

멸치액젓으로부터 분리한 *Bacillus subtilis* JM-3의 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성에 관한 연구

이상수 · 김상무 · 박옥연¹ · 김희연² · 신일식*

강릉대학교 해양생명공학부, ¹강원도립대학 식품생명과학과,
²한국식품의약품안전청 식품첨가물과

Studies on Proteolytic and Fibrinolytic Activity of *Bacillus subtilis* JM-3 Isolated from Anchovy Sauce

Sang-Soo Lee, Sang-Moo Kim, Uk-Yeon Park¹, Hee-Yun Kim² and Il-Shik Shin*

Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University

¹Department of Food and Life Science, Gangwon Provincial University

²Division of Food Additives, Korea Food and Drug Administration

This study was performed to search for potential microorganism that has rapid fermenting and physiological functions from anchovy sauce. We isolated three bacterial strains, JM-1, JM-2 and JM-3 with proteolytic and fibrinolytic activity from anchovy sauce. Among the 3 bacterial strains, JM-3 showed the strongest proteolytic and fibrinolytic activity. Bacterial strain JM-3 was gram-positive rod, motile and formed endospore. The 16S rRNA of bacterial strain JM-3 was amplified by PCR and then its sequence was determined by ABI 310 genetic analyzer. The 16S rRNA sequence of bacterial strain JM-3 was compared to BLAST DNA database and identified to *Bacillus subtilis* with 99% of homology. The optimum temperature, pH and NaCl concentration for growth of *B. subtilis* JM-3 were 40°C, 5.0 and 0%, respectively. The optimum temperature, pH and NaCl concentration for proteolytic and fibrinolytic enzyme production of *B. subtilis* JM-3 were same as optimum conditions for growth. At 20% of NaCl concentration which is common NaCl concentration of fish sauce, *B. subtilis* JM-3 showed about 60% of proteolytic and fibrinolytic activity of 0% NaCl concentration. From above results, we found that *B. subtilis* JM-3 will be able to used for starter of functional fish sauce.

Key words: anchovy sauce, proteolytic activity, fibrinolytic activity, *Bacillus subtilis* JM-3

서 론

최근 조사된 현대인의 사망 원인별 분석자료⁽¹⁾에 의하면 혈관 내 장애에 의한 사망률이 1위를 차지하고 있으며, 우리나라의 경우 또한 국민소득의 향상과 식생활 문화의 서구화에 따라 혈관 장애에 의한 사망률이 1위를 차지하고 있다. 혈관 장애에 의한 질환으로는 뇌졸중(中風)과 심부전증 등이 대표적으로 알려져 있으며, 그 원인으로는 고혈압과 동맥경화가 직접적인 원인으로 보고⁽²⁾되고 있다. 특히 뇌졸중(中風)은 현재 우리나라의 중·장년층에서 많이 발생하고 있으며 이로 인하여 많은 사람들이 사망에 이르거나 불구가 되고 있

는 실정이다. 우리 인체는 생체 내에서 일어나는 크고 작은 상처들에 의한 혈액의 손실을 방지하기 위한 방어 수단으로 혈전(Fibrin)을 생성하게 되는데 이렇게 생성된 혈전의 일부가 상처복구 후에도 분해 되지 않고 혈관을 순환하게 된다. 혈관내의 잉여(剩餘) 혈전들은 뇌혈관과 같은 아주 작은 모세혈관 벽에 침착하여 혈액의 흐름을 방해함으로써 뇌 조직으로의 원활한 영양분 및 산소의 공급을 차단하게 되고, 이로 인하여 동맥벽이 변성을 일으켜 동맥압을 이겨내지 못하고 파열되면, 뇌졸중에 의한 반신불수 또는 직접적인 사망의 원인으로 작용하게 된다. 이러한 잉여 혈전의 생성을 사전에 억제하거나, 혈관 벽에 침착된 혈전을 제거하기 위한 수단으로 지렁이의 건조분말⁽³⁾, 뱀의 독⁽⁴⁾ 그리고 거머리⁽⁵⁾와 같은 벌레 등이 가지고 있는 혈전 용해물질의 분리에 관한 연구들이 수행되어 왔으며, 최근에는 전통발효식품과 같은 새로운 분리원으로부터 혈전의 억제·용해물질들의 분리에 대한 연구^(6,7)가 활발하게 진행되고 있다.

액젓은 신선한 선어(鮮魚)를 염장하여 자가소화 효소 및

*Corresponding author : Il-Shik Shin, Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University, 123 Chibyundong, Gangneung, Gangwondo 210-702, Korea
Tel: 82-33-640-2346
Fax: 82-33-640-2410
E-mail: shinis@kangnung.ac.kr

미생물의 작용에 의하여 원료가 분해·숙성된 액상의 전통 발효식품으로, 독특한 맛과 영양이 풍부하여 예로부터 간장 대용, 김치의 부재료나 조미료로 널리 사용되어 왔다. 숙성 기간 중 미생물 기원의 효소작용에 의하여 어육단백질이 여러 형태의 peptide로 분해 되어 액젓의 풍미를 향상시킬 뿐만 아니라 항암, 혈압강하, 혈청콜레스테롤 강하, 면역증강 그리고 칼슘 흡수의 촉진 등과 같은 광범위한 생리활성기능을 가지는 것으로 보고 되고 있다⁽⁸⁾. 이에 액젓 숙성 중에 생성되는 peptide의 생리활성기능에 관한 많은 연구 결과들이 보고 되고 있으며, 이 등⁽⁹⁾은 액젓의 숙성에 관여하는 미생물의 특성에 대하여서도 보고한 바 있다. 이러한 일련의 연구들은 액젓을 비롯한 전통발효식품 중에는 미지의 생리활성 기능을 가지는 물질들이 다량 존재한다는 것을 보여주고 있으나, 액젓 산업은 인스턴트식품의 보급과 화학조미료의 개발 등으로 인하여 그 규모가 작아지고 있는 추세⁽¹⁰⁾이며, 숙성기간의 장기화와 지속적인 저장·관리 또한 액젓 제조산업의 경제성을 저하시키는 원인으로 작용하고 있어, 액젓 제조공정의 획기적인 전환을 요구하고 있다. 이에 장기간을 요하는 액젓의 숙성기간을 단축하기 위하여 단백질 분해효소를 액젓에 첨가하거나 단백질 분해활성이 우수한 미생물을 starter로 첨가하는 연구 보고들이 있었다^(11,12). 그러나 이러한 연구들은 재래식 방법에 의하여 숙성된 액젓에 비하여 쓴맛을 가지며, 액젓의 염농도가 20% 이상에 달함으로써 첨가된 미생물의 성장이 저해되는 단점이 있다.

