

## 한국재래간장 발효균 *Bacillus subtilis* K7 유래의 혈전용해 Protease의 정제 및 특성

김두영 · 이은탁 · 김상달\*

영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과

(2003년 월 일 접수, 2003년 월 일 수리)

한국재래간장으로부터 혈전용해효소를 강하게 생산하는 균주를 선발하고 이를 *Bacillus subtilis* K7로 동정하였다. *B. subtilis* K7이 생산하는 혈전용해성 protease를 정제하여 분자량을 확인한 결과 21,500 Da이었다. 정제된 효소의 최적반응조건은 40°C와 pH 9.0이었으며 pH 5.0에서 12.0까지 안정하고 50°C에서 20분간 열처리한 후에도 50% 이상의 효소활성을 가지며 EDTA, CDTA 및 iodoacetat에 실활하는 효소이었다. 이 효소의 fibrin에 대한 Km 값은  $1.8 \times 10^{-2}$  M이었다.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, 혈전용해활성, fibrinolytic protease

### 서 론

최근 국민소득의 향상과 서구화된 식문화 형성으로 인하여 혈액순환 장애에 따른 심·혈관계질환을 위시한 성인병의 발병률이 높아지고 있으며 이로 인한 사망률이 증가하고 있다.

혈액순환계 질환의 많은 원인중 대표적인 것으로 혈전을 들 수 있는데, 이는 혈류중의 fibrinogen이 활성화된 thrombin에 의해서 fibrin으로 전환되어 불용성의 중합체를 형성함으로써 생성되며, 상처 복귀시 지혈과정에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다.<sup>1,2,3)</sup>

혈관 내에 생성된 혈전은 혈관벽에 점착하거나 미세혈관을 막아 정상적인 혈류를 방해하게 되어 혈액순환계 질환을 초래하게 된다. 따라서 이들 질환의 예방 및 치료에 대한 연구가 진행되고 있으며 그에 따른 일환으로 혈전생성을 억제하는 항혈전제의 개발과 생성된 혈전을 용해시키는 혈전용해제의 개발이 이루어지고 있다. 혈전용해제로는 urokinase, streptokinase가 가장 많이 사용되고 있으며, tissue type plasminogen activator (TPA) 등도 개발되고 있다. 그러나 이와 같은 제형들은 반감기가 짧고 가격이 매우 높은 단점을 지니고 있다.<sup>4)</sup> 특히 용혈성 연쇄상 구균(*Streptococcus haemolyticus*)으로부터 생산되는 streptokinase는 urokinase보다는 혈중의 반감기가 길고 전신에 고루 작용하는 이점이 있으나, 혈전을 직접 분해하는 것이 아니라 혈액중의 plasminogen에 작용하여 plasmin을 형성케하는 plasmin activator의 역할만 담당하여 출혈 등의 부작용을 나타내는 단점이 있다.<sup>3)</sup>

이러한 부작용을 줄이고자 한국전통식품인 청국장 및 된장, 간장에서도 혈전용해효소를 분비하는 균주가 존재한다는 보고를 바탕으로 전통장류 발효균의 혈전분해효소 연구를 진행하였

다.<sup>4)</sup> 혈전용해제의 대부분이 일종의 단백질 분해효소이기 때문에 기질에 대한 특이성은 물론 장내 흡수성 및 체내에서의 면역반응 유발여부 등의 부작용을 줄이는 것이 필수 조건이라고 생각된다.

대두를 이용한 전통식품속에 존재하는 *Bacillus subtilis*는 많은 종류의 protease를 균체 밖으로 분비하고 이러한 효소는 다양한 기질에 반응하는 성질을 가지고 있다. 이중 일부 alkaline protease는 fibrin을 강력히 분해하는 성질을 가지고 있다.<sup>5)</sup> 그동안 많은 연구자들에 의해 *Bacillus*가 생산하는 protease가 확인된 바 있으나 최근 일본의 전통식품인 natto에서 분리된 *B. subtilis* var natto(*B. natto*)가 강력한 fibrinolytic activity를 갖는 alkaline serine protease를 분비하는 것으로 보고된 바 있다.<sup>5,6)</sup>

국내에서는 전통적인 콩발효식품인 청국장에서 natto 발효균과 유사한 성질을 갖는 *Bacillus* 균주가 분리되고 있으며 분리균에서 fibrinolytic activity를 갖는 alkaline protease<sup>3)</sup>가 보고되었으며, *Serratia*의 protease는 anti-inflammatory 효과를 가지는 것으로 보고되었다.<sup>5)</sup> 아울러 많은 fibrinolytic enzymes들이 발효식품으로부터 분리된 *Bacillus* sp. 균주에 의해 생산되는 것으로 보고되었다.<sup>4)</sup>

본 연구에서는 한국전통간장으로부터 혈전용해력을 가지는 균주를 분리하여 이 균주가 생산하는 혈전용해효소를 정제하여 효소학적 특성연구를 시도하였으며 그 일환으로 비특이적이고 부작용이 많은 고가의 종래의 혈전용해효소의 단점을 해결할 수 있는 특이성이 높은 혈전용해효소를 개발하기 위하여 *Bacillus subtilis* 균주가 생산하는 혈전용해효소를 연구하고자 하였다.

