

## 다발구멍장이버섯으로부터 분리한 혈전용해 세린분해효소의 특성 연구

김 준 호\*

상지대학교 이공과대학 화학과

### Characterization of a Fibrinolytic Serine Protease from an Edible Mushroom, *Albatrellus confluens*

Jun-Ho Kim\*

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

(Received October 6, 2008. Accepted December 19, 2008)

**ABSTRACT:** A fibrinolytic serine protease was purified from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Albatrellus confluens*. The enzyme had a molecular mass of 30086.41 Da, as measured by MALDI-TOF mass spectrometry. The N-terminal amino acid sequence of the enzyme was Glu-Thr-Val-Thr-Glu-Thr-Ala-Pro-Trp-Gly-Leu-Ser-Arg-Ile. It displayed optimal activity at 50°C and within a pH range of 8.0-10.0, suggesting that the enzyme is an alkaline protease. The enzyme was stable up to 30°C. The enzyme displayed a strong substrate specificity for the synthetic peptide, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe pNA. The enzyme activity was completely inhibited by addition of PMSF, indicating that the enzyme is a serine protease. No inhibition was observed following addition of E-64, pepstatin, or EDTA. The activity of the purified enzyme was decreased in the presence Fe<sup>2+</sup> or Co<sup>2+</sup>, and the enzyme was completely inhibited by addition of Hg<sup>2+</sup>. From these results, we propose that *Albatrellus confluens* could be used for biofunctional foods development and has potential therapeutic value for the treatment of vascular diseases.

**KEYWORDS :** *Albatrellus confluens*, Fibrinolytic serine protease, Vascular diseases

한국인의 평균수명은 79.1세로 경제개발협력기구(OECD) 회원국의 평균 수명 78.9세를 앞지르며 빠른 속도로 증가하고 있다. 평균수명의 증가와 함께 나타나는 노인성 질환은 큰 사회적인 문제가 되고 있으며 개인적으로는 노후 삶의 질을 좌우하는 한 요인이 되고 있다. 노인성 질환의 하나인 혈관계질환에는 뇌혈관 질환, 심장질환, 고혈압성 질환 등이 있으며 이들은 한국인의 사망원인 10위 안에 드는 질병들로 이들에 의한 사망율은 높은 편이다(통계청, 2008).

2007년도 통계청 발표에 의하면 우리나라 3대 사망원인은 악성신생물(암), 뇌혈관질환, 심장질환으로 전체 사망자의 48.4%를 차지하고 있으며 암은 단일 질병으로는 가장 높은 27.6%를 나타냈다. 그러나 실제 암에 의한 사망률은 폐암, 위암, 간암 등 모든 암을 합한 통계임을 감안하면, 오히려 단일 질환으로 뇌혈관질환이 더 위험함을 알 수 있다. 특히 남성에 비해 평균 수명이 긴 여성의 경우, 뇌혈관질환, 심장질환, 고혈압성질환의 사망률의 합이 26.8%로 22.5%의 암보다 높아 남성보다 여성의 경우 혈관계질환에 더 취약함을 알 수 있다. 이들 혈관계 질환은 한번 발생하면 치료기간도 길며, 완치도 힘들고 치료비용

도 큰 노인성 질환으로 대다수 노인이 겪어야 하는 질병들로 모든 이에게 심적인 부담을 주는 질병들이다. 치료와 함께 예방이 중요한 혈관계 질환의 발생 요인으로는 유전적요인, 환경적요인과 식생활의 변화요인 등이 알려져 있다(김, 2001).

