

## 청국장으로부터 분리한 *Bacillus amyloliquefaciens* D4-7이 분비하는 혈전용해효소의 특성 및 열안정성에 미치는 첨가물의 효과

김상숙 · 이주훈 · 안용선 · 김정환<sup>1</sup> · 강대경\*  
이지바이오시스템 생물자원연구소, <sup>1</sup>서울보건대학 조리예술과

**A Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* D4-7 Isolated from Chungkook-Jang; It's Characterization and Influence of Additives on Thermostability.** Kim, Sang Suk, Ju-Hoon Lee, Yong-Sun Ahn, Jung-Hoan Kim, and Dae-Kyung Kang\*. Bio-Resources Institute, EASY BIO System Inc., Uiwang 437-020, Korea. <sup>1</sup>Department of Culinary Art, Seoul Health College, Sunghnam 461-713, Korea - *Bacillus amyloliquefaciens* D4, which produces a strongly fibrinolytic enzyme, was isolated from Chungkook-Jang, a traditional Korean soybean-fermented food. *B. amyloliquefaciens* D4 was mutated with N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) to yield a series of mutants with increasing levels of fibrinolytic enzyme production. After mutation, a mutant D4-7 was obtained with fibrinolytic activity about eight times stronger than the parent strain. The fibrinolytic activity of *B. amyloliquefaciens* D4-7, reached a maximum, when the producer was cultivated in 2% Isolated Soy Protein (ISP) broth for 48 h at 37°C. Compared to commercial fibrinolytic enzymes, the cell-free culture supernatant of *B. amyloliquefaciens* D4-7 showed stronger activity than plasmin and streptokinase. The optimum temperature and pH were 50°C and 10.0 and thermostability was increased by the addition of glycerol, glucose, and NaCl.

**Key words:** *Bacillus amyloliquefaciens*, Chungkook-Jang, fibrinolytic enzyme, thermostability

최근 조사된 현대인의 사망률 분석에 의하면 혈관 장애에 의한 사망률이 1위를 차지하고 있으며 우리나라 역시 식생활 문화의 서구화에 따라 혈관 장애에 의한 사망률이 1위를 차지하고 있다.

현재까지 혈전증의 치료제로 사용되고 있는 치료제로는 streptokinase, urokinase, tissue-type plasminogen activator (tPA) 등이 있으나 이런 치료제들은 비경제적이고 반감기가 짧으며 urokinase를 제외하고는 경구 투여가 어려운 문제점을 가지고 있다. 현재 일본의 미야자키 의과대학팀은 중풍 치료에 사용되어왔던 지렁이로부터 6가지의 혈전용해효소 (lumbrikinase)를 분리하여 경구용 치료제로 만들었으나 역시 제품의 반감기가 짧고 가격이 비싼 단점이 있다[16, 18]. 이에 따라 식품섭취를 통해 뇌졸중, 심근경색, 혈전증 등을 미연에 방지하거나 개선시킬 수 있는 새로운 물질을 찾기 위한 노력이 진행중이다.

이미 일본에서는 자국의 전통 대두발효식품인 낫토로부터 분리된 nattokinase라는 효소를 경구 투여시 생체내의 혈전용해능을 높일 수 있다고 보고되어 있다. nattokinase는 콩을 발효시킬 때 *Bacillus natto*가 대두의 영양성분을 섭취, 생육

하면서 만들어내는 혈전용해효소로서 직접적이고 강력한 혈전분해능력과 pro-urokinase 활성화 능력을 갖고 있는 것으로 알려지고 있다[17, 20, 21]. 실제로 일본에서는 낫토가 기능성 식품으로 각광받고 있으며 nattokinase를 함유하는 많은 건강보조 식품들이 시판되고 있다.

우리나라에도 일본의 낫토와 마찬가지로 우리 조상들이 수백년 동안 섭취한 대두발효 식품인 청국장, 된장, 간장 등이 특별한 부작용이 없는 식품으로 널리 사용되고 있다. 요즘은 이러한 대두발효식품에서 항산화효과, 혈전용해효과, 혈압강화효과 등 각종 유익한 생리활성물질들이 밝혀지고 있으며[8, 10], 특히 청국장을 섭취할 때 생체내의 혈전용해능이 증가됨이 밝혀져, 이러한 식품을 섭취함으로써 여러 혈관질환을 치료 및 예방할 수 있다는 점에서 관심이 고조되고 있다.

이에 본 연구에서는 1) 우리나라 전통 대두발효식품인 청국장에서 혈전용해효소를 분비하는 미생물을 분리, 동정한 후 돌연변이에 의한 균주 개량을 시도하였고, 2) 분리되는 혈전용해효소의 특성을 분석하였으며 3) 첨가물에 의한 저장안정성을 연구함으로써 산업적인 적용성을 높이고자 하였다.

