

## Characterization of a Fibrinolytic Serine Protease from a Wild Mushroom, *Lepista nuda*

Jun-Ho Kim<sup>†</sup>

Department of Chemistry, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

Fibrinolytic enzyme was purified from the fruiting bodies of *Lepista nuda*, using DEAE-Cellulose chromatography, Phenyl Sepharose chromatography, and Mono-S column chromatography. The substance has a molecular weight of 30006.62 Da as measured by MALD-TOF mass spectrometry. The N-terminal amino acid sequence of the enzyme was Tyr-Pro-Ser-Pro-Ser-His-Gln-Thr-Ala-Val-Asn-Ala-Ile-Ile-X. The activity of the enzyme was inhibited by PMSF, indicating that the enzyme is a serine protease. No inhibition was found with E-64, pepstatin, and EDTA. It has broad substrate specificity for synthetic peptides. The enzyme was stable up to 30°C. The enzyme hydrolyzes both A $\alpha$  and  $\gamma$  chains of human fibrinogen but did not show any reactivity for B $\beta$  chain of human fibrinogen.

**Key Words:** Fibrin plate assay, Fibrinolytic enzyme, *Lepista nuda*

### 서 론

혈전은 혈관 내 상처 복구 시 지혈과정에서 트롬빈에 의해 섬유소원으로부터 생긴 섬유소와 혈소판의 응집체로 형성된다. 정상적인 경우 내피세포로부터 생긴 플라즈미노겐 활성화제 (plasminogen activator)의 작용에 의해 plasminogen 으로부터 생긴 plasmin에 의해 형성된 혈전이 용해되어 혈관 내에 응고체와 용해체가 평형을 이룬다. 그러나 지혈과정에서 혈액응고가 과도하게 진행되어 생긴 혈전은 plasmin에 의해 완전한 용해가 일어나지 않아, 이 작은 혈전들이 혈관을 따라 흐르며 뇌혈전증, 뇌졸중, 심장 마비 등과 같은 심각한 혈관계 질환을 유발한다. 혈전용해효소에는 혈전에 직접 작용하여 용해시키는 plasmin (Eisele and Mihalyi, 1975) 유사 단백질분해효소들이 있는데 이러한 효소들을 주입 시에는 무제한적인 단백질분해효과로 혈전외에 혈전생성인자들까지 파괴하여 출혈을 일으킬 수 있어 거의 사용하지 않고, 인체의 혈전분해를 촉진시키는 효소인 urokinase (Blasiak et al., 1999), streptokinase (Nakashima et al., 1990), tissue-type plasminogen activator (Akassoglou et al., 2000) 등이 일반적인 치료제로 사용되고 있는데, 이들은 플라즈미노겐 활성화제 (plasminogen activator)로 작용하여 플라즈민 (plasmin)을 만

드는데 관여할 뿐 아니라 혈소판 응집을 강하게 억제하는 작용도 한다 (Choi, 1992). 그러나 이 혈전용해제들은 활성은 크지만 섬유소 (fibrin)에 대한 선택성이 작아 장기간 복용 시 용혈현상과 면역반응이 나타나고, urokinase를 제외하고는 경구 투여를 할 수 없으며, 또한 가격이 매우 높은 단점이 있다. 이런 문제점을 해결하기 위하여 혈전에 대한 선택성이 크고 섬유소용해 활성이 높은 새로운 혈전용해물질에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 최근에는 발효식품과 식용 가능한 식품 재료로부터 이와 같은 혈전용해물질을 찾으려는 연구가 이루어지고 있다. 발효식품인 청국장 (Kim et al., 1995), 된장 (Kim, 1998), 젓갈 (Kim et al., 1997)로부터 혈전용해물질을 만들어내는 균주를 분리하고 그들이 생산한 혈전용해효소의 분리 정제에 관한 보고가 있었다. 또한 식품 재료로 사용되고 있는 버섯인 *Flammulina velutipes*에 혈전을 분해하는 효소가 있다는 Gavrilova 등의 보고 (Gavrilova and Falina, 1975) 이후 여러 종의 버섯으로부터 혈전용해효소의 분리 정제에 관한 보고도 있었다 (Shin and Choi, 1998; Kim and Kim, 1999; Kim and Kim, 2001; Kim, 2002). 옛날부터 식용과 더불어 약용으로도 사용되어 왔던 버섯에는 항균성물질 (Park et al., 1995), 항암물질 (Kim et al., 1983), 면역증진물질 (Kino et al., 1989) 뿐 아니라 여러 종류의 생리활성물질도 함유하고 있는 것으로 알려져 있어, 의학적인 목적으로 사용하기 위한 실험도 많이 이루어지고 있다.

