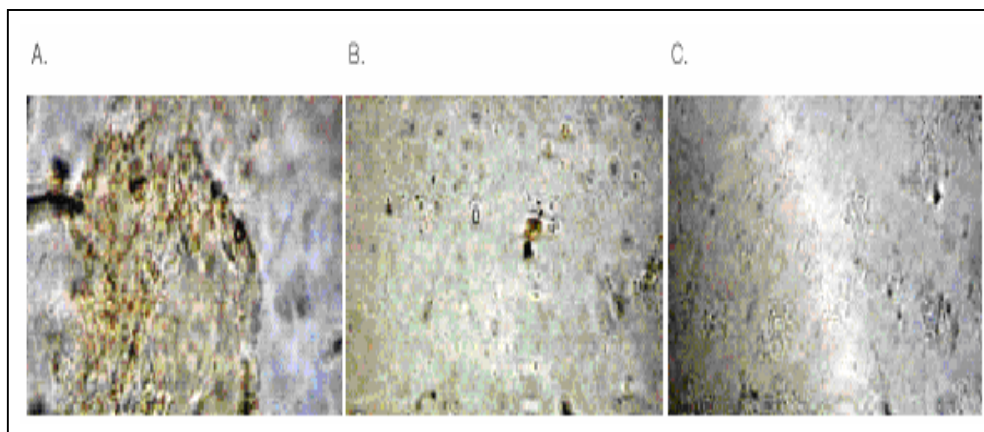
3) 금속이온 및 단백질분해효소 억제제에 대한 혈전분해효소 활성 측정

금속이온에 대한 혈전분해효소의 활성은 각각의 금속이온을 처리하여 Azocasein assay 및 Fibrin agarose plate를 수행하였다. 뽕나무버섯으로부터 정제된 혈전분해효소는 EDTA에 의해 활성이 저해되었고(Table 6) Mg^{2+} , Ca^{2+} 에 의해 활성화되었다(Table 7). 이는 뽕나무버섯균사체로부터 정제된 혈전분해효소는 metalloprotease 계열임을 확인하였으며, Doonan 등 (1999)이 보고한 뽕나무버섯자실체로부터 정제된 혈전분해효소와 동일한 결과임을 확인하였다. 그러나 Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} 등의 금속이온이 이온에 의해서는 약한 저해활성을 나타내었다.

4) pH 및 온도에 대한 혈전분해효소의 활성 측정

혈전분해효소반응의 최적 pH를 검토하기 위해 정제된 혈전용해효소를 각 pH 완충용액에 가하여 37℃에서 1 시간동안 반응시킨 후 Azocasein assay 및 Fibrin agarose plate를 수행하여 효소활성을 비교하였다. 분리된 혈전분해효소는 대부분 pH 5~pH 7에서 비교적 안정한 활성을 나타내었으며, 특히 pH 6.0에서 가장 높은 효소활성을 나타내었다. 그러나 pH 7.0 이상부터는 강력하게 효소활성이 저해됨을 확인하였다(Fig. 14). 분리된 뽕나무버섯균사체의 혈전분해효소의 열안정성을 알아보기 위하여 효소액 0.1 ml을 10℃ 간격으로 30~80℃에서 10분간 처리하여 Azocasein assay 및 Fibrin agarose plate를 수행하였다. 분리된 혈전분해효소들은 30℃ 이하에서 안정적인 효소활성을 나타내었으나, 30℃ 이상으로부터는 급격한 효소활성 억제를 나타내었다(Fig. 15).

I.



II.

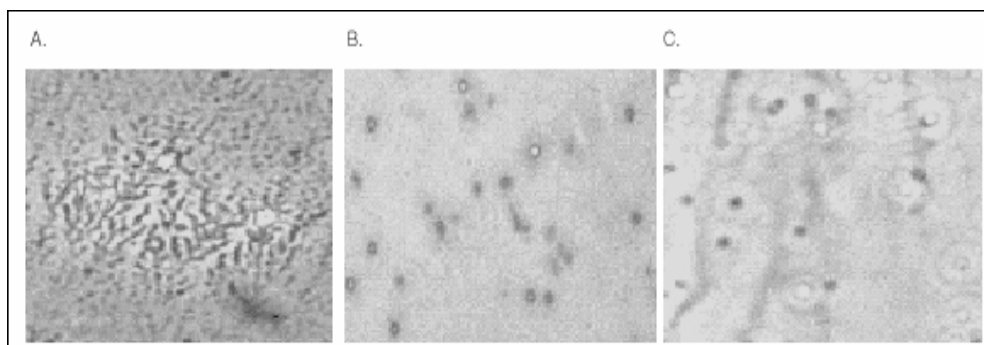


Fig. 13. Hydrolytic characterization of fibrin by fibrinolytic enzyme *in vivo* and *in vitro*. I. Hydrolysis of human fibrin by purified fibrinolytic enzyme from *A. mellea* mycelium. A, Negative control as Saline (20 μ l) ; B, Positive control as Plasmin (10 μ g) ; C, Purified enzyme from *A. mellea* mycelium (10 μ g)
II. Inhibitory effects of platelet aggregation of fibrinolytic enzyme in rat(\times 400). A, Negative control as Saline (20 μ l) ; B, Positive control as Plasmin (10 μ g) ; C, Purified enzyme from *A. mellea* mycelium (10 μ g)

미생물로부터 분리정제된 혈전분해효소 (Chen 등 2000, Heo 등 2001)과 할미송이버섯 (*Tricholoma asponaceum*)으로부터 분리정제된 혈전분해효소는 최적활성온도가 50~60℃로 보고되었다. 따라서 뽕나무버섯 균사체로부터 분리정제된 혈전분해효소는 인체에 투여 시 pH와 온도 측면에서 안정적인 효소활성을 나타냄에 따라, 혈전형성억제 및 분해 특이적 기능성식품의 재료로 적합할 것으로 사료되어진다.

5) 다양한 기질에 의한 혈전분해효소의 특성 분석

단백질분해 특성을 확인하기 위하여 Urokinase-like, Streptokinase-like, Plasmin-like, tPA-like, Factor Xa-like, Thrombin-like, 그리고 Chymotrypsin-like 등의 Chromic substrate를 구입하여 뽕나무버섯균사체로부터 분리정제된 혈전분해효소와 반응시켜 특성을 분석하였다. Chromogenic substrate 중 S2586인 Chymotrypsin-like substrate에서 가장 높은 반응을 나타내었다. 따라서 분리정제된 혈전분해효소는 Chymotrypsin 계열의 단백질 분해효소로 S2586의 MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA+H₂O에 분리정제된 분해효소가 작용하여 MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-OH+pNA로 작용하게 된다(Fig. 16).

6) Fibrin 및 fibrinogen에 대한 혈전분해 특성분석

가) 정제된 효소에 의한 Fibrin의 혈전분해 특성

Fibrin은 α , β , γ - γ 의 3개 단위체로 구성되어 있는 섬유상 단백질이다. 따라서 이러한 단위체들에 어떻게 혈전분해효소가 작용하는지를 일정한 시간적 간격으로 반응시켜 특성을 분석하였다. 뽕나무버섯 균사체로부터 분리정제된 혈전분해효소의 fibrin 분해특성은 최초 α 단위체를 시작으로, 4시간 이후부터는 β 단위체를 분해시키게 되지만, γ - γ 단위체는 반응 8시간까지 분해가 일어나지 않으나 12시간 이후에는 모든 단위체가 분해되어짐을 확인하였다. 따라서 뽕나무버섯균사체로 분리정제된 혈전분해효소가 fibrin을 α 단위체, β 단위체 마지막으로 γ - γ 단위체 순서로 가수분

Table 6. Effects of protease inhibitors on the activity of the fibrinolytic enzyme from *A. mellea* mycelium.

Protease inhibitors	Relative activity (%)
	1 mM
Control	100
PMSF	81.5
APMSF	89.2
EDTA	50.6
TLCK	88.9
TPCK	78.7

The enzyme was pre-incubated with various protease inhibitors on 10 mM Citrate-NaOH (pH 7.0) buffer for 1 hr at 37°C. After incubation, the mixture was subjected to the 1% azocasein assay. Results were expressed as percentage (%) relative activity to that of none.

Table 7. Effects of metal ions on the activity of the fibrinolytic enzyme from *A. mellea* mycelium.

metal ions	Relative activity (%)
	1 mM
Control	100
CuSO ₄	81.7
CoCl ₂	78.2
CaCl ₂	126.4
ZnCl ₂	86.3
FeCl ₂	87.5
MgCl ₂	118.2

The enzyme was pre-incubated with various metal ions on 10 mM Citrate-NaOH (pH 7.0) buffer for 1 hr at 37°C. After incubation, the mixture was subjected to the 1% azocasein assay. Results were expressed as percentage (%) relative activity to that of none.

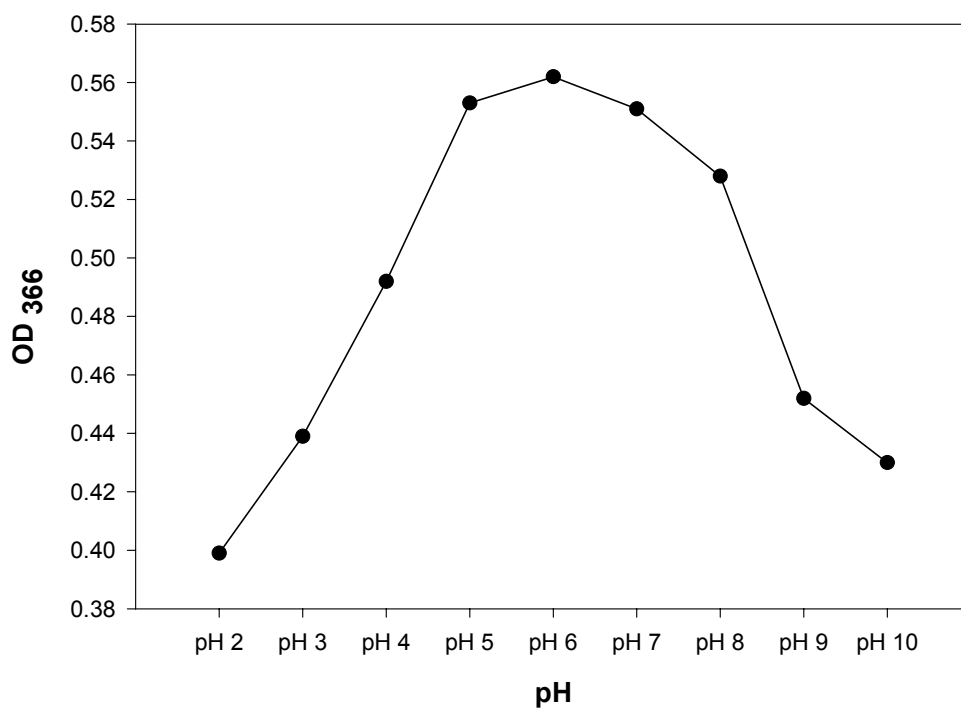


Fig. 14. Effect of pH on the activity of the fibrinolytic enzyme from *A. mellea* mycelium. The enzyme activity was assayed in the pH range of 2~10, respectively in 1% azocasein for 0.5 M Glycine-HCl (pH 2.0~3.0), 0.5 M Acetate (pH 4.0~5.0), 0.5 M Tris-HCl (pH 6.0~8.0), and 0.5 M Glycine-NaOH (pH 9.0~10.0) buffers. The enzyme activity was measured by incubating it for 20 min at the various pH values and 37°C.

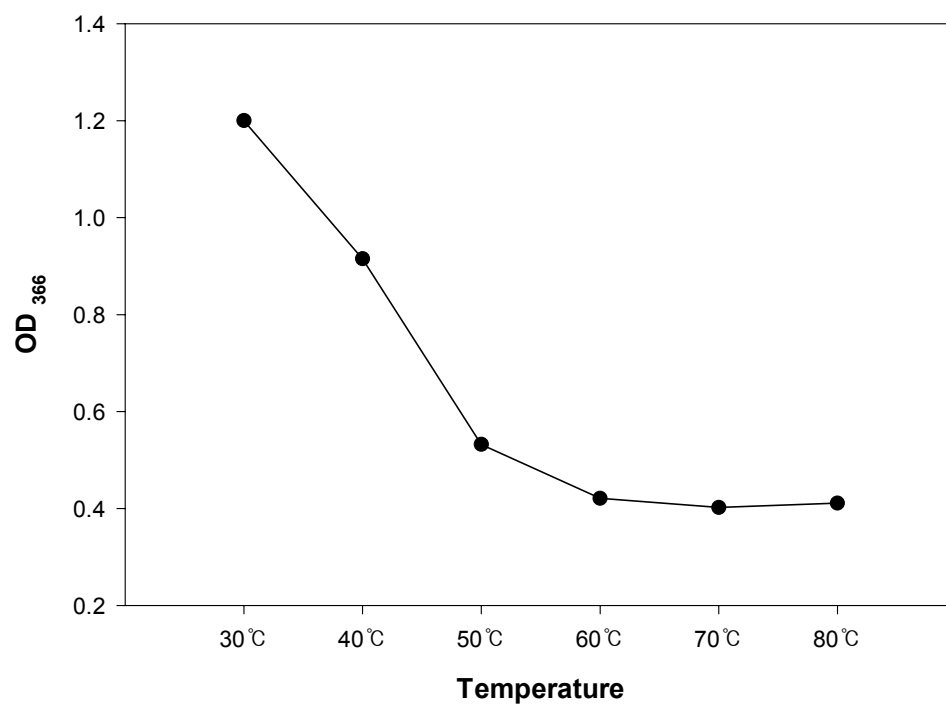


Fig. 15. Effect of temperature on the activity of the fibrinolytic enzyme from *A. mellea* mycelium. The enzyme activity was assayed various temperature of 30~80°C and pH 7.0 in 10 mM Citrate-NaOH (pH 7.0) buffer. The enzyme activity was measured by keeping it for 1 hr at the various temperatures and was performed azocasein assay.

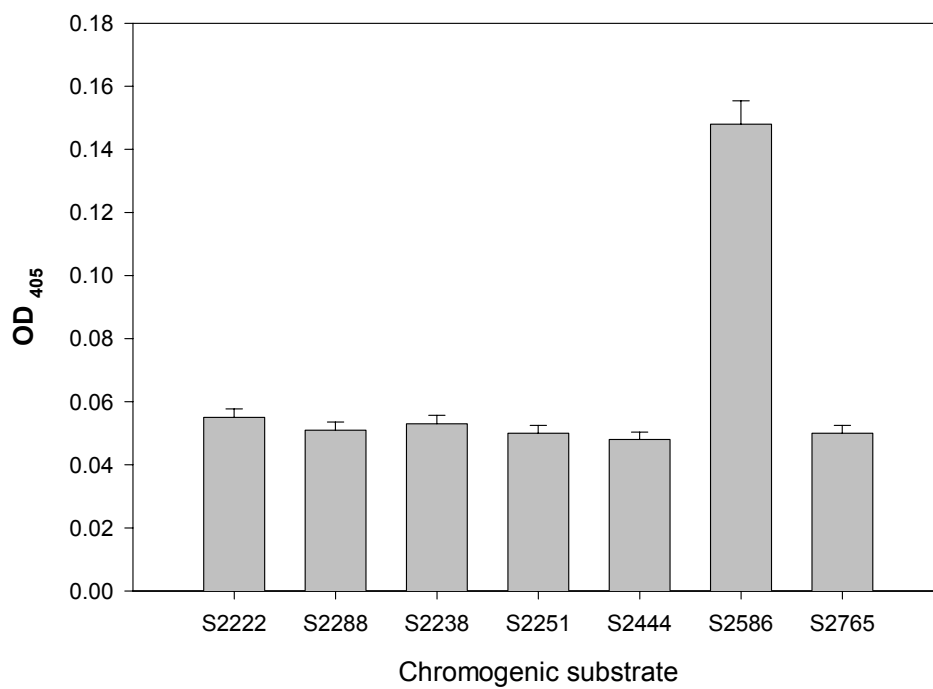


Fig. 16. Aminolytic activity on chromogenic substrate. Amidolytic activities were measured spectrophotometrically using the chromogenic protease substrates, such as S2222, S2288, S2238, S2251, S2444, S2586 and S2765.

해시킴을 확인하였다.

나) 정제된 효소에 의한 fibrinogen의 분해특성

Fibrinogen은 Thrombin에 의하여 Fibrin으로 전환되어진다. 최근 혈전분해효소 및 혈전제의 개발은 크게 3가지 방향으로 연구되어지고 있다. 첫 번째는 직접 Fibrin을 가수분해시키는 효소제의 개발, 두 번째는 Fibrin의 전구체인 Fibrinogen에 작용하는 Thrombin을 불활성화시키는 Antithrombin의 개발 마지막으로 세 번째는 체내 Plasminogen을 Plasmin으로 전환시키는 효소제의 개발이다. 따라서 본 연구에서 분리정제된 혈전분해효소가 Fibrin을 직접 가수분해시키는 작용외에도 어떠한 효과를 가지고 있는지를 확인하기 위하여 Fibrinogen에 대한 분해특성을 확인하여보았다(Fig. 17).

Fibrinogen은 A α , B β 그리고 γ 단위체로 구성되어있다. Fibrin의 분해특성과 동일하게 일정한 시간적 간격을 두고 Fibrinogen의 분해특성을 확인하였다. Fig. .에서와 같이 정제된 혈전분해효소는 Fibrinogen의 단위체들 중 A α 단위체에 대한 높은 단백질분해특이성을 나타냄을 확인할 수 있었으며, 약 4 시간 이후에는 A α 단위체가 분해되어짐을 확인할 수 있었다(Fig. 18).

라. 뿔나무버섯 균사체의 혈전분해효소 유전자 크로닝 및 염기서열분석

1) 뿔나무버섯 균사체의 혈전분해효소 유전자 크로닝

뿔나무버섯 균사체로부터 혈전분해효소 유전자를 크로닝하기 위하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 에 등록되어있는 *Armillaria mellea* 의 metalloendopeptidase의 유전자 염기서열과 정제된 혈전분해효소의 아미노산 염기서열을 기초로하여 제작된 sepcific primer를 이용하여 뿔나무버섯 균사체로부터 혈전분해효소 유전자를 크로닝하였다. F1-R1 (650 bp), F2-R2 (588 bp) 2부분으로 나누어 PCR을 수행하였다.

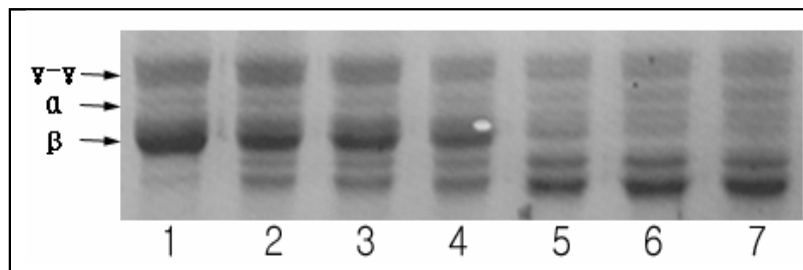


Fig. 17. Fibrinolysis pattern of fibrin by purified fibrinolytic enzyme from *A. mellea* mycelium with time. The enzyme was incubated with 10 μ g of fibrin in 10 mM Citrate-NaOH buffer (pH 7.0) at 37°C for up to 1 hr. Lane 1, Control; lane 2, after 5 min reaction; lane 3, after 10 min reaction; lane 4, after 15 min reaction; lane 5, after 30 min reaction; lane 6, after 1 hr.

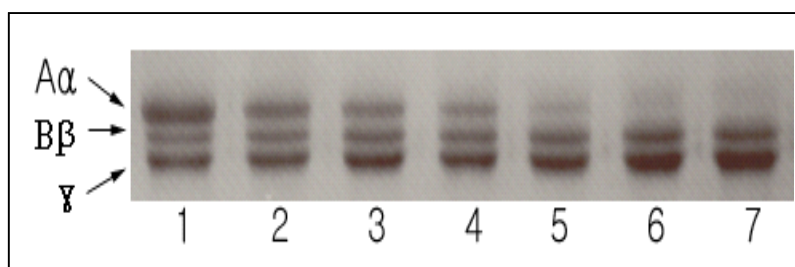


Fig. 18. Fibrinogenolysis pattern of fibrinogen by purified fibrinolytic enzyme from *A. mellea* mycelium with time. The enzyme was incubated with 10 μ g of fibrinogen in 10 mM Citrate-NaOH buffer (pH 7.0) at 37°C for up to 1 hr. Lane 1, Control; lane 2, after 5 min reaction; lane 3, after 10 min reaction; lane 4, after 15 min reaction; lane 5, after 30 min reaction; lane 6, after 1 hr reaction.

각각의 primer에 의해 합성된 2 종류의 단편은 94.0°C에서 5 분간 미리 변성시킨 후 94.0°C에서 1 분, 63.0°C에서 1 분, 72.0°C에서 1 분 30 초로 35 회 반복하고 72.0°C에서 5 분간 반응시켰다. 증폭된 단편을 1.0% agarose gel에 전기영동한 후 EtBr에 염색하여 UV에서 확인한 결과 각각의 F1-R1은 650 bp에서 확인되었고, F2-R2은 588 bp에서 확인되었다 (Fig. 19).

2) 뿔나무버섯 균사체의 혈전분해효소 유전자 염기서열분석

pGEM T-easy vector에 크로닝된 뿔나무버섯 균사체의 혈전분해효소 유전자(Fig. 20)는 한국기초과학연구소 광주분소에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다.

분석된 염기서열을 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Accession No. AJ238718 (*Armillaria mellea* mp gene for metalloendopeptidase) 염기서열 및 아미노산서열을 비교분석하였다. NCBI에 등록되어진 뿔나무버섯 혈전분해효소의 총 염기서열 1,056 bp로 352개의 아미노산으로 구성되어진 lys-specific metalloendopeptidase로 본 연구분석에서 얻어진 결과와 동일하였으며, 유전자상동성은 98%였다(Fig. 21, Fig. 22).

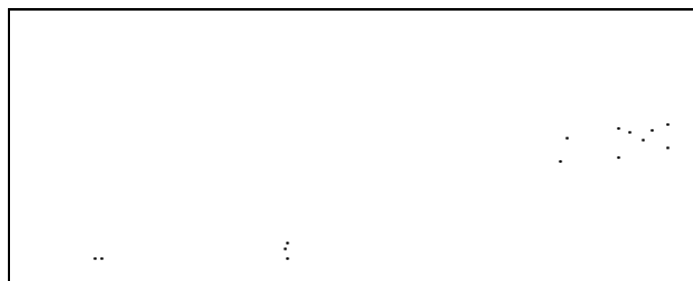


Fig. 19. The results of agarose gel electrophoresis of PCR product. M, marker; Lane 1, Produced 650 bp PCR product by F1 and R1 primers. ; Lane 2, Produced 588 bp PCR product by F2 and R2 primers.

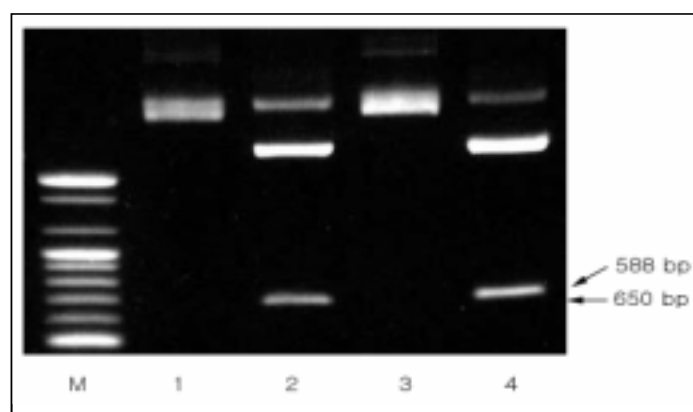


Fig. 20. Restriction enzyme digestion of the recombinant *Armillaria mellea* AMMEP gene. M, 100 bp ladder ; lane 1, recombinant plasmid of 650bp PCR product by F1-R1 primer ; lane 2, lane1 plasmid digested with *EcoRI* ; lane 3, recombinant plasmid of 588bp PCR product by F2-R2 primer ; lane 4, lane3 plasmid digested with *EcoRI*.

1												*	*				45
AM1	ATG	TTC	TCC	CTC	TCC	TCT	GGC	TTC	TTC	TTG	TAC	ACT	CTC	TGC	CTC		
AM2	ATG	TTC	TCC	CTC	TCC	TCT	GGC	TTC	TTC	TTG	TAC	TCC	CTC	TGC	CTC		
46												*	*			90	
AM1	TCC	GCG	GTC	GCT	GTA	TCC	GCC	GCC	CCG	GGG	CTT	TCC	CTC	TCA	CTT		
AM2	TCC	GCG	GTC	GCT	GTA	TCC	GCC	GCC	CCG	GGG	CTT	TCT	CTC	TCA	CTT		
91												*	*			135	
AM1	TCC	GGC	GCT	GAT	TCT	GTC	GTT	GAT	GTC	GAG	AAC	CTT	AAT	GTC	GCC		
AM2	TCC	GGT	GCT	GAT	TCT	GTC	GTT	GAT	GTC	GAG	AAT	CTT	AAT	GTC	GCC		
136												*	*			180	
AM1	GCG	ACT	CTC	ACT	AAC	ACC	GGT	GAC	ACG	ACA	ATG	AAG	ATC	CTT	AAC		
AM2	GCA	ACT	CTC	ACT	AAC	ACC	GGT	GAT	ACG	ACA	TTG	AAG	ATC	CTT	AAC		
181												*	*			225	
AM1	GAC	CCC	TCC	AGT	ATC	TTG	TOG	TOG	AAA	TTT	GCC	ACC	CAC	ACT	TTC		
AM2	GAC	CCC	TCC	AGT	ATC	TTG	TOG	TOG	AAA	TTT	GCC	ACC	CAC	ACT	TTC		
226												*	*			270	
AM1	GAC	ATC	AGC	AGC	GAA	AAT	GGG	TCC	CCC	GCT	TTC	ACT	GGT	GTC	AAG		
AM2	GAC	ATC	AGC	AGC	GAT	AAT	GGG	TCC	CCC	GCT	TTC	ACT	GGT	GTC	AAG		
271												*	*			315	
AM1	GTC	AAG	TAC	GAT	OCT	GAT	TAC	GTC	GTC	AAG	AAG	AAT	GCG	GAT	TCT		
AM2	GTC	AAG	TAC	GAT	OCT	AAC	TAC	GTC	GTC	AAG	AAG	AAT	GCG	GAT	TCT		
316												*	*			360	
AM1	TCC	TTT	ACG	GTC	CTC	GCA	CCG	GGT	GAA	TCT	GTC	ACC	GTC	AGC	CAT		
AM2	TCC	TTT	ACG	GTC	CTT	GCA	CCT	GGT	GAA	TCT	GTC	ACC	GTC	AAC	CAT		
361												*	*			405	
AM1	GCC	TTG	GCC	GCC	GCC	TAC	AAC	TTC	ACT	GGC	TCC	GGC	GCG	GCT	TCA		
AM2	GCC	TTG	GCC	GCT	GCC	TAC	AAC	TTC	ACT	GGC	TCT	GGC	GCA	GCA	TCA		
406												*	*			450	
AM1	TAT	AGC	ATC	GAG	OCT	TCT	AGC	CTC	TTC	TAT	TAT	GTC	GAT	CCC	GAC		
AM2	TAT	AGC	ATC	GAG	OCT	TCC	AGT	CTC	TTC	TAT	TAT	GTC	GAT	CCC	GAC		
451												*	*			495	
AM1	ACT	AGT	GAQ	CTC	CCC	AGC	ATC	AAC	GCA	GAC	ACG	CAQ	CAQ	CAT	ACC		
AM2	ACC	AAT	GAQ	CTC	CCC	AGC	ATC	AAC	GCC	GAC	ACG	CAQ	CAQ	CAT	ACC		
496												*	*			540	
AM1	ACT	AAG	ATC	AGC	GGT	AGG	CTC	GGC	GTC	GCT	CGC	CGC	TCT	AAC	TTC		
AM2	ACT	AAG	ATC	AGC	GGC	AGG	CTT	GGC	GTC	GCT	CGC	CGC	TCC	AAC	CTC		
541												*	*			585	
AM1	GGC	AAG	AGG	ATC	AGC	TAT	AAT	GGC	TGC	ACG	TCC	TCC	AGG	CGG	ACT		
AM2	GGT	AAG	AGG	ATC	AGC	TAT	AAT	GGC	TGC	ACG	TCC	TCC	AGG	CAG	ACC		
586												*	*			630	
AM1	ACC	CTC	GTT	TCG	OCT	OCT	OCT	OCT	GCC	CAG	ACC	TAC	GCC	CAA	GGC		
AM2	ACT	CTT	GTC	TCG	OCT	OCT	OCT	OCT	GCC	CAG	ACC	TAC	GCC	CAA	AGC		
631												*	*			675	
AM1	TCT	TAT	GAC	TAC	CTC	TOG	TOG	CAC	ADG	GCT	AGT	ACC	ACA	CGG	TAT		
AM2	TCT	TAT	AAC	TAC	CTC	TOG	TOG	CAC	ADG	GCC	AGT	ACC	ACG	CGA	TAT		
676												*	*			720	
AM1	GTC	ACC	TGG	TTC	GGA	ACC	TAC	ACC	AGC	GCC	CGC	CAC	TCC	ACC	ATC		
AM2	GTC	ACC	TGG	TTC	GGA	CCC	TAC	ACC	AGC	GCT	CGC	CAC	TCT	ACC	GTC		
721												*	*			765	
AM1	CTC	TCG	CAC	TAC	TCT	AAT	AGG	CTT	GCC	CAC	OCT	TAC	GCC	GAC	TAC		
AM2	CTC	TCG	TGC	TTC	TCC	AAT	ATG	CTT	GCC	TAC	OCT	TAC	GCT	AAC	TAC		
766												*	*			810	
AM1	GAA	TAC	GAC	TGT	ACT	TGT	ACC	GAG	TOC	GAC	GTC	TAC	GCC	TAT	GTT		
AM2	GAA	TAC	GAC	TGT	ACT	TGT	ACC	GAG	TOC	GAT	GTC	TAT	GCT	TAC	GTT		
811												*	*			855	
AM1	TAC	OCT	TCT	GGG	TTC	GGA	ACT	ATC	TAT	CTC	TGT	GGC	GTC	TTC	TGG		
AM2	TAC	OCT	TCT	CAG	TTC	GGA	ACT	ATC	TAT	CTC	TGC	GGC	GCC	TTC	TGG		
856												*	*			900	
AM1	CAG	ACC	ACC	ACT	ACT	GGG	ACC	GAC	TOC	AGG	GGT	GGA	ACT	TTG	ATC		
AM2	CAG	ACC	ACC	ACT	ACT	GGC	ACC	GAC	TOC	AGG	GGC	GGA	ACT	TTG	ATC		
901												*	*			945	
AM1	CAT	GAG	TCC	TCT	CAT	TTC	ADG	GTC	ATC	GGT	AGC	ACC	CAA	GAC	TAC		
AM2	CAC	GAG	TCC	TCT	CAC	TTC	ADG	ATC	ATC	TGT	GGT	ACC	CAA	GAC	TAC		
946												*	*			990	
AM1	GTC	TAC	GGT	CAG	AGC	TCA	GCC	AAG	TOC	CTC	GCC	TCG	AGC	AAC	CCC		
AM2	GCC	TAC	GGT	CAG	AGT	GCA	GCA	AAG	TOC	CTC	GCG	TCG	AGC	AAC	CCC		
991												*	*			1035	
AM1	AGC	GAG	GCC	ATC	GAG	AAC	GCT	GAC	AAC	CAT	GAA	TAT	TTC	GCA	GAG		
AM2	AGC	GAA	GCC	ATC	AAG	AAC	GCT	GAC	AAC	TAT	GAA	TAT	TTC	GCA	GAG		
1036												*	*			1056	
AM1	AAC	AAC	OCT	GCG	CAG	TCT	TAA										
AM2	AAC	AAC	OCT	GCG	CAG	TCT	TAA										

Fig. 21. Comparison of AMMEP gene nucleotide sequence from *A. mellea* Iksna national college (AM1) and *A. mellea* NCBI(AM2). Different sequence are designated by asterisks.

