

제주전통된장으로부터 세포외효소 분비능이 우수한 미생물의 분리 및 특성

오유성¹ · 박지은¹ · 오현정¹ · 김정현² · 오명철³ · 오창경³ · 오영주⁴ · 임상빈^{1,5*}

¹제주대학교 생명과학기술혁신센터, ²제주관광대학 관광외식조리계열
³제주산업정보대학 관광호텔조리과, ⁴제주한라대학 호텔조리과
⁵제주대학교 식품생명공학과

Isolation and Characteristics of Microorganisms Producing Extracellular Enzymes from Jeju Traditional Fermented Soybean Paste (*Doenjang*)

You-Sung Oh¹, Ji-Eun Park¹, Hyun-Jeong Oh¹, Jung Hyon Kim², Myung-Cheol Oh³,
Chang-Kyung Oh³, Young-Ju Oh⁴, and Sang-Bin Lim^{1,5*}

¹Biotechnology Regional Innovation Center, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²Dept. of Tourism & Food Service Cuisine, Cheju Tourism College, Jeju 690-791, Korea

³Dept. of Tourism Hotel Culinary Arts, Jeju College of Technology, Jeju 690-714, Korea

⁴Dept. of Hotel Culinary Arts, Jeju Halla College, Jeju 690-708, Korea

⁵Dept. of Food Bioengineering, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract

Bacteria strains with high activities of extracellular enzymes (protease, fibrinolytic enzyme, amylase, cellulase, and lipase) were isolated from Jeju traditional fermented soybean paste (*Doenjang*), and characterized by 16S rRNA gene sequence analysis and physiological properties. Protease activities were higher in JR14, JR19, JR25, JR32, JR38, JR47, and JR64 than *Bacillus subtilis* KCCM 12027 (standard strain). Amylase activities were shown in JR6, JR25, JR38, JR56 and JR81, while not in KCCM12027. Cellulase activities were higher in JR6, JR14, JR48, and JR65 than those of other isolated strains and KCCM 12027 whereas lipase activities were the higher in JR-14 and JR-48. Thrombolytic activity in JR19 with high hemolysis activity were 192% compared with that of plasmin as a positive control. Zymogram analysis indicated that the thrombolytic active strains had 4~5 bands in the molecular weight range of 25~75 kDa. Gene sequence analysis of rRNA revealed that the isolated stains had 99% homology with *Bacillus* species, and the thrombolytic active stain JR19 was *B. stratosphericus* 41KF2a^T.

Key words: Jeju traditional *Doenjang*, extracellular enzyme, *Bacillus* species

서 론

콩 발효식품은 콩에 함유되어 있는 우수한 단백질, 지방 등이 다양한 미생물의 작용에 의해 몸에 흡수되기 쉬운 형태로 전환되어 질병을 예방하거나 면역능력을 향상시키는 것으로 알려져 있다(1,2). 특히 전통된장은 제조과정 중 메주를 건조시키는 과정에서 수많은 미생물이 성장하게 되어, 된장의 숙성과정에서 당질은 단당류로 분해되고 단백질은 저분자의 펩타이드와 아미노산으로 분해되는데 일부 아미노산은 된장 특유 향기성분의 주원인으로 알려져 있다. 된장숙성에 관여하는 주요 미생물로는 *Bacillus licheniformis*, *B. pumilis*, *B. subtilis* 등이 보고되고 있다(3,4).

현대인은 과거와 다른 식습관에 따라 혈액순환 장애에 의한 심혈관계 질환을 비롯한 여러 가지 성인병의 발병률이

높아져 사회문제로 대두되고 있다. 우리나라 국민의 주요 사망원인인 심혈관질환은 식품에 의해 1차적으로 예방되거나 2차적으로 발병기간을 연장할 수 있다고 알려지고 있다(5).

우리나라의 된장 및 청국장을 비롯하여 일본의 miso 및 natto, 중국의 douche, 인도네시아의 tempeh 등 콩 발효식품에서 혈전용해 활성, 항산화, 혈압강하, 동맥경화저해 등 기능성에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다(6-8). 특히 발효미생물에 의해 생성되는 혈전용해효소는 혈액순환계 질환의 여러 요인들 중에 주요한 원인으로 알려지고 있는 혈전 현상에 적용될 수 있다.

혈전은 혈류 중의 fibrinogen이 활성화된 thrombin에 의해 fibrin으로 전환되어 불용성의 중합체를 형성함으로써 생성되므로 fibrin의 용해를 담당하고 있는 plasmin의 생성을 증가시키면 혈전의 용해가 부작용 없이 쉽게 이루어질 수

*Corresponding author. E-mail: sblim@jejunu.ac.kr
Phone: 82-64-754-3617, Fax: 82-64-755-3601

있다. 혈전용해에는 plasminogen activator(streptokinase, urokinase, single chain prourokinase, tissue plasminogen activator)가 주로 사용되는데, 이들의 사용은 부작용, 작용 시간의 제한 및 경제성 등 많은 문제점을 가지고 있다(9).

