

## 된장으로부터 혈전용해능 및 $\beta$ -Glucosidase 활성을 가진 균주 분리 및 효소생산 배지의 최적화

나경수<sup>1</sup> · 오성훈<sup>2</sup> · 김진만<sup>3</sup> · 서형주<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>대구공업대학 식품영양과

<sup>2</sup>안산공과대학 식품생물공학과

<sup>3</sup>고려대학교 병설 보건대학 식품영양과

### Isolation of Fibrinolytic Enzyme and $\beta$ -Glucosidase Producing Strains from *Doenjang* and Optimum Conditions of Enzyme Production

Kyung-Soo Ra<sup>1</sup>, Sung-Hoon Oh<sup>2</sup>, Jin-Min Kim<sup>3</sup> and Hyung-Joo Suh<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food and Nutrition, Daegu Technical College, Daegu 704-721, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Food and Biotechnology, Ansan College of Technology, Ansan 425-792, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Food and Nutrition, College of Health Sciences, Korea University, Seoul 136-703, Korea

#### Abstract

Bacterial strains showing the fibrinolytic and  $\beta$ -glucosidase activity were screened from *Doenjang*. The strain of KH-15 revealed a high level of fibrinolytic and  $\beta$ -glucosidase activity. The isolated bacterium was identified and designated as *Bacillus* sp. KH-15. The carbon, nitrogen and salts significantly influenced the fibrinolytic enzyme and  $\beta$ -glucosidase production. The optimized composition of medium appeared to be 2% glucose, 0.5% yeast extract, and 0.1% calcium chloride. The optimum pH and temperature for fibrinolytic enzyme and  $\beta$ -glucosidase activities were pH 7~8, 40°C and pH 6~8, 30~40°C, respectively.

Key words: *Bacillus* sp. KH-15, doenjang, fibrinolytic enzyme,  $\beta$ -glucosidase, optimal condition

#### 서 론

식생활의 서구화와 스트레스로 인해 동맥경화증, 심근경색, 뇌졸중, 혈전증과 같은 성인병이 날로 증가되고 있다. 그 중 뇌혈관 질환은 상처발생시 생긴 fibrin이 뇌혈관 등에 분해되지 않고 축적되어 혈액순환을 차단함으로써 발생된다. 따라서 이들 질환의 예방 및 치료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 그 일환으로 혈전생성을 억제시키는 항혈전제의 개발과 생성된 혈전을 용해시키는 혈전용해제의 개발에 초점을 두고 있다.

현재, 혈전증 치료제로 널리 사용되고있는 urokinase, streptokinase, tPA 등은 가격이 매우 높은 단점을 지니고 있으며, urokinase를 제외하고는 경구투여가 불가능하다(1).

Urokinase의 경우 장내에 투입시켜 흡수시키면 혈액내의 혈전용해능이 현저히 증가한다고 하여 관심을 끌었다. 즉, 장에서 흡수된 urokinase가 간에 도달하여 혈전을 용해시키는 효소의 합성을 증진시킴으로써 혈전용해능이 증가하는 것으로 추측된다고 보고(1)함으로써 혈전용해효소의 장내투여 응용성이 가능하다는 점을 시사하고 있다.

또한 일본 전통 대두 발효식품인 natto로부터 분리된 nattokinase라는 효소를 경구 투여시 생체내의 혈전용해능을 높일 수 있다는 보고가 있으며, 현재 일본에서는 natto가 지니는 혈전용해능을 활용한 제품이 상용화되어 있다(2,3).

오래전부터 우리나라의 전통식품인 청국장 및 된장에서 높은 단백질분해효소를 분비하는 균이 존재하는 것으로 보고되고 있고(4,5) 혈전용해능이 있는 효소를 분비하는 균주를 분리한 바 있으며, 된장에서도 최근에 와서는 혈전용해효소의 존재가 보고되고 있다(6).

