

청국장으로부터 혈전용해균주의 분리 및 동정

김용택* · 김원극 · 오훈일¹

롯데그룹중앙연구소 생물과학팀, ¹세종대학교 식품공학과

Screening and Identification of the Fibrinolytic Bacterial Strain from Chungkook-jang

Yong-Tack Kim*, Won-Keuk Kim and Hoon-Il Oh¹

Department of Biotechnology, Lotte R and D

¹Department of Food Science and Technology, Sejong University

Abstract — Bacterial strains showing the fibrinolytic activity were screened from Chungkook-jang and Natto (Japanese traditional soy food). The strains isolated from Natto revealed a high level of fibrinolytic activity, whereas nearly half of the isolates from Chungkook-jang did not show the relevant activity. However, one strain isolated from Chungkook-jang showed the highest fibrinolytic activity (1.84 plasmin unit), and subsequently identified as *Bacillus* species. The fibrinolytic strain was designated as *Bacillus* sp. CK 11-4.

혈전(fibrin)은 상처복구시 생체내의 복잡한 blood cascade mechanism에 의해 활성화 된 thrombin에 의하여 fibrinogen이 fibrin으로 전환되어 서로 중합체를 형성함으로써 생성된다(1).

이러한 혈전이 뇌 혈관에 생성되면 뇌혈전증이 일어나 반신불수가 되고, 뇌혈관이 파열되면 뇌출혈, 뇌의 미세한 혈관이 파열되어 뇌와 머리뼈 사이의 공간으로 출혈되면 거미줄막 출혈 등이 일어나 생명에 치명적인 상태가 되며, 심장혈관이 막히면 심부전증이나 심장마비가 되어 사망의 원인이 된다. 최근 우리나라에서도 국민소득의 향상과 식생활의 서구화에 따라 심장질환으로 인한 사망율이 1위를 차지하고 있다.

현재, 혈전증(thrombosis)의 치료에 널리 사용되고 있는 urokinase, streptokinase, tPA(tissue type plasminogen activator) 등은 가격이 매우 높은 단점을 지니고 있으며, urokinase를 제외하고는 경구투여가 불가능하다. 최근 혈관주사되는 플라스미노겐 활성화 인자 이외에 병행요법으로 직접 경구 투여함으로써 혈액내의 혈전용해능을 증가시키는 제제에 관심을 갖기 시작하고 있다. 현재 경구투여하는 혈전용해제는 지렁이(*Lumbricus lubellus*)로부터 분리된 6가지의

혈전용해효소가 보고되고 있으며(2, 3), 우리나라에서도 제약화되어 있다.

Sumi 등의 보고에 의하면 urokinase를 장내에 투입시켜 흡수시키면 혈액내의 혈전용해능이 현저히 증가한다고 하여 관심을 끌었다(4-8). 즉, 장에서 흡수된 urokinase가 간에 도달하여 혈전을 용해시키는 효소의 합성을 증진시킴으로써 혈전용해능이 증가하는 것으로 추측된다고 보고하므로써 혈전용해효소의 장내투여 응용성이 가능하다는 점을 시사하고 있다.

또한 일본의 전통 대두 발효식품인 natto로부터 분리된 nattokinase라는 효소를 경구투여시 생체내의 혈전용해능을 높일 수 있었다는 보고가 있으며(9, 10) 현재 일본에서는 natto가 혈전용해능을 지닌 제품으로 알려져 건강식품으로서 판매량이 급증하고 있다. Nattokinase는 *Bacillus natto*에서 생산되는 subtilisin NAT와 아미노산 배열이 동일한 것으로 밝혀져 있다(10-12).

우리나라에도 일본의 natto과 마찬가지로 콩을 원료로 하여 발효시켜 섭취해 온 전통식품인 청국장이 있으므로, 우리나라의 청국장으로부터도 natto와는 다른 혈전용해능이 우수한 균주가 존재할 수도 있을 것이라는 점에 착안하여 우리나라의 전통발효식품인 청국장으로부터 혈전용해능이 우수한 균주를 선별하고, 그 활성을 비교 검토하였다.

Key words: Fibrinolytic strain, Chungkook-jang, Natto

*Corresponding author

재료 및 방법

시료

균주배양에 사용한 nutrient medium은 Difco 사의 제품을 사용하였으며, 청국장은 한국에서 시판되고 있는 각종 청국장 제품과 시장의 야판에서 구입하였고, natto는 일본에서 시판되고 있는 각종 제품을 구입하여 사용하였다. Fibrin, fibrinogen, thrombin, agarose 및 plasmin 등은 Sigma 사의 제품을 구입하여 사용하였으며 그 외의 시약은 특급 시약을 사용하였다.

