

## *Bacillus subtilis* MG410에 의한 Fibrin 분해효소 생산배지의 최적화

이주연 · 백남수\* · †김영만

한경대학교 식품생물공학과 및 식품생물 산업연구소, \*(주) 메디오젠

### Medium Optimization for Fibrinolytic Enzyme Production by *Bacillus subtilis* MG410 Isolated

Ju-Youn Lee, Nam-Soo Paek\* and †Young-Man Kim

Dept. of Food Science & Biotechnology, Food Science & Biotechnology Research Center, Hankyong National University

\*Mediogen, Co. Ltd, Seoul 133-111, Korea

#### Abstract

Using the bacteria isolated from Chungkookjang, *Bacillus subtilis* MG410 which is excellent in fibrinolytic enzyme activity was isolated. In increase the high production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* MG410, the effect of various carbon sources, nitrogen sources, inorganic sources, the initial pH of medium were investigated.

The most effective carbon and nitrogen sources were founded cellobiose 0.5%(w/v) and soybean meal 2%(w/v) respectively. None of inorganic sources examined had any detectable stimulating effect on fibrinolytic enzyme production except  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . The initial optimum pH for fibrinolytic enzyme production ranged from 5~6 and agitation speed was effect at 150rpm.

In jar fermentor experiments under optimal culture conditions, the activity of fibrinolytic enzyme reached about 5.050 unit after 48hours.

Key words : Chungkookjang, *Bacillus subtilis*, fibrinolytic enzyme

#### 서 론

혈액의 응고는 혈액의 상태를 액상에서 gel 상으로 전환하는 현상으로 지혈작용의 일부이다. 생체 내에서 지혈현상은 반드시 혈관 주변에서만 일어나게 되며, 여러 응고인자들의 선택적인 결합과 혈장 내에 존재하는 여러 가지 단백질 가수분해 억제 인자들과 결

합적인 작용을 하는 일련의 효소반응에 의하여 정교하게 조절되고 있다<sup>2,5)</sup>. 이처럼 정교한 조절에도 불구하고 다양한 병적 또는 외부적 원인에 의하여 생체 내 혈액 응고와 용해의 균형이 깨지게 되면 과도한 혈전이 형성되어 뇌 혈전증이나, 심장마비를 유발하게 된다<sup>7)</sup>. 따라서 혈전의 형성을 방지하고 혈전을 용해하는 치료제를 개발하기 위한 연구가 범세계적으로 활발히

† Corresponding author : Young-Man Kim, Department of Food Science & Biotechnology and Food Science & Biotechnology Research Center, Hankyong National University, 67 Seokjeong-dong, Ansong, Kyonggi-do 456-746, Korea.

Tel : +82-31-670-5150, Fax : +82-31-677-0990, E-mail : kimagj@hanmail.net

진행되고 있으며, 그의 일환으로 혈전의 생성을 억제하는 항 혈전제의 개발과 생성된 혈전을 용해시키는 혈전 용해제의 개발에 초점을 두고 있다. 항 혈전제로서는 유기 합성제제인 Coumarin과 Warfarin 제제가 있고, 거머리에서 생성되는 hirudin제제가 있다.<sup>4,14,18,21,27)</sup>

혈전 용해제로는 urokinase, streptokinase가 가장 많이 사용되고 있으며 TPA(tissue type plasminogen activator)등도 개발되고 있다. 그러나 이와 같은 제품은 반감기가 짧고, 가격이 매우 높은 단점을 지니고 있다. 현재 투여용 혈전 용해제로서는 6가지의 혈전 용해 효소를 함유하고 있는 것으로 알려진 지렁이 (*Lumbricus lubellus*)의 건조 분말을 캡슐화해서 한국과 일본에서 시판되고 있다.<sup>22,23)</sup> 최근에 일본의 전통발효 식품인 natto를 섭취할 때 생체내의 혈전 용해능이 증가됨을 발견하고, 이 natto로부터 혈전 용해효소를 분리하여 8일째 장내 투여한 결과 혈전 용해 등이 점차 증가하여 4일째 가장 높은 수치를 나타내었으며, 혈중 fibrin 분해산물 항원량은 2일째 가장 높은 수치를 나타내다가 점차 감소하였고, TPA의 항원량은 4일째까지 점차 증가하다가 8일째는 다소 감소된다고 보고하여<sup>28,29)</sup>식품을 섭취함으로써 여러 혈관질환을 치료 및 예방할 수 있다는 점에서 관심을 끌고 있다. 또한 natto를 지속적으로 섭취하면 혈관에 누적된 혈전을 점차 감소시키는 것으로 나타나 고역가의 natto를 함유하는 건강식품의 개발은 혈전을 용해시키는 효과가 탁월한 식품으로 인정되어 일본에서는 연간 120~130억엔의 시장규모를 가지고 있으며, 우리나라에서도 순환기계 환자 급증에 따른 수요확대는 물론 고령화 시대의 장수를 위한 필수 기능성 건강식품 소재로 평가될 것이라고 예상하고 있다.