또한 Kim과 Kwon(7)은 국민영양조사를 근거하여 우리나라 사람들의 isoflavone 섭취량을 추정한 결과 콩과 두부, 된장, 콩나물이 전체 isoflavone 섭취량의 94%를 차지한다고 하였다. 특히 아시아에서 많이 섭취하는 대두 발효식품인 된장이나 miso, tempeh 등에서는 발효과정에서 isoflavone이 주로 흡수되기 쉬운 상태인 aglycone 형태로 변환되어 genistein, daidzein의 함량이 높아지는 것으로 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 된장에서 혈전용해능뿐만 아니라 대두의 isoflavone을 소화섭취하기 쉬운 상태인 aglycone 형태로 전환시킬 수 있는  $\beta$ -glucosidase의 활성이 우

\*Corresponding author. E-mail: suh1960@unitel.co.kr  
Phone: 82-2-940-2853, Fax: 82-2-941-7825

수한 균주를 분리하여, 이를 활용하여 혈전용해능과 isoflavone의 소화섭취가 용이한 된장 제조에 사용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시료

균주배양에 사용한 nutrient medium은 Difco Laboratories(USA)의 제품을 사용하였으며, 된장은 임의로 선별된 10가구에서 재래식으로 가정에서 제조한 된장을 수집하여 사용하였다. Fibrin, fibrinogen, thrombin, agarose 및 plasmin 등은 Sigma Chemical Co.(USA)의 제품을 구입하여 사용하였으며 그 외의 시약은 특급이상의 시약을 사용하였다.

### 균주의 분리

된장에서 단백질 분해능이 있는 균주를 분리하기 위해 시료 10 g에 생리식염수 90 mL를 취하여 진탕하고  $10^{-5} \sim 10^{-7}$  CFU/mL으로 희석한 후 미리 준비한 nutrient agar skim milk 배지에 도말한 후 37°C에서 48시간 배양한 후 배지에 나타난 colony의 크기와 모양 및 환의 크기에 따라 균주를 분리하였다. 선별된 균주들은 nutrient medium에 37°C에서 24시간 배양한 후 원심분리하여 균체를 제거하고 그 상침액을 조효소액으로 하여 혈전용해효소 활성 및  $\beta$ -glucosidase 활성을 측정하였다.

### 혈전용해효소 활성 측정

10 mM 인산완충용액(pH 7.8, 0.15 M NaCl 포함)에 fibrinogen을 0.3%가 되도록 용해시키고, 완전히 용해된 fibrinogen 용액 5 mL에 위와 동일한 완충용액에 1% agarose 용액 5 mL를 첨가하여 혼합하였다. 여기에 다시 thrombin(100 NIH/mL) 0.1 mL를 첨가하여 혼합한 후 페트리디쉬에 붓고 실온에서 5~10분간 방치하여 고화시켜 fibrin plate를 만들었다. Fibrin plate에 pasteur pipette으로 지름 5 mm의 구멍을 만들어 조효소액 20  $\mu$ L를 주입하고 37°C에서 12시간 반응시킨 다음 생성된 투명한 환의 면적을 측정하였으며 대조구로서 정제된 혈전용해효소인 plasmin(1.0 unit/mL)을 사용하였다. 조효소의 혈전용해활성은 대조구의 용해면적에 대한 상대적인 비율로 환산하여 산출하였다.

### $\beta$ -Glucosidase 활성 측정

$\beta$ -Glucosidase 활성은 Peralta 등(8)의 방법을 사용하여 측정하였다. 효소액은 50°C 항온수조에서 5분간 활성화시켰다. 5 mM *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside(Sigma Chemical Co., USA)를 함유한 50 mM 인산완충용액(pH 6.0) 0.5 mL에 효소액 0.2 mL를 가하여 50°C에서 10분간 반응시킨 후 1 mL의 sodium tetraborate saturated solution으로 반응을 중지시켜 유리되는 *p*-nitrophenol의 양을 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 1 단위는 반응시간 분당 생성되는 *p*-nitrophenol 1  $\mu$ mole을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

### 균주의 동정

분리균주에 대한 현미경관찰을 통한 형태학적 특징 및 각종 배지에서의 배양상의 특징을 검토하였으며, 균주의 생리적 및 생화학적인 특성을 규명하고 이를 토대로 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(9)에 준하여 분리균주를 동정하였다.