균주의 분리

한국에서 시판되고 있는 각종 청국장과 natto로부터 다음과 같은 방법으로 균주를 분리하였다. 각 시료로부터 한 백금이씩 취하여 nutrient agar medium(3 g/l bacto beef extract, 5 g/l bacto peptone, 15 g/l bacto agar)에 도말하고, 37°C 에서 24시간 배양하여 단일 균락을 분리하였다. 청국장으로부터 분리된 균주들은 CK 1-1~CK 23-4로 명명하였고, 일본의 natto 제품으로부터 분리한 균주는 NA-1~NA-12로 명명하였다. 각 균락을 0.1% fibrin을 함유한 nutrient agar medium에 접종하고 37°C 에서 24시간 배양 후 0.2 N trichloroacetic acid를 부가하여 투명한(clear zone)이 넓은 균주를 분리하였다.

혈전용해능 확인법

1 N NaOH 용액 100 ml에 fibrin 0.6 g을 용해시키고 6 N HCl로 pH를 7.8로 조절한 후 용액속의 염을 투석막을 사용하여 충분히 투석하였다. 이 용액을 200 mM 인산완충용액(pH 7.8) 200 ml과 혼합한 후 nutrient agar medium을 용해시켜 플레이트(plate)를 제조하고 이 플레이트 위에 분리된 균주를 24시간 배양하여 균락(colony) 주위에 투명한이 생기는 균주만을 fibrin 용해능이 있는 균주로 선별하였다. 선별된 균주들을 nutrient medium에 37°C 에서 24시간 동안 생육시키고 원심분리하여 균체를 제거하고 그 상등액을 혈전용해효소 활성측정법에 따라 그 활성을 측정하였다.

혈전용해효소 활성 측정법(13)

10 mM 인산완충용액(pH 7.8, 0.15 M NaCl 포함)에 fibrinogen을 0.3%가 되도록 용해시키고, 완전히 용해된 fibrinogen 용액 5 ml에 위와 동일한 완충용액에 1% agarose 용액 5 ml을 첨가하여 충분히 혼합하였다. 여기에 다시 thrombin(100 NIH/ml) 0.1 ml을 첨가하

여 혼합한 후 즉시 샤아레에 붓고 실온에서 5~10분간 방치하여 고화시킨 다음 한개의 샤아레당 7개의 구멍을 만들어 fibrin 플레이트를 제조하였다. 각 시료 5 μ l를 취하여 fibrin 플레이트의 시료구멍에 주입하고 37°C 에서 18시간 반응시킨 다음, fibrin 플레이트의 용해면적을 측정하였다. 대조구로서는 정제된 혈전용해효소인 plasmin(1.0 U/ml)을 사용하였으며, 다음과 같은 방법으로 혈전용해활성을 산출하였다.

$$\text{혈전용해활성(\%)} = (\text{시료의 용해영역} / \text{plasmin의 용해영역}) \times 100$$

균주의 동정

분리 균주에 대한 현미경관찰을 통한 형태학적 특징 및 각종 배지에서의 배양상의 특징을 검토하였으며, 균주의 생리적 및 생화학적 특성을 규명하고 이들 결과를 토대로 Bergey's manual of systematic bacteriology(14)에 준하여 분리균주를 동정하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 혈전용해능 측정

한국에서 시판되고 있는 각종 청국장으로부터 시료 한 백금이씩 취하여 평판희석 배양법에 의하여 nutrient agar medium에 도말하고, 37°C 에서 24시간 배양한 후 단일 균락을 분리한 결과 청국장에서는 47종의 균주를 분리하여 CK 1-1~CK 23-4로 명명하였고, 일본의 natto에서는 13종의 균주를 분리하여 NA-1~NA-12로 명명하였다. 이 60주의 균주를 nutrient medium에 접종하여 배양한 후 원심분리하여 상등액의 혈전용해능을 측정하여 본 결과 Table 1에 나타낸 바와 같이 natto 분리균의 한 균주(NA 8-2)는 혈전용해능이 전혀 없었고 다른 한 균주(NA-11)는 plasmin 1 unit보다 다소 낮은 혈전용해능을 보였으며 4개의 균주는 plasmin 1 unit와 같은 혈전용해능을 나타냈다. 나머지 7개 균주는 122~158%의 혈전용해능을 나타내어 전반적으로 청국장에서 분리한 균주보다 혈전용해능을 나타내는 균주가 많았다. 한편, 청국장에서 분리한 균주의 경우 대부분의 균주(41종)가 혈전용해능이 전혀 없거나 또는 100% 이하의 혈전용해능을 나타냈으며 나머지 5균주가 100~184%의 혈전용해능을 보였는데 특히 CK 11-4 균주가 plasmin (1 Unit)보다 1.84배의 혈전용해능(184%)을 보여 가장 우수한 균주로 선발되었다(Fig. 1).

