

김치에서 혈전용해효소 생산균주의 분리

노경아 · 김동호 · 최낙식 · 김승호
생명공학 연구소 단백질기능 R.U.

Isolation of Fibrinolytic Enzyme Producing Strains from *kimchi*

Kyoung-A Noh, Dong-Ho Kim, Nack-Shick Choi and Seung-Ho Kim

Protein Function Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

Abstract

Various bacterial strains that secrete extracellular fibrinolytic enzyme were screened from *kimchi*, a traditional vegetable fermented food in Korea. Three microbes of them were identified to be *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis* and *Micrococcus luteus* strains according to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. It was found that *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis* and *M. luteus* produced 2.58, 1.48 and 2.03 plasmin unit/mL of fibrinolytic enzyme, respectively. All extracellular proteases showing the fibrinolytic activity were confirmed by SDS-PAGE and fibrin zymography assay and we propose that some of the fibrinolytic enzymes from this work are novel enzymes.

Key words: *kimchi*, fibrinolytic enzyme

서 론

인체의 혈관이 손상을 받게 되면 출혈을 방지하기 위한 체내 방어작용으로 혈액의 응고가 진행된다. 이 과정은 연속적인 혈액 응고인자의 활성화에 의하여 조절되며, 최종적으로는 활성화된 thrombin에 의하여 fibrinogen이 fibrin으로 전환됨으로써 유도된다⁽¹⁾. 이렇게 생성된 혈전(fibrin clots)은 상처가 회복된 후 plasmin과 같은 혈전용해효소(fibrinolytic enzyme)에 의하여 다시 용해된다. 그러나 혈전이 체내에 과도하게 축적되거나 혈전의 용해작용이 원활하지 못할 경우에는 혈전증(thrombosis)이 발생되어 심혈관 질환에 따른 치명적인 손상을 유발할 수도 있다. 이러한 혈전증의 치료를 위하여 현재 streptokinase, urokinase, 그리고 tPA (tissue-type plasminogen activator) 등이 일반적인 치료제로 사용되고 있으나 이러한 약품들은 가격이 높고 전신출혈과 같은 부작용이 있으며 urokinase⁽²⁾를 제외하고는 경구투여가 어려운 문제점을 가지고 있다. 따라서 보다 경제적이고 경구투여가 가능하며 부작용이 적은 혈전증 치료제에 대한 연구가 다양하게 시도되어 거머리⁽³⁾나 지렁이⁽⁴⁾ 등에서 새로운 혈전 용해

물질을 분리한 바 있으며 이러한 연구 방향 중에서도 한국과 일본을 중심으로 한 발효식품에서의 혈전용해효소 연구는 직접 섭취가 가능한 식품을 대상으로 한다는 점에서 특히 주목할 만하다.

Sumi 등은 일본의 발효식품인 *natto* (nattokinase)^(5,6)와 *shiokara* (katsuwokinase)⁽⁷⁾에서 혈전용해효소 생산균주를 분리하고 효소를 정제하였으며, 이의 경구 투여시 생체내의 혈전용해능을 높일 수 있다고 보고^(8,9,10)하였다. 우리나라에서도 일본의 *natto*와 유사한 대두 발효식품인 청국장에서 혈전용해능을 가진 *Bacillus* 균주를 분리하였으며^(11,12), 최근에는 된장⁽¹³⁾과 젓갈⁽¹⁴⁾ 등의 발효식품에서 혈전용해능을 가진 균주들을 분리하고 된장에서 분리된 균주들이 *natto*와 청국장에서 분리한 균주에 비하여 2~3배 이상의 높은 혈전용해효소를 생산할 수 있음을 보고하였다. 한편, 우리나라의 대표적인 발효식품인 김치도 항암효과나 항산화효과 등과 같은 기능성에 대한 연구 결과^(15,16)가 많이 보고되고 있으나 아직까지 혈전용해능에 관한 연구는 찾아볼 수 없었다. 본 연구에서는 김치에서 혈전용해효소를 생산하는 균주들을 분리한 결과 2종의 *Bacillus* 속 균주와 1종의 *Micrococcus* 속 균주를 동정하였으며, 이 균주들도 *natto*나 청국장에서 분리한 균주들보다 높은 혈전용해효소 생산능이 있음을 확인하였으므로 이에 관한 연구결과를 보고하고자 한다.

