

## 멸치젓갈유래의 혈전용해효소에 대한 특성

양웅석 · 임학섭<sup>1</sup> · 정경태 · 김영희 · 허만규<sup>2</sup> · 최병태<sup>3</sup> · 최영현<sup>3</sup> · 정영기\*

동의대학교 자연과학대 생명융용학과, <sup>1</sup>(주)천년약속 바이오연구소, <sup>2</sup>분자생물학과, <sup>3</sup>한의학대과

Received March 25, 2005 / Accepted June 1, 2005

**Characterization of a Fibrinolytic Enzyme from Pickled Anchovy.** Woong-Suk Yang, Hak-Seob Lim<sup>1</sup>, Kyung Tae Chung, Young-Hee Kim, Man Kyu Huh<sup>2</sup>, Byung Tae Choi<sup>3</sup>, Yung Hyun Choi<sup>3</sup> and Yong Kee Jeong\*. Department of Life Science and Biotechnology, Dongeui University, Busan 614-714, <sup>1</sup>Institute of BIO, MILLENNIUM PROMISE CO., LTD., Gijang-gun, Busan 619-962, Korea, <sup>2</sup>Molecular Biology, <sup>3</sup>Dongeui University, Busan 614-714, College of Oriental Medicine, Dongeui University, Busan 614-052, Korea – In the previous study, we isolated a myulchikinase (MK), which has fibrinolytic activity and cytotoxicity to the tumor cell line, from myl-chi-jeot-gal. In this study, the effect of NaCl concentration, metallic ions, pH, temperature, and plasminogen on the activity of MK was analysed. The MK activity was maintained at least 80% activity up to 30% NaCl, which indicates that the enzyme may be halotolerant. The optimal pH and temperature were 8 and 40°C, respectively. The fibrinolytic activity of MK was completely inhibited with 0.5 mM Hg<sup>2+</sup> and inhibited to 50% with 1 mM Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>. The MK showed strong activity in plasminogen-rich fibrin plate but not in plasminogen-free fibrin plate. The result indicates that the MK may be a plasminogen activator type fibrinolytic enzyme.

**Key words** – Fibrinolytic enzyme, Myulchikinase (MK), Fibrin plate, Plasminogen activator

지혈은 혈관 내피세포, 혈소판, 그리고 혈전 형성조절에 관여하는 혈장요소들의 합작으로 복잡한 경로로 진행된다 [18]. 상처 혹은 혈전 형성 자극이 유발되면 혈관내피 세포의 변화로 지혈에 관여하는 세포내 단백질들의 분비 및 혈소판 세포 표면의 특성이 변하여 혈전형성 환경이 조성된다. 혈소판 부착 및 활성화, 동시에 혈장응고 활성이 트롬빈 형성을 촉진하여 피브리노겐이 축적된다. 혈관내의 피브리노겐 축적은 일반적으로 혈전을 증가시켜 혈액의 흐름을 방해하거나 혈관을 따라 이동하면서 뇌경색, 심근경색과 같은 질병을 유발한다. 이때 형성된 혈전은 상처회복 후 프라즈민(plasmin)과 같은 혈전분해 효소(fibrinolytic enzyme)에 의해서 분해된다[10]. 만약 생성된 혈전이 과도하게 축적되거나 혈전용해 기작이 원활하게 작동하지 않을 경우 혈전증(thrombosis)을 유발하여 인체에 치명적인 손상을 줄 수도 있다. 따라서 혈전분해 시스템은 혈관기능 유지 및 혈관외벽의 피브리노겐 축적의 분해에 있어서 필수적이다. 또한 병리학적 상태에서 다수의 다른 단백질 분해 효소들과 협력하여 세포외 기질들의 분해에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 프라즈민은 혈전분해 시스템에서 피브리노겐 분해의 핵심 단백질 분해제이다.

