

한국재래간장에서 분리한 *Bacillus amyloliquefaciens* K42가 생산하는 혈전용해효소의 정제 및 특성

윤경현 · 이은탁 · 김상달*
영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과

Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus amyloliquefaciens* K42 Isolated from Korean Soy Sauce. Yun, Gyung-Hyun, Eun-Tag Lee, and Sang-Dal Kim*. Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea – *Bacillus amyloliquefaciens* K-42, which produces strongly a fibrinolytic enzyme, was isolated from Ganjang, a traditional Korean soy sauce. The fibrinolytic enzyme was purified to homogeneity by ammonium sulfate fractionation, ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50, gel chromatography on Sephadex G-100, and gel chromatography on Sephadex G-75 of the culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* K42. The purified enzyme showed the specific activity of 59.4 units per milligram, which was increased by 17.1 fold over the culture broth. And the molecular weight of purified fibrinolytic enzyme was confirmed to be about 45,000 Dalton by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme activity was relatively stable at pH 4.0-10.0 and the optimum pH was 8.0. The activity of the purified enzyme was increased by Mg^{2+} , Cu^{2+} but the enzyme was totally inhibited by Ba^{2+} , Hg^{2+} . In addition, the enzyme activity was potently inhibited by EDTA, EGTA and CDTA. It was concluded that the purified enzyme was a metalloprotease. And *Km* value was 2.03 mg/ml to fibrin.

Key words: Fibrinolytic enzyme, *Bacillus amyloliquefaciens*, purification

혈전용해제란 혈관속의 fibrin을 용해하여 신속히 체내의 조직에 혈액을 공급하도록 하는 것으로서, 기존의 혈전용해제는 주로 plasminogen을 plasmin으로 활성화시키는 plasminogen activator로 작용하여 fibrin을 용해시키지만 fibrin뿐만 아니라 다른 혈액응고인자를 용해시켜 용혈상태 (lytic state)라는 부작용을 일으켜 장애가 되고 있다. 현재 임상적으로 흔히 사용하는 항응고제로는 warfarin과 같은 coumarine계와 동물의 폐장이나 장에서 분리한 heparin 등이 있는데 heparin의 경우 용량에 따라 출혈성 합병증이 발생할 수 있고, 흔히 혈소판 감소증, 탈모, 과민반응, 저알도스테론증, 그리고 장기간 투여하는 경우 골다공증 등의 합병증이 있을 수 있고 warfarin은 임신부의 경우 태반을 거쳐 태아에 넘어가 기형아를 출산할 위험이 매우 높다[9, 12, 13, 19, 20, 22]. 이러한 문제점으로 인한 혈전증(thrombosis)의 치료에 널리 사용되는 것으로는 urokinase, streptokinase, tPA(tissue type plasminogen activator) 등이 있으나 지렁이에서 분리된 urokinase를 제외하고는 경구투여가 불가능하다. 또한 현재 시판되는 혈전용해 치료제의 문제점인 체내의 내산성으로 인한 흡수정도와 치료제의 대부분이 고가

인 점을 감안하여 새로운 제제의 개발이 필요할 것으로 생각된다.

최근 일본의 전통 대두발효식품인 낫또(natto)로부터 분리된 nattokinase는 경구투여시 생체내의 혈전용해능을 높인다 하여 많은 주목을 받고 있으며 현재 건강식품으로 생산 판매되고 있다[8, 21]. 이와 더불어 일본의 natto에 비해 혈전용해능이 월등히 우수한 미생물을 한국의 전통 장류에서 분리하였다는 보고[6, 14]는 일상적인 식생활에서 조미료나 소스, 찌개 등으로 섭취하는 우리나라의 전통 장류식품이 여러 혈관질환을 치료 및 예방할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 한국의 전통 장류인 청국장과 된장으로부터 혈전용해능을 띄는 미생물을 탐색하였다는 보고에 따라 예로부터 중요한 단백질과 맛성분의 급원이었으며 또한 가정의 식탁에서 기본적인 조미료가 되어 온 한국의 전통발효식품인 간장을 본 연구의 혈전용해효소 균주의 탐색 및 혈전용해효소 개발의 목표로 삼고 수대에 걸쳐 전통적인 재래식 방법으로 담근 간장으로부터 혈전용해능이 우수한 균주를 분리 및 선별하고, 동정하였으며 선별균주가 생산하는 혈전용해효소의 각종 특성 조사와 효소정제를 수행하였다. 이는 향후 의약품이나 식품첨가제 혹은 건강식품으로 이용할 수 있을 것으로 생각되어 본 연구는 혈전용해효소 개발을 위한 기초연구로 삼고자 하였다.