### 재료 및 방법

**균주의 분리 및 선발.** 본 실험에서 사용한 균주는 경북 경산지에서 전통방식으로 발효된 한국간장들에서 분리한 균을 대상으로 선발하였다. 간장을 멸균 생리식염수에 10<sup>-4</sup>까지 현탁,

\*연락처

Phone: 82-53-810-2395, Fax: 82-53-811-4319

E-mail: sdkim@yumail.ac.kr

희석하고, 이를 NaCl을 첨가한 nutrient 한천배지에 0.1 ml씩 도말봉으로 접종하여, 30°C에서 1일간 배양시켰다.

생성된 colony를 tryptone 0.5%, yeast extract 0.25%, glucose 0.1%, skim milk solution 100 ml, agar 1.5%(pH 7.0 ± 0.1)의 조성으로 이루어진 5% skim milk 한천배지에 toothpick하여 clear zone을 형성하는 것을 1차 선정하고, 다시 기본배지에서 액체배양하여 protease 활성을 측정하여 분리, 선정하였다.

1차선별된 균주중에서 fibrin 분해효소 생산성 균주의 분리를 위하여 상기에서 분리된 colony들을 0.5%의 fibrin이 함유된 nutrient agar 배지 평판위에 각 균주들을 접종하여 30°C에서 1일간 배양한 후 투명환이 형성되는 균주를 활성균주로 최종 선별하였다.

**미생물의 동정.** 최종 선별된 균주 K7의 분류학적 동정을 위해 Bergey's manual of systematic bacteriology 방법에 따라 형태학적, 생화학적 특성을 조사하였으며, API® system과 Biolog사의 MicroLog® system(Release 4.0) 등을 이용해 조사하여 최종적으로 *Bacillus subtilis*로 동정하였다.

**Fibrin 용해활성 및 단백질 용해활성의 측정.** Fibrin 용해활성 및 단백질 용해활성은 Casein-Folin법<sup>3)</sup>으로 측정하였다. 즉, 기질로 0.6% hammarstein casein용액 또는 0.6%의 fibrin 용액 2.5 ml / 1/15M sodium phosphate buffer 1 ml와 배양액 0.5 ml를 가하고 40°C에서 30분간 반응시킨 후 2.5 ml의 0.44 M trichloroacetic acid(TCA)를 가하여 반응을 정지시켰다. 이때, 대조구에 0.5 ml 배양액을 넣은 후 실온에서 10분간 방치 후 20분간 3000 rpm에서 원심분리 하여 상등액 0.5 ml에 0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액 10 ml와 Folin 시약 1 ml를 같이 넣고 37°C에서 30분간 발색시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성도(unit)는 1분 동안에 hammarstein casein으로부터 1 µg의 tyrosine을 생성하는 효소의 양으로 하였다.

**단백질 정량.** 단백질 함량은 Lowry 등의 방법<sup>7)</sup>에 따라 정량하였으며, 표준 단백질로는 bovine serum albumin(BSA)을 사용하였다.

**혈전용해효소의 정제.** 선별된 균주 K7의 protease 생산은 protease 생산용 배지<sup>14)</sup> 즉, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%, fructose 0.1%, soybean meal 1.2%, CaCO<sub>3</sub> 0.01% (pH 7.0)에서 30°C, 160 rpm으로 3일간 진탕배양하여 protease를 생산하였고, 이를 8000 rpm에서 30분간 원심분리하여 그 원심상등액을 회수하였다. 여기에 75% 황산 암모늄으로 포화시켜 4°C에서 24시간 단백질을 침전시킨 후 8000×g으로 30분간 원심분리하여 얻은 침전물을 삼차증류수에 녹였다. 이를 투석막에 넣어 4°C에서 증류수로 한시간 간격으로 두 번 같이준 후 1 overnight 투석하고, 이를 동결건조후 -70°C에 보관하여 조효소액으로 사용하였다. 동결건조된 조효소액을 sodium borate buffer(pH 9.0)으로 평형화된 QAE-Sephadex anion exchange column(2.5×50 cm)에 흡착시켜 0.48 ml/min으로 용리한 후 활성분획만 모아 동결건조를 통해 농축하였다. 동결건조된 protease 활성 단백을 sodium phosphate(pH 6.0)에서 SP-Sephadex C-50 cation exchange chromatography(column size 2.5×50 cm)하였으며 분획한 활성부분을 동결건조시킨 후,

Sephadex G-100 filtration(column size 1.5×75 cm)으로 0.14 ml/min으로 분획하여 정제하였다.

**전기영동 및 분자량 측정.** 효소의 정제정도와 분자량을 구하기 위하여 8%의 acrylamide gel로 sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)하였고, Coomassie brilliant blue R-250용액(Coomassie brilliant blue R-250 0.25 g을 50% methanol 90 ml와 10 ml의 glacial acetic acid에 용해시켜 제조)을 사용하여 염색하고, 과량으로 염색된 gel의 탈색은 7% acetic acid와 5% methanol 혼합용액으로 탈색하였다. 표준분자량 marker는 Promega사로부터 구입한 mid-range markers로서 phosphorylase B(97.4 kDa), bovine serum albumin(66.2 kDa), glutamate dehydrogenase(55 kDa), ovalbumin(42.7 kDa), aldolase(40 kDa), carbonic anhydrase(31 kDa), soybean trypsin inhibitor(21.5 kDa), lysozyme(14.4 kDa)이 mix된 것을 사용하였다.<sup>8,9)</sup>

