Journal of Life Science **2009** Vol. 19. No. 3. 397~402 ©JLS / ISSN 1225-9918

볏짚 청국장 발효 세균 분리 및 분비된 protease의 확인

오재현 · 이병정 · 백형록 · 정상철 · 백근식 · 최상기*

순천대학교 생물학과

Received December 29, 2008 / Accepted March 2, 2009

Isolation of Bacteria from Chunggukjang Prepared by Rice Straw and Identification of Protease Secreted. Jae Hyeon Oh, Byeong Jeong Lee, Hyoung Rok Paik, Sang Chul Jung, Keun Sik Baik and Sang Ki Choi*. *Department of Biological Sciences, Sunchon National University, Sunchon 540-742, Korea* - To isolate bacteria secreting protease, which can dissolve fibrin efficiently, we prepared chunggukjang using rice straw and isolated, preliminarily, approximately 100 bacterial stains. Their capabilities to dissolve milk protein as well as fibrin included in media were then examined and finally, five strains named J1 - J5 were selected. Among them, J-4, which is close to *bacillus subtilis,* showed highest activity for fibrin dissolution. Proteases secreted from the J-4 strain were partially purified from culture supernatant using DEAE-sepharose column chromatography and identified with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Three proteins were subjected to analysis with MALDI-TOF and PMF (Peptide Mass Fingerprinting). 41.9 kDa protein was identified as a neutral protease. On the other hand, 45 kDa protein turned out to be bacillopeptidase F, with a molecular mass of 91.7 kDa, indicating that partially purified peptide is a degradation product.

Key words : Chunggukjang, protease, fibrin, bacillus, MALDI-TOF

서 론

최근 생명공학의 발전과 더불어 식품, 의약품 및 섬유산업에 이르기까지 효소자원의 수요는 급격히 증가하고 있으며, 다양한 생물로부터 새로운 효소가 발견되고 있을 뿐만 아니라, 효소의 이용분야도 점차 증대되고 있다. 현재까지 알려진 효소의 종류는 약 3,000종에 이르고 있으며, 산업적으로 사용되고 있는 산업용 효소는 전분, 단백질, 펙틴, 섬유소를 가수분해 시키는 효소가 주종을 이룬다[13]. 이 중 단백질 분해효소가 40%를 점유하고 있어 효소산업 분야에서 가장 큰 비중을 차지하여 왔다[9].

단백질 분해효소(protease)는 단백질 또는 peptide에 작용하여 peptide bond의 가수분해를 촉매하는 효소로서 동 · 식물, 미생물의 조직이나 세포조직 중에 존재한다. 다양한 물리적, 화학적 조건에서 활용될 수 있는 protease는 단백질 화학, 의학 등의 자연과학 분야와 식품공업, 피혁산업, 세제 공업 및 제지 공업 등의 일반 산업분야에도 응용되고 있다[12,14]. Protease는 동물, 식물, 미생물 등 대부분 생명체의 세포 안과 밖에서 발견되며, 다양한 생리적 역할을 하는 중요한 효소이다. Protease는 활성 부위에서 작용하는 기능기에 의해 serine protease, metal protease, aspartic protease, cysteine protease 등으로 구분되어지며, 작용 pH에 따라 acid protease, neutral protease, alkaline protease로 분류된다. 미생물로부터 생산되며 상업적인 protease는 neutral, alkaline protease가 대부분을 차지하고 있다[2,3].

