

흑두로 제조한 청국에서 분리된 *Bacillus subtilis* BB-1으로부터 혈전용해효소 유전자 크로닝 및 특성규명

이영훈 · 이성호¹ · 전주미¹ · 김홍출 · 조용운 · 박기훈² · 최영주³ · 갈상완*

진주산업대학교 미생물공학과, ¹경상대학교 환경생명국가 핵심연구센터, ²경상대학교 응용생명과학부, ³신라대학교 식품영양학부

Received May 3, 2005 / Accepted June 8, 2005

Cloning and Characterization of a Gene for Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus subtilis* BB-1 Isolated from Black Bean *Chung-kuk*. Young-Hoon Lee, Sung-Ho Lee¹, Ju-Mi Jeon¹, Hong-Chul Kim, Yong-Un Cho, Ki-Hoon Park², Young-Ju Choi³ and Sang-Wan Gal*. Department of Microbiological Engineering, Jinju National University, 150 Chilamdong jinju 660-758, Korea, ¹Environmental Biotechnology National Core Research center, Gyeongsang Natinal University, 900 Gajadong Chinju 660-701, ²Department of Applied Life Science, Gyeongsang Natinal University, 900 Gajadong Chinju 660-701. ³Department of Food and Nutrition, Silla University, San 1-1 Sasanggu Goebeopdong Pusan, 617-736, Korea – A bacterium producing five fibrinolytic isozymes was isolated from black bean *chung kuk*. The bacterium was identified as *Bacillus subtilis* BB-1 by 16s rDNA sequence homology search. A gene out of five fibrinolytic genes in the *Bacillus subtilis* BB-1 was cloned by shot-gun method. A *Cla* I DNA fragment of *B. subtilis* BB-1 chromosome was cloned in to pBluescript II SK(-) and showed the fibrinolytic activity to bacterial cells. The *Cla* I DNA fragment was sequenced and the sequences did not show homology with gene for protease or fibrinolytic enzyme genes in other organisms. The *Cla* I DNA fragment was reduced to 2,142 bp by activity-guided PCR cloning method. The optimum pH and temperature of the enzyme were 5.0 and 35°C, respectively. Substrate specificity of the fibrinolytic enzyme was detected in skim milk, casein, gelatin and blood agar plates. The activity of the enzyme was not detected with these substrates. Taken together, this enzyme is a new fibrinolytic enzyme and may be used to prevent thrombosis and arteriosclerosis.

Key words – *Chung-kuk*, *Bacillus subtilis* BB-1 (KFCC 11344P), fibrinolytic enzyme, fibrinolytic isozymes, deletion mutation

혈관벽이 손상되면 혈소판에서 thrombin이 생성되어 섬유소원을 섬유소로 만들어 섬유소혈관을 형성하게 되어 출혈을 막게 된다. 이런 지혈과정을 거친 후 조직이 재생되고 생성되었던 혈전은 혈관 내 plasminogen 활성화인자에 의해서 활성화된 plasmin이 작용하여 용해되지만, 완전한 용해는 일어나지 않아 혈관을 따라 흐르면서 혈액의 흐름을 방해하게 되어 혈관계 질환을 초래하게 된다. 이 혈전에 의한 질환이 인간의 가장 큰 사망원인으로 알려져 큰 관심을 불러일으키고 있다[7]. 이러한 혈전을 분해하는 것으로서 현재 사용중인 혈전용해제로는 urokinase[23,28]와 streptokinase[8] 그리고 tPA[2]가 있는데 이들은 장기간 복용시 혈전에 대한 특이성이 낮아 혈관벽 분해 및 적혈구 파괴 그리고 구입가격이 고가인 단점[19]등이 있으며, urokinase를 제외하고는 경구 투여가 불가능한 실정이다[26]. 따라서 현재 새로운 혈전용해제의 개발이 절실히 요구되고 있다.

최근에 혈전분해효소를 배독[6]과 지렁이[16,17,22]로부터 분리·정제하였다는 보고가 있었으며, 일본에서는 natto[9, 10,20,27]를 발효하여 그 식품중에 혈전용해효소가 존재하는 것을 발견하고 기능성 식품으로서의 개발을 시도한 바 있다.

그리고 국내에서도 전통발효식품인 청국장[12,30], 된장[13], 젓갈[14], 김치[29]등에서 혈전용해작용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 대두청국보다도 혈전용해력이 우수한 흑두 청국으로부터 혈전용해력이 가장 우수한 미생물을 선발하고 그 미생물이 생산하는 혈전용해효소의 특성을 조사하고, 또한 그 유전자를 크로닝하여 특성을 규명하고 산업적 이용가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

청국의 제조

청국제조를 위해 원료인 콩은 재래시장에서 시판중인 한국산 흑두를 구입하여 사용하였다. 연등의[15]의 방법을 변형하여 원료콩을 세척 후 20°C의 멸균수에서 10시간동안 침지하여 100°C에서 1시간의 조건으로 증자한 후 상온에서 냉각시켰다.

청국의 발효는 starter를 접종하지 않고 자연상태로 40±1°C, 습도는 포화습도를 유지하도록 조절하였으며, 발효시간은 48시간으로 하였다.

혈전용해효소 생산 미생물의 분리 및 동정

이미 제조된 청국으로부터 혈전용해효소 생성능이 우수한

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-3393, Fax : +82-55-751-3399

E-mail : sangal@jinju.ac.kr

미생물을 선별하기 위하여 청국 1g을 멸균생리식염수에 현탁, 희석하고 이를 LB agar plate (Tryptone 1.0%, Yeast extract 0.5%, NaCl 1.0%, Agar 1.5%. pH 7.2. Difco)에 0.1 ml를 도말한 후 단일 colony를 분리하였다. 분리된 colony를 LB broth 5 ml에 접종하여 37°C에서 optical density (OD)가 1.0이 되게 배양한 후 fibrin plate에 20 ul씩 loading하여 혈전용해능이 가장 우수한 미생물을 선발하였다. 미생물의 동정은 한국 미생물보존센터(KCCM)에 의뢰하여 16s rDNA sequence에 의한 유전자간의 상동성비교로 동정하였다.

