

부들 화분 혈전 용해효소의 정제와 특성

박혜민¹ · 구자형² · 오만진^{1*}

Purification and Some Properties of Fibrinolytic Enzyme from *Typha angustata* Pollen

Hae-Min Park¹ · Ja-Hyeong Gu² · Man-Jin Oh^{1*}

ABSTRACT

When the cattail pollen was identified by using fibrinolytic agents, we found that the fibrinolytic activity was controlled by an enzyme. Therefore, for determining the fibrinolytic activity of cattail pollen, the fibrinolytic enzyme in cattail pollen was purified by gel filtration using DEAE-cellulose, Sephadex G-150 and HPLC. Also, its purity was certified by polyacrylamide gel electrophoresis, and its physico-chemical properties, such as pH and temperature stabilities and effects of metal, inhibitors and substrates, were examined. The specific activity, purification fold, and molecular weight of the enzyme were 38U/mg, 86.4, and 75kDa, respectively. The optimum pH for the purified enzyme was at 4.0 and it was stable at pH 4.0-6.0. The optimum temperature was 55°C and it was stable at 30-60°C. But the enzyme began to be inactivated at 70°C and its activity was totally lost at temperatures above 80°C. As for substrate specificity, the enzyme was most effective in dissolving fibrin, followed by whole

2009년 1월 15일 접수; 2009년 5월 7일 수정; 2009년 6월 3일 채택

¹ 충남대학교 농업생명과학대학 식품공학과(Dept. of Food Science and Technology, College of Agriculture and Life Science, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea)

² 충남대학교 농업생명과학대학 원예학과(Dept. of Horticulture, College of Agriculture and Life Science, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea)

* 교신저자: 오만진(E-mail: ohmj@cnu.ac.kr, Tel +82-42-821-6728)

casein, κ -casein, α -casein, β -casein, and BSA. With casein as the substrate, K_m value was found to be 0.44mM and the enzyme showed a high affinity for casein. As for the metal ions affecting enzyme activity, K^+ , Na^+ , and Mg^{2+} had no effect on enzyme reaction while Zn^{2+} and Fe^{2+} showed potent inhibitory activity. Judging from the fact that the purified enzyme was also strongly inhibited by PMSF, iodoacetic acid, and SDA, it assumed to be a serine protease.

Key words : Cattail pollen, fibrinolytic activity, *Tapha angustata*

1. 서 론

부들(Cattail)은 여러 해 살이 습지 식물로서 좀 부들, 애기 부들, 큰 부들의 3 품종이 우리나라 전역에 자생하고 있으며 애기 부들이 제일 흔한 것으로 알려져 있다. 부들은 습지의 오염물질을 정화하고 지상부와 근경이 발달하여 많은 양의 biomass를 생산할 수 있기 때문에 bioenergy 원으로 근래 주목을 받고 있으며 부들의 싹은 맛이 우수하여 김치로 이용하거나 샐러드 소재로서 이용되어 왔다(1). 부들은 화분이 가장 많이 채취되는 식물로서 수술 1개당 0.7-1.5g 정도 화분을 얻을 수 있다.

부들 화분은 포황(蒲黃)이라는 이름으로 오랜 옛날부터 지혈(止血), 어혈(瘀血)의 제거, 토혈(吐血), 혈변(血便), 혈뇨(血尿)등의 치료에 민간에서 이용되어 왔으며 혈압강하, 항 경련작용, 항균작용이 있는 것으로 알려져 있다(2). 본 연구에서는 부들 화분의 약리 기능 중 어혈 제거를 통한 혈전의 용해에 대하여 많은 관심을 가지게 되었다. 혈액의 응고와 용해작용의 균형이 깨어져서 일어나는 심혈관 질환은 혈전생성과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다(3,4). 생체 내에서 생기는 작은 상처 들을 복구하기 위해 생성되는 혈전들은 상처복구 후에 분해되지 않은 채 혈

관을 순환하게 된다. 혈전은 활성화된 thrombin에 의하여 fibrinogen이 fibrin으로 전환되어 불용성의 격자 중합체를 형성함으로써 생성된다.

이와 같은 혈전을 예방하고 치료하는 약물로는 항 응고제, 항 혈소판제, 혈전용해제가 있으며 혈전 용해제로는 urokinase, tissue type plasminogen activator, streptokinase 등이 있으나 urokinase를 제외하고는 경구 투여가 불가능하다. Tissue type plasminogen activator는 반감기가 짧은 단점이 있으나(5) fibrin에 대한 친화성이 높을 뿐만 아니라 fibrin이 존재할 때 그 활성도가 100-200배 증가하는 특성이 있다. 따라서 fibrin 표면에서 국소적으로 작용하여 plasminogen을 plasmin으로 전환시키며 urokinase, streptokinase 등과 같은 혈전용해제에 비해 특이성이 높은 것으로 알려져 있다. 한편, urokinase, streptokinase등은 혈전에 대한 선택성이 적어 혈액내에 순환하는 plasminogen까지도 불활성화 시키기 때문에 심한 출혈현상 등과 같은 부작용을 나타내기도 한다. 아울러 urokinase의 정맥 내 주사와 같은 혈전용해 효소 치료는 비용이 많이 들고 출혈성 합병증 등의 부작용이 있어 문제점으로 노출되고 있다. 혈전을 직접 용해하는 효소로서 뱀독액의 출혈 독소(6)나 지렁이 분비물(7,8), 미생물(9)부터 분리하였다는 보고가 있다. 또한, natto(10),

