



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 36/07 (2006.01)

A61K 36/074 (2006.01)

(11) 공개번호

10-2007-0052824

(43) 공개일자

2007년05월23일

(21) 출원번호 10-2005-0110539

(22) 출원일자 2005년11월18일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

김승

광주광역시 서구 풍암동 1132 풍암우미아파트 102-309

조선대학교산학협력단

광주직할시 동구 서석동 375, 조선대학교 산학기획팀

(72) 발명자

김성준

광주광역시 광산구 양동 186

김승

광주광역시 서구 풍암동 1132 풍암우미아파트 102-309

김명곤

전라북도 전주시 완산구 서신동 960-5 서신동아2차 202/1001

전홍성

광주 북구 문흥1동 현대아파트 102-203

김지은

광주광역시 서구 상무1동 광명하이츠아파트 101-2105

김재성

전라남도 순천시 조례동 동아·시영아파트 101-1310

최한석

전라북도 전주시 완산구 교동 1가 23-4

(74) 대리인

조광형

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 장수버섯 유래의 혈전분해효소, 이를 함유하는 기능성 식품및 그의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 장수버섯 균사체 유래의 혈전분해효소, 이를 함유하는 기능성 식품 및 그 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 장수버섯 균사체 유래의 혈전분해 효소는 천연물에서 유래한 것으로 부작용이 없으며 종래의 혈전분해제와는 상이한 기질 특이성을 가지며 뛰어난 피브린 및 피브리노겐 용해 활성을 나타내므로 혈전증의 치료 및 예방에 효과적으로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 이를 위한 기능성 건강 식품으로 이용할 수 있다.다.

대표도

도 4

특허청구의 범위

청구항 1.

장수버섯 균사체(*Formitella fraccine*)로부터 분리되고, 분자량이 약 42 kDa이며, EDTA, EGTA에 의해 활성이 저해되는 메탈로프로테아제(metalloprotease)이고, 최적 온도는 20 ~ 45 °C의 범위이고, 최적 활성 pH는 5.0 ~ 7.0의 범위이며, Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} 등의 금속이온에 의해 활성이 저해 받으며, 피브린 및 피브리노젠을 1 시간 이내에 분해하는 능력을 지닌 것을 특징으로 하는 장수버섯(*Formitella fraccine*) 유래의 혈전분해효소 FFP(Purified *Formitella fraccine* protease), 그의 효소변이체 또는 돌연변이 효소 및 제약학상 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 혈전 용해제.

청구항 2.

제1항에 있어서, 장수버섯 균사체의 배양 여액에서 분리된 것을 특징으로 하는 혈전 용해제.

청구항 3.

제1항에 따른 혈전분해효소, 그의 효소변이체 또는 돌연변이 효소를 주성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 체내 혈전형성예방 또는 억제용 기능성 식품.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 장수버섯 유래의 혈전분해효소에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 장수버섯 유래의 혈전분해효소 및 그의 정제 방법 및 이들의 혈전 치료 및 예방에 있어서 용도에 관한 것이다.

전 세계 사망원인의 약 39%를 차지하고 있는 혈전질환관련의 질병은 최근 우리나라에서도 식생활의 서구화, 과도한 스트레스, 인구 고령화 등으로 인하여 더욱 증가되고 있는 추세이다.

혈전용해 기전은 도 1에 나타낸 바와 같이 요약할 수 있다. 현재 사용 중인 혈전분해효소제로는 스트렙토키나아제(streptokinase, SK), 유로키나아제(urokinase, UK), 조직플라스미노겐 활성화제(t-PA) 등이 알려져 있으며, 주로 생체 내 플라스미노겐(plasminogen)을 플라스민(plasmin)으로 활성화하는 간접적인 방법으로 혈전을 용해시킨다. 위와 같은 플라스미노겐 활성화제의 경우 알러지, 발열, 국소출혈, 짧은 반감기 및 고가의 의약품으로 분류되어 혈전치료제에 국한되어 이용된다는 문제점이 있다. 또한, 단백질 분해효소제는 brinase, papain, ochrase, trypsin, plasmin 등이 있으나 정맥 주사로 주입시 무작위적인 단백질분해로 인한 혈전의 혈전생성 인자들까지 파괴하여 출혈유발 및 독성이 강하여 거의 사용하고 있지 않고 있다. 스트렙토키나아제 및 유로키나아제는 플라스미노겐을 플라스민으로 전환시키는 외래성 효소 물질로써 발열, 알러지, 국소출혈, 저혈압 유발 등의 부작용 내포하고 있을 뿐만 아니라 가격이 매우 비싼 의약치료제로 분류되어 있어 치료제에 국한되어 있으며, 체내 혈전형성 예방에는 사용되지 못하고 있는 실정이다.

따라서 직접 혈전에 작용하고 부작용을 최소화시킬 수 있으며 저렴한 가격의 혈전분해제를 개발할 필요성이 대두되고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명자들은 상기한 바의 문제점들을 해결하고, 가격이 저렴하고 반감기가 길며 직접적 분해 기작을 이용한 혈전용해제를 얻기 위하여 다양한 식용 버섯의 균사체로부터 예의 연구한 결과, 장수버섯 균사체 배양액에서 혈전분해효소를 검출하고 분리하여 그 특성을 시험해 본 결과, 이것이 부작용이 없을 뿐만 아니라 뛰어난 혈전용해 활성을 가지고 있음을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

따라서, 본 발명의 목적은 장수버섯의 자실체, 균사체, 균사체의 배양 여액으로부터 분리한 혈전용해 효소 및 이를 포함한 배양액, 이들의 제조 방법을 제공하는데 있다.

본 발명의 추가의 목적은 장수버섯 균사체의 배양물 또는 이로부터 유래한 혈전용해효소를 포함한 제약조성물을 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 추가의 목적은 상기 혈전분해효소를 주성분으로 포함하는 혈행개선용 기능성 식품을 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 추가의 목적은 상기 혈전분해효소를 포함하는 제약조성물 및 기능성 식품의 제조 방법을 제공하는데 있다.

본 발명의 추가의 목적 및 이점은 이후의 명세서의 기재 사항으로부터 명백할 것이다.

발명의 구성

본 발명은, 일면에 있어서, 장수버섯 균사체로부터 분리한 혈전분해 효소, 동일한 기능을 가진 효소변이체 또는 돌연변이 효소를 제공한다.

장수버섯은(*Formitella fraccinea*)은 민주름 버섯목 구멍장이 버섯과에 속하는 담자균류로서 아카시재목버섯이라고도 명명되며 오래 전부터 민간약재로 사용되어 왔다. 북한에서는 만년버섯, 일명 장수버섯을 이용해 간염주사약을 개발해 치료에 이용하고 있는 것으로 알려졌다. 이것은 특히 북한에서는 백두산 볼로초라고도 하는 약용버섯으로 스테로이드 화합물 3.5%, 플라보노이드 1.5%, 배당체 0.2%, 쿠마린 0.8%, 알칼로이드 0.5%가 함유되어 있다. 특히 장수버섯은 만성 B형 간염과 암, 신장염, 관절염을 비롯한 여러 가지 면역성 질병에 특효가 있으며 성욕을 높여주고 항산화 효과가 강한 것으로 밝혀졌다. 또한 장수버섯으로부터 유래된 항생제의 경우 부작용을 덜어주며 핵산합성을 촉진시켜 인체의 원상회복을 돕고 암환자를 치료한 결과 잔존 암세포의 전이를 억제해 성숙된 암조직의 성장도 현저히 억제시키는 것으로 밝혀졌다.

본 발명에서는 임상에서 사용되고 있는 혈전분해제의 단점을 보완할 수 있으면서 대량생산이 가능한 장수버섯 균사체로부터 혈전분해효소를 분리 정제하여 체내 혈전형성 예방 효과 및 혈전분해 효과를 나타내는 혈전분해제를 제공한다.

본 발명에 따른 장수버섯(*Formitella fraccinea*) 유래의 혈전분해효소FFP(Purified *Formitella fraccinea* protease), 그의 효소변이체 또는 돌연변이 효소는 이후 자세히 설명하는 바와 같이, 분자량이 약 42 kDa이며 EDTA, EGTA에 의해 활성이 저해되는 메탈로프로테아제(metalloprotease)이고, 최적 온도는 20 ~ 45℃의 범위이고, 최적 활성 pH는 5.0 ~ 7.0의 범위이며, Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} 등의 금속이온에 의해 활성이 저해 받으며, 피브린 및 피브리노겐을 1시간 이내에 분해하는 능력을 지닌 것을 특징으로 한다.

이러한 연구 결과에 더하여, 혈전분해효소에 관련된 유전자 연구와 새로운 혈전분해효소에 대한 앞으로의 연구를 통하여 기능성 버섯류 개발과 인체 부작용을 최소화할 수 있는 새로운 혈전용해제 개발이 가능하리라 사료되어지며, 이와 같은 실험 결과에 의하여 장수버섯의 균사체로부터 분리정제된 혈전분해효소는 혈전증 질환을 예방 및 치료할 수 있을 것이라고 사료된다.

본 발명에서 사용된 용어 "혈전분해효소"는 피브린에 직접 작용하여 피브린을 분해하는 효소를 의미한 것으로 의도한 것이며, 본질적으로는 기능상에 차이가 없으나 "혈전용해효소", "피브린 분해효소" 또는 "단백질 분해효소"라는 표현과 상호 교환적으로 사용하며 이들 모두 상기 개념에 포함되는 것으로 의도하였다.

또한, 본 명세서에서 사용된 용어, "효소변이체 또는 돌연변이 효소"는 하나 또는 복수의 아미노산이 모유전자 또는 그것의 유도체의 DNA 뉴클레오타이드 서열의 변경에 의하여 수식되거나 변경된, 상기 피브린분해효소와 기능적으로 동일한 효소를 의미한다.

