Food Engineering Progress
Vol. 13, No. 4. pp. 326~334 (2009.11)

산업식품공학
Food Engineering Progress

목이버섯 추출물로부터 항혈전물질의 정제와 항혈전효과

박영서* · 최혁준[1] · 최태현[2]
경원대학교 식품생물공학과, [1](주)비케이바이오, [2]한국원자력의학원

Purification of Antithrombotic Material from *Auricularia auricular-judae* Extracts and Its Antithrombotic Activity

Young-Seo Park*, Hyuk-Joon Choi[1] and Tae Hyun Choi[2]
Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University
[1]BK bio Co., Ltd.
[2]Korea Institute of Radiological and Medical Sciences

Abstract

Blood coagulation and aggregation of platelet are crucial events in the pathogenesis of various ischemic diseases. The substance which can prevent blood coagulation and platelet aggregation was extracted from wood ear mushroom (*Auricularia auricular-judae*) and its anticoagulation activity was investigated. The dried *A. auricular-judae* was extracted with 0.1 N NaOH and its supernatant was further extracted with methanol and ethanol followed by H_2O. The resulting methanol soluble fraction showed significant antithrombotic activity in activated partial thromboplastin time, thrombin time, and prothrombin time assays with values of 100, 124, and 54 sec, respectively. This active substance was purified with DEAE-Sepharose CL6B and Sephacryl 400-HR and was found to be polysaccharide with the average molecular weight of over 150 kDa. This polysaccharide was xyloglucomannan of which the main component was mannose, and its anticoagulant activity was mostly mediated by inhibition of thrombin activity.

Key words: Auricularia auricular-judae, anticoagulant activity, polysaccharide

서 론

통계청 자료에 의하면 2008년도 우리나라 5대 사망원인은 암, 뇌혈관질환, 심장질환, 고의적 자해(자살), 당뇨병으로, 이로 인한 사망자수가 전체 사망자의 60%를 차지하고 있다. 인구 10만명 당 사망률인 조사망율을 보면, 암이 139.5명으로 가장 많았고, 그 다음으로 뇌혈관질환이 56.5명, 심장질환으로 인한 사망자가 43.4명으로 조사되어 순환기계 질환이 국민건강에 심각한 문제를 일으키고 있는 것으로 나타났다.

심혈관계 질환을 효과적으로 예방하기 위해서는 혈중 콜레스테롤의 저하, 혈소판 활성 및 혈액응고 활성의 억제, 혈관 평활근세포의 증식 억제 등이 요구된다. 혈전성 질환의 예방과 치료에는 혈전용해제, 항혈소판제, 항응고제 등이 보편적으로 사용되고 있는데, 현재 임상에서는 심혈관계 환자의 경우 스타틴 계열의 콜레스테롤 저하제, coumardin 등의 항응고제, 아스피린 등의 항혈소판제를 장기 복용하도록 처방하여 혈관 협착을 억제하고 있다(Jaques, 1979). 그러나 이러한 유효한 약제들의 투여는 어디까지나 이미 심혈관질환이 발생한 환자를 대상으로 한 2차 예방을 위한 처방이며, 세계적으로도 근원적인 예방을 위한 1차 예방제는 개발되지 못한 상황이다(McGinnis & Outschoom, 1991).

Urokinase나 t-PA와 같은 혈전용해제는 이미 형성된 혈전을 용해시켜 혈액의 흐름을 돕는 효과적인 치료제로 사용되고 있고, 항혈소판제제인 아스피린은 효능이 우수하지만 위장장애와 같은 부작용이 보고되고 있으며, 항응고제인 coumardin은 너무 강한 활성 때문에 출혈의 부작용이 나타나고 있는 등 모두 장기적인 1차 예방제로 사용하는데 한계가 있다. 또한, 고지혈증의 치료에 사용되는 스타틴 계열의 약제는 혈중 LDL을 낮추는데 아주 좋은 효과를 보이고 있으나, 가격이 너무 고가인 문제가 있다(McGinnis & Outschoom, 1991). 따라서 부작용이 최소화되고 심혈관계 질환을 근원적으로 예방할 수 있는 경제적인 예방제의

Corresponding author: Young-Seo Park, Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University, Seongnam, Gyeonggi-do 461-701, Korea
Tel: +82-31-750-5378; Fax: +82-31-750-5273
E-mail: ypark@kyungwon.ac.kr
Received October 26, 2009; revised November 17, 2009; accepted November 17, 2009

개발이 필요하며, 외국 제약회사의 치료제와 차별화될 수 있는 기능성 식품으로의 개발이 요구된다(Merton & Thomas, 1987).

목이버섯(*Auricularia auricula* (L. et Hook) Underw)은 담자균류(Basidiomycetes)의 목이과(Auriculariales) 진균으로, 한약제로서 각종 약리작용에 의한 민간요법제로 사용되었고 민간에서 음식이 여름에 변패되는 것을 방지하는 소재 등 다양한 용도로 이용되어 왔다. 특히 피를 활성화시키는 등 피를 맑게 하는 작용이 뛰어나고 지혈작용이 있으며 혈리, 치질출혈, 대하, 자궁출혈, 고혈압, 안저 출혈 등에 효능이 있다고 알려져 있다(Lee et al., 1981; Kim & Kim, 1995).

목이버섯에 관한 연구는 목이버섯의 지방산 및 스테롤 성분조성의 보고, 마우스에 sarcoma 180 cancer cell을 이식한 후 목이버섯 추출물의 복강투여 시 항암효과가 있었다는 보고, 목이버섯 알코올 추출물이 *Salmonella* Typhimurium TA98, TA100 균주를 이용한 Ames test와 SOS chromotest에서 돌연변이 억제작용이 있다는 보고, 그리고 목이버섯 메탄올추출물이 유전독성을 억제하는 효과가 있다는 연구 등이 보고되어 있다(Lee et al, 1981; Ham et al., 1997a; Ham et al., 1997b; Chang et al., 1998).

본 연구에서는 목이버섯을 여러 가지 용매로 분획 추출하여 이들 추출물의 항혈전효과를 조사함으로써 심혈관계 질환을 예방할 수 있는 기능성 식품원료로서의 개발 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

버섯 시료 전처리

본 실험에 사용한 목이버섯(*Auricularia auricula-judae*)은 경동시장에서 건조된 것을 구입하였다. 버섯 건조시료를 blender(HGB25E1, Waring, USA)로 마쇄한 후 10 g의 시료에 150 mL의 용매를 넣고 끓는점에서 2시간 또는 4시간 동안 환류 추출하였다. 사용 용매는 실험 목적에 따라 증류수, 100% methanol, 100% ethanol, 0.1 N HCl 또는 0.1 N NaOH를 사용하였다. 추출된 시료는 실온으로 냉각한 후 산, 알칼리 추출물은 중화하였고 그 이외의 용매로 추출한 시료는 8,000×g에서 20분간 원심분리한 후 Whatman No. 1 filter pater로 여과하였다. 여과액을 44°C rotary evaporator에서 감압농축한 후 동결 건조하여 혈행 개선 활성을 측정하였다.

