



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](#)

2010 年 2 月

碩士學位論文

눈꽃동충하초로부터
혈전분해효소의 정제 및 특성분석

朝鮮大學校 大學院

生命工學科

金 會 昶

눈꽃동충하초로부터
혈전분해효소의 정제 및 특성분석

Purification and characterization of fibrinolytic enzyme
from *Paecilomyces japonica*

2010年2月25日

朝鮮大學校 大學院

生命工學科

金會昶

눈꽃동충하초로부터
혈전분해효소의 정제 및 특성분석

指導教授 金成俊

이 論文을 理學碩士學位 論文으로 提出함

2010 年 10月 日

朝鮮大學校 大學院

生命工學科

金會昶

金 會 昶의 碩士學位論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 教授 _____ 印

委員 朝鮮大學校 教授 _____ 印

委員 朝鮮大學校 教授 _____ 印

2010 年 11 月 日

朝鮮大學校 大學院

목 차

LIST OF TABLE	i
LIST OF FIGURE	iv
ABBREVIATION	vi
ABSTRACT.....	vii
I. 서 론.....	1
II. 재료 및 방법.....	5
1.....	재
료 및 시약.....	5
2.....	분
석기기.....	5
3.....	단
백질정량	6
4.....	혈
전용해 활성 측정	6
5.....	혈
전분해효소정제.....	6
5-1.....	조
효소 조제	6
5-2.....	D
EAE sepharose CL-6B fast flow column chromatography	7
5-3.....	S
ephadex G-75 column chromatography	7

5-4.	OROS 20 HQ column chromatography	P	8
6.	전분해 효소의 분자량 측정 및 혈전분해 활성검색	혈	8
7.	소활성도와 안정성에 대한 온도의 영향	효	9
8.	소활성도와 안정성에 대한 pH의 영향	효	9
9.	정제효소에 대한 금속이온 및 효소활성저해제의 영향		9
10.	Fibrin 및 fibrinogen에 대한 분해패턴 분석		10
11.	다양한 기질에 대한 혈전분해 특성 분석		10
12.	분리정제된 혈전분해효소의 아미노산 서열분석		10
III.	결과 및 고찰		13
1.	전분해 효소정제	혈	13
1-1.	tOH 침전법에 의한 조단백 분리	E	13
1-2.	EAE sepharose CL-6B fast flow column chromatography	D	13
1-3.	ephadex G-75 column chromatography	S	15
1-4.	OROS 20 HQ column chromatography	P	15

2.....	혈
전분해 효소의 분자량 측정	19
3.....	효
소활성도와 안정성에 대한 온도의 영향	19
4.....	효
소활성도와 안정성에 대한 pH의 영향.....	24
5.....	정
제효소에 대한 금속이온의 영향.....	27
6.....	정
제효소에 대한 효소활성저해제의 영향.....	27
7.....	정
제효소의 fibrin 및 fibrinogen 분해패턴 분석.....	30
8.....	기
질분해 특성분석	32
9.....	아
미노산 서열 분석	32
III. 결론	36
V. 참고문헌	38

LIST OF TABLES

Table 1. Chromogenic substrates	11
Table 2. Purified fibrinolytic enzyme activity yield from <i>Paecilomyces japonica</i>	18
Table 3. Effect of metal ions on the activity of the fibrinolytic enzyme from <i>Paecilomyces japonica</i>	28

Table 4. Effect of protease inhibitors on the activity of the fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces japonica* 29

LIST OF FIGURES

Figure 1. Photograph of <i>Paecilomyces japonica</i>	4
Figure 2. Ion-exchange column chromatography of fibrinolytic enzyme from <i>Paecilomyces japonica</i> on DEAE sepharose CL-6B fast flow	14
Figure 3. Gel filtration of fibrinolytic enzyme from <i>Paecilomyces japonica</i> on Sephadex G-75	16
Figure 4. Ion-exchange column chromatography of fibrinolytic enzyme from <i>Paecilomyces japonica</i> on POROS 20 HQ	17
Figure 5. SDS-PAGE of the purified enzyme from <i>Paecilomyces japonica</i> ..	20
Figure 6. Fibrinolytic activity of purified enzyme on a fibrin-agrose plate ..	21
Figure 7. Effect of temperature on the activity of the fibrinolytic enzyme from <i>Paecilomyces japonica</i>	22
Figure 8. Thermal stability of fibrinolytic enzyme from <i>Paecilomyces japonica</i>	23
Figure 9. Effect of pH on the activity of the fibrinolytic enzyme from <i>Paecilomyces japonica</i>	25
Figure 10. The pH stability of fibrinolytic enzyme from <i>Paecilomyces japonica</i>	26
Figure 11. Fibrinolysis and fibrinogenolysis patterns exhibited by the fibrinolytic enzyme purified from <i>Paecilomyces japonica</i>	31
Figure 12. Amidolytic activity on chromogenic substrates	33
Figure 13. Comparison of the N-terminal amino acid sequence of the purified fibrinolytic enzyme from <i>Paecilomyces japonica</i> with fungi and mushroom serine proteases	34

ABBREVIATIONS

t-PA	tissue plasminogen activator
TPCK	tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone
TLCK	tosyl lysine chloromethyl keton
APMSF	4-amidophenylmethylsulfonyl fluoride
PMSF.....	phenylmethylsulfonyl fluoride
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis

ABSTRACT

Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces japonica*

Kim, Hoi-Chang

Advisor : Prof. Kim, Sung-Jun, Ph. D.

Department of Biotechnology,

Graduate School of Chosun University

This study was carried out to investigate the purification and characteristics of the fibrinolytic protease from medical cordyceps, *Paecilomyces japonica*. The fibrinolytic enzyme was purified by using DEAE sepharose CL-6B fast flow chromatography followed by Sephadex G-75 gel filtration and POROS 20 HQ chromatography. The final specific activity of purified enzyme was 1431.81 units per milligram and increased 550.69 fold comparing homogenate and the final

recovery yield was 3.8%. The apparent molecular weight of purified fibrinolytic enzyme was estimated to be about 14 kDa by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The optimal reaction pH value and temperature for the enzyme activity were pH 5.0 and 35°C, respectively. The purified enzyme had fibrinolytic activity showing that the protease rapidly hydrolyzed the A α -chain followed by the B β -chain. The purified protease also hydrolyzed fibrin, preferentially digesting the α -chains, followed by γ - γ chains. Interestingly the γ -chains of fibrinogen and the β -chains of fibrin were not hydrolyzed. The activity of the purified enzyme was totally inhibited by ZnCl₂, and moderately MgCl₂, CoCl₂, or MnCl₂, but enhanced by the additions of CaCl₂ metal ions. The protease activity was potently inhibited by PMSF (serine protease inhibitor), and it was found to exhibit a higher specificity for the chromogenic substrate S-2222 and S-2765 for factor Xa, indicating that the purified enzyme is a factor Xa-like serine protease. The N-terminal amino acid sequence of purified enzyme was identified to be AQNIGAVVNLSPPKQ. Therefore, the purified enzyme from *Paecilomyces japonica* can be an effective thrombolytic source.

I. 서론

세계적인 인구고령화 추세와 환경의 악화로 인해 노인성 질병인 순환계 질환의 관심이 증대되고 있다. 2004 년도에 World Health Organization(WHO)에서 순환계 관련 질병을 사망률 1, 2 위로 보고하였다. 2008 년 통계청의 국내 사망원인 발표를 보면, 순환계 질환으로 대표적이라고 할 수 있는 뇌혈관질환 및 심장질환 사망률이 각각 11.3%와 8.7%로 집계되었다.

생체내의 혈관계가 손상을 받게 되면 혈액은 coagulation 을 일으켜 fibrin clot 이 발생한다. Vascular plasminogen activator, tissue plasminogen activator(t-PA), urokinase, Hageman factor, streptokinase plasminogen complex 등의 plasminogen activators 들에 의해 전구체 plasminogen 은 plasmin 으로 변형되고 이 plasmin 에 의해 fibrin clot 는 자연히 분해된다.^[1] 이처럼 혈관계에서 coagulation 과 fibrinolysis 는 균형을 이루고 있으나 여러 요인에 의해 균형이 깨질 경우 혈관 내에 fibrin clot 이 침착되고 혈액순환 장애가 발생하여 혈관 관련 질병의 원인인 혈전증이 발생하게 된다. 혈전증은 심장, 동맥혈관, 정맥혈관, 방광, 요로, 자궁 등 동맥혈관계나 정맥혈관계 모두에서 발생할 수 있다. 혈전을 이루는 단백질인 fibrin 은 thrombin 에 의해서 fibrinogen 이 변형되는 형태로 생성된다.^[2]

현재 일반적으로 사용되는 혈전용해제제들은 plasminogen activator 이며 사람의 뇨에서 추출한 urokinase, 악성종양인 melanoma cell 유래의 tPA, *Streptococcus haemolyticus* 유래의 streptokinase, *Staphylococcus. sp* 유래의 staphylokinase 등이 있으나 urokinase 이외에는 경구투여를 할 수가 없고 혈전에 대한 선택성이 낮아 전신출혈을 발생하는 부작용이 존재하는 단점이 있다.^[3] 따라서 최근에는 기존

치료제보다 출혈에 대한 부작용이 적고 혈전을 직접 용해할 수 있는 물질에 대한 연구가 이루어지고 있다.

