

할미송이버섯으로부터 혈전용해효소의 정제 및 특성 연구 (II)

상지대학교 이공과대학 화학과

김 준 호[†]

국문초록: 할미송이버섯으로부터 혈전용해효소 (FE-2)를 DEAE-cellulose, Mono-S column으로 분리 정제하였다. 이 효소는 분자량이 18.2 kDa 이었으며, ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometer) 분석 결과 Zn²⁺을 포함하고 있었다. 15번째까지의 N-terminal amino acid 서열은 A-L-Y-V-G-X-S-P-X-Q-Q-S-L-L-V이고, pH 7.5에서 활성이 가장 큰 염기성 단백질 분해효소로, EDTA와 1,10-phenanthroline에 의해 활성이 감소되는 metalloprotease였다. Mg²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺의 첨가 시 활성이 증가하였으나 Hg²⁺의 경우 활성이 완전히 소멸되었다. 이 효소 (FE-2)는 단백질 분해효소 저해제인 E-64 (trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butane), PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), pepstatin과 2-mercaptoethanol의 영향을 받지 않으며, 섬유소원 (fibrinogen)과 반응 시 α chain과 β chain은 분해시키지만 γ chain과는 반응하지 않았다.

서 론

여러 가지 원인에 의해 혈관 내에 형성된 혈전은 쉽게 용해되지 않고 혈관을 따라 흐르며 뇌혈전증, 뇌출혈, 심부전증, 심장마비와 같은 혈관계 질환을 유발하기 때문에 이 혈관계 질환의 주원인인 혈전을 용해하는 혈전용해제에 관한 관심이 점점 더 커지고 있다. 지금까지 사용되고 있는 혈전용해제로는 유로키나제, tPA (tissue-type plasminogen activator), streptokinase 등이 있으나 투여 시 혈전에 대한 선택성이 적어 전신출혈이 발생하며, 유로키나제를 제외하고는 경구 투여를 할 수 없는 단점이 있다²⁹. 기존에 사용되고 있는 혈전용해제들은 plasminogen 활성화제로 간접적인 과정으로 혈전을 용해하지만 근래에는 혈전과 섬유소원을 직접 용해하는 새로운 혈전용해 물질들이 보고되고 있다.

혈전을 직접 용해하는 효소를 뱀독³⁾과 지렁이^{18,19)}로부터 분리하였다는 보고가 있으며 또한 섭취하고

있는 식품으로부터 혈전용해효소를 밝히려는 많은 연구도 수행되고 있다^{8,13,16,23,24)}. 이와 같이 식용 가능한 자원 중에서 찾고자 하는 연구는 여러 가지 부작용을 일으키는 의약품과는 달리 식품은 반복해서 장기간 섭취하기 때문에 유효성분이 미량이라 하더라도 항상 공급됨으로서 큰 영향을 줄 수 있기 때문이다.

지금까지는 주로 버섯으로부터 항균성 물질²¹⁾, 항암물질⁷⁾과 함께 단백질 및 효소¹²⁾에 관한 연구가 진행되어 왔으며 혈전을 분해하는 물질에 관한 논문은 팽이버섯²²⁾과 본 실험실에서 발표한 뽕나무버섯^{11,12)}과 할미송이버섯⁹⁾ 이외에는 거의 발표되어 있지 않아 체계적인 연구가 필요하게 되었다.

본 논문에서는 할미송이버섯으로부터 분리한 활성이 큰 혈전용해효소 (FE-2)의 특성을 발표하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재 료

본 실험에 사용한 버섯시료는 1998년 10월 3일 치악산에서 채집하여 분류동정 후 시료로 사용하였다. 시약으로 사용한 fibrinogen, plasmin (P 4895, 3 units),

*논문 접수: 2000년 11월 10일

수정재접수: 2000년 12월 24일

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

plasminogen, thrombin, bovine serum albumin, agarose, glycine, Sephadex G-150와, protease inhibitor는 Sigma 제품을, DEAE-cellulose는 Whatman 제품을, LMW Electrophoresis calibration Kit는 Pharmacia 제품을 사용하였다.

