creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[UCI]I804:24011-200000265332

2016년 2월
박사학위논문

2016년 2월 박사학위논문 백만송이 버섯 균사체 배양액을 이용한 혈전 용해 효소의 분리 및 특성 양 왕 식

백만송이 버섯 균사체 배양액을 이용한 혈전 용해 효소의 분리 및 특성

조선대학교 대학원

치의학과

양 왕 식

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

백만송이 버섯 균사체 배양액을 이용한 혈전 용해 효소의 분리 및 특성

Isolation and characterization of fibrinolytic enzyme from lyophyllum shimeji mushroom mycelium culture extract

2016년 2월 25일

조선대학교 대학원

치의학과

양 왕 식

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

백만송이 버섯 균사체 배양액을 이용한 혈전 용해 효소의 분리 및 특성

지도교수 김 수 관

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2015년 10월

조선대학교 대학원

치의학과

양 왕 식

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

양왕식의 박사학위 논문을 인준함

위원장	전남대학교	교 수	오 희 균	(인)
위 원	조선대학교	교 수	이 상 호	(인)
위 원	조선대학교	교 수	김 흥 중	(인)
위 원	조선대학교	교 수	김 춘 성	(인)
위 원	조선대학교	교 수	김 수 관	(인)

2015년 12월

조선대학교 대학원

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT ····· iv

I. 서론 ····· 1

II. 재료 및 방법 ····· 3

III. 결과 ····· 6

IV. 고찰 ····· 20

V. 결론 ····· 22

참고문헌 ····· 23

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

도 목 차

Figure 1. 백만송이 버섯 균사체 배양배지 및 조건 확립 ····· 9

Figure 2. SDS-PAGE 젤을 이용한 백만송이 버섯균사체에서 분리한 단백질의 혈전용해 활성생리활성 물질 크기 확인 ····· 11

Figure 3. 섬유소 평판법을 이용한 대두박 배양액 및 감자추출 배양액에서 분리한 생리활성 물질의 혈전용해 효과 ····· 13

Figure 4. pH, 온도, 배양일에 따른 백만송이 버섯 균사체 혈전용해 단백질 분리 최적의 조건 확립 ····· 15

Figure 5. 섬유소 침전법을 사용한 혈전용해 효과 확인 ····· 17

Figure 6. SDS-피브린 자이모그램 및 섬유소 침전법을 통한 혈전 용해 효능 ····· 19

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

표 목 차

Table 1. 백만송이 버섯 균사체 배양배지 조건 확립. 대두박 배지 조성(A), 감자추출배지 조성(B) ····· 7

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Isolation and characterization of fibrinolytic enzyme from lyophyllum shimeji mushroom mycelium culture extract

Yang, Wang-Shik
Advisor : Prof. Su-Gwan Kim, Ph.D.
Department of Dentistry,
Graduate School of Chosun University

The effect of fibrinolytic activity of Lyophyllum shemeji mushroom mycelial was observed in culture medium containing extracted potato and sugar in the controlling at 25°C in pH 4.0. In addition, the maximum production of mycelial dry weight was 7.5 mg/ml after 10 days under the optimal conditions. A novel fibrinolytic enzyme was isolated from Lyophyllum shemeji mycelial culture media. The enzyme was purified using combination of anion exchange chromatography on a Mono Q 5/5 column and size exclusion gel filtration chromatography on Superdex 200 100/300 column. The molecular weight of the purified enzyme was estimated to be 21 kDa by SDS-PAGE the N-terminal amino acid sequence were confirmed by protein sequencing analysis, which is dissimilar from that of known fibrinolytic enzymes. The purified enzyme was a protease with an optimal reaction pH 4-6 and temperature of 25°C, respectively. The relative fibrinolytic activity of 1 μg purified enzyme have 1.5 fold more activity than 1 unit/ml of plasmin on fibrin plate. Furthermore, purified enzyme preferentially hydrolyzed the Aα-chain followed by the Bβ- and γ-chain of fibrinogen, which is precursor of fibrin. Therefore, these data

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

suggests that the fibrinolytic enzyme derived from edible mushroom, lyophyllum shemeji mushroom mycelial might be useful for thrombolytic therapy and preventing thrombotic related variable diseases.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

I. 서 론

버섯은 주로 죽은 나무나 유기질을 함유한 기질에 생육하면서 다양한 세포외 효소를 분비하여 필요한 영양분을 공급하는 고등균류에 속하며 자연에는 수많은 약용 및 식용 가능한 버섯이 생육되고 있고, 자연 생태계의 유기물 분해자로서 중요한 역할을 하고 있다. 버섯에 함유하고 있는 생리활성 물질을 이용하여 항균, 혈압강하, 혈당강하, 항혈전, 함염증 및 항암효과에 대한 다양한 실험결과가 보고되었다(1). 버섯 균사체의 액체배양은 저비용으로 균일한 품질의 균사체를 대량 생산할 수 있으며, 이로부터 유용물질의 추출, 분리가 간편하여 고부가가치의 생리활성물질의 생산이 가능하다고 보고되었다(2). 버섯균사체 추출물 중 생리활성을 나타내는 성분으로는 주로 항생물질과 같은 저분자의 활성물질과 다당류 또는 단백다당류 등의 고분자 물질로 대별된다. 특히, 고분자물질의 경우, 활성정도는 평균분자량, 구조 및 용해도 등에 따라 차이가 있으며, 이들 성분 중에서도 대표적인 것이 β-D-glucan으로 항함효과가 있는 것으로 알려져 있다. 백만송이 버섯은 (Lyophyllum shimeji)은 식용 및 약용버섯으로 알려져 있으며, 우리나라를 비롯한 일본, 중국, 동남아시아, 유럽 등 여러나라에서 분포하며 재배되는 버섯이다(3). 분류학적으로 만가닥버섯은 진정담자균강, 동담자균아강(모균아강), 주름버섯목, 송이과에 속하는 버섯으로 가을에서 초겨울 사이 느릅나무 등의 활엽수 고목이나 그루터기에서 다발로 발생되며 버섯 갓의 크기에 비하여 대의 길이가 길어 엿가락처럼 보이며 다발성이 매우 강해 수많은 개체가 발생한다(4).

