

유산균 발효에 의한 겨우사리 중의 렉틴 성분의 변화 —분리 및 정제—

박원봉* · 김희숙

서울여자대학교 자연과학대학 화학과

(Received October 14, 1994)

Changes of Lectin from *Viscum coloratum* by Fermentation with *Lactobacillus plantarum* — Isolation and Purification —

Won-Bong Park and Hee-Sook Kim

Department of Chemistry, College of Natural Science, Seoul Woman's University, Seoul 139-774, Korea

Abstract—Lectin from mistletoe(*Viscum coloratum*) fermented by *Lactobacillus plantarum* for 1,2,3 days were obtained by salt fractionation, gel filtration, anion exchange chromatography and SDS-PAGE, and compared with the lectin from unfermented mistletoe. The new lectin of molecular weight of about 18,500D from fermented mistletoe was identified.

Keywords □ *Viscum coloratum*(mistletoe), fermentation, lectin, *Lactobacillus plantarum*

겨우사리(*Viscum coloratum*, mistletoe)는 한방명으로는 기생목(寄生木), 해기생(解寄生), 표기생(票寄生) 등으로 불리어지는데, 고혈압, 동맥경화증 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 최근에는 겨우사리의 항종양 효과에 관한 많은 연구들이 보고되고 있다.¹⁾ 특히, 발효시킨 겨우사리(Iscador®)는 오래전부터 암치료에 이용되어 왔는데, 폐암, 결장암, 유방암 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 기타 많은 임상시험이 시도되고 있다.²⁾ 발효한 겨우사리는 종양세포의 성장을 억제하고, 체액성 면역체계와 세포성 면역체계를 자극하며 암환자의 자연살해세포(NK cell)의 활성을 강화하는 것으로 알려져 있다.³⁾ 또한 발효시킨 겨우사리는 쥐의 hepatoma tissue culture(HTC) 세포의 성장 억제에, 발효시키지 않은 겨우사리는 leukemia Molt 4 세포에 대해 더 효과적인 것으로 보고되었다.⁴⁾

겨우사리 렉틴은 주로 유럽에서 유럽산 겨우사리(*Viscum album*)에 대하여 많이 연구되어 왔는데, 우리나라에서 자라는 겨우사리에 대한 연구는 드문 편

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

이다. 겨우사리에서 활성을 갖는 단백질인 렉틴은 단백질 혹은 당단백질로 되어 있고, 당과의 2~6개의 결합부위를 가지고 있으며 분자량, subunit등이 매우 다양하다. 2개의 subunit가 각기 다른 특성을 갖는 A-chain(active-chain)과 B-chain(binding-chain)이 disulfide bond에 의해 결합되어 있는, 분자량이 60,000D정도인 것이 있으며, 이러한 것이 2개, 즉, 4개의 subunit가 비공유의 약한 상호작용에 의해 연결되어 있는, 분자량이 120,000D정도인 agglutinin이 있다.⁴⁻⁷⁾ 렉틴의 A-chain은 active chain으로 B-chain이 세포표면의 수용체에 결합하면 세포내부로 침투하여 진핵세포의 리보조음을 불활성화 시켜서 단백질 합성을 저해시키는 작용을 하며, B-chain은 binding chain으로 세포표면의 당과 항원-항체의 결합력과 비슷하거나 더 큰 힘으로 결합하는 subunit이다.⁷⁾ 한편, A-chain을 단일클론성항체에 붙여서 immunotoxin을 만들어 그 항체의 목적 세포에만 특이적으로 작용할 수 있게 하여 악성세포를 죽이는데 A-chain을 이용할 수 있으며,⁸⁾ PAP(type 1 RIPs의 하나)와 transferrin 수용체를 붙여서 만든 immunotoxin을 이용하여 사

람의 유방암 세포(MCF-7)를 효과적으로 죽일 수 있다는 보고도 있다.^{9,10} 이와 같이 많은 종류의 immunotoxin들이 암의 화학적 치료법에 이용되고 있고, 또 이종이식에 의해 생긴 이종의 T-림프구를 죽임으로써 이식수술에 의한 부작용을 막는데도 이용되고 있다.^{11,12} 렉틴의 또 다른 중요한 생리 활성으로는 림프구 자극 분열 효과가 있는데, 대부분의 렉틴이 T-림프구를 자극 분열시키지만 B-림프구를 자극 분열하는 렉틴도 보고된 바 있다.¹³ 이러한 특성을 갖는 렉틴은 식물체에 널리 존재하며, 식물은 동물과는 달리 면역 체계를 가지고 있지 않기 때문에 렉틴이 세포 표면에 붙어서 그러한 역할을 수행하도록 하는 것으로 추측되고 있다.¹⁴

본 연구팀은 우리나라의 겨우사리의 단백질질을 분리, 정제하여 그 특성을 조사한 결과, 분자량 66,000D의 렉틴이 있으며, 이 렉틴은 28,000D의 A-chain과 33,000D의 B-chain이 disulfide결합에 의하여 연결되어 있는 것으로 나타났다. 또한 pH 3.77~8.71와 온도 40°C 이하에서 렉틴의 활성이 100% 유지되는 것을 알 수 있었으며 N-acetyl-D-galactosamine에 대하여 강한 당특이성이 있는 것으로 나타났다.¹⁵ 본 연구에서는 겨우사리를 유산균으로 1, 2, 3일간 발효시킨 것을 겔 여과와 음이온 교환 column chromatography에 의하여 렉틴 성분을 분리, 정제하여 활성을 측정하고 전기영동에 의하여 순도를 검정하여 겨우사리의 렉틴이 발효에 의하여 어떻게 변화하였는가를 알아보았다.