**효소활성에 대한 pH의 영향.** Protease 활성에 반응 pH가 미치는 영향을 검토하기 위해 1 M HCl-sodium acetate buffer, 1/15 M phosphate buffer, 1/20 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-HCl buffer를 그리고 pH 12는 1/20 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-NaOH buffer를 이용하여 pH를 0.5 간격으로 각각의 반응구에 완충액으로 1 ml씩 첨가하고, 0.6% hammarstein casein 기질용액을 2.5 ml씩 넣은 후, 조효소액 0.1 ml를 첨가하여 40°C에서 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

또한 정제효소의 pH 안정성을 검토하기 위하여 1 M HCl-sodium acetate buffer, 1/15 M phosphate buffer, 1/20 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-HCl buffer를 그리고 pH 12는 1/20 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-NaOH buffer를 이용하여 pH 0.5 단위로 각각의 buffer용액 0.2 ml와 효소 0.2 ml를 동량으로 첨가하여 상온에서 12시간 전처리한 다음 효소의 잔존활성도를 측정하였다.

**효소활성에 대한 온도의 영향.** Protease 활성에 미치는 온도의 영향을 검토하기 위해 0.6% hammarstein casein 용액 2.5 ml, 1/20 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-HCl buffer(pH 9.0) 완충액 1 ml 및 조효소액 0.1 ml를 첨가하여, 효소 반응온도를 30~60°C 범위에서 10°C간격으로 30분 반응시켜 효소의 상대활성으로 표시하였다.

또한 정제효소의 열 안정성을 검토하기 위하여 40~70°C까지 10°C간격으로 하여 효소액을 10분 단위로 열처리를 해서 효소의 잔존활성도를 측정하였다.

**효소활성에 대한 금속이온 및 저해제의 영향.** 효소활성에 미치는 금속이온의 영향을 검토하기 위하여 각종 금속염을 각각 2 mM이 되게 증류수에 녹이고 금속염용액 0.2 ml와 효소액 0.2 ml를 동량으로 첨가하여 4°C에서 12시간 전처리 시킨 후, 효소의 잔존활성도를 측정하였다.

정제효소에 미치는 저해제의 영향을 검토하기 위하여 SDS, p-chloromercuribenzoic acid(p-CMB), iodoacetate, ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), trans-1,2-diamino cyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid(CDTA), acetihydroxamic acid(AHA), L-cystein, hydroxyurea, thiourea를 선정하여 각종 저해제를 2 mM이 되게 증류수에 녹이고 저해제 용액 0.2 ml와 효소액 0.2 ml를 동량으로 첨가하여 상온에서 12시간 전처리 시킨 후, 효소의 잔존활성도 측정하였다.

Table 1. Clear zone diameter (mm) of protease activity and fibrinolytic activity shown by bacteria isolated from soy sauce

strain	skim milk (1%)	fibrin (1%)
K-6	1.6 (mm)	0.2 (mm)
K-7	2.0	1.5
K-9	1.2	0.5
K-15	1.6	0.4
K-18	1.5	0.8
K-26	1.0	0.3
K-30	1.4	0.7
K-32	1.2	0
K-34	1.8	1.1
K-38	1.6	0.7
K-43	1.7	0.5

Clear zone size of each strain was compared for 1% on fibrin plate and 1% on casein plate after incubation at 30°C for 2 days.

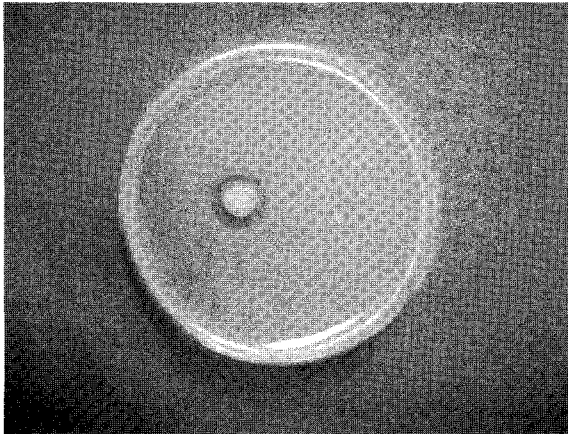


Fig. 1. Clear zone formation of hydrolyzed skim milk by the protease produced from the selection strain on skim milk agar plate. The strain was incubated on 5% skim milk agar plate for 2 days at 30°C. Left: strain K7, Right: *Escherichia coli* (control).

## 결과 및 고찰

**균주의 분리 및 동정.** 경북 경산시 용성면의 한 가정에서 채취한 간장으로부터 분리한 약 45균주를 대상으로 2차에 걸친 효소생산능력 측정을 통하여 혈전용해력이 강하며 protease 생산능력이 가장 강한 균주를 선정하였다(Table 1, Fig. 1). 선정된 균주의 형태학적 특성, 배양학적 특성, 생리학적 특성을 API® system과 Biolog사의 MicroLog® system(Release 4.0)으로 조사해본 결과 분균주가 *Bacillus subtilis*인 것으로 확인되었다(Table 2, 3).