목이버섯으로부터 산 또는 알칼리 추출물 제조

목이버섯을 0.1 N HCl 또는 0.1 N NaOH로 97°C에서 2시간 동안 환류 추출한 후 원심분리한 상등액을 감압 농축한 다음 동결 건조하였다.

목이버섯 알칼리 추출물의 methanol 용해성 분획 제조

동결건조한 알칼리 추출물에 100% methanol을 가하고 76°C에서 2시간 동안 추출한 후 8,000×g에서 20분간 원심분리한 상등액을 감압 농축한 다음 동결 건조하였다.

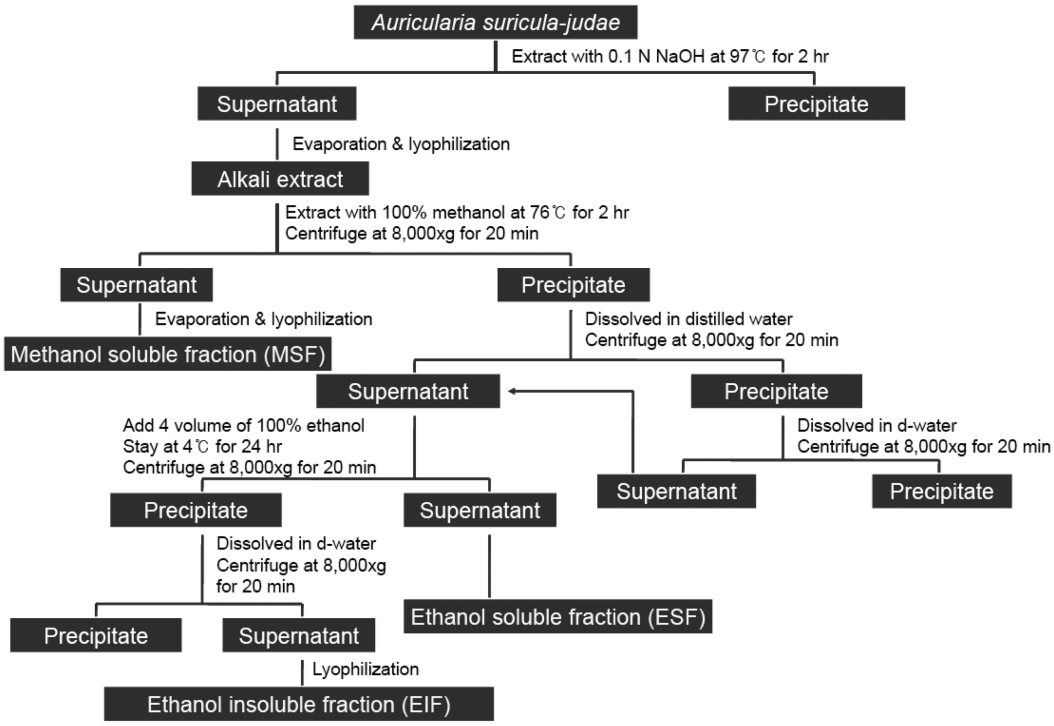


Fig. 1. Extraction of anticoagulant material from *Auricularia auricula*

목이버섯 추출물의 ethanol 용해성 분획 제조

동결건조한 알칼리 추출물에 100% methanol을 가하고 76°C에서 2시간 동안 추출한 후 8,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻어지는 불용성 성분을 증류수로 용해한 다음 8,000×g에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻어진 상등액에 100% ethanol을 4배 용량이 되도록 첨가한 후 4°C에서 24시간 동안 정치한 다음 8,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 ethanol 용해성 분획으로 하였다.

목이버섯 추출물의 ethanol 불용성 분획 제조

목이버섯 추출물의 ethanol 용해성 분획을 분리하고 남은 불용성 성분을 증류수로 용해시킨 다음 8,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 동결 건조하여 ethanol 불용성 분획으로 하였다.

목이버섯으로부터 혈행 개선 물질의 추출 과정은 Fig. 1에 나타내었다.

목이버섯으로부터 혈행 개선 물질의 정제

목이버섯으로부터 혈행 개선 물질을 정제하기 위하여 목이버섯 추출물의 methanol 용해성 분획 0.15 g을 증류수로 용해한 다음 DEAE sepharose CL-6B(Sigma Chemicals, USA) ion exchange column chromatography를 이용하여 정제하였다. Column은 높이 20 cm, 지름 2.5 cm로, bed volume은 98 cm^3이었으며 유속은 1 mL/min, sample loading volume은 2 mL로 하였다. Column에서 용출되는 시료는 fraction collector를 사용하여 5 mL씩 분획하여 수집하였으며 resin에 결합된 시료의 용출은 0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0 M NaCl을 사용하여 stepwise gradient로 수행하였다.

목이버섯 유래 혈행 개선 물질의 분자량 측정

항혈전물질의 분자량은 gel permeation column chromatography로 측정하였다. 사용한 resin은 Sephacryl 400-HR(Sigma Chemicals, USA)이었고 column의 높이는 105 cm, 지름은 1.5 cm이었으며 bed volume은 190 mL이었다. Sample loading volume은 1.5 mL이었고 시료의 용출은 0.2 M NaCl 용액을 사용하여 유속 0.25 mL/min로 하였고 fraction volume은 2 mL로 하였다. Void volume 측정은 dextran blue를 사용하였고 분자량 측정을 위한 표준물질로는 albumin(66 kDa, 10 mg/mL), thioglobulin(669 kDa, 8 mg/mL), β-amlyase(200 kDa, 4 mg/mL)를 사용하여 혼합액 2 mL를 사용하였으며 동일한 column에 loading하여 표준곡선을 작성하였다.

당정량

항혈전물질의 정제와 분자량 측정 시 시료의 당정량은 총당법(Dubois et al., 1956)으로 수행하였다. 시료 0.5 mL에 동일부피의 phenol 0.5 mL와 5배 부피의 H_2SO_4를 첨가하여 10분간 방치한 후 vortexing한 다음 실온에 30분간 방치한 뒤 490 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 당정량의 표준곡선은 glucose를 표준물질로 사용하여 작성하였다.