혈관계질환은 주로 혈관 안에 노폐물의 축적으로 생긴 질환들로, 특히 혈관에 생긴 혈전은 혈액의 흐름을 방해하여 뇌출혈, 뇌혈전증, 심부전증, 심장마비 등을 유발하는 혈관계질환의 주원인으로 알려져 있다. 정상적인 경우 혈관내에 섬유소 용해제와 혈액 응고계가 균형을 이루고 있어 혈전이 생기지 않지만, 여러 가지 원인에 의해 혈전이 생기면 쉽게 용해되지 않아 혈관계 질환을 일으킨다(Daka and Semba, 1995). 이 혈전의 주성분은 주로 혈소판과 섬유소로 이루어져 있어(김, 1998), 혈전용해제를 이용하여 혈전의 용해로 혈액의 흐름을 원활히 하여 혈관계 질환을 치료 할 수 있으며, 예방 약물로는 혈전의 형성을 저해하는 항응고제와 항혈소판제가 이용되고 있다. 기존의 혈전용해제들은 혈전에 대한 선택성이 작아 장기간 사용 시 전신출혈이 나타나며, 가격이 비싸고 유로키나제를 제외하고는 경구투여가 힘든 단점이 있어, 이러한 단점을 극복할 수 있는 새로운 혈전 용해제가 필요하게 되었다. 이 같은 기대를 충족 시켜 줄 수 있는 소재가 식용 가능

\*Corresponding author <E-mail : jhokim@mail.sangji.ac.kr>

하고 많은 약리활성 물질을 함유하고 있어 오래 전부터 민간요법에서 질병 치료목적으로 사용되어오고 있는 버섯이다. 버섯은 오래 전부터 식용과 약용으로 이용되어 왔기에 독성에 대한 안전성이 확인 된 소재로 근래 기능성 식품과 신약개발의 소재로 크게 관심을 끌고 있는 소재이다.

최근 소득의 증가와 평균 생존 연령의 증가와 함께 삶의 질에 대한 관심이 증가하면서, 치료효과는 크지만 부작용이 나타나는 화학약품 대신 그보다 약효는 작지만 부작용이 없는 생약에 대한 관심이 더 커지고 있다. 이 같은 생약의 재료가 되는 버섯을 기능성 식품의 재료로 이용할 경우 유효성분이 미량이라도 장기간 섭취함으로써 큰 효과를 기대 할 수 있다.

우리나라에는 약 1600 여종의 버섯이 자생하고 있으며, 이 중 송이, 능이, 표고로 대표되는 식용 가능한 야생버섯이 약 350~400 여종이 있고, 상황버섯, 표고버섯, 구름버섯 같이 약용으로 사용되는 있는 버섯 약 100 여종이 자생하는 것으로 알려져 있다(안, 1992).

버섯에 항암효과가 있다는 사실은 이미 오래전에 알려져 주로 민간요법에서 사용되어 왔으나, 최근에서야 그 성분이 다당체임이 알려 졌고 이를 이용한 여러 제품들이 생산되어 이용되고 있다. 버섯류가 가지고 있는 여러 가지 약리 작용 중에는 항암작용(김 등, 1983), 항균 효과(박 등, 1995), 항산화작용(Stavino, 1997), 혈중 콜레스테롤 저하효과(Kubo *et al.*, 1983), 혈압강하효과(Kabir and Kimura, 1989), 항바이러스 효과, 항 혈전효과, 혈소판응집억제작용 등이 있으며(Kubo *et al.*, 1983; Kabir and Kimura, 1989), 혈당강하효과와 혈전용해효과에 관한보고도 있다(김 등, 2007). 이외에도 버섯들로부터 생리활성물질에 관한 보고들이 계속되고 있지만, 그 버섯의 종이 일부에만 국한되어 있어 아직도 많은 종류의 버섯에 관한 연구가 필요하다. 이 같이 다양한 약리효과를 나타내는 버섯이 식용 가능한 경우 이 버섯은 제재의 소재로 사용할 수 있을뿐만아니라 기능성 식품이나 음료의 개발에도 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 국내산 야생버섯에서 혈전용해효과를 탐색하던(김 등, 1998) 중 혈전용해효과가 큰 다발구멍장이 버섯을 발견하고 이를 혈전용해제나 기능성식품의 소재로 이용하기위한 기초자료를 수집하기위해 이 버섯으로부터 혈전용해 효소를 분리 정제하고 물리 화학적 특성을 연구하였다. 다발구멍장이버섯은 향긋한 향이 나며, 맛은 약간 쓰고 부드러운 육질을 갖고 있으며 주로 가을 침엽수림 지역에 다발로 자라는 식용 가능한 버섯으로 알려져 있다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 다발구멍장이버섯은 2007년 9월 설

악산에서 채집하여 분류동정 후 시료로 사용하였다. 시약으로 사용한 fibrinogen, plasmin(P 4895, 3 units), thrombin, bovine serum albumin, glycine과 protease inhibitor는 Sigma(St. Louis, Missouri 63178; USA) 제품을, DEAE-cellulose는 Whatman(Maidstone; England) 제품을, Phenyl Sepharose column (HiTrap Phenyl FF), LMW Electrophoresis calibration Kit는 Pharmacia(Little Chalfont Buckinghamshire; England) 제품을 사용하였다.

