

Partial Purification and Characterization of Fibrinolytic Substance from Wooltalikong (*Phaseolus ssp.*)

Hae-Sook Oh and Jun-Ho Kim[†]

Department of Food and Nutrition, Sangji University, Wonju 220-702, Korea,

Department of Chemistry, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

Fibrinolytic substance was purified from the Wooltalikong (*Phaseolus ssp.*), using DEAE-cellulose chromatography, Sephadex G-150 gel-filtration, and FPLC gel-filtration. The substance has a molecular weight of 5262.70 Da as measured by MALD-TOF mass spectrometry. It has a pH optimum at pH 6.0. The fibrinolytic activity of purified substance was inhibited by EDTA and 1,10-phenanthroline and slightly decreased by PMSF and pepstatin A. It shows the maximum fibrinolytic activity at 40 °C and the substance was stable up to 50 °C. The activity of the substance was increased by Zn²⁺ and was totally inhibited by Hg²⁺. This study revealed that Wooltalikong could be a good source of fibrinolytic products due to its small molecular size and heat-resistant ability.

Key Words: Fibrin plate assay, Fibrinolytic substances, Wooltalikong

서 론

통계청이 발표한 95년도 사망원인 통계에 따르면 순환기계 질환과 암에 의한 사망률이 각각 36.3%와 21.4%로 전체 사망률의 반 이상을 차지하고 있으며, 국민소득의 향상과 식생활의 서구화에 따라 이들 질병으로 인한 사망률이 점차 높아지고 있다고 보고된 바 있어 그 대책마련이 시급한 실정이다. 혈전은 혈액의 흐름을 방해함으로써 여러 가지 혈관계 질환을 유발하는데 이 혈전은 한번 생성되면 쉽게 용해되지 않는다. 혈전을 제거하기 위해서 지금까지는 urokinase, streptokinase, tPA (tissue type plasminogen activator) 등 혈전자체에 대한 선택성이 낮은 편인 plasminogen activator가 사용되어 왔다.

여러 가지 부작용을 일으키는 의약품과는 달리 식품은 반복해서 장기간 섭취하기 때문에 유효성분이 미량 함유되어 있어도 항상 섭취할 수 있는 장점이 있다. 심혈관계 질환이나 동맥경화 등과 같은 현대병은 식이 조절이 중요하므로 일상적으로 쉽게 접할 수 있는 농산물 중에서 생리활성 물질이 함유된 종류를 규명하는 것이 바람직하며, 동시에 민간요법에서 주장하는 생리활성을 과학적으로 입증할 필요가 있다.

콩은 여러 종류의 생리활성 물질을 함유하고 있으며, 최근에는 항암, 항균물질과 더불어 이소플라본, 사포닌, 레시틴, 올리고당 등 여러 기능성 성분의 주요 소재로 그 활용가치를 인정받고 있다 (Kwon, 1999; Sohn et al., 2000). 이중 이소플라본은 폐경기 증후군 골다공증, 심혈관계 질환, 유방암, 전립선암, 대장암 등과 같이 호르몬과 관련된 질환의 예방에 효과가 있음이 알려지고 있으며 (Cassidy, 1996; Knight et al., 1996; Hong et al., 2000), 콩에 포함된 여러 종류의 효소 중에는 혈전성분인 섬유소 (fibrin)를 분해시키는 단백질 분해효소의 존재도 규명된 바 있다. 실제로 식품에서 혈전용해활성을 얻기 위한 연구들이 수행되고 있으며, 청국장과 된장 (Kim et al., 1996; Kim, 1998), 나토, 젓갈 등의 발효식품으로부터 혈전용해효소의 정제 및 생산균주의 분리가 보고되었고, 버섯 (Kim et al., 1998; Kim et al., 1999; Kim 2000)과 콩류 (Hussein et al., 1998; Oh et al., 2002; Oh et al., 2003)도 주요 소재가 될 수 있음이 알려졌다.