*Corresponding author
Tel: 82-53-810-2395, Fax: 82-53-811-4319
E-mail: sdkim@yumail.ac.kr

재료 및 방법

재래간장으로부터 단백질분해효소와 혈전용해효소 생산균주의 분리 및 선발

재래간장으로부터 단백질 가수분해능과 혈전용해효소 생산능이 우수한 균주를 선발하기 위해 경상북도 경산시 용성 지역의 재래간장을 분리원으로 하여 멸균 생리식염수에 현탁, 희석하고 이를 Nutrient agar에 0.1 ml를 도말 후 30°C에서 24시간 배양시켰다. 생성된 colony중 단백질 분해능이 우수한 균주를 분리하기 위해 skim milk agar medium (0.5% pancreatic digest of casein, 0.25% yeast extract, 0.1% glucose, 1.0% skim milk, 1.5% agar)에 toothpick하여 30°C에서 24시간 배양하여 casein 분해환이 큰 균주를 1차 분리한 후, 2차 분리를 위해 분리균을 액체배양 후 상등액을 Anson 방법[1]을 이용하여 protease 활성이 우수한 균주를 분리하였다. 분리된 균주에 대해 혈전 용해능이 우수한 균주를 최종 선발하기 위해 Fibrin plate법[2]에 의해 혈전용해효소 활성이 가장 크게 나타내는 균주를 선발하였다.

재래간장으로부터 분리한 혈전용해성 미생물의 동정

최종 선발된 균주의 분류학적 동정을 하기 위하여 Bergey's manual of Systematic Bacteriology[11]에 준하여 각종 형태학적, 생화학적 실험을 실시하였고 Biolog사의 Microlog™ 자동 동정 시스템의 데이터와 비교하여 최종적으로 동정하였다.

단백질분해효소와 혈전용해효소 활성측정

단백질분해효소 활성측정은 Anson 방법을 변형하여 실험하였다[1]. 즉, 효소액 0.5 ml에 1/15 M 인산염 buffer(pH 7.0) 1 ml와 0.6% Hammarsten casein 2.5 ml를 가하여 40°C에서 30분간 반응시킨 후 TCA solution(0.11 M trichloroacetic acid, 0.22 M sodium acetate, 0.33 M acetic acid) 2.5 ml를 첨가하여 실온에서 10분간 방치하면서 반응을 정지시킨 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액 0.5 ml에 0.55 M Na₂CO₃ 용액 5 ml와 Folin-Ciocalteu 시약 0.5 ml를 넣고 37°C에서 30분간 발색 시킨 후 UV-Vis Spectrophotometer를 이용하여 660nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈전용해효소 활성측정은 0.5% fibrin 0.5 ml에 1/20 M Na₂B₄O₇-HCl buffer(pH 8.0) 1 ml와 효소액 0.2 ml를 가하여 40°C에서 60분간 반응시킨 후 상기와 동일하게 측정하였다. 이때 효소활성 단위는 1분간에 1 µg에 상당하는 tyrosine을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의 하였다.

단백질 정량

Lowry법을 이용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량 분석하였으며 표준단백질로는 bovine serum albumin (BSA)을 사용하였다[16].

효소의 생산과 정제

최종 선발된 균주를 효소생산용 최적배지(3.5% soybean, 0.7% cellobiose, 2% tryptone, 0.01% MgSO₄ · H₂O, 0.7% K₂HPO₄, 0.2% KH₂PO₄)에 seed culture한 전배양액을 1% 농도로 집중하여 30°C에서 96시간 진탕 배양하여 효소를 생산하였다.

효소의 정제는 효소 생산용 배지에 seed culture한 선발균주를 1% 농도로 집중하여 30°C에서 180 rpm으로 96시간 진탕배양한 후 10,000 rpm에서 40분간 원심분리하여 상등액을 회수하였고 여기에 ammonium sulfate로 분별 염석하여 단백질을 회수하고 투석 후 동결건조로 농축하였다. 이를 1/20 M 인산염 완충액(pH 8.0)으로 평형화한 DEAE-Sephadex A-50 이온교환 column(2.5×30 cm)에 loading한 후 NaCl 농도를 0에서 0.8 M까지 순차적으로 증가시키면서 용출시켜 비흡착 단백질과 불순단백질을 제거하고 받은 단백질 fraction중 활성 분획을 모아 농축한 후 이를 1/15 M 인산염 완충액(pH 7.0)으로 평형화시킨 Sephadex G-100 column(2.5×100 cm)으로 두차례의 gel filtration을 수행하여 효소 활성부분을 회수하였다. 이후 인산염 완충액(pH 7.0)으로 평형화시킨 Sephadex G-75 column(1.5×100cm) gel filtration 과정을 거쳐 최종적으로 본 균주가 생산하는 혈전용해효소를 정제하였다.

전기 영동

정제된 효소단백질의 polyacrylamide gel electrophoresis는 Davis법[7]에 의해 7.5% polyacrylamide gel을 사용하여 tube당 5 mA로 전기영동 하였다. 전기 영동한 후 gel은 1% Amido black 10-B로 염색하고 7% acetic acid로 탈색하였다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)는 Laemmli의 방법[18]에 따라 10% gel을 사용하여 80 V에서 전기영동을 행한 후 gel은 0.2% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 7% acetic acid와 5% methanol 혼합용액으로 탈색하였다.