### 혈전용해효소의 정제

모든 정제 과정은 4°C에서 수행하였다. 채집한 버섯 자실체 약 40 g을 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)에 넣고 잘게 부수고 12,000 rpm에서 1시간 원심분리 하여 얻은 상등액을 같은 완충용액으로 평형된 DEAE-cellulose column(20 × 200 mm)에 흘려보내고 완충용액 200 ml로 씻어 준 후 0.0~0.5 M NaCl의 농도 기울기로 용출 시켰다.

혈전용해 활성 부분을 모아 1.4 M ammonium sulfate가 포함된 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충 용액으로 포화된 Phenyl Sepharose column(HiTrap Phenyl FF: 1 ml)에 흘려 보낸 후 1.4 M~0.0 M ammonium sulfate의 농도 기울기로 흘려준다. 활성분획을 다시 모아 20 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.0)에 투석시킨 후 동일한 완충 용액으로 미리 평형 시킨 fast protein liquid chromatography (FPLC)의 Mono S column(5.0 × 100 mm)에 주입하였다. 완충 용액 3 ml로 씻어 준 후 0.0~0.3 M NaCl 농도 기울기로 용출 시켰다. 각 분획의 효소활성을 측정 한 후 활성이 큰 부분을 모아 실험에 사용하였다.

### 단백질의 정량

효소의 단백질은 Lowry 등(Lowry *et al.*, 1951)의 방법에 의하여 bovine serum albumin을 사용한 표준곡선에 의해 정량하였다.

### 혈전용해활성의 측정(Fibrin plate assay)

Haverkate-Trass의 fibrin plate법(Haverkate and Traas, 1974)에 따라 2% gelatin용액에 녹인 0.7%(w/v) fibrinogen 용액 10 ml와 0.05 M barbital 완충용액(pH 7.5)에 녹인 thrombin(100 NIH units) 50 μl을 잘 섞은 후 이를 petri dish에 부어 fibrin막을 만들었다. 효소 용액을 20 μl씩 fibrin plate 위에 점적한 후 36°C에서 8시간 동안 방치하였다. 효소에 의해 fibrin막이 용해되면 용해면적을 측정하여 상대적인 활성을 측정하였다. 표준대조구로는 plasmin을 사용하였으며, plasmin을 연속적으로 희석하여 얻은 표준곡선에 따라 활성을 계산하였다.

### 분자량 결정

분리한 효소의 분자량은 12% SDS-PAGE를 이용한 전기영동과 MALDI-TOF/MS(Voyager-DE STR, Perseptive

Biosystems)을 이용하여 결정하였으며, gel은 coomassie blue R-250로 염색하였다. MALDI-TOF/MS 에 의한 분자량 측정은 기초과학 지원연구소(서울)에서 수행하였다.

### N-Terminal amino acid analysis

분리한 효소의 아미노산 서열은 기초과학 지원연구소(서울)의 precise protein sequencing system(Applied Biosystems Model Procise-491)을 사용하여 결정하였다.

### 최적 pH

효소의 활성에 미치는 pH의 영향은 완충용액으로 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 5.0~7.5), 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 8.0~9.5), 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 10~10.5)를 사용하였고 기질로 N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe pNA를 사용하여 36°C에서 혈전용해 효소와 반응하는 가수분해 활성을 조사하였다. 즉 3 mM의 기질 50  $\mu$ l에 해당하는 buffer 925  $\mu$ l와 효소 25  $\mu$ l을 넣고 섞은 후 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

### 최적온도

Fibrin plate 방법을 이용하여 온도 변화에 따른 효소의 활성도 변화를 측정하였다. 30°C에서 90°C까지 배양기의 온도를 변화시키며 효소를 점적한 plate을 넣고 3시간 후에 plate의 용해면적을 측정하여 효소의 활성을 비교하였다.