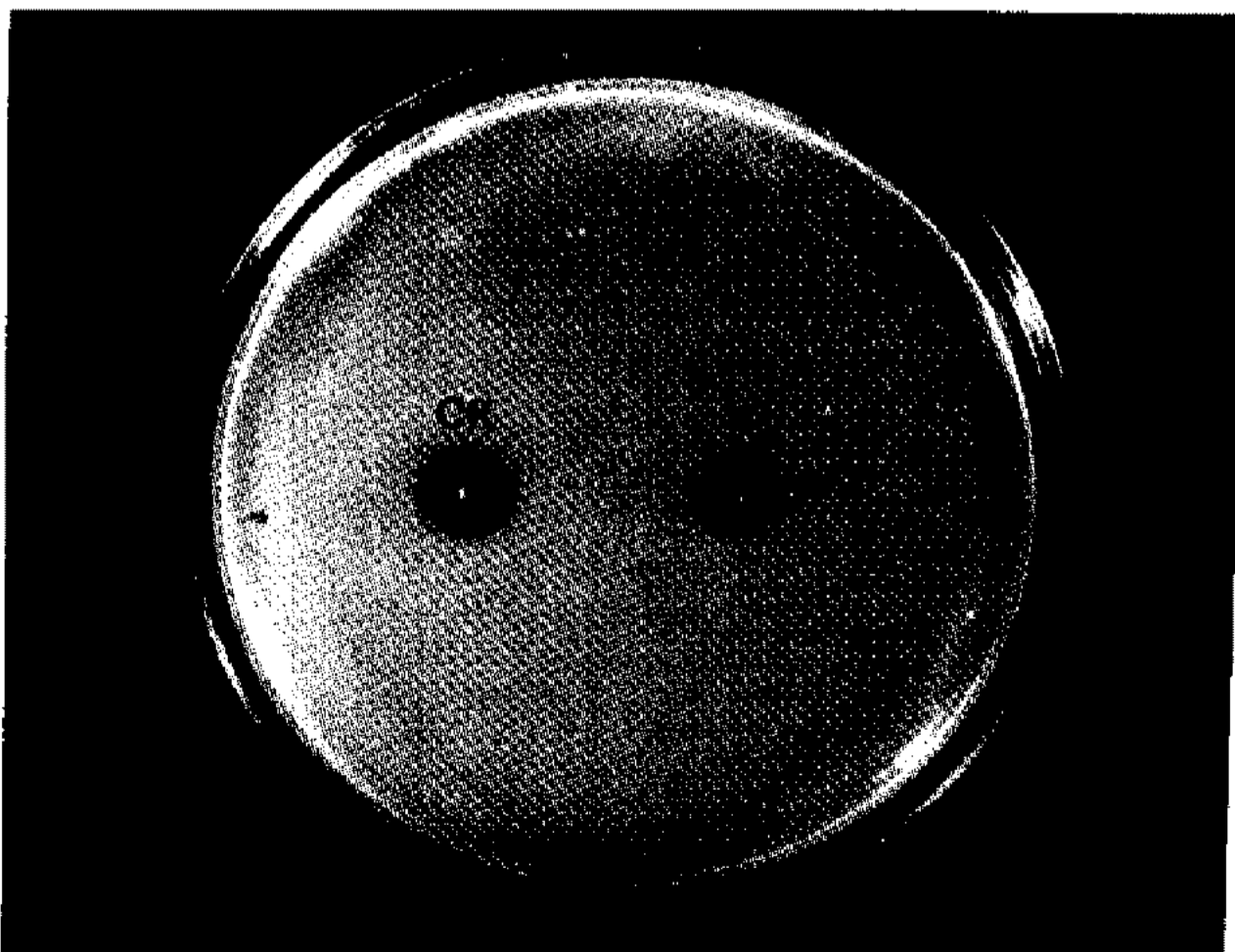
균주의 동정

Table 1. Fibrinolytic activity of the microorganisms isolated from Natto and Chungkook-jang

Strain	Fibrinolytic activity (%)	Strain	Fibrinolytic activity (%)
NA-1	100	NA-2	138
NA-3	132	NA-4	100
NA-5	138	NA-6	100
NA-7	100	NA-8-1	154
NA-8-2	0	NA-9	93
NA-10	137	NA-11	122
NA-12	135		
CK-1-1	8	CK-1-2	0
CK-1-3	73	CK-1-4	0
CK-1-5	0	CK-1-6	0
CK-1-7	29	CK-2-1	8
CK-2-2	0	CK-2-3	0
CK-3-1	30	CK-3-2	68
CK-3-3	107	CK-3-4	39
CK-4-1	0	CK-4-2	93
CK-4-3	0	CK-4-4	0
CK-5-1	48	CK-5-2	8
CK-5-3	62	CK-5-4	0
CK-6-1	131	CK-6-2	100
CK-6-3	0	CK-6-4	0
CK-7-1	51	CK-7-2	64
CK-7-3	0	CK-7-4	0
CK-8-1	51	CK-8-2	56
CK-8-3	68	CK-8-4	32
CK-8-5	62	CK-9-1	115
CK-9-2	0	CK-9-3	0
CK-10-1	13	CK-10-2	0
CK-11-1	32	CK-11-2	13
CK-11-3	62	CK-11-4	184
CK-12-1	0	CK-12-2	0
CK-12-3	13		
Plasmin(1 unit)	100	<i>Bacillus B</i>	139

