천연물 유래 혈행개선제의 개발

정 영 기
동아대학교 생명공학과 교수

우리 몸의 혈액은 혈관을 통하여 각 조직 구석구석까지 영양물질이나 산소를 공급하므로써 생명을 유지해 나가는데 이러한 순환계의 질환으로 인한 사망률은 매우 높은 편이다. 순환계 질환은 모두 혈액 내에서 형성되는 혈전에 기인하는 경우가 대부분이며 이 혈전이 원인이 되어 질병을 유발시키는 것을 혈전성 성인병이나 혈전증이라고 한다.

혈전증은 혈관에 혈전이 쌓여 혈액의 순환을 방해함으로써 세포의 성장장애 및 기능장애를 유발시키는 등의 원인으로 여러 형태의 성인병을 일으키는 증상을 말한다.

생체 내의 혈관계가 손상을 받게 되면 혈액은 응고현상을 일으켜 지혈되며, 이 때 생성된 혈전은 자연히 분해된다. 이 과정에서 형성된 혈소판과 섬유소 (fibrin)의 응집체인 혈전 (thrombus)은 지혈과정이 완결되고 손상된 부위의 조직이 재생되면 plsminogen 활성제인 urokinase, tPA (tissue-type plasminogen activator), streptokinase에 의해 plasminogen이 활성화된 plasmin에 의해 용해되어 혈관의 혈액은 다시 정상 상태를 유지하게 된다.

이와 같이 혈액의 응고 분해계는 효소의 작용에 의해 균형을 이루고 있다. 그러나 혈전이 과도하게 축적되거나 혈전의 용해작용이 원활하지 못할 경우에는 혈전증이 발생되어 혈액순환이 차단되어 인체에 치명적인 손상을 야기 시킬 수 있다. (Fig. 1 참조)

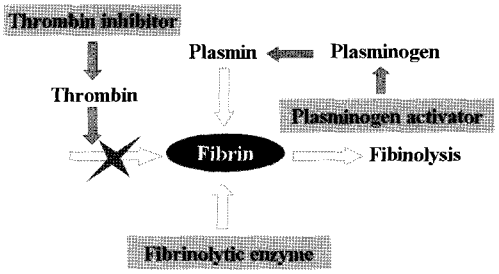

Fig. 1. The mechanism of fibrin formation and fibrinolysis

이와 같이 혈전이 축적되는 속도가 빨라지면 혈관벽의 Cholesterol과 결합하여 고혈압을 유발 할 수 있으며 뇌혈관이나 심장혈관을 막아 뇌졸중, 뇌경색 그리고 협심증과 심근 경색 등과 같은 성인병의 원인이 될 수 있다. 실제로 1996년도와 2006년도의 우리나라 사망원인 별 사망률을 보면 심장질환과 뇌혈관질환의 순환계질환이 사망원인 중 높은 율을 보이는 것을 알 수 있다. (Fig. 2 참조)

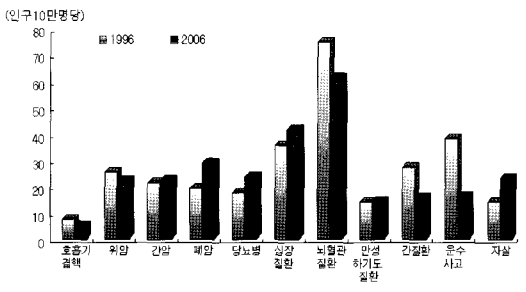

Fig. 2. 주요 사망원인별 사망률 추이, 1996-2006

본 연구진은 인류의 건강을 위하여 순환계질환의 예방과 치료가 무엇보다도 중요하다는 인식하에 혈행개선제 개발의 연구를 수행해왔다. 물론 urokinase (UK)나 tPA(tissue-plasminogen activator)와 streptokinase (SK), staphyrokinase 등 plasminogen activator가 1953년부터 발견되어 실제 임상에 사용되고 있다. 그러나 이들은 대부분 주사용 치료제로서 사용되고 고가이거나 출혈 등의 부작용이 많은 것이 흠이라 하겠다.

그래서 본 연구진은 세균과 버섯 그리고 발효전통식품 등에서 혈전용해효소를 발견하고 이를 이용한 혈행개선제의 개발을 시도하여 Table1과 같은 몇 종류의 새로운 혈전용해효소를 개발하기에 이르렀다.

Tabl 1. Various Fibrinolytic enzymes from Jeong's Lab

Strain	M.W.	Enzyme
Bacillus subtilis A1	28kDa	Bacillokinase-1 (BK-1)
Bacillus subtilis A1	33kDa	Bacillokinase-2 (BK-2)
Bacillus subtilis BK-17	31kDa	Bacillokinase-17 (BK-17)
Aeromonas hydrophila	36kDa	Aerokinase (AK)
Myulchi Jeot-gal	28kDa	Myulchikinase (MK)
Mushroom (*Schizophyllum commune*)	17kDa	MashroKinase (MSK)

본 연제에서는 주로 *Bacillus subtilis*가 생산 분비하는 단백질 중 혈전용해기능을 가진 효소에 대하여 정제, 유전자 분석, 제품개발을 위한 고체배양의 결과 순으로 언급하고자 한다.