현재 사용되고 있는 혈전분해제로는 urokinase (UK)[17, 15, 11, 19], streptokinase (SK)[9], tissue type plasminogen activator (tPA)[1]등이 있다. 하지만 이와 같은 제품은 반감기가 짧고, 가격이 매우 비싼 단점을 지니고 있다. 또한 urokinase를 제외하고는 경구투여가 불가능한 실정이다. 한

편 한국과 일본을 중심으로 한 발효식품에서의 혈전분해효소의 연구는 직접섭취가 가능한 식품을 대상으로 한다는 점에서 주목할 만하다[3, 13, 14, 16]. 일본의 전통대두 발효식품인 natto (nattokinase)와 절임 식품인 Shiokara (katsuwo kinase)에서 혈전용해 효소 생산균주를 분리하고 효소를 정제 하였으며, 이의 경구 투여시 생체내의 혈전 용해능을 높일 수 있다고 보고 하였다[13, 14, 16].

이전 연구에서 본 연구진은 한국인이 오랫동안 먹어오고 있는 식품인 멸치 젓갈에서 분리된 혈전용해효소가 암세포에 세포독성이 있음을 보고하였다[5]. 본 연구에서는 이 혈전용해 효소의 활성에 영향을 미치는 요인들에 대해서 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 혈전용해 활성의 측정(fibrin plate assay)

Haverkate-Trass의 fibrin plate법[2]에 따라 2% gelatin 용액에 녹인 0.2% fibrinogen 용액 10 ml에 0.2 M borate 완충 용액(pH 7.8)에 녹인 thrombin 20 unit를 적하하여 잘 섞은 후 이를 petri-dish에 부어 fibrin막을 만들었다. 효소용액을 100 µl씩 paper disc에 흡입시켜 plate에 놓고 37°C에서 18시간 방치 하였다. 효소에 의해 fibrin막이 용해되면 용해면적을 측정하여 상대적인 활성을 측정하였다. Fibrin plate는 plasminogen이 제거된 fibrinogen과 plasminogen이 포함된 fibrinogen을 이용하여 두 가지 방법으로 준비하였다.

### 분자량 측정

분리된 단백질의 분자량은 전기영동을 실시하여 결정 하였

### \*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1534, Fax : +82-51-894-0840

E-mail : ykjeong@deu.ac.kr

으며 전기영동은 4% stacking gel 과 12.5% separating gel로 이루어진 SDS-PAGE[8]를 사용하여 100V에서 2시간동안 전기영동한 후 gel을 coomassie로 염색하였다. 분자량 측정을 위해 low molecular weight standard (Bio-rad)를 사용하였다.

**NaCl이 효소활성에 미치는 영향**

정제된 효소액을 멸균 증류수에서 2일간 투석하여 염을 제거한 후 효소액에 NaCl 농도가 0~30%까지 되게 하였다. 각각의 농도에 따른 fibrin plate상에서 100 μl 씩 paper disc에 점적하여, 5시간 반응시켜 NaCl이 효소활성에 미치는 영향을 측정하였다.

**pH에 따른 영향**

효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위해 농축한 효소를 20 mM sodium citrate buffer (pH 3.0, 4.0, 5.0), 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0, 7.0), 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 20 mM sodium carbonate buffer (pH9.0, 10.0)로 녹여 pH 별로 조정 한 다음, 4℃에서 24시간 방치한 후 잔존활성을 측정 하였고, 최적 반응 pH는 각 pH별로 조정된 효소액을 사용하여 효소활성의 pH 의존성을 검토 하였다.

**온도에 따른 영향**

효소의 최적반응 온도를 결정하기 위해 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 녹인 효소를 점적한 fibrin plate (pH 7.8)를 각 20℃에서 80℃ 범위의 배양기에 넣고 4시간 후 plate의 용해면적을 측정하여 효소의 활성을 비교하였다. 온도의 안정성은 효소액을 20℃~80℃까지 각각 30분간 열처리 한 후 효소를 점적한 fibrin plate (pH 7.8)를 37℃에서 4시간동안 방치한 후 잔존 활성을 측정하였다.

**효소활성에 미치는 금속 2가 이온의 영향**

정제한 효소의 활성에 대한 금속 이온의 영향을 알아보기 위하여 CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, EDTA를 각각 1 mM이 되도록 20 mM Tris-HCl buffer (pH7.5)에 첨가한 뒤, 같은 부피의 혈전용해 효소용액과 섞은 후 fibrin plate에 점적하고 37℃에서 8시간 배양 후 용해된 면적을 측정하여 활성을 비교하였다.