tofuyo(11), 청국장(12)등과 같은 발효 식품과 식용 버섯(13), 새우 paste(14)와 같은 양념류가 강력한 혈전 용해능을 가지고 있는 것으로 보고된 바 있다. 이와 같이 식용 가능한 자원 중에서 혈전용해 효소는 부작용을 일으키는 의약품과는 달리 식품은 반복해서 장기간 섭취하기 때문에 유효성분이 미량이라 하더라도 항상 공급됨으로써 큰 영향을 줄 수 있어 심혈관계 관련 질환을 효과적으로 예방할 수 있는 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

따라서 본 연구팀에서는 부들 화분의 생리활성에 관한 연구를 수행하던 중 부들 화분의 혈전 용해능이 있음을 확인하고 혈전 용해 물질의 특성 규명이 필요하게 되었다. 특히 본 연구에서는 부들 화분으로부터 혈전용해 효소를 분리 정제하고 순도를 확인한 다음 정제한 혈전용해 효소의 특성을 조사하여 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 시약

1) 실험재료

본 실험에 사용한 부들 화분은 충남대학교 실습답과 충남지역에서 2007년 애기부들을 재배 수확하여 실험재료로 하였다

2) 시약

Fibrinogen, plasmin, plasminogen, thrombin, bovine serum albumin, casein, α-casein, β-casein, κ-casein는 Sigma사 제품, DEAE-cellulose, Sephadex G-150은 Pharmacia사 제품을 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 효소액 조제

부들화분에 10배량의 물을 가하여 진탕기로 10시간 진탕하여 효소를 추출하고 원심분리(3,500 rpm, 15분)하여 상정액을 조효소액으로 하였다.

2) 혈전용해 활성의 측정

(1) Fibrin plate를 이용한 fibrinolytic activity 측정

Fibrinogen 0.09g을 10mM phosphate buffer (pH 7.8) 15mL에 녹인 후 thrombin(20unit/mL) 100μl를 넣고 1% agarose용액을 15ml 첨가하여 petri-dish에 분주한 후 30분간 응고 시켰다. 여기에 조 효소액을 50μl를 점적한 후 36.5°C, 24시간 반응하여 용해된 환의 면적을 측정하였다.

(2) α-casein을 이용한 plasmin unit 측정

Robbin 방법(15)을 변형하여 사용하였다. 즉, 4% α-casein 용액 2mL에 Tris-lysine-NaCl-EDTA buffer 1.6mL을 넣은 후 시료 용액 200μl를 넣어 37°C에서 30분간 반응시켰다. 그후 15% TCA용액을 6mL 넣어 반응을 정지시키고 원심분리하여 280nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 plasmin casein unit(PCU)는 1시간에 생성되는 TCA-soluble 용액중의 tyrosine 450μg을 유리하는 효소의 양을 1unit로 하였으며 그 계산식은 다음과 같다.

$$1\text{PCU/ml} = \frac{\text{Absorbance}(280\text{nm})}{\text{Samplevolume}(\text{ml})} \times 2 \times 10 \times 147 \times \frac{1}{450}$$

3) 단백질 정량

효소의 단백질 정량은 Lowry등의 방법(16)에 의하여 측정하였으며 bovine serum albumin을

표준 단백질로 하였다.

4) Fibrinolytic enzyme의 정제

화분에 증류수를 가하여 추출한 뒤 동결건조한 효소액을 10mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에 녹여 같은 완충용액으로 평형된DEAE-cellulose column에 흘려 보내고 완충용액 200mL로 씻어 준 후 1M NaCl의 농도 기울기로 시간당 50mL의 유속으로 용출시켰다. 용출된 분획은 모두 280nm에서 흡광도를 측정하였다. 분획부분 가운데 효소활성이 높은 부분은 투석을 이용하여 염을 제거한 뒤 농축시킨 뒤 10mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에 용해 시킨 뒤 Sephadex G-150 column에 주입하고 동일한 buffer로 시간당 18mL의 유속으로 용출시키면서 tube당 5mL씩 분획하였다. 모든 정제 과정마다 혈전용해능과 단백질 농도를 측정하였다.