실험방법

실험재료—본 실험에 사용한 겨우사리(*Viscum coloratum*)는 강원도 고성에서 참나무와 배나무에 기생하는 것을 1~2월 중에 채취하여 -20°C에 보관한 것이며, 동덕여자대학교의 도상학 교수가 감정하였다. 겨우사리의 발효에 사용한 균주는 Dr. Hansen's lab (Denmark)에서 기증받은 *Lactobacillus plantarum* (Vege-Start 10)을 사용하였다.

시약—Sephadex G-75는 Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden)에서, DEAE-Cellulose C 54 5는 Fluka Chemie AG.에서 구입하였고, 단백질 표준분자량 marker와 D-galactosamine, N-acetyl-D-galactosamine은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였

으며 기타시약은 시중에서 특급 내지 일반시약을 구입하여 사용하였다.

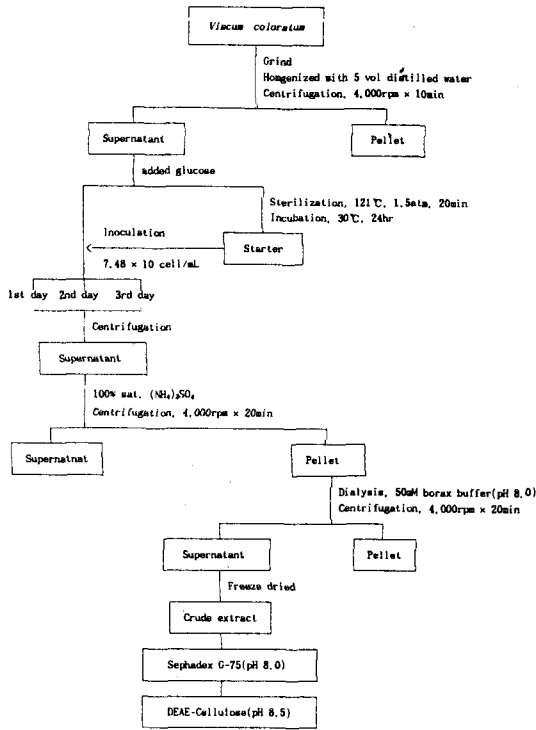
기기—본 실험에서는 Diode array UV-vis spectrophotometer(Hewlett Packard 8452A), Mini cell (Novex CA 92121), Fraction collector(Vision Scientific Co.), Peristaltic pump(Vision Scientific Co.), Incubator(Sewon Instrument Co.), pH meter(Sun-tex) 등의 기기를 사용하였다.

Crude extract 추출—겨우사리 100 g을 50 mM sodium tetraborate(borax) 완충용액(pH 8.00) 500 ml와 함께 2회 분쇄하고, 10분간 원심분리(4,000 rpm)하여 상정액을 취하였다. 100% 포화(NH₄)₂SO₄로 단백질을 침전시키고 다시 20분간 원심분리하여 얻어진 침전물을 소량의 50 mM borax 완충용액(pH 8.00)에 녹여 투석막에 넣어 4°C에서 48시간 동일한 완충용액으로 투석한 후, 원심분리하여 불용성 물질을 제거하고 동결건조하였다.

발효—겨우사리 400 g을 증류수 2 l와 함께 분쇄하여, 10분간 원심분리(4,000 rpm)하여 상정액을 취하여 포도당(7% w/v)을 첨가하였다. 포도당을 첨가한 액의 일부는 121°C, 1.5기압에서 20분간 멸균하여 유산균(*Lactobacillus plantarum*)을 접종하고, 30°C에서 24시간 정지 배양하였다. 이 배양액을 균수가 7.48×10⁷ cell/ml가 되도록 멸균하지 않은 겨우사리액에 접종한 후, 30°C에서 24시간 간격으로 시료를 채취하면서 72시간 동안 발효시켰다. pH를 측정하여 유산균이 성장하고 있는가를 확인한 후, 4,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상정액을 단백질 정제에 사용하였다. 발효 과정 및 단백질 정제 과정을 Scheme I에 도시하였다.

적혈구 응집반응에 의한 렉틴 활성측정—주사기로 사람 B형 혈액을 5 ml를 뽑아서 1 ml Alsever's 용액*이 들어있는 vial에 넣었다. 10배량의 0.15M NaCl로 부유시켜 세척한 후 회석하여 3% 적혈구 부유액을 얻었다. Well plate에 0.15M NaCl 50 μl를 넣고 시료 50 μl를 첨가하여 2배수로 단계적으로 회석한 후, 3% 적혈구 부유액 50 μl를 가하고, 37°C에서 1시간 배양시킨 후, 대조표준과 비교하여 응집유무를 확인하였다.

Sephadex G-75 gel chromatography(pH 8.00)—Crude extract를 소량의 50 mM borax 완충용액(pH 8.00)에 녹인 후, 동일한 완충용액으로 미리 평형시켜둔 Sephadex G-75 column(3.3×60 cm)에 주입하



Scheme 1

였다. 유속을 15 ml/hr으로 하여 겔 여과를 실시하였다. 각 분획의 단백질 성분은 280 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였고, 렉틴 활성은 사람 B형 적혈구 응집반응으로 확인하였다. 렉틴 활성을 나타낸 분획을 모아서 100% 포화(NH₄)₂SO₄로 침전시키고 4°C에서 50 mM tris-HCl 완충용액(pH 8.50)으로 48시간 투석하여 다음 정제 단계의 시료로 사용하였다.