분리균주의 혈전용해동위효소 측정

SDS-fibrin zymography는 fibrinogen 농도가 0.12% (W/ V)가 되게 polyacrylamide 용액에 혼합한 후 즉시 thrombin (1,000 unit/ml)을 첨가하여 제조한 12% fibrin- polyacrylamide gel에서 수행하였다. 각 lane에 혈전용해능이 우수한 분리균주의 배양상등액을 점적한 후 전기영동을 실시한 다음 SDS에 의해 불활성화된 효소를 재활성화 시키기 위하여 gel을 2.5% Triton X-100을 포함한 Tris-HCl (50 mM, pH 7.4)에 3시간 동안 침적하여 단백질을 활성화시킨 후 Triton X-100을 제거하기 위하여 멸균수로 15분간 2회 세척하였다. 분획된 단백질의 혈전분해활성은 활성반응 완충용액(200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.02% Na₃N가 포함된 30 mM Tris-HCl, pH 7.4)에 gel을 침적하여 37°C 항온기에서 16시간 반응을 시켰다. Fibrin 분해능을 지닌 단백질 분획은 활성염색법에 의해 gel상의 fibrin을 분해하여 Coomassie blue R-250 염색결과 투명대로 활성을 확인하였다[21].

혈전용해활성 측정

Astrup와 Hullertz의 방법[1]을 변형하여 사용하였다. 0.4% Fibrinogen (Sigma)을 sodium borate buffer (10 mM sodium borate, 160 mM boric acid, 40 mM NaCl. Merck)에 녹인 후 직경 87×15 mm petridish에 10 ml 넣은 후 thrombin (1,000 unit/ ml Sigma) 20 unit를 첨가하여 실온에 30분간 방치하여 응고시켰다. 응고된 fibrin plate에 각 시료를 적당량 점적하여 6hrs동안 37°C에서 반응시켜 용해된 분해면적을 측정하였으며, 활성의 세기를 측정하기 위하여 혈전분해효소 plasmin과 비교 후 unit로 환산하여 단위를 정하였다.

사용균주 및 플라스미드

사용된 숙주세포로서는 *Escherichia coli* XL1-blue (*supE+ lac- hsdR17 recA1 F proAB+ lacI Z ΔM15*)[4]를 사용하였고 cloning 및 subcloning vector로서 pBluescriptII SK(-) [Stratagene®]와 pET-28a(+)[Novagen®] vector를 사용하였다

Chromosomal DNA의 분리

IntRon사의 Genomic DNA Extraction kit를 이용하여 분리하였다. 혹두에서 분리한 미생물을 OD가 1.0이 되게 배양한 후 얻은 균체를 50 ul Pre buffer (added 20 mg/ ml RNase A)로 현탁시킨 후 100 g/ ml Lysozyme 3 ul를 첨가, 37°C에서 15분간 반응시켰다. 반응 후 250 ul G-buffer (added 20 mg/ ml RNase A, 20 mg/ ml Protease K)를 첨가, 65°C에서 15분간 반응시켰다 반응이 끝난 후 250 ul Binding buffer를 첨가하여 binding시킨 후 column을 이용하여 DNA를 분리하였다.

플라스미드 분리 및 형질전환

Plasmid DNA 분리 정제는 rapid alkaline lysis법[5]과 Spin column kit (IntRon)를 이용하였고, 각종 plasmid를 사용한 형질전환은 Hanahan[11]이 확립한 과정에 따라 실시하였다.

Agarose gel electrophoresis 및 분리 DNA 단편의 회수

Gel electrophoresis는 TAE buffer를 사용한 Maniatis 방법[18]에 따랐으며, agarose gel 상에서 분리된 DNA단편은 gel elution 방법[25]을 이용하여 추출 회수하였다.

혈전용해효소 유전자 염기서열의 분석

혈전용해효소 유전자의 염기서열분석은 Sanger의 dideoxy termination method[24]에 따라 ABI 377A 자동 염기서열 분석기에서 분석하였다.

크로닝된 혈전용해효소유전자의 deletion mutation에 의한 효소 활성 측정

크로닝된 혈전용해효소 유전자의 deletion mutation을 구축하기 위해 primer를 Table 1과 같이 합성하여 PCR에 의해 점차 size를 줄여 6가지의 DNA단편을 얻었으며, 각 DNA단

Table 1. List of primers used in PCR

Number	Sequence (5'-3')	Direction
BSF1	cct cag gat gaa gct tga agt gga t	forward
BSF2	cct cag gat gga tgt gcc ggt caa a	forward
BSF3	cct cag gat gga gct gta tat gtc t	forward
BSF4	cct cag gat gca gat cgc caa ttt g	forward
BSF5	cct cag gat gag aga cct cgg gaa c	forward
BSF6	cct cag gat gga aga tcc aaa ctc a	forward
BSR	tga att ctt aag atg tag ctg ttt c	reward

편을 크로닝하여 혈전용해효소 활성을 조사하였다. PCR 증폭에 사용된 Perkin Elner-2400은 조건을 초기 denaturation 단계에서 95℃ 30초를 유지하였으며, 55℃ 30초, 72℃ 30초에서 30 cycle로 증폭한 후 최종 단계인 DNA 합성은 72℃에서 10분동안 실시하였다.

크로닝된 혈전용해효소유전자를 함유한 균주의 혈전용해 활성 측정 및 기질특이성 조사

크로닝된 혈전용해효소 유전자를 함유한 균주의 혈전용해능을 조사하기 위하여 대조구로서 pBSK(-)를 가지고 있는 XL1-blue를 사용하였으며, 재조합 균주 및 대조구를 각각 600 nm에서 OD가 1.0이 되게 배양하여 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 후 배양상등액과 균체를 혈전분해활성측정에 사용하였으며, 집균된 균체는 멸균생리식염수로 2회 세척한 후, 20 mM Tris-HCl (pH 7.2)에 현탁시켜 10℃이하를 유지하면서 초음파 파쇄기(Bandelin Co. Sonopuls GM70. USA)를 사용하여 120Hz로 파쇄시켰다. 파쇄균체는 13000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 fibrin plate, skim milk, casein, gelatin, blood agar plate에 각각 점적하여 혈전분해 활성 및 기질특이성을 조사하였다.