### 열 안정성 조사

20°C부터 80°C까지 각각 1시간 동안 열처리한 후 이 시료들을 점적한 fibrin plate를 36°C의 온도로 유지된 배양기에 8시간 동안 방치한 후 용해된 면적을 측정하고 가장 넓게 용해된 경우를 100%로 하고 이에 대한 상대적인 넓이의 비를 %로 나타낸다.

### 기질 선택성 조사

정제된 효소의 기질에 대한 선택성을 조사하기 위해 합성된 p-nitroaniline를 포함하는 펩티드 기질들을 사용하였다. 3 mM 기질용액 50  $\mu$ l에 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 8.5) 925  $\mu$ l와 효소 25  $\mu$ l를 넣고 섞은 후 405 nm에서 흡광도 변화를 측정한다. 사용한 기질로는 D-Phe-Pip-Arg pNA, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe pNA, Phe-Ala pNA, Ala pNA, Lys pNA, Pro pNA, Gly pNA, Leu pNA 등이 있다.

### 효소활성에 미치는 금속 2가 이온과 효소 저해제의 영향

정제된 효소의 활성에 대한 금속 이온의 영향과 효소 저해제의 영향을 알아보기 위하여 2 mM의 CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, EDTA, 1,10-phenanthroline 과 단백질 분해효소 저해제인 PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride), E-64(trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butane)과 0.4 mM의 Pepstain A을 같은 부피의 혈전용해효소 용액과 섞은 후 fibrin plate에 점적 하고 36°C 배양기에 넣고 8시간 후 용해된 면적을 측정하여 활성을 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 혈전용해 효소의 정제

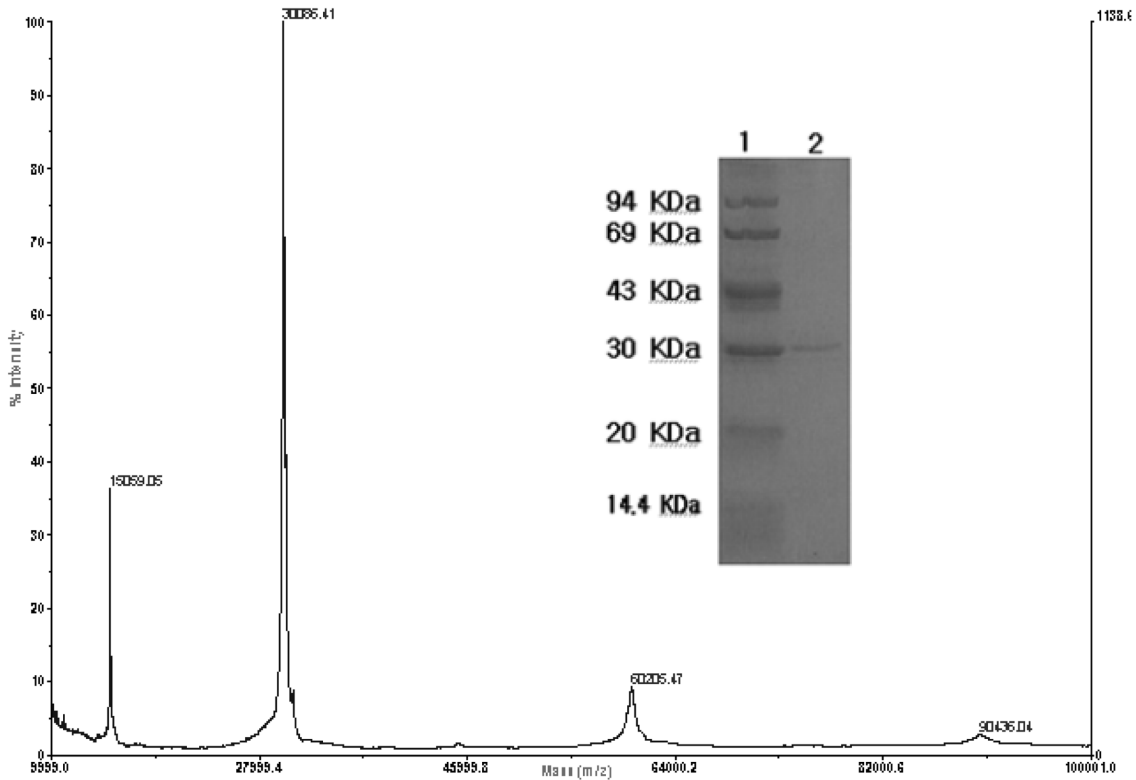
혈전용해활성이 큰 다발구멍장이버섯으로부터 3단계를 거쳐 혈전용해효소를 분리 정제하였다(Table 1). 조효소액 중 활성을 갖는 대부분의 효소는 DEAE-cellulose관에 붙지 않고 흘러 나왔으며, 이 활성 부분을 흡착크로마토그래피인 Phenyl Sepharose관을 이용하여 분리한 결과 ammonium sulfate의 낮은 농도에서 활성 부분이 나타났다. 이를 다시 FPLC의 Mono S column을 이용하여 분리하고 활성 분획을 SDS-PAGE로 확인한 결과 분자량 32 kDa의 단일 띠로 나타났으며, MALDI-TOF/MS을 이용하여 측정한 결과는 30086.41 Da으로 이 효소는 단량체로 이루어진 것을 예상할 수 있었다. 최종 단계에서 분리한 효소의 비활성은 30.49 U/mg으로 버섯에서 분리한 혈전용해효소로서는 비교적 큰 활성이었다(Fig. 1). 이 활성은 할미송이버섯(32.7 U/mg; Kim and Kim, 2001) 보다는 작지만, 민자주방망이버섯(22.78 U/mg; 김, 2005), 뽕나무버섯(17.02 U/mg; Kim and Kim, 1999), 쓴송이버섯(11.42 U/mg; Kim, 2002)의 비활성 보다 큰 것을 알 수 있었다. 분리한 효소의 분자량 30 kDa은 민자주방망이버섯과, 팽나무버섯(Shin and Choi, 1998)으로부터 분리한 효소와 같고, 뽕나무버섯(18.5 kDa)과 할미송이버섯(18.1 kDa)으로부터 분리한 혈전용해 효소에 비하여 큼을 알 수 있었다. 이외에도 재배버섯으로 *Pleurotus sajor-caju*(Shin and Choi, 1999)에 관한 연구도 알려져 있다.

