

## 전통 청국장의 발효 기간 동안 변화하는 수용성 단백질 개요

아이린산토스<sup>1,†</sup> · 손일영<sup>1,†</sup> · 최현수<sup>1</sup> · 박선민<sup>1</sup> · 유성희<sup>1</sup> · 권대영<sup>2</sup> · 박천석<sup>3</sup> · 김정환<sup>4</sup> · 김정상<sup>1</sup> · 임진규<sup>1,\*</sup>  
<sup>1</sup>경북대학교 동물공학과, <sup>2</sup>한국식품연구원, <sup>3</sup>경희대학교 식품생명공학과, <sup>4</sup>경상대학교 식품공학과

### Changes of Protein Profiles in *Cheonggukjang* during the Fermentation Period

Ilyn Santos<sup>1,†</sup>, Il-Young Sohn<sup>1,†</sup>, Hyun-Soo Choi<sup>1</sup>, Sun-Min Park<sup>1</sup>, Sung-Hee Ryu<sup>1</sup>, Dae-Young Kwon<sup>2</sup>,  
 Cheonseok Park<sup>3</sup>, Jeong-Hwan Kim<sup>4</sup>, Jong-Sang Kim<sup>1</sup>, and Jinkyu Lim<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Life and Food Sciences, Kyungpook National University

<sup>2</sup>Korea Food Research Institute

<sup>3</sup>Department of Food Science and Biotechnology, and Institute of Life Science & Resources, KyungHee University

<sup>4</sup>Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University

**Abstract** The fermented soybean product, *cheonggukjang*, is favored by many people, partly due to its bio-functional ingredients. Since the fermentation process of *cheonggukjang* is mediated by enzymes, including proteases, produced by microbes, analysis of the proteome profile changes in *cheonggukjang* during fermentation would provide us with valuable information for fermentation optimization, as well as a better understanding of the formation mechanisms of the bio-functional substances. The soluble proteins from *cheonggukjang* were prepared by a phenol/chloroform extraction method, in order to remove interfering molecules for high resolution 2-D gel analysis. Proteomic analysis of the *cheonggukjang* at different fermentation periods suggested that most of the soluble soy proteins were degraded into smaller forms within 20 hr, and many microbial proteins, such as mucilage proteins, dominated the soluble protein fraction. The proteomic profile of *cheonggukjang* was very different from that of *natto*, in terms of the 2-D gel protein profile. Among the separated protein spots on the 2-D gels, 50 proteins from each gel were analyzed by MALDI-TOF MS and PMF for protein identification. Due to database limitations with regard to soy proteins and microbial proteins, identification of the changed proteins during fermentation was restricted to 9 proteins for *cheonggukjang* and 15 for *natto*. From *de novo* sequencing of the proteins by a tandem MS/MS, as well as by database searches using BLASTP, a limited number of proteins were identified with low reliability. However, the 2-D gel analysis of proteins, including protein preparation methods, remains a valuable tool to analyze complex mixtures of proteins entirely. Also, for intensive mass spectrometric analysis, it is also advisable to focus on a few of the interestingly changed proteins in *cheonggukjang*.

**Key words:** *Cheonggukjang*, proteomics, MALDI-TOF MS, *de novo* sequencing, soluble proteins

## 서 론

콩 발효 식품인 전통청국장은 *Bacillus*균류나 *Aspergillus*균류에 의해 생산되는 효소의 작용으로 대두 단백질이 분해되고 끈끈한 점질물이 생성되고 특유의 구수한 맛과 고유한 향을 내며 단백질과 지방의 함량이 높은 양질의 영양식 식품이다.

현재까지 보고된 전통 청국장 제조에 관한 과학적 연구 결과는 국산 황대두를 이용하여 protease의 역가 변화 및 유리 아미노산 생성을 측정함으로써 적정 발효 조건을 36시간에서 50시간

이내로 정한 연구로부터 시작하여(1), 청국장 발효에 의해 생성되는 펩타이드를 분석하여 콩 단백질변화에 대한 연구(2) 등이 보고 되어 있다. 그 후 오늘날에 이르기 까지 청국장에 대한 과학적 연구가 지속적으로 진행되고 있는데 연구의 내용은 크게 두 가지로 분류될 수 있다: i) 콩, 균주, 발효 조건, 냄새성분, 기호도 등을 고려한 청국장 제조에 관한 연구 및 ii) 청국장 발효 동안 생성되는 생리활성물질의 분리 및 동정이다. 생리활성물질 분리 및 동정에 관한 연구로는 혈전 용해능(3-5), 항산화능(6), 항고혈압 활성(7), 항미생물 활성(8), 플라보노이드 활성(9) 및 그 외에 가능한 활성들을 찾는 연구들이 진행되고 있다. 청국장 제조에 관해서는 재료로 사용되는 콩의 종류(10,11), 균주의 종류(12)에 따른 풍미, 색, 불쾌취(13), 점질물 생성(14,15) 등의 변화와 이를 고려한 발효조건을 확립하는 연구들이 주를 이루고 있다(16-20).

*Bacillus*균주를 접종하여 발효한 나토를 대상으로 한 연구에서 혈전의 주성분인 fibrin을 용해시키는 혈전용해효소 *natto* kinase (NK)가 임상적 효과를 나타냄이 보고되기도 하였다(21,22). 점질물로부터 여러 종류의 단백질을 분리하여 활성을 규명하는 연구가 보고되어 있다(23-25). 그러나 콩 단백질과 발효 균주들이 생

<sup>†</sup>두 사람이 본 연구에 기여한 바가 동일함(equal contribution to this work).

\*Corresponding author: Jinkyu Lim, Department of Life Science and Food Science, Kyungpook National University, 1370 Sankyuk-dong, Buk gu, Daegu 702-701, Korea  
 Tel: 82-53-950-5755  
 Fax: 82-53-950-6750  
 E-mail: jkylim@knu.ac.kr  
 Received February 10, 2007; accepted July 23, 2007

산하는 단백질 효소들 및 여러 기능성 단백질들 그리고 효소에 의해 분해되어 형성되는 peptide나 분해 단백질들에 대한 조직적 연구는 아직 미흡한 수준이다. 청국장에서 일어나는 단백질의 변화에 대한 연구는 단백질의 분해에서 생성되는 peptide의 연구(2), protease 역가의 변화와 유리 아미노산 생성(1) 등 극히 제한된 영역에서 이루어져 왔다.

질량분석기와 2-D gel 전기영동을 이용한 단백질체의 발전은 오늘날의 단백질 분석의 개념을 바꾸어 놓았다. 2-D gel 상에 분리된 단백질들을 개별적으로 잘라내고 trypsin과 같은 단백질 분해효소로 분해하여 얻은 peptide를 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight(MALDI-TOF) 질량분석기로 분석하여 정확한 질량을 측정하거나, 각 peptide들을 연속질량분석기로 분해하여 얻은 product ions의 질량 값 profile을 얻어서 이것들과 컴퓨터가 단백질 또는 유전자 database로부터 계산하여 얻은 이온값과 비교하여 각 단백질을 동정할 수 있기 때문에 빠른 시간 안에 다수의 단백질을 분석할 수 있다(26). 따라서 분석하고자 하는 단백질이 유래한 종의 유전자 서열 정보가 확보되어 있는 것이 단백질체 연구방법에 의한 단백질 분석에 있어 필수적이다.