백만송이 버섯의 형태학적 특징은 발생초기 둥근 단추모양이거나 반구형이고 성숙해지면 편평해지는데 초기의 갓 표면은 짙은 크림색을 나타내고 자라면서 차차 옅어지고 특히 건조하게 되면 갓의 표면이 갈라져 거북이 등 모양의 무늬를 이루는 것이 특징이다. 백만송이 버섯은 느타리버섯이나 표고버섯에 비해 조직이 연하고 잘 부스러지며 씹는 질감이 좋아 동양인들의 기호에 적합할 뿐만 아니라 맛과 향이 좋아 식용버섯으로 다양한 재배 시설에 의한 대량 재배가 가능하다(5, 20). 우리나라의 백만송이 버섯의 생산은 연간 100톤 정도 생산되고 있으며 일본에서는 연간 2,000톤 정도 생산 될 정도로 팽이버섯, 표고버섯에 이어 세 번째로 소비량이 많으며 일본에서는 '혼시메지' 또는 '부나시메지' 라고 부르며 인기가 매우 많은 식용 버섯으로 다른 식재료의 맛을 해치지 않아 여러 가지 요리에 잘 어울리

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

는 제일의 맛 이라고 여겨진다(6, 7, 21). 백만송이 버섯은 100g 당 열량은 33kcal, 단백질 2.7 g, 지방 0.5 g, 탄수화물은 5.4 g 으로 기타 무기질과 비타민 C와 같은 다양한 성분을 함유하고 있으며 체내 콜레스테롤 함량을 줄이고 지방세포의 크기를 줄여주는 효과가 있어 비만을 억제하고, 항혈전, 항종양, 면역체계 강화 등의 다양한 효능이 있는 것으로 알려져 있으며(8, 9, 10), 최근에는 인간 유래 혈액암세포의 증식억제효과를 나타내는 것이 보고되어지면서(11, 18, 19) 전통적인 질병의 치료를 위한 민간요법에 사용되기도 하고 현대 의학 및 약학적 목적으로 사용되기 위한 연구에 중요히 대두되고 있다. 본 연구결과는 백만송이 버섯균사체를 이용하여 액체 배양함으로서 얻어지는 생리활성의 물질의 혈전용해 효과를 확인하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

II. 재료 및 방법

1. 균사체 배양

백만송이 버섯(Lyophyllum shimeji)의 균사체는 참맛버섯영농조합법인에서 제공되어 사용하였다.

2. 균사체 배양액 성분 조성

먼저 감자껍질을 벗기고 잘게 썰어서 증류수 1,200 ml (끓이면 증발되어 1,00 ml로 됨)에 200 g씩을 넣고 20 분간 끓인 후 망사로 걸러 용액만 1,000 ml 정도로 만든다. 위 용액에 한천 20g을 넣고 다시 3-5분간 끓여 가면서 설탕 또는 Dextrose 20g을 첨가한 후 여러 시험관에 나누어 넣고 멸균 후 사용하였다.

3. 최적 균사체 배양일 확립

배양온도를 16°C~31°C까지 3°C 간격으로 조정하여 온도별로 1-20일 동안 균사를 배양하여 생리활성물질을 추출하였다.

4. 최적 pH 실험

NaOH와 HCl 용액을 각각 1M 농도로 만들어 감자한천배지의 pH 조정용으로 사용한다. 감자 배양액을 제조하여 1 M농도의 NaOH와 HCL을 사용하여 pH가 2.0~8.0이 되도록 제조하였다.

5. 최적 온도 실험

버섯 균사체의 증식 및 발달은 온도에 극히 예민하게 영향을 받으므로 정밀한 시험을 하였다. 본 실험에서는 히타찌 제품의 정온기를 사용하여 15°C부터 5°C 간격으로 각각 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 30°C 등으로 조절하여 균사체 배양을 실시하였는데 시험 중에 잡균이 오염된 것은 중간에서 제거시킨 후 수행하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

6. 혈전 용해능 실험

PBS로 fibrinogen의 최종 농도가 0.6%가 되도록 완전히 용해시킨 용액 5 ml를 직경 4 cm의 petri dish에 옮기고 PBS 16.5 ml에 녹인 thrombin 용액 5 NIH units를 30분 이상 상온에 방치하여 고화시켰다. 대조군은 직경 6 mm filter paper disc에 증류수를 각각 점적하여 fibrin plate 상에 놓고 시험군은 증류수에 녹인 생리활성 효소를 점적하여 사용하였으며, 37°C 에서 5 시간 동안 반응시킨 후 fibrin plate가 용해되어 형성된 투명환의 넓이를 측정하여 혈전용해 활성을 비교하였다.

7. SDS-PAGE 전기영동

조제한 단백질은 SDS-PAGE (Laemmli, U.K. Nature, 227:680-685, 1970)를 수행하여 분자량을 분석하였다. 전기영동은 12%의 separating gel과 5% stacking gel로 이루어진 SDS-PAGE gel 상에서 진행하였다. 단백질과 5 ul SDS 시료 완충액(60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% 글리세롤, 2% SDS, 14.4 mM β-메캅토에탄올, 0.1% 브로모페놀 블루)을 혼합하여 100°C에서 5 분간 끓인 후 단백질 마커와 함께 전기영동을 수행하였다. 전기 영동된 겔은 Coomassie brilliant blue R-250로 염색하고 탈색 완충액으로 탈색시킴으로써 단백질 크기를 확인하였다.