2. 혈전용해효소의 정제

모든 정제 과정은 4°C에서 수행하였으며 정제 과정마다 혈전용해능과 단백질 농도를 측정하였다. 채집한 버섯을 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0)에 넣고 잘게 부수고 원심분리하여 얻은 상층액을 24시간 동안 투석한 후 같은 완충용액으로 평형된 DEAE-cellulose column (20×200 mm)에 흘려 보내고 완충용액 200 mL로 씻어준 후 0~0.5 M NaCl의 농도 기울기로 용출시켰다. 활성이 검출된 분획은 20 mM sodium phosphate 완충액 (pH 6.0)에 투석시킨 후 동일한 완충용액으로 미리 평형시킨 fast protein liquid chromatography (FPLC)의 Mono S column (5.0×100 mm)에 주입하였다. 완충용액 3 ml로 씻어준 후 0~0.1 M NaCl 농도 기울기로 용출시켰다. 두 번째 행한 FPLC의 경우에는 분획 당 용출량은 0.33 ml이고 용출 속도는 분당 1 ml로 하였다. 각 분획의 효소 활성을 측정한 후 활성이 큰 부분 (FE-2)을 모아 실험에 사용하였다.

3. 단백질의 정량

효소의 단백질 정량은 Lowry 등¹⁷⁾의 방법에 의하여 측정하였으며 bovine serum albumin을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

4. 혈전용해활성의 측정

Haverkate-Trass의 fibrin plate법¹⁸⁾에 따라 2% gelatin 용액에 녹인 0.7% (w/v) fibrinogen 용액 10 ml와 0.05 M barbital 완충용액 (pH 7.5)에 녹인 thrombin (100 NIH units) 50 µl을 잘 섞은 후 이를 petri dish에 부어 fibrin막을 만들었다. 효소 용액을 20 µl씩 fibrin plate 위에 점적한 후 36°C에서 8시간 방치하였다. 효소에 의해 fibrin막이 용해되면 용해 면적을 측정하여 상대적인 활성을 측정하였다. 표준대조구조는 plasmin을 사용하고 plasmin을 연속적으로 회석하여 얻은 표준곡선에 따라 활성을 계산하였다.

Fibrin plate는 plasminogen이 제거된 fibrinogen과 plasminogen이 포함된 fibrinogen을 이용하여 두 가지 방법으로 준비하였다.

5. 분자량 결정

단백질의 분자량은 전기영동과 MALDI-TOF 질량 분석기 (Voyager-DE STR, Perseptive Biosystems)를 이용하여 결정하였으며, gel은 coomassie blue R-250과 silver staining kit로 염색하였다. MALDI-TOF 질량 분석기에 의한 분자량 측정은 기초과학 지원연구소 (대전)에서 측정하였다.

6. N-terminal amino acid 서열 분석

분리된 효소의 amino acid sequencing은 기초과학 지원연구소 (서울)에 precise protein sequencing system (Applied Biosystems Model procise-491)을 사용하여 수행되었다.

7. 금속 이온의 종류

분리한 효소가 갖고 있는 금속의 종류와 양은 상지대학교 자연과학지원센터에서 Ultra mass 700 inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS, Ultra-mass 700, Varian)을 이용하여 측정하였다.

8. 최적 pH

효소의 활성에 미치는 pH의 영향은 완충용액으로 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0~7.0), 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0~9.5), 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.5~10.0)를 사용하였고 기질로 N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe pNA를 사용하여 35°C에서 혈전용해효소와 반응하는 가수분해 활성을 조사하였다. 즉 3 mM의 기질 50 µl에 해당하는 buffer 925 µl와 효소 25 µl을 넣고 섞은 후 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

9. 효소 활성에 미치는 금속 2가 이온과 효소 저해제의 영향

정제한 효소의 활성에 대한 금속 이온의 영향과 효소 저해제의 영향을 알아보기 위하여 2 mM의 CaCl₂, CoCl₂, ZnCl₂, CuSO₄, MgCl₂, FeCl₂, HgCl₂, EDTA, 1,10-phenanthroline, 2-mercaptoethanol과 단백질

질 분해효소 저해제인 PMSF, E-64과 0.4 mM의 Pep-stain A을 같은 부피의 혈전용해효소 용액과 섞은 후 fibrin plate에 점적하고 36°C incubator에서 8시간 후 용해된 면적을 측정하여 활성을 비교하였다.