버섯을 이용한 식품은 장기간 복용하여도 부작용이 거의 없고 (Ahn, 1992), 유효성분이 미량이라도 식품으로 자주 이용 시 큰 영향을 줄 수 있을 뿐 아니라 버섯의 균사체로부터 원하는 물질을 대량 생산 할 수 있는 장점이 있다. 따라서

\*논문 접수: 2006년 7월 25일

수정재접수: 2006년 8월 29일

<sup>†</sup>교신저자: 김준호, (우) 220-702 강원도 원주시 우산동 660번지, 상지대학교 이공과대학 화학과

Tel: 033-730-0423, Fax: 033-730-0403

e-mail: jhokim@sangji.ac.kr

많은 생리활성물질과 더불어 선택성이 좋은 혈전용해물질을 함유한 버섯은 새로운 혈전용해제 개발의 재료뿐 아니라 기능성 식품을 개발하는데도 좋은 재료로 사용할 수 있을 것이다. 따라서 본 실험실에서는 좀더 혈전용해활성이 좋고 혈전에 대한 선택성이 좋은 버섯 종을 찾기 위해 치약산 (Kim et al., 1998)과 칠갑산 (Kim et al., 2005)에 자생하는 야생버섯들로부터 fibrin 분해활성을 검색하고 발표한 바 있다. 그 중에서 식용 가능하고 혈전용해활성이 큰 민자주방망이버섯을 확인하고 이 버섯으로부터 혈전용해효소를 분리 정제한 후 생화학적 특성을 연구하고자 한다. 민자주방망이버섯은 우리나라를 포함한 북반구 일대와 호주 등에 분포하며 늦가을부터 초겨울에 걸쳐 정원, 잡목림, 혼합림, 내 땅위에 단생 또는 군생하는 낙엽 분해성과 외생 균근성 버섯으로 균류를 형성한다. 또한 이 버섯은 맛과 향이 뛰어난 송이과 버섯으로 구미나 중국 등지에서 식용으로 널리 이용되고 있으며, 항종양작용도 높은 것으로 알려져 있다 (Park and Lee, 1999).

## 재료 및 방법

### 1. 재료

본 실험에 사용한 민자주방망이버섯은 2004년 9월 오대산에서 채집한 버섯 자실체를 분류동정 후 시료로 사용하였다. 시약으로 사용한 fibrinogen, plasmin (P 4895, 3 units), plasminogen, thrombin, bovine serum albumin, agarose, glycine, Sephadex G-150와, protease inhibitor는 Sigma (St. Louis, Missouri 63178; USA) 제품을, DEAE-cellulose는 Whatman (Maidstone; England) 제품을, LMW Electrophoresis calibration Kit는 Pharmacia (Little Chalfont Buckinghamshire; England) 제품을 사용하였다.

### 2. 혈전용해효소의 정제

모든 정제과정은 4°C에서 수행하였다. 채집한 버섯 자실체 약 70 g을 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0)에 넣고 잘게 부수고 12,000 rpm에서 1시간 원심분리 하여 얻은 상등액을 같은 완충용액으로 평형된 DEAE-cellulose column (20×200 mm)에 흘려 보내고 완충용액 200 ml로 씻어 준 후 0.0~0.5 M NaCl의 농도 기울기로 용출 시켰다.

혈전용해활성 부분을 모아 1.4 M ammonium sulfate가 포함된 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충용액으로 포화된 Phenyl Sepharose column (HiTrap Phenyl FF: 1 ml)에 흘려 보낸 후 1.4 M~0.0 M ammonium sulfate의 농도 기울기로 흘려준다. 활성분획을 다시 모아 20 mM sodium phosphate 완충액 (pH 6.0)에 투석시킨 후 동일한 완충용액으로 미리 평형 시킨 fast protein liquid chromatography (FPLC)의 Mono S column (5.0×100 mm)에 주입하였다. 완충용액 3 ml로 씻어 준 후

0.0~0.1 M NaCl 농도 기울기로 용출 시켰다. 각 분획의 효소 활성을 측정 후 활성이 큰 부분을 모아 실험에 사용하였다.

### 3. 단백질의 정량

효소의 단백질은 Lowry 등 (Lowry et al., 1951)의 방법에 의하여 bovine serum albumin을 사용한 표준곡선에 의해 정량하였다.