혈행 개선 물질의 구성당 분석

혈행 개선 물질의 구성당은 세종대학교 탄수화물소재연구소에 의뢰하여 high-performance anion-exchange chromatograpy(HPAEC)-pulsed amerometric detection(PAD) system (Dionex)을 이용하여 중성 단당류(neutral monosaccharides)를 분리 동정하였다. 시료를 trifluoroacetic acid로 100°C에서 4시간동안 산 가수분해한 후 최종 농도가 2 mg/mL가 되도록 증류수에 용해한 후 분석하였다. 분석 column은 CarboPac PA1을 사용하였고 용출을 위한 용매로는 18 mM NaOH를 사용하였다. 유속은 1.0 mL/min으로 하였고 시료의 주입 부피는 10 μL로 하였다 용출된 시료는 PAD로 검출하여 분석하였다.

목이버섯 추출물의 항혈액응고 활성 측정

목이버섯 추출물의 항혈액응고 활성을 측정하기 위하여 동결 건조한 시료를 증류수를 사용하여 적당 농도로 용해한 후 0.9 mL의 혈장(rat plasma, IRT-N, Innovative research, 3.8% Na citrate)에 액상 시료를 0.1 mL 첨가하고 Dade actin 100 μL를 첨가한 다음 37°C에서 5분간 반응시켰다. Activated partial thromboplastin time(APTT)을 측정하기 위해서는 20 mM $CaCl_2$ 100 μL를, thrombin time(TT)을 측정하기 위해서는 Dade thrombin reagent 10 μL를, prothrombin time(PT)을 측정하기 위해서는 Dade thromboplastin C reagent 100 μL를 넣은 시점부터 fibrin이 형성되어 응고가 일어나는 시간을 coagulator(diagnostica STAGO, France)로 측정하였다.

목이버섯 추출물의 항혈액응고 활성에 따른 혈장 내 fibrinogen 함량 측정

시료의 Fibrinogen 함량을 측정하기 위하여 STA-Fibrinogen kit를 사용하여 혈장의 응고시간을 측정한 후 이미 알고 있는 양의 Fibrinogen이 포함된 혈장의 응고시간과 비교하여 검체의 Fibrinogen의 양을 dl/mL의 값으로 구하였다.

혈전 용해 활성 측정

시료의 혈전 용해 활성을 측정하기 위하여 0.3% fibrinogen 용액 10 mL를 petri dish에 넣고 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.8)에 녹인 thrombin 용액(100 NIH unit/mL) 100 μL를 신속히 첨가하여 균일하게 혼합되도록 흔들어 준 후 실온에서 30분간 방치한 후 사용하였다. 활성 측정은 시료 20 μL를 fibrin plate에 loading하고 37°C에서 일정 시간동안 반응시

켜 fibrin이 분해되어 생기는 clear zone의 직경을 측정하였다.

항혈소판응집능 측정

시료의 항혈소판응집능을 측정하기 위하여 시료가 포함된 whole blood 450 μL와 saline 450 μL를 coagulator glass cuvette에 넣어 잘 혼합한 후 37°C에서 3분간 반응시켰다. 여기에 1 mg/mL collagen 5 μL를 첨가한 후 platelet aggregator를 이용하여 항혈소판응집능을 측정하였으며 시료 대신 증류수를 첨가한 대조구와의 상대적인 측정비로 항혈소판응집능을 표시하였다.

혈행 개선 물질의 돌연변이원성 평가

혈행 개선 물질의 돌연변이원성 평가는 Ames test에 의해 수행하였다. Nutrient broth를 이용하여 37°C에서 하룻밤 배양한 *Salmonella* Typhimurium TA1535(KCCM 11863), *S.* Typhimurium TA1537(KCCM 11864), *S.* Typhimurium TA1538(KCCM 41444)를 각각 3 mL의 top agar(0.5% NaCl, 0.65% agar, 0.05 mM histidine)에 0.1 mL 접종하고 0.1 mL의 시료 후 M56 minimal agar(8.2 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 2.7 g KH_2PO_4, 1.0 g $(NH4)_2SO_4$, 0.25 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 mg $Ca(NO_3)_2$, 0.2% glucose, 1.6% agar, pH 7.2)에 overlay하여 고형화시켰다. 이를 빛이 차단된 37°C incubator에서 2일간 배양한 후 생성된 colony의 수를 측정하였다. 대조구로서는 시료 대신 증류수를 첨가하였고 돌연변이원성의 판정은 1 mg의 시료를 첨가하였을 때 시료를 첨가하여 발생한 복귀돌연변이체의 수가 대조구를 첨가한 자연발생적 복귀돌연변이체의 수보다 2배가 넘지 않으면 돌연변이원성이 없다고 판정하였다.

혈행 개선 물질의 안정성 평가

혈행개선물질의 열 안정성은 일정 농도로 증류수에 용해한 혈행 개선 물질을 100°C에서 10, 20, 30분간 가열한 후 혈행 개선 물질의 APTT, TT, PT와 FIB 활성을 측정하여 평가하였다.

혈행개선물질의 내산성은 일정 농도로 증류수에 용해한 혈행 개선 물질에 0.5 N HCl을 상온에서 1시간 동안 처리한 다음 동량의 0.5 N NaOH를 첨가하여 중화시킨 후 혈행 개선 물질의 APTT, TT, PT와 FIB 활성을 측정하여 평가하였다.

통계처리

모든 실험값은 최소한 3번 이상의 결과값을 Microsoft Office Excel 2007 프로그램을 이용하여 평균과 표준편차를 구하여 나타내었다.

