

유산균 발효에 의한 겨우사리 중의 렉틴 성분의 변화: pH, 온도의 영향, 당 특이성, 림프구 자극분열효과

박원봉* · 김희숙 · 나혜복 · 함승시*
서울여자대학교 자연과학대학, *강원대학교 농과대학
(Received October 20, 1994)

Changes of Lectin from *Viscum coloratum* by Fermentation with *Lactobacillus plantarum*: Effects of pH and Temperature, Sugar Specificity and Lymphocyte Stimulating Activity

Won-Bong Park*, Hee-Sook Kim and Hye-Bock Na and Seung-Shi Ham*
College of Natural Science, Seoul Woman's University, Seoul 139-774, Korea
*Agricultural College, Kangweon National University Chuncheon 200-701, Korea

Abstract—Lectin from mistletoe(*Viscum coloratum*) fermented by *Lactobacillus plantarum* was compared with the lectin from unfermented mistletoe. Agglunating activity of fermented mistletoe was stable at pH 3.77~8.71, at temperature range of 0~40°C and in the presence of 9 mental ions, which results are similar to unfermented one, but less stable at pH 2.03~3.00 and more stable at temperature 60~80°C than lectin from unfermented one. Agglunating activity of lectin from mistletoe fermented for 1 or 2 days and from fraction number 42~54 was not inhibited by all sugars used except for lectin from fraction number 21~34. Mitogenic activity to murine lymphocytes of lectin from mistletoe was decreased by fermentation process.

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

겨우사리(*Viscum coloratum*, mistletoe)는 한방명으로는 기생목(寄生木), 해기생(解寄生) 등으로 불리 어지는데, 당뇨, 고혈압, 동맥경화증 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 최근에는 겨우사리의 항종양 효과에 관한 많은 연구들이 보고되고 있다.¹⁾ 특히, 발효한 겨우사리(Iscador[®])는 체액성, 세포성 면역체계와 자연살해세포(NK cell)의 활성을 강화하며,²⁾ 종양세포의 성장을 억제하여 폐암, 유방암 등 각종 암에 효과가 있어 오래전부터 암치료에 이용되어 왔다.²⁾ 발효한 겨우사리는 쥐의 hepatoma tissue culture (HTC) 세포의 성장억제에, 발효하지 않은 겨우사리는 leukemia Molt 4 세포에 대해 더 효과적인 것으로 보고되었다.⁴⁾

겨우사리 렉틴은 주로 유럽에서 유럽산 겨우사리(*Viscum album*)에 대해 많이 연구되어 왔다. 겨우사리의 렉틴은 단백질 혹은 당단백질로 되어 있고, 당과의 2~6개의 결합부위를 가지고 있으며 분자량, subunit 등이 매우 다양한데 2개의 subunit가 각기 다른 특성을 갖는 A-chain과 B-chain이 disulfide에 의해 결합되어 있는 분자량이 60,000D 정도인 것이 있으며, 이러한 것이 다시 2개가 연결되어 있는 분자량이 120,000D 정도인 agglutinin이 있다.⁴⁻⁷⁾ 렉틴의 A-chain은 active chain으로 B-chain이 세포표면의 수용체에 결합하면 세포내부로 침투하여 진행세포의 리보조음을 불활성화시켜서 단백질 합성을 저해시키는 작용을 하며, B-chain은 binding chain으로 세포 표면의 당과 결합하는 subunit이다.⁷⁾ 또한 A-chain을 단일클론성항체에 붙여서 immunotoxin을 만들어 그

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

항체의 목적 세포에만 특이적으로 작용하게 하여 악성세포를 죽이는데 이용하는 등 많은 종류의 immunotoxin들이 암의 화학적 치료법에 이용되고 있으며, 또한 이종이식에 의해 생긴 이종의 T-림프구를 죽임으로써 이식수술에 의한 부작용을 막는데도 이용되고 있다.⁸⁻¹²⁾ 또한 렉틴은 림프구 자극 분열 효과가 있는데 대부분의 렉틴이 T-림프구를 자극 분열시키지만 B-림프구를 자극 분열하는 렉틴도 보고된 바 있다.^{13,14)}