\*Corresponding author  
Tel: 82-41-585-2881, Fax: 82-41-585-2887  
E-mail: kdk@easybio.co.kr

## 재료 및 방법

### 사용배지 및 시약

Plasmin, fibrinogen, thrombin, N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) 등은 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. 미생물 배양용 배지인 Luria-Bertani(LB), Nutrient Broth(NB), Tryptic Soy Broth(TSB)는 Difco에서 구입하여 사용하였고, 균주의 분리를 위한 배지로는 1% skim milk를 포함하는 LB agar 배지를 사용하였다. 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

### 미생물의 분리 및 배양

혈전용해효소를 분리하는 미생물을 분리하기 위해서 국내 재래시장에서 시판하는 청국장을 구입하여 시료로 사용하였다. 시료 1 g을 100 ml의 멸균증류수에 현탁한 후 NB agar plate에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 이때 형성된 단일 균락을 선택하여 fibrin plate에 계대하였으며 37°C에서 24시간동안 배양한 후 균락 주변에 투명환을 생성하는 미생물중 투명환의 크기로 미생물을 분리하였다. 선발된 균주를 TSB broth에서 액체배양한 후 fibrin plate에 30 µl를 점적하여 fibrinolytic activity를 측정하여 최종 선발하였다. 대조구로는 Plasmin(1 U/ml)을 사용하였다.

### 미생물의 동정

선발된 균주는 NB agar에서 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 동정에 사용하였다. 1차적으로 형태학적, 생화학적 특성을 조사한 후, API 50CHB kit(bioMerieux Co, France)를 이용하여 49개의 탄소원에 대한 이용성을 조사하여 간이 동정하였다. 16S rDNA를 이용한 동정을 위해, Promega에서 판매하는 Wizard genomic DNA purification kit를 사용하여 total DNA를 추출하였다. 추출된 total DNA는 Bsub5F(5'aagtcgagcggcagatgg3')와 Bsub3R(5'ccgttccaatgacctccc3') primer를 이용하여 PCR product를 얻었다. PCR product의 sequencing을 통해 얻어진 염기서열은 Blast program(National Center for Biotechnology Information, USA)을 사용하여 유전자 database와 비교 분석하였다.

### MNNG 처리에 의한 돌연변이주의 선발

돌연변이주의 분리는 Garhardt 등[7]의 방법을 변형하여 사용하였다. 대수기 중기(OD<sub>600</sub>=0.3-0.4)까지 배양한 균체를 원심분리하여 수거한 뒤 0.5 M Tris-Maleate buffer(pH 7.8)로 3회정도 세척한 후 동일 완충용액으로 현탁시켰다. 현탁액에 농도 5 mg/ml의 MNNG를 첨가하여 37°C에서 적정시간 반응시킨 후 0.5 M Tris-Maleate buffer(pH 7.8)로 2회 세척하고 1% skim milk를 포함하는 LB agar plate에 도말하였다. Skim milk 함유 LB plate에 생기는 투명환의 크기로 돌연변이체를 1차로 분리하였으며, 1차로 분리된 돌연변

이체들은 Tryptic Soy Broth (TSB)에서 24시간동안 배양하여 fibrin plate에서의 fibrinolytic enzyme 활성을 확인한 후 최종 선발하였다. 최종 선발된 균주는 반복 배양으로 효소 활성이 일정하게 유지되는지 확인하였다.

### Fibrin plate를 이용한 균주의 혈전용해효소 활성 측정

10 mM 인산완충용액(pH 7.8, 0.15 M NaCl)에 human fibrinogen을 0.6%가 되도록 용해시키고, 완전히 용해된 fibrinogen 용액 5 ml에 100 U/ml의 thrombin 100 µl를 첨가하였다. 위와 동일한 완충용액에 녹인 1% agarose 용액 5 ml를 첨가하여 충분히 혼합한 후 즉시 평판에 붓고 실온에서 5-10분간 방치, 고화시켜 최종적으로 0.3% fibrin plate를 제조하였다[2]. 여기에 균체를 제거한 배양액을 10 µl 씩 점적한 후 37°C에서 24시간 반응시켜 용해된 환의 면적을 측정하였다. 대조구로는 정제된 혈전용해제인 plasmin(1 unit/ml)을 사용하였다.

#### 혈전용해 활성(PU/ml)

= 시료의 투명환 면적/plasmin(1 U/ml)의 투명환의 면적

### Fibrin 용액을 이용한 조효소액의 혈전용해효소 활성 측정

Ehrlich 방법을 사용하였다[5]. 선발된 균주를 2% 분리대 두단백(ISP) 액체배지에서 37°C, 48시간 배양하였다. 배양액을 원심분리(12,000 rpm, 4°C)한 다음 상등액에 ammonium sulfate를 처리하여 crude enzyme를 침전시켰다. 침전된 crude enzyme은 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 용해한 후, 동일한 완충용액으로 4°C에서 12시간 이상 투석하여 조효소액을 얻었다. Fibrin 0.6 g을 1 N NaOH 80 ml에 녹이고 pH를 7.5~8.0으로 조정한 후 증류수에서 하루동안 투석하여 염을 제거하였으며, 염이 제거된 용액을 증류수로 100 ml이 되게 맞추어 0.6% fibrin substrate 용액을 제조하였다. 이 용액과 조효소액을 37°C에서 10분간 반응시킨 후 0.4 M trichloroacetic acid(TCA)로 반응을 정지시켰으며, 10분간 방치한 후 원심분리하여 상등액을 275 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit는 조효소액 1 ml이 1분동안 tyrosine 1.5 µg을 생성하는 능력으로 정하였다.