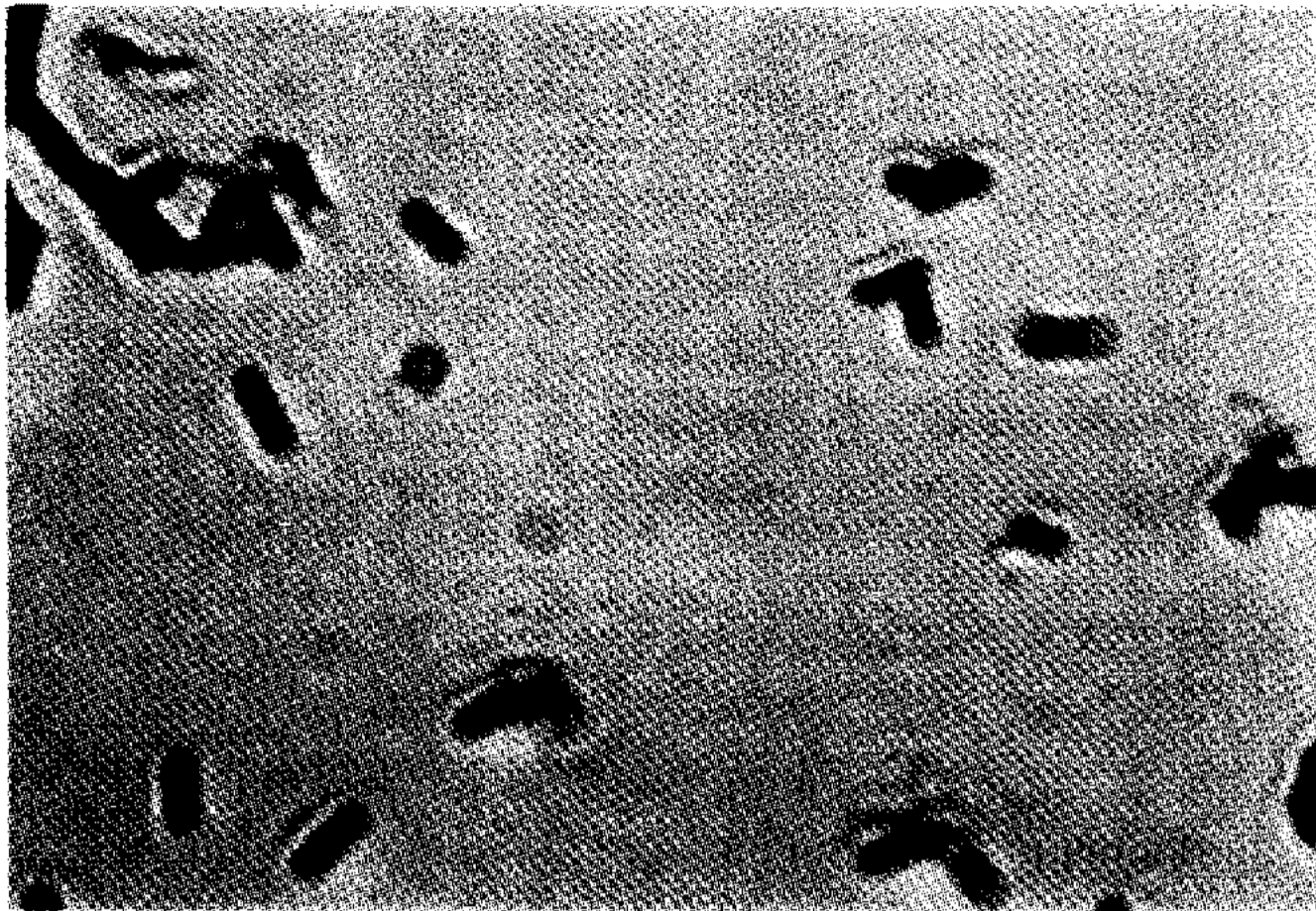
NA: strains isolated from Natto

CK: strains isolated from Chungkook-jang

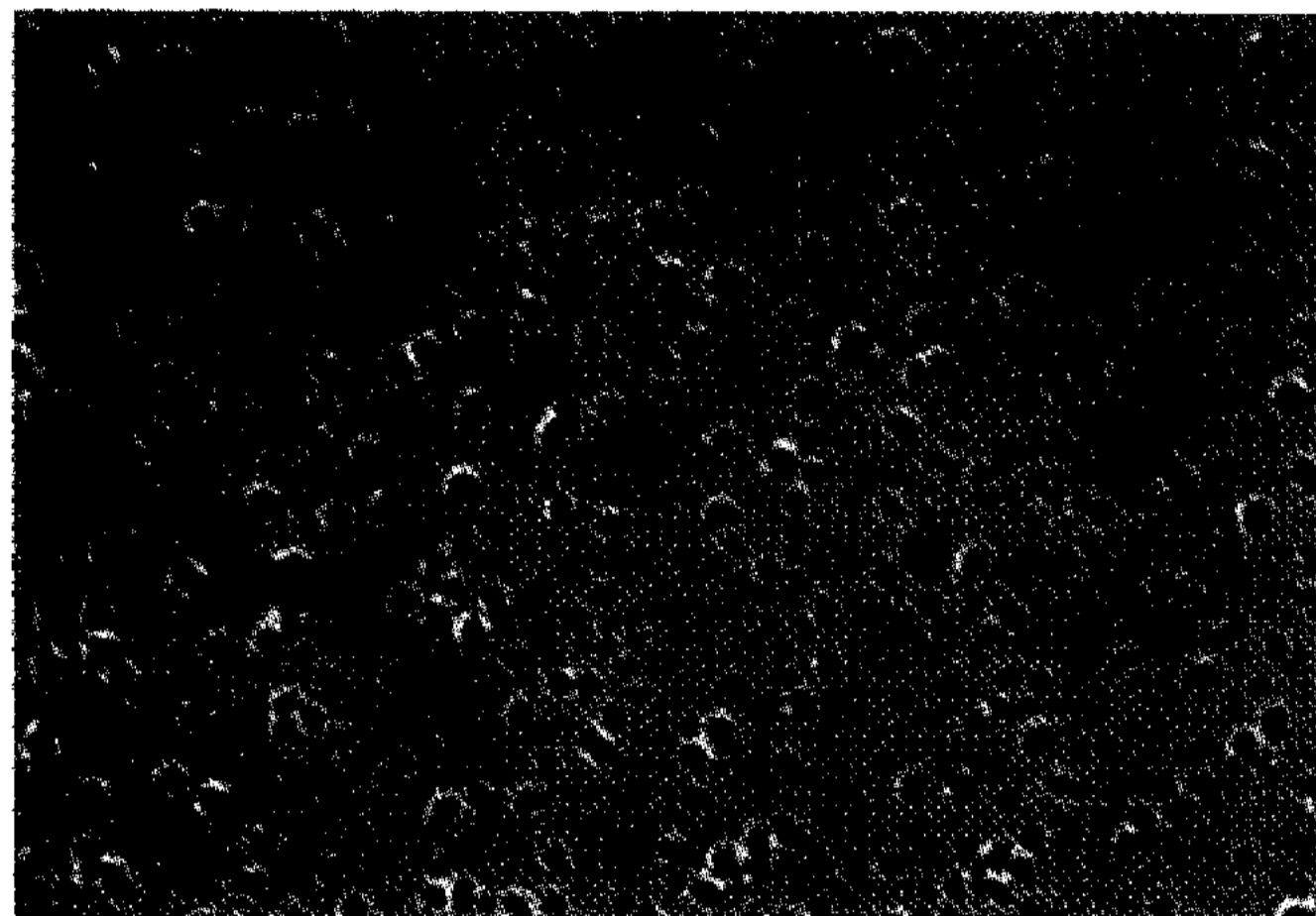
**Fig. 1. Fibrinolytic activity of the CK 11-4 strain and plasmin (1.0 unit).****Table 2. Morphological, cultural and biochemical characteristics of the strain CK 11-4**

1. Morphological characteristics	
- Form	: rods, 1.0~1.1 μ × 5.6~6.5 μ
- Mobility	: positive
- Gram stain	: positive
- Spores	: positive
2. Cultural characteristics	
- Nutrient agar	: positive reproduction, slim material secretion.
- Growth pH	: 5~8
- Growth temperature	: 25~45°C
3. Biochemical characteristics	
- Starch hydrolysis	: slowly hydrolyzed
- Casein	: quickly hydrolyzed
- Gelatin	: quickly hydrolyzed
- Carboxy methyl cellulose	: not hydrolyzed
- pectin	: slowly hydrolyzed
- Pullulan	: not hydrolyzed
- Catalase	: positive
- β -galactosidase	: positive
- Arginine dihydrolase	: positive
- Lysine decarboxylase	: positive
- Ornithine decarboxylase	: positive
- H ₂ S production	: negative
- N ₂ gas production	: negative
- Nitrate reduction	: negative
- Urease	: positive
- Acetoin	: positive
- Oxidase	: positive
- Tryptophane deamidase	: negative
4. Utilization of sugars	
- Glucose	: positive
- Mannitol	: negative
- Inositol	: negative
- Sorbitol	: positive
- Rhamnose	: negative
- Sucrose	: positive
- Melibiose	: negative
- Amygdalin	: positive
- Arabinose	: positive