본 연구팀은 우리나라에서 자생하는 겨우사리의 단백질을 분리, 정제하여 그 특성을 조사한 결과, 66,000D의 렉틴이 있으며, 이 렉틴은 28,000D의 A-chain과 33,000D의 B-chain이 disulfide결합에 의하여 연결되어 있고, pH 3.77~8.71와 온도 40°C 이하에서 렉틴의 활성이 100% 유지되며 N-acetyl-D-galactosamine에 대하여 강한 당특이성이 있는 것을 보고한 바 있다.¹⁵⁾ 또한 겨우사리를 유산균으로 1, 2, 3일간 발효하여 렉틴성분을 분리, 정제, 확인하여 렉틴이 발효에 의하여 어떻게 변화하였는가를 알아본 결과,¹⁶⁾ 1, 2일간 발효에 의해 분자량 66,000D의 렉틴이 분해되고 분자량 22,000D~15,000D의 렉틴이 생성되며 3일 후 다시 66,000D의 렉틴이 생성되는 것을 알 수 있었으며, 1일, 2일과 3일 발효시킨 시료중 분자량 22,000D~15,000D의 렉틴은 서로 유사한 것으로 추측되었다. 또한 전기영동에 의해 발효한 겨우사리에서 분리된 렉틴은 분자량이 18,500D이며, 발효에 의해서 단백질 분자의 A-chain과 B-chain사이의 external disulfide 결합이 끊어지고 B-chain의 당 결합부위가 렉틴으로부터 분리된 것으로 추측되었다.

본 연구에서는 유산균으로 1, 2, 3일간 발효하여 분리, 정제한 겨우사리의 렉틴이 발효에 의하여 어떻게 변화하였는가를 알아보았다. 즉, 정제된 렉틴에 미치는 pH, 온도 및 금속 이온의 영향을 조사하였고, 당에 대한 결합특이성을 알아보았으며, 또한 림프구 자극 분열 효과를 시험하여 본 실험에서 분리된 렉틴의 생리활성을 조사하였다.

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 Chr. 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 545는 Fluka Chemie AG.에서 구입하였고, 단백질 표준 분자량 marker와 D-galactosamine, N-acetyl-D-galactosamine은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였으며 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(Suntext) 등의 기기를 사용하였다.

발효—겨우사리 400 g을 증류수 2l와 함께 분쇄하여, 10분간 원심분리(4,000 rpm)하여 상징액을 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 7.48×10^7 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 상징액을 단백질 정제에 사용하였다.

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

렉틴의 추출, 정제, 분자량 측정—렉틴의 추출, 정제, 분자량 측정은 전보^{15,16)}에 보고한 바와 같이 실시하였다. 즉, 겨우사리를 borax 완충용액과 함께 분쇄하고 원심분리하여 상징액을 취하여 (NH₄)₂SO₄로 단백질을 침전시키고 침전물을 완충용액으로 투석한 후

동결건조한 것을 Sephadex G-75 column(3.3×60 cm)에 주입하여 겔 여과를 실시하고, 렉틴 활성은 사람 B형 적혈구 응집반응으로 확인하였다. 렉틴활성을 나타내는 분획을 DEAE-cellulose C 545 column(1.6×25 cm)에 주입하여 NaCl 농도를 변화시키면서 step-wise salt gradient 방법에 의해 분리한 후, 다시 사람 B형 적혈구 응집반응을 실시하여 렉틴활성을 나타내는 분획을 찾았다. 전기영동은 Weber¹⁷⁾의 방법을 이용하여 실시하였다. 이때 시료를 SDS만 처리한 것과 SDS와 2-mercaptoethanol로 처리한 것의 두 가지로 하였다.