혈전용해효소생산의 최적 pH 및 온도

혈전용해효소생산의 최적 pH와 온도를 측정하기 위하여 pH는 fibrin plate를 제조함에 있어서 fibrinogen용액의 pH를 각각 5.0부터 9.0까지 조절한 후 thrombin 10 unit를 가하여 본 혈전용해효소를 적당량 점적한 후 37℃에서 6시간 반응시켜 용해된 분해면적을 측정하였다. 이때 pH 4.0이하와 10.0이상에서는 강산과 강염기로 인해 fibrin plate가 만들어 지질 않았다. 최적활성온도는 20℃부터 40℃로 온도를 조절 후 6시간 반응시켜 용해된 분해면적을 측정하였다.

결과 및 고찰

혈전용해능활성이 높은 미생물의 분리 및 동정

국내산 흑두로 제조한 청국에서 혈전용해능이 있는 미생물을 9종 분리 하였으며(Fig. 1), 혈전용해능의 크기를 plasmin 1 unit와 비교실험을 실시한 결과 Table 2와 같이 BB-1균주가 생성하는 효소가 400%, BB-2는 324%, BB-3, 4는 100%, BB-7은 196%, BB-8은 196%, BB-9는 100%로 BB-1균주의 활

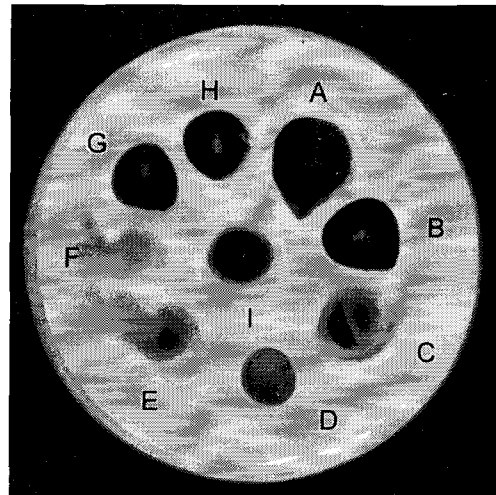


Fig. 1. Screening of bacteria having a fibrinolytic activity from black bean chung kuk.

Fibrinolytic activity was showed by clear zones.
A : BB-1 B : BB-2 C : BB-3 D : BB-4 E : BB-5
F : BB-6 G : BB-7 H : BB-8 I : BB-9

성이 가장 높았다. 혈전용해능이 우수한 BB-1의 동정을 위해서 한국미생물보존센터에 16s rDNA sequence를 의뢰하여 분석 결과 그 유전자의 상동성이 *Bacillus subtilis*와 99% 유사성을 가지는 것으로 Fig. 2, 3과 같이 동정되었다. 따라서 이 균을 *Bacillus subtilis* BB-1로 명명하고 한국미생물보존센터(KCCM)에 위탁관리 시켰으며, 관리번호는 KFCC 11344P이다.

***B. subtilis* BB-1의 혈전용해동위효소 측정**

흑두를 이용하여 제조된 청국에서 분리한 *B. subtilis* BB-1의 혈전용해동위효소를 확인하기 위하여 12% fibrin-polyacrylamide gel상에서 전기영동을 실시하였다. Fibrin 분해능을 지닌 단백질 분획은 활성염색법에 의해 gel상의 fibrin을 분해하여 Coomassie blue R-250 염색결과 투명대로서 활성을 가지는 5종류의 혈전용해효소 isozyme band를 Fig. 4와 같이 확인하고 대략적인 분자량은 60, 45, 30, 25, 19 kDa이었다.

혈전용해효소 유전자의 크로닝 및 염기서열의 결정

혈전용해효소를 세포외로 다량 생산하는 *B. subtilis* BB-1의 genomic DNA를 분리하여 *Cla*I으로 절단한 다음 7~3 kb의 DNA단편과 *Cla*I으로 절단 후 Calf Intestinal Alkaline phosphatase (CIP) 처리한 pBluescript II SK(-)를 ligation시켜

Table 2. Fibrinolytic activities of bacteria isolated from black bean chung-kuk.

Strain	Fibrinolytic activity (%)	Strain	Fibrinolytic activity (%)
BB-1	400	BB-6	10
BB-2	324	BB-7	196
BB-3	100	BB-8	196
BB-4	100	BB-9	100
BB-5	30	Plasmin (1unit)	100

CCTATCATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGGGGACGG
 GTGAGTAACACGTTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTA
 ATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACT
 TACAGATGGACCCGCGCGCATATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGGCAGCA
 TGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCC
 TACGGGAGGACAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCG
 CGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAAGTACCGT
 TCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAAGAAAGCCAGGGCTAACCTAGTGCCAG
 CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATATTGGGCGTAAAGGGCTCG
 CAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA
 ACTGGGGAACCTTGAGTGCAAGAAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGT
 AGAGATGTGGAGAACACCAAGTGGCGAAGGGGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG
 AGCGAAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCGCTAAACGATG
 AGTGCTAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGACGTAACCGATTAAGCACTCC
 GCCTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAAATTGACGGGGCCCGCACAAAGC
 GGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTTTGACATCCT
 CTGACAACTCCTAGAGATAGGACGTCGCCCTTCGGGGGCGAGTACACGGTGGTGCATGGTT
 GTCGTGAGCTGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATC
 TTAGTTGCCAGCAATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
 GTGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGCTGCTACAAATG
 GACAGAAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAAATCCCAAAATCTGTTCTCAGT
 TCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTGGAAATCGCTAGTAATCGCGGATGAG
 CATCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCTCACACCAGAGGTT
 TGTAACACCGAAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCCGGAAGGTGACA

Fig. 2. 16s rDNA sequence of the isolated BB-1 strain.