5) HPLC에 의한 fibrinolytic enzyme 분리

Sephadex G-150 column에 의해 분획된 sample 은 농축한 후 reversed-phase C₁₈ column(Agilent C18, 4.60×250mm, 5 μ m)를 이용하여 혈전 용해능이 있는 분획을 HPLC로 분리 하였다. 용매로는 H₂O와 0.1% TFA를 함유한 acetonitrile을 사용 하였으며 용매의 공급은 0.5 mL/min의 유속으로

acetonitrile을 30%에서 60%로 농도로 gradient 하였다.

효소의 정제 방법을 요약하면 Fig. 1과 같다.

6) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

SDS-PAGE는 Laemmli's(17)의 방법에 따라 수행하였으며 acrylamide의 농도는 12%, gel은

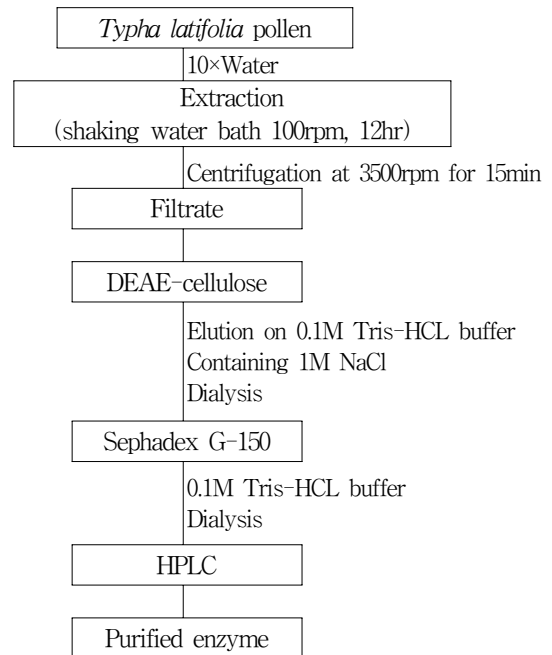


Fig. 1. Purification step of fibrinolytic enzyme of Cattail pollen.

Table 1. Operating conditions for analysis of fibrinolytic enzyme of Cattail pollen by HPLC

Apparatus	Young-lin M930		
Column	Reversed phase(Agilent C18, 4.60×250mm, 5 μ m)		
Flow rate	0.5mL/min		
Detector	UV detector, 280nm		
		Water	0.1% TFA in Acetonitrile(%)
Solvent	Initial	70	30
	20min	40	60
	40min	40	60

silver staining kit로 염색하였고 표준물질은 Broad-way(15) prestained protein marker를 사용하여 효소 단백질의 순도와 분자량을 측정하였다.

7) 정제효소 성질

(1) 최적pH와 pH 안정성

정제효소의 최적 pH를 검토하기 위하여 1% casein이 함유된 완충액(pH 3~6: Na₂HPO₄-KCl buffer, pH 7~9: 0.1M Tris-HCl buffer, pH 10~11: NaHCO₃-NaOH buffer, pH 12~13: NaOH-KCl buffer)에 효소액을 첨가하여 pH에 따른 효소활성을 측정하여 활성이 가장 높은 pH를 최적 pH로 하였다. 정제효소의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 pH 3~6 완충액과 정제 효소액과 1:1로 혼합하여 30°C에서 6시간 정치시킨 후 효소활성을 측정하여 pH안정성을 검토 하였다.

(2) 최적 온도와 온도 안정성

0.1M-Tris완충용액(pH7.5)에 1% 농도가 되도록 casein을 용해시켜 효소액을 가하고 30~80°C에서 1시간 반응시켜 온도에 따른 효소활성을 측정하였다. 0.1M-Tris완충용액(pH 7.5)에 효소액을 가한 후 30~80°C에서 1시간 방치하여 잔존하는 효소 활성을 측정하여 안정성을 검토하였다.

(3) 금속이온과 저해제의 영향

0.1M-Tris완충액(pH 7.5)에 용해된 1% casein에 정제 효소액과 금속이온농도가 10⁻³M되도록 첨가하여 40°C에서 1시간 반응시켜 효소활성을 측정하여 금속이온 영향을 검토하였다. 여러 종류의 저해제를 정제 효소액에 가하여 최종농도가 10mM가 되도록 조정한 후 1% casein용액을 가하여 37°C, 1시간 반응시킨 다음 생성된 tyrosine equivalent양을 측정하여 무 첨가구와 비교하여

%로 표시하였다.

(4) 기질특이성

각 기질을 0.1M-Tris 완충액(pH 7.5)에 용해하고 기질 농도 10mg/mL가 되도록 효소액과 기질을 혼합하여 40°C에서 1시간 반응 시켜 단백질의 가수분해 정도를 340nm에서 흡광도를 측정하여 비교 표시하였다.