근래에 해조류, 젓갈류, 장류, 등^[4,5,6,7]과 같은 섭취가 가능한 자원에서 혈전을 직접 용해하는 효소를 분리하는 연구가 진행되고 있으며 버섯에서도 혈전용해효소가 분리되었다는 보고가 있다.^[8]

버섯은 독특한 향미와 조직감을 가지고 있기 때문에 동서양을 막론하고 고급 식품재료나 민간약재로 이용되어 왔다. 버섯은 현재 공식적으로 14,000 종, 비공식적으로 22,000 여종이 알려져 있다. 하지만 이는 현재 미확인된 버섯 중 10%에 불과하며 아직 밝혀지지 않은 버섯 중에서 약 7,000 여종이 인간에게 유용하게 이용될 수 있을 것으로 추측하고 있다.^[9]

영지버섯속(*Ganoderma*)에서 추출된 ganomycin A, B 는 *Staphylococcus aureus* 및 다른 미생물에 항균효과가 있음이 보고되었고^[10], *Inonotus obliquus* 의 수용성 lignin 은 HIV-1 protease 활성을 저해하여 바이러스를 억제하는 항바이러스 효과가 있는 것으로 알려져 있다^[11]. 이 밖에도 *Lentinus edodes* 의 항산화, 면역증강, 항균효과^[12,13,14]와 *Pleurotus ostreatus* 의 항암, 항균효과^[15,16,17], 등 다양한 약리작용을 가지는 물질들이 존재함이 보고되고 있다.

동충하초속에서도 인체에 유효한 성분들이 연구, 보고되었는데 *Cordyceps militaris* 에서 유래된 천연항생물질이자 면역증강물질인 Cordycepin^[18,19]이 그 좋은 예라고 할 수 있겠다.

동충하초라는 이름은 겨울에 곤충의 몸에 침입하여 기주의 영양분을 이용하여 내생균핵을 만든 다음, 여름에는 곤충의 몸 밖으로 자실체를 형성하여 풀처럼 돌아나는 모습에서 연유한 이름이다.^[20] 대부분의 동충하초균은 자낭균아문, 핵균강, 맥각균목, 동충하초과에 속하며, 한국을 비롯하여 중국, 일본 등 세계적으로 널리

알려져 있다^[21]. 현재 곤충을 비롯한 절지동물, 균류, 또는 고등식물의 종자 등에 기생하는 균류에 속하는 모든 균류 동충하초의 계통분류 및 시판동충하초의 분류학적 위치를 넓은 의미에서 동충하초라고 하며, 이들 중에서 곤충에 침입하는 동충하초균은 세계적으로 약 800 여종이 알려져 있고, 버섯을 형성하는 것으로 알려진 것은 대부분 자낭균류의 동충하초속(*Cordyceps*)에 속하는 균들로서 약 300 여종이 보고되었다.^[22]

본 연구에서는 한국을 비롯한 아시아권에서 예로부터 약용으로 어혈, 중풍, 동맥경화 등의 증세에 사용되어왔으나 동충하초속에 비하여 그 연구가 미진한 눈꽃동충하초속 *Paecilomyces japonica*[Fig.1]로부터 혈전분해능을 검색하였다. 혈전분해물질을 정제한 후, 최적온도, 최적 pH, 혈전분해활성에 대한 금속이온, 활성저해제에 대한 영향, 염기서열분석, 분자량 측정 등을 통하여 *Paecilomyces japonica* 의 약용성분에 대해 체계적으로 접근해 보고자 하였다.



Fig. 1. Photograph of *Paecilomyces japonica*

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 시약

본 실험에서는 전북대학교 바이오식품공학과 식품가공학 실험실에서 분류·동정된 *Paecilomyces japonica*를 사용하였다. 시약으로 Bovine fibrinogen, Bovine thrombin, Human fibrinogen, Human fibrin, Plasmin, acrylamide, N,N'-methylenebisacrylamide, glycine, citrate monohydrate, trizma base, 4-amidophenylmethylsulfonyl fluoride (APMSF), phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), tosyllysine chloromethyl keton(TLCK), Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone(TPCK), Aprotinin, ethylene diamine tetra acetic acid(EDTA), ethylene glycol tetra acetic acid (EGTA), potassium chloride, sodium dodecyl sulfate(SDS), Urea는 Sigma-aldrich Co.(USA) 제품을 이용하였으며 Agarose는 Invitrogen, protein maker는 Fermentas(USA)사의 PageRuler™ Prestained Protein Ladder 제품을 사용하였다.

2. 분석기기

단백질 정량을 위한 UV spectrometer는 UV-1650PC(Shimadzu Co., Japan)를 이용하였다.

효소정제를 위한 DEAE Sepharose CL-6B fast flow, Sephadex G-75는 Phamacia(U.K.) 제품을 이용하였고 POROS 20 HQ는 Applied Biosystem

(USA)사의 제품을 이용하였다.

3. 단백질 정량

단백질의 농도는 Bradford의 방법^[23]을 이용하여 bovine serum albumin (Sigma,USA)을 표준 시료로 하여 595nm에서 측정하였으며 발색제는 Bio-Rad(USA)사로부터 구입하였다.

4. 혈전용해 활성 측정

혈전용해 활성은 Astrup과 Müllertz의 fibrin plate법^[24]을 수정하여 사용하였다. 1% agarose 용액 20ml을 가열하여 녹이고 45℃에서 천천히 식히며 fibrinogen 0.15% 를 넣고 혼합시켰다. 여기에 Thrombin 1.0 unit를 첨가하고 1시간 동안 실온에서 고화시켜 fibrin plate를 제조하였다. 제조된 fibrin plate에 지름 3mm의 구멍을 만들어 plasmin(Sigma, USA) 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0unit를 각각 침적하고 37℃ 에서 12시간 반응시켜 생성된 용해환의 크기를 standard curve로 사용하였다. 조단백질 및 컬럼 분획을 필요에 따라 농축시키거나 희석하여 fibrin plate에 침적하고 그 용해환의 크기를 plasmin의 용해환과 대조한 뒤 unit로 환산하였다.

5. 혈전분해 효소정제

5-1. 조효소 조제

*Paecilomyces japonica*를 누에번데기에서 조심스럽게 분리한 뒤 습중량 200g을

3차 증류수로 여러 차례 세척하여 실험에 이용하였다. 균질화에 필요한 최소량의 증류수를 섞어 blender로 갈아 균질화하였으며 이를 멸균거즈를 이용하여 1회 거르고 4℃, 5,000rpm에서 1시간 동안 원심분리(Supura21k Hanil, Korea)하여 상층액을 회수하였다.

회수된 상층액에 -70℃ 로 전처리한 에탄올 동량을 가하고 0℃에서 1시간 교반하였다. 다시 4℃, 5,000rpm에서 1시간 원심분리하여 침전물은 제거하고 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액에 -70℃ 로 전처리한 에탄올 동량을 가하여 최종 에탄올 농도를 75%로 적정한 후 0℃에서 1시간 교반하였다. 이를 4℃, 5,000rpm에서 1시간 원심분리하여 침전물을 회수한 뒤 3차 증류수에 현탁하여 시료로 사용하였다.

5-2. DEAE sepharose CL-6B fast flow column chromatography

75% 에탄올 침전 후 증류수에 현탁한 시료를 DEAE sepharose CL-6B fast flow column(1.6×20cm)에 적하하였다. 10mM Tris-HCl(pH 7.0) buffer를 이용하여 전개시켰으며 0.5M KCl(10mM Tris-HCl, pH 7.0)의 농도구배로 용출시켜 활성 분획만을 회수하였다. 이 때 flow rate 6ml/hr, fraction size 3ml씩 분획하였다.

활성분획물은 Sartorius stedim(Germany)의 vivaspin 500을 이용하여 농축하고 10mM Tris-HCl(0.1M KCl, pH 7.0) buffer로 평형화시켰다.

5-3. Sephadex G-75 column chromatography

농축하고 10mM Tris-HCl(0.1M KCl, pH 7.0) buffer으로 평형화시킨 시료를 Sephadex column(1.0×63cm)에 적하하고 10mM Tris-HCl(0.1M KCl, pH 7.0)

buffer로 전개하였다. Flow rate 4ml/hr, fraction size 1ml씩 분획하였다.

활성분획물을 vivaspin 500을 이용하여 10mM Tris-HCl(pH 8.0) buffer로 탈염 및 농축하였다.

5-4. POROS 20 HQ column chromatography

10mM Tris-HCl(pH 8.0) buffer로 평형화된 시료를 POROS 20 HQ column(1.0×10cm)에 적하하고 10mM Tris-HCl(pH 8.0) buffer로 전개하였으며 0.5M KCl(10mM Tris-HCl, pH 8.0)의 농도구배로 용출시켜 활성 분획만을 회수하였다. 이 때 flow rate 0.5ml/min, fraction size 1ml씩 분획하였다.

활성분획물을 vivaspin 500으로 농축하고 10mM Tris-HCl(pH 7.0) buffer로 평형화시켰다.

6. 혈전분해 효소의 분자량 측정 및 혈전분해 활성검색

추출된 단백질은 Laemmli의 방법^[25]으로 SDS-PAGE를 수행하여 분자량을 분석하였다. 12%의 separating gel과 5% stacking gel로 이루어진 SDS-PAGE에 단백질 시료 20μg과 5×sample buffer(60mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4mM β-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)와 혼합하여 100℃에서 5분간 중탕하여 전기영동을 수행하였으며 protein marker를 사용하여 분자량을 확인하였다. 전기영동 후 gel은 Coomassie blue R-250으로 염색하였다.

또한 정제된 혈전분해 효소의 효소활성 반응 유·무를 확인하기 위하여 fibrin plate에 음성·양성 대조구와 함께 침적하고 그 효소활성을 검색하였다.

7. 효소활성도와 안정성에 대한 온도의 영향

Fibrinolytic activity의 온도에 대한 의존성은 20~90℃의 측정 조건하에서 측정하였다. 10mM Tris HCl buffer(pH 7.0)로 효소용액을 dilution하여 10 μ l를 취하고 이를 각각의 온도에서 12시간 반응시킨 후 fibrin plate에 침적하여 효소활성을 측정하였다. 효소의 안정성을 시험하기 위해 1/10로 dilution된 효소용액 10 μ l를 각각의 온도에서 10, 30, 60분간 방치한 후 반응용액을 fibrin plate에 침적하여 최적온도에서 12시간 동안 잔존 효소활성을 측정하였다.