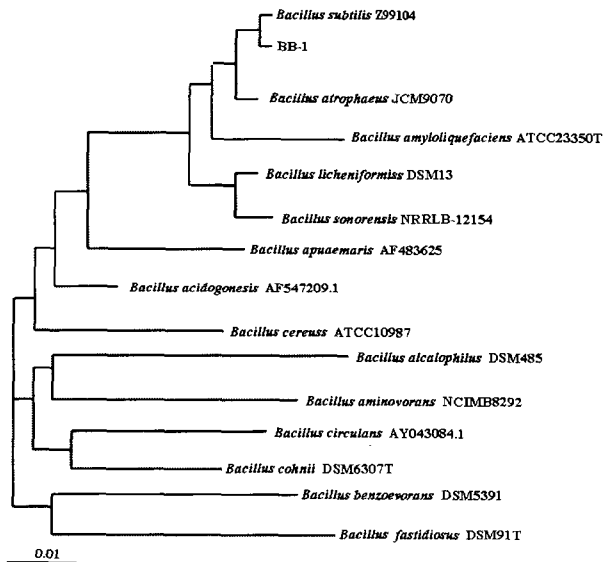


Fig. 3. Phylogenetic classification of the isolated BB-1 strain.

E. coli XL1-blue에 형질전환 시켰다. Ampicillin과 X-gal, IPTG가 포함된 선별 배지에서 자란 약 1,500여개의 형질전환체 중에서 혈전용해력을 갖는 하나의 clone이 확인 되었다(Fig. 5). 이 균으로부터 plasmid를 분리하여 insert를 확인하여 본 결과 약 3.0 kb의 insert 단편을 확인하였다. 이때 *Cla* I으로 절단시 insert의 size와 vector size가 유사하여 vector의 multi cloning site (MCS)에 있는 *Bam*H I으로 절단한 결과 6.0 kb인 하나의 band를 얻었으며, 염기서열의 결정은 먼저 T7 primer와 T3 primer를 이용하여 양방향으로 염기서열을 확인하고 확인된 후 다시 연속적으로 새로운 primer를 합성하여 확인함으로써 최종적으로 중복되는 연결순서에 의해 전체적인 염기서열을 결정하였다. 염기서열을 토대로 제한효

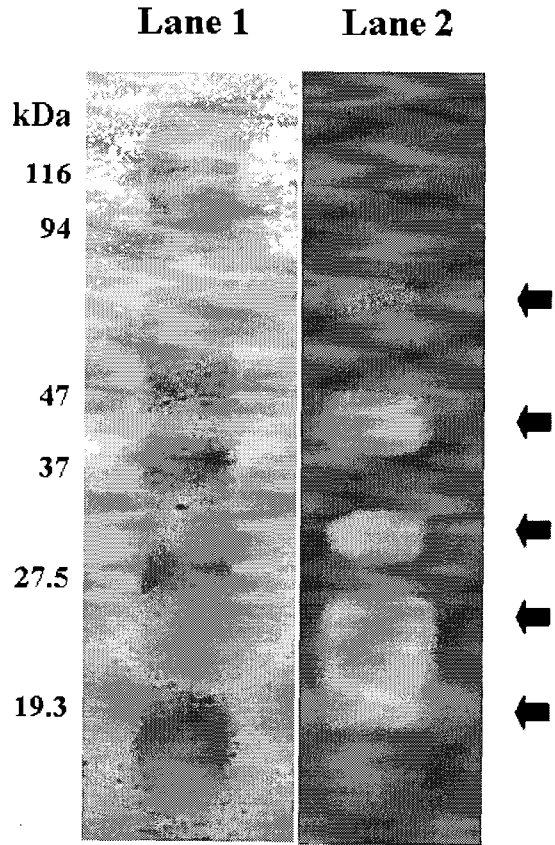


Fig. 4. Detection of fibrinolytic isozymes by 12% polyacrylamide gel containing 0.12% fibrin. The detection method are described in materials and methods.

lane 1 : standard marker

lane 2 : zymography of fibrinolytic isozymes of *B. subtilis* BB-1



Fig. 5. Screening of a gene encoding fibrinolytic enzyme from genomic library prepared from *Bacillus subtilis* BB-1.

- The fibrinolytic activity was measured as described in materials and methods.
- Arrow indicates colony containing fibrinolytic activity.

소 지도를 작성한 후 PCR을 이용하여 크로닝한 결과 약 2.5 kb 크기의 DNA 단편안에 혈전용해효소를 생산하는 유전자가 포함된 클론을 확인하였다(Fig. 6, 7). 이 재조합 DNA를 BSF-1으로 명명하였다. BSF-1은 기존에 알려진 혈전용해효소 유전자와는 상동성을 전혀 보이지 않아 새로운 혈전용해효소 유전자임을 알 수 있었다. 이 유전자는 안정성과 높은 생리활성[3]이 입증된 청국의 고초균에서 분리되었다는 점에서 식품제조 사용시 위험성을 배제할 수 있으며, 혈전증 및 순환기계통의 성인병에 대한 예방인자로 사용가능하리라 판단된다.

BSF-1의 deletion mutation에 의한 효소 활성특징

BSF-1의 insert를 PCR방법으로 Fig. 8 A와 같이 크기를 줄여 다시 크로닝하였다(Fig. 8 B). 크로닝된 각 clone의 혈전분해력을 조사하였던 바 처음 ATG (BSFF1)와 TAA (BSFR) 사

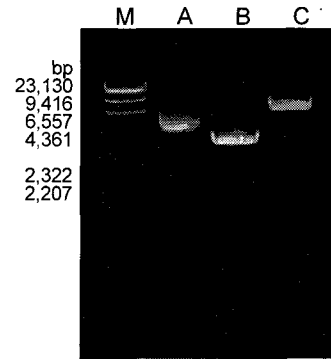


Fig. 6. Identification of cloned DNA segment containing a fibrinolytic enzyme gene by restriction endonucleases.