(5) 반응상수의 측정

Casein을 기질로 하여 효소작용 시킨 후 Km value를 Lineweaver-Burk plot(18)상에서 작도하여 구하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 효소의 정제

1) DEAE-Cellulose column chromatography

Glass column(2.8×44cm)에 Sigma제 DEAE-Cellulose를 충전 시키고 0.1M Tris-HCl buffer용액(pH 7.5)으로 미리 평형 시킨 후 sample 15ml을 loading하고 NaCl을 1M로 gradient하였으며 50mL/hr속도로 용출하여 10mL씩 분획을 받아 효소 활성을 측정하였다. 분획 No.13~35까지 모아 활성을 측정한 결과 9.1unit 였다(Fig. 2).

2) Sephadex G-150 column chromatography

DEAE-Cellulose column에 의해 얻은 활성 분획을 모아 탈염, 농축하여 Sephadex G-150에 loading 하였다. 동일한 완충액으로 18mL/hr 속도로 용출시키면서 5mL씩 분획하였다. 활성도가 높은 분획 No. 11~37을 모아 활성을 측정한 결과 14.8unit이였다(Fig. 3).

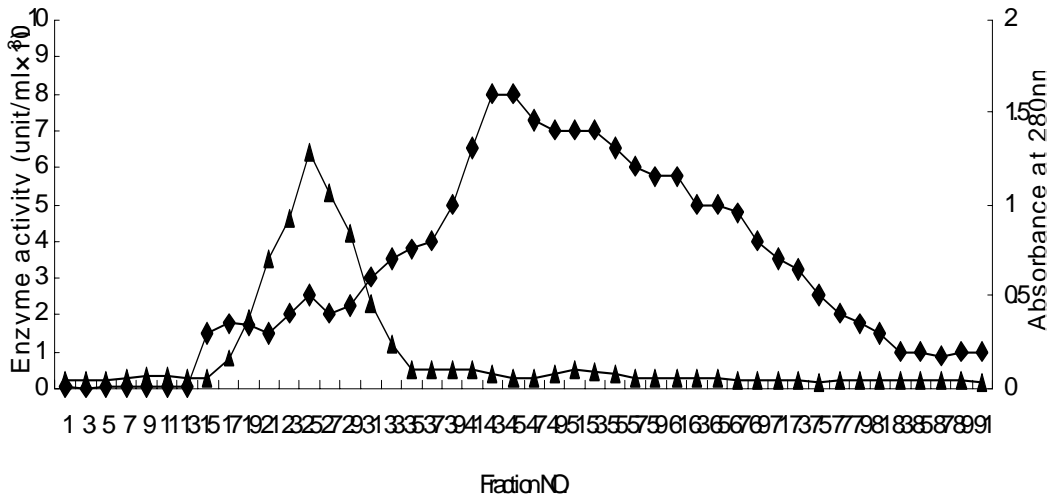


Fig. 2. Chromatogram of fibrinolytic enzyme isolated from Cattail pollen by DEAE-cellulose. Column was equilibrated with 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.5). Column size : 2.8×44cm, Fraction volume : 10ml/hr <▲--▲ : Enzyme activity, ◆--◆ : Absorbance at 280nm>

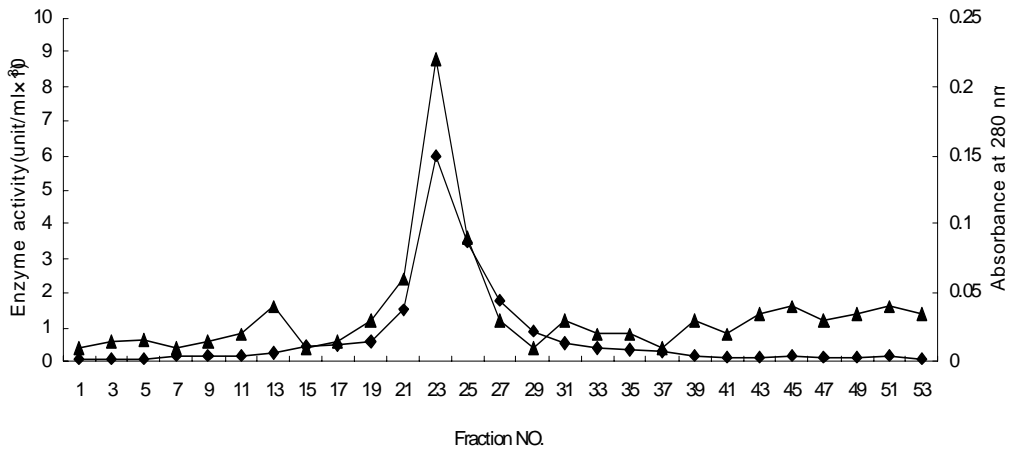


Fig. 3. Gel filtration profile of fibrinolytic enzyme isolated from Cattail pollen by Sephadex G-150(1st). Column was equilibrated with 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.5). Elution was performed with the same buffer at a flow rate of 18ml per hour. Column size : 1.8×90cm, Fraction volume : 5mL/hr <▲--▲ : Enzyme activity, ◆--◆ : Absorbance at 280nm>

3) High performance liquid chromatography
Sephadex G-150에 의하여 얻어진 활성 분획을 모아 HPLC로 확인한 결과 RT 21.6분에서 단일 peak를 얻었다.

