

새로운 혈전용해 효소의 생성 및 특성: 청국장에서 분리한 *Bacillus* sp. KP-6408로부터 효소 생성의 최적조건

길지은 · 김기남 · 박인식[†]
동아대학교 식품영양학과

Production and Characterization of Fibrinolytic Enzyme: Optimal Condition for Production of the Enzyme from *Bacillus* sp. KP-6408 Isolated from *Chungkook-jang*

Ji-Oeun Kil, Gi-Nahm Kim and Inshik Park[†]

Dept. of Food Science and Nutrition, Dong-A University, Pusan 640-714, Korea

Abstract

A bacterium, KP-6408, capable of hydrolyzing fibrin was isolated from *Chungkook-jang*, which was possibly identified as a strain of *Bacillus* sp. The effects of culture condition and medium composition on the enzyme production were investigated. Among nitrogen sources tested, yeast extract was the most effective for the enzyme production, and the level of the concentration for the optimal enzyme production was 0.2% (w/v). For carbon sources, glucose was the best for the enzyme production with the level of 2.0% (w/v). The enzyme was maximally produced by cultivating the organism at the liquid medium of the initial pH 8.0 and temperature of 40°C. In *Chungkook-jang* fermentation, the enzyme was maximally produced when incubated at 35°C for 24 hrs using soybean as a solid medium. The addition of various rice starch to the soybean in *Chungkook-jang* fermentation lowered the enzyme production.

Key words: *Bacillus* sp. KP-6408, fibrinolytic enzyme, production, *chungkook-jang*

서 론

최근의 국민소득의 증가에 따라 식품섭취 패턴이 현저하게 변화하고 있으며, 특히 동물성 식품의 섭취량이 크게 증가하고 있다. 따라서 혈전증(thrombosis)과 같은 성인병이 증가하고 있으며, 성인병의 예방과 치료는 주요 국민 보건, 영양문제로 대두될 전망이다. 상처복구시 생체내의 복잡한 blood cascade mechanism에 의하여 활성화된 thrombin에 의해 fibrinogen이 fibrin으로 전환되어 서로 중합체를 형성하여야 생성되는 혈액 응고의 최종 산물인 fibrin clot이 제거되는 과정을 fibrinolysis라고 하며, 이것은 혈전 중에 존재하는 일종의 단백분해효소인 plasmin에 의하여 수행된다. Plasmin은 plasminogen이 절단됨으로써 형성되는데, plasminogen을 절단시키는 효소는 urokinase와 tissue-type plasminogen activator(t-PA)가 있다(1). 또한 heart at-

tack과 stroke 치료에 이용되는 미생물기원의 streptokinase도 사용되고 있다(2). 그러나, urokinase 및 streptokinase 등은 가격이 고가인 단점을 지니고 있을 뿐더러 정맥 주사로 투여되어, 혈중에서 반감기가 매우 짧아지고(3) urokinase를 제외하고는 경구투여가 불가능하다. 현재 경구투여하는 혈전 용해제로는 지렁이(*Lumbricus lubellus*)로부터 분리된 6가지 혈전 용해효소가 보고되고 있으며(4), 우리나라에서도 상품화되어 있다. 최근에 청국장과 유사한 일본의 전통 발효식품인 납두(natto)의 발효과정 중에 생성되는 단백질분해효소 중에서 혈전의 주성분인 fibrin을 용해시키는 혈전 용해효소를 확인하고, 이것을 nattokinase(NK)라고 명명하였으며(5), 효소의 특성과 납두의 임상적 효과를 확인하였고(3), 납두에서 분리한 nattokinase라는 효소를 경구투여시 생체내에서 혈전 용해능을 높인다는 즉 납두를 사람에게 장기 섭취시켰을 경우에 혈중에서의 혈전용