10. 혈전용해효소에 의한 섬유소원의 분해 양상

분리한 효소 (1.3 µg/ml)와 섬유소원 (2 mg/ml)를 36°C에서 반응시키면서 일정한 시간 간격을 두고 반응액 일부를 취하여 전기영동을 행하여 섬유소원의 분해 과정을 분석하였다.

결 과

1. 혈전용해효소의 정제

혈전용해효소 (FE-2)는 Table 1에서와 같이 3단계를 거쳐 분리 정제하였다. 효소 용액을 DEAE-cellulose에 주입한 결과 활성을 갖는 대부분의 효소는 관에 붙지 않고 흘러 나왔다. FPLC의 Mono S column을 이용하여 처음 분리한 활성 부분의 SDS-PAGE는 두 개의 띠를 나타냈는데, MALDI-TOF 질량 분석기를 이용한 결과 그들의 분자량은 각각 17946 Da과 18147 Da 이었다 (Fig. 1). 두 번째 FPLC의 결과 이들은 두 개의 peak (FE-1, FE-2)로 분리되었으며, SDS-PAGE의 결과 비교적 순수한 단일 띠가 나타남으로 그 순도를 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 즉 Table 1에서와 같이 할미송이버섯의 추출용액에 존재하는 혈전용해효소인 FE-1과 FE-2가 74%와 26%로 FE-1이 더 많이 존재하지만, 비활성은 각각 32.7 U/mg과 43.4 U/mg로 FE-2가 FE-1 보다 약 1.33배 더 크게 나타났다 (Table 1). FE-2는 지금까지 버섯으로부터 분리한

혈전용해효소 중 혈전용해능이 가장 큰 효소였다. 본 실험은 비활성이 큰 FE-2의 특성에 대하여 연구하였다.

정제한 효소 (FE-2)는 plasminogen을 포함하는 fibrin plate 뿐만 아니라 포함하지 않은 fibrin plate에서도 같은 활성을 나타냈다 (자료 제시되지 않음).

2. 분자량 측정

SDS-PAGE와 MALDI-TOF 질량 분석기를 이용하여 측정된 결과 분리한 효소 (FE-2)의 분자량이 18.2 kDa인 것을 알게 되었으며, 또한 이 효소가 단량체로 이루어진 것을 알 수 있었다.

3. 금속 이온

ICP-MS을 이용하여 FE-2이 갖고 있는 금속의 종류와 양을 측정된 결과 이 효소는 1 mole 당 Zn²⁺을 0.98 mole 포함하고 있었다.

4. N-terminal amino acid 서열 분석

이 효소 (FE-2)의 15번째까지 N-terminal amino acid 서열 분석 결과는 Ala-Leu-Tyr-Val-Gly-X-Ser-Pro-X-Gln-Gln-Ser-Leu-Leu-Val으로 FE-1의 서열과 같았다.

5. 최적 pH

기질로 N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe pNA을 이용하여 pH 변화에 따른 효소 활성을 조사한 결과 Fig. 3과 같이 pH 7.5에서 최적의 활성을 보여주는 염기성 단백질 분해효소였다.