- M : *Hind* III marker of λ DNA
- A : recombinant DNA (pBSK + insert DNA)
- B : recombinant DNA digested with *Cla* I
- C : recombinant DNA digested with *Bam* HI

	<u><i>Cla</i> I</u>					
1	GTATCGATGT	CATCGGTGAG	GAAGAGCTGA	<u>GTTCAGCGA</u>	GCATCATGCC	TGTCCGCACT
61	GCGGATTTTC	AATTGGTGAA	CTTGAGCCGC	GTCTGTTTTC	GTTTAACAGT	CCGTTCCGGG
121	CGTGTCGGAC	GTGTGACGGT	CTCGGAATGA	AGCTTGAAGT	GGATGCCGAT	CTTGTCATCC
181	CCAATCAAGA	TTTGTCAATT	AAGGAGAATG	CGGTGCGCCC	TTGGACACCG	ATCAGTCCAC
241	AATATTATCC	TCAGCTGCTT	GAGGCAGTCT	GCACCCACTA	CGGGATTGAT	ATGGATGTGC
301	CGGTCAAAGA	TTTGCGAAG	CATCAACTGG	ATAAAGTGCT	GTACGGCAGC	GGGGATGGCC
361	TGATTTATTT	CCGATATGAA	AATGATTTTG	GACAAATCCG	CGAGGGTGAA	ATTCATTTG
421	AAGGCGTATT	GCGCAACATT	GAAAGACGCT	ATAAGGAGAC	AGGCTCTGAT	TTCATCCGTG
481	AGCAGATGGA	GCAGTATATG	TCTCAGAAGT	CTTGTCCGAC	GTGCAAAGGC	TATCGGTAA
541	AGAAAGAGGC	GCTTGCCGTA	CTGATTGAGC	GCCGCCACAT	TGGAAAATT	ACCGAGCTGT
601	CTGTGCGCGA	CGCACTTGCC	TTCTTTAAAA	ACCTTACCCT	TTCTGAGAAG	GATATGCAGA
661	TCGCCAATTT	GATTTTGCCG	GAAATTGTGG	AGCGCTTAAG	CTTTCTGGAC	AAAGTCCGGC
721	TCGATTACCT	GACATTGAGC	AGGGCAGCGG	GTACATTGTC	CGGGGAGAG	GCCGACGCCA
781	TCAGGCTGGC	GACTCAAATT	GGCTCGCGTT	TATCCGGTGT	GCTTTATATT	TTAGATGAGC
841	CGTCTATCGG	TCTGCATCAG	CGTGATAACG	ACCGCTTGAT	CAGCGCTCTG	AAAAATATGA
901	GAGACCTCGG	GAACACGCTG	ATTGTTGTCT	AACATGATGA	GGACACGATG	ATGGCAGCAG
961	ATTATTTAAT	AGATATTGGA	CCGGGAGCCG	GCATTACCGG	CGGACAGGTG	ATATCTCGGG
1021	GTACGCCCGA	AGAAGTGATG	GAAGATCCAA	ACTCATTAA	GGGCAGCTAT	TTATCAGGGA
1081	AAAAGTTTAT	CCCATTGCCT	CCTGAAAGAA	GAAAGCCGGA	CGGACGTTAC	ATTGAAATTA
1141	AAGGTGCATC	AGAAAACAAC	CTGAAAAAAG	TGAATGCCAA	GTTCGCCGTT	GGGACGTTTA
1201	CAGCAGTTAC	AGGTGTTTCC	GGTTCAGGAA	AGAGTACACT	CGTTAATGAA	ATTTTGCAT
1261	AGGCCGTGGC	GCAAAAAGCTT	CATAAAGCGA	AAGCGAAGCC	CGGCAGCCAT	AAAGAGATTA
1321	AAGGTTTGG	TCATTTAGAT	AAAGTCATTG	ACATTGACCA	GGCGCCAATC	GGAAGAACGC
1381	CGAGATCCAA	CCCTGCGACA	TACACCGGTG	TATTTGATGA	CATTCTGTAT	GTATTCGGC
1441	AGACAAATGA	AGCGAAGGTC	CGCGGCTATA	AAAAAGGCCG	TTTCAGCTTC	AACGTGAAG
1501	GCGGACGATG	TGAAGCCTGC	CGCGGCGACG	GGATTATTAA	AATTGAAATG	CACCTTCCTC
1561	CTGACGTATA	CGTTCATATG	GAGGTGTGTC	ACGGCAAACG	CTATAACCGT	GAAACGCTTG
1621	AAGTGACGTA	CAAAGGAAAA	AGCATCTCTG	ATGTGCTTGA	TATGACGGTT	GAAGATGCTC
1681	TTCTTTTCTT	TGAAAATATC	CCGAAAATCA	AACGCAAGCT	CCAAACCCTT	TATGATGTTG
1741	GTTTAGGTTA	TATTACGCTC	GGCCAGCCGG	CGACGACCTT	GTCAGGCGGA	GAAGCGCAGC
1801	GCGTGAAGCT	CGCGTCAGAG	CTGCACAAAC	GCTCGACCGG	ACGCAGCCTC	TACATTTTAG
1861	ATGAGCCGAC	GACAGGTTTG	CATGTCGACG	ATATGCCACG	GCTTCTTGTG	GTGCTGCAAC
1921	GGTTGGTAGA	CAACGGAGAC	ACTGTACTGG	TTATTGAGCA	CAACCTTGAT	ATCATTAAAG
1981	CGGCCGATTA	CATTGTGGAT	TTGGGCCCGG	AAGCGGGAGC	CGGGGGCGGA	ACCATTGTCC
2041	CGTCTGGAAC	GCCTGAGGAA	ATCACTGAAG	TGGAAGAATC	GTATACAGGC	CGTTATTTGA
2101	AGCCTGTTAT	CGAAGCTGAC	AAAGCACGCA	TGAAATCGCT	CTTGAAGGCG	AAAGAAACAG
2161	CTACATCTTA	AAACCCTCTG	TTAAGAGGGG	ACAGCTTGTC	AGCAAGTCCA	TCCTTGGGCT
2221	TAGCAGGCAA	GCTTTTTTCT	TACGGCATAA	TAGGTTTAGA	TTCTGCTTTG	GTATAATTTT
2281	TTTGGGAAAA	TGCCTAAACA	TTTACAAATT	GCTGTCGATA	TATGAATTGA	AAGGCGGATG
2341	ATGATTTCCA	AATTAAGCAG	ACAAAACCTA	TTAAGGGGCT	TAAAGGCATC	CITTAAGCAAT
2401	AACTGAATCT	ACATAGGTTA	GAAGCTTTAT	TGGAATCTGA	TACGCCAGAA	ATCAAAGAAA
2461	AGGAAGTCTT	TGATTTCAAA	AACATATACA	CATGGAGGTA	TTTTTCACAT	GAGAATCAAC
2521	CACAAATATG	CAGCGCTTAA	CACATTA AAC	CGTTTGTCTT	CAAAACAACG	TGCCAGCTCA

Fig. 7. Nucleotide sequence of a gene encoding fibrinolytic enzyme cloned from *B. subtilis* BB-1. Gray boxes are start codon and stop codon for a fibrinolytic enzyme. *Cla* I and *Sac* I sites are underlined.