우리나라도 일본의 natto와 마찬가지로 옛부터 된장, 고추장, 간장, 청국장 등의 장류를 제조하였고, 장류의 고유한 맛은 콩 단백질의 가수분해물인 아미노산에서 기인하는 구수한 맛들의 조화에서 이루어졌다. 청국장은 삶은 콩에 벗집을 이용하여 재래식으로 발효시키거나<sup>11)</sup> *Bacillus subtilis*를 이용하여 단시간 발효 숙성시켜 제조되며<sup>17)</sup> 실모양의 끈끈한 점질물이 생성되고 특유한 향기와 맛을 내게 된다. 또한 청국장, 된장, 간장 같은 대두발효식품에서 항산화효과, 혈전 용해 효과, 혈압 강화 효과 등 각종 유익한 생리활성물질들이 밝혀지고 있으며<sup>20,32)</sup>특히 청국장을 섭취할 때 생체내의 혈전 용해능이 증가됨이 밝혀져, 이러한 식품을 섭취함으로써 여러 혈관질환을 치료 및 예방할 수 있다는 점에서 관심이 고조되고 있다.

예전부터 우리나라의 전통식품인 청국장 및 된장에

서도 높은 단백질 분해 효소를 분리하는 균이 존재하는 것으로 보고되고 있어<sup>13,15)</sup>혈전 용해능이 있는 효소를 분비하는 균의 존재 가능성이 높아 분리, 동정하였으며<sup>19)</sup>본 연구에서는 청국장으로부터 분리된 혈전 용해능이 우수한 *Bacillus subtilis* MG410 균주를 이용, 배지 조건을 달리하여 혈전 용해 효소생산을 위한 최적의 조건을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주의 분리 및 배지

혈전 용해효소를 분비하는 균주는 (주)메디오젠에서 청국장으로부터 분리한 *Bacillus subtilis* MG410을 제공 받아 nutrient agar(Difco, USA) 사면배지에 4주마다 계대 배양하여 4°C에서 냉장 보관하며 사용하였다. 기본배지로 사용된 nutrient broth는 DIFCO사 제품을 사용하였으며, 그 외 배지제조에 사용된 재료는 식품 첨가물용 재료를 사용하였다.

### 2. 혈전용해 효소활성 측정

#### 1) 시료의 전처리

시료는 24시간과 48시간 배양된 균주를 각각 1 mL 씩 취해서 endpendrop tube에 넣고 원심분리(12,000 rpm × 5분, 4°C)하여 상등액을 취해 사용하였다.

#### 2) 효소 활성 측정

효소의 활성 측정은 fibrin에 혈장 분해효소가 작용할 때 펩타이드 결합의 분해로 증가하는 가용성 저분자 분해산물량을 275 nm의 영역에서 흡수되는 흡광도를 구하는 방법을 활용하여 Fig. 1과 Fig. 2와 같이 측정하였다. 즉, 시험관에 0.05M 붕산(Borax) 완충액(pH 8.5) 1.4 mL 및 0.72% Fibrinogen 용액 0.4 mL를 취하고, 37±0.3°C의 항온수조에서 5분간 가온한 후 20U/mL thrombin 용액 0.1 mL를 가하고 교반하였다. 이 용액을 37°C에서 정확히 10분간 방치한 후 시료용액 0.1 mL를 가하고 5초간 교반한 다음 37°C에 방치하였다. 시료용액을 첨가한 때부터 20분, 40분, 60분에 각 5초간 교반한 다음 정확히 60분 후에 2 mL의 0.2 M TCA 용액을 가한 후 5초간 교반한 다음 37°C에서 20분간 방치하였다. 이 용액을 Ependorf tube에 넣고 15,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 상등액을 취하여 275 nm에서 흡광도(A<sub>r</sub>)를 측정하였다. Blank는 0.2 M TCA 용액을 2 mL 가한 후, 시료용액 0.1 mL를 가하여 반응을 fibrinogen과 thrombin이 시료에 반응이 일어나지 않