전라남도 목포의 청국장에서 분리한 CK 11-4 균이 가장 높은 혈전용해활성을 나타내어 균주의 형태학적, 생화학적 특성을 조사한 결과(Table 2) 분리균주 CK 11-4는 간균이며 운동성이 있고, 호기성(catalase 함유)이며 그람 양성의 세균이었고 포자를 형성하는



(a)



(b)

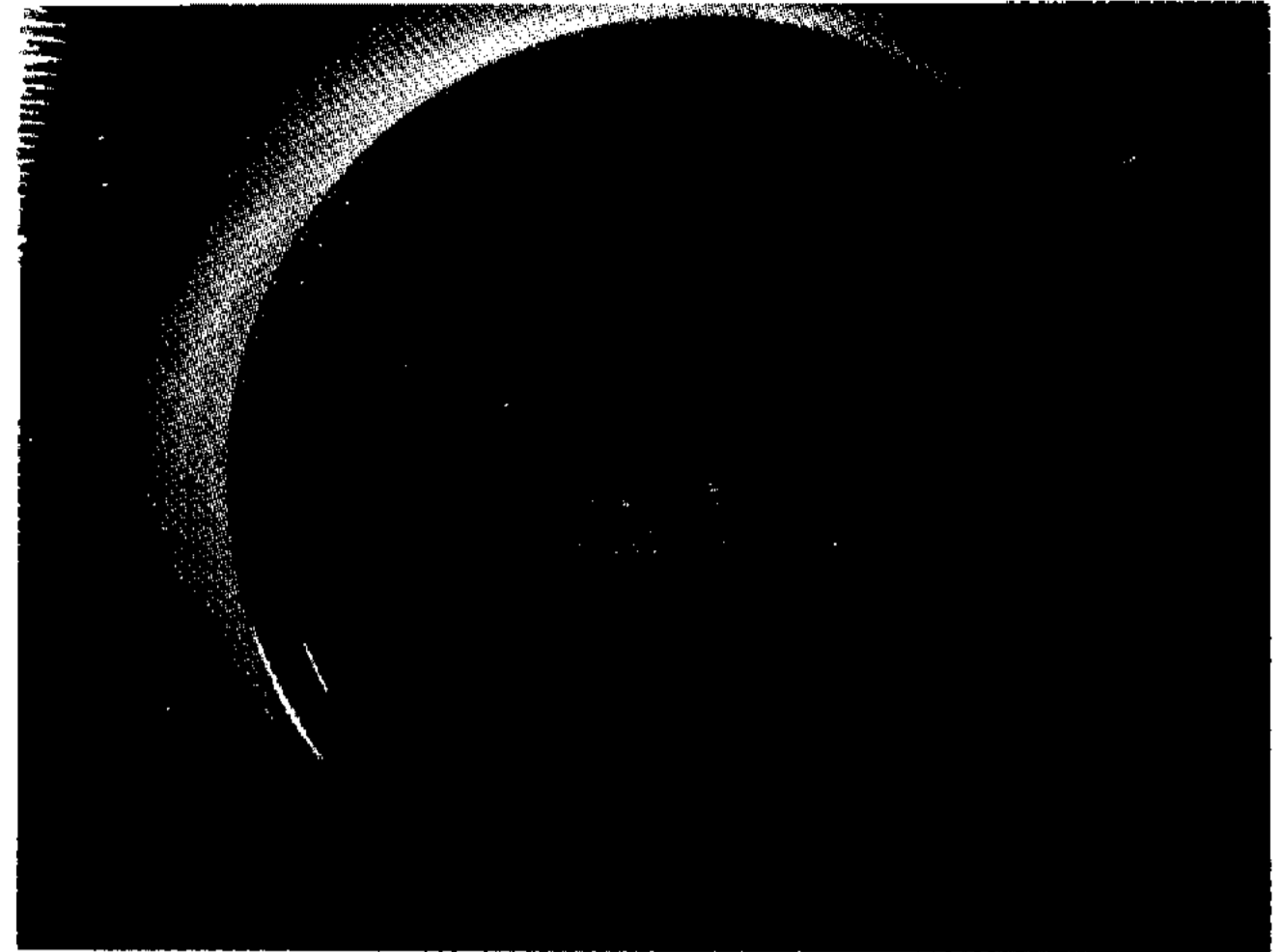
Fig. 2. Micrographs of the vegetative cells (A) and the spores (B) of the CK 11-4 strains.

것으로 관찰되었다(Fig. 2). 따라서 이 균주를 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 의거하여 *Bacillus* 속에 속하는 세균으로 동정되었으며 *Bacillus* sp. CK 11-4로 명명하였다.