### pH 및 온도변화에 따른 효소의 활성 및 안정성

효소의 최적 pH를 검토하기 위해서는, pH 2.0~4.0은 50 mM glycine-HCl buffer, pH 4.0~7.0은 50 mM sodium acetate buffer, pH 7.0~9.0은 50 mM Tris-HCl buffer, pH 9.0~12.0은 50 mM glycine-NaOH buffer를 각각 사용하였다. 효소반응의 최적온도를 알기 위해, 30°C에서 70°C까지의 각 온도에서 반응시킨 후 효소의 활성을 측정하였다.

효소의 온도 안정성을 검토하기 위해, 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)에 조효소액을 첨가하여 30°C에서 70°C까지의 온도에서 30분간 방치한 후 효소의 잔존활성을 측정하였다. 효소의 pH 안정성을 조사하기 위해서는, pH 2.0에서

pH 12.0까지의 각 원충용액에 조효소액을 첨가한 후 30분간 방치한 후 효소의 잔존활성을 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**분리균주의 선발 및 동정**

재래시장에서 구입한 청국장으로부터 분리된 미생물 중 fibrin plate에서 생성되는 환의 크기로 6종을 1차 선발하였다. 선발된 6종의 균주들을 TSB broth에서 24시간 배양한 후, 0.3% fibrin plate에서 혈전용해능을 확인하여 최종적으로 D4를 선발하였다. 최종 선발된 D4는 생화학적 특성과 16S rDNA의 분석을 통하여 동정되었다. D4의 생화학적 특성을 조사하기 위해서는 API system을 사용하였고, 분석결과 분리된 미생물 D4는 그람 양성으로 간균이며 호기성으로 세포내에 포자를 갖고 있는 bacilli 속의 균주임을 알 수 있었다. Catalase test는 양성, oxidase test는 음성이며, 97.6%의 유사성율로 *B. amyloliquefaciens*로 동정되었다. 16S rDNA를 이용한 동정을 위해서는 total DNA를 추출하였고 bacteria의 16S rDNA의 동정에는 primer Bsub5F와 Bsub3R를 사용하였다. 사용된 primer Bsub5F와 Bsub3R은 *B. subtilis* 근연종으로 알려진 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. atrophaeus*에서만 PCR product를 얻을 수 있는 primer로, 그 PCR product의 크기는 약 585 bp이다[22]. 실제로 이 primer를 사용하여 D4에서 약 600 bp정도의 PCR product를 얻었고 이를 pGEM-T vector에 cloning하여 염기서열을 분석한 결과 *B. amyloliquefaciens*와 100% 상동성을 보여(Fig. 1), 청국장으로부터 분리된 혈전용해능이 우수한 균주 D4는 *B. amyloliquefaciens* D4로 명명하였다.