Corresponding author: Kim, Seung-Ho, Protein Function Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Yusong, Taejeon 305-600, Korea

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

우리 나라의 충청, 경기 지역에서 수집한 배추김치의 여액을 tryptic soy agar medium (Bacto tryptone 1.7%, Bacto soytone 0.3%, Bacto dextrose 0.25%, sodium chloride 0.5%, dipotassium phosphate 0.25%, and Bacto agar 2.0%)에 pour plating한 다음 37°C에서 24시간 배양하였다. 이 때 형성된 단일 colony를 선택하여 fibrin plate에 계대한 다음 37°C에서 24시간 배양하고 colony 주변에 투명환이 생성되는 균주를 혈전용해효소 생산 균주로 분리하였다. 분리된 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology⁽¹⁷⁾와 Microbial Identification System (MIDI; Microbial ID, Inc., Newark, Delaware, U.S.A.)의 세포막 지방산 분석방법에 준하여 동정하였다.

Fibrin plate의 제조

Astrupt의 방법⁽¹⁸⁾을 변형하여 50 mM 인산완충용액 (pH 7.4, 0.15 M NaCl 포함)으로 fibrinogen을 최종농도 0.3%가 되도록 완전히 용해시켜 여과지를 통해 여과한 후, 용액 5 mL에 동량의 2% agarose 5 mL을 첨가하여 혼합하였다. 혼합한 용액에 thrombin (100 NIH unit/mL) 0.1 mL를 첨가하여 충분히 혼합한 후 즉시 petri-dish에 붓고 고화시켜 fibrin plate를 제조하였다.

혈전용해효소 활성 측정법

선별된 균주를 tryptic soy broth에 접종하여 37°C에서 24~48시간 배양한 배양액을 원심분리(10,000×g, 4°C)한 다음 상등액을 회수하여 이를 조효소로 하였다. 혈전용해효소 활성은 fibrin plate에서 다음과 같이 측정하였다. Fibrin plate에 pasteur pipet으로 지름 5 mm의 구멍을 만들어 각 시료 20 μL를 주입하고 37°C에서 2시간 반응시킨 다음 이 때 생성된 투명환의 면적을 계산하였으며 대조구로서는 정제된 혈전용해효소인 plasmin (1.0 unit/mL)을 사용하였다. 조효소의 혈전용해활성은 대조구의 용해면적에 대한 시료의 용해면적을 상대적인 비율로 환산하여 산출하였다.

SDS-PAGE 및 fibrin zymography assay

Laemmli 방법⁽¹⁹⁾에 따라 10% polyacrylamide gel을 SDS-PAGE에 사용하였고, 단백질정량은 BSA (bovine serum albumin)를 표준으로 하여 Lowry 방법⁽²⁰⁾에 따라 수행하였다. Fibrin zymography assay는 Kim 등의 방법⁽²¹⁾에 따라 fibrinogen의 농도가 0.12% (w/v) 되게

polyacrylamide 용액에 혼합한 후 곧바로 thrombin (1 unit)을 첨가하여 제조한 fibrin-polyacrylamide gel에서 실시하였다. 각 lane에 20 ng의 단백질을 loading하여 10 mA의 전류에서 전기영동을 실시한 다음 SDS에 의해 불활성화된 효소를 재활성화하기 위하여 gel을 2.5% Triton X-100을 포함한 Tris 완충용액(50 mM, pH 7.4)에 30분간 침적하여 SDS를 제거하였으며 다시 증류수로 Triton X-100을 제거하였다. 분획된 단백질의 혈전용해 활성은 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ 그리고 0.02% NaN₃가 포함된 Tris 완충용액(30 mM, pH 7.4)에 gel을 침적하여 37°C 항온기에서 12시간 반응시킨 다음 Coomassie blue 염색으로 확인하였다. Fibrin 분해활성을 나타내는 단백질 분획은 gel의 fibrin을 분해하여 Coomassie blue 염색 결과 투명대를 형성하므로 확인이 가능하다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

수집한 김치 여액을 tryptic soy agar medium에 pour plating하고 37°C에서 24시간 배양하여 단일 colony를 선택 분리한 다음 이 단일 colony를 fibrin plate에 계대하여 투명환을 생성하는 균주들을 분리하였다. 분리된 균주들을 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology와 Microbial Identification System의 세포막 지방산 분석방법에 의하여 동정한 결과 *Micrococcus luteus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, 그리고 *Bacillus brevis*의 3가지 균주를 명명하였다(Table 1).