이에 본 연구에서는 멸치액젓의 숙성발효 및 혈전 용해 활성과 같은 생리활성기능을 부여한 신 개념의 멸치액젓을 제조할 목적으로 상업적으로 이용 가능한 기능성 멸치액젓 제조용 starter를 분리하고자 전통발효식품의 하나인 멸치액젓으로부터 강력한 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성을 동시에 가지는 균주를 분리하여, 최적 성장 조건 및 최적 효소 생산 조건 등을 조사하였으며, 분리균주들의 동정은 형태학적, 배양학적 특징 및 PCR을 이용한 16S rRNA의 염기서열을 분석⁽¹³⁻¹⁵⁾하여 동정하였다.

재료 및 방법

시료

단백질 분해활성과 혈전 용해 활성을 가지는 균주의 분리를 위하여 강원도 속초시에 위치한 풍미(株)에서 생산·시판하고 있는 1년, 3년 그리고 5년 숙성한 멸치액젓을 사용하였다. 시료의 채취는 풍미(株)의 저장 탱크로부터 무균적으로 직접 채취하였으며, 5°C 이하의 냉장함에 넣어 실험실로 운반하여 즉시 실험에 사용하였다.

균주의 분리 및 배양

1, 3 그리고 5년간 숙성한 멸치액젓으로부터 다음과 같은 방법으로 단백질 분해활성이 있는 균주를 분리하였다. 2% skim milk(Difco Co., USA)를 첨가한 DeMan, Rogosa, Sharpe(이하 MRS, Difco Co., USA) 한천배지에 멸치액젓 100 µL를 도말평판법으로 접종하고 27.5°C에서 48 시간 배양한 후, 단백질 분해활성이 있는 3균주를 분리하여 각각 JM-1, JM-2 그리고 JM-3라고 명명하였다. 이렇게 분리된 균주

들을 MRS 액체배지에서 24시간 이상 배양한 후에 배양액과 glycerol을 4:1이 되게 혼합하고 멸균된 2 mL vial tube에 분주하여 -85°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

분리균주의 형태학적 및 생화학적 특성

분리균주 JM-1, JM-2 그리고 JM-3를 Brain heart infusion(이하 BHI, Difco Co., USA) 액체배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후에 hanging drop method에 의해 현미경을 통하여 운동성을 직접 관찰하였고, gram 염색을 통하여 균의 형태 및 염색여부를 관찰하였으며, malachite green 용액을 가하여 60초간 중탕한 후에 포자형성의 유·무를 관찰하였다. 분리균주들의 catalase test, glucose로부터 가스 생성 여부, indole 생성, ONPG, Gelatin 액화성, citrate의 이용 여부, urea의 이용 여부, esculin 분해 여부, VP reaction, Nitrate reduction 등은 A.P.H.A.의 방법⁽¹⁶⁾에 따라 실시하였으며, 당의 이용에 관한 실험은 API kit(API 50 CHB, Bio Merieux Co., France)를 사용하여 관찰하였다.

분리균주의 동정

숙성 멸치액젓으로부터 분리한 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성을 가지는 분리균주 JM-1, JM-2 그리고 JM-3를 다음과 같은 방법으로 동정하였다.

분리균주의 DNA 추출: BHI 액체배지에서 배양한 각 균들을 4,000×g, 10분간 원심 분리하여 균체를 모으고, 그 pellet을 TE buffer에 현탁한 후 40 µL의 lysozyme을 첨가하여 30°C에서 30분간 반응시키고, 이후 절차는 Bioneer의 AccuPrep TM Genomic DNA extraction Kit를 이용하여 DNA를 추출하였다.

추출된 DNA의 PCR: PCR 반응은 DNA thermal cycler(Perkin Elemer Co., USA)를 사용하여 수행하였으며, 6F(5'GRAGTTTGATCMTGGC: corresponding to positions 6 to 23 of *Escherichia coli* 16s rRNA)와 1492R(3'GGTTACCTTGTTACGACTT: corresponding to positions 1474 to 1492 of *E. coli*)를 primer로 사용하였다⁽¹⁴⁾.

반응 조건은 94°C에서 1분간 denaturation, 53°C에서 2분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension, 이러한 반응을 1회로 하여 30회 실시하였다. PCR products는 전기영동(agarose gel)을 통하여 분리, 정제하였다.

16S rRNA 유전자의 염기 서열 분석: 분리, 정제한 PCR product의 염기서열을 분석하기 위하여 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Perkin Elemer Co., USA)로서 sequencing reaction을 실시하였다. 미리 준비하여 둔 PCR mixture를 thermal cycler(GeneAmp PCR System 2400)에 넣고 96°C(10 sec), 50°C(5 sec), 60°C(4 min)를 1회로 하여 25회 실시하였다. Sequencing 과정은 ABI 310 genetic analyzer의 protocol에 따라서 실시하였다.

16S rRNA sequence의 비교 및 동정: 각 균주의 16S rRNA sequence를 National Center for Biotechnology Information(이하 NCBI)에서 제공하는 BLASTIN 2.0(BLAST DNA database search service, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)의 유전자 database와 비교 분석하여 균을 동정하였다.