4. 적 요

전 세계 사망원인의 약 39%를 차지하고 있는 혈전질환관련의 질병은 최근 우리나라에서도 식생활의 서구화, 과도한 스트레스, 인구 고령화 등으로 인하여 더욱 증가되어지고 있는 추세이다. 그러나 임상에서 사용되어지고 있는 혈전분해제인 Streptokinase, Urokinase, Tissue specific plasminogen activator 등은 체내의 Plasminogen을 활성화시켜 Plasmin으로 전환시킴으로써 혈전을 제거시키게 된다. 따라서 혈전에 대한 낮은 특이성 및 반감기가 짧으며, 국소적인 출혈 또는 발열, 알러지 등의 다양한 부작용을 내포하고 있다. 따라서 최근 직접 혈전에 작용하고 부작용을 최소화시킬 수 있으며 저렴한 가격의 혈전분해제 개발 필요성이 대두되어지고 있다. 본 연구에서는 임상에서 사용되어지고 있는 혈전분해제의 단점을 보완할 수 있으면서 저렴한 가격으로 대량생산이 가능한 뽕나무버섯 균사체로부터 혈전분해효소를 분리 정제하여 체내 혈전형성 예방 효과 및 혈전분해효과에 대하여 분석하였다.

뽕나무버섯 균사체로부터 분리정제된 혈전분해효소는 약 22 kDa의 분자량을 가지고 있으며, EDTA에 의해 강력하게 활성이 저해되는 Metalloprotease 계열 및 Chymotrypsin 계열의 혈전분해효소로 확인되어졌다. 분리정제된 혈전분해효소는 pH 5.0~pH7.0에서 안정적인 효소반응을 나타내었고 특히 pH 6.0에서 가장 높은 효소반응을 나타내었다. 또한 안정적인 효소반응 온도는 약 30°C이며, 효소의 활성에 영향을 주는 금속이온으로는 Mg^{2+} , Ca^{2+} 로 나타났으며, 정제된 혈전분해효소는 Plasmin과 비교하여 2 배이상의 혈전분해효소활성을 나타내었다. *In vivo*와 *in vitro*에서 혈전분해를 확인하기 위하여 Fibrin과 Rat의 PRP에서 반응시킨 결과 Blinc 등 (2000)이 보고한 결과와 동일하게 Fibrin과 Rat의 PRP의 음성대조군에서는 fibrin섬유가 그물모양으로 얽혀있었고, Plasmin과 버섯으로부터 추출된 효소를 처리한 곳에서는 Fibrin섬유가 분해되어 있음을 현미경($\times 400$)하에서 확인 할 수 있었다. 또한 뽕나무버섯 균사체로부터 혈전분해효소 유전자를 크로닝하여 염기서열 및 아미노산서열을 분석하여 NCBI에 등록되어있는 뽕나무버섯 AMMEP 유전자 및 아미노산서열을 비교분석하여 본 결과 유전자의 크기는 1,056 bp로 염기서열 상동성은

약 98%를 차지하였으며 아미노산 서열 상동성은 99%의 상동성을 보였다. 따라서 뽕나무버섯 자실체와 뽕나무버섯 균사체에서 분리정제된 혈전분해효소가 99%이상 동일함을 확인하였다. 향후 혈전분해 관련 유전자 연구와 새로운 혈전분해물질에 대한 연구를 통하여 기능성 버섯류 개발과 인체 부작용을 최소화할 수 있는 새로운 혈전분해제 개발이 가능하리라 사료된다.

제 3 절 뽕나무버섯 균사체의 생리활성

1. 서 론

뽕나무버섯은 담자균류주름버섯목 송이과의 버섯과의 약용버섯으로 봄부터 가을에 걸쳐 활엽수, 침엽수의 나무 밑동, 고목 또는 생나무 뿌리에 기생하여 다발로 발생한다.

뽕나무버섯은 식용버섯인 동시에 뿌리썩음병을 일으키는 임목해균으로 이 균과 공생하는 천마는 고가의 한약재이고, 자실체인 뽕나무버섯은 옛날부터 우수한 야생 식용버섯으로서 재배가 유망한 버섯이다. 이 버섯은 야산에서 다발로 발생하고 수량이 많고, 약간 건성인 연질버섯이며 일광에도 쉽게 건조하므로, 인공재배에 적합한 조건을 갖추고 있다. 은은한 양과 씹는 맛은 우리 기호에도 적합하므로 소득작물로 재배가 가능하다. 뽕나무버섯 균은 기주식물과 자실체의 특징 등으로 생물학적 종이 분류되며, 보통 갓은 지름 5~15cm이다. 빛깔은 황갈색이며 갈색의 가늘고 비늘 모양의 털이 덮여 있으며 습할 때는 꿀 같은 끈끈한 물이 있다. 살은 백색이고 주름도 처음에 백색이나 담갈색으로 되며 자루에 바로 붙거나 약간 내려붙는다. 자루는 4~15cm×5~13mm이고 섬유질의 담황갈색이며 상부는 백색이고 하부는 진하며 백색의 섬유상 막질의 자루테가 있다. 포자는 타원형이며 포자무늬는 백색이다.

지구상에는 수천종에 이르는 버섯 (담자균과 자낭균류)이 자생되고 있으며, 유전 자원으로서의 가치가 크다. 바이오 기술의 도입이 기대되는 많은 버섯이 식품소재 (기능성식품)로서, 또 약품개발소재로서도 주목을 받고 있다. 그 중에서도 식용버섯은 최근, 식용전 정적인 특성이 있는 영양특성 (1차기능), 기호특성 (2차기능), 그리고 다음으로 식용후의 동적인 생체조절기능 특성 (3차기능)에 관여하는 성분의 질과 함량에 의해 평가되어 지고 있다. 지금 버섯은 저 칼로리 식품이고 특유의 향과 맛, 그리고 치감이 꽤 좋으므로 식품으로서의 선호도가 높다. 또한 버섯이 나타내는 생리특성 (약리 효과)으로서 생체방어 (면역부활), 생체항상성의 유지, 체조리듬의 조절, 질병회복 등, 더욱 암, 뇌졸중, 심장병 등의 성인병에 대한 예방과 개선효과가 지적되어지고 있다. 그밖에 특히 본 연구에서는 뽕나무버섯의 생체조절기능 특성인 섭

식 후에 발현되는 생리활성, 생체방어 (면역), 생체항상성의 유지, 노화방제, 성인병의 효과 등을 검증하게 되었다. 탈코레스테롤, 고지혈장개선, 항혈전, 혈압강하, 혈당강화, 노인성 치매증 개선 등에까지 여러 가지 유효한 성분이 증명되어있다.

따라서 건강지향식품 (기능식품)의 소재로서 주목받고, 여러 가지의 이용방법이 모색되어지고 있다. 특히 본 연구에서는 최근 급격한 고령인구 증가로 인하여 사회문제로 부각되고 있는 노인성 신경퇴행성 질환인 파킨슨씨병인 치매와 연계하여 연구를 진행하였다.

Tyrosine hydroxylase (TH)는 도파민 (Dopamine)의 전구체인 L-DOPA를 tyrosine으로부터 전환을 촉진하는 효소로 카테콜라민 생합성 경로의 첫 번째로 작용하는 Rate-limiting enzyme이다(Fig. 23). 카테콜라민 생합성에서 도파민은 노르에피네프린 (Norepineprine)과 에피네프린 (Epineprine)을 생성하는 전구체이다. TH는 카테콜라민 생합성경로의 활성화에 다양한 기작을 부여하며 카테콜라민을 생성하는 신경세포들의 활성화에 매우 중요한 역할을 하고 있다. 또한 TH는 카테콜라민성 신경세포에 고도의 특이적인 면역세포화학적 표지효소로 알려져 있으며 조직을 이용한 immunohisto chemistry를 실행한 TH의 형태학적인 연구가 활발히 진행되어졌다. TH는 주로 중추신경계 (CNS)인 Midbrain, 뇌간, Diencephalon, Retina와 Olfactory bulb에서 발현되고 Neural crest에서 발달한 말초신경계통 (PNS)인 Sympathetic ganglia와 Adrenal medullary chromaffin 세포에서도 발현된다 (chan-palay 등, 1984; kiss, 1987). 또한 TH는 Adrenal medullary tumor에서 기원한 Rat pheochromocytoma(PC) 세포인 PC12에서도 발현되어 (Greene 등, 1996) 연구되었다.

TH의 활성화는 퇴행성 질병과 관련이 있어 TH 유전자와 활성화에 대한 많은 연구되었다. TH의 활성화는 여러 가지 환경적, 생리적인 자극과 다양한 인자에 의해 영향을 받는데 주로 Glucocorticoid administration (Zhe 등, 1993), Drug administration, Cold / immobilization stress (Lee 등, 1996)와 같은 다양한 약리적, 생리적인 상태에 따라 변화된다. 특히 Reserpine (Nicole 등, 1986), Forskolin (Spyridon 등, 2001)은 rat brain과 PC12 세포에서 TH 효소를 유도 발현한다고 보고하였다. 그리고

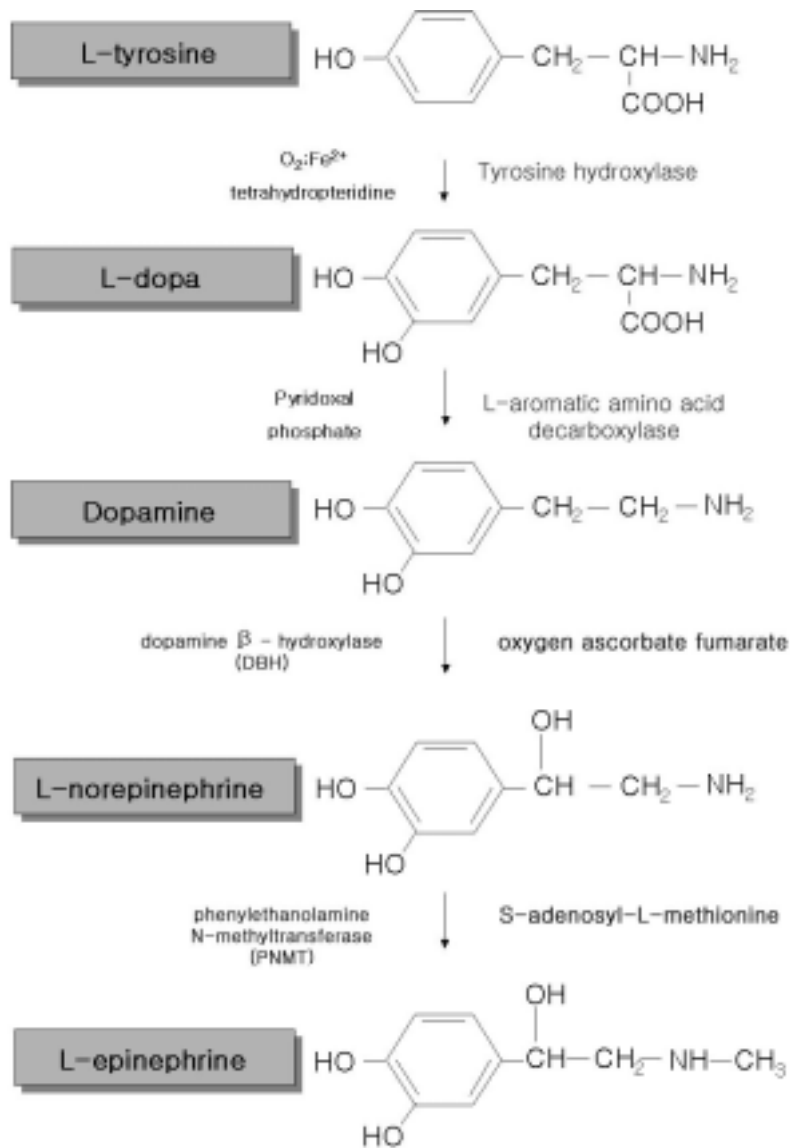


Fig. 23. The pathway of Catecholamine biosynthesis

neurotrophin의 일종인 BDNF (Spyridon 등, 2001; Lewis 등, 1987), NGF (Acheson 등, 1984)와 GDNF (Carl 등, 2000), EGF (Goodman 등, 1980; Lewis 등, 1987), cAMP (Kumakara 등, 1999; Lewis 등, 1993)에 의해 TH를 유도 발현한다고 보고 하였다.

뇌에서 카테콜라민 체계의 비정상적인 기능은 정신적인 질병과 연관된다. 특히 SN의 mesencephalic dopaminergic 신경세포는 신체 운동성 기능의 퇴행에 중요한 역할을 담당하고 있어 Parkinson's disease(PD)와 관련된다. 이러한 dopaminergic 신경세포의 활성화는 TH의 발현 양상에 따라 큰 영향을 받는다. PD는 계속적으로 진행되는 퇴행성 신경질환이며, 전형적인 신경적 형태는 striatum에서의 TH 및 다른 카테콜라민과 연관된 효소와 도파민이 결핍되거나 감소된다. (Birkmayer 등, 1989; Nagatsu, 1984; Riedere 등, 1989). 지금까지 가장 효과적인 PD의 치료법으로서 L-DOPA를 처리함으로 회복된다는 보고 (Weiner 등, 1980)가 있으나 이 도파민 치료는 지속적인 복용으로 인한 여러 side effect를 초래 (Obeso 등, 1989)하고 경제적인 손실이 크기 때문에 현재에는 TH나 L-DOPA의 유도생성에 대한 관심이 모아지고 있다. 또한 이를 생성할 수 있는 세포를 이식하는 방법 (Koji 등, 2000)들이 보고되어지고 있으나 효율성과 윤리적인 면에서 논쟁의 여지가 계속적으로 제기되고 있어 다른 치료법의 개발이 요구되어지고 있다.

따라서 본 연구에서는 뽕나무버섯 추출물에 의해 파킨슨씨병과 연관되어있는 dopamin 생합성과정 중 dopamin의 전구체인 L-DOPA를 생성시키는 tyrosine hydroxylase의 발현 유도 및 신경의 성장 및 생존에 연관되어있는 neurotrophic factor의 발현여부를 검증하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시 료

협동연구기관인 국립익산대에 의하여 국내에서 생산 및 자생되고 있는 약용버섯

중 인공대량배양이 가능하고 향후 우수한 기능성버섯으로 선별된 뽕나무버섯 균사체를 시료로 사용하였다.

나. 버섯 추출물 조제

유기용매인 에탄올과 메탄올에 7일간 침적하여 얻어지는 상층액을 evaporator를 이용하여 추출 및 농축시켜 사용하였다.

다. 실험동물

생후 6~8주된 약 150 g의 specific pathogenic free male sprague-dawely rat를 한국화학연구소 안정성 연구부로부터 구입하여 실험에 사용하였다. 사료와 물은 자유롭게 먹게 하며, 사육실의 온도는 21~24℃, 상대 습도는 40~60%로 유지한다. 또한 사육실의 밤과 낮이 12시간마다 반복되도록 조절하였다.

라. *A. mellea* 추출물의 투여

Rat과 Mouse 에 *A. mellea* 추출물(20 mg/kg)과 LPS(10 mg/kg) 복강과 경구를 통해 투여한 후 시간의 경과에 따라, 뇌 부위를 절단하고 뇌와 각 조직을 적출하였다.

마. Rat tissue로부터 total RNA 분리

조직 100 mg 당 0.5 ml의 GIT buffer solution (4 M Guanidium thiocyanate, 25 mM Sodium citrate, pH 7.0, 0.5% N-lauroyl sarcosine, 0.1 M β-mercaptoethanol)을 첨가하여 4℃에서 homogenizer로 조직을 파쇄한 후 2 M sodium acetate(pH 4.0) 0.5 ml을 첨가하여 30초간 vortex하였다. 그리고 chloroform 100 μl를 첨가하여 20초간 vortex한 후 얼음에서 15분간 반응시킨 후 4℃에서 12,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 새로운 tube에 옮기고 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20℃에서 1시간 이상 정치시킨다. 반응 후, 4℃에서 12,000 rpm으로 20분간 원심분리하여

얻은 pellet을 75% 에탄올로 세척한 후, 4,500 rpm으로 4℃에서 5분간 원심분리하여 얻은 pellet을 건조시키고 RNase free water에 현탁하여 -20℃에 보관하여 사용하였다.

바. RT(reverse transcriptase)-PCR 및 specific primer

쥐의 뇌에서 추출한 RNA를 각각 2 μ g를 사용하여 역전사 반응용액 [2 mM dNTPS, 10 units RNase inhibitor, 1 μ l Oligo-dT (100 pmol), 15 units AMV Reverse transcriptase]에서 역전사 반응을 하였다. 각각 얻어진 sample의 cDNA를 Specific primer (Table 3)를 제작하여 PCR (Alison M. Comer and Hannah M. Gibbons, 1999; Alison M. Comer and Jianguo Qi, 1998)을 수행한 후 PCR product는 1.2~1.5% Agarose gel에 전기영동한 후 Ethidium-bromide로 염색하여 Neurotrophic factor, Cytokine, Tyrosine-hydroxylase gene의 발현을 확인하였다.

사. Immunohistochemistry

Rat은 흉부를 절개한 후 심장의 정맥을 이용해 PBS로 체내의 혈액을 제거한 뒤 4% Paraformaldehyde로 관류 고정하였다. 고정된 쥐 뇌와 위를 적출하고 microcryocut를 이용하여 3~5 μ m두께의 동결절편을 제작하였다. 준비된 뇌와 위 절편은 PBS로 여러 번 씻어주었다. 30% hydrogen peroxide로 전처리하여 씻어준 후 vectastain ABC kit의 normal goat serum을 0.5% BSA/PBS에 섞어 1시간동안 반응시켜 비특이적 단백질의 결합을 막았다. TH primary 항체와 0.5% BSA/PBS (1:10000) 희석하여 실온에서 1시간에서 2시간 정도 반응시켰다. Sample을 PBS로 3번 씻은 후, 이차 항체 (biotinylated anti-rabbit IgG in 1% BSA/ PBS)를 이용하여 1시간 동안 반응시킨 다음 1% BSA/ PBS로 두 번 씻어냈다. 사용하기 30분 전에 vectastain ABC kit (1:50)를 희석하여 50분 동안 반응시킨 후 PBS로 2번 씻고, 50 ml DAB 용액과 0.2 M PB 용액에 30% hydrogen peroxide 12 μ l를 첨가한 용액으로 5분간 염색시켜 0.1 M PB로 5분간 반응을 동시에 정지시킨 다음, 광학 현미경으로 관찰하였다. 그리고 위에서의 세포 counting은 각각 처리된 4 개의 염색된 절

Table 8. Oligonucleotide primers for PCR used in this study.

Gene	Forward primer	Reverse primer
GDNF	5'-AGCTGCCAGCCAGAGAATT-3'	5'-GATACATCCACACCGTTAG-3'
BDNF	5'-ACCAGGTGAGAAGAGTGA-3'	5'-CCACTATCTTCCCCTT-3'
TH	5'-GCTGTCACGTCCCCAAGGTT-3'	5'-AAGCGCACAAAATACTCCAGG-3'
IL-18	5'-ATGGCTGCCATGTCAGAAGA-3'	5'-GTAGGTTATCATAAGGCTCG-3'
β -actin	5'-CCTCTATGCCAACACAGT-3'	5'-AGCCACCAATCCACACAG-3'

* Abbreviation : GDNF, Glial Derived Neurotrophic Factor ; BDNF, Brain Derived Neurotrophic Factor ; TH, Tyrosine-Hydroxylase ; IL-18, Interleukin-18

편을 선택하여 $\times 400$ 에서 전 층을 대상으로 조직절편의 단위면적당 TH가 발현된 세포의 수를 측정하였고 계수 결과는 윌콕슨의 순위합 검정 (Wilcoxon rank sum test)를 이용하였다.

아. 다양한 배지조성물에 의한 뽕나무버섯의 항산화효과 검증

분리된 조효소액의 SOD 활성도를 측정하기 위해 시료 20 μg 을 열처리하지 않은 상태에서 SDS가 첨가되지 않은 9% Native-PAGE에서 30 mA로 전기영동을 실시하였다. SOD의 활성도 측정은 Beauchamp 등 (1971)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 0.05 M KH_2PO_4 (pH 7.8), 1×10^{-4} M EDTA, 2.45×10^{-3} M NBT를 포함한 용액에서 20분 동안 1차 염색을 실시한 후 0.05M KH_2PO_4 (pH 7.8), 1×10^{-4} M EDTA, 28 mM TEMED, 2.8×10^{-5} M ribvoflavin 용액에서 15분 동안 2차 염색을 실시하여 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 신경영양인자 발현 유도 검증

신경퇴행성 질환은 흑색질의 신경세포가 계속적으로 사멸함으로써 진행성으로 증세가 악화되는 신경계 질환이다. 신경성장인자 (Nerve growth factor, NGF), 뇌유래 신경영양인자 (Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF)을 포함한 각종의 신경영양인자 (Neurotrophic Factor)가 알려져 있다. 이들 신경영양인자는 파킨슨병, 알츠하이머병, 헌팅톤병, 척수축색경화증 (ALS) 등의 신경변성질환의 동물모델에서 변성, 또는 사멸하는 신경세포를 구제하고 그 생존을 촉진한다고 보고되어 있다. 따라서 본 연구과제에서는 도파민성 신경세포의 생존에 필요한 신경성장인자를 버섯추출물을 투여함으로써 신경영양인자를 생산하는 세포로부터 유도발현을 확인하고자 하였다.

1) Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

신경세포의 생존 및 분화에 관여하는 Neurotrophic Factor인 Brain Derived neurotrophic factor (BDNF)는 돼지의 뇌에서 처음으로 분리되어졌으며(Brade 등, 1982), Neuron 및 척추신경생존에 관여하는 신경영양인자로 알려져 있다. 따라서 최근 고령화사회로 변화되어감에 따라 신경퇴행성 질병인 Parkinson's disease(PD), Alzheimer disease(AD) 등 신경세포의 사멸에 의해 유도되어지는 질병에 대한 치료제 및 예방제로써 연구되어지고 있는 물질 중의 하나이다. 본 연구에서는 뽕나무버섯 균사체 추출물을 처리하여 유도되어지는 BDNF를 검증하였다.

BDNF mRNA의 발현수준은 뇌의 전부분에서 발현되어지지만 가장 높은 수준으로 발현되는 부분은 뇌의 해마 내에서 발견 (Ernfors 등, 1990)되어지므로 본 연구에서도 쥐뇌의 해마부분으로부터 mRNA를 분리하여 그 발현을 확인하였다(Fig.).

뽕나무버섯 균사체 추출물에 의한 BDNF의 발현은 2~4시간에서 발현이 유도되어짐을 확인하였으며 (Fig. 25), 투여량에 따른 BDNF의 발현은 20 mg/kg에서 가장

높은 수준으로 발현됨을 확인 할 수 있었다 (Fig. 24).

따라서 뽕나무버섯 균사체 추출물이 뇌에서 BDNF를 발현유도시킴으로 신경퇴행성 질병에 관련된 특정 신경세포들의 생존을 보호하고 퇴행성 뇌질환에 대한 예방 및 치료효과를 나타낼 것으로 사료되어진다.

2) Tyrosine-Hydroxylase gene(TH)과 Glial Derived Neurotrophic Factor (GDNF)

신경영양인자 가운데서 최근에 주목을 받고 있는 것이 신경교세포종양유래 신경영양인자(GDNF, glial derived neurotrophic factor)이다. GDNF는 TGF 그룹에 속하며, Neurturin과 함께 GPI-linked 수용체에 결합하여, Receptor tyrosine kinase이며 proto-oncogene인 c-ret를 활성화시킨다고 알려졌으나 그 정확한 기작은 아직 확실하지 않다 (Trupp 등., 1996). GDNF 는 1993년 흰쥐 신경교세포의 종세포주인 B49 라인의 조건배양액에서 분리되었으며, 분자량 50 kDa의 단백질로서 흰쥐의 중뇌 흑질의 도파민성 신경세포의 배양중에서의 생존을 증진시킨다 (Lin 등., 1993).

GDNF는 이밖에도 척수전각운동 신경세포 (Henderson 등., 1994) 말초감각신경세포 (Zurn 등., 1994), 교감신경절신경세포 (Buj-Bello 등., 1995), 후뇌의 노르아드레날린성 신경세포 (Beck 등., 1995)의 생존과 재생을 촉진시킨다고 보고되었다.

따라서 GDNF 단백질을 주입하여 그 효력이 지속적이지 못한 문제점을 극복하기 위하여, GDNF 유전자치료법에 의해 GDNF 생산세포를 중뇌 혹은 선조체 부위에 주입하면 지속적으로 GDNF가 생산되어서 도파민성 신경세포의 생존과 재생을 실질적으로 촉진시킬 수 있을 것이다. 이는 GDNF가 Dopaminergic neuron과 같은 신경세포 전달물질을 자극하여 dopamine 생합성유도에 관여하는 TH (Molinoff 등., 1971)의 활성화에 관여한다고 보고되었다(Carl 등., 2000).

본 연구에서 Tyrosine-Hydroxylase (TH) mRNA는 뽕나무버섯 균사체 추출물을 10 mg/kg, 20 mg/kg 그리고 40 mg/kg을 처리한 결과 10 mg/kg에서 가장 높은 발현을 유도시켰으나, 20~40 mg/kg을 투여한 실험군에서도 높은 발현율을 나타내었다

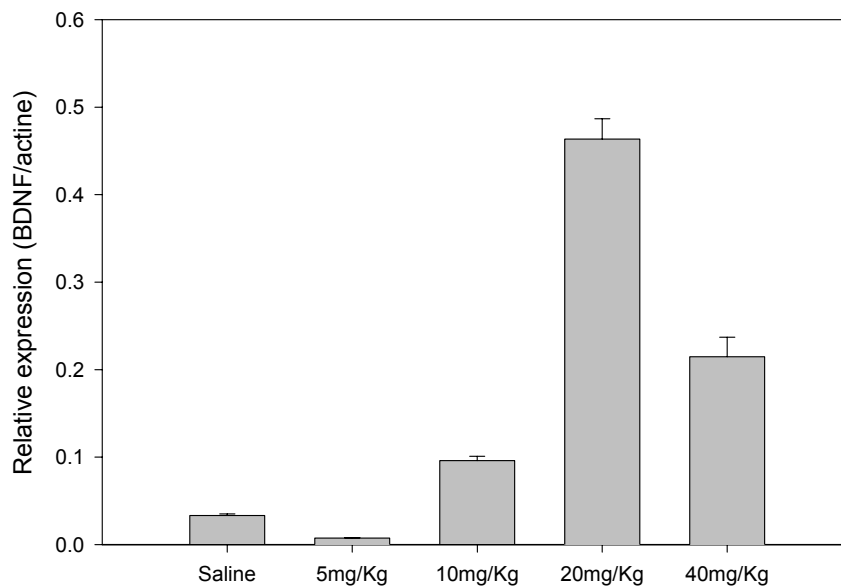
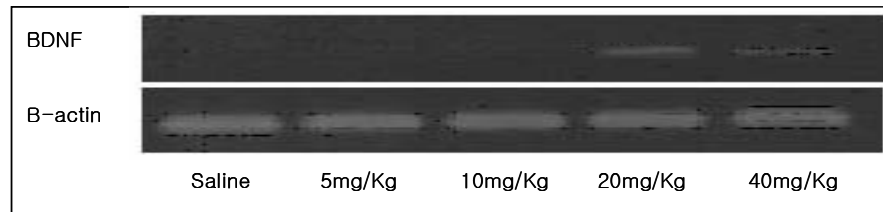


Fig. 24. In rat brain, BDNF expression by dose-dependent. Untreated (saline) or treated with *A.mellea* crude extract at 5, 10, 20 and 40 mg/Kg. After 4 hrs, the rat brain was obtained and RT-PCR was performed as described in materials and methods. The resulting PCR products were electrophoresed onto 1.2% agarose gel and visualized with 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium-bromide. To quantify the BDNF mRNA, a computer-assisted image analysis system was used.

