

## Streptomyces sp. JK-20 유래 혈전용해효소의 생산조건

정영기\* · 전홍기<sup>1</sup> · 김유정

동의대학교 미생물학과  
<sup>1</sup>부산대학교 생명과학부

## The Optimal Conditions for Fibrinolytic Enzyme Production from *Streptomyces* sp. JK-20

Yong-Keek Jeong\*, Hong-Ki Jun<sup>1</sup> and You-Jung Kim

Dept. of Microbiology, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea

<sup>1</sup>Division of Biological Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

### Abstract

An actinomycetes which produces fibrinolytic enzyme was isolated from soil. Characteristics of the isolated strain and the optimal conditions for the productions of fibrinolytic enzyme were summarized as follows; The fibrinolytic enzyme production strain generates gray airmycelium and had about  $0.6\sim 0.8 \times 0.4\sim 0.8 \mu\text{m}$  cylindrical spore, smooth surface and formed spore chain of 10~40 spores. We have identified this strain as *Streptomyces* sp. JK-20. This strain was able to grow up at 20~32°C and its optimum growth temperature and pH was 24°C and pH 6.0, respectively. The optimal conditions for producing fibrinolytic enzyme; carbon source, nitrogen source, metal ions and phosphorous sources was 1% xylose, 0.5% yeast extract, 0.5% polypepton, 0.1%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and 0.1%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , respectively. This strain showed the highest productivity of fibrinolytic enzyme after the fourth day under such optimal culture conditions.

**Key words** – fibrinolytic enzyme, *Streptomyces* sp.

### 서 론

우리몸의 혈액은 혈관을 통하여 각 조직에 영양물질이나 산소를 공급하므로써 생명을 유지해 나가는데 이러한 순환계의 질환으로 인한 사망률은 매우 높은 편이다. 순환계 질환은 모두 혈액 내에서 형성되는 혈전에 기인하는 경우가 대부분이며 이 혈전이 원인이 되어 질병을 유발시키는

것을 혈전성 성인병 혹은 혈전증이라고 한다. 인체내에서 혈전이 형성되는 기전은 혈액내에 존재하는 fibrinogen이 thrombin의 작용을 받아 섬유소 성분인 혈전으로 되어 응고되는 것이다. 이런 혈전 형성의 기전은 상처가 생겨 혈관의 일부가 파괴되었을 때 혈전 유출방지를 위한 정상기전으로 작용하고 있으나 그렇지 않은 평상시에 생성되는 혈전은 혈관벽에 부착하여 혈관을 좁게 만들어 혈압을 높일 뿐만 아니라 혈전을 형성하는 섬유소 성분은 점착성이 강하여 혈구나 응고된 덩어리를 만들어 혈액내에 남게 된다. 이렇게 형성된 혈전은 혈액중에 존재하면서 혈류를 방

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : (051) 890-1534, Fax : (051) 894-0840  
E-mail : ykjeong@hyomin.donggeui.ac.kr

해하거나 혈관을 따라 이동하면서 뇌혈관과 같은 미세혈관을 막아 각종 순환기계의 성인병을 유발하게 된다.

세균으로부터 plasminogen을 활성화하는 혈전용해물질이 포도상구균(*Staphylococcus* sp.)의 배양액에서 발견되었으나 bovine plasminogen을 활성화시키지 못하였다[2,3]. 그러나 용혈성 연쇄상구균(*Streptococcus* sp.)의 배양액 중에서 plasminogen을 활성화하여 혈전용해 작용을 나타내는 물질을 발견한 Fletcher 등은 이를 정제하여 streptokinase라 하였다[4]. Streptokinase(SK)[7,10,11]는 1933년에 알려진 후 1949년에 처음으로 인체에 투여되었고 1980년대에 들어와서 본격적으로 사용되기 시작하였다. 이 후 Sobel 등은 사람 또는 동물의 뇨 중에 plasminogen을 활성화하는 효소가 존재하는 것을 확인하고 이를 정제하여 urokinase(UK)라 하였다[9]. 또한 UK와 비슷한 작용을 하는 물질중 사람의 악성 종양인 melanoma 유래의 tissue plasminogen activator(이 물질은 혈관 내피 세포와 같은 사람의 정상세포에서도 생산되며 t-PA라고 총칭함)가 혈전 용해 효소제로서 현재 임상에서 사용되고 있다[8]. 그러나 t-PA는 혈중에서 반감기가 짧고 가격이 고가이기 때문에 비경제적이라는 것이 큰 결점이라 할 수 있다. 따라서 본 연구는 손쉽게 대량 생산이 가능하고 부작용이 없고 혈중에서 반감기가 길며 가격이 저렴한 혈전용해효소를 생산하는 미생물을 토양에서 탐색하여, 혈전용해효소의 생산을 위한 최적 생산 조건을 조사하여 보고 하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 혈전용해효소 생산을 위한 방선균 분리