8. SDS-피브린 자이모그램

SDS-피브린 자이모그램 활성 확인법은 피브리노겐 농도가 0.12% (W/V)가 되게 12% 폴리아크릴아마이드 용액에 혼합한 후 즉시 트롬빈 (200 NIH unit/ml)을 첨가하여 겔을 제조하고 전기영동을 수행하였다. 단백질과 β-메캅토에탄올이 함유되지 않은 5×SDS 시료 완충액을 혼합하여 전기영동을 수행하였다. 전기영동은 단백질의 활성을 보존하고 전기영동과정에 일어나는 분해반응을 방지하기 위해 4°C에서 전압은 90-180 V로 진행하였다. 그런 후 SDS에 의해 불활성화 된 효소를 재활성화 시키기 위하여 겔을 2.5% Triton X-100을 포함한 Tris-HCl (30 mM, pH 6.0)에서 30 분간 진탕시켜 SDS를 제거한 후 다시 증류수로 수차례 세척하여 Triton X-100을 제거하였다. 그리고 겔을 활성반응 완충용액 (200 mM NaCl, 10 mM CaCl2 포함된 30 mM Tris-HCl, pH 6.0)으로 15 분씩 2 번 세척한 후, 그 완충용액에 넣어 37°C 항온기에서 15 시간 반응을 시켰다. 반응이 끝난 후 겔을 Coomassie brilliant blue R-250로 염색하고 탈색 완충액으로 탈색시킴으로써 피브

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

린 분해능을 지닌 단백질의 투명대를 얻어 활성을 확인하였다.

8. 실험자료의 통계학적 검정

모든 실험성적은 mean ± standard error of the mean으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 ANOVA 후에 standard t-test를 하였으며, p-value가 0.05 미만(*, $p<0.05$)과 0.01 미만(**, $p<0.05$)의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅲ. 결 과

1. 백만송이 버섯 균사체 배양배지 확립

백만송이 버섯 균사체 배양 조건을 확립하기 위해 배양배지 선택이 우선시 되어 다양한 문헌을 통하여 대두박 배지(대두박 3 g, 설탕 30 g, KH_2PO_4 0.5 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g)와 감자 추출배지(감자 200 g, 설탕 20 g)를 증류수 1 리터에 첨가한 후 3M paper filter을 이용하여 거른 후 멸균하여 배지를 조성하였다. 두 배지에 백만송이 버섯 균사체 10 g을 첨가하여 25℃ 에서 100 rpm으로 10 일 동안 배양하였다(Table 1).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

균사체 배양액 조성물

대두박 배지(1 리터)	감자추출 배지(1 리터)
대두박(콩비지) 3g	감자 200g
설탕 30g	설탕 20g
KH_2PO_4 0.5 g	
$MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g	

Table 1. Established of Lyophyllum shimeji mycelium culture medium conditions. Soybean medium composition (A), potato extracted medium composition (B).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 대두박 배양액과 감자추출 배양액에서 혈전용해 단백질 추출

대두박 배양액과 감자추출 배양액에 백만송이 버섯 균사체 10 g을 첨가하여 10 일동안 배양 후 원심분리기를 사용하여 상층액을 회수하였다. 상층액의 4 배 주정 에탄올을 천천히 첨가하여 단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질을 분리하기 위해 12,000 rpm, 1 시간동안 원심 분리하여 침전된 단백질을 분리 한 후 증류수에 녹여 동결 건조하여 분말을 획득하였다(Fig. 1).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

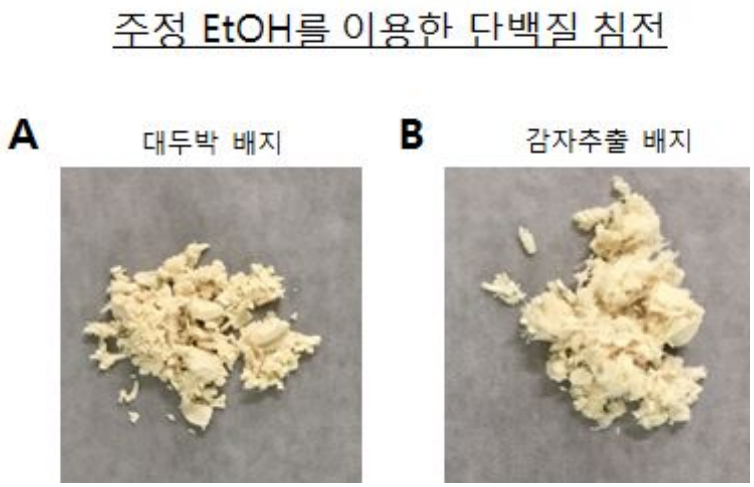

Figure 1. Precipitation of protease from lyophyllum shimeji mycelium culture medium conditions. Soybean medium composition (A), potato extracted medium composition (B).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 백만송이 버섯 균사체 배양액에서 SDS-PAGE에 의한 생리활성 물질 분리

대두박 배양액과 감자추출 배양액 1liter 에 백만송이 버섯균사체 10 g 을 첨가하여 10 일 동안 배양 후 주정 에탄올을 이용하여 혈전용해 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질 10 ug을 SDS-PAGE 젤을 이용하여 전기영동을 수행하여 commasie blue 염색을 수행하여 혈전용해 단백질을 확인한 결과, 자실체에서 분리한 혈전 용해 단백질과 같은 크기에서 백만송이 버섯 균사체에서 분리한 혈전 용해 단백질이 있음을 확인하였다. 대두박 배양액과 감자추출 배양액에서 추출한 혈전용해 단백질 양을 비교한 결과, 감자추출 배양액에서 분리한 혈전용해 단백질의 양이 많음을 확인하였다(Fig. 2).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