이에서 나온 clone만이 혈전용해력이 있는 것(Fig. 8 C)으로 나타났으며 나머지 클론들은 활성이 없었다.

BSF-1을 함유한 균주의 혈전용해활성 측정 및 기질특이성 조사
BSF-1을 함유한 균주의 혈전용해능을 조사하기 위하여 대

조구로서 pBSK(-)를 가지고 있는 XL1-blue를 사용하여 혈전용해활성과 기질특이성을 조사한 결과 재조합 균주의 배양상등액(Fig. 9, A)과 초음파 파쇄(Fig. 9, B)에서 혈전분해활성이 관찰되었다. 배양상등액에서 BSF-1의 활성은 초음파 파쇄물보다 활성은 낮았지만 혈전분해능이 보이는 것을 관찰하

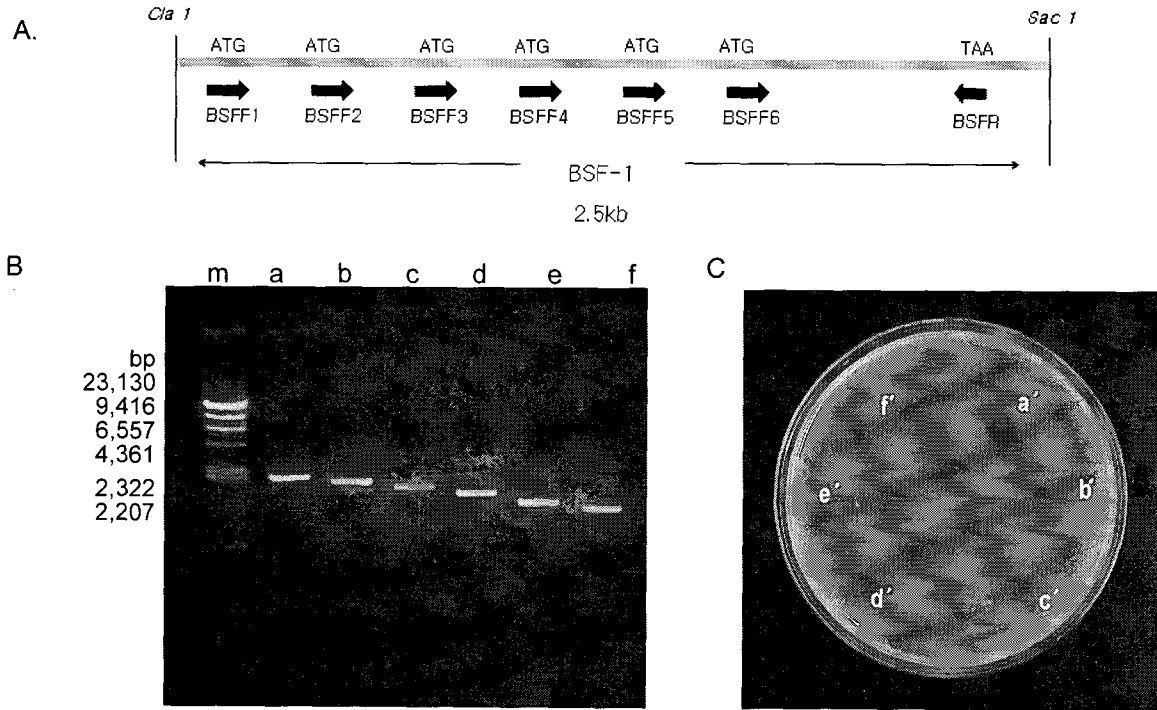


Fig. 8. Fibrinolytic activity of its derivatives constructed deletion mutation from BSF-1.
 A: deletion map of BSF-1,
 a : PCR product of BSFF1 and BSFR primers
 b : PCR product of BSFF2 and BSFR primers
 c : PCR product of BSFF3 and BSFR primers
 d : PCR product of BSFF4 and BSFR primers
 e : PCR product of BSFF5 and BSFR primers
 f : PCR product of BSFF6 and BSFR primers
 C: detection of fibrinolytic activity of deletion mutants
 a' : clon of PCR product of BSFF1 and BSFR primers
 b' : clon of PCR product of BSFF2 and BSFR primers
 c' : clon of PCR product of BSFF3 and BSFR primers
 d' : clon of PCR product of BSFF4 and BSFR primers
 e' : clon of PCR product of BSFF5 and BSFR primers
 f' : clon of PCR product of BSFF6 and BSFR primers

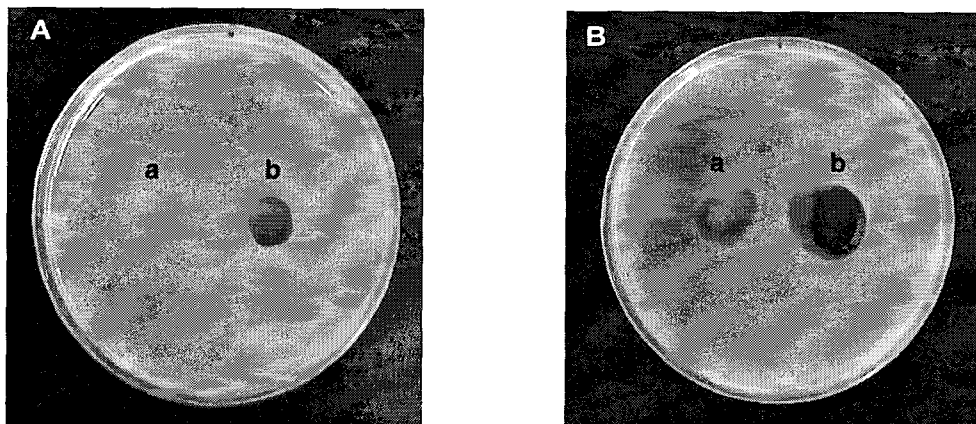


Fig. 9. Fibrinolytic activity of the cloned gene (BSF-1) from *B. subtilis* BB-1.
 A : culture supernatant B : cell extract a : XL1-Blue containing pBSK b : XL1-Blue containing BSF-1

