

젓갈류로부터 혈전용해 균주의 분리 및 동정

장영렬 · 김원국 · 권익부 · 이현용*

롯데그룹중앙연구소, *강원대학교 식품생물공학부

Screening and Identification of the Fibrinolytic Bacterial Strain from Jeot-Gal, Salt-fermented Fish

Young-Ryeol Jang, Won-Keuk Kim, Ik-Boo Kwon and Hyun-Yong Lee*

Department of Biotechnology, Lotte Group Institute of R&D

*Division of Food Science & Biotechnology, Kangwon National University

Abstract

Bacterial strain showing the strong fibrinolytic activity (2.04 plasmin unit) was screened from Jeot-Gal, Korean salt-fermented fish collected from various region. For the identification, when the strain was characterized morphologically, culturally, and biochemically, it was identified to *Bacillus pumilus*. And, when the fatty acids composition of the strain was analyzed, it was identified to *Bacillus atropheus*. Finally, the 16S rRNA partial sequence (V3 region) showed that the fibrinolytic stain screened from Jeot-Gal was identified as *Bacillus subtilis*. So, we named it *Bacillus subtilis* KJ-48.

Key words: fibrinolytic, *Bacillus*, 16S rRNA, identification

서 론

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

이러한 혈전이 뇌혈관에 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 tPA 이외에 병행요법으로 직

접 경구 투여함으로써 혈액내의 혈전용해능을 증가시키는 제제에 관심을 갖기 시작하고 있다. 현재 경구투여하는 혈전용해제는 지렁이(*Lumbricus tubellus*)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^(4,5). 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^(6,10) 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 본 연구진은 우리나라의 청국장으로부터도

Corresponding author: Won-Keuk Kim, Department of Biotechnology, Lotte Group Institute of R&D, 23, 4-ga, Yangpyung-dong, Youngdeungpo-gu, Seoul 150-104, Korea

natto와는 다른 혈전용해능이 우수하고 plasminogen activator 활성을 나타내는 효소를 분리하여 보고한 바 있다⁽¹³⁾.

또한, Nobuyoshi 등⁽¹⁴⁾은 일본의 전통발효식품인 젓갈류(*Katsuwonus pelamis*)의 소화관으로부터 분자량이 38,000, pI가 4.65인 알칼리성 혈전 용해효소를 분리하였으며 N-말단 아미노산 배열을 조사한 결과 trypsin과 유사하였다고 보고하고 있다.

따라서 본 연구에서는 우리나라의 젓갈류에도 혈전 용해능이 우수한 효소를 분리, 생산하는 균주가 존재할 수 있을 것이라는 점에 착안하여 젓갈류로부터 혈전 용해능이 우수한 효소를 분리하는 균주를 분리하고 그 동정을 시도하였다.

재료 및 방법

시료

균주배양에 사용한 nutrient medium은 Difco사의 제품을 사용 하였으며, 젓갈은 우리나라의 광주, 군산, 목포, 강진, 순천, 속초, 강릉, 동해의 시장노점에서 판매되고 있는 12종류의 52개 sample을 구입하여 시험에 사용하였고, fibrin, fibrinogen, thrombin, agarose 및 plasmin 등은 Sigma사의 제품을 구입하여 사용하였으며 그 외의 시약은 특급 시약을 사용하였다.

균주의 분리

한국에서 시판되고 있는 각종 젓갈류로부터 다음과 같은 방법으로 균주를 분리하였다. 각 시료를 stomacher를 이용하여 잘 분쇄하고, 이 분쇄액을 100 μ l 취하여 0.1% fibrin을 함유한 nutrient agar medium에 도말하고 실온에서 24시간 배양 후 투명환(clear zone)을 나타내는 균주를 분리하였다. 분리된 균락을 한 백금이씩 취하여 nutrient medium에 접종하여 37°C에서 24시간 액체배양한 후, nutrient agar medium에 streaking하고, 단일 균락을 분리하였다.

선별된 균주들을 nutrient medium에 37°C에서 24시간 동안 생육시키고 원심분리하여 균체를 제거하고 그 상등액을 혈전용해효소 활성측정법에 따라 그 활성을 측정하였다.