### 4. 혈전용해활성의 측정 (Fibrin plate assay)

Haverkate-Trass의 fibrin plate법 (Haverkate and Traas, 1974)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. 효소용액을 20 µl씩 fibrin plate 위에 점적한 후 36°C에서 8시간 동안 방치하였다. 효소에 의해 fibrin막이 용해되면 용해면적을 측정하여 상대적인 활성을 측정하였다. 표준대조구로는 plasmin을 사용하였다. Plasmin을 연속적으로 희석하여 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/MS (Voyager-DE STR, Perseptive Biosystems)을 이용하여 결정하였으며, gel은 coomassie blue R-250과 silver staining kit (Pharmacia Little Chalfont Buckinghamshire; England)로 염색하였다. MALDI-TOF/MS에 의한 분자량 측정은 기초과학 지원연구소(서울)에서 수행하였다.

### 6. N-terminal amino acid analysis

분리된 효소의 아미노산 서열은 기초과학 지원연구소(서울)의 precise protein sequencing system (Applied Biosystems Model Procise-491)을 사용하여 결정하였다.

### 7. 열 안정성 조사

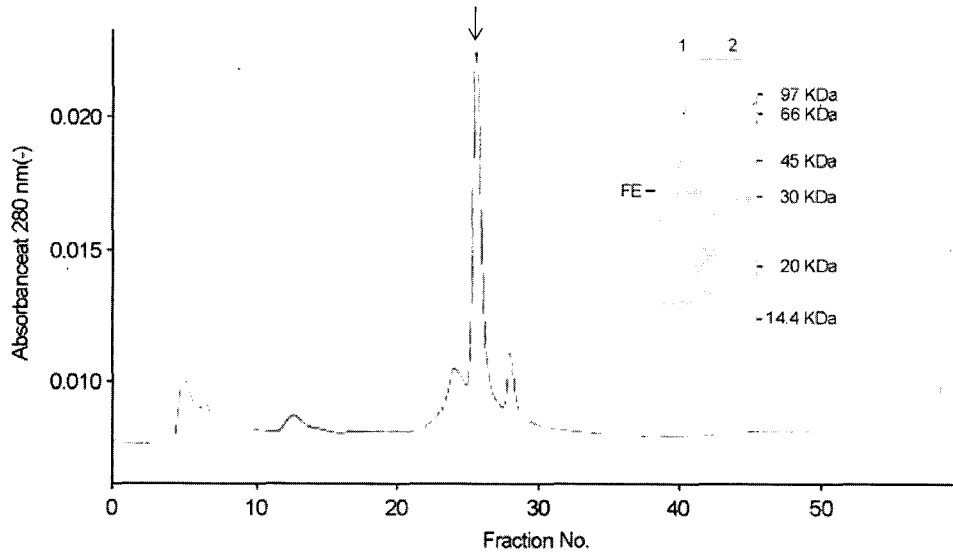
20°C부터 80°C까지 각각 1시간 동안 열처리한 후 이 시료들을 점적한 fibrin plate를 36°C의 온도로 유지된 oven에 8시간 동안 방치한 후 용해된 면적을 측정하고 가장 넓게 용해된 경우를 100%로 하고 이에 대한 상대적인 넓이의 비를 %로 나타낸다.

### 8. 기질 선택성 조사

정제된 효소의 기질에 대한 선택성을 조사하기 위해 합성

**Table 1.** Purification of fibrinolytic enzyme from *Lepista nuda*

| Purification step | Total protein (mg) | Total activity (U) | Specific activity (U/mg protein) | Recovery (%) | Purification fold |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------------------------|--------------|-------------------|
| Extract           | 22285.6            | 2304               | 0.103                            | 100          | 1                 |
| DEAE-cellulose    | 96                 | 253                | 2.635                            | 10.98        | 25.58             |
| Phenyl Sepharose  | 9.54               | 142                | 14.88                            | 6.16         | 144.46            |
| Mono S (FPLC)     | 3.45               | 78.6               | 22.78                            | 3.41         | 221.16            |



**Fig. 1.** FPLC and electrophoregram of the purified enzyme. Lane 1. purified enzyme, lane 2. molecular mass marker.

된 p-nitroaniline를 포함하는 펩티드 기질들을 사용하였다. 3 mM 기질용액 50  $\mu$ l에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 925  $\mu$ l와 효소 25  $\mu$ l를 넣고 섞은 후 405 nM에서 흡광도 변화를 측정한다. 사용한 기질로는 D-Phe-Pip-Arg pNA, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe pNA, Phe-Ala pNA, Ala pNA, Lys pNA, Pro pNA, Gly pNA, Glu pNA, Leu pNA 등이 있다.