Table 1. Purification of fibrinolytic enzymes from *Tricholoma saponaceum*

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg protein)	Recovery (%)	Purification fold
Crude extracts	1510	1426	0.95	100	1
DEAE cellulose	39.2	359	9.14	25.1	9.67
1st Mono S (FPLC)	7.92	233	29.4	16.3	31.1
2nd Mono S (FPLC)					
FE-1	4.07	133	32.7	9.32	34.6
FE-2	1.43	62	43.4	4.35	45.9

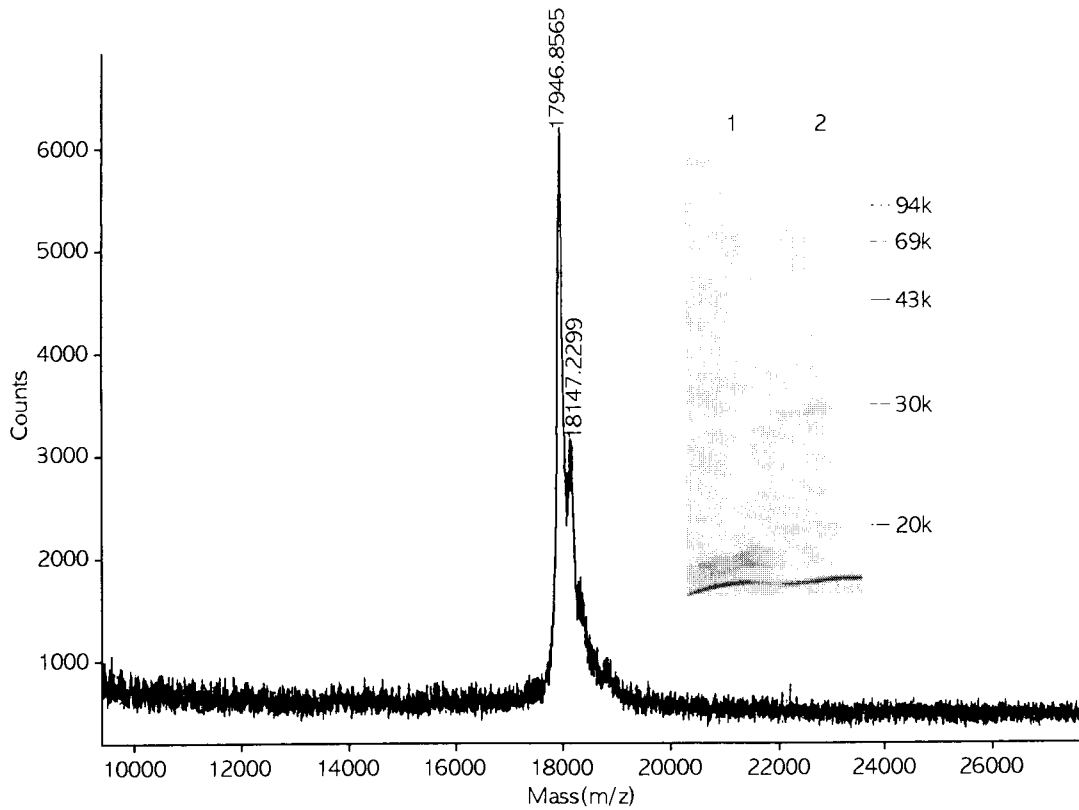


Fig. 1. MALDI-TOF Spectra and Electrophoregram of the 1st Purified Enzyme. Lane 1. purified enzyme: lane 2. Molecular mass marker.

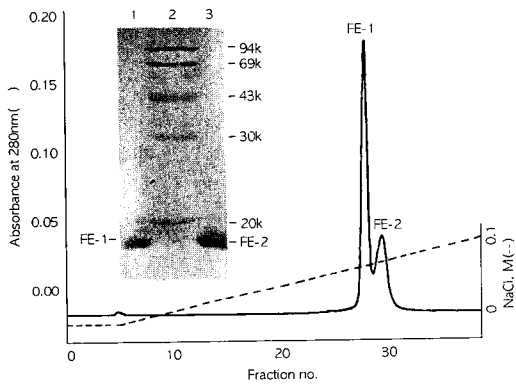


Fig. 2. FPLC and Electrophoregram of Purified Enzyme. Lane 1. FE-1: lane 2. Molecular mass marker: lane 3. FE-2.