넝쿨콩으로도 알려진 울타리콩 (*Phaseolus ssp.*)은 우리나라 재래콩의 한 종류로서 흔히 밥밀콩이나 호박죽 재료의 하나로 이용되어 왔다. 상당수의 밥밀콩류가 혈전용해활성을 갖고 있음이 보고된 바 있으며 (Oh et al., 2002; Oh et al., 2003), 이에 근거하여 본 연구에서는 울타리콩으로부터 혈전용해물질을 부분 정제하고, 그의 이화학적 특성을 연구하여 새로운 혈전용해제로의 사용 가능성을 탐색하고자 하였다.

* 논문 접수: 2004년 7월 7일

수정재접수: 2004년 11월 3일

[†] 교신저자: 김준호, (우) 220-702 강원도 원주시 우산동 660번지, 상지대학교 이공과대학 화학과

Tel: 033-730-0423, Fax: 033-730-0403

e-mail: jhokim@mail.sangji.ac.kr

재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에서 시료로 사용한 울타리콩 (*Phaseolus ssp.*)은 2001년 10월 중순경 서울소재 경동시장에서 구입하였다. 시약으로 사용한 fibrinogen, plasmin (3 units), thrombin, bovine serum albumin, glycine, Sephadex G-150과 protease inhibitor는 Sigma 제품을, DEAE-cellulose는 Whatman 제품을 사용하였다.

2. 혈전용해활성의 측정 (Fibrin plate assay)

Haverkate-Trass (1974)의 fibrin plate법에 따라 2% gelatin-용액에 녹인 0.7% (w/v) fibrinogen-용액 10 ml와 0.05 M barbital 완충용액 (pH 7.5)에 녹인 thrombin (100 NIH units) 50 μ l을 잘 섞은 후 이를 petri dish에 부어 fibrin막을 만들었다. 시료액을 20 μ l씩 fibrin plate 위에 점적한 후 36°C에서 16시간 반응시키고, 용해면적의 크기를 통해 상대적인 활성을 측정하였다.

3. 혈전용해물질의 부분 정제

울타리콩으로부터 혈전용해물질은 4 단계를 거쳐 부분 정제하였다. 곱게 간 시료를 일정량 취해서 5배 분량 (w/v)의 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0)를 가하여 균질화시키고 (GTR-1000, Eyla Co., Japan) 4°C, 12,000 \times g에서 60분간 원심분리한 후 상층액을 얻었다. 첫 번째 정제 과정은 100°C에서 10분간 열처리하여 일부 protease inhibitor들을 제거하였으며 (Ryu et al., 1990), 이를 DEAE-cellulose column chromatography, Sephadex G-150 column chromatography, 및 FPLC gel-filtration (5.0 \times 100 mm) 과정을 거치면서 활성이 있는 분획들만 모았다. DEAE-cellulose column chromatography는 column (20 \times 200 mm)에 시료액을 주입하고 먼저 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0) 200 ml로 씻어준 다음 NaCl의 농도를 0~0.5 M로 증가시키면서 용출시켰으며, 활성이 검출된 분획은 20 mM sodium phosphate (pH 6.0) 완충액에 투석 후 같은 완충액으로 미리 평형시킨 Sephadex G-150 column chromatography (2.6 \times 100 cm)에 시간당 20 ml의 속도로 용출시켰다. Fast protein liquid chromatography (FPLC; Waters 650E)를 이용한 gel-filtration (Protein Park 300 SW) column chromatography도 같은 완충액을 분당 0.33 ml의 속도로 용출시켜 혈전용해물질을 분리하였다.

4. 혈전용해물질의 이화학적 특성

1) 분자량 측정

부분 정제한 혈전용해물질의 분자량은 MALDI-TOF/MS (Voyager-DE STR, Perseptive Biosystems)을 이용하여 측정하였다.

2) 최적 pH 측정

pH가 울타리콩에서 분리한 혈전용해물질의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해서 완충용액으로 0.1 M sodium acetate (pH 4.0~6.0), 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0~7.0), 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0~9.5), 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.5~10.0)를 사용하였다.

3) 최적 온도 측정

온도조건을 20°C에서 90°C까지 변화시키면서 혈전용해활성 변화를 관찰하였다. 즉, 특정 온도로 조절한 incubator에 시료를 점적한 plate을 넣고 3시간 반응시킨 후 용해면적을 측정하여 활성을 비교하였다.