## 결과 및 고찰

### 균주의 분리

각지에서 수집한 재래식 된장으로부터 분리한 균주의 혈전용해능과  $\beta$ -glucosidase의 활성을 측정한 결과(Table 1), strain KH-5, 13, 15는 혈전용해활성이 2.9, 2.8, 2.8 unit로 비교적 높은 활성을 보인 반면,  $\beta$ -glucosidase의 활성은 strain KH-13과 15가 각각 1564.6과 1995.3 unit의 높은 활성을 보였다. 특히 strain KH-15는 높은 혈전용해능과  $\beta$ -glucosidase의 활성을 보임에 따라 우수한 혈전용해능과 isoflavone의 소화되기 쉬운 형태인 aglycon을 다량생산이 가능한 균주로 선정하였다.

분리된 균주의 형태학적, 생화학적 특성을 조사한 결과이다. 분리된 균주는 간균, gram 양성이었으며, 운동성이 있고 catalase 양성, 그리고 포자를 생성하는 것으로 관찰되었다. 그리고 이 균주는 nitrate 환원반응과 citrate 이용반응, Voges-Proskauer test에서도 양성의 반응을 보였고, propionate 이용반응, glucose와 nitrate로부터의 gas 생성반응은 음성을 보였다. 이 균주는 생육시 casein, gelatin, starch에 대해서 활성이 매우 높은 것으로 나타나 단백질과 전분의 분해능력이 우수하였다. 따라서 이 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (9)의 기준에 의하여 *Bacillus* 속으로 판단되었으며, 이 균주를 *Bacillus* sp. KH-15로 명명하였다.

이와같이 발효식품에서의 혈전용해능을 가지는 균주를 분리하고자 하는 연구가 국내외에서 진행중이다. 특히 최근 우리나라에서도 일본의 natto와 유사한 대두발효식품인 청국장에서 혈전용해능을 가진 *Bacillus* 균주를 분리하였으며(4,10), 또한 된장(11)과 젓갈(12) 등의 발효식품에서 혈전용해능을 가진 균주들을 분리하였다. 또한 대두, 메주 및 된장에서의 isoflavones의 aglycones % 함량을 분석하여  $\beta$ -

**Table 1. Fibrinolytic and  $\beta$ -glucosidase activities of strains isolated from Doenjang**

Strains	Fibrinolytic enzyme (unit)	$\beta$ -Glucosidase (unit)
KH-2	2.3	567.3
KH-3	2.1	457.1
KH-5	2.9	890.8
KH-6	2.7	765.3
KH-8	0.9	132.2
KH-9	1.9	546.9
KH-13	2.8	1564.6
KH-15	2.8	1995.3

glucosidase의 존재 가능성을 제시한 연구(13)는 있으나 된장의 혈전용해능뿐만 아니라 isoflavone의 aglycones의 함량을 늘릴 수 있는 균주의 분리에 대한 연구는 전무하다.

탄소원의 영향

*Bacillus* sp. KH-15는 nutrient medium을 기본배지로 glucose, sucrose 등 탄소원을 2% 첨가한 후 혈전용해능과  $\beta$ -glucosidase활성을 측정된 결과(Fig. 1), glucose와 sucrose를 사용한 결과 3.0 및 2.7 unit의 혈전용해활성을 보였으며,  $\beta$ -glucosidase의 활성 역시 glucose 및 sucrose를 사용한 경우 2235와 2123 unit의 활성을 보였다. 이러한 결과는 Choi 등(14)이 대두에서 분리한 균주 *Bacillus subtilis* BK-7의 경우 탄소원으로 glucose가 최대의 효소 생산을 보였다는 보고와 일치하나, Jang 등(12)은 새우젓에서 분리한 *Bacillus* sp.의 혈전용해효소 생산시 mannitol, xylose 및 soluble starch를 탄소원으로 사용시 높은 효소의 활성 보고와 Choi(15)가 *Bacillus brevis* KJ-23 균주의 탄소원으로 ribose를 선정한 결과와는 다른 결과를 보였다.

