

능이버섯으로부터 Fibrin분해활성이 있는 단백질의 분리 및 정제

이종호* · 양정례¹ · 정청송² · 김희숙³ · 조재선⁴

성심외국어대학 외식산업학과, ¹창원대학교 식품영양학과, ²경희대학교 조리과학과,
³경성대학교 식품공학과, ⁴경희대학교 식품공학과

Isolation and Purification of Fibrinolytic Enzyme of Edible Mushroom, *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito

Jong-ho Lee*, Jeong-Lye Yang¹, Chung-Sung Jung², Hee-Sook Kim³ and Jae-Sun Cho⁴

Department of Food Service Industry, Sungsim College of Foreign Languages.

¹*Department of Food and Nutrition, Cangwon National University.*

²*Department of Culinary Science and Art, Kyung Hee University.*

³*Department of Food Science and Technology, Kyungsung University*

⁴*Department of Food Science and Technology, Kyung Hee University.*

Abstract

To isolate and purify fibrinolytic active substance from *Sarcodon aspratus* (NH₄)₂SO₄ precipitation, DE52 anion exchange column chromatography, Sephacryl-S 200 gel filtration chromatography and Mono S cation FPLC were carried out and the characterizations of the purified enzyme were investigated. The bound active fraction on DE52 anion exchange column chromatography were eluted with 0.2 M NaCl and the fibrinolytic enzyme was purified after following Sephacryl-S200 gel filtration chromatography and Mono S cation FPLC. The specific activity of purified enzyme was 55.2 U/mg protein and increased 11.3 fold comparing crude extract and the yield was 49.5%. 12% SDS-PAGE electrophoresis and gel filtration chromatography revealed that *Sarcodon aspratus* fibrinolytic enzyme was highly purified and had 29,300 Da molecular weight. Enzyme activity of the purified fibrinolytic enzyme from *Sarcodon aspratus* was increased on higher pH and was stable until pH 10.5. On temperature dependent stability, the enzyme activity was decrease sharply but remained 25% relative activity on 80°C. This enzyme activity was inhibited by heavy metal ion, Cu²⁺ and Co³⁺ with 68% and 38%, respectively. And also, the enzyme activity was inhibited with Ca²⁺ chelator EDTA and serine protease inhibitor PMSF. These results from this study suggested that the fibrinolytic enzyme from *Sarcodon aspratus* is a serine protease and the enzyme activity was increased by Ca²⁺ or Mg²⁺ ion.

Key words – Purification, Enzyme, *Sarcodon aspratus*, Fibrinolytic.

*To whom all correspondence should be addressed

Tel : 051-540-7205, Fax : 051-543-9347

E-mail : JOH@sungsim.ac.kr

서 론

심혈관 질환의 위험요인 중 하나인 혈전은 혈액내에서 복잡한 blood cascade mechanism에 의해 활성화된 thrombin에 의하여 fibrinogen이 fibrin으로 전환되어 응고된 중합체를 형성함으로써 생성된다[17]. 생성된 혈전은 잘 용해되지 않는 불용성 덩어리로서 혈류를 따라 이동하면서 혈관벽에 콜레스테롤과 함께 부착하여 고혈압, 뇌혈전증을 일으키기 도하고 심장혈관을 막아 심부전증이나 심장마비의 원인이 되기도 한다.

혈전에 의하여 병증을 나타내는 것을 혈전증이라 하는데, 혈전의 예방 및 치료에 이용되는 혈전용해효소는 혈전 성분인 fibrin을 분해한다. 혈전용해작용은 혈전용해효소의 직접적인 용해작용과 plasminogen활성 인자에 의해 plasmin을 활성화 시켜 혈전을 용해하는 간접적인 용해작용이 있다. 현재까지 혈전증 치료에 널리 사용되어 왔던 streptokinase [6], urokinase[15], TPA[1](tissue-type plasminogen activator)등과 같은 의약품은 출혈 등 부작용의 위험이 크고 반감기가 짧으며 가격이 높다는 것과 urokinase를 비롯하여 하고는 경구 투여가 불가능 하다는 문제점이 있다.