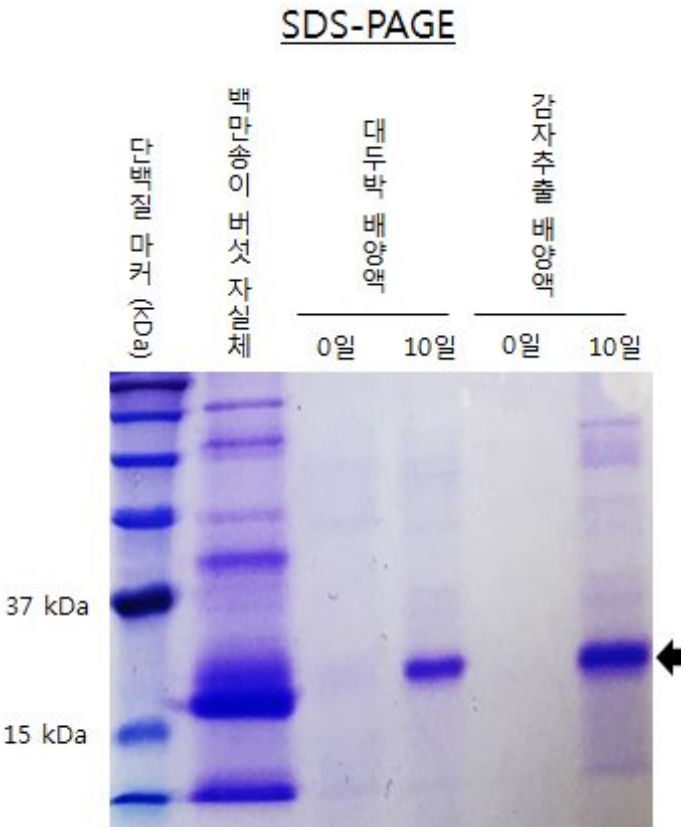

Figure 2. Protein isolation from soybean medium and potato extracted medium were electrophoresed on 12% SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 to visualize. Lane 1, Marker; lane 2, crude extract of lyophyllum shimeji fruit body; lane 3 and 4, soybean medium; lane 5 and 6, potato extracted medium.Approximately 20 kDa purified enzyme in size is indicated.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4. 백만송이 버섯 균사체 배양액에서 분리한 단백질의 혈전용해 효능 확인

대두박 배양액과 감자추출 배양액에서 추출한 단백질 1 ug을 3M paper filter 젓신 후 fibrin 이 첨가된 고체 plate에서 37°C 에서 4 시간 반응하여 투명환을 확인하였다. 고체 plate에는 fibrin이 함유되었으며 혈전용해 효능이 나타나면 fibrin이 분해되어 투명한 환이 생기게 된다. 두 배양액을 비교하였을 때 감자추출 배양액에서 추출한 혈전용해 단백질의 효능이 대두박 배양액에서 분리한 혈전용해 단백질로 1.5 배 효능이 뛰어남을 확인하였다(Fig 3). 또한 대두박 배양액 조성보다 감자추출배양액 조성의 경제적 단가가 싸며, 감자추출 배양액에 들어가는 조성은 식용으로 가능한 감자와 설탕만 함유되어 있어 식용으로 가능하기 때문에 추후 실험은 감자추출 배양액을 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