**효소의 정제.** 효소의 생산용 배지의 최적조성은  $K_2HPO_4$  0.7%,  $KH_2PO_4$  0.2%, fructose 0.1%, soybean meal 1.2%,  $CaCO_3$  0.1%로 조사되었으며<sup>14)</sup> 이 배지를 이용하여 30°C에서 48시간 배양하여 효소를 생산하였다. 효소의 정제는 원심분리 상등액을 분획하여, 75%의 황산암모늄에 의한 분별염색과 QAE-Sephadex anion exchange column chromatography 및 SP-Sephadex C-50 cation exchange column chromatography, Sephadex G-100 gel filtration을 이용하여 비활성도 233.9, 수

Table 2. Identification of the *Bacillus* sp. K7 on MicroLog system

Dextrin	+	D-psicose	+
Tween 40	+	D-ribose	+
N-acethyl D-glucosamine	+	D-salicin	+
L-arabinose	+	Sucrose	+
D-arabitol	-	D-trehalose	+
D-fructose	+	D-xylose	+
$\alpha$ -D-glucose	+	L-malic acid	+
M-inositol	-	Methyl pyruvate	+
Lactulose	-	Propionic acid	-
Maltotriose	-	Pyruvic acid	+
D-mannitol	+	L-asparagine	+
D-mannose	+	Glycyl-L-glutamic acid	-
$\alpha$ -methyl-D-galactoside	-	Uridine	+
3-methyl glucose	+	2-deoxy adenisine	-
$\alpha$ -methyl-D-glucoside	+	inosine	+
Glycerol	+	thymidine	+
API®	<i>Bacillus subtilis</i>		
MicroLog®	<i>Bacillus subtilis</i>		

This selected bacteria was identified as *B. subtilis* K7 through the automatic identification systems, Biolog system in MicroLog® the strain used (+) or did not use (-) each nutrient substrate.

율 3.8%, 정제배수 7.7배로 효소를 정제하였다(Table 4). 이 정제 단백질의 SDS-PAGE 분석에서 주 밴드의 분자량은 약 21.5 kDa이었다(Fig. 2).

*Bacillus subtilis* K7균주가 생산하는 protease의 분자량은 *Streptomyces*(30 kDa), *Bacillus* sp.(28.2 kDa), *Flammulina*(33 kDa) 과 *Bacillus* sp.(30 kDa)균주가 생산하는 protease와 유사하였으나,<sup>10-13)</sup> 다른 *Bacillus* sp.(45 kDa),<sup>15)</sup> *Serratia* sp.(66 kDa)가 분비하는 protease의 분자량보다는 작은 것으로 나타났다.<sup>16)</sup>

**효소활성과 안정성에 대한 pH의 영향.** Protease 활성화에 반응 pH가 미치는 영향을 검토하기 위해 pH 2.0~12.0까지 조정된 반응액을 이용하여 효소활성을 측정된 결과(Fig. 3), 정제효소의 활성은 9.0에서 최대활성을 나타내었다. 최 등<sup>17)</sup>이 *Bacillus subtilis* 근연종 유래의 protease의 최적 pH가 9.0이라고 보고한 것과 동일하였으며, 김 등, 황 등이 보고한 *Bacillus* sp.(pH 10.0), *Flammulina* sp.(pH 7.0), *Bacillus cereus*(pH 8.0)균주가 생산한 protease의 최적 pH와는 다르게 나타났다.<sup>5,11,12,18)</sup>

정제효소의 pH 안정성을 검토하기 위하여 pH 2.0~12.0까지 조정하여 12시간 전처리한 다음 효소의 잔존활성도를 측정하여 본 결과 5.0~12.0까지 안정성을 나타내었으나(Fig. 4), 5.0와 13.0에서는 활성이 저하되는 것으로 나타났다. 본 연구의 결과는 심 등이 pH 4~12범위에서 효소가 안정하고, pH 13에서는 잔존활성이 전혀 없었다는 보고와 유사하였으나, *Bacillus* sp.가 생산하는 알칼리성 protease는 pH 6.0~12까지 안정하였다는 김 등의 보고<sup>19)</sup>에 비해 본 실험의 효소의 pH 안정영역이 다소 넓은 결과를 보였다.

**효소활성과 안정성에 대한 온도의 영향.** Protease 활성화에 미치는 온도의 영향을 검토하기 위해 효소 반응온도를 20~60°C 범위에서 10°C간격으로 30분 반응 시켜 효소의 상대활성으로 표시한 결과, 정제효소는 40°C에서 반응 최적 온도를 보였다

**Table 3. Identification of the Bacillus sp. K7 on their physiological and biochemical characteristics**

	<i>Bacillus alcalophilus</i>	<i>Bacillus badius</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	K7
Gram stain	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+
VP-test	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+
Acid from D-Glucose	+	-	+	+
L-Arabinose	+	-	-	-
D-Xylose	+	-	-	-
D-Mannitol	+	-	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-
Hydrolysis of casein	+	+	+	+
Gelatine	+	ND	+	+
Starch	+	-	-	-
Utilization of citrate	-	-	-	-
Nitrate reduced of nitrite	-	-	+	+
Formation of indole	-	-	-	-
Growth at pH 6.8 nutrient broth <sup>a</sup>	+	+	+	+
5.7	+	+	+	+
Growth at 10°C	-	-	d	-
30°C	+	+	+	+
40°C	+	+	d	+
50°C	-	-	-	-

<sup>a</sup>: pH in the nutrient broth was adjusted by adding 1 M NaOH.