부산 근교 각 지역에서 채집한 토양 시료 약 1g을 멸균수 10 ml에 현탁시켜 충분히 진탕하였다. 약 20분간 방치한 후 상등액을 방선균 분리용 배지(glucose 10g, yeast extract 1g, polypeptone 1g, beef extract 1g, agar 20g, 증류수 1L, pH 7.5)에 도말하여 28℃에서 4일간 배양한 다음 생성된 colony를 순수 분리하였다. 순수 분리한 균을 fibrin plate에 이식하여 37℃에서 혈전용해 정도를 관찰하였다. 관찰결과 혈전을 용해하는 방선균을 선별해서 28℃에서 방선균 분리용 배지 조성으로 된 액체배지 8 ml가 든 시험관(1.8×18 cm)에 각각 접종해서 28℃에서 1~5일간 진탕 배양하면서 날짜별로 약 1 ml씩 배양액을 취하여 원

심분리 후 상등액으로 혈전용해 반응을 측정하였다.

### 혈전용해효소의 활성 측정법

Fibrin을 기질로 하는 방법 중 fibrin 평판법[1]을 사용하였다. Fibrin 평판법은 fibrinogen에 thrombin을 가하여 fibrin plate를 만들어 그 위에 시료검체를 점적하여 37℃에서 시간별로 반응하여 fibrin의 분해면적을 측정하는 방법이다. Fibrin plate 제조 방법은 borate saline buffer(pH 7.8) 10 ml에 0.06g fibrinogen을 넣어 37℃ incubator에서 녹인다. 녹은 fibrinogen 용액 10 ml를 petri dish에 넣고 borate saline buffer (pH 7.8)에 녹인 thrombin용액(20 unit)을 가하여 균일하게 혼합되도록 잘 흔들어 준다. Fibrinogen을 thrombin과 반응하면 서서히 굳게되는데 이 plate를 실온에서 30분 정도 방치한 후 사용하였다. 측정할 시료를 fibrin palte위에 얹어 활성 측정을 하는데 표면 장력이 약한 액체시료인 경우 plate위에서 퍼져버리므로 paper disc에 충분히 흡입시켜 plate위에 놓는다. 반응은 37℃ incubator에서 약 18시간 반응한 후 fibrin의 분해 면적(가로×세로)을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 혈전용해효소를 생산하는 방선균의 탐색

토양으로부터 혈전용해효소를 생산하는 방선균을 분리하였다. 현재까지 방선균으로부터 생산되는 혈전용해효소에 관한 연구가 보고된 바 없는 것에 주목하여 이 중 비교적 fibrin에만 특이적으로 활성을 보이는 균주 JK-20을 생산 균주로 선택하여 본 실험에 사용하였다. 본 균주는 회색의 기중균사를 가지며, 약 0.6~0.8  $\mu\text{m}$ ×0.4~0.8  $\mu\text{m}$  크기의 원통형 포자를 가지고 있다. 포자의 표면은 매끈하며, 약 10~40개의 포자가 고리를 이루고 있는 형태를 나타내었다. 이상의 결과로 본 균주는 *Streptomyces* 속으로 추정되어 *Streptomyces* sp. JK-20로 명명하였다.