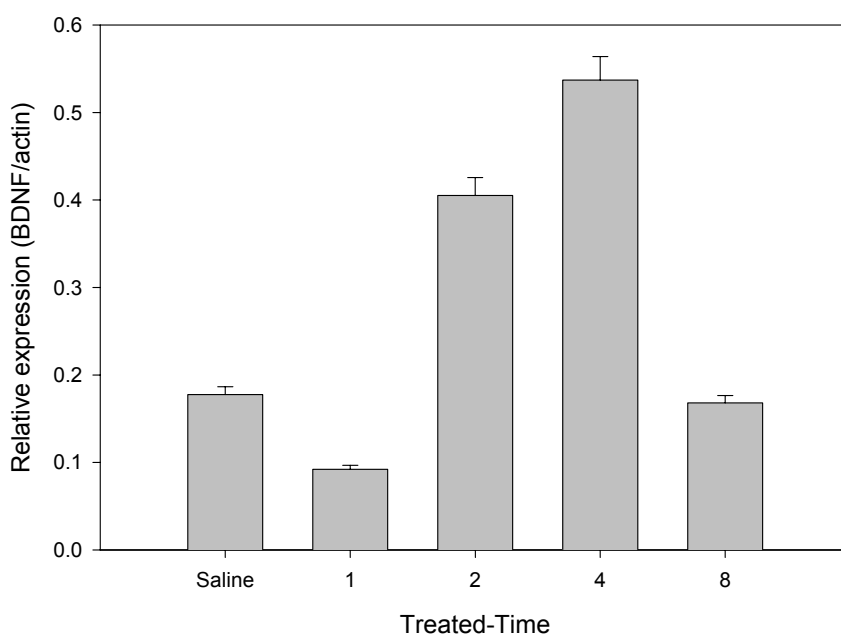
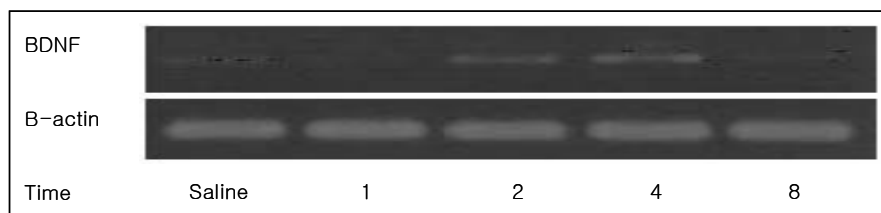


Fig. 25. In rat brain, induction of BDNF mRNA by time-dependent. The extract was injected into a mouse as a time indicated. After 1 to 8 hrs, the rat brain was obtained and RT-PCR was performed as described in materials and methods. The resulting PCR products were electrophoresed onto 1.2% agarose gel and visualized with 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium-bromide. To quantify the BDNF mRNA, a computer-assisted image analysis system was used.

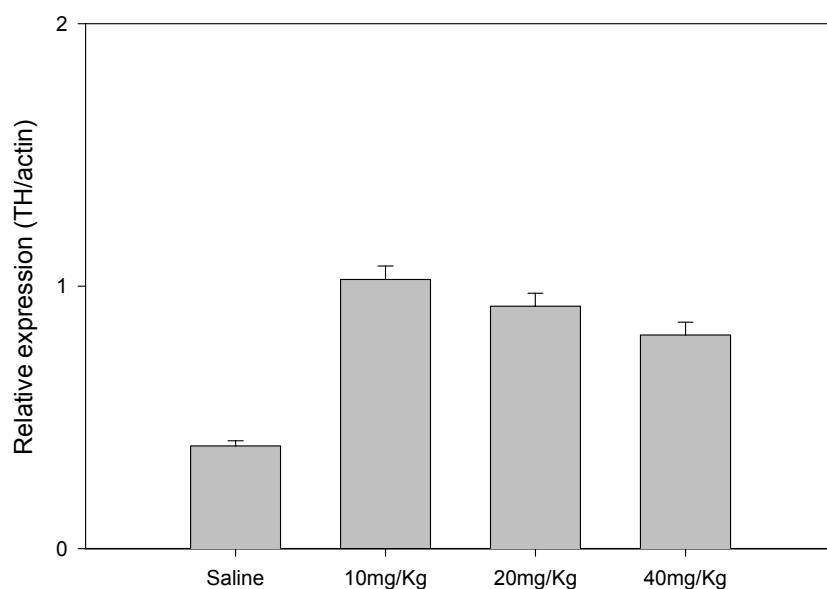
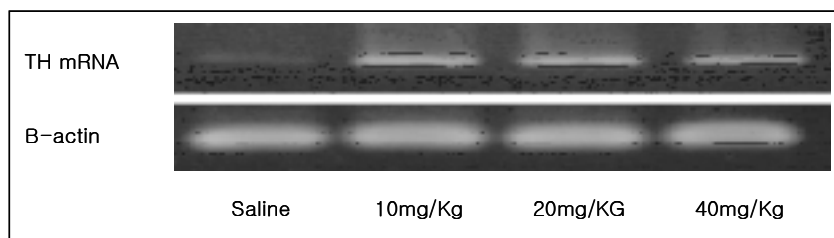


Fig. 26. In rat brain, induction of TH mRNA by dose-dependent. Untreated (saline) or treated with *A.mellea* crude extract at 5, 10, 20 and 40 mg/Kg. After 4 hrs, the rat brain was obtained and RT-PCR was performed as described in materials and methods. The resulting PCR products were electrophoresed onto 1.2% agarose gel and visualized with 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium-bromide. To quantify the BDNF mRNA, a computer-assisted image analysis system was used.

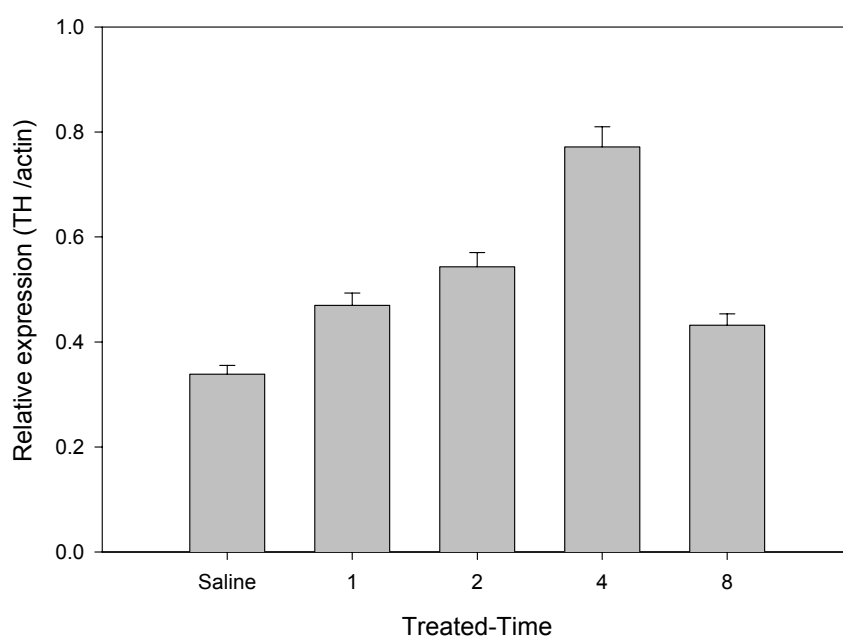
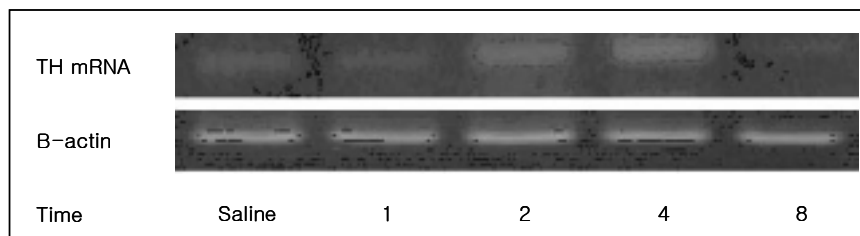


Fig. 27. In rat brain, induction of TH mRNA by time-dependent. The extract was injected into a mouse as a time indicated. After 1 to 8 hrs, the rat brain was obtained and RT-PCR was performed as described in materials and methods. The resulting PCR products were electrophoresed onto 1.2% agarose gel and visualized with 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium-bromide. To quantify the BDNF mRNA, a computer-assisted image analysis system was used.

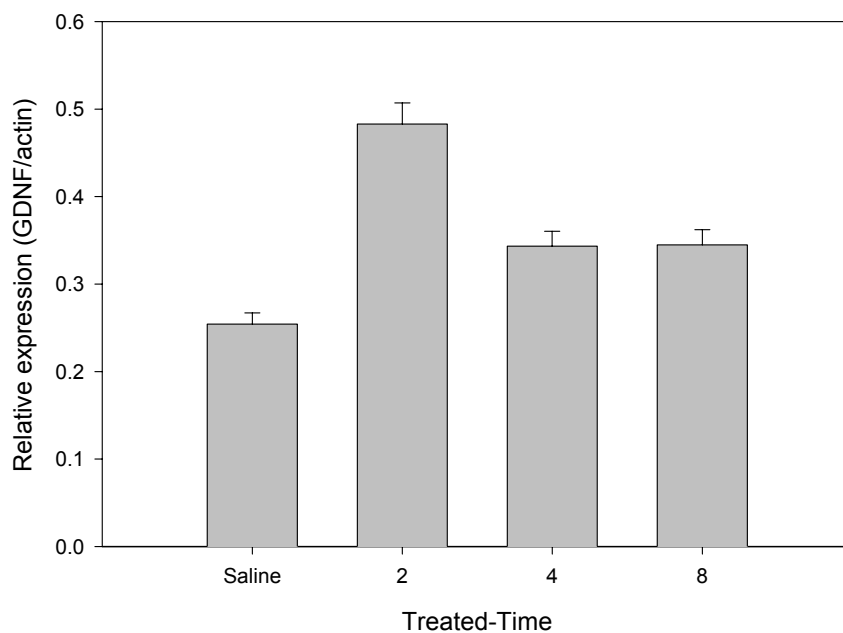
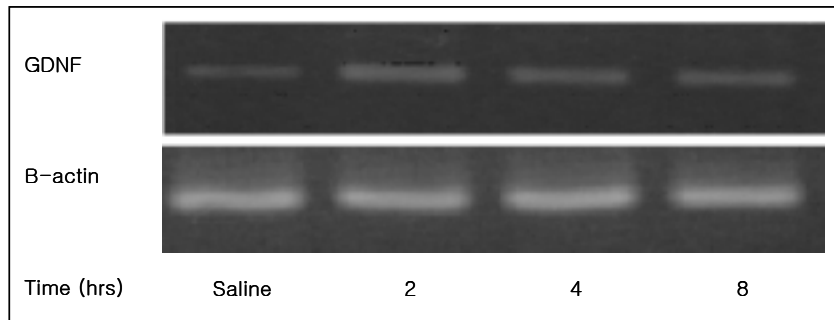


Fig. 28. In rat brain, induction of GDNF mRNA by time-dependent. The extract(10mg/Kg) was injected into a mouse as a time indicated. After 2 to 8 hrs, the rat brain was obtained and RT-PCR was performed as described in materials and methods. The resulting PCR products were electrophoresed onto 1.2% agarose gel and visualized with 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium-bromide. To quantify the BDNF mRNA, a computer-assisted image analysis system was used.

(Fig. 26). 또한 시료처리 후 TH mRNA는 처리 후 2시간에서부터 발현을 하여 4시간에서 가장 높은 발현율을 나타내었고, 처리 8시간 후 TH mRNA의 발현율이 감소되어짐을 확인하였다 (Fig. 27). Dopamin 생합성에 관여하는 TH의 발현과 더불어 GDNF는 TH mRNA 발현 전인 약 2시간에서 가장 높은 발현율을 나타냄에 따라 GDNF가 발현된 후 TH mRNA가 발현되어 dopamin의 생합성률을 증가시키는 것으로 사료되어진다 (Fig. 28).

3) 면역조직화학적 방법에 의한 TH의 발현 분석

Western blotting 방법은 단백질의 발현 여부만을 알 수 있는 반면, 면역조직화학적 방법은 조직의 어떤 부위에서 단백질이 발현되는가를 정확히 육안으로 관찰 할 수 있는 장점이 있다. 또한, TH는 catechol amine성 신경세포에 고도의 특이적인 면역세포화학적 표지효소로 알려져 있으며, 조직을 이용한 면역조직화학적 염색을 통한 TH의 형태학적인 연구가 활발히 진행되고 있어 본 실험에서도 위의 내용을 바탕으로 쥐의 장기에서 TH의 발현여부를 확인하고자 실험을 수행하였다.

뿔나무버섯 균사체 추출물을 TS량으로 20 mg/kg을 쥐에 구강투여 한 후 4시간 뒤에 쥐를 마취하여 조직을 고정하고 적출한 후 동결절편을 제작하여 Western blotting과 동일하게 TH primary antibody와 ABC kit를 이용하여 쥐의 뇌와 위에서 면역조직화학적 염색을 실행하고 TH-IR (TH-Immuno Reactive) Neuron들의 발현양상을 관찰하였다. 뇌에서는 TH neuron들이 가장 많이 분포되어 있는 SN 부위를 중점적으로 관찰하였다.

Fig. 29의 결과와 같이 MB의 일부로서 dopamine의 생성 및 전달경로의 시작부분인 VTA (Ventral Tegmental Area), SNR (Substantia Nigra, Reticular), SNC (Substantia Nigra, Compacta) 모두에서 대조군에 (Fig. 29; A, B) 비하여 TH-IR neuron의 밀도가 더욱 높음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 29; C, D). 특히 Dopaminergic neuron들에 의해 dopamine이 합성되고 분비되는 SNC 부분에서 강하게 발현되어 TH-IR neuron들의 밀도가 현저하게 증가됨이 관찰되었다. 또한 VTA, SNC, SNR 부위의 독립적으로 존재하는 neuron을 400배 현미경으로 관찰한 결과 TH-IR

neuron들의 발현 증가로 세포체 (cell body) 크기가 확대되었으며, 세포체 영역 또한 확장됨이 관찰되었다. 따라서 뽕나무 버섯 추출물은 MB 부위의 dopaminergic neuron을 활성화시켜 TH 생성이 증가하였던 것으로 추측되기 때문에 *A. mellea* 균 사체의 TH 발현 유도물질을 밝히고 유도물질 생산방법의 최적화 연구가 선행된다면 Parkinson씨 병의 치료 및 예방에 활용 가치가 클 것으로 사료된다.

Fig. 30은 위 (Stomach)에서의 TH-IR의 발현양상을 나타낸 것으로 Eisenhofer 등 (1999)의 보고와 같은 TH-IR 세포의 형태 및 발현양상을 보여주고 있었으며, TH-IR 세포들은 주로 점막근관 (Muscularis mucosae)에 나타났고 대조구에 비하여 처리구에서는 위선 (Gastric glands)까지 TH-IR 세포들의 발현영역이 확장됨을 관찰할 수 있었다. 또한, 동일면적 (40mm²)에 대한 TH-IR세포들의 수를 측정한 결과에서도 점막근관에서는 약 1.6배, 위선에서는 약 3배가 높은 TH-IR 세포들이 발현됨을 알 수 있었다 (ANOVA, P<0.05) (Fig. 31). 그러나 세계적으로 위 (Stomach)에서 TH의 발현에 관한 연구는 아직 미진하여 이에 관련된 추가적인 연구가 따라야 할 것으로 생각된다.

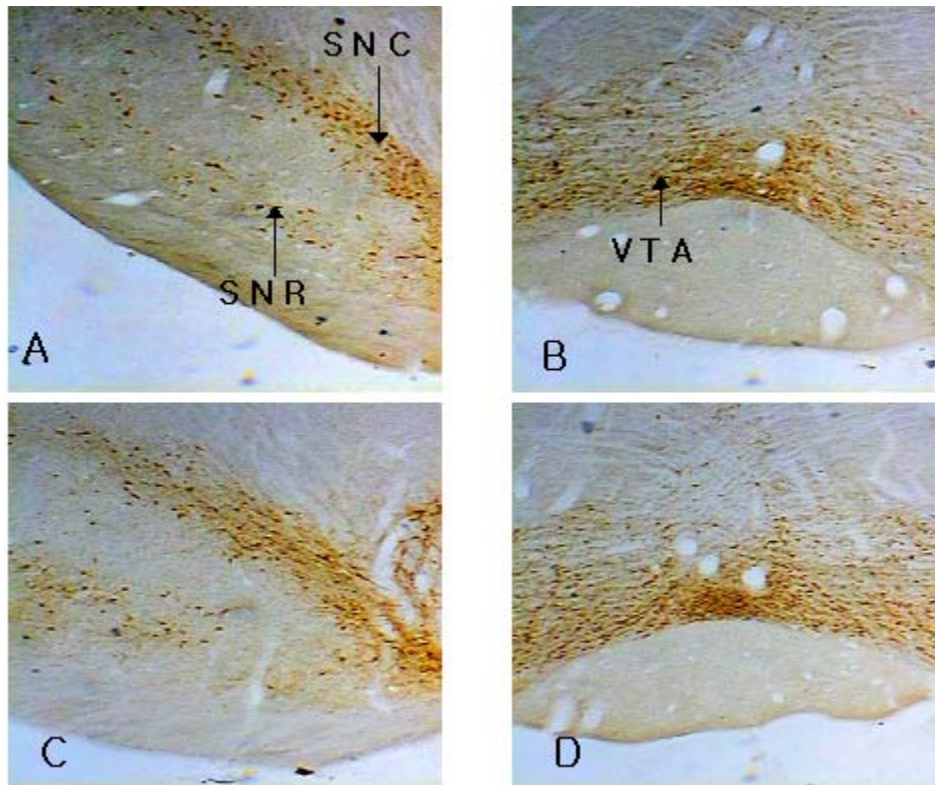


Fig. 29. Immunohistochemical detection of TH by *A. mellea* in the substantia nigra after 4hours ($\times 200$). A, B : Non-treated ; C, D : Mycelia of *A. mellea* VTA : Ventral Tegmental Area ; SNC : Substantia nigra, compact ; SNR : Substantia nigra, reticular.

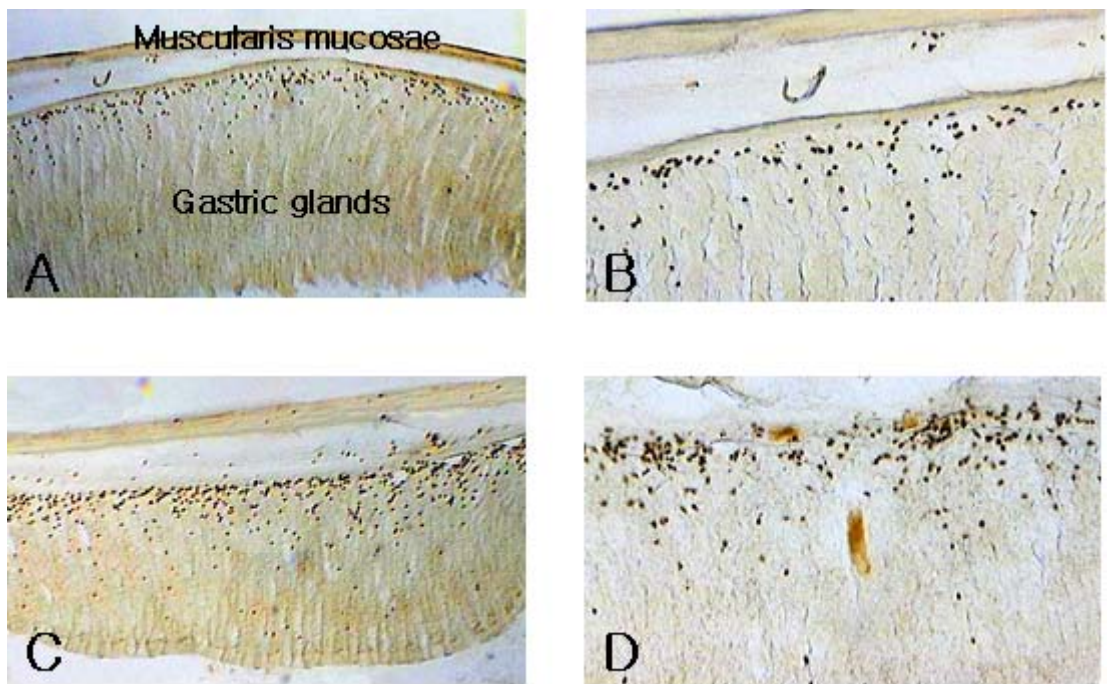


Fig. 30. Immunohistochemical detection of TH in the stomach. Section were incubated with TH antibodies (1:10000) and visualized by DAB reaction products using the avidin-biotin technique. A, B : Control ; C, D : Mycelia of *A. mellea* ; A, C : $\times 100$; B, D : $\times 400$

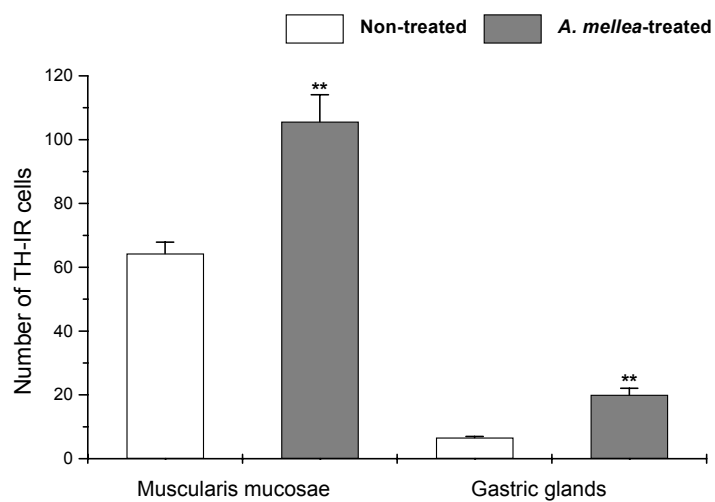


Fig. 31. The expression of TH-IR cells in muscularis mucosae and gastric glands of stomach by treatment of mycelia of *A. mellea*. . Data are expressed as mean±S.E.M (**P < 0.05).

나. 다양한 배지 조성물에 의한 항산화 효과

뽕나무버섯 균사체 추출물의 항산화 (SOD) 활성을 알아보기 위하여 Beauchamp 와 Fridovich (1971)의 방법에 준하여 활성을 측정하였다. 양성 대조군으로는 정제된 항산화제인 bovine CuZn-SOD 1 μg 을 사용하여 50~70% 에탄올 균사체 추출물 각 400 μg 과 12% Native-PAGE을 통하여 비교 실험을 실시한 결과 (Fig. 32) 각종 추출물 및 무기물을 첨가한 배지에서 생산한 균사체 중 5% 참마, 5% 유근피, 5% 홍삼박, Ge 100 ppm 첨가구에서 무첨가구에 비해 3~4배의 활성이 높게 나타났으나, 5% 가시오갈피 가지, 5% 가시오갈피 뿌리 추출물 첨가구에서는 전혀 활성이 나타나지 않았고, Se 50 ppm 첨가구에서는 그 활성이 매우 미약하였다.

Shimomura (1992)는 뽕나무 버섯을 포함한 빛을 발산하는 6 종의 버섯을 대상으로 SOD활성을 측정해본 결과 애주름버섯(*Mycena citricolor*)을 제외하고는 자실체 보다는 균사체에서 그 활성이 높았으며, 뽕나무 버섯 균사체는 6 종의 균사체 중 가장 활성이 높았고, 17 일 동안 증식한 균사체에서 최대의 SOD 활성을 보인다고 보고하였다. 현재 보고된 SOD 들은 다양한 분자량을 가지고 있으며, 특히 세포질에 있는 CuZn-SOD는 이량체 (dimer)로써 분자량이 약 32~33 kDa이며, mitochondria 내에 있는 Mn-SOD는 삼량체 (trimer)로 분자량은 약 80~90 kDa인 것으로 알려져 있다.

본 실험에서 사용된 뽕나무버섯 균사체에서 추출한 SOD는 12% Native-PAGE 결과 CuZn-SOD와 동일한 위치에 band가 나타나는 것으로 미루어 CuZn-SOD와 유사한 물질이거나 그 유도체인 것으로 추정되어진다. 또한, 단백질 band 2 개가 형성되어진 것으로 미루어 2 종의 SOD가 존재하는 것으로 확인되었다. 그러나 항산화 활성이 큰 5% 참마, 5% 유근피, 5% 홍삼박 추출물 첨가구에서는 1 개의 단백질 band가 관찰되어 이에 관한 연구는 더 진행되어져야 할 것으로 생각된다.

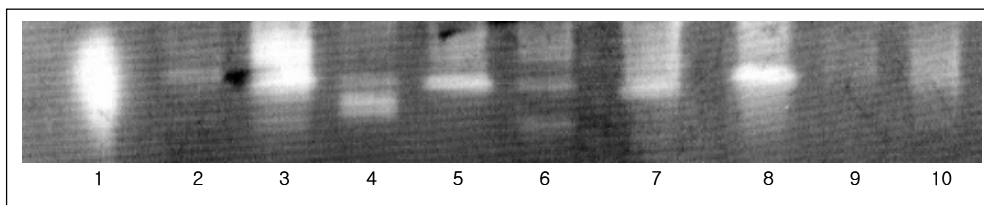


Fig. 32. Bioassay of SOD activity from *A. mellea* mycelium.

lane 1, 1 μ g CuZn SOD

lane 2, cultured *A. mellea* mycelium in control medium

lane 3, cultured *A. mellea* mycelium in medium contained Ge 100 ppm

lane 4, cultured *A. mellea* mycelium in medium contained 5 % *Morus alba* L.

lane 5, cultured *A. mellea* mycelium in medium contained 5 % *Dioscorea japonica*

lane 6, cultured *A. mellea* mycelium in medium contained 5 % *Rhus verniciflua*

lane 7, cultured *A. mellea* mycelium in medium contained 5 % *Ulms darvidiana*

lane 8, cultured *A. mellea* mycelium in medium contained 5 % waste of red Ginseng

lane 9, cultured *A. mellea* mycelium in medium contained 5 % *Acanthopanax senticosus*

lane 10, cultured *A. mellea* mycelium in medium contained Se 50 ppm

4. 적 요

본 연구에서는 담자균류주름버섯목 송이과의 버섯인 뽕나무버섯은 생체조절기능 특성인 섭식 후에 발현되는 약리 및 기능성에 관하여 다음과 같이 보고한다.

노인성퇴행질환인 파킨슨씨병과 연관하여 도파민생합성에 관련된 tyrosine hydroxylase의 발현 유도과 신경퇴행성과 연관된 신경세포의 사멸에 연관하여 신경세포의 성장 및 생존에 관련된 신경영양인자인 Brain Derived Neurotrphic Factor (BDNF), Glial Derived Neurotrophic Factor (GDNF)의 발현유도 그리고 뽕나무버섯에 의한 항산화효과 등 다양한 기능성을 검증하였다.

뽕나무버섯 추출물에 의한 신경영양인자의 발현은 시간과 투여량에 따라 실험동물의 뇌로부터 분리한 Total mRNA를 이용하여 RT-PCR을 수행한 후 결과를 분석하였다.

BDNF는 뽕나무버섯 추출물 20 mg/kg을 투여 후 2~4시간에서 발현이 유도되어짐을 확인하여, 뽕나무버섯 추출물이 뇌에서 BDNF를 발현유도시킴을 확인하였고, 향후 퇴행성 뇌질환에 대한 예방 및 치료효과를 나타낼 것으로 사료되어진다.

또한 신경영양인자 중의 하나인 GDNF는 뽕나무버섯추출물 10 mg/kg을 투여한 실험군에서 가장 높은 발현율을 나타내었으며, 20~40 mg/kg을 투여한 실험군에서도 높은 발현율을 나타내었다. 이와 연관하여 GDNF는 신경퇴행성질환인 파킨슨씨병 원인중의 하나인 도파민생합성 경로의 tyrosine-hydroxylase (TH)의 발현과 밀접한 관계가 있으므로 본 연구에서도 확인할 수 있었다. 뽕나무버섯 추출물 처리 후 TH mRNA는 처리 후 2시간부터 발현을 하여 4시간에서 가장 높은 발현율을 나타내었고 처리 8시간 후 TH mRNA의 발현율이 감소되어짐을 확인하였다. 이는 GDNF가 발현된 후 TH mRNA가 발현되어 도파민 생합성률을 증가시키는 것으로 사료되어진다. 또한 단백질 수준 및 면역조직화학적 방법에 의한 TH 단백질의 발현분석결과로는 mRNA가 단백질로 번역되어짐에 따라 뽕나무버섯 투여 후 약 4시간에서 발현이 일어남을 확인하였으며, 특이하게 실험동물의 위(stomach)에서도 TH-IR 세포들의 발현역역이 확장되었다. 따라서 위에서 발현되어지는 TH 단백질이 어떠한 역할을 하는지에 대한 연구가 더욱 진해되어야 할 것으로 사료되어진다.

뽕나무버섯에 의한 항산화효과 즉 노화억제효과의 경우 활성산소분해효소(SOD)를 분석함으로써 확인 할 수 있었다. *A. mellea* 균사체에서 추출한 SOD는 12% Native-PAGE 결과 CuZn-SOD와 동일한 위치에 band가 나타나는 것으로 미루어 CuZn-SOD와 유사한 물질이거나 그 유도체인 것으로 추정되어진다. 또한, 단백질 band 2개가 형성되어진 것으로 미루어 2종의 SOD가 존재하는 것으로 확인되었다. 그러나 항산화 활성이 큰 5% 참마, 5% 유근피, 5% 홍삼박 추출물 첨가구에서는 1개의 단백질 band가 관찰되어 이에 관한 연구는 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

위와 같은 결과를 종합하여 볼 때 뽕나무버섯은 신경퇴행성질환에 대한 예방적 효과 및 항노화효과를 가진 약용버섯으로써 기능성 식품으로의 개발가능성을 제시하고 있다.