혈전분해 관련 유전자 연구와 새로운 혈전분해물질에 대한 앞으로의 연구를 통하여 기능성 버섯류 개발과 인체 부작용을 최소화할 수 있는 새로운 혈전용해제 개발이 가능하리라 사료되며, 결과적으로 장수버섯(FF) 균사체 배양액으로부터 분리 정제된 혈전분해효소는 혈전증질환을 예방, 치료용 제약조성물의 주성분으로서 사용될 수 있다.

본 발명에 따른 혈전분해효소는 조 추출물을 그대로 사용할 수도 있고, 이를 정제하여 순도 높게 사용해도 좋다.

조 추출물은 배양된 장수버섯 균사체의 배양 여액을 원심분리한 후 그 상층액을 취하여 이를 동결건조하여 용적을 줄인 후 에탄올 침전법으로 단백질을 분리함으로써 조단백질을 조제하여 필요한 용도에 사용할 수 있다. 균사체로부터 조단백질을 조제할 때는 완충액으로 깨끗이 세척하여 현탁시킨 다음 이를 초음파 파쇄기(Sonics & Materials Inc.)를 이용하여 파쇄한 다음 여과기로 여과하여 조단백질을 제조할 수 있다. 조단백질을 자실체에서 조제하는 경우에는 먼저 자실체에 증류수를 가하여 마쇄한 후 진공원심분리기로 원심 분리하여 그 상층액을 취하고 에탄올 침전법을 이용하여 50~75%의 에탄올로 추출하여 조제할 수 있다.

위와 같이 분리된 조단백질은 필요에 따라 원하는 용도로 사용할 수 있으나 더욱 순도가 높은 것이 필요한 경우에는 통상의 방식으로 추가로 정제하여 사용하여도 좋다. 예를 들면 CM-Cellulose column을 완충액으로 평형화시키고 조 단백질을 주입하여 액체 크로마토그래피를 수행하여 분획을 회수하고, 피브린 아가로오스 플레이트 확인법과 아조카제인 에세이를 진행하여 혈전분해 활성이 있는 부분만을 취한 다음, 예를 들면, DEAE Sephadex A-50 column을 완충액으로 평형화시킨 후 단백질 분획들을 음이온 교환 크로마토그래피(Anion-exchange chromatography)를 진행하고 액체크로마토그래피를 이용하여 분획을 회수한다. 피브린 분해 활성을 가진 것으로 확인되면 이들 분획을 추가의 정제에 사용할 수 있다. 활성단백질 분획은 모아서 투석하고 동결건조를 이용하여 농축시킨 후, 예를 들면, Sephadex G-75 column 등을 사용하여 완충액으로 평형화시킨 후 단백질 분획을 주입하여 겔여과 크로마토그래피 및 액체 크로마토그래피에 의해 활성 분획을 회수하여 더욱 정제할 수 있다.

또한, 본 발명은, 추가의 일면에 있어서, 유효 성분으로서 상기 혈전분해효소, 그의 효소 변이체 또는 돌연변이 효소 및 제약학상 허용되는 담체를 포함하는 혈전에 직접 작용하여 피브린을 용해시키는 혈전 용해제 및 그의 제조방법을 제공한다.

본 발명의 제약 조성물은 혈전에 직접 작용하여 피브린을 용해시키는 혈전 용해제로서 사용될 수 있으며, 당업자는 그러한 질병, 상태 및 이상으로부터 고통을 받는 것으로 추정되는 개인들을 표준 진단 기술을 사용하여 용이하게 파악할 수 있다. 본 발명의 혈전분해제를 적용할 수 있는 질환으로는, 이들에 한정되지 않고, 뇌혈전, 뇌색전증 등의 뇌질환, 폐색전, 폐경색증 등의 폐질환, 하지심부정맥 혈전증, 보행장애, 혈류장애성빈혈, 동맥경화성괴저증, 신경통, 고지혈증 등의 말초신경계질환, 신성고혈압, 신장병, 신부전 등의 신장질환, 협심증, 허혈성심장질환, 심근경색 등의 심장계 질환 등을 포함한다.

본 발명의 제약 조성물은 공지의 의약품 담체와 조합하여 제제화할 수 있다. 일반적으로는, 유효 성분을 약학적으로 허용할 수 있는 액상 또는 고체상의 담체와 배합하고, 또한 필요에 따라 용제, 분산제, 유화제, 완충제, 안정제, 부형제, 결합제, 붕괴제, 활택제 등을 가하고, 정제, 과립제, 산제, 분말제, 캡슐제 등의 고형제, 통상액제, 현탁제, 유제 등의 액제로 할 수 있다. 또한 이것을 사용 전에 적당한 담체의 첨가에 의해 액상으로 만들 수 있는 건조품으로 할 수도 있다.

본 발명의 제약 조성물은 경구제나, 주사제, 점적용제 등의 비경구제 중의 어떠한 것에 의해서도 투여할 수 있다.

의약품 담체는, 상기 투여형태 및 제형에 따라서 선택할 수 있고, 경구제의 경우는, 예를 들어 전분, 유당, 백당, 만니톨, 카복시메틸셀룰로스, 콘 스타치, 무기염 등이 이용된다. 또한 경구제의 조제에 있어서는 추가로 결합제, 붕괴제, 계면활성제, 윤택제, 유동성 촉진제, 교미제, 착색제, 향료 등을 배합할 수도 있다.

한편, 비경구제의 경우는 통상의 방법에 따라서 본 발명의 유효성분인 단백분해효소를 포함하는 조성물을 희석제로서의 주사용 증류수, 생리식염수, 포도당 수용액, 주사용 식물유, 참기름, 낙화생유, 대두유, 옥수수유, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 등에 용해 내지 현탁시켜서 필요에 따라 살균제, 안정제, 등장화제, 무통화제 등을 가함으로써 조제된다.

본 발명의 의약품 조성물은 제제 형태에 따른 적당한 투여경로로 투여된다. 투여방법은 특히 한정할 필요는 없고, 내용, 외용 및 주사에 의해 투여할 수 있다. 주사제는, 예를 들어 정맥내, 근육내, 피하, 피내 등에 투여할 수 있다.

본 발명의 의약품 조성물의 투여량은, 그 제제형태, 투여방법, 사용 목적 및 이것에 적용되는 환자의 연령, 체중, 증상에 따라서 적절히 설정되고, 일정하지 않지만 일반적으로는 제제 중에 함유되는 유효성분의 양은 성인 1일당 예컨대 10 μ g~2000

mg/kg이다. 그러나, 당업자는 특정 시약의 약물동력학적인 특성 및 그의 투여 모드 및 경로; 수여자의 나이, 건강, 체중; 증상의 성질 및 정도, 동시 치료의 종류, 치료의 빈도 및 목적하는 효과 등의 공지의 요인에 따라서 투여량이 변화함은 이해할 것이다.

본 발명은, 추가의 일면에 있어서, 혈전분해활성이 우수하며, 체내 혈전형성억제효과 및 다양한 약리활성을 포함하고 있는 장수버섯 균사체 또는 배양 여액 및(또는) 이로부터 분리한 혈전분해 효소를 포함하는 혈행개선용 식품 조성물 및 그의 제조방법을 제공한다.

이러한 기능성 식품은 장수버섯을 간단한 공정에 의해 대량생산이 가능하므로 제조 비용이 저렴하면서도 혈전용해 및 체내 혈전예방이 가능한 혈행개선제 효과 뿐만 아니라 천연물에 기인한 다양한 건강 증대의 시너지 효과를 기대할 수 있으므로 매우 경제적이고 유익하다.

상기 장수버섯으로부터 분리된 혈전용해제는 본 발명의 기능성 건강 식품 조성물의 전체 중량을 기준으로 약 0.1~99.9 중량%로 사용하는 것이 바람직하다.

본 발명의 식품 조성물의 복용량은, 그 제제 형태, 투여 방법, 사용 목적 및 이것에 적용되는 환자의 연령, 체중, 증상에 따라서 적절히 설정되고, 일정하지 않지만 일반적으로는 제제 중에 함유되는 유효성분의 양은 성인 1일당 예컨대 10 mg~2000 mg/kg이다. 물론 복용량은, 각종 조건에 의해서 변동하기 때문에, 상기 투여량보다 적은 양으로 충분한 경우도 있고, 또는 범위를 초과하여 필요한 경우도 있다.

본 발명에 따른 혈행개선용 기능성 식품의 제형은 당해 분야에서의 통상적인 방법에 따라, 예를 들면 분말원료, 캡슐 또는 액상 제품의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 장수버섯 유래의 혈전 분해 효소를 포함하는 건강 기능성 제품을 분말 원료의 형태로 제공하고자 하는 경우에는 그 일례를 도 16에 나타낸 바와 같이 장수버섯 균주를 약 3일 내지 15일 정도 액체 배양하여 배양 후 원심분리 등의 방법에 의하여 얻어진 균사체 및 배양액을 자가 소화방법으로 저온에서 장시간 방치 후 원심분리 및 한외여과를 통하여 기타 미생물을 제거한 후, 필요에 따라 일정량의 부형제를 첨가하여 동결 건조한 후 미세분말의 원료를 생산한다. 생산된 혈행개선 원료를 중심으로 하여 기타 상호보완 작용을 할 수 있는 건강식품 원료를 첨가하여 제품을 완성한다. 캡슐 형태의 제품은 그 제조 일례를 도 17에 나타낸 바와 같이, 상기 동결건조된 형태의 장수버섯 추출물을 각종 첨가제와 혼합한 후, 통상의 캡슐화 방식에 의하여 개별 포장 단위로 제조할 수 있다. 액상 제품은 그 제조 예를 도 18에 나타낸 바와 같이, 예를 들면, 상기 유효 성분 외에, 음료용 첨가제 또는 부형제를 적절하게 배합하여 혼합한 후, 정제수로 첨가하여 포장단위로 제조할 수 있다.