단백질 분해활성 측정

단백질 분해활성이 있는 균주들을 BHI 액체배지에 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후, 3,000×g, 20분간 원심 분리하여 cell을 제거하고, 그 상청액만을 시료로 사용하였다. 2% skim milk를 첨가한 BHI 한천배지의 평판 중앙에 멸균 disk paper(지름 8 mm)를 올려놓고 시료 40 μL를 분주하여 37°C에서 48시간 배양한 후에 형성된 투명한 크기로 그 활성의 정도를 비교하였다. 양성 대조구는 한국생명공학연구원 유전자은행으로부터 분양 받은 단백질 분해활성을 지닌 *Bacillus subtilis* ATCC 6633을 사용하였고, 음성 대조구는 멸균 BHI 액체배지를 시료와 동량 사용하였다.

혈전 용해 활성 측정

Fibrin(혈전) 용해 활성은 Astrup 등⁽¹⁷⁾의 방법을 일부 수정한 방법에 의해 측정하였다. Fibrinogen을 0.3%가 되도록 10 mM 인산완충용액(pH 8.0)에 완전히 용해시키고, 이 fibrinogen 인산완충용액 10 mL를 평판에 붓고, 45°C로 유지된 1% 멸균한천용액을 동량 첨가하여 충분히 혼합 후, thrombin 100 units(Sigma Co., USA)를 첨가하였다. 이를 상온에서 1시간 정도 방치하여 고화된 fibrin 평판에 적정수의 구멍(지름 2 mm)을 뚫은 후 단백질 분해활성 실험에 사용한 것과 동일한 시료 50 μL를 분주하여 37°C에서 10시간 배양한 후 형성되는 투명한 크기로 활성의 정도를 비교하였다.

양성 대조구는 대표적인 혈전 용해제인 plasmin(1.0 U/mL, Sigma Co., USA)을 사용하였고, 음성 대조구는 멸균 BHI 액체배지를 시료와 동량 사용하였다.

$$\text{혈전 용해 활성(\%)} = \frac{\text{시료의 용해영역}}{\text{plasmin의 용해영역}} \times 100$$

***B. subtilis* JM-3의 최적 성장조건**

온도: *Bacillus subtilis*로 동정된 분리균주들 중 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성이 가장 강하였던 *B. subtilis* JM-3를 BHI 액체배지(2% NaCl, pH 7.0)에 접종하여 37°C에서 18시간 전배양 하였다. 동일 배지 100 mL에 전배양액 100 μL씩을 분주하여 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 그리고 50°C의 각 온도에서 48시간 배양시킨 후 흡광도(500 nm)를 측정하여 생육 상태를 비교 관찰하였다.

pH: *B. subtilis* JM-3의 전배양액 100 μL를 pH 4, 5, 6, 7, 8 그리고 9로 조절된 BHI 액체배지 100 mL에 접종하여 37°C에서 48시간 배양시킨 후 흡광도(500 nm)를 측정하여 생육 상태를 비교 관찰하였다.

최적 성장 식염농도: *B. subtilis* JM-3의 전배양액 100 μL를 NaCl이 각각 0%, 3%, 6%, 9%, 12%, 15% 그리고 20% 함유된 BHI 액체배지 100 mL에 접종하여 37°C에서 30일간 배양하면서 5일 간격으로 흡광도(500 nm)를 측정하여 생육 상태를 비교 관찰하였다.

***B. subtilis* JM-3의 단백질 분해효소 및 혈전 용해효소 최적 생산조건**

온도: *B. subtilis* JM-3를 BHI 액체배지(2% NaCl, pH 7.0)에 접종하여 37°C에서 18시간 전배양 하였다. 동일 배지

100 mL에 전배양액 100 μL씩을 분주하여 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 그리고 50°C의 각 온도에서 48시간 배양시킨 후 3,000 ×g, 20분간 원심분리 하였다. 원심 분리한 배양 상청액을 0.2 μm의 membrane filter로 여과 멸균하여 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성 측정하였다.

pH: *B. subtilis* JM-3의 전배양액 100 μL를 pH 4, 5, 6, 7, 8 그리고 9로 조절된 BHI 액체배지(2% NaCl) 100 mL에 접종하여 37°C에서 48시간 배양시킨 후 3,000×g, 20분간 원심분리 하였다. 원심 분리한 배양 상청액을 0.2 μm의 membrane filter로 여과 멸균하여 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성 측정하였다.

식염농도: *B. subtilis* JM-3의 전배양액 100 μL를 NaCl이 각각 0%, 3%, 6%, 9%, 12%, 15% 그리고 20% 함유된 BHI 액체배지(pH 7.0) 100 mL에 접종하여 37°C에서 30일간 배양시키면서 5일 간격으로 흡광도를 측정하여, 흡광도가 0.8~0.9 범위에 도달한 실험구의 배양액을 3,000×g, 20분간 원심분리 하였다. 원심 분리하다 배양 상청액을 0.2 μm의 membrane filter로 여과 멸균하여 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성 측정하였다.

결과 및 고찰

형태학적 특성 및 생화학적 특성

1, 3 그리고 5년 간 숙성한 멸치액젓으로부터 2% skim milk를 첨가한 MRS 한천배지를 이용하여 단백질 분해활성을 가지는 3 종의 균주(bacterial strain JM-1, JM-2, JM-3)를 분리하였으며, 분리균주들의 형태학적 특성 및 생화학적 특성을 Table 1에 나타내었다.