전통된장의 기능성 성분으로는 콩에 함유되어 있는 주요 영양성분인 단백질, 지방 외에 식이섬유, 인지질, isoflavones, saponins 등이 알려져 있으며, 이들 기능성 성분과 우수 균주를 활용하여 기능성 된장개발에 관한 연구가 이루어지고 있다(10). 또한 콩으로 만든 전통발효식품이나, 콩 가수분해물에서 유래된 여러 종류의 펩타이드들이 항종양, 혈압강하, 혈청콜레스테롤 강하활성을 갖는 신기능성 식품소재로서 응용될 수 있는 가능성이 제기되고 있다(11-13).

제주전통된장은 제주지역의 식문화 및 식생활에서 아주 중요한 부분을 차지하지만 제주전통된장에 대한 연구로는 isoflavones의 함량 및 된장 품질 특성(14,15) 외에 발효미생물 또는 그 기능적 측면에 대한 체계적인 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 제주에서 전통 방식으로 제조하여 판매하고 있는 업체의 된장을 수거하여 미생물을 순수 분리하였으며, 분리된 미생물의 protease, fibrinolytic enzyme, amylase, cellulase, lipase 등 세포외효소 분비능을 측정하였다. 또한 세포외효소 분비능이 우수한 균주의 생화학적 특성 및 계통수를 분석하여 제주전통된장의 발효과정에서 유용한 효소생산에 관여하는 미생물을 선발하여 제주전통된장 제조방법의 체계화 및 과학화의 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

시료

된장은 제주도에서 전통적인 방법으로 제조 판매하고 있는 4개 업체로부터 수거하여 사용하였다.

균주의 분리

된장으로부터 protease, amylase, cellulase, lipase의 분비능이 우수한 균주는 다음과 같이 분리하였다. 즉, 생리식염수 90 mL에 시료 10 g를 넣어 교반기로 12시간 진탕하여 정치시킨 후 상등액을 취하여 표준 희석법으로 희석하고, 희석액을 각각의 기질이 100 μ L 첨가된 nutrient agar(NA) 배지에 평판도말 하여 35°C에서 24시간 배양한 후 투명환(clear zone)을 나타내는 균주를 1차 선별하였다.

세포외효소 분비능 측정

Protease 분비능은 2% skim milk를 첨가한 NA 배지에 균주를 접종하여 35°C에서 48시간 배양하고 집락 주위의 투명환을 관찰하였다. Amylase 분비능은 2% soluble starch를 첨가한 NA 배지에 균주를 접종하여 35°C에서 48시간 배양한 후 iodine으로 염색하여 starch 분해활성을 측정하였다.

Cellulase 분비능은 2% carboxymethyl cellulose을 NA 배지에 첨가하여 평판배지를 만들고 균주를 접종하여 35°C에서 48시간 배양한 후 0.1% congo red로 30분간 염색하고 1 M NaCl 용액으로 세척하여 집락 주위의 투명환을 관찰하였다. Lipase 분비능은 1% tributyrin을 첨가한 NA 배지에 균주를 접종하고 35°C에서 48시간 배양한 후 균 주위의 투명환을 관찰하였다.

혈전용해 활성 및 hemolysis 활성 측정

세포외효소 분비능 측정실험을 통하여 protease 활성이 우수한 균주를 선발한 후, Astrup과 Mullertz의 방법(16)을 약간 변형하여 fibrinogen을 0.3%가 되도록 인산완충용액(0.1 M, pH 7.4)에 용해시키고 평판에 부은 후 2% agarose 용액을 동량 첨가하여 혼합하였다. 여기에 thrombin(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 100 μ L 첨가하여 실온에서 고화시키고 지름 5 mm 정도의 구멍을 뚫은 후 균 배양액 25 μ L을 분주하여 35°C에서 48시간 반응시켰다. 양성 대조구로는 plasmin(1.0 U/mL Sigma Co.)을 사용하였고, 음성 대조구로는 NA 배지를 사용하였다.

$$\text{혈전용해활성(\%)} = \frac{\text{시료의 용해 영역}}{\text{plasmin의 용해 영역}} \times 100$$

한편, hemolysis 활성은 혈전용해 활성이 우수한 균주를 sheep blood agar plate에 spot하여 35°C에서 24~48시간 배양하고 용혈된 환의 생성을 확인하여 측정하였다.

