

## 혈전용해능을 갖는 버섯류의 탐색

최낙식 · 서승엽\* · 김승호  
생명공학 연구소 단백질기능 R.U.,  
\*공주대학교 자연과학대학 생물학과

### Screening of Mushrooms Having Fibrinolytic Activity

Nack-Shick Choi, Sung-Yum Seo\* and Seung-Ho Kim

Protein Function Research Unit

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

\*Department of Biology, Kongju National University

#### Abstract

Five fungi (mushrooms), *Daedaleopsis styracina*, *Trichaptum abietium*, *Coriolus versicolor*, *Pisolithus tinctorius* and *Tricholomopsis decora*, were screened and examined the fibrinolytic activity and specificity. The extracts of mushrooms showed a level of fibrinolytic activity that was about 3-4 times higher than that of plasmin 1.0 unit. In particular, *Pisolithus tinctorius* of them showed the greatest enzyme activity (4.71 plasmin unit/mL) by fibrin plate assay, and the highest specificity (1.32 plasmin unit/mL) using chromogenic substrate (N-p-Tosyl-Gly-Pro-Lys p-nitroanilide) by *Tricholomopsis decora*. And the same molecular mass 54 and 61kDa showing the fibrinolytic activity obtained from all fruiting bodies were confirmed, and it was found that *Trichaptum abietium* and *Tricholomopsis decora* have a strong fibrinolytic enzyme with an apparent size of 100 kDa and 84 kDa, respectively on SDS-fibrin zymography activity assay.

Key words: mushroom, fibrinolytic enzyme, fibrin zymography

#### 서 론

혈관이 손상을 받아 출혈이 일어나면 혈액이 응고되는 체내방어 작용이 작동하게 되는데 이 과정은 활성화된 thrombin에 의해 fibrinogen이 fibrin으로 전환됨으로써 유도된다<sup>(1)</sup>. 이렇게 생성된 혈전(fibrin clots)은 상처 회복 후 plasmin과 같은 혈전용해효소(fibrinolytic enzyme)에 의해 용해되는데, 만약 생성된 혈전이 체내에 과도하게 축적되거나 혈전용해 기작이 원활하게 작동하지 못할 경우 혈전증(thrombosis)을 유발하여 인체에 치명적인 손상을 줄 수도 있다<sup>(2)</sup>.

현재 streptokinase, urokinase 그리고 tPA (tissue-type plasminogen activator) 등과 같은 plasminogen activator가 혈전증의 치료제로 사용되고 있으나, 이러한 물질들은 가격이 매우 높을 뿐 아니라<sup>(3)</sup>, urokinase를 제외하고는 경구투여가 불가능한 실정이다<sup>(4)</sup>. 따라서 보다

경제적이고 경구투여가 가능한 혈전증 치료제에 대한 연구가 다양하게 시도되고 있으며, 현재 경구투여가 가능한 혈전제로 6가지의 혈전용해효소를 함유하고 있는 지렁이(*Lumbricus lubellus*)가 알려져 있다<sup>(5,6)</sup>.

이 외에도 한국과 일본을 중심으로 한 발효식품에서의 혈전용해효소의 연구는 직접섭취가 가능한 식품을 대상으로 한다는 점에서 주목할 만하다. 일본의 전통대두 발효식품인 natto (nattokinase)<sup>(7-10)</sup>와 절임 식품인 Shiokara (katsuwokinase)<sup>(8,11)</sup>에서 혈전용해효소 생산 균주를 분리하고 효소를 정제하였으며, 이의 경구투여시 생체내의 혈전용해능을 높일 수 있다고 보고하였다<sup>(10,12)</sup>. 우리 나라에서도 일본의 natto와 유사한 콩을 원료로 한 전통발효식품인 청국장에서 혈전용해능을 가진 *Bacillus* 균주를 분리 및 정제하였으며<sup>(13,14)</sup>, 또한 본 연구진은 청국장과 마찬가지로 우리 나라의 전통대두 발효식품인 된장으로부터 natto와 청국장에서 분리한 균주에 비해 2~3배 이상의 높은 혈전용해효소를 생산하는 균주를 분리하여 보고한 바 있다<sup>(2)</sup>.