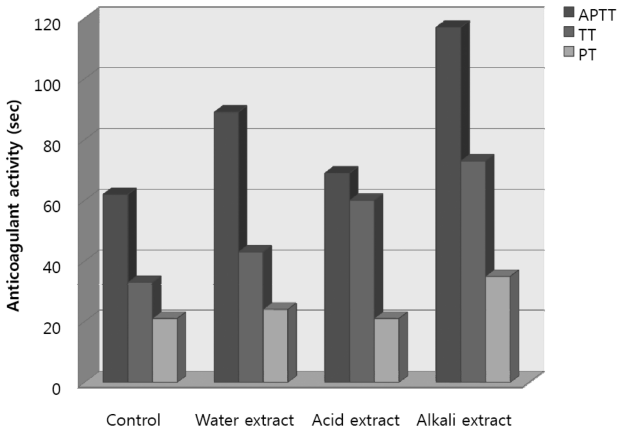


Fig. 2. Anticoagulant activity of water extract, acid extract, and alkali extract of *Auricularia auricula*

결과 및 고찰

목이버섯 추출물의 혈행 개선활성

목이버섯을 열수, 0.1 N HCl 또는 0.1 N NaOH에 의해 추출한 후 추출물 2 mg을 사용하여 항응고활성을 측정함으로써 열수 추출물, 산 추출물, 알칼리 추출물의 혈행 개선 활성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 알칼리 추출물의 APTT는 117 sec, TT는 733 sec, PT는 35 sec로 열수 추출물(APTT: 89 sec, TT: 43 sec, PT 24 sec)이나 산 추출물(APTT: 69 sec, TT: 60 sec, PT 21 sec)보다 매우 높은 항응고활성을 지니고 있음을 알 수 있었다. 따라서 목이버섯으로부터 혈행 개선 물질을 추출할 경우 알칼리 추출이 가장 효과가 좋은 것으로 확인되어 알칼리 추출물의 농도별 항응고활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3에 나타낸 바와 같이 알칼리 추출물의 농도가 증가함에 따라 APTT,

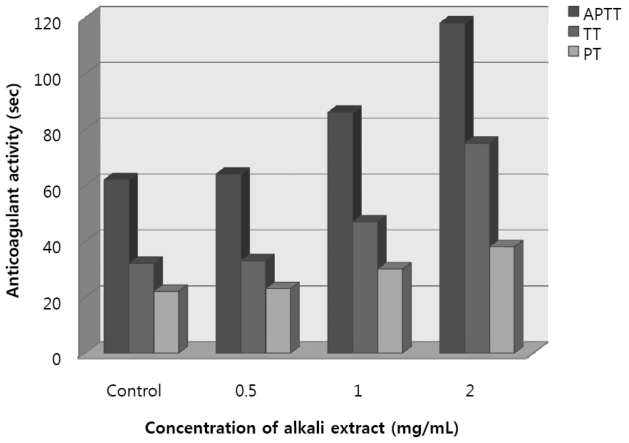


Fig. 3. Effect of concentration of alkali extract of *Auricularia auricula* on the anticoagulant activity

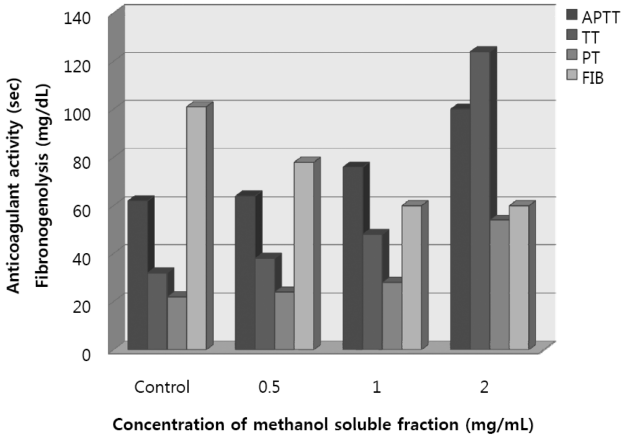


Fig. 4. Effect of anticoagulant activity on the concentration of methanol soluble fraction of *Auricularia auricula*

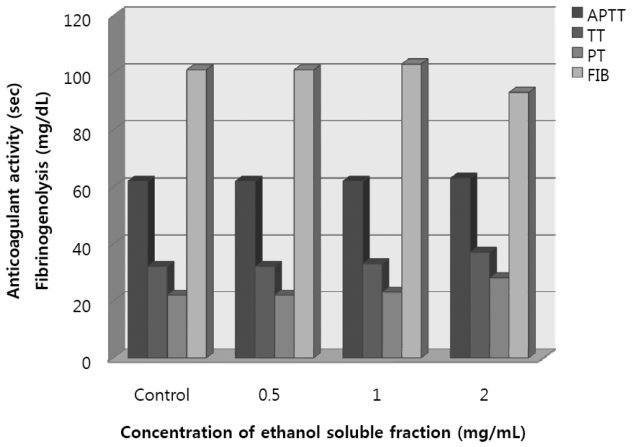


Fig. 5. Effect of anticoagulant activity on the concentration of ethanol soluble fraction of *Auricularia auricula*

TT와 PT가 증가하는 것으로 나타났다.

목이버섯으로부터 혈행 개선 물질을 추출하고 정제하기 위하여 '재료 및 방법'에 서술한 바와 같이 추출 과정을 Fig. 1과 같이 확립하여 목이버섯을 추출하고 추출물의 항응고활성을 APTT, TT, PT와 fibrinogen 농도로 측정하였다. 목이버섯을 0.1 N NaOH로 97°C에서 2시간 동안 환류 추출한 후 원심분리한 상등액을 감압 농축한 다음 동결 건조하여 알칼리 추출물로 하였다. 동결건조한 알칼리 추출물에 100% methanol을 가하고 76°C에서 2시간 동안 추출한 후 8,000×g에서 20분간 원심분리한 상등액을 감압 농축한 다음 동결 건조하여 methanol 용해성 분획(methanol soluble fraction)으로 하였다. Methanol 불용성 성분을 증류수로 용해한 다음 8,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻어진 상등액에 100% ethanol을 4배 용량이 되도록 첨가한 후 4°C에서 24시간 동안 정치한 다음 8,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 ethanol 용해성 분획(ethanol soluble fraction)으로 하였다. Ethanol 불용성 성분을 증류수로 용해한 다음 8,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 동결건조하여 ethanol 불용성 분획(ethanol insoluble fraction)으로 하였다. 각 분획의 항응고활성을 농도별로 측정한 결과 Fig. 4와 같이 methanol 용해성 분획은 APTT, TT와 PT 활성이 각각 100, 124, 54 sec로 모두 높게 나타났으며 농도 의존적으로 증가하는 것으로 확인되었다. Methanol 용해성 분획의 FIB도 0.5 mg은 22%, 1 mg 이상에서는 40% 활성이 증가함을 알 수 있었다. Ethanol 용해성 분획의 경우에는 APTT의 활성은 나타나지 않았으며 TT와 PT 활성은 2.0 mg/mL에서 각각 37 sec와 28 sec로 약간 존재하였다(Fig. 5). Ethanol 용해성 분획의 FIB는 1 mg까지는 활성이 존재하지 않다가 2 mg에서 약 7%의 활성이 증가하는 것을 보여주었다. 한편 ethanol 불용성 분획은 APTT, TT와 PT 활성이 거의 존재하지 않았다. Ethanol 불용성 분획의 FIB도 0.5 mg은 22%, 1 mg 이상에서는 40% 활성이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 6).