렉틴 활성에 미치는 pH, 온도 및 금속이온의 영향—16 HU의 활성을 나타내는 렉틴용액을 pH 2.03~10.62사이의 여러가지 완충용액에 4°C, 24시간 투석시킨 후 남아있는 렉틴의 활성을 조사하였다. 완충용액으로는 25 mM KCl-HCl(pH 2.03), 25 mM glycine-HCl(pH 3.00), 25 mM citrate(pH 3.77), 25 mM citrate(pH 4.80), 25 mM tris-HCl(pH 7.48), 25 mM tris-HCl(pH 8.71), 25 mM carbonate(pH 9.68), 25 mM carbonate(pH 10.62)를 사용하였다. 16HU의 활성을 나타내는 렉틴을 0~90°C 사이의 온도에서 30분간 정지 항온시킨 후, 즉시 얼음물에 냉각시킨 다음 남아있는 활성을 조사하였다.

Ba²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Hg²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺을 20 mM로 제조하여 well plate에 50 μl를 취해 2배수로 단계적으로 희석하고 각 well에 2HU의 활성을 나타내는 렉틴 용액 50 μl를 가하고, 1시간 방치시킨 후, 3% 적혈구 부유액 50 μl를 가하였다. 37°C에서 1시간 배양시킨 다음 대조표준과 비교하여 적혈구 응집력의 저해효과를 조사하였다. 이때 금속이온에 의한 저해효과는 적혈구 응집력을 완전히 저해할 수 있는 최소의 금속이온의 농도로 표시하였다.

렉틴의 당 특이성—당에 의한 적혈구 응집 저해효과는 Ravindranth¹⁸⁾ 등의 방법을 응용하여 실시하였다. 200 mM의 D-glucose, L(+)-arabinose, β-D(-)-fructose, D-galactosamine, N-acetyl-D-galactosamine, maltose, D-galactose, sucrose, lactose를 well plate에 50 μl를 가하여 4°C에서 1시간 반응시킨 후, 3% 적혈구 부유액 50 μl를 가하였다. 37°C 배양기에서 1시간 배양시켜 대조표준과 비교하여 적혈구 응집력을 완전히 저해할 수 있는 최소의 당 농도로 표시하였다.

렉틴의 림프구 자극 분열 효과—렉틴의 림프구 자극 분열효과는 Pandolfini¹⁹⁾ 등의 방법을 이용하여 실시하였다. Crude extract를 겔 여과한 것을 시료로 하여 흰쥐의 림프구에 대한 mitogenic activity를 측정하였다. 렉틴 용액과 Con A는 멸균된 milipore 여과지를 통과시켜 재균하여 사용하였다. RPMI 배지는 carbonate 완충용액에 HEPES를 10 mM이 되도록 가하고, gentamycin 1.4 mg/ml를 가한 다음, 40% NaOH를 가해 pH 7.4로 하여 여과한 후 냉동보관하여 사용하였다. 10% serum배지는 10% bovine calf serum을 56°C에서 30분간 배양한 후 냉동보관하여 사용하였다. 150 g의 흰쥐의 비장세포를 RPMI 배지에 부유시켜 세척한 것을 희석하여 2.5×10⁶ cell/ml가 되도록 하고 1700 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 침전물에 10% serum 배지 2 ml를 가하였다. Well plate에 100 μl씩 분주하고, 렉틴 용액을 10 μl씩 가하여 잘 혼합한 후, 37°C에서 4시간 배양한 후 MTT assay와 SRB assay를 실시하였다.

아미노산 조성—정제된 시료 2 mg에 6N HCl 0.1 ml를 가하여 98°C에서 8시간 가수분해시킨 다음, 원심분리하여 상등액을 80°C에서 15시간 건조시키고 다시 완충용액으로 녹인 후 아미노산 자동분석기에 주입하여 다음과 같은 조건으로 분석하였다.

HPLC: Beckmann 6300 system,
Column: Lithium methologis column, 2.6 mmφ×100, Mobile phase; Li-A, B, C buffer(Beckmann),
Sample size: 50 μl, Detector; Vis 440+570 nm,
Column temp; gradient 34~63°C, Flow rate; 0.30 ml/min.

결과 및 고찰

발효에 의한 pH의 변화—발효에 의한 pH의 변화는 Fig. 1과 같다. 겨우사리를 유산균으로 발효시켜 1일 간격으로 pH를 측정된 결과, 1일간 발효시의 pH변화가 가장 크고, 2일과 3일간의 발효시는 변화의 폭이 그다지 크지 않음을 알 수 있었다.