DEAE-Cellulose C 545 column chromatography (pH 8.50)—전항에서 얻어진 시료를 50 mM tris-HCl 완충용액(pH 8.50)으로 미리 평형시켜둔 DEAE-cellulose C 545 column(1.6×25 cm)에 주입하였다. 유속을 15 ml/hr로 하여 약 150 ml의 비흡착 단백질 분획을 받아 렉틴 활성을 확인하고, column에 흡착되어 있는 단백질은 NaCl 농도를 0.05M, 0.10M, 0.15M, 0.20M, 0.30M, 0.40M로 변화시키면서 step-wise salt gradient 방법에 의해 분리한 후, 사람 B형 적혈구 응집반응을 실시하여 렉틴활성을 가지는 분획을 찾았다.

Sephadex G-75 겔 여과에 의한 검정 곡선 작성—Bovine serum albumin(m.w: 66,000D), pepsin(m.w: 34,000D), lysozyme(m.w: 14,700D)을 50 mM bo-

rax 완충용액(pH 8.00)에 녹인 후, 동일한 완충용액으로 미리 평형시켜 둔 Sephadex G-75 column(3.3×60 cm)에 주입하고, 유속을 15 ml/hr로 하여 겔 여과를 실시하였다.

SDS-PAGE에 의한 분자량 측정—전기영동은 Weber 등¹⁶⁾의 방법을 이용하여 실시하였다. 시료 및 표준 분자량 단백질 50 μ에 sample buffer 50 μ(0.2% BPB 함유)를 넣은 다음 98~100°C에서 1분 30초간 반응시켰다. 미리 만들어 굳혀 놓은 겔에 시료를 50 μ씩 주입하고 stacking 겔에서 15 mA, 80V로 1시간 전개시킨 다음, separating 겔에서 30 mA, 200V에서 2~3시간 전개시켰다. 이 때 시료를 SDS만 처리한 것과 SDS와 2-mercaptoethanol로 처리한 것의 두 가지로 하였다. 0.125% Coomassie blue용액으로 염색한 후 탈색하여 단백질의 띠를 확인하였다.

결과 및 고찰

발효한 겨우사리 중의 렉틴의 분리—1일간 발효하여 얻은 단백질을 Sephadex G-75 column(pH 8.00)으로 겔 여과하여 검정곡선으로부터 분자량을 추정하였고, Fig. 3와 같은 결과를 얻었다. 분획번호 21~25의 분자량 66,000D부근에서 작은 피크와 그 이하의 전 범위에 걸쳐 크고 넓게 퍼진 피크가 나타

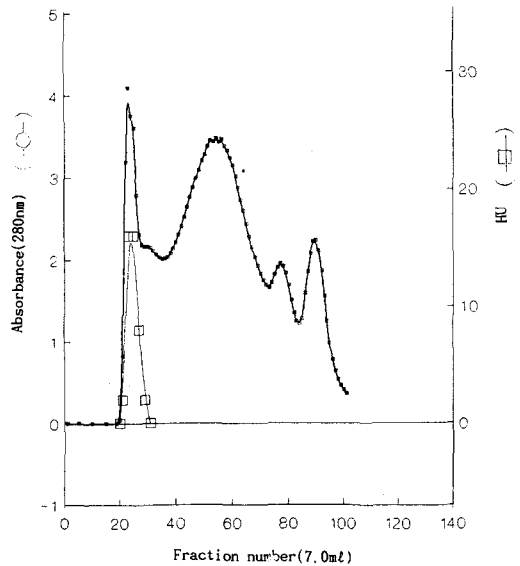


Fig. 1—Gel filtration of crude extract of unfermented *Viscum coloratum* on Sephadex G-75, column: 3.3×60 cm, flow rate: 30 ml/hr.

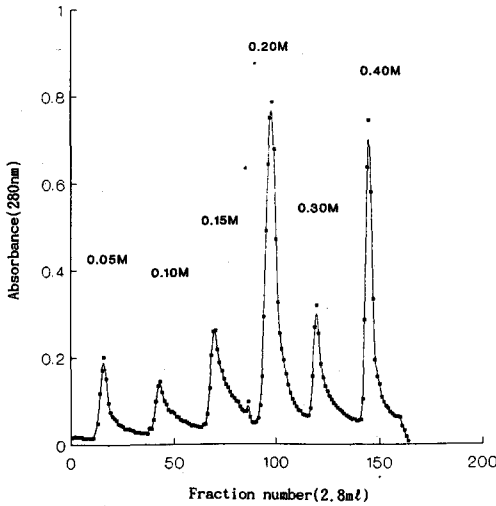


Fig. 2—DEAE-Cellulose chromatogram of fraction eluted from Sephadex G-75(unfermented), column: 1.6×25 cm, flow rate: 15 ml/hr.