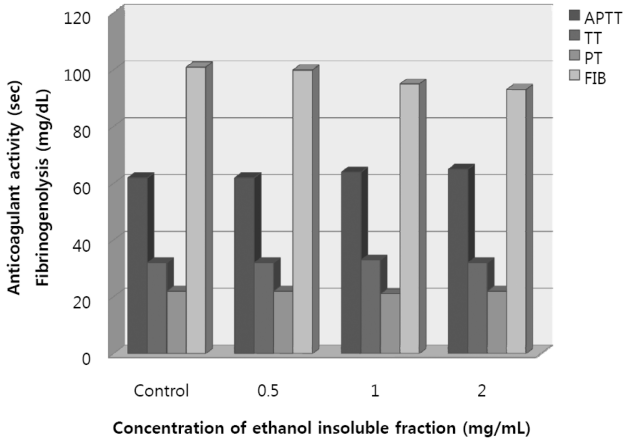


Fig. 6. Effect of anticoagulant activity on the concentration of ethanol insoluble fraction of *Auricularia auricula*

한편 각 분획의 항혈소판응집능을 측정한 결과 Fig. 7과 같이 methanol 용해성 분획이 가장 높은 항혈소판응집능을 지니고 있어 대조구와 비교하여 28% 높은 활성을 나타내었다. 알칼리 추출물은 약 12%의 활성을 나타내었으며 ethanol 용해성 분획이나 ethanol 불용성 분획은 활성이 거의 존재하지 않음을 알 수 있었다. 항혈소판응집능이 가장 좋은 methanol 용해성 분획을 정제하여 농도별 활성을 측정한 결과 Fig. 8과 같이 농도가 증가함에 따라 항혈소판응집능이 증가하는 것으로 나타났다.

목이버섯으로부터 혈행개선활성 물질의 정제

목이버섯의 혈행 개선 활성이 methanol 용해성 분획에 존재하는 다당류인 것이 확인됨에 따라 이온교환수지를 사용하여 methanol 용해성 분획 중에 존재하는 혈행 개선 물질을 정제하였다. 목이버섯의 methanol 용해성 분획 성분인 다당 150 mg을 증류수에 녹인 후 증류수로 평형화시킨

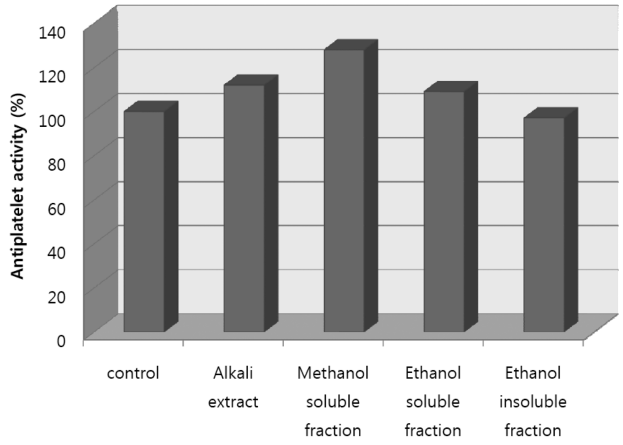


Fig. 7. Antiplatelet activity of various extracts from *Auricularia auricula*

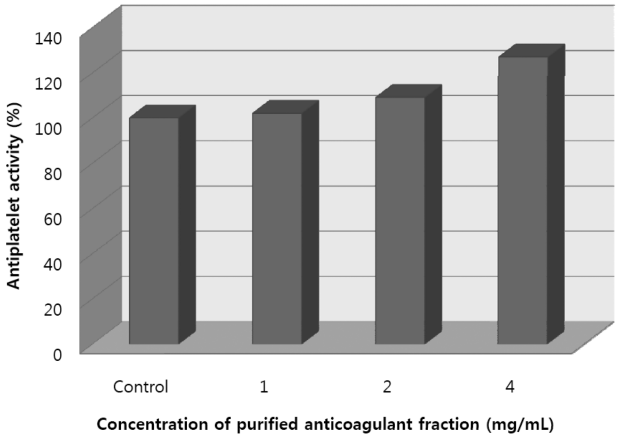


Fig. 8. Antiplatelet activity of purified anticoagulant fraction separated by DEAE sepharose CL-6B column chromatography

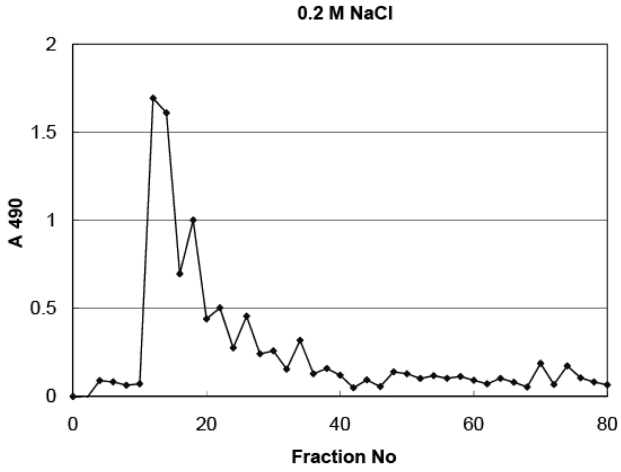


Fig. 9. DEAE sepharose CL-6B column chromatography of methanol soluble fraction from *Auricularia auricula*

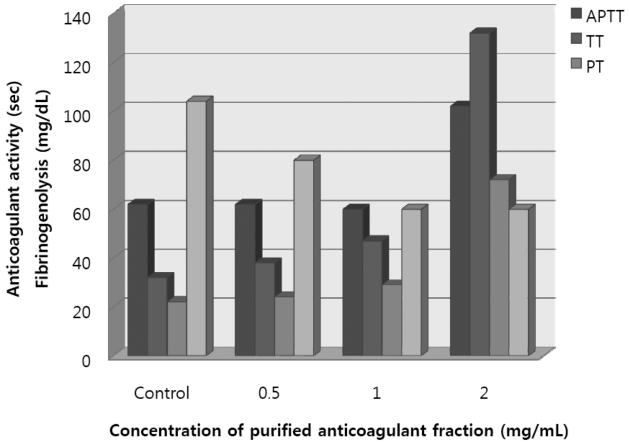


Fig. 10. Anticoagulant activity of purified fraction separated by DEAE sepharose CL-6B column chromatography

DEAE sepharose CL-6B에 흡착시키고 증류수로 세척한 다음 0-1.0 M의 NaCl로 stepwise gradient를 통해 5 mL씩 분획하여 총당 정량을 수행하였다. 그 결과 Fig. 9와 같이 0.2 M NaCl에서 peak가 관찰됨으로써 0.2 M NaCl 의 11-20번 fraction에서 정제물질이 용출된 것으로 확인하였고 정제물질의 농도별 항응고활성을 측정한 결과 Fig. 10과 같았다. 정제된 혈행 개선 물질의 APTT와 PT는 1 mg/mL 농도까지는 수치가 증가하지 않다가 2 mg/mL 농도에서 102 s로 급격하게 증가하는 것으로 나타났는데 이는 정제물질이 APTT 값을 나타내기 위해서는 최소 2 mg/mL의 농도 이상이어야 함을 보여주는 결과이다. TT와 FIB는 혈행 개선 물질의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다.