발효한 겨우사리 중의 렉틴의 분리 및 분자량 측정—발효한 겨우사리 중의 렉틴의 분리 및 분자량 측정은 전보¹⁶⁾에 보고 하였다. 즉, 발효에 의해 분자량 60,000D부근에 있던 피이크가 상당히 작아지고, 또한 그 부분에서의 렉틴활성이 얻어지고 분자량 22,000

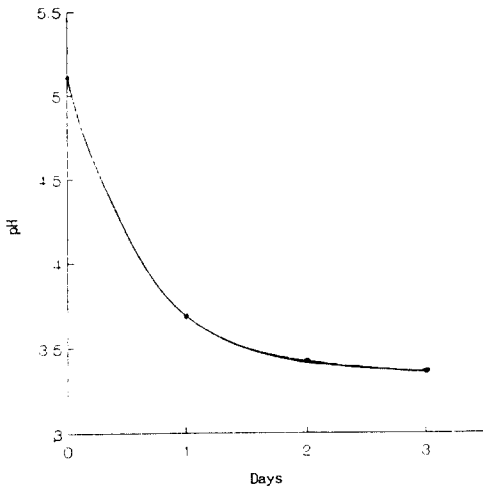


Fig. 1—pH changes by fermentation.

Table I—Effect of pH on hemagglutinating activity of lectin purified by gel filtration

pH(Buffer, 25 mM)	Residual activity(%)				
	0	1	2	3-1	3-2
2.03(KCl-HCl)	25	12	12	12	25
3.00(Glycine-HCl)	25	12	12	12	25
3.77(Citrate)	100	100	100	100	100
4.84(Citrate)	100	100	100	100	100
7.48(Tris-HCl)	100	100	100	100	100
8.71(Tris-HCl)	100	100	100	100	100
9.68(Carbonate)	50	50	50	50	50
10.62(Carbonate)	0	0	0	0	0

0: unfermented sample

1: fermented sample for 1 day

2: fermented sample for 2 days

3-1: 42~54 fraction of fermented sample for 3 days

3-2: 21~34 fraction of fermented sample for 3 days

D~15,000D(분획번호 42~54)에서 나타나고 3일 발효후 다시 66,000(분획번호 21~25)부근의 활성이 있는 렉틴이 나타났다. 발효한 겨우사리의 렉틴활성을 나타내는 단백질을 전기영동한 결과, 발효하지 않은 겨우사리에는 분자량 66,000D의 렉틴이 disulfide 결합에 의해 33,000D의 B-chain과 28,000D의 A-chain이 연결되어 있으나, 1, 2, 3일간 발효한 겨우사리에서 분리된 렉틴은 분자량이 18,500D이었다.

렉틴활성에 미치는 pH의 영향—pH 2.00~11.00사이에는 겨우사리 렉틴의 안정성을 시험한 결과 Table

I에 나타내었다. pH 3.77~8.71사이에서는 1,2,3일간 발효한 시료의 렉틴은 발효하지 않은 시료와 마찬가지로 매우 안정하여 100%로 활성이 유지되었다. pH 2.03과 pH 3.00의 산성 조건에서는 발효하지 않은 시료와 3일간 발효한 시료 중 분획번호 21~34의 렉틴은 각각 25%의 활성이 남아있는데 비해, 1,2일간 발효한 시료와 3일간 발효한 시료중 분획번호 42~54의 렉틴은 각각 12%의 활성이 남아 있었다. 또한 pH 9.68과 pH 10.62의 염기성 조건에서는 발효한 모든 시료가 발효하지 않은 시료와 마찬가지로 각각 50%, 0%로 불안정함을 알 수 있었다. 따라서 1일, 2일, 3일간 발효에 의해서 합성된 분획번호 42~54의 단백질의 서로 유사한 것으로 추측된다.