### 효소 생산에 미치는 탄소 및 질소원의 영향

기본배지에서 탄소원인 glucose 대신에 Table 1에 언급된 각종 탄소원을 첨가하여 배양 후 혈전용해효소의 활성 및 생육상태를 검토하였다. 그 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 lactose 및 soluble starch의 경우에 균의 생육은 각각

Table 1. The effect of carbon sources on the production of fibrinolytic enzyme by *Streptomyces* sp. JK-20

Carbon sources (1 %)	Final pH	Wet weight (mg/ml)	Fibrinolytic activity(cm <sup>2</sup> )
Basic medium*	7.7	35.6	3.0
None	8.3	5.9	3.2
D-Fructose	8.1	30.4	3.6
D-Galactose	8.1	35.0	3.8
Dextrose	7.7	39.3	4.0
D-Mannose	7.6	38.3	4.4
D-Ribose	5.8	27.1	2.7
<b>Xylose</b>	<b>7.6</b>	<b>37.3</b>	<b>5.1</b>
Glycerin	6.8	34.0	1.9
D-Sorbitol	8.3	36.3	3.6
Maltose	7.6	27.4	4.2
L-Sorbose	8.1	30.4	4.6
Mannitol	8.3	29.7	2.7
Lactose	8.2	43.2	2.9
Sucrose	8.3	39.3	2.7
Soluble starch	6.8	49.2	1.4

\*Soluble starch 1.0g, Polypeptone 0.2g, Yeast extract 0.1g, Beef extract 0.1g, D.W 100 ml

43.2 mg/ml 및 49.2 mg/ml로 증가하였으나 효소 활성에 있어 lactose는 1.4 cm<sup>2</sup>로 효소 생산이 적음을 알 수 있었다. 반면, xylose는 생육이 37.3 mg/ml로 lactose나 soluble starch에 비해 낮지만 효소 활성은 5.1 cm<sup>2</sup>로 높고 효소 생산도 증가하여 탄소원은 xylose로 결정하였다.

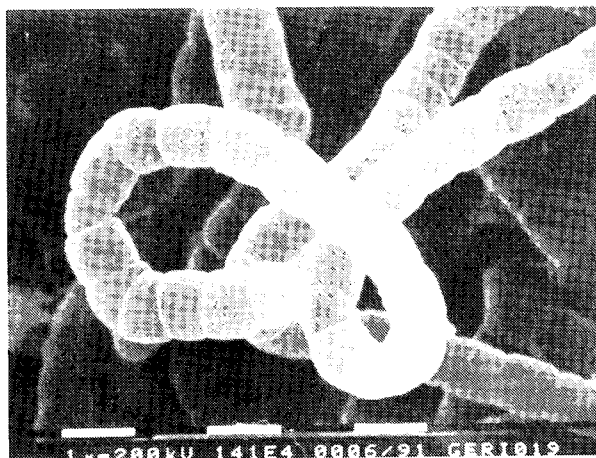


Fig. 1. The scanning electron micrograph of spore chain of the isolated strain *Streptomyces* sp. JK-20.

그런 다음 탄소원을 xylose(1%)로 정했을 때 배지의 질소원에 대해 검토하였다. 그 결과 Table 2에서 polypeptone의 경우 균체의 생육이 110.3 mg/ml로 다른 질소원에 비해 2~5배 정도로 생육이 높지만 효소활성이 1.4 cm<sup>2</sup>로 낮았다. 반면에 yeast extract는 생육이 polypeptone에 비해 낮지만 효소 활성이 4.8 cm<sup>2</sup>로 polypeptone보다 효소 활성이 약 3배 정도 증가하였다. 하지만 polypeptone과 yeast extract를 각각 0.5%씩 같이 넣어본 결과 균의 생육이 60 mg/ml이며 효소 활성이 12.35 cm<sup>2</sup>로 yeast extract만 넣은 것보다 높은 효소 활성과 생산을 보여 질소원은 yeast extract 0.5%와 polypeptone 0.5%로 결정하였다.

효소 생산에 필요한 금속염과 인산염의 영향

탄소원인 xylose 1%, 질소원인 yeast extract 0.5% 및 polypeptone 0.5%를 각각 첨가한 배지에 각종 금속염을 0.1% 첨가하여 혈전용해효소의 생산성을 검토하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 대부분의 금속염은 효소생산이 억제되는 반면 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O만 효소 생산이 증가하였다.