8. 효소활성도와 안정성에 대한 pH의 영향

Fibrinolytic activity의 pH에 대한 의존성은 pH 2~10의 범위에서 측정되었다. pH 2~3은 glycine-HCl buffer, pH 4~6은 citric-NaOH buffer, pH 7~8은 Tris-HCl buffer, pH 9~10은 glycine-NaOH buffer를 사용하여 효소활성을 fibrin plate에서 측정하였으며, pH에 대한 안정성은 pH 2~10의 범위에서 4℃, 24시간 방치 후 잔존효소 활성을 fibrin plate에 침적하여 확인하였다.

9. 정제효소에 대한 금속이온 및 효소활성저해제의 영향

정제한 효소의 활성에 대한 금속이온 및 효소활성저해제의 영향을 알아보기 위해 CaCl₂, CoCl₂, ZnCl₂, CuSO₄, MgCl₂, MnCl₂, FeSO₄, EDTA, EGTA, PMSF를 효소용액에 섞어 최종농도 1mM, APMSF는 0.5mM, TLCK, TPCK는 10mM,

Aprotinin은 5 TIU/ml의 농도로 만들어 1시간 동안 최적온도에서 반응 시킨 후 fibrin plate를 수행하여 활성을 비교하였다.

10. Fibrin 및 fibrinogen에 대한 분해패턴 분석

Fibrin 및 fibrinogen에 대한 혈전분해 특성을 분석하기 위하여 10 μ l의 fibrinogen 및 fibrinogen에 Thrombin 0.1unit를 처리하여 고화시킨 fibrin에 정제된 효소 10 μ l을 첨가하여 일정한 시간적 간격을 두고 최적온도에서 반응시킨 후 SDS-PAGE를 이용하여 분해특성을 비교하였다. Fibrin의 경우 Stop solution(10M Urea, 4% SDS, 4% β -mercaptoethanol)을 첨가하여 반응을 정지시키고 monomer fibrin으로 전환시켜 SDS-PAGE 상에서 전개하였다. Fibrinogen의 분해패턴은 12% SDS-PAGE에서 전개하고 fibrin의 분해패턴은 7.5% SDS-PAGE 상에서 전개하여 그 분석을 용이하게 하였다.

11. 다양한 기질에 대한 혈전분해 특성 분석

Table 1에 서술된 다양한 chromogenic substrate(Chromogenix, Italy)을 이용하여 Amidolytic activity를 측정하였다. 활성화 측정은 0.5mM chromogenic substrate에 정제된 혈전분해효소 1 μ g을 첨가하여 최적온도에서 5분간 반응시킨 후 ELISA plate reader를 사용하여 405nm에서 방출된 p-nitroaniline의 양을 측정하였다.

12. 분리·정제된 혈전분해효소의 아미노산 서열분석

Table 1. Chromogenic substrates

Chromogenic substrates	Amino acid sequence	characteristics
S-2238	H-D-Phe-Pip-Arg- pNA	For thrombin
S-2765	Z-D-Arg-Gly-Arg- pNA · 2HCl	For factor Xa
S-2222	Bz-Ile-Glu-(OR)- Gly-Arg-pNA	For factor Xa
S-2251	H-D-Val-Leu-Lys- pNA	Streptokinase-activated plasminogen
S-2444	pyroGlu-Gly-Arg- pNA	For urokinase
S-2288	H-D-Ile-Pro-Arg- PNA	For t-PA

정제된 *Paecilomyces japonica*의 혈전분해효소는 SDS-PAGE 전기영동 후 PVDF membrane으로 transfer시키고 건조한 후 한국기초과학지원연구원에 의뢰하여 N-terminal sequence analysis를 수행하였다.

Ⅲ. 결과

1. 혈전분해 효소정제

1-1 EtOH 침전법에 의한 조단백 분리

모든 정제과정은 4℃에서 수행하였으며 안정적인 혈전분해효소 활성을 유지시키기 위해 에탄올침전법을 이용하여 조단백추출을 수행하였다. 50% EtOH 침전물을 제거, 상층액을 회수하여 최종 75% EtOH 침전물을 10mM Tris-HCl buffer(pH7.0)에 추출된 침전물을 현탁하였다. 최종적으로 현탁액을 12,000rpm, 30min으로 원심분리하여 상층액만을 조단백질로 실험에 이용하였다. 조단백질의 단백질 총량은 14.99mg이며 효소활성은 336.22unit/ml로 측정되었다.

1-2 DEAE sepharose CL-6B fast flow column chromatography

DEAE sepharose CL-6B fast flow column을 10mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)로 평형화 시킨 후 조효소를 적하하고 0~0.5M KCl(10mM Tris-HCl buffer, pH 7.0)으로 농도구배를 형성시켜 column을 전개하였다. 각 분획은 6ml/hr의 유속으로 3ml씩 수집되었으며 혈전분해활성은 fibrin plate를 사용하여 측정되었다. 활성분획은 0M 구획에서 확인되었으며 0.5M의 농도구배 구간에서는 활성분획이 존재하지 않음을 확인하였다.

활성분획은 모두 모은 뒤 vivaspin 500으로 농축하고 10mM Tris-HCl

buffer(0.1M KCl, pH 7.0)로 평형화하였다.

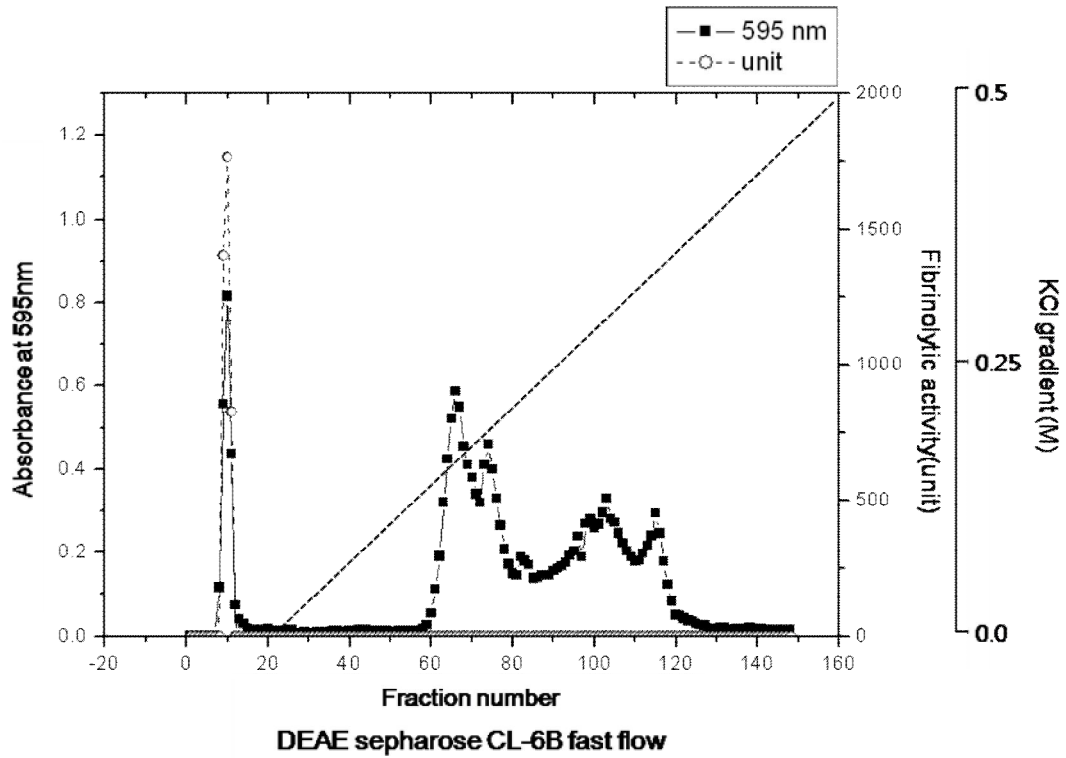


Fig. 2. Ion-exchange column chromatography of fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces japonica* on DEAE sepharose CL-6B fast flow. The protein sample was applied to the column(1.6×20cm) equilibrated with 10mM Tris-HCl buffer(pH 7.0). The protein was eluted with 0~500mM KCl(10mM Tris-HCl, pH 7.0) linear gradient at the flow rate of 6ml/hr at 4°C. The fraction volume was 3ml.

1-3 Sephadex G-75 column chromatography

Sephadex G-75를 충전하고 column volume 2배수의 10mM Tris-HCl buffer(0.1M KCl, pH 7.0)로 평형화 시켰다. DEAE sepharose CL-6B fast flow column에서 획득하여 농축한 활성단백질을 Sephadex G-75에 적하하고 4ml/hr의 유속으로 1ml씩 분획을 수집하였다.

Sephadex G-75 column의 배제분자량보다 상위크기의 단백질을 제거하고 활성분획은 모은 뒤 vivaspin 500으로 농축, 10mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 평형화하였다.

1-4 POROS 20 HQ column chromatography

POROS 20 HQ column을 10mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 평형화 시킨 후 활성단백질을 적하하고 0~0.5M KCl(10mM Tris-HCl buffer, pH 8.0)으로 농도구배를 형성시켜 컬럼을 전개하였다. 0.5ml/min의 유속으로 컬럼을 전개하였으며 1ml 씩 분획을 수집하였다.