[†]To whom all correspondence should be addressed

해 활성이 증가되는 것을 확인하였다. 남두는 *Bacillus natto*에 의하여 대두를 발효시킨 식품이며, *Bacillus natto*는 우리 나라의 전통 발효식품인 장류의 제조에 널리 사용되는 *Bacillus subtilis*와 매우 유사한 세균이다. 최근에 청국장 발효시에 관여하는 *Bacillus* sp.에 이와 유사한 생리활성 기능을 갖는 혈전용해효소가 존재하고 있음이 확인되었다(6). 그러나 미생물로부터 혈전용해 효소를 생성하는 배양조건 또는 청국장 제조의 경우에 효소생성의 최적 조건에 관한 연구는 미약하다. 따라서 본 연구에서는 청국장을 제조하여, 미생물을 선발하고, 선발된 균을 이용하여 혈전용해 효소를 생성하는 최적 조건을 확립하여 효소의 대량생산에 기여하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주는 본 실험실에서 제조한 청국장으로부터 분리하였다. 청국장은 대두 10g에 증류수 20ml를 가한 후, 고압멸균(121°C, 15분)시킨 후 냉각하고 여기에 벗짚을 첨가하여 35°C에서 24시간 배양하여 제조하였다. 그리고 시료량과 동일한 멸균수를 가하여 희석시킨 후, 0.1ml를 nutrient agar(Difco) 배지에 도말하였다. 그리고 35°C에서 24시간 배양 후 배지상에 자란 각각의 colony를 40°C에서 24시간 nutrient broth에서 배양 후에 배양액을 조효소로 하여 fibrin plate법에 의하여 최대의 혈전용해 효소의 활성을 지니는 colony를 분리하였다.

Fibrin plate의 조제

Fibrin plate는 0.6% fibrinogen(Sigma, U.S.A.)을 0.1M borate buffer(pH 7.8)에 용해시킨 후 petri dish에 9ml를 가한 후 thrombin(Sigma, U.S.A.) 20unit를 가하여 균일한 평판을 제조한 후 실온에서 30분 방치 후 사용하여(7).

혈전용해효소의 Assay

Fibrinolytic enzyme(혈전용해효소)의 assay는 fibrin plate를 만든 후에, 효소액 50μl를 원형(d=0.8cm)의 paper disk(Toyo Roshi, Japan)에 흡수시켜, 35°C에서 4시간 반응시켰다. 그리고 반응 후에 생긴 lysed zone의 서로 수직인 두개의 지름을 측정하며, lysed zone이 타원형인 경우에는 가장 긴지름(d₁)과 가장 짧은 지름(d₂)을 측정하여 paper disk의 면적을 뺀값으로 lysed zone의 면적 [cm²=π×d₁/2×d₂/2-(paper disk 면적)]을 계산하

였다(8,9). 효소를 fibrin plate의 paper disk에 50μl를 가한 후, 효소반응의 결과로 생성되는 lysed zone의 면적은 효소반응 후 4시간까지 직선적으로 증가하였다. 그리고 생성된 효소의 활성은 표준 plasmin용액(Sigma, USA)을 0.48unit/ml에서 2.40unit/ml로 다양하게 조제한 후, fibrin plate에 50μl씩 가하여 형성된 lysed zone의 면적을 측정된 후 생성한 plasmin 효소의 활성의 표준 곡선과 비교하여 plasmin unit로 환산하였다.

조효소의 생성

효소생성을 위한 액체배지의 basal medium조성은 2% glucose, 0.2% yeast nitrogen base(without amino acid and ammonium sulfate) 및 0.2% yeast extract를 사용하였다. 액체배양은 40°C에서 24시간 배양하였으며, 배양 후 배양액을 15,900×g에서 30분간 원심분리하였다. 그리고 원심분리 후 상등액을 조효소로 사용하였다. 청국장을 시료로 하였을 경우에는 10g의 대두에 20ml의 증류수를 가한 후 고압멸균하였다. 그리고 활성화시킨 분리한 균주를 접종하여 35°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 시료량과 동일한 양의 멸균수를 가한 후 여과하였으며, 그리고 여과액을 15,900×g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 조효소로 사용하였다.

단백질의 정량

단백질은 Lowry법에 의하여 정량하였으며(10), bovine serum albumin을 표준단백질로 이용하였다.

결과 및 고찰

균의 동정

Table 1은 분리된 균주의 형태학적, 생화학적 특성을 조사한 결과이다. 분리된 균은 간균, Gram양성이었으며(11), 운동성이 있고 catalase양성(호기성), 그리고 포자를 생성하는 것으로 관찰되었다. 그리고 이 균주는 nitrate 환원반응과 citrate 이용반응, 그리고 Voges-Proskauer test에도 양성반응을 보였고, propionate 이용반응, glucose와 nitrate로부터의 gas생성반응은 음성을 보였다(12). 이 균주는 생육시 casein과 gelatin 그리고 starch에 대해서 활성이 매우 높은 것으로 나타나 단백질과 전분의 분해능력이 우수하였다. 따라서 이 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 기준에 의하여(13) *Bacillus*속에 속하는 세균으로 판단되었으며, *Bacillus* sp. KP-6408로 명명하였다.