6. 효소 활성에 미치는 금속 2가 이온과 단백질 분해효소 저해제의 영향

Table 2와 같이 Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} 의 경우 활

성이 증가하였으나 Ca^{2+} 경우는 약간 감소한 반면 Cu^{2+} 에 의해 급격히 감소하다가 Hg^{2+} 의 경우는 활성이 나타나지 않았다. 각종 단백질 분해효소 저해제에 대한 영향을 조사한 결과 serine protease 저해제인 PMSF에 의해서는 약간 감소했으나 cystein protease 저해제인 E-64와 aspartic protease 저해제인 pepstain에 의해서는 거의 효소 활성이 영향을 받지 않았다. 1 mM의 EDTA와 1,10-phenanthroline를 첨가한 경우 효소의 활성이 상당히 저해되었으며, 5 mM의 EDTA와 1,10-phenanthroline를 첨가한 경우에는 전혀 활성이 나타나지 않았다.

7. 혈전용해효소에 의한 섬유소원의 분해 양상

정제한 효소 (FE-2)와 섬유소원 (fibrinogen)의 반응 시 시간별로 취한 반응액을 SDS-PAGE로 분석한 결과 fibrinogen의 $\text{A}\alpha$ chain은 5분 후, $\text{B}\beta$ chain은 20분 후에 분해가 일어났지만 γ chain은 90분 후에도 손상을 받지 않았다 (Fig. 4).

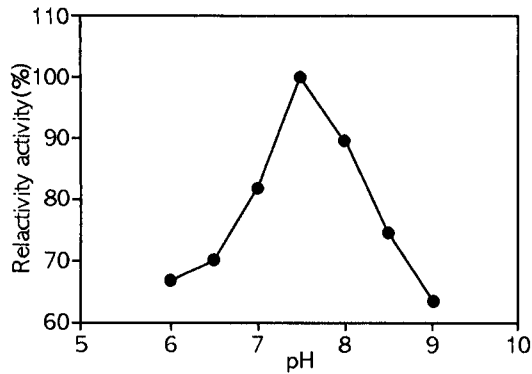


Fig. 3. Effect of pH on the Activity of the Purified Enzyme (FE-2). Activity is expressed as a percentage of maximal activity.

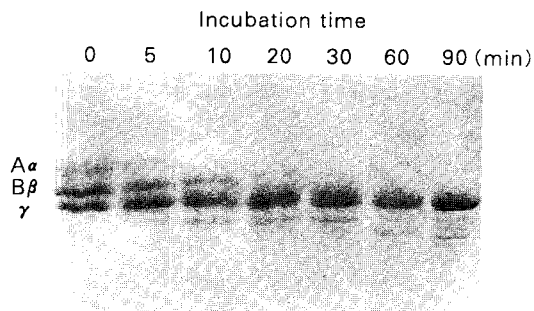


Fig. 4. Degradation of Human Fibrinogen by Fibrinolytic Enzyme. Purified enzyme (1.3 $\mu\text{g/ml}$) was incubated with fibrinogen (2 mg/ml) at 36°C in 20 mM sodium phosphate, pH 7.0.

고찰

현대인의 사망 원인 중 가장 높은 비중을 차지하고 있는 것이 혈관계 질환이다. 이 혈관계 질환의 주원인 중 하나가 혈전으로 이 혈전을 용해시키는 혈전용해제에 관한 관심이 높아지고 있다. 기존에 사용되고 있는 혈전용해제들은 여러 가지 부작용을 나타내며, 대부분 수입에 의존하기 때문에 가격이 비싼 단점을 갖고 있다. 따라서 이 단점을 극복할 수 있는 새로운 혈전용해제의 개발이 필요하게 되었다. 버섯에 혈전의 주성분인 피브린을 용해시키는 단백질 분해효소가 있다는 Gavrilova의 보고⁹⁾에 따라, 한국에 자생하는 야생 버섯의 혈전용해능¹⁰⁾을

Table 2. Effects of various divalent ions and protease inhibitors on protease activity

Reagents	Concentration	Residual activity (%)
None	1 mM	100
Ca ²⁺	1 mM	93
Co ²⁺	1 mM	128
Zn ²⁺	1 mM	136
Cu ²⁺	1 mM	48
Mg ²⁺	1 mM	110
Fe ²⁺	1 mM	111
Hg ²⁺	1 mM	0
EDTA	1 mM	51
	5 mM	0
1,10-phenanthroline	1 mM	71
	5 mM	0
PMSF	1 mM	88
Pepstain A	0.2 mM	103
E-64	1 mM	101
2-mercaptoethanol	1 mM	100

E-64: trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butane. PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride.