*Aspergillus niger* 균주(16)에 의한  $\beta$ -glucosidase 생산시 탄소원으로 CMC가 가장 높은 효소의 활성을 보였으나 glucose와 fructose도 다른 탄소원에 비해 비교적 높은 효소의 활성을 보였다.

질소원의 영향

질소원이 효소생산에 미치는 영향을 살펴 보기위해 탄소원으로 2% glucose를 사용하여 각종 질소원을 0.5% 첨가하여 효소의 생산량을 측정하였다(Fig. 2). 그 결과 yeast extract, soytone 및 soybean powder를 첨가한 경우 혈전용해활성이 3.2, 2.7, 3.0으로 높은 활성을 보였으며,  $\beta$ -glucosidase의 활성은 yeast extract와 peptone 첨가시 2345과 1923 unit의 활성을 보였으며, 혈전용해활성이 비교적 높았던 soytone과 soybean powder는 1213과 1532 unit의 활성을 보였다. Jang 등(12)도 새우젓에서 분리한 균주의 질소원으로 yeast extract를 이용하였으나, Choi 등(14)이 *Bacillus subtilis* BK-17의 질소원으로 peptone과 beef extract를 이용하

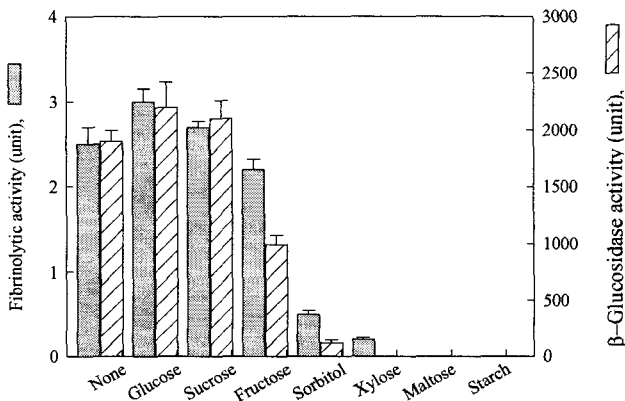


Fig. 1. Effect of carbon source on the production of fibrinolytic enzyme and  $\beta$ -glucosidase.

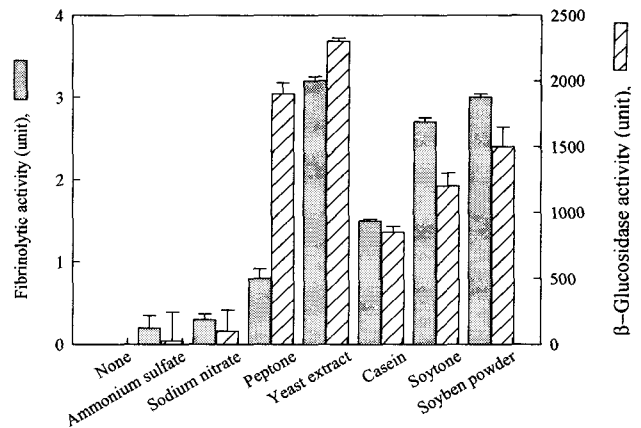


Fig. 2. Effect of nitrogen source on the production of fibrinolytic enzyme and  $\beta$ -glucosidase.

였다는 결과와는 다소 차이를 보였다. 반면  $\beta$ -glucosidase 생산시 질소원으로 yeast extract와 peptone이 높은 활성을 보인 결과(16)와는 유사한 결과를 보였다.

금속이온의 영향

금속이온이 효소생산에 미치는 영향을 살펴보기 위해 탄소원으로 2% glucose, 질소원으로 0.5% yeast extract를 사용하여 각종 금속이온을 0.1% 첨가하여 효소의 생산량을 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 sodium phosphate와 calcium chloride를 첨가한 경우 혈전용해활성이 각각 3.5와 3.5 unit로 높은 활성을 보였으며,  $\beta$ -glucosidase의 활성은 각각 2123과 423 unit의 효소활성을 보였다.  $\beta$ -Glucosidase의 활성은 혈전용해활성과는 달리 magnesium sulfate 첨가시 가장 높은 효소 활성인 2345 unit를 보였다. 금속이온 첨가시 혈전용해활성과  $\beta$ -glucosidase 활성이 비교적 높은 calcium chloride 첨가가 가장 바람직하였다. 반면 Choi 등(14)이 가장 높은 혈전용해활성을 보고한 sodium phosphate 첨가는 3.5 unit로 높은 효소활성을 보였으나  $\beta$ -glucosidase 활성은 423 unit로 낮은 활성을 보였으며, Choi(15)가 가장 높은 혈전용해활성을 보인