Zymogram 측정

10% polyacrylamide gel에 gelatin을 첨가하여 최종 농도가 0.1 mg/mL이 되도록 하였다. 균 배양액 20 μ L에 sample buffer(10% SDS, 50% glycerol, 25 mM Tris-HCl(pH 6.8), 0.1% bromophenol blue)를 혼합하여 gel에 loading하고 전기영동 하였다. Gel을 2.5% Triton X-100에서 20분간 2회 세척하고 다시 증류수로 20분간 2회 세척하였다. 세척된 gel은 reaction buffer(1 M Tris(pH 7.5), 1 M CaCl₂, 5 M NaCl, 0.2 mM ZnCl₂, 25% TX-100, 0.2% NaN₃)에 넣어 37°C에서 16시간 반응시킨 후 Comassie blue R250으로 1시간 염색하고 50% 메탄올과 10% 빙초산으로 탈색하였다.

분리균주의 특성 및 16S rRNA 유전자 염기서열 분석

분리균주의 생리적 특성은 API 50CHB, API 20E(Bio-merieux Inc., Marcy l'Etoile, France)로 측정하였는데, 선택된 지시약이 포함된 kit medium에 접종하고 strip에 분주하여 24시간과 48시간 경과 후 API analytical profile index로 분석하였다. 그리고 16S rDNA를 증폭하기 위해 universal PCR primer 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1522R(5'-AAG GAG GTG ATC MRC CGC A-3')을 사용하였다. PCR 조건은 다양한 농도(10~100 ng)의 DNA를 주형으로 사용하고 2.5 U Taq polymerase, 0.2 μ M primers, 200 μ M dNTPs와 10배의 반응용액(100 mM

Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 500 µg·mL⁻¹ BSA, pH 8.3)을 첨가하고 최종 부피를 50 µL로 하여 95°C에서 5분간 반응시키고, 95°C에서 1분, 55°C에서 1분 및 72°C에서 1분 반응을 33회 수행한 후, 최종적으로 72°C에서 10분간 반응시켰다. 1% agarose gel에서 전기영동으로 DNA 증폭 산물을 확인하고 1.5 kbp의 16S rDNA 증폭 산물을 QIAEX II gel extraction kit(QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 정제하였다. 정제된 증폭산물의 염기서열은 Big-Dye Cycle sequencing kit와 ABI 3100 Genetic analyzer(PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 분석된 염기서열은 NCBI GenBank database (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)의 염기서열과 비교하여 계통분류학적 유연관계를 분석한 후 PHYLIP package v. 3.6(7)을 이용하여 kimura 2-parameter distance model(13)과 neighbor-joining method에 의해 염기서열간의 유전적 거리와 phylogenetic tree를 추론하였으며 각각의 branch의 bootstrap 값은 1,000회의 재구성된 자료로부터 새로운 tree를 작성하여 계산하였다.

결과 및 고찰

된장으로부터 세포외효소 분비능이 우수한 균주의 선발된장은 발효과정에서 다양한 미생물에 의하여 protease, amylase, cellulase, lipase 등이 분비되어 콩에 함유되어 있는 단백질, 올리고다당류, isoflavones, 지질 등이 소화되기 쉬운 형태의 아미노산, 유리당, isoflavones aglycon, 지방산 등으로 분해되어 향산화, 혈전용해 등의 기능을 갖는 2차 산물이 생성된다(4,11,12). 제주 전통된장으로부터 표준회석법을 이용하여 100 여종의 균주를 선발하고 세포외효소 분비능이 우수한 균주 12종을 선발하였다. 선발된 균주 중 JR14, JR19, JR25, JR32, JR38, JR47, JR64의 7종은 2% skim milk를 첨가한 nutrient agar(NA) 배지에서 *Bacillus subtilis* KCCM12027보다 clear zone이 더 크게 형성되어 protease 분비능이 우수함을 확인할 수 있었다. 그리고 amylase 분비능은 표준균주 KCCM12027에서는 활성을 보이지 않았으나 JR6, JR81에서는 활성이 우수하였다(Table 1). Cellulose는 미생물에 의해 분해되어 이용되는데, 곰팡이 및 세균 등에 의하여 분비되는 cellulase 성분으로는 endo-1,4-β-D-glucanase, exo-1,4-β-D-glucanase, β-glucosidase가 있으며, 콩 발효과정에서는 β-glucosidase에 의하여 isoflavones 배당체가 aglycon으로 전환되어 향산화 등의 기능을 나타내는 것으로 알려져 있다(11). 제주전통된장에서 분리한 균주의 cellulase의 분비능은 JR6, JR14, JR48, JR65 균주가 표준균주 KCCM12027보다 우수함을 알 수 있었으며, lipase 분비능은 JR14와 JR48가 우수하였다(Table 1). 콩에 다량 함유되어 있는 지방(약 20%)은 된장의 발효과정에서 미생물이 분비하는 lipase의 작용에 의하여 다양한 지

Table 1. Activities of extracellular enzymes from strains isolated from Jeju traditional *Doenjang*

Strains	Clear zone			
	Amylase	Cellulase	Lipase	Protease
JR06	+++	+++	+	-
JR14	-	+++	++	+++
JR19	-	+	+	+++
JR25	++	++	+	+++
JR32	-	++	+	+++
JR38	++	++	+	+++
JR47	-	++	+	+++
JR48	-	+++	++	+
JR56	++	-	+	+
JR64	-	++	+	+++
JR65	-	+++	+	-
JR81	+++	++	+	++
KCCM12027	-	+	+	+++

-: not shown, +: 0.30 mm 이하, ++: 0.31~0.50 mm, +++: 0.51~0.80 mm.