Neutral protease는 반응의 중간물질 때문에 음식에 첨가하였을 때 동물성 단백질 분해효소보다 더 음식물 내 단백질을 잘 가수분해하여 쓴 맛을 줄여준다. 이런 작용 때문에 식품산업에 널리 이용되고 있다[12]. Alkaline protease는 Horikoshi에 의해 처음으로 연구가 시작되어 *Bacillus* 속을 비롯하여 방선균, 곰팡이 등 여러 미생물에서 분리되어 연구되어 왔다[5]. 이러한 알칼리성 단백질 분해효소는 피혁, 세제 공업에 있어 종래의 유기합성 세제보다 환경오염에 대한 피해가 적고 이차 오염이 일어나지 않으므로 생태계의 피해를 예방할 수 있다[10]. 또한 세제용 protease로 많이 각광을 받고 있으며 그 분자의 active site에 serine이 포함되어 있는데 이러한 점은 특히 *Bacillus* 종에서 많이 생산되고 있다. Alkaline protease는 피혁의 탈모 공정과 세제 성분으로 많이 사용되는데 이에 대한 조건은 저온 및 알칼리성 하에서 효소 활성이 충분하게 발휘되어야 한다. 산업적으로 유용한 protease는 방선균, *Bacillus*, 곰팡이 등 다양한 미생물로부터 발견되었고, 최근에는 새로운 화학적 물리적 조건에 맞는 protease를 산업적으로 이용하기 위해 다양한 서식지로부터 다양한 미생물들이 검색되고 있다[4]. 또한 최근에는 단백질 분해효소를 이용한 혈전 치료제로 개발하기 위한 연구가 진행되고 있는 실정이다[11].

청국장은 삶은 콩을 볏짚에 깔아 볏짚에 붙어있는 *Bacillus* 속 미생물에 의해 발효된 것으로 오래 전부터 우리가 섭취해 왔던 식품임에도 불구하고, *Bacillus* 속 미생물로부터 생성되는 암모니아 화합물의 특이한 냄새와 그 특유의 맛으로 인해

***Corresponding author**
Tel : +82-61-750-3619, Fax : +82-61-750-3608
E-mail : sangkic@sunchon.ac.kr

소비자들이 기피하는 경향이 있었다. 그러나 최근에 발효과정 중 미생물이 생산하는 효소에 의해 생성된 물질들은 그 대부분이 생리활성 물질로 단백질 분해 활성과 혈전용해능, 항산화능 및 항암활성의 면역증가 효능과 혈압강하 효과, 항균효과 등 각종 유용한 생리활성 기능이 보고됨에 따라 가장 효과적인 영양적, 경제적 콩의 섭취 방법으로 인정되어 기능성 식품으로 관심이 증가하고 있는 추세이다. 또한 청국장으로부터 혈전용해 활성이 우수한 균주를 분리하여 향후 의약품 또는 식품 첨가물의 기초 원료로 이용하려는 시도가 매우 활발하게 진행되고 있다[1].

청국장에 관한 연구는 발효에 관여되는 미생물을 규명하려는 연구가 진행되어 왔으며, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* 등이 청국장에서 분리되었다[1]. 따라서 본 연구에서는 전통청국장에서 protease 활성이 우수한 균주를 선발하여 동정하였으며, 균주가 생산하는 단백질을 정제 분리하여 PMF와 MALDI-TOF/MS 분석하였다. 또한 protease 활성이 있는 부위의 변형을 통해 우수한 단백질을 선별하고 그로 인한 혈전용해효소와 단백질분해효소로서의 산업적 이용가치를 높이고자 하였다.

재료 및 방법

배지

균주 배양과 분리용 배지는 nutrient agar (BD, USA)를 사용하였고, 청국장 현탁을 위해 1% NaCl 용액을 사용하였다. 단백질 분해능이 우수한 균주를 분리하기 위해 1% skim milk를 첨가한 NA배지를 사용하였다. 또한 fibrin test를 위해 fibrinogen, plasmin, thrombin은 Sigma (MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 단백질 분해 활성도 측정을 위한 azocasein [8]은 Sigma (MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 효소정제를 위한 시약은 Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden) 제품을 사용하였다. 그리고 기타 시약은 Sigma (MO, USA) 및 Difco (BD, USA)의 시약을 사용하였다.

청국장 제조

시중에 있는 청국장용 대두와 농가의 볏짚으로 직접 청국장을 제조하였다. 대두를 흐르는 물에 세척한 후 대두 양의 3배되는 증류수를 넣어 상온에서 18 hr 침지 시키고 121°C에서 30 min간 증자한 후 60°C로 식힌 후, 채반에 넣고 볏짚과 증자액을 함께 발효 용기에 넣어 50°C에서 48 hr 발효시켰다.