혈전용해효소 활성 측정법⁽¹⁵⁾

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 혼합하였

다. 여기에 다시 thrombin(100 NIH/mL) 0.1 mL을 첨가하여 혼합한 후 즉시 켈트리디쉬에 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°C에서 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 배지에서 배양상의 특징을 검토하였으며, 균주의 생리적 및 생화학적 특성을 규명하고 이들 결과를 토대로 Bergey's manual of systematic bacteriology⁽¹⁶⁾에 준하여 분리균주를 동정하였다.

세포막의 지방산 분석은 Microbial Identification System (MIDI; Microbial ID, Inc., Newark, Delaware, U.S.A.)에서 제공하는 방법 의하여 지방산 에스테르를 형성시켜, Gas-chromatography를 사용하여 분석하였으며, 16S rRNA sequencing은 V3 region을 primer CGGCCAGACUCCUACGGGA와 TTACCGCGG-CUCUGGCAC를 이용하여 direct sequencing하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 혈전용해능 측정

한국에서 시판되고 있는 여러 젓갈류로부터 fibrin이 함유된 nutrient agar medium plate를 이용하여 균주를 분리한 결과 48종의 균주가 혈전용해능을 나타내는 clear zone을 형성하여, 각각 KJ-1~48로 명명하였다. 각 균주를 nutrient medium에 접종하여 배양하고 그 상등액의 혈전용해능을 측정한 결과 전라남도 강진에서 구입한 전어창젓에서 분리한 KJ-48균주가 가장 높은 활성(2.04 plasmin unit)을 나타내었다.

형태 및 배양특성

이 균주의 동정을 위하여 형태학적, 생화학적 조사한 결과(Table 1) 분리균주는 간균으로 운동성이 있고, 호기성(catalase함유)으로 그람양성의 세균이었으며 포자를 형성하는 것으로 관찰되어 *Bacillus* 속에 속하는 미생물로 판단되었다.

따라서, 동정을 위하여 API 50CHB kit를 사용하여

Table 1. Morphological, biochemical and cultural characteristics of the strain KJ-48

1. Morphological characteristics			
-Gram positive			
-Form: Straight rods, motile			
-Spore: Endospores produced.			
Spores round			
Sporangium not swollen.			
-Colony: Irregular, wrinkled colonies, white to cream colored colonies.			
2. Biochemical and cultural characteristics			
Oxidase		-	
Catalase		+	
Fluorescens pigment		-	
gas production on glucose		-	
Galactosidase (ONPG)		-	
Glucosidase (Esculin)		+	
Arginine digydrolase		-	
Lysine decarboxylase		-	
Citrate utilization		+	
Urease production		-	
Indole formation		-	
VP reaction		+	
Gelatinase production		+	
Casein decomposition		+	
Starch hydrolysis		+	
Nitratee reduction		+	
Denitrification		-	
Phenylalanine deamination		-	
Growth	at pH 6.8, nutrient broth	+	
	at pH 5.7, Sabouraud dextrose broth	+	
	in NaCl	2%	+
		5%	+
		7%	+
		10%	+
	Anaerobic		-
Acid from	D-glucose	+	
	D-mannitol	+	
	D-xylose	+	
	L-aravinose	+	
Utilization of	L-aravinose	+	
	pyruvate	+	
	D-xylose	+	
	hydroxybutyric acid	-	

자체 Data base를 이용하여 동정한 결과, 99% 신뢰도를 보이는 *Bacillus pumilus*로 나타났다.

세포지방산 분석

지방산은 세포막의 중요한 구성성분으로 이들의 조성은 세균을 분류하고 동정하는데 주요한 지표가 되므로⁽¹⁷⁾, 위에서 언급한 Microbial Identification System (MIDI; Microbial ID, Inc., Newark, Delaware, U.S.A.)을 사용하여 세포지방산을 분석한 결과 C15:0_{antiso}가 47.13%, C17:0_{antiso}가 19.18%, C15:0_{iso}가 13.96%, C17:0_{iso}가 6.80%, C16:0_{iso}가 6.43%, C16:0가 3.59%이었으며, 자체 내장된 Library를 탐색하여 판정한 결과,

90% 이상의 신뢰도를 보이며 *Bacillus atropheus*로 나타났다.