방산을 생성하는데, Oh 등(17)에 의하면 필수지방산인 linoleic acid가 61.5~62.2%의 함량을 보인다고 보고하였다.

혈전용해 활성 측정

Protease활성이 표준균주보다 높은 균주 7종 중(Table 1), 활성이 우수한 JR19, JR32, JR47과 JR64 균주의 혈전용해 활성을 측정하기 위하여 nutrient broth에서 15시간 배양한 후 원심분리하고 상등액을 조효소액으로 사용하여 fibrin plate에서 혈전용해 활성을 측정하였으며(Fig. 1), plasmin (1.0 U/mL)과 nutrient broth를 각각 positive와 negative control로 측정하였다. Plasmin은 0.0045 unit에서 0.5 unit으로 증가할수록 fibrin plate 용해환의 면적이 증가하였다 (data not shown). 선발된 4개의 균주와 KCCM12027 균주의 protease 활성은 비슷하였으나(Fig. 1A), fibrin 용해활성은 positive control인 plasmin의 용해 영역(3.25 mg)에 비하여 JR19가 192%로 6.25 mg의 fibrin을 용해시켰으며, JR47, JR64와 JR32가 77%와 61%의 용해활성을 나타내었다(Fig. 1B & Table 2).

지금까지 우리나라를 비롯하여 중국, 태국 등의 콩을 이용한 전통발효식품에서 혈전용해 및 면역 활성 등 다양한 기능이 밝혀지고 있는데(18-20), 중국의 전통식품인 *Douchi*

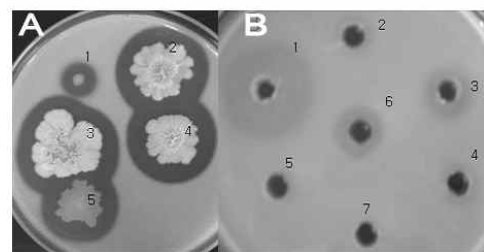


Fig. 1. Protease (A) and fibrinolytic activity (B) of the strains isolated from Jeju traditional *Doenjang*. 1: JR19, 2: JR32, 3: JR47, 4: JR64, 5: KCCM12027, 6: plasmin as positive control, 7: nutrient broth as negative control.

Table 2. Fibrinolytic activities of the culture supernatants from the strains isolated from Jeju traditional *Doenjang*

Sample	Clear zone (cm ²)	Degraded fibrin (mg)	Fibrinolytic activity (%)
Nutrient broth	0	0	0
Plasmin	1.33	3.25	100
KCCM12027	0	0	0
JR19	4.91	6.25	192
JR32	0.50	2	61
JR47	0.79	2.5	77
JR64	0.50	2	61



Fig. 2. Hemolysis activity of the strains isolated from Jeju traditional *Doenjang*. 1: JR19, 2: JR32, 3: JR47, 4: JR64, 5: KCCM12027.

에서 혈전용해능이 우수한 *B. subtilis* DC33이 보고되어 있고(21), 태국의 콩 전통발효식품에서 분리한 *B. licheniformis*와 *B. subtilis* 등이 알레르기를 감소시킨다는 보고가 있다(6).

Hemolysis 활성을 갖는 균주 확인

제주 전통된장에서 혈전용해능이 우수한 균주의 sheep blood agar plate에서 hemolysis를 측정된 결과(Fig. 2), 혈전용해능이 가장 우수한 JR19가 가장 높은 hemolysis 활성을 나타내었다. Gabriela와 Jaroslava(22)는 *B. subtilis*에서 분리한 물질인 surfactin이 강력한 항균, 항바이러스, 항염증 및 항혈전 효과가 있는 것으로 보고하였다. 따라서 제주 전통된장에서 분리한 균주인 JR19도 surfactin으로서의 가능성이 있을 것으로 추정되었다.

혈전용해 활성을 갖는 균주의 zymography

Matrix metalloproteinases(MMPs)의 여러 분자들은 세포의 혈전용해 시스템과 관련이 있다고 알려져 있는데(23), 제주 전통된장에서 분리한 혈전용해능이 높은 균주인 JR19, JR32, JR47, JR64가 gelatin을 이용함을 알 수 있었다(Table 3). 따라서 각각의 균주 배양액을 zymography한 결과, 25~75 kDa 사이에서 4~5개의 밴드가 확인되었다(Fig. 3). Jeong 등(24)도 청국장에서 분리한 *B. subtilis* CH3-5에서 분리되는 혈전용해효소는 63, 47, 29, 20 kDa 등 적어도 4개의 분자를 SDS-PAGE와 zymography로 확인한 바 있다.