앞에서 정해진 탄소원(xylose 1%), 질소원(yeast extract

Table 2. The effect of nitrogen sources on the production of fibrinolytic enzyme by *Streptomyces* sp. JK-20

Nitrogen sources (1 %)	Final pH	Wet weight (mg/ml)	Fibrinolytic activity(cm <sup>2</sup> )
None	6.0	10.9	-
NH <sub>4</sub> Cl	6.8	9.1	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	6.8	10.0	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	6.4	8.1	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.5	6.8	-
KNO <sub>3</sub>	7.1	9.1	-
NaNO <sub>3</sub>	6.7	6.8	-
<b>Polypeptone</b>	<b>8.2</b>	<b>110.3</b>	<b>1.4</b>
<b>Yeast extract</b>	<b>7.9</b>	<b>45.3</b>	<b>4.8</b>
Malt extract	5.5	8.7	-
Beef extract	8.4	21.3	0.81
Lysine	6.3	6.8	-
Arginine	7.4	8.4	-
Cysteine	5.2	8.1	-
Casamino acid	8.3	21.0	-
Bacto-soytone	8.2	23.0	2.3

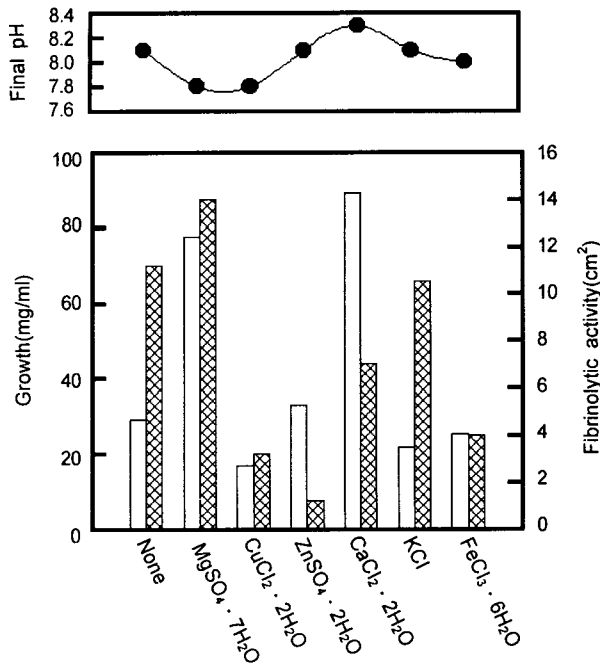


Fig. 2. The effect of metal salts on the production of fibrinolytic enzyme by *Streptomyces* sp. JK-20.

● : Final pH  
 ⊠ : Fibrinolytic activity (cm<sup>2</sup>)  
 □ : Growth (mg/ml)

0.5%와 polypeptone 0.5%) 및 금속염(MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1%)을 구성 성분으로 하는 배지에서 혈전용해효소 생산에 대한 인산염의 영향을 조사하였다. 여러 종류의 인산염을 각각 0.1% 첨가하여 효소 생산에 가장 좋은 인산염을 선택하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 인산염을 첨가하지 않은 경우가 균의 생육에 좋았고 효소활성은 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O와 NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 첨가하였을 경우 비슷한 활성을 보였으므로 인산염은 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O로 결정하였다.

초기 pH 및 배양온도의 영향

xylose 1%, yeast extract 0.5%, polypeptone, 0.5%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1% 및 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.1% 를 함유한 배지를 1N HCl과 1N NaOH로 pH 4~10까지 조절하여 초기 pH가 혈전용해 효소 생산에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 Fig. 4에서 나타난 바와 같이 초기 pH 6에서 효소 생산이 가장 높았고 생육도 다른 pH보다 증가하였다.