Sumi등[16]은 일본의 발효식품인 natto로부터 혈전용해효소인 nattokinase를 분리 정제 하였으며 이 효소를 경구 투여시 생체내의 혈전 용해능이 높아졌다고 보고하였다. 최근 우리나라에서도 청국장[10]과 된장[11]으로부터 혈전 용해효소를 생산하는 *Bacillus*균주가 분리 되었으며 첫갈[8], 김치[9]등의 발효식품에서도 혈전용해능을 가진 효소가 존재함이 보고되었다. 특히 된장에서 분리된 균주들은 natto와 청국장에서 분리된 균주에 비하여 3-4배 이상의 높은 혈전용해 효소를 생산 할 수 있음이 보고 되었다[12].

한국과 일본에서 9월 하순과 10월 초순에 자생하는 능이버섯 [*Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito]은 전통적으로 식용과 약용으로 애용되어 왔으나 최근에 와서는 대량생산되는 다른 식용버섯에 비하여 그 이용도는 매우 제한되어 있다. 능이버섯은 단백분해활성이 강하여 육류를 먹고 채했을 때의 약품으로도 이용되어 왔다. 본 연구에서는 능이버섯의 fibrin 분해능을 조사하던 중 그 활성이 매우 높음을 발견하고 fibrin 분해 활성물질을 분리 정제하여 그 특성을 조사하였으며 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 건조된 능이버섯을 서울 경동시장에서 구입하여 분쇄한 후 40 mesh의 체를 통과한 가루를 사용하였다.

시약 및 분석기기

혈전용해활성의 측정에 사용된 시약 및 SDS-PAGE 시약은 Sigma사 제품을, DEAE-cellulose(DE52)는 Whatman 사 Sephacryl-S 200과 Mono S column pharmacia 사 제품을 이용하였고, 그 밖에 언급되지 않은 시약들은 특급을 사용하였다.

원심분리기는 Beckman사, Gradifrac LC 및 FPLC는 Pharmacia, LKB사제품을 electrophoresis 장치는 Heoffer사 제품을 이용하였다.

조효소액의 조제

분쇄한 능이버섯 분말을 5배(v/v)의 아세톤으로 2시간 동안 탈지하고 음건하여 본 실험에 사용하였다. 탈지 건조한 능이 100 g에 10배의 0.1 M 인산완충용액(pH 7.0)을 넣고 2시간동안 진탕 추출하고 cheese cloth로 걸러서 그 여액을 16,000×g로 20분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 조효소액으로 하였다.

(NH₄)₂SO₄에 의한 분획

이 조효소액에 (NH₄)₂SO₄을 가하여 25% 포화용액이 되도록 한 후 16,000×g로 20분간 원심분리하여 침전물을 제거하고 그 상등액에 다시 (NH₄)₂SO₄을 가해 75% 포화되도록 하였다. 이 용액을 4℃에서 2시간 방치한 후 전과 동일한 방법으로 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 이 침전물을 소량의 동일 완충용액에 용해하고 4℃에서 50배의 동일 완충액으로 여러번 교환하여 투석하였다.

DE52 anion exchange column chromatography 20mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 평형화된 DE52 anion exchange column(4×27cm)에 (NH₄)₂SO₄으로 분획된 조효소액을 동일 완충액에 녹여 주입하였다. 처음 500분간 0.5 ml/min의 유속으로 씻어 낸 후 동일 완충액 1,000 ml과 여

기에 0.5 M NaCl을 함유하는 완충액으로 linear gradient (0.5ml/min)방식으로 용출 시키면서 5 ml씩 fraction collector로 분획하고 fibrin용해활성이 있는 획분을 모아 투석 농축하여 Sephacryl gel filtration column chromatography에 사용하였다.

Sephacryl-S 200 gel filtration column chromatography

0.1M NaCl이 함유된 20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 평형화한 Sephacryl-S 200 column(1.5×100cm)에 DE52 anion exchange column chromatography에서 얻은 활성물질 획분을 주입하고 0.1 ml/min의 유속으로 용출시키면서 2 ml씩 분획하여 fibrin용해활성이 있는 획분을 확인하였다.

Mono S cation exchange column chromatography

10mM citrate-20mM Na₂HPO₄(pH 4.0) 완충액으로 평형화시킨 Mono S cation column에 Sephacryl-S 200 gel filtration chromatography에서 얻은 효소액을 투석 농축하여 주입하였다. 0.5 M NaCl이 함유된 완충액을 이용하여 linear gradient 방법으로 용출시키면서 0.5 ml씩 fraction collector로 분획하여 fibrin 용해활성이 있는 획분을 확인하였다.