혈행 개선 물질의 분자량 측정과 구성당 분석

DEAE sepharose CL-6B를 사용하여 분리한 methanol 용해성물질의 항혈전활성 fraction의 정제물질에 대한 분자량을 측정하기 위하여 Sephacryl 400-HR을 이용하여 gel permeation column chromatography를 수행하였다. Column의 bed volume은 190 mL이었고 dextran blue로 확인한 void volume은 88 mL로 나타났다. Column에 DEAE sepharose CL-6B로부터 정제된 항혈전활성 fraction 1.5 mL를 loading하여 chromatography를 수행한 결과 80번 fraction에서 가장 높은 peak를 나타내었다(Fig. 11(A)). 이를 분자량을 알고 있는 표준 물질의 fraction 번호와 비교하여 분자량을 측정한 결과 Fig. 11(B)와 같이 약 150 kDa의 분자량을 지니고 있는 것으로 확인되었다.

한편 항혈전물질의 구성당을 분석하기 위하여 HPAEC-PAD system(Dionex)을 이용하여 중성 단당류(neutral monosaccharides)를 분리 동정하였다. 분석을 위한 표준품으로는 fucose, rhamnose, arabinose, galactose, mannose, xylose를 사용하였으며 표준품에 대한 retention time을 사용하여(자료 미제시) 정제한 methanol 용해성 물질의 구성당에 대한 chromatogram과 retention time을 구한 결과 12.83

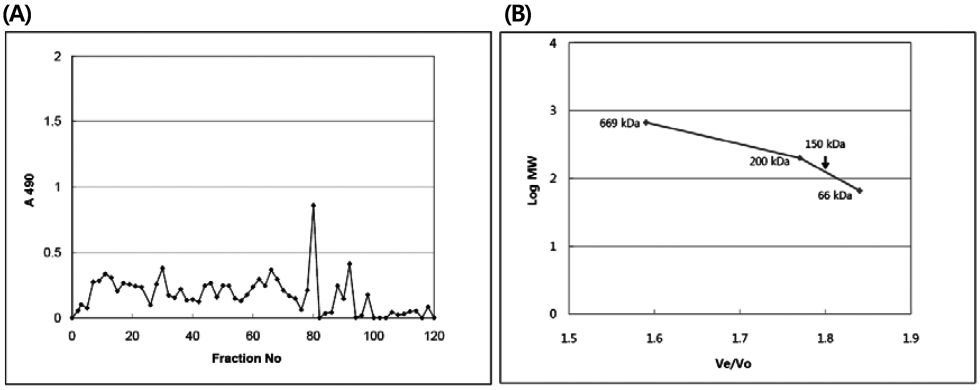
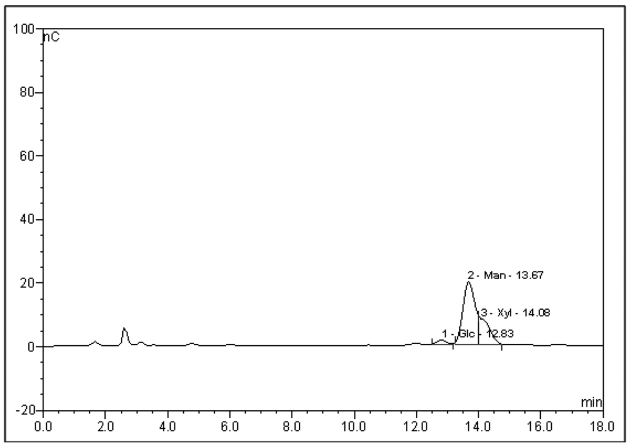


Fig. 11. Sephacryl 400-HR column chromatography of active fraction eluted from DEAE sepharose CL-6B column chromatography (A) and the determination of molecular weight using standard protein marker (B)



No.	Ret. Time (min)	Peak Name	Area (nC*min)	Rel. Area (%)	Amount (pmol)	Molar ratio
1	12.83	Glc	0.463	3.69	57.117	1.00
2	13.67	Man	8.816	70.41	1150.278	20.14
3	14.08	Xyl	3.243	25.90	373.947	6.55
Total			12.522	100.00	1581.342	

Fig. 12. HPAEC-PAD chromatogram and retention time of purified methanol soluble fraction from *Auricularia auricula*

분에 glucose, 13.67분에 mannose, 14.08분에 xylose가 검출되었다(Fig. 12). Peak의 상대 면적을 토대로 계산하였을 때 methanol 용해성 물질의 단당 구성비는 mannose가 70.4%, xylose가 25.9%, glucose가 4.7%로 확인되어 목이버섯 유래의 항혈전활성을 지니는 다당류는 mannose가 주요 구성당으로 되어 있는 xyloglucomannan의 복합다당체인 것으로 확인되었다.

혈행 개선 물질의 항혈전활성 혈액응고인자, 혈전용해활성 및 항혈소판활성 분석

목이버섯으로부터 추출한 혈행 개선 물질이 혈액응고계에서 어떠한 방식으로 작용하여 항혈전 효과를 나타내는지를 분석하였다. 혈액응고는 순차적으로 반응하는 아주 정교하고 복잡한 과정을 거쳐서 이루어지는데, 일반적으로 비활성화된 전구 물질이 활성화된 특정 혈액응고 인자들에 의해 활성화된 후 다음 혈액응고 인자들을 활성화시키는 방법으로 진행된다(Kenneth, 1997). Thrombin은 이들 중에서 가장 중요한 역할을 하는데 thrombin은 전구 물질인 prothrombin이 factor Va, factor Xa, Ca^{2+}, phospholipid (PL)로 구성된 prothrombinase complex에 의해 활성화되며 이것이 fibrinogen을 fibrin으로 변환시키면 활성화된 factor XIIIa에 의해 fibrin들이 교차결합(crosslinking)되어 안정화된 fibrin clot을 최종적으로 생성한다. Prothrombinase complex가 형성되려면 factor Xase complex에 의해 factor X가 factor Xa로 활성화되어야 한다. Intrinsic pathway에서 생성된 factor VIIIa, factor IXa, Ca^{2+}, phospholipid(PL) 또는 extrinsic pathway에서 생성된 factor VIIa, tissue factor (TF), Ca^{2+}가 factor Xase complex로 작용한다(Epstein, 1999).