MMPs 중에서 MMP-2는 gelatinase-A로 잠재적인 형태는 70, 65 kDa를, 활성형은 61, 58 kDa의 분자량을 가지며 fibronectin type II에 관여한다고 알려져 있으며, MMP-9는 gelatinase-B로 잠재적 형태는 94 kDa와 활성형의 83 kDa의 분자량을 갖는 것으로 보고되어 있다(23). 따라서 제주 전통된장에서 분리한 JR19는 fibrin plate에서 가장 높은 활

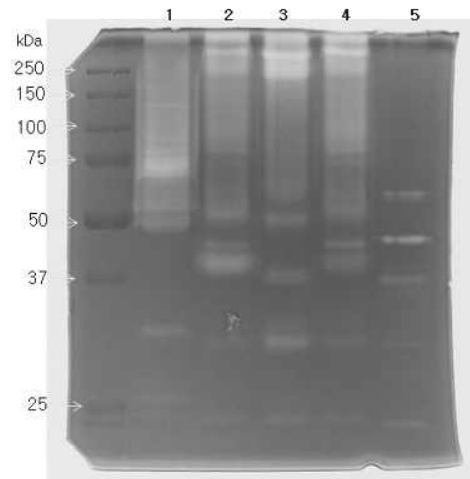


Fig. 3. Zymogram of SDS-PAGE the strains isolated from Jeju traditional *Doenjang*. 1: JR19, 2: JR32, 3: JR47, 4: JR64, 5: KCCM12027.

성을 보였으며, zymography한 결과 65~75 kDa의 분자량에서 강한 활성을 나타내는 것으로 보아 MMP-2의 활성과 관련이 있을 것으로 추정된다. 앞으로 MMPs와 제주 전통된장에서 분리된 균주 배양액의 혈전용해 활성과의 관계에 대한 보다 깊은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

분리균주의 동정

제주 전통된장으로부터 세포외효소 분비능이 우수한 균주 7종을 동정하기 위하여 형태학적 특성과 API 20E 및 API 50CH을 이용하여 생리·생화학적 특성을 측정하였다. 분리된 균주는 공통적으로 gram 양성이었다고 포자를 형성하며, 길이가 2.0~5.4 μm , 폭이 1.0~1.8 μm 의 간균으로 나타냈다(data not shown). Oxidase, catalase와 gelatin에 의한 가수분해는 양성반응으로 나타났으며, nitrate 환원, indole 생성, citrate 이용, H₂S 생성, acetoin 생성, 그리고 arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithinedecarboxylase, urease와 typtophane deaminase의 활성 반응은 모두 음성으로 나타났다(data not shown). 그리고 β -galactosidase 반응은 JR19 균주에서만 양성으로 나타났으며, VP test는 JR25, JR47 그리고 JR64 균주에서 양성반응으로 나타났다. 분리된 균주의 탄소원 이용성을 분석한 결과 glycerol, L-arabinose, D-ribose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, methyl- α -D-glucopyranoside, esculin ferric citrate, salicin, D-cellobiose, D-saccharose, D-trehalose를 공통적으로 이용함을 알 수 있었다(Table 3). 특히 JR19 균주는 분리된 다른 균주와는 달리 D-galactose와 *N*-acetylglucosamine를 이용하고 inositol과 D-maltose를 이용하지 않음을 알 수 있었다(Table 3). 또한 API analytical profile index를 분석한 결과, JR48과 JR64 균주를 제외한 분리 균주 대부분이 98.0% 이상의 신뢰도를 보이는 *Bacillus* 속의 이종으로 분석되었다(Table 4).

Table 3. Biochemical utilization of the strains isolated from Jeju traditional *Doenjang*

Substrate	JR19	JR32	JR47	JR64	JR25	JR48	JR81
Gelatin	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinose	+	+	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+
D-xylose	+	+	+	+	+	-	+
L-xylose	-	-	-	-	-	-	-
D-adonitol	-	-	-	-	-	-	-
Methyl-β D-xylopyranoside	-	-	-	-	-	-	-
D-galactose	+	-	-	-	-	-	-
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+
D-fructose	+	+	+	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbose	-	-	-	-	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	+	+	+	+	+	+
D-mannitol	+	+	+	+	+	+	+
D-sorbitol	-	+	+	+	+	+	+
Methyl-α D-mannopyranoside	+	-	-	-	-	-	-
Methyl-α D-glucopyranoside	+	+	+	+	+	+	+
N-acetylglucosamine	+	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	+	+	+	+	+	-	+
Arbutin	+	+	+	+	+	-	+
Esculin ferric citrate	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+
D-cellobiose	+	+	+	+	+	+	+
D-maltose	-	+	+	+	+	+	+
D-lactose (bovine origin)	-	+	+	+	+	-	+
D-melibiose	+	+	+	+	+	-	+
D-saccharose (sucrose)	+	+	+	+	+	+	+
D-trehalose	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-
D-melezitose	-	-	-	-	-	-	-
D-raffinose	+	+	+	+	+	-	+
Amidon (starch)	-	+	-	-	-	-	+
Glycogen	-	+	-	-	-	-	+
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	+	+	+	+	+	-	-
D-turanose	-	-	±	±	±	+	-
D-lyxose	-	-	-	-	-	-	-
D-tagatose	+	-	-	-	-	+	-
D-fucose	-	-	-	-	-	-	-
L-fucose	-	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-
Potassium gluconate	-	-	-	-	-	-	-
Potassium 2-ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-
Potassium 5-ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-