4) 열 안정성 측정

시료를 각각 20°C부터 90°C까지 1시간 동안 열처리한 후 실온으로 급냉시켰다. 이를 fibrin plate에 점적하여 36°C에서 16시간 반응시키고 용해된 면적을 측정하여 다음 가장 넓게 용해된 것을 100%로 하고 상대적인 값을 %로 나타내었다.

5) 금속 이온, 킬레이트 화합물 및 단백질 분해효소 저해제의 영향 측정

부분 정제한 물질의 혈전용해활성에 대한 금속 이온의 영향과 효소 저해제의 영향을 알아보기 위하여 2 mM의 CaCl₂, CoCl₂, ZnCl₂, CuSO₄, MgCl₂, FeCl₂, HgCl₂, EDTA, 1,10-phenanthroline과 단백질 분해효소 저해제인 2 mM PMSF과 0.4 mM Pepstain A를 사용하였다. 이들 물질을 부분 분리한 혈전용해물질과 동일 비율로 섞은 후 fibrin plate에 점적하고 36°C incubator에서 16시간 후 용해된 면적을 측정하여 활성을 비교하였다.

결 과

1. 혈전용해물질의 부분 정제

울타리콩으로부터 혈전물질을 정제하기 위하여 열처리, DEAE-cellulose column chromatography, Sephadex G-150 column chromatography, 및 FPLC gel-filtration 등 4 단계를 거쳤다. 혈전용해활성은 조효소액을 100°C에서 10분간 열처리 후에도 많이 남아 있었다. NaCl 농도를 증가시키면서 DEAE-cellulose column chromatography를 실시한 결과 활성을 갖는 대부분의 물질은 DEAE-cellulose에 부착되지 않고 흘러 나왔으며 (#5~9) (Fig. 1), 이를 모아 Sephadex G-150 column chromatography를 실시한 결과는 Fig. 2에 제시하였다.

2. 혈전용해물질의 이화학적 특성

1) 분자량

열처리 및 DEAE-cellulose column chromatography, Sephadex G-150 column chromatography, 및 FPLC gel-filtration chromatography 등 일련의 정제 과정을 거쳐 분리한 혈전용해물질

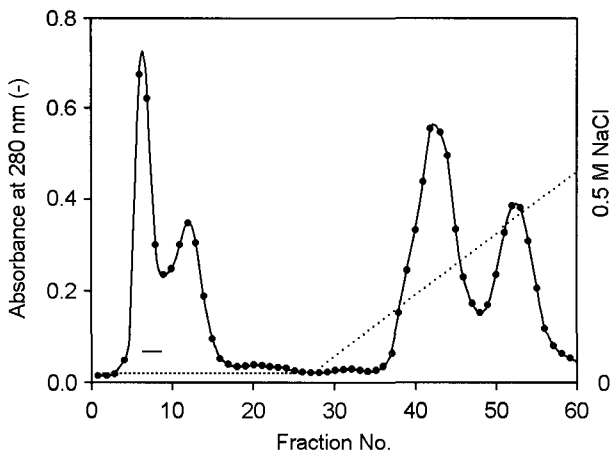


Fig. 1. Elution profiles of fibrinolytic substance with DE-52 cellulose column. Fractions containing fibrinolytic activity (#5~9) were pooled, as indicated by bars in the chromatogram.

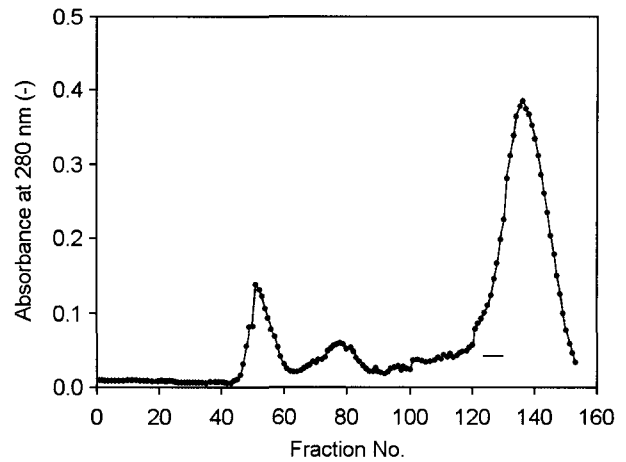


Fig. 2. Elution profiles of fibrinolytic substance with Sephadex G-150 column. Fractions containing fibrinolytic activity (#123~129) were pooled, as indicated by bars in the chromatogram.

