

배지 조성에 따른 *Bacillus* sp.의 혈전 용해효소 생산효과

김 영 숙[†]

양산대학교 식품가공과

Effect of Medium Components on the Productivity of Fibrinolytic Enzyme in *Bacillus* sp.

Young-Sook Kim[†]

Department of Food Science & Technology, Yangsan College, Yangsan 626-040, Korea

Abstract

A bacterial strain which can produce the extracellular fibrinolytic enzyme was isolated from Jeot-Gal (anchovy) that wa Korean traditional salt-fermented fish. The isolated bacterium was identified to be a strain of *Bacillus* sp. The optimal medium for fibrinolytic enzyme production was determined to consist of 5 g maltose, 10 g defatted soybean, 20 g sodium chloride, 1.75 g K₂HPO₄ per liter (pH 7.0)

Key words – *Bacillus* sp., Fibrinolytic enzyme, Jeot-Gal

서 론

우리 신체는 혈관을 통하여 각 조직에 영양 물질과 산소를 공급함으로써 신진대사를 유지하므로 순환계의 원활한 유통은 건강한 생활을 영위하기 위해서 매우 중요하다. 이러한 순환계에서 혈류를 방해하는 요인 중의 하나로 혈액에서 형성되는 혈전이 그 요인이다. 현재 우리나라에서도 식생활의 서구화와 지방의 과다 섭취 등의 원인으로 혈전성 성인병이 날로 늘어가는 추세에 있다. 혈전증이라고 하면 혈전이 신체내에서의 생성과 분해의 균형이 깨어져 과다 생성되면 혈전은 혈관 벽에 부착, 누적되어 혈관을 좁히거나 더 나아가 혈류를 따라 미세혈관에 침입하여 이를 폐쇄함으로써 발생하는 증상으로 뇌경색, 심근 경색, 폐경색 등이라는 각종 순환계 성인병을 유발시킨다. 이리

한 혈전증에 의하여 건강을 잃는 사람의 총수는 암에 의하여 고통을 받는 환자의 수보다 월등히 많다. 이러한 혈전증으로 치료할 수 있는 치료제로서는 현재 streptokinase [7], urokinase[1,8,10,11,13], tissue plasminogen activator (TPA) [5,12] 등이 있다. Streptokinase는 세균인 *Streptococcus haemolyticus*에 의하여 생산되는 물질로서 일종의 혈액중에 존재하는 plasminogen의 activator이다. 혈액중에서는 plasminogen이 plasmin으로 되어야 fibrin을 분해할 수 있는데 여기에 작용하는 물질이다. 현재 사용되어지고 있는 혈전용해제는 거의 모두가 사람의 콩팥세포나 뇨중에서 분리, 정제하거나 유전공학적 방법을 사용하여 만든 recombinant protein이기 때문에 정제과정의 어려움도 많아 비싼 가격인데 반해 비특이적으로 작용하고 부작용도 심한 경우가 많이 있다.

[†] Corresponding author

기존의 혈전용해효소가 가지는 혈전에 대한 비특이성, 부작용, 고가 등의 단점을 해결할 수 있는 새로운 혈전용해 효소 개발을 위한 연구가 전통발효식품으로부터 찾아 보려는 연구들이 활발히 진행되고 있다. 김 등은 혈전에 대하여 직접적으로 작용하고 특이성이 높은 혈전용해효소를 개발하기 위하여 젓갈로부터 *Bacillus* sp. 균주가 생산하는 혈전 용해 효소를 정제하여 그 특성을 보고하였다 [4]. 본 연구에서는 젓갈로부터 분리된 *Bacillus* sp.이 생산하는 혈전용해효소를 의약품이나 식품첨가제로 이용하기 위한 기초 연구로서 혈전용해효소를 생산 조건을 최적화 할 수 있는 배지의 조성에 관한 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 실험에 사용된 균주는 재래 시장에서 구한 젓갈로부터 분리된 *Bacillus* sp.로서 김 등[4]으로부터 분양받아 사용하였다. 전배양을 위해 고체 평판 배지에 보존 된 균을 15 ml의 시험관내 3 ml의 Luria-Bertani(LB) medium (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)에 접종하였으며 이 시험관을 진탕배양기를 이용하여 37°C, 180 rpm에서 5~6시간 동안 진탕하였다. 본 배양에는 500 ml 삼각 플라스크를 사용하여 200 ml의 배지에 2 ml의 전배양액을 접종하였다. 표준 조건은 별도의 조건이 언급되지 않은 경우 37°C, 180 rpm이며 30시간을 배양하였다.