수집된 분획은 vivaspin 500으로 각각 농축하고 fibrin plate에 침적하여 혈전분해활성을 검색하였으며 동시에 SDS-PAGE를 수행하여 protein band를 확인하였다. 0M KCl로 전개된 분획에서 혈전분해활성이 관찰되었고 SDS-PAGE 상에서 단일 band로 확인되었다.[Fig.5]

회수된 단백질 총량은 0.176mg, 효소활성은 550.69배 증가하였고 회수율은 3.8%로 확인되었다.[Table. 2]

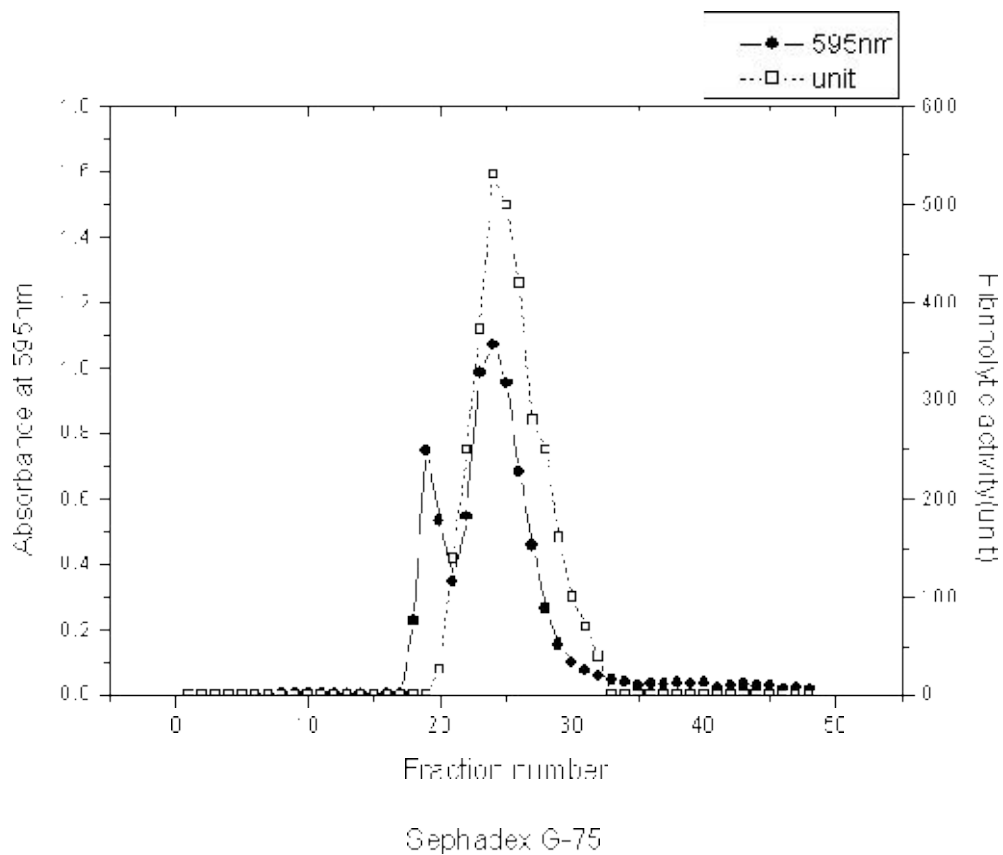


Fig. 3. Gel filtration of fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces japonica* on Sephadex G-75. The protein was eluted through the column(1.0×63cm) equilibrated with 10mM Tris-HCl(contain 0.1M KCl, pH 7.0) buffer at the flow of 4ml/hr at 4°C. The fraction volume was 1ml.

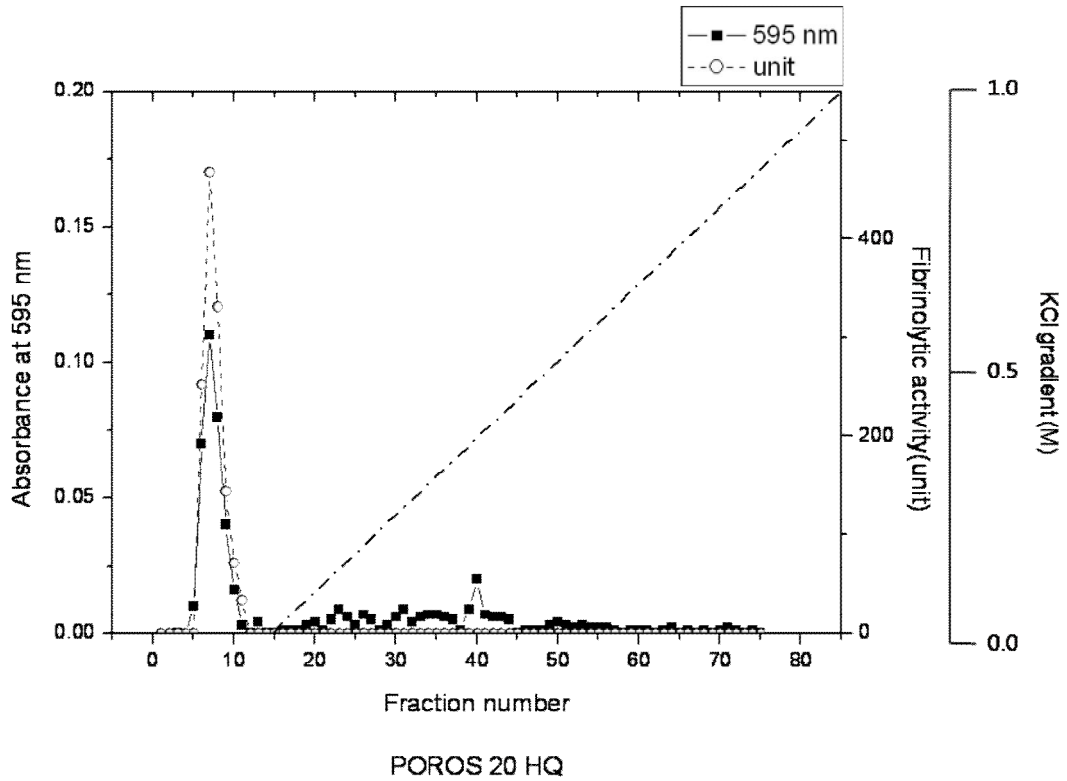


Fig. 4. Ion-exchange column chromatography of fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces japonica* on POROS 20 HQ. The protein sample was applied to the column(1.0×10cm) equilibrated with 10mM Tris-HCl buffer(pH 8.0). The protein was eluted with 0~1M KCl(10mM Tris-HCl, pH 8.0) linear gradient at the flow rate of 0.5ml/min at 4°C. The fraction volume was 1ml.

Table 2. Purified fibrinolytic enzyme activity yield from *Paecilomyces japonica*

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (Unit)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	fold
Homogenate	2487.5	6480	2.60	100	1
Crude extract	14.99	5040	336.22	77.70	129.31
DEAE-sepharose CL6B fast flow	5.841	3996	684.12	61.65	263.12
Sephadex G-75	2.374	3139	1322.24	48.40	508.55
POROS 20 HQ	0.176	252	1431.81	3.8	550.69

Fibrinolytic activity was measured by using the fibrin plate assay.

2. 혈전분해 효소의 분자량 측정 및 혈전분해 활성검색

POROS 20 HQ column에서 정제된 단백질은 SDS-PAGE를 수행하여 분자량을 분석하였다. 12%의 separating gel과 5% stacking gel로 이루어진 SDS-PAGE에 정제효소 20 μ g과 5 \times sample buffer를 혼합하고 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 증탕하여 전기영동을 수행하였으며 protein marker를 사용하여 분자량을 확인하였다. 전기영동된 gel은 Coomassie blue R-250으로 염색하였다.

정제된 혈전분해효소 단백질 band는 protein maker 10kDa과 15kDa 부분에서 관찰되었으며 약 14kD 크기로 확인되었다.[Fig.5] 따라서 기존에 보고된 *Flammulina velutipes*에서 정제된 혈전분해효소 33kDa^[26], *Bacillus subtilis* BK-17에서 보고된 혈전분해효소 31kDa^[27]과 비교하여 크기가 더욱 작은 효소임을 확인 할 수 있었다.

정제된 효소의 혈전분해 활성 검색을 위하여 fibrin plate에 효소 10 μ g을 침적, 12시간 반응하여 혈전분해 활성을 검색하였다. 정제된 효소는 plasmin 1unit와 비교하여 약 1.596배 크기의 용해환을 형성하는 것으로 확인되었다.[Fig.6]

이상의 정제된 효소는 현재 보고되어 있는 fibrinolytic enzyme과^[4,5,6,7,8] 비교하여 그 분자량이 매우 작고 fibrinolytic activity가 뛰어나므로 차후 혈전용해제제로 사용되는데 큰 이점으로 작용할 것으로 사료된다.

3. 효소활성도와 안정성에 대한 온도의 영향

혈전분해효소 반응의 최적온도를 검토하기 위하여 정제된 효소를 25 $^{\circ}$ C에서 40 $^{\circ}$ C 사이 구간은 2.5 $^{\circ}$ C 간격으로 나머지 구간은 5 $^{\circ}$ C 간격으로 20~80 $^{\circ}$ C에서 fibrin plate

assay를 12시간 진행하였다. 효소반응 최적온도는 30℃에서 37.5℃ 사이

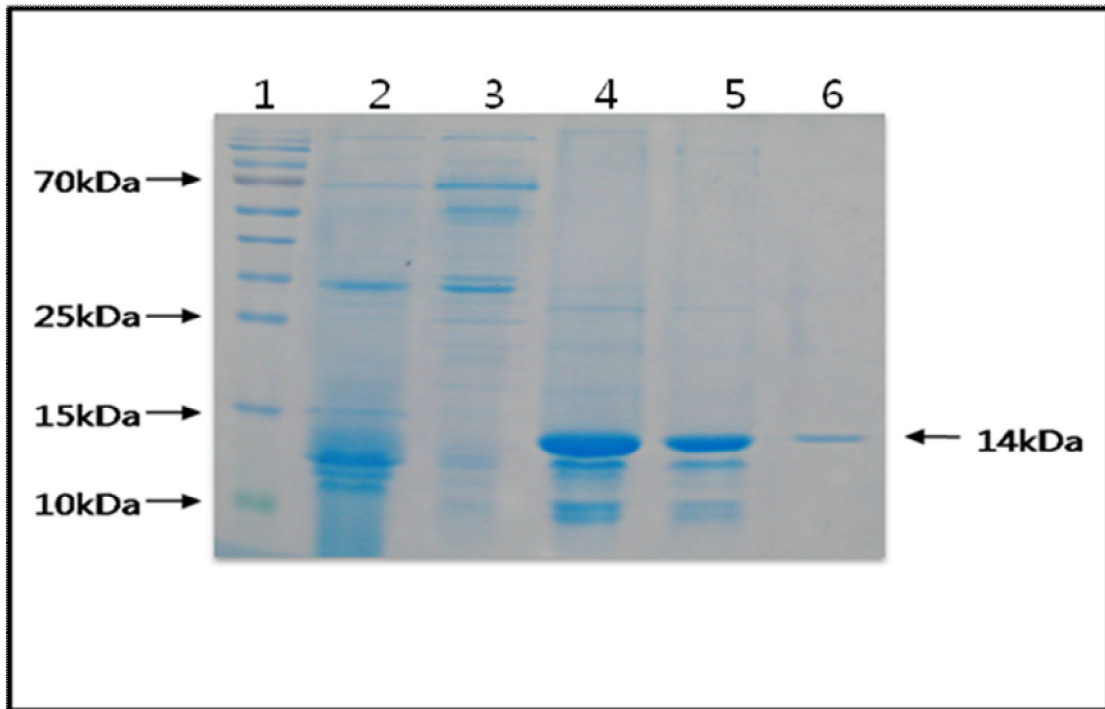


Fig. 5. SDS-PAGE of the purified enzyme from *Paecilomyces japonica*. SDS-electrophoresis was carried out in 12% polyacrylamide gel. The protein in the gel was stained with Coomassie brilliant blue G-250.