#### 9. 효소활성에 미치는 효소저해제의 영향

정제된 효소의 활성에 효소저해제의 영향을 알아보기 위하여 2 mM의 EDTA, 1,10-phenanthroline과 단백질 분해효소 저해제인 PMSF, E-64과 0.4 mM의 Pepstain A을 같은 부피의 혈전용해효소 용액과 섞은 후 fibrin plate에 점적하고 36°C incubator에서 8시간 동안 방치한 후 용해된 면적을 측정하여 활성을 비교하였다.

#### 10. 혈전용해활성에 미치는 염의 영향

분리된 효소에 각각 0.5, 1, 2, 3%의 NaCl을 첨가 후 fibrin plate에 점적하고 36°C incubator에서 8시간 동안 방치한 후 용해된 면적을 측정하여 활성을 비교하였다.

#### 11. 혈전용해효소에 의한 섬유소원의 분해 양상

분리된 효소 (1.3  $\mu$ g/ml)와 섬유소원 (2 mg/ml)를 36°C에서 반응시키면서 일정한 시간 간격을 두고 반응액 일부를 취하여 전기영동을 행하여 섬유소원의 분해과정을 분석하였다.

## 결 과

#### 1. 혈전용해효소의 정제

3단계를 거쳐 민자주방망이버섯으로부터 혈전용해효소를 분리 정제하였다 (Table 1). 활성을 갖는 대부분의 효소는 DEAE-cellulose관에 붙지 않고 흘러 나왔다. 이 활성 부분을 모아 Phenyl Sepharose관을 이용하여 분리한 결과 ammonium sulfate의 낮은 농도에서 활성 부분이 나타났다. 이를 다시 FPLC의 Mono S column을 이용하여 분리한 활성분획은 SDS-PAGE 위에서 분자량 34 kDa의 단일 band로 나타났다 (Fig. 1). 그러나 MALDI-TOF/MS를 이용한 결과 최종 분자량은 30,006.62 Da이었기 때문에 (Fig. 2) 이 효소는 단량체로 이루어진 것을 알 수 있었다. 최종 단계에서 분리된 효소의 비활성은 22.78 U/mg이었으며 이 효소는 plasminogen을 포함하는 fibrin plate 뿐만 아니라 포함하지 않은 fibrin plate에서도

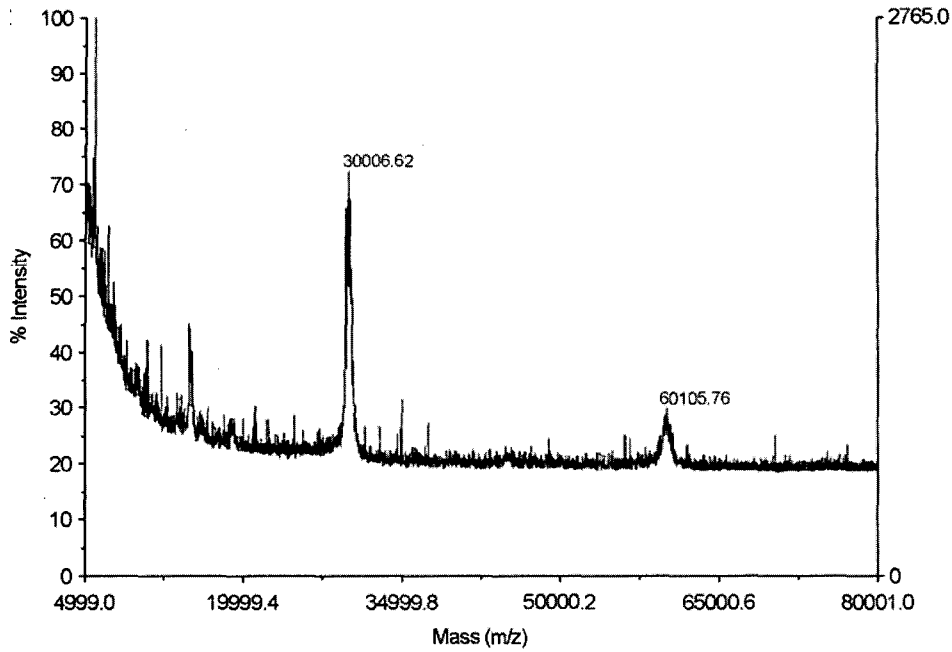


Fig. 2. MALDI-TOF spectra of purified enzyme.