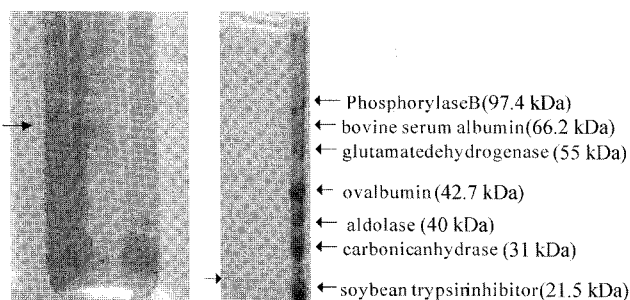
Symbol: +, 90% or more positive; -, 10% or less positive; d, 11-89% positive.

**Table 4. Purification of the protease produced from Bacillus subtilis K7**

Purification step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Culture supernatant	52260	1668.9	31.3	100	1.0
75% Ammonium sulfate	39528	658.8	60	75.6	1.92
QAE-Sephadex ion exchange	14138	80.8	175	27.1	5.6
SP-Sephadex C-50 ion exchange	2749	11.1	247.7	5.3	7.9
Sephadex G-100 gel filtration	1991.3	8.3	239.9	3.8	7.7

• Total protein: estimated by Lowry *et al.*<sup>32)</sup>

• Specific activity (units/mg): One unit was defined as the amount of protein needed to increase an absorbance at 750 nm.



**Fig. 2. Disc-gel electrophoresis and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified Bacillus subtilis K7.** Left: Disc-electrophoresis (nondenaturing PAGE), Right: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (lane 1: purified enzyme, lane 2: molecular weight marker).

(Fig. 5). 최 등과 김 등이 연구한 protease가 50°C에서 최대활성을 보인다는 것보다는 낮았으나,<sup>2,17)</sup> 40°C에서 최대활성을 보인다고 보고하는 유 등의 것<sup>3)</sup>과 동일하였으나, 호열성 *Bacillus*

*subtilis*(65°C) 균주는 다르게 열에 저항성을 나타내었다.<sup>3)</sup>

정제효소의 열 안정성을 검토하기 위하여 40~70°C까지 10°C 간격으로 하여 효소액을 10분 단위로 열처리를 해서 효소의 잔존활성도를 측정하여 본 결과 40°C에서도 열처리한 시간이 증가함에 따라 효소가 실활하였으며 50°C부터 급격한 실활을 보여 열에는 상당히 불안정한 것으로 판단되었다(Fig. 6). 김 등,<sup>20)</sup> 황<sup>11)</sup> 등이 *Bacillus sp. alkaline protease*의 열안정성이 40-45°C 정도라고 보고한 것과 유사하였으나, 반면 *Pseudomonas sp.*<sup>21)</sup>의 protease가 50°C에서 30분간 처리한후 56%의 잔존활성도를 보인 것과 비교하면 열안정성이 낮은 것으로 나타났다.

**효소활성에 대한 금속이온과 저해제의 영향.** 정제효소에 미치는 금속이온의 영향을 검토하여 본 결과(Table 5), Ca<sup>2+</sup> 첨가 시에는 효소활성이 증가되었고, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ag<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>에 강한 저해를 받으며, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>에 30%정도의 저해를 받는 것으로 나타났다. 이는 오 등이 Ag<sup>2+</sup>에 의해 60%의 활성이 감소되었다고 보고된 것<sup>21)</sup>과 유사하였으며, Cu<sup>2+</sup>에 의해 활성이 증가된다고 한 황 등의 보고<sup>11)</sup>와는 상이한 결과를 보여주었다.

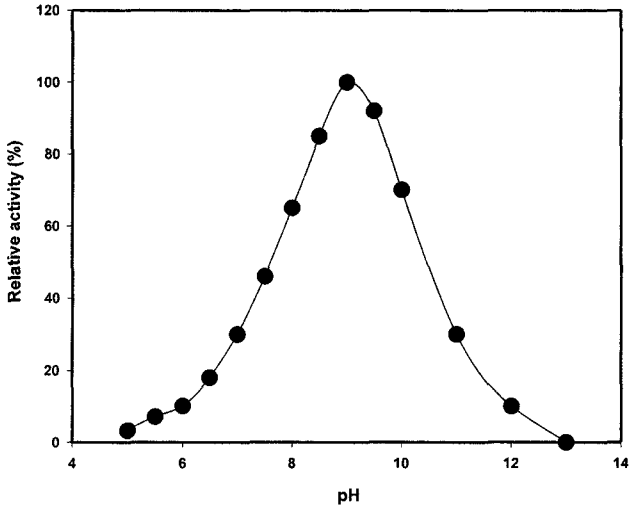


Fig. 3. Effect of pH on the activity of *Bacillus subtilis* K7 protease. The optimum pH was studied by incubating the enzyme with different buffers from pH 2 to 13 for 30 min (pH 2-5: 1 M sodium acetate-HCl, pH 5-8: 1/15 M phosphate, pH 8-9: 1/20 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-HCl, pH 9-12: 1/20 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-NaOH).