결과 및 고찰

재래간장으로부터 혈전용해효소 생산균주의 분리 및 선발

경상북도 용성지역에서 재래식으로 담근 간장으로부터 45종의 세균을 분리하였다. 이들을 대상으로 단백질 가수분해 효소 생산능이 우수한 균주 15종을 skim milk medium을 이용하여 분리하였다. 또한 이 균주들을 대상으로 하여 혈전용해효소 생산성 균주를 선발하기 위해 fibrin 용해 분해환을 크게 형성하는 균주 K42를 최종 선발하였다(Fig. 1).

선발된 혈전용해성 미생물의 동정

최종 선발된 균주의 각종 형태학적, 생화학적 실험을 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 준하여 실

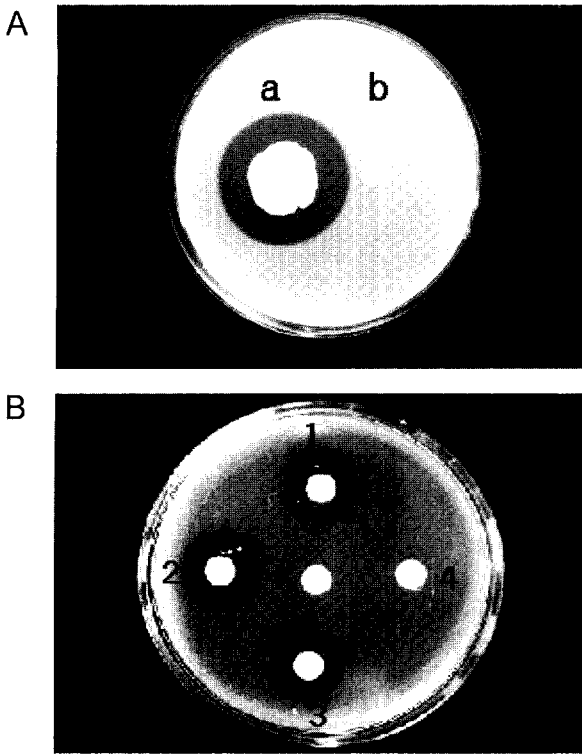


Fig. 1. Enzyme activity assay for fibrinolysis and caseinolysis. (A) Formation on lysis zone in casein plate (1%): *B. amyloliquefaciens* K42 (a), *Bacillus* sp. (control strain, b). (B) Fibrinolytic activity assay on the fibrin plate (0.3%) with the culture supernatants of strains: No. 1, strain K2; No. 2, strain K42; No. 3, strain K45; No. 4, strain K48. The culture supernatants were loaded on the holes and incubated at 30 for 12 h.

험을 행하여 본 결과 최종 분리균 K42는 그람양성의 간균이며 세포내에 포자를 갖고 있으며 catalase 활성이 있는 *Bacillus* 속의 균주였고 Biolog사의 Microlog™ 자동동정 시스템의 동정 결과와 견주어 보아 분리균 K42는 *B. amyloliquefaciens*로 최종 동정되었다(Table 1).

선발된 균주의 NaCl 생육능 조사

선발된 균주 *B. amyloliquefaciens* K42가 대두발효 식품인 재래간장에서 분리하였으므로 NaCl의 높은 농도에서도 효소 활성이 유지 되거나 또는 촉진 할 것으로 보아 NaCl 농도별 배양 배지를 제조하여 본 균주를 72시간, 30°C에서 배양 후 NaCl 생육능을 조사하였다. 그 결과 12%의 NaCl 농도에서도 균생육이 양호하였으며 0에서 8% NaCl 농도에서는 효소 생산능이 60% 이상을 나타내어 이로 보아 본 균주는 내염세균임을 알 수 있었다(Fig. 2).

효소의 정제

본 균주가 생산하는 혈전용해효소의 정제를 위해 효소생산용 배지에서 *B. amyloliquefaciens* K42를 배양한 후 배양상등액에 ammonium sulfate 분별염석을 거쳐 DEAE-

Table 1. Identification of strain K42 on their physiological and biochemical characteristics

	<i>Bacillus</i> sp.	Strain K42
Rod-Shaped	+	+
Endospores produced	+	+
Motile	+	+
Catalase	+	+
Anaerobic growth	D*	-
Acid from D-Glucose	+	+
Hydrolysis of Casein	+	+
Gelatin	+	+
Starch	+	+
Utilization of Citrate	+	-
Nitrate reduced to Nitrite	+	+
Indole	-	-
Detrain	+ D-psicose	+
N-acetyl-D glucosamine	- D-ribose	+
Mannan	- Sucrose	+
D-arabitol	- D-trehalose	+
D-fructose	D-xylose	+
α-D-glucose	+ α-keto glutaric acid	-
Microlog™ m-inositol system (4.01C)	- Methyl pyruvate	+
Lactulose	- Propionic acid	-
Maltotriose	- Pyruvic acid	+
D-mannitol	+ D-alanine	-
D-mannose	+ Glycyl-L-glutamic acid	-
α-methyl-D-galactoside	- Uridine	+
3-methyl glucose	+ 2-deoxy adenosine	-
α-methyl-D-glucoside	+ Inosine	+
Glycerol	+ Thymidine	+

D*: substantial proportion of speices differ, +: positive -: negative. The isolated strain K42 was identified as *B. amyloliquefaciens*.