청국장으로부터 균의 분리 및 선발

볏짚을 이용하여 제조된 청국장을 각각 1 g, 3 g, 5 g씩 1% NaCl용액에 현탁하여 30 min간 방치한 후 상층액을 2차 증류수에 10^6배, 10^7배씩 희석하였다. NA 배지에 100 µl씩 분주하여 도말하고, 37°C에 16 hr 동안 배양하였다. 배지에 자란 colony를 NA 배지에 streak 후 24 hr 동안 배양하였다. 100개의 단일 콜로니를 NA 배지에 다시 streak하여 순수분리 된 균주를 얻는 작업을 진행하였다. 분리된 균주를 각각 1% skim milk 가 첨가된 NA배지에 접종하여 37°C에서 24 hr 배양한 후 투명환의 크기를 측정하였다. 최종적으로 활성이 큰 5종류의 균을 선발하였다.

Fibrin plate 제조 및 분리된 균의 활성도 측정

10 mM 인산완충용액(pH 7.8, 0.15 M NaCl)에 human fibrinogen을 0.6%가 되도록 용해시키고 완전히 용해된 fibrinogen 용액 5 ml에 100 U/ml의 thrombin 100 µl를 첨가하였다. 위와 동일한 완충 용액에 녹인 1% agarose 용액 5 ml를 첨가하여 충분히 혼합한 후 즉시 평판에 붓고 실온에서 5~10 min간 방치, 고화시켜 최종적으로 0.3% fibrin plate를 제조하였다. Fibrin plate에 분리된 균을 접종한 후 37°C에 24 hr 반응시켜 용해된 환의 면적을 측정하였다. 대조구로는 정제된 혈전용해제인 plasmin (1 unit/ml)을 사용하였다. 혈전용해 활성(PU/ml)은 시료의 투명환 면적/plasmin (1 U/ml)의 투명환의 면적으로 정하였다.

16S rRNA gene sequencing

Genomic DNA 추출은 순수 분리된 미생물을 전날 배양(70 ml)하여 30 ml씩 centrifuge tube에 담아 원심분리(12,000 rpm, 10 min, 4°C)하였다. 배양액을 완전히 제거하고 균체를 lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 10 mM NaCl, 2% SDS] 800 µl에 혼합액의 80%정도로 glass bead (size: 0.4 mm)를 넣고 10분간 TOMY mixer (TOMY, USA)에 혼합하였으며, 1× TE buffer 2 ml와 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) 2 ml을 넣고, 혼합한 후 원심분리(12,000 rpm, 10 min, 4°C)하였다. 상등액을 새로운 tube에 옮긴 후 상등액의 동량으로 chloroform:isoamyl alcohol (24:1)를 넣어서 흔들어 혼합해 준다. 다시 상등액을 새로운 tube에 옮긴 후 RNase A (20 mg/ml) 60 µl을 넣고 37°C에 30 min간 배양하였고, 0.1 volume의 3 M sodium acetate (pH 5.2)와 2 volume의 차가운 100% ethanol을 넣고 DNA을 침전 시킨 후 원심분리(12,000 rpm, 10 min, 4°C)하였다. 차가운 70% ethanol로 세척한 후 건조하여 증류수에 녹여 실험에 사용하였다.

Genomic DNA의 shearing 및 명도를 확인하기 위해 1% agarose에 전기영동하여 확인하였고, DNA 순수성은 U-0080D spectrophotometer (HITACHI, Japan)를 이용하여 흡광도법으로 정량하였다.

PCR 산물 정제는 16S rRNA gene을 증폭하기 위해 세균의 genomic DNA에 특이적으로 부착하는 universal primer 27F (*E. coli* numbering 8~27; 5′-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3′)와 1492R (*E. coli* numbering 1492~1510; 5′-GGY TAC

CTT GTT ACG ACT T-3′) primer을 사용하였다. PCR을 위한 reaction mixture 구성은 template DNA 10 ng, 200 μM dNTP, 1U n*Taq* polymerase (Enzynomics™, USA), 10× n*Taq* Buffer ($MgCl^{2+}$), 20 μg BSA (TaKaRa, Japan) 그리고 forward와 reverse primer를 각각 0.5 μM로 첨가하여 총 volume을 50 μl로 하였다.