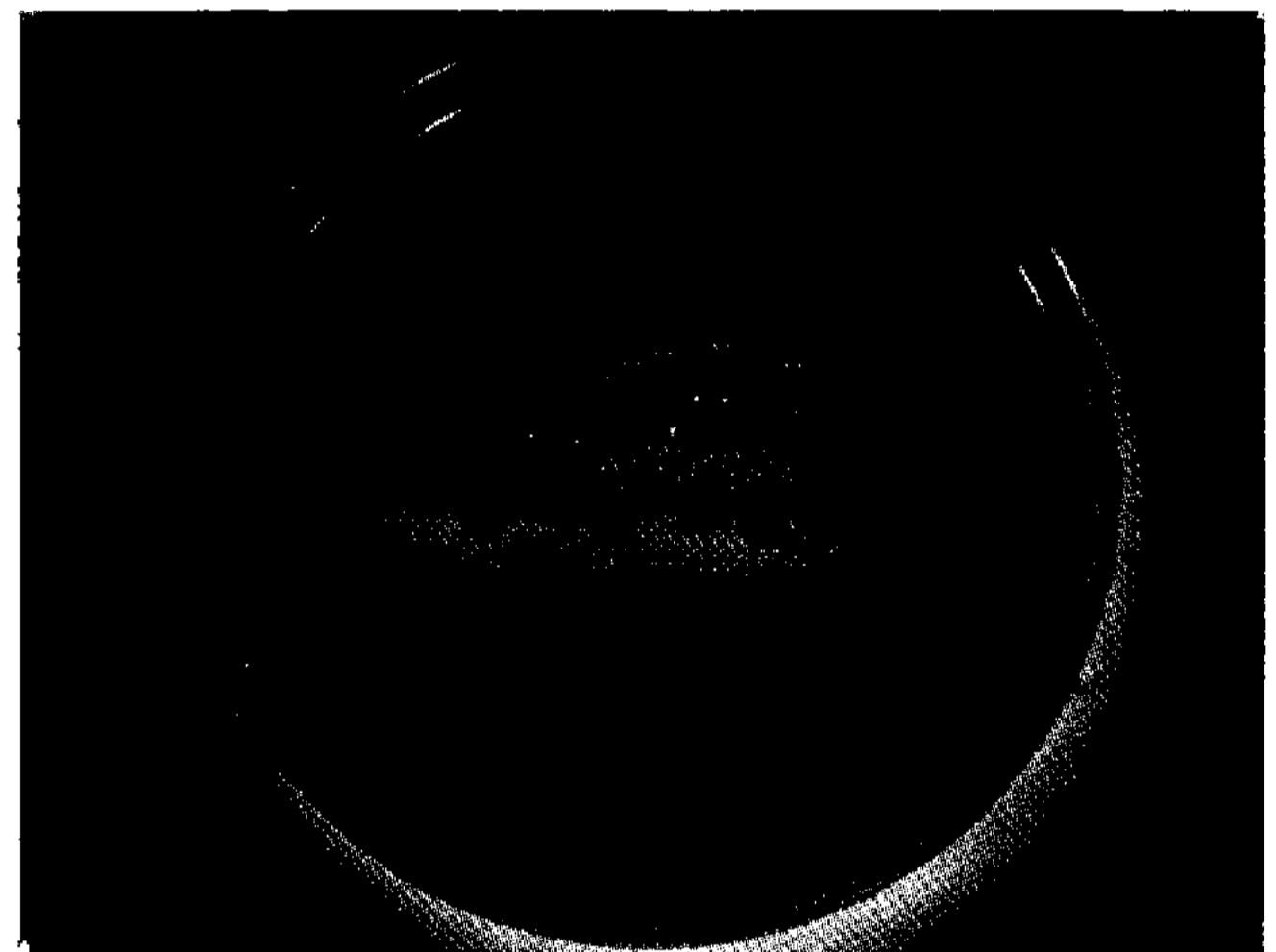
Bacillus sp. CK 11-4 균주는 생육시 gelatin과 casein에 대하여 protease 활성이 매우 높은 것으로 나타나 fibrin 분해능이 우수하다는 것을 확인할 수 있었으나, 생육시 상대적으로 전분 분해력은 다소 약한 것으로 나타났다(Table 2, Fig. 3).

청국장은 전통적으로 *Bacillus subtilis*에 의하여 발효되어 특이한 향과 맛을 나타내는 대두발효식품이므로 본 실험에서 분리한 *Bacillus* sp. CK 11-4 균주는 혈전용해능이 우수한 효소를 분비하는 균주로 사료되며, 청국장이 혈전용해능이 있는 기능식품으로의 가능성을 제시하고 있다.