조사한 결과 할미송이버섯에서 혈전용해능이 매우 크게 나타났다. 이 할미송이버섯으로부터 분리한 두 혈전용해효소 (FE-1, FE-2) 중 더 큰 비활성을 나타낸 효소 (FE-2)는 fibrin을 용해하는데 있어 plasminogen activator (PA)로 작용하지 않고 fibrin을 직접 가수분해하는 혈전용해효소였으며, 비활성 (43.4 U/mg)은 이미 발표된 할미송이버섯 (FE-1: 32.7 U/mg), 뽕나무버섯 (17.02 U/mg), 젓갈 (1.4 U/mg), 청국장 (1.84 U/mg)으로부터 분리한 효소들 보다 매우 큰 것을 알 수 있었다. 즉 이 효소는 버섯으로부터 분리한 혈전용해효소 중 혈전용해능이 가장 큼을 알 수 있었다.

또한 분자량 (18.2 kDa)은 팽나무버섯 (30 kDa), 뱀독 (51 kDa), 청국장 (28.2 kDa), 젓갈 (41 kDa), Shio-kara (35 kDa), 뽕나무버섯 (18.5 kDa), 지렁이 (20 kDa), 발효식품인 natto (20 kDa)로부터 분리한 혈전용해효소에 비하여 작음을 알 수 있다.

이 효소의 15번째까지 N-terminal amino acid 서열

분석 결과는 A-L-Y-V-G-X-S-P-X-Q-Q-S-L-L-V으로 지금까지 발표된 뽕나무버섯, 팽나무버섯²²⁾, 잎새버섯과 느타리버섯²⁰⁾ 등의 metalloprotease와 다른 구조의 새로운 효소였다. 할미송이버섯으로부터 분리한 FE-2과 FE-1는, 같은 N-terminal 구조를 갖고, 분자량이 200 Da 차이가 나는 것으로 보아 이 효소들은 같은 효소인데 분자량이 큰 FE-2의 C-terminal 일부가 잘려 나가 FE-1이 생긴 것으로 생각되기도 하며 또한 같은 N-terminal sequencing을 갖는 다른 단백질일 가능성도 전혀 배제할 수 없다⁹⁾.

또한 FE-2는 pH 7.5에서 최적의 활성을 보여주는 염기성 단백질 분해효소였다.

Table 2의 결과로부터 이 효소 (FE-2)는 활성 중심에 metal ion을 갖는 metalloprotease로 추정할 수 있는데 ICP-MS의 결과 mole 당 Zn²⁺을 0.98 mole 포함하고 있는 것으로 밝혀졌다. 이와 같이 혈전용해 효소가 metalloprotease인 경우에 그 활성 중심에 있는 금속 이온은 대부분 Zn²⁺이지만 Co²⁺의 경우도 알려져 있다⁹⁾.

또한 2가 금속 양이온의 효소 활성에 대한 영향을 FE-1과 비교하면 Ca²⁺의 경우를 제외하고 모두 크게 나타났다. 그러나 FE-1은 EDTA 1 mM과 4 mM에 의해 활성이 감소되는 정도가 비슷한 반면, FE-2는 EDTA 1 mM에 의해 활성이 감소하다 4 mM에서는 완전히 소멸되었다 (자료 제시되지 않음). 1,10-phenanthroline를 첨가한 경우 활성이 완전히 소멸되었으나 Co²⁺나 Zn²⁺의 첨가에 의해 사라진 활성이 재생되는 것이 관찰되기도 하였다⁹⁾.