Lane 1. Protein marker

Lane 2. Homogenated sample

Lane 3. Crude extract

Lane 4. After DEAE sepharose CL-6B fast flow column

Lane 5. After sephadex G-75

Lane 6. After POROS 20 HQ, Purified enzyme

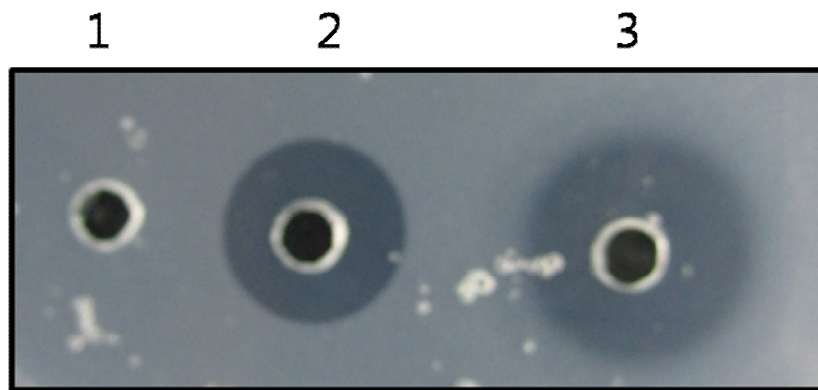


Fig. 6. Fibrinolytic activity of purified enzyme on a fibrin-agarose plate. Samples were pipette on plate and incubated for 12hr at 35°C. 1, negative control(10mM Tris-HCl buffer, pH 7.0); 2, positive control(1 unit plasmin); 3, (10 μ g purified enzyme).

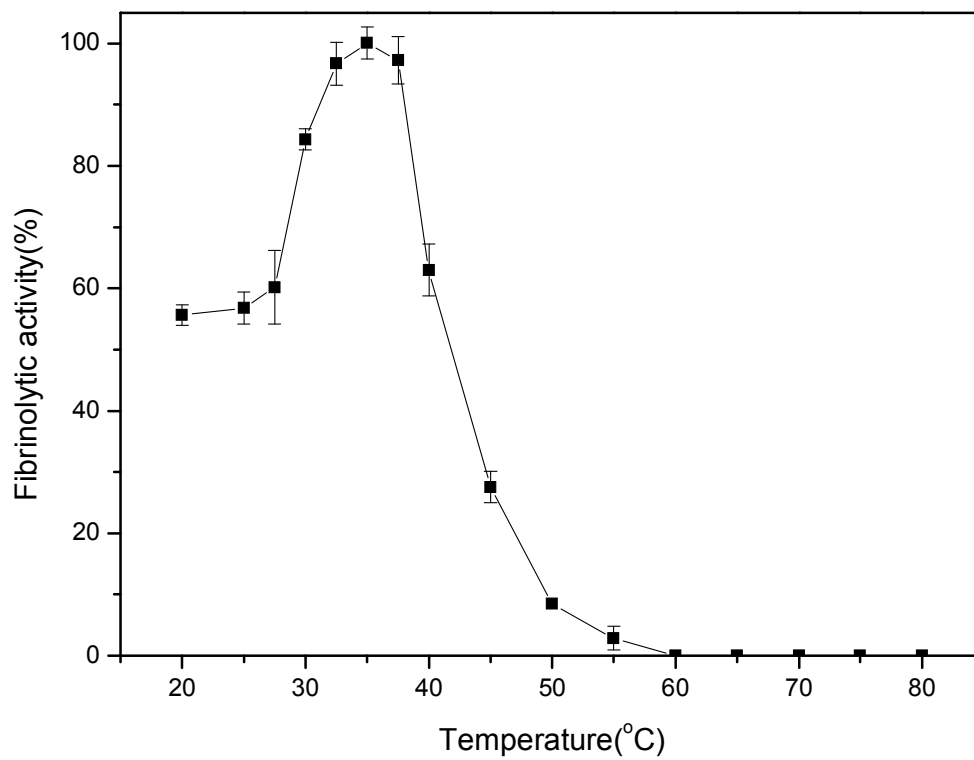


Fig. 7. Effect of temperature on the activity of the fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces japonica*. The purified enzyme was incubated at various temperatures between 20°C and 80°C for 12hr. Fibrinolytic activity was measured by fibrin plate assay. All experiments were performed in triplicate.

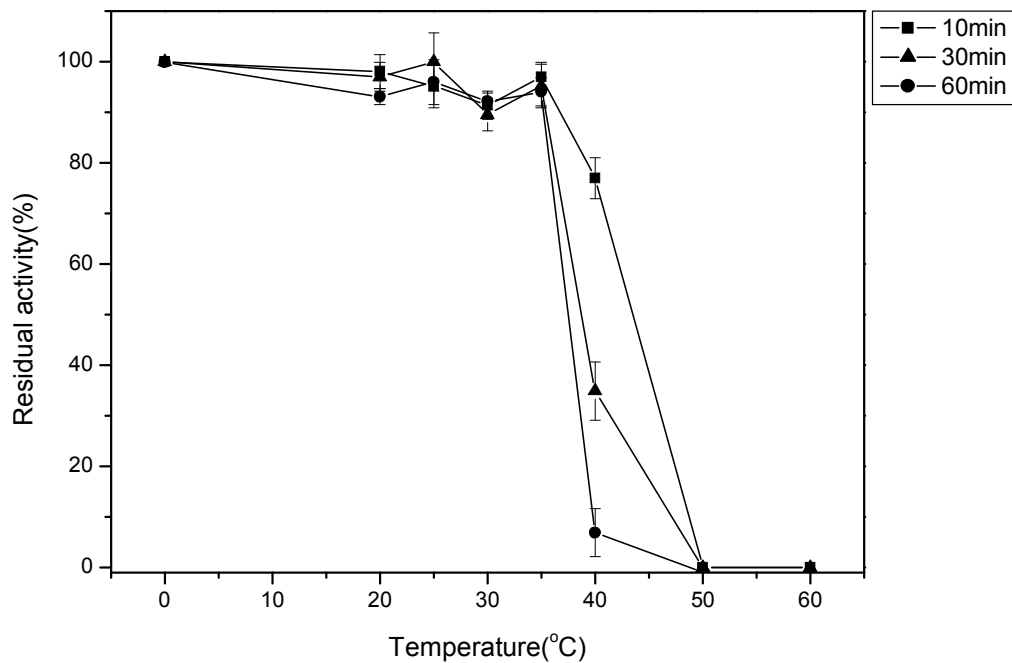


Fig. 8. Thermal stability of fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces japonica*. The purified enzyme was treated at various temperatures between 20°C and 60°C for 10, 30 min or 1hr, respectively. Fibrinolytic activity was measured by fibrin plate assay. All experiments were performed in triplicate.

구간이었으며 특히 35℃에서 가장 높은 혈전분해효소 활성을 가지는 것으로 확인되었다.[Fig.7] 또한 40℃ 이상의 온도에서는 그 활성이 급감하기 시작하여 60℃ 이상의 온도에서는 정제효소의 혈전분해활성이 모두 실패하는 것으로 관찰되었다.

정제효소의 열안정성 검토를 위해 20~80℃의 온도에서 5℃의 간격으로 10분, 30분, 60분 동안의 열처리 후 효소를 fibrin plate에 침적하고 35℃에서 12시간 경과 후 관찰하였다. 20~35℃ 구간에서는 시간의 경과에 따른 유의한 효소활성 변화가 관찰되지 않아 정제효소가 35℃ 이내에서는 열에 대하여 비교적 안정적인 것을 확인할 수 있었다. 40℃에서 정제효소는 10분 이내의 단시간 열처리에 효소의 활성 변화가 보이지 않았으나 30분과 60분 이상의 열처리에는 활성이 급감되는 것으로 보아 40℃ 이상의 온도에서는 시간의 경과에 따라 정제효소가 불안정한 것을 확인할 수 있었다. 또한 50℃ 이상의 온도에서는 정제효소의 효소활성이 10분 이내에 완전하게 실패하는 것이 확인되었다.[Fig.8]

4. 효소활성도와 안정성에 대한 pH의 영향

혈전분해효소 반응의 최적 pH를 검토하기 위하여 정제효소를 pH 2~10의 pH buffer에 첨가하여 1시간 반응시킨 후 fibrin plate assay를 수행하여 혈전분해활성을 확인하였다. 분리된 효소는 pH 4부터 pH 7까지 비교적 안정적인 활성을 나타내었으며 특히 pH 5에서 가장 최적의 활성을 보이는 것으로 확인되었다. [Fig.9]

정제된 효소의 pH 안정성을 검토하기 위해 정제효소를 pH2~10까지의 pH buffer에 첨가하고 4℃ 환경에서 24시간 방치한 뒤 반응액을 pH buffer를 첨가하여 pH 5로 적정하고 fibrin plate에 침적하여 그 활성을 관찰하였다. 분리된 효소는 pH 5부터 pH