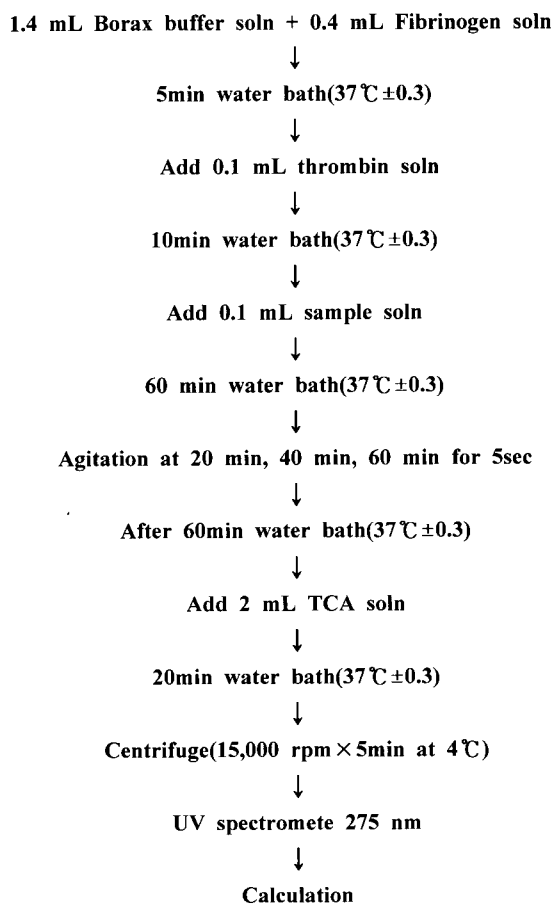


Fig. 1. Procedeuce fibrinolytic enzyme activity.

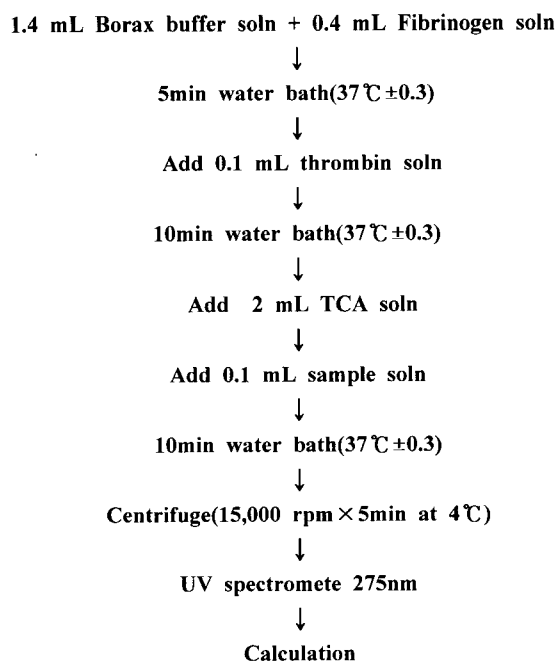


Fig. 2. Preparation of blank.

도록 조절한 다음 이전의 방법을 사용하여 측정(A<sub>B</sub>)하였다. 이와 같은 방법으로 나타난 흡광도 값으로부터 혈전분해 효소활성도(FU/mL)는 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{혈전분해 효소활성도(FU/mL)} = \frac{(AR \times AB)}{0.01} \times \frac{1}{60} \times \frac{1}{0.1}$$

### 3. 배양 조건의 시험

#### 1) 탄소원의 영향

*Bacillus subtilis* MG410의 혈전 분해효소의 생산을 위한 최적 탄소원과 그 농도를 조사하기 위해 nutrient broth를 기본배지로 하고 탄소원 8종 중 단당류와 이당류는 0.5%의 농도로 첨가하고, dextrin 및 soluble starch는 각각 5%의 농도로 첨가하여 효소활성과 균체의 성장을 측정하였다. 이때 균체의 성장률은 660 nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었다. 시험결과 우수한 탄소원으로 선정된 한 종의 탄수화물을 택하여 그 농도를 0.3%, 0.5%, 0.7%, 1%, 3%, 5% 그리고 7%로 각각 달리하여 배양한 후 효소 활성과 균체 성장을 측정하였다.

#### 2) 질소원의 영향

질소원의 최적 조건을 확립하기 위해 nutrient broth를 기본배지로 하여 가장 우수하게 나타난 탄소원을 최적농도로 첨가하고 서로 다른 질소원 8종을 0.5%의 농도로 첨가하여 효소활성과 균체의 성장을 측정하였다. Soybean meal은 그 종류를 달리하여 생대두분, 탈지대두분을 사용하였다. 시험결과 우수한 질소원으로 선정된 질소원을 대상으로 그 농도가 0.5%, 1%, 2% 그리고 3%가 되도록 첨가하여 배양 후 효소 활성과 균체 성장을 측정하였다.

#### 3) 무기질원의 영향

무기질의 최적 조건을 확립하기 위해 nutrient broth를 기본배지로 하여 가장 우수하게 나타난 탄소원과 질소원을 최적농도로 첨가하고 무기질원 8종을 0.02%의 농도로 첨가하여 효소활성과 균체 성장을 측정하였다. 실험결과 가장 우수한 무기질원으로 선정된 무기질원을 0.005%, 0.01%, 0.015%, 0.02%, 0.025%, 0.03% 그리고 0.035%가 되도록 첨가하여 배양 후 효소활성과 균체 성장을 측정하였다.