청국장발효의 주를 이루는 *Bacillus*균 중에는 *Bacillus subtilis*균의 유전체 정보가 알려져 있으나(30) 콩(*Glycine max*)은 아직 유전체 정보가 미흡하여 질량분석에 의한 콩 단백질의 대단위 동정을 위해서는 한계가 있다. 그러나 2007년 현재 375,521개나 등록되어 있을 정도로 Expression Sequence Tag(EST) 서열은 많이 알려져 있기 때문에 이러한 정보와 Basic Local Alignment Search Tool-Protein(BLASTP) 검색 방법을 이용하여 콩 단백질을 동정하는 단백질체 연구가 보고되어 있다(28).

본 연구에서는 대부분의 청국장에 관한 연구가 *Bacillus* sp.를 콩에 접종하여 청국장을 만드는 통제된 조건인 반면 순창지역의 전통적 발효제조 방법에 의해 생산되는 청국장의 수용성 단백질의 변화를 2-D gel로 분리하여 단백질 발현의 profile변화를 분석하고 변화된 단백질을 proteomics 방법으로 동정함으로써 우리의 전통 식품인 청국장 발효의 최적화와 기능성 식품으로서 기능성 물질들이 형성되는 과정을 보다 과학적으로 설명하고 청국장 발효 시 생성되는 생리활성물질의 변화와 상관관계가 있는 단백질들을 선별하는 데 활용될 수 있는 정보를 얻고자 발효과정 중 변화하는 수용성 단백질들의 총체적 분석을 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 전통 청국장 제조와 시료 채취

청국장은 Ahn 등(17)의 방법에 따라 순창지역 전통 청국장 제조방법에 따라 제조하였다. 순창에서 생산된 한국산 백태를 20°C의 물에 18시간 담가두었다가 121°C에서 15분 간 멸균하고 42°C에서 43-45시간 동안 청국장 생산 발효실에서 발효 시키면서 자연 증균 접종이 되도록 하였다. 발효가 진행되는 동안 일정 시간 간격으로 6개의 발효 상자에서 각각 200 g 정도의 시료를 채취하여 섞은 다음 50 g의 시료를 따로 채취하여 수용성 단백질 추출을 진행하였다.

### 수용성 청국장 단백질 추출 및 이차원 전기영동을 위한 단백질 시료 준비

시료 50 g에 protease inhibitor(Roche, Indianapolis, IN, USA)가 들어 있는 0.1× phosphate buffered saline(PBS) 100 mL을 가하여 0°C에서 서서히 교반하며 수용성 단백질을 추출하였다. 부유물과 고형물을 10분 간 저속원심분리(500 g)로 제거하고 다시 30분 간

4°C에서 20,000 g로 고속원심분리 하여 고형물을 제거한 뒤  $\phi 0.22 \mu\text{m}$  여과막을 통과 시켰다. 단백질을 농축시키기 위해 동결 건조장치로 시료를 건조시키고 10 mL의 초순수 물에 녹여 단백질을 10배 농축하였다. 이차원 전기영동을 위해 시료에 들어 있는 염분 및 전기영동 저해물질을 제거하기 위해 Natarajan 등(29)의 방법을 변형하여 사용하였다. 단백질을 0.1 M Tris-HCl(pH 8.8)이 포화된 phenol로 추출하고 phenol 층을 5배 부피의 100% 메탄올에 들어있는 0.1 M ammonium acetate로 -20°C에서 밤새 침전시켰다. 침전물을 20,000 g로 원심분리 하여 모으고 100% 에탄올로 3회, 70% 에탄올로 1회 닦아 준 다음 동결건조기로 건조시켰다. 건조된 단백질 분말을 이차원 전기영동을 위한 rehydration buffer(8 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 50 mM dithiothreitol (DTT), 0.5%(v/v) ampholyte [pH 3-10])에 녹였다. 일차원 전기영동을 위해서 단백질 분말을 sodium dodecylsulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE)용 sample buffer(0.05 M Tris-HCl [pH 6.8], 10% glycerol, 0.2% 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue)에 녹이고 95°C에서 10분간 가열하였다.

### 일차원 및 이차원전기영동

Sample buffer에 녹인 단백질을 12% separating gel, 4% stacking gel로 이루어진 disc SDS-PAGE mini-gel(BioRad, Hercules, CA, USA)에 시료를 넣고 120V 조건으로 1시간 30분 정도 전기영동 하였다. 전기영동이 끝나면 gel에 분리된 단백질 bands를 coomassie brilliant blue(CBB)로 염색하고 UMAX Powerlook 1100 scanner(UMAX Technologies, Dallas, TX, USA)로 image를 얻었다. 이차원 전기영동은 rehydration buffer에 녹아 있는 시료 400 g이 120 L rehydration buffer에 녹아 있도록 하여 Immobilized pH gradient(IPG) strip(7 cm, pH 3-10, 또는 pH 4-7 nonlinear, BioRad)에 넣고 IEF-Cell(BioRad)에서 일차원 전기영동 isoelectric focusing(IEF)를 진행하였다. 수동적 또는 능동적으로 50 V에서 12 시간 동안 rehydration, 250 V에서 2시간, 500 V에서 1시간 ramping, 4000 V에서 6시간 focusing하였다. IEF 후에는 IPG strip을 equilibration buffer I(50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS, 2% w/v DTT와 소량의 bromophenol blue)에서 15분, 그리고 이어서 alkylation buffer 2(50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS, 2.5% w/v iodoacetamide, 소량의 bromophenol blue)에서 15분 반응 시켰다. IPG strip을 12% polyacrylamide gel(8×6 cm) 위에 놓고 0.5% agarose로 덮은 뒤 120 V, 15°C에서 bromophenol blue가 gel의 끝 부분에 도달 할 때까지 전기영동을 진행하였다. 전기영동 후에는 gel을 CBB로 염색하고 UMAX Powerlook 1100 scanner로 gel의 image를 얻고 gel image를 PDQUEST(BioRad) 이미지 분석 프로그램으로 보내서 gel 간의 단백질 변화를 비교하였다.

### 단백질의 trypsin 분해

단백질 spots 또는 bands를 scalpel로 잘라내어 1.5 mL Eppendorf tube로 옮기고, 200  $\mu\text{L}$  50% acetonitrile(ACN)/25 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0로 15분씩 2회 닦아 주었다. Gel 조각을 200  $\mu\text{L}$  100% ACN으로 닦고 Speed-Vacuum 건조기에서 건조시켰다. 건조된 gel 조각을 10  $\mu\text{L}$  25 mM ammonium bicarbonate에 0.1 mg trypsin(sequencing grade; Promega, Madison, WI, USA)이 든 용액으로 수화시키고 37°C에서 16 시간 이상 반응시켰다. 이렇게 해서 만들어진 peptide를 얻기 위해 50  $\mu\text{L}$  50% ACN/5% tri-fluoroacetic acid(TFA)로 2회 추출하였다. 얻어진 peptide용액을 SpeedVac 농축기로 건조하고 10  $\mu\text{L}$  0.1% TFA에 녹이고 이 용액

을 ZipTip C18(Millipore, Bedford, MA, USA) column에 10회 이상 오르내리게 하여 peptide가 흡착되게 하고 ZipTip을 10  $\mu$ L 0.1% formic acid로 3회 닦아준 다음 peptides를 5  $\mu$ L 75% ACN/0.1% formic acid로 용출시켰다.

**Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry(MS)와 Tandem MS/MS 분석**

MALDI-TOF MS와 MS/MS 분석을 위해 시료를 matrix 용액 (5 mg/mL Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid(CHCA)/50% ACN, 0.1% v/v TFA, 2% w/v ammonium citrate)에 1:1로 섞어 주고 MALDI용 시료 판에 시료 당 1  $\mu$ L씩 점적하고 말렸다. DE-STR MALDI-TOF(Applied Biosystem, Framingham, MA, USA)와 MALDI-TOF-TOF(Applied Biosystem)를 이용하여 MS 및 MS/MS data를 얻었다. MS survey scanning에서 MS/MS로 옮겨진 *m/z* 800-3000 영역의 peak를 argon 가스와 충돌시켜 collision-induced dissociation(CID) MS/MS data를 얻었다. Ms-Fit(<http://prospector.ucsf.edu/prospector/>) 및 MASCOT(<http://www.matrixscience.com>)을 이용하여 peptide mass fingerprinting(PMF)와 peptide sequence를 찾았다. 검색 변수로는 methionine의 산화, cysteine의 carbamidomethylation, 불완전한 trypsin 분해를 고려하여 SWISS-PROT와 NCBI protein databases를 검색하였다.

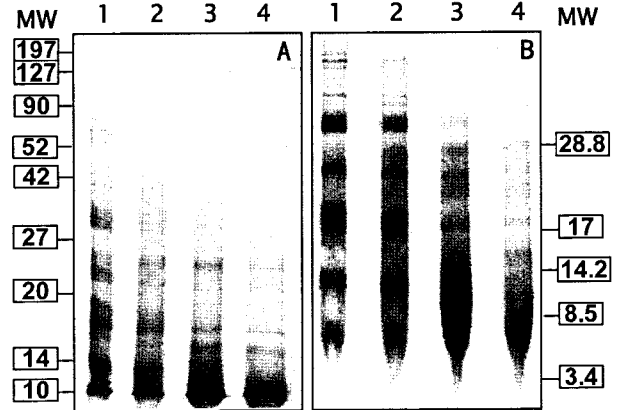
**결 과**

**청국장지의 수용성 단백질 추출**

순창 지역의 전통 청국장지의 발효기간 동안의 단백질 변화와 발효가 완료된 제품의 수용성 단백질을 분석하기 위해 각 단계에서 채취한 시료 50 g씩을 protease 저해제가 들어 있는 0.1x PBS 100 mL에 넣고 1시간 동안 얼음위에서 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질을 먼저 12%와 18% SDS-PAGE로 분석하여 단백질의 변화를 보았다. Fig. 1에서와 같이 발효시간 30시간이 경과하면 단백질 profile상으로는 큰 변화를 보이지 않는 것이 관찰되었고 발효가 완료된 청국장지에는 대부분의 수용성 단백질은 분자량 10 kDa이하의 작은 peptide로 분해되었으나 일부 단백질은 발효가 진행되어도 분해가 잘되지 않는 성질이 있음을 보였다.

**청국장 발효 시간 별 변화하는 단백질의 2-D gel profile 분석**

수용성으로 각 발효 시간대에 추출된 단백질은 PBS에 녹아 있으므로 IEF로 일차원 전기영동을 하기 위해서는 시료에 들어 있는 염분 및 방해성분을 제거해야만 한다. 이를 위하여 10% TCA를 처리하여 단백질을 침전시키고 침전된 단백질을 원심분리로 모아 100% 알코올로 3-4회 닦아 주었다. 염분이 제거된 시료일 지라도 여전히 일차원 전기영동을 저해하는 물질이 남아 있어 반복적인 전기영동 결과를 얻는데 어려움이 있었다. Fig. 2는 2-D gel 상에서 각 발효시간 별로 채취한 시료에서 추출한 단백질을 분리한 결과인데 발효 10시간과 발효 20시간에서의 분자량 10 kDa 이상의 단백질 분포를 비교할 때 상당한 차이를 보이고 있다. 그 후로 30시간과 43시간에서는 비슷한 분자량과 pI 부근에 단백질이 나타나는 것으로 미루어 발효가 진행됨에 따라 새로운 종류의 콩 단백질의 용출이 이루어지거나 발효 미생물이 만든 단백질들이므로 추정된다. 이 결과는 질량분석에 의한 단백질 확인 과정에서 *Bacillus*류 균이 만든 단백질이 나타나는 것으로 추측을 가능케 한다(Fig. 4). 더 세밀한 분석을 위해 pH 영역이



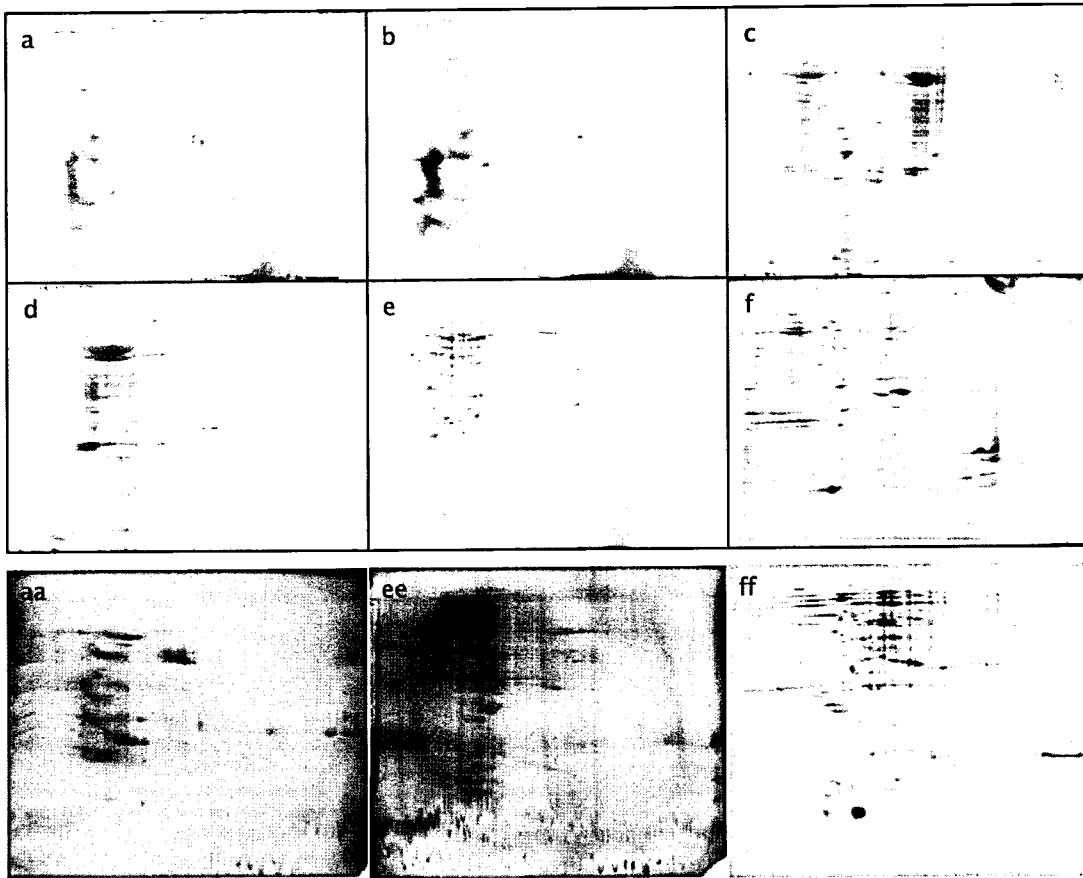
**Fig. 1. Time course changes of soluble cheonggukjang proteins on 1-D gel.** Soluble proteins of cheonggukjang from the fermentation period of 0 hr (lane 1), 10 hr (lane 2), 30 hr (lane 3) and 43 hr (lane 4) were separated on 12% (A) and 18% (B) SDS-polyacrylamide gel and proteins in the gels were visualized by CBB staining. Molecular weight of the standard proteins are designated in the boxes (MW, kDa).