**결과 및 고찰**

**분자량 측정**

MK는 ammonium sulfate (80%) 침전, 투석, 그리고 DEAE Sephadex A-50 chromatography를 이용하여 정제하였다. 이 정제된 효소를 SDS-PAGE 전기영동 결과 단일 band를 확인 할 수 있었으며, 그 분자량은 약 28 kDa 였다(Fig. 1). 이 효소의 분자량은 지금까지 알려진 청국장[7], 팥나무 버섯[12], *Bacillus* spp.[4,6]로부터 분리된 혈전용해 효소와 비슷한 크기였다.

**정제된 효소의 활성에 대한 NaCl의 영향**

MK는 NaCl이 없는 상태에서 최고활성을 보였다. NaCl이 없는 상태에서 정제된 효소의 활성을 100%로 보았을 때, NaCl의 농도가 5% 에서는 약 15%정도 활성이 억제되었고, 30%까지는 그 활성이 약 85%정도로 유지될 정도로 NaCl에 대한 저항성이 아주 높았다(Fig. 2).

**정제된 효소 활성에 대한 pH의 영향**

MK는 Fig. 3에서와 같이 pH 3~8범위에서 혈전분해 활성은 지속적으로 증가되어 pH 8에서 최고점에 도달하였다가 그 이후 약간 감소하여 pH 10에서 최고점대비 약 80%를 유지하였다. pH 8에서의 활성을 100%로 하였을 때, pH 3에서 40%가 유지되었다. 예상과 같이 본 정제효소의 활성은 산성

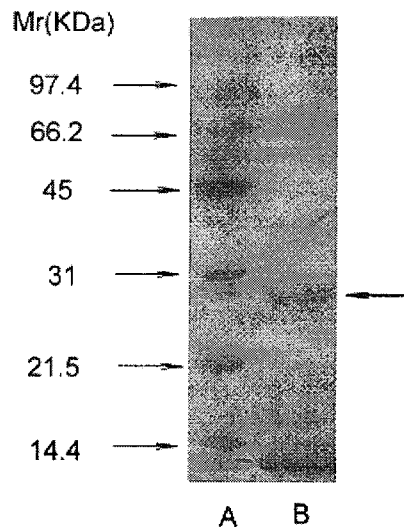


Fig. 1. Molecular weight of purified fibrinolytic enzyme on SDS-PAGE. A; low molecular weight marker protein, B; arrow indicates a purified fibrinolytic enzyme.

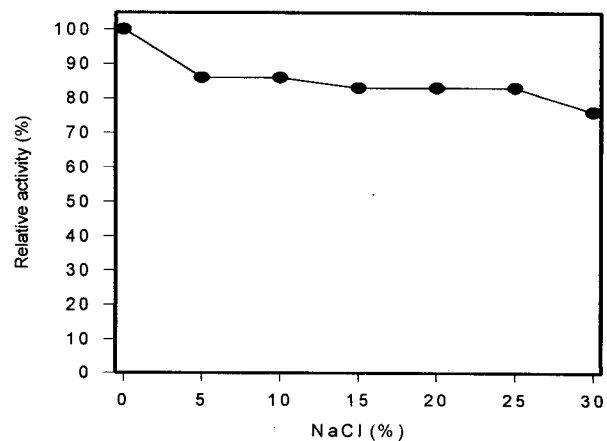


Fig. 2. Effect of NaCl concentration on the activity of purified fibrinolytic enzyme.

상태에서 보다 약알칼리 상태에서 더 높게 유지되었다. 본 정제효소의 안정성은 활성과 유사했으며, 강산성(pH 3) 조건에서도 65%의 활성을 유지할 만큼 비교적 안정하였다.

결론적으로 MK의 최적 활성 및 안정성을 나타내는 pH는 8로 나타났다(Fig. 3).

**온도의 영향**

MK는 20℃에서 40℃ 사이에서 안정하였으며, 40℃에서 50℃ 범위에서는 그 안정성이 완만한 감소를 보이다가 50℃ 이상부터는 급격한 불안정성을 보였다. 70℃에서는 약 33%로 수준으로 감소되었다(Fig. 4). MK의 최적반응 온도는 40℃였다.