#### 4) 초기 pH에 따른 영향

효소활성과 균체의 성장에 따른 pH의 영향을 조사

하기 위하여 nutrient broth 기본배지에 최적 조건의 탄소원, 질소원, 무기질원  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 를 각각 0.02%가 되도록 첨가한 다음 초기 pH는 5~8로 하여 48시간 배양 후 효소활성과 균체 성장을 측정하였다.

### 5) 배양시간의 영향

배양 시간에 따른 효소활성과 균의 생육 정도를 조사하기 위하여 최적조건하에서 jar fermentor(MK250 KF-7L, Korea)을 이용하여 효소활성은 4시간 간격으로 측정하였으며 균의 생육정도와 pH는 2시간 간격으로 60시간동안 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 탄소원의 영향

청국장으로부터 분리된 *Bacillus subtilis* MG410 균주의 fibrinolytic enzyme의 생산을 위한 탄소원의 효과를 조사하기 위하여 nutrient broth를 기본배지로 하여 glucose, fructose 등의 단당류와 cellobiose, lactose, mannitol, maltose 등의 이당류를 각각 0.5%씩 첨가하였고, dextrin, soluble starch는 각각 5%가 되도록 첨가한 후 효소활성 및 균체 성장을 측정하여 Table 1과 같은 결과를 얻었다.

Dextrin첨가는 균의 성장과 효소활성이 대조구에 비해 낮게 나타났으며, soluble starch를 첨가했을 때 균의 성장과 효소활성은 대조구에 비해 높게 나타났다. 이 등<sup>31)</sup>은 dextrin과 soluble starch를 각각 5%씩 첨가 시에 균의 성장과 효소활성이 대조구에 비해 월등히 높았

다고 하였는데 본 실험 결과와는 상이하게 나타났다.

Mannitol의 첨가는 균의 성장에는 영향을 주지 않았지만 효소활성을 증가시켰고, lactose의 경우 균의 성장은 높았지만 효소활성이 낮게 나타났으며, maltose는 균의 성장은 대조구와 비슷했지만, 효소활성은 심하게 억제하였다. 또한 cellobiose를 첨가한 경우 균의 성장과 효소 활성이 가장 높은 것으로 나타났다.

균의 성장과 효소활성에 대한 cellobiose의 영향을 측정한 결과 1%를 제외하고는 균의 성장은 높게 나타났으며, 0.3%, 0.5%, 0.7%는 효소활성이 높게 나타났다(Table 2). 반면 1%, 3%, 5%의 농도에서는 효소활성이 낮게 나타났다. 그 중에서 0.5%가 가장 높은 효소활성을 보여 주었고, 균의 성장도 높았다.

Glucose를 첨가 시에는 균의 성장은 다소 높았으나 효소활성은 높지 않은 수치를 나타냈다. Fructose는 균의 성장은 다소 높았으나 효소활성은 낮게 나타났다. 하지만 대량생산을 위해 Glucose를 각각 농도별로 균의 성장과 효소활성을 측정한 결과는 Table 3과 같았다.

이상의 결과는 *B. licheniformis*를 이용한 protease 생성에 관한 실험에서 탄소원으로 lactose가 우수하였고 보고한 구 등<sup>13)</sup>의 결과와는 상이하였다. 김<sup>12)</sup>이 혈전 용해효소 생산 균주로 분리한 *Bacillus* sp.는 탄소원으로 dextrin과 soluble starch를 각각 2% 첨가시에 효소활성이 증가되었으나 soluble starch보다는 dextrin이 효소 생성에 효과적이었다고 보고하여 상이한 결과를 보였다. 한편 glucose, fructose, lactose등을 첨가하였을 때 효소활성이 억제되었다는 결과는 본 실험에서 분리한 균주와 유사한 것으로 보였다.

**Table 1. Effect of carbon sources on the growth and fibrinolytic enzyme production of *Bacillus subtilis* MG410**

Component	24hr		48hr	
	Cell growth ( $A_{660}$ )	Activity (unit/mL)	Cell growth ( $A_{660}$ )	Activity (unit/mL)
Control	0.195	0.510	0.250	2.51
Glucose	0.027	1.001	0.290	2.051
Fructose	0.058	0.970	0.201	2.280
Cellobiose	0.135	1.930	0.400	6.301
Lactose	0.209	0.580	0.320	1.970
Mannitol	0.095	1.920	0.145	2.870
Maltose	0.053	1.630	0.232	0.631
Dextrin	0.107	0.15	0.252	1.370
Soluble starch	0.327	2.001	0.440	2.780

**Table 2. Cellobiose effects of various concentration on fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* MG410**

Component	24hr		48hr	
	Cell growth ( $A_{660}$ )	Activity (unit/mL)	Cell growth ( $A_{660}$ )	Activity (unit/mL)
Control	0.175	1.501	0.180	2.617
0.3%	0.203	2.201	0.231	7.101
0.5%	0.232	2.258	0.266	18.050
0.7%	0.265	0.283	0.280	8.283
1%	0.123	2.350	0.127	0.733
3%	0.273	1.850	0.287	6.850
5%	0.226	3.501	0.252	7.717
7%	0.181	1.883	0.172	7.950

## 2. 질소원에 따른 영향

효소생산을 위한 다양한 질소원에 대한 영향을 조사하기 위하여 NB 기본배지에 탄소원으로써 cellobiose를 0.5% 첨가하고 각각 다른 질소원을 0.5%씩 첨가하여 효소활성 및 균체 성장을 측정하여 Table 4와 같이 나타냈다.