효소 활성 측정

혈전 용해효소의 활성은 Astrup and Müllertz method를 모방하여 사용하여 측정[4,17]하였다. Borate buffer 10 ml(pH 7.8)당 0.06 g의 fibrinogen을 넣어 37°C에서 약 2시간 동안 방치하여 완전히 녹인 후 여기에 20 unit의 thrombin을 투여하여 500 µl씩 eppendorf tube에서 제조하였다. 여기에 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 800 µl에 fibrin clot을 현탁 시킨 후 enzyme solution 100 µl를 첨가하여 30분 동안 37°C shaking incubator에서 반응시킨다. 반응후 10 분동안 얼음에서 반응을 멈추게 한 후 4°C에서 13000 rpm으로 20분동안 원심 분리한 후 상등액만으로 280 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

결과 및 고찰

탄소원의 영향

탄소원의 효소의 활성에 미치는 영향을 보기 위하여 0.5%의 yeast extract가 있는 배지에 fructose, galactose, glucose, lactose, malt extract, maltose, mannitol, sorbitol, sucrose corn starch, potato starch, soluble starch, wheat starch 등을 1% 첨가한 배지와 glucose를 2.5% 첨가하여 생산된 fibrinolytic enzyme의 활성을 측정하였다(Fig. 1). 그 결과 galactose, maltose, sorbitol, potato starch, soluble starch 등이 첨가 되었을 경우 탄소원의 첨가가 없을 때 보다 그 활성이 증가를 나타내었다. 이 중 maltose를 첨가 하였을 때 그 증가가 가장 뚜렷하였으며 maltose를 0~1.25%까지 농도를 조절하여 본 결과 0.5%에서 약 1.7배의 효율의 증가를 나타내었다(Fig. 2).

질소원의 영향

Extracellular enzyme의 생산에 있어 매우 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있는 질소원의 영향[3]을 확인하기 위하여 탄소원의 영향에서 얻어진 0.5%의 maltose만 있는 배지에 질소원으로 beef extract, casamino acid, gelatin, glycine, peptone, polypeptone, skim milk, defatted soybean, tryptone, yeast extract 등을 0.5% 첨가하여 그 활성을 본

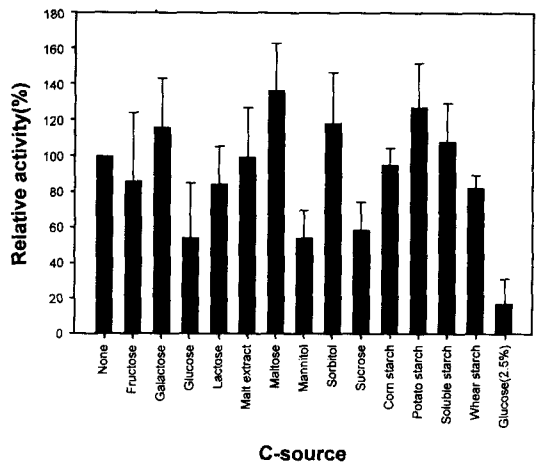


Fig. 1. Effect of carbon source on the production of fibrinolytic enzyme in *Bacillus* sp. 1% each carbon source was added.

배지 조성에 따른 *Bacillus* sp.의 혈전 용해효소 생산효과

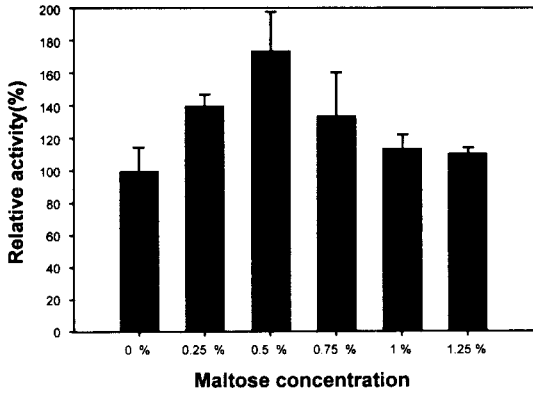


Fig. 2. Effect of Maltose concentration on the production of fibrinolytic enzyme in *Bacillus* sp. Various amount of maltose was added into the 0.5% yeast extract media.