### N-Terminal amino acid 서열 분석

이 효소의 15번째까지 N-terminal amino acid 서열 분

**Table 1.** Purification of fibrinolytic enzyme from *Albatrellus confluens*

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg protein)	Recovery (%)	Purification fold
Extract	9270.00	9184.00	0.95	100.00	1.00
DEAE-cellulose	74.06	844.11	11.40	9.19	12.00
Phenyl sepharose	21.58	495.70	22.97	5.40	24.18
Mono S (FPLC)	12.29	374.72	30.49	4.08	32.10



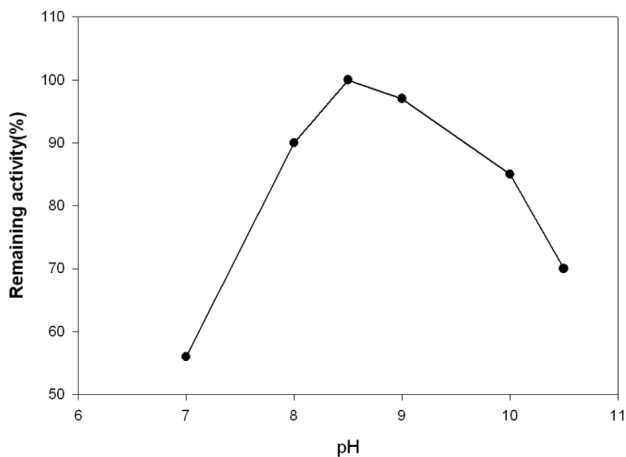
**Fig. 1.** MALDI-TOF spectra and electrophoregram of the purified enzyme. lane 1. molecular mass marker, lane 2. purified enzyme.