Temperature cycling은 PTC-150 Mini-Cycler™ (MJ Research Inc. Watertown MA, USA)를 이용하여 predenaturation 과정으로 95°C에서 5 min간 수행하였고, denature (94°C, 1 min), annealing (58°C, 30 sec), elongation (72°C, 30 sec) 반응을 총 30회 반복하고 post-elongation (72°C, 7 min)을 수행하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동한 후 16S rRNA gene 크기를 확인하였다.

증폭된 PCR 산물의 정제는 AccuPrep® PCR purification kit (Bioneer, Korea)을 사용하였다. 미생물의 동정은 genomic DNA를 분리하여 PCR한 후 DNA를 정제하고 정제된 DNA를 sequence를 한 후 염기서열간의 유사도를 확인하기 위하여 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search program을 이용하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 염기서열을 GenBank database와 비교 분석하였다. 16S rRNA gene의 결정된 염기서열과 database에 얻어진 염기서열은 PHYDIT program (http://plaza.snu.ac.kr /~jphydit/phydit)을 이용하여 Clustal W multiple alignment로 정렬하여 계통수을 제작하였다.

효소 활성 측정 및 부분 정제

Culture broth를 준비하기 위해 PCA (Plate Count Agar)배지(trypton 1 g, yeast extract 0.5 g, dextose 0.2 g, agar 3 g) 200 ml를 1 l 삼각 flask에 넣고, 미리 배양한 균주를 접종하여 30°C에서 12 hr, 200 rpm에서 배양하였다. 본 배양은 $CaCO_3$와 dextrose가 첨가된 OSY배지를 사용하였다. 효소 활성 곡선은 overnight배양한 전배양액을 위 배지에 1%가 되게 접종하여 30 hr까지 배양하였으며 2 hr 간격으로 배양액을 채취하여 0°C에 보관하였고 이들 시료의 효소 활성을 측정하였다.

효소의 활성측정은 Leighton의 azocasein 법[8]을 변형하여 사용하였다. 0.5% (w/v) azocasein (Sigma, MO, USA)을 2 mM $CaCl_2$를 포함한 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 용액에 녹여 기질용액으로 사용하였다. 조효소액 및 용출액 0.1 ml을 0.9 ml 0.5% azocasein (pH 7.0) 기질용액에 첨가한 후, 37°C에서 30 min간 반응시킨다. 반응이 끝난 반응액에 0.25 ml 15% trichloroacetic acid (TCA)를 첨가하여 반응을 정지시킨다. 반응액을 Hanil HM-150Ⅳ 고속 원심분리기를 이용하여 12,000 rpm, 10 min 원심분리 시킨 후, 침전물을 제외한 상층액 만을 취해 440 nm에서 흡광도를 측정하였다.

효소 분리 정제를 위해 액체 배지 600 ml씩 넣은 2 l 삼각플라스크 4개에 각각 전배양액을 1%가 되게 접종하여 37°C, 200 rpm, 14 hr 배양하였다. 배양액은 Hanil Supra 22K 초고속 원심분리기를 이용하여 6,000 rpm, 30 min 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 이용하였다.

조효소액을 30 mM Tris-Cl 완충액(pH 7.0)으로 미리 평형시킨 음이온 교환수지인 DEAE-sepharose column (2.0×30 cm)을 사용하여 흡착시킨 후 동일한 완충액(pH 7.0)으로 세척한 후 1 M NaCl을 함유한 30 mM Tris-Cl 완충액(pH 7.0)으로 linear gradient법을 이용해 용출시켰다. Column 통과액과 상층액을 centricon YM-3 devices (Millipore, USA)를 이용하여 농축하였다.

SDS-PAGE상 부분정제 단백질의 확인

Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)는 Laemmli의 방법[7]에 준하여 행하였다.

Separating gel은 10%를 사용하였다. 150 mA에서 2 hr동안 전개 후 Coomassie Brilliant R-250 (Sigma, MO, USA)이 함유된 45% (v/v) methanol, 10% (v/v) glacial acetic acid solution으로 2 hr 동안 염색시키고, 10% (v/v) methanol, 10% (v/v) glacial acetic acid solution 으로 overnight 탈색하여 단백질 band를 확인하였다. 표준 단백질 marker [Phosphorylase b (MW 97,400), Serum albumin (MW 66,200), Ovalbumin (MW 45,000), Carbonic anhydrase (MW 31,000), Trypsin inhibitor (MW 21,500), Lysozyme (MW 14,400)]를 사용하였다.