온도는 미생물의 생육과 조효소 생산에 큰 영향을 미치는 요인이다. 따라서, 앞에서 결정된 모든 배지 성분과 pH

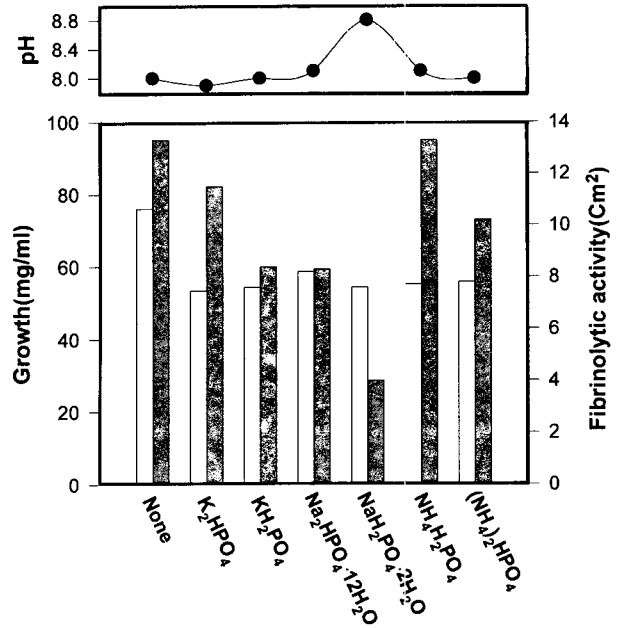


Fig. 3. The effect of phosphorus sources on the production of fibrinolytic enzyme by *Streptomyces* sp. JK-20.

● : Final pH  
 ⊠ : Fibrinolytic activity (cm<sup>2</sup>)  
 □ : Wet weight (mg/ml)

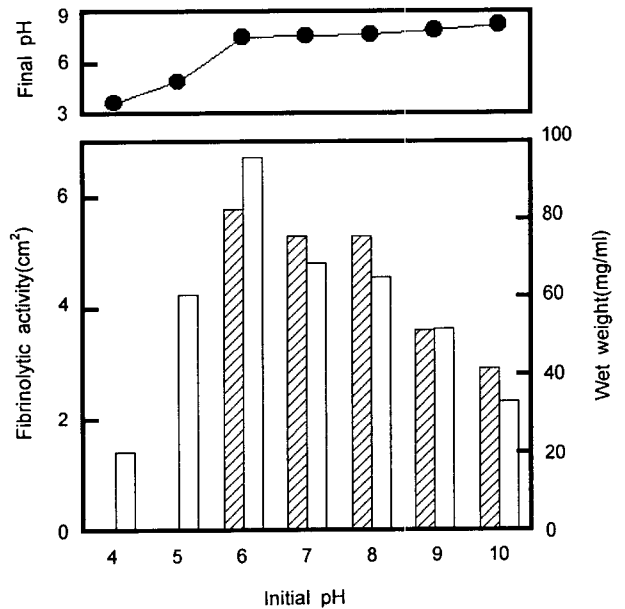


Fig. 4. The effect of initial pH on the production of fibrinolytic enzyme by *Streptomyces* sp. JK-20.

● : Final pH  
 ⊠ : Fibrinolytic activity (cm<sup>2</sup>)  
 □ : Wet weight (mg/ml)

를 맞추어 배양 온도를 25°C에서 40°C까지의 범위에서 배양하여 효소의 생산성을 검토하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 30°C에서 균의 생육은 좋았으나 효소 생산은 25°C에서 가장 크게 나타났다. 배양 온도 35°C 이상에서는 균의 생육 자체가 정지되어 효소 생산도 전혀 나타나지 않았다.

통기량의 영향

통기량에 따른 균의 생육과 혈전용해효소 생산 관계를 검토하기 위해 앞에서 결정된 최적 배지 조건으로하여 배지를 pH 6으로 조정된 다음 500 ml shaking flask에 각각 50~300 ml 넣어 25°C에서 진탕배양하였다. 배양 후 혈전용해효소 생산성은 Table 3에서와 같이 50 ml로 배양할 때 균 생육과 효소 생산이 가장 높게 나타났다. 하지만 효소 대량 생산을 위한 배양 관계상 100 ml로 배양할 경우와 50 ml로 배양할 경우 크게 차이가 없으므로 액체배지량은 100 ml로 결정하였다. 이상과 같이 혈전용해효소 생산균주인 *Streptomyces* sp. JK-20에 의한 혈전용해효소 생산을 위한 최적조건은 Table 4와 같다.