Table 1. Morphological, cultural and biochemical characteristics of *Bacillus* sp. KP-6408

1. Morphological characteristics	
- Form	: rods, 0.6~0.7 μ ×1.5~2.0 μ
- Mobility	: +
- Gram stain	: +
- Spores	: +
2. Cultural characteristics	
- Growth pH	: 4~11
- Growth temperature	: 30~45°C
- Anaerobic growth	: -
- Acid from	
D-Glucose	: +
D-Xylose	: +
D-Mannitol	: +
- Growth in NaCl	
0%	: +
2%	: +
5%	: +
7%	: +
10%	: -
- NaCl and KCl required	: -
3. Utilization of sugar	
- D-Glucose	: +
- Sucrose	: +
- D-Mannitol	: -
- Sorbitol	: +
- D-Ribose	: -
- D-Xylose	: -
- Lactose	: -
- D-Fructose	: +
4. Biochemical characteristics	
- Starch hydrolysis	: +
- Casein hydrolysis	: +
- Gelatin hydrolysis	: +
- Catalase	: +
- Gas from glucose	: -
- Gas from nitrate	: -
- Nitrate reduced to nitrite	: +
- Citrate utilization	: +
- Propionate utilization	: -
- Voges-Proskauer test	: +

액체배양에 의한 효소의 생성

분리된 *Bacillus*속으로부터 혈전용해 효소의 생성은 basal medium에서 사용한 yeast extract를 다양한 질소원으로 교환하여 배양하였다. 효소의 생성을 fibrin plate법으로 측정하였을 경우, 효소의 생성은 질소원을 yeast extract를 사용한 경우에 최대의 효소생성을 나타내었으며, peptone도 효소생성에 효과적이었다(Table 2). 사용한 질소원 중에서 무기질소 및 아미노산은 효소생성에 적합하지 않았다. Fibrin은 효소의 기질이 나, fibrin이 배지에 용해되지 않고 침전되므로 효소생성에 적합하지 않은 것으로 사료된다. 따라서 액체배양의 경우에는 yeast extract를 질소원으로 이용하였다. Table 3는 사용한 yeast extract의 농도변화에 따른 혈전용해 효소의 생성을 조사한 것으로 효소의 생성은 yeast extract의 농도가 0.2%(w/v)일 때 가장 높았다.

Table 2. Effect of nitrogen sources on production of fibrinolytic enzyme

Nitrogen source	Relative activity(%)
None	0
Ammonium sulfate	0
Sodium nitrate	30.0
Fibrin	41.4
L-Aspartic acid	0
L-Glutamic acid	0
Glycine	0
Peptone	99.3
Yeast extract	100.0

The basal medium composition was 2% D-glucose, 0.2% yeast nitrogen base(without amino acid and ammonium sulfate) and 0.2% various nitrogen sources. The inoculum size was 0.5% and cultivation was carried out at 40°C for 24 hrs. The 100% relative activity corresponds to 1.09 cm² of area measured by fibrin plate method and 3.46 unit/ml in plasmin unit

Table 3. Effect of yeast extract concentration on production of fibrinolytic enzyme

Concentration(%)	Relative activity(%)
None	0
0.002	0
0.02	30.8
0.2	100.0
1	39.6
2	30.8

The basal medium composition was 2% D-glucose, 0.2% yeast nitrogen base(without amino acid and yeast extract) and 0.2% various nitrogen sources. The cultivation conditions were same as Table 2

Table 4은 yeast extract를 질소원으로 사용하였을 경우에 배지 탄소원의 변화에 따른 효소생성을 측정하는 것이다. 효소의 생성은 탄소원으로 mannitol을 사용했을 경우에 크게 억제되었으며, 사용한 탄소원 중에서 D-glucose가 가장 효과가 좋았다. 따라서 액체배양의 경우에는 glucose를 탄소원으로 이용하였다. Table 5는 사용한 glucose의 농도를 달리하여 액체배양 후 효소활성을 측정하는 것으로 효소의 생성은 glucose의 농도가 2.0%(w/v)일 때 가장 높았다.

배지의 초기 pH를 2.0에서 11.0으로 변화시킨 후 40°C에서 24시간 배양하여 효소의 생성을 측정하였다. 배지의 조성은 0.2% yeast extract, 2% glucose로 조절하였다. Table 6에서와 같이 효소생성은 배지의 pH를 8.0으로 조절하였을 경우에 최고를 나타내었다.