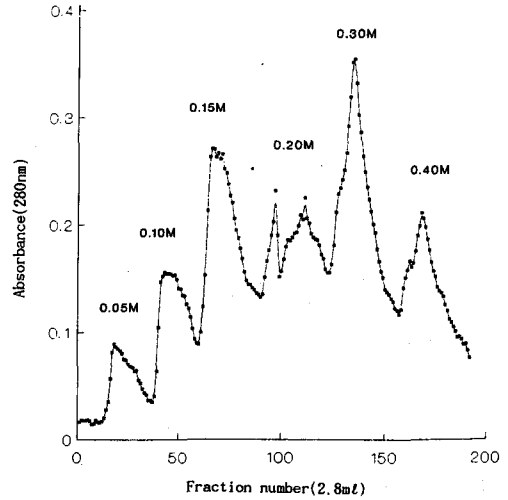


Fig. 4—DEAE-Cellulose chromatogram of fraction eluted from Sephadex G-75(fermented for 1 day), column: 1.6×25 cm, flow rate: 15 ml/hr.

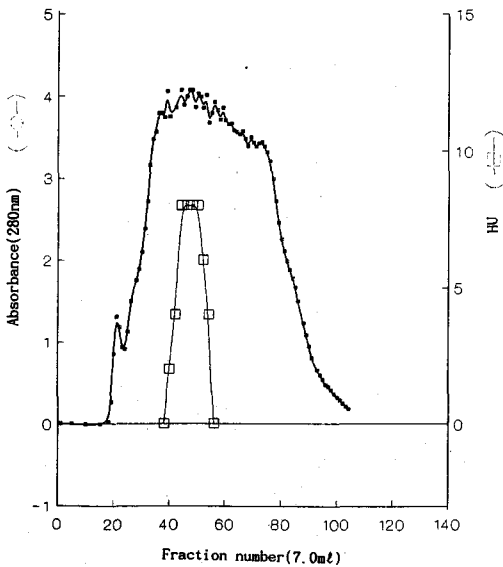


Fig. 3—Gel filtration of crude extract of *Viscum coloratum* fermented for 1 day on Sephadex G-75, column: 3.3×60 cm, flow rate: 30 ml/hr.

났으며, 발효하지 않은 시료의 결과(Fig. 1)와 비교하여 보면, 분획 번호 80 이하의 작은 분자량의 피이크가 없어지고, 분자량 60,000D 부근에 있던 피이크의 크기가 상당히 작아진 것으로 보아 발효에 의해서 60,000D 부근의 단백질이 더 작은 분자량의 단백질로 분해된 것으로 추측된다. 렉틴 활성이 있는 분획을 찾기 위해 사람 B형 적혈구 응집반응을 실시한 결과

발효하지 않은 겨우사리에는 없었던 분획 번호 42~54(22,000D~15,000D) 범위에서 활성이 나타났으며 이는 새로운 렉틴이 합성되었기 때문으로 추측된다. 그러나 발효하지 않은 시료에서 나타났던 분자량 60,000D 부근에서의 렉틴 활성이 없어진 것으로 보아 렉틴이 분해된 것으로 추측된다.

렉틴 활성을 나타내는 분획을 모아서 농축하여 DEAE-cellulose 음이온 교환 column chromatography를 실시하여 150 ml의 비흡착 단백질을 받은 후, step-wise salt gradient를 실시하여 Fig. 4와 같은 결과를 얻었다. 비흡착 부분에서 하나의 피이크를 얻었으나 적혈구 응집반응을 실시한 결과 활성을 나타내지 않았으며, 흡착부분을 salt gradient를 실시한 부분에서는 발효하지 않은 겨우사리의 결과(Fig. 2)와는 달리 0.20M에서 2개의 피이크를 얻었고 나머지 각각의 농도에서는 1개씩의 피이크를 얻었다. 이 각 분획들을 사람 B형 적혈구로 응집반응을 실시한 결과 발효하지 않은 겨우사리의 렉틴은 NaCl 농도 0.20M과 0.30M에서 용출된 분획이 가장 큰 활성을 나타냈으나¹⁰ 1일간 발효한 겨우사리에서는 NaCl 농도 0.15M에서 8HU로 가장 강한 활성이 나타났다.

2일간 발효하여 얻은 단백질을 Sephadex G-75 column(pH 8.00)으로 겔 여과를 실시하여 1일간 발효시켰을 때와 유사한 Fig. 5와 같은 결과를 얻었다. 사람 B형 적혈구 응집반응에 의해서 렉틴 활성을 나타내는 분획은 1일간 발효했을 때와 마찬가지로 분

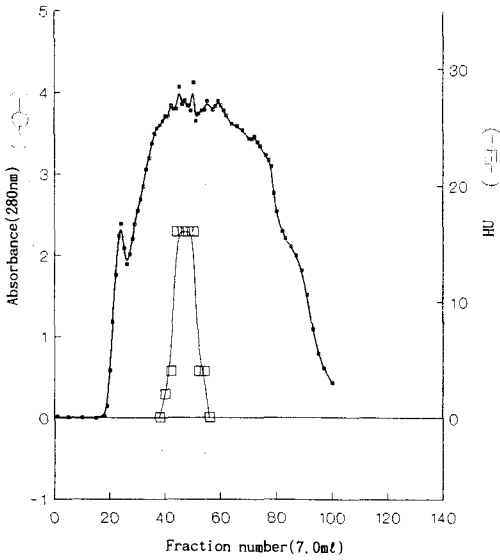


Fig. 5—Gel filtration of crude extract of *Viscum coloratum* fermented for 2 days on Sephadex G-75, column: 3.3×60 cm, flow rate: 30 ml/hr.