7의 범위에서 안정적인 활성을 가지고 있음이 확인되었고 pH 6에서 가장 안정적으로

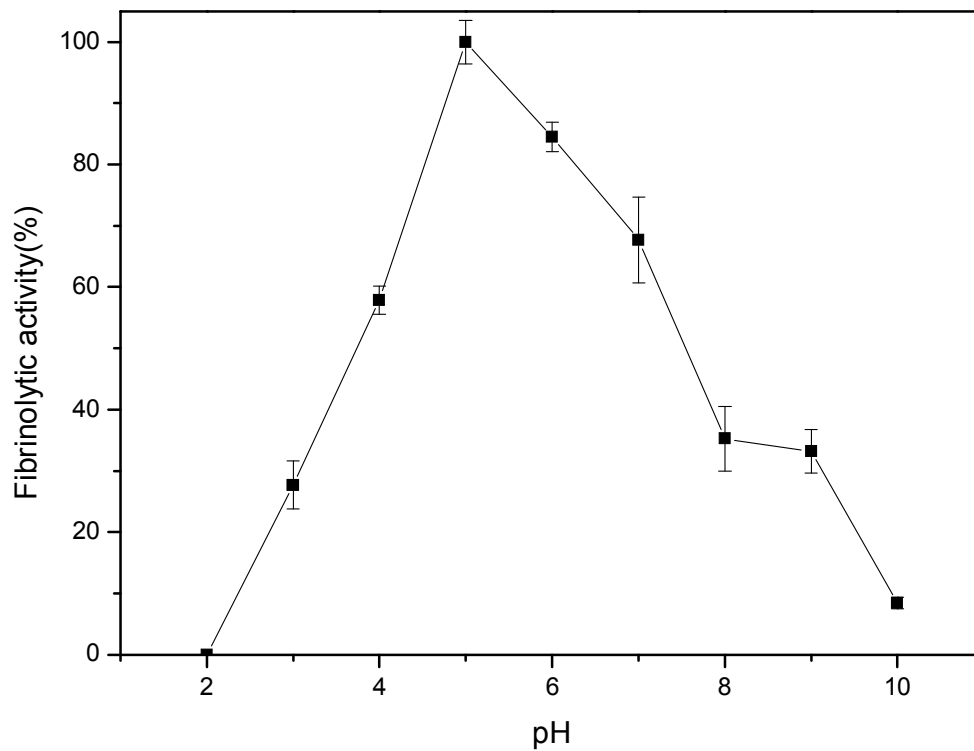


Fig. 9. Effect of pH on the activity of the fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces japonica*. The purified enzyme was incubated at various pH between 2 and 10 for 12hr. Fibrinolytic activity was measured by fibrin plate assay. All experiments were performed in triplicate.

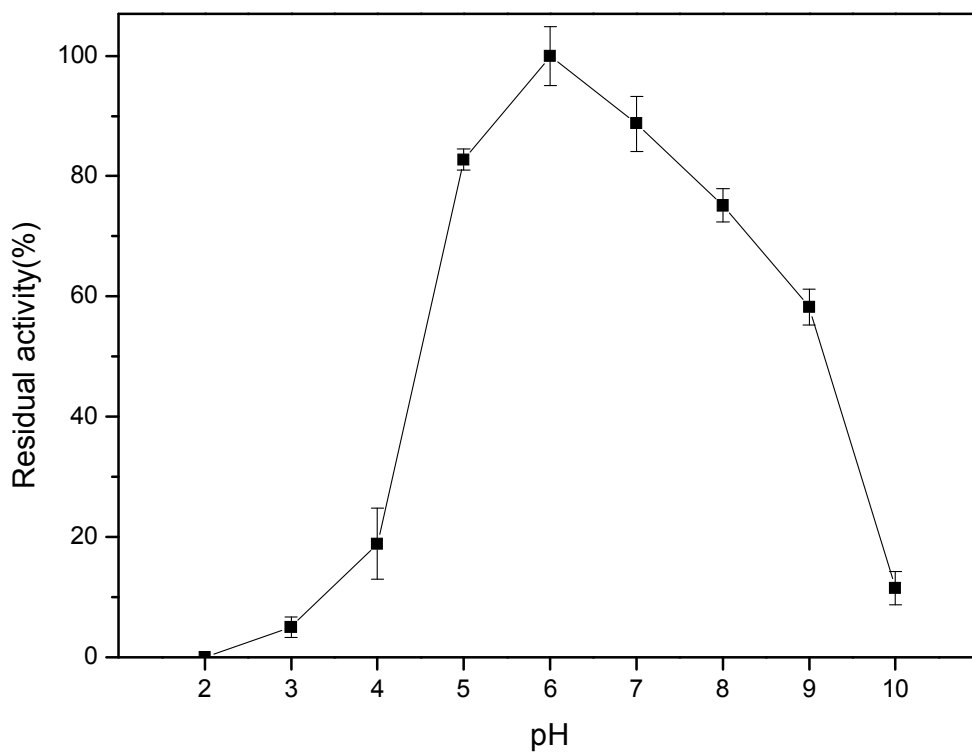


Fig. 10. The pH stability of fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces japonica*. The purified enzyme was treated at various pH between pH 2 and pH 10 for 24hr. After 24hr, it was incubated for 12hr at pH 5 on fibrin plate. All experiments were performed in triplicate.

활성을 유지하였다.[Fig.10]

따라서 *Paecilomyces japonica* 에서 분리된 혈전분해효소는 인체 내의 환경과 동일한 온도와 pH에서 안정적인 효소활성을 유지하여 인체 투여시 안정적인 효소반응을 나타낼 것으로 사료된다.

5. 정제효소에 대한 금속이온의 영향

금속이온에 대한 혈전분해효소의 활성은 각각의 금속이온을 효소반응액에 첨가하고 fibrin plate에서 반응을 수행하는 것으로 확인하였다. 각 금속이온들에 대한 효소활성은 Table 4 과 같다. $ZnCl_2$, $MnCl_2$, $MgCl_2$ 에서 활성이 저해되는 것이 확인되었으며 특히 $ZnCl_2$ 에서 활성저해가 크게 나타난 것을 알 수 있었다. $CoCl_2$ 처리구는 효소활성이 다소 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, $CaCl_2$ 처리구는 대조구와 비교하여 오히려 약간 그 활성이 증가하는 것으로 확인되었다.

6. 정제효소에 대한 효소활성저해제의 영향

단백질분해효소 저해제인 APMSF, PMSF, TLCK, TPCK, Aprotinin, EDTA, EGTA를 정제효소에 처리한 뒤 그 활성을 관찰하였다. PMSF가 처리된 실험군에서는 정제효소의 활성이 완전히 실패하는 것을 확인 할 수 있었으며 PMSF 처리군을 제외한 다른 실험군에서는 대조구와 비교하여 그 차이가 미비함을 확인 할 수 있었다. 따라서 *Paecilomyces japonica* 유래의 정제된 혈전분해효소는 serine 계열의 단백질분해효소임을 확인하였다.

Table 3. Effect of metal ions on the activity of the fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces japonica*

Metal ions	Relative activity (%)
none	100
MgCl ₂	51.3 ± 6.3
CoCl ₂	88.3 ± 1.4
CaCl ₂	105.3 ± 5.3
MnCl ₂	60.0 ± 6.3
ZnCl ₂	3.2 ± ± 3.0

The enzyme was pre-incubated with 1mM metal ion in citrate-NaOH(pH 5.0) buffer for 1h at 35°C. After incubation, the mixture was performed the fibrin plate assay. The relative activity was expressed as percentage.

Table 4. Effect of protease inhibitors on the activity of the fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces japonica*

Proteases inhibitors	Relative activity (%)
none	100
1mM EDTA	102.54 ± 7.33
1mM EGTA	102.54 ± 1.40
10mM TLCK	109.39 ± 10.36
10mM TPCK	88.8 ± 4.01
1mM PMSF	3.24 ± 1.40
0.5M APMSF	84.10 ± 4.61
5 TIU/ml Aprotinin	97.55 ± 3.79

The enzyme was pre-incubated with various protease inhibitors in citrate-NaOH (pH 5.0) buffer for 1h at 35°C. After incubation, the mixture was performed to the fibrin plate assay. The results were expressed as percentage relative activity to that of none.

7. 정제효소의 fibrin 및 fibrinogen 분해패턴 분석

Fibrin은 α , β , γ - γ 의 3개 단위체로 이루어진 섬유상 단백질이다.^[1,2] 따라서 *Paecilomyces japonica*에서 분리된 혈전분해효소가 이러한 fibrin에 어떻게 작용하는지를 확인하여 특성을 분석해야 할 필요성이 존재하게 된다. Fibrinogen 1% 용액을 만들고 10 μ l씩 나누어 thrombin 0.1unit를 첨가하는 것으로 fibrin을 조제하였으며 여기에 분리된 혈전분해효소로 반응시켜 그 분해패턴을 분석하였다.

*Paecilomyces japonica*에서 분리된 혈전분해효소는 반응시간동안 fibrin의 α 단위체를 매우 특이적으로 분해하기 시작하여 4시간 이후에는 α 단위체를 대부분 분해하는 것으로 확인되었으며 β 및 γ - γ 단위체에도 반응하여 분해하는 것으로 확인되었다. 따라서 *Paecilomyces japonica*에서 분리된 혈전분해효소가 fibrin을 α 단위체를 매우 특이적으로 가수분해한다는 것을 확인할 수가 있었고 β 단위체 및 γ - γ 단위체에도 특이성을 지니고 가수분해함을 확인 할 수가 있었다.

Fibrinogen은 thrombin에 의하여 fibrin으로 전환된다. 따라서 본 연구에서는 *Paecilomyces japonica*에서 분리된 혈전분해효소가 fibrin을 직접 가수분해시키는 작용 이외에도 어떠한 효과를 가지고 있는지 분석하기 위하여 fibrinogen에 대한 분해특성을 확인하여 보았다. Fibrinogen은 A α , B β , γ 단위체로 구성되어 있는 fibrin의 전구체 단백질^[1,2]이며 이들 단위체에 대한 정제효소의 특성을 확인하기 위해 fibrin의 분해특성과 동일하게 일정한 시간적 간격을 두고 효소와 반응시키는 실험을 진행하였다.