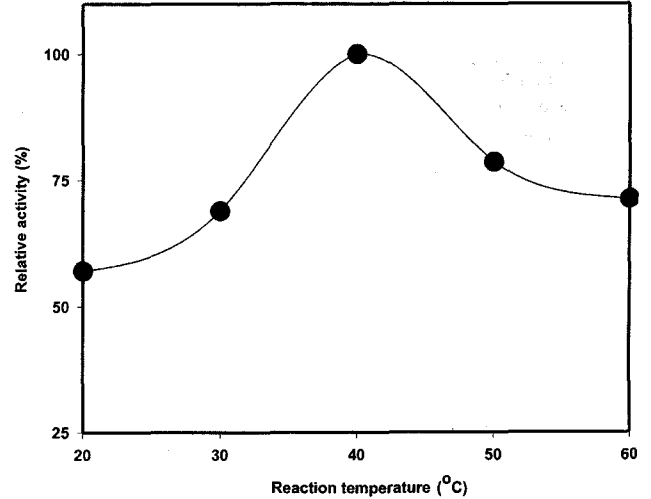


Fig. 5. Effect of temperature on the activity of *Bacillus subtilis* K7 protease. The optimum temperature was studied by incubating the enzyme with the optimum buffer (1/20 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-NaOH, pH 9) from 20°C to 60°C for 30 min.

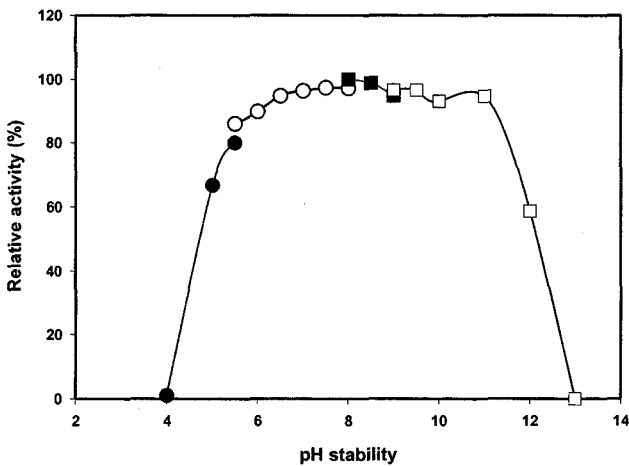


Fig. 4. pH stability of the protease produced from *Bacillus subtilis* K7. The pH stability was studied with the residual protease activities after pretreating for 12 hr at 4°C. (●: 1 M sodium acetate-HCl, ○: 1/15 M phosphate, ■: 1/20 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-HCl, □: 1/20 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-NaOH).

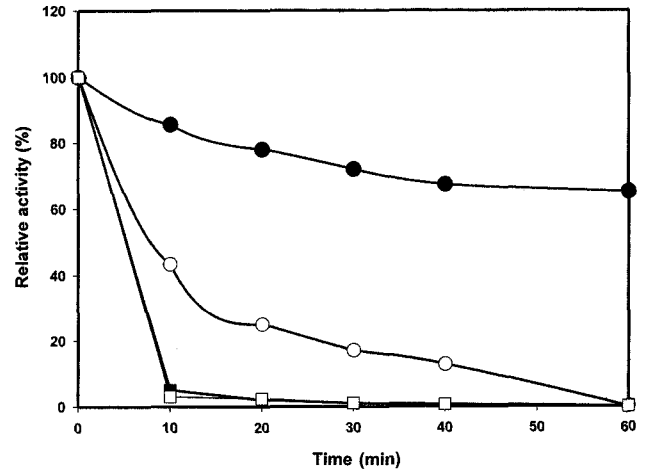


Fig. 6. Thermal stability of the protease produced from *Bacillus subtilis* K7. After the enzyme solutions at various temperatures (40-70°C) were incubated for different time (0-60 min), the residual activity was measured. (●: 40°C, ○: 50°C, ■: 60°C, □: 70°C).

정제효소에 미치는 각종효소저해제의 영향을 검토하여 본 결과(Table 6), 저해제의 영향은 저해제의 농도가 증가함에 따라 p-CMB는 20%에서 35%의 효소활성이 저해되었으며, iodoacetate는 10 mM 이상의 농도에서 거의 80, 90%의 활성이 강하게 저해되었으며, 효소활성단에 금속이온이 있는 경우 금속이온과 chelate를 형성해 효소활성저해를 일으키는 EDTA와 CDTA는 각각 65%와 50%의 저해를 받아 본 효소는 금속이온을 가지는 metalloprotease 또는 serine protease로 추정되었다. 장 등에 의해 fibrinolytic enzyme은 EDTA에 의해 저해되지만 PMSF에 의해서 저해되지 않는다고 보고<sup>23)</sup>되었는데 이는 fibrinolytic activity가 Cu<sup>2+</sup>에 의해 증가되는 반면 Cd<sup>2+</sup>와 Ba<sup>2+</sup>에 의해 강력하게 저해되는 것을 나타낸다.<sup>23)</sup> 또한 김 등에 의

해서 fibrinolytic activity가 Cu<sup>2+</sup>에 의해 강하게 저해되고 Zn<sup>2+</sup>에 의해 활성이 증가되는 것으로 보고<sup>11)</sup>되었는데 이와 같이 많은 fibrinolytic enzyme이 금속이온을 가지는 metalloprotease로 추정되었다.