석 결과는 Glu-Thr-Val-Thr-Glu-Thr-Thr-Ala-Pro-Trp-Gly-Leu-Ser-Arg-Ile으로 지금까지 알려져 있지 않은 새로운 효소였다. 비슷한 분자량을 갖는 serine protease인 민자주 방망이버섯의 혈전용해효소와 구조를 비교한 결과 어떤

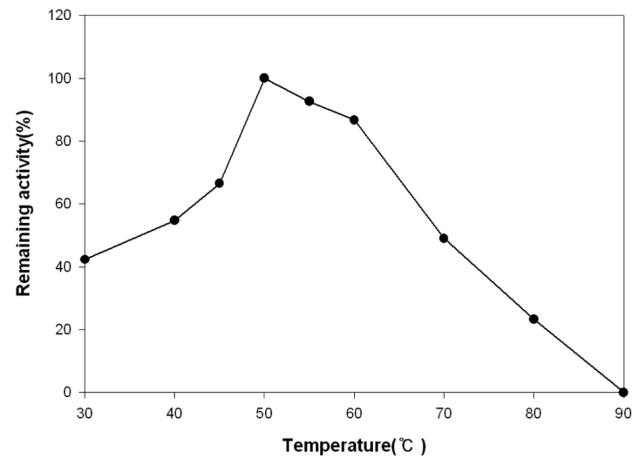
구조적인 유사성을 확인하지 못했다.

**최적 pH**

기질로 N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe pNA을 이용하여 pH 변화에 따른 효소 활성을 조사한 결과 Fig. 2와 같이 pH 8.0에서 10.0까지 넓은 pH 범위에서 큰 활성을 보여 주는



**Fig. 2.** Effect of pH on the fibrinolytic activity of purified enzyme from *Albatrellus confluens*. 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 5.0~pH 7.5), 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0~pH 9.5), and 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 10.0~pH 10.5) were used with N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe pNA. The maximal enzyme activity was expressed as 100%.



**Fig. 3.** Effect of temperature on the fibrinolytic activity of purified enzyme from *Albatrellus confluens*. The purified enzymes was incubated at temperatures from 30°C to 80°C for 3 hrs. Maximal enzyme activity was expressed as 100%.

alkaline protease로 pH 8.5에서 가장 큰 활성을 나타냈다.

**최적온도**

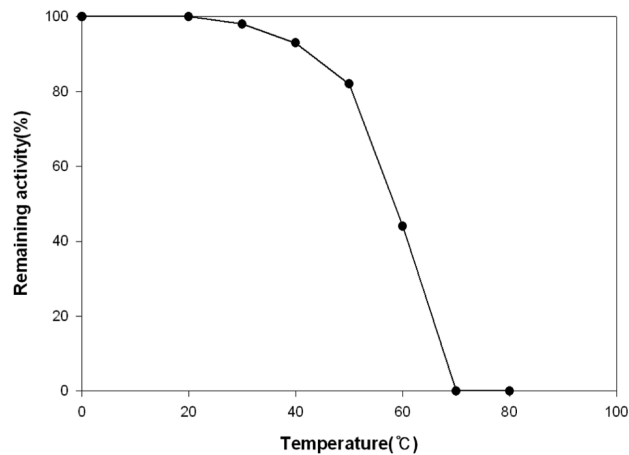
Fibrin plate 방법을 이용하여 온도 변화에 따른 효소의 활성도 변화를 측정된 결과 Fig. 3와 같이 50°C와 60°C 사이에서 비교적 큰 활성을 나타냈으며, 50°C에서 최대 활성을 나타내고 60°C 이상에서 활성이 현저히 감소하였다.

**열 안정성 조사**

20°C까지는 변화를 보이지 않다가 30°C에서 조금씩 감소하기 시작하였으며 50°C에서도 83%의 높은 활성을 유지하다 이후 급격히 감소하여 70°C에서는 거의 활성이 사라졌다(Fig. 4).