렉틴 활성에 미치는 온도의 영향—0~90°C 사이의 온도에서 30분간 항온시킨 후 남아있는 렉틴활성을 측정하여 Table II와 Fig. 2에 나타내었다. 발효시키지 않은 시료는 40°C까지 활성이 유지되었고, 50°C부터는 25%로 급격히 감소하여 90°C가 되면 완전히 없어졌으나, 1일, 2일간 발효한 시료와 3일간 발효한 시료 중 42~54 분획의 경우 60°C까지는 100%로 활성이 유지되고, 70°C부터는 25%로 급격히 감소하여 80°C에서는 완전히 없어졌다. 3일간 발효한 시료 중 21~34 분획의 경우는 50°C까지는 활성이 유지되고, 60°C에서는 50%로 감소하며, 70°C에서는 활성이 완전히 없어졌다. 따라서 1일, 2일과 3일간 발효한 시료 중 발효에 의해 새로 합성된 것으로 추정되는 분자량 22,000D~15,000D의 42~54 분획이 비교적 열에 안정함을 알 수 있다.

렉틴 활성에 미치는 금속이온의 영향—금속이온은 단백질의 구조를 변화시켜 단백질의 활성의 변화를 초래하는 경우가 있는 것으로 알려져 있으나, 본 실험에서 사용한 9종의 금속 이온들은 발효하지 않은 시료와 마찬가지로 발효한 겨우사리의 렉틴활성에 아무런 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

렉틴의 당 특이성—발효하지 않은 겨우사리와 발효한 겨우사리의 렉틴에 대한 당의 적혈구 응집 억제효과를 Table III에 나타내었다. 발효하지 않은 시료의 경우 9종의 당 용액 중 N-acetyl-D-galactosamine과 가장 큰 결합특이성이 갖는 것으로 나타났으며 D-galactose, lactose와도 약간의 결합 특이성이 있는 것으로 보아 D-galactose 배열에 특이성을 가지고 있는 것으로 생각된다. 또한 이를 유럽산 겨우

Table II—Effect of temperature on hemagglutinating activity of lectin purified by gel filtration

Temperature (°C)	Residual activity(%)				
	0	1	2	3-1	3-2
0	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100
15	100	100	100	100	100
30	100	100	100	100	100
40	100	100	100	100	100
50	5	100	100	100	100
60	2	100	100	100	50
70	6	25	25	25	0
80	3	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0

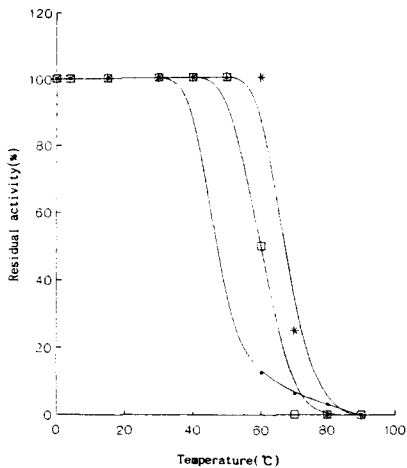
0: unfermented sample

1: fermented sample for 1 day

2: fermented sample for 2 days

3-1: 42~54 fraction of fermented sample for 3 days

3-2: 21~34 fraction of fermented sample for 3 days



□ : unfermented sample
 △ : fermented sample for 1 day
 ★ : fermented sample for 2 days
 ○ : 42~54 fraction of fermented sample for 3 days
 × : 21~34 fraction of fermented sample for 3 days

Fig. 2—Effect of temperature on the lectin purified by gel filtration.

사리(*Viscum. album*)에서 분리한 렉틴 II(m.w: 60,000D)는 D-galactose와 N-acetyl-D-galactosamine에 특이성이 있다는 보고¹⁹⁾와 비교하여 볼때, 렉틴 II의 당 결합부위의 아미노산 배열에 유사성이 있을 것으로 생각된다. 1일, 2일과 3일 발효시킨 시료 중 42~54 분획은 9종의 당에 대해 특이성을 나타내지