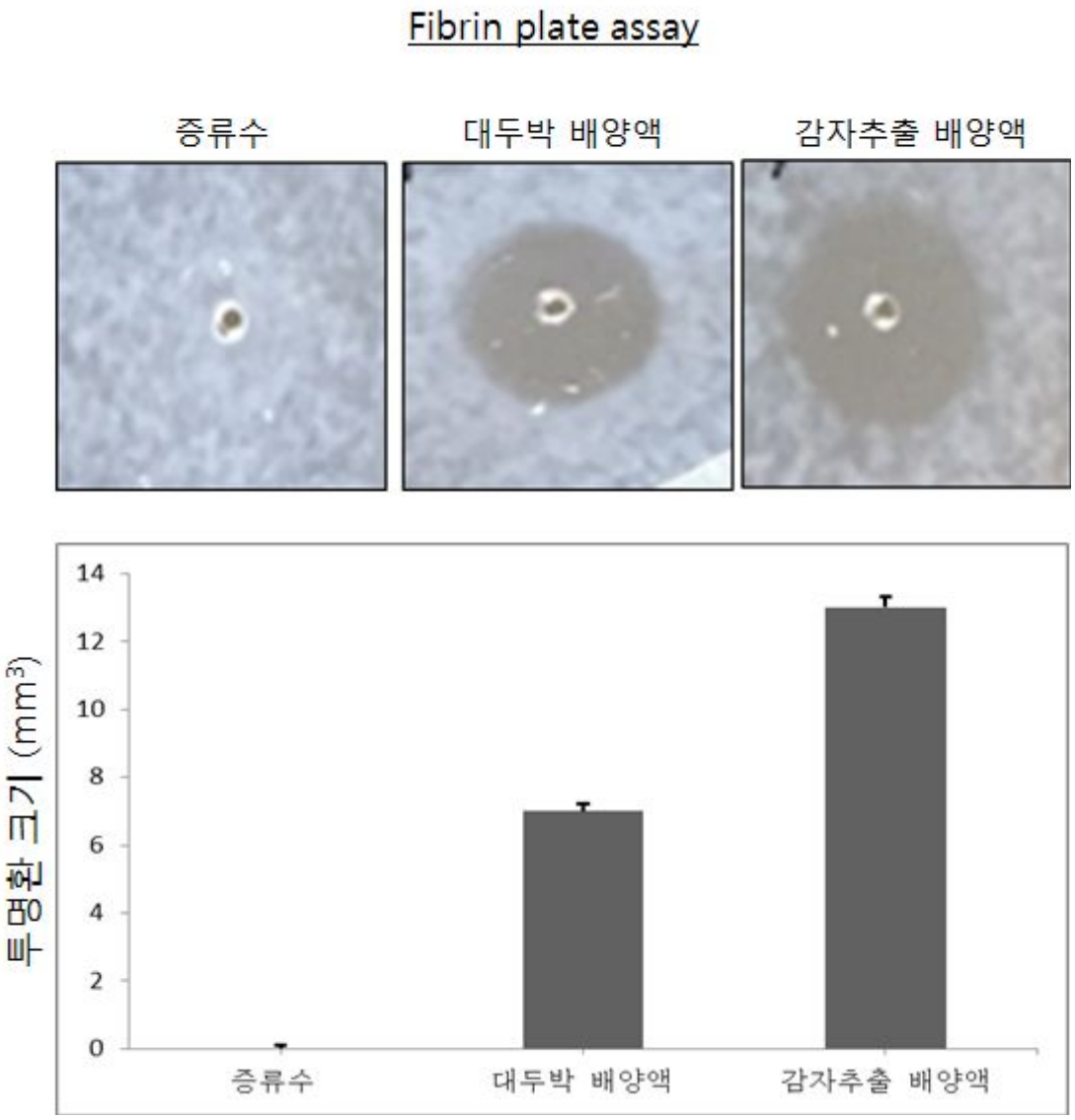

Figure 3. Fibrinolytic activity of the purified enzyme measured on fibrin plate. Isolation of protein from soybean medium and potato extracted medium. Samples were applied to the wells in the plasminogen free fibrin plate and incubated for 1 h at 37°C (A). After incubation, the mean diameters of the hydrolyzed clear zone were measured. Data was expressed as mean ± SD of three independent experiments (B).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

5. 백만송이 버섯 균사체 배양액에서 분리한 단백질의 특성 확인

백만송이 버섯 균사체 배양액은 혈전용해효과 및 단가에서 뛰어난 감자추출배지를 사용하여 균사체 배양조건을 확립하기 위해 감자추출배지의 pH (pH2, 4, 6, 8), 배양 온도 (15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C) 그리고 배양시간 (Day 1, Day5, Day 10, Day 20, Day 30)으로 백만송이 버섯 균사체의 최적의 배양조건 확립하기 위해 SDS-PAGE, 아조카제인 효소법을 수행한 결과 감자추출배지의 pH는 4~6, 감자추출배지의 배양온도 25°C에서 10일간 배양하였을 때 최적의 조건임을 확인하였다(Fig. 4). 아조카제인 효소 실험을 통하여 피브린분해 활성에 대한 온도의 효과에 대한 평가를 위해 사용되었다. 효소활성을 위한 최적의 온도가 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 및 90°C의 온도범위에 걸쳐서 20 mM Tris-HCL 완충액(pH 8.0)에서 효소활성의 측정에 의해 결정되었다. 효소의 열 안정성을 관찰하기 위해서, 효소활성이 효소를 1시간 동안 20 mM Tris-HCL 완충액(pH 8.0)에서 다양한 온도(40, 50, 및 60°C)로 배양한 후에 측정되었다. 효소활성을 위한최적의 pH가 0.5 M glycine -HCl완충액(pH 2.0 및 3.0), 0.5 M acetate (pH 4.0 및 5.0), 0.5 M Tris-HCL 완충액(pH 6.0, 7.0, 및 8.0), 및 0.5 M glycine-NaOH완충액(pH 9.0 및 10.0)에서 잔여효소활성의 측정에 의해 결정되었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