단백질 분석 및 동정

단백질 분석은 SDS-PAGE Gel 상에 나타난 주요 단백질 band의 peptide들을 제노마인(주)에 의뢰하여 Etan MALDI-TOF (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)를 사용하여 Mass spectrum 분석과 PMF (Peptide Mass Fingerprinting)를 이용하여 분석하였다. PMF로 분석한 data는 Genomine local database에서 일차동정 후 ProFound를 이용한 외부 database search에 의해 동일한 것으로 확인된 자료를 사용하였다.

결과 및 고찰

균주 선별 및 형태적 특성

청국장을 제조하기위하여 콩을 직접 물에 담군 상태에서 30 min간 멸균한 후 60°C까지 식힌 후, 순천 서면에서 수집한 볏짚을 사용하여 청국장을 제조하였다. 제조된 청국장에서 형태적으로 다른 약 100여 종의 균주를 분리하였다. 2차적으로 skim milk배지에서 protease 활성을 보이는 균주를 분리하였고, 또한 fibrin배지에서 단백질분해활성을 보이는 발효 균주를 5종 분리 선발하여 J-1 ~ J-5라 명명하였다. 이들 중에서 fibrin 분해 및 skim milk 분해검사를 실행하였을 때 J-4균주가 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 1).

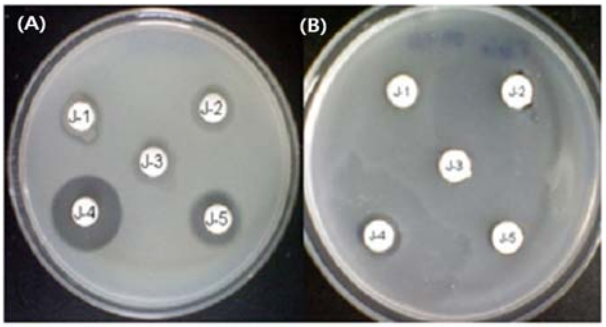

Fig. 1. Protease assay of the strains isolated from Chungkukjang on the nutrient agar including 1% skim milk (A), or fibrin (B).

청국장에서 분리한 균주는 J-1, J-2, J-3, J-5 의 경우 배지상에서 끈적거리는 특성을 보였으며, 모두 제조된 청국장의 특유의 냄새를 가지고 있었다. J-4 균주는 cream 색이며, agar 배지상의 colony형이 불규칙적(irregular)이며 표면은 거칠고 불투명하다. 또한 분리된 균주는 모두 현미경관찰 시 막대형(rod)이었고, 포자 염색 결과 내생포자를 가지고 있었다.

선발 균주 동정

Protease 활성이 좋은 청국장 발효 균주 5종을 동정하기위하여 16S rRNA gene의 염기서열을 분석하였다. Fig. 2에 보여지듯이 J-1과 J-3는 가장 가까운 균으로 관찰되었으며 *Bacillus licheniformis* DSM 13T와 유사하였다. J-4균주 역시 *Bacillus licheniformis* DSM 13T와 유사함을 알 수 있다. 반면에 J-5는 *Bacillus subtilis* subsp DSM 10T에 가까운 분자생물학적인 특성을 보였다. 그러나 J-4 균주만의 16S rRNA염기서열을 이용하여 계통수 및 유사도를 만들었을 때 J-4균주가 *Bacillus subtilis*와 99% 이상의 유전자의 상동성을 보였다(Table 1). 따라서 16S rRNA gene의 염기 서열이 97%를 나타내는 것을 기준으로 종을 구분하는 최근 추세에 따라 J-4가 *Bacillus subtilis* group과 97% 이상의 유사도가 보였으며, 진화적 유연관계를