3-10인 IEF gel과(Fig. 1) pH 영역이 4-7인 gel을 사용하여 단백질 분리 profile을 비교하였다(Fig. 3). 대부분의 단백질이 pH 7 이하의 산성영역에 위치하였으며 발효 전의 수용성 콩 단백질은 분자량 40 kDa 이하의 크기가 주를 이룬 반면 발효가 완료된 청국장지에서는 40 kDa 이하의 단백질은 단백질 분해효소에 의해 분해가 일어나고 40-80 kDa 정도 크기의 단백질이 주종을 이루었다. 43시간 발효 후 추출한 수용성 단백질들 중 상당수가 당 단백질 특유의 구슬을 나열한 듯 한 배열을 나타내는 것으로 미루어 볼 때 콩에서 유래한 당 단백질일 가능성이 높음을 보였다(Fig. 3). 그 외에 새로 나타나는 단백질들은 미생물 유래 또는 미생물이 분비한 단백질 분해효소에 의해 절단된 단백질 단편으로 나타난 것으로 추정하였다(Fig. 3).

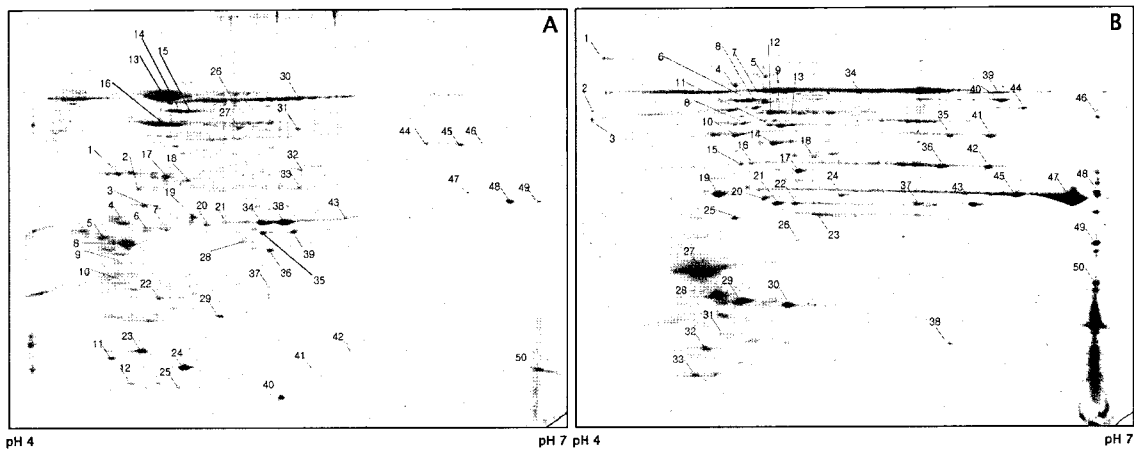
**전통 청국장지의 수용성 단백질체 분석**

발효가 완료된 전통 청국장지에서 추출한 수용성 단백질을 이차원 전기영동이 가능한 시료로 만들기 위해 다양한 방법을 시도하였다. 일반적으로 사용되는 desalting column을 이용한 desalting, 10% TCA 침전을 이용한 desalting, phenol 층 추출과 ammonium acetate를 이용한 침전 후 침전물을 다시 10% TCA로 침전시켜 salt를 제거하는 방법들을 시도하여 최종적으로 phenol 추출법에서 얻은 단백질 시료가 이차원 전기영동에서 가장 좋은 분해 능력을 보였기 때문에(data not shown) 본 실험에서는 이 방법으로 실험을 진행하였다.

대부분의 수용성 콩 단백질이 이차원전기영동 gel 상에서 pH 4-7 영역에 나타나기 때문에 pH 4-7 IPG strip을 이용하여 이차원 전기영동을 실시하였다(Fig. 3). 이차원 전기영동 gel 상에 나타난 단백질들을 임의로 50개 선발하여 trypsin으로 분해하고 추출한 peptides를 MALDI-TOF MS로 질량 값을 정확히 얻어 MS-Fit과 (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/>) Mascot(<http://www.matrixscience.com/>) 탐색기능을 이용하여 databases를 검색하는 peptide mass fingerprinting(PMF) 방법으로 단백질을 동정하였으나 콩의 유전체 정보가 충분치 않은 이유로 신뢰도가 높은 결과를 얻을 수 없었지만 유사 단백질들에 대한 정보를 얻게 되었다(Table 1).



**Fig. 2. Change of soluble protein profiles from *cheonggukjang* during the fermentation period on 2-D gel.** (A) Proteins from each *cheonggukjang* fermentation period of 0 hr (a), 10 hr (b), 20 hr (c), 30 hr (d), 43 hr (e), and commercially available *natto* (f). Proteins extracted by a phenol method and concentrated by lyophilization were loaded to pH 3-10 IPG strips for the 1st dimensional IEF and then second dimensional 12% SDS-PAGE. (B) Proteins from 0 hr (aa), 43 hr (ee), *natto* (ff), were separated on 18% gel to analyze the low molecular weight proteins under 30 kDa.



**Fig. 3. Comparison of soluble proteins from *cheonggukjang* and *natto* on 2-D gel.** Phenol extracted soluble proteins from *cheonggukjang* (A) and *natto* (B) were separated on pH 4-7 IPG strip and 12% SDS-PAGE gel (18 × 20 cm), and 50 randomly selected protein spots were analyzed by MALDI-TOF MS.

**전통 청국장과 *natto* 단백질 profile의 비교 분석**

전통 청국장의 2-D gel 상의 수용성 단백질 profile과 단일 균주인 *Bacillus subtilis*나 *Bacillus natto*를 사용한 *natto*의 수용성 단백질의 profile을 비교하기 위해 같은 방법으로 단백질을 분석했을 때 단백질 중 다수가 *Bacillus*군에서 유래한 단백질임이 밝혀

졌다(Table 2).