Fibrinogen에 대한 *Paecilomyces japonica*에서 분리된 혈전분해효소의 분해패턴을 관찰한 결과 정제된 혈전분해효소는 반응 5분부터 fibrinogen의 A α 단위체를

분해하기 시작하여 반응 10분 이후에는 A α 단위체를 완전히 분해하는 것을 확인 할

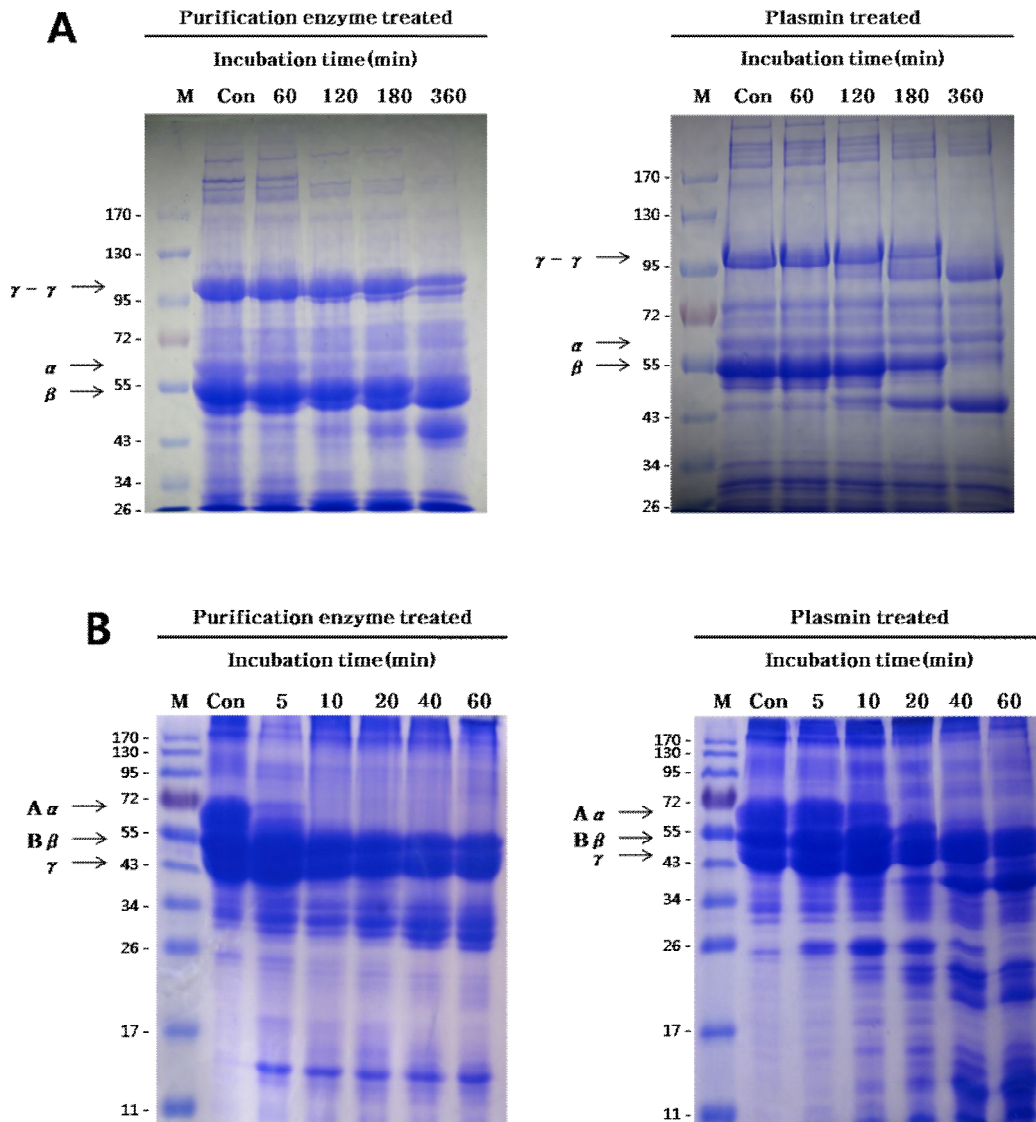


Fig. 11. Fibrinolysis (A) and fibrinogenolysis (B) patterns exhibited by the fibrinolytic enzyme purified from *Paecilomyces japonica*. Fibrin and fibrinogen were incubated with purified fibrinolytic enzyme for various times as indicated. Plasmin treatment was used as a positive control.

수 있었다. 반면에 B β 단위체와는 반응활성이 크지 않음을 확인하였고 γ 단위체에는 특이성이 없는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 *Paecilomyces japonica*에서 분리된 혈전분해효소가 fibrinogen의 A α 단위체를 특이적으로 매우 신속하게 가수분해한다는 것을 확인 할 수 있었다.

8. 기질분해 특성분석

단백질분해 특성을 확인하기 위하여 Urokinase-like(S-2444), Streptokinase-like(S-2251), tPA-like(S-2288), Factor Xa-like(S-2222, S-2765), Thrombin-like(S-2238)등의 Chromogenic substrate를 구입하여 *Paecilomyces japonica*에서 분리된 혈전분해효소와 반응시켜 특성을 분석하였다. Chromogenic substrate 중 S-2222와 S-2765에서 가장 높은 반응을 나타내었다.[Fig.12]

따라서 효소활성 저해제인 Aprotinin에 의해 저해되지 않는 serine 계열의 protease라는 점과 Factor Xa와 특이적인 chromogenic substrate에서 amidolytic activity가 증가한다는 점을 종합하면 분리·정제된 효소는 Factor Xa 계열의 serine protease로 작용한다는 것을 확인 할 수 있었다.

9. 아미노산 서열 분석

정제된 *Paecilomyces japonica*의 혈전분해효소는 SDS-PAGE 전기영동 후 PVDF membrane에 120mA의 전류로 35분간 transfer를 수행하고 염색 후 14kDa 크기의 band를 잘라내고 건조하여 한국기초과학지원연구원에 N-terminal sequence

analysis를 의뢰하였다. 정제 효소의 N-terminal amino acid 서열을 분석한 결과

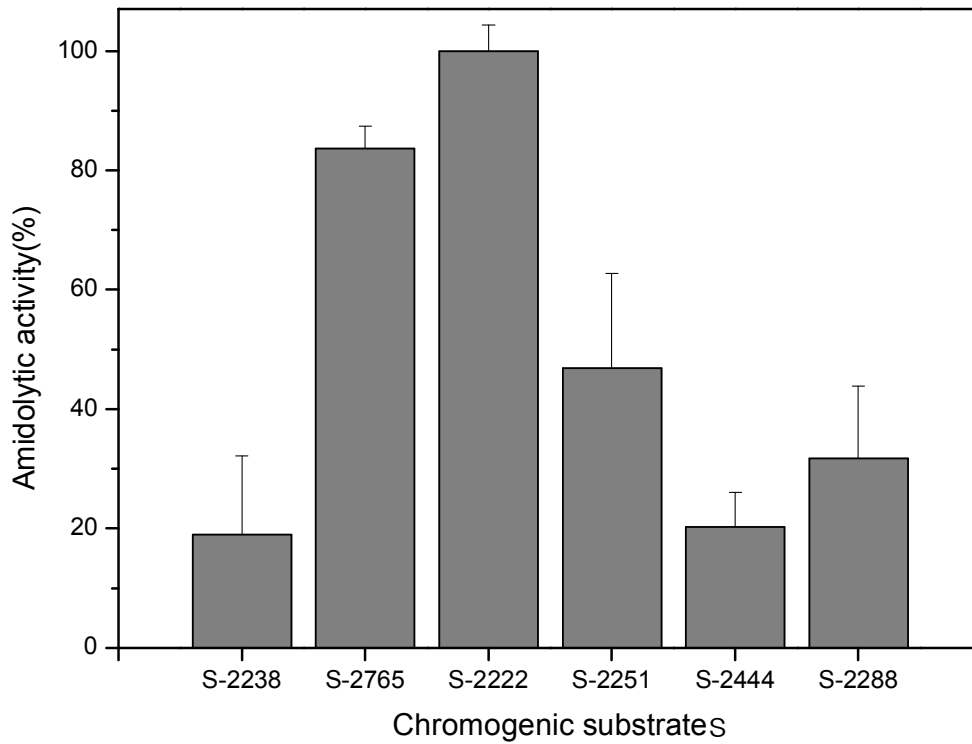


Fig. 12. Amidolytic activity on chromogenic substrates. Amidolytic activities were measured spectrophotometrically using the chromogenic protease substrates, such as S-2238, S-2765, S-2222, S-2251, S-2444 and S-2288. Results were expressed as percentage.

Purified enzyme	A	Q	N	I	G	A	V	V	N	L	S	P	P	K	Q	Identity (%)
<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	H	C	P	N	G	V	V	V	N	L	S	L	G	G	G	40%
<i>Aspergillus fumigatus</i> A1163	G	M	G	G	R	A	V	V	N	L	S	L	G	G	P	40%
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357	A	E	N	I	G	A	M	V	N	S	R	P	L	F	D	53%
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	A	E	N	I	G	A	M	V	N	S	R	P	L	F	D	53%
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	R	E	L	L	R	A	L	V	N	L	P	P	P	K	S	46%
<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	V	P	R	G	Y	A	V	V	N	I	D	P	P	G	I	40%

Fig. 13. Comparison of the N-terminal amino acid sequence of the purified fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces japonica* with fungi serine proteases and hypothetical proteins.