**MNNG에 의한 돌연변이주 선발**

혈전용해효소 분비균주로 선발된 *B. amyloliquefaciens* D4의 혈전용해효소 분비능을 높이기 위해 MNNG를 이용한 돌연변이를 유도하였다. MNNG를 처리한 후 1% skim milk를 포함하는 LB agar plate에서 skim milk 분해능이 높은 7개의 돌연변이주를 1차 선발하였다. 선발된 균주들을 TSB broth에서 모균주와 24시간 배양한 후 원심분리하여 상등액의 혈전용해능을 0.3% fibrin plate상에서 비교함으로써 혈전용해능이 가장 우수한 돌연변이주를 선발하였다. 얻어진 돌연변이주를 *B. amyloliquefaciens* D4-7로 명명하였으며, fibrin plate를 사용하여 측정된 혈전용해능은 6.5 PU/ml로서 모균주(0.85 PU/ml)보다 약 8배 정도 개선되었다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 natto와 청국장에서 분리한 Kim 등[11]의 보고(1.58~1.84 PU/ml)와, 이보다 2~3배 우수한 균주로 보고된 Kim 등[9]이 분리한 *B. subtilis*(4.93 PU/ml), *B. pantothenicus*(3.83 PU/ml) 보다 더 높은 혈전용해효소 생산능이 있음을 알 수 있었다. 특히 fibrinolytic/caseinolytic

```

D4 : 1  aagtcgagcggacagatgggagcttgcctccctgatgttagcggcgacgggtgagtaaca 60
      : 11  : 21  : 31  : 41  : 51  : 61  : 71  : 81  : 91  : 101
B. amy1 : 45 aagtcgagcggacagatgggagcttgcctccctgatgttagcggcgacgggtgagtaaca 104
      : 11  : 21  : 31  : 41  : 51  : 61  : 71  : 81  : 91  : 101

D4 : 61  cgtgggtaacctgacctgtaagactgggataactccgggaaccggggctaataccggatg 120
      : 11  : 21  : 31  : 41  : 51  : 61  : 71  : 81  : 91  : 101
B. amy1 : 105 cgtgggtaacctgacctgtaagactgggataactccgggaaccggggctaataccggatg 164
      : 11  : 21  : 31  : 41  : 51  : 61  : 71  : 81  : 91  : 101

D4 : 121 cttgtttgaaccgatggttcaaacataaaaggctggctcggctaccacttacagatgga 180
      : 11  : 21  : 31  : 41  : 51  : 61  : 71  : 81  : 91  : 101
B. amy1 : 165 cttgtttgaaccgatggttcaaacataaaaggctggctcggctaccacttacagatgga 224
      : 11  : 21  : 31  : 41  : 51  : 61  : 71  : 81  : 91  : 101

D4 : 181 cccgcggcgcattagctagttggtgaggtacggctcaccaggcgacgatcgtagccg 240
      : 11  : 21  : 31  : 41  : 51  : 61  : 71  : 81  : 91  : 101
B. amy1 : 225 cccgcggcgcattagctagttggtgaggtacggctcaccaggcgacgatcgtagccg 284
      : 11  : 21  : 31  : 41  : 51  : 61  : 71  : 81  : 91  : 101

D4 : 241 acctgagagggtgatcggccacactgggactgagacaogccagactcctaccggggagc 300
      : 11  : 21  : 31  : 41  : 51  : 61  : 71  : 81  : 91  : 101
B. amy1 : 285 acctgagagggtgatcggccacactgggactgagacaogccagactcctaccggggagc 344
      : 11  : 21  : 31  : 41  : 51  : 61  : 71  : 81  : 91  : 101

D4 : 301 agcagtagggaaatctccgcaatggacgaaagtctgacggagcaacgccgctgagtgat 360
      : 11  : 21  : 31  : 41  : 51  : 61  : 71  : 81  : 91  : 101
B. amy1 : 345 agcagtagggaaatctccgcaatggacgaaagtctgacggagcaacgccgctgagtgat 404
      : 11  : 21  : 31  : 41  : 51  : 61  : 71  : 81  : 91  : 101

D4 : 361 gaaggttttcggatcgtaaagctctgtttagggagaacaagtcgcttcaaataggg 420
      : 11  : 21  : 31  : 41  : 51  : 61  : 71  : 81  : 91  : 101
B. amy1 : 405 gaaggttttcggatcgtaaagctctgtttagggagaacaagtcgcttcaaataggg 464
      : 11  : 21  : 31  : 41  : 51  : 61  : 71  : 81  : 91  : 101

D4 : 421 cggcaccttgacgggtacctaacagaaagccacggctaacctacgtgccagcagccgggt 480
      : 11  : 21  : 31  : 41  : 51  : 61  : 71  : 81  : 91  : 101
B. amy1 : 465 cggcaccttgacgggtacctaacagaaagccacggctaacctacgtgccagcagccgggt 524
      : 11  : 21  : 31  : 41  : 51  : 61  : 71  : 81  : 91  : 101

D4 : 481 aatacgtaggtggcaagcgttgcctggcaattattggcgtaaaaggctcgcagccggttt 540
      : 11  : 21  : 31  : 41  : 51  : 61  : 71  : 81  : 91  : 101
B. amy1 : 525 aatacgtaggtggcaagcgttgcctggcaattattggcgtaaaaggctcgcagccggttt 584
      : 11  : 21  : 31  : 41  : 51  : 61  : 71  : 81  : 91  : 101

D4 : 541 cttaaagtctgatgtgaaagccccggctcaaccggggagggtcattggaactgg 595
      : 11  : 21  : 31  : 41  : 51  : 61  : 71  : 81  : 91  : 101
B. amy1 : 585 cttaaagtctgatgtgaaagccccggctcaaccggggagggtcattggaactgg 639
    
```

Fig. 1. 16S rDNA genes, partial sequences of *B. amyloliquefaciens* (*B. amy1*) and D4. Primer sequences are underlined.