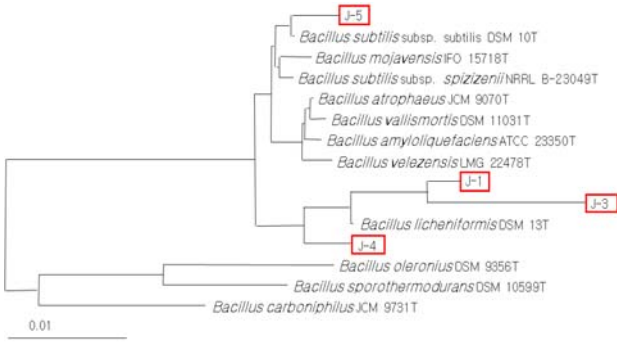

Fig. 2. Phylogenetic tree of strains J-1, J-3, J-4, and J-5 isolated from prepared Chunggukjang based on 16s rDNA sequences. The sequence of *Bacillus carboniphilus* JCM 9731^T was used as an outgroup. Bar, 0.01 nucleotide substitution per position.

나타내는 계통도에서도 이를 뒷받침함으로 본 균주를 *Bacillus subtilis* J-4로 명명하였다(Fig. 2, Table 1).

효소 활성 및 부분 정제

Culture broth를 준비하기 위해 PCA (Plate Count Agar)배지(trypton 1 g, yeast extract 0.5 g, dextose 0.2 g, agar 3 g) 200 ml를 1 l 삼각 flask에 넣고, 미리 배양한 균주를 접종하여 30°C에서 12 hr, 200 rpm에서 배양하여 접종원으로 사용하였다. OSY에 $CaCO_3$와 dextrose가 첨가된 배지를 사용하여 배양 중 배양액의 효소 활성을 시간대별로 측정한 결과, 10 hr부터 급격하게 활성이 증가하기 시작하여 14 hr에 최대 활성을 보였으며 16 hr부터 급격하게 떨어지는 것을 관찰하였다(Fig. 3).

효소 분리 정제를 위한 배양은 액체 배지 600 ml씩 넣은 2 l 삼각플라스크 4개에 각각 전배양액을 1%가 되게 접종하여 37°C, 200 rpm, 14 hr 배양하였다. 배양액은 Hanil Supra 22K 초고속 원심분리기로 6,000 rpm에서 30 min간 원심분리하여 상층액을 정제단계에 사용하였다.

상층액을 30 mM Tris-Cl 완충액(pH 7.0)으로 미리 평형시

Table 1. Identification result of the isolate J-4 based on 16s rRNA gene sequence

Strain	Accession No	Similarity (%)	Nucleotide differences /compared
Bacillus subtilis subsp. *subtilis* NCDO 1769^T	X60646	99.71	4/1383
Bacillus amyloliquefaciens ATCC 23350^T	X60605	99.34	9/1374
Bacillus atrophaeus NCIMB 12899^T	X60607	99.15	11/1301
Bacillus licheniformis DSM 13^T	X68416	97.44	36/1405
Bacillus pumilus NCDO 1766^T	X60637	96.74	44/1348
Bacillus azotoformans ATCC 29788^T	X60609	94.71	69/1305
Bacillus carboniphilus JCM 9731^T	AB021182	94.29	80/1402
Bacillus sporothermodurans DSM 10599^T	U49079	94.10	83/1406
Bacillus circulans NCDO 1775^T	X60613	94.06	79/1330
Bacillus firmus IAM 12464^T	D16268	94.00	84/1399
Bacillus oleronius ATCC 700005^T	AY988598	93.81	87/1405

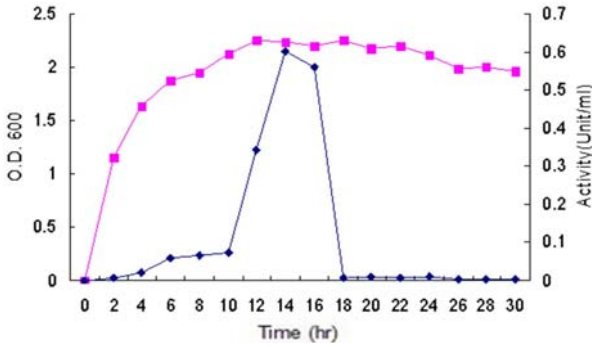

Fig. 3. Time course of protease production during cultivation of strain J-4. ■: O.D. 600 nm, ◆: protease activity.