16S rDNA gene partial sequence

상기한 실험의 결과 중 내장 Library를 탐색하여 판정할 수 있는 자동동정시스템을 사용한 경우(MIDI 및 API), 자체 판정의 수준이 각기 90% 이상의 신뢰도를 갖는 수준이다. 그러나, MIDI의 결과로 나온 *Bacillus atropheus*는 그 배양특성에 있어 *Bacillus subtilis*와 거의 동일한 특성을 가지며 장기간 배양할 경우 갈색 또는 검정색의 색소를 생성한다는 특성 및 rRNA sequence에서 차이를 나타낸다. 또한, API 50CHB의 결

KJ-48 ¹⁾ :	¹ CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
B.sub ²⁾ :	³³⁰ CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
KJ-48:	⁶¹ CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
B.sub:	³⁹⁰ CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA
KJ-48:	¹²¹ GAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT
B.sub:	⁴⁵⁰ GAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT
KJ-48:	¹⁸¹ AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA ²⁰⁵
B.sub:	⁵¹⁰ AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA ⁵³⁴

¹⁾ KJ-48: V3 region partial sequence of 16S rRNA of fibrinolytic strain KJ-48

²⁾ B.sub: V3 region partial sequence of 16S rRNA of *Bacillus subtilis*

Fig. 1. Comparison of 16S rDNA partial sequence of fibrinolytic strain KJ-48 with that of *Bacillus subtilis* type strain.

과인 *Bacillus pumilus*의 경우 99.9%의 신뢰도임에도 불구하고, 해당 실험의 특성이 sugar metabolism을 색깔의 변화로부터 판정을 내리는 것이므로 반복 실험을 한다고 하더라도 다소간 오차가 발생하는 경우가 있다. 또한 *Bacillus pumilus* 역시 *Bacillus subtilis* group에 속하므로 sugar metabolism 이외의 다른 특성으로 두 균주를 구분할 수 있는데, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 2)의 Genus *Bacillus*에 기술되어 있는 starch hydrolysis positive, nitrate reduction positive인 특성으로부터 시험균이 *Bacillus subtilis*에 더 밀접한 균으로 사료되었다. 따라서, 16S rRNA 유전자의 partial sequence가 동정의판정이 될 수 밖에 없다.

분리균주의 16S rDNA partial sequence (V3 region)를 결정하여 NCBI의 GenBank data를 탐색한 결과 (Fig. 1)는 *Bacillus subtilis*와 100% 동일하였다.

이상의 실험 결과로부터 젓갈류에서 분리한 혈전용해능을 나타내는 KJ-48균주를 *Bacillus subtilis*로 최종 판정하여, *Bacillus subtilis* KJ-48로 명명하였다.

Nattokinase가 장내 흡수되어 혈전용해능을 높이는 것으로 보고되고 있으나 섭취시 위를 통과해야 하므로 장내흡수에 대한 논란이 많다. 현재 urokinase를 비롯하여 serum albumin, lipase, ¹³¹I-elastase, Serratia protease 등도 장내 흡수될 결과가 보고된 바 있으므로^(18,22), 앞으로 *Bacillus subtilis* KJ-48 균주로부터 생성되는 효소를 분리정제하고 그 특성을 조사하여 혈전용해제로

서의 응용가능성을 타진하기 위하여 계속 실험진행중이다.

요 약

우리나라 각지에서 젓갈류를 수집하여 혈전용해능을 나타내는 균주들을 분리하였다. 분리된 균주들의 활성을 측정된 결과 2.04 plasmin unit의 가장 우수한 혈전용해활성을 나타내는 균주를 선별하여 동정하였다. 균주의 형태학적, 배양학적 및 생화학적 성질을 조사한 결과 *Bacillus pumilus*로 나타났으나, 균체의 지방산조성을 분석하여 동정한 결과 *Bacillus atropheus*로 나타났다. 최종적 결론을 얻기 위해, 16S rRNA partial sequence(V3 region)를 결정하여 분석한 결과 *Bacillus subtilis*의 16S rRNA partial sequence와 동일한 것으로 나타나, *Bacillus subtilis* KJ-48로 명명하였다.