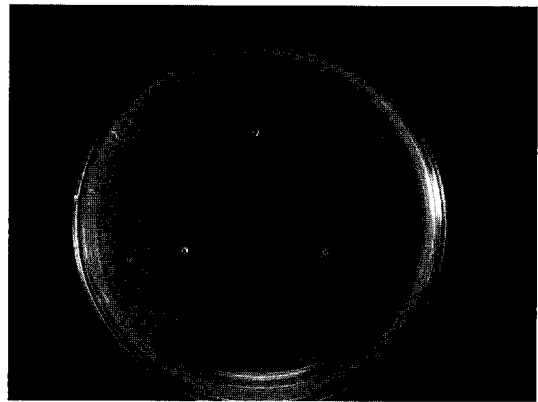


Fig. 2. Fibrinolytic activity assay on the fibrin plate (0.3%) with the culture supernatant of *B. amyloliquefaciens* D4 and *B. amyloliquefaciens* D4-7. P: Plasmin 1.0 U/ml, D4: *B. amyloliquefaciens* D4, D4-7: *B. amyloliquefaciens* D4-7.

activity(%)가 68%로서, 이미 알려진 단백질분해효소들이 10~30% 정도의 fibrinolytic/caseinolytic activity를 갖는 것에 비해 높은 혈전용해 활성을 갖는 것으로 나타났다. 또한 균주의 안정성을 위한 반복 배양 실험에서도 안정적으로 효소의 활성이 유지되었기 때문에(data not shown) *B. amyloliquefaciens* D4-7을 혈전용해효소 분비 미생물로 최종 선발하였다.

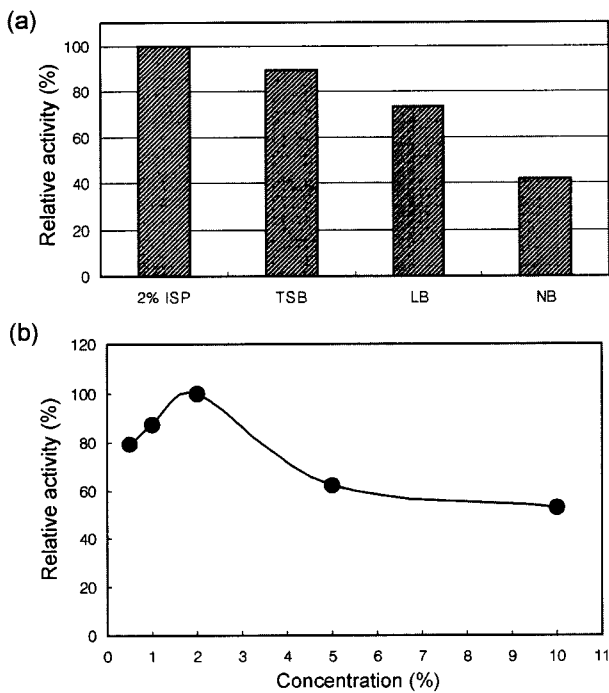
**배지종류에 따른 혈전용해효소의 생산성**

배지종류에 따른 혈전용해효소의 생산성을 비교하기 위하

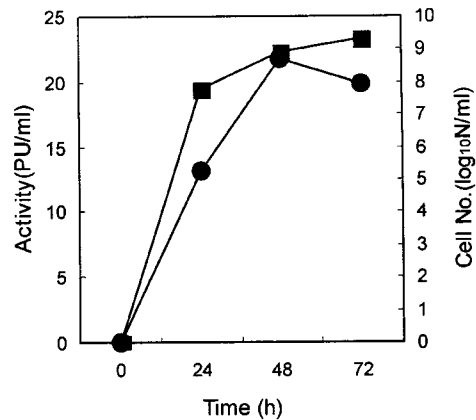
여 LB, NB, TSB 및 2% ISP 배지에서 각각 배양한 후 분비되는 혈전용해효소의 양을 비교한 결과, 2% ISP 배지에서 혈전용해효소의 활성이 가장 높았으며 TSB 배지보다 활성이 10%가량 증가하였다(Fig. 3a). 또한, ISP 농도에 따른 효소생산성을 비교한 결과, ISP 2%에서 효소생산성이 가장 높았다(Fig. 3b). 한편, 2% ISP 배지에 glucose, mannose, sucrose 등의 탄소원을 2% 첨가해도 균체의 증식에는 유의적인 차이를 나타내지 않았고 효소의 생산성은 오히려 저하되는 경향을 보였는데(data not shown), 이와 같은 현상은 catabolite repression에 의해 혈전용해효소의 생산이 저해되기 때문인 것으로 추측된다[3, 12]. 한편, 배지의 초기 pH에 따른 효소의 생산을 조사한 결과, pH 8.5가 가장 적합하였다(data not shown). 이상의 결과에 따라 혈전용해효소 생산용 배지로서 2% ISP 배지를 선정하였으며, 2% ISP 배지에서 48시간 배양하였을 때 효소의 생산량이 가장 높았다(Fig. 4).