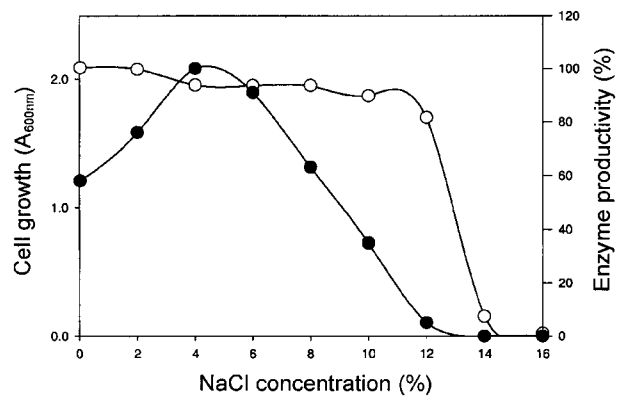


Fig. 2. Growth curve and fibrinolytic enzyme productivity of *Bacillus amyloliquefaciens* K42. -●-, Fibrinolytic enzyme productivity; -○-, Cell growth

Sephadex A-50 column chromatography, Sephadex G-100 column gel filtration, Sephadex G-75 column gel filtration 과정을 거쳐 최종적으로 본 균주가 생산하는 혈전용해효소를 정제하였다(Fig. 3). 정제과정을 요약한 결과를 Table 2에

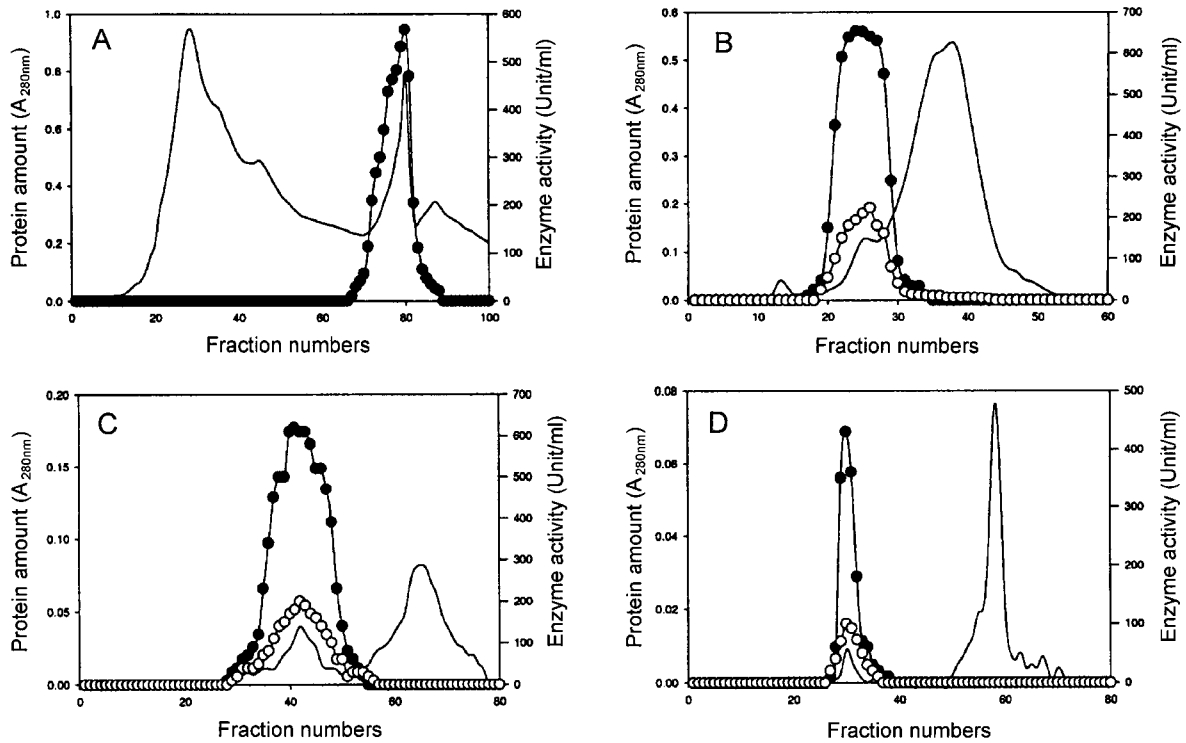


Fig. 3. Purification of the fibrinolytic enzyme. (A) DEAE Sephadex A-50. The crude enzyme of *Bacillus amyloliquefaciens* K42 was applied to a DEAE Sephadex A-50 (2.5×30 cm) column and eluted with 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, at a step by step gradient of 0.0-0.4 M NaCl, 18 ml/hr. (B) Sephadex G-100 (1st). Active fractions pooled from A were applied to a Sephadex G-100 (1.5×100 cm) column and eluted at a flow rate of 0.5 ml/min. (C) Sephadex G-100 (2nd). Active fractions pooled from B were applied to a Sephadex G-100 (1.5×100 cm) column and eluted with 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, at a flow rate of 0.3 ml/min. (D) Sephadex G-75. Active fractions pooled from C were applied to a Sephadex G-75 (1.5×100 cm) column and eluted with 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, at a flow rate of 0.5 ml/min. ●-, Caseinolytic activity; ○-, Fibrinolytic activity; —, Protein.