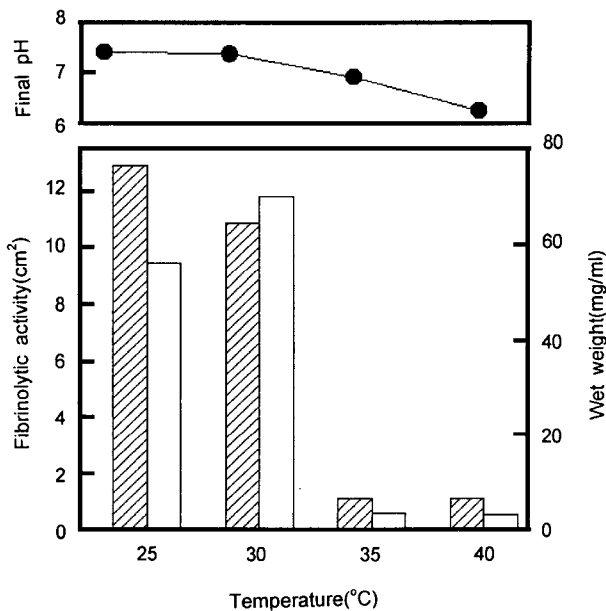


Fig. 5. The effect of temperature on the production of fibrinolytic enzyme by *Streptomyces* sp. JK-20.

●: Final pH  
 ▨: Fibrinolytic activity (cm<sup>2</sup>)  
 □: Wet weight (mg/ml)

Table 3. The effect of aeration on the production of fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. JK-20

Volume of medium (ml)	Final pH	Cell growth (mg/ml)	Fibrinolytic activity (cm <sup>2</sup> )
50	8.48	66.9	10.89
100	8.01	86.9	10.24
150	7.87	250.6	8.12
200	7.81	238.3	6.76
250	7.8	272.3	6.25
300	7.82	338.3	5.06

Table 4. The optimal culture condition for the production of fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. JK-20

Medium	Xylose	1%
	Yeast extract	0.5%
	Polypeptone	0.5%
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1%
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.1%
	Initial pH	6
Other conditions	Temperature	25°C
	Culture time	4 days
	Agitation	120 Rev × 6 cm stroke(reciprocal)
100 ml of medium per 500 ml shaking flask		

효소 생산을 위한 생산균 배양의 경시 효과

상기의 각 항에서 언급한 효소 생산을 위한 최적 조건을 갖추어 생산균을 배양하면서 시간에 따른 효소 활성의 변화와 균의 생육 그리고 배양액의 pH 변화에 대한 조사를 하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 균의 생육은 배양 5일째가 가장 양호하였으나 효소 활성은 4일째에 가장 높은 수치를 나타내었다. 이상과 같이 최적 생산조건을 갖추었을 때 효소 활성은 처음 기본배지 보다 약 10배의 활성 증가를 보였다. 기존의 혈전용해효소들의 거의 대부분이 사람의 신(腎)세포나 뇨중에서 분리하여 얻을 수 있어 정제 과정이 어려울 뿐만 생산량도 소량이며 가격도 고가에 해당한다. 따라서 미생물로부터 대량생산을 시도하여 저렴한 혈전용해제의 생산이 요구되고 있다. 그 중 세균으로부터 *Streptococcus* sp.[2,3] 및 *Bacillus* sp.[5,6] 등의 세균이 생산하는 혈전용해효소가 보고 된바 있으나, 방선균에 대해서는