4) SDS-PAGE에 의한 순도 검증
정제된 효소의 단일성을 확인하기 위하여 SDS-PAGE로 분석한 결과 Fig.5와 같이 단일 band를 나타내었다. 이 정제 효소의 분자량이 75kDa으로 갯지렁이(19)의 혈전 용해 효소 29kDa, 할미송이버섯(13)의 혈전 용해 효소 18.2kDa, 청국장(12)의 혈전 용해 효소 29kDa, 새우젓(14)의 혈전 용해 효소 43-46kDa과 비교하였을 때 분자량이 큰 것을 확인 할 수 있었다.

조 효소액과 정제 효소의 혈전 용해능 확인 결과는 Fig. 6과 같았으며 이로써 정제 효소가 혈전 용해능이 있음을 다시 확인하였다.

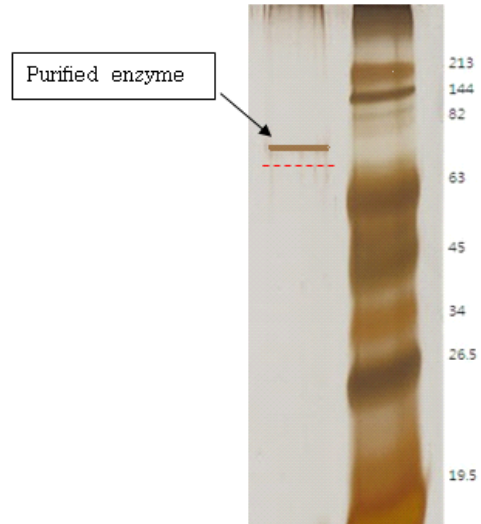


Fig. 5. Polyacryamide gel electrophoresis of purified fibrinolytic enzyme in Cattail pollen.
(protein 1 : 213 kDa, protein 2 : 144 kDa, bovine serum albumin : 82 kDa, T4 ligase : 63 kDa, ovalbumin : 46 kDa, carbonia anhydrase : 34 kDa, trypsin inhibitor : 26.6 kDa, lysozyme : 19.5 kDa)

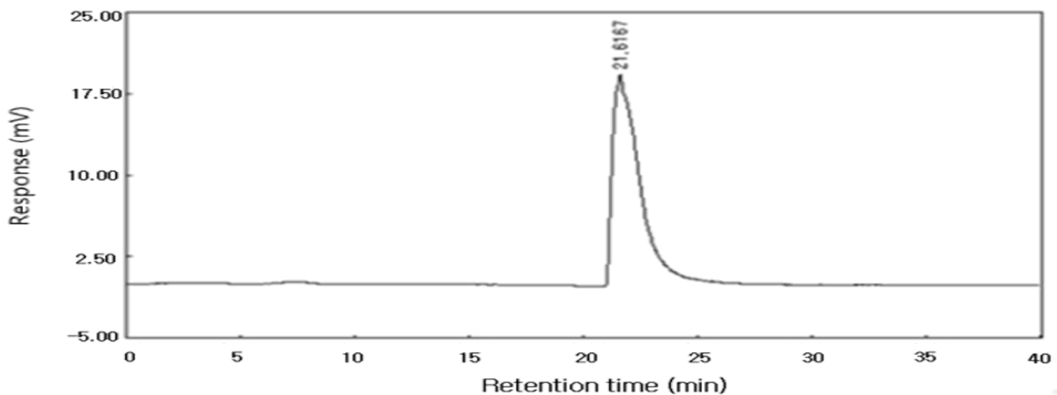


Fig. 4. HPLC pattern of purified fibrinolytic enzyme of Cattail pollen.

5) 정제효소의 혈전용해능 분석 결과

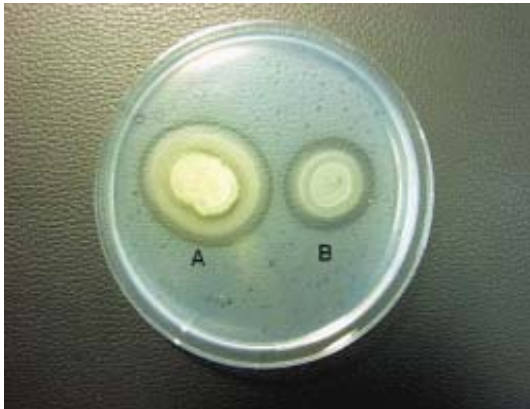


Fig. 6. Clear zone of fibrinogen by purified fibrinolytic enzyme of Cattail pollen.
A : Crude enzyme B : Purified enzyme

부들 화분의 혈전 용해효소를 정제하여 요약한 결과는 Table 2와 같으며 최종적으로fibrinolytic enzyme은 회수율이 8%로서 86.4배로 정제되었으며 효소의 비활성도는 38u/mg protein이었다. 할미송이버섯(13)의 혈전 용해 효소 정제도 45.9 배, 효소의 비활성도 43.4 u/mg protein에 비교할 때 정제도와 비활성도가 높았지만 갯지렁이(19)의 혈전 용해 효소 정제도 1430.3배, 효소의 비활성도 19767.6 u/mg protein에 비교할 때 큰 차이를 보였다.