한편 버섯의 경우 간단한 요리로 직접 섭취가 가능

Corresponding author: Seung-Ho Kim, Protein Function Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Yusong, Taejeon 305-600, Korea

하므로 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있으나, 주로 metalloendopeptidase<sup>(15,16)</sup>와 항진균 활성<sup>(17)</sup>에 대한 연구가 많이 진행되어 있지만 혈전용해에 관한 연구는 보고되어 있지 않다. 버섯은 예로부터 식용 및 약용으로 널리 이용되어 왔으며 그 종류 또한 다양하여, 현재 한국산 버섯은 990여종이 분류되어 있으며, 이 중 100여종이 식용 가능한 버섯으로 확인되어 있다. 따라서 본 연구에서는 한국산 버섯 50여종을 fibrin plate와 fibrin zymography 활성 확인법 및 plasmin의 기질을 이용하여 혈전용해능을 가진 버섯의 선발 및 활성의 특이성을 연구하여 이를 보고 하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시료

본 연구에 사용된 50여종의 한국산 버섯은 전국 각지에서 수집하여 실험에 사용하였고, fibrin plate 제조에 사용된 fibrinogen, thrombin, agarose 및 대조구로 사용된 plasmin과 plasmin에 대한 기질 N-p-Tosyl-Gly-Pro-Lys p-nitroanilide (T-6140) 등은 Sigma사 제품을 구입하여 사용하였으며, 그 외 사용된 기타 시약들은 특급시약을 사용하였다.

### 버섯 추출물의 조제

분류된 50여종의 버섯을 100 g의 동일 무게를 80% 메탄올 500 mL에 충분히 잠길 정도로 침적한 후 한 달간 실온에 방치하여 추출액을 여과하였다. 여액을 evaporator로 증류하여 분말로 만든 다음 동일량의 메탄올에 현탁시킨 후 다시 여과하였다. 여액을 5 mL이 되도록 농축시켜 버섯 추출물을 조제하였다.

### 혈전용해효소 활성 측정법

50 mM 인산완충용액(pH 7.4, 0.15 M NaCl 포함)에 fibrinogen을 최종농도 0.3%가 되도록 완전히 용해시킨 용액 5 mL에 동량의 2% agarose 5 mL을 첨가하여 혼합하였다. 혼합한 용액에 thrombin (100 NIH unit/mL) 0.1 mL을 첨가하여 충분히 혼합한 후 즉시 사야레에 붓고 1시간 동안 실온에서 고화시켜 fibrin plate<sup>(18)</sup>를 제조하였다. 활성측정을 위해 fibrin plate에 pasteur pipette으로 지름 5 mm의 구멍을 만들어 각 버섯 추출액 시료 20  $\mu$ L를 주입하고 37°C에서 12시간 반응시킨 다음 이때 생성된 투명환의 면적을 계산하였으며, 대조구로서는 정제된 혈전용해효소인 plasmin (1.0 unit/mL)을 사용하였다. 추출액의 혈전용해활성은 대조구의 용해면적에 대한 시료의 용해면적의 상대적인 비

율로 환산하여 산출하였다.

### Amidolytic activity

효소에 대한 활성 특이성을 알아보기 위하여 plasmin에 대한 기질(chromogenic substrate, T-6140)인 N-p-Tosyl-Gly-Pro-Lys p-nitroanilide를 이용하여 기질에 대한 효소의 특이성을 알아보았다<sup>(21)</sup>. 0.5 mM 기질용액 0.2 mL (20 mM 인산완충용액, pH 7.0)과 버섯 추출액(3  $\mu$ g/0.2 mL)을 37°C water bath에 넣고 1분간 반응시킨 후 50% 초산용액 0.1 mL을 첨가하여 반응을 멈추게 하였다. 대조구로서는 정제된 plasmin (1.0 unit/0.2 mL)을 사용하였고, blank는 추출액 0.2 mL과 인산완충용액 0.2 mL을 측정온도에서 1분간 방치한 후 50% 초산용액 0.1 mL을 혼합하여 제조하였다. 이렇게 제조된 각각의 시료와 blank를 405 nm에서 흡광도를 측정하여 plasmin에 대한 상대적 효소활성을 결정하였다.