항혈전활성을 측정하는 항목인 APTT, TT 및 PT는 혈액응고계에 존재하는 혈액응고인자의 작용점을 측정하는 것으로서 다음과 같이 설명된다. APTT는 factor XII, XI, IX, VIII, X. V, II, fibrinogen 등의 혈액응고인자를 측정하는 방법으로서 intrinsic pathway계에 존재하는 응고인자의 결핍 유무를 종합적으로 검사하는 항목이다. APTT가 증가되는 이유는 PT가 정상일 경우 factor VIII, IX, XI, XII에 결함이 발생되었기 때문이다(Epstein, 1999). TT는 fibrin 형성을 측정하는데 사용하는 간단하면서 빠른 test인데, fibrinogen이 감소하거나 질적 이상이 있는 경우, thrombin의 작용을 억제하거나 polymer 형성을 방해하는 물질이 있는 경우 등에서 TT가 증가한다. PT는 extrinsic pathway의 응고활성을 종합적으로 검사하는 항목으로서 혈액 내 prothrombin의 전체량을 나타낸다. Coagulation factor II, V, VII, X, I의 활성을 측정하는 것으로 factor II, V, VII,

Table 1. Heat stability of anticoagulant activity

Concent-ration (mg/mL)	APTT (s)				TT (s)				PT (s)				Fibrinogen (mg/dL)			
	Incubation time (min)															
	0	10	20	30	0	10	20	30	0	10	20	30	0	10	20	30
0	60±1.3[1)]	60±1.3	60±1.3	60±1.3	34±0.7	34±0.7	34±0.7	34±0.7	22±1.4	22±1.4	22±1.4	22±1.4	104±3.1	104±3.1	104±3.1	104±3.1
1	57±1.6	58±1.8	60±2.1	51±2.4	46±1.6	47±2.2	47±0.9	46±2.1	28±2.1	29±2.5	30±3.1	28±1.8	60±3.9	60±4.2	60±2.8	60±2.2
2	101±3.5	129±2.8	154±2.2	117±3.0	134±2.8	132±3.3	111±3.0	103±2.7	74±3.6	120±4.1	120±2.7	68±1.1	60±2.6	60±2.3	60±1.9	60±1.5
4	180±3.4	180±3.1	180±2.6	180±2.0	180±2.9	180±1.9	180±2.7	180±3.1	120±3.3	120±1.1	120±2.6	120±3.0	60±2.1	60±2.0	60±2.1	60±1.3

[1)]Numbers are mean ± SD.

X, fibrinogen의 결핍으로 PT가 증가된다. Fibrinogen은 340 kD의 당단백으로서 fibrinogen의 생산이 원활하지 않으면 fibrin 형성이 제대로 이루어지지 않는다. Plasma 내의 fibrinogen의 농도가 감소한다는 것은 fibrinogenolysis에 의해 분해됨을 의미한다(Kenneth, 1997).

이상과 같은 이론적 배경을 근거로 본 연구 결과를 다음과 같이 분석할 수 있다. 목이버섯의 methanol 용해성 분획의 항혈전효과는 APTT, TT 그리고 PT에 의해 이루어지는 것으로 확인되었다. APTT의 값이 증가하는 것은 목이버섯의 methanol 용해성 분획이 혈액응고과정 중 intrinsic pathway에 관여하는 혈액응고인자에 영향을 미치기 때문인 것으로 보이며, TT 값이 증가하는 것은 목이버섯의 methanol 용해성 분획이 antithrombin 활성을 지니고 있기 때문인 것으로 판단된다. PT 값이 증가하는 것은 목이버섯의 methanol 용해성 분획이 혈액응고과정 중 extrinsic pathway에 관여하는 혈액응고인자에 영향을 미치기 때문인 것으로 보이며, 또한 methanol 용해성 분획의 농도가 증가함에 따라 fibrinogen 함량이 감소하는 것으로 나타나 혈전용해 활성도 지니고 있는 것으로 확인되었으며 항혈소판응집능도 지니고 있는 것으로 확인되었다.

결론적으로 목이버섯이 지니고 있는 혈행 개선 작용은 혈액응고과정의 intrinsic pathway와 extrinsic pathway에 모두 작용하며, thrombin에 작용하여 발생되는 항응고활성과 fibrinogen을 분해하는 혈전 용해 활성 및 항혈소판응집능에 기인하는 것으로 판단된다.

혈행 개선 물질의 열 및 산 안정성 평가

목이버섯으로부터 분리 정제한 혈행 개선 물질의 열 안정성을 평가하기 위하여 일정 농도로 증류수에 용해한 혈행 개선 물질을 100°C에서 10, 20, 30분 동안 가열한 후 혈행 개선 물질의 APTT, TT, PT 및 FIB 활성을 측정하였다. 그 결과 Table 1과 같이 APTT는 1 mg/mL 농도에서는 30분간 가열시 약간 감소되는 경향을 나타내었으나 2 mg/mL 농도에서는 10분 또는 20분간 가열하였을 경우 오히려 증가되었다. 4 mg/mL의 농도에서는 30분간 가열하여도 APTT가 감소하지 않음을 알 수 있었다. TT는 1 mg/mL 농도에서는 열 안정성이 높았으나 2 mg/mL 농도에서 가열시간에 따라 TT가 감소하는 경향을 보여 주었다. PT는 2 mg/mL의 농도에서 20분간 가열하였을 때 값이 증가하다가 30분 가열시 감소함을 나타내었으며 4 mg/mL 농도에서는 30분간 가열하여도 감소하지 않았다. Fibrinogen 함량도 모든 농도에서 30분간 가열에 의해 값이 변화하지 않아 목이버섯 유래의 혈행 개선 물질은 열안정성이 매우 높은 것으로 확인되었다.