+: positive, -: negative.

된장으로부터 분리한 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열을 이용하여 상동성 분석을 수행한 결과, 분리된 균주의 계통적 유사도는 *Bacillus* 속과 대부분 99%의 높은 유사도를 보였다(Table 4). 특히 혈전용해능이 우수한 JR19 균주는 *B. stratosphericus* 41KF2a^T, *B. altitudinis* 41KF2b^T 그리고 *B. aerophilus* 28K^T와 99.8%, *B. pumilus* DSM 27^T와는 99.5%의 유사성을 나타내었다. Lipase 분비능이 우수한 JR48 균주는 *B. licheniformis* ATCC 14580T 및 *B. aerius*

24K^T와는 99.3%의 유사성을 보였고, *B. sonorensis* NRRL B-23154^T와는 99.2%의 유사성을 보였다. 다른 분리 균주들은 *B. subtilis*와 99.5%의 유사성을 보였고, *B. amyloliquefaciens*와는 99.3%의 유사성을 나타내었다(Fig. 4). 또한 분리된 균주들의 계통학적 유연관계를 알아보기 위하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 기초로 하여 *Bacillus* 속의 표준 종들과의 유연관계를 조사한 결과, JR19 균주는 *B. altitudinis* 41KF2b^T, *B. stratosphericus* 41KF2a^T 그리

Table 4. Identification of the isolated strains from Jeju traditional *Doenjang* using an API 50CHB-kit and 16S rRNA gene sequence

Strains	Significant taxa	% ID	
		API 50CHB	16S rRNA sequence
JR19	<i>Bacillus stratosphericus</i>	—	99.8
	<i>B. pumilus</i>	99.9	99.5
JR25	<i>B. subtilis/B. amyloliquefaciens</i>	99.9	99.2/99.2
JR32	<i>B. subtilis/B. amyloliquefaciens</i>	99.9	99.5/99.4
JR47	<i>B. subtilis/B. amyloliquefaciens</i>	99.9	99.5/99.4
JR48	<i>B. licheniformis</i>	38.5	99.3
	<i>B. pumilus</i>	53.5	96.1
JR64	<i>B. subtilis/B. amyloliquefaciens</i>	87.1	99.4/99.5
	<i>B. licheniformis</i>	12.8	97.7
JR81	<i>B. subtilis/B. amyloliquefaciens</i>	98.4	99.5/99.6

고 *B. aerophilus* 28K와 가장 가까운 관계를 보여 주었고, JR48 균주는 *B. sonorensis* NRRL B-23154^T, *B. licheniformis* ATCC 14580^T 그리고 *B. aerius* 24K^T와 그룹을 형성하고 있음을 보여 주었다. 다른 분리 균주는 *B. subtilis* NBRC 13719^T, *B. amyloliquefaciens* ATCC 23350^T 그리고 *B. mojavensis* IFO 15718^T와 같은 그룹에 속하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 상기의 형태 및 생리생화학적 특성을 조사한 결과와 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석을 바탕으로

분리된 균주들은 *Bacillus* 속에 속하는 종으로 나타났다.

본 연구에서 제주전통된장의 발효과정에 *Bacillus*속 미생물의 관여가 필수적으로 요구됨을 알 수 있었으며, protease, amylase, cellulase, lipase 분비능이 우수한 균주를 된장의 제조공정에 활용하면 제주전통된장의 품질 과학화에 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 JR19는 fibrinolytic enzyme를 강하게 분비하므로 활용할 만한 가치가 있을 것으로 추정된다.