**효소활성에 미치는 pH의 영향**

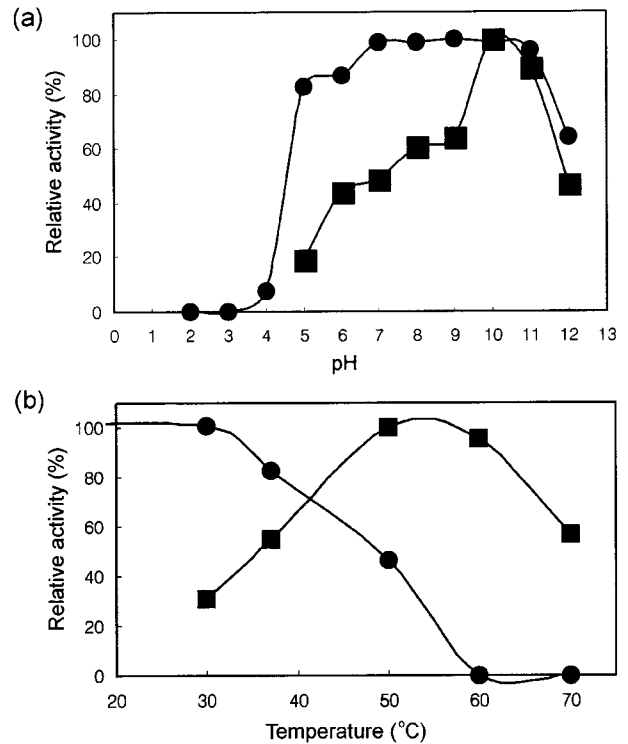
*B. amyloliquefaciens* D4-7가 분비하는 혈전용해효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해 buffer pH를 5에서 12까지 변화를 주어 측정된 결과, pH 10에서 최고의 활성을 얻었다(Fig. 5a). 한편, 효소의 pH 안정성을 측정하기 위해 pH 2에서 12까지 각각의 pH에서 37°C에서 30분간 방



**Fig. 3.** Comparison of the fibrinolytic activity of *B. amyloliquefaciens* D4-7 cultivated in several media broth. (a) Comparison of the fibrinolytic activity of *B. amyloliquefaciens* D4-7 cultivated in several media. (b) Effect of concentration of ISP (Isolated Soy Protein) on enzyme activity.



**Fig. 4.** Growth and fibrinolytic enzyme production of *B. amyloliquefaciens* D4-7. *B. amyloliquefaciens* D4-7 was cultured in 2% ISP broth at 37°C. -■-, Cell growth; -●-, Fibrinolytic activity.



**Fig. 5.** (a) Effect of pH on the fibrinolytic activity (-■-) and stability (-●-). The enzyme was assayed at various pHs for the measurement of enzyme activity and assayed after incubation at various pHs for 30 min for the measurement of pH stability. (b) Effect of temperature on the fibrinolytic activity (-■-) and stability (-●-). The enzyme was assayed at various temperatures for the measurement of enzyme activity and assayed after incubation at various temperature for 30 min for the measurement of thermostability.

치한 후 잔존 활성을 측정된 결과, pH 7.0~11.0까지 안정한 활성을 보였다(Fig. 5a). 이상의 결과에서 보듯이와 같이 *B. amyloliquefaciens* D4-7에서 분비되는 혈전용해효소는 알칼

리성 효소임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Kim 등[10]이 보고한 *Bacillus* sp. strain CK11-4 유래의 혈전용해효소의 최적 pH(pH 10~12) 및 pH 안정성(pH 7~12), Yoo 등[23]이 보고한 *B. subtilis* K-54 유래 효소의 최적 pH(pH 10) 및 pH 안정성(pH 8~12), Lee 등[13]이 보고한 *Bacillus* sp. KDO-13 유래 효소의 최적 pH(pH 8.0) 및 pH 안정성(pH 6~10)과 유사하였다. 하지만 산성 범위 pH 5~6에서의 효소의 잔존활성이 80%로서, 기 보고된 혈전용해효소들보다 pH 안정성이 상대적으로 높은 효소임을 알 수 있었다.

**효소활성에 미치는 온도의 영향**

효소활성에 미치는 반응 최적온도를 조사하기 위해 30°C에서 70°C까지 각 온도에서 반응시킨 후 활성을 측정 한 결과, 50°C에서 최고의 활성을 보였다(Fig. 5b). 한편, 효소의 온도안정성을 검토하기 위하여 조효소액을 20°C에서 70°C까지의 각 온도에서 30분간 처리한 후, 37°C에서의 효소잔존활성을 측정하였다. Fig. 4b에서 보는 바와 같이 40°C 이상에서 효소활성이 급격히 감소하기 시작하여 50°C에서는 약 50%의 활성이 유지되었다. 이러한 결과는 Kim 등[10]의 *Bacillus* sp. strain CK11-4와 Yoo 등[23]의 *B. subtilis* K-54에서 분비되는 혈전용해효소의 최적 온도 70°C, 65°C와 다른 양상을 보였으며, Lee 등[13]의 *Bacillus* sp. KDO-13에서 분비되는 효소의 최적온도 50°C와는 유사한 양상을 보였다. 온도 안정성이 50-60°C 사이에서 급격하게 떨어지는 현상은 단백질 가수분해효소의 열안정성을 연구할 때 자주 관찰되는 현상으로 온도 증가에 따른 단백질 구조의 변성 뿐 아니라, autoproteolysis의 급격한 증가로 설명되며[15], 첨가물에 의해 효소의 열안정성이 증가된다는 보고가 있다[19].