**기질 선택성 조사**

분리한 효소의 합성 기질들에 대해 기질특이성을 확인한 결과 N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe pNA는 강하게 분해시킨 반면, D-Phe-Pip-Arg pNA는 약하게 분해시켰고, 나머지



**Fig. 4.** Thermal stability of fibrinolytic activity of the purified enzyme.

**Table 2.** Substrate specificity on the purified fibrinolytic enzyme

Substrate	Relative activity (%)
D-Phe-Pip-Arg pNA	6
N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe pNA	100
Phe-Ala pNA	1
Gly pNA	2
Ala pNA	0
Leu pNA	1
Lys pNA	2
Pro pNA	0
Fibrin	+
Fibrinogen	+

+, positive hydrolysis

**Table 3.** Effects of various divalent ions and protease inhibitor on protease activity

Reagent	Concentration (mM)	Residual activity (%)
None	1	100
Ca <sup>2+</sup>	1	100
Co <sup>2+</sup>	1	74
Zn <sup>2+</sup>	1	100
Cu <sup>2+</sup>	1	98
Fe <sup>2+</sup>	1	90
Hg <sup>2+</sup>	1	0
PMSF	1	0
Pepstain A	0.2	107
E-64	1	102
1,10-phenanthroline	1	96
EDTA	1	100

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

기질들과는 거의 반응하지 않았다. 결과로부터 이 효소는 기질과 반응 시 반응 자리에 대한 선택성이 큼을 알 수 있었다. 효소는 섬유소(fibrin)와 섬유소원(fibrinogen)도 분해하였다(Table 2).

**효소활성에 미치는 금속 2가 이온과 단백질 분해효소 저해제의 영향**

분리한 효소에 금속 2가 이온을 첨가하여 혈전용해 활성의 변화를 측정된 결과 Fe<sup>2+</sup>의 용액을 첨가한 경우 효소의 혈전용해활성이 약간 감소하였고, Co<sup>2+</sup>의 첨가에는 급격히 감소하다가 Hg<sup>2+</sup>의 경우는 활성이 완전히 사라졌다(Table 3).

단백질 분해효소 저해제가 효소의 활성에 미치는 영향을 보면, EDTA나 1,10-phenanthroline의 영향을 크게 받지 않는 것으로 보아 metalloprotease가 아님을 알 수 있다. Cystein protease 저해제인 E-64와 aspartic protease 저해제인 pepstain도 효소활성에 영향을 주지 못했으나, serine protease 저해제인 PMSF를 첨가한 경우 효소의 활성이 전혀 나타나지 않는 결과로부터 이 효소는 serine protease임을 알 수 있었다. 즉 분리한 효소는 금속 단백질 분해효소인 빵나무버섯, 할미송이버섯, 쓴송이버섯의 혈전용해효소와는 다르고, 민자주방망이버섯의 혈전용해 효소와 같은 serine 분해효소였다.

혈관계질환은 혈전에 의해 혈액의 흐름이 방해 되어 생긴 질환들로 혈전용해 물질이나 혈전생성 억제물질을 이용함으로써 미리 예방 할 수 있다. 일반적으로 혈전은 서서히 생성되므로 혈전용해 물질을 함유하고 있는 재료를 식품으로 사용할 수 있다면 혈관계질환의 예방과 치료에 큰 효과를 기대할 수 있을 것이다. 이 같은 조건을 갖추고 있는 버섯이 식용가능하며 향이 뛰어나고 혈전용해 활성이 큰 다발구멍장이버섯이다. 이 버섯의 혈전용해활성은 식용 가능한 민자주방망이버섯, 빵나무버섯, 쓴송이버섯

의 혈전용해효소 보다 컸으며, 할미송이버섯의 활성보다는 조금 작았다. 그러나 할미송이버섯은 활성은 크지만 약간의 독성을 갖고 있어 기능성 식품의 소재로 사용하기에는 한계가 있다. 다발구멍장이버섯 혈전용해효소의 큰 기질 선택성도 새로운 혈전용해제 개발의 큰 장점이 될 수 있을 것이다. 좀 더 많은 임상 실험을 통해 혈전과 혈장단백질에 대한 선택성이 큼이 확인되면, 식용가능하며 독성이 없고 혈전용해활성이 큰 다발구멍장이버섯은 기존의 혈전용해제들의 단점을 극복할 수 있는 새로운 혈전용해제 개발의 재료 물질로 사용할 수 있을 것이며, 또한 혈전용해활성은 적지만 다른 약리효과를 나타내는 식품재료와 함께 사용할 경우 기능성 식품의 개발을 위한 소재로 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