Natto에는 natto 균주에 의하여 생성된 nattokinase가 장내 흡수되어 혈전용해능을 높이는 것으로 보고되고 있으나 섭취시 위를 통과해야 하므로 장내



(a)



(b)



(c)

Fig. 3. Activity tests of the CK 11-4 strain. (A) Starch, (B) Pectin, (C) Casein

흡수에 대한 논란이 많다. 현재 urokinase를 비롯하여 serum albumin, lipase, ^{131}I -elastase, Serratia protease 등도 장내 흡수된 결과가 보고된 바 있으므로

(16-20), 앞으로 *Bacillus* sp. CK 11-4 균주로부터 생성되는 효소를 분리정제하고 그 특성을 조사하여 혈전용해제로서의 응용 가능성을 타진하고자 한다.

요 약

우리나라의 전통식품인 청국장과 일본의 전통 발효식품인 natto로부터 혈전용해 균주를 분리하여 혈전용해능을 조사한 결과 청국장에서 분리된 균주 중에는 혈전용해능을 나타내지 않는 균주가 다수 포함되어 있으나, natto로부터 분리한 균주들은 대부분 혈전용해능을 나타내었다. 그러나 가장 우수한 혈전용해능을 나타내는 균주는 청국장에서 발견되었으며, 그 활성은 1.84 plasmin unit였다. 이 균주의 동정을 위하여 형태학적, 생화학적 특성을 조사한 결과 분리균주는 간균으로 운동성이 있고, 호기성(catalase 함유)으로 그람양성의 세균이었으며 포자를 형성하는 것으로 관찰되어 *Bacillus* 속에 속하는 미생물로 동정되었으므로 *Bacillus* sp. CK 11-4로 명명하였다.

참고문헌

1. Voet, D. and Voet, J.G. Biochemistry. Willy Press. 1990.
2. Nakajima, N., Mihara, H. and Sumi, H. 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 10, 1730.
3. Mihara, H., Sumi, H., Yoneta, T., Mizumoto, H., Ikeda, R., Seiki, M. and Maruyama, M. 1991. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Japanese Journal of Physiology.* **41**: 461.
4. Sumi, H., Seiki, M., Morimoto, N., Tsushima, H., Maruyama, M. and Mihara, H. 1985. Plasma fibrinolysis after intraduodenal administration of urokinase in rats. *Enzyme* **33**: 121.
5. Sumi, H., Maruyama, M., Yoneta, T. and Mihara, H. 1983. Activation of plasma fibrinolysis after intrarectal administration of high molecular weight urokinase and its derivative. *Acta Haemat.* **70**: 289.
6. Toki, N., Sumi, H., Sasaki, K., Boreisha, I. and Robbins, K.C. 1985. Transport of urokinase across the intestinal tract of normal Uman Subjects with stimulation of synthesis and/or release of urokinase-type proteins. *J. Clin. Invest.* **75**: 1212.
7. Sumi, H., Sasaki, K., Toki, N. and Robbins, K.C. 1980. Oral administration of urokinase. *Thrombosis Research* **20**: 711.
8. Sasaki, K., Moriyama, S., Tanaka, Y., Sumi, H., Toki, N. and Robbins K.C. 1985. The transport of ¹²⁵I-labeled human high molecular weight urokinase across the intestinal tract in a dog model with stimulation of synthesis and/or release of plasminogen activators. *Blood* **66**: 1, 69.
9. Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Muraki, H. 1987. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia* **43**: 1110.
10. 須見洋行. 1990. ナットウキナ-ゼと ヘルシ-納豆の開発. *Bioindustry* **7**: 11, 725.
11. 一島英治. 1993. 스프치리신 NAT. *日本醸造協會誌* **88**: 7, 537.
12. Nakamura, K., Yamagata, Y. and Ichishima, E. 1992. Nucleotide sequence of the subtilisin NAT gene, aprN, of *Bacillus subtilis* (natto). *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 1, 1869.
13. Astrup, T., and Müllertz, S. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Archs. Biochem. Biophys.* **40**: 346.
14. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2., Williams and Wilkins Press. Pp. 1105, 1986.
15. Warshaw, A.L., Walker, W.A. and Isselbacher, K. J. 1974. Protein uptake by the intestine, evidence of absorption of intact macromolecules. *Gastroenterology* **66**: 987.
16. Kabacoff, B.L., Wohlman, A., Umhey, M. and Avakian, S. 1963. Absorption of chymotrypsin from the intestinal tract. *Nature, Lond* **199**: 815.
17. Fink, E., Dietl, T., Seifert, J. and Fritz, H. 1980. Studies on the biological functions of grandular kallikrein; in Fujii, Moriya, Suzuki, Kinins II, Syatemic proteases and cellular function, Plenum Press, New York, Pp. 261.
18. Papp, M., Feher, S., Folly, G. and Horvath, E.J. 1977. Absorption of pancreatic lipase from the duodenum into lymphatics. *Experientia* **33**: 1191.
19. Katayama, K. and Fujita, T. 1972. Studies on biotransformation of elastase. II. Intestinal absorption of ¹³¹I-labeled elastase in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.* **288**: 181.

(Received 15 September 1994)