제 4 절 뿡나무버섯균의 영양요구성, 대량생산 및 가공식품개발

1. 서 론

뿡나무버섯균 (*Armillaria mellea*.)은 담자균의 일종으로 나무뿌리모양의 균사속을 형성하며, 자실체 갓의 직경은 3~12 cm, 갓 중앙부가 암갈색이고 주변 및 주름살은 황갈색을 띠고, 갓의 주변에는 방사상의 선이 있다. 침엽수 및 활엽수의 사물 및 활물에 기생하는 목재 부후균으로서 그 기생력이 강하여 산림에 치명적인 피해를 주는 병원성 균인 동시에 봄과 가을철에 많은 자실체를 균생 또는 속생하는 식용 버섯 (honey mushroom)으로 잘 알려져 있고, 세계적으로 널리 분포되어 있다 (이 등, 1985). 엽록소가 없어서 탄소동화 작용이 불가능하고, 독립적인 양분합성 능력이 없기 때문에 독자생존이 불가능한 난과 식물인 천마 (*Gastrodia elata*)와 공생하여 양분과 수분을 공급해줌이 밝혀진 (Zhang, 1980; Kusano, 1911) 이후 천마의 인공재배가 가능하게 되었다. 따라서 천마 인공재배의 성패는 뿡나무버섯균에 달려있으나 뿡나무버섯에 관한 연구는 주로 산림의 병원성 (Redfern 등, 19788; Lopez-real 등, 1975), 분포 (Anderson 등, 1979)와 생태학 (Kwaśna 등, 2001) 및 형태학적 특성 (Watling, 1982)에 대한 연구가 주를 이루고 있어 뿡나무 버섯균의 생리적 및 영양적 특성에 대한 체계적인 연구가 절실히 요망되고 있다.

뿡나무 버섯균은 일반적으로 Peptone, Yeast extract, 각종 식물체 추출물과 같은 복합기질들이 함유된 영양원이 풍부한 배지 (김, 1995; 홍 등, 1990)나 PDA, 맥아배지 (최 등, 1983; 宇田川, 1978; Raabe, 1966)에서는 균사속 (*Rhizomorpha*)이 잘 형성되나 영양이 불충분한 제한 배지 상태에서는 균사는 생육하지만 균사속을 전혀 형성하지 못하는 것으로 알려져 있다 (Weinhold, 1963). 또한 각종 식물체의 대사산물에 의한 뿡나무버섯 균사속의 생육촉진 효과도 보고된 바 있는데, 최 등 (1983)은 Hetero-auxin 및 Gibberellin 첨가가, Cheo (1982)는 Tannic acid와 Gallic acid가, Garraway (1970)는 o-amino benzoic acid와 p-amino benzoic acid가 균사속 발달을

촉진한다고 하였다. 홍 등 (1990)은 각종 휘발성 유기산 및 알코올 성분 중 Valeric acid와 Ethanol이, Moody 등 (1972)은 Coconut, Corn, Cotton seed, Olive 등과 같은 천연 식물 유지류와 Tween계 계면활성제 등에 의하여 뽕나무버섯 균사속의 생육이 촉진된다는 보고도 있다.

뽕나무버섯은 천마와 함께 예로부터 중국 및 한국에서 진귀한 한약제로 사용되어 왔으며, 노인병 (Geriatric patients), 중풍 (Palsy), 현기증 (Dizziness), 두통 (Headache), 신경쇠약 (Neurasthenia), 불면증 (Insomnia), 사지마비 (Numbness in limbs), 소아마비 (Infantile convulsion) 간질 (Epilepsy) 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Yang 등, 1976). Yang 등 (1984)은 뽕나무버섯 (*A. mellea*) 자실체로부터 3개의 새로운 Sesquiterpenoide aromatic esters (Armillarin, Armillaridin, Armillaricin)를 분리했으며, Donnelly 등 (1990)과 Cremin 등 (1995)은 균사체에서도 유사한 물질이 존재함을 확인한 바 있다. Obuchi 등 (1990)은 뽕나무버섯에서 분리한 Armillaric acid, 2-Hydroxy-4-methoxy-6-methyl benzoic acid, Armillarin 및 Melleolide가 그람양성 세균과 효모에 항균성을 가진다고 보고하였다. 또한, Watanabe 등 (1990)은 뽕나무버섯에서 분리한 Adenosine 유도체들이 대뇌보호 효과가 있다고 보고하였으며, 김 등 (1983)은 뽕나무버섯 자실체로부터 추출한 단백질 다당류를 쥐에 투여한 결과 항암효과 및 면역촉진 효과가 있다고 보고하였으며, 김 등 (1998) 및 Kim 등 (1999)은 뽕나무버섯 자실체로 추출한 성분이 항혈전 효과가 있다고 하였다. 또한 Junhua 등 (1990)에 의해 쥐와 개를 이용한 실험에서 뽕나무버섯 추출물에서도 천마와 마찬가지로 중추신경 및 심장혈관 계통과 고지방혈증에 대한 효과를 검색한 결과 진정작용, 경련억제, 대뇌보호, 저혈압, 고지방혈증 방지 등에 약리 효과를 보이는 성분이 존재하고 있음이 시사된 바 있기 때문에 앞으로 뽕나무버섯은 천마 생산을 위한 영양공급원으로써 뿐만 아니라 천마재배에 소요되는 3~4 년 간의 기간을 단축할 수 있는 대안으로서 그리고 이를 이용한 유용 성분의 생산 또한 크게 기대된다. 또한 유용 기능성 물질 생산을 위해 많은 장점을 가지고 있는 뽕나무버섯 균사체에 관해서도 뽕나무버섯 자실체와 더불어 유사한 생리활성 성분을 함유하고 있다는 보고에 근거한다면 뽕나무버섯 균사체의 생산 및 활용 기술에 관하여서도 많은 연구가 뒤따라야 할 것으로 사료된다.

혈관이 손상되면 출혈이 일어나고 지혈과정이 뒤따르며 이 과정에서 형성된 혈소판과 섬유소 (Fibrin)의 응집체인 혈전 (Thrombus)은 지혈과정이 완료되고 손상된 부위의 조직이 재생되면 Plasminogen 활성화제인 Urokinase (UK), Tissue-type Plasminogen activator (tPA), Streptokinase (SK)에 의해 Plasminogen이 활성화된 plasmin에 의해 용해되어 혈관의 혈액은 다시 정상상태를 유지하게 된다. 그러나 생성된 혈전이 체내에 과도하게 축적되거나 혈전용해 기작이 원활하게 작동하지 못할 경우 혈전증 (Thrombosis)을 유발하여 인체에 치명적인 손상을 줄 수도 있다. 이 혈전은 혈관을 따라 흐르면서 뇌혈전증, 뇌출혈, 심부전증, 심장마비와 같은 혈관계 질환을 유발하는데 현대인의 사망원인 중 혈관계 질환에 의한 사망이 39%로 알려지고 있어 이 혈관계 질환의 주원인 중 하나인 혈전을 용해하는 혈전 용해제에 관한 관심이 점점 더 커지고 있다 (정, 1991).

현재 임상에서 사용되어지고 있는 혈전 용해제로는 UK, tPA, SK (Reed 등, 1995) 등이 있으나 UK를 제외하고는 경구 투여를 할 수 없고 tPA의 경우 반감기가 짧은 단점이 있다. 이 용해제들은 투여 시 혈전에 대한 선택성이 적어 전신출혈이 발생할 수도 있으며, Fibrin에 대한 선택성이 작아 장기간 복용시 용혈현상과 면역거부반응이 나타나는 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라 가격이 매우 높은 단점이 있어 혈전을 직접 용해하는 새로운 대체 혈전 용해제들이 필요한 실정이다. Mihara 등 (1991)은 지렁이 (*Lumbricus lubellus*)로 부터, Chung 등 (1992)은 뱀독으로부터 혈전용해제를 분리하였으나 그 안전성 문제는 논란의 대상이 되고 있다. 또한 Kim 등 (1995), Lee 등 (1998)도 발효식품에서의 혈전분해효소를 분리하였다고 보고한 바 있다.

한편 최 등 (1999)은 국내에 자생하는 버섯인 때죽도장버섯(*Daedaeopsis styracina*), 기와웃솔버섯 (*Trichaptum abietium*), 구름버섯 (*Coriolus versicolor*), 모래발버섯 (*Pisolithus tinctorius*) 등의 자실체에서 혈전분해 활성이 있음을 보고하였고, 또한 Kim 등 (2000, 1998)에 의해 식용버섯인 활미송이버섯 (*Tricholoma saponaceum*), 먹물버섯 (*Coprinus comatus*), 주름버섯 (*Agaricus campestris*), 점박이애기버섯 (*Coprinus disseminatus*), 민자주방망이버섯 (*Lepista nuda*) 등의 자실체에서도 단백질 분해 및 혈전분해 활성이 있음이 밝혀져 있으나, 이외의 버섯류

에 대한 연구는 없는 실정이며, 군사체를 대상으로 한 혈전분해 활성화에 관한 연구는 전무한 상태이다. 뽕나무버섯은 예로부터 중국에서 천마와 함께 중풍, 어혈, 불면증 치료제로 사용되는 한약제이기 때문에 자실체 보다도 대량생산이 훨씬 용이한 뽕나무버섯 군사체에서도 항혈전 효과의 탐색은 상당한 의미가 있다고 판단된다.

뽕나무버섯 군사체 생산에 대한 예비 실험결과 엿기름 배지에서 다른 미생물에 비하여 현저하게 높은 군사체 생산력을 확인한 바 있고 (Fig. 34), 배양액에 각종 기능성 식물체 추출물 및 무기물을 첨가한 후 배양시켜 균체량 및 효소활성을 측정할 결과 각각의 처리구별로 차이가 있음이 확인되었다. 총 16개의 식물체 추출물 및 무기물 처리구 중 13개의 처리구에서 군사체 생산량 증가와 14개의 처리구에서 단백질 분해 활성화 등 각종 기능적 특성 등에서도 처리 종류 및 량에 따라서도 차이가 있음이 확인되었다.

한편, 뽕나무버섯의 인공재배는 중국에서 일부 실시하고 있으나 많은 연구가 되어 있지 않으며, 톱밥 및 나무를 이용한 인공재배시 군사속이 완전하게 증식되는데는 약 70일이 소요되며, 자실체를 수확하기까지는 90~100일 소요된다 (김 등, 1992). 또한 그 수확량이 적어 상업적으로도 이용되기 어렵다.

그러나 뽕나무 버섯 군사체는 생산 면에서 지금까지 알려져 있는 어떠한 미생물체 보다 높은 생산수율을 보여 배양액 1000 ml 당 550 g 이상의 군사체 (생체량) 생산 가능성이 확인된 바 있어 이의 영양적 혹은 생리활성적 효능에 착안한다면 식품이나 의약품으로 높은 잠재력을 가지고 있다고 판단된다. 또한 뽕나무 버섯에는 천마에서 나타나는 약리적 활성이 있다는 보고도 있어 3~4년이 소요되는 천마를 대신할 수 있을 뿐만 아니라 배지 조성의 변형에 따라 다양한 기능성 향상을 도모할 수 있으며, 높은 군사체 생산 잠재력을 이용한다면 산업화 가능성이 충분히 있다고 판단되어 안정성이 검증된 천연물 함유 배지로부터 군사체 대량생산의 최적조건을 확립하고 그 기능성을 검토하였다. 또한 군사체의 영양성분 분석 및 군사체 기능성 향상을 위한 방안을 확립하였으며, 기능성 식품 개발기술에 접목을 위하여 보조제의 종류 및 적정배합비 선정을 통한 가공식품을 개발하였다.

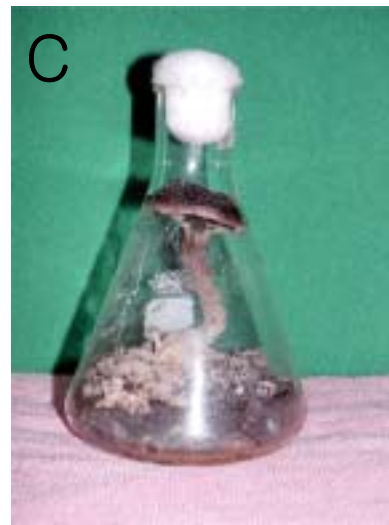


Fig. 33. The morphology of mycelia (A, B) and fruit body (C) of *A. mellea* in various media

2. 재료 및 방법

가. 공시균주

익산대학 식량환경과 균이학 실험실에서 분리 보관 중인 뿔나무버섯균(*Armillaria mellea*)을 공시균주로 사용하였다.

나. 합성배지를 이용한 균사체 생산

1) 배지의 조제

가) 종배양용 배지

2.5% Malt extract (Difco), 2% Agar를 함유한 배지를 pH 5.0으로 조정하였다.

나) 배양용 배지

Narkran's medium을 약간 수정하여 기본배지로 사용하였다. 즉 Sucrose 20 g, Peptone 2 g, KH_2PO_2 1 g, MgSO_4 0.5 g, FeCl_3 5 mg, MnSO_4 5 mg, ZnSO_4 4.4 mg, CaCl_2 55.5 mg, Thiamine · HCl 50 μg , 멸균수 1000 ml이었다.

(1) 탄소원

기본배지의 탄소원인 Sucrose 대신 각종 탄소원을 2% 씩 가하고 배지의 pH는 5.0으로 조정하여 시험관 ($\text{Ø}30 \times 20\text{cm}$)과 샤페 ($\text{Ø}9\text{ cm}$)에 30 ml씩 분주하여 고화시켰다. 단 탄소원 중 효과가 있는 Glucose는 0~3%의 농도로 조제하였다.

(2) 질소원

탄소원을 Glucose 1.5%로 하고 Peptone 대신 각종 질소원을 질소로 0.028%되게 조제하였다. 단 질소원 중 효과가 있는 Proteose peptone은 0~0.25%의 농도로 조제하였다.

(3) KH_2PO_4

(1)의 배지에서 질소원을 Proteose peptone 0.2%로 조정하고 KH_2PO_4 를 0~0.25%의 농도로 조제하였다.

(4) MgSO_4

(2)의 배지에서 KH_2PO_4 의 농도를 0.15%로 조정하고 MgSO_4 의 농도를 0~0.1%로 조제하였다.

(5) 기타 무기염류의 영향

(3)의 배지에서 MgSO_4 의 농도를 0.025%로 조정하고 FeCl_3 , MnSO_3 , ZnSO_4 , CaCl_2 의 첨가실험을 행하였으며, 이중 가장 효과가 컸던 CaCl_2 의 농도를 0~10 mg%로 달리 조제하였다.

(6) Vitamin

(4)의 배지에서 FeCl_2 0.5 mg%, MnSO_4 0.5 mg%, ZnSO_4 0.44 mg%, CaCl_2 5.55 mg%로 조정하고 버섯균의 생육에 영향을 미치는 Vitamin으로 알려진 Biotin, Folic acid, Ascorbic acid, Nicotinic acid, Ca-pantothenate 및 Thiamine · HCl의 농도를 Table 21과 같이 달리 조제하였다.

2) 배양방법

종배양 배지에서 10일간 배양한 군사속을 길이 3 mm 씩 잘라 배지에 접종하고 온

도실험을 제외하고는 25℃에서 배양하면서 균사속의 성장속도와 증량을 측정하였다. 고층배지 (Stab culture)에서 배양한 균사속은 시험관 밑으로 뺏어나간 길이를 측정하였으며 평판배지 (Plate culture)에서 배양한 균사속의 colony는 직경을 측정하였다 (Fig. 34). 균사속의 증량은 고화된 한천을 더운물에서 녹여내고 증류수로 수회 세척한 후 건조평량한 여과지로 여과하여 65℃에서 항량이 될때까지 건조시켜 순수한 균사속의 건조증량을 구하여 비교하였다.

다. 천연배지를 이용한 균사체 생산

1) 배지의 조제

보관용 배지는 2.5% Malt extract (Difco)에 2%(w/v) agar를 첨가한 배지를 pH 6.0으로 조절하여 사용하였으며, 3개월 주기로 계대배양하여 냉장보관 하였다. 배양용 배지는 전라북도 종자보급소에서 구입한 태백보리 품종을 이용하여 17℃, RH (Relative Humidity, 상대습도) 80%에서 싹이 2 mm될 때까지 발아시켜 천일건조한 것을 배지원료로 사용하였다. 건조된 엇기름은 4 배의 멸균수를 첨가하여 60℃에서 6 시간 동안 당화한 후 11 Brix°, pH 6.0으로 조절한 것을 사용하였으며, 시험관 (∅ 21×20 cm)에 50 ml 씩 분주하여 살균한 후 배지를 종배양용 배지로 사용하였다. 뽕나무버섯 균사체의 생리 및 균사체 생산 비교실험을 위한 기타 배지 조성은 Table 9와 같다.

2) 접종원의 조제

종배양용 배지에 2회 계대배양하여 활성화시킨 뽕나무버섯 균사를 5×5 mm되게 잘라 멸균된 기본배지에 접종하고 25℃에서 정치배양하여 대수증식기에 도달한 균을 Homogenizer (Omni mixer, USA)를 이용하여 1,000 rpm에서 무균적으로 마쇄한 후 Test Plate (∅16.2×16.8 mm)에 미리 분주해 놓은 종배양용 배지 2 ml에 0.5 ml씩 접종하고 25℃에서 6일 동안 배양하여 이를 seed로 사용하였다.

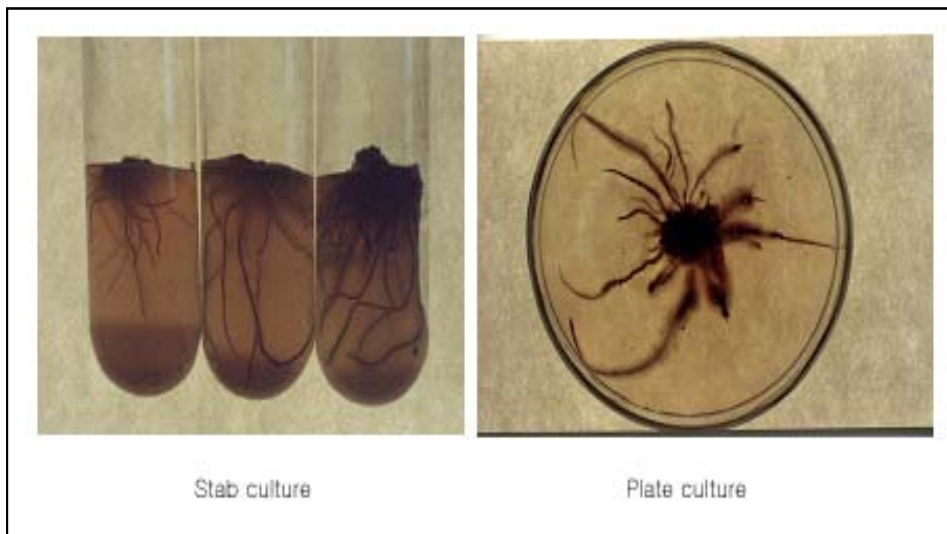


Fig. 34. Growth of *A. mellea* mycelium rhizomorph on stab and plate culture

3) 천연물 및 무기물의 첨가

빵나무버섯 균사체의 기능성 향상을 위하여 균사체 생산용 배지에 첨가한 각종 천연물 및 무기물의 종류는 Table 10와 같다.

천연물 첨가물은 10배 (V/W)의 멸균수를 가한 후 환류냉각장치를 부착하여 100℃에서 6시간 추출하고 3000×g에서 30분간 원심분리하여 그 상정액을 사용하였으며, 무기물은 제균용 Filter (Millipore, 0.2 μm)를 이용하여 제균한 후 첨가하였다.

4) 균사체 생산 최적화

온도, pH, 배양기간을 최적화는 Cragle 등 (1955)의 반응표면분석법에 준하여 실시하였으며, 독립변수 3개의 중심합성계획을 사용한 것으로 $\alpha=2$ 를 택하였고, 중심점수는 2개를 선정하였다 (Table 11).

5) 균사체의 성분분석

가) 일반성분

일반성분의 분석은 상법에 준하였다. 즉, 수분은 105℃ 건조법, 조단백질은 micro-Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet법, 조회분은 건식회화법, 전당은 25% HCl로 가수분해하여 얻은 환원당을 Somogyi 변법으로, 조섬유정량은 AOAC법으로 각각 분석하였다.

나) Vitamin D 정량

Vitamin D 추출은 Takamura 등 (1991)의 방법에 준하였으며, Provitamin D2 및 Vitamin D2 함량은 HPLC를 이용하여 분석·정량하였다. 이때 HPLC의 분석조건은 Table 12와 같다.

Table 9. List of culture media for production of mycelia of *A. mellea*

Media	Composition of media (w/v%)
MCM	malt extract 2%, yeast extract 0.2%, dextrose 2%
YEPD	yeast extract 0.3%, peptone 0.5%, dextrose 2%
MEB	malt extract 2%
Weinhold's	glucose 0.5%, (NH ₄) ₂ PO ₄ 0.2%, KH ₂ PO ₄ 0.175%, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.075%, thiamine-HCl 0.1mg%
PDB	potato extract 20%, dextrose 2%
DSM	soybean extract 0.3%, sucrose 3%, KH ₂ PO ₄ 0.45%, MgSO ₄ 0.05%
GMEB	germinated-malt extract broth with 11 Brix°

MCM : Mushroom Complete medium

YEPD : Yeast Extract Peptone Dextrose medium

MEB : Malt Extract Broth medium

Weinhold's : Weinhold (1963) medium, modified

PDB : Potato Dextrose Broth medium

DSM : Defatted Soybean Meal medium

GMEB : Germinated-malt saccharified at 65°C with 4 fold D.W.

for 6 hours and adjusted to 11 Brix°

Table 10. List of plants and inorganic compounds added to GMEB.

A. Plant

Botanical name (abbreviation)	Korean name	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> (Rupr. et Max.) Harms.(ASH)	가시오갈피	root and stem
Waste of red Ginseng (WRG)	홍삼박	root
~ <i>Angelicae gigantis</i> Radix. (AGR)	당귀	root
Korean Ginseng (KG)	인삼	root

B. Inorganic compound

Element (abbreviation)
Germanium (Ge)
Selenium (Se)

Table 11. Independent variables and the levels of variables chosen for trials

Variable		Levels of variables					
		- α^*	-1	0	1	α^*	
Experi- mental value	Temperature (°C)	X ₁	21	23	25	27	29
	pH	X ₂	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0
	Incubation period (days)	X ₃	10	12	14	16	18

* - α , α = lowest and highest level for each variable ($\alpha=2$) design
by Cragle et al. (1955)

Table 12. HPLC condition for vitamin D₂ analysis

Instrument	HPLC (Shimadzu LC-10 Series)
Column	Prodigy 5 ODS-2 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m)
Guard column	Supelco Discovery C ₁₈ (2 cm×4.0 mm, 5 μ m)
Mobile phase	Methanol/Acetonitrile (25/75; vol), 1.3ml/min
Detection	UV, 264 nm
Oven temp.	30°C
Pressure	86~87psi

라. 혈전용해활성 측정

1) 조효소 분리 및 정량

조효소 분리는 Vincent 등 (1999)의 방법에 준하여 분리하였다. 즉, 뽕나무버섯 균사체 50 g에 동량의 멸균수를 넣고 균질화한 후 600×g, 4℃, 30분간 원심분리하여 상정액을 회수하고 동량의 100% 에탄올 (-70℃)을 서서히 가하며 교반 (최종 에탄올 농도, 50%)시킨 후 1 시간 동안 4℃에서 교반하며 반응시켰다. 다시 600×g, 0℃에서 30분간 원심분리하여 상정액을 회수하고 최종 에탄올 농도를 70%로 하여 4℃에서 1시간 교반 후 1200×g, 0℃에서 원심분리하여 생성된 침전물을 10 mM Citrate-NaOH (pH 6.0) 완충용액에 용해시켜 사용하였다.

단백질 정량은 Lowry 등 (1951)의 방법에 의해 단백질 정량 kit (Pierce co.)를 사용하여 측정하였으며, Bovine Serum Albumin (BSA)을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

2) 단백질 분해활성

1% Azocasein (50 mM Tris-HCl, pH 7.0) 300 μ l에 각 조효소액 100 μ g/50 μ l를 가하여 37℃에서 20분간 반응시킨 후 얼음에서 냉각된 10% (w/v) TCA 600 μ l를 넣고 즉시 혼합하였다. 이 시료들은 10분 동안 얼음에 보관하였으며, 15,000 rpm, 4℃, 15분 동안 원심분리한 후 상정액을 분리하고 366 nm의 UV과장에서 OD값을 측정하여 단백질분해활성을 측정하였다. 1 unit는 위 조건 하에서 Azocasein으로부터 흡광도 0.1에 상당하는 양으로 하였다.

3) 혈전용해효소 활성

0.15 M NaCl 함유 50 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에 Fibrinogen을 최종농도 0.3% 되도록 완전히 용해시킨 용액 5 ml에 동량의 2% Agarose 5 ml를 첨가하여 혼합한 후 용액에 Thrombin (100NIH unit/ml) 0.1 ml를 첨가하여 1시간 동안 실온에

서 고화시켜 fibrin plate를 조제하였다. Fibrin plate에 지름 5 mm의 구멍을 만들어 각 조효소 추출물 200 μ g과 대조구로 정제된 혈전효소인 Plasmin 1 unit (Calbiochem co.)를 점적한 후에 37°C에서 12시간 반응시켜 plasmin 용해면적에 대한 시료의 상대적인 용해면적 비율로 환산하여 산출하였다.

마. 데이터 분석

균사체 생산에 대한 실험자료의 통계처리를 위하여 SAS program (version 8.1)을 이용하여 ANOVA와 RSREG을 수행하여 유의성을 검증하였다. 모든 데이터는 95% 신뢰도범위에서 표현되었다.

2. 결과 및 고찰

가. 합성배지 상에서의 영양 요구성

혈전용해활성을 위주로 기능성 유망버섯을 발굴하기 위하여 야생균주 및 일반 재배되고 있는 식용 및 약용버섯균을 대상으로 실험한 결과 대량생산 가능성 및 균사체 생산수율 면에서 뽕나무버섯 균사체를 활용하는 방안이 가장 바람직하였기 때문에 합성배지를 이용하여 뽕나무버섯균에 대하여 탄소원, 질소원, 무기물, 비타민 등의 영양요구성을 검토하였다.

1) 탄소원의 영향

기본배지의 탄소원인 Sucrose 대신 각종 당류를 탄소원으로 2%씩 첨가하여 균사속 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 13와 같이 뽕나무버섯균은 Sorbose와 Lactose를 제외한 당류를 이용하여 균사속을 생산할 수 있었으며, 다당류, 이당류 및 당알코올 보다 단당류를 더 효과적으로 이용함을 알 수 있었다. 단당류는 5탄당 보다 6탄당의 경우가 더 효과적이었고 6 탄당 중에서는 Glucose와 Fructose가 우수한 탄소원임을 알 수 있었는데 Glucose는 Fructose보다 평판배양시 균사속 생산

량이 약 10 mg이 더 많아 가장 우수한 탄소원으로 나타났다.

Kuraishi (1954)는 3 종의 *Armillaria* sp. 분리균주의 균사속 생산에 가장 우수한 탄소원은 Glucose와 Sucrose였으며, 당류가 유기산을 탄소원으로 하였을 때보다 훨씬 더 효과적이었다고 한 보고와 유사한 경향이었다.

2) Glucose 농도의 영향

탄소원 중 가장 우수하였던 Glucose의 농도가 균사속 생산에 미치는 영향을 살펴 보기 위하여 0~3.0%의 농도로 조정하여 본 결과는 Table 14에서와 같이 Glucose의 농도가 증가함에 따라 1% 이상의 농도에서 균사속의 생성수가 20개 이상을 나타내었고 1.5~2.0%의 범위에서 균사속의 생산량이 가장 많았는데 배양 12일째 균사속 생산량은 평판배양시 Glucose 농도 1.5%에서는 223 mg, 2.0%에서는 215 mg으로 1.5%의 농도에서 약간 많았다.

3) 질소원의 영향

각종 질소원이 균사속 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 각종 질소원을 질소량으로 0.028%되게 조정하여 본 결과는 Table 15과 같다. 균사속 생산은 무기태 질소원보다 유기태 질소원에서 높았고 유기태 질소원 중에서는 Proteose-peptone이 6일까지 가장 우수하였으며, 다음으로는 Bacto-pepotone이었으나 12일에는 Bacto-pepotone과 Proteose-peptone 순이었다. 무기태 질소원들은 대부분 균사속 성장을 촉진시키지 못하였지만 그 중에도 양호한 촉진효과를 보이는 질소원은 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 이었다. 그러나 질산태 질소원과 아질산태 질소원은 균사속 생산량이 감소할 뿐만 아니라 균사속 생육에도 부진한 면을 보여 오히려 저해적임을 알 수 있었다. 이는 Peptone이나 Glycine, Asparagine 등과 같은 유기태 질소원을 뽕나무버섯균이 더 잘 이용하며, 아질산태 질소원에서는 전혀 생육하지 못하였다고 보고한 Kuraishi (1954)의 보고와 유사한 경향이었다.