□ Bacillokinase-1, 2 (BK-1, 2) from Bacillus subtilis

Bacillus sp. 유래의 혈전용해효소는 일본의 Natto (낫토)에서 분리한 *Bacillus natto* 유래의 NattoKinase (NK)를 선두로, 우리나라에서는 청국장에서 분리한 Changguk Kinase(CK)가 알려져 있다. CK의 분리와 거의 같은 시기에 본 연구진은 *Bacillus subtilis* BK-17에 의하여 분리된 분자량 31KDa의 혈전용해효소를 BacilloKinase-17(BK-17)로 명명하였다. 그 후 *B. subitlis* A1 균주로부터 28KDa의 단백질을 분리정제하여 특성을 조사한 결과 Serine계 효소이며 Chymotrypsin에 가까운 효소라는 것을 알았다. 특히 fibrin에 대한 기질 특이성이 뛰어나서 인체피부 단백성분인 gelatin 이나 적혈구단백질, 우유단백질인 casein, skim milk 등을 기질로 37℃에서 5시간 동안 반응시켜도 분해하지 않았다. 이결과는 이 물질을 혈행개선제로 인체에 투입 했을 때 부작용을 일으킬 염려가 없다는 것을 시사하는 것이다. 이 단백질의 N-말단 아미노산 sepuence는 A-T-G-G-S-I-I-D-P-I-N-G-Y-N로서 기존의 알려진 Bacillus속 유래의 혈전용해효소와 다른 새로운 단백질임을 확인하고 Bacillo Kinase-1(BK-1)이라고 명명하였다.

이후 BK-1의 cloning과 DNA Sequence를 시도하였다. 그 결과 N-말단 아미노산으로부터 약 300개의 아미노산과 분자량 약 33~37 KDa으로 산출되었다.

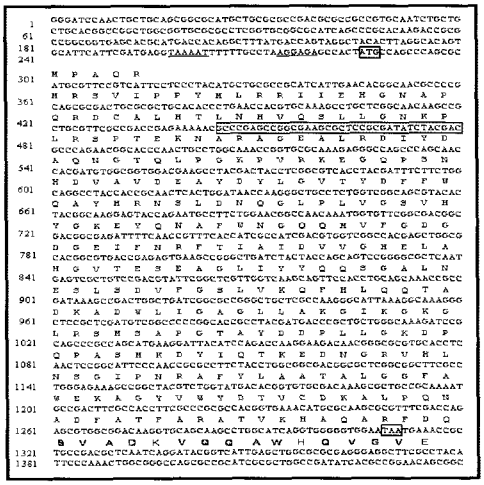

Fig. 3. Nucelotide and amino acid sequences of the fibrinolytic enzyme gene

이 gene유래의 recombinant protein을 정제하여 SDS-PAGE상에서 분자량을 측정한 결과 33KDa의 단백질을 확인할 수 있었다. 이는 앞에서 BK-1과

다른 결과이므로 배양시간 별로 생산된 단백질을 조사한 결과 33KDa의 단백질과 28KDa 두 종류의 단백질이 분비되는 것을 알았다. 물론 N-말단 아미노산 염기서열도 다른 것으로 나타났기 때문에 33KDa의 단백질을 BacilloKinase-2(BK-2)로 명명하였다.

Protease	N-terminal amino acid sequence
BK-II	A R A G E A L R D I Y
Carls	A Q T V P Y G I P L I
BPN'	A Q S V P Y G V S Q I
NAT	A Q S V P Y G I S Q I
Mesen	A Q S V P Y G I S Q I
CK	A Q T V P Y G I P L I

Fig. 4. Comparison of N-terminal seqence of the purified protease, BK-II with other proteases

□ Solid culture for functional product

Fibrinolytic enzyme 생산균주 *Bacillus subtilis* A1을 spore forming medium에서 약 72시간 이상 액체배양하면 배양액에 포자가 방출된다. 이 포자 현탁액을 100℃로 살균한 후 삶은 대두에 살포하여 42℃에서 약 15~18시간 배양한 후 37℃에서 약 3~5시간 고체배양을 한다. 이후 콩에서 생성된 혈전용해효소의 활성을 확인할 수 있다. (Fig. 5 참조)

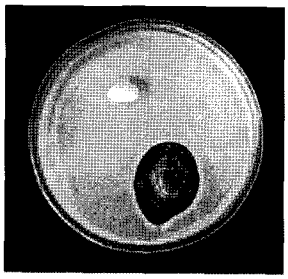

Fig. 5. Fibrinolytic enzyme activity of non-fermented soybean and solid state fermented soybean

A : Non-fermented soybean, B : Solid state fermented soybean

배양된 발효대두는 활성을 유지하면서 동결건조하여 powder화한다. 이 powder는 영양학적으로 발효하지 않은 대두보다 단백질과 지질이 증가하며 필수 아미노산과 일반 아미노산의 양도 미 발효 대두보다 증가하여 식품적가치가 높은 것으로 나타났다. 특히, 효소 활성의 안전성은 유통과정이나 소비자가 섭취하는 저장기간 중에 효소활성이 안전하게 유지되어야 한다. 저장실험결과 시제품은 약 70일간 상온에서 저장할 때 4℃에서 같은 기간 저장한 것과 큰 차이 없이 활성이 유지되는 것을 알았다.(Fig. 6 참조)

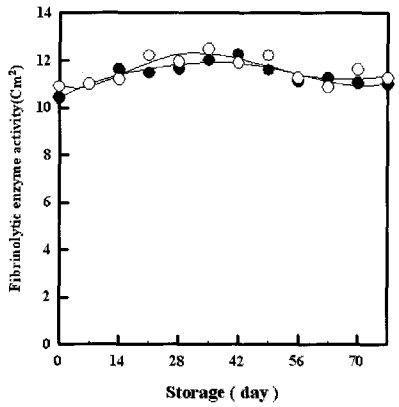

Fig. 6. Stability of fermented soybean powder

● : room temp. ○ : cold room (4 °C)