## 적 요

3단계를 거쳐 식용 가능한 다발구멍장이버섯으로부터 분리한 혈전용해효소의 비활성은 30.49 U/mg이었으며, MALDI-TOF/MS로부터 분자량이 30086.41 Da이었다. 일차 아미노산 구조는 Glu-Thr-Val-Thr-Glu-Thr-Thr-Ala-Pro-Trp-Gly-Leu-Ser-Arg-Ile으로 밝혀졌으며, pH 8.0에서 pH 10.0의 넓은 범위에서 큰 활성을 나타내는 alkaline protease로, 최적온도는 50°C이며, 30°C까지는 대체로 열에 안정한 효소였다. 이 효소는 합성 기질 N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe pNA을 강하게 분해하였으며, Hg<sup>2+</sup> 금속이온의 첨가로 효소 활성이 완전히 사라졌다. 효소저해제인 PMSF의 첨가로 혈전용해활성이 사라지는 결과로부터 serine 분해효소임을 알 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 2007년도 상지대학교 교내 연구비의 지원으로 이루어졌음을 밝히며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 김길영. 1998. 임상지혈혈전학. 군자출판사. pp. 1-33.
- 김명국. 2002. Science for health and humanity. *Food Science and Industry* 34:12-15.
- 김병각, 김진숙, 최응칠, 김혜령, 이종길, 이정옥, 정경수, 심미자. 1983. 한국산 고등 균류의 성분 연구(제 37보). *한국균학회지*. 11:151-157.
- 김준호. 2005. 민자주방망이버섯으로부터 혈전용해효소의 정제 및 특성연구. *한국균학회지* 33:69-74.
- 김준호, 이은진, 석순자. 2007. 야생버섯 메탄올추출물의 혈전용해 활성과  $\alpha$ -glucosidase 저해활성. *한국균학회지* 35:128-132.
- 김준호, 이호용, 유관희, 김양선, 석순자, 김양섭. 1998. 치악산 버섯추출물로부터 Fibrin 분해활성의 검색. *한국균학회지* 26:589-593.
- 박상신, 이갑득, 민태진. 1995. 버섯 중 항균물질의 검색 및 개발에 관한 연구. *한국균학회지* 23(1):28-36.
- 안덕균. 1992. 한국산 약용 균류. *한국균학회지* 20:154-166.
- 통계청. 2008. 주로 찾는 통계. 주요사망원인별 사망자 수.
- Daka, M. D. and Semba, C. P. 1995. Thrombolytic therapy in venous occlusive disease. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 6(suppl):73-77.
- Haverkate, F. and Traas, D. W. 1974. Dose-response curves in the fibrin plate assay. fibrinolytic activity of protease. *Thromb. Haemost.* 32:356-365.
- Kabir, Y. and Kimura, S. 1989. Dietary mushrooms reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR). *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 35:91-94.
- Kim, J. H. 2002. Purification and characterization of fibrinolytic enzymes from *Tricholoma sejunctum*. *Kor. J. Biomed. Lab. Sci.* 8:245-250.
- Kim, J. H. and Kim, Y. S. 1999. A fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Armillariella mellea*. *Biosci. Biotech. Biochem* 63(12):2130-2136.
- Kim, J. H. and Kim, Y. S. 2001. Characterization of a metalloenzyme from a wild mushroom, *Tricholoma saponaceum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 65(2):356-362.
- Kubo, M., Tatsuda, H., Nogami, M., Arichi, S and Takahashi, T. 1983. Studies on the *Ganoderma lucidum* (IV), effects on the disseminated intravascular coagulation. *Yakugaku Zasshi* 103:871-877.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J. and Randall, A. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Shin, H. H. and Choi, H. S. 1998. Purification and partial characterization of a Metalloprotease in *Flammulina velutipes*. *J. Microbiol.* 36:20-25.
- Shin, H. H. and Choi, H. S. 1999. Purification and characterization of metalloenzyme from *Pleurotus sajor-caju*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9:675-678.
- Stavinoha, W. B. and Satsangi, N. 1997. The 7th international symposium on the *Ganoderma Lucidum*. Seoul, Korea, 11 June. pp. 5-17.