본 발명에 따른 식품 조성물은 원하는 조성물의 형태에 따라 통상의 보조제 또는 첨가제, 또는 감미료, 예를 들면 감초, 바이오틴, 고 프락토오스 콘 시럽, 맥류약염원말(건강식품 원료로 사용되는 식물명칭), 감마오리자놀, 은행잎 추출분말, 홍국 분말, 5종 비타민(비타민 E, 비타민 C, 비타민 B₁, 비타민 B₂, 비타민 B₆), 사과산, 타우린, 액상과당, 구연산, 구연산나트륨, 니코틴산, 안식향산, 안식향산나트륨, 아스파탐, 사카린, 펙틴, 말리톨, 솔비톨, 자일리톨, 구아검, 탈지분유 및 올리고당으로 이루어진 군 중에서 선택되는 하나 이상의 성분 또는 이들의 혼합물을 추가하여 기호도나 미감을 증대시킬 수 있다.

이러한 각종 첨가제의 적정 농도는 관능 검사를 통하여 선정한 후 기능성 음료 등 식품의 제형을 제조할 수 있다. 이들은 첨가제 및 부형제, 보조제 등은 본 발명의 조성물의 전체 중량을 기준으로 약 0.1~99.9 중량%로 사용하는 것이 적합하다.

<실시예>

이하, 본 발명을 실시예에 의해 더욱 구체적으로 설명한다. 그러나 이들은 단지 예시적인 것이며, 본원 발명을 이들에 한정하고자 의도한 것은 아니다.

본 발명의 실시예에서 사용된 장수버섯 균사체(*Formitella fraccinea* 이하, "FF"라고도 한다.)는 국립익산대학에서 얻은 것을 사용하였으나, 특별한 제한없이 모든 장수버섯이 사용될 수 있다. 소 피브리노젠, 인간 피브리노젠, 트롬빈, 플라스민, 아조카제인, 아크릴아마이드, 스트레이트 모노하이드레이트, 트리즈마 염기, 염산 트리즈마, 카르복시메틸(CM)-셀룰로오스, 페닐메틸술포닐플루오라이드(PMSF), 토실라이신 클로로메틸케톤(TLCK), 4-(아미디노페닐)메탄술포닐 플루오라이드(APMSF), 아프로티닌, 펩스타틴 A, 토실페닐알라닌 클로로메틸 케톤(TPCK), 에틸렌글리콜-비스-(2-(아미노에틸)-N,N,N,N'-테트라아세트산(EGTA), 소듐 클로라이드, 카제인 밀크 및 디에틸아미노에틸(DEAE)-세파로스 CL6B는 시그

마사(Sigma Co.) 제품을 사용하였다. 아가로스(Agarose)는 프로메가사(Promega Co.) 제품을 사용하였다. 예비염색 단백질 마아커 및 컬러 마아커는 캄브렉스사(Cambrex Co.) 제품을 사용하였다. 세파덱스(Sephadex) G-75 및 HiLoad™ Superdex™ 75 FPLC 컬럼은 파마시아 바이오텍(Parmacia Biotech)으로부터 구입하였다.

실시예 1: 장수버섯 균사체(FF)의 배양

장수버섯(*F. fraxinea*)의 최적의 균사체 생산을 위한 배지조건을 확립하기 위하여 표 1에 나타난 다양한 배지를 사용하여 장수버섯을 배양하였다. 장수버섯 균사체를 PDA 배지(Potato extract 20%, Dextrose 2%)에 접종하여 25 °C에서 일주일 동안 배양하였다. 균사체는 멸균된 메스와 핀셋을 사용하여 약 5 mm의 크기로 도려내어 그 중 5 조각을 액체 배지 100ml을 함유하는 플라스크에 접종시켰다. 배양물은 회전 조건(120 rpm, 직경 20 mm)에서 10일 동안 25 °C에서 배양시켰다. 최적 배양 배지를 스크리닝한 후, 높은 생산량을 위한 최적 온도 및 pH를 각각 5 °C 간격의 다양한 온도 범위 및 4.0~8.0 사이의 pH에서 배양시킴으로써 결정하였다. 모든 시험은 3회 반복하였다.

【표 1】

배지명	배지 조성 (w/v%)
MCM	malt extract 2%, yeast extract 0.2%, dextrose 2%
YEPD	yeast extract 0.3%, peptone 0.5%, dextrose 2%
CVM	dextrose 2%, peptone 0.4%, yeast extract 0.6%, KH ₂ PO ₄ 0.046%, K ₂ HPO ₄ 0.1%, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.05%
PDB	potato extract 20%, dextrose 2%
GMEB	germinated-malt extract broth with 11 Brix ²⁵

그 결과는 도 2에 나타난 바와 같다. 도 2는 다양한 배지에서 장수 버섯 균사체를 25°C에서 10일 동안 배양한 결과를 나타내는 도면이다. GMEB; 발아 맥아즙 브로쓰 (11 Brix²⁵), YEPD; 효모 추출 펩톤 텍스트로스, CVM; 장수버섯 배지 (*Coriolus versicolor* medium), MCM; 버섯 완전 배지, PDM; 감자 텍스트로스 배지. 그 결과 GMEB 배지에서 균사체 생산수율이 가장 높은 것을 확인하였다(건조 중량 1.8 g/200 ml). 이 결과는 천연 배지가 화학 합성 배지 보다 우수하였고, 효율적인 균사체 생산을 나타냄을 알 있다.

배양 시간에 따른 피브린 분해 활성을 검사하기 위하여 장수버섯 균사체를 다양한 배지에서 10일 동안 성장시킨 후 피브린 분해 활성을 매일 분석하고 그 결과를 도 3에 나타냈다. 도 3은 장수버섯으로부터 피브린 분해 효소의 생산을 나타내는 도면이다. GMEB 배지에서 배양한 균사체가 접종한지 8일째에 최대 피브린 분해 활성을 나타냈다.

최적 온도 및 pH의 결정의 결과는 표 2에 나타냈다. 표 2는 GMEB 배지에서 균사체 생산을 위한 온도 및 pH의 영향을 나타낸다. 최대 균사체 생산(wet weight 12 g/200 ml)은 각각 25°C의 온도 및 pH 5.0에서 발견되었다.

【표 2】

Temp. (°C)	pH				
	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
15°C	4.4 ± 0.002	5.7 ± 0.001	6.1 ± 0.001	5.9 ± 0.002	6.3 ± 0.001
20°C	7.6 ± 0.012	8.2 ± 0.005	8.0 ± 0.002	7.7 ± 0.015	7.8 ± 0.001
25°C	10.3 ± 0.033	12.0 ± 0.007	11.2 ± 0.002	11.4 ± 0.013	11.0 ± 0.002
30°C	9.2 ± 0.233	10.9 ± 0.061	10.1 ± 0.047	9.1 ± 0.230	8.7 ± 0.007
35°C	7.9 ± 0.074	8.5 ± 0.188	8.1 ± 0.049	8.2 ± 0.004	8.4 ± 0.059

실시예 2: 단백질 및 피브린 가수분해 활성의 스크리닝

(2-1) 군사체로부터 프로테아제(피브린분해 효소)의 제조

군사체를 여과에 의해 배양 브로스로부터 분리하였다. 이어서 3차 증류수로 3회 세척하였다. 군사체(건조 중량 1 g)를 초음파기(Sonics & Materials Inc., USA)에서 5초 간격으로 10분 동안 2 부피의 물(2 ml)로 균질화시켰다. 균질화물을 진공 원심분리기(Model J2-21, BECKMAN)를 사용하여 5,000 x g로 4 °C에서 15 분 동안 원심분리시켰다. 미리 얼린(-70 °C) 에탄올을 지속적으로 교반하면서 각각의 0 ~ 90%에 10% 단위로 떨어 뜨려 주었다. 이어서 용액을 추가로 1 시간 동안 교반하에 보관하였다. 침전 단백질은 4 °C에서 30 분 동안 10,000 x g로 원심분리에 의해 제거하였다. 상층액을 제거한 후, 펠렛들을 건조시키고 단백질을 멸균 3차 증류수에서 재현탁시켰다.

(2-2) 프로테아제 활성 에세이

페트리 디쉬에 0.3% 탈지유 5 ml과 2% 아가로오스 용액 5 ml을 첨가하여 탈지 플레이트를 만들었다. 플레이트를 실온에서 1 시간 동안 정치시키고 굳어진 플레이트에 직경 5mm로 구멍을 낸 후 이어서 샘플 용액 20 μ l을 플레이트 상에 조심스럽게 넣어주었다. 상이한 에탄올 함량을 지닌 각 시료 10 μ l을 2% 탈지유 플레이트 상에 조심스럽게 위치시켰다. 트립신을 양성 대조군으로 사용하였다. 플레이트를 37 °C에서 14 시간 동안 인큐베이션시키고, 용해된 원의 직경을 측정하였다. 프로테아제 활성의 1 유닛은 37°C에서 14시간 동안 인큐베이션시킨 후 10 mm의 용해된 원을 생성하는데 필요한 양으로 정의하였다. 그 결과를 도 4에 나타냈다. 도 4는 장수버섯 탈지유 플레이트로부터 프로테아제 분해 활성을 나타내는 도면이다. (1. 양성 대조군으로서 트립신, 2. 음성 대조군으로서 3차 증류수, 3. 0%, 4. 10%, 5. 20%, 6. 30%, 7. 40%, 8. 50%, 9. 60%, 10. 70%, 11. 80%, 12. 90%). 에탄올 농도가 높을수록 더 큰 용해 원이 관찰되었고, 70% 이상의 에탄올을 함유한 시료는 거의 동등한 용해 원을 나타냈다.