### SDS-fibrin zymography 활성확인법

SDS-fibrin zymography 활성확인법은 Kim 등<sup>(19)</sup>의 방법에 따라 fibrinogen의 농도가 0.12% (w/v)가 되게 polyacrylamide 용액에 혼합한 후 곧바로 thrombin (1 NIH unit/mL)을 첨가하여 제조한 fibrin-polyacrylamide gel에서 실시하였고, 단백질 정량은 BSA (bovine serum albumin)를 표준으로 Lowry<sup>(20)</sup> 방법에 따라 수행하였다. 각 lane에 시료 20 ng의 단백질을 loading한 후 10 mA의 일정한 전류를 걸어 전기영동을 실시한 다음 SDS에 의해 불활성화된 효소를 재활성화 시키기 위하여 gel을 2.5% Triton X-100을 포함한 Tris 완충용액 (50 mM, pH 7.4)에 30분간 방치하여 SDS를 제거한 후 다시 증류수로 Triton X-100을 제거하였다. 분획된 단백질의 혈전용해활성은 활성반응 완충용액(200 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>가 포함된 30 mM Tris 완충용액, pH 7.4)에 gel을 침적하여 37°C 배양기에서 12시간 반응을 시켰다. Fibrin 분해능을 지닌 단백질 분획은 활성염색법에 의해 gel상의 fibrin을 분해하여 Coomassie blue 염색 결과 투명대를 형성하게 하여 활성을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 혈전용해능 버섯의 선발

전국 각지로부터 수집한 50여종의 한국산 버섯으로부터 메탄올 추출물을 조제하여 fibrin plate 상에서 혈전용해능을 측정 하였을 때 *Daedaleopsis styracina*,

**Table 1. Fibrinolytic activity of the mushrooms**

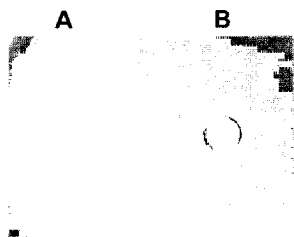
Strains	Fibrinolytic activity (plasmin unit/mL) <sup>1)</sup>
<i>Daedaleopsis styracina</i>	2.75
<i>Trichaptum abietium</i>	4.32
<i>Coriolus versicolor</i>	4.45
<i>Pisolithus tinctorius</i>	4.71
<i>Tricholomopsis decora</i>	4.19

<sup>1)</sup>Fibrinolytic activity: dimension of clear zone of sample/ dimension of clear zone of plasmin

*Trichaptum abietium*, *Coriolus versicolor*, *Pisolithus tinctorius* 그리고 *Tricholomopsis decora*의 5종의 버섯이 활성을 나타내었다. 선발된 5종의 버섯을 이용하여 fibrin plate상에서 plasmin (1 unit/mL)에 대한 각 버섯 추출액의 투명환의 상대적 넓이를 비교하여 혈전용해 활성을 측정하였다(Table 1). 버섯 추출액을 조제하여 동일량의 단백질에 대한 활성을 비교한 결과 5종의 버섯 모두가 plasmin 1.0 NIH unit 보다 3~4배의 높은 활성을 보였으며(Table 1), 그 중 *Pisolithus tinctorius* 이 가장 높은 활성(4.71 plasmin unit)을 나타내었다(Fig. 1). 이는 김 등<sup>(13)</sup>이 보고한 한국과 일본의 전통대두발효식품인 청국장(1.84 plasmin unit)과 natto (1.58 plasmin unit)에서 분리한 *Bacillus* 균주의 활성보다 2~3배 높은 활성이었다. 또한 본 연구진에 의해 한국 전통재래식 된장에서 분리한 혈전용해균주들의 활성(2~5 plasmin unit)과는 비슷한 활성을 나타내었다<sup>(2)</sup>. 하지만 *Bacillus* 균주들과는 달리 버섯의 경우 직접 섭취가 가능하다는 점에서 더욱 주목할 만하다.

**혈전용해능 기질특이성의 조사**

일반적으로 fibrin plate는 plasmin 뿐만 아니라 다른 protease에 의해서도 쉽게 분해될 수 있으므로<sup>(2)</sup> fibrin plate는 plasmin에 대한 특이성이 낮기 때문에 plasmin의 특이 기질(chromogenic substrate, T-6140)을 사용하여 각 버섯 추출액의 fibrin에 대한 기질 특이성을 알아



**Fig. 1. Fibrinolytic activity of *Pisolithus tinctorius*.** Twenty microliter of the *Pisolithus tinctorius* (A) and 1.0 unit of plasmin (B) as control were dropped into each hole on the fibrin plate and incubated at 37°C for 12 hour.