질소원으로 soybean meal, bacto peptone을 각각 첨가하였을 때 기본배지에서 보다 균의 성장과 효소활성이 높게 나타났으며, bacto peptone의 경우 균의 성장은 낮았지만 효소활성은 높게 나타났다. 그 중 soybean meal을 첨가했을 때 균의 성장과 효소활성이 가장 높게 나타났다. 이는 본 실험에 사용한 균주가 콩을 주원료로한 청국장에서 분리한 균주임을 고려할 때 대두 성분이 본 효소를 생성하는데 적합한 것으로 사료

**Table 3. Glucose effects of various concentration on fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* MG410**

Component	24hr		48hr	
	Cell growth (A <sub>660</sub> )	Activity (unit/mL)	Cell growth (A <sub>660</sub> )	Activity (unit/mL)
Control	0.164	0.550	0.264	2.680
0.5%	0.215	1.320	0.245	2.731
1%	0.212	2.980	0.265	4.821
1.5%	0.241	3.980	0.286	6.201
2%	0.156	2.180	0.234	4.430

**Table 4. Effect of nitrogen sources on the growth and fibrinolytic enzyme production of *Bacillus subtilis* MG410**

Component	24hr		48hr	
	Cell growth (A <sub>660</sub> )	Activity (unit/mL)	Cell growth (A <sub>660</sub> )	Activity (unit/mL)
Control	0.215	9.650	0.368	14.211
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.377	9.580	0.316	19.830
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.360	8.670	0.370	13.681
Soytone peptone	0.387	11.370	0.410	23.371
Yeast extract	0.430	10.180	0.360	16.130
Casein milk	0.360	7.971	0.267	18.070
Bacto peptone	0.375	6.851	0.272	22.681
Beef extract	0.428	8.420	0.338	20.980
Soybean meal	0.798	17.801	0.974	48.221

된다.

탈지 대두분의 첨가효과를 알아보기 위하여 soybean meal의 종류와 농도를 0.5%, 1%, 2% 그리고 3%로 각각 달리하여 효소 활성과 균체 성장을 측정하여 Table 5와 같았다. 생대두분 2% 첨가하였을 때 효소생성과 균체 성장이 가장 높게 나타났으며, Kalebina 등<sup>8)</sup>은 *Bacillus brevis*을 이용시 질소원으로 yeast extract가 우수하였다고 하였으며, 이 등<sup>16)</sup>은 beef extract, casein을 이용시 가장 높은 생성 효과가 있었다고 보고하였으나 본 연구에서는 beef extract를 첨가시 효소 생성력의 차이는 나타나지 않았다.

김 등<sup>10)</sup>은 *B. amyloliquefaciens* NB 15-4를 이용하여 protease를 생산시 soybean meal이 효소생성에 우수한 효과를 보였다는 보고와 Takami 등<sup>30)</sup>이 *Bacillus* sp.를 이용한 alkaline protease 생산에서 soybean meal이 높은 효과를 보였다는 보고와는 본 실험의 결과와 일치하였다.

## 3. 무기질원에 따른 영향

효소 생산과 균체 증식에 있어서 미량원소로서 무기

**Table 5. Effects of various soybean meals on fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* MG410**

Component	24hr		48hr	
	Cell growth (A <sub>660</sub> )	Activity (unit/mL)	Cell growth (A <sub>660</sub> )	Activity (unit/mL)
Control	0.231	3.280	0.397	16.512
Raw soybean meal(0.5%)	0.630	18.001	0.699	18.130
Raw soybean meal(1%)	0.904	18.301	0.997	18.371
Raw soybean meal(2%)	1.513	20.031	1.842	23.181
Raw soybean meal(3%)	1.163	18.610	1.512	19.931
Defatted soybean meal (0.5%)	0.621	11.080	0.734	12.230
Defatted soybean meal(1%)	0.604	13.111	0.684	15.001
Defatted soybean meal(2%)	1.076	13.660	1.218	16.470
Defatted soybean meal(3%)	1.002	13.530	1.129	14.801

질의 영향을 조사하기 위하여 nutrient broth 기본배지에 탄소원 cellobiose 0.5%, 질소원 soybean meal 2%와 각각의 무기질원을 0.02%씩 첨가한 결과는 Table 6과 같이 나타났다.