Table 2. Purification steps of the fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* K42

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Recovery (%)
Culture broth	15520	64020	4.1	1	100
Salting out	3060	18017	5.9	1.4	28.1
DEAE Sephadex A-50	1509	14939	9.9	2.4	23.4
Sephadex G-100 (1st)	186	4426	23.8	5.8	6.9
Sephadex G-100 (2nd)	46	2198	47.8	11.6	3.4
Sephadex G-75	12	658	54.9	13.4	1.1

나타내었는데 효소의 정제도는 배양여액에 비해 17.1배 증가하였고, 회수율은 1.1%로 다소 낮게 나타났다. 또한, 정제된 효소는 caseinolytic activity와 fibrinolytic activity를 동시에 나타내었다.

정제효소의 분자량

정제된 효소의 순도와 분자량을 조사하기 위하여 Disc-electrophoresis와 SDS-PAGE 전기영동을 실시하였으며 확인된 분자량은 45,000 Da으로 나타났다(Fig. 4). 이는 Choi 등 [6]이 보고한 된장으로 분리한 *B. amyloliquefaciens* DJ-4의 분자량이 38,000 Da인것과 Kim 등[14]이 보고한 청국장에서

분리한 *Bacillus* sp. CK 11-4가 생산하는 혈전용해효소의 분자량이 28,200 Da과 Mitsugu 등[8]이 보고한 nattokinase의 분자량이 27,728 Da과는 상이한 차이를 보였다. 또한 Kim 등[15]이 보고한 젓갈에서 분리한 *Bacillus* sp. KA38의 혈전용해효소의 분자량이 41,000 Da 인것과는 유사하였으나 Guan 등[9]과 Lee 등[17]이 보고한 뱀의 독액에서 분리한 혈전용해효소의 분자량이 23,000~24,000인 보고와도 상이하였다. 따라서 발효식품인 재래간장으로부터 분리한 선발균주 *B. amyloliquefaciens* K42가 생산하는 혈전용해효소는 같은 유래의 한국 전통 발효식품인 청국장이나 된장에서 분리한 균주가 생산하는 혈전용해효소의 분자량과 비교해 볼

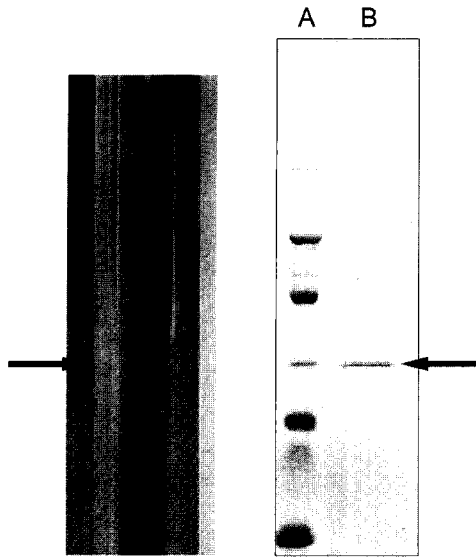


Fig. 4. Disc-electrophoresis (left) and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (right) of purified enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* K42. Line A: Molecular markers (97.4 kDa, Phosphorylase B; 66.2 kDa, Bovine Serum Albumin; 45.0 kDa, Ovalbumin; 31.0 kDa, Carbonic anhydrase; 21.5 kDa, Soybean trypsin inhibitor; 14.4 kDa, Lysozyme) Line B: Purified enzyme.

때 다른 효소들에 비해 다소 큰 분자량을 짐을 알 수 있었다. 또한 지렁이, 짓갈, 뱀의 독액에서 분리한 혈전용해효소와도 분자량의 차이를 보였다.

혈전용해효소 특성조사

Fibrinolytic enzyme 활성에 미치는 pH의 영향 및 안정성 - 본 균주 *B. amyloliquefaciens* K42가 생산하는 fibrinolytic enzyme의 활성에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과 pH 8.0에서 최대 활성을 나타내었다(Fig. 5). 이는 *Streptomyces* sp.에서 분리하여 Chitte 등이 보고한 효소의 최적 pH와 유사하였다[4]. 또한 pH 안정성을 검토하기 위하여 pH 2.0에서 pH 12.0까지의 완충액에서 전처리한후 본 효소의 잔존 활성을 검토하여 본 결과 Fig. 5에서 보는 것과 같이 pH 4.0에서 pH 10.0 범위에서 80% 이상의 잔존활성을 나타내었으며 pH 10.0 이상에서는 효소의 잔존 활성도가 급격히 감소하였다. 이는 Nattokinase의 안정성이 pH 7~pH 12이었다는 Fujita 등의 보고[8] 보다는 본 효소가 산성조건에서 안정함을 보였고, 이는 경구 투여시 체내에서의 혈전 용해능이 유지될수 있어 매우 유용하다고 사료된다.