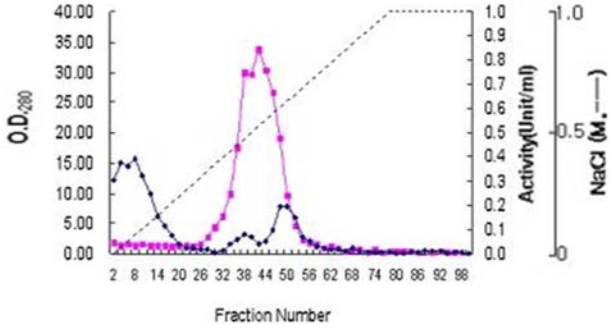

Fig. 4. DEAE-sepharose column chromatography for purification of protease from culture supernatant of strain J-4. ■: O.D. 280 nm, ◆: protease activity, ---: NaCl.

킨 음이온 교환수지인 DEAE-sepharose column (2.0×30 cm)을 사용하여 흡착시킨 후 동일한 완충액(pH 7.0)으로 세척한 후 1 M NaCl을 함유한 30 mM Tris-Cl 완충액(pH 7.0)으로 linear gradient법을 이용해 용출시킨 결과 효소 활성도는 8번 분획에서 최대 peak를 나타내었으며, 그 외에 38번, 50번 분획에서 peak를 나타내었다. O.D.280은 42번 분획에서 최대 peak를 나타내었다(Fig. 4).

단백질 분석 및 동정

단백질 분해효소 활성이 높은 8번, 50번 분획과 배양액 상등액, column 통과액을 Centricon YM-3 devices (Millipore, Uppsala, Sweden)로 농축하여 SDS-PAGE에 의해 분석한 결과 8번 분획에서 28.5 kDa, 50번 분획에서 45.0 kDa, 상등액과 통과액에서 28.5 kDa, 41.9 kDa의 주요 단백질 band를 확인할 수 있었다(Fig. 5). SDS-PAGE gel에서 확인된 주요 단백질

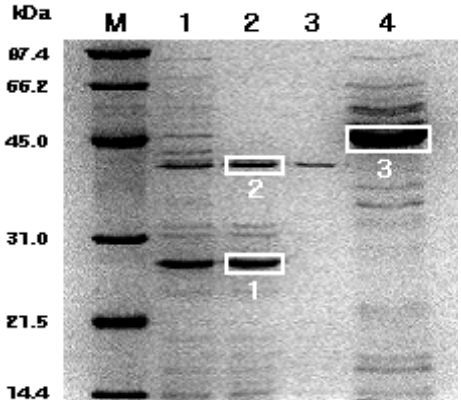

Fig. 5. SDS-PAGE of protein samples obtained during purification of protease from culture supernatant of strain J-4. Lane M: protein marker, Lane 1: supernatant, Lane 2: solution passed through column, Lane 3: Fraction *No.* 8, Lane 4: Fraction *No.* 50.

band 중 통과액의 28.5 kDa, 41.9 kDa 각 단백질 band와 50번 분획의 45.0 kDa 단백질 band를 절단하였다(Fig. 5). 절단한 sample을 분석한 결과 단백질 분해 관련 단백질은 sample 2, 3 단백질이었고, sample 1은 pI 6.4, 27.28 kDa의 beta-glucanase precursor로 확인되었다. Sample 2는 pI 5.5, 32.66 kDa의 neutral protease로 확인되었으며, PMF분석법으로 측정된 21개 peptides 중 17개 peptides가 ProFound database에서 매치되었고, 52% 시퀀스 커버율을 나타냈다. Sample 3은 pI 5.5, 91.76 kDa의 bacillopeptidase F로 검색 되었으며, PMF분석법으로 측정된 8개 peptides 중 7개 peptides가 ProFound database에서 매치되었고, 15% 시퀀스 커버율을 나타냈다(Table 2). 이러한 결과에서 32.66 kDa의 neutral protease는 SDS-gel 상에서 느리게 이동하여 41.9 kDa 크기로 측정되는 현상을 보이는 J-4 균주가 배출하는 주요 단백질임을 알 수 있다. Neutral protease는 *Bacillus subtilis* var. amylosacchariticus에서 분리되고 아미노산서열이 이미 보고되었다[6]. 반면 45 kDa 크기의 protease는 주요 단백질이 아니며 91.76 kDa의 bacillopeptidase F가 배양 혹은 정제 중 분해되었지만 protease활성을 나타내는 단백질임을 알 수 있다[15].