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O를 첨가시 효소생산이 가장 높게 나타났고, CaCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 첨가시에는 효소생산에 높은 효과를 보였으나 CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 첨가 시에는 효소 생산 및 균체 생육이 강력히 억제되었다.

이러한 결과는 대부분의 *Bacillus* spp.에서는 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O가 효소생산과 균체 생육에 영향을 준다는 Horikoshi 등<sup>6)</sup>의 보고와 Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>에 의해서 효소생산이 저해된다는 보고와도 일치하였으나, Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>를 첨가시 효소생산이 증가한다는 Zlotnik 등<sup>32)</sup>의 보고와는 상이하였다.

그 중 균체 성장과 효소 생산이 가장 높게 나타난 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O를 0.005%, 0.01%, 0.015%, 0.02%, 0.025%, 0.03%, 0.035% 로 농도를 달리하여 나온 결과는 Table 7과 같이 나타났다. 즉, 0.02%에서 효소생산과 균체 성장이 가장 우수하였고, 이는 Santos 등<sup>25)</sup> 및 Horikoshi<sup>6)</sup>의 0.02%와 일치하지만, Raman 등<sup>24)</sup>의 0.05% 보다는 월등히 낮았다.

#### 4. 최적 조건에서의 초기 pH에 따른 변화

균체 성장과 효소 생산이 가장 높게 나타난 최적 조건 NB 배지를 기본 배지로하여 cellobiose 0.5%, soybean meal 2%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 0.02%, 소포제 0.2%로 초기 pH를 pH 5~8로 48시간 배양하여 균체 성

**Table 6. Effect of mineral sources on the growth and fibrinolytic enzyme production of *Bacillus subtilis* MG410**

Component	24hr		48hr	
	Cell growth (A <sub>660</sub> )	Activity (unit/mL)	Cell growth (A <sub>660</sub> )	Activity (unit/mL)
Control	1.464	20.010	1.743	21.280
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.930	4.301	0.935	5.280
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.421	26.780	1.534	30.031
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	1.829	27.681	1.834	32.680
CaCl <sub>2</sub>	1.698	26.850	1.860	31.451
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.981	7.720	0.979	11.101
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1.400	16.830	1.395	18.221
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.776	26.881	1.829	30.070
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.800	26.971	1.780	31.601

**Table 7. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O effects of various concentration on fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* MG410**

Component	24hr		48hr	
	Cell growth (A <sub>660</sub> )	Activity (unit/mL)	Cell growth (A <sub>660</sub> )	Activity (unit/mL)
Control	1.524	19.701	1.824	23.381
0.005%	1.685	18.370	1.940	18.780
0.01%	1.689	19.301	1.934	22.431
0.015%	1.799	19.550	1.930	20.280
0.02%	1.829	28.150	2.004	32.171
0.025%	1.826	28.051	1.916	30.421
0.03%	1.805	28.481	1.909	29.701
0.035%	1.800	25.471	1.981	29.781

**Table 8. Effect of pH on the growth and fibrinolytic enzyme production of *Bacillus subtilis* MG410**

Initial	48hr	48hr
	Cell growth (A <sub>660</sub> )	Activity (unit/mL)
Control	0.264	2.680
pH 5	1.353	27.001
pH 6	1.203	23.101
pH 7	1.181	16.580
pH 8	1.380	16.950

장과 효소 생산을 알아본 결과 Table 8과 같이 나타났다. pH 5에서 효소생산이 가장 높았으며, 균의 성장도 높게 나왔다.

#### 5. 배양시간에 따른 균체 성장과 효소의 생산

이상의 실험에서 NB(nutrient broth)배지를 기본배지로 cellobiose 0.5%, soybean meal 2%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 0.02%, 소포제 0.2%, pH 5가 최적배지 조건으로 나타났다. 그러나 대량생산시 cellobiose가 매우 고가인 점을 감안하여 cellobiose 대신 glucose 1.5%를 첨가 하여 *Bacillus subtilis* MG410 균주를 배양시 배양시간에 따른 균에 성장과 혈전 용해, 효소의 생성 및 pH 등의 변화를 Fig. 3에 나타내었다.

균의 성장과 함께 혈전용해 효소의 생성이 증가하였으며, 배양 48시간에 최대 활성을 보인 후 그 후부터 감소하는 경향을 보였다.

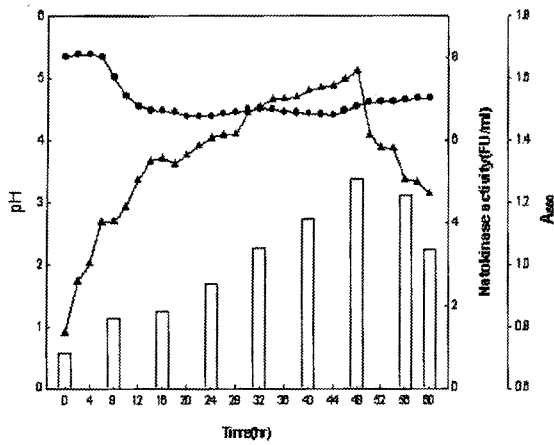


Fig. 3. Time course of pH and cell growth and fibrinolytic enzyme production of *Bacillus subtilis* MG410.