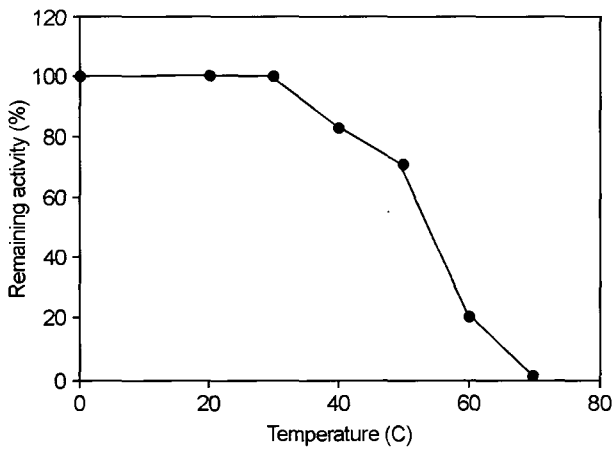


Fig. 3. Thermal stability of fibrinolytic activity of the purified protease.

같은 활성을 나타냈다. 이는 이 효소가 plasminogen activator 이 아니고 fibrin plate를 직접 용해하는 fibrinolytic enzyme임을 나타내는 것이다.

#### 2. N-terminal amino acid 서열 분석

이 효소의 15번째까지 N-terminal amino acid 서열 분석 결과는 Tyr-Pro-Ser-Pro-Ser-His-Gln-Thr-Ala-Val-Asn-Ala-Ile-Ile-X 이었다.

#### 3. 열 안정성 조사

30°C까지는 변화를 보이지 않다가 40°C에서 서서히 감소

Table 2. Substrate specificity on the purified fibrinolytic enzyme

| Substrate                 | Relative activity (%) |
|---------------------------|-----------------------|
| D-Phe-Pip-Arg pNA         | 12                    |
| N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe pNA | 100                   |
| Phe-Ala pNA               | 0                     |
| Gly pNA                   | 0                     |
| Ala pNA                   | 0                     |
| Leu pNA                   | 10                    |
| Lys pNA                   | 30                    |
| Pro pNA                   | 0                     |
| Glu pNA                   | 0                     |
| Fibrin                    | +                     |
| Fibrinogen                | +                     |

+, positive hydrolysis

하기 시작하여 50°C에서 급격히 감소하다 70°C에서 거의 활성이 사라짐을 확인하였다 (Fig. 3).

#### 4. 기질 선택성 조사

분리한 효소는 사용한 합성 기질들에 대해 기질 특이성을 나타냈다. N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe pNA를 강하게 분해시켰고, Lys pNA는 중간 정도, D-Phe-Pip-Arg pNA와 Leu pNA는 약하게 분해 시켰으며, 나머지는 기질들과 반응하지 않았다. 또한 fibrin과 fibrinogen을 분해함을 확인하였다 (Table 2).

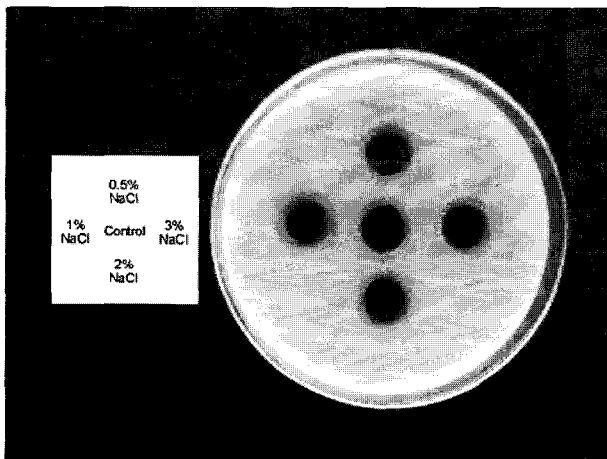
#### 5. 효소활성에 미치는 단백질 분해효소 저해제의 영향

EDTA에 의해 약간 활성이 감소해 했으나 1,10-phenan-

**Table 3.** Effects of inhibitor on the purified fibrinolytic enzyme

| Reagent             | Concentration (mM) | Residual activity (%) |
|---------------------|--------------------|-----------------------|
| None                | 1                  | 100                   |
| PMSF                | 1                  | 0                     |
| Pepstain A          | 0.2                | 102                   |
| E-64                | 1                  | 100                   |
| 1,10-phenanthroline | 1                  | 98                    |
| EDTA                | 1                  | 69                    |