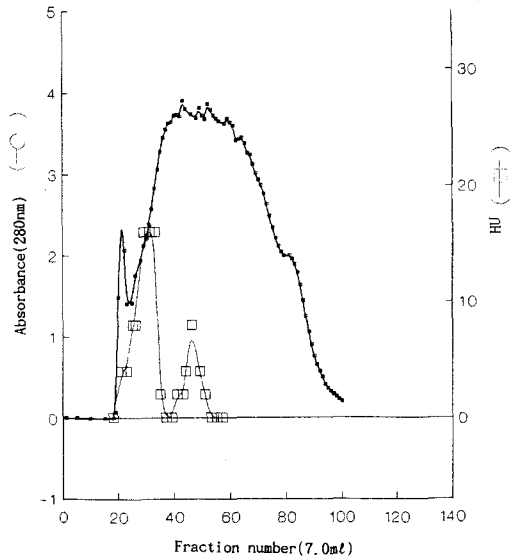


Fig. 7—Gel filtration of crude extract of *Viscum coloratum* fermented for 3 days on Sephadex G-75, column: 3.3×cm, flow rate: 30 ml/hr.

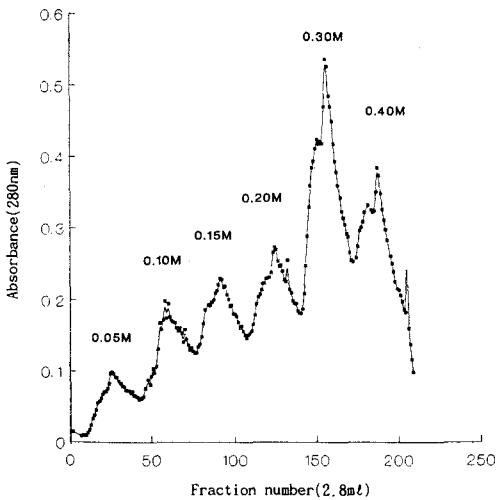


Fig. 6—DEAE-Cellulose chromatogram of fraction eluted from Sephadex G-75(fermented for 2 days), column: 3.3×60 cm, flow rate: 15 ml/hr.

획번호 42~54(22,000D~15,000D)범위에서 나타났다. 이것을 DEAE-cellulose로 음이온 교환 column chromatography(pH 8.50)를 실시하여 Fig. 6과 같은 결과를 얻었다. 비흡착 부분에서 흡광도 0.1 이하의 작은 피이크가 나타났으나 적혈구 응집반응에 의한 활성이 나타나지 않았으며, salt gradient한 부분에서 각각의 농도에서 한개씩의 피이크가 나왔다. NaCl농

도 0.30M에서 흡광도 0.5이상의 가장 큰 피이크가 얻어졌고, 사람 B형 적혈구 응집반응 결과 1일간 발효시켰을 때와 같은 NaCl농도 0.15M에서 4HU의 활성이 나타났다. 이것을 표준 분자량 marker와 함께 전기영동하여 순도 및 분자량을 측정하였다.

3일간 발효하여 얻은 단백질을 Sephadex G-75 column(pH 8.00)으로 겔 여과를 실시하여 Fig. 7과 같은 결과를 얻었다. 1일, 2일간 발효했을 때와 유사한 profile을 얻었지만, 사람 B형 적혈구 응집반응 결과 두 부분에서 렉틴 활성이 나타났다. 1, 2일간 발효시와 같은 분획 번호 42~54(22,000D~15,000D) 부근과 발효하지 않은 시료와 유사한 분획 번호 21~34(60,000D~25,000D)부근의 영역에서 활성이 나타났다. 이것은 1일, 2일간 발효에 의해 저분량으로 분해되었던 렉틴이 3일 발효후 다시 고분자량의 물질로 된 것으로 추측된다. 활성을 갖는 두 분획을 DEAE-cellulose로 음이온 교환 column chromatography(pH 8.50)를 실시하여 분획번호 42~54의 시료의 결과는 Fig. 8에, 분획번호 21~34의 시료의 결과는 Fig. 9에 나타내었다. 비흡착 부분에서도 흡광도 0.3 이상의 상당히 큰 피이크가 나타났으나 렉틴의 활성을 나타내지 않았으며, Fig. 8을 보면 salt gradient한 부분에서 각각의 농도마다 하나씩의 비교적 깨끗한 피이크들이 얻어졌으며, 1일, 2일간 발효시의 결과와 마찬가지로

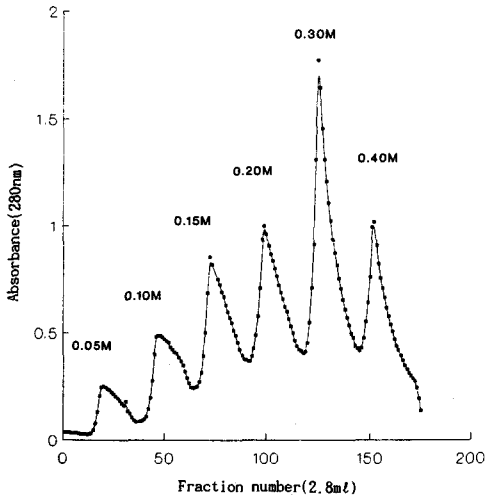


Fig. 8—DEAE-Cellulose chromatogram of 42~54 fraction eluted from Sephadex G-75(fermented for 3 days), column: 1.6×25 cm, flow rate: 15 ml/hr.