3균주 모두 Gram-positive의 단간균으로서 내생포자를 형성하며, 운동성이 있었다. Colony는 우윳빛의 불규칙한 cream 형태로 평판에 넓게 퍼져 자라는 것을 관찰할 수 있었다. ONPG와 indole 음성으로 나타났으며, citrate를 이용하고, decarboxylase와 urease 그리고 oxidase는 생산하지 않는 반면에 catalase와 gelatinase는 생산하는 것으로 나타났다. 당의 이용은 D-glucose, L-arabinose, D-xylose, D-mannitol를 이용하여 산을 생산하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 분리균주 JM-1, JM-2 그리고 JM-3는 모두 *Bacillus* 속으로 추정⁽¹⁸⁾되었으며, 동정을 위해서 PCR을 이용하여 분리균주의 16S rRNA의 염기서열을 분석, NCBI에서 제공하는 BLASTN 2.0 프로그램을 이용하여 동정을 시도하였다.

분리균주의 동정

Bacillus sp. JM-1, JM-2 그리고 JM-3를 동정하기 위하여 16S rRNA의 염기서열을 분석한 결과 3균주 모두 동일한 염기서열을 가지는 것으로 나타났으며, 그 중 *Bacillus* sp. JM-3의 염기서열을 Fig. 1에 나타내었다.

16S rRNA sequence를 NCBI에서 제공하는 BLAST DNA database search service(BLASTN 2.0)를 이용하여 비교, 분석한 결과 *Bacillus* sp. JM-1, JM-2 그리고 JM-3 모두 *Bacillus subtilis*와 100%의 상동성을 보이는 근연종으로 나타났다. 이 결과를 토대로 멸치액젓에서 분리한 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성 가지는 *Bacillus* sp. JM-1, JM-2, JM-3 세 균

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of bacterial strain JM-1, JM-2 and JM-3 with those of *B. subtilis* and *B. pumilis*

Characteristics	JM-1	JM-2	JM-3	<i>B. subtilis</i> ¹⁾	<i>B. pumilis</i> ¹⁾
Isolation	3 ¹⁾	1 ¹⁾	1 ¹⁾		
Gram stain	+ ²⁾	+	+	+	+
Form	rod	rod	rod	rod	rod
Spore	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+
Oxidase	- ²⁾	-	-	-	-
Catalase	+ ³⁾	+	+	+	+
ONPG	-	-	-	-	-
Esculin	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	-
Gas production on glucose	-	-	-	-	-
Citrate utilization	+	+	+	+	+
Gelatinase production	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	-
Acid from L-arabinose	+	+	+	+	+
D-xylose	+	+	+	+	+
D-mannitol	+	+	+	+	+
D-glucose	+	+	+	+	+

¹⁾Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

²⁾Negative.

³⁾Positive.

<i>B. subtilis</i> JM-3:	1	ggcgtcctaatacatgcaagtcgagcggacagatggagctgctccctgatgttagcg	60
<i>B. subtilis</i> KL-077:	31	ggcgtgctaatacatgcaagtcgagcggacagatggagctgctccctgatgttagcg	90
<i>B. subtilis</i> JM-3:	61	gcgacgggtgagtaacacgtgtaacctgctgtaagactgggataactccggaaac	120
<i>B. subtilis</i> KL-077:	91	gcgacgggtgagtaacacgtgtaacctgctgtaagactgggataactccggaaac	150
<i>B. subtilis</i> JM-3:	121	cgggcctaatacgggatggtttgaaaccgatggtcaacataaaaggctcctcg	180
<i>B. subtilis</i> KL-077:	151	cgggcctaatacgggatggtttgaaaccgatggtcaacataaaaggctcctcg	210
<i>B. subtilis</i> JM-3:	181	ctaccactacagatgacccgcgccgcatgtagtggtagtaacgctcaccac	240
<i>B. subtilis</i> KL-077:	211	ctaccactacagatgacccgcgccgcatgtagtggtagtaacgctcaccac	270
<i>B. subtilis</i> JM-3:	241	ggcaacgatcgtagccgactgagaggtgatcgccacactgggactgagacacggcc	300
<i>B. subtilis</i> KL-077:	271	ggcaacgatcgtagccgactgagaggtgatcgccacactgggactgagacacggcc	330
<i>B. subtilis</i> JM-3:	301	cagactcctacggaggcagcagtagggaattctccgaatggacaaagtctgacggag	360
<i>B. subtilis</i> KL-077:	331	cagactcctacggaggcagcagtagggaattctccgaatggacaaagtctgacggag	390
<i>B. subtilis</i> JM-3:	361	caaccccgctgagtgatgaagtttccgatcgtaaagctctgttttaggaagaaca	420
<i>B. subtilis</i> KL-077:	391	caaccccgctgagtgatgaagtttccgatcgtaaagctctgttttaggaagaaca	450
<i>B. subtilis</i> JM-3:	421	agtaccgttcgaataggcggctaccttgacggtacacccaagaagccacggctaacta	480
<i>B. subtilis</i> KL-077:	451	agtaccgttcgaataggcggctaccttgacggtacacccaagaagccacggctaacta	510
<i>B. subtilis</i> JM-3:	481	cgtagc 485	
<i>B. subtilis</i> KL-077:	511	cgtagc 515	

Fig. 1. 16S ribosomal RNA gene, partial sequence of *B. subtilis* JM-3 *B. subtilis* KL-077.

Length=1501, Score=961 bits (485), Identities=485/485 (100%).

주 모두 *Bacillus subtilis*로 동정되었다.

단백질 분해활성 측정

2% skim milk를 함유한 MRS 한천배지에서 분리균주들의

단백질 분해활성을 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. *B. subtilis* JM-1과 JM-2에서는 직경 15 mm와 17 mm의 투명환을 관찰할 수 있었으며, *B. subtilis* JM-3는 직경 20 mm로 가장 넓게 나타나 가장 강한 단백질 분해활성을 나타내었다.