요 약

청국장에서 혈전 용해능이 우수한 균주를 분리하기 위해

Table 2. Identification of the protein purified from J-4 strain by ProFound database analysis

Sample*	Matched peptides/Measured peptides	Minimum sequence coverage	Protein type
1	7/10	26%	β-glucanase precursor
2	17/21	52%	neutral protease
3	7/8	15%	bacillopeptidase F

*Samples represent proteins obtained from SDS-PAGE of Fig. 5.

짚을 이용하여 직접 청국장을 제조하였으며 이로부터 1,000여 종의 균주를 1차적으로 분리하였다. 2차적으로 skim milk가 첨가된 배지 및 fibrin 배지의 단백질분해 실험을 통해 혈전 용해능이 우수한 균주를 분리하였다. 이 과정을 통해 선발된 균주는 J-1, J-2, J-3, J-4, J-5로 명명된 5종 균주이었으며 그 중 *Bacillus* 계통의 J-4 균주가 가장 활성이 높은 균주로 선별되었다. *Bacillus subtilis* J-4 균주가 생산하는 protease를 DEAE-sepharose column을 사용하여 부분 정제 분리한 결과 SDS-PAGE Gel 상에서 45.0 kDa의 질량이었다. 이 단백질을 MALDI-TOF 및 PMF(Peptide Mass Fingerprinting)를 사용하여 분석한 결과 neutral protease와 bacillopeptidase F가 확인되었다.

References

1. Ahn, Y. S., Y. S. Kim, and D. H. Shin. 2006. Isolation, identification, and fermentation characteristics of *Bacillus* sp. with high protease activity from traditional cheonggukjang. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38,** 82-87.
2. Chun, D. S., D. K. Kang, and H. K. Kim. 2002. Isolation and enzyme production of a neutral protease-strain, *Bacillus* sp. DS-1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30,** 346-351.
3. Fujii, M., M. Takagi, T. Imanaka, and S. Aiba. 1983. Molecular cloning of a thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus* in vector plasmid and its expression in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bact.* **154**, 831-837.
4. Godfrey, T. and S. West. 1996. *Industrial Enzymology*. 2nd eds., Macmillian Publishers Inc., New York.
5. Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganism. *Agric. Biol. Chem.* **35,** 1407-1414.
6. Kobayashi, R., T. Yoshimoto, and D. Tsuru. 1989. Complete amino acid sequence of neutral protease from *Bacillus subtilis* var. amylosacchariticus. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2737-2749.
7. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
8. Leighton, T. J., R. H. Doi, R. A. J. Warren, and R. A. Kelln. 1973. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **76**, 103-122.
9. Paul, P., U. Faust, W. Sitting, and A. S. Dieter. 1987. Fundamentals of Biotechnology, pp. 493-498, VCH, New York.
10. Payne, W. J. 1963. Pure culture studies of the degradation of detergent compounds. *Biotechnol. Bioeng.* **5**, 355.
11. Peng, Y., X. Yang and Y. Zhang. 2005. Microbial fibronolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity *in vivo*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69,** 126-32.
12. Rao, M. B., A. M. Tankale, M. S. Ghatage, and V. V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**. 597-635.
13. Reed, G. 1975. *Enzymes in Food Processing*. pp. 123-179, Academic Press, New York.
14. Ward, O. P. 1985. Proteolytic Enzymes, pp. 789-792, *In* Murray, M. Y. (eds.), *Comprehensive Biotechnology*, Pergamon Press, New York.
15. Wu, X. C., S. Nathoo, A. S. Pang, T. Carne, and S. L. Wong. 1990. Cloning, genetic organization, and characterization of a structural gene encoding bacillopeptidase F from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **265**, 6845-6850.