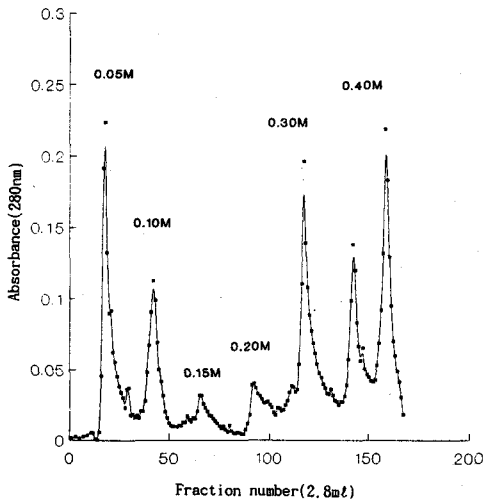


Fig. 9—DEAE-Cellulose chromatogram of 21~34 fraction eluted from Sephadex G-75(fermented for 3 days), column: 1.6×25 cm, flow rate: 15 ml/hr.

가지로 NaCl농도 0.30M에서 가장 큰 피이크가 나타났으며 전체적인 profile은 2일의 것과 유사하였다. 사람 B형 적혈구 응집력을 시험하여 렉틴 활성을 가지고 있는 분획이 NaCl농도 0.15M임을 알았다. Fig. 9를 보면 NaCl농도 0.15M, 0.20M에서는 매우 작은 피이크가 나타났으며, 0.40M에서 2개의 피이크가 나타났다. 사람 B형 적혈구 응집반응 결과 0.05M과

0.10M에서 각각 8HU로 가장 큰 활성이 나타났다.

발효한 시료와 발효하지 않은 시료를 비교해 보면 분자량 60,000D부근에 있던 피이크가 상당히 작아지고, 또한 그 부분에서의 렉틴활성이 없어지고 발효에 의해 분획번호 42~54(22,000D~15,000D)에서 나타나고 3일 발효후 다시 66,000D부근의 활성이 있는 렉틴이 나타나는 것으로 보아 발효과정에 의해 단백질의 성질이 달라지는 것을 알 수 있다. 그러나 1일, 2일과 3일 발효한 시료중 42~54 분획은 겔 여과의 profile이 서로 비슷하고 척혈구 응집력을 나타냈을 뿐만 아니라 음이온 교환 chromatography에서도 모두 0.15M에서 렉틴 활성을 나타내는 것으로 보아 이들 분획의 1~3일간의 발효기간에 따른 단백질의 변화는 별로 없었던 것으로 생각된다. 또한 같은 NaCl 농도에서 분리된 것으로 보아 서로 유사한 특징을 가질 것으로 추측된다.

순도 검정 및 분자량 측정—β-Galactosidase(m.w: 116,000D), phosphorylase(m.w: 97,000D), albumin(m.w: 66,000D), fumarase(m.w: 48,500D), carbonic anhydrase(m.w: 28,000D)의 5개의 표준 분자량 단백질과 발효하지 않은 시료, 1,2,3일간 발효한 시료의

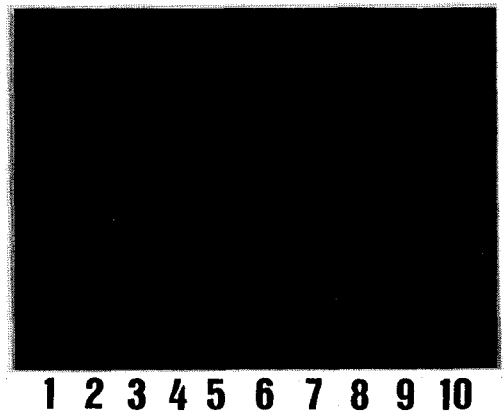


Fig. 10—SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of crude extracts.

lane 1 and 6: standard marker proteins,
lane 2 and 7: unfermented,
lane 3 and 8: fermented for 1 day,
lane 4 and 9: fermented for 2 days,
lane 5 and 10: fermented for 3 days,
lane 1~5: treated with SDS,
lane 6~10: treated with SDS and 2-mercaptoethanol.

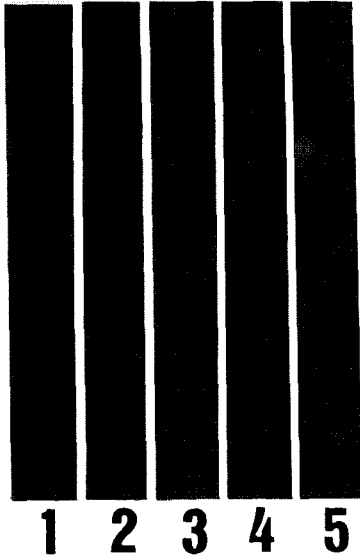


Fig. 11—SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of proteins purified from unfermented *Viscum coloratum*,
 lane 1: standard marker proteins,
 lane 2 and 4: 0.20M fraction of DEAE-cellulose,
 lane 3 and 5: 0.30M fraction of DEAE-cellulose,
 lane 2 and 3: treated with SDS,
 lane 4 and 5: treated with SDS and 2-mercaptoethanol.