혈전 용해 활성 측정

단백질 분해활성을 지닌 분리균주들의 혈전 용해 활성 조사한 결과를 Table 2와 Fig. 3에 나타내었다. *B. subtilis* JM-1, JM-2 그리고 JM-3 모두에서 투명환을 관찰할 수 있었으며, 그중 *B. subtilis* JM-3에서 가장 넓은 투명환이 관찰되어 혈전 용해 활성 가장 강력함을 알 수 있었다. *B. subtilis* JM-1의 혈전 용해 활성(%)은 plasmin 1.0 U/mL의 60%에 해당하는 fibrin 분해활성을 나타낸 반면, *B. subtilis* JM-2와 JM-3는 90%와 110%로 plasmin과 거의 같은 활성을 보였다. 더욱이 본 실험에서 확인된 분리균주들의 혈전 용해 활성 정제되지 않은 배양액을 그대로 사용하여 얻어진 결과로서 앞으로 분리·정제된 효소를 사용한다면 보다 높은 혈전 용해 활성 나타낼 것으로 사료된다.

***B. subtilis* JM-3의 최적 성장조건**

숙성 멸치액젓으로부터 분리한 균주 중 단백질 분해활성 및 혈전 용해 활성이 제일 강하였던, *B. subtilis* JM-3의 최적 성장 온도와 pH를 조사한 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

20°C 이하의 온도에서는 느린 성장을 보였으나, 25°C 이상의 온도에서는 온도가 증가함에 따라 성장속도가 빨라지는 경향을 나타내었다. 최적성장 온도는 일반적인 *Bacillus* 속의 최적 성장온도인 30~37°C보다는 조금 높은 40°C로 나타났다.

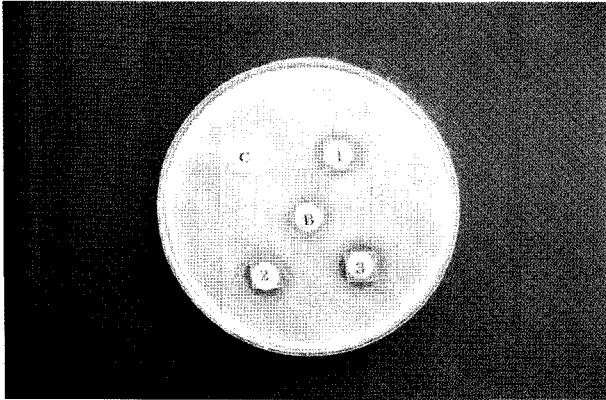


Fig. 2. Proteolytic activity of *B. subtilis* JM-1, JM-2 and JM-3 in skim milk plate at 37°C for 48 h.

C: BHI broth (negative control).
 B: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (positive control).
 1: *B. subtilis* JM-1.
 2: *B. subtilis* JM-2.
 3: *B. subtilis* JM-3.

Table 2. The fibrinolytic activity of *B. subtilis* JM-1, JM-2 and JM-3 isolated from anchovy sauce

Sample	Relative activity (%)
<i>B. subtilis</i> JM-1	60
<i>B. subtilis</i> JM-2	90
<i>B. subtilis</i> JM-3	110
Plasmin (positive control)	100
BHI broth (negative control)	0

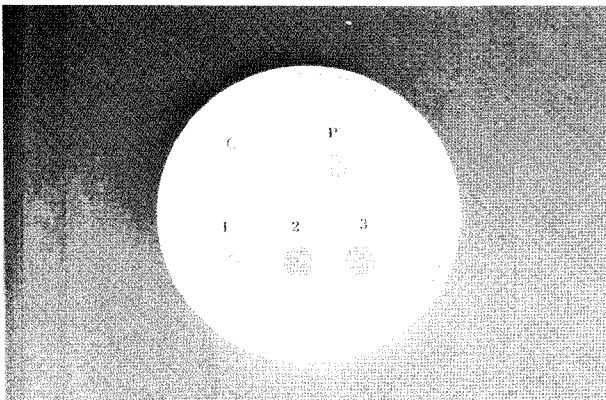


Fig. 3. Fibrinolytic activity of *B. subtilis* JM-1, JM-2 and JM-3 in fibrin plate at 37°C for 10 h.

C: BHI broth (negative control).
 P: Plasmin 1.0 U/mL (positive control).
 1: *B. subtilis* JM-1.
 2: *B. subtilis* JM-2.
 3: *B. subtilis* JM-3.

이는 최 등⁽¹⁹⁾의 발효 대두로부터 분리된 단백질 분해활성을 가지는 *B. subtilis*의 최적 성장온도가 37~40°C 사이였다는 보고와 길 등⁽²⁾에 의하여 청국장에서 분리된 혈전 용해효소 생산 *Bacillus* sp. KP-6408의 최적 성장온도가 40°C이었다는 보고와 유사하게 나타났다.

B. subtilis JM-3는 pH 5부근에서 가장 빠른 성장을 보였

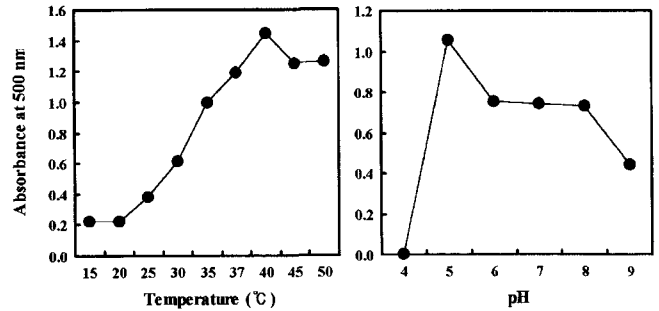


Fig. 4. Optimum growth temperature and pH of *B. subtilis* JM-3 isolated from anchovy sauce.

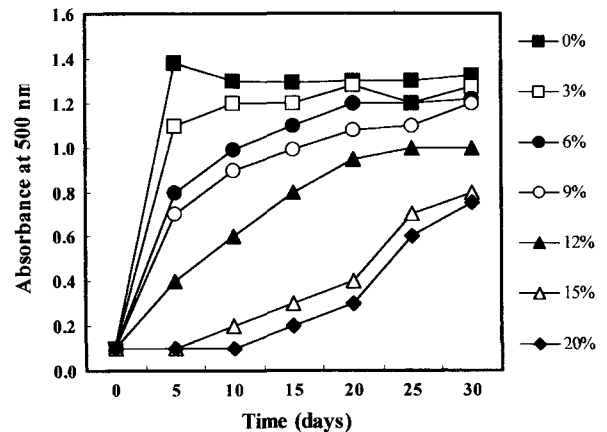


Fig. 5. Optimum growth NaCl concentration of *B. subtilis* JM-3 isolated from anchovy sauce.