Fig. 13과 같은 15개의 아미노산 서열(AQNIGAVVNLSPKQ)을 얻을 수 있었다. 정제 효소의 amino acid 서열은 나방이동충하초속에 속하는 녹장균(*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*)에서 정제된 subtilisin-like protease(Gene bank, CAB63912)와 40%의 상동성을 지니는 것을 확인하였고, fungi 종류인 *Aspergillus fumigatus*의 alkaline serine protease(Gene bank, EDP48333)와도 40%의 상동성을 가지고 있었다. 또한 *Aspergillus flavus* NRRL3357(Gene bank, XP_002373888), *Aspergillus oryzae* RIB40(Gene bank, XP_001820515), *Aspergillus nidulans* FGSC A4(Gene bank, XP_662224), *Aspergillus terreus* NIH2624(Gene bank, XP_001213130)의 hypothetical protein들과도 각각 53%, 53%, 46%, 40%의 상동성을 보임이 확인되었다.

IV. 결론

전 세계 사망원인 1, 2위를 차지하고 있는 순환계질환은 최근 식생활과 스트레스, 인구고령화 등의 원인으로 더욱 더 증가하고 있는 추세이다. 현재 임상에서 사용되고 있는 plasminogen activator 계열의 혈전분해제들은 혈전에 대한 낮은 특이성을 가지고 있어 반감기가 짧고, 국소적인 출혈 또는 알러지 등의 부작용을 내포하고 있다. [3] 따라서 혈전에 직접적으로 작용하고 부작용이 최소화된 새로운 혈전분해제를 개발할 필요성이 대두되고 있다. 최근 이러한 추세에 맞추어 일상적으로 섭취하는 식품으로부터 혈전분해제를 발굴하려는 시도가 이루어지고 있으며 청국장, 젓갈과 같은 발효식품에서 용리된 혈전분해효소들은 그 좋은 사례라고 할 수 있다. [4,5,6,7] 따라서 본 연구에서는 식품에서 용리되는 혈전용해제의 장점을 이해하고 과거부터 약용, 식용으로 널리 사용되어왔던 *Paecilomyces japonica*로부터 혈전분해효소를 분리 정제하여 그 특성에 대하여 분석하였다.

*Paecilomyces japonica*로부터 분리·정제된 혈전분해효소는 약 14kD의 저분자량으로 SDS-PAGE를 통해 확인되었으며, PMSF에 의해 강력하게 활성이 저해되는 serine protease 계열 및 Factor Xa 계열의 혈전분해효소임을 확인 할 수 있었다. 또한 $ZnCl_2$, $MnCl_2$, $MgCl_2$ 금속이온들에 활성이 억제되는 것으로 확인되었다. 분리·정제된 혈전분해효소는 pH 5.0~7.0에서 안정적으로 효소활성을 유지하였고 pH 5.0에서 가장 높은 효소활성을 나타내었다. 최적 반응온도는 35℃로 확인되었으며 37.5℃ 이내의 온도범위에서는 효소활성을 유지하여 체내 혈전형성 억제 및 분해제제로 사용시 pH 및 온도 측면에서 안정적인 효소활성을 나타낼 것으로 사료된다. 분리된 효소의 fibrinolysis 및 fibrinogenolysis를 분석한 결과 fibrin의 α 단위체, β 단위체, γ - γ 단위체, 그리고 fibrinogen의 A α 단위체를 매우 특이적으로

신속하게 분해하는 fibrinolytic, fibrinogenolytic 특성을 지니고 있음이 확인되었다. 이는 분리된 효소가 fibrin과 fibrin의 형성에 큰 역할을 하는 fibrinogen에 대한 분해특성을 동시에 지녀 혈전용해효과뿐만 아니라 혈전예방효과를 내포하고 있음으로 결론지을 수 있었다.

위와 같은 결과를 종합하여 볼 때 *Paecilomyces japonica*에서 분리된 혈전용해효소는 관련질환에 대한 예방적인 효과 및 혈전용해효과를 가진 약품개발소재로서의 가능성이 크다고 할 수 있겠으며, 향후 동물투여 실험, 인체 혈장단백질에 대한 안정성 실험, 관련 단백질 대량생산을 위한 유전자 클로닝 등과 같은 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

1. **Lucy A. Norris.** Blood coagulation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, Volume 17, Issue 3, June 2003, Pages 369–383
2. **Patricia A. Gentry** Comparative aspects of blood coagulation. *The Veterinary Journal*, Volume 168, Issue 3, November 2004, Pages 238–251
3. **Sumi HM, Seiki N, MoriMoto H, Tsushima M, Maruyama and Mihara H** Plasma fibrinolysis after intradudenal administration of urokinase in rat. *Enzyme*, Volume 33, Issue 3, 1985, Pages 21–127
4. **Kiminori Matsubara, Hiroyuki Sumi, Kanji Hori, Keisuke Miyazawa** Purification and Characterization of Two Fibrinolytic Enzymes from a Marine Green Alga, *Codium intricatum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 119, Issue 1, January 1998, Pages 177–181
5. **Kiminori Matsubara, Kanji Hori, Yasushi Matsuura, Keisuke Miyazawa** A fibrinolytic enzyme from a marine green alga, *Codium latum*. *Phytochemistry*, Volume 52, Issue 6, November 1999, Pages 993–999
6. **Hyun-Kuk Kim, Gu-Taek Kim, Dae-Kyung Kim, Won-A Choi, Sung-Hoon Park, Yong-Kee Jeong, In-Soo Kong** Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus sp.* KA38

- originated from fermented fish. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Volume 84, Issue 4, 1997, Pages 307–312
7. **J.A. Ko, S.Y. Koo, H.J. Park** Effects of alginate microencapsulation on the fibrinolytic activity of fermented soybean paste (Cheonggukjang) extract. *Food Chemistry*, Volume 111, Issue 4, 15 December 2008, Pages 921–924
 8. **Jae-Sung Kim, Ji-Eun Kim, Bong-Suk Choi, Se-Eun Park, Kumar Sapkota, Seung Kim, Hyun-Hwa Lee, Chun-Sung Kim, Yeal Park, Myung-Kon Kim, Yoon-Sik Kim, Sung-Jun Kim** Purification and characterization of fibrinolytic metalloprotease from *Perenniporia fraxinea mycelia*. *Mycological Research*, Volume 112, Issue 8, August 2008, Pages 990–998
 9. **David L. Hawksworth**. Mushrooms: the extent of the unexplored potential. *International Journal for Medical Mushrooms*, Volume 3, Issue 4, 2001, 333–7
 10. **Mothana R A; Jansen R; Jülich W D; Lindequist U** Ganomycin A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. *Journal of natural products*, Volume 63, Issue 3, 2000, Pages 416–8
 11. **Ichimura T, Watanabe O, Maruyama S**. Inhibition of HIV–1 protease by water–soluble lignin–like substance from an edible mushroom, *Fuscoporia oblique*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, Volume 62, Issue 3, 1998, Pages 575–7

12. **C. Israilides, D. Kletsas, D. Arapoglou, A. Philippoussis, H. Pratsinis, A. Ebringerová, V. Hříbalová, S.E. Harding** In vitro cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. *Phytomedicine*, Volume 15, Issues 6–7, 20 June 2008, Pages 512–519
13. **Cíntia Sorane Good Kitzberger, Artur Smânia Jr., Rozangela Curi Pedrosa, Sandra Regina Salvador Ferreira** Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*, Volume 80, Issue 2, May 2007, Pages 631–638
14. **ZhanHai Yu, Yin LiHua, Yang Qian, Liu Yan** Effect of *Lentinus edodes* polysaccharide on oxidative stress, immunity activity and oral ulceration of rats stimulated by phenol. *Carbohydrate Polymers*, Volume 75, Issue 1, 5 January 2009, Pages 115–118
15. **Haibin Tong, Fengguo Xia, Kai Feng, Guangren Sun, Xiaoxv Gao, Liwei Sun, Rui Jiang, Dan Tian, Xin Sun** Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology*, Volume 100, Issue 4, February 2009, Pages 1682–1686
16. **Yongxu Sun, Jicheng Liu** Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology*, Volume 100, Issue 2, January 2009, Pages 983–986

17. **Iris Lavi, Dana Friesem, Shimona Geresh, Yitzhak Hadar, Betty Schwartz**
An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. *Cancer Letters*, Volume 244, Issue 1, 28 November 2006, Pages 61–70
18. **J. Williamson** Cordycepin, an antitumour antibiotic with trypanocidal properties *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 60, Issue 1, 1966, Page 8
19. **Cunningham KG, Hutchinson SA, Manson W, Spring FS** Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. *Nature*, Volume 166, Issue 4231, 1950, Pages. 949
20. **Sung. JM, Kim, CH, Yang KJ, Lee HK, Kim YS** Studies on distribution and utilization of *Cordyceps militaris* and *C. nutans*. *Korean Journal of Mycology*, Volume 21, Issue 2, June 1993, Pages. 94–105
21. **Yue-Qin Chen, Ning Wang, Liang-Hu Qu, Tai-Hui Li, Wei-Ming Zhang** Determination of the anamorph of *Cordyceps sinensis* inferred from the analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacers and 5.8S rDNA. *Biochemical Systematics and Ecology*, Volume 29, Issue 6, June 2001, Pages 597–607
22. **Sung, J. M., H. K. Lee and K. J. Yang.** Classification of *Cordyceps* spp. by morphological characteristics and protein banding pattern. *Korean Journal of Mycology*, Volume 23, Issue 1, March 1995, Pages 92–104
23. **Marion M. Bradford** A rapid and sensitive method for the quantitation of

- microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, Volume 72, Issues 1–2, 7 May 1976, Pages 248–254
24. **Tage Astrup, Sten Müllertz** The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 40, Issue 2, October 1952, Pages 346–351
25. **U. K. Laemmli** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, Volume 227, Issue 5259, August 1970, Pages 680–685
26. **Shin, H. H. and H. S. Choi.** Purification and partial characterization of a metalloprotease in *Flammulina velutipes*. *The Journal of Microbiology*. Volume 36, Issue 1, August 1998, Pages 20–25
27. **Jeong, Y. K., J. U. Park, H. Baek, S. H. Park, I. S. Kong, D. W. Kim and W. H. Joo** 2001. Purification and biochemical characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* BK–17. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17, 89–92. Volume 17, Issue 4, February 2001 , Pages 89–92