**첨가물이 효소의 저장안정성에 미치는 영향**

저장중의 효소 활성의 유지 여부는 산업적 적용에 매우 중요한 요소라고 할 수 있다. 특히 저장온도의 변화는 효소 활성 유지에 많은 영향을 미치므로 열안정성과 온도에 따른 저장안정성에 영향을 줄 수 있는 여러 첨가물을 이용하는 연구가 이루어지고 있다. 예를 들어, 효소의 기질, 산물 또는 효소저해제 등이 효소의 열안정성을 높여줄 수 있고[4], site-directed mutagenesis을 통한 특정 아미노산의 치환이 열안정성을 증가시키며[14], sugars, polyhydric alcohols과 organic solvent 등의 첨가물이 효소의 열안정성에 영향을 미친다는 보고도 있다[1]. 본 연구에서는 당류, CaCl<sub>2</sub>, salt 등이 혈전용해효소의 열안정성에 미치는 영향을 조사하였으며, 그 중에서 혈전용해효소의 열안정성을 증가시키는 효과가 우수한 3종의 첨가물을 선발하여 농도별로 조효소액에 첨가하고 60°C에서 30분간 방치한 후 효소의 잔존활성을 측정하였다.

Table 1에서 보는 바와 같이 control의 경우에는 60°C, 30분 후에 효소활성을 측정할 수 없을 정도로 역가가 낮았으

**Table 1. Effect of various additives on the thermostability of the fibrinolytic enzyme from *B. amyloliquefaciens* D4-7.**

additives	None	residual activity(%)			
		60°C 30 min	37°C 10 days	30°C 10 days	4°C 10 days
control	100	nd*	<20	<20	92
2M NaCl	100	25			
3M NaCl	100	32			
20% glucose	100	44			
30% glucose	100	64			
20% glycerol	100	29			
40% glycerol	100	69			
60% glycerol	100	70	80	86	91
2M NaCl+60% glycerol	100	88	76	78	93
30% glucose+60% glycerol	100	84	76	78	92

\* nd: not detected

나 glucose, glycerol 또는 NaCl에 의해 열안정성이 증가되었으며, 첨가물의 농도가 증가할수록 열안정성도 증가하였다. 또한 이들 첨가물들의 병용 즉, 60%의 glycerol에 2 M NaCl 또는 30% glucose를 첨가하였을 경우에 80% 이상의 활성이 유지되어 높은 열안정성을 나타내었다. 한편, 첨가물에 따른 저장안정성을 보기 위하여 4, 30, 37°C에서 10일간 방치한 후 효소의 잔존활성을 측정하였다(Table 1). 60% glycerol에 2 M NaCl 또는 30% glucose를 혼합하여 첨가하였을 경우, 전 온도구간에서 효소의 활성이 80% 이상 유지되었다. 특히 control의 경우 4°C에서는 저장안정성이 높았으나 30, 37°C에서는 10일 후에 잔존활성이 20% 이하로 떨어진 반면, 60% glycerol 단독첨가구는 10일 후에도 80% 이상의 활성을 유지하는 안정성을 보임으로써, glycerol이 효소의 안정성에 큰 역할을 하는 것을 알 수 있었다.

첨가물이 효소의 안정성을 높여주는 이유는, stabilizing agents처럼 단백질분자 내부의 hydrophobic interaction을 증가시켜 단백질의 구조를 안정화시키기 때문으로 추측된다[6]. 효소의 저장 안정성은 각 효소의 hydrophilic, hydrophobic character와 첨가물 종류별 interaction의 정도에 따라 다른 것으로 예상되며, *B. amyloliquefaciens* D4-7이 분비하는 혈전용해효소의 경우에는 glycerol이 많은 영향을 미치는 것으로 추측되었다. 향후에는 *B. amyloliquefaciens* D4-7이 분비하는 혈전용해효소의 유전자를 클로닝하고 대량발현을 유도함으로써, 혈전치료제로서의 응용가능성을 타진하고자 한다.