으며, pH 4 이하에서는 성장이 불가능하였고, pH 9 이상의 알칼리 조건에서는 성장에 저해를 받는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 지금까지 보고된 protease를 생산하는 여러 *Bacillus* 속의 성장조건으로 알려진 중성 부근 혹은 약알칼리였다는 보고들^(9,20)과는 다소 상이한 pH 특성을 나타내었다.

B. subtilis JM-3의 최적 성장 식염농도를 조사한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. *B. subtilis* JM-3는 식염을 첨가하지 않은 실험구에서 가장 양호하게 성장하였으며, 식염 12% 첨가구까지는 성장의 저해는 없었으나, 12% 이상의 농도에서는 배양 10일까지 성장의 저해를 보였다. 그러나 배양시간이 경과함에 따라서 잘 적응하여, 배양 종료시점인 30일 경과 후에는 20%의 식염 첨가구에서도 식염을 첨가하지 않은 실험구의 약 60%까지 성장하였다.

B. subtilis JM-3의 단백질 분해효소 및 혈전 용해효소 최적 생산조건

온도: *B. subtilis* JM-3의 단백질 분해효소 및 혈전 용해효소 생산에 미치는 온도의 영향을 Fig. 6에 나타내었다. 15~50°C에서 배양한 모든 실험구에서 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성 보였으며, 40°C에서 가장 강력한 활성을 나타내었다.

pH: *B. subtilis* JM-3의 단백질 분해효소 및 혈전 용해효소 생산에 미치는 pH의 영향을 Fig. 7에 나타내었다. pH 4를 제외한 pH 5~9에서 배양한 실험구에서 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성 보였으며, pH 5에서 가장 강력한 활성을 나

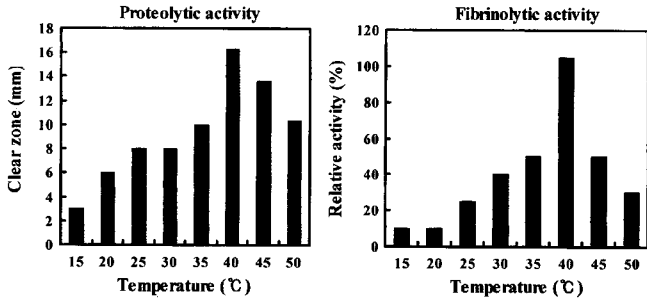


Fig. 6. Optimum temperature for the proteolytic and fibrinolytic enzyme production of *B. subtilis* JM-3.

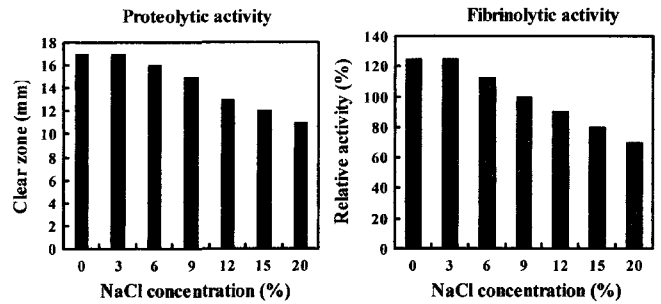


Fig. 8. Optimum NaCl concentration for the proteolytic and fibrinolytic enzyme production of *B. subtilis* JM-3.

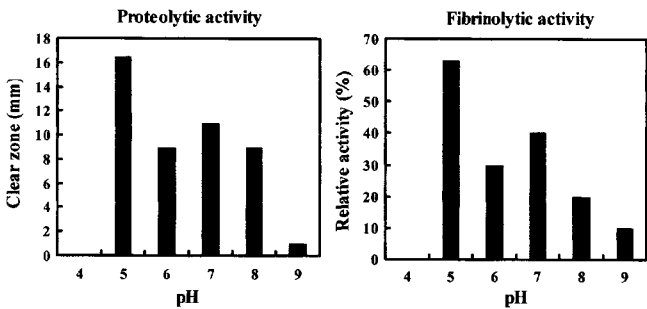


Fig. 7. Optimum pH for the proteolytic and fibrinolytic enzyme production of *B. subtilis* JM-3.

타내었다.

식염농도: *B. subtilis* JM-3의 단백질 분해효소 및 혈전 용해효소 생산에 미치는 식염농도의 영향을 Fig. 8에 나타내었다. 식염농도 0~20%에서 배양한 모든 실험구에서 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성 보였으며, 식염을 첨가하지 않은 실험구에서 가장 강력한 활성을 나타내었으나 멸치액젓의 일반적인 염농도인 NaCl 20%에서도 식염을 첨가하지 않은 실험구의 약 60%의 활성을 나타내었다.