요 약

제주 전통된장으로부터 세포외효소(protease, fibrinolytic enzyme, amylase, cellulase, lipase) 분비능이 우수한 세균을 분리한 후 16S rRNA 유전자 분석과 생리적 특성을 분석하여 균주를 확인하고자 하였다. Protease 분비능은 JR14, JR19, JR25, JR32, JR38, JR47과 JR64가 표준균주인 *Bacillus subtilis* KCCM12027보다 활성이 높았다. Amylase 분비능은 JR6, JR25, JR38, JR56, JR81에서 나타난 반면 표준균주인 KCCM12027에서는 나타나지 않았다. Cellulase 분비능은 JR6, JR14, JR48과 JR65가 다른 분리균주 또는 표준균주보다 높았으며, lipase 분비능은 JR14와 JR48이 높았

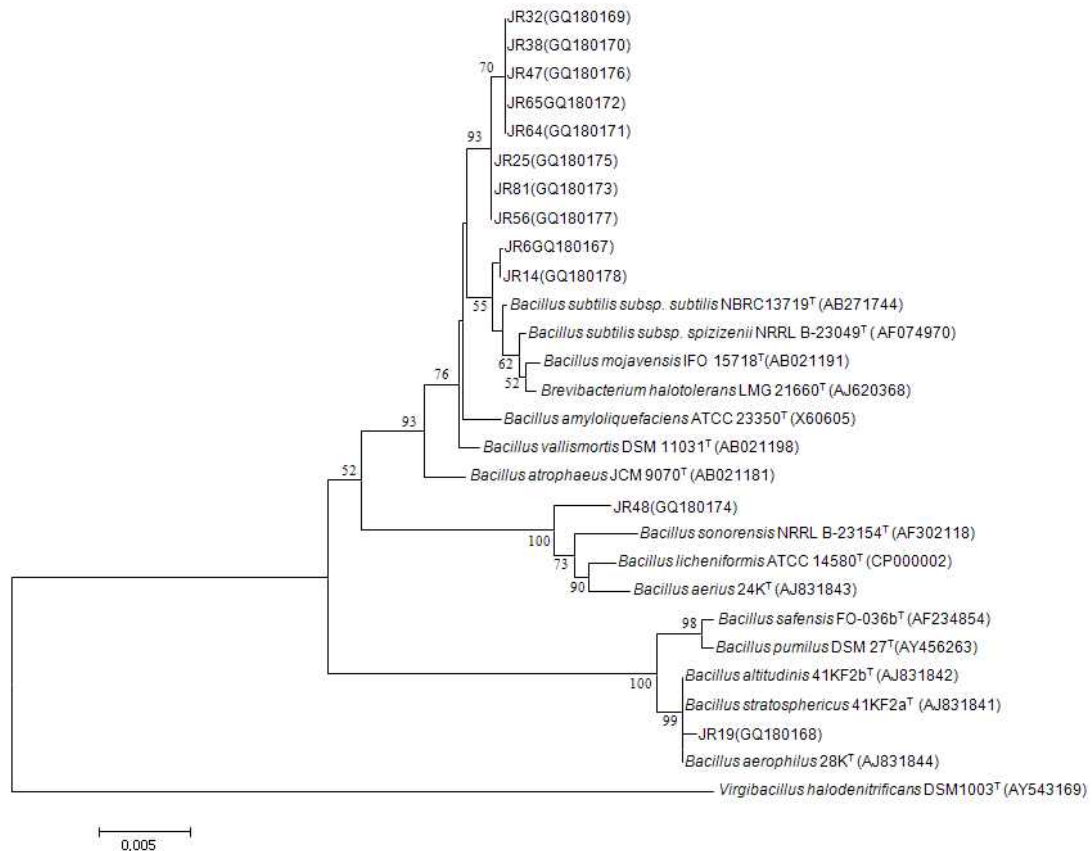


Fig. 4. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the positions of the strains producing extracellular enzymes isolated from Jeju traditional *Doenjang*.

다. 혈전용해 활성은 positive control인 plasmin의 용해 영역에 비하여 JR19가 192%로 가장 높았고, hemolysis 활성도 높았다. 혈전용해능이 있는 균주인 JR19, JR32, JR47, JR64의 배양액을 zymography한 결과, 25~75 kDa 사이에서 4~5개의 밴드가 확인되었다. 된장으로부터 분리한 균주들의 16s rRNA 유전자 염기서열을 분석한 결과 모두 *Bacillus* species와 99%의 상동성을 나타내었으며, 혈전용해능이 가장 우수한 JR19는 *B. stratosphericus* 41KF2a^T와 거의 일치하였다.

감사의 글

본 연구는 2009년도 제주특별자치도의 제주형 발효식품 산업육성 클러스터사업을 제주대학교 생명과학기술혁신센터(제주대 RIC)에서 수행한 연구결과의 일부로, 이에 감사드립니다.