—●— : pH, —▲— : A<sub>660</sub>

본 균주를 이용하여 최적화된 배지를 사용하였을 때 Horikoshi의 변형배지를 사용시<sup>19)</sup>보다 효소활성이 2배 이상의 증가 효과가 있었다. 이상의 결과는 alkaline protease 생산을 위해 Schinner 등<sup>26)</sup>이 *Pseudomonas* sp.을 이용시 배양 96시간에 최대 효소활성을 보였다는 보고나 장<sup>1)</sup>이 *Xanthomonas* sp.를 이용하였을 때 배양 84시간에 alkaline protease의 최대 활성을 보였다는 보고와 많은 차이가 있었으나, 이는 이들이 사용한 균주가 저온성 세균에 기인하는 것으로 생각된다. 한편 김<sup>12)</sup>이 청국장에서 혈전 용해 효소 생성균으로 분리한 *Bacillus* sp. 의 경우 배양시간이 증가함에 따라 효소활성이 증가하여 배양 8시간에 최대 효소활성을 나타내었다고하여 배양시간에 따른 본 균의 효소 생성 패턴과 많은 차이를 나타냈다. 그러나 Kembhavi 등<sup>9)</sup>이 분리한 *Bacillus* NCM No.64 균주가 배양 38시간에 protease 최대 활성이 있었다는 보고와는 유사한 결과가 나타났다.

## 요 약

청국장으로부터 분리한 균을 이용하여 fibrin을 분해 효소활성이 우수한 균주 *Bacillus subtilis* MG410을 분리한 균주를 이용하여 fibrinolytic enzyme의 생성을 위한 최적 배지 조건을 확립하고자 하였다.

최적 배지 조성은 탄소원 cellobiose 0.5% 첨가시 control보다 균의 성장은 0.5배, 효소 활성은 9배 정도 높은 효과를 보였고, 당당류인 glucose를 첨가시에는 균의 성장은 다소 높았으나 효소활성은 높지 않은 수치를 나타냈다.

질소원으로 soybean meal, soybean peptone을 각각 첨가시 기본배지에서 보다 균의 성장과 효소활성이 높게 나타났고, bacto peptone은 균의 성장은 낮았지만 효소 활성은 높게 나타났다. 그 중 soybean meal을 첨가시에 가장 높은 균의 성장과 효소활성이 나타났다. 질소원 soybean meal 2%를 첨가시 control보다 균의 성장은 6배, 효소 활성은 0.5배 높은 효과를 보였다.

무기질원으로는 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O를 첨가시 효소생산이 가장 높게 나타났으며, CaCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 첨가시에는 효소 생산에 높은 효과를 보였으나 CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 첨가시에는 효소생산 및 균체 생육이 강력히 억제되었다.

pH에서는 pH 5가 control보다는 균의 성장은 5배, 효소 활성은 10배 이상 높은 효과를 보였다.

따라서 최적 배지 조성은 탄소원 cellobiose 0.5%, 질소원 soybean meal 2%, 무기질원 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 0.02%, pH 5로 조성되었다.

이 조건하에서 배양 37℃, 48시간, 150 rpm에서 효소 생성이 가장 높은 것으로 나타났다.

## 참고문헌

1. Chang, HS. Study on the alkaline prease from *Xanthomonas* sp. YL-37. Kon-Kuk Univ. Doctoral Degree Thesis. 1997
2. Harlan, JM and Harker, LA. Haemostasis, thrombosis and thromboembolic disorder. *Med. Clin. North Am.* 65:855-857. 1981
3. Choi, KJ, Separation of *Bacillus* sp. and changes of NH<sub>2</sub>-N, and protease activity in *Chonggukchang* mejiu adding with mufwort (*Artemisia asiatica* N.) extract. Kon-Kuk Univ. Master's Degree Thesis. 1995
4. Electricwala, AR, Sawyer, T, Powell, JC and Atkinson, T. Isolation of thrombin inhibitor from the jeech *Hirudinaria manillensis*. *Blood Coagul. Fibrin.* 2:83-85. 1991
5. Lapentina, EG, Geep, B, Read, NG and Moncada, S. Adhesion of human platelet to collagen in the preance of prmstacyclin, inometacin and compoi-hund BW775C. *Thromb. Res.* 37:325-330. 1986
6. Horikishi, K. Produccion of alkaline enxyme by aikalophilic micriirganism. *Agric. Biol. Chem.* 35: 1783-1791. 1971
7. Gomex, CC, Simoncarballo, R, Coma, AC, Sanchez de Leon, T, Montero, DE and Rodriguez, PR. The