문 헌

1. Voet. D. and Voet. J.G.: Biochemistry. Willy Press. p. 1086 (1990)
2. Nakajima, N., Mihara. H. and Sumi, H.: Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus lubellus*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1726-1730 (1993)
3. Mihara. H., Sumi. H., Yoneta. T., Mizumoto, H., Ikeda, R., Seiki. M. and Maruyama, M.: A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus lubellus*.

- Jap. J. of Physiology*, **41**, 461-472 (1991)
4. Sumi, H. Seiki, M., Morimoto, N., Tsushima, H., Maruyama, M. and Mihara, H.: Plasma fibrinolysis after intraduodenal administration of urokinase in rats. *Enzyme*, **33**, 122-127 (1985)
 5. Sumi, H., Maruyama, M., Yoneta, T. and Mrhara, H.: Activation of plasma fibrinolysis after intrarectal administration of high molecular weight urokinase and its derivative. *Acta Haemat.*, **70**, 289-295 (1983)
 6. Toki, N., Sumi, H., Sasaki, K., Boreisha, I. and Robbins, K.C.: Transport of urokinase across the intestinal tract of normal human subjects with stimulation of synthesis and/or release of urokinase-type proteins. *J. Clin. Invest.*, **75**, 1212-1222 (1985)
 7. Sumi, H., Sasaki, K., Toki, N. and Robbins, K.C.: Oral administration of urokinase. *Throm. Res.*, **20**, 711-714 (1980)
 8. Sasaki, K., Moriyama, S., Tanaka, Y., Sumi, H., Toki, N. and Robbins K.C.: 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**, 69-75 (1985)
 9. Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Muraki, H.: A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*, **43**, 1110-1111 (1987)
 10. Sumi, H.: Development of nattokinase and healthy natto (in Japanese). *Bioindustry*, **7**, 725-731 (1990)
 11. Ichishima, E.: Subtilisin NAT (in Japanese). *Nippon Jozokyoikaikashi*, **88**, 537-543 (1993)
 12. Nakamura, K., Yamagata, Y. and Ichishima, E.: Nucleotide sequence of the subtilisin NAT gene, aprN, of *Bacillus subtilis* (natto). *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1869-1871 (1992)
 13. Wonkeuk, K., Keehyun, C., Youngtaek, K., Hyunghwan, P., Yoonsoo, L., Hoonil, O., Ikboo, K. and Shinyoung, L.: Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. Strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2482-2488 (1996)
 14. Nobuyoshi, N., Naotoshi T. and Hiroyuki S.: Potent fibrinolytic enzyme from the lysate of *Katsuwonus pelamis* digestive track (shiokara): purification and characterization. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1604-1605 (1992)
 15. Astrup, T. and M llerzt, S.: The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Archs. Biochem. Biophys.*, **40**, 346-352 (1952)
 16. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2., Williams and Wilkins Press. p.1105 (1986)
 17. Yang, P., Vauterin, L., Vancaneyt, M., Swings, J. and Kersters, K.: Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.*, **16**, 47-51 (1993)
 18. Warshaw, A.L., Walker, W.A. and Isselbacher, K.J.: Protein uptake by the intestine, evidence of absorption of intact macromolecules. *Gastroenterology*, **66**, 987-992 (1974)
 19. Kabacoff, B.L., Wohlman, A., Umhey, M. and Avakian, S.: Absorption of chymotrypsin from the intestinal tract. *Nature*, Lond, **199**, 815-825 (1963)
 20. Fink, E., Dietl, T., Seifert, J. and Fritz, H.: Studies on the biological functions of grandular kallikrein; in Fujii, Moriya, Suzuki, Kinins II. Syatemic proteases and cellular function, Plenum Press, New York, p.261 (1980)
 21. Papp, M., Feher, S., Folly, G. and Horvath, E.J.: Absorption of pancreatic lipase from the duodenum into lymphatics. *Experientia*, **33**, 1191-1192 (1977)
 22. Katayama, K. and Fujita, T.: Studies on biotransformation of elastease. II. intestinal absorption of ¹³¹I-labeled elastease *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **288**, 181-185 (1972)

(1998년 2월 16일 접수)