Table 7은 최적 조건에서 배양온도에 따른 효소생성의 변화를 측정하는 것이다. 효소의 생성은 배양온도를 40

Table 4. Effect of carbon sources on production of fibrinolytic enzyme

Carbon source	Relative activity(%)
None	6.4
D-Glucose	100.0
Saccharose	66.1
D-Fructose	57.8
Maltose	41.3
D-Ribose	49.5
D-Xylose	25.7
Starch(rice)	45.0
Mannitol	9.2
Sorbitol	57.8

The medium composition was 0.2% yeast extract, 0.2% yeast nitrogen base(without amino acid and yeast extract) and 2% various carbon sources. The cultivation conditions were same as Table 2

Table 5. Effect of glucose concentration on production of fibrinolytic enzyme

Concentration(%)	Relative activity(%)
None	0
0.1	9.6
0.3	12.5
0.5	20.2
1.0	43.3
1.5	89.4
2.0	100.0
3.0	99.0
5.0	89.4
10.0	89.4
15.0	89.4
20.0	75.0

The basal medium composition was 0.2% yeast extract, 0.2% yeast nitrogen base(without amino acid and yeast extract) and various glucose concentrations. The cultivation conditions were same as Table 2

Table 6. Effect of initial pH of medium on production of fibrinolytic enzyme

pH	Relative activity(%)
2.0	0
3.0	0
4.0	9.9
5.0	11.9
6.0	21.8
7.0	89.1
8.0	100.0
9.0	78.2
10.0	30.7
11.0	15.8

The medium composition was 0.2% yeast extract, 0.2% yeast nitrogen base(without amino acid and ammonium sulfate) and 2% glucose. The cultivation conditions were same as Table 2

Table 7. Effect of temperature on production of fibrinolytic enzyme

Temperature(°C)	Relative activity(%)
25	0
30	14.7
35	85.3
40	100.0
45	21.1
50	0

The medium composition was 0.2% yeast extract, 0.2% yeast nitrogen base(without amino acid and ammonium sulfate) and 2% glucose. The cultivation conditions were same as Table 2

°C로 조절함으로써 최고치를 나타내었다.

청국장 제조에 의한 효소의 생성

청국장 제조방법에 따른 혈전용해 효소의 생성의 변화를 검토하기 위하여 다양한 조건에서 청국장을 제조하였다. 청국장의 제조는 재료 및 방법에서 서술한 것과 같은 방법으로 제조하였으며, 종균의 접종량은 5%로 하였다. 대두에 종균을 접종한 후 배양온도를 25°C에서 50°C로 다양하게 변화시켜 효소의 생성을 측정하였다(Table 8). 청국장 제조에는 배양온도를 35°C로 유지하였을 경우에 효소생성이 최대였으며, 이것은 액체배양의 경우의 최적 배양온도인 40°C에 비하여 다소 낮았다. 그리고 청국장 제조시 배양시간에 따른 혈전용해 효소의 생성은 배양 후 24시간에 최고치를 보였으며, 배양 후 36시간 이후부터는 효소생성이 감소하였다(Table 9). 따라서 혈전용해 효소의 생성을 위한 청국장의 제조는 종균을 접종 후 35°C에서 24시간 배양하여 사용하였다.

청국장 제조에 의한 혈전용해 효소의 생성에 미치는 곡류의 첨가효과는 다양한 곡류를 20%에서 100%까지 첨가하여 효소의 생성을 측정하였다(Table 10). 곡류의 첨가에 의한 효소의 생성은 곡류의 함량이 증가될수록

Table 8. Effect of incubation temperature on production of fibrinolytic enzyme from *Chungkook-jang* fermentation

Temperature(°C)	Relative activity(%)
25	31.8
30	49.4
35	100.0
40	52.6
45	14.9
50	9.7

The cultivations were carried at 35°C for 24 hrs. The 100% relative activity corresponds to 1.50cm² in fibrin plate method, and 4.76 unit/ml in plasmin unit

Table 9. Effect of incubation time on production of fibrinolytic enzyme from *Chungkook-jang* fermentation

Time(hr)	Relative activity(%)
0	0
12	50.4
24	100.0
36	62.3
48	50.4

The cultivation conditions were same as Table 8

Table 10. Effect of added rice starch on production of fibrinolytic enzyme from *Chungkook-jang* fermentation