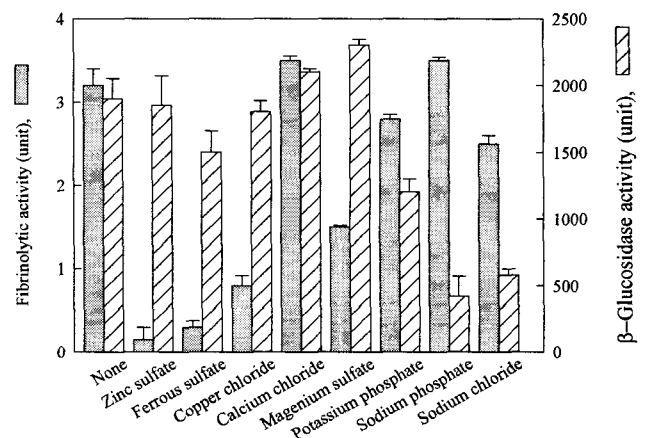


Fig. 3. Effect of inorganic salt on the production of fibrinolytic enzyme and  $\beta$ -glucosidase.

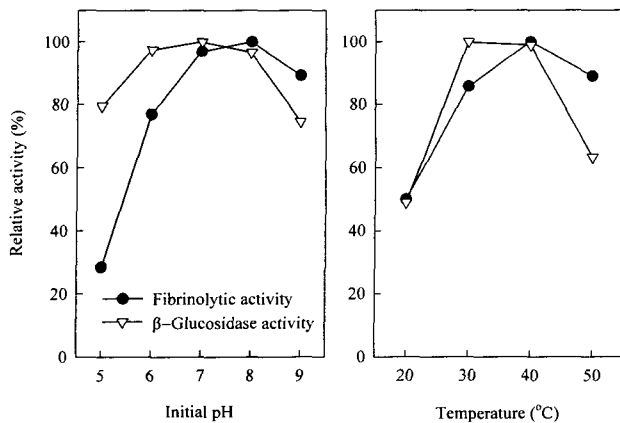


Fig. 4. Effect of initial pH and temperature on the production of fibrinolytic enzyme and  $\beta$ -glucosidase.

potassium phosphate 첨가시 2.8 unit의 활성을 보였으나  $\beta$ -glucosidase 활성은 1232 unit로 비교적 낮은 활성을 보였다.

#### 초기 pH와 온도의 영향

혈전용해효소 활성과  $\beta$ -glucosidase의 효소활성을 가장 높게 생산하는 최적화 배지(2% glucose, 0.5% yeast extract, 0.1% calcium chloride)에서 초기 pH와 온도의 영향을 살펴보기 위해 pH를 5~9 사이로 조절하여 효소의 생산량을 측정된 결과(Fig. 4), 혈전용해효소는 pH 7~8에서 가장 높은 활성을 보인 반면,  $\beta$ -glucosidase 효소활성은 pH 6~8 사이에서 가장 높은 효소활성을 보였다. 또한 배양온도에 따른 효소의 활성을 측정된 결과(Fig. 4), 혈전용해효소는 40°C에서 가장 높았으며,  $\beta$ -glucosidase 활성은 30~40°C에서 높은 활성을 보였다. 지금까지 보고에 의하면 된장 또는 청국장에서 분리한 세균의 혈전용해효소는 초기 pH 6~8 사이에서 가장 높은 활성을 보였으며(12,14,15), 배양온도 30~40°C에서 비교적 높은 효소의 활성을 보임에 따라 된장에서 분리한 균주 *Bacillus* sp. KH-15는 중온성 균에 해당한다.