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



**Fig. 4.** The effects of addition of salt on fibrinolytic activities of the purified protease.

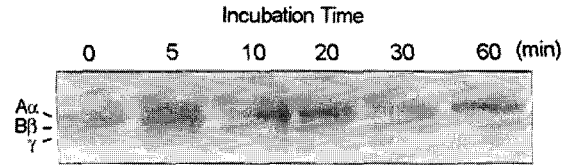
throleine의 영향은 받지 않았다. 단백질분해효소 저해제에 대한 영향을 조사한 결과 cystein protease 저해제인 E-64와 aspartic protease 저해제인 pepstain에 의해서는 거의 효소활성이 영향을 받지 않았으나 serine protease 저해제인 PMSF를 첨가한 경우에는 효소의 활성이 전혀 나타나지 않았다 (Table 3). 결과로부터 이 효소는 serine protease임을 추정할 수 있다.

#### 6. 혈전용해활성에 미치는 염의 영향

Fig. 4는 분리한 효소용액에 각각 0.5, 1, 2, 3%의 NaCl 첨가 효과에 대한 결과이다. 실험에 첨가한 모든 농도의 NaCl은 혈전용해활성을 저해시키는 것으로 나타났는데, 0.5%와 1%의 염을 가했을 때는 첨가하지 않았을 때의 약 91%의 활성을 나타냈고, 2%와 3%를 첨가 시에는 85%의 활성으로 같았다.

#### 7. 혈전용해효소에 의한 섬유소원의 분해 양상

정제된 효소와 섬유소원 (fibrinogen)의 반응 시 시간별로 취한 반응액을 SDS-PAGE로 분석한 결과 A $\alpha$  chain과  $\gamma$



**Fig. 5.** Degradation of human fibrinogen by fibrinolytic enzyme. Purified enzyme (1.3  $\mu$ g/ml) was incubated with fibrinogen (2 mg/ml) at 36 $^{\circ}$ C in 20 mM sodium phosphate, pH 7.0.

chain은 10분 후에 거의 분해되지만 B $\beta$  chain은 60분 후에도 분해하지 않았다 (Fig. 5).

## 고 찰

오래전부터 식용과 약용으로 이용되고 있는 버섯은 항암 효과 (Kim et al., 1983), 항균효과 (Park et al., 1995), 항산화효과 (Stavino, 1997)를 나타내는 물질뿐 아니라 뇌졸중, 뇌혈전증, 심장병과 같은 혈관계 질환에 대한 치료와 예방효과를 나타내는 물질도 포함하고 있는 것으로 알려져 있으며 (Kubo et al., 1983; Kabir and Kimura, 1989), 근래에는 혈전용해효소도 함유하고 있는 것으로 알려져 새로운 혈전용해제 개발을 위한 유용한 소재로 이용될 수 있을 것으로 예상되며, 또한 이와 같은 유용물질의 함유로 기능성 식품 개발의 재료로도 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 항종양작용도 높은 것으로 알려진 민자주방망이버섯으로부터 분리한 혈전용해효소의 비활성은 22.78 U/mg으로, 발표된 할미송이버섯 (32.7 U/mg; Kim and Kim, 2001) 보다는 적지만, 뽕나무버섯 (17.02 U/mg; Kim and Kim, 1999), 쓴송이버섯 (11.42 U/mg; Kim, 2002) 보다 크고, 젓갈 (1.4 U/mg; Kim et al., 1997), 청국장 (1.84 U/mg; Kim et al., 1995)으로부터 분리한 효소들 보다는 매우 큰 것을 알 수 있었다. 분리한 효소의 분자량 30 kDa는 젓갈 (41 kDa)의 효소 보다는 작지만 뽕나무버섯 (30 kDa; Shin and Choi, 1998)으로부터 분리한 효소와 같고, 청국장 (28.2 kDa), 지렁이 (20 kDa; Mihara et al., 1991), 뽕나무버섯 (18.5 kDa)과 할미송이버섯 (18.1 kDa)으로부터 분리한 혈전용해효소에 비하여 크를 알 수 있었다. 이 효소의 15번째까지 N-terminal amino acid 서열 분석 결과는 Tyr-Pro-Ser-Pro-Ser-His-Gln-Thr-Ala-Val-Asn-Ala-Ile-Ile-X으로 지금까지 알려져 있지 않은 새로운 효소였으며 여러 종류의 합성 기질을 이용하여 기질 특이성을 실험한 결과 반응 시 반응자리에 선택성이 크를 알 수 있었다. 또한 이 효소는 serine protease로 추정되며, 지금까지 발표된 잎새버섯과 느타리버섯 (Nonaka et al., 1997), 표고버섯, 팽이버섯 (Shin and Choi, 1998), 뽕나무버섯, 할미송이버섯, 쓴송이버섯과 같이 금속이온을 함유하는 금속 단백질 분해효소와는 다른 유형의 단백질 분해효소로 혈전과 섬유소원을 용해하는 기작이 다를 것으로 예상된다