(2-3) 피브린 분해 활성 에세이

피브린 분해 활성 에세이는 Mullertz(Mullertz, S. and Lassen, M., An activator system in blood indispensable for formation of plasmin by streptokinase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 82 : 264, 1953)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 0.1 M NaCl을 포함한 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.8) 중의 0.4% 인간 피브리노겐 5 ml을 2% 아가로오스 용액 5 ml에 첨가하고, 0.1 ml 트롬빈 (100 NIH units/ml)과 혼합하였다. 혼합물을 10 cm 페트리 디쉬 내에 붓고, 실온에서 1 시간 동안 정치시켰다. 이어서, 시료 용액 20 μ l(각 시료 용액 10 μ l 및 양성 대조군으로서 플라스민 10 μ g)을 조심스럽게 피브린 플레이트 상에 위치시켰다. 플레이트를 37°C에서 14 시간 동안 인큐베이션 시키고, 용해 원의 직경을 측정하였다. 그 결과를 도 5에 나타냈다. 도 5는 피브린 플레이트에서 장수버섯 군사체로부터의 프로테아제의 피브린 분해 활성을 나타내는 도면이다(1. 양성 대조군으로서 플라스민, 2. 음성 대조군으로서 3차 증류수, 3. 0%, 4. 10%, 5. 20%, 6. 30%, 7. 40%, 8. 50%, 9. 60%, 10. 70%, 11. 80%, 12. 90%). 14 시간 반응 후, 더 높은 에탄올 농도는 더 큰 용해 원을 나타내었고 70% 이상의 에탄올을 함유한 시료는 거의 동등한 용해 원을 나타냈다. 따라서, 장수 버섯은 혈전 예방을 위한 기능성 (건강) 식품으로써 개발 및 사용될 수 있다.

실시예 3: 피브린 분해 효소의 정제

(3-1) 조 추출 단백질의 농축

달리 언급하지 않는 한, 모든 절차는 피브린 분해 효소 활성 및 생산 수율을 높이기 위해 4 °C에서 수행하였다. 단백질 농도는 BCA 단백질 에세이 키트(Pierce co.)를 사용하여 결정하였다. 배양한 장수 버섯 군사체(*F. fraxinea* mycelia)를 3차 증류수로 3회 세척하였다. 군사체(100 g)를 동일 부피의 물(100 ml)로 균질화기내에서 최대 속도로 2 분 동안 균질화시키고, 액체 질소를 사용하여 동결 및 해동시켰다. 이를 수차례 반복한 후, 균질화물을 4 °C에서 30 분 동안 5,000 x g로 원심 분리 시켰다. 상층액을 식염 얼음조(salt-ice bath)에 함유된 1 리터 스테인레스강 부켓(bucket) 내에 위치시켰다. 동일한 부피의 미리 얼린(-70 °C) 에탄올을 지속적으로 교반하면서 적하하였다. 이어서 용액을 추가로 1 시간 동안 교반하에 보관하였다. 침전 단백질은 4 °C에서 30 분 동안 10,000 x g로 원심분리에 의해 제거하였다. 정화된 에탄올 가용성 분획은 식염-얼음 조 내에 위치된 강철 부켓으로 되돌아 왔고, 그의 에탄올 농도는 지속적인 혼합에 의해 75%까지 적하하여 증가시켰다. 교반을 1 시간 동안 계속하고 이어서 침전된 단백질을 4 °C에서 30 분 동안 10,000 x g로 원심분리시켜 회수하였다. 상층액을 제거한 후, 펠렛들을 건조시키고 단백질을 멸균 3차 증류수 내에 재현탁시켰다. 불용성 물질들은 10,000 x g로 4°C에서 10분 동안 원심분리시켜서 제거하였다.

(3-2) 단백질 측정

단백질 농축물은 BCA 또는 Micro BCA 단백질 에세이 리어전트 키트(Pierce, Rockford, IL, USA) (Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.T., Protein measurement with the folin reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275, 1951)를 사용하여 측정하였다. 단백질 표준으로 소 혈청 알부민(BSA)을 사용하였다.

도 4 및 5에서 보는 바와 같이, 피브린 분해 활성은 에탄올의 농도가 증가함에 따라 증가되었고, 70% 이상의 에탄올 농도에서는 유사한 피브린 분해 활성을 나타내었다. 단백질은 장수버섯 (*F. fraxinea*)의 50 ~ 75% 농도의 에탄올을 사용하여 배양 균사체로부터 농축하고, 펠릿들을 추가의 정제에 사용하였다.

(3-3) 이온 교환 크로마토 그래피

(1) 양이온 교환 컬럼 크로마토그래피

상기 재현탁된 펠릿들은 20 mM Tris-HCl(pH 7.4) buffer로 예비평형화시킨, CM-cellulose column(7 x 15 cm)에 가하고, Tris-HCl(pH 7.4) 20 ~ 500 mM의 선형 구배로, 4 °C에서 1.5 ml/fr의 유속으로 용출시켰다. 각 분획 1.5 ml를 수집하여 아조카제인 및 피브린 플레이트 에세이를 사용하여 피브린 분해 활성을 측정하고 그 결과를 도 6에 나타냈다. 높은 프로테아제 활성을 나타내는 분획들을 음이온 교환 크로마토그래피에 적재하였다. 도 6은 CM-셀룰로오스를 사용한 장수버섯 균사체로부터 피브린분해 효소의 음이온 교환 크로마토그래피도이다. 단백질 농도는 UV 분광광도계를 사용하여 계산하였다. 피브린 분해 활성은 피브린 플레이트(테이터에 나타내지 않음)를 사용하여 결정하였다. 화살로 나타낸 프로테아제 분획들을 수집한 것이고 이를 DEAE-Sephadex CL6B 컬럼에 가하였다. 도 6에서 보는 바와 같이, 선두부분의 분획들이 피브린분해 활성을 나타냈고, 그러한 분획들이 뉴터 젠더(neuter gender) 또는 음성 하전 단백질로서 여겨진다.

(2) 음이온 교환 컬럼 크로마토그래피

용출된 CM-셀룰로오스 컬럼 분획들은 20 mM Tris-HCl(pH 7.4) 완충액으로 예비평형시킨 DEAE-Sephadex CL6B column(5 x 20 cm)에 가하고, 0 ~ 2 M의 NaCl 선형 구배로 4 °C에서 1.5 ml/분획의 유속으로 용출시켰다. 각 분획을 수집하고 피브린 분해활성을 아조카제인 및 피브린 플레이트 에세이에 의해 측정하였다. 그 결과를 도 7에 나타냈다. 도 7은 DEAE-Sephadex CL6B를 사용한 장수버섯 균사체로부터 피브린 분해 효소의 음이온 교환 크로마토 그래피도이다. 도 7에서 보는 바와 같이, 0.6 M NaCl을 함유한 분획들이 높은 프로테아제 활성을 나타냈으며, 이들 단백질은 음하전을 띠었다. 이들 모든 활성 분획들을 수집하여 동결건조 전에 투석시켰다. 높은 프로테아제 활성을 나타내는 분획들을 Sephadex G-75 컬럼에 부하하였다.

(3-4) 프로테아제 활성 분획의 분리

프로테아제 활성은 아조카제인(Sigma co.)으로부터 산-가용성 물질의 방출을 측정함으로써 결정하였다. 효소 시료/컬럼 분획(50 μ l)을 0.1%(w/v) 아조카제인(50 mM Tris-HCl 중에 제조함, pH 7.0) 300 μ l에 첨가하였다. 37 °C에서 20 분 동안 인큐베이션 시킨 후, 빙냉 10% (w/v) 트리클로로아세트산(TCA) 600 μ l을 즉시 섞어 첨가하였다. 시료를 10 분 동안 얼음 상에 위치시킨 후, 15,000 x g로 15분 동안 원심분리를 하였다. 상층액 중의 산-가용성 물질의 양은 366 nm에서 흡광도에 의해 측정하였다. 프로테아제 활성의 1 유닛은 37 °C에서 1 시간 동안 인큐베이션 시킨 후, 아조카제인으로부터 366 nm에서 0.1의 흡광도를 나타내기에 충분한 산-가용성 물질을 생성하는데 필요한 양으로 정의한다. 또한, 효소 시료/컬럼 분획은 피브린 분해 활성을 위해 플레이트에 조심스럽게 위치시켰다.

(3-5) 겔 여과

음이온 교환 크로마토그래피의 용출된 DEAE-Sephadex CL6B 컬럼 분획들을 0.15 M NaCl을 함유한, 10 mM Tris-HCl(pH 7.4) 완충액으로 예비 평형시킨 Sephadex G-75 column(1.5 x 130 cm) 상에 가하고 동일한 완충액으로 4 °C에서 0.1 ml/min의 유속으로 용출하였다. 각 분획을 수집하고 피브린 분해활성을 아조카제인 및 피브린 플레이트 에세이에 의해 측정하였다. 그 결과를 도 8에 나타냈다. 활성 분획들을 수집하고 동결 건조에 의해 농축시켰다. 도 8은 Sephadex G-75를 사용한 장수버섯 균사체로부터 피브린 분해 효소의 겔-여과 크로마토그래피도이다. 화살로 나타낸 프로테아제 분획들을 수집하여 HiLoadTM SuperdexTM 75 column에 가하였다.