2. 정제 효소 특성

1) 최적 pH

효소의 최적 pH를 조사하기 위하여 각기 다른 pH의 범위의 buffer용액에 효소를 녹여 효소활성을 측정 한 결과는 Fig. 7과 같다. 본 효소의 최적 활성은 pH 4이었으나 pH 4~4.5에서 활성이 80~90% 수준임을 알 수 있다. 이는 새우젓(14)의 혈전 용해 효소와 할미송이버섯(13)의 혈전 용해 효소 최적 pH보다는 현저히 낮았다.

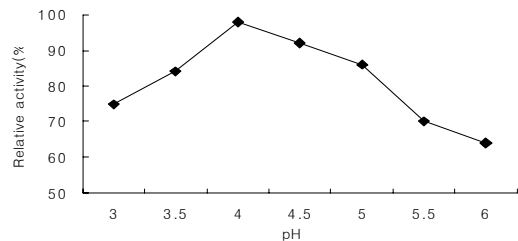


Fig. 7. Effect of pH on the activity of fibrinolytic enzyme activity of Cattail pollen.

2) pH안정성

각각의 pH별로 효소를 녹여 40°C에서 60분간 반응시켜 잔존하는 효소활성을 확인한 결과 pH 4~6까지는 매우 안정함을 보였으며 새우젓(14)

Table 2. Purification yield of fibrinolytic enzyme of Cattail pollen

Purification step	Total Protein(mg)	Total Activity (U)	Specific activity (U/mg protein)	Recovery (%)	Purification Fold
Crude extract	214.3	94.8	0.44	(100)	(1)
DEAE-cellulose	5.58	49.9	9.1	52.6	20.7
Sephadex G-150	1.02	15.1	14.8	15.9	33.6
HPLC	0.2	7.6	38	8.0	86.4

의 혈전 용해 효소 pH안정성 범위보다 안정 영역이 좁은 것을 볼 수 있으나 잔존 활성은 90% 이상으로 높게 나타났다.

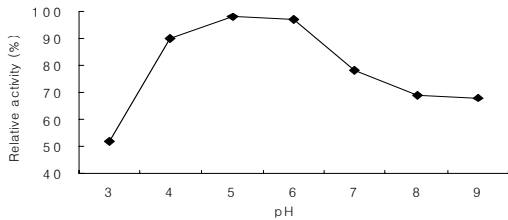


Fig. 8. Effect of pH on stability of the fibrinolytic enzyme activity of Cattail pollen.

3) 최적 온도

Fibrinolytic enzyme 의 온도 안정성을 조사하기 위하여 1% casein을 기질로 하여 30℃에서 80℃까지 효소 활성을 측정한 결과는 Fig. 9와 같다.

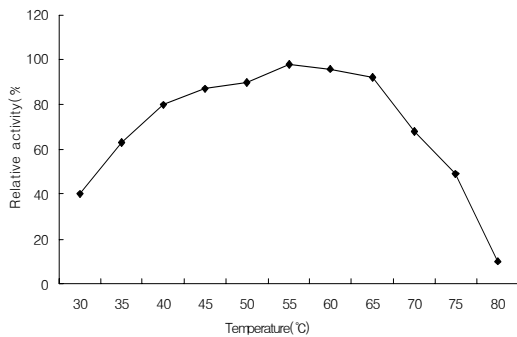


Fig. 9. Effect of temperature on the activity of fibrinolytic enzyme activity of Cattail pollen.

정제효소의 최적온도는 55℃ 이었으며 80℃ 이상에서는 효소활성이 나타나지 않았다. 이 효소

의 최적 온도는 청국장(12)의 혈전 용해 효소 보다는 낮고 또 *Bacillus* sp. (20)가 생산하는 단백질 분해 효소보다는 높은 최적온도를 보였다.

4) 온도 안정성

정제효소의 온도 안정성을 조사하기 위하여 1% casein을 기질로 하여 30℃에서 80℃까지 30분간 반응 시키면서 효소 활성을 조사한 결과는 Fig. 10과 같다. 본 효소는 30~60℃까지는 안정하였으나 그 이상의 온도에서는 급격히 활성이 감소하였다.