였다. 이 결과에 의하여 이 효소는 세포외로 분비되는 exo-type enzyme임을 알 수 있었다. 기질특이성조사에서는 skim milk, casein, gelatin, blood agar에서 분해현상을 보이지 않았다(Fig. 10). 특히 blood agar plate에서 분해가 일어나지 않은 것은 urokinase나 streptokinase의 혈액 내 부작용[19]에 대한 것을 비교하여 볼 때, 본 효소는 적혈구 파괴현상이나 혈액 내에서의 부작용에 대한 위험성을 배제할 수 있을

것으로 판단된다.

혈전용해효소생산의 최적 pH 및 온도

혈전용해효소생산의 최적 pH와 온도를 검토한 결과 Fig. 11과 같이 pH 5.0, 온도 35℃에서 가장 높은 활성을 나타내었다. pH 5.0에서 높은 활성을 나타내는 것으로 보아 본 효소는 산성에 있어서 매우 안정적으로 기능을 하는 것으로 추정된다.

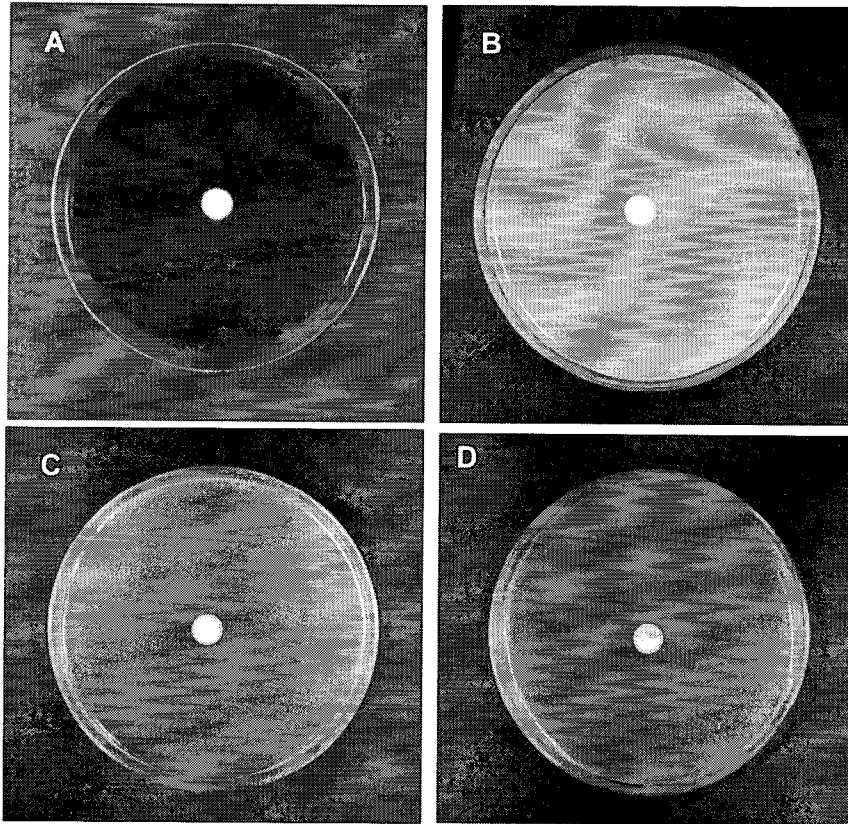


Fig. 10. Substrate specificity of BSF-1 enzyme in four substrates.

A : blood agar plate B : skim milk plate
C : casein plate D : gelatin plate

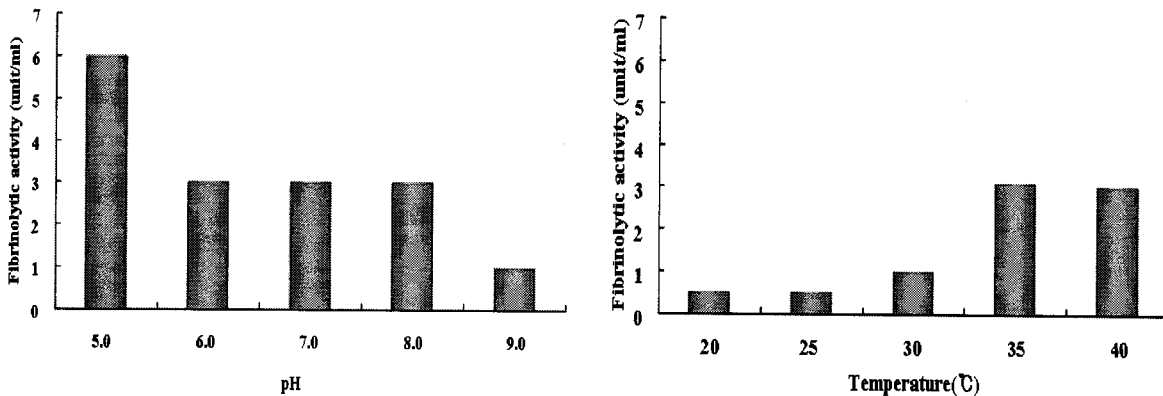


Fig. 11. Effect of various pH and temperature on the production of BSF-1 enzyme.