다. 이와 같은 혈전용해의 serine protease은 지렁이와 발효식품인 새우젓 (Jang et al., 2000)과 Shiokara (Sumi et al., 1995)도 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 민자주방망이버섯은 식용버섯이므로 요리나 식품으로 이용할 때는 염을 첨가하므로 염을 첨가 하였을 때 혈전용해효소의 활성 변화를 측정할 결과 약간의 활성 저하를 나타냈다. 0.5~3.0%는 식품의 조리·가공 시 첨가되는 일반적인 식염의 농도 범위로서 무첨가군에 비해 혈전용해 활성이 약간 낮기는 하였으나 실황되거나 크게 감소하는 것은 아니라고 할 수 있으며, 식품으로서 민자주방망이버섯의 혈전용해활성을 기대할 수 있는 결과라고 여겨진다. 섬유소원의 A $\alpha$  chain과  $\gamma$  chain은 짧은 시간 안에 거의 분해하지만 B $\beta$  chain은 분해하지 않는 선택성을 갖고 있었다. 위 실험 결과로부터 이 효소는 기존에 사용되고 있는 혈전용해제인 플라즈미노겐 활성화제들과는 다르게 혈전의 주성분인 섬유소와 섬유소원을 직접 분해하는 fibrinolytic enzyme으로 기질에 대한 선택성이 큰 새로운 혈전용해효소인 것을 알 수 있었다. 일반적으로 혈전성 성인병은 병징이 나타나기 시작한 후에는 치료가 매우 어려운 한계가 있어 혈전을 감소시키는 식품이나 약품을 상시 섭취하여 혈전에 의한 성인병을 미리 예방하는 것이 최선의 방법이다. 따라서 생성된 혈전을 제거할 수 있는 혈전용해물질을 함유하고 있는 재료를 식품으로 사용하여 항상 사용할 수 있다면 혈전증 치료에 큰 효과를 얻을 수 있을 것이다.

위 실험 결과로부터 이와 같은 조건을 갖고 있는 것이 민자주방망이 버섯임을 알 수 있다. 이 버섯은 다른 버섯에 비해 큰 장점을 갖고 있다. 즉, 할미송이버섯으로부터 분리한 혈전용해효소의 활성은 매우 크지만 할미송이버섯은 약간의 독성을 갖고 있으며, 뽕나무버섯의 경우는 식용 가능하지만 야생에서 대량 채배 시 버섯 균사가 사물기생과 더불어 활물 기생도 하므로 다른 나무의 성장에 피해를 줄 수 있다. 이와 같이 혈전용해활성은 크면서 독성도 없고, 대량 채배 시 다른 나무에 피해를 주지 않는 식용 가능한 민자주방망이버섯이 식품으로 이용되어 자주 섭취할 수 있다면 혈전에 의한 혈관계 질환의 예방과 치료에 큰 효과를 볼 수 있을 것이다. 따라서 이 버섯은 새로운 혈전용해제 개발의 후보물질로 사용할 수 있을 것이며, 또한 기능성 식품 개발의 재료물질로도 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

#### 감사의 글

본 연구는 2005년도 상지대학교 교내 연구비의 지원으로 이루어졌음을 밝히며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

Ahn DK. Medical Fungi in Korea. Kor J Mycol. 1992. 20: 154

-166.

Akassoglou K, Kombrinck KW, Degen JL, Strickland S. Tissue plasminogen activator-mediated fibrinolysis protects against axonal degeneration and demyelination after sciatic nerve injury. J Cell Biol. 2000. 149: 1157-1166.

Blasiak J, Smolarz B, Piestrzeniewicz D. Urokinase plasminogen activation system and its role in cancer progression. Postepy Biochem. 1999. 45: 42-50.

Choi J. Pathology. Soo-Moon Publishing. Seoul. 1992. pp.47-66.

Eisele JW, Mihalyi E. Studies of the advanced stages of the plasmin and trypsin digestion of bovine fibrinogen. Thromb Res. 1975. 6: 511-522.