Table 13. Effect of carbon sources on the rhizomorph growth of *A. mellea*

Carbon source (2%, w/v)	Stab culture			Plate culture				
	Growth rate(mm)		Mycelial dry weight(mg)*	Growth rate(mm)		Mycelial dry weight(mg)		
	6 days	12 days		6 days	12 days			
Control	(+)**3	(+) 7	23	(+) 8	(+) 10	27		
Soluble Starch	(+) 6	(+) 20	61	(+) 10	(+) 20	112		
CMC	(+) 3	(+) 10	65	(+) 19	(+) 28	92		
Sucrose	(++)	15 (++)	45	197	(++)	32 (++)	50	215
Maltose	(+) 13	(++)	35	172	(+) 33	(++)	58	204
Lactose	(-) 5	(-) 7	5	(-) 7	(-) 20	7		
Glucose	(++)	15 (++)	50	212	(++)	36 (++)	63	225
Fructose	(++)	16 (++)	50	212	(++)	36 (++)	60	215
Galactose	(++)	10 (++)	33	159	(++)	30 (++)	45	192
Mannose	(++)	20 (++)	50	208	(++)	39 (++)	68	220
Xylose	(+) 10	(+) 25	116	(+) 35	(++)	55	135	
Sorbose	(-) 0	(-) 0	0	(-) 0	(-) 0	0		
Mannitol	(+) 17	(+) 35	168	(+) 24	(++)	48	175	

A. mellea was cultured in Narkaran's medium (pH 5.0) for 12days at 25°C, and the rhizomorph weight(mg) was measured.

Number of rhizomorph: -; 0, +; 1, ++; 11-20, +++; above 20

Table 14. Effect of concentration of glucose on the rhizomorph growth of *A. mellea*

Glucose conc. (%, w/v)	Stab culture			Plate culture				
	Growth rate(mm)		Mycelial dry weight(mg)*	Growth rate(mm)		Mycelial dry weight(mg)		
	6 days	12 days		6 days	12 days			
0	(+)**7	(+) 12	25	(+) 8	(+) 10	25		
0.5	(++)	9 (++)	27	117	(++)	12 (++)	33	129
1.0	(+++)	25 (+++)	45	198	(+++)	33 (+++)	54	174
1.5	(+++)	20 (+++)	50	213	(+++)	35 (+++)	63	223
2.0	(+++)	22 (+++)	50	212	(+++)	32 (+++)	60	215
2.5	(+++)	30 (+++)	50	208	(+++)	30 (+++)	66	217
3.0	(+++)	21 (+++)	40	207	(+++)	27 (+++)	60	209

A. mellea was cultured in Narkaran's medium (pH 5.0) for 12days at 25°C, and the rhizomorph weight (mg) was measured.

Number of rhizomorph: -; 0, +; 1, ++; 11-20, +++; above 20

4) Proteose peptone 농도의 영향

질소원 중 균사속 생산에 가장 우수하였던 Proteose peptone의 농도를 0~0.5%로 달리 조제하여 그 영향을 검토한 결과는 Table 16에서와 같이 질소원은 균사속 생산에 밀접한 관련성을 보였는데 질소원의 무첨가시는 균사속의 생산이 전혀 이루어지지 못하였고 Proteose peptone의 농도가 증가함에 따라 0.2% 이상의 농도에서 균사속의 생산이 활발하였으며, 0.2% 농도에서 최고의 균사속 생산량을 보여 고층배지에서 223 mg, 평판배지에서 235 mg의 생산량을 보였으나 그 이상의 농도에서는 증가현상을 볼 수 없었다.

5) 무기염류의 영향

가) KH_2PO_4 농도

배지 중의 KH_2PO_4 의 농도가 균사속 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 KH_2PO_4 의 농도를 0~0.25%로 달리하여 본 결과는 Table 17에서와 같이 KH_2PO_4 의 농도가 증가함에 따라 균사속 생산량도 증가하여 0.15%에서 배양 12일의 균사속 생산량이 고층배지에서 230 mg, 평판배지에서 243 mg으로 최대치를 보였으며 그 이상의 농도에서는 농도가 증가함에 따라 점점 감소하는 추세를 보였다. 이는 北本과 葛西 (1968)의 *Flavolus arcularius*의 균체생육이 KH_2PO_4 0.3% 농도일 때, 金 (1985)의 *Pleurotus sajor-caju*와 *Pleurotus ostreatus*에서 0.2%제일 좋았다고한 농도보다는 약간 낮았으나 金 (1986)의 *Lyophyllum decastes*의 균체생산 최적 농도인 0.4%와는 큰 차이를 보였다. 또한 Morrison (1975)은 뽕나무버섯의 균사속이 PO_4^{-2} 이온을 잘 흡수한다고 보고한 바 있다.

나) MgSO_4 농도

균사속 생산에 미치는 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 농도의 영향을 검토하기 위하여 0~0.1%의 농도로 달리하여 본 결과는 Table 18에서와 같이 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의

Table 15. Effect of nitrogen sources on the rhizomorph growth of *A. mellea*

Nitrogen source (0.028%, N)	Stab culture			Plate culture		
	Growth rate(mm)		Mycelial dry weight(mg)*	Growth rate(mm)		Mycelial dry weight(mg)
	6 days	12 days		6 days	12 days	
Control	(-) 3	(-) 6	5	(-) 8	(-) 5	10
Bacto-peptone	(++) 20	(+++) 50	211	(++) 35	(+++) 60	227
Proteose-peptone	(+++) 18	(+++) 51	221	(+++) 33	(+++) 72	233
Tryptone	(+) 6	(+++) 34	161	(++) 32	(+++) 48	195
Casaminio acid	(+) 8	(+++) 30	36	(+) 13	(++) 25	45
Urea	(-) 3	(-) 10	7	(-) 3	(-) 10	12
(NH ₄) ₂ SO ₄	(-) 4	(+) 18	25	(-) 15	(+) 19	37
(NH ₄) ₂ HPO ₄	(+) 8	(+) 24	69	(+) 16	(+) 40	163
(NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆	(+) 5	(+) 30	35	(+) 8	(+) 20	37
NH ₄ NO ₃	(+) 5	(+) 20	51	(+) 5	(+) 18	50
KNO ₃	(-) 3	(-) 10	10	(-) 5	(-) 13	21
NaNO ₃	(-) 3	(-) 6	5	(-) 3	(-) 8	7
NaNO ₂	(-) 0	(-) 0	0	(-) 0	(-) 0	0

A. mellea was cultured in Narkaran's medium (pH 5.0) for 12days at 25°C, and the rhizomorph weight (mg) was measured.

Number of rhizomorph: -; 0, +; 1, ++; 11-20, +++; above 20

Table 16. Effect of proteose peptone concentrations on the rhizomorph growth of *A. mellea*

Proteose peptone conc. (%, w/v)	Stab culture			Plate culture		
	Growth rate(mm)		Mycelial dry weight(mg)*	Growth rate(mm)		Mycelial dry weight(mg)
	6 days	12 days		6 days	12 days	
0	(-) 2	(-) 5	5	(-) 8	(-) 9	9
0.1	(+) 18	(++) 40	173	(++) 22	(++) 53	174
0.2	(+++) 17	(+++) 50	223	(+++) 32	(+++) 72	235
0.3	(+++) 17	(+++) 45	216	(+++) 33	(+++) 70	213
0.4	(+++) 14	(+++) 40	209	(+++) 25	(+++) 67	207
0.5	(+++) 15	(+++) 40	205	(+++) 25	(+++) 60	196

A. mellea was cultured in Narkaran's medium (pH 5.0) for 12 days at 25°C, and the rhizomorph weight (mg) was measured.

Number of rhizomorph: -; 0, +; 1, ++; 11-20, +++; above 20

농도는 0.025%에서 가장 양호하였으며 그 이상의 농도에서는 오히려 균사속 생산이 점점 감소하는 경향을 보였다. 이는 Casselton과 Casselton (1966)이 *Coprinus lagopus*가 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03%의 농도에서 균사생육이 가장 우수하였다는 보고보다는 약간 낮은 경향이었으나 金 (1986)의 *Lyophyllum decastes*의 균사체 생산 최적 농도인 0.06%와는 큰 차이를 보였다.

다) $CaCl_2$ 농도

기본배지의 5종의 미량 무기염류중 균사속 생산에 가장 큰 영향을 미쳤던 $CaCl_2$ 의 농도를 0~10 mg%로 조정하여 그 영향을 검토한 결과는 Table 11에서와 같이 $CaCl_2$ 의 농도가 증가함에 따라 균사속의 생산도 증가하여 5.5 mg% (w/v)의 농도에서 배양 12일의 균사속 생산량이 고층배양에서 236 mg, 평판배양에서 288 mg으로 가장 높았으며 그 이상의 농도에서는 약간씩 감소되는 경향을 보였다. 이는 北本 등 (1974)의 *Psilocybe panaeoliformis*에서 $CaCl_2$ 의 첨가는 균사생육에 저해적 이었다는 보고와는 큰 차이를 보였으나 金 (1986)의 *Lyophyllum decastes*의 균사체 생산시 0.01%의 $CaCl_2$ 첨가는 균체 생육을 촉진시켰다는 보고보다는 약간 낮은 경향이 있었다.

라) 기타 무기염류

무기 미량원소들인 Mn, Fe, Zn 및 Ca ion등이 균사속 생산에 미치는 영향을 검토하여 본 결과는 Table 20와 같이 각종 미량원소들은 무첨가구에 비하여 첨가구에서 균사속의 생산을 촉진시켰는데 상기 5종의 미량원소 중 Ca ion을 제외한 4종의 원소만을 첨가시켰을 때 균사속의 생산이 현저히 감소되는 것으로 미루어 Ca ion이 균사속 생육과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

7) 비타민의 영향

담자균의 생육을 촉진시키는 것으로 알려진 Biotin, Folic acid, Ascorbic acid,

Table 17. Effect of potassium phosphate monobasic concentrations on the rhizomorph growth of *A. mellea*

KH ₂ PO ₄ conc. (%, w/v)	Stab culture			Plate culture		
	Growth rate(mm)		Mycelial dry weight(mg)*	Growth rate(mm)		Mycelial dry weight(mg)
	6 days	12 days		6 days	12 days	
0	(+) 9	(+) 5	126	(+) 13	(+) 31	205
0.05	(+) 12	(++) 27	205	(+) 15	(++) 60	218
0.10	(++) 17	(+++) 50	220	(++) 30	(+++) 72	231
0.15	(+++) 30	(+++) 55	230	(+++) 55	(+++) 90	243
0.20	(+++) 27	(+++) 50	217	(+++) 50	(+++) 90	240
0.25	(+++) 27	(+++) 47	163	(+++) 50	(+++) 85	222

A. mellea was cultured in Narkaran's medium (pH 5.0) for 12days at 25°C, and the rhizomorph weight (mg) was measured.

Number of rhizomorph: -; 0, +; 1, ++; 11-20, +++; above 20

Table 18. Effect of magnesium sulfate concentrations on the rhizomorph growth of *A. mellea*

MgSO ₄ conc. (%, w/v)	Stab culture			Plate culture				
	Growth rate(mm)		Mycelial dry weight(mg)*	Growth rate(mm)		Mycelial dry weight(mg)		
	6 days	12 days		6 days	12 days			
0	(++)	18 (+++)	45	143	(++)	47 (+++)	82	236
0.025	(+++)	45 (+++)	55	234	(+++)	55 (+++)	90	289
0.050	(+++)	30 (+++)	55	233	(+++)	52 (+++)	90	245
0.075	(+++)	30 (+++)	52	183	(+++)	32 (+++)	76	240
0.1	(++)	27 (++)	50	183	(+)	25 (++)	70	221

A. mellea was cultured in Narkaran's medium (pH 5.0) for 12 days at 25°C, and the rhizomorph weight (mg) was measured.

Number of rhizomorph: -; 0, +; 1, ++; 11-20, +++; above 20

Table 19. Effect of calcium chloride concentrations on the rhizomorph growth of *A. mellea*

CaCl ₂ conc. (mg%, w/v)	Stab culture			Plate culture		
	Growth rate(mm)		Mycelial dry weight(mg)*	Growth rate(mm)		Mycelial dry weight(mg)
	6 days	12 days		6 days	12 days	
0	(+) 20	(+) 5	143	(++) 47	(+++) 82	236
2.50	(+++) 40	(+++) 55	234	(+++) 55	(+++) 90	289
5.55	(+++) 45	(+++) 55	233	(+++) 52	(+++) 90	245
7.50	(+++) 43	(+++) 52	183	(+++) 32	(+++) 76	240
10.00	(++) 35	(++) 50	183	(+) 25	(++) 70	221

A. mellea was cultured in Narkaran's medium (pH 5.0) for 12 days at 25°C, and the rhizomorph weight (mg) was measured.

Number of rhizomorph: -; 0, +; 1, ++; 11-20, +++; above 20

Nicotinic acid, Ca-pantothenate 및 Thiamine · HCl 등이 균사속 생산에 미치는 영향을 검토하여 본 결과는 Table 21에서와 같이 뽕나무버섯균의 균사속 생산에 촉진 효과를 보이는 Vitamin 및 그 농도는 Biotin 0.05~0.1 mg/ℓ, Ascorbic acid 250 mg/ℓ, Nicotinic acid 0.1250 mg/ℓ, Thiamine · HCl 0.05~0.1 mg/ℓ 이었으며, 이중 가장 양호한 효과를 보인 Vitamin은 Thiamine · HCl이었다. Thiamine · HCl은 0.1 mg/ℓ 농도에서 고층배양시 250 mg, 평판배양시 307 mg의 균사속 생산량을 보여 가장 양호하였는데 이는 뽕나무버섯 균사속 생육에 가장 양호한 Vitamin은 Aneurin (Thiamine)으로 최적 농도는 50~100 μg/ℓ 이었다는 Kuraishi (1954)의 보고와 유사한 경향이였다.

나. 천연성배지를 이용한 균사체 생산

1) 최적배지선정

뽕나무버섯의 균사체 생산 최적배지를 선정하기 위해 기존에 보고된 천연, 합성, 반합성 액체배지에 50 ml 당 건조 균체량으로 153~155 mg인 접종원을 접종하여 25℃에서 11일 동안 배양시켜 건조 균체량을 측정된 결과는 Fig. 35과 같다. 균사체 생산은 GMEB (맥아즙 배지)가 2.3149 g으로 가장 양호하였고 그 다음으로는 MCM (버섯 완전배지), YEPD, PDB (감자추출물 배지), DSM (탈지대두박 배지), MEB, 변형된 Weinhold's (1982)의 배지 순이었으며, 맥아즙 배지, 버섯완전 배지, YEPD, 감자추출물 배지, 탈지대두박 배지에서는 균사속 (Rhizomorph)이 잘 형성되었으나 그 외의 제한된 배지에서는 형성되지 못하였다. 이는 최 등 (1983), Weinhold 등 (1963), 홍 등 (1987)의 연구와 유사한 경향을 보였으나, Hansson 등 (1984)이 MEB 배지에서 균사속을 생산했다는 보고와는 다소 차이가 있었다.

최 등 (1983)은 Gibberrellin, Vitamin, Folic acid 첨가가, Cheo (1981)는 Tannic acid (0.6%), Weinhold (1963), Moody 등 (1971), 홍 등 (1990)은 알코올, 유기산 및 지방산 첨가가 뽕나무버섯 균사체 생산에 효과를 나타내었다고 보고한 바 있으나, 보리에는 전분, 단백질, 지방의 유기질, Phosphate, Potassium salts 등의 무기질 성

Table 20. Effect of minor mineral salts on the rhizomorph growth of *A. mellea*

Mineral salt	Stab culture			Plate culture		
	Growth rate(mm)		Mycelial dry weight(mg)*	Growth rate(mm)		Mycelial dry weight(mg)
	6 days	12 days		6 days	12 days	
Control	(+) 18	(+) 30	102	(+) 25	(+) 43	205
MnSO ₄ +ZnSO ₄ +CaCl ₂	(++) 35	(++) 43	125	(++) 42	(++) 64	260
FeCl ₃ +ZnSO ₄ +CaCl ₂	(++) 27	(++) 40	150	(++) 36	(++) 50	240
FeCl ₃ +MnSO ₄ +CaCl ₂	(++) 40	(++) 45	191	(++) 45	(++) 65	268
FeCl ₃ +MnSO ₄ +ZnSO ₄	(+) 20	(+) 35	110	(+) 30	(+) 45	216
FeCl ₃ +MnSO ₄ +ZnSO ₄ +CaCl ₂	(+++) 45	(+++) 55	232	(+++) 52	(+++) 90	290

A. mellea was cultured in Narkaran's medium (pH 5.0) for 12 days at 25°C, and the rhizomorph weight (mg) was measured.

Number of rhizomorph: -; 0, +; 1, ++; 11-20, +++; above 20

Table 21. Effect of various vitamin source on the rhizomorph growth of *A. mellea*

Vitamin	conc. (mg/l)	Stab culture			Plate culture		
		Growth rate(mm)		Mycelial dry weight(mg) *	Growth rate(mm)		Mycelial dry weight(mg)
		6 days	12 days		6 days	12 days	
Control	0	(++) 20	(++) 37	165	(++) 24	(+++) 55	209
Biotin	0.01	(+++) 20	(++) 40	168	(++) 25	(+++) 62	213
	0.05	(+++) 43	(+++) 55	236	(+++) 50	(+++) 90	299
Folic acid	0.03	(+++) 23	(+++) 45	187	(+++) 43	(+++) 75	237
	0.15	(++) 23	(++) 47	195	(+) 47	(++) 82	247
Ascorbic acid	250	(++) 32	(+++) 50	214	(++) 51	(+++) 88	271
	1000	(+++) 25	(+++) 45	175	(+++) 36	(+++) 72	222
Nicotinic acid	0.1	(+++) 35	(+++) 50	230	(+++) 52	(+++) 90	292
	0.5	(+++) 25	(+++) 42	175	(+++) 35	(+++) 72	222
Ca-pantot- henate	0.1	(++) 23	(++) 40	168	(++) 28	(++) 63	213
	0.5	(+++) 21	(+++) 47	203	(+++) 50	(+++) 86	257
Thiamine . HCl	0.05	(+++) 45	(+++) 55	232	(+++) 52	(+++) 90	287
	0.10	(+++) 45	(+++) 55	240	(+++) 61	(+++) 90	307

A. mellea was cultured in Narkaran's medium (pH 5.0) for 12 days at 25°C, and the rhizomorph weight (mg) was measured.

Number of rhizomorph: -, 0, +, ++, 11-20, +++; above 20

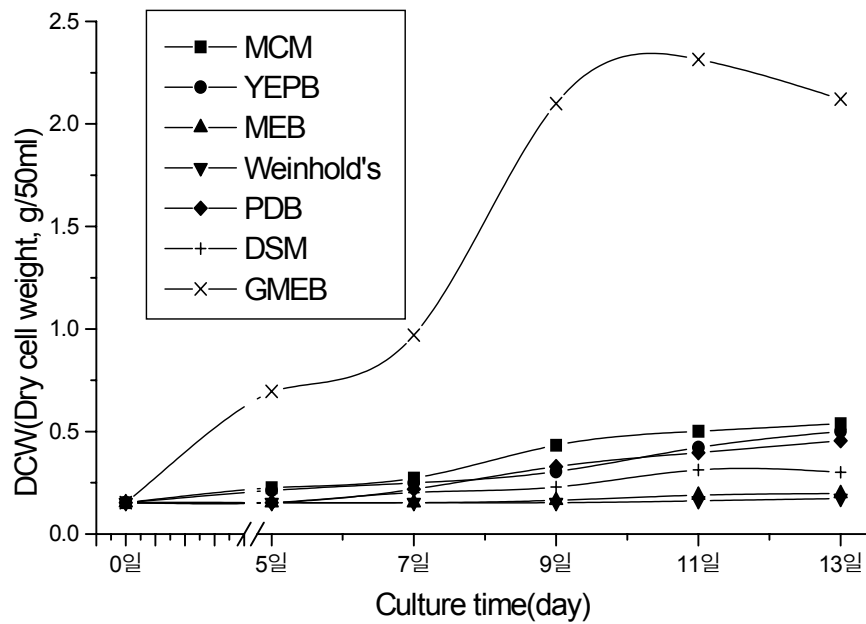


Fig. 35. Time course of mycelial production of *A. mellea*.

.grown at 25°C, pH 6.0 for 13days in various media.

.initial dry cell weight of mycelia was 0.153~0.155 g.

MCM : Mushroom complete medium

YEPD : Yeast Extract Peptone Dextrose medium

MEB : Malt Extract Broth medium

Weinhold's : modified Weinhold (1963) medium

PDB : Potato Dextrose Broth medium

DSM : Defatted Soybean Meal medium

GMEB : saccharified germinated-malt at 65°C and adjusted to
11 brix° (Yang, 1982)

분과 Polyphenol성 물질 및 Tannin, Vitamin B₁, B₂, E 등의 성분뿐만 아니라 발아 시 작용되는 Amylase, β -Glucanase, Protease, Phosphatase 등의 효소에 의한 고분자 물질의 저분자물질로의 전환에 의하여 맥아즙 배지에 풍부한 영양물질이 공급되어 짐에 따라 맥아즙 배지에서 균사체 생산이 우수한 것으로 추정된다

2) 균사체 생산배지 최적화

반응표면분석법 (RSM, Response Surface Methodology)은 여러 개의 요인변수가 복합적으로 작용하여 반응변수에 영향을 미칠 때 반응변화가 이루는 반응표면에 대한 통계적인 분석방법으로 제품개발 및 생산, 최적 공정조건을 찾는 데 세계적으로 널리 이용되고 있으며, 최근 우리나라의 식품개발 및 반응특성 연구에 많이 응용되고 있다. 최근 세균을 비롯한 효모, 사상균 등의 증식조건 및 2차 대사산물 생산의 최적조건을 확립하고자 많이 사용되고 있으나 뽕나무버섯 균사체와 같은 균사속을 형성하는 균류에 적용한 예는 보고된 바 없다.

맥아즙 배지가 그 외의 배지에서 보다 균사체 생산 수율이 4.6~14.2배가 높게 나타남에 따라 맥아즙 배지를 배양용 우수 배지로 선정하고 이의 최적조건을 확립하고자 맥아즙 배지의 농도 (Brix°)를 달리하여 pH 6.0, 25°C에서 14일 동안 배양시킨 후 건조 균체량을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 36과 같다.

Fig. 37에서와 같이 일반적으로 버섯균 배양에 사용하는 맥아즙배지의 농도 11 Brix° 보다 15 Brix° 에서 건조 균체량이 가장 우수하였으며, 그 이상의 농도에서는 오히려 억제효과를 보였다. 이때 배양액 중의 pH는 5.1~5.5 범위를 나타냈다.

Table 22는 Fig. 36에 표현된 데이터를 SAS Program (ver. 8.1)을 이용하여 RSM을 실행한 결과로 맥아즙 농도의 변화에 따라 통계적으로 균체량의 차이가 있음을 보여주고 있으며, 맥아즙 농도 16.123 Brix° 에서 최대 예측치 3.04 g/50 ml을 나타내었다 (P<0.001). 또한, 통계처리에 의하여 가정된 모형이 실제실험 데이터 자료에 얼마나 적합한지를 보여주는 결정계수 (R²)가 0.6832로 나타나 가정된 모형이 실험 데이터에 비교적 잘 표현해주고 있음을 알 수 있었다.

그러나 15 Brix° 에서도 3.03 g/50 ml의 높은 예측치를 보여주고 있으며, 또한 맥아즙배지 제조시 당화과정 후 당화액의 최종농도가 15.2~15.6 Brix° 사이에서 형성되어 진다. 그러므로 맥아즙 배지를 16 Brix° 이상으로 만들기 위해서는 농축과정이 추가되며, 이로 인한 경제적 손실 및 배지의 열변성이 발생한다. 따라서, 본 연구에서는 균체생산에 맥아즙 배지의 적정 농도를 15 Brix° 로 하였다.

Fig. 27는 15 Brix° 맥아즙 배지에서 초기배지 pH 조건에 따른 배양기간별 균체량의 변화로 pH 5.5와 pH 6.0 에서는 흡사한 경향을 보인 반면, pH 5.0에서는 현저한 증식억제를 보였다.

위의 결과를 바탕으로 뽕나무버섯 균사체 생산을 위한 온도 (X_1), pH (X_2), 배양기간 (X_3)의 최적조건을 구명하기 위하여 Table 11에 정의된 Cragle 등 (1955)의 반응표면 실험계획법을 적용하여 조건 구명을 실시하였다. 이 때 α 값을 2로, 중심점은 2개로 선정하였으며, 3반복으로 실시한 결과를 Table 23, 24와 Fig. 38로 나타내었다.

Table 23와 같이 온도, pH, 배양기간 등에 대하여 SAS Program (ver. 8.1)으로 RSM을 적용하여 분석한 결과 온도, pH, 배양기간의 각 인자들은 통계적으로 높은 유의성 ($P < 0.0001$)을 보여 온도, pH, 배양기간의 변화에 따라 뽕나무버섯 균사체 생산에 큰 영향이 있음을 알 수 있었으나 교호작용은 통계적인 유의성이 없었다. 또한, 결정계수 (R^2)가 0.843으로 높은 결정계수를 보였으며, 결정계수가 1에 가깝다 할 수 있으므로 가정된 반응 모형이 자료에 잘 적용됨을 알 수 있었다.

Table 24는 실험치와 Table 22의 방정식에 적용한 예측치를 비교한 결과로서 실험번호 2, 6, 7, 13, 14에서는 비교적 많은 차이를 보였지만 대부분의 데이터가 실험치와 예측치가 서로 유사하여 통계적으로는 25.90°C, pH 5.72, 배양기간 15.22 일에서 3.40 g/50 ml으로 최대 수율을 보이는 것으로 나타내었다.

Fig. 39는 RSM을 적용하여 3차원 반응표면과 2차원 등고선으로 나타낸 결과로서 23°C 미만, 29°C 이상의 온도와 5.0 이하와 7.0 이상의 pH에서는 뽕나무버섯 균사체 생육이 현저하게 저하된 반면, 25~27°C, pH 5.5~6.0 및 배양기간 14~17일에서 뽕나무버섯 균사체 생산이 가장 양호하였다. 특히, pH 5.5~6.0 범위에서 pH 변화에 대해서는 둔감하게 작용한 반면 온도와 배양기간의 변화가 뽕나무버섯 균사체 생산

에 민감하게 작용함을 보여주고 있어 온도와 증식기간이 뽕나무버섯 균사체 생산에 결정적인 요인임을 알 수 있었다.

최 등 (1983)은 본 실험과 동일한 맥아즙 배지 (11 Brix°)배지에 α gar를 첨가하여 고화시킨 고체배지에서 pH 6.0, 온도 27°C에서 뽕나무버섯 균사생육이 양호하였고, 상기배지에 vit. A 200ppm 첨가하였을 때 314.6 mg/10 ml의 균체량을 보였다는 보고는 본 실험과 유사한 경향임을 알 수 있었으나 균체량 면에 있어서는 2배 가량의 차이를 나타냈다.

또한, 합성배지에서 차 (1981)는 pH 6.2~7.0 범위에서 Cook 등 (1991)은 pH 6.2~5~6.5 범위에서 뽕나무버섯 균사체 생산이 양호하다고 보고하여 본 연구와 상이점이 있으나 이는 배지의 차이로 생각된다. 그러나 15~21°C의 온도범위에서 뽕나무버섯 균사체 생산이 양호하였다는 Gibson 등 (1964)의 보고가 있어 23°C 이하에서 균사체 생산이 현저하게 감소한 본 실험과는 대조적인 차이를 보여 이에 관한 연구가 요구된다.

전통적인 실험방법 즉, 한 변수를 제외한 모든 변수를 고정시키고 한번에 한 변수만을 변화시켜 그 효과를 관찰하는 방법은 변수들이 상호 의존성을 가지고 있을 경우에는 최적조건이라 보기 어렵다 (이 등, 2000). 그러나 통계적인 실험계획 및 방법은 이를 극복하여 전통적인 방법으로 찾아내기 힘든 True optimum condition을 구할 수 있다. 따라서 본 연구는 통계적인 방법을 적용하여 반응변수가 복합적으로 작용할 때 균사체 생산의 변화 및 최대 생산을 위한 이들 변수의 최적조건을 선정하였으며 추후 비슷한 연구에 중요한 자료가 되리라 사료된다.

3) 천연물 추출물이 균사체 생산에 미치는 영향

뽕나무버섯 균사체 생산용 배지에서 균사체의 기능적 특성을 향상시킬 목적으로 국내에서 약용 및 식용으로 이용되는 각종 기능성 소재들의 첨가가 균사체 생산에 미치는 영향을 검토하였다. 각종 천연물을 10배 (v/w)의 멸균수를 가한 후 환류냉각 장치를 부착하여 100°C에서 6시간 추출하고 3000×g에서 30분간 원심분리하여,

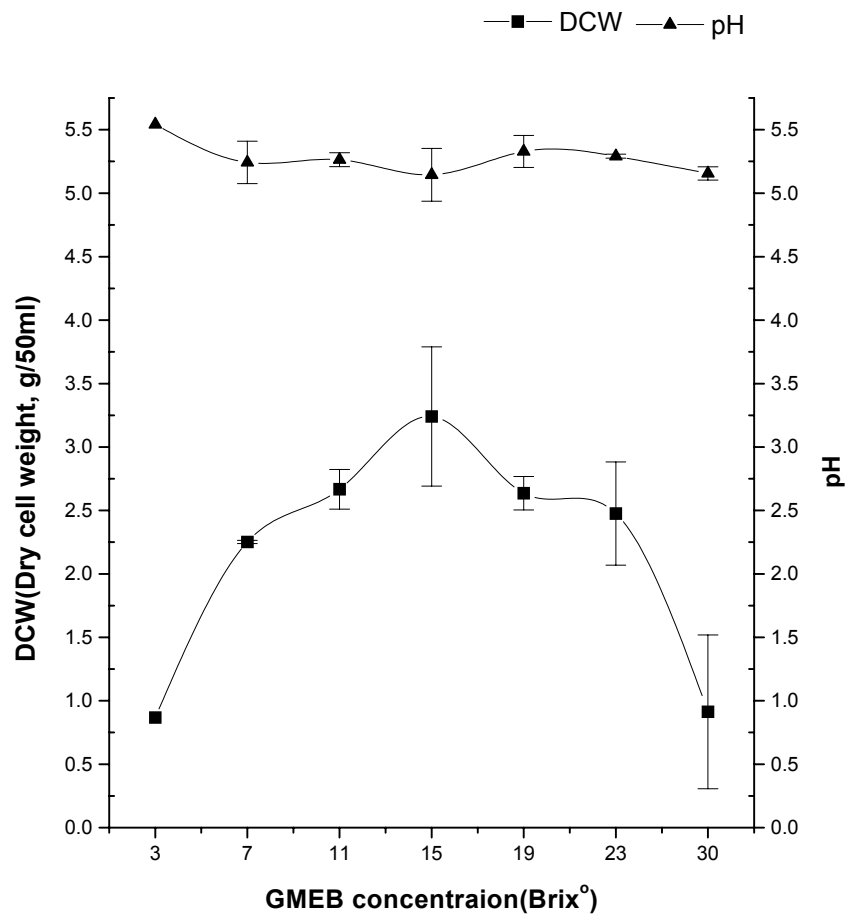


Fig. 36. Effect of GMEB concentration (Brix°) on the mycelial production of *A. mellea*

. grown at 25°C and pH 6.0 for 14 days

. Data shown are means of five replicates ± S.E.M

Table 22. The equation by RSM program for DCW of *A. mellea* on various GMEB concentration.