혈전용해능 측정 및 확인

분리된 3종의 혈전용해효소 생산균주를 tryptic soy broth 배지에서 배양하여 조효소를 제조한 다음 fibrin plate에서 plasmin (1 unit/mL)에 대한 각 조효소의 투명환의 상대적 넓이를 비교하여 혈전용해 활성을 측정하였다. 분리된 3종의 균주 가운데 *Bacillus amyloli-*

Table 1. Fatty acid compositions of the fibrinolytic strains screened from kimchi (unit: relative %)

Fatty acid strains	<i>M. luteus</i>	<i>B. amyloliquefacience</i>	<i>B. brevis</i>
14:0 _{iso}	1.98	2.78	2.12
15:0 _{iso}	21.08	25.18	19.69
15:0 _{Anteiso}	47.69	44.00	49.18
16:0 _{iso}	6.30	6.11	6.57
16:0	2.06	5.78	2.23
17:0 _{iso}	6.28	7.41	6.79
17:0	14.61	8.75	13.42

Table 2. Fibrinolytic activity of the strains isolated from kimchi

Strains	Fibrinolytic activity (plasmin unit/mL) ^a	F/C ^b
<i>M. luteus</i>	2.03	1.35
<i>B. amyloliquefaciens</i>	2.58	1.18
<i>B. brevis</i>	1.48	0.71

^aActivity=dimension of clear zone of sample/dimension of clear zone of plasmin.

^bF/C=dimension of clear zone on fibrin plate/dimension of clear zone on casein plate.

*quefaciens*가 2.58 unit/mL로 가장 높은 효소활성을 보였으며 *Bacillus brevis*는 1.48 unit/mL, *Micrococcus luteus*는 2.03 unit/mL의 혈전용해효소 활성을 나타내었다(Table 2). 이같은 결과는, 같은 방법으로 *natto*와 청국장장의 혈전용해효소 생산균주를 탐색하여 *natto*에서는 1.58 unit/mL, 청국장에서는 1.84 unit/mL의 혈전용해효소를 생산하는 균주를 우수균주로 분리한 김 등^(11,12)의 보고보다 더 높은 것이었다. 따라서 김치에서 분리한 균주가 *natto*나 청국장에서 분리한 균주보다 높은 혈전용해효소 생산능을 가지고 있음을 알 수 있었다. 한편, *Bacillus*속 미생물들은 일반적으로 extracellular protease를 생산하는 것으로 알려져 있으며 이러한 protease에 의해서도 fibrin이 분해되므로⁽²²⁾ 0.3% (w/v) casein을 첨가한 casein plate에서의 protease 활성과 fibrin plate에서의 fibrin 분해활성을 비교하여 각 분리균주의 casein 분해도에 대한 혈전용해효소 활성의 상대적인 activity를 살펴보았다. 실험 결과 *B. amyloliquefaciens*와 *M. luteus*가 casein의 분해도에 비하여 fibrin의 분해도가 높아 혈전용해효소로서의 활성이 높은 것으로 평가되었으며 *B. brevis*는 상대적으로 혈전용해효소로서의 활성이 낮은 것으로 조사되었다(Table 2). 따라서 향후 효소의 정제와 특성의 연구에 있어 혈전용해 활성과 효소생산능이 모두 높은 *B. amyloliquefaciens*와 *M. luteus*를 우수 균주로 선발하였다.

분리된 3종의 혈전용해효소 생산균주를 tryptic soy broth 배지에서 배양하여 배양시간별로 효소활성의 변화를 조사하였다(Fig. 1). 세 균주 모두 24시간대에 최대의 효소생산성을 보여주었으며 시간이 지남에 따라 효소활성은 감소하였다. 특히, *M. luteus*의 효소활성 감소는 현저하여 24시간에 2.03 unit/mL의 최대활성을 보였다가 40시간에는 혈전용해 효소활성이 나타나지 않았다. 그러나 *B. amyloliquefaciens*와 *B. brevis*의 효소활성은 48시간까지도 최대 효소활성의 80%이상을 유지하여 각 균주에 따라 protease에 의한 자가분해