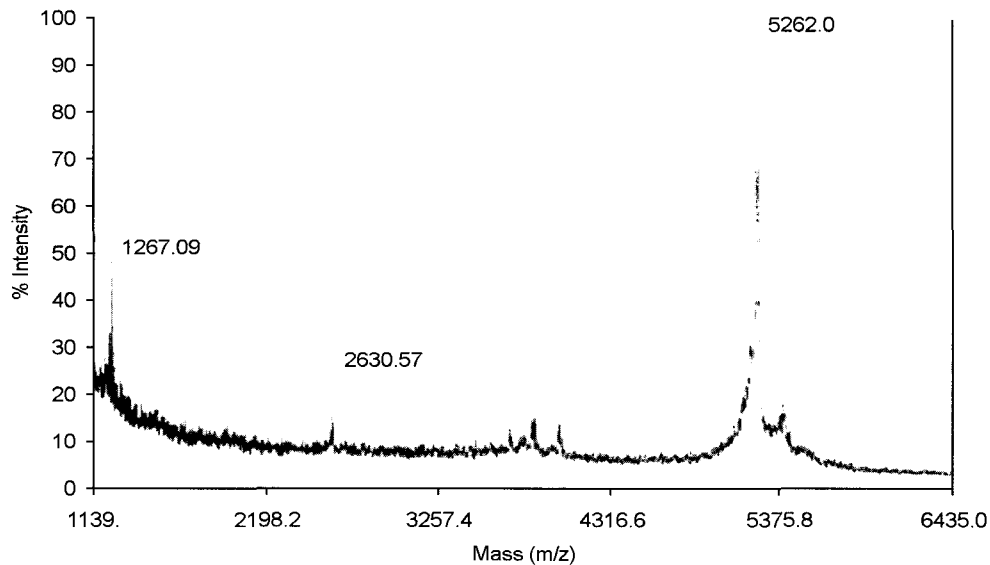


Fig. 3. MALDI-TOF spectra of isolated material.

을 MALDI-TOF/MS을 이용해 분자량을 측정하였다 (Fig. 3). Fig. 3에서 알 수 있는 바와 같이 3개의 주 피크 외에 작은 피크들이 많아 순도가 아주 높지 않아 정제 과정이 더 필요함을 알 수 있으나 분리 정제 과정을 진행할수록 활성이 감소하였기 때문에 정제가 어려운 실정으로 이러한 상황은 다른 논문에서도 보고된 바 있다 (Hussein et al., 1998). 3개의 주 피크로 미루어 혈전용해물질의 분자량은 주 피크가 나타내는 5262.70 Da인 것으로 추정되며, 나머지 1267.09 Da 및 2630.57 Da의 값을 가진 물질들은 5262.70 Da 값을 갖는 물질로부터 유래된 것으로 유추된다.

2) 최적 pH

올타리콩으로부터 부분 정제된 혈전용해물질의 최적 pH는 Fig. 4에서 볼 수 있는 바와 같이 pH 6에서 최대값을 나타내었고, pH 7 이상에서는 활성이 급감하였다. pH 4, 5, 7에서는 각각 pH 6의 값의 94, 98, 95%를 나타내는 결과로 미루어 비교적 산성에서 강한 활성을 보여 주었다.

3) 최적 온도

혈전용해물질의 최적 온도를 알아보기 위하여 온도 변화에 따른 활성도를 측정하였다. Fig. 5에서와 같이, 혈전용해 활성은 40°C에서 가장 컸으며, 35°C에서는 40°C의 81%를, 45°C에서는 65%를 보였으며, 30°C와 50°C에서는 각각 35%