Factor	Pr > F	Equation
Brix°	0.0010	$Y = -0.011B^2 + 0.3640B + 0.1069$

Coefficient of determination (R²) = 0.6832

Maximum predicted value at stationary point (B = 16.123) : 3.04

Y = DCW (g/50ml) of *A. mellea* (25°C, pH 6.0)

B = Brix°, GMEB concentration

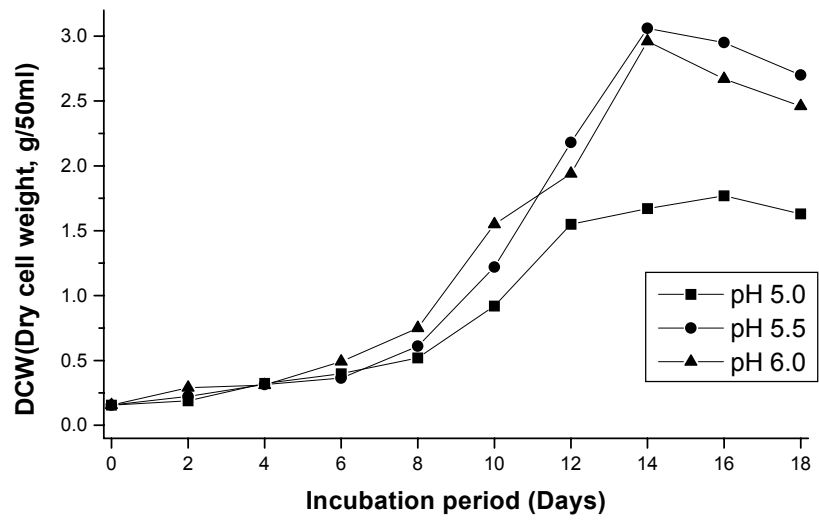


Fig. 37. Effect of pH on the mycelial production of *A. mellea* in GMEB (15 Brix°)

Table 23. The equation by RSM program for DCW of *A. mellea* for the defined model in Table 11.

Factor	Pr > F	Equation
X ₁ (Temperature)	<.0001	$Y = -0.157X_1^2 - 1.903X_2^2 - 0.091X_3^2 - 0.495X_1X_2 + 0.009X_1X_3 + 0.095X_2X_3 + 10.830X_1 + 33.132X_2 + 1.189X_3 - 246.707$
X ₂ (pH)	<.0001	
X ₃ (Incubation period)	<.0001	

Coefficient of determination (R²) = 0.8432

Table 24. Predicted and experimental value of response surface for mycerial production of *A. mellea* at the defined conditions in Table 11.

Trial no.	Variables			Experimental value(g/50ml)	Predicted value**(g/50ml)
	X ₁	X ₂	X ₃		
1	-1	-1	-1	1.147	0.889
2	1	-1	-1	2.925	2.333
3	-1	1	-1	0.534	0.948
4	1	1	-1	0.311	0.414
5	-1	-1	1	1.756	1.588
6	1	-1	1	3.655	3.176
7	-1	1	1	1.500	2.026
8	1	1	1	1.442	1.635
9	0	0	0	3.145	3.093
10	0	0	0	2.978	3.093
11	-2	0	0	0.343	0.336
12	2	0	0	0.752	1.106
13	0	-2	0	1.216	1.932
14	0	2	0	1.101	0.450
15	0	0	-2	0.547	0.681
16	0	0	2	2.671	2.601

Variables coded are same as given in Table 3.

** Predicted values were obtained by equation in Table 15.

Maximum predicted value at stationary point: 3.403079

(X₁=25.90, X₂=5.72, X₃=15.22)

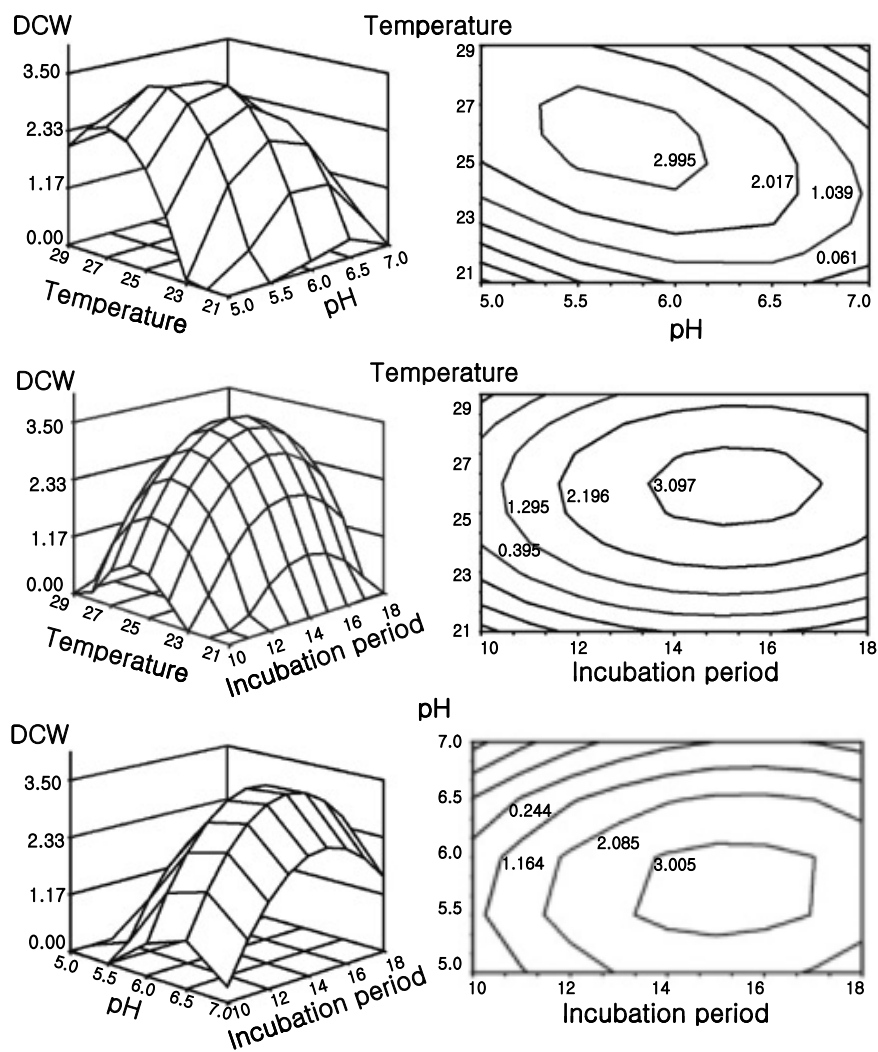


Fig. 38. Response-surface (left) and contour graphic (right) of mycelial production of *A. mellea* for temperature, pH and incubation period

. DCW : Dry cell weight (g/50ml)

. Incubation period : days

그 상징액을 배양액에 1~5% (v/v) 되게 첨가하고 최종농도를 11 Brix° (pH 6.0)로 조정하여 12일간 배양한 결과를 Fig. 39으로 나타내었다.

Fig. 39과 같이 대부분의 천연 약재들에는 각종 항균성 물질들의 함유로 미생물의 생육 억제활성이 있는 것으로 알려져 있으나 이들의 첨가가 뽕나무 버섯균의 균사체 성장에는 인삼과 오갈피 가지 첨가구를 제외하고는 큰 저해 현상이 관찰되지 않아 뽕나무버섯 균사체의 기능성 향상을 위해 이들 재료의 활용 가능성이 충분히 있다고 판단되었다.

뽕나무버섯 균사체 생산에 큰 저해를 보였던 것은 인삼 추출물이었으며, 가시오갈피의 줄기, 윗피 등도 정도의 차이는 있었지만 약간의 저해 현상을 보였다. 그러나 저해현상이 심하게 나타난 인삼을 제외하고는 뽕나무버섯 균의 기능성 향상을 위한 소재로서의 활용 가능성은 충분히 있다고 판단되었다. 생육저해현상을 보였던 재료들은 비교적 수지성분이 다량 함유된 식물체 추출물들이었다.

다. 천연물 추출물이 혈전용해활성에 미치는 영향

Vincent 등 (1999)의 방법에 준하여 분리한 *A. mellea* 균사체 단백질에서 안정적으로 활성을 유지시키면서 효소를 분리하기 위하여 에탄올 추출법을 사용하였다. 혈전분해 효소가 분리되는 농도를 구하기 위하여 에탄올 농도를 50%, 70%, 85%로 점차 증가시켜 가면서 분리하였다. 분리되어진 효소단백은 Lowry 등 (1951)의 방법에 의해 단백질을 정량한 후 1% Azocasein assay를 통하여 단백질 분해활성을 측정하였고, 2% fibrin plate assay를 수행하여 혈전 용해활성을 측정한 결과를 Table 25 및 Fig. 40로 나타내었다.

단백질 분해 활성 및 혈전 용해활성은 50~70% 에탄올 농도에서 분리한 조효소액에서 활성을 보였다. 또한 뽕나무버섯 균사체 배양 중 각종 천연물 및 무기물들에 의한 단백질 분해 활성 및 혈전 용해활성의 상승효과를 검토한 결과 5% 가시오갈피 가지 및 5% 홍삼박 첨가구에서 Proteolytic specific activity와 혈전 용해활성 모두가 무첨가구에 비해 현저히 증가 (149~176%)되어 배지에 첨가되는 각종 물질들이 효소의 생산에 많은 영향을 미치는 것으로 나타났다. 단백질 분해활성은 5% 가시오

갈피 뿌리, Ge (100 ppm), Se (50 ppm) 첨가구에서 낮은 활성을 보였던 반면, 혈전 분해활성에 있어서는 이들 첨가구에서 무첨가구 보다 높은 생산력을 보였다. 이는 첨가되어진 각종 천연물 및 무기물이 대사작용에 관여하여 효소생산에 많은 영향을 주고 기질특이성에도 관여하는 것으로 사료된다.

Kim 등 (1998)은 전통 발효식품인 된장으로부터 분리되어진 *Bacillus* sp.로 부터 분리한 혈전분해효소는 1.3 Plasmin unit의 활성을 가지고 있다고 보고했으며, 또한 김 등 (1999)은 모래밭 버섯 (*Pisolithus tinctorius*) 자실체의 메탄올 추출물이 4.71 Plasmin unit의 혈전분해활성이 있다고 보고한 바 있다. 본 실험에서도 뽕나무버섯 균사체에서 추출한 조효소액의 혈전분해 활성이 5% 홍삼박 첨가구에서 0.72 plasmin unit/mg protein로 여러 처리구 중 가장 높게 나타났다. Kim 등 (1999)은 뽕나무버섯 자실체의 혈전분해 활성이 조효액은 0.17 Plasmin unit를 보인 반면, FPLC를 이용하여 정제하였을 경우 17 Plasmin unit를 나타낸다는 보고가 있어 본 실험에 사용된 뽕나무버섯 균사체 또한 완전 정제되었을 경우 기 보고된 버섯 자실체 효소와도 큰 차이가 없을 것으로 판단된다.

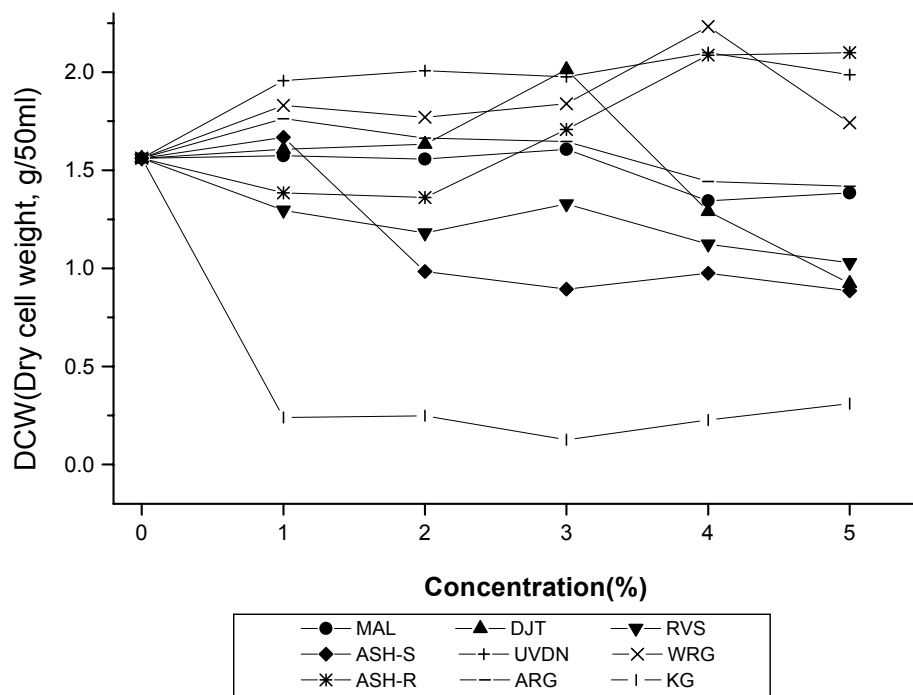


Fig. 39. Effect of various plant extraction added in GMEB on mycelial production.

. which were grown at 25°C, pH 6.0 for 12days

Table 25. The effect of extract of plant and inorganic compounds, added to media on proteolytic activity of *A. mellea*

Added to medium (%, v/w)		Crude	50~70% EtOH	
		Total protein (mg/50g)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)
1	Not added	1572.73	119.95	8.6
2	5% MAL	2292.46	175.36	7.2
3	5% DJT	1999.24	93.11	9.2
4	5% RVS	3188.12	124.52	7.2
5	5% ASH-S	1466.11	127.38	12.8
6	5% UDVN	1226.20	89.11	6.5
7	5% WRG	1759.33	81.11	15.1
8	5% ASH-R	1599.39	130.24	3.2
9	Ge 100ppm	1466.11	42.27	5.6
10	Se 50ppm	2025.90	41.13	7.5

ASH-S : *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Max.) Harms. stem

ASH-R : *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Max.) Harms. root

* 1 unit is azocasein yield at absorbance of 0.1 at 366 nm following a incubation at 37°C for 20 min

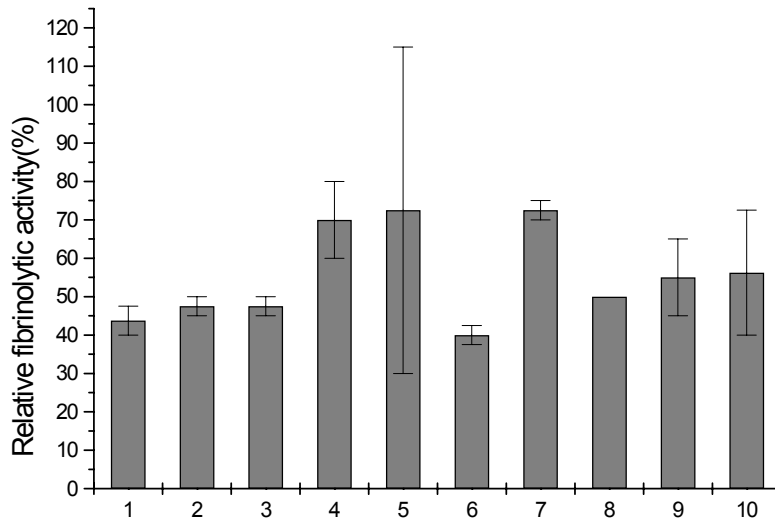
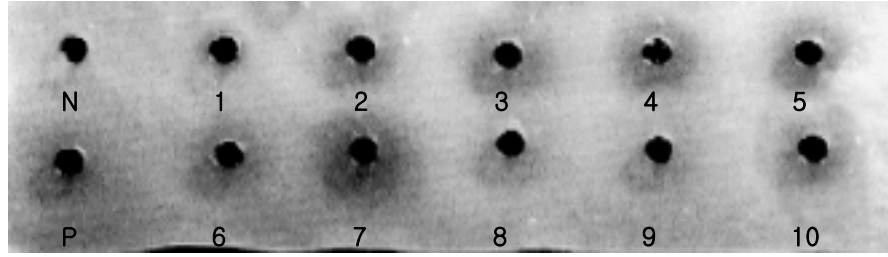


Fig. 40. The effect of extract of plants and inorganic compounds to fibrinolytic activity.

. mycelium was extracted with 50~70% Ethanol

. fibrinolytic activity assayed on 2% fibrin agarose plate at 37°C, 24 hrs.

N : Negative control : Autoclaved with 3rd D.W

P : Positive control : plasmin (1 unit)

1~10 : Variables coded are same as given in Table 11. (200 μ g)

Data shown are means of three replicates \pm S.E.M

라. 균사체의 성분

1) 일반성분

뽕나무 버섯 균사체의 일반성분을 분석한 결과는 Table 26과 같다. 뽕나무버섯 균사체 성분으로는 특히 단백질의 함량이 높았다.

2) 비타민 D

Vitamin D는 장관에서 칼슘의 흡수, 뼈에서는 칼슘대사 등에 관여하는 중요한 영양소로 현재까지 Provitamin D₂에서 D₇ 까지 발견되었다. 버섯이 단순한 식품재료에 머물지 않고 우수한 Provitamin D의 자원 (0.19~4.92 mg/g)으로서 중요한 위치를 차지하기 위해서는 다량의 Vitamin D를 생산하는 우수 버섯의 개발이 요망된다. 일반적으로 버섯은 천연물 중에서 Vitamin D의 전구물질인 Provitamin D (Ergosterol)를 가장 많이 함유하고 있으며, 무공해 자연식으로 뿐만 아니라 건강식으로도 널리 알려져 있어 그 소모량도 날로 증가하고 있지만, 현재까지의 버섯생산은 양적인 측면에서만 고려되어 왔으며 버섯 중에 함유된 특수성분은 제대로 활용되지 않고 있다.

Vitamin D가 결핍되면 뼈의 석탄화 (Calcification)가 정상적으로 이루어지지 않아 구루병이 발생한다. 특히 현대의 고령화 사회에서는 골조발증이 심각한 사회문제로 대두되고 있다. 이러한 골조발증을 예방하기 위해서는 소아기 때부터 Vitamin D나 칼슘을 충분히 섭취하고, 지속적이고 적당한 운동을 통하여 30세 중반에 도달하는 최대 골량을 증대시켜야 한다.

이러한 Vitamin D는 어류의 일부와 버섯에 풍부하게 함유되어 있지만, 계란이나 우유 중에는 미량이 함유되어 있을 뿐 다른 식품에는 거의 함유되어 있지 않다. 미국에서는 Vitamin D의 부족을 보충하기 위해 시판우유 1 ℓ당 400 IU정도의 Vitamin D를 강화(첨가)하고 있다. 우리나라에서도 두유와 같은 식품에 일부 첨가하는 시도가 있기는 하나 Vitamin D 강화 식품은 극히 미미한 실정이다.

Table 26. Nutritional composition of *A. mellea* (mycelium)

(%)

	Crude				Carbo- hydrate	Water
	Fat	Fiber	Protein	Ash		
Mycelium of <i>A. mellea</i>	2.3	11.6	37.62	3.18	48.14	91.87

Carbohydrate = 100 - crude (fat + fiber + ash + protein)

Table 27. Vitamin D content of various mushroom sources.

Species Vitamin D	Fruit bodies					Mycelium of <i>A. mellea</i>
	<i>Lentinus edodes</i>	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Flammulina velutipes</i>	<i>Pleurotus eryngii</i>	
Ergocalciferol ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	424	290	289	573	265	305
Ergosterol ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	139,279	50,788	102,728	56,236	99,943	101,823
Total vitamin D ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	139,702	51,078	103,017	56,809	100,208	102,128

일반적으로 버섯은 천연물 중에서 Vitamin D의 전구물질인 Provitamin D를 가장 많이 함유하고 있는 것으로 알려져 있어 뽕나무버섯 균사체의 영양학적 활용가치를 타진하고자 뽕나무 버섯 균사체 100 g에 함유된 Vitamin D를 Takamura 등 (1991)의 방법에 준하여 추출한 후 Provitamin D 및 Vitamin D의 함량을 HPLC로 분석·정량한 결과를 Table 19에 나타내었다.

Table 19에서 보는 바와 같이, 각종 식용 및 약용버섯의 자실체 및 뽕나무 버섯 균사체에 존재하는 Vitamin D는 대부분 비활성형인 Provitamin D가 대부분이었으며, 100 g 중량에 대하여 총 Vitamin D의 함량은 50~140 mg으로 분포되어 있었고 총 Vitamin D 중에서 활성형 Vitamin D (Ergocalciferol)는 0.2~1.0 w/w%이었다.

이 중에서 느타리버섯 자실체가 총 Vitamin D 함량이 103 mg%로 가장 높았으나 뽕나무버섯 균사체에 함유되어 있는 총 Vitamin D도 102.128 mg%로 표고버섯 외 3종의 버섯 자실체 보다 높았으며, 느타리버섯의 자실체와도 거의 비슷한 결과를 보여 Vitamin D 자원으로서 충분한 활용가치를 가지고 있다고 판단된다.

마. 뽕나무버섯 균사체를 이용한 기능성 식품 개발

세계적으로는 버섯류에 대한 영양소 및 기호성과 더불어 기능적 특성이 밝혀지면서 뽕나무 버섯, 상황, 천마, 구름버섯, 영지, 신령버섯, 노루궁뎅이 버섯, 동충하초, 표고버섯, 팽이버섯 등을 이용한 의약품 개발 내지는 건강보조식품으로 개발되고 있으나 우리나라에서는 이에 대한 연구가 미흡한 실정으로 국내 부존 버섯자원에 대한 연구개발이 체계적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

특히 버섯류를 새로운 생물신소재로 이용하기 위해서는 이들의 효율적인 배양관리와 저렴한 원료를 이용한 대량생산 기술이 요구되고 있다.

기능성 음료 제조를 위하여 현재 각종 생약제 및 기호성 식품원료의 종류, 적정 배합 농도 및 처리조건에 관한 실험을 수행하고 관능검사를 통하여 선정된 배합조건 및 살균조건을 거친 후 최종 상품을 (주)바이젠과 공동연구에 의하여 개발하였다.

1) 원료

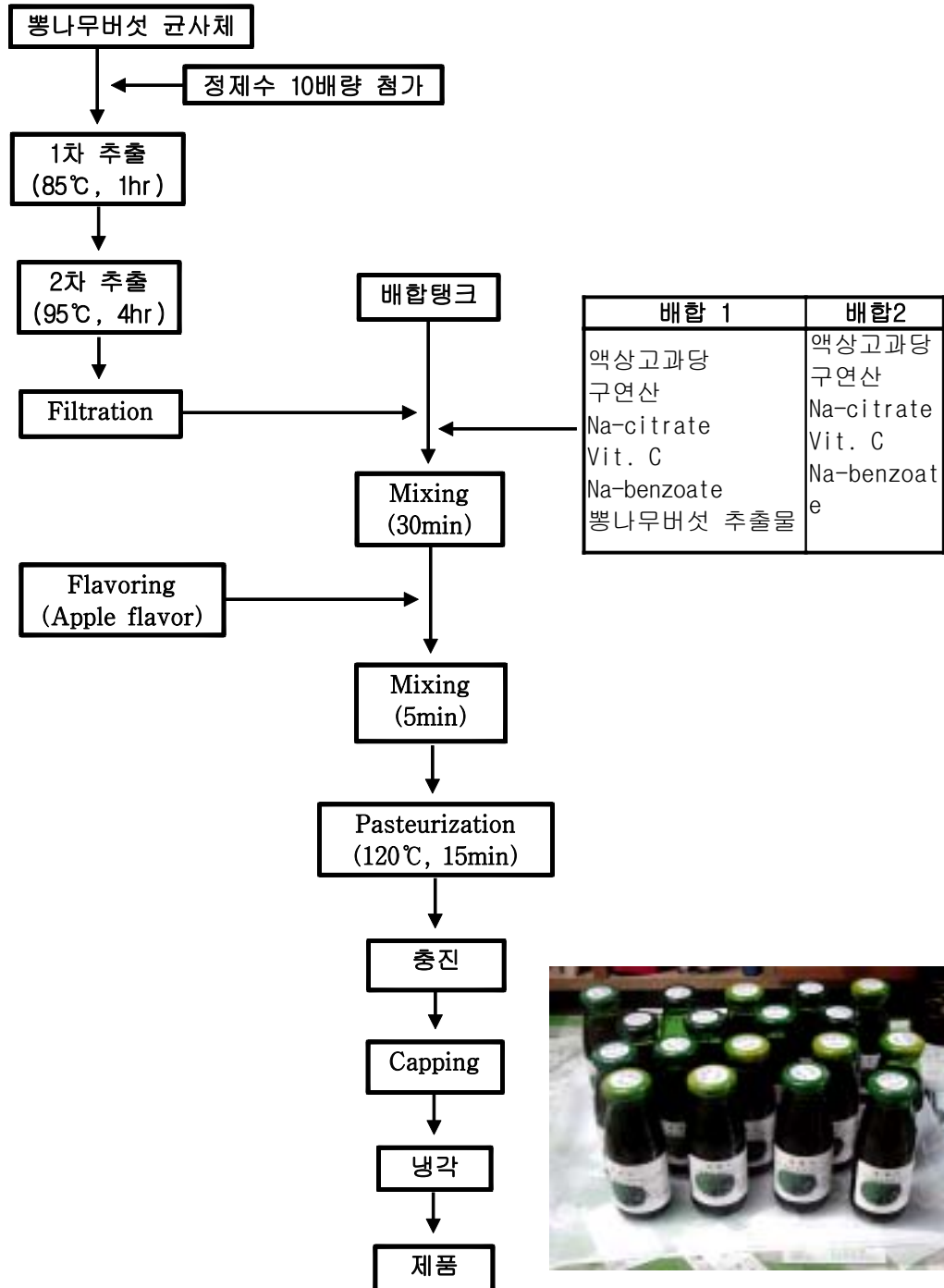
익산대학에서 규명한 뽕나무 버섯균 균사체 인공대량생산을 적정조건에 준하여 대량생산한 뽕나무버섯균 균사속을 활용하여 가공식품 재료로 사용하였다. 즉 1ℓ 플라스틱 종균병에 pH 5.7, 15 Brix° 농도의 맥아즙 배지 500 ml를 분주하고 살균하고, 뽕나무버섯 균사체가 배양액 속으로 가라앉지 않게 특수처리된 종균 일정량을 접종하여 25±2℃로 조절된 배양실에서 30일간 배양하고 배양 후 흐르는 수돗물로 충분히 배양물을 세척한 후 가공용 재료로 사용하였다.

세척된 균사체 생산물은 생체량에 대하여 10배수에 해당하는 정제수를 첨가하고 85℃ 1시간, 95℃ 4시간 열수추출하고 여과하여 각종 첨가제의 적정 농도를 관능검사를 통하여 선정한 후 기능성 음료를 제조하였다. 적정 배합제의 선정은 뽕나무버섯 추출물을 기초로 하여 기타 첨가제는 맛 조정으로 기호성 향상을 위한 최소농도에 기초하여 배합비를 설정하였다.

2) 제품 배합비

원료명	종류		비고
	A type	B type	
뽕나무버섯 균사체 추출물	84.00%	80.00%	생체 10배수 열수추출물
뽕나무버섯 추출물	-	4.00%	시판 첨가제
High fructose corn syrup	15.55%	15.55%	72° Brix
Citric acid	0.16%	0.16%	
Sodium citrate	0.04%	0.04%	
Vitamin C	0.05%	0.05%	
Sodium benzoate	0.05%	0.05%	
Flavor	0.15%	0.15%	Apple flavor
합 계	100%	100%	

3) 제조 공정도



4. 적 요

가. 합성배지를 이용한 뽕나무버섯 균사속 생산

- 1) 각종 탄소원중 Glucose가 균사속생산에 가장 우수한 탄소원이었고 Glucose의 최적 농도는 1.5%이었다.
 - 2) 각종 질소원중 Proteose peptone이 균사속 생산에 가장 우수한 질소원이었으며, Proteose peptone의 최적농도는 0.2%이었다.
 - 3) KH_2PO_4 의 최적농도는 0.15%이었고, MgSO_4 의 최적농도는 0.025%이었다.
 - 4) 기타 무기염류중 균사속 생산에 가장 영향을 많이주는 것은 CaCl_2 이었으며, CaCl_2 의 최적농도는 5.55 mg%이었다.
- 다. 균사속 생산에 가장 효과적인 Vitamin은 Thiamine · HCl이었으며, 최적농도는 1000 $\mu\text{g}/\ell$ 이었다.

나. 반합성배지와 천연배지를 이용한 균사속의 생산

뽕나무 버섯균사체 생산의 최적배지 선정을 위하여 7종의 배지 (MCM, YEPD, MEB, Weinhold's, PDB, DSM, GMEB)를 대상으로 실험을 수행한 결과 맥아즙 (GMEB)배지가 뽕나무 버섯 균사체 생산에 가장 우수하였다.

다. 염가 천연배지 상에서의 균사체 대량생산 조건

- 1) 맥아즙 배지에서 뽕나무 버섯균 균사체 생산을 위한 적정조건은 맥아즙 농도 15 Brix° 이었으며 온도, pH, 배양기간의 조건을 반응표면분석법에 의해서 실행한 결과, 통계적으로 온도 25.9°C, pH 5.72, 배양기간은 15.22일에서 3.40 g/50 ml의 최대 예측치를 나타내었다.
- 2) 11 Brix° 맥아즙 배지에 1~5% 농도로 각종 천연물 추출액의 첨가 뽕나무 버섯 균사체 생산에 미치는 영향을 살펴본 결과 대부분의 천연물 추출액의 첨가는 균사

체 생산에 큰 영향을 주지 않았으나 가시오갈피 가지, 율피 처리시 증식이 약간 억제되었다. 특히, 인삼 첨가구에서는 현저한 증식억제를 보였다.