**효소활성에 대한 금속 2가 이온 영향**

금속 이온이 첨가되지 않았을 때의 활성을 100%로 하여 그 상대적인 활성을 측정하였을 때 1mM의 Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>에 의해서는 15~29% 감소되었으며, 같은 농도의 Cu<sup>2+</sup>와 Zn<sup>2+</sup>에 의해서는 약 43%의 활성저해를 보였고, Hg<sup>2+</sup>에 의

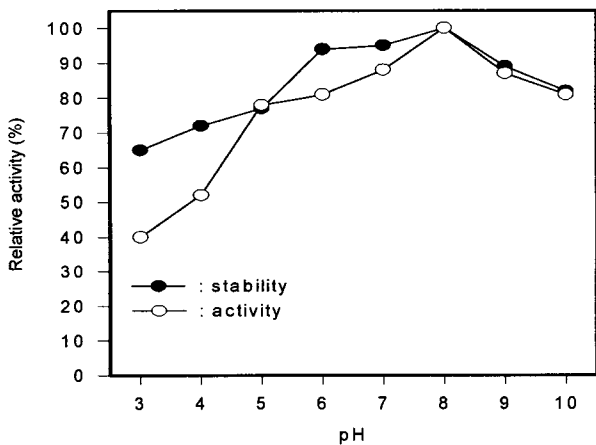


Fig. 3. Effect of pH on the stability and activity of the purified fibrinolytic enzyme.

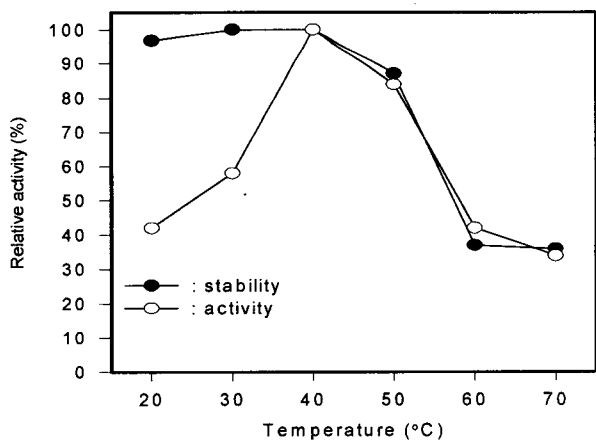


Fig. 4. Effect of temperature on the stability and activity of the purified fibrinolytic enzyme.

해서는 완전히 실활 되었다(Table 1). 그리고 EDTA를 첨가 하였을 때 그 활성이 거의 변화가 없는 것으로 보아 본 MK는 metalloprotease 계열이 아닌 것으로 생각된다.

**기질의 특이성**

혈전용해효소는 fibrin을 분해하는 양상에 따라 2가지로 나눌 수 있다. 그 중 하나는 혈액 중 plasminogen을 active type인 plasmin으로 변화시켜 plasmin으로 하여금 혈전(fibrin)을 분해하도록 하는 plasminogen activator type과 이와 상관없이 효소자체가 직접 혈전을 분해 시키는 direct active type이 있다. 이를 확인하기 위하여 plasminogen-rich fibrin plate와 plasminogen-free fibrin plate를 사용하였다. 그 결과 본 정제효소는 plasminogen-rich fibrin plate에서는 fibrin 분해능이 있었지만 plasminogen이 제거된 plasminogen-free fibrin plate에서는 활성이 나타나지 않았다. 그러므로 본 효소는 plasminogen을 plasmin으로 activation하여 plasmin에 의하여 혈전(fibrin)을 분해 하도록 하는 plasminogen activator type으로 분류되어질 수 있다(Fig. 5).

다양한 종류의 기질을 이용한 효소활성을 검토한 결과, Fig. 6에 나타난 것과 같이 본 정제 효소는 fibrin 및 gelatin

Table 1. Effect of various metal ions and EDTA on the activity of fibrinolytic enzyme from salted anchovy.