Gavrilova VP, Falina NN. Proteolytic enzyme isolated from a fungus, *Flammulina velutipes*(Fr). Sing. Mikol Fitopatol. 1975. 9: 431-433.

Haverkate F, Traas DW. Dose-response curves in the fibrin plate assay. fibrinolytic activity of protease. Thromb Haemost. 1974. 32: 356-365.

Jang S, Kim M, Lee M, Oh T, Sohn C. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus sp.* S19 from Shrimp Jeot-Gal. Kor J Appl Microbiol Biotechnol. 2000. 28: 258-263.

Kabir Y, Kimura S. Dietary mushrooms reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR). J Nutr Sci Vitaminol. 1989. 35: 91-94.

Kim BK, Kim JS, Choi EC, Kim HR, Lee KL, Lee CO, Chung KS, Shim MJ. Studies on constituents of the higher fungi of Korea (XXVII). Kor J Mycol. 1983. 11: 151-157.

Kim HK, Kim GT, Kim DK, Choi WA, Park SH, Jeong YK, Kong IS. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus sp.* KA38 originated from fermented fish. J Ferment Bioeng. 1997. 84: 307-312.

Kim JH. Purification and characterization of fibrinolytic enzymes from *Tricholoma sejunctum*. Kor J Biomed Lab Sci. 2002. 8: 245-250.

Kim JH, Kim YS. A fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Armillariella mellea*. Biosci Biotech Biochem. 1999. 63: 2130-2136.

Kim JH, Kim YS. Characterization of a metalloenzyme from a wild mushroom, *Tricholoma saponaceum*. Biosci Biotech Biochem. 2001. 65: 356-362.

Kim JH, Lee HY, Yoo KH, Kim YS, Seok SJ, Kim YS. The Screening of fibrinolytic activities of extracts from mushrooms in Mt. Chiak. Kor J Mycol. 1998. 26: 589-593.

Kim JH, Yoo KH, Seok SJ, Kim YS. Screening of fibrinolytic

- activities of extracts from wild mushrooms collected in Mt. Chilgap of Korea. *Kor J Mycol.* 2005. 33: 18-21.
- Kim SH. New trends of studying on potential activities of Doen-Jang. *Kor Soybean Digest.* 1998. 15: 8-15.
- Kim YT, Kim WK, Oh HS. Screening and Identification of the Fibrinolytic Bacterial Strain from ChungKook-jang. *Kor J Microbiol Biotechnol.* 1995. 23: 1-5.
- Kino K, Yamashita A, Yamaoka K, Watanabe J, Tanaka S, Ko K, Shimizu K, Tsunoo H. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, Ling Zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*. *J Biol Chem.* 1989. 264: 472-478.
- Kubo M, Tatsuda H, Nogami M, Arichi S, Takahashi T. Studies on the *Ganoderma lucidum* (IV), effects on the disseminated intravascular coagulation. *Yakugaku Zasshi* 1983. 103: 871-877.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Randall AJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951. 193: 265-275.
- Mihara H, Sumi H, Yoneta T, Mizumoto H, Ikeda R, Seiki M, Maruyama M. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Jp J Physiol.* 1991. 41: 461-472.
- Nakashima A, Okada T, Sugie I. Fibrin-dependent activation of plasminogen by a proteolytic digest of streptokinase. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 1990. 1: 279-284.
- Nonaka T, Dohmae N, Hashimoto Y, Takio K. Amino acid sequences of metalloendopeptidases specific for Acyl-Lysine bonds from *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. *J Biol Chem.* 1997. 272: 30032-30039.
- Park WH, Lee HD. Illustrated book of korean medical mushroom. Kyo-Hak Publishing. Seoul. 1999. 186-187.
- Park SS, Lee KD, Min TJ. Study on the screening and development of antibiotics in the mushrooms. The screening of bacterial antibiotics in Basidiomycetes (I). *Kor J Mycol.* 1995. 23: 28-36.
- Shin HH, Choi HS. Purification and partial characterization of a Metalloprotease in *Flammulina velutipes*. *J Microbiol.* 1998. 36: 20-25.
- Stavinoha WB, Satsangi N. The 7th international symposium on the *Ganoderma Lucidum*. Seoul. Korea. 11 June. 1997. p. 5-17.
- Sumi H, Nakajima N, Yatagai C. A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack Shiokara, a Japanese traditional fermented food. *Comp Biochem Physiol B* 1995. 112: 543-547.