Table III—Inhibition of lectin activity for human B erythrocytes by sugars

Sugars	Minimum concentration (mM) of sugars completely inhibiting 2 HU doses				
	0	1	2	3-1	3-2
D-Glucose	—	—	—	—	—
D-Galactose	50	—	—	—	—
L(+)-Arabinose	100	—	—	—	—
β-D(-)-Fructose	—	—	—	—	—
Sucrose	—	—	—	—	—
Maltose	—	—	—	—	—
Lactose	50	—	—	—	12
D-Galactosamine	—	—	—	—	—
N-Acetyl-D-galactosamine	6	—	—	—	—

0: unfermented sample

1: fermented sample for 1 day

2: fermented sample for 2 day

3-1: 42~54 fraction of fermented sample for 3 days

3-2: 21~34 fraction of fermented sample for 3 days

않았으며 이것은 유산균의 발효에 의해서 렉틴이 분해되었을 뿐만 아니라 당 결합부위의 3차 구조가 변형되어 여전히 B형 적혈구를 응집시키지만 원래의 렉틴과는 다른 세포표면의 당과 결합하는 것으로 추측된다.

3일간 발효시킨 시료 중 21~34 분획은 9종의 당 중에서 12.5 mM의 lactose에 의해서만 적혈구 응집력이 저해되었다. 즉 이 렉틴은 lactose에 대한 결합 특이성을 갖는다는 것을 알 수 있고, 발효에 의한 분자량의 변화는 거의 없지만 결합부위의 3차 구조에 변화가 생겼음을 알 수 있다. D-Glucose, D-galactose, D-galactosamine과 N-acetyl-D-galactosamine에 대해서는 특이성이 없는 것으로 보아 발효시키지 않은 시료의 경우와는 달리 D-galactose 배열에 특이성을 가지고 있지 않고, D-glucose 배열에 대해서도 특이성을 가지고 있지 않음을 알 수 있다. 또한 D-glucose 두개로 이루어진 lactose의 배열이 특이성을 결정하는데 중요한 요인일 것으로 생각된다.

림프구 자극 분열효과—발효한 시료에서 분리한 렉틴의 림프구 자극 분열효과를 Concanavalin A (0.075 μg/μl)와 함께 비교 실험하여 Table IV와 같은 결과를 얻었다. 발효하지 않은 시료는 MTT assay와 SRB assay 둘 다에서 Con A보다 더 높은 활성을 나

Table IV—Lymphocyte stimulating activity of lectin purified from *viscum coloratum*

Mitogen	MTT assay	SRB assay
cocanavalin A	0.201	2.261
0	0.236	2.374
1	0.181	2.322
2	0.159	1.501
3-1	0.157	1.037
3-2	0.131	1.347

0: unfermented sample

1: fermented sample for 1 day

2: fermented sample for 2 days

3-1: 42~54 fraction of fermented sample for 3 days

3-2: 21~34 fraction of fermented sample for 3 days

Table V—Percentages of amino acids in proteins purified by anion exchange column chromatography

Amino acids	(A)	(B)
Aspartic acid	8.10	5.46
Threonine	4.83	3.84
Serine	7.28	5.86
Glutamic acid	6.56	4.20
Proline	1.91	1.48
Glycine	8.94	10.13
Alanine	7.32	5.61
Valine	2.88	0.68
Methionine	0.34	—
Isoleucine	2.34	1.30
Leucine	6.20	3.20
Tyrosine	1.16	—
Phenylalanine	2.19	—
Histidine	34.07	53.25
Lysine	5.94	5.00

(A): proteins eluted from NaCl step-wise gradient(unfermented sample)

(B): proteins eluted from 0.15M NaCl step-wise gradient(42~54 fraction of fermented sample for 3 days)

타냈으나 발효한 모든 시료는 Con A보다 낮은 활성을 나타냈다. 특히 3일간 발효한 시료중 42~54분획의 SRB assay를 제외한 모든 분석 결과가 발효가 진행됨에 따라 림프구를 자극하는 효과가 떨어지는 것으로 나타났다. 그러나 발효한 겨우사리(Iscador)가 종양 세포의 성장을 억제한다는 보고²⁾가 있는 것으로 보아 발효한 겨우사리의 다른 생리활성의 변화는 더 조사해야 할 것으로 생각된다.