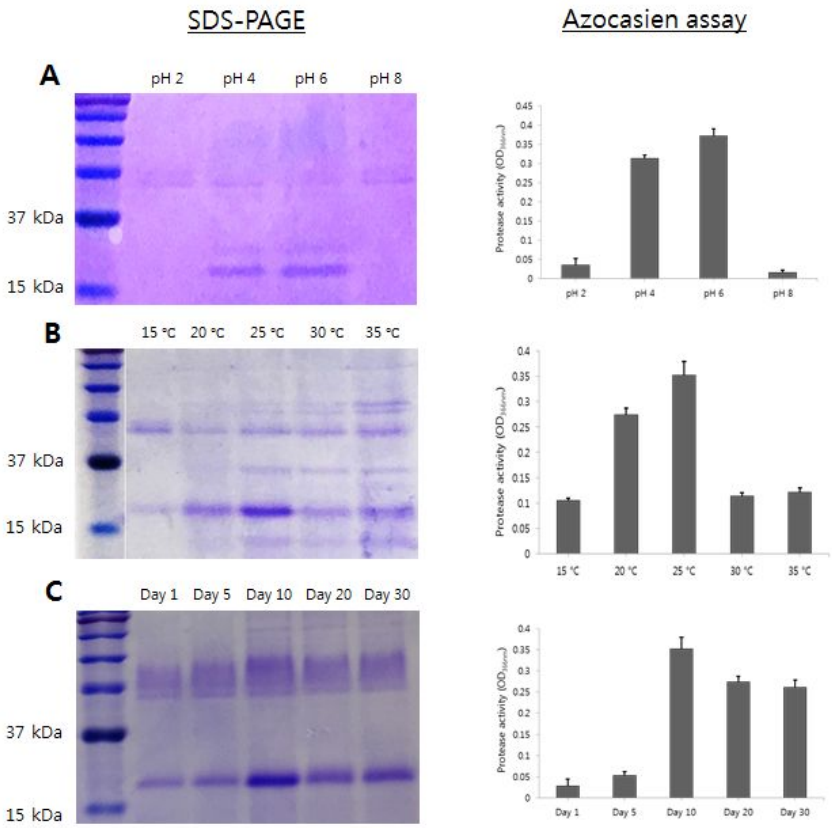

Figure 4. Dependence of pH, temperature and cultivation of purified enzyme from lyophyllum shimeji mycelium culture medium. pH range of 0.5 M glycine - HCl (pH 2.0 - 3.0), 0.5 M acetate (pH 4.0 - 5.0), 0.5 M Tris - HCl (pH 6.0 - 8.0), and 0.5 M glycine - NaOH (pH 9.0 - 10.0) buffers. Enzymatic activity was measured by incubation for 1 h at various pH values at 37°C using a 1% azocasein solution (A). Temperature dependence of enzymatic activity of purified enzyme of L. shimeji. The purified enzyme was incubated for 1 h at temperatures from 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, and 35°C using a 1% azocasein solution. Enzymatic activity was measured by azocasein assay (366 nm) (B). Day of cultivation of enzymatic activity of purified enzyme of L. shimeji. The purified enzyme was incubated for 1 h at temperatures from Day 1, 5, 10, 20, and 30 using a 1% azocasein solution. Enzymatic activity was measured by azocasein assay (366 nm) (B). All data were expressed as mean ± SD of three independent experiments

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

6. 다양한 조건에서 백만송이 버섯 균사체 배양액에서 분리한 생리 활성 물질의 in vitro 혈전 용해 효과

백만송이 버섯 균사체 배양의 최적의 조건을 확립 한 후, 혈전용해 효능을 확인하기 위해 섬유소 침전법을 수행하여 투명환을 통해서 혈전용해능을 확인한 결과 pH는 6, 감자추출배지의 배양온도 25°C에서 10일간 배양하였을 때 최적의 조건임을 확인하였다(Fig. 5).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

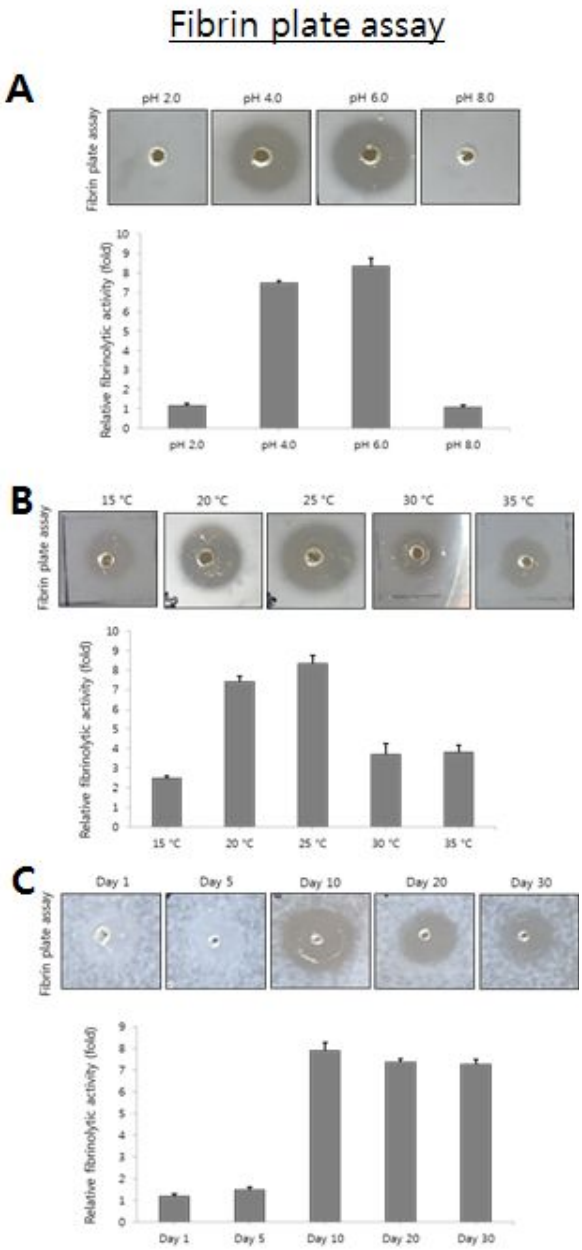

Figure 5. Fibrinolytic activity of the purified enzyme measured on fibrin plate. Samples were applied to the wells in the plasminogen free fibrin plate and incubated for 1 h at 37°C. After incubation, the mean diameters of the hydrolyzed clear zone were measured. Data was expressed as mean ± SD of three independent experiments.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

7. 백만송이 균사체 배양의 최적의 조건 확립 후 생리활성효소를 대량 추출하여 in vitro 혈전 용해 효과 확인

백만송이 버섯 균사체 배양액 배지 및 균사성장 조건을 확립한 후 대량 배양하여 생리활성을 포함되어 있는 추출물을 확보하였다. 확보된 추출물의 생리활성을 확인하기 위해 fibrinolytic SDS-PAGE를 이용하여 혈전이 유발되는 플라즈민의 α, β 소단위체가 분리됨을 확인 하였고 또한 fibrin plate assay을 수행하여 혈전 용해능을 확인하였다(Fig. 6).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