이상의 결과로 볼 때, *B. subtilis* JM-3의 단백질 분해효소 및 혈전 용해효소 생산의 최적온도는 40°C, 최적 pH는 5 그리고 식염농도 0% 이었다. 이러한 결과는 *B. subtilis* JM-3의 최적 성장조건과 일치하는 것으로, 대부분의 미생물이 생산하는 효소활성에 관한 연구들⁽²¹⁾의 최적 성장조건과 최대 효소 생산 범위는 크게 차이가 나지 않는다는 보고⁽²²⁾들과 같은 경향을 보이는 것으로 나타났다. 그러나 Kamal 등⁽²³⁾의 *B. subtilis*가 생산하는 subtilisin의 특성을 파악한 연구에서는 최대 효소 생산 범위가 40°C, pH는 7부근 이었다는 보고와 안 등⁽²⁴⁾의 *B. subtilis*가 생산하는 protease의 최적 생산 조건은 40°C와 pH 12.5 이었다는 보고 등과 비교하였을 때, 최적 효소 생산 온도는 일치하였으나, *B. subtilis* JM-3의 최적 효소 생산 pH는 5 부근으로 상대적으로 낮은 값을 보였다. 대부분의 *Bacillus* sp.이 생산하는 단백질 분해효소는 중성이나 염기성 조건에서 단백질 분해효소의 최적 생산이나 최대 효소 활성을 가지는 alkaline protease로 알려져 있다⁽²⁵⁻²⁷⁾. 이에 반하여 *B. subtilis* JM-3의 최적 성장과 최대 단백질 분해효소 생산 조건은 약산성인 pH 5로서 대단히 특이적인 것으로 사료된다. 멸치액젓은 숙성 초기에는 단백질 분해활성이 강력

한 균들이 대량 증식하면서 어육단백질의 분해가 빠르게 진행되지만 숙성이 진행되면서 유산균과 효모류의 성장에 의하여 멸치액젓의 pH가 낮아져 그 성장이 저해 받게 되는데 이는 멸치액젓의 숙성 기간을 장기화시키는 여러 요인 중의 하나로 작용하고 있다. 그러나 *B. subtilis* JM-3는 단백질 분해효소의 최적 생산조건이 pH 5로서 숙성 멸치액젓의 starter로서의 매우 유리한 조건이라 할 수 있을 것이다. 혈전 용해효소의 생산 또한 단백질 분해효소의 생산 조건과 같은 pH 5에서 최대의 생산능을 가짐으로서 숙성 멸치액젓의 제조와 더불어 혈전 용해능을 가지는 기능성식품 개발의 가능성을 제시하고 있다. 최근 우리나라의 청국장⁽²⁾ 및 일본의 전통 발효 식품의 하나인 Natto로부터 혈전 용해 활성 가지는 균주를 분리하였으며⁽²⁸⁾, 이 균주가 생산하는 nattokinase가 장내 흡수되어 혈전 용해능을 높이는 것으로 보고 되고 있으나 섭취시 위를 통과해야 하므로 장내 흡수에 대한 논란이 많다. 앞으로 *B. subtilis* JM-3가 생산하는 혈전 용해효소의 분리 정제를 통하여 혈전 용해효소의 특징이 규명된다면 다양한 혈전 용해제로서의 가능성 또한 기대할 수 있을 것이다.

식염 첨가량에 따른 *B. subtilis* JM-3의 성장 및 단백질 분해효소 및 혈전 용해효소 생산은 배양 초기에는 식염농도 12% 이상의 첨가구에서 성장 저해를 보였지만, 30일간의 장기 배양 결과 멸치액젓의 일반적인 식염농도인 20%의 식염첨가구에서도 식염 무첨가구의 약 60%의 성장 및 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성 나타내었다. 최근 5~10% 수준의 저식염농도의 멸치액젓 제조 방법이 계속적으로 개발되고 있으며^(11,29,30), 숙성 멸치액젓 또한 3~6개월의 숙성기간을 요함으로, 숙성 초기에 성장이나 효소 생산의 지연은 멸치액젓 starter로서 문제가 되지 않는 것으로 사료된다.

본 연구를 통하여 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성 가장 우수했던 *B. subtilis* JM-3의 기능성 멸치액젓 제조용 starter로서 가능성이 확인되었으며, 앞으로 본 균주의 대량배양기술과 경제적인 효소의 분리 및 정제기술이 확립된다면 기존의 단백질 분해효소와 혈전 용해제들이 갖고 있는 단점인 고가의 제품 대신 저가의 새로운 효소개발이나 혈전 용해제의 개발이 가능할 것으로 기대된다. 그리고 앞으로 본 균주의 멸치액젓 starter로서의 이용을 극대화하기 위하여서는 돌연변이에 의한 호염성 변이주의 유전적 육종⁽³¹⁾이나 형질 전환 방법 등을 응용한 호염성 미생물과의 접목을 통한 내염성 균주의 개발도 필요할 것으로 여겨진다.

요 약

숙성 발효 및 기능성 멸치액젓의 제조에 사용할 수 있는 미생물 starter의 개발을 목적으로 1, 3 그리고 5년 숙성한 멸치액젓으로부터 단백질 분해활성 및 혈전 용해 활성 우수한 균주를 분리, 동정하였고, 분리균주들 중 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성 가장 강하였던 *B. subtilis* JM-3의 최적 성장 조건과 단백질 분해효소 및 혈전 용해효소 최적 생산조건들을 조사하였으며, 그 결과를 요약하면 다음과 같다. 1, 3 그리고 5년 숙성한 멸치액젓으로부터 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성 가지는 3균주를 분리하였으며, 분리균주 JM-1, JM-2 그리고 JM-3는 모두 *Bacillus subtilis*로 동정되었다. 분리균주들 중 가장 강력한 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성 나타낸 *B. subtilis* JM-3의 최적 성장조건은 40°C, pH 5.0 그리고 NaCl를 첨가하지 않았을 때 성장이 가장 좋은 것으로 나타났다. *B. subtilis* JM-3의 단백질 분해효소 및 혈전 용해효소 최적 생산 조건은 최적 성장 조건과 일치하는 것으로 나타났다. 또한 멸치액젓의 일반적인 염농도인 NaCl 20% 첨가구에서도 식염 무첨가구의 약 60%의 활성을 나타내어 *B. subtilis* JM-3의 멸치액젓의 starter로서의 충분한 이용 가능성을 나타내었다.