렉틴의 아미노산 조성-발효시키지 않은 시료 중 0.20M NaCl에서 용출된 단백질(A)과 3일 발효시킨 시료 중 42~54분획의 0.15M NaCl에서 용출된 단백질(B)의 아미노산 조성을 측정하여 그 결과를 Table V에 나타내었다. 분획(A), (B) 둘다 histidine을 34.07%, 53.25%로 가장 많이 함유하고 있으며, methionine, tyrosine, phenylalanine은 (A)에만 있고(B)에는 존재하지 않았다. 전기영동 결과에 의하면 분획(A)에는 cycteine이 존재해야 하는데 나타나지 않은 것으로 보아 매우 적은 양이 존재할 것으로 생각된다.

결론

1. 발효한 시료의 렉틴은 발효하지 않은 시료와 마찬가지로 pH 3.77~8.71사이에서는 안정하고, pH 9.68과 pH 10.62에서는 불안정하였으며, pH 2.03과 pH 3.00에서는 1,2일간 발효한 시료와 3일간 발효한 시료 중 분획번호 42~54(22,000D~15,000D)의 렉틴은 활성이 발효하지 않은 시료의 절반으로 떨어졌다. 또한 60~80C에서 발효한 시료는 발효하지 않은 시료에 비해 안정한 것으로 나타났으며, 발효에 의해 새로 합성된 것으로 추정되는 42~54 분획은 비교적 열에 안정함을 알 수 있었다.

2. 1일, 2일간 발효한 시료와 3일간 발효한 시료 중 42~54 분획은 발효하지 않은 시료와 달리 사용량 당에 대해 특이성을 나타내지 않았으며, 3일간 발효한 시료 중 21~34 분획의 렉틴은 lactose에 대해 결합 특이성을 나타냈다. 이것은 유산균의 발효에 의해서 렉틴이 분해되었으며, 당 결합부위의 3차 구조가 변형되어 B형 적혈구 응집시 원래의 렉틴과 다른 세포 표면의 당과 결합하는 것으로 추측된다.

3. 발효한 시료는 발효하지 않은 시료와 달리 Con A보다 낮은 활성을 나타냈으며, 3일간 발효한 시료 중 42~54분획의 SRB assay를 제외한 모든 분석 결과가 발효가 진행됨에 따라 림프구를 자극하는 효과가 떨어지는 것으로 나타났다. 그러나 발효한 겨우사리(Iscador[®])가 종양세포의 성장을 억제한다는 보고²⁾가 있는 것으로 보아 발효한 겨우사리의 생리활성은 더 연구해야 할 것으로 생각된다.

문헌

- 1) Franz, H.: Request an Impartial Discussion of the So-Called Mistletoe Therapy. *Oncology* 43: suppl. 1, 1 (1986).
- 2) Tasneem A, Khwaja O., Cecilia B., Stephanie, P.: Recent studies on the Anticancer Activities of Mistletoe(*Viscum album*) and Its alkaloids. *Oncology* 43: suppl. 1. 42-50 (1986).
- 3) Tibor H.: Immunomodulatory effects of Iscador; A *Viscum album* preparation. *Oncology* 43: suppl. 1. 55-65 (1986).
- 4) Gilles R -G., Jung M. -L., Dominique D. and Beck J. -P.: 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., Thesis, 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 S. and Luigi B.: 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) 박원봉, 김희숙: 유산균 발효한 겨우사리 중의 렉틴 성분의 변화-분리 및 정제. *약학회지.* 38(6) 209-215 (1994).
- 17) 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).
- 18) Ravindranth, M. H., Higa, H. H., Cooper, E. L. and Paulson, J. C.: Purification and characterization of an O-acetylsialin acid-specific lectin from marine crab *Cancer atennarius. L. Biol. Chem.* 260, 8850-8856 (1985).
- 19) Pandolfino, E. R., Namen, A. E., Munske, G. R. and Magnuson, J. A.: A comparison of the mitogenic and nonmitogenic lectins from lima beans. *J. Biol. Chem.* 258, 9203-9207 (1983).