Starch source (%)	Relative activity(%)					
	0	20	40	60	80	100
Rice	100.0	71.3	58.0	45.3	21.3	0
Glutinous rice	100.0	52.7	46.0	32.7	10.0	0
Rice(unpolished)	100.0	46.0	26.7	10.0	4.7	0
Glutinous millet	100.0	52.7	46.0	32.7	15.3	0

The total amount of soybean and added starch source were 10g in 20ml water. The cultivation conditions were same as Table 8

Table 11. Effect of added NaCl on production of fibrinolytic enzyme from *Chungkook-jang* fermentation

NaCl(%)	Relative activity(%)
0	100
1.0	99.5
2.0	96.0
5.0	95.9
10.0	91.7

The cultivation conditions were same as Table 8

저하되었으며, 특히 곡류만 이용하여 분리한 균을 첨가한 경우에는 혈전용해의 생성이 전혀 없었다. 이러한 결과는 혈전용해 효소는 일종의 단백분해효소이므로 배지에 대두의 단백질에 의하여 유도되는 inducible enzyme으로 사료된다.

청국장의 맛을 향상시키기 위하여 소금 등을 약간씩 첨가하여 식용하므로, 청국장 제조시 소금의 첨가에 의한 혈전용해효소 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과는 Table 11에서와 같이 첨가한 소금의 농도범위에서는 혈전용해 효소의 생성에 첨가한 소금이 영향을 미치지 못했다.

요 약

청국장에서 혈전을 용해시키는 혈전용해 효소를 세포외로 분비하는 미생물을 분리하였으며, 분리한 균을

형태학적, 생화학적인 분류를 수행하여 *Bacillus* sp.로 추정하고, *Bacillus* sp. KP-6408로 명명하였다. 그리고 분리한 *Bacillus* sp. KP-6408을 이용하여 액체배지에서 배양 및 청국장으로 발효시켰을 경우에 최대 효소의 생성조건을 조사하였다. 선발된 균은 액체배지에서 yeast extract를 질소원으로 glucose를 탄소원으로 하였을 경우에 최대 효소생성을 나타내었다. 액체배지를 이용한 효소생성은 사용한 배지의 pH가 8.0, 배양온도는 40°C가 최적이었으며, 대두를 이용한 청국장 발효에서는 35°C에서, 배양 후 24시간에 효소생성이 최대값을 나타내었다. 청국장 발효에서는 대두만을 사용하였을 경우에 효소생성이 높았으며, 곡류의 첨가는 효소의 생성을 억제하였으나, 소금의 첨가는 효소생성에 별 영향이 없었다.

감사의 글

본 논문은 1995년도 한국학술진흥재단의 지방대 육성과제 연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사를 드립니다.

문 헌

1. Voet, D. and Voet, J. G. : *Biochemistry*. John Wiley & Sons, New York, p.1087(1990)
2. Esmon, C. T. : The regulation of natural anticoagulant parthway. *Science*, **235**, 1348(1987)
3. Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K. and Hiratani, H. : Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematologica*, **84**, 139(1990)
4. Nakajima, N., Mihara, H. and Sumi, H. : Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm. *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotech Biochem.*, **57**, 10, 1730(1993)
5. Sumi, H., Tsushima, H. and Muraki, H. : A novel fibrinolytic enzyme(nattokinase) in the vegetable cheese natto; A typical and popular soybean food in the Japan diet. *Experientia.*, **43**, 1110(1987)
6. Kim, W., Choi, K., Kim, Y., Park, H., Choi, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon, I. and Lee, S. : Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from chungkook-jang. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2482(1996)
7. Astrup, T. and Mullertz, S. : The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys.*, **40**, 346(1952)
8. Sumi, H., Kawabe, K. and Nakajima, N. : Effect of various poly amino acid and D- and L-amino acids on the blood fibrinolytic system. *Comp. Biochem. Physiol.*, **102B**, 159(1992)
9. 한국생화학회 : 생물활성 연구법. p.897(1990)

10. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
11. Harold, J. B. : *Microbiological Applications*. 5ed., Wm. C. Brown Publishers, p.166(1990)
12. 박석기, 김관천, 김영성, 김윤기, 김중배, 최한영 : 최신미생물학 실험. 신광문화사, p.85 (1995)
13. Krieg, N. R. and Holt, J. G. : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimor, p.1122(1984)

(1997년 10월 20일 접수)