**K<sub>m</sub> Value.** 기질농도와 효소활성과의 친화성을 알아보기 위해 fibrin을 2~16 mg/ml로 기질농도를 달리하였을 때 효소활성의 변화를 측정후 Lineweaver-Burk plot 방법으로 본 효소의 fibrin에 대한 K<sub>m</sub> 값을 측정한 결과 Fig. 7에서 볼수 있는바와 같이 본 효소의 K<sub>m</sub> 값은 1.8×10<sup>-2</sup> M로 계산되었다. 이 결과는 유<sup>3)</sup>가 보고한 *Bacillus* sp. 균주의 3.1 mM과 유사하였으나 *Bacillus cereus*<sup>1)</sup>, *Bacillus* sp.<sup>24,25)</sup>보다는, 각각 11.11 mM, 4.8 mM, 8.2 mM로 낮았고 *Bacillus* sp.<sup>26)</sup> 1.3 mM보다는 높았다.

**Table 5. Effect of various metal ions on the activity of *Bacillus subtilis* K7 protease**

Metal ion	Relative activity (%)		
	2 mM	10 mM	20 mM
None	100	100	100
KCl	92.1	84	74.9
BaCl <sub>2</sub>	90	85	83.5
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	88.5	44	15.8
CaCl <sub>2</sub>	105.9	85	85.9
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	96.8	78.7	69.2
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	95.6	61.6	52.9
MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	97.6	95	99.1
AgNO <sub>3</sub>	83	50.3	3.34
FeCl <sub>3</sub>		4	0

Metal ions were added to the final concentration of 2, 10, 20 mM and the enzyme solution was incubated at 40°C for 20 min after preincubation for 12 hr at 4°C.

**Table 6. Effect of chemical inhibitors on the activity of *Bacillus subtilis* K7 protease**

Chemicals	Relative activity (%)		
	2 mM	10 mM	20 mM
None	100	100	100
SDS	85.8	85.2	85.9
p-CMB	92.3	81	65.9
Iodoacetate	81	14	2.5
EDTA	41	35	28.3
CDTA	62.7	53.7	33.4
L-cystein	96.4	83	80
Hydroxyurea	85.9	83.4	80.3
AHA	88.3	85	80.1
Thiourea	84.7	81.8	71.7

Protease activity was measured by 20 min of incubation at 40°C after preincubating the enzyme solution (added at 2, 10, 20 mM) for 12 hr at 4°C.

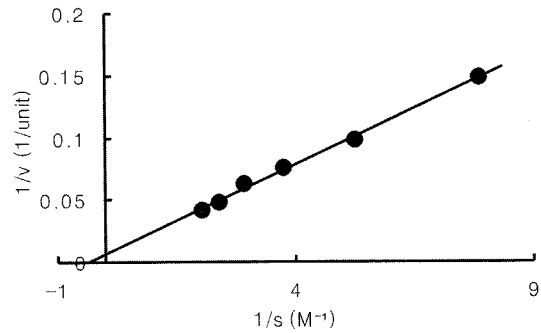
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, SDS: sodium dodecyl sulfate, CDTA: trans-1,2-diaminocycloheane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, p-CMB: p-chloromercuribenzoic acid, AHA: acetohydroxamic acid.

### 감사의 글

본 연구는 학술진흥재단 연구비(KRF-21-005-G0009)에 의해 수행된 과제로 연구비 지원에 감사드리며 원고 정리를 해준 김진락에게 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Fujita, M., Nomura, K., Hong, K., Ito, Y., Asada, A. and Nishimuro, S. (1993) Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 1340-1347.
2. Kim, H. K., Kim, G. T., Kim, D. K., Choi, W. A., Park, S. H., Jeong, Y. K. and Kong, I. S. (1997) Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermented fish. *J. Ferment. Bioeng.*



**Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of various concentrations of fibrin on the enzyme reaction rate.** Velocity (V) was expressed in µg-tyrosine per ml of enzyme solution (tyrosine with optimum buffer) at 40°C per minute.

84, 307-312.

3. Yoo, C. K., Seo, W. S., Lee, C. S. and Kang, S. M. (1998) Purification and characterization of fibrinolytic enzyme excreted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from Chungkookjang. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 507-514.
4. Choi, N. S. and Kim, S. H. (2001) The Effect of sodium chloride on the serine type fibrinolytic enzymes and the thermostability of extracellular protease from *Bacillus amyloliquefaciens* DJ-4. *J. Biochem. Mol. Biol.* **34**, 134-138.
5. Yi, H. K., Chun, Y. J. and Kim, H. B. (1999). Characterization of *Bacillus cereus* SH-7 extracellular protease. *J. Microbiol.* **37**, 213-217.
6. Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K. and Hiratani, H. (1990) Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of NK. *Acta Haematol.* **84**, 139-143.
7. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
8. Davis, B. J. (1964) Disk electrophoresis II method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
9. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
10. Lee, S. K., Heo, S. and Joo, H. K. (1998) Isolation and identification of fibrinolytic bacteria from Korean traditional Chungkookjang. *Kor. Agr. Chem. Soc.* **41**(in press).
11. Hwang, S. Y. (1995) Purification and characterization of extracellular serine protease produced by *Bacillus* sp. KUN-17. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 53.
12. Shin, H. H. and Choi, H. S.. (1998) Purification and partial characterization of a metalloprotease in *Flammulina velutipes*. *J. Microbiol.* **36**, 20-25.
13. Fayek, K. I. and El-Sayed, S. T. (1980) Purification and properties of fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis*. *Zeit. fur Allgem. Mikrobiol.* **20**, 375-382.
14. Kim, D. Y. (2001) Purification and characteristics of fibrinolytic protease produced from *Bacillus subtilis* K7 a Korean soy sauce fermenting bacteria. MS Thesis, Yeungnam University.
15. Kurotsu, T., Marahel, M. A., Muller, K. D. and Kleinkauf, H.