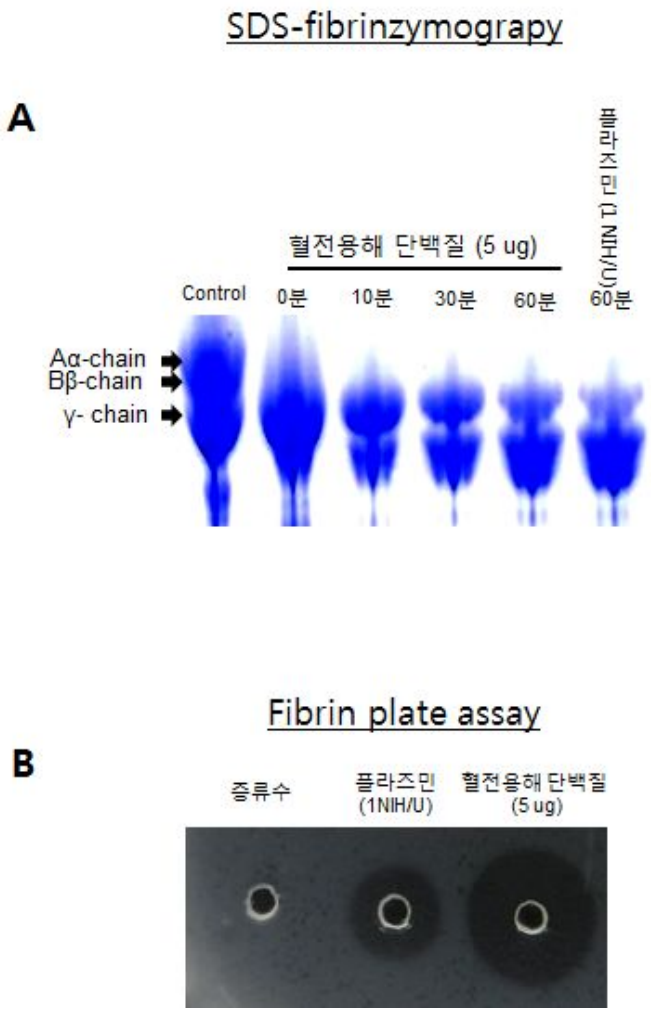

Figure 6. The analysis of fibrinogenolytic pattern measurement of relative fibrinolytic activity. (A) Fibrinogenolytic pattern analysis of purified enzyme on the fibrinogen as the time dependent manner. Fibrinolytic activity of the purified enzyme measured on fibrin plate (B). Samples were applied to the wells in the plasminogen free fibrin plate and incubated for 1 h at 37°C. Buffer (20 mM Tris - HCl) only used as negative control and plasmin (1NIH unit/ml) was used as positive control. After incubation, the mean diameters of the hydrolyzed clear zone were measured. Data was expressed as mean ± SD of three independent experiments.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅳ. 고찰

전 세계적으로 각종 질병의 예방 및 치료용 천연생리활성 물질을 약용식물에서 찾고자 하는 노력이 활발하게 이루어지고 있는 가운데 새로운 천연생리활성 물질의 탐색 및 활용을 위한 연구개발 노력이 급격히 증대되고 있다(12). 최근에는 약용버섯으로 알려져 있는 영지버섯의 수용성 저분자 성분을 실라카겔 컬럼으로 분획하여 분리한 뉴클레오티드 AMP와 GMP에서 생쥐 혈소판 응집을 억제하는 효과가 보고되었다. 또한 표고버섯에서도 뉴클레오시드와 뉴클레오티드 중 렌치나신, 데옥시렌치나신, 5'-AMP, 그리고 5'-GMP와 같은 항혈전 효과를 나타내는 성분을 분리하였다(15, 16, 17). 본 연구결과는 백만송이 버섯균사체를 이용하여 감자와 설탕을 이용하여 배양액을 만든 후 pH, 온도, 배양일의 다양한 조건하에서 감자 배양액 1L에 10 g의 백만송이 버섯균사체를 위와 같은 실험조건배양한 후 원심분리 후 배양액에 포함한 단백질 분해효소를 주정 에탄올을 이용하여 조추출물을 분리하여 동결건조를 수행하여 분말을 획득하였다. 획득한 분말을 증류수로 녹여서 SDS-PAGE 젤을 이용하여 크기 및 양을 확인한 결과, pH 4, 온도는 25℃, 배양일은 10일 이었을 때 최적의 단백질 분해효소 분리할 수 있었다(결과 4). Mono Q 5/5 컬럴 및 size exclusion gel filtration chromatography on Superdex 200 100/300 컬럼을 이용하여 약 21 kDa의 단백질 분해효소를 분리하여 SDS-PAGE를 이용하여 단일 밴드임을 확인하였다(결과 2). 분리된 단일 밴드를 단백질 서열 분석을 통하여 ITFQSASP 의 염기서열을 분석하였다. 분리된 단백질 분해효소를 가지고 섬유소 평판법을 이용하여 혈전용해 효과를 확인한 결과 기존에 알려져 있는 혈전용해 효소 플라스민(1NIH unit/ml)보다 1.5 배 혈전분해 효과가 있음을 확인하였다(결과 6). 정제된 단백질 분해효소에 의한 피브리노겐의 가수분해는 12% SDS-PAGE 젤에 의해 분석되었다. 정제된 단백질 분해효소는 즉시 피브리노겐의 Aα-체인을 가수분해하였고, 이후 10분의 배양 후에 Bβ-체인으로 이어졌다. 정제된 피브린분해 효소는 섬유소 평판법에 의해 실험한 결과 투명환 크기가 플라스민(1NIH unit/ml)보다 더 컸을 확인하였다. 피브리노겐 분해 패턴은 정제된 효소가 즉시 피브린 Aα-체인 및 Bβ-체인을 가수분해한다는 것을 드러냈다. 이것은 60분 이내에 γ-체인의 빠른 분해로 이어졌다(결과 5). 이러한 결과는 피브리노겐 분해 패턴이 Agkistrodon contortrix(아크키스트로돈속) 및 Codium divaricatum(말청각)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

의 피브린분해 효소에 의해 빠르게 피브리노겐 Aα-체인 및 Bβ-체인을 가수분해하였다는 유사한 연구결과가 보고된 바 있다(13, 14). 더욱이, 정제된 효소의 피브린분해 활성은 플라스민보다 더 큰 투명환의 크기 및 투명환 영역의 형성을 보여주었다. 정제된 효소는 인공 섬유소의 직접적인 분열을 통해 작용하기 때문에 직접적으로 작용하는 피브린 분해제임을 확인하였다. 이러한 결과로, 우리는 정제된 효소가 피브린분해 효소로서 작용한다는 근거를 제공하였다. 또한, 정제된 효소는 혈전용해요법을 위해 채택될 수 있을 뿐만 아니라 동맥 및 정맥에 비정상적인 혈전의 형성을 방지할 수 있을 것으로 사료된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅳ. 결 론

백만송이 버섯균사체의 액체 배양액을 이용하여 최적의 생리활성 물질 분리 조건을 확립하였고, 또한 섬유소 평판법 실험을 통하여 혈전용해 효과가 기존의 플라즈민 보다 탁월함을 확인하였다.

