

새우젓 유래 *Bacillus* sp. S19가 생산하는 혈전용해효소의 정제 및 특성

장순애 · 김명희¹ · 이명선 · 오태광¹ · 손천배*
충남대학교 식품영양학과, ¹생명공학연구소 환경생물소재연구실

Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced by *Bacillus* sp. S19 from Shrimp *Jeot-Gal*. Jang, Sun-Ae, Myung-Hee Kim¹, Myung-Sun Lee, Tae-Kwang Oh¹, and Cheon-Bae Sohn*.
Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, *Environmental Bioresources Lab., Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology – A fibrinolytic enzyme was purified to homogeneity from *Bacillus* sp. S19 using DEAE and CM column chromatographies, and gel filtration with a recovery yield of 13%. Its molecular mass was estimated to be 42 kDa by SDS-PAGE. The pH and temperature optima were 8.0 and 40°C, respectively. The enzyme was stable up to 45°C and over a pH range of 6-9. The N-terminal amino acid sequence of the enzyme was determined as Ala-Gln-Asp-Ala-Thr-Val-Asn-Ile-Ser-Ala-Glu-Arg-Gln-Val-Ile. The fibrinolytic activity was increased by Cu²⁺ while it was strongly inhibited by metal ions such as Cd²⁺ and Ba²⁺. In addition, the enzyme was inhibited by EDTA, but not by PMSF, suggesting that it is a metalloprotease.

Key words: fibrinolytic enzyme, purification, *Bacillus* sp.

생체 내의 혈관계가 손상을 받게 되면 혈액은 응고현상을 일으켜 지혈되며, 이 때 생성된 혈전은 자연히 분해된다. 이와 같이 혈액의 응고-분해계는 효소의 작용에 의해 균형을 이루고 있다[8]. 그러나 혈전이 과도하게 축적되거나 혈전의 용해작용이 원활하지 못할 경우에는 혈전증이 발생되어 혈액순환이 차단되어 인체에 치명적인 손상을 야기시킬 수 있다. 혈전분해효소는 작용기전에 따라 혈전에 직접 작용하여 용해시키는 단백분해 효소제와 인체의 혈액 분해계를 활성화시키는 효소제로 크게 분류된다. 단백분해 효소제로는 brinase[7], ochrase[3], trypsin[6], plasmin[6] 등이 있으나 이러한 효소제들을 주입시 무제한적인 단백분해효과로 혈전외에 혈전생성인자들까지 파괴하여 출혈을 일으킬 수 있어 거의 사용하지 않고 인체의 혈전 분해를 촉진시키는 효소제인 urokinase[4], streptokinase[13], tisse-type plasminogen activator(t-PA)[1] 등이 일반적인 치료제로 사용되고 있다. 이러한 치료제들은 인체에 투여시 용혈성 연쇄상구균에서 유래된 streptokinase의 경우 인체내에서 항원성을 가지고 있어 발열, 알레르기, 저혈압 유발 등의 부작용을 일으킬 수 있고, urokinase와 t-PA는 경제적인 문제점들을 가지고 있다.

최근 우리나라에서는 전통발효식품인 청국장을 섭취할 때 생체내의 혈전용해능이 증가됨이 밝혀져 이러한 식품을 섭취함으로써 여러 혈관 질환을 치료 및 예방할 수 있다는

점에서 관심이 고조되고 있다. 이러한 분위기 속에서 많은 연구자들이 청국장과 젓갈로부터 혈전용해효소를 생산하는 균주들을 분리하고 그 균주들로부터 혈전용해효소를 정제하여 그것들의 특성을 보고하였다[9-11,14]. 본 연구자들도 이미 새우젓에서 혈전용해능이 우수한 균을 분리하여 동정하였고, 또한 그 균주로부터 혈전분해효소를 효과적으로 생산하기 위한 배지의 최적화를 보고한 바 있다[9].

본 연구에서는 이미 보고한 *Bacillus* sp. S19가 생산하는 혈전용해효소를 분리 및 정제하여 그 특성을 살펴보았다.

재료 및 방법

사용균주 및 시약

혈전용해효소 생산균주는 이미 장 등[9]이 새우젓에서 분리한 *Bacillus* sp. S19를 사용하였다. DEAE-Sephadex A-50, CM-Sepharose CL 6B, Sephadex G-75 등은 Pharmacia (Sweden)로부터 구입하여 사용하였다.

혈전용해효소의 활성도 측정

혈전용해효소의 활성 측정은 Anson의 방법[2]을 변형하여 수행하였다. 효소액 0.1 ml에 0.6% fibrin 용액 0.45 ml (pH 8.0)을 넣은 후 40°C water bath에서 20분간 효소반응시켰다. 반응액에 0.55 M trichloroacetic acid(TCA) 0.45 ml를 넣고 실온에서 30분간 방치하였다. 그 후 원심분리하여 얻은 상정액 0.1 ml에 Na₂CO₃ 1 ml를 첨가하고 Folin reagent 0.2 ml를 가하여 실온에서 30분간 반응시키고 660 nm에서 흡