Metal ions	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control	0	100
EDTA	0.1	92
	0.5	87
	1.0	85
Ca <sup>2+</sup>	0.1	90
	0.5	84
	1.0	77
Mg <sup>2+</sup>	0.1	92
	0.5	85
	1.0	85
Cu <sup>2+</sup>	0.1	92
	0.5	70
	1.0	57
Zn <sup>2+</sup>	0.1	90
	0.5	68
	1.0	57
Co <sup>2+</sup>	0.1	87
	0.5	87
	1.0	77
Mn <sup>2+</sup>	0.1	90
	0.5	84
	1.0	71
Hg <sup>2+</sup>	0.1	78
	0.5	0
	1.0	0

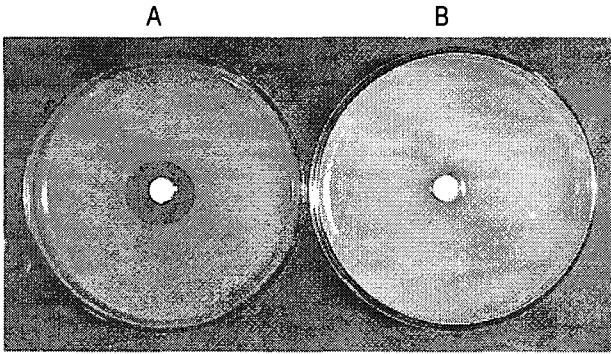


Fig. 5. Comparison of the fibrinolytic enzyme activity on the plasminogen-rich fibrin plate (A) and plasminogen-free fibrin plate (B).

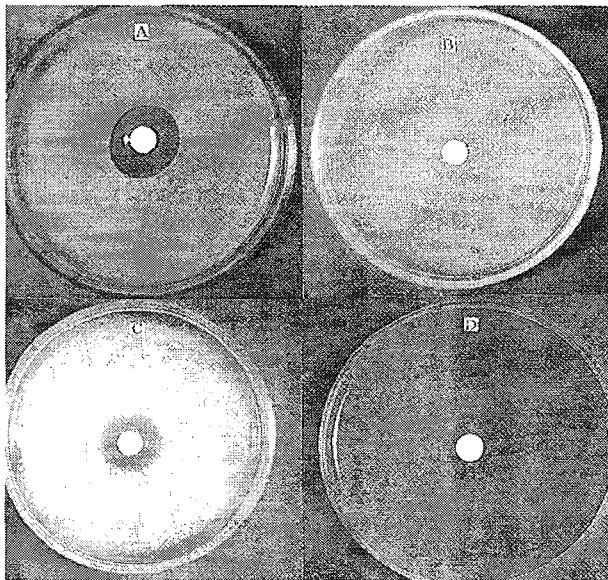


Fig. 6. The fibrinolytic enzyme activities toward various substrates. A; fibrin plate, B; skimmilk plate, C; gelatin plate, D; red blood agar plate.

plate에 대해서는 fibrin plate의 분해능을 100%로 보았을 때, 각각 100%, 30%의 분해활성을 가졌다. 하지만 skimmilk, casein, blood cell plate에서는 전혀 활성을 보이지 않았다. MK는 Fig. 6에 나타난 것처럼 fibrin을 특이적으로 분해됨이 밝혀졌다.

**요 약**

멸치액젓을 이용하여 ammonium sulfate 침전, ion exchange, gel filtration, ethanol 침전 등의 과정을 거쳐 혈전분해 효소 (myulchikinase, MK)를 분리 및 정제하였다. 이 정제된 효소를 SDS-PAGE gel 전기영동한 결과 분자량은 약 28 kDa 이었다. MK의 활성에 대한 특성을 조사한 결과 NaCl 30%까지

활성이 80% 이상 유지되는 것으로 보아 내염성 효소로 판단된다. 온도에 대한 효소활성을 조사한 결과, MK의 온도에 대한 안정성은 40℃까지는 안정하였으나 50℃ 이상의 온도에서는 급격하게 활성 떨어졌고, 최적온도는 40℃였다. MK의 활성은 pH 6~9범위에서 매우 안정하였고, 최적 pH는 8이었다. 또한 2가 금속 양이온에 대한 효과는 Hg<sup>2+</sup> (1mM)에 의하여 완전히 활성저해를 보였고, Zn<sup>2+</sup> (1mM)에 의하여 약 50%의 저해되는 것을 알았다. Fibrinogen-rich plate와 Fibrinogen-free plate에서 활성을 측정 한 결과, Fibrinogen-rich plate에서는 fibrin 분해능이 있었지만 Fibrinogen-free plate에서는 분해활성이 없는 것으로 보아 본 효소는 plasminogen activator type의 혈전용해효소로 사료된다.