라. 뽕나무버섯 균사체의 혈전용해활성

뽕나무 버섯 균사체로부터 혈전분해효소 생산을 증대시키기 위해 배양액에 5% 농도의 각종 천연물 추출물 및 무기물 (Ge 100 ppm, Se 50 ppm)을 첨가한 결과 홍삼박 첨가구에서 0.72 Plasmin unit/mg protein으로 가장 높은 활성을 보였다.

마. 뽕나무버섯 균사체의 영양성분

각종 식용 및 약용버섯의 자실체 및 뽕나무 버섯 균사체에 존재하는 총 Vitamin D의 함량은 50~103 mg/100 g으로 분포되어 있었으며, 뽕나무버섯 균사체에 함유되어 있는 총 Vitamin D도 102 mg/100 g으로 표고버섯 외 3종의 버섯 자실체 보다 높았다. 또한 건조량 기준으로 뽕나무버섯 균사체의 일반성분은 조지방 2.3%, 조섬유 11.6%, 조단백 37.6%, 조회분 3.2%, 탄수화물 48.1%로 탄수화물과 조단백질 함량이 높았다.

바. 뽕나무버섯 균사체를 이용한 기능성 식품 개발

기능성 음료 제조를 위하여 현재 각종 생약제 및 기호성 식품원료의 종류, 적정 배합 농도는 뽕나무버섯 균사체 추출물 84%, 고과당 15.55%, Citric acid 0.16%, Sodium citrate 0.04%, Vitamin C 0.05%, Sodium benzoate 0.05%, 사과향 0.15%이었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

본 연구는 2001 년 8 월 ~ 2003 년 8월까지 2년간 “버섯으로부터 혈전분해효소 생산 및 유전자크로닝“이라는 연구목적에 따라 주관연구기관인 조선대학교와 협동연구기관인 국립익산대학에 의하여 다음과 같은 연차별 목표 및 연구가 성실하게 진행되었다고 사료되어진다.

1. 1 년차 “고기능성 유용균주를 선별하여 혈전분해물질과 생리활성물질 탐색 및 분리”

가. 주관연구기관 조선대학교

1) 연구개발목표 : 혈전분해물질과 생리활성물질 탐색

2) 연구개발 내용 및 달성도

가) 버섯으로부터 신경성장인자 및 생리활성의 탐색

주관연구기관인 조선대학교와 협동연구기관인 국립익산대학에서 우수한 약리효과와 대량배양이 가능한 버섯으로 선정하고, 인공배양시킨 뽕나무버섯 균사체로부터 열수추출, 에탄올 및 메탄올 추출하여 얻은 추출물을 이용하여 실험동물에 투여시킨 후 파킨슨씨병과 알츠하이머병의 원인인 신경퇴행을 완화시키는데 관여하는 신경영양인자(Neurotrophic factor), 도파민(Dopamin) 생합성에 관여하는 Tyrosine-hy

droxylase (TH) 유전자의 발현유도를 확인하였다.

실험동물에 다양한 시간 및 투여량을 결정하여 신경영양인자 (Neurotrophic factor) 인 Brain Derived Neurotrophic factor (BDNF), Glial Derived Neurotrophic factor (GDNF), tyrosine-hydroxylase (TH) 유전자의 발현을 확인함으로써 뽕나무버섯의 퇴행성신경질환에 대한 완화효과와 치매예방 및 퇴행성신경예방 효과에 대하여 분석하였다. 또한 뽕나무버섯 배양배지를 다양한 천연배지를 이용하여 배양시킨 후 항산화효과 및 항혈전효과를 분석하여 뽕나무버섯의 다양한 생리활성 중 항노화효과 및 체내 혈전형성에 대한 예방효과를 확인하였다.

나) 혈전분해효소의 분리 및 특성분석

기 선정된 뽕나무버섯을 협동연구기관인 익산대학에서 균사체를 대량배양하여 이를 분양받아 혈전분해효소를 분리정제하고 특성을 분석하였다.

뽕나무버섯 균사체로부터 에탄올침전법, 이온교환수지법, Gel-filtration 등 다양한 정제방법을 통하여 22 kDa의 혈전분해효소를 분리정제 하였으며, 금속이온, 단백질 분해효소억제인자, Chromogenic substrate, 온도, pH에 의한 혈전분해효소의 특성을 분석하여 뽕나무버섯 균사체로부터 분리정제된 혈전분해효소는 metalloprotease 및 Chymotrypsine-like protease임을 확인하였다. 또한 분리정제된 혈전분해효소의 아미노산서열을 분석한 후 미국의 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에 등록되어있는 뽕나무버섯 자실체의 혈전분해효소인 AMMEP와 아미노산 서열을 분석하여 99%이상 상동성을 나타내고 있음을 확인하여, 동일한 혈전분해효소임을 확인하여 향후 균사체를 대량배양함으로써 저렴한 혈전분해효소의 정제에 대한 기초자료를 제공하였다.

다) 혈전분해효소 유전자의 탐색

아미노산 서열을 분석한 결과 NCBI에 등록되어있는 뽕나무버섯 자실체의 혈전분해효소인 AMMEP와 98% 상동성을 나타내고 있음을 확인하였고, 이들의 유전자 염기

서열을 분석하여 유전자의 크로닝을 위한 다양한 primer를 제작하여 뽕나무버섯 균사체에 동일한 혈전분해효소 유전자가 존재함을 확인하였다.

나. 협동연구기관 익산대학교

1) 연구목표 : 고기능성 유용균주 선발 및 균주별 영양조건 확립

2) 연구개발 내용 및 달성도

가) 고기능성 유용균주선발

야생 균주 및 일반 재배되고 있는 영지, 운지, 노루궁뎅이, 뽕나무버섯, 표고, 느타리 등 식용 및 약용버섯균을 대상으로 경제성 및 기능성이 우수한 소재로 뽕나무버섯 균사체를 선정하였다.

나) 균주별 영양조건 확립

선발균주에 대한 영양요구성 검토를 위해 합성배지, 반합성배지, 천연배지를 대상으로 실험을 실시하였다. 합성배지내의 탄소원, 탄소원의 농도, 질소원, 질소원 농도, 무기염류 (KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , 기타 무기 미량원소들인 Mn, Fe, Zn 및 Ca ion 등) 및 Vitamin 등의 영양 요구성을 구명하였으며, 반합성배지와 천연배지를 조제하여 뽕나무버섯 균사체 대량 생산 최적배지 선정을 위해 합성배지, 반합성배지와 천연배지들의 배지조성을 달리하여 검토한 결과 천연배지인 맥아즙배지를 균사체 생산 최적배지로 선정하였고, 균사체 수율 증진을 위한 배양방법 등 뽕나무버섯 균사체 생산을 위해 배양조건 구명하였다. 또한 균사생산 과정 중 유용효소인 혈전용해효소의 생산 증대를 위한 천연유기물 및 무기물의 첨가효과도 검토하였다.

2. 2 년차 “혈전분해효소의 대량생산과 실용화 기술개발”

가. 주관연구기관 조선대학교

1) 연구개발목표 : 혈전분해효소 유전자의 크로닝 및 대량생산과 제품화 가능성

2) 연구개발 내용 및 달성도

가) 뽕나무버섯으로부터 혈전분해효소 유전자의 크로닝

기 정제된 혈전분해효소의 아미노산 서열을 기초로 다양한 primer를 이용하여 혈전분해효소유전자를 크로닝하여 염기서열을 분석한 결과 1,056 bp로 구성되어있으며, NCBI에 등록되어있는 뽕나무버섯 자실체의 혈전분해효소인 AMMEP의 염기서열과 98% 이상의 상동성을 가지는 혈전분해효소를 크로닝하여 이를 이용한 혈전분해효소의 생명공학적 대량생산 및 순수대량분리에 대한 기초자료를 제공하였다.

나) 혈전분해효소의 상품화 가능성

혈전분해효소를 생산하는 뽕나무버섯 균사체를 대량배양함으로써 이를 이용한 체내 혈전형성억제 및 퇴행성신경예방에 대한 시너지 효과를 가진 기능성 식품의 대량생산을 위한 첨가물 조성 및 분말을 이용한 캡슐화, 음료화를 대량생산하기 위한 시제품을 개발하였으며, 이를 대량생산하기 위한 상품화 가능성을 test하였다.

나. 협동구기관 국립의산대학

1) 연구개발목표 : 혈전분해능 우수균 선발 및 버섯균 대량생산 체계화와 실용화 기술개발

2) 연구개발 내용 및 달성도

가) 혈전 용해능 우수균 선발 버섯균

혈전용해 활성이 우수한 버섯 자원을 발굴하므로서 식·의약용으로 활용 가치를 높이고자 14종의 버섯균 균사체와 7종의 인공재배된 자실체를 대상으로 버섯의 종류, 버섯 균사체 배양액, 균사체, 자실체 등 각종 단계에서 혈전용해활성을 검토한 결과 뽕나무버섯 균사체를 이용한 혈전용해효소 생산이 가장 우수함을 확인함.

나) 버섯균 대량생산 체계확립 및 실용화 기술개발

뽕나무버섯 균사체의 대량생산을 위한 적정 배양조건 구명을 위해 온도, pH, 배양기간을 최적화하였다. 뽕나무버섯 균사체를 이용한 가공식품 개발을 위해 뽕나무버섯균의 영양성분조성으로 일반성분과 버섯류의 주요 비타민인 vitamin D를 분석하였다. 기능성 음료 제조를 위하여 현재 각종 생약제 및 기호성 식품원료를 배합하여 기능성 음료를 제조하였다.

다) 대량생산방법에 대한 특허출원

주관연구기관인 조선대학교와 협동연구기관인 국립익산대학에 의하여 선별된 뽕나무버섯 균사체의 대량생산에 대하여 다음과 같이 특허를 출원하였다.

출원번호 10-2002-0045686, “ 뽕나무버섯 균사체 생산방법 및 그 배지 조성물 ”

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 제품화 개요

1. 제품화 기술의 중요성(필요성)

1) 혈관이 손상되면 출혈이 일어나고 지혈과정이 뒤따르며 이 과정에서 형성된 혈소판과 섬유소(Fibrin)의 응집체인 혈전(Thrombus)은 지혈과정이 완결되고 손상된 부위의 조직이 재생되면 Plasminogen 활성화제인 Urokinase(UK), Tissue-type plasminogen activator(tPA), Streptokinase (SK)에 의해 Plasminogen이 활성화된 plasmin에 의해 용해되어 혈관의 혈액은 다시 정상상태를 유지하게 된다. 만약 생성된 혈전이 체내에 과도하게 축적되거나 혈전용해 기작이 원활하게 작동하지 못할 경우 혈전증(Thrombosis)을 유발하여 인체에 치명적인 손상을 줄 수도 있다. 이 혈전은 혈관을 따라 흐르며 뇌혈전증, 뇌출혈, 심부전증, 심장마비와 같은 혈관계 질환을 유발하는데 현대인의 사망원인 중 혈관계 질환에 의한 사망이 39%로 알려지고 있어 이 혈관계 질환의 주원인 중 하나인 혈전을 용해하는 혈전 용해제에 관한 관심이 점점 더 커지고 있다.

2) 임상에서 사용되어지고 있는 혈전 용해제로는 UK, tPA, SK 등이 있으나 UK를 제외하고는 경구 투여를 할 수 없고 tPA의 경우 반감기가 짧은 단점이 있다. 이 용해제들은 투여 시 혈전에 대한 선택성이 적어 전신출혈이 발생하며 또한 가격이 비싼 단점이 있다. 기존에 사용되고 있는 혈전 용해제들은 Plasminogen활성화제들로 간접적인 방법으로 혈전을 용해하지만 혈전을 직접 용해하는 새로운 혈전 용해제들이 보고되었고, 경제적이고 경구투여가 가능한 혈전증 치료제에 대한 연구가 다양하게 시도되고 있다.

3) 따라서 체내 혈전형성을 억제시키기 위하여 경구투여가 가능하고, 저렴하고 경제적이며, 부작용을 최소화시킬 수 있는 혈전분해효소제의 개발이 절실히 요구되어지고 있다.

2. 혈전분해제 시장규모

1) 세계 항혈전제 시장은 '99년 67억 달러로 추산되며 연평균 약 5%의 성장률로 2005년경 약 93억 달러의 시장을 형성할 것으로 전망되고 있다.

지난 4년동안 혈전 예방 및 치료제 시장에 상당한 진보가 이뤄졌으며, 특히 저분자 헤파린 개발로 도입된 주사형 항응고제 시장은 기존 표준 치료제인 헤파린을 대체해가고 있다.

2) 뇌졸중 분야의 경우 약효가 뚜렷한 치료제가 개발되지 않아 새로운 혈전 분해제 및 항응고제 개발 수요를 일으키고 있으며 정부의 Deep vein thrombosis 예방을 위한 노력이 강화됨에 따라 전체적으로 항혈전제 시장의 동인이 되고 있다. 전체적으로 성장의 동인을 분석하면, 업계의 연구개발 강화, 고령 인구 증가 및 정부의 예방 의학 정책 등이 맞물려 항혈전제 시장은 지속적이고 높은 성장률을 보일 것으로 분석되고 있다.

3) 미국은 항응고제와 혈전분해제가 항혈전제 시장 성장을 주도하는 반면, 유럽권은 항응고제 및 항혈소판제가 시장 성장을 주도하고 있다. 미국의 항응고제 시장은 '99년 기준 약 9억 달러로 추산되며 경구형 항응고제와 저분자 헤파린 개발로 심근 경색, 앵기나 등 치료 범위를 확대하면서 시장 성장의 동인이 되고 있다.

4) 항혈소판제제의 시장은 약 5억 달러로 추산되며 주로 허혈성 뇌졸중 치료제로 사용되고 있으며, 고령 인구의 급격한 증가는 항혈소판제제의 시장 전망을 밝게 하고 있다.

5) 유럽권의 항혈전제 시장은 '99년 12억4천만 달러이며 2005년경 약 23억4천만 달러의 시장을 형성하며 연평균 25%의 성장률을 보일 것으로 분석되고 있다. 시장 성장의 주도 제품은 항혈소판제와 주사형 항응고제로 장기적으로 항혈전제 시장을 지배할 것으로 전망되고 있는 가운데, 주사형 항응고제는 외래 환자 증가와 1일 수술 증가로 인해 항혈전제 시장에서 가장 큰 점유율을 보일 것으로 분석된다.

3. 제품화 개발 시 예상되는 기대효과

1) 기술적 측면

가) 임상에서 사용되어지는 혈전분해제의 경우 국소적인 출혈, 발열, 알러지, 구강투여의 불가능, 비싼 생산단가 등에 의한 단점을 보완하여, 고대로부터 약용버섯으로 사용되어진 뽕나무버섯 균사체를 대량배양함으로써 혈전분해효소제의 저가 생산 및 구강투여 등 부작용을 최소화 할 수 있으며, 체내 혈전형성 억제 및 분해기능을 가지고 있는 기능성 식품의 개발이 가능하리라 사료되어짐.

나) 특히 최근 전세계 사망원인의 약 39%를 차지하고 있으며, 식생활의 서구화에 따른 다양한 혈전에 기인한 급성질환이 증가추세임에 따라 혈행개선을 위한 기능성 식품의 수요도 증가할 것으로 사료되어짐.

다) 또한 본 기술에서 사용되어진 뽕나무버섯의 균사체의 경우 다양한 생리활성 기능을 내포하고 있으므로 혈행개선효과 및 다양한 생리활성(면역증가효과, 신경퇴행성질환 억제 효과 등) 의 시너지 효과가 기대되어짐.

라) 현재 전임상단계에서의 혈전분해활성이 검증되어짐에 따라 향후 혈전분해효소의 순수분리정제에 의해 임상에서의 저렴한 혈전분해제의 개발이 가능하리라 사료되어짐.

2) 경제·사업적 측면

가) 혈전증 관련 의약품 세계 시장은 약 100억 달러로 추산되어지고 있으며, 항응혈제, 항혈소판 등 혈전증 관련 치료제의 세계 시장은 연평균 15% 이상 증가하여 2005년경에는 약 100억 달러를 돌파할 것으로 전망되어짐.

나) 혈액응고 저지제는 순환기계질환의 치료 및 예방에 이용되고 있으며, 최근 식생활의 변화 및 노령인구의 증가로 혈관장애에 의한 사망자수가 급증하고 있고, 이에 따라 심혈관계질환 치료제의 연구 개발에 대한 투자가 급증하고 있어 하루단의 잠재시장인 혈액응고 저지제 시장은 크게 확대될 것으로 기대되고 있다.

다) 국내 혈액응고 저지제 시장은 2000년의 경우 820억원, 2010년에는 1조 2천억원을 상회할 것으로 추정되어 단일품목으로서의 연구개발 제품으로는 충분한 잠재시장을 확보하고 있는 것으로 나타났다.

라) 국내·외 잠재시장이 매우 크기 때문에 정부 및 기업에서는 이 분야에 대한 지속적인 연구개발 투자를 통해 21세기에 예상되는 혈전분해효소제의 국제적 시장경쟁에 주도권을 가질 수 있도록 국가적인 차원에서 노력하여야 할 것이다.

제 2 절 제품화 목표 및 내용

1. 제품화 목표

- 1) 대량배양된 뽕나무버섯 균사체로부터 혈전분해효소제의 원료의 대량생산 체제확립
- 2) 대량생산된 혈전분해효소제 원료를 이용한 체내 혈전형성억제효과 유지 및 기능성 시너지효과를 위한 첨가물의 조성에 의한 시제품 제작
- 3) 체내 혈전형성억제 기능성식품 생산을 위한 대량생산시스템 설계 및 생산
- 4) 혈전분해능을 정제된 혈전분해효소제인 Plasmin과 동일한 효능을 가진 시제품의 생산
- 5) 생산된 시제품의 혈전분해효과 및 식품안전성 평가

2. 제품화 내용 및 범위

혈행개선 효과가 뛰어난 뽕나무버섯 균사체를 배양하여 원심분리 및 한외여과를 통하여 기타 미생물을 제거한 후 일정량의 부형제를 첨가하여 동결건조 후 미세분말의 원료를 생산한다. 생산된 혈행개선 원료를 중심으로 하여 기타 상호보완 작용을 할 수 있는 건강식품 원료를 첨가하여 제품을 완성한다.

3. 기대효과

- 1) 뽕나무버섯은 고대로부터 천마와 함께 한약재로서 약용 및 식용으로 이용되어진 만큼 다양한 기능성식품으로 개발되어질 수 있음.

- 2) 특히 기 연구에서 뽕나무버섯 균사체로부터 혈전분해효소를 분리정제하여 특성을 확인한 바 혈전분해제의 대량생산으로 인한 저렴한 생산비용으로 저가의 혈전분해제 개발이 가능하리라 사료되어짐.
- 3) 또한 뽕나무버섯은 약용버섯류로서 식용이 가능하며, 다양한 약리활성이 밝혀진바 발열, 알러지, 국소출혈 등의 부작용을 최소화할 것으로 사료되어짐.
- 4) 초기 개발은 혈전형성예방 기능을 체내 혈전형성을 억제시키는 기능성식품으로 개발하고, 전임상 실험 및 임상 실험을 거쳐 새로운 혈전용해제의 개발이 가능하리라 사료되어짐.

4. 제품화 후 활용방안 및 사업화 추진계획

- 1) 대량의 혈전분해효소를 정제하기 위한 초기단계로 뽕나무버섯 균사체의 대량배양기술 및 뽕나무버섯균사체로부터 최적의 혈전분해효소 정제 조건에 대하여 기술이전
- 2) 뽕나무버섯 균사체로부터 혈전분해효소의 정제 및 원재료 가공처리에 대한 기술이전
- 3) 뽕나무버섯 균사체로부터 혈전분해제의 활성 및 특성에 대한 정보제공
- 4) 다양한 한약재 처리 후 기능을 증가시킨 기능성 식음료 제조에 대한 기술제공
- 5) 뽕나무버섯 균사체를 이용한 혈전형성예방 기능성 식품의 대량생산을 위한 기술설계
- 6) 향후 국내 기능성 시장 및 중국 기능성 시장을 겨냥하여 각국의 기호에 맞는 원재료 가공처리 및 조성물을 첨가하여 새로운 시제품 개발

제 6 장

연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절. 관련기술의 국내외 시장현황 및 사업화 전망

1. 국내외 연구현황

가. 국외 연구현황

1) 항응고제

트롬빈, Factor Xa, Factor IXa, Factor VIII/tissue factor complex를 표적으로 이들의 활성을 억제하여 Protein C의 억제 메커니즘을 향상시키는데 중점이 되어왔으며 이중 트롬빈을 직접 표적으로 한 신약이 개발되어 임상 연구 중에 있으며 그 외 표적들도 활발하게 연구되고 있다.

가) 트롬빈 억제제

트롬빈은 물론 피브린과 결합한 트롬빈의 활성을 억제하기 때문에 강력한 항혈전 효과를 얻을 수 있다. 현재 임상 평가를 받고 있는 트롬빈 억제제로 히루딘(Hirudin)이 있으며 합성 히루딘 유사체인 Bivalirudin, Argatroban, Efegatran, Inogratran 등이 개발되었으나 hirudin과 Bivalirudin의 항혈전 효과가 가장 우수하다.

나) Factor IXa 억제제

개발 중에 있으며 대표적인 억제제로 펩타이드 화합물인 Antistatin 27와 비펩타이드인

DX-906527은 동물 모델에서 우수한 항혈전 효과를 보여준 것으로 보고되고 있다.

다) 헤파린계

Pentasaccharide는 Antithrombin에 대한 친화성이 높아 잠재적인 항혈전제로 평가 받고있는 가운데 현재 2상 임상 연구 중에 있다.

라) Protein C

재조합 Protein C가 개발되어 동물 모델에 이어 임상 연구를 진행 중에 있다.

2) 항혈소판제 연구개발

혈소판의 활성을 억제하여 혈전 생성을 억제하는 항 혈소판제는 Ticlopidine, Clopidogrel 등이 개발되어 상품화가 진행되고 있다. 이 혈소판제는 ADP 수용체에 작용하여 ADP가 혈소판의 응집을 억제한다. 현재까지 정확한 항혈전 메커니즘이 밝혀지지 않고 있는데, 미확인 대사 물질에 의해 Ticlopidine의 항혈전 효과가 나타나는 것으로 추정되고 있다. 이 같은 이유로 항혈소판제는 약물 투여 후 수시간이 지난 후에 확인할 수 있다. 항혈전 효과는 아스피린에 비해 약간 뛰어나나, 아스피린과 병행 투여할 경우 항혈전 효과가 크게 증가하여 혼합 투여를 통해 임상 적용되고 있다.

나. 국내 연구현황

아시아권을 중심으로한 한국, 일본, 중국 등지에서는 직접 혈전을 용해시키는 효소위주의 연구가 진행되어지고 있다. 미국 및 유럽권에서 사용되고 있는 혈전 용해제들은 Plasminogen활성화제들로 간접적인 방법으로 혈전을 용해하지만 혈전을 직접 용해하는 새로운 혈전 용해제들이 보고되었고, 경제적이고 경구투여가 가능한 혈전증 치료제에 대한 연구가 다양하게 시도되고 있다.

1) 현재 경구투여가 가능한 혈전제로 지렁이(*Lumbricus lubellus*)이로부터 6가지의 혈

전분해효소를 분리하였으며, 혈전을 직접 분해하는 효소를 뱀독으로부터 분리하였다.

2) 한국과 일본을 중심으로 한 발효식품에서의 혈전분해효소의 연구는 직접 섭취가 가능한 식품을 대상으로 하였다. 일본의 전통대두 발효식품인 Natto와 절임식품인 Shiokara (Katsuwo kinase)에서 혈전용해효소 생산 균주를 분리하고 효소를 정제하였으며, 이의 경구투여 시 생체내의 혈전분해능을 높일 수 있다고 보고하였다. 우리나라에서도 일본의 Natto와 유사한 콩을 원료로 한 전통발효식품인 청국장에서 혈전분해능을 가진 *Bacillus* sp.를 분리 및 정제하였으며, 전통대두 발효식품인 된장으로부터 Natto와 청국장에서 분리한 균주에 비해 2 ~ 3배 이상의 높은 혈전용해효소를 생산하는 균주를 분리하여 보고하였다.

3) 국내에서는 버섯에 대한 많은 연구가 진행되고 있으나, 주로 Metalloprotease와 항진균활성에 관한 연구가 많이 되었다. 한국산 버섯은 약 990 여종이 분류되어 있으며, 이 중 100 여종이 식용 가능한 버섯으로 확인되었고, Fibrin plate와 Fibrin zymography 을 이용하여 혈전분해능을 가진 버섯을 선별하고 활성의 특이성을 연구하였다. 국내에 자생하는 버섯류 중 때죽도장버섯 (*Daedaeopsis styracina*), 기와웃솔버섯 (*Trichaptum abietium*), 구름버섯 (*Coriolus versicolor*), 모래발버섯 (*Pisolithus tinctorius*) 등이 혈전분해능을 가지고 있음을 보고하였다. 또한 식용버섯인 활미송이버섯 (*Tricholoma saponaceum*), 먹물버섯 (*Coprinus comatus*), 주름버섯 (*Agaricus campestris*), 민자주방망이버섯 (*Lepista nuda*) 등의 버섯류에서 단백질 분해 효소 및 혈전분해 효소가 밝혀졌다.

다. 문제점

혈전분해효소는 작용 기전에 따라 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, 첫째 혈전에 직접 작용하여 fibrin을 용해시키는 단백분해 효소제와 둘째, 인체의 혈액 분해계를 활성화시키는 효소제로 나눌 수 있다. 단백분해효소제로는 Brinase, Papain, Ochrace, Trypsin, Plasmin 등이 있으나 이러한 단백분해효소제들은 정맥 주사로 주입 시 무작위적인 단백분해효과로 혈전 외에 혈전생성인자들까지 파괴하여 출혈을 일으킬 수 있어 매우 독성이 강해 거의 쓰이지 않고 있으며, 대신 인체의 혈전 분해를 촉진시키는 효소제인

Streptokinase, Urokinase 등이 일반적으로 사용되고 있다. 혈전 내에 생긴 피브린이 용해하여 혈전이 용해되는 현상은 혈장중의 Plasmin의 작용에 의한다. 플라스민은 일종의 세린 프로테아제이며, 혈액 중에는 존재하지 않고 불활성전구체 형태인 Plasminogen으로서 혈장 중에 함유되어 있다. 혈전 용해는 위와 같은 기작에 의해서 일어나는데 실제로는 플라스민 저해제 등에 의한 혈전 방해 등의 문제가 있다. 또 플라스민이 피브린에만 작용하도록 하지 않으면 출혈 등의 부작용을 일으킬 수도 있다. 따라서 플라스미노겐과 활성화제가 피브린에 흡착하여 여기서 플라스민이 생기게 하면 매우 이상적이기 때문에 혈전 용해에 플라스미노겐 활성제를 사용하는 경우가 점점 늘어나고 있다. 이러한 Plasminogen activator 활성을 가진 것으로는 Streptokinase, Urokinase, Single chain prourokinase, Trypsin, Staphylokinase, tPA 등이 있다. 중요한 혈전분해효소의 예로는, Streptokinase(SK)는 Hoechst-Roussel과 Kabi에 의해 제조된 것으로 용혈성 연쇄상 구균의 배양액에서 발견된 효소로서 플라스미노겐을 직접 활성화시키며, 플라스민으로 변화시킨다. SK는 본래 외래성 물질이기 때문에 인체 내에서 항원성을 가지고 있어 인체에 투여할 경우 발열, 알레르기, 저혈압 유발 등의 부작용을 일으키게 된다. 그러나 SK는 대량 생산이 용이하고 가격이 Urokinase나 tPA 보다 훨씬 저렴하며, 현재 항원성이 있는 부분을 없애거나 아실화하는 연구가 진행되고 있어 장래 혈전을 용해하는 치료제로서 기대되고 있다. Urokinase는 1964년 일본의 녹십자에 의해 인노로부터 처음 공업화되었는데 최근 태아 콩팥세포의 조직배양으로 생산하는데서 최근은 유전자조작에 의해서 대량생산이 가능하게 되었으며, 국내에서는 녹십자 등에 의해 생산되고 있다. Urokinase는 인체의 콩팥 세포에 의해 만들어져 뇨중에 배출되며, 항원성이 없고 발열의 부작용이 없다. Urokinase는 일종의 세린 프로테아제이며, 플라스미노겐에 특이적 친화력을 가지고 활성화하는 인자로 저분자형(M.W. 33,000)과 고분자형(M.W. 54,000)이 있으며 고분자형의 활성이 높다. Tissue Plasminogen Activator (tPA)는 분자량 72,000의 세린 프로테아제의 일종으로 two-chain polypeptide로 구성되어 있다. tPA는 피브린에 특이적으로 반응하여 플라스미노겐과 복합체를 형성하여 강력한 혈전 용해 작용을 나타내기 때문에 유로키나아제보다 출혈 등의 부작용이 적다.

제 7 장 참고문헌

제 1 절 혈전용해능 우수 버섯균 선발

- [1] Chang, S. T. and Miles, P. G. 1989. Edible mushrooms their cultivation. CRC Press.
- [2] Chang, S. T. and Miles, P. G. 1989. Mushroom Science in "Edible mushroom and their cultivation". CRC press, Inc., 3-25.
- [3] Kawagishi, H., Shimada, A., Mori, H., Okamoto, K., F., Sakamoto, H., and Furukawa, S. 1996. Erinacines D, A stimulator of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. Heterocyclic Communications 2:51-54.
- [4] Kim J. S., Lee H. Y., Yoo K. H., Kim Y. S., Seok S. J. and Kim Y. S. : The screening of fibrinolytic activities of extracts from mushrooms in Mt . Chiak, Korean J. Mycol., 26(4):589-593 (1998).
- [5] Mizuno, T. 1995. Yamabushitake, *Hericium erinaceum*: bioactive substances and medicalutilization. Food Reviews International 11:173-178.
- [6] Reed G. L., Lin L. F., Parhaml-Seren B., and Kussie P. : Identification of plasminogen binding region in streptokinase that is necessary for the creation of streptokinase-plasminogen activator complex, Biochemistry 34: 10266 - 10271 (1995).
- [7] 김준호, 김양선 : 빵나무버섯으로부터 fibrinolytic enzyme의 정제 및 특성 연구, 한국균학회지, 26(4):583-588 (1998).
- [8] 김준호: 할미송이버섯으로부터 혈전용해효소의 정제 및 특성 연구, 한국균학회지, 28(1):60-65 (2000).