**Table 2. Enzyme activity of the mushrooms using the substrate (T-6140)<sup>1)</sup>**

Strains	Specific activity (plasmin unit/mL) <sup>2)</sup>
<i>Daedaleopsis styracina</i>	0.12
<i>Trichaptum abietium</i>	0.08
<i>Coriolus versicolor</i>	0.24
<i>Pisolithus tinctorius</i>	0.99
<i>Tricholomopsis decora</i>	1.32

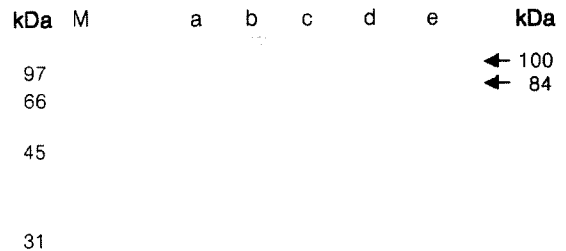
<sup>1)</sup>T-6140: substrate (N-p-Tosyl-Gly-Lys pNA)

<sup>2)</sup>plasmin unit/mL

보았다. 조사한 결과 *Daedaleopsis styracina* (0.12 plasmin unit), *Trichaptum abietium* (0.08 plasmin unit) 그리고 *Coriolus versicolor* (0.24 plasmin unit)는 아주 낮은 특이성을 보였고, *Pisolithus tinctorius*의 경우 0.99 plasmin unit의 높은 특이성을 나타내었다. 특히 *Tricholomopsis decora*의 경우 1.32 plasmin unit의 가장 높은 fibrin 다량체에 대한 효소 특이성을 보였다(Table 2).

**SDS-fibrin zymography 활성확인법**

Fibrin을 기질로 사용한 SDS-fibrin zymography 활성 확인법을 통해 각 버섯 추출액의 혈전용해능을 지닌 단백질을 확인하였다. 분석한 결과 5종의 버섯 모두에서 분자량이 54와 61 kDa의 공통된 활성을 가지는 단백질을 확인하였으며, *Trichaptum abietium*는 100 kDa의 그리고 *Tricholomopsis decora*는 84 kDa의 강한 활성을 가지는 혈전용해효소를 확인하였다(Fig. 2).



**Fig. 2. SDS-fibrin zymography activity assay of mushrooms.** SDS-fibrin zymography (12%) electrophoresis was carried out as described in materials and methods. Molecular weight of proteins was calculated by comparison with six standard proteins (M). Lane A: *Daedaleopsis styracina*, B: *Trichaptum abietium*, C: *Coriolus versicolor*, D: *Pisolithus tinctorius* and E: *Tricholomopsis decora*.

혈전용해효소에 대한 연구는 여러 각도에서 많이 진행되고 있으며, 특히 직접 섭취가 가능한 식품에서의 연구는 한국과 일본의 전통대두 발효식품에서 눈에 띄게 진척되고 있다. 하지만 지금까지 보고된 식품에서의 혈전용해효과는 모두 공통된 세균인 *Bacillus* 균에 의한 것임이 알려졌다. 반면 버섯의 경우 균자체 (fungi)를 직접 섭취가 가능하다는 점에서 세균보다 유리한 잇점을 가지고 있다. 이에 대한 보다 더 많은 연구가 요구되고 있다.

## 요 약

혈전용해능을 가진 균류 (버섯류) 5종 *Daedaleopsis styracina*, *Trichaptum abietium*, *Coriolus versicolor*, *Pisolithus tinctorius* 그리고 *Tricholomopsis decora* 등을 선발하여 혈전용해효소 활성을 측정하였고, 기질 특이성을 조사하였다. 버섯 추출액을 조제하여 혈전용해도를 측정한 결과 plasmin 1.0 unit 보다 3~4배의 높은 활성을 보였으며, 그 중 *Pisolithus tinctorius*이 가장 높은 활성(4.71 plasmin unit)을 나타내었고, *Tricholomopsis decora*가 Plasmin에 대한 기질 N-p-Tosyl-Gly-Pro-Lys p-nitroanilide에 대해 가장 높은 특이성(1.32 plasmin unit)을 보였다. 버섯의 균사체로부터 추출한 효소를 SDS-fibrin zymography 활성확인법에 의해 분석한 결과 분자량이 54와 61 kDa의 공통된 활성을 가지는 단백질을 확인하였으며, *Trichaptum abietium*는 100 kDa의 그리고 *Tricholomopsis decora*는 84 kDa의 강한 활성을 가지는 혈전용해효소를 확인하였다.