요 약

흑두로 제조한 청국으로부터 혈전용해력이 우수한 균을 선발하여 동정하였으며, 그를 *Bacillus subtilis* BB-1로 명명하였다. 이 균은 혈전용해효소 isozyme을 적어도 5개이상 생성하는 균주로 확인되었다. 이 균으로부터 크로모솜을 분리하여 shot gun법으로 혈전용해효소 유전자를 크로닝하였으며, 이 유전자를 BSF-1이라 명명하였다. 이 유전자는 714개의 아미노산을 암호화하고 있으며 기존에 밝혀진 혈전용해효소 유전자와 상동성은 검출되지 않은 새로운 혈전용해효소 유전자였다. 혈전용해효소활성 최적 pH 및 온도는 5.0과 35℃였다. 기질특이성은 적혈구 배지 또는 skim milk, gelatin등에 전혀 분해활성이 없었다. 이는 혈전만을 특이적으로 분해하는 기질특이성을 보였으며, 혈전분해효소로서의 이용가능성이 충분한 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2003~2006년 농림부 첨단기술과제 생명공학분야(203069-03-2-CG000)로 수행중이며, 이 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Astrup, T and S. Hullertz. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *The National Danish Society against Rheumatic Disease*. 346-351.
- Astrup, T. and Stermdorff, I. 1956. The plasminogen activator in animal tissue. *ACTA physiol. scand.*, 363-250.
- Bok-Nan Kim, Jong-Dai Kim, Seung-shi Ham, Yong-Sorn Choi and Sang-Young Lee. 1995. Effects of spice added natto supplementation on the Lipid Metabolism in Rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**(1), 121-126.
- Bullock, W. O., J. M. Fernandez and J. M. Short. 1987. XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta galactosidase selection. *Bio Techniques* **5**, 376.
- Birhion, H. C and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**, 1513-1523.
- Chung KH and Kim DS. 1992. Fibrinolytic and cogulation activities of korean Snake Venoms. *Kor Biochem J*, **25**, 696-701.
- DaKa MD and Semba CP. 1995. Thrombolytic therapy in venous occlusive disease. *J Vasc Interv Radiol*, **6**, 73-77.
- Fletcher, A. P and Johnson, A. J. 1975. Methods employed for purification of streptokinase. *Por. Soc. Exp. Biol. Med.*, **94**, 233.
- Fujita, M., Hong, K., Ito, Y., Misawa, S., Takeuchi, N., Kartya, K and Nishimuro, S. 1995. Transport of nattokinase across the rat intestinal tract. *Biol. Pharm Bull.* **18**, 1194-1196.
- 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. Comm.* **197**, 1340-1347.
- Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*, pp. 109-135. In D. M. Glover(ed.), DNA cloning, vol. I. IRL press, Oxford.
- Kim YT, Kim WK and Oh HS. 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK11-4 screened from chungkookjang. *Appl Environ Microbiol.* 2482-2488.
- Kim SH. 1998. New trends of studying on potential activities of Doen-jang. *Korea Soybean digest*, **15**(1), 8-15.
- Kim HK, Kim GT, Kim DK, Choi WA, Park SH, Jeong YK and Kang IS. 1997. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermenter fish. *J of Ferment and Bioengin.* **84**(4), 307-312.
- Kyu-chum Youn, Dong-Ho Kim, Jang-Ok Kim, Byung-Jun Park, Hong-Sun Yook, Jae-Min Cho and Myung-Woo Byun. 2002. Quality characteristics of the chung kook jang fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**(2), 204-210.
- Mihara H, Nakajima N and Sumi H. 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzyme in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**(10), 1730.
- Mihara H, Sumi H, Yonata T, Mizumoto H, Ike da R, Seiki M and Maruyama M. 1991. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Jpn J Physiol.* **41**, 461.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1989. Molecular cloning A Laboratory Manual. Cold spring Harbor Laboratory, New York.
- Nakajima, N., Taya, N and Sumi, H. 1993. Potent fibrinolytic enzyme from the lysate of *katsuwonus pelamis* digestive tract (shioikara) : purification and characterization. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 1604-1605.
- Nakamura, T., Yamagata, Y and Ichishima, E. 1992. Nucleotide sequence of the subtilisin NTA gene, aprN, of *Bacillus subtilis*(natto). *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 1869-1871.
- Nack-Shick Choi, Kab-Seog Yoon, Jin-Young Lee, Kyoung-Yoen Han and Seung-Ho Kim. 2001. Comparison of three Substrates(casein, fibrin, and gelatin) in Zymographic Gel. *J. Biochemistry and Molecular Biology*, **34**(6), 531-536.
- Park YD, Kim JW, Min BG, Seo JW and Jeong JM. 1998. Rapid purification and biochemical characteristics of Lumbricinase III from earthworm for use as a fibrinolytic agent. *Biotechnol Lett*, **20**(2), 169-172.
- Plug, J and Kieldgarrd, O. 1957. Urokinase an activator from human urine. I. Isolation and proper ties. *Biochem. Biophys.*, **ACTA.**, **61**, 624.
- Sambrook, Fritsch, Maniatis. Molecular cloning. 3rd ed. p13.1-p13.101, 6.36-p6.38.
- Sang-Wan Gal, Yong-Un Cho. 1997. "Simple DNA elution from agarose gels. *Korean Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2**, 62-63.
- Sumi, H., Seiki, M., Morimoto, N., Tsushima, H., Maruyama, M and Mihara, H. 1985. Plasma fibrinolysis after intraduodenal administration of urokinase in rats. *Enzyme* **33**, 121-127.
- Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H and Muraki,

- H. 1987. A novel fibrinolytic enzyme(nattokinase) in the vegetable cheese Natto. *a typical and popular soybean food in the japan diet. Experientia.* **43**, 1110-1111.
28. Toki, N., Sumi, H., Sasaki, K., Boreisha, I and Robbins, K. C. 1995. Transport of urokinase across the intestinal tract of normal Uman Subjects with Stimulation of synthesis and release of urokinase-type proteins. *J. clin Invest.*, **75**, 1212
29. Yong-Kee Jeong, Woong-Suk Yang, Jeong-Ok Kang, In-Soo Kong, Jeong-Ok Kim. 1995. Fibrinolysis of fermented kimchi. *Korean. J. Life Science*, **5(4)**, 203-210
30. Yoo CK, Seo WS, Lee CS and Kang SM. 1998. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme extracted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from *chunggukgang*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 507-514.