(3-6) 고성능액체 크로마토그래피 (FPLC)

용출된 Sephadex G-75 컬럼 분획들은 20 mM Tris-HCl(pH 7.4) 완충액으로 예비 평형시킨 HiLoad™ Superdex™ 75 column 상에 가하고, 동일한 완충액으로 1.5 ml/min의 유속으로 용출시켰다. 각 분획을 수집하고 피브린 분해활성을 아조 카제인 및 피브린 플레이트 에세이에 의해 측정하였다. 그 결과를 도 9 및 표 3에 나타냈다.

[표 3]
장수버섯 균사체로부터 피브린 분해 효소의 정제 단계

단계	총 단백질 (mg)	총 프로테아제 활성 (U)	특이 화성 (U/mg)	회수율 (%)	정제 (배)
조 추출물	133.9	1249.7	9.3	100.0	1.0
DEAE-세파로스 CL6B	39.9	631.6	15.8	29.8	1.7
Sephadex G-75	8.8	463.1	52.6	6.6	5.7
Superdex™ 75	1.1	144.9	131.7	0.8	14.2

도 9는 HiLoad™ Superdex™ 75를 사용한 장수버섯 균사체로부터 피브린 분해 효소의 FPLC 결과도이다. 표 3으로부터 알 수 있는 바와 같이, 피브린 분해 효소 1.1 mg은 HiLoad™ Superdex™ 75 column에 의해 0.8%의 수율로 14.2 배로 정제되었다. 화살로 나타낸 프로테아제 분획들을 수집하고 SDS-PAGE 및 피브린 자이모그래피에 의해 측정하였다.

실시예 4: 분자량 측정

(4-1) SDS-PAGE

정제된 효소의 분자량은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)에 의해 결정하였다(Laemmli, *U.K. Nature*, 227 : 680-685, 1970). 단백질 시료 20 µg을 5 x 시료 완충액 (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM β-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)과 혼합하였다. 이 혼합물을 100 °C에서 5 분 동안 비등시키고, 12% 폴리아크릴아마이드 겔 중에서 전기영동시켰다. 겔을 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색시킨 후 효소의 분자량을 표준 마아커(ProSieve™ protein marker, Cambrex Co.)를 사용하여 결정하였다.

(4-2) 피브린-자이모그래피

피브린 자이모그래피는 Leber *et al.*(1997) and Kim *et al.*(1998)의 방법에 따라 수행하였다(Leber, T.M. and Balkwill, F.R., *Zymography: A Single-step Staining Method for Quantitation of Proteolytic activity on Substrate gels. Anal. Biochem.*, 249 : 24-28, 1997; Kim, J.H., and Kim, Y.S., Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from *Armillaria mellea*. *Kor. J. Mycology*, 26(4) : 583-588, 1998). 0.12%(w/v). 피브리노겐을 함유한 해상겔 (resolving gel) 용액 (12%) 전체 용적 10 ml로 준비하여 원심분리시켜 SDS 원액을 혼합하였을때 유도되는 불용성 불순 물을 제거하였다. 트롬빈(1 unit/ml) 용액 및 TEMED(N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine)을 각각 최종 농도 0.1 unit/ml 및 0.028%(v/v)로 겔 용액에 첨가하였다. 정제된 FFP 효소는 피브린 겔 내로 전기영동시키고, 이어서 2.5% Triton X-100 solution 중에서 세척하고 피브린에 대한 반응 완충액(20 mM Tris-HCl로 제조함, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.02% NaN₃ 함유)을 함유한 통에서 37 °C에서 인큐베이션 시켰다. 피브린 자이모그래피에서, 피브린 가수분해 효소는 비 가수분해된 피브린 기질의 푸른 배경에 비하여 피브린 분해의 단일 맑은 밴드로 나타났다. 그 결과를 도 10에 나타낸다. 도 10은 정제된 피브린분해 프로테아제 FFP의 SDS-PAGE 및 SDS-피브린 자이모그래프도이다. Lane 1, 단백질 표준 마아 커; lane 2, 정제 FFP(SDS-PAGE); lane 3, 정제 FFP(SDS-피브린 자이모그래피).

그의 겔보기 분자량은 SDS-PAGE 및 SDS-피브린 자이모그래피 모두에 의해 약 42 kDa으로 계산되었다. 이 결과는 정제 된 피브린분해 효소가 단량체임을 의미한다. 이는 기존에 일본의 전통발효식품인 natto로부터 분리된 효소는 35 kDa로 발효미생물에서 분리된 혈전분해효소와는 다른 효소임을 확인할 수 있었다. 또한 현재 임상에서 사용 중인 sPA는 47 kDa, uPA는 55 kDa 그리고 tPA는 70 kDa로 분리 정제된 효소는 완전히 다른 크기의 혈전분해효소로 측정된다. 그리고 약용버

첫인 CM에서는 52 kDa, PT에서는 65kDa 그리고 AM에서는 22.5 kDa의 혈전분해효소가 분리되었는데 이들과 크기가 전혀 다른 혈전분해효소임이 확인되었다. 이들 결과는 장수버섯으로부터 혈전분해 효소가 다른 혈전분해 효소와는 상이한 것임을 나타낸다.

실시에 5: 정제 효소의 특성화

(5-1) 피브린 분해 활성에 대한 pH의 영향

효소의 피브린 분해 활성에 대한 pH의 영향은 아조카제인 에세이를 사용하여 검사하였다. 효소의 피브린 분해 활성에 대한 최적 pH는 2.0 ~ 10.0의 pH 범위 내에서 결정하였다. 효소 용액 10 μ l을 각각 0.5 M Glycine-HCl (pH 2.0 ~ 3.0), 0.5 M Acetate(pH 4.0 ~ 5.0), 0.5 M Tris-HCl(pH 6.0 ~ 8.0), 및 0.5 M Glycine-NaOH(pH 9.0 ~ 10.0) 완충액 90 μ l에 첨가하였다. 37 °C에서 1 시간 동안 인큐베이션 시킨 후, 잔여 프로테아제 활성을 0.1% 아조카제인을 사용하여 측정하였다. 그 결과를 도 11에 나타낸다. 도 11은 아조카제인 에세이에 의해 측정된 장수버섯 균사체로부터의 피브린 분해효소에 대한 다양한 pH의 영향을 나타내는 도면이다. 다음의 완충액을 상이한 pH에서 사용하였다; 0.5 M Glycine-HCl (pH 2~3), 0.5 M Acetate-NaOH (pH 4~pH 5), 0.5 M Tris-HCl (pH 6~pH 8), 0.5 M Glycine-NaOH (pH 9~pH 10)를 사용하였다. 모든 시험은 3회 반복하였다.

그 결과 피브린 분해 효소는 넓은 범위의 pH(2.0 ~ 9.0)에 걸쳐서 활성을 나타냈으나, 최적 활성은 pH 5.7에서 나타났다. 효소는 pH 5.0 ~ 7.0의 범위에서 37 °C에서 1시간 동안 안정하였고, pH 8.0 까지 50% 이상의 활성을 나타냈다. 활성은 pH 8.0 이상에서 급격히 감소하였다.

(5-2) 피브린 분해 활성에 대한 온도의 영향

효소 활성의 최적 온도는 피브린 분해 효소 0.1 ml을 다양한 온도(20 ~ 80 °C)에서 1시간 동안 인큐베이션 시킨 후 잔류 활성의 측정에 의해 결정하였다. 인큐베이션 후, 잔류 프로테아제 활성은 366 nm에서 흡광도 및 0.1% 아조카제인으로 측정하였다. 도 12는 장수버섯으로부터의 피브린 분해 효소에 대한 다양한 온도의 영향을 나타내는 도면이다. 피브린분해 활성에 관한 온도의 영향은 효소가 20 ~ 40 °C 사이에서 활성을 나타낸 것으로 밝혀졌다. 최적 활성은 35 ~ 40 °C 이었으나, 45 °C 이상에서는 이상에서 효소 활성은 급격히 감소하였다.

미생물로부터 분리정제된 혈전분해효소와 할미송이버섯(*Tricholoma asponaceum*)으로부터 분리 정제된 혈전분해효소는 최적 활성 온도가 50~60 °C로 보고되었다. 상기 최적 pH 및 온도를 고려할 때, 장수버섯으로부터 정제된 혈전분해효소는 인체에 투여되었을 때 안정된 효소적 활성을 나타낼 수 있는 것으로 보인다. 장수버섯은 혈전생성 제어 및 혈전분해 용의 기능성 식품으로서 사용가능할 것으로 기대된다.

(5-3) 피브린분해 활성에 대한 금속이온의 영향

금속 이온의 영향은 CuSO₄, CoCl₂, CaCl₂, ZnCl₂, MgCl₂, MnCl₂, KCl, FeSO₄, Fe₂(SO₄)₃ 및 CsCl 이온들을 사용하여 조사하였다. 정제된 효소들은 Cu²⁺, Co²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, K⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ 및 Cs⁺ 등의 양이온들의 존재 및 부재하에서 10 mM Tris-HCl 중의 1 mM의 최종 농도로 37 °C에서 1 시간 동안 예비 배양시켰다. 37 °C에서 1 시간 동안 인큐베이션시킨 후, 잔류 프로테아제 활성은 0.1% 아조카제인으로 측정하였다. 그 결과를 도 13에 요약하였다. 모든 시험은 3회 반복하였고, 나타낸 값은 평균 $\pm$ SEM이다; p<0.05. 도 13은 정제된 혈전분해 효소 활성에 미치는 다양한 금속 이온의 영향을 나타낸 그래프이다.