- relationship between lipid peroxidation and platelets aggregation in atherosclerotic patients. *Angiologia* 43:241-246. 1991
8. Kalebina, TS, Galina, NR, Selyakh, LO, Khodova, OM and Kulaev, IS. Serine proteinase from *Bacillus brevis*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 28:531-533. 1988
  9. Kembhavi, AA, Kulkarni, A and Pant, A. Salt tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. NCIM No. 64. *Appl. Biochem. Biotech.* 38:83-89. 1993
  10. Kim, HK, Kim, KH, Lee, JK, Kim, YO, Nam HS and Oh, TK. Characterization of a thermostable protease from thermophilic *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23:322-328. 1995
  11. Kim, KJ, Ryu MK and Kim, SS. *Chungkookjang* koji fermentation with rice straw. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 14:301-308. 1982
  12. Kim, YT. Characteristics of fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus* sp. isolated from *Chungkookjang*, Sejong Univ, Doctoral Degree Thesis. 1995
  13. Koo, JH, Choi, IJ, Nam, HS, Lee, HJ, Shin, ZI and Oh, TK. Medium optimization for production of thermostable alkaline proteases from *Bacillus licheniformis* NS70. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25:207-221. 1997
  14. Krstenansky, JL, Owen, TJ, Yates, MT and Man, SJT. The C-terminal binding domain of hirullin P18 antithrombin activity and comparison to hirudin peptides. *FEBS Letters* 269:425-4310. 1990
  15. Kwon, OJ, Kim, JK and Chung, YG. The characteristics of bacteria isolated from ordinary Korean soy sauce soybean paste. *Kor. Agr. Chem. Soc.* 29:422-428. 1986
  16. Lee, EG, Park, EH, Lee HH and Hyun, HH. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. producing alkaline protease. *Kor. J. Microbiol.* 22: 289-297. 1990
  17. Lee, KH, Lee, HJ and Chung, MK. Studies on *Chungkookjang*(Part 1) on the changes of soybean protein in manufacturing *Chungkookjang*. *Kor. Agr. Chem. Soc.* 14:191-196. 1971
  18. Lee, SK, Sohn, JH, Choi, ES and Rhee, SK. Screening and purification of anticoagulant protein from Korean leeches. *Kor. J. Biochem.* 26:228-234. 1993
  19. Lee, SK, Heo, S and Joo, HK. Isolation and identification of fibrinolytic bacteric from Korean traditional *Chungkookjang*. *Kor. Agr. Chem. Soc.* 41(inpress). 1998
  20. Kol, JO, Kim, HK and Park, I. Production and characterization of fibrinolytic enzyme: Optimal condition for production of the enzyme from *Bacillus* sp. KP-6408 isolated from *Chungkookjang*. *L. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27:51-56. 1997
  21. Markwardt, F. The isolation and chemical characterization of hirudin. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 308:147-152. 1957
  22. Mihars, H, Sumi, H, Yoneta, T, Mizumoto, H, Ikeda, R, Seiki, M and Maruyama, M. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus fubellus*. *Jap. J. Physiol.* 41:461-468. 1991
  23. Nakajima, N, Mihara, H and Sumi. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm. *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57:1730:1737. 1993
  24. Rahnman, RN, ZA, Kamaruzaman, CNR, Yunus, WM, MB, ZW and Salleh, AB. Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:822- 827. 1994
  25. Santos, JA, LJ, Cabral, MS and Cooney, CL. Recovery of alkaline protease by membrane filtration. *Bioprocess Eng.* 7:205-211. 1992
  26. Schinner, F and Maregensin, R. Production and properties of an extracellular metalloprotease from a psychophilic *Pseudomonas fluorescens* J. *Biotech.* 24:207-210. 1994
  27. Teiner, SD, Knecht, VR and Gruetter, M. Isolation and purification of novel hirudins from the leech *Hirudinaria manillensis* by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography* 530:273-279. 1990
  28. Sumi, H. Nattokinase and health-development' of natto. *Bioindustry* 7:725-730. 1990
  29. Sumi, H, Hamada, H, Tsushima, H, Mihara, H and Muraki, H. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Nattor; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experimentia*



- 43:1110-1111. 1987
30. Takami, H, Akjba, T and Horikoshi, K. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. *Appl. Microbiol. Biotech.* 30:120-124. 1989
31. Lee, SK, Heo, S, Bae, DH and Choi, KH. Medium Optimization for Fibrinolytic Enzyme Production by *Bacillus subtilis* KCK-7 Isolated from Korean Traditional Chungkookjang. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol* 26:226-232. 1998
32. Kim, WK, Kim, CY, Park, H, Choi, J, Lee, Y, Kwon, HI and Lee, S. Purification and characterizztion of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from *Chungkook-Jang*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2482-2488. 1996
- 
- (2004년 12월 31일 접수; 2005년 2월 3일 채택)