그러나 섬유소원과의 반응 시 FE-1의 경우는 α chain과 β chain이 거의 같은 속도로 30분 후에 완전히 분해되지만 FE-2의 경우는 더 빨리 분해가 일어났으며, α chain이 β chain 보다 조금 더 빨리 분해가 일어나는 것을 알 수 있었다. 그러나 두 효소 모두 90분이 경과하여도 γ chain은 분해하지 못했다.

물론 전체 full amino acid sequencing을 하면 확실히 알 수 있겠지만, 지금까지의 결과로부터 FE-1은 FE-2의 C-terminal 일부가 절단되어 생긴 것으로 추정되며, 이와 같이 같은 물질로부터 나온 두 효소가, 같은 N-terminal 구조를 갖고⁹⁾, 분자량 차이는 적지만, 비활성 차이가 크게 나타나는 이유는, catalytic

domain은 N-terminal 영역에 존재하지만, 혈전용해에 중요한 역할을 하는 binding domain이 더 큰 분자량을 갖는 효소의 C-terminal 영역에 있기 때문에 추정된다¹⁵⁾.

즉 실험 결과로부터 분리한 효소 (FE-2)는, 버섯으로부터 분리한 혈전용해효소 중 혈전용해능이 가장 크며, 분자량도 작고, 혈전을 직접 용해시키는 혈전용해효소로 혈전용해제로의 장점을 갖고 있어, 이 효소의 catalytic domain과 binding domain에 관한 연구와 함께 좀더 많은 임상 실험을 거치면 새로운 혈전용해제의 개발이 가능할 것으로 예상된다.

참 고 문 헌

- 1) Bajorth J, Saenger W and Pal GP (1988): Autolysis and inhibition of proteinase K, a subtilisin-related serine proteinase isolated from the fungus *Tritirachium album* Limber. *Biochim Biophys Acta (NETHERLANDS)*, **954(2)**: 176-182.
- 2) Burton KS, Wood DA, Thurston CF and Barker PJ (1993): Purification and characterization of a serine proteinase from senescent sporophores of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *J Gen Microbiol*, **139**: 1379-1386.
- 3) Chung KH and Kim DS (1992): Fibrinolytic and Cogulation Activities of Korean Snake Venoms. *Kor Biochem J*, **25**: 696-701.
- 4) El-Aassar SA (1995): Production and properties of fibrinolytic enzyme in solid state cultures of *Fusarium pallidoroseum*. *Biotechnol Lett*, **17**: 943-948.
- 5) GavriloVA VP and Falina NN (1975): (Russ) Proteolytic enzyme isolated from a fungus, *Flammulina velutipes* (Fr) Sing. *Mikol Fitopatol*, **9**: 431-433.
- 6) Haverkate F and Traas DW (1974): Dose-response curves in the fibrin plate assay. Fibrinolytic activity of protease. *Thromb Haemost*, **32**: 356.
- 7) Kim BK, Kim JS, Choi EC, Kim HR, Lee KL, Lee CO, Chung KS and Shim MJ (1983): Studies on constituents of the Higher Fungi of Korea (X XXVII). *Kor J Mycol*, **11**: 151-157.
- 8) Kim HK, Kim GT, Kim DK, Choi wA, Park SH,