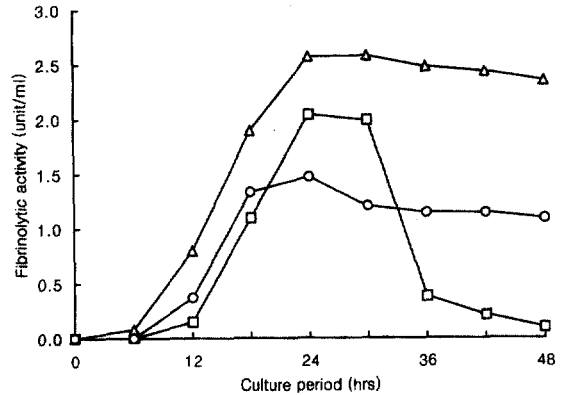


Fig. 1. Changes of fibrinolytic activities in the culture filtrates of the strains following to the culture period. Symbols, ○—○, *M. luteus*; △—△, *B. amyloliquefaciens*; □—□, *B. brevis*.

정도나 효소의 안정성에 차이가 있는 것으로 평가되었다. 이러한 효소의 안정성은 향후 산업화나 효소의 이용에 중요한 요소이므로 이에 대한 보다 자세한 연구를 진행 중에 있다.

SDS-PAGE와 fibrin zymography 활성측정법을 통하여 각 분리균주가 생산한 조효소로부터 혈전용해능을 지닌 단백질을 확인하였다. SDS-PAGE 결과 각 균주의 세포의 단백질은 서로 다른 양상을 보였으며(Fig. 2A) zymography assay 결과 fibrin 분해활성을 지닌 단백질도 각 균주별로 서로 다른 분자량을 갖는 것으로 조사되었다(Fig. 2B). *M. luteus*에서는 약 5개의 단백질 band가 혈전용해 활성을 나타내었으며 이 중 약 45 kDa와 50 kDa의 단백질이 높은 효소활성을 보이는 것으로 평가되었고 *B. brevis*에서는 약 4개의 단백질

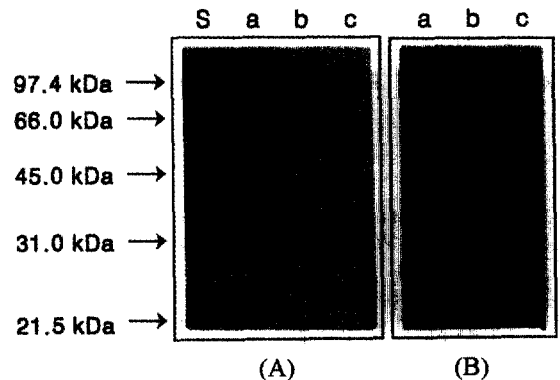


Fig. 2. SDS-PAGE analysis (A) and zymography assay (B) of the 24 hour culture filtrate of the strains. Molecular weight of each protein was calculated by comparison with six standard proteins (S). lane a, *M. luteus*; lane b, *B. amyloliquefaciens*; lane c, *B. brevis*.

band가 혈전용해 활성을 나타내었으며 이 중 약 38 kDa의 단백질이 높은 효소활성을 보이는 것으로 조사되었다. 한편, *B. amyloliquefaciens*에서는 약 29 kDa의 분자량을 갖는 하나의 단백질만이 확인되었다.

본 실험실에서 김치로부터 분리한 균주들은 이미 보고된 일본의 *natto*⁽⁵⁾나 한국의 청국장^(11,12)과 비교할 때 이들보다 높은 효소 생산능을 보여 주었으며 fibrin zymography 활성측정법에서 확인한 혈전용해 단백질의 분자량이 *shiokara*⁽⁶⁾분리 균주의 효소(35 kDa), 청국장⁽¹²⁾ 분리균주의 효소(28.2 kDa), *natto*⁽⁶⁾에서 분리한 nattokinase (27.7 kDa) 등과는 다른 것으로 조사되어 새로운 혈전용해효소의 발견 가능성을 보였다. 따라서 본 연구자들은 앞으로 김치에서 분리한 혈전용해 효소 생산균주로부터 효소를 정제하고 그 특성을 조사하여 혈전용해제로서의 가능성과 김치의 기능성에 대한 새로운 접근 방향을 찾아보고자 한다.