목이버섯으로부터 분리 정제한 혈행 개선 물질의 산 안정성을 평가하기 위하여 일정 농도로 증류수에 용해한 혈행 개선 물질에 0.5 N HCl을 상온에서 1시간 동안 처리한 다음 동량의 0.5 N NaOH를 첨가하여 중화시킨 후 혈행 개선 물질의 APTT, TT, PT 활성과 fibrinogen 함량을 측정하였다. 그 결과 Table 2와 같이 APTT와 TT, PT는 2 mg/mL의 농도에서 산 처리 후 상당히 감소하는 것으로 나타나 항혈전효과는 산에 불안정함이 확인되었다. 그러나

Table 2. Acid stability of anticoagulant activity

Concent-ration (mg/mL)	APTT (s)		TT (s)		PT (s)		Fibrinogen (mg/dL)	
	Control	Acid treatment	Control	Acid treatment	Control	Acid treatment	Control	Acid treatment
0	60±1.9[1)]	60±1.9	34±1.2	34±1.2	22±1.6	22±1.6	104±2.2	104±2.2
1	57±2.1	47±1.7	46±2.8	41±2.2	28±1.9	26±1.3	60±2.7	60±1.7
2	101±2.7	85±1.3	134±3.0	86±2.5	74±1.3	59±1.2	60±1.2	60±1.2
4	180±1.2	180±2.8	180±2.1	180±2.4	120±2.3	120±2.9	60±2.7	60±2.1

[1)]Numbers are mean ± SD.

Table 3. Ames test of anticoagulant fraction separated by DEAE sepharose CL-6B column chromatography

(Unit: CFU/mL)

S. Typhimurium strain	Control	Anticoagulant sample
TA1535	1.6±0.2[1)] ×10^2	0.3±0.1 ×10^2
TA1537	1.2±0.3 ×10^2	0.4±0.2 ×10^2
TA1538	1.5±0.3 ×10^2	0.5±0.2 ×10^2

[1)]Numbers are mean±SD.

fibrinogen 함량은 산 처리 후에도 처리 전과 동일한 값을 나타내어 혈전 용해 활성은 산에 의한 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

혈행 개선 물질의 유전독성 평가

목이버섯으로부터 분리 정제한 혈행 개선 물질의 유전독성을 평가하기 위하여 *Salmonella* Typhimurium의 histidine 영양요구성 돌연변이주를 이용한 Ames test를 수행하여 돌연변이원성을 조사하였다. 실험에 사용한 *Salmonella* Typhimurium의 histidine 영양요구성 돌연변이주 중에서 *Salmonella* Typhimurium TA1535는 histidine 생합성 경로의 첫 번째 효소를 coding하는 유전자에서 missense 돌연변이를 유발하는 염기치환이 이루어진 균주이다. *S.* Typhimurium TA1537은 TA1535에서 돌연변이된 유전자와는 다른 유전자에서 염기 1개가 실활된 frameshift 돌연변이주이며, TA1538은 TA1537에서 돌연변이된 유전자에서 염기 1개가 삽입된 frameshift 돌연변이주이다.

목이버섯으로부터 분리 정제한 혈행 개선 물질 1 mg을 *Salmonella* Typhimurium 돌연변이주에 처리한 결과 Table 3과 같이 생육을 위해 미량 첨가한 histidine에 의해 back ground로 생성된 colony 수보다 혈행 개선 물질 1 mg을 첨가한 plate의 colony수가 적은 것으로 나타나 목이버섯으로부터 분리한 혈행 개선 물질은 돌연변이원성을 지니고 있지 않음을 알 수 있었다.

요 약

목이버섯으로부터 항혈전활성과 항혈소판응집활성을 지니는 물질을 추출하여 추출물의 혈행개선활성을 조사하였다. 건조 목이버섯을 0.1 N NaOH, methanol, ethanol 등의 용매를 사용하여 추출하여 각 추출물의 항혈전활성을 activated partial thromboplastin time, thrombin time과 prothrombin time 값으로 측정한 결과 methanol 용해성 분획이 각각 100, 124, 54 s로 조사한 분획 중에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 활성 분획을 DEAE-Sepharose CL6B ion exchange column chromatography와 Sephacryl 400-HR gel permeation column chromatography로 정제하였으며 활성물질은 분자량이 150 kDa 이상인 다당류이며 mannose가 주요 구성당으로 되어 있는 xyloglucomannan의 복합다당체인 것으로 확인되었다. 정제된 다당류의 항혈전활성은 thrombin 활성을 저해하기 때문인 것으로 해석되었다.

감사의 글

이 연구는 2008년도 중소기업청 산학협력실 지원사업에 의해 수행되었으며 2009년도 경원대학교 지원에 의한 결과임.

참고문헌

Chang JS, Kim HJ, Bae JT, Park SH, Kim SE, Kim OM. 1998. Inhibition effects of Auricularia auricula-judae-judae methanol extract on lipid peroxidation and liver damage in benzo(a)pyrene-treated mice. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 712-727.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 175: 595-603.

Epstein FH. 1999. Vascular-bed: specific hemostasis and hypercoagulable states. New Engl. J. Med. 340: 1555-1564.

Ham SS, Kim DH, Choi KP, Lee DS. 1997a. Antigenotoxic effects of methyl alcohol extracts from Auricularia auricula and Gyrophora esculenta. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 26: 57-62.

Ham SS, Kim DS, Lee DS. 1997b. Antimutagenic effect of methyl alcohol extracts from Auricularia auricula and Gyrophora esculenta. Korean J. Food Sci. Technol. 29: 1281-1287.

Jaques LB. 1979. Heparin: an old drug with a new paradigm. Sci. 206: 528-533.

Kenneth GM. 1997. Thrombosis: theoretical considerations. Am. J. Clin. Nutr. 65: 1657-1664.

Kim SS, Kim YP. 1995. Korean mushrooms. Yu-Pung Co. Ltd., Seoul, Korea, p. 321.

Lee SA, Jung KS, Shim MJ, Choi OC, Kim PK. 1981. The study on anticancer component of Korea Basidiomycetes (II), Schizophyllum and Auricularia auricula-judae-judae. Korean Soc. Mycol. 9: 25-32.

McGinnis DM, Outschoorn AS. 1991. Problems of component activities of heparin. Pharmacop. Forum 5: 2438-2441.

Merton RE, Thomas DP. 1987. Experimental studies on the relative efficacy of dermatan sulphate and heparin as antithrombotic agents. Thromb. Haemost. 8: 839-842.

Nader HB, Dietrich CP. 1989. Natural occurrence and possible biological role of heparin. In: Heparin: chemical and biological properties-clinical application. Lane DA, Lindahl U (eds) Academic Press, London, Auckland. p. 81.