- (1982) Characterization of an intracellular serine protease from sporulating cells of *Bacillus brevis*. *J. Bacteriol.* **151**, 1466-1472.
16. Kim, M. H., Choi, S. K., Koo, B. T., Shin, B. S., Sohn, C. B. and Kim, J. I. (1992) Cloning and expression of *Serratia marcescens* protease gene in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **2**, 231-236.
17. Choi, C., Choi, K. S., Cho, Y. J., Lim, S. I., Lee, S. H., Son, J. H., Choi, H. J. and Lee, H. D. (1996) Characteristics and action pattern of protease from *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118 in Korean traditional soy sauce. *Kor. Agric. Chem. Soc.* **39**, 460-465.
18. Kim, W. E., 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. (1996) Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from chungkookjang. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2482-2488.
19. Kim, S. J., Yoon, H. J., Lee, M. S. and Kim, H. B. (1997) Isolation and characterization of *Bacillus cereus* secreting protease from Korean soybean paste. *Kor. J. Microbiol.* **33**, 13-141.
20. Kim, E. B. and Kim, Y. M. (1990) Purification and some properties of two intracellular proteases from *Acinetobacter* sp. strain JC1 DSM 3803. *Kor. J. Biochem.* **23**, 308-314.
21. Lee, E. G., Park, E. H. and Hyun, H. H. (2000) Purification and characterization of two alkaline proteases produced by *Pseudomonas* sp. BK7. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 677-684.
22. Yun, S. W., Lee, G. P., Sin, C. S. and Oh, D. H. (1989) Purification and properties of alkaline protease produced by an alkalophilic *Streptomyces* sp. YSA-130. *Microbiol. Bioeng.* **17**, 358-364.
23. Jang, S. A., Kim, M. H., Lee, M. S., Oh, T. K. and C.B. Sohn. (2000) Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus* sp. S19 from Shrimp *Jeot-Gal*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 258-263.
24. Chung, M. S. (1985) Production and properties of thermostable alkaline protease from thermophilic *Bacillus* sp. MS-22. MS Thesis, Konkuk University.
25. Taksmi, H., Akiba, T. and Horikoshi, K. (1990) Characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 519-523.
26. Bae, M. and Park, P. R. (1989) Purification and characterization of thermostable alkaline protease by alkalophilic *Bacillus* sp. No. 8-16. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**, 545-551.
27. Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, N. and Hiratami, H. (1990) Enhancement of the fibrolytic activity in plasma by oral administration of NK. *Acta Haematol.* **84**, 139-143.
28. Kang, B. S., Jeon, S. J. and Kim, Y. M. (1999) Purification and characterization of two extracellular proteases from *Oligotropha carboxydovorans* DSM 1227. *J. Microbiol.* **37**, 14-20.
29. Hong, N., Choi, M. and Yang, C. (1989) Extracellular proteases from *Bacillus licheniformis*: partial purification and characterization. *Kor. J. Microbiol.* **27**, 245-249.
30. Izotova, L., Strongin, A. Y., Chekulaeva, L. N., Sterkin, V. E., Ostoslavskaya, V. I., Lyublinskaya, L. A., Timokhina, E. A. and Stepanov, V. M. (1983) Purification and properties of serine protease from *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* **155**, 826-830.
31. Lee, H. S. and Kim, Y. M. (1991) Purification and characterization of an intracellular protease from *Pseudomonas carboxydohydrogena*. *Kor. J. Microbiol.* **29**, 167-171.
32. Schmitz, G. and Braun, V. (1985) Cell bound and secreted protease of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **161**, 1002-1009.
33. Wry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Biol. Chem.* **193**, 265-275.

#### Purification and Characterization of Fibrinolytic Enzyme Produced by *Bacillus subtilis* K7 Isolated from Korean Traditional Soy Sauce

Doo Young Kim, Eun Tag Lee and Sang-Dal Kim\* (Department of Applied Microbiology, College of Natural Resources, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea)

**Abstract:** An alkaline fibrinolytic protease-producing bacteria was isolated from Korean traditional soy sauce and identified as *Bacillus subtilis* K7 from the results of analyses of its morphological and physiological properties, API<sup>®</sup>, and Biolog system. The enzyme was purified by 75% ammonium sulfate fractionation, QAE-Sephadex anion and SP-Sephadex cation exchange column chromatography and Sephadex G-100 gel filtration. The specific activity of the purified enzyme was 233.9 unit/mg protein and the yield of enzyme was 3.8%. The homogeneity of the purified enzyme was confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis. Molecular mass of the enzyme was estimated about 21,500 Da by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and gel chromatography. The optimum temperature and pH for the enzyme activity were 40°C and 9.0, respectively. The enzyme was stable in a pH range of 5.0 to 12.0, and 60% of its activity was lost on heat treatment at 50°C for 20 min. The activity of the purified enzyme was inhibited by the presence of Fe<sup>2+</sup>, Ag<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, iodoacetate, ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), and trans-1,2-diaminocycloheane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (CDTA). The results indicates that the enzyme requires a metal ion for its enzymatic activity.

Key words: *Bacillus subtilis*, fibrinolytic activity, fibrinolytic protease

\*Corresponding author