콩 단백질의 database가 충분치 못함으로 tandem MS/MS 방법으로 *de novo* sequencing을 하여 얻은 아미노산 서열을 가지고 NCBI나 SWISSPROT에 있는 단백질 database를 BLASTP 검색엔진으로 단백질을 동정하는 방법을 사용하기 위해 먼저 청국장과

**Table 1. Soluble proteins from cheonggukjang separated by 2-D gel and identified by peptide mass fingerprinting**

spot no.	score	molecular weight (Da)	pI (cal)	molecular mass (Da)	pI (exp)	Protein function
2	41	40031	6.29	40500	4.7	<b><i>protein disulfide isomerase<sup>a</sup></i></b>
11	25	13276	4.52	14000	4.6	GyrA
22	31	17620	4.77	19000	4.8	<b><i>ribonuclease-like protein<sup>a</sup></i></b>
24	27	14677	4.61	13400	4.9	YqhY
28	26	28611	5.61	26000	5.25	G-carboxyhexanoate-CoA ligase
29	52	15582	5.58	18500	5.15	conserved hypothetical protein ( <i>Pseudomonas</i> ) <sup>b</sup>
33	25	43476	5.31	40000	5.6	histidyl-tRNA synthetase
34	29	33153	5.67	29800	5.3	YwqM
44	39	57466	5.94	52500	6.3	<b><i>aldehyde 5-hydroxylase<sup>a</sup></i></b>

<sup>a</sup>Proteins from plants are designated in bold and italic.

<sup>b</sup>Non-bacillus proteins are specified for the source microbes.

**Table 2. Soluble proteins from natto separated by 2-D gel and identified by peptide mass fingerprinting**

spot no.	score	molecular weight (Da)	pI (cal)	molecular mass (Da)	pI (exp)	Protein function
6	56	72295	4	73000	4.90	transketolase
7	31	71076	5.17	79000	5.00	YfmA
8	55	69654	5.26	65000	4.85	<b><i>methyl accepting chemosensory transducer<sup>a</sup></i></b>
15	26	47550	5.67	44000	4.80	<b><i>adenylosuccinate synthetase (IWP-aspartate ligase)<sup>a</sup></i></b>
17	30	49508	5.93	42000	5.10	<b><i>signal recognition particle-like (GAP) component<sup>a</sup></i></b>
18	24	55573	5.55	47000	5.25	SpoVA
21	40	36237	9.52	38000	5.05	<b><i>maturase<sup>a</sup></i></b>
24	35	39446	6.6	38000	5.35	<b><i>G-adenosylmethionine synthase<sup>a</sup></i></b>
27	46	26520	6.23	25500	4.70	<b><i>dihydrodipicolinate reductase<sup>a</sup></i></b>
28	29	20500	5.85	20000	4.75	<b><i>ribulose-1,6-bisphosphate carboxylase/oxygenase<sup>a</sup></i></b>
31	22	13563	5.55	16000	4.75	YbcI
35	46	53109	6.72	56000	6.00	putative protease ( <i>Haemophilus</i> ) <sup>b</sup>
36	32	41168	5.72	44000	6.00	alcohol dehydrogenase
40	43	75519	6.17	79000	6.30	ATP-dependent DNA helicase ( <i>Chromobacterium</i> ) <sup>b</sup>
43	43	42066	6.54	34000	6.20	<b><i>phytochrome O<sup>a</sup></i></b>

<sup>a</sup>Proteins from plants are designated in bold and italic.

<sup>b</sup>Non-bacillus proteins are specified for the source microbes.

natto에서 추출한 수용성 단백질을 8-18% 농도구배 SDS-PAGE gel에서 분리하고(Fig. 4) gel을 10등분하여 각 gel 조각에 들어있는 단백질을 trypsin으로 분해하여 얻은 peptide의 amino acid 서열을 질량분석방법으로 조사하였다(Table 3). 전통 청국장의 발효 과정에 관여하는 미생물 군이 다양하고 사용하는 콩의 품종이 다른 점 등을 고려할 때 database의 걸림으로 콩 단백질의 확인은 어려웠지만 database에서 확인 되는 식물이나 미생물의 단백질과 80% 이상의 서열일치를 나타낸 것을 가능성 있는 단백질로 정하였다.

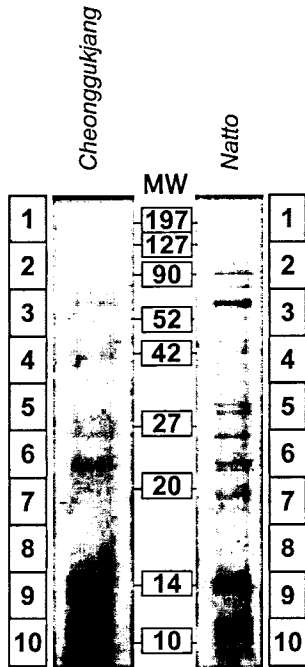
## 고 찰

### 2-D gel을 이용한 단백질 분리과 단백질체 분석 방법을 이용한 전통 청국장의 수용성 단백질 분석

본 연구에서는 전통 청국장에 들어 있는 기능성 물질에 대한 탐색을 위한 기초적 연구로서 단백질을 분석하였기 때문에 발효 과정 중에서 변화를 보이는 수용성 단백질에 관심을 갖고 실험을 진행하였다. 청국장에서부터 추출한 수용성 단백질 중에는 이론적으로 미생물이 생산한 단백질과 단백질 분해 효소에 의해 변

형된 콩 단백질 그리고 발효과정 중 수용성이 증가한 콩 단백질 등이 있다. 이들 단백질 중에서 기능성이 있다고 알려진 단백질 중 natto kinase(21), 산업적으로 사용이 가능한 protease, 점질물에 있는 poly- $\gamma$ -glutamate(24,25) 등이 있지만 음식물로 섭취했을 때 우리 몸에 유용한 기능성 단백질로는 아직까지 알려진 것이 없다. 그러나 일반적으로 수용성 단백질은 다른 기능성 물질을 만드는 효소로 작용할 수 있기 때문에 단백질 발현의 profile 변화를 연구하는 것은 기능성 물질의 탐색이나 기능성 물질의 생성에 대한 연구를 할 때 동반되어야 하는 중요한 연구이다.

콩 단백질을 추출하기 위해 청국장을 파쇄하거나 건조하지 않고 발효과정 중 일정 시간을 두고 또는 발효가 끝난 시점에서 바로 청국장 시료 50 g을 protease inhibitor가 들어있는 0.1 × PBS 100 mL에 넣어 1시간 얼음 위에서 교반함으로써 수용성이 높은 단백질을 얻었다. 이렇게 얻은 단백질은 전기영동 시에 분리가 잘 일어나지 않는 문제를 일으키므로 방해 물질을 제거하기 위해 단백질을 10% TCA로 침전시키고 100% 에탄올로 3회 닦아 주어 방해 물질을 제거하고 일차원 전기영동을 하였다. 이러한 노력에도 불구하고 이차원 전기영동에서는 반복성이 있고 분해 능력이 높은 gel을 얻기가 어려웠다. 이 결과는 콩 단백질에 이



**Fig. 4.** MS/MS analysis of soluble proteins from *cheonggukjang* and *natto*. Proteins were separated on 12% SDS-PAGE, and the gel was sliced into 10 pieces for trypsinization to make peptides. Five peptides were selected from MS scan and *de novo* sequenced. The resulting sequences were queried to search SWISS-PROT database by BLASTP.

차원 전기영동을 방해하는 물질이 많이 있음을 의미하는데 이러한 물질을 제거하기 위해 phenol로 시료를 추출하여 방해 물질을 없애고 phenol 층에 녹아 있는 단백질을 침전하여 단백질을 얻은 결과 성공적인 이차원 전기영동을 할 수 있었다(Fig. 1).