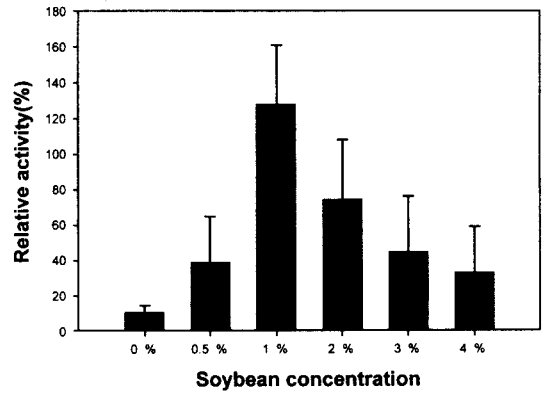


Fig. 4. Effect of soybean concentration on the production of fibrinolytic enzyme in *Bacillus* sp. Various amount of soybean was added into the 0.5% maltose media.

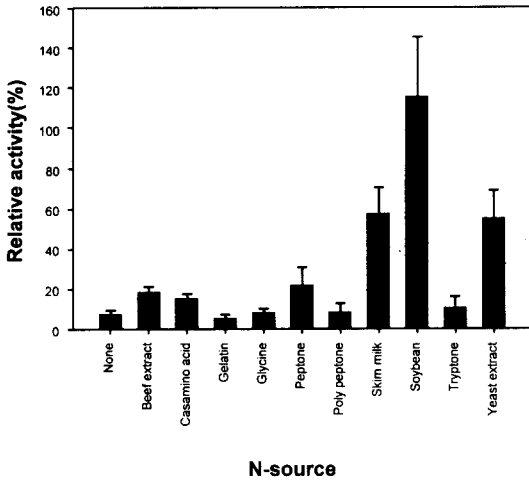


Fig. 3. Effect of nitrogen source on the production of fibrinolytic enzyme in *Bacillus* sp. 0.5% each nitrogen source was added.

결과 Fig. 3에서 볼수 있듯이 skim milk, defatted soybean, yeast extract 등이 첨가 되었을 때 활성의 증가를 볼 수 있다. 그 중 defatted soybean을 첨가하였을 때의 활성의 뚜렷한 증가를 나타내었으며 최적 농도를 얻기 위하여 0~4%까지 실험해본 결과 1%일 경우 0%보다 약 12배의 증가를 나타내었다(Fig. 4). 이 실험 결과는 *Bacillus stearo*

*thermophilus*와 *Streptomyces clavuligerus*로부터 protease 생산을 향상시켰다는 보고와 같은 경향을 나타내고 있다[6,13]. 본 연구에서 사용된 균은 NaCl 함량이 비교적 높은 식품인 젓갈에서 분리한 균으로서 NaCl에 대한 영향을 검토하기 위하여 탄소원과 질소원에 의한 혈전용해 생산에 관한 결과에서 얻어진 0.5%의 soybean과 1%의 maltose가 있는 배지에서 NaCl을 0%에서 20%까지를 조절하여 효소 생산에 내리는 영향을 보았다(Fig. 5). NaCl의 그 결과 2%

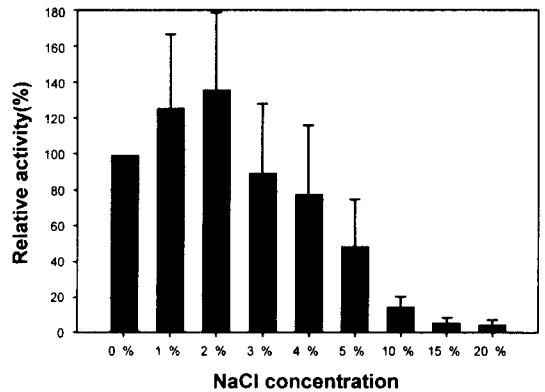


Fig. 5. Effect of NaCl concentration on the production of fibrinolytic enzyme in *Bacillus* sp. Various amount of NaCl was added into the control (0.5% maltose, 0.5% soybean).

까지는 활성이 증가하였으나 3%부터는 급격히 감소하는 경향을 나타내었다.