crude extract를 전기영동하여 그 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 전체적으로 발효하지 않은 것에 비해 발효시킨 것의 전기영동 띠가 적음을 알 수 있다. SDS로만 처리한 것의 경우, 발효시키지 않은 것은 분자량 60,000D부터 17,000D에 걸쳐 고르게 분포하고 있는데, 발효에 의해 띠 수가 많이 줄어들었음을 알 수 있다. SDS와 2-mercaptoethanol로 처리한 것의 경우, SDS로만 처리한 것과 마찬가지로 띠 수가 줄었음을 알 수 있고, 1, 2, 3일간 발효한 것의 분자량 18,000D 이하의 띠가 발효하지 않은 것에 비해 진해진 것으로 보아 발효에 의해 고분자량의 단백질이 18,000D 정도의 분자량을 가진 단백질로 분해되었음을 알 수 있다. 또한, SDS로만 처리한 것과 SDS와 2-mercaptoethanol로 처리한 것을 비교하여 보면, SDS와 2-mercaptoethanol로 처리한 것에서 분자량 60,000D 정도의 띠가 흐려지고 30,000D 정도의 띠가 진해진



Fig. 12—SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of proteins purified from *Viscum coloratum* fermented for 1 day,
 lane 1: standard marker proteins,
 lane 2: 0.15M fraction of DEAE-cellulose, treated with SDS,
 lane 3: 0.15M fraction of DEAE-cellulose, treated with SDS and 2-mercaptoethanol.

것으로 보아 최소한 2개의 분자량 30,000D정도인 subunit가 external disulfide 결합에 의해 연결되어 있는 단백질이 존재하고 있는 것으로 추측된다.

또한 겔 여과와 음이온 교환 chromatography에 의해 분리된 렉틴활성을 나타낸 분획 번호 42~54 (22,000D~15,000D)와 NaCl농도 0.15M에서 용출된 정제된 분획을 전기영동하여 순도 검정을 하였고, 검정 곡선으로 부터 분자량을 추정하여 Fig. 11~Fig. 14에 나타내었다. 1일간 발효한 겨우사리의 결과인 Fig. 12를 보면, 발효전의 것(Fig. 11)과는 달리 Lane 2(SDS만 처리한 것)와 lane 3(2-mercaptoethanol을 함께 처리한 것)을 비교하여 보면, lane 2와 3에서 이동도가 매우 큰 단일 띠가 나타나고 분자량의 변화가 없는 것을 알 수 있다. 이것은 단백질 분자에 external disulfide 결합이 없음을 의미하고, 발효에 의해서 A-chain과 B-chain사이의 disulfide 결합이 끊어졌을 가능성이 있으며 렉틴 활성을 나타내는 것으로 보아 B-chain의 당 결합부위가 렉틴으로 부터 분리되었음을 나타낸다. 그러므로 본 실험에서 분리된

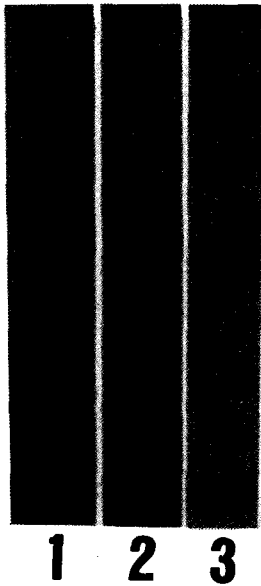


Fig. 13—SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of proteins purified from *Viscum coloratum* fermented for 2 days,
lane 1: standard marker proteins,
lane 2: 0.15M fraction of DEAE-cellulose, treated with SDS,
lane 3: 0.15M fraction of DEAE-cellulose, treated with SDS and 2-mercaptoethanol.

렉틴은 A-chain을 가지고 있지 않을 것으로 생각된다. 점정곡선으로부터 렉틴의 분자량을 계산하여 18,200 D임을 확인하였다.

2일간 발효한 시료의 결과를 Fig. 13에 나타내었으며, 분자량을 계산하여 약 18,500D임을 알았고, 1일간 발효한 것과 마찬가지로 B-chain만을 가지고 있는 렉틴으로 생각된다.

3일간 발효한 시료의 결과를 Fig. 14에 나타내었다. 42~54 분획을 음이온 교환 chromatography하여 얻은 0.15M 분획에서 하나의 띠가 나타났고(lane 4, lane 7) 분자량을 측정된 결과 약 18,500D임을 알았다. 1일, 2일간 발효했을 때와 마찬가지로 B-chain만을 가지고 있는 것으로 생각된다. 21~34분획을 음이온교환 chromatography하여 얻은 0.05M, 0.1M 분획에서는 하나의 진한 띠와 여러개의 약한 흐린 띠가 나타났으므로 더욱 분리 확인할 필요가 있다고 생각된다.

결 론

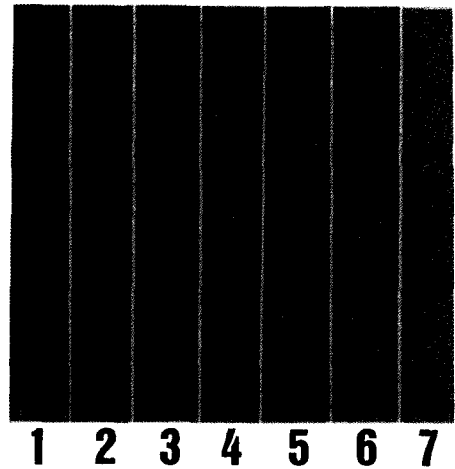


Fig. 14—SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of proteins purified from *Viscum coloratum* fermented for 3 days, treated with SDS,
lane 1: standard marker proteins,
lane 2 and 5: 0.05M fraction of DEAE-cellulose,
lane 3 and 6: 0.10M fraction of DEAE-cellulose,
lane 4 and 7: 0.15M fraction of DEAE-cellulose,
lane 2, 3, and 4: treated with SDS,
lane 5, 6, and 7: treated with SDS and 2-mercaptoethanol.