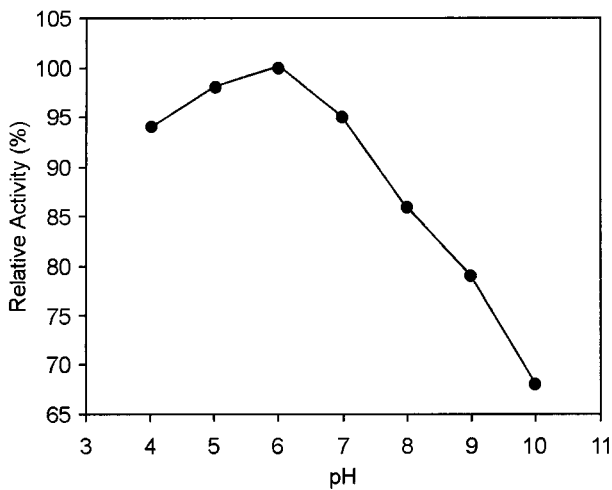


Fig. 4. Effect of pH on the activity of the purified substance. Activity is expressed as a percentage of maximal activity.

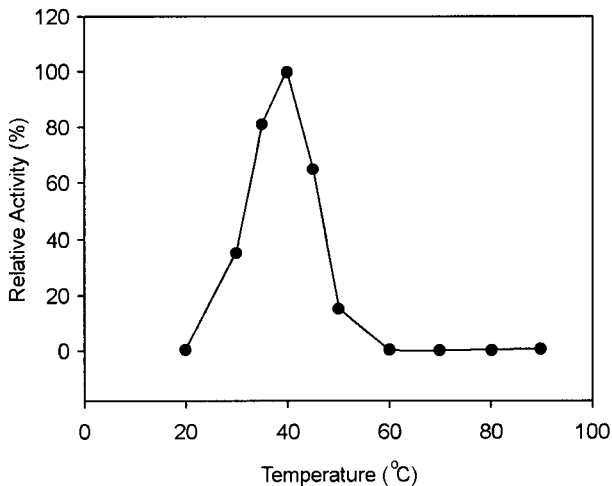


Fig. 5. Effects of temperature on fibrinolytic activity

와 15%의 활성을 나타냈다. 그러나 20°C와 50°C 이상의 온도로 처리한 경우에는 거의 활성이 없어졌다.

4) 열 안정성

부분 정제한 혈전용해물질의 열 안정성은 50°C까지는 최대의 활성을 유지하다가 60°C 이상에서는 급감하였고, 90°C에서는 25%의 활성만 나타냈다 (Fig. 6).

5) 금속 2가 이온, 킬레이트 화합물 및 단백질 분해효소 저해제의 영향

Table 1과 같이 Zn²⁺는 혈전용해활성을 증가시켰으며 다른 금속 이온들은 모두 활성저해제로 작용하였다. 그 중 Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺ 경우는 약하게 저해시킨 반면, Hg²⁺, Co²⁺, Cu²⁺들은 심하게 저해하는 것으로 나타났다. 단백질 분해효소 저해제의 영향을 조사한 결과 serine protease 저해제인 PMSF와

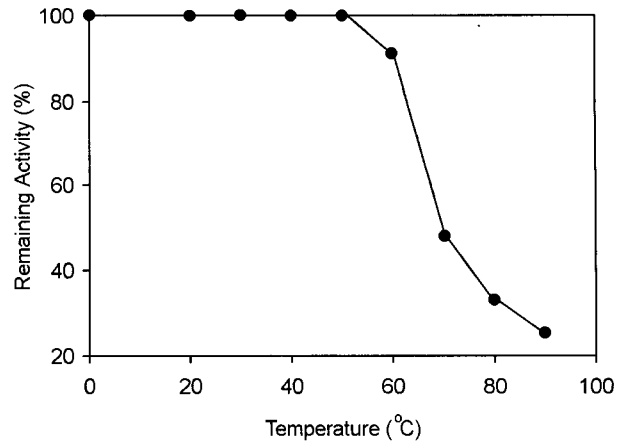


Fig. 6. Thermal stability of fibrinolytic activity of the purified substance.