**요 약**

한국의 전통 대두발효식품인 청국장에서 혈전용해능이 우수한 미생물을 분리하였으며, 이를 동정한 결과 *B. amyloliquefaciens* D4로 명명하였다. 혈전용해효소의 대량 분비를 위해 N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine을 사용하

돌연변이를 유도하여 *B. amyloliquefaciens* D4-7 변이주를 얻었으며, plasmin 1 U/ml의 6.5배 정도의 높은 혈전분해능을 나타내었다. *B. amyloliquefaciens* D4-7는 분리대두단백배지에서 혈전용해효소 분비능이 가장 우수하였다. *B. amyloliquefaciens* D4-7가 생산하는 혈전용해효소의 최적 활성조건은 pH 10, 50°C이었고, pH 7.0 에서 pH 11 사이에서 상대적으로 안정하였으며, 50°C에서 30분간 방치하였을 경우 50%의 활성이 유지되었다. 또한, NaCl, glycerol 또는 glucose의 첨가에 의해 혈전용해효소의 저장안정성이 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

## REFERENCES

- Ahn, J. H., J. B. Hwang, and S. H. Kim. 1991. Effect of various additives and solvents on thermostability of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 368-371.
- Astrup, T. and S. Millertz. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**: 346-351.
- Chun, D.-S., D.-K. Kang, and H.-K. Kim. 2002. Isolation and enzyme production of a neutral protease-producing strain, *Bacillus* sp. DS-1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 346-351.
- Citri N. 1973. Conformational adaptability in enzymes. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* **37**: 397-648.
- Ehrlich, H. J., N. U. Bang, S. P. Little, S. R. Jaskunas, B. J. Weigel, L. E. Mattler, and C. S. Harms. 1987. Biological properties of a kringless tissue plasminogen activator mutant. *Fibrinolysis.* **1**: 75-77.
- George, S. P., A. Ahmad, and M. B. Rao. 2001. A novel thermostable xylanase from *Thermomonospora* sp.: influence of additives on thermostability. *Bioresour. Technol.* **78**: 221-4.
- Gerhardt, P., G. E. Murray, G. Gostilow, F. W. Nester, A. W. Wood, N. R. Krig, and G. B. Philips. 1981. In *Manual of Methods for General Bacteriology*, pp. 222-242. American Society for Microbiology, Washington.
- Kil, J. O., G. N. Kim, and I. Park. 1998. Production and characterization of fibrinolytic enzyme: Optimal condition for production of the enzyme from *Bacillus* sp. KP-6408 isolated from Chungkook-jang. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**: 51-56.
- Kim, S. H., N. S. Choi, W. Y. Lee, J. W. Lee, and D. H. Kim. 1998. Isolation of *Bacillus* strains secreting fibrinolytic enzymes from Doen-Jang. *Kor. J. Microbiol.* **34**: 87-90.
- Kim, W., K. Choi, Y. Kim, H. Park, J. Choi, Y. Lee, H. Oh, I. Kwon, and S. Lee. 1996. 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.
- Kim, Y. T., W. K. Kim, and H. I. Oh. 1995. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from Chungkook-jang. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 1-5.
- Ku, J.-H., I.-J. Choi, H.-S. Nam, H.-J. Lee, J.-I. Shin, and T.-K. Oh. 1997. Medium optimization for production of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* NS70. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 207-211.
- Lee, S.-K., D.-H. Bae, T.-J. Kwon, S.-B. Lee, H.-H. Lee, J.-H. Park, S. Heo, and M. G. Johnson. 2001. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KDO-13 isolated from soybean paste. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 845-852.
- Lehmann, M., C. Loch, A. Middendorf, D. Studer, S. F. Lassen, L. Pasamontes, A.P. van Loon, and M. Wyss. 2002. The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept. *Protein Eng.* **15**: 403-411.
- Martin-Hernandez, M. C., A. C. Alting, and F. A. Exterkate. 1994. Purification and characterization of the mature, membrane-associated cell-envelope proteinase of *Lactobacillus helveticus* L89. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 828-834.
- Mihara, H., H. Sumi, T. Yoneta, H. Mizumoto, R. Ikeda, M. Seiki, and M. Maruyama. 1991. A novel fibrinolytic enzyme extracted from earthworm, *Lubricus rubellus*. *Jan. J. Physiol.* **41**: 461-472.
- Mitsugu, F., K. Hong, Y. Ito, R. Fujii, K. Kariya, and S. Nishimuro. 1995. Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat. *Biol. Pharm. Bull.* **18**: 1387-1391.
- Najajima, N., H. Mihara, and H. Sumi. 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Bioact. Biotech. Biochem.* **57**: 1726-1730.
- Rahman, R. N. Z. A., C. N. Razak, K. Ampon, M. Basri, W. M. Z. W. Yunus, and A. B. Salleh. 1994. Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 822-827.
- Sumi, H., H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara, and H. Muraki. 1987. A novel fibrinolytic enzyme(nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia.* **43**: 1110-1111.
- Sumi H., H. Hamada, K. Nakanishi, and H. Hiratani. 1990. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol.* **84**: 139-143.
- Wattiau, P., M.-E. Renard, P. Ledent, V. Debois, G. Blackman, S. N. Agathos. 2001. A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its application to the monitoring of wastewater biotreatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 816-819.
- Yoo, C.-K., W.-S. Seo, C.-S. Lee, and S.-M. Kang. 1998. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme excreted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from Chung Guk Jang. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 507-514.

(Received May 16, 2003/Accepted Aug. 20, 2003)