반복성이 높은 이차원 전기영동 gel을 얻어서 시간 별로 단백질의 변화를 비교하면 발효되지 않은 콩에서 추출한 수용성 단백질(Fig. 2A-a)은 주로 분자량 40kDa 이하이고 pH 4-5 영역에 위치하였는데 발효가 진행됨에 따라 분자량 40kDa 이하인 단백질은 감소하고 30-90 kDa, pH 4-5 영역에 위치하는 단백질들이 증가하는 흥미로운 결과를 보였는데 이는 발효 미생물이 생성하는 단백질 분해효소에 의해 콩 단백질이 분해되고 발효진행에 따른 미생물 유래 단백질(예, mucilage, protease, subtilisin, 등)이 증가하고(Table 1 and 2) 콩 단백질 중 수용성이 증가하여 얻어지는 단백질들로 추론할 수 있다.

Mooney와 Thelen(28)에 의해 콩 단백질의 2-D 분리와 질량분석, peptide mass fingerprinting(PMF) 방법에 의한 단백질의 동정은 시도 되었으나 이들은 전체 콩 단백질에 대한 단백질 분석을 시도하여 최대 44개의 단백질을 동정하였다. 그 결과 주로 밝혀진 단백질들은 glycinin류의 단백질이 전체의 2/5를 차지하였고, sucrose binding protein(14%), hypothetical proteins(12%) 등으로 나타나 콩의 주성분 단백질을 위주로 단백질이 밝혀지거나 아직 기능이 잘 밝혀져 있지 않은 단백질로 나타났다. 그러나 본 연구에서는 콩 및 청국장의 수용성 단백질을 분리하여 분석하였기 때문에 기존의 결과와는 다른 양상을 보이고 있다.

본 연구에서 선별한 50개의 단백질 시료를 PMF로 분석한 결과 data의 신뢰를 나타내는 score가 낮게 나왔으며, 동정된 단백질들의 공통적인 특징은 발견할 수 없었다. 전통 청국장에서 9개의 단백질이 동정되었는데 그 중 미생물 유래 단백질은 6개,

식물유래 단백질은 3개였다(Table 1). 한편 *natto*에서는 15개의 단백질이 동정 되었고 미생물 유래 단백질이 7개, 식물유래 단백질이 8개였다(Table 2).

**콩의 유전체 정보 한계와 이를 극복하기 위한 접근**

콩(*Glycin max*)의 유전체 정보는 아직 미미한 수준에 머물러 있기 때문에 이 유전체 정보를 이용하여 단백질체를 분석하는 데는 명백한 제약이 있다. 이 한계를 극복하기 위하여 Mooney와 Thelen(28)은 콩의 EST database로부터 contig를 만들어서 분석하는 단백질을 동정하고자 했으나 콩의 주종을 이루는 제한된 단백질을 동정하는 수준의 결과를 얻었다. 그러나 EST database는 계속 늘어나고 있으며 sequence의 정확도가 보장된다면 proteomics를 이용한 콩 단백질체의 분석은 더 신뢰할 수 있고 확장된 범위로 진행 될 수 있을 것이다. 또 다른 방법으로, 단백질을 MS/MS 분석을 통해 *de novo* sequencing하고 얻어진 아미노산의 서열을 가지고 BLASTP와 같은 단백질 검색 엔진을 이용하여 단백질을 동정하는 것이다. 본 연구에서도 청국장과 *natto*의 수용성 단백질을 일차원 전기영동으로 분리하고 단백질 band에서 peptide를 얻어 MS/MS로 *de novo* sequencing하여 단백질을 동정하고자 하였는데 여전히 80% 정도의 아미노산 서열의 일치치를 보이는 수준에서 제한된 단백질의 동정을 할 수 있었다(Fig. 4, Table 3). 이 결과는 청국장의 콩 재료가 일반적으로 알려진 콩과 유전적으로 상이하거나, 전통 청국장은 자연발효 산물이므로 미생물의 종류가 다양하기 때문에 미생물 유래 단백질도 proteomics에 의한 분석이 용이하지 않은 것으로 판단된다. 이러한 한계 때문에 proteomics 방법을 통한 전통 청국장의 분석은 단백질의 profile 분석을 통해 특정 단백질들을 선별하고 이들 단백질을 *de novo* sequencing하여 아미노산 sequence를 얻어 sequence homology 비교에 의한 단백질의 기능을 규명하는 것과 같은 방법으로 접근하는 것이 바람직하다고 판단된다.

**분석된 단백질의 정보로부터 추론할 수 있는 청국장과 *natto*의 생화학적 성질**

청국장 발효가 완료 되었을 때 나타나는 단백질 profile은 이미 발효 30시간이 경과하면 얻어진다(Fig. 1, Fig. 2). 발효가 계속 진행되어도 단백질 분해효소에 의해 분해되지 않고 유지되는 수용성 단백질들 중에는 단백질 분해효소에 대해 저항성이 있는 단백질이 존재할 가능성이 크다. 수용성 단백질 중 단백질 분해효소 저항성은 당단백질 또는 매우 folding이 단단하게 이루어진 globular 단백질 동일 것으로 추측할 수 있으며 이 단백질들은 장에서 소화 흡수되는 영양학적 가치를 가졌기 보다는 이 단백질들의 표면에 물을 함유하여 마치 식물성 fiber들이 장의 연동운동을 도와 변비와 같은 증세에 도움이 되듯이(32,33) 장의 연동운동을 돕거나 또는 단백질 분해효소에 내성을 보임으로써 allergic 면역반응(33,34) 등에 영향을 줄 가능성이 있으므로 이에 대한 생화학적 연구가 필요하다. 청국장과 *natto*에서 공통적으로 발견되는 단백질은 *Bacillus* 유래의 YggD 유전자가 만드는 단백질인데 아미노산 226개로 이루어져 있으며 superoxide dismutase기능을 갖는 domain을 갖고 있으면서 *Bacillus*의 포자형성에 관여하는 유전자 군에 속한다(30). 청국장과 *natto*에서 볼 수 있듯이 확인된 단백질 중 YuaB, morphogenic protein 과 같은 포장 형성 단백질이 검출되는 것으로 보아 발효가 완료된 청국장에는 *Bacillus*의 포자형성이 진행되고 있거나 포자를 형성하고 있음을 보인다. 또한 alkaline serine protease, extracellular protease와 같은 단백질 분해효소가 검출되어 발효가 완료된 후에도 지속적으로 단백질

**Table 3. Identification of soluble cheonggukjang and natto proteins by de novo sequencing and Basic Local Alignment Search Tool-Protein**