Table 1. Effects of various divalent ions and protease inhibitors on fibrinolytic activity

Reagents	Concentration	Residual activity (%)
None	1 mM	100
Ca ²⁺	1 mM	70
Co ²⁺	1 mM	0
Zn ²⁺	1 mM	109
Cu ²⁺	1 mM	0
Mg ²⁺	1 mM	75
Fe ²⁺	1 mM	67
Hg ²⁺	1 mM	0
PMSF	1 mM	83
Pepstain A	0.2 mM	91
1, 10-phenanthroline	1 mM	0
EDTA	1 mM	15

E-64: trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butane
PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride

aspartic protease 저해제인 pepstain에 의해서는 효소활성이 약간 감소하였다. 금속의 킬레이트화합물인 EDTA는 활성을 크게 저해시켜 약 15%의 활성을 보였으며, 1,10-phenanthroline를 혼합한 경우에는 활성이 전혀 나타나지 않았다.

고 찰

최근 심근경색이나 뇌졸중으로 대표되는 심혈관계 질환에 의한 사망률이 제 1순위로 대두되면서 이들 질환의 가장 큰 원인이 되는 혈전과 이 혈전을 용해하는 혈전용해제에 대한 관심이 커지고 있다. 이와 더불어 기존에 사용되고 있는 혈전용해제들은 혈전에 대한 선택성이 낮은 점 등 많은 단점을 갖고 있어 이를 개선할 수 있는 새로운 혈전용해제의 개발이 시도되고 있다. 오래전부터 식용되어 온 콩은 다양한 종류의

생리활성물질을 함유하고 있음이 밝혀지면서 새로운 혈전용해물질을 탐색하기 위한 소재로 이용되어 왔다. 오 등 (Oh et al., 2002)의 보고에 의하면 우리나라 부존자원의 일종인 밥밀콩류의 상당수는 혈전용해활성을 지니고 있으며, 고온으로 처리한 후에도 혈전용해활성을 유지하는 특성을 지니고 있다. 따라서 본 연구에서는 밥밀콩류의 하나인 울타리콩으로부터 혈전용해물질의 특성을 알아내어 상용하므로써 혈관계 질환의 예방 혹은 치료 소재로 활용하기 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

울타리콩으로부터 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 8.0)으로 추출한 조효소액의 혈전용해활성은 0.002 plasmin unit/mg (비활성으로 표시)였으나 100°C에서 10분간 가열 후에는 0.062 plasmin unit/mg로 열처리에 의해 비활성이 증가하였는데, 이는 비교적 과도한 열처리에 의해 단백질 분해효소 저해제가 제거된 것으로 해석된다 (Oh et al., 2002). 콩으로부터 혈전용해물질을 분리, 정제하는 경우 다른 저자들의 보고와 같이 정제 과정이 진행될수록 활성이 감소하는 결점을 갖고 있다. 이들은 콩을 이용하여 새로운 혈전용해물질을 개발하고자 할 때 반드시 극복해야 하는 문제점으로 지적하였다.

부분 정제한 혈전용해물질의 분자량은 MALDI를 이용해 측정된 결과 5262.70 Da이었다. 이는 뱀독 (51 kDa) (Chung et al., 1992), 청국장 (28.2 kDa) (Kim et al., 1996; Choi et al., 1998), 지렁이 (20 kDa) (Mihara et al., 1993; Park et al., 1998), 뽕나무버섯 (18.5 kDa) (Kim et al., 1998; Kim et al., 1999)과 할미송이버섯 (18.1 kDa) (Kim, 2000)으로부터 분리한 효소들의 경우에 비해 매우 작은 편이다. 일반적으로 분자의 크기가 작으면 혈전용해제로 사용 시 흡수가 용이한 장점을 갖는다고 할 수 있다. 울타리콩에서 분리한 혈전용해물질은 pH 6.0에서 최대 활성을 띠고 최적 온도는 40°C로 나타났으며, 90°C에서 1시간 열을 가한 후에도 약 25%의 활성이 남는 비교적 열에 안정한 물질인 것 같다. 또한 실험에 사용한 7종의 금속 이온 중 Zn^{2+} 는 활성을 증가시킨 반면, Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} 첨가 시에는 활성을 완전히 저해시켰고, 나머지 3종의 금속 이온은 25~33% 정도 활성을 저해시켰다. 단백질 분해효소 저해제인 PMSF와 pepstain에 의해서는 효소활성이 약간 감소하였으며 킬레이트 화합물인 EDTA와 1,10-phenanthroline의 경우는 매우 낮은 활성을 나타냈다.