혈전용해 활성 측정

혈전 용해능은 Astrup[2]의 방법을 수정하여 시험관법으로 측정하였다. 즉, sodium borate 완충용액에 fibrinogen (from bovine plasma, Sigma, USA)을 0.006 g/ml되게 하여 37°C에서 완전히 잘 용해시킨 후, 시험관에 분주하였다. 동일 완충용액으로 희석한 200 unit thrombin(from bovine plasma, 10,000 units, Sigma, USA)을 가하고 균일하게 섞어 실온에서 30분간 방치하였다. 이 fibrin 배지에 시료를 30 μl씩 가하고 37°C에서 5시간 반응시킨 후, fibrin이 분해된 액상을 여과지로 흡수시켜 그 무게를 정량화하고 plasmin (bovine plasmin, Sigma, USA)을 표준물질로 하여 활성을 나타내었다. 단백질 정제과정 중의 단백질획분은 280 nm에서의 흡광도로 조사하였고 이때 효소의 활성은 초기속도 구간에서 1분당 0.001의 흡광도 증가를 1unit로 정의 하였다.

단백질 농도측정

혈청알부민 (Bovine serum albumin)을 표준 단백질로

하여 Bradford 등[3]의 방법으로 측정하였다.

pH 안정성

pH 3.0에서 pH 6.0까지는 0.1M citrate-phosphate 완충액을, pH 7.0에서 pH 9.0까지는 0.1 M Tris-HCl 완충액을, pH 10.0에서 pH 11.0까지는 0.1 M carbonate-bicarbonate 완충액을 사용하였으며, 4°C에서 48시간 incubation 후 혈전용해 활성을 측정하였다.

온도안정성

0.1 M Na₂CO₃-NaHCO₃ 완충액(pH 10.0)에 효소액을 가용화한 후 30°C에서 90°C까지 각 온도별로 30분간 반응시킨 후 곧 얼음물에 냉각하고 효소의 잔존활성을 측정하여 상대활성도로 나타냈다.

금속이온 및 저해제의 영향

BaCl₂, CaCl₂, CoCl₂, CuSO₄, FeCl₂, MgSO₄, MnSO₄, NaCl, KCl, Pb(CH₃COO)₂, ZnCl₂ 및 PMSF, EDTA, 2-mercaptoethanol, SDS를 5 mM되게 효소액에 가하고 30°C에서 1시간 incubation한 후 효소활성도를 측정하였다.

SDS-PAGE에 의한 분자량 측정

혈전용해효소의 분리 정도와 분자량을 측정하기 위하여 Laemmli[13]의 방법에 준하여 sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 수행하였고, 이때 stacking gel과 separating gel의 농도는 각각 4%, 12%를 사용하였으며, 표준품은 Sigma사로부터 구입한 pre-staining marker를 사용하였다.

Gel상의 단백질 밴드는 ethanol 및 acetic acid에 녹인 0.125% Coomassie brilliant blue R-250용액으로 염색하였으며 30% methanol 용액으로 탈색하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

탈지 능이버섯 분말을 인산완충용액으로 추출한 조효소액을 (NH₄)₂SO₄ 침전시키고 투석한 후 단백질을 DE52 anion exchange column chromatography로 분리한 결과는 Fig. 1과 같다.

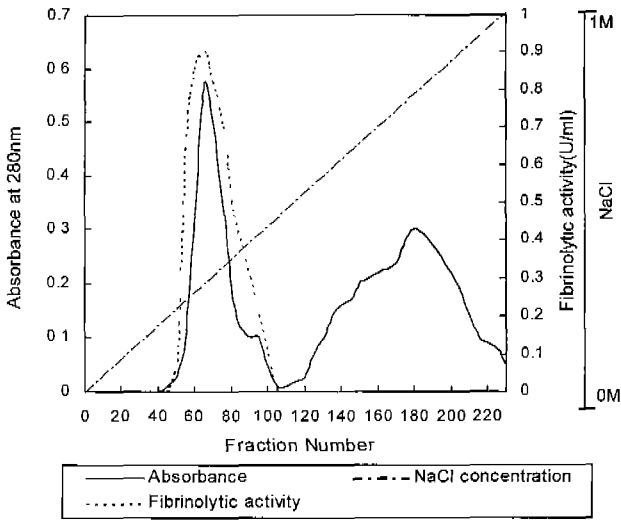


Fig. 1. Chromatogram of DE52 anion exchange column chromatography of saturated fraction from crude extract of *Sarcondon aspratus*.