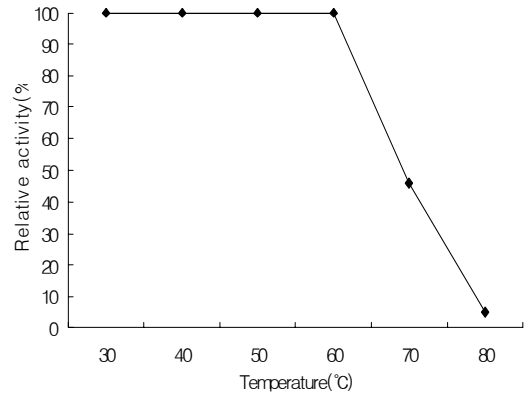


Fig. 10. Temperature stability for purified fibrinolytic enzyme activity of Cattail pollen.

5) 금속이온의 영향

정제효소 액에 금속이온을 1 mM이 되도록 첨가하여 40℃에서 60분간 작용시킨 후 효소의 활성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. Na⁺, K⁺ 등은 효소 활성에 영향을 미치지 않았으나 Zn²⁺, Fe²⁺는 심하게 저해작용을 나타냈다. 한편 할미송이버섯(13)의 혈전 용해 효소와 새우젓(14)의 혈전 용해 효소에 금속이온 영향에서는 Zn²⁺의 존재가 효소 활성을 저해하기 보다는 활성을 증가

하였다고 보고하여 다른 결과를 나타내었다.

6) 저해제의 영향

정제효소 액에 저해제를 10mM 농도로 첨가하여 이들이 효소활성에 미치는 영향을 검토한 결과 PMSF, iodoacetic acid 및 SDS에 의하여 심하게 저해되는 것으로 보아 serine protease로 추정되었고 SDS 에 의하여 저해 받는 결과로 미루어 볼 때 S-S기가 존재할 것으로 사료된다 이는 청국장(12)의 혈전용해 효소와 새우(14)의 혈전용해 효소에서 PMSF가 심하게 저해한다는 보고와 비슷한 경향이였다.

7) 기질 특이성

여러 기질을 0.1M Tris 완충액(pH 7.5)에 용해

fibrin이 가장 잘 분해되었으며 casein, κ -casein, α -casein, β -casein, BSA순으로 나타났다. 이와 같은 기질 특이성의 차이는 protein에 작용하는 proteinase의 작용부위에 관련이 있을 것으로 생각된다(21).

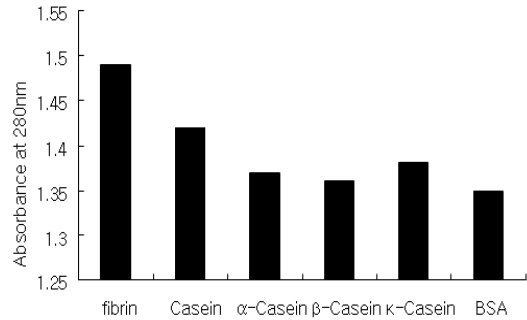


Fig. 11. Substrate specificity on the purified fibrinolytic enzyme activity of Cattail pollen.

Table 3. Effect of metal ions on the purified fibrinolytic enzyme activity of Cattail pollen

Metal ions (5×10^{-3})	Relative activity(%)
None	100.0
Na ⁺	101.0
K ⁺	100.6
Ca ²⁺	90.7
Fe ²⁺	53.9
Mg ²⁺	93.0
Zn ²⁺	60.4

Table 4. Effect of inhibitors on the purified fibrinolytic enzyme activity of Cattail pollen

Chemical reagents	Concentration	Relative activity(%)
PMSF	10mM	15.4
Iodoacetic acid	10mM	30.7
SDS	10mM	44.1
EDTA	10mM	78.1
Sodium oxalate	10mM	46.2
EGTA	10mM	78.1
α -phenanthroline	10mM	48.5

하고 40°C에서 반응시킨 결과 Fig. 11와 같이

8) 반응 속도에 미치는 기질의 영향

Casein을 기질로 하여 효소작용 시킨 후 반응 속도의 상수를 Lineweaver-Burk plot(18) 상에서 작도한 결과는 Fig. 12와 같다.

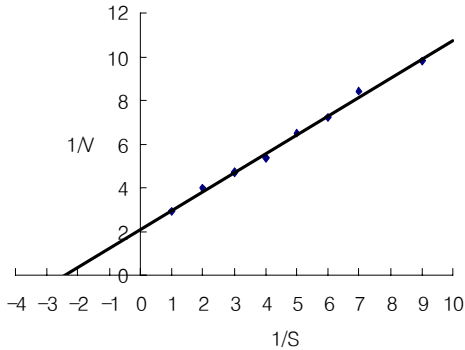


Fig. 12. Lineweaver-burk plot on the purified fibrinolytic enzyme of Cattail pollen.

본 효소의 Km값은 효소 ml당 0.44mM로써 본 기질에 대한 친화력이 높다는 것을 알 수 있었다. 이는 청국장(12)의 혈전용해 효소 연구에서 보고된 0.31mM보다는 높았다.