- Jeong YK and Kong IS (1997): Purification and Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus sp.* KA38 Originated from Fermented Fish. *J of Fermentation and Bioengineering*, **84(4)**: 307-312.
- 9) Kim JH (2000): Purification and characterization of fibrinolytic enzymes from *Tricholoma saponaceum*. *Kor J Mycol*, **28(1)**: 60-65.
- 10) Kim JH, Lee HY, Yoo KH, Kim YS, Seok SJ and Kim YS (1998): The Screening of fibrinolytic activities of extracts from Mushrooms in Mt. Chiak. *Kor J Mycol*, **26**: 589-593.
- 11) Kim JH and Kim YS (1998): Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from *Armillariella mellea*. *Kor J Mycol*, **26(4)**: 583-588.
- 12) Kim JH and Kim YS (1999): A fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Armillariella mellea*. *Biosci Biotech Biochem*, **63(12)**: 2130-2136.
- 13) Kim SH (1998): New trends of studying on potential activities of Doen-Jang. *Korea Soybean Digest*, **15(1)**: 8-15.
- 14) Park YD, Kim JW, Min BG, Seo JW and Jeong JM (1998): Rapid purification and biochemical characteristics of *Lumbrokinase III* from earthworm for use as a fibrinolytic agent. *Biotechnol Lett*, **20(2)**: 169-172.
- 15) Kim YS, Kim JE, Byun HS, Chang CS and Suh JS (1995): Catalytic importance of the C-terminal region of a fibrinolytic enzyme from *Lumbricus rubellus*. *J Biochem Mol Biol*, **28**: 398-401.
- 16) Kim YT, Kim WK and Oh HS (1996): Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus sp.* Strain CK 11-4 Screened from *ChungkookJang*. *Appl Environm Microbiolo*, **2482-2488**.
- 17) Lowry OH, Rosenbrough NJ and Randall AJ (1951): Protein Measurement with the folin Phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**: 265-275.
- 18) Mihara H, Nakajima N and Sumi H (1993): Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci Biotech Biochem*, **57(10)**: 1730.
- 19) Mihara H, Sumi H, Yoneta T, Mizumoto H, Ikeda R, Seiki M and Maruyama M (1991): A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Jpn J Physiol*, **41**: 461.
- 20) Nonaka T, Dohmae N, Hashimoto Y and Takio K (1997): Amino acid Sequences of Metalloendopeptidases specific for Acyl-Lysine bonds from *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* Fruiting Bodies. *J Biol Chem*, **272**: 30032-30039.
- 21) Park SS, Lee KD and Min TJ (1995): Study on the Screening and Development of Antibiotics in the Mushrooms. - The Screening of Bacterial Antibiotics in Basidiomycetes (I). *Kor J Mycol*, **23(1)**: 28-36.
- 22) Shin HH and Choi HS (1998): Purification and Partial Characterization of a Metalloprotease in *Flammulina velutipes*. *J Microbiolo*, **36**: 20-25.
- 23) Sumi H, Hamada H, Tsushima H, Mihara H and Muraki HA (1987): A noble fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*, **43**: 1110-1111.
- 24) Sumi H, Nakajima N and Yatagai C (1995): A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack Shiokara, a Japanese traditional fermented food. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **112(3)**: 543-547.
- 25) Sumi HM, Seiki N, Morimoto H, Tsushima M, Maruyama and Mihara H (1985): Plasma fibrinolysis after intraduodenal administration of urokinase in rats. *Enzyme*, **33**: 121-127.

=Abstract=

**Purification and Characterization of Fibrinolytic Enzyme from
Tricholoma saponaceum (II)**

Jun-Ho Kim[†]

Department of Chemistry, SangJi University, Wonju 220-702

Fibrinolytic enzyme (FE-2) was purified from the fruiting bodies of *Tricholoma saponaceum* using DEAE-Cellulose chromatography and Mono-S column chromatography. The enzyme has a molecular weight of 18.2 kDa and include Zn²⁺ ion as found by ICP/MS. The N-terminal amino acid sequence of the enzyme was A-L-Y-V-G-X-S-P-X-Q-Q-S-L-L-V. It has a pH optimum at pH 7.5, suggested that FE-2 was a neutral protease. The activity of FE-2 was highly inhibited by EDTA and 1,10-phenanthroline, indicating that the enzyme is a metalloprotease. The activity of FE-2 was increased by Mg²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, and Co²⁺, but the enzyme activity was totally inhibited by Hg²⁺. No inhibition was found with PMSF, E-64, pepstatin and 2-mercaptoethanol. The enzyme hydrolyzed both A α and B β chains of human fibrinogen. The γ chain was resistant to hydrolysis by FE-2.

Key Words: Fibrin plate assay, Fibrinolytic enzyme, *Tricholoma saponaceum*

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 6(4): 261–268, December, 2000]

[†]Corresponding author