능이의 혈전용해효소의 활성은 NaCl의 농도가 0.2 M 전후에서 용출 되었으며 단일 peak로 나타나 상당히 높은 정제효과를 나타내었다. 이를 더욱 정제하기 위해 활성획분만을 amicon으로 농축한 후, 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)으로 투석하여 Sephacryl-S 200 gel filtration chromatography를 실시한 결과 Fig. 2와 같은 chromatogram을 얻었다.

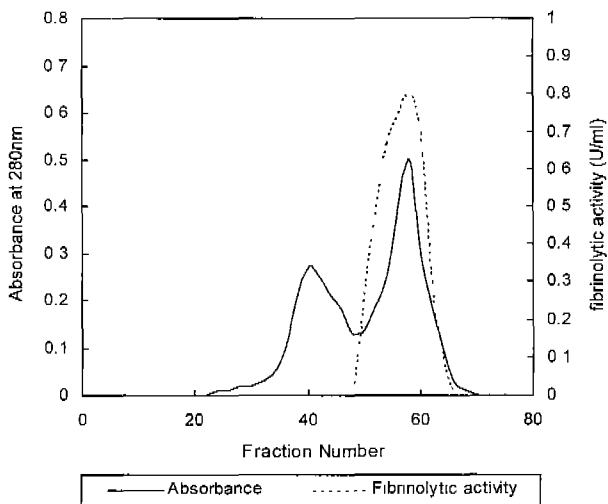


Fig. 2. Sephacryl-S 200 column chromatography of fibrinolytic active fractions of DE 52 anion column chromatography.

혈전용해효소의 활성은 획분번호 50에서 65번 사이에 나타났으나, 효소 단백질이 단일 peak로 분리되지 않았으므로 활성부위만을 amicon으로 농축하고 이를 투석한 후 Mono S cation column chromatography를 실시하여 정제하였으며, 그 결과는 Fig. 3과 같았다. 능이의 혈전용해효소활성은 분획번호 14번부터 17번 사이에서 단일 peak로 나타났으며 활성획분을 모아 투석하여 정제 여부를 전기영동으로 검토해 본 결과는 Fig. 4에서와 같이 단일 band로 나타나 정제되었음을 알 수 있었다.

정제된 효소의 분자량을 측정하기 위하여 12%의 SDS-PAGE 상에 전기영동 하였으며 표준단백질의 이동거리로부터 plotting 한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 29,300 Da 정도로 추정되었다. 이는 이[14]가 능이 protease의 분자량을 30,100 Da으로 은 등[5]이 29,000 Da으로 보고한 것과 유사한 분자량이었다. 본 연구에서 정제한 능이의 혈전용해효소는 29,300 Da의 단일 band로 나타났으며, 양[18]은 청국장으로부터 35,000~45,000 Da의 다양한 분자량의 혈전용해효소를 확인한 바 있으며, 일본의 대표적인 발효식품인 *natto*에서 분리한 nattokinase의 분자량은 28,000 Da인 것으로 보고되었다[7]. 이와 같은 사실은 식품원에 따라 다양한 분자량의 혈전용해효소가 존재하고 있음을 알 수 있다.

능이버섯의 혈전용해효소를 정제한 결과는 정제표로 나타내었다(Table 1). 즉 조효소의 특이활성은 4.9 U/mg

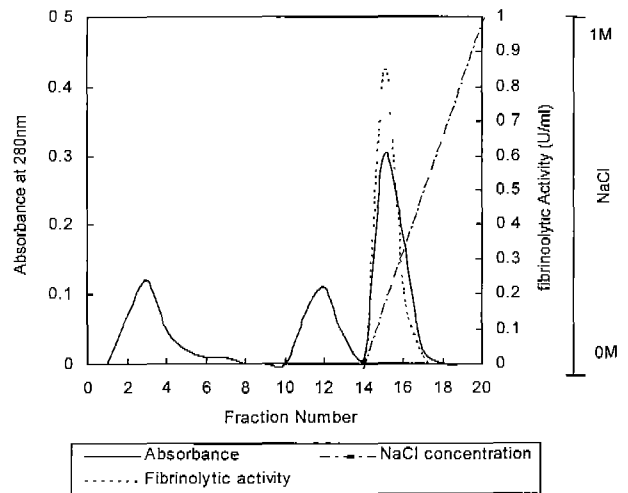


Fig. 3. Mono S cation exchange column chromatography of active fractions from Sephacryl-S 200 gel filtration chromatography.