Band No.	MS Precursor (Da)	Sequence	Identified Protein
1	2249	PRGALNFKEADV KPHGPVDEX	alcohol dehydrogenase [ <i>Psychrobacter arcticus</i> ]
2	2012	GSSFHGCNCVEKHTKGGDLPR	A/G-specific adenine glycosylase [ <i>Xylella fastidiosa</i> ]
	2153	VMCSTPNSDANRVEGHVAVR	CU (copper) ATPase [ <i>Caenorhabditis elegans</i> ].
3	1825	KPDKASFYDPCVNER	conserved hypothetical protein [ <i>Bacillus cereus</i> ]
	1443	KNVVFACFACER	beta-lactamase domain protein [ <i>Anaeromyxobacter</i> sp.]
	1248	LKECLDTKNK	serine/threonine kinase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
4	1638	KGGSHTGDKRDVASSH	peptidase S11 [ <i>Psychrobacter cryohalolentis</i> ]
	2705	NPNKTVENCHCKCALACAKAASDFR	2-isopropylmalate synthase [ <i>Nitrobacter winogradskyi</i> ]
5	2095	NGNTSLASGSKTKYGVGAKVR	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase [ <i>Bacillus thuringiensis</i> ]
	1668	CCTASFCKSLAPPKGV	cytosolic tRNA-Ala synthetase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
	1290	AKSVAEDPGCASV	YqgD [ <i>Bacillus</i> ]
6	1578	SKRECARAPNMR	nucleoporin (Nup184) [ <i>Aspergillus clavatus</i> ]
7	1638	MKAADLFSAPNNTCR	chloroplast lipocalin [ <i>Glycine max</i> ]
	2501	NDDPGWMYVSETGLLFMGGKKR	ABC transporter (ATP-binding protein) [ <i>Bacillus halodurans</i> ]
	1690	FSSAGESFETVGGKNS	morphogenic protein [ <i>Bacillus subtilis</i> ]
8	1773	TLCRGKVC SRHFPR	AMP-(fatty) acid ligase [ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ]
9	1499	REMTNSFAVCEER	cytokinin oxidase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ].
10	1254	RHRLSGGDVSGN	dNDP-4-keto-6-deoxy-glucose-2,3-dehydratase [ <i>Geobacter</i> sp.]
1N <sup>a</sup>	1748	CSTNERKSCETGVKPR	serine metalloprotease [ <i>Legionella pneumophila</i> ]
	1768	ACAKYDNCFGADKPRR	glycosyl hydrolase family [ <i>Salvia miltiorrhiza</i> ]
2N <sup>a</sup>	2153	GPRYNSVCFKGLVPEAGSSK	enoyl-CoA hydratase [ <i>Roseobacter</i> sp.]
3N <sup>a</sup>	1597	GHFDSNKCSYKVP	PilY1 gene product [ <i>Xylella fastidiosa</i> ]
	2652	KPFFKKEVPLV VSCGDGVTWNGM	quinone oxidoreductase [ <i>Roseovarius</i> sp.]
4N <sup>a</sup>	2669	CASKDCCSSCNGPSHGPTRHPPKSR	Peptidase S26A, signal peptidase I [ <i>Medicago truncatula</i> ]
5N <sup>a</sup>	1209	SFTWTNAKVR	glucosyltransferase [ <i>Streptococcus mutans</i> ]
	2084	KVRTCKSDHGRFLSFLSYCK	protein kinase family [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
	1290	AKSVAEDPGCASV	YqgD [ <i>Bacillus</i> ]
6N <sup>a</sup>	1884	EEGELVADMPSVSRPLR	phosphoserine aminotransferase [ <i>Nitrosococcus oceanii</i> ]
	1909	CAPSAADHDMNAFGHPLR	Dihydrodipicolinate reductase [ <i>Mycobacterium flavescens</i> ]
7N <sup>a</sup>	1549	KPGDGGRFTNHS GK	glutathione S-transferase [ <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ]
	1144	MNRTGCARR	UDP-glucose 4-epimerase [ <i>Roseobacter denitrificans</i> ]
8N <sup>a</sup>	1893	ATAVCTNVCTDGHNTCYR	Peptidase [Francisella tularensis], yuaB [ <i>Bacillus</i> ]
9N <sup>a</sup>	1442	VPIAIDIICAGERK	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [ <i>Polaromonas naphthalenivorans</i> ]
	2910	AKTASAAGPNGGAGGPKETSTPGAADIFPVR	glycin-rich signal peptide protein [ <i>Ralstonia metallidurans</i> ]
10N <sup>a</sup>	1222	VCPSPDYTCAR	Glycosyl transferase, family 2 [ <i>Prochlorococcus marinus</i> ]
	2083	CCRDAVSACERVDLYLKK	NADH dehydrogenase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]

<sup>a</sup>, #N, bands from natto sample

분해가 진행됨을 보이고 있다. 전통 청국장과 natto를 단백질적 측면에서 생화학적으로 비교하여 우열을 가리는 데는 무리가 있지만 natto는 단일 균주를 사용하기 때문에 불쾌취를 줄일 수 있고 외형상으로도 mucilage를 많이 생성하여 소비자의 선호를 이끌어 내는 데 유리한 점이 있다. 순창 지역의 전통 청국장 발효는 자연발효 조건을 이용하고 있는데 이 발효조건의 최적화라는 측면에서도 단백질만을 고려했을 때 사용 콩의 표준화 및 사용 균주의 표준화가 이루어져야 보다 더 과학적이고 체계적이고 반복성 높게 제품을 생산할 수 있을 것이다. 따라서 콩 및 균주가 표준화된 발효 조건에서 청국장 수용성 단백질 profile을 중심으로 한 발효의 최적화 시도가 필요하며 이를 바탕으로 청국장에 생성된 기능성 물질과 특정 단백질과의 연관관계를 추적해 나갈 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

콩 발효식품인 청국장은 어느 정도는 그 기능성 때문에 많은 사람들이 선호하고 있다. 청국장의 발효 과정은 발효미생물이 분해하는 단백질 분해 효소를 포함하는 여러 효소들에 의해 이루어지기 때문에 발효기간 동안 청국장의 단백질체 분석은 발효의 최적화를 이루기 위해서 그리고 청국장에 생성되는 기능성물질 생성 과정을 이해하는 데 도움이 된다. 청국장의 수용성 단백질을 phenol/chloroform 추출 방법으로 분리하여 2-D gel 분석에 방해하는 물질들을 제거하였다. 각 발효 단계에서 단백질 분석을 하였을 때 20시간 안에 대부분의 단백질들이 작은 분자로 분해되었고 수용성 단백질에는 미생물 유래 단백질들이 점차 증가하였다. 청국장의 단백질 프로파일은 natto의 것과는 매우 다른 양

상을 2-D gel 상에서 보였다. 각 gel에서 50개의 단백질을 임의로 선별하여 MALDI-TOF MS 분석을 하고 PMF로 단백질을 동정하였다. 결과는 콩이나 발효 미생물들의 유전체 정보가 부족하여 청국장에서 9종 *natto*에서 15종의 단백질만을 동정할 수 있었다. MS/MS 분석을 통한 아미노산 서열 분석을 통해 얻은 정보를 가지고 BLASTP 검색엔진으로 database를 검색한 결과 제한된 수의 단백질이 낮은 신뢰도 범위에서 동정되었다. 그렇지만 청국장과 같이 복잡한 단백질체를 분석하기에는 본 연구에서 고안한 전체 단백질 분리 기술과 2-D gel 분석적 접근은 단백질을 전체적으로 분석함에 있어 훌륭한 방법이다. 앞으로 청국장의 단백질 변화에 대한 연구는 의미 있는 변화를 보이는 소수의 단백질을 선별하고 이들에 대해 집중적으로 질량분석 하여 단백질을 동정하는 것이 필요하다.