## 문 헌

- Marks, D., Marks, A. and Smith, C.: Basic Medical Biochemistry. Williams & Wilkins, Baltimore. p.107 (1996)
- Kim, S.H., Choi, N.S., Lee, W.Y., Lee, J.W., and Kim, D.H.: Isolation of *Bacillus* strains secreting fibrinolytic enzymes from Doen-Jang. (in Korean) *Kor. J. Microbiol.* **34**, 87-90 (1998)
- Nakajima, N., Taya, N. and Sumi, H.: Potent fibrinolytic enzyme from the lysate of *Katsuwonus pelamis* digestive tract (Shiokara): purification and characterization. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 1604-1605 (1993)
- Sumi, H., Seiki, M., Morimoto, N., Tsushima, H., Maruyama, M. and Mihara, H.: Plasma fibrinolysis after intraduodenal administration of urokinase in rats. *Enzyme* **33**, 121-127 (1985)
- Mihara, H., Sumi, H., Yoneta, T., Mizumoto, H., Ikeda, R., Seiki, M. and Maruyama, M.: A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus fubellus*. *Jap. J. Physiol.* **41**, 461-468 (1991)
- Nakajima, N., Mihara, H. and Sumi, H.: Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 1730-1737 (1993)
- Fujita, M., Hong, K., Ito, Y., Misawa, S., Takeuchi, N., Kariya, K. and Nishimuro, S.: Transport of nattokinase across the rat intestinal tract. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 1194-1196 (1995)
- Fujita, M., Nomura, K., Hong, K., Ito, Y., Asada, A. and Nishimuro, S.: Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **197**, 1340-1347 (1993)
- Nakamura, T., Yamagata, Y. and Ichishima, E.: Nucleotide sequence of the subtilisin NAT gene, aprN, of *Bacillus subtilis* (natto). *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 1869-1871 (1992)
- Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Muraki, H.: A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia.* **43**, 1110-1111 (1987)
- Sumi, H., Nakajima, N. and Yatagai, C.: A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack "Shiokara", a Japanese traditional fermented food. *Comp. Biochem. Physiol.* **112B**, 543-547 (1995)
- Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K. and Hiratani, H.: Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol.* **84**, 139-143 (1990)
- Kim, Y.T., Kim, W.K., and Oh, H.I.: Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from Chungkook-jang. (in Korean) *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1-5 (1995)
- Kim, W., Choi, K., Kim, Y., Park, H., Choi, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon, I. and Lee, S.: Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2482-2488 (1996)
- Nonaka, T., Dohmae, N., Hashimoto, Y. and Takio, K.: Amino acid sequences of metalloendopeptidases specific for acyl-lysine bonds from *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. *J. Biol. Chem.* **272**, 30032-30039 (1997)
- Nonaka, T., Hashimoto, Y. and Takio, K.: Kinetic characterization of lysine-specific metalloendopeptidases from *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. *J. Biochem.* **124**, 157-162 (1998)
- Min, T.J., Kim, E.M., Lee, S.J., and Bae, K.G.: Studies on the screening and development of antibiotics in the mushroom-The screening of antifungal components in Basidiomycetes (I). (in Korean) *Kor. J. Mycol.* **23**, 14-18 (1995)
- Astrup, T. and M llertz, S.: The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Archs. Biochem. Biophys.* **40**, 346 (1952)
- Kim, S.H., Choi, N.S. and Lee, W.Y.: Fibrin zymography: a direct analysis of fibrinolytic enzymes on gels. *Anal.*

- Biochem.* **263**, 115-116 (1998)
20. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951)
21. Helmut, L. and Knut, B.:  $\alpha_2$ -plasmin inhibitor ( $\alpha_2$ -antiplasmin). *Methods of Enzymatic analysis* (Enzyme 3) 455-461 (1984)
22. Kim, S.J., Yoon, J.H., Lee, M.S., and Kim, H.B.: Isolation and characterization of *Bacillus cereus* secreting proteases from Korean soybean paste. (in Korean) *Kor. J. Microbiol.* **33**, 136-141 (1997)
- 

(1998년 11월 27일 접수)