요 약

Bacillus sp.의 혈전용해효소 생산에 미치는 여러 가지 배지성분에 관한 영향을 조사하였다. 탄소원으로는 0.5%의 maltose가 가장 좋았으며 0.5%의 yeast extract만 있는 경우보다 1.7배의 증가를 나타내었다. 질소원으로는 1%의 soybean을 첨가하여 주었을 경우 0.5%의 maltose만 있는 경우보다 약 11배의 증가를 나타내었다. NaCl의 농도별 영향은 최적화되어 있는 탄소원과 질소원에 NaCl의 농도별 영향을 본 결과 2%가 최적 조건이었으며 효소의 안정성에도 별 영향을 미치지 않았다. 최적 배지의 조성은 1ℓ에 5 g maltose, 10 g defatted soybean, 20 g sodium chloride, 1.75 g K₂HPO₄ (pH 7.0)이었다.

감사의 글

논문 작성을 위해 많은 노력을 해주신 부경대학교 생물공학과 최선영 연구원과 박제현 군에게 감사를 드립니다. 본 연구는 1996년 교육부 학술 연구조성비(해양·수산과학분야)에 의하여 연구되었습니다.

참 고 문 헌

1. Abe, T., M. Kazama, T. Kinoshita, I. Naito, T. Ogushi, Y. Yoshimura, J. Teruya, and N. Shimizu. 1982. Shift of fibrinolysis system at oral administration of urokinase in human subjects ; Double blind cross over study. *Blood and Vessels(in Japanese)*, **13**, 472-479.
2. Astrup, t. and S. Müllertz. 1952. The fibrin plate method for estimating, fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**, 346-351.
3. Bascaran, V., C. Hardisson, and A. F. Brana. 1990. Regulation of extracellular protease production in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 208-213.
4. Kim Hyun-Kuk, Gu-Taek Kim, Dae-Kyung Kim, Won-A Choi, Sun-Hoon Park, Yong-Kee Jeong and In-Soo

- Kong. 1997. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated form fermented fish. *J. Ferment. Bioeng.*, **84**, 307-312.
5. Pennica, D., W. E. Holmes, W. J. Kohr, R. N. Harkins, G. A. Vehar, C. A. Ward, W. F. Bennett, E. Yelverton, P. H. Seeburg, H. L. Heyneker, D. V. Goeddel, and D. Collen. 1983. Cloning and expression of human tissue type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature*, **301**(20), 214-221.
6. Porto, A. L. F., G. M. Campos Takaki, and J. L. Lima Filho. 1996. Effects of culture cinditions on protease production by *Streptomyces clavulihurus* growing on soybean flour medium. *Appl. Biochem. Biotech.*, **60**, 115-122.
7. Reed, G. L., L. F. Lin, B. Parhami-Seren, and P. Kussie. 1995. Identification of plasminogen binding region in streptokinase that is necessary for the creation of functional streptokinase-plasminogen activator complex. *Biochemistry*, **34**, 10266-10271.
8. Sasaki, K., S. Moriyama, H. Sumi, N. Toki, and K. C. Robbins. 1985. The transport of ¹²⁵I-labeled human high molecular weight urokinase across the intestinal tract in a dog model with stiumulation of synthesis and/or release of plasminogen activators. *Blood*, **66**, 67-75.
9. Sumi, H., M. Maruyama, T. Yoneta, and H. Mihara. 1983. Activation of plasma fibrinolysis after intrarectal administration of high molecular weight urokinase and its derivative. *Acta. Haematol.*, **70**, 289-295.
10. Sumi, H., N. Toki, K. Sasaki, and K. C. Robbins. 1980. Oral adminstraion of urokinase. *Thromb. Res.*, **20**, 711-714.
11. Toki, N., H. Sumi, K. Sasaki, I. Boreisha, and K. C. Robbins. 1985. Transport of urokinase across the intestinal tract of normal human subjects with stimulation of syntehsis and/or release of urokinase-type proteins. *J. Clin. Invest.*, **75**, 1212-1222.
12. Voet, D. and J. G. Voet. 1990. pp.1087-1095. *Biochemistry*, Willy Press.
13. Wun, T. C., W. D. Schleuning, and E. Reich. 1982. Isolation and Characterization of urokinase from human plasma. *J. Biol. Chem.*, **257**, 3276-3283.
14. Yoshimitsu U. and H. Atsushi. 1994. Effects of culture conditions on growth and protease production of *Bacillus stearothermophilus* YG 185. *J. Chem. Eng. Japan*, **27**, 425-428.