Table 1. Purification table of the fibrinolytic enzyme from *Sarcodon aspratus*

Step	Purification				
	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity(U/mg)	Yeild (%)	Purity (fold)
Crude extract	841	4125	4.9	100	1
25~70% (NH ₄) ₂ SO ₄	328	3730	11.4	90.4	2.3
DE 52 anion	167	3277	19.6	79.4	4.0
Sephacryl S-200	92	2863	31.1	69.4	6.3
Mono S cation	37	2041	55.2	49.5	11.3

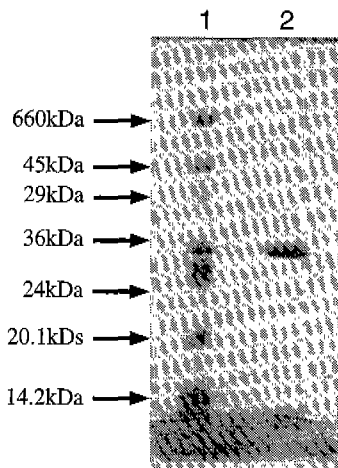


Fig. 4. SDS-PAGE of the purified fibrinolytic enzyme.

Lane 1: Standard proteins (STD); Bovine serum albumin (66,000), Ovoalbumin (45,000), GAP-dehydrogenase (36,000), Carbonic anhydrase (29,000), Trypsinogen (24,000), Trypsin inhibitor (20,100), α -lactalbumin(14,200)
 Lane 2: *Sarcodon aspratus*

protein이었으나 Mono S cation column chromatography에서는 효소의 특이활성이 55.2 U/mg protein으로 조효소액에 비하여 11.26배 증가하였고, 수율은 49.5%로 나타났다. 이러한 결과는 본 효소가 정제배수는 낮으나 정제가 거의 완전히 이루어진 점 등으로 미루어보아 건조버섯 중 효소의 함량이 매우 높을 것으로 사료된다.

효소의 특성

pH 안정성

본 효소의 pH 안정성을 검토해본 결과는 Fig. 6과 같았다. 즉 pH 3과 4사이의 강산성에서는 혈전용해활성이 낮았으나 pH가 높아질수록 혈전용해활성이 증가하기 시작하여 알칼리성 용액에서도 매우 안정된 활성을 보여주었다.

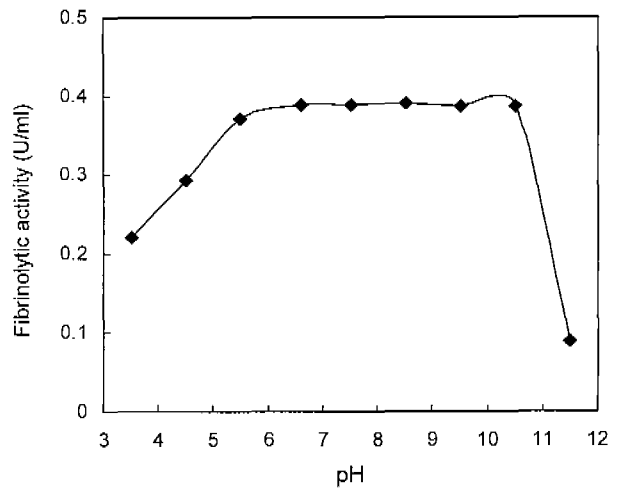


Fig. 5. Effect of pH on the fibrinolytic activity of purified enzyme from *Sarcodon aspratus*.