문헌

1. Yoshikatsu M, Mitsuo Y. 2008. Traditional healthful fermented products of Japan. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 791-798.
2. Susumu M, Hitomi Y, Toshiko K, Tomoyuki S, Ryohei FT, Ikuko N. 2008. Immunomodulatory effect of halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* Th221 from soy sauce moromi grown in high-salt medium. *Int J Food Microbiol* 121: 245-252.
3. Kwon HY, Ryu HY, Kwon CS, Lee SH, Sohn HY. 2007. Optimization of culture conditions of *Bacillus pumilis* JB-1 for *Chungkookjang* fermentation in soybean boiling-waste liquor medium. *Kor J Microbiol Biotechnol* 35: 304-309.
4. Yoo SK, Cho WH, Kang SM, Lee SH. 1999. Isolation and identification of microorganisms in Korean traditional soybean paste and soybean sauce. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 27: 113-117.
5. Feldeisen SE, Tucker KL. 2007. Nutritional strategies in the prevention and treatment of metabolic syndrome. *Appl Physiol Nutr Metab* 32: 46-60.
6. Phromraksa P, Nagano H, Boonmars T, Kamboonruang C. 2008. Identification of proteolytic bacteria from Thai traditional fermented food and their allergenic reducing potentials. *J Food Sci* 73: 189-195.
7. Kim SB, Lee DW, Cheigh CI, Cheo EA, Lee SJ, Hong YH, Choi HJ, Pyun YR. 2006. Purification and characterization of a fibrinolytic subtilisin-like protease of *Bacillus subtilis* TP-6 from an Indonesian fermented soybean, Tempeh. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33: 436-444.
8. Deepak V, Kalishwaralal K, Ramkumarbandian S, Venkatesh BS, Senthilkumar SR. 2008. Optimization of media composition for nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology. *Biores Technol* 99: 8170-8174.
9. Ro YM. 1998. How important is the mode of thrombolytic agents administration for optimal thrombolysis?—comments on the results of double bolus urokinase regimen in thrombolysis in myocardial infarction in Korea (TIMIKO) multicenter trial. *Kor Circul J* 28: 1661-1663.
10. Omura K, Hitosugi M, Zhu X, Ikeda M, Maeda H, Tokudome S. 2005. A new derived protein from *Bacillus subtilis* natto with both antithrombotic and fibrinolytic effects. *J Pharmacol Sci* 99: 247-251.
11. Ra KS, Oh SH, Kim JM, Suh HJ. 2004. Isolation of fibrinolytic enzyme and β -glucosidase producing strains from *Doenjang* and optimum conditions of enzyme production. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 439-442.
12. Ryu BH. 2003. Development of functional *Doenjang* for antioxidant and fibrinolytic activity. *Kor J Life Sci* 13: 559-568.
13. Hyun KW, Lee JS, Ham JH, Choi SY. 2005. Isolation and identification of microorganism with potent fibrinolytic activity from Korean traditional *Doenjang*. *Kor J Microbiol Biotechnol* 33: 24-28.
14. Shin GM. 2004. Studies on quality characteristics of the traditional *Doenjangs* in Jeju. *MS Thesis*. Jeju National University, Jeju, Korea.
15. Hyun GT, Koh SH, Chun CB, Lee CH. 2004. Studies on the contents of isoflavone in traditional soybean paste and soybeans in Jeju-do. Report of J.I.H.E. 15: 45-66.
16. Astrup T, Mullertz S. 1952. The fibrin method for estimating of fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys* 40: 346-351.
17. Oh HJ, Lim JH, Lee JY, Jeon BS, Kang HY, Oh YS, Oh YJ, Lim SB. 2009. Quality characteristics of Jeju traditional *Doenjang*. *Kor J Cul Res* 15: 298-308.
18. Choi NS, Chung DM, Han YJ, Kim SH, Song JJ. 2009. Purification and Characterization of a subtilisin D5, a fibrinolytic enzyme of *Bacillus amyloliquefaciens* DJ-5 isolated from *Doenjang*. *Korean J Food Sci Technol* 18: 500-505.
19. Kim DH, Song HP, Kim JO, Byun MW. 2004. A correlation between fibrinolytic activity and microflora in Korean fermented soybean products. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 41-46.
20. Lee SK, Bae DH, Kwon TJ, Lee SB, Lee HH, Park JH, Heo S, Johnson MG. 2001. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KDO-13 isolated from soybean paste. *J Microbiol Biotechnol* 11: 845-852.
21. Wang CT, Ji BP, Li B, Nout R, Li PL, Ji H, Chen LF. 2006. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional *Douchi*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33: 750-758.
22. Gabriela S, Jaroslava S. 2008. Review of surfactin chemical properties and potential applications. *Cent Eur J Med* 3: 123-133.
23. Lijnen HR. 2002. Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochem (Moscow)* 67: 92-98.
24. Jeong SJ, Kwon GH, Chun J, Kim JS, Park CS, Kwon DY, Kim JH. 2007. Cloning of fibrinolytic enzyme gen from *Bacillus subtilis* isolated from *Cheonggukjang* and its expression in protease-deficient *Bacillus subtilis* strains. *J Microbiol Biotechnol* 17: 1018-1023.

(2009년 10월 14일 접수; 2009년 12월 8일 채택)