## 감사의 글

이 연구는 과학기술부 바이오식품소재 기반기술개발 사업(2005-00382)으로 수행한 연구의 일부로 한국과학재단의 연구비 지원에 감사드립니다.

## 문헌

- Joo HK. Studies on the manufacturing of *cheonggukjang*. Korean J. Food Sci. Technol. 3: 64-67 (1971)
- Lee KH, Lee HJ, Jung MK. Studies on *cheonggukjang*-on the changes of soy-bean protein in manufacturing *cheonggukjang*. J. Korean Agr. Chem. Soc. 14: 191-200 (1971)
- Jang JH, Shim UY, Kim SH, Ji KM, Cha SK. Fibrinolytic and immunostimulating activities of *Bacillus* spp. strains isolated from *cheonggukjang*. Korean J. Food Sci. Technol. 37: 255-260 (2005)
- Kil JO, Kim GN, Park IS. Production and characterization of fibrinolysis enzyme: optimal condition for production of the enzyme from *Bacillus* sp. KP-6408 isolated from *cheonggukjang*. Korean J. Food Sci. Nutr. 27: 51-56 (1998)
- Kang SM, Lee CS, Yoo CK, Seo WS. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme excreted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from *cheonggukjang*. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 26: 507-514 (1998)
- Lee JJ, Cho CH, Kim JY, Kee DS, Kim HB. Antioxidant activity of substances extracted by alcohol from *cheonggukjang* powder. Korean J. Microbiol. 37: 177-181 (2001)
- Cho YJ, Cha WS, Bok SK, Kim MU, Chun SS, Choi UK. Production and separation of anti-hypertensive peptide during *cheonggukjang* fermentation with *Bacillus subtilis* CH-1023. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 42: 247-252 (2000)
- Youn HK, Choi HS, Hur SH, Hong JH. Antimicrobial activities of viscous substance from *cheonggukjang* fermented with different *Bacillus* sp. J. Food Hyg. Saf. 16: 188-193 (2001)
- Shon MY, Seo KI, Park SK, Cho YS, Sung NJ. Some Biological activities and isoflavone content of *cheonggukjang* prepared with black beans and *Bacillus* strains. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30: 662-667 (2002)
- Yu SM, Jang CM. Study on the processing adaptability of soybean cultivars for Korean traditional *cheonggukjang* preparation. J. Korean Soc. Agric. Chem. 42: 91-98 (1999)
- Choi JS, Yu SM, Kim HR, Kim JS, Jang CM. Volatile compounds of *cheonggukjang* prepared by different fermentation methods and soybean cultivars. J. Korean Soc. Agric. Biotechnol. 42: 111-115 (1999)
- Shin DH, Kwon OJ, Ji YD, Choi UK, Kwon O-J, Lee EJ, Jo YJ, Cha WS, Jung YG. The quality changes of *cheonggukjang* prepared by *Bacillus* sp. CS-17 during fermentation time. J. Korean Soc. Agric. Biotechnol. 43: 1-6 (2000)
- Kim YS, Jung HJ, Park MS, Yu TS. Characteristics of flavor and functionality of *Bacillus subtilis* K-20 *cheonggukjang*. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 475-478 (2003)
- Lee YR, Kim SH, Jung NH, Lim MH. A study on the production of viscous substance during the *cheonggukjang* fermentation. J. Korean Agric. Chem. Soc. 35: 202-209 (1992)
- Lee BY, Kim DM, Kim KH. Physico-chemical properties of viscous substance extracted from *cheonggukjang*. Korean J. Food Sci. Technol. 23: 599-604 (1991)
- Lee BY, Kim DM, Kim KH. Studies on the change in rheological properties of *cheonggukjang*. Korean J. Food Sci. Technol. 23: 478-484 (1991)
- Ahn YS, Kim YS, Shin DH. Isolation, identification and fermentation characteristics of *Bacillus* sp. with high protease activity from traditional *cheonggukjang*. Korean J. Food Sci. Technol. 38: 82-87 (2006)
- Kim DM, Kim SH, Lee JM, Dung NT, Kang SC. Monitoring of color changes and organoleptic properties of *cheonggukjang* products during storage for shelf-life establishment. J. Korean Soc. Appl. Chem. 48: 140-149 (2005)
- Youn KC, Kim DH, Kim JO, Park BJ, Yook HS, Cho JM, Byun MW. Quality characteristics of the *cheonggukjang* fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*. J. Korean Food Sci. Nutr. 31: 204-210 (2002)
- Youn SM, Chang CM. Study on processing adaptability of soybean cultivars for Korean traditional *cheonggukjang* preparation. J. Korean Agric. Chem. Soc. 31: 204-210 (1999)
- Sumi H, Hamada H, Tsushima H, Mihara H, Muraki H. A novel fibrinolytic enzyme (*natto* kinase) in the vegetable cheese *natto*: a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia* 43: 1110-1117 (1987)
- Kameda Y, Ouhira S, Matsui K, Kanatomo S. Anti-tumor activity of *Bacillus natto* V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311. *Chem. Pharm. Bull.* 22: 938-944 (1974)
- Seo JH, Lee SP. Production of fibrinolytic enzyme from soybean grits fermented by *Bacillus firmus* NA-1. *J. Med. Food* 7: 442-449 (2004)
- Tanimoto H, Mori M, Motoki M, Torii K, Kadowaki M, Noguchi T. *Natto* mucilage containing poly-gamma-glutamic acid increases soluble calcium in the rat small intestine. *Biosci. Biotech. Bioch.* 65: 516-21 (2001)
- Ashiuchi M, Kamei T, Baek DH, Shin SY, Sung MH, Soda K, Yagi T, Misono H. Isolation of *Bacillus subtilis* (*cheonggukjang*), a poly- $\gamma$ -glutamate producer with high genetic competence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 764-769 (2001)
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith, I, Hochstrasser DF, Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng.* 13: 19-50 (1995)
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390: 249-256 (1997)
- Mooney BP, Thelen JJ. High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: automated work flow and ability of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification. *Phytochemistry* 65: 1733-1744 (2004)
- Natarajan S, Xu C, Caperna TJ, Garrett WM. Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Anal. Biochem.* 342: 214-220 (2005)
- Mizuno M, Masuda S, Takemaru K, Hosono S, Sato T, Takeuchi M, Kobayashi Y. Systematic sequencing of the 283 kb 210 degrees-232 degrees region of the *Bacillus subtilis* genome containing the skin element and many sporulation genes. *Microbiology* 142: 3103-3111 (1996)
- Amenta M, Cascio MT, Di Fiore P, Venturini I. Diet and chronic constipation. Benefits of oral supplementation with symbiotic zircon (*Bifidobacterium longum* W11 + FOS Acilight). *Acta Biomed.* 77: 157-162 (2006)
- Kacmaz Z, Kasici M. Effectiveness of bran supplement in older orthopaedic patients with constipation. *J. Clin. Nurs.* 16: 928-936 (2007)
- Maleki SJ, Kopper RA, Shin DS, Park CW, Compadre CM, Sampson H, Burks AW, Bannon GA. Structure of the major pea-



- nut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation. *J. Immunol.* 164: 5844-5849 (2000)
34. Lehmann K, Schweimer K, Reese G, Randow S, Suhr M, Becker WM, Vieths S, Rösch P. Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions. *Biochem. J.* 395: 463-472 (2006)