#### 요 약

재래식 된장으로부터 혈전용해능과  $\beta$ -glucosidase 효소를 생산하는 미생물을 분리하였으며, 분리한 균의 형태학적, 생화학적 분류를 수행하여 *Bacillus*속으로 동정하였으며, *Bacillus* sp. KH-15로 명명하였다. 그리고 분리한 균주의 효소 생산을 위한 배지조건과 배양조건을 측정하였다. 선발균주는 2% glucose, 0.5% yeast extract, 0.1% calcium chloride의 최적 배지에서 최대의 효소생산을 보였다. 초기 pH 7~8과 40°C에서는 혈전용해능이 최대를 보였으며, 초기 pH 6~8과 30~40°C에서는  $\beta$ -glucosidase 효소활성의 생산이 가장 높았다.

#### 감사의 글

본 연구는 과학기술부·한국과학재단 지정 대구대학교 농

산물저장·가공 및 산업화 연구센터의 지원입니다. 이에 감사를 드립니다.

#### 문 헌

- Marks D, Marks A, Smith C. 1996. *Basic Medical Biochemistry*. Williams & Wilkins Press, Philadelphia. p 107-113.
- Sumi H, Hamada H, Tsushima H, Mihara H, Muraki H. 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. 1990. Nattokinase and health; development of Natto. *Bioindustry* 7: 724-730.
- Choi KJ. 1995. Separation of *Bacillus* sp. and changes of  $\text{NH}_2\text{-N}$ ,  $\text{NH}_3\text{-N}$  and protease activity in Chungkookjang meju adding with mugwort extract. *MS Thesis*. Konkuk University, Seoul.
- Kwon OJ, Kim JK, Chung YG. 1986. The characteristics of bacteria isolated from ordinary Korean soybean sauce and soybean paste. *Kor Agr Chem Biotechnol* 29: 422-428.
- Kim SH, Choi NS, Lee WY, Lee JW, Kim DH. 1998. Isolation of *Bacillus* strains secreting fibrinolytic enzyme from Doenjang. *Kor J Microbiol* 34: 87-90.
- Kim JS, Kwon CS. 2001. Estimated dietary isoflavone intake of Korean population based on national nutrition survey. *Nutr Res* 21: 947-953.
- Peralta RM, Kadowaki MK, Terenzi HF, Jorge JA. 1997. A highly thermostable  $\beta$ -glucosidase activity from the thermophilic fungus *humicola-grisea* var. *thermopedia*: purification and biochemical characterization. *FEMS Microbiol Letter* 146: 291-295.
- Holt JG, Sharpe ME, Mair NS, Sneath PH. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins Press, Baltimore. Vol 2, p 1105-1107.
- Kil JO, Kim GN, Park IS. 1998. Production and characterization of fibrinolytic enzyme: optimal condition for production of the enzyme from *Bacillus* sp. KP-6408 isolated from Chungkookjang. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 51-56.
- Kim JM, Suh HJ, Ahn SW, Kim MS, Oh SH. 2002. Fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* KH-4 isolated from *Deonjang*. *Neutraceuticals & Food* 7: 417-420.
- Jang SA, Kim MH, Lee MS, Lee MJ, Jhee OH, Oh TK, Sohn CB. 1999. Isolation and identification of fibrinolytic enzyme producing strain from shrimp Jeot-Gal, a tiny salted shrimps, and medium optimization for enzyme production. *Kor J Food Sci Technol* 31: 1648-1653.
- Kim JS, Yoon S. 1999. Isoflavone contents and  $\beta$ -glucosidase activities of soybeans, meju, and doenjang. *Kor J Food Sci Technol* 31: 1405-1409.
- Choi WA, Lee JO, Lee KH, Park SH. 1998. Effects of environmental and nutritional conditions on fibrinolytic enzyme production from *Bacillus subtilis* BK-17 in flask culture. *Korean J Biotechnol Bioeng* 13: 491-496.
- Choi MY. 2003. Screening of fibrinolytic enzyme producing from microorganism and optimum conditions of enzyme production. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 976-980.
- Moon IS, Park SK, Lee KY. 1993. Production of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Korean J Biotechnol Bioeng* 8: 409-414.

(2003년 9월 26일 접수; 2003년 12월 20일 채택)