**감사의 글**

본 연구는 2004학년도 동의대학교 학술지원연구비 지원에 의하여 이루어졌기에 이에 감사드립니다.

**참 고 문 헌**

- Collen, D. and H. R. Lijnen. 1991. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78, 3114-3124.
- Haverkate, F. and D. W. Traas. 1974. Dose-response curves in the fibrin plate assay. Fibrinolytic activity of protease. *Thromb. Haemostas.* 32, 356-365.
- Jeong, Y. K., W. S. Yang, J. O. Kang, I. S. Kong and J. O. Kim. 1995. Fibrinolysis of fermented Kimchi. *J. Life Science* 5, 203-207
- Jeong, Y. K., J. U. Park, H. Baek, S. H. Park, I. S. Kong, D. W. Kim and W. H. Joo, 2001. Purification and biochemical characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* BK-17. *J. Microbiol. & Biotechnol.* 17, 89-92.
- Jeong, Y. K., W. S. Yang, K. H. Kim, K. T. Chung, W. H. Joo, J. H. Kim, D. E. Kim and J. U. Park. 2004. Purification of a fibrinolytic enzyme (mulchikinase) from pickled anchovy and its cytotoxicity to the tumor cell lines. *Biotechnol. Lett.* 26, 393-397.
- Kim, H. H., G. T. Kim, D. K. Kim, W. A. Choi, S. H. Park, Y. K. Jeong and Kong, I. S. 1997. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus sp.* KA38 originated from fermented fish. *J. Ferment. and Bioeng.* 84, 307-312.
- Kim, W. K., K. H. Choi, Y. T. Kim, H. H. Park, J. Y. Lee, Y. S. Choi, H. I. Oh, I. B. Kwon and S. Y. Lee 1996. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus sp.* strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2482-2488.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227, 680-685.
- Reed, G. L., F. F. Lin, B. Parhaml-Seren and P. Kussie. 1995. Identification of plasminogen binding region in strepto-

- kinase that is necessary for the creation of streptokinase plasminogen activator complex. *Biochemistry* **34**, 10266-10271.
10. Samis, J. A., G. D. Ramsey, J. B. Walker, M. E. Nesheim and A. R. Giles. 2000. Proteolytic processing of human coagulation factor IX by plasmin. *Blood* **95**, 943-951.
  11. Sasaki, K., S. Moriyama, Y. Tanaka, H. Sumi, N. Toki and K. C. Robbins. 1985. The transport of <sup>125</sup>I-labeled human high molecular weight urokinase across the intestinal tract in a dog model with stimulation of synthesis and/or release of plasminogen activators. *Blood* **66**, 69-75.
  12. Shin, H. H. and H. S. Choi. 1998. Purification and partial characterization of a metalloprotease in *Flammulina velutipes*. *J. Microbiol.* **36**, 20-25.
  13. Sumi, H., H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara and H. Muraki. 1987. A novel fibrinolytic enzyme (NK) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia* **43**, 1110-1111.
  14. Sumi, H., H. Hamada, K. Nakanishi and H. Hiratani. 1990. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of NK. *Acta. Haematol.* **84**, 139-143.
  15. 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.
  16. Sumi, H., N. Nakajima and C. Yatagai. 1995. A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack Shiokara, a Japanese traditional fermented food. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **112**, 543-547.
  17. Sumi, H., N. Toki, K. Sasaki and K. C. Robbins. 1980. Oral administration of urokinase. *Thromb. Res.* **20**, 711-714.
  18. Susan, S. 2000. Risk factors for thromboembolism: pathophysiology and detection. *CMAJ.* **163**, 991-994.
  19. Toki, N., H. Sumi, K. Sasaki, I. Boreisha and K. C. Robbins. 1985. Trans-transport of urokinase across the intestinal tract of normal human subjects with stimulation of synthesis and/or release of urokinase-type proteins. *J. Clin. Invest.* **75**, 1212-1222.