[9] 정광희 : 천연동물 약제로부터의 혈전용해제 연구, 한국 생화학회 (신물질 창출을 위한 생물활성연구법), pp 53-56 (1991).

[10] 최낙식, 서승엽, 김승호 : 혈전용해능을 갖는 버섯류의 탐색, 한국 식품과학회지, 31(2):553-557 (1999).

제 2 절 *Armillaria mellea* mycelium으로부터 혈전분해효소 정제 및 특성분석

[1] Lucy A. Norris. Blood coagulation. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 2003 ; 17(3) : 369-383

[2] Douglas E. Vaughan. Angiotensin and vascular fibrinolytic balance. American Journal of Hypertension, 2002 ; 15(1) : S3-S8

[3] D. C. Rijke\ and D. V. Sakharov. Basic Principles in Thrombolysis: Regulatory Role of Plasminogen. Thrombosis Research, 2001 ; 103 : S41-S49

[4] Jeffrey I. Weitz. A novel approach to thrombin inhibition. Thrombosis Research, 2003 109 : S17-S22

[5] Megan C. Leary, Jeffrey L. Saver, Y. Pierre Gobin, Reza Jahan, Gary R. Duckwiler, Fernando Vinuela, Chelsea S. Kidwell, John Frazee and Sidney Starkman. Beyond tissue plasminogen activator: Mechanical intervention in acute stroke. Annals of Emergency Medicine, 2003 ; 41(6) : 838-846

[6] Niels Ole Kjeldgaard and Jrgen Ploug. Urokinase an activator of plasminogen from human urine II. Mechanism of plasminogen activation. Biochimica et Biophysica Acta, 1957 ; 24 : 283-289

[7] Vincent Healy, Joe O'Connell, Tommie V. McCarthy and Shawn Doonan. The Lysine-Specific Proteinase from *Armillaria mellea* Is a Member of a Novel Class of metalloendopeptidases Located in Basidiomycetes. Biochemical and Biophysical

Research Communications, 1999 ; 262(1) : 60-63

[8] Jun-Ho Kim and Yang-Sun Kim. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from *Armillaria mellea*. Kor. J. Mycology 1998 ; 26(4) : 583-588

[9] Nack-Shick Choi, Sung-Yum Seo and Seung-Ho Kim. Screening of mushroom having fibrinolytic activity. Kor. J. Food Sci. Technol. 1999 ; 31(2) : 553-557

[10] Tai-Hao Hsu, Li-Hua Shiao, Chienyan Hsieh and Der-Ming Chang. A comparison of the chemical composition and bioactive ingredients of the Chinese medicinal mushroom DongChongXiaCao, its counterfeit and mimic, and fermented mycelium of *Cordyceps sinensis*. Food Chemistry, 2002 ; 78(4) : 463-469

[11] A. R. Shahed, S. I. Kim and D. A. Shoskes Down-regulation of apoptotic and inflammatory genes by *Cordyceps Sinensis* extract in rat kidney following ischemia/reperfusion. Transplantation

Proceedings, 2001 ; 33(6) : 2986-2987

[12] S. Frederiksen, H. Malling and H. Klenow. Isolation of 3'-deoxyadenosine (cordycepin) from the liquid medium of *Cordyceps militaris* (L. ex Fr.) Link Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Nucleic Acids and Protein Synthesis, 1965 ; 95(2) : 189-193

[13] Guillaume De Nanteuil, Christine Lila-Ambroise, Alain Rupin, Marie-Odile Vallez and Tony J. Verbeuren. New fibrinolytic agents: benzothiophene derivatives as inhibitors of the t-PAPAI-1 complex formation. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2003 ; 13 : 1705-1708

[14] Jan Rosing, Joyce Curvers and Guido Tans. Oral contraceptives, thrombosis and haemostasis. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2001 ; 95(2) : 193-197

- [15] Christopher F. Toombs. New directions in thrombolytic therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, 2001 ; 1(2) : 164-168
- [16] Hyun-Kuk Kim, Gu-Taek Kim, Dae-Kyung Kim, Won-A Choi, Sung-Hoon Park, Yong-Kee Jeong and In-Soo Kong. Purification and Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus* sp. KA38 Originated from Fermented Fish. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997 ; 84(4) : 307-312
- [17] Hiroyuki Sumi, Nobuyoshi Nakajima and Chieko Yatagai. A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack "Shiokara," a Japanese traditional fermented food. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1995 ; 112(3) : 543-547
- [18] Yong Peng, Qing Huang, Ren-huai Zhang and Yi-zheng Zhang. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003 ; 134(1) : 45-52
- [19] Ji-Oeun Kil, Gi-Nahm Kim and In-Shik Park. Production and characterization of fibrinolytic enzyme : Optimal condition for production of the enzyme from *Bacillus* sp. KP-6408 isolated from Chungkook-jang. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 1998; 27(1) : 51-56
- [20] Yong-Tack Kim, Won-Keuk Kim and Hoon-Il Oh. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from Chungkook-jang. *Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol.* 1995; 23(1) : 1-5
- [21] Fujita M., Nomura K., Hong K., Ito Y., Asada A. and Nishimuro S. Purification and Characterization of a Strong Fibrinolytic Enzyme (Nattokinase) in the Vegetable Cheese Natto, a Popular Soybean Fermented Food in Japan. *Biochemical and Biophysical Research*

Communications, 1993 ; 197(3) : 1340-1347

[22] Cen Wu, Li Li, JingZhao, Qiao Fan, Wei-Xi Tian¹ and Rong-Qiao He. Effect of Ca^{2+} on earthworm fibrinolytic enzyme III-1 from *Lumbricus rubellus*. International Journal of Biological Macromolecules, 2002 ; 31 : 71-77

[23] Datta G., Dong A., Witt J. and Tu A. T. Biochemical-Characterization of Basilase, a Fibrinolytic Enzyme from *Crotalus basiliscus basiliscus*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1995 ; 317(2) : 365-373

[24] Yong Tang, Dongcai Liang, Tao Jiang, Jiping Zhang, Lulu Gui and Wenrui Chang. Crystal Structure of Earthworm Fibrinolytic Enzyme Component A: Revealing the Structural Determinants of its Dual Fibrinolytic Activity. Journal of Molecular Biology, 2002 ; 321(1) : 57-68

[25] Masugi Maruyama, Masahiko Sugiki, Keita Anai and Etsuo Yoshida. N-terminal amino acid sequences and some characteristics of fibrinolytic/hemorrhagic metalloproteinases purified from *Bothrops jararaca* venom. Toxicon, 2002 ; 40(8) : 1223-1226

[26] Bum-Soo Hahn, So Yean Cho, Mi Young Ahn and Yeong Shik Kim. Purification and characterization of a plasmin-like protease from *Tenodera sinensis* (Chinese mantis). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2001 ; 31 : 573-581

[27] Oscar H. P. Ramos, Adriana K. Carmona and Heloisa S. Selistre-de-Araujo. Expression, refolding, and in vitro activation of a recombinant snake venom pro-metalloprotease. Protein Expression and Purification, 2003 ; 28(1) : 34-41

[28] Kiminori Matsubara, Kanji Hori, Yasushi Matsuura and Keisuke Miyazawa. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme and identification of fibrinogen clotting enzyme in a marine green alga, *Codium divaricatum*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular

Biology, 2000 ; 125(1) : 137-143

[29] Young-Sook Paik, Jae-Kyoung Song, Chun-Hee Yoon, Kyo-Soon Chung and Hye-Sook Yun-Choi. Anti-platelet and anti-thrombotic effects of *Gastrodia elata*. Kor. J. Pharmacogn. 1995;26(4) : 385-389

[30] Nack-Shick Choi and Seung-Ho Kim. Two Fibrin Zymography Methods for Analysis of Plasminogen Activators on Gels. Analytical Biochemistry, 2000 ; 281(2) : 236-238

[31] Seung-Ho Kim¹, Nack-Shick Choi and Woo-Yiel Lee. Fibrin Zymography: A Direct Analysis of Fibrinolytic Enzymes on Gels. Analytical Biochemistry, 1998 ; 263(1) : 115-116

[32] Seung-Ho Kim¹ and Nack-Shick Choi. Electrophoretic Analysis of Protease Inhibitors in Fibrin Zymography. Analytical Biochemistry, 1999 ; 270(1) : 179-181

[33] Seung-Ho Kim¹, Nack-Shick Choi and Woo-Yiel Lee. Fibrin Zymography: A Direct Analysis of Fibrinolytic Enzymes on Gels. Analytical Biochemistry, 1998 ; 263(1) : 115-116

제 3 절 뽕나무버섯 균사체의 생리활성

[1] Acheson A.L., Naujoks K. and Thoenen H.. Nerve growth factor-mediated enzyme induction in primary cultures of bovine adrenal chromaffin cells: specificity and level of regulation. J. Neurosci. 4:1771-1780, 1984.

[2] Alison M. Comer., Hannah M. Gibbons., Jianguo Qi., Yoshinori Kawai., Joe Win., Janusz Lipski.. Detection of mRNA species in bulbospinal neurons isolated from the rostral ventrolateral medulla using single-cell RT-PCR. Brain Research protocols 4:367-377, 1999.

[3] Alison M. Comer, Jianguo Qi., David L. Christie., Hannah M. Gibbons., Janusz Lipski.. Noradrenaline transporter expression in the pons and medulla oblongata

of the rat: localisation to noradrenergic and some C1 adrenergic neurones. *Molecular Brain Research* 62:65-76, 1998.

[4] Aso H., Suzuki F., Yamaguchi T., Hayashi Y., Ebina T. and Ishida N.. Induction of interferone and activation of NK cells and macrophages in mice by oral administration of Ge-132, and organic germanium compound. *Microbiol. Immunol.* 29(1):65-74, 1985.

[5] Birkmayer W. and Birkmayer G.D.. The L-DOPA story. In: *Parkinsonism and Aging*. Calne DB et al. eds, Raven Press, New York 1-7, 1989.

[6] Bok J.w., Lermer L., Chilton J., Klingeman H.G., Towers G.H.. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry* 51(7):891-898, 1999.

[7] Carl Rosenblad., Mette Gronborg., Claus Hansen., Nikolai Blom., Morten Meyer. *In Vivo* protection of nigral dopamine neurons by lentiviral gene transfer of the novel GDNF-Family member Neublasrin/Artemin. *Molecular and Cellular Neuroscience* 15:199-214, 2000.

[8] Chan-Palay V., Zaborszky L., Kohler C., Goldstein M. and Palay S.L.. Distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the hypothalamus of rats. *J. Comp. Neurol.* 227: 467-496, 1984.

[9] Dimartino M.J.. Antiarthritic and immunoregulatory activity of spirogermanium. *J. pharmacol. Exp. ther.* 236(1):103-110, 1986.

[10] Edgar D.H. and Thoenen H.. Selective enzyme induction in a netve growth factor-responsive pheochromocytoma cell line PC12. *Brain Res.* 154:186-190, 1978.

[11] Eells J.B., Rives J.E., Yeung S.K., Nikodem V.M.. In vitro regulated expression of tyrosine hydroxylase in ventral midbrain neurons from Nurr1-null mouse pups. *Journal of Neuroscience Research* 64(4):322-330, 2001.

[12] Eisenhofer E., Hansson G., Harta S., Hoffman G.. Non-neuronal dopamine in

the gastrointestinal system. *Clinical and Exp. Pharm. & Phys. Supplement* 26:14-22, 1999.

[13] Gao Jin Ming, Yang Xue, Wang Chen Ying, Liu Ji Kai. Armillaramide, anew sphingolipid from the fungus *Armillaria mellea*. *Fitoterapia* 72:858-864, 2001.

[14] Grima B., Lamouroux A., Blanot F., Faucon Biguet N. & Mallet.. *J. Proc. natn. Acad. sci. U.S.A.* 82:617-621, 1985.

[15] Goodman R., Slater E. and Herschman H.R.. Epidermal grow the factor induces tyrosine hydroxylase in a clonal pheochromocytoma cell line PC-G2. *J. Cell Biol.* 84:495-500, 1980.

[16] Hirokazu Kawagishi, Atsushi Shimada, Satoshi Hosokawa. Erinacines E, F, and G, srimulators of Nerve Growth Factor(NGF)-Synthesis, from the Mycelia of *Hericum erinaceum*. *Tetrahedon Letters*, 37(41):7399-7402,1996.

[17] Ho C.C., Cherm Y.F. and Lin M.T.. Effects of organogermanium compound 2-carboxyethylgermanium sesquioxide on cardiovascular function and motor activity in rats. *Pharmacology* 41(5): 286-291, 1990.

[18] Horellou P., Guibert B., Leviel V., & Mallet.. *J. FEBS Lett.* 205: 6-10, 1986.

[19] Hyoung-Chun Kim, Wang-Kee Jhoo, Shin Guoying Bing. Selenium deficiency potentiates methamphetamine-induced nigral neuronal loss: comparison with MPTP model. *Brain Research* 862: 247-252, 2000.

[20] Jacpueline K. Phillips, Ratna Dubey, Erekle Sesiashvilvi. Differential expression of the noradrenaline transporter in adrenergic chromaffin cells, ganglion cells and nerve fibers of the rat adrenal medulla. *J. chem. Neutoanatomy* 21:95-104, 2001.

[21] Jao S.W., Lee W., Ho Y.S.. Effects of germanium on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal cancer in rats. *Dis-Coln-Rectum* 33(2):99-104, 1990.

[22] Kiss J.Z., Peczely p.. Distribution of tyrosine-hydroxylase(TH)

-immunoreactive neurons in the diencephalon of the pigeon (*Columbia livia domestica*). *J. Comp. Neurol.* 257:333-346, 1987.

[23] Kumakara K., Guidotti A. and Costa E.. Primary culture of chromaffin cells: molecular mechanism for the induction of tyrosine hydroxylase mediated by 8-Br-cyclic AMP. *Mol. Pharmacol.* 16:865-876, 1979.

[24] Kumano N. Nakai, Y. Ishikawa, T. Koinumaru, S. Kuzuki, S. and Konno, K.. Effect of carboxyethylgermanium sesquioxide in the methylcholathrene-induced tumorigenesis. *Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ.* 25:89-95, 1978.

[25] Kuo Y.C., Lin C.Y., Tsai W.J., Wu C.L., Chen C.F., Shiao M.S.. Growth inhibitors against tumor cells in *Cordyceps sinensis* other than cerdycepin and polysaccharides. *Cancer Invest* 12(6):611-615, 1994.

[26] Lee H.M. and Chung Y.. Effect of organic germanium on metallothionein induction in liver and kidney of cadmium and mercury intoxicated rats. *Yakhak Hoeji* 35(2):99-110,1991.

[27] Lee YongKyu and Park DongHa.. Tyrosine Hydroxylase Activity and mRNA in rat Locus Coeruleus and Adrenals Following Chronic Ethanol Treatment and Acute Cold Stress. *J. Biochem. Mol. Biol.* 29(5):393-397, 1996.

[28] Lewis E.J. and Chikaraishi D.M.. Regulated expression of the tyrosine hydroxylase gene by epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol.* 7:3332-3336, 1987.

[29] Lewis E.J., Tank A.W., Weiner N. and Chikaraishi D.M.. Regulation of tyrosine hydroxylase mRNA by glucocorticoid and cyclic AMP in a rat pheochromocytoma cell line. Isolation of a cDNA clone for tyrosine hydroxylase mRNA. *J. Biol. Chem.* 258:14632-14637, 1983.

[30] Marina Romero-Ramos., Jose L. Venero., Josefina Cano., Alberto Machado. Low selenium diet induces tyrosine hydroxylase enzyme in nigrostriatal system of the rat. *Molecular Brain Research*, 84:7-16, 2000.

- [31] Molinoff P.B. and Axelrod J.. Biochemistry of catechol amines. *Annu. Rev. Biochem.* 40:465–500, 1971.
- [32] Nagatsu T., Yamaguchi T., Rahman M.K., Trocewicz J., Oka K., Hirata Y., Nagatsu I., Narabayashi H., Kondo T. and Iizuka R.. Catecholamine-related enzymes and the bipterin cofactor in parkinson's disease and related extrapyramidal diseases. *Advances in Neurology* 40:467–473, 1984.
- [33] Nagatsu I., Kondo Y., Inagaki S., Karasawa N., Kato T. and Nagatsu T.. Immunofluorescent studies on tyrosine hydroxylase. Application for its axoplasmic transport. *Acta Histochem. Cytochem.* 10:494–499, 1977.
- [34] Nagatsu T., Levitt M. and Udenfriend S.. Tyrosine hydroxylase—the initial step in NE biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 239:2910–2917, 1964.
- [35] Nicole Faucon Biguet, Michel Buda, Annie Lamouroux, Daniele Samolyk. and Jacques, Mallet.. Time course of the changes of TH mRNA in rat brain and adrenal medulla after a single enjection of recerpine. *The EMBO Journal* 5(2):287–291, 1986.
- [36] Obeso J.A., Grandas F., Vaamonde J., Luquin M.R., Artieda J., Lera L.M., Rodriguez M.E. and Martinez-Lage J.M.. Motor complicatrons associated with chronic levodopa therapy in Parkinson's disease. *Neurology* 39(2):11–1, 1989.
- [37] Riederer P., Sofic E., Rausch W.D. and Hebenstreit.. Tyrosine hydroxylase, dopamine, and energy metabolism. Role in Parkinson's disease and aging. In *Parkinsonism and Aging*. Calne DB et al. eds, Raven Press, New York, 69–77, 1989.
- [38] Sasaki K., Ishikawa M., Monma K. and Takayanagi G.. Effect of arboxyethyl-germanium sesquioxide(Ge-132) on the acute inflammation and CC14-induced hepatic damage in mice. *Pharmacometrics* 27(6):1119–1131, 1984.
- [39] Shahed A.R., Kim S.I., and Shoskes D.A.. Dawn-regulation of apoptotic and

inflammatory genes by *Cordyceps senensis* extract in rat kidney following ischemia/Reperfusion. *Transplantation Proceedings* 33:2986-2987, 2001.

[40] Simonium N.A., and Coyle J.L.. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36:83-106, 1996.

[41] Spyridon Theofilopoulos, Julian Goggi, Samina S. Riaz, Eric Jauniaux, Gerald M. Stern, Henry F. Bradford. Parallel induction of the formation of dopamine and its metabolites With induction of tyrosine hydroxylase expression in foetal rat and human cerebral cortical cells by brain-derived neurotrophic factor and glial-cell derived neurotrophic factor. *Developmental Brain Research* 127:111-112, 2001.

[42] Suzuki F.. Antitumor activity of Ge-132, a new organogermanium compound, in mice is expressed through the functions of macrophages and T lymphocytes. *Gan-To-Kagaku-Ryoho.* 12(7): 1445-1452, 1985.

[43] Suzuki F., Brutkiewicz R.R. and Pollard R.B.. Cooperation of lymphokine(s) and macrophage in expression of antitumor activity of carboxyethyl germanium (Ge-132). *Antitumor Res.* 62(2):177-182, 1986.

[44] Willner P.. Dopamine mechanisms in depression and mania. In. Bloom FE, Kupfer DJ, editors. *Psychopharmacology. The fourth generation of progress.* New York. Raven Press. 921-931, 1995.

[45] Weiner W.J., Koller W.C., Perlik S., Nausieda O.P.A. and Kwans H.L.. Drug holiday and management of Parkinson's disease. *Neurology* 30:1257-1268, 1980.

[46] Zhe YuanShan, Brodsky Marina, Steven O. Franklin, Theresa Huang, and Charles E. Inturrisi. "Metrazole Induces the Sequential Activation of c-fos, Orogenkephalin, and Tyrosine Hydroxylase Gene Expression in the Rat Adrenal Gland: Modulation by Glucocorticoid and Adrenocorticotropic Hormone." *Molecular Pharmacology* 44:328-336, 1993.

[47] Kim, C.S.. *Codyceps militaris*에 의한 Interferon Gamma Inducing Factor와 Brain Derived Neurotrophic Factor 유전자의 생성유도. 2001. 조선대학교 박사학위 논문

제 4 절 선발균주인 뽕나무버섯균의 영양요구성 및 대량생산

[1] Anderson J. B. and Ullrich R. C. : Biological species of *Armillaria mellea* in north America, *Mycologia*, 71:402-414 (1979).

[2] Casselton, L. A. and Casselton, P. J. (1966): Control of fruiting of *Coprinus lagopus* on certain synthetic media. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 49:579-581.

[3] Cheo P. C. : Effect of tannic acid on rhizomorph production by *Armillaria mellea*, *Phytopathology*, 72:676-679 (1982).

[4] Chung K. H. and Kim D. S. : Fibrinolytic and cogulation activities of Korean snake venoms. *Korean Biochem. J.*, 25:696-701 (1992).

[5] Cragle R.G., Myers R. M., Waugh R. K., Hunter J. S., and Anderson R. L. : The effect of various levels of sodium citrate, glycerol, and equilibrium time on survival of bovine spermatozoa after storage at -79°C, *Journal of Dairy Science*, 38(5):508-512 (1995).

[6] Cremin P., Donnelly D. M. X., Wolfender J., and Hostettmann K. : Liquid chromatographic-thermospray mass spectrometric analysis of sesquiterpenes of *Armillaria* (Eumycota: Basidiomycotina) species, *J. Chromatography A*, 710:210-285 (1995).

[7] Donnelly D. M. X. and Hutchinson R. M. D : Armillane, a saturated sesquiterpene ester from *Armillaria mellea*, *Phytochemistry*, 29(1):179-182 (1990).

Garraway M. O. : Rhizomorph inhibition and growth in *Armillaria mellea* promoted by o-amino benzoic acid and p-amino benzoic acid, *Phytopathology*, 60:861-865 (1970).

- [8] Gibson, I. A. S. and Corbett, D. C. (1964): Variation in isolates from *Armillaria* root disease in Nyasaland. *Phytopathology*. 54:122-123.
- Junhua H., Dechao Y., Xianyu C., Zemin H., and Xiaozhang F. : Effect of Mi Huan Jun (*Armillaria mellea*) on central nervous and vascular system, *Fitoterapia*, 61(3):207-214 (1990).
- [9] Kim J. H. : Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from *Tricholoma saponaceum*. *Korean J. Mycol.*, 28(1):60-65 (2000).
- Kim J. H., and Kim Y. S. : A Fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of and edible mushroom, *Armillaria mellea*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63(12):2130-2136 (1999).
- [10] Kim J. S., Lee H. Y., Yoo K. H., Kim Y. S., Seok S. J. and Kim Y. S. : The screening of fibrinolytic activities of extracts from mushrooms in Mt . Chiak, *Korean J. Mycol.*, 26(4):589-593 (1998).
- [11] Kuraishi, H. (1954): Studies in mycorrhizal fungi. Part III. Nutritional features of *Armillariae*. *Ecol. Rev.* 13:263-269.
- [12] Kusano S. : *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea*, *J. Agric. Coll. Tokyo*, 4:1-66 (1911).
- [13] Kwaśna H. : Fungi in the rhizosphere of common oak and its stumps and their possible effect on infection by *Armillaria*, *Applied Soil Ecology* 17(3):215-227 (2001).
- [14] Lopez-real J. M. and Swift M. J. : The formation of *pseudosclerotia* ('zone line') in wood decayed by *Armillaria mellea* and *Stereum hirsutum*, *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 64:473-481 (1975).
- [15] Lowry W. G., Rosenbrough N. J. and Randall A. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193:265 (1951).
- [16] Mihara H., Sumi H., Yoneta T., Mizumoto H., Ikeda R., Seiki M., and

- Maruyama M. : A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus fubellus*, Jap. J. Physiol. 41:461-468 (1991).
- [17] Moody A. R., and Weinhold A. R. : Fatty acids and naturally *Armillaria mellea*. Phytopathology 62:264-267 (1972).
- [18] Moririson, D. J. (1976): Vertical distribution of *Armillaria mellea* rhizomorphs in soil. Trans. Brit. Mycol. Soc. 66:393-399.
- [19] Nakajima N., Mihara H. and Sumi H. : Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. Biosci. Biotech. Biochem., 57:1730-1737 (1993).
- [20] Obuchi T., Kondoh H., Watanabe N., Tamai M., Omura S., Yang J. S. and Liang X., Armillaric acid, a new antibiotic produced by *Armillaria mellea*, Planta Medica, 56:198-201 (1990).
- [21] Rabbe R., D. : Variation of *Armillaria mellea* in culture, Phytopathology, 27:1214-1244 (1966).
- [22] Redfern D. B. : Infection by *Armillaria mellea* and some factors affecting host resistance and the severity of disease, Forestry, 51:120-135 (1978).
- [23] Reed G. L., Lin L. F., Parhaml-Seren B., and Kussie P. : Identification of plasminogen binding region in streptokinase that is necessary for the creation of streptokinase-plasminogen activator complex, Biochemistry 34:10266-10271 (1995).
- [24] Takamura K. and Hoshino H. : Determination of Vitamin D2 in Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) by high-performance liquid chromatography, J. chromatography, 545:201 (1991).
- [25] Vincent H., Joe O., Tommie V. M., and Shawn D. : The lysine-specific proteinase from *Armillaria mellea* is a member of a novel class of metalloendopeptidases located in basidiomycetes, Biochemical and Biophysical

- Research Communications 262:60-63 (1999).
- [26] Watababe N., Obuchi T., Tamai M., Araki H., Omura S., Yang J. S., Yu D., Liang X. and Huan J. : A Novel N6-substituted adenosine isolated from Mi Huan Jun (*Armillaria mellea*) ad a cerebral-protecting compound, *Planta Medica*, 56:48-52 (1990).
- [27] Watling R. : The genus *Armillaria*-nomenclature, typication, the identity of *Armillaria mellea* and species differentiation, *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 78:271-285 (1982).
- [28] Weinhold A. R. : Rhizomorph production by *Armillaria mellea* induced by ethanol and related compounds, *Science* 142:1065-1066 (1963).
- [29] Yang J. S., Chen Y. W., Feng X. Z., Yu D. Q., He C., H., Zheng Q., T., Yang J. and Liang X. T. : Isolation and structure elucidation of Armillaricin, *Planta Med.*, 55:564-565 (1989).
- [30] Yang J. S., Chen Y. W., Feng X. Z., Yu D. Q., Liang X. T. : *Planta Med.*, 50:288-290 (1984).
- [31] Zhang W. J. and Li B. F. : The biological relationships of *Gastrodia elata* and *Armillaria mellea*, *Acta Bot. Sin.*, 16(3):206-213 (1980).
- [32] 김명숙 (1986): *Lyophyllum decastes*의 심부배양에 의한 균체생산에 관한 연구. 전북대학교 대학원 석사학위논문.
- [33] 김용규 : 뽕나무버섯 (*Armillaria mellea*) 균사속의 특성 및 천마(*Gastrodia elata*)의 생육에 미치는 영향, 전북대학교 대학원 박사학위 논문, (1995).
- [34] 김용택 , 김원극 , 오훈일 : 청국장으로부터 혈전용해균주의 분리 및 동정, *산업미생물학회지*, 23(1) (1995).
- [35] 김준호, 김양선 : 뽕나무버섯으로부터 fibrinolytic enzyme의 정제 및 특성 연구, *한국균학회지*, 26(4):583-588 (1998).
- [36] 김진숙, 최웅철, 김해령, 이종길, 이정옥, 정경수, 심미자, 김병각 : 한국산 고등

- 균류의 성분 연구(제37보); 뽕나무버섯의 항암 성분, 한국균학회지, 11(4):151-157 (1983).
- [37] 김현중, 고민규, 이창근, 성재모 : 뽕나무버섯의 인공 균상재배, 한국균학회지, 20(3):273-276 (1992).
- [38] 北本豊, 葛西善三郎, 細非登, 市川吉夫 (1974): 置換培養にねけるアミスギタケの子實體形成の營養條件. 日菌報 15:60-71.
- [39] 宇田川俊一, 椿啓介, 堀江義一, 三浦宏一郎, 基浦久兵衛, 山崎幹夫, 横山龍夫, 渡邊昌平 : 菌類圖監(上), p 120~121, 東京 講談社 (1978)
- [40] 宇田川俊一, 椿啓介, 堀江義一, 三浦宏一郎, 基浦久兵衛, 山崎幹夫, 横山龍夫, 渡邊昌平 : 菌類圖監(下), p 827~829, 東京 講談社 (1978)
- [41] 이기동, 이정은, 권중호 : 식품공업에서 반응표면분석의 응용, 한국식품과학회지, 33(1):33-45 (2000).
- [42] 이지열, 홍순우 : 한국동식물도감; 제28권 고등균류편(버섯류), 문교부 (1985).
- [43] 이현용, 김원극, 권익부, 장영렬 : 젓갈류로부터 혈전용해 균주의 분리 및 동정, 한국식품과학회지, 30(3):665-670 (1998).
- [44] 정광희 : 천연동물 약제로부터의 혈전용해제 연구, 한국 생화학회 (신물질 창출을 위한 생물활성연구법), pp 53-56 (1991).
- [45] 차동열 (1981): 야생 식용버섯의 인공재배 검토. 한국균학회지. 9:123-128.
- [46] 최낙식, 서승염, 김승호 : 혈전용해능을 갖는 버섯류의 탐색, 한국 식품과학회지, 31(2):553-557 (1999).
- [47] 최미자, 이지열 : 뽕나무 버섯 균사체의 생리·생태학적 연구, 한국균학회지, 11(2):79-84 (1983).
- [48] 홍재식, 김명곤, 이재홍, 김형무 : 알코올 및 휘발성 유기산류가 뽕나무버섯의 균사속 생산에 미치는 영향, 한국균학회지 18(3):158-163 (1990).

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.