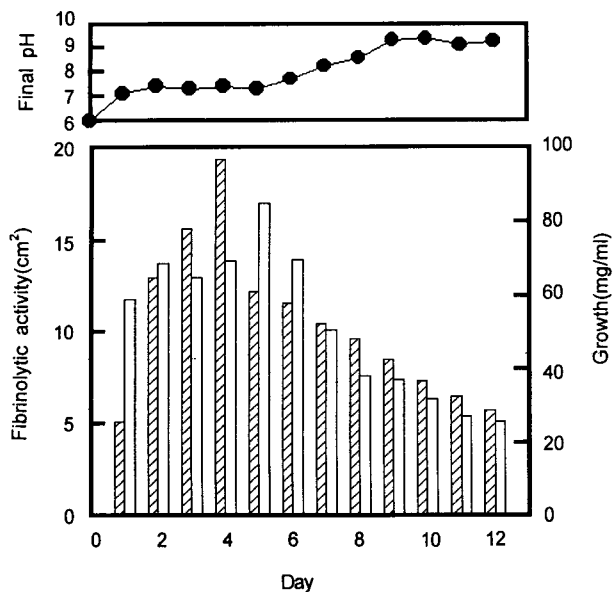


Fig. 6. Time course of fibrinolytic enzyme production from *Streptomyces* sp. JK-20.

●: Final pH  
 ▨: Fibrinolytic activity (cm<sup>2</sup>)  
 □: Growth (mg/ml)

아직 보고된 바가 없다. 본 방선균 유래의 혈전용해효소는 pH 5~10까지의 넓은 pH범위에도 안정한 특성을 가지고 있어 혈전용해효소의 생산에 보다 유리 할 것으로 추정된다.

### 요 약

토양으로부터 혈전용해효소를 생산하는 방선균을 분리하여, 본 방선균이 생산하는 혈전용해효소의 최적 생산 조건을 검토하였다. 생산균주는 회색의 기균사를 생성하며 약 0.6~0.8×0.4~0.8μm 크기의 원통형 포자를 가지며 포자의 표면은 매끈하며, 약 10~40개의 포자가 고리를 이루고 있는 형태를 나타내었다. 이상의 결과로 본 균주는 *Streptomyces* 속으로 추정되어 *Streptomyces* sp. JK-20로 명명하였다. 본 균주의 생리학적 특성으로 20~32℃의 온도에서 생육 가능하며 최적 생육 온도 및 pH는 24℃ 및 pH 6이었다. 본 균주의 혈전용해효소의 생산을 위한 최적 생산 조건을 검토한 결과 탄소원으로 1% xylose였고 질소원은 0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone, 금속염은 0.1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O였으며 인산염은 0.1% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O이었다. 본 생산 균주를 최적 배지 조건에서 배양하였을 때 배양 4일

째에 혈전용해효소의 생산력이 가장 높았다.

### 참 고 문 헌

1. Astrup, T. and S. Müllertz. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 346-351.
2. Cliffton, E. E. and D. A. Cannamela. 1953. Proteolytic and fibrinolytic activity of serum. Activation by Streptokinase and Staphylokinase indicating dissimilarity of enzymes. *Blood* **8**, 554-559.
3. Davidson, F. M. 1960. Activation of plasminogen by Staphylokinase. *Nature* **185**, 626-632.
4. Fletcher, A. P. and A. J. Johnson. 1957. Methods employed for purification of Streptokinase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **94**, 223-225.
5. Jeong, Y. K., J. U. Park, H. Back, S. H. Park, I. S. Kong, D. W. Kim and W. H. Joo. 2001. Purification and biochemical characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* BK-7. *World J. Micro. Biotec.* **17**, 89-92.
6. Kim, H. K., G. T. Kim, D. K. Kim, W. A. Choi, S. H. Park, Y. K. Jeong and I. S. Kong. 1997. Purification and chracterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA 38 originated from fermented fish. *J. Ferment Bioeng.* **84**, 307-312.
7. Müllertz, S. and M. Lassen. 1953. An activator system in blood indispensable for formation of plasmin by streptokinase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **82**, 264-269.
8. 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**, 214-220.
9. Plug, J. and O. Kjeldgarrd. 1957. Urokinase an activator from human urine. I. Isolation and properties. *Biochem. Biophys. Acta.* **24**, 278-283.
10. Troll, W., S. Sherry and J. Wachraan. 1954. The action of plasmin of synthetic substrates. *J. Biol. Chem.* **208**, 85-88.
11. Troll, W., S. Sherry and J. Wachman. 1955. The actiration of human plasminogen by Streptokinase. *J. Biol. Chem.* **213**, 881-886.

(Received December, 14; Accepted January 24, 2002)