참고문헌

1. Korea National Statistical Office. A study on causes of death for 1999 (2000)
2. Kil, O.K., Kim, G.N. and Park, I.S. Production and characterization of fibrinolytic enzyme: optimal condition for production of the enzyme from *bacillus* sp. KP-6408 isolated from chungkook-jang (in Korean). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 51-56 (1988)
3. Nakajima, N., Mihara, H. and Sumi, H. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1730-1734 (1993)
4. Kim, D.S., Choi, H.L. and Youm, Y.N. Purification and properties of snake venom phosphodiesterase from *Agkistrodon halys* (in Korean). J. Korean Biochem. 24(1): 71-77 (1991)
5. Lee, S.K., Lee, S.G. Son, J.H. Choi, Y.S. 1993. Screening and purification of anticoagulant proteins from Korea leeches (in Korean). J. Korean Agric. Chem. Soc. 26(3): 228-233 (1993)
6. 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. Experimentia. 43: 1110-1111 (1987)
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. Vol. 112B 3: 543-547 (1995)
8. Park, J.O., Yoon, M.S. Cho, E.J. Kim H.S. and Ryu, B.H. Anti-oxidant effects of fermented anchovy (in Korean). Korean J. Food Sci. Technol. 31: 1378-1385 (1999)
9. Lee, Y.J., Cho, Y.J. Son, K.M. and Choi, C. Characterization of alkaline protease produced by *Bacillus* sp. CW-1121 (in Korean). Korean J. Biotechnol. Bioeng. 24: 537-542 (1991)
10. Korea National Statistical Office. Quantities of production, shipment (Domestic, Export), Inventory (2001)
11. Kim, Z.U. and Cho, S.H. A study on the manufacturin of soy-sauce by the combined use of *Aspergillus sojae* and *Bacillus subtilis* (in Korean). J. Korean Agric. Chem. Soc. 18(1): 1-9 (1975)
12. Kim, Y.M., Koo, J.G., Lee, Y.C. and Kim, D.S. Study on the use of sardine meal Koji and autolysates from sardine meat in rapid

- processing of sardine sauce (in Korean). J. Korean Fish. Soc. 23(2): 167-177 (1990)
13. Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R., Magrum, L., Zablén, I.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsen, K.R., Chen, K.N. and Woesw. C.R. The phylogeny of prokaryotes. Science, 209: 457-463 (1980)
14. Franco, W., Ramon, J.S., Patrick, M.G., Lidia, S.W. and George, D.G. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2545-2553 (1998)
15. Yang, Y., Jiang, L., Zhu, L., Wu, Y. and Yang, S. Thermal stable and oxidation-resistant variant of subtilisin E. J. Biotechnol. 81: 113-118 (1999)
16. A.P.H.A. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. Washington, DC, USA (1984)
17. Astrup, T. and Mullertz, S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. Archs. Biochem. Biophys. 40: 346-350 (1952)
18. John, G.H., Noel, R.K., Peter, H.A.S., James, T.S. and Stanley, T.W. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins. 1105-1138 (1984)
19. Choi, Y.J., Kim, S.H., Im, Y.S., Kim, I.S., Kim, K.S. and Cho, Y.J. Properties and utilization of undigested peptides in anchovy sauces (in Korean). J. Korean Fish. Soc. 31: 386-392 (1988)
20. Jang, Y.C. Proteinases produced from *bacillus licheniformis* SSA3-2M1 (in Korean). Korean J. Microbiol. 30: 239-244 (1992)
21. Kwak, G.S., Kim, S.K. and Jun, H.K. Purification and characterization of bacteriocin J105 produced by *Lactococcus lactis* subsp. lactis J105 isolated from Kimchi. J. Microbiol. Biotechnol. 11(2): 275-280 (2001)
22. Mah, J.H., Kim, K.S., Park, J.H., Byun, M.W., Kim, Y.B. and Hwang, H.J. Bacteriocin with a broad antimicrobial spectrum, produced by *Bacillus* sp. isolated from Kimchi. J. Microbiol. Biotechnol. 11(4): 577-584 (2001)
23. Kamal, M.J., Hoog, O., Kaiser, R., Shafqat, J., Razzadi, T., Zaidi Z.H. and Jormvall, H. Isolation, characterization and structure of subtilisin from a thermostable *Bacillus subtilis* isolate. Federation of European Biochemical Societies 374: 363-366 (1995)
24. Ahan, J.W., Oh, T.K., Park, Y.H. and Park, K.H. Partial purification and characterization of the alkaline protease from *Bacillus* sp (in Korean). Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18: 344-350 (1990)
25. Horikoshi, K. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* No. 211. Agric. Biol. Chem. 35: 1407-1414 (1971)
26. Chang, S.J., Kim, Y.S., Sung, H.C., Choi, Y.J. and Yang, H.C. A study on the alkaline protease produced from *Bacillus subtilis* (in Korean). J. Korean Agric. Chem. Soc. 31(4): 356-360 (1988)
27. Tsuchiya, K., Sakashita, T., Nakamura, Y. and Kimura, T. Production of thermostable alkaline protease by alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. Agric. Biol. Chem. 55: 3125-3131 (1991)
28. Fink, E., Dietl, T., Seifert, J. and Fritz, H. Studies on the biological functions of granular kallikrein; in fujii, Moriya, Suzuki, Kinins II, Syatemic proteases and cellular function. pp. 261-269. Plenum Press. New York, USA (1980)
29. Ha, J.H., Han, S.W. and Lee, E.H. Studies on the processing of low salt fermented seafoods (in Korean). Bull. Korean Fish. Soc. 19(4): 312-320 (1986)
30. Cha, Y.J., Chung, S.Y. Ha, J.H. Jeong, I.C. and Lee, E.H. Studies on the processing of low salt fermented sea foods (in Korean). Bull. Korean Fish. Soc. 16(3): 211-215 (1983)
31. Kim, J.K. and Kim, S.D. Genetic breeding of Korean soybean paste-fermenting *Bacillus* sp. by UV mutation (in Korean). J. Korean Agric. Chem. Soc. 32(2): 148-153 (1999)