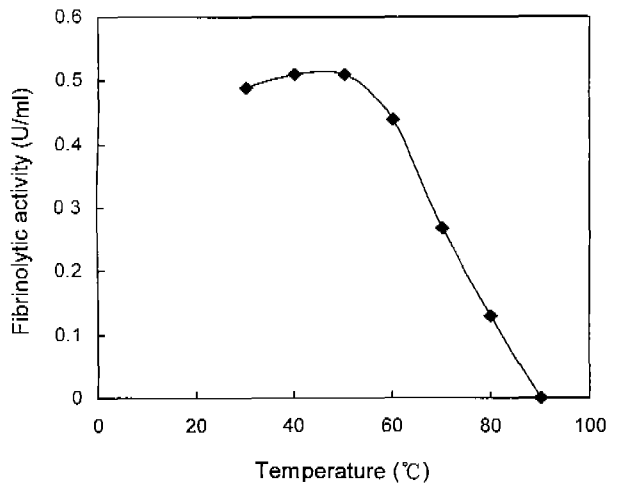


Fig. 6. Effect of temperature on the fibrinolytic activity of the purified enzyme from *Sarcodon aspratus*.

전체적으로 pH 5이상에서는 효소의 활성이 큰 변화가 없음을 보여주었으나 pH 10.5에서 0.396(U/ml)이었는데

요 약

능이버섯(*Sarcodon aspratus*(Berk.) S.Ito)의 fibrin 분해활성물질(효소)을 분리정제하기 위하여 (NH₄)₂SO₄ 침전법, DE52 anion exchange column chromatography, Sephacryl-S200 gel filtration chromatography 및 Mono S cation FPLC를 행하였으며 정제된 효소의 특성을 측정하였다. 혈전용해효소의 활성물질은 DE52 anion exchange column chromatography에서 NaCl의 농도가 0.2 M 정도에서 용출되었으며 계속된 Sephacryl-S200 gel filtration chromatography 및 Mono S cation FPLC를 실시한 결과 단일 peak를 얻었고 혈전용해효소의 특이활성은 55.2 U/mg protein으로 조효소액에 비하여 11.3배 증가하였으며 수율은 49.5%이었다. 또한 Mono S cation FPLC에서 얻은 활성획분을 12% SDS-PAGE로 전기영동한 결과 단일 band를 얻었으며 gel filtration의 결과와 비교함으로써 정제된 능이의 혈전용해효소의 분자량은 29,300 Da인 것으로 확인되었다. 능이로부터 정제한 혈전용해효소는 pH가 높아질수록 효소활성이 증가하였으며 pH 10.5의 알칼리성에서도 안정하였으며 60℃ 이상의 온도에서는 효소활성이 급격히 실패하기 시작하였지만 80℃에서도 25%의 상대활성을 보였다. 또한 본 효소는 Cu²⁺이온 및 Co³⁺이온 등 중금속에 의하여 68% 및 38% 활성이 저해되었으며 Ca²⁺이온 또는 Mg²⁺의 chelator인 EDTA 및 serine protease inhibitor인 PMSF에 의하여 활성이 저해되었었다. 이러한 결과들은 능이의 혈전용해효소가 Ca²⁺ 또는 Mg²⁺에 의하여 활성이 증가하는 serine protease임을 암시해 주고 있다.

참 고 문 헌

1. Astrup, T. and I. Stermdoff. 1956. The plasminogen activator in animal tissue. *ACTA Physiol. Scand.* 36, 250.
2. Astrup, T. and S. Mullertz. 1952. The fibrin plate Method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 40, 346.
3. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

pH 11.5에서는 0.089(U/ml)로 급격히 활성이 실패 하였음을 나타내었고 이는 이[14]의 연구에 의하면 pH 10.8에서 급격히 안정성을 상실하였다고 보고되고 있어 본 효소와 비슷하였다. 대부분 버섯에서 추출한 효소는 산성 또는 중성에 안정하였는데 능이에서 추출한 본효소가 알칼리 안정한 것은 특이할 만한 사실이다.

온도의 안정성

본 효소의 온도 안정성을 알아보기 위해 fibrin을 기질로 하여 각각의 온도에서 30분간 보존한 후, 효소의 활성을 검토한 결과는 Fig. 7과 같다, 혈전용해효소는 60℃ 이후에서 급격히 실패하였지만, 80℃에서도 25%의 상대활성을 보였다. 한편 정[4]은 fibrin 용해균주의 분리에 관한 연구에서 조효소의 열 안정성은 50℃까지 100%의 활성을 유지하다가 60℃에서는 거의 모든 활성을 상실하였다. 따라서 본 정제효소가 fibrin에 대해 높은 온도안정성을 나타낸다 하겠다.