Fibrinolytic enzyme의 활성에 미치는 온도의 영향 및 열 안정성 - *B. amyloliquefaciens* K42가 생산하는 fibrinolytic enzyme의 활성에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과 50°C에서 최대 활성을 나타내었다(Fig. 6). 그리고 열 안정성에 있어서는 30°C에서 50분간 열처리로 80% 이상 잔존 활성을 보였고 40°C에서 50분간 열처리시 70% 이상의 효소활

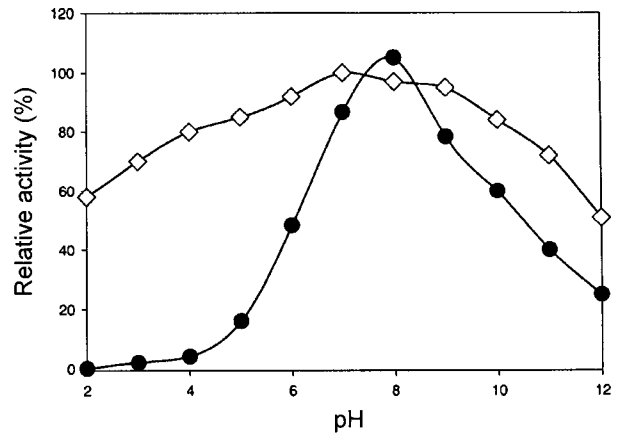


Fig. 5. Effect of pH on the fibrinolytic activity and stability of the enzyme. -●-, activity; -◇-, stability.

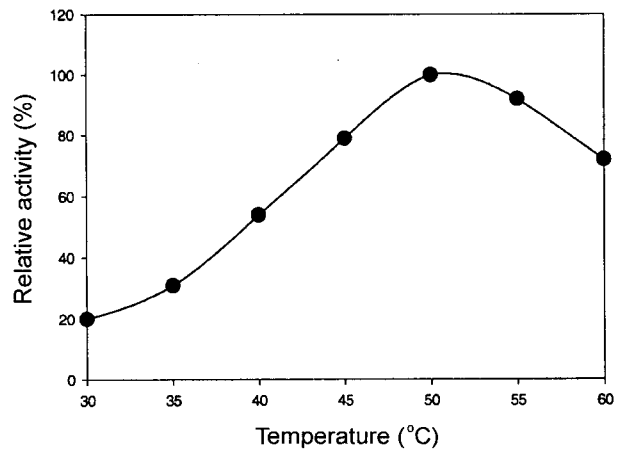


Fig. 6. Effect of temperature on the fibrinolytic activity of the enzyme.

성을 나타내었다. 또한 50°C의 온도에서 20분간 열처리시 50%의 효소활성이 존재하였으나 60분간 처리시 잔존 효소 활성이 30% 이하로 저하되었고, 60°C와 70°C의 온도에서는 10분간 열처리시 효소 활성이 90%가 실패 되어 열안정성은 다소 낮게 나타났다(Fig. 7).

Fibrinolytic enzyme의 활성에 미치는 금속이온의 영향 - 각종 금속이온들이 *B. amyloliquefaciens* K42가 생산하는 fibrinolytic enzyme의 활성에 미치는 영향을 검토한 결과 Mg²⁺, Cu²⁺는 1mM에서 효소활성이 100%였고 5 mM에서는 120%로 증가하는 양상을 보였다(Table 3). 또한 Ag⁺는 1 mM과 5 mM에서 80% 이상의 활성을 유지하였고 Fe²⁺의 경우는 1 mM에서 80%의 활성을 보이다가 5 mM에서는 50% 이상 실패 되었다. Mn²⁺, Zn²⁺, Sn²⁺, Ni⁺는 1 mM과 5 mM 농도에서는 활성이 유지되거나 약간 증가하는 경향을 나타내었다. Ca²⁺의 경우 1 mM 농도에서는 효소활성이 10% 증대되었고 5 mM 농도시에는 88% 이상의 효소활성을 유지 하였다. 따라서 본 균주 K42가 생산하는 fibrinolytic

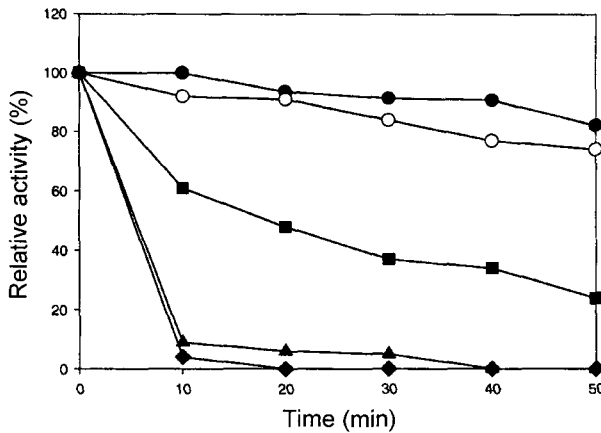


Fig. 7. Thermal stability of the fibrinolytic enzyme. -●-, 30°C; -○-, 40°C; -■-, 50°C; -▲-, 60°C; -◆-, 70°C. Residual activity was measured after thermal treatment at each temperature.