다른 연구결과에 비해 분자량이 매우 작은 점과 혈전용해활성에 영향을 미치는 물질들의 결과로 보아 울타리콩이 함유하고 있는 혈전용해물질은 단백질 분해효소로 보기에 어려운 측면이 있다. 콩에는 여러 종류의 생리활성물질인 펩타이드나 탄수화물이 포함되어 있는데, 그 중 galactomannans와 같은 물질은 항암, 항균, 항응고 뿐 아니라 혈전용해활성도 나타내는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 분리 정제한 이 물질도 펩타이드나 혹은 저분자 탄수화물 가

수분해물로 추정하는 것이 타당한 것으로 여겨지며, 보다 정확한 정보를 얻기 위해서는 정제 및 구조 분석이 수반되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 상지대학교 교내 연구비의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Cassidy A. Physiological effects of phyto-estrogens in relation cancer and other human health risk. Proc Nutr Soc. 1996. 55: 399-417.
- Choi YB, Sohn HS. Isoflavone content in Korean fermented and unfermented soybean foods. Korean J Food Sci Technol. 1998. 30: 745-750.
- Chung KH, Kim DS. Fibrinolytic and Cogulation Activities of Korean Snake Venoms. Korean Biochem J. 1992. 25: 696-701.
- Haverkate F, Traas DW. Dose-response curves in the fibrin plate assay. Fibrinolytic activity of protease. Thromb Haemost. 1974. 32: 356-365.
- Hong HD, Kim SR, Kim SS. Bowman-Birk protease inhibitor contents of soybeans and soybean products. Korea Soybean Digest. 2000. 17: 61-68.
- Hussein MM, Helmy WA, Salem HM. Biological activities of some galactomannans and their sulfated derivaties. Phytochemistry. 1998. 48: 479-484.
- Kim JH. Purification and characterization of fibrinolytic enzymes from *Tricholoma saponaceum*. Korean J Mycol. 2000. 28: 60-65.
- Kim JH, Kim YS. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from *Armillariella mellea*. Korean J Mycol. 1998. 26: 583-588.
- Kim JH, Kim YS. A fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Armillariella mellea*. Biosci Biotech Biochem. 1999. 63: 2130-2136.
- Kim SH. New trends of studying on potential activities of Doen-Jang. Korea Soybean Digest. 1998. 15: 8-15.
- Kim YT, Kim WK, Oh HS. Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus* sp. Strain CK 11-4 Screened from ChungkookJang. Appl Environm Microbiol. 1996: 2482-2488.
- Knight DC, Eden JA. A review of the clinical effects of phyto-estrogens. Obstet Gynecol. 1996. 87: 897-904.

- Kwon HJ. Bioactive compounds soybean and their activity in angiogenesis regulation. *Korean Soybean Digest*. 1999. 16: 63-68.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Randall AJ. Protein Measurement with the folin Phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951. 193: 265-275.
- Mihara H, Nakajima N, Sumi H. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci Biotech Biochem*. 1993. 57: 1726-1730.
- Oh HS, Kim JH, Lee MH. Isoflavone contents, antioxidative and fibrinolytic activities of red bean and mung bean. *Korean J Soc Food Cookery Sci*. 2003. 19: 263-270.
- Oh HS, Park YH, Kim JH. Isoflavone contents, antioxidative and fibrinolytic activities of some commercial cooking-with-rice soybeans. *Korean J Food Sci Technol*. 2002. 34: 498-504.
- Park YD, Kim JW, Min BG, Seo JW, Jeong JM. Rapid purification and biochemical characteristics of *Lumbrokinase III* from earthworm for use as a fibrinolytic agent. *Biotechnol Lett*. 1998. 20: 169-172.
- Ryu BW, Han KH. Inactivation of trypsin inhibitor and inhibitory activity of soybean (*Glycine max*) cultivars. *J Korean Agric Chem Soc*. 1990. 32: 109-115.
- Sohn HS, Lee YS, Shin HC, Chung HK. Does soybean isoflavone have adverse on human. *Korean Soybean Digest*. 2000. 17: 39-60.