요 약

우리 나라의 전통 발효식품인 김치에서 혈전용해 효소를 생산하는 미생물을 분리하고 그 중 *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Micrococcus luteus*의 세 종을 Bergey's manual of systematic bacteriology 등에 의하여 동정하였다. 분리된 미생물을 효소 유도 배지에서 배양한 결과 *B. amyloliquefaciens*는 2.58 plasmin unit/mL, *B. brevis*는 1.48 plasmin unit/mL, 그리고 *M. luteus*는 2.03 plasmin unit/mL의 혈전용해 효소 생산능을 보여 주었다. 각 균주에서 생산된 세포의 단백질을 SDS-PAGE와 fibrin zymography assay에 의해 분석한 결과 *B. brevis*와 *M. luteus*에서는 서로 다른 분자량을 가진 3-4개의 혈전용해 효소가 존재하였으며 *B. amyloliquefaciens*에서는 분자량이 약 29 kDa인 단일 band의 혈전용해 효소가 생산되었음을 확인하였다.

문 헌

1. Marks, D., Marks, A. and Smith, C.: *Basic Medical Biochemistry*, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, U.S.A. (1996)
2. Sumi, H., Seiki, M., Morimoto, N., Tsushima, H., Maruyama, M. and Mihara, H.: Plasma fibrinolysis after intraduodenal administration of urokinase in rats. *Enzyme*, **33**, 121-127 (1985)
3. Electricwala, A., Sawyer, R.T., Powell, J.C. and Atkinson, T.: Isolation of thrombin inhibitor from the leech *Hirudinaria manillensis*. *Blood Coagul. Fibrin*, **2**, 83-85 (1991)
4. Nakajima, N., Mihara, H. and Sumi, H.: Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus lubellus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1726-1730 (1993)
5. 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)
6. Fujita, M., Nomura, K., Hong, K., Ito, Y., Asada, A. and Nishimuro, S.: Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese *Natto*, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **197**, 1340-1347 (1993)
7. Sumi, H., Nakajima, N. and Yatagai, C.: A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack "*Shiokara*" a Japanese traditional fermented food. *Comp. Biochem. Physiol.*, **112B**, 543-547 (1995)
8. Nakajima, N., Taya, N. and Sumi, H.: Potent fibrinolytic enzyme from the lysate of *Katsuwonus pelamis* digestive tract (*Shiokara*): purification and characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1604-1605 (1993)
9. Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K. and Hiratani, H.: Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol.*, **84**, 139-143 (1990)
10. Fujita, M., Hong, K., Ito, Y., Misawa, S., Takeuchi, N., Kariya, K. and Nishimuro, S.: Transport of nattokinase across the rat intestinal tract. *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1194-1196 (1995)
11. Kim, Y.T., Kim, W.K. and Oh, H.I.: Screening and identifications of fibrinolytic bacterial strains from *Chungkookjang* (in Korean). *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 1-5 (1995)
12. Kim, W.K., Choi, K.H., Kim, Y.T., Park, H.H., Choi, J.Y., Lee, Y.S., Oh, H.I., Kwon, I.B. and Lee, S.Y.: 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)
13. Kim, S.H., Choi, N.S., Lee, W.Y., Lee, J.W. and Kim, D. H.: Isolation of *Bacillus* strains secreting fibrinolytic enzymes from *Doenjang* (in Korean). *Kor. J. Microbiol.*, **34**, 87-90 (1998)
14. Jang, Y.R., Kim, W.K., Kwon, I.B. and Lee, H.Y.: Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strains from *Jeot-Gal*, salt-fermented fish (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**, 655-659 (1998)
15. Cheigh, H.S. and Park, K.Y.: Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of *kimchi*, Korean fermented vegetable products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **34**, 175-203 (1994)
16. Koo, Y.J. and Choi, S.Y. *Science and Technology of kimchi* (in Korean). Korea Food Research Institute, Banwol. (1990)
17. Holt, J.G., Sharpe, M.E., Mair, N.S. and Sneath, P.H.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins Press. **2**, 1105 (1986)
18. Astrup, T. and Müllertz, S.: The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Archs. Biochem. Biophys.*, **40**, 346-347 (1952)

19. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
 20. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
 21. Kim, S.H., Choi, N.S. and Lee, W.Y.: Fibrinolytic activity, a direct analysis of fibrinolytic enzymes on gels. *Anal. Biochem.*, **263**, 115-116 (1998)
 22. Kim, S.J., Yoon, J.H., Lee, M.S. and Kim, H.B.: Isolation and characterization of *Bacillus cereus* secreting proteases from Korean soybean paste (in Korean). *Kor. J. Microbiol.*, **33**, 136-141 (1997)
-

(1998년 11월 3일 접수)