Table 3. Effect of various metal ions on the fibrinolytic activity

Metals	Relative activity (%)	
	1 mM	5 mM
CoCl ₂	94.5	94.1
MgSO ₄	103.1	125.9
CuSO ₄	101.9	118.4
MnSO ₄	103.1	115.3
BaCl ₂	93.7	11.4
CaCl ₂	110.0	88.0
ZnCl ₂	103.1	97.3
HgCl ₂	49.0	7.8
AgNO ₃	81.6	87.8
ZnSO ₄	98.0	100.4
SnCl ₂	95.0	102.9
Pb(CH ₃ COO) ₂	72.3	66.5
FeSO ₄	83.9	44.2
NiCl ₂	88.4	100.0
None	100.0	100.0

enzyme의 활성화에 있어 Mg²⁺, Mn²⁺ 등의 금속이 효소의 activator로 효소의 활성 발현에 관계한다는 사실을 알 수 있었다.

Fibrinolytic enzyme의 활성화에 미치는 저해제의 영향 - 각종 효소활성 저해제와 본 균주의 fibrinolytic enzyme의 효소활성과의 관계를 검토한 결과 L-cysteine, iodoacetic acid, thiourea, sodium azide, hydroxyurea, AHA, p-CMB를 1 mM과 5 mM 처리하였을 때 효소 활성을 그대로 유지하거나 촉진하였는데 hydroxyurea의 경우는 5 mM 농도하에서 164%의 활성을 나타내었다. Serine계 enzyme의 저해제인 PMSF에 의해서는 효소활성이 87% 유지 되었고 cysteine계 enzyme 저해제인 iodoacetic acid에 의해서는 효소활성이 90% 이상을 유지하였다(Table 4). 그러나 metallo enzyme

Table 4. Effect of various chemical inhibitors on the fibrinolytic activity

Chemicals	Relative activity (%)	
	1 mM	5 mM
SDS	83.3	8.3
CDTA	11.2	12.3
L-cystine	97.5	96.7
Iodoacetic acid	91.7	101.0
PMSF	87.0	83.3
EDTA	10.9	11.2
EGTA	16.7	14.5
Thiourea	95.9	93.0
Sodium azide	92.6	103.7
Hydroxyurea	103.3	164.0
AHA	130.2	165.7
p-CMB	96.3	110.7
None	100.0	100.0

의 활성 저해제인 EDTA, EGTA, CDTA에 대해서는 85% 이상의 효소 활성의 저해가 일어났는데 이것으로 보아 *B. amyloliquefaciens* K42가 생산하는 fibrinolytic enzyme의 활성화에 금속이온이 강하게 작용한다는 사실을 알 수가 있었다. 이러한 사실을 기존의 대두발효 식품인 natto와 청국장, 된장에서 분리한 fibrinolytic enzyme이 대부분 serine enzyme [3, 5]인 것인데 반면 본 연구의 재래간장으로부터 분리한 *B. amyloliquefaciens* K42가 생산하는 fibrinolytic enzyme은 metallo enzyme인 것으로 나타났다.

Km 값

B. amyloliquefaciens K42가 생산하는 fibrinolytic enzyme가 기질인 fibrin과의 친화성을 알아보기 위해 Lineweaver-Burk plot 방법으로 Km 값을 측정된 결과 Km 값은 Fig. 8

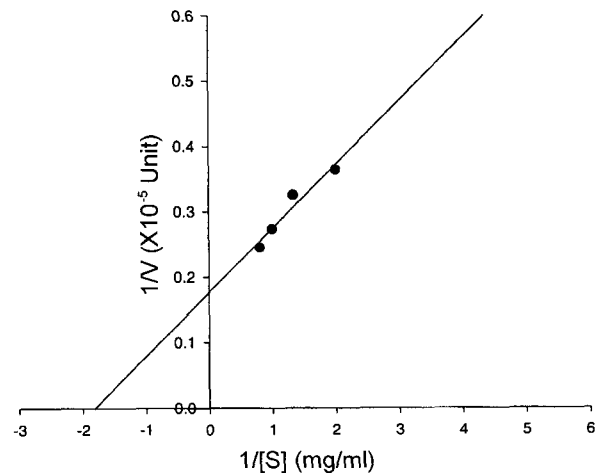


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot of fibrin hydrolysis by the purified enzyme.

에 나타난 것과 같이 2.03 mg/ml로 나타났는데 이는 Choi 등[6]이 보고한 바 있는 2.3 mg/ml과는 유사하게 나타났다.