1. 발효한 시료와 발효하지 않은 시료를 비교해 보면 분자량 60,000D 부근에 있던 피크가 상당히 작아지고, 또한 그 부분에서의 렉틴활성이 없어지고 발효에 의해 분자량 22,000D~15,000D에서 나타나고 3일 발효후 다시 66,000D 부근의 활성이 있는 렉틴이 나타나는 것으로 보아 발효과정에 의해 단백질의 성질이 달라지는 것을 알 수 있다. 그러나 1일, 2일과 3일 발효시킨 시료중 분자량 22,000D~15,000D 분획은 겔 여과의 profile이 서로 비슷하고, 적혈구 응집력을 나타내며, 음이온 교환 chromatography에 의해 모두 0.15M에서 렉틴 활성을 나타내는 것으로 보아 이들 분획의 1~3일간의 발효기간에 따른 단백질의 변화는 별로 없었던 것으로 생각된다.

2. 발효시킨 겨우사리의 렉틴활성을 나타내는 단백질을 전기영동한 결과를 발효시키지 않은 겨우사리와 비교해 본 결과, 발효시키지 않은 겨우사리에는

분자량 66,000D의 렉틴이 disulfide 결합에 의해 33,000D의 B-chain과 28,000D의 A-chain이 연결되어 있으나, 발효에 의해서 단백질 수가 줄어드는 것을 알 수 있었다. 또한 1,2,3일간 발효한 겨우사리에서 분리된 렉틴은 분자량이 18,500D이었으며, 이 단백질이 렉틴 활성을 나타내는 것으로 보아 발효에 의해서 단백질 분자의 A-chain과 B-chain사이의 external disulfide 결합이 끊어졌을 가능성이 있으며 B-chain의 당 결합부위가 렉틴으로부터 분리된 것으로 추측된다.

문 헌

- 1) Franz, H.: Request an Impartial Discussion of the So-Called Mistletoe Therapy. *Oncology* **43**: suppl. 1. 1 (1986).
- 2) Tasneem A, Khwaja., Cecilia B. Dias, Stephanie Pentecost.: Recent studies on the Anticancer Activities of Mistletoe(*Viscum album*) and Its alkaloids. *Oncology* **43**: suppl. 1. 42-50 (1986).
- 3) Tibor Hajta: Immunomodulatory effects of Iscador; A *Viscum album* preparation. *Oncology* **43**: suppl. 1. 55-65 (1986).
- 4) Gilles Ribereau-Gayon, Marie-Louise Jung, Dominique Di Scala and Jean-Paul Beck: Comparison of the effects of fermented and unfermented Mistletoe preparations of cultured tumor cell. *Oncology* **43**: suppl. 1. 35-41 (1986).
- 5) Franz, H., Ziska, P., Kindt, A.: Isolation and properties of three lectins from mistletoe(*Viscum album L.*). *Biochem. J.* **195**. 481-484 (1981).
- 6) Olsnes, S., Stirpe, F., Sandvig, K., Pihl, A.: Isolation and characterization of Viscumin, a toxic lectin from *Viscum album L.*(Mistletoe). *J. Biol. Chem.* **257**(22). 13263-13270 (1982).
- 7) Luther, P., Theise, H., Chatterjee, B., Karduck, D., Uhlenbruck, G.: The lectin from *Viscum album L.*- Isolation, characterization, properties and structure. *Int. J. Biochem.* **11**. 429-435 (1980).
- 8) Vitetta, E. S., Uhr, J. W. *Annu. Rev. Immunol.* **3**. 197-212 (1985).
- 9) Olsnes, S., Pihl, A.: Coben and von Heyningen(eds) Molecular action of Toxins and Viruses. *Elsevier Biomedical Press*. 51-105 (1982).
- 10) Bjorn, M. J., Larrick, J., Piatak, M., Wilxon, K. J. *Biochim. Biophys. Acta.* **790**. 154-163 (1983).
- 11) Thorpe, P. E., Brown, A. N. F., Ross, W. C. J., Cumber, A. J., Detre, S. I., Edwards, D. C., Davies, A. J. S., Stirpe, F. *Eur. J. Biochem.* **116**. 447-454 (1981).
- 12) Fiorenzo Stirpe and Luigi Barbieri.: Ribosome-inactivating proteins up to date. *FEBS Lett* **195**. 1-8 (1986).
- 13) Campbell, P., Hartman, A. L., Abel, C. A.: Stimulation of B cell but not T cell or thymocytes by a sialic acid-specific lectin. *Immunology.* **45**. 155 (1982).
- 14) Sharon, N: Lectins. *Sci. Am.* **236**, 108-119 (1977).
- 15) 박원봉, 김희숙: 겨우사리 중의 렉틴성분 분리 및 특성. *약학회지.* **38**(4). 418-424 (1994).
- 16) Weber K. and Osborn M.: The reliability of the molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412 (1969).