피브린 분해 활성의 50% 이상이 Cu²⁺ 및 Fe³⁺에 의해 감소되었고, Zn²⁺은 40% 이상으로 감소시켰다. 한편, 거의 20%의 활성이 Ca²⁺, Mn²⁺ 및 Mg²⁺ 이온에 의해 증가되었다.

(5-4) 피브린분해 활성에 대한 프로테아제 억제제의 영향

프로테아제 억제제의 영향은 PMSF, APMSF, TLCK, TPCK, EDTA, EGTA, 아프로티닌 및 웨스타틴 A를 사용하여 조사하였다. 정제된 효소를 10 mM Tris-HCl 중의 100 μ g/ml PMSF, APMSF 및 TPCK, 50 μ g/ml TLCK, 1 mM EDTA 및 EGTA, 1 μ g/ml 아프로티닌 및 웨스타틴 A의 최종 농도로 PMSF, APMSF, TLCK, TPCK, EDTA, EGTA, 아프로티닌 및 웨스타틴 A 중에 37 °C에서 1 시간 동안 예비 배양시켰다. 37 °C에서 1 시간 동안 인큐베이션 시킨 후, 잔류 프로테아제 활

성을 0.1% 아조카제인으로 측정하였다. PMSF, APMSF, TLCK 및 TPCK는 세린프로테아제 억제제이고, 아프로티닌은 트립신-유사 세린프로테아제 억제제이다. EDTA 및 EGTA는 메탈로프로테아제 억제제인 반면, 펩스타틴 A는 산 프로테아제 억제제에 속한다. 그 결과를 도 14에 나타낸다. 도 14는 정제된 피브린 분해 효소 활성에 미치는 여러 가지 프로테아제 억제제의 영향을 나타낸다. 모든 시험은 3회 반복하였고, 나타낸 값은 평균 $\pm$ SEM이다.

도 14에서 보는 바와 같이, PMSF, TLCK, 아프로티닌 및 펩스타틴 A에 의해서는 의미있는 영향이 관찰되지 않았다. APMSF 및 TPCK에 의해서는 대략 10%의 활성이 감소되었고, EDTA, EGTA는 활성을 약 40% 감소시켰다. 이들 결과는 정제된 효소가 메탈로프로테아제임을 나타낸다. 버섯유래의 혈전분해효소들이 상당수 metalloprotease로 알려져 왔다. 식물체를 기주로 하는 할미송이버섯(*Tricholoma asponaceum*)으로부터 분리된 혈전분해효소와 PT 자실체와 AM의 자실체로부터 분리된 효소는 모두 EDTA 처리시 불활성화되는 metalloprotease로 보고되었다(참조: Doonan S., Healy V., O'Connell J., and McCarthy T.V., 1999. The Lysine-Specific Proteinase from *Armillaria mellea* Is a Member of a Novel Class of Metalloendopeptidases Located in Basidiomycetes. *Biochem. Biophys. Com.*, 262(1): 60~63.).

(5-5) 시간에 따른 피브린 및 피브리노겐 분해의 분석

피브린분해 활성은 Datta *et al.*(1995)의 방법을 약간 변형하여 수행하였다(Datta, G., Dong, A., Witt, J., and Tu, A. T., *Biochemical characterization of basilase, a fibrinolytic enzyme from *Crotalus basiliscus basiliscus*. Archives of Biochemistry and Biophysics*, 317(2) : 365-373, 1995). 구체적으로, 0.1 M NaCl을 함유하는 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.8) 중의 1% 인간 피브리노겐 용액 30 μ l을 동일한 완충액 중의 트롬빈 용액 (10 NIH units/ml) 30 μ l과 혼합하였다. 피브린 클롯을 실온에서 1 시간 정도 정치시켰다. 총 30 μ l의 정제된 알갈(algal) 프로테아제 용액 (20 μ g/ml)을 클롯 표면 상에 위치시키고, 다양한 시간 간격으로 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션시켰다. 플라스민 (0.1 U/ml)을 양성 대조군으로 사용하였다. 반응은 변성 용액(denaturing solution, 10 M urea, 4% SDS, 및 4% β -mercaptoethanol) 90 μ l을 첨가함으로써 정지시켰다. 결과의 펩티드들은 12% 젤 상의 SDS-PAGE에 의해 분석하였다(Laemmli, 1970, 상기함).

피브리노겐 분해 활성은 상기한 바와 같이 측정하였다(Matsubara, K., Hori, K. Matsuura, Y. and Miyazawa, K., Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme and fibrinogen clotting enzyme in a Marine Green Alga, *Codium divaricatum*. *Biochem. Mole. Biol.*, 125(1) : 137-143, 2000). 구체적으로, 0.1 M NaCl을 함유한 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.8) 중의 1% 인간 피브리노겐 80 μ l을 4 μ g의 정제 프로테아제와 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션시켰다. 다양한 간격으로, 반응 용액의 부분을 철회하고, Laemmli(1970)의 방법에 따라 SDS-PAGE에 의해 분석하였다.

정제된 효소에 의한 가수분해는 SDS-PAGE에 의해 나타내고 그 결과를 도 15에 나타냈다. 도 15는 장수버섯으로부터 정제된 피브린분해 효소의 피브린 용해(A) 및 피브리노겐 용해(B) 패턴을 나타내는 도면이다. Lane C, 대조군으로서 플라스만; lane 1, 1 분 반응후; lane 2, 2분 반응후; lane 3, 3분 반응후; lane 4, 4분 반응후; lane 5, 5분 반응후; lane 6, 10분 반응후; lane 7, 15 분 반응후; lane 8, 30분 반응후; lane 9, 1시간 반응후. 도 15(A)에서 보는 바와 같이, 정제 효소는 α 및 γ - γ chain을 급속히 가수분해 시켰고, β chain을 서서히 가수분해시켰다.

또한, 정제 효소는 피브리노겐 용해 활성을 가졌다. 도 15(B)는 A α 및 γ 체인을 급속히 가수분해시키는 반면, B β 체인은 인큐베이션한지 30분 내에 가수분해되지 않았음을 나타낸다. 그러나, 모든 체인들은 1 시간 이내에 가수분해되었다. 정제 효소에 의한 피브린의 가수분해 패턴의 분석 결과는 직접 작용을 명백히 나타내며, 대부분의 통상적으로 사용되는 혈전 용해제, 예컨대 SK, UK 및 tPA는 간접적으로 작용하는 것을 나타낸다. 따라서, 정제된 피브린 분해 효소는 혈전 치료용의약으로 사용될 수 있고, 경구 투여될 수 있다.

실시에 6: 캡슐제의 제조

본 발명 피브린분해효소(실시에 3-1) 21 mg

맥류약염원말 56 mg

감마오리자놀 5 mg

은행잎 추출분말 1 mg

홍국분말 4 mg

비타민류(5종) 13 mg

락토오스 55 mg

전분 15 mg

스테아르산 마그네슘 5 mg

결정성 셀룰로오스 10 mg

본 발명의 한 실시 형태는 그 예를 상기에 나타난 캡슐제의 유효 성분으로써 상기 피브린분해효소의 용도이다. 캡슐제는 통상의 방법에 의해 제조될 수 있으며, 한 바람직한 실시형태는 통상의 장용성 피복(예를 들면, 히드록시프로필메틸 셀룰로오스 프탈레이트), 당코팅 또는 피막 코팅을 갖는 정제 또는 연질 캡셀 형태이다.

실시예 7: 음료수의 제조

실시예 3-1에서 얻은 장수버섯 조추출물 150g를 넣고, 여기에 고 푸락토오스 콘시럽 160g, 구연산 2g, 구연산나트륨 0.5g, 벤조산나트륨 0.5g 및 비타민 C 0.5g 을 첨가한 후 나머지를 정제수로 첨가하여 혼합한 다음 여기에 미량의 향료를 넣어 음료수 1 l를 제조하여 저온 살균하였다. 결과적으로 본 발명 음료수는 종래의 음료수 제품과 입안 감촉, 맛 그리고 종합평가 면에서 양호한 반응을 얻었다.

발명의 효과

이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 장수버섯 균사체 유래의 혈전분해 효소는 플라스민과는 다른 기질 특이성을 갖는, 피브린 및 피브리노젠을 특이적으로 분해하는 신규의 혈전분해효소임을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명에 따른 피브린 분해 효소 및 이를 포함하는 추출물은 혈전증 또는 유사 질환의 치료 및 예방을 위한 의약 또는 건강 식품으로서 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 혈전용해 기전의 개략도.

도 2는 다양한 배지에서 장수 버섯 균사체를 배양한 결과를 나타내는 도면.

도 3은 장수버섯으로부터 피브린 분해 효소의 생산을 나타내는 도면.

도 4는 장수버섯 탈지유 플레이트로부터 프로테아제 분해 활성을 나타내는 도면.

도 5는 피브린 플레이트에서 장수버섯 균사체로부터의 프로테아제의 피브린 분해 활성을 나타내는 도면.

도 6은 CM-셀룰로오스를 사용한 장수버섯 균사체로부터 피브린분해 효소의 음이온 교환 크로마토그래피도.

도 7은 DEAE-Sephrose CL6B를 사용한 장수버섯 균사체로부터 피브린 분해 효소의 음이온 교환 크로마토그래피도.

도 8은 Sephadex G-75를 사용한 장수버섯 균사체로부터 피브린 분해 효소의 겔-여과 크로마토그래피도.

도 9는 HiLoad™ Superdex™ 75를 사용한 장수버섯 균사체로부터 피브린 분해 효소의 FPLC 결과도.

도 10은 정제된 피브린분해 프로테아제 FFP의 SDS-PAGE 및 SDS-피브린 자이모그래프도.

도 11은 아조카제인 에세이에 의해 측정된 피브린 분해효소에 대한 다양한 pH의 영향을 나타내는 도면.

도 12는 장수버섯으로부터의 피브린 분해 효소에 대한 다양한 온도의 영향을 나타내는 도면.

도 13은 정제된 혈전분해 효소 활성화에 미치는 다양한 금속 이온의 영향을 나타낸 그래프도.

도 14는 정제된 피브린 분해 효소 활성화에 미치는 여러 가지 프로테아제 억제제의 영향을 나타내는 도면.

도 15는 정제된 피브린분해 효소의 피브린 용해(A) 및 피브리노겐용해(B) 패턴을 나타내는 도면.

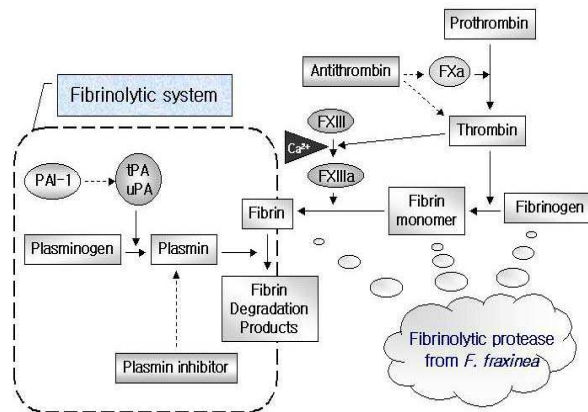
도 16은 본 발명의 식품 조성물을 분말 형태로 제조하기 위한 공정도.

도 17은 본 발명의 식품 조성물을 캡슐 형태로 제조하기 위한 공정도.

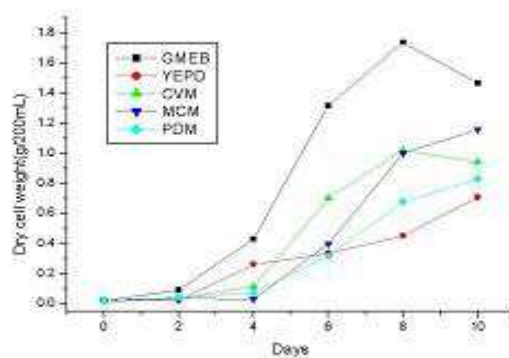
도 18은 본 발명의 식품 조성물을 음료 형태로 제조하기 위한 공정도.

도면

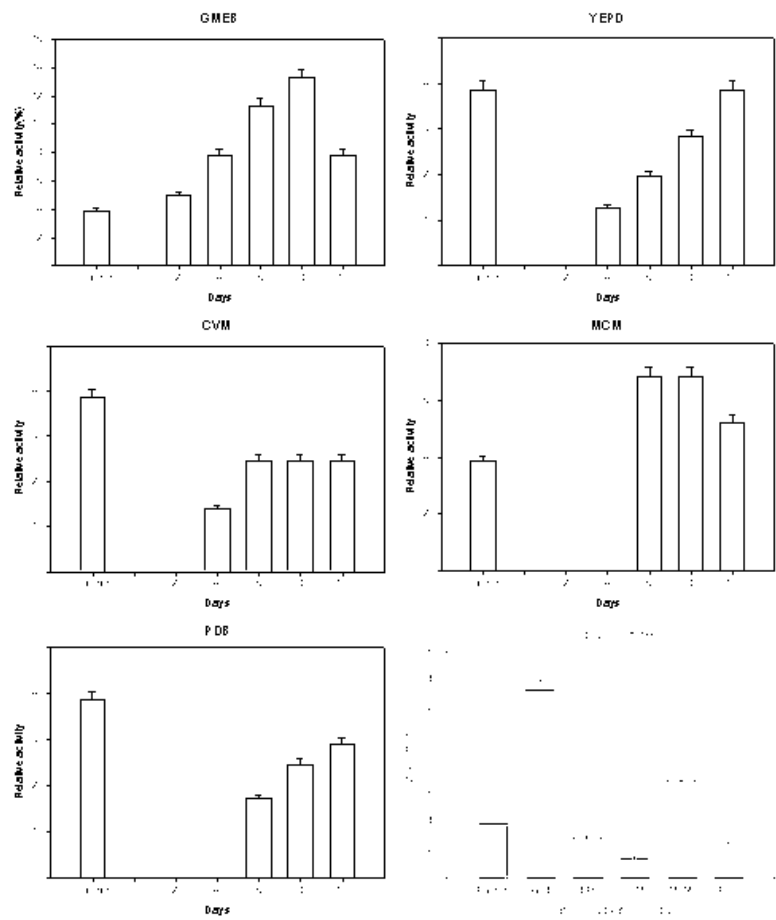
도면1



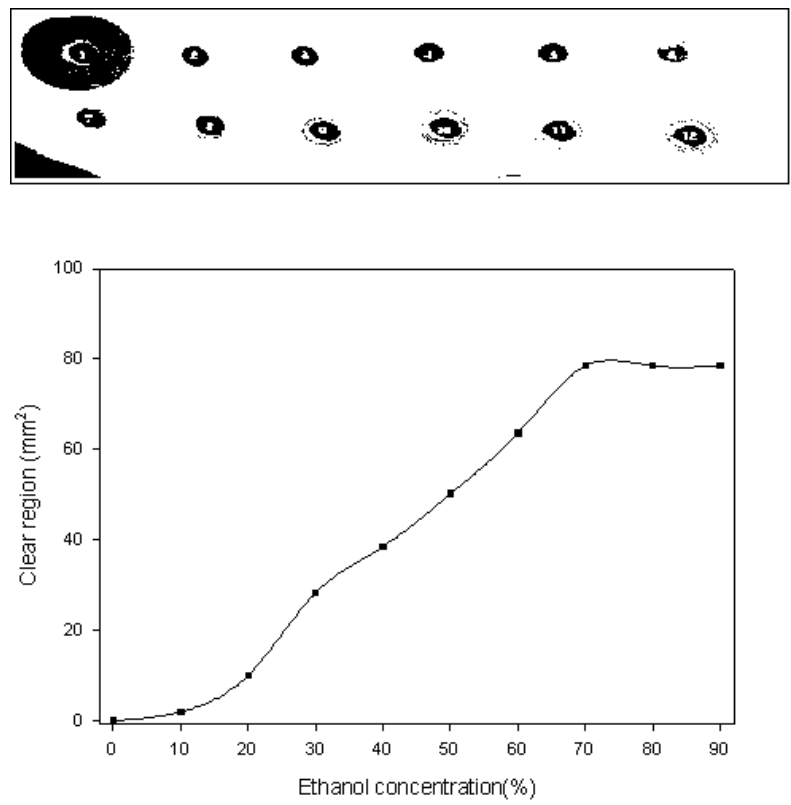
도면2



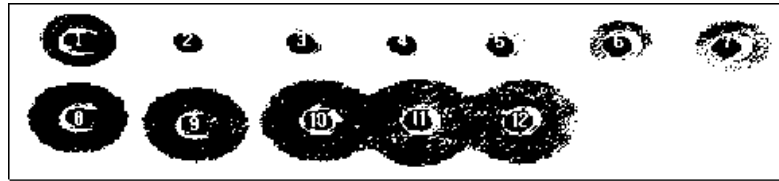
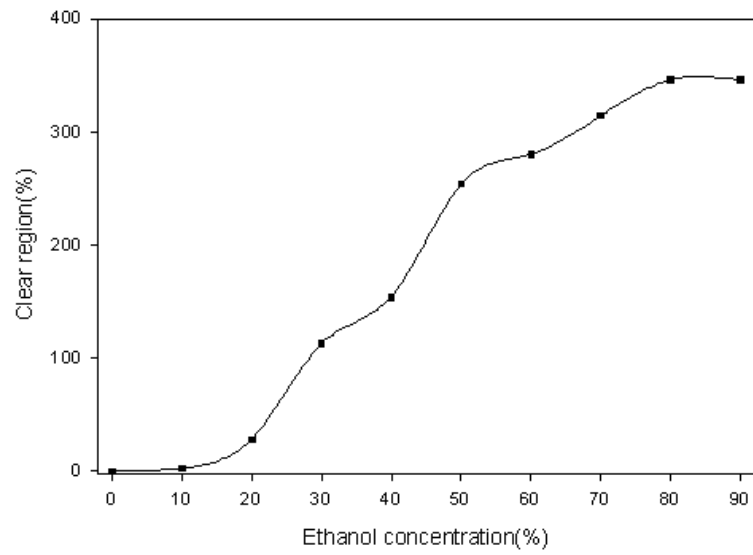
도면3



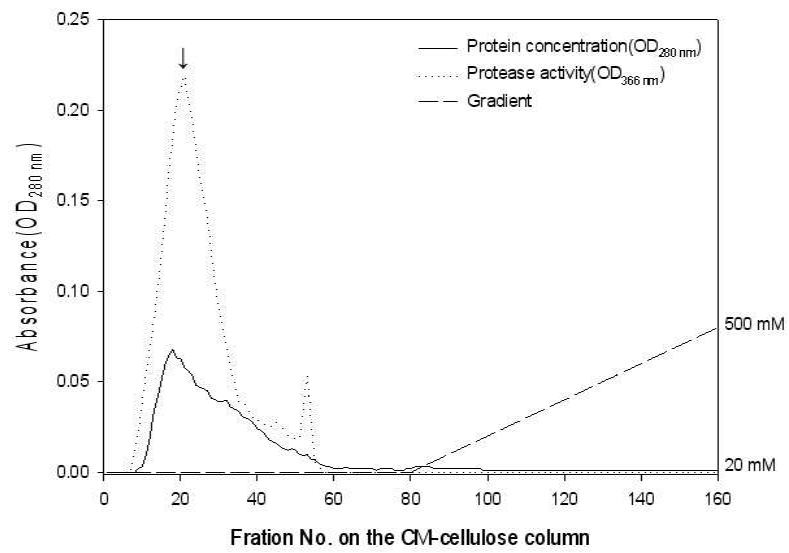
도면4



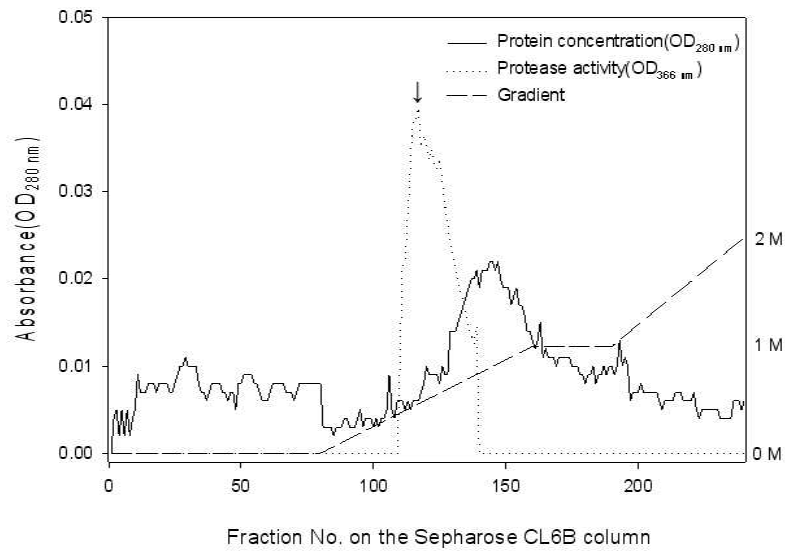
도면5



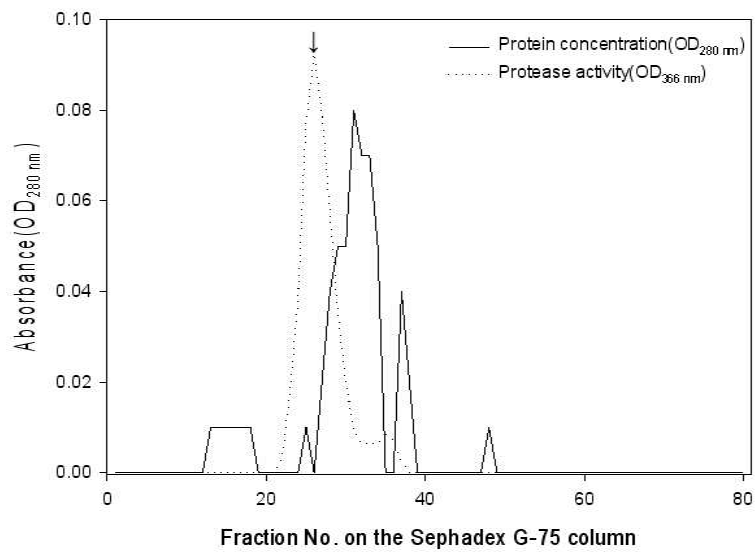
도면6



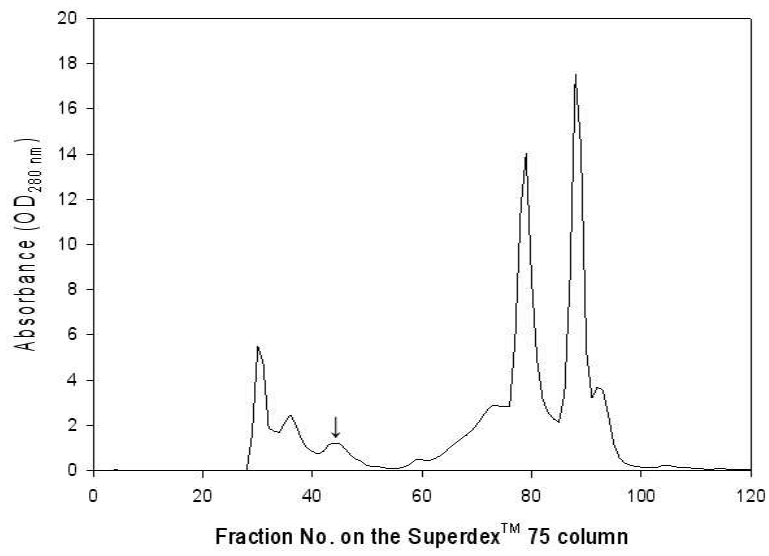
도면7



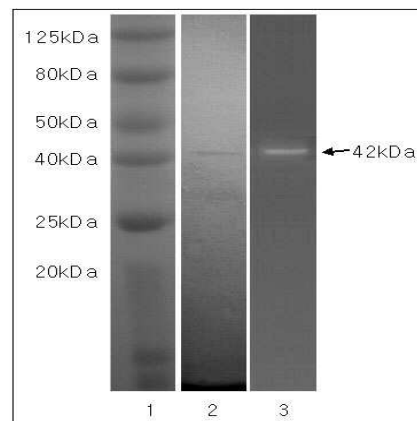
도면8



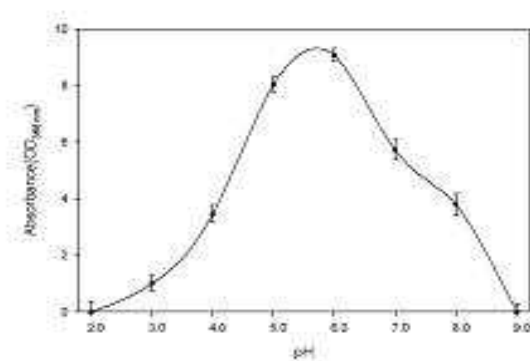
도면9



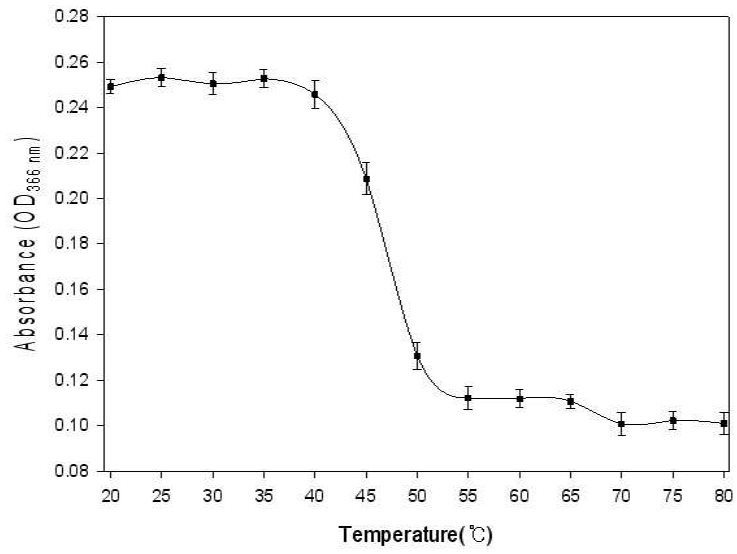
도면10



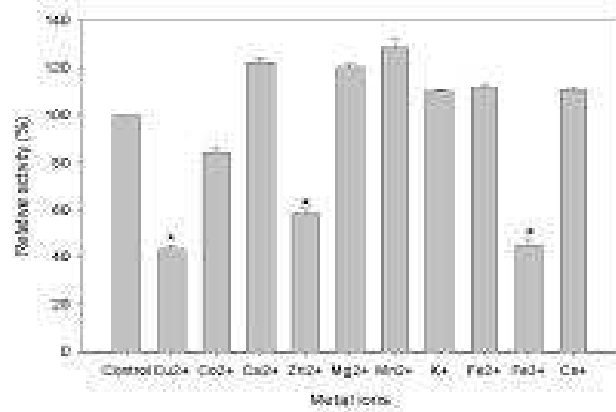
도면11



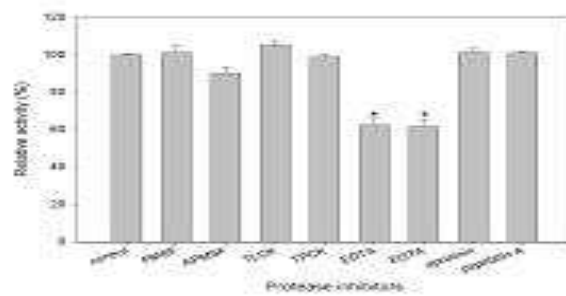
도면12



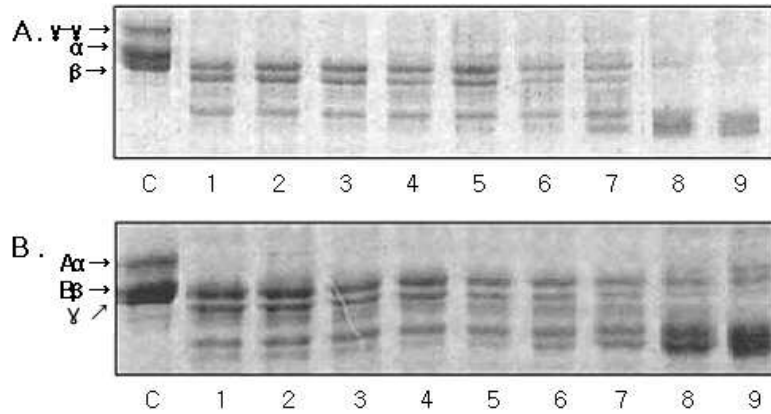
도면13



도면14



도면15



도면16



도면17



도면18