IV. 요약

부들 화분(蒲黃)의 혈전 용해능을 검토하기 위하여 부들 화분을 물 추출하여 혈전 분해능이 있음을 확인하였다. 부들 화분의 혈전용해효소를 DEAE-cellulose, Sephadex G-150을 이용한 gel filtration, HPLC로 정제하여acrylamide gel electrophoresis로 정제를 하였다. 정제효소는 HPLC와 전기영동에 의하여 순수하게 정제되었음을 확인하였고 비활성은 38U/mg로서 정제도는 86.4배 이었고 분자량은 75kDa이었다. 정제효소의 최적

pH는 4.0이었고 pH 4.0-6.0에서 안정하였으며 정제효소의 최적온도는 55℃이었고 30-60℃에서는 안정하였으나 70℃ 부터 활성이 현저히 저하하여 80℃ 이상에서는 완전히 실활하였다. 기질특이성은 fibrin을 가장 잘 분해하였고 fibrin, whole casein, κ-casein, α-casein, β-casein, BSA순으로 나타났다. Casein을 기질로 하였을 때 Km value는 0.44 mM 이었으며 casein에 대한 친화력이 높은 것으로 나타났다. 효소활성에 미치는 금속이온의 영향은 K⁺, Na⁺, Mg²⁺ 등은 효소반응에 영향을 미치지 않았으나 Zn²⁺, Fe²⁺는 심하게 저해작용을 나타내었고 정제효소는 PMSF, iodoacetic acid 및 SDS에 의하여 심하게 저해되는 것으로 보아 serine protease로 추정되었다.

참고 문헌

1. 구자형. (2007) 습담을 활용한 부들의 재배 및 이용기술 개발. 농림기술개발사업. 24.
2. 홍문화. (1999) 허준 동의보감. 313.
3. Kwon, S.J., Lim, C.Y., Kim, J.S., Park, M.H., Lee, S.Y. (2006) Fibrinolytic Activities and Effects of Gamma-Irradiated on Seeds from Coix Lacryma-jobi L., Carthamus tinctorius L. and Malva verticillata L. *Biotechnology and Bioprocess Engineering J.* 21: 20-27.
4. Ruggeri, J.R. and Zimmerman, T.S. (1985) Platelets and Wilebrands disease. *Semin. Hematol.* 22: 203-206.
5. Lee, M.Y. and Yum, Y.K. (2004) Studies on the fibrinolytic activities from natural products. *Soonchunhyang J. Nat, Sci.* 10(2): 379-383.
6. Chung, K.H. and Kim, D.S. (1992) Fibrinolytic and cogulation activities of Korean snake venoms. *kor. Biochem J.* 25:696-701

7. 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.
8. Mihara, H., Nakajima, N. and Sumi, H. (1993) characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci biotech Biochem.* 57(10): 1730- 1735.
9. Lee, S.Y., Kim, J.S., Kim, J.U. (2005) Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of *Armillaria mellea*. *Protein Expression and Purification.* 43:10-17.
10. Sumi, H. (1987) Development of nattokinase and healthy natto. *Bioindustry.* 7: 723-731.
11. Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and muraki, H. (1987) A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto: a typical and popular soybeen food in the Japanese diet. *Experimentia.* 43: 1110-111.
12. Yoo, C.K., Seo, W.S., Lee, C.S., and Kang, S.M. (1998) Purification and Characterization of Fibrinolytic Enzyme Excreted by Bacillus subtilis K-54 Isolated from Chung Guk Jang. *Korean J. Appl. Microbial. Biotechnol.* 26(6): 507-514.
13. Kim, J.H. (2000) Purification and Characterization of Fibrinolytic Enzyme from Tricholoma saponaceum(II). *Korean J. Biomed. Lab. Sci.* 6(4): 261-268.
14. Hua, Y., Jiang, B., Mine, Y. (2008) Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus sp.* Nov. SK006 isolated from an asian traditional fermented shrimp paste. China. *J. Agric. Food Chem.* 56: 1451-1457.
15. Robbins, K. C. and L. Summaria. (1966) Human plasminogen and plasmin. *Method in enzymol.* 101:184-187
16. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J. and Randall, A.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.
17. Laemmli, U.K. (1970) *Nature.* 227: 680-685.
18. Lineweaver, H. and D. Burk. (1934) *J. Amer. Chem. Soc.* 56:658.
19. Zhang, Y., Cui, J., Zhang, R., Wang, Y., Hong, M. (2007) A novel fibrinolytic serin protease from the polychete *Nereis(Neanthes) virens (Sars)*: purification and characterization. *Biochimie,* 89: 93-103.
20. 황지원, 박상현, 안희영, 조영수. (2005) 혈전 용해 효소를 생산하는 Bacillus sp.의 분리·동정 및 배양학적 특성. *한국 생명과학회.* 44: 237-237.
21. 윤성식, 소명환, 이영엽 이수원 (1991) Pseudomonas sp. K101이 생산하는 단백분해 효소의 특성. *한국 한국낙농학회* 13: 116-123.