요 약

본 연구는 우리나라의 전통발효식품인 재래간장에서도 혈전용해효소 생산 미생물이 존재할 가능성이 있다고 판단하여, 지역의 재래간장으로부터 혈전용해효소 생산능이 우수한 균주 K42를 최종 선발하였다. 선발된 균주는 *B. amyloliquefaciens*로 동정되었으며, 12% NaCl이 함유된 배지에서도 균생육이 양호하였으며 10% NaCl 농도까지 효소 생산이 유지되는 내염성 세균임을 알 수 있었다. 혈전용해효소의 정제는 40% ammonium sulfate로 분별 염석 후 DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-100, Sephadex G-75를 이용하여 단일단백의 효소로 정제하였다. 효소의 활성도는 배양액에 비해 17.1배 증가하였고, 회수율은 1.1%로 나타났다. Disc-electrophoresis와 SDS-PAGE를 실시하여 분자량 45,000 Dalton의 단일 단백질로 확인하였다. 혈전용해효소의 특성조사에 있어서는 최적 pH는 8.0의 약알칼리성을 나타내었고 안정성에 있어서는 pH 4.0에서 pH 10.0 범위에서 80% 이상의 잔존활성을 나타내었으며, 최적반응 온도는 50°C로 조사되었고 열 안정성에 있어서는 30°C의 온도에서 50분간 열처리시 80% 이상 잔존 활성을 보였다. 금속이온이 *B. amyloliquefaciens* K42가 생산하는 fibrinolytic enzyme의 활성에 미치는 영향을 검토한 결과 Mg^{2+} , Cu^{2+} 에 대해서는 효소 활성이 증가하는 양상을 보였다. 또한 *B. amyloliquefaciens* K42가 생산하는 fibrinolytic enzyme는 metallo enzyme의 활성저해제인 EDTA 등에 대해서는 15% 이하로 효소 활성이 감소되었는데 이러한 효소 활성 저해로 보아 metallo enzyme이거나 활성에 금속이온이 필요한 것으로 추정된다. 그리고 기질인 fibrin과의 친화성을 알아보기 위해 Km 값을 측정하였는데 Km 값은 2.03 mg/ml로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 학술진흥재단 연구비(KRF-21-005-G0009)에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Anson, M. L. 1939. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* **22**: 79-85.
- Astrup, T. and C. Mullertz. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**: 346-351.
- Chang, C. T., M. H. Fan, F. C. Kuo, and H. Y. Sung. 2000. Potent Fibrinolytic from a Mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK 1. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 3210-3216.
- Chitte, R. R. and S. Dey. 2000. Potent fibrinolytic enzyme from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SD5. *Letters in Appl. Microb.* **31**: 405-410.
- Cho, S. Y., B. S. Hahn, and Y. S. Kim. 1999. Purification and characterization of a novel serine protease with fibrinolytic activity from *Tenodera sinensi* (Chinese Mantis) egg cases. *J. Biochem. Mol. Biol.* **32**: 579-584.
- Choi, N. S. and S. H. Kim. 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.
- Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.
- Fujita, M., K. Nomura, K. S. Hong, Y. ITO, A. Asada, and S. Nishimuro. 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.
- Guan, A. L., A. D. Retzios, G. N. Henderson, and F. Markland. 1991. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from Venom of the southern copperhead snake (*Agkistrodon contortrix contortrix*). *Archiv. Biochem. Biophys.* **289**: 197-207.
- Hahn, B. S., I. M. Chang, and Y. S. Kim. 1995. Purification and characterization of piscivorase I and II, the fibrinolytic enzymes from eastern Cottonmout Moccasin Venom. *Toxicol.* **33**: 929-941.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Wiliilams. 1994. Bergey's manual of systematic bacteriology. 9th ed. *Wiliilams Wilkins*.
- Jeon, O. H., W. J. Moon, and D. S. Kim. 1995. An anticoagulant/fibrinolytic protease from *Lumbricus rubellus*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **28**: 138-142.
- Kim, Y. S., J. E. Kim, H. S. Byun, C. S. Chang, and J. J. Suh. 1995. Catalytic importance of the C-terminal region of a fibrinolytic enzyme from *Lumbricus rubellus*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **28**: 398-401.
- Kim, W. K., K. Y. Choi, Y. T. Kim, H. H. Park, and J. Y. Choi. 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, H. K., G. T. Kim, D. K. Kim, W. A. Choi, S. H. Park, Y. K. Jeong, and I. S. Kong. 1997. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermented fish. *J. Ferment. Bioeng.* **84**: 307-312.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lee, J. W., J. H. Seu, I. K. Rhee, I. Jin, Y. Kawamura, and W. Park. 1999. Purification and characterization of Brevinase, a heterogeneous two-chain fibrinolytic enzyme from the

- venom of Korean snake, *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **260**: 665-670.
18. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
19. Matsubara, K., H. Kanji, M. Yasushi, and M. Keisuke. 1999. A fibrinolytic enzyme from a marine green alga *Codium latum*. *Phytochem.* **52**: 993-999.
20. Nobuyoshi, N., I. Kohji, S. Manabu, S. Hiroyuki, M. Katsuhiko, and H. Hiroki. 1996. Chemical modification of earthworm fibrinolytic enzyme with human serum albumin fragment and characterization of the protease as a therapeutic enzyme. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 293-300.
21. 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**: 1110-1116.
22. Yoo, C. K., C. Kwon, 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. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 507-514.
23. Xiuxia, L., C. Jiashu, Z. Yingna, Q. Pengxin, and Y. Guangmei. 2001. Purification and biochemical characterization of F II, a fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon acutus* venom. *Toxicon.* **39**: 1133-1139.

(Received June 11, 2003/Accepted July 23, 2003)