금속이온 및 저해제의 효과

각종 금속이온 및 저해제의 농도를 5 mM되게 첨가하여 효소활성에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 8과 같았다. 혈전용해효소는 Co³⁺ 이온에 의하여 38% 활성이 저해되었으며, Cu²⁺ 이온의 첨가는 68% 활성을 저해하였다. 능이로부터 정제된 혈전용해효소에 대하여 금속이온 chelator인 EDTA와 serine protease inhibitor로 알려진 PMSF가 활성을 크게 저해하였으므로 본 효소는 금속이온을 필요로 하며 serine protease일 것으로 사료된다.

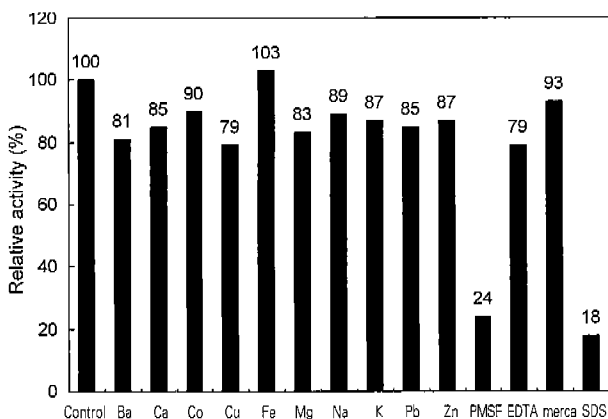


Fig. 7. Effect of metal ions and inhibitors on the fibrinolytic activity of purified from *Sarcodon aspratus*.

4. Chung, Y.-J. 1999. Isolation and characterization of a bacterium with a fibrinolytic activity. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**(1). 103-108.
5. Eun, J.-S., J.-H. Yang, T.-K. Lee and D.-S. Choi. 1989. Studies on higher fungi in Korea(V) : N-terminal amino acid sequence and some properties of proteolytic enzyme from *Sarcodon aspratus*. *Yakhak Hoeji* **33**(6), 339-344.
6. Fletcher, A. P. and A. J. Johnson. 1957. Methods employed for purification of streptokinase. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* **94**, 223.
7. Fujita, M., K. Nomura, K. Hong, Y. Ito, A. Asada and S. Nishimuro. 1993. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 1340-1347.
8. Jeong, Y.-K., W.-S. Yang and B.-K. Kim. 1998. Effect of oral administration of fibrinolytic enzyme from a fermented anchovy, myulchi jeot-gel. *Korean J. Life Science* **8**, 737-740.
9. Jeong, Y.-K., W.-S. Yang, J.-O. Kong, I.-S. Kong and J.-O. Kim. 1995. Fibrinolysis of fermented kimchi. *Korean J. Life Science* **5**, 203-210.
10. Kim, Y.-T., W.-K. Kim and H.-I. Oh. 1995. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from chungkook-jang. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1-5.
11. Kim, S.-H., N.-S. Choi, W.-Y. Lee, J.-W. Lee and D.-H. Kim. 1990. Isolation of *Bacillus* strains secreting fibrinolytic enzymes from Doen-Jang. *Kor. J. Microbiol.* **34**, 87-90.
12. Kim, S.-H. 1998. New trends of studying on potential activities of Doen-jang fibrinolytic activity. *Korea soybean Digest* **15**, 8-15.
13. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680-685.
14. Lee, T.-K. 1986. Purification and some characteristics of the proteolytic enzyme in fruitbody of neungee *Sarcodon aspratus*(Berk.) S. Ito. *Kor. Soc. Food Nutr.* **17**, 276-285.
15. Plug, J. and O. Kjeldgaard. 1957. Urokinase an activator from human urine. I. Isolation and properties. *Biochem. Biophys. ACTA.* **61**, 424.
16. Sumi, H., M. Maruyama, T. Yoneta and H. Mihara. 1983. Activation of plasma fibrinolysis after intrarectal administration of high molecular weight urokinase and its derivative. *Acta Haematol.* **70**, 289-295.
17. Voet, D. and J. G. Voet. 1990. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, New York. **9**, 1087-1095.
18. Yang, J.-L. 2000. Antiatherogenic effect of chongkukjang. *Ph. D. Thesis. Busan National University.*

(Received July 10, 2001; Accepted October 26, 2001)