1. 백만송이 버섯균사체의 혈전용해 단백질 분리는 아조카제인 효소를 이용하여 확인한 결과 pH 4, 온도는 25℃, 배양일은 10일에서 최적의 혈전용해 단백질 분리 조건임을 확인하였다.

2. 음이온 컬럼 및 size exclusion 컬럼을 이용하여 분리한 생리활성 물질을 SDS-PAGE을 이용하여 혈전용해 단백질이 단일밴드임을 확인하였다.

3. 혈전용해 단백질의 염기서열은 ITFQSASP임을 확인하였다.

4. 분리한 혈전용해 단백질은 섬유소 평판법을 수행하여 기존의 혈전용해 효소 플라스민(1NIH unit/ml) 보다 1.5 배 혈전용해 효과가 있음을 확인하였다.

5. SDS-피브린 자이모그램을 수행하여 혈전 단위체의 분리를 확인한 결과 혈전용해 요법을 위해 사용 할 수 있을 뿐만 아니라 동맥 및 정맥에 비정상적인 혈전의 형성을 방지할 수 있을 것으로 사료된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

참고문헌

1. Chang ST. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st Century, non-green revolution, Int. J. Med. Mushrooms. 1999;1:1e7.

2. Aida F, M N A, Shuhimi M, Yazid M, Maaruf A. Mushroom as potential sources of prebiotics: a review, Trends Food Sci. Technology 2009;20:567e575.

3. Hyun-Ku kim. Functional Activities of Microwave-Assisted Extracts fromLyophyllum ulmarium, Korean Jounal of Food Preservation Vol.9. 2002;NO4:p385-395

4. Jae-seong Park, Jea-sun Choi. Effect of the light qualities on the growth characteristics and yield in the cultivation of Lyophyllum ulmarium. 2010

5. Young min Choi, Who Bong Chang, Seong Yeol Choi, Jae Sun Choi, Jae Goan Noh, In Gyu Song, Kyoung Beom Min, Jun soo Lee. Biological activities of Lyopyllum ulmarium, extracts Journal of Agriculture & Life Science Vol. 42. No. 1. 2008;pp35-41

6. Kim H J, J T Bae, J W Lee, M H Hwangbo, H G Im, I S Lee. Antioxidant activity and inhibitive effects on human leukemia cells of edible mushrooms extracts, Korean J Food Preserv. 2005;12:80-85.

7. Choi Y, J B Ku, H B Chang, J Lee. Antioxidant activities and total phenolics of ethanol extracts from several edible mushrooms produced in Korea, Food Sci Biotech. 2005.;4:700-703

8. Petersen PE. Oral cancer prevention and control--theapproach ofthe World

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Health Organization, Oral Oncol. 2009;45:454-460.

9. Jin-Seok Lee, Hyeong-Seok Seo, So-Jung Kim, Hyeong-Jin Kim, Jin Kim, Seung-Ho Lee, Young-Seok Park, Byung-Kwon Park, Byeong-Soo Kim, Sang-Ki Kim, Ji-Youn Jung. Studies on the Anticancer Effect of Apigenin in KB Cell Xenograft Nude Mouse Model, Journal of Life Science Vol. 20. 2010;No.10:1519~1524.

10. Petersen PE. Oral cancer prevention and control-the approach of the World Health Organization, Oral Oncol. 2009;45:454-460.

10. Llewellyn CD1, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people-a comprehensive literature review. Oral Oncol. 2001 Jul;37(5):401-18.

11. Bodin I, Jäghagen EL, Isberg A. Intraoral sensation before and after radiotherapy and surgery for and pharynegal cancer, Head and Neck 2004;26:923-929.

12. Kish JA, Drelichman A, Jacobs J : Clinical trial of cislatin and 5-fluorouracil infusion as initial treatment of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck, Cancer treatres. 1982;66:471-474.

13. Retzios AD, Markland FS, Fibrinolytic enzymes from the venoms of Agkistrodon contortrix contortrix and Crotalus basiliscus basiliscus: cleavage site specificity towards the alpha-chain of fibrin, Thromb Res. 1994 May 15;74(4):355-67.

14. He Z1, Zhang A, Ding L, Lei X, Sun J, Zhang L, Chemical composition of the green alga Codium Divaricatum Holmes.Fitoterapia, 2010 Dec;81(8):1125-8.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

15. Tsai I L, W. Y Lin, C T Chang, I-S Chen. Peroxycoumarius from the root bark of Zanthoxylum schinifolium, Journal of Chinese Society 1998;45:99-101.

16. Mun SI, HS Ryu, JS Choi. Inhibition effects of Zanthoxylum schinifolium and its active principle on liquid peroxidation and liver damage in carbon tetrachloride-treated mice, Hanguk Sikpum Yongyang Kwahak Hoechi 1997;26:943-951.

17. Mukherjee AK, Basu S, Sarkar N, Ghosh AC. Advances in cancer therapy with plant based natural products, Curr. Med. Chem. 2001;8:1467-1486.

18. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death, Toxicol Pathol. 2007 Jun;35(4): 495-516.

19. Fulda S, Debatin KM,.Apoptosis signaling in tumor therapy. Ann N Y Acad Sci. 2004 Dec; 1028:150-6.

20. John stone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy, Cell. 2002Jan;25:00108(2):153-64.

21. Kaufmann SH1, Mesner PW Jr, Samejima K, Toné S, Earnshaw WC. Detection of DNA cleavage in apoptotic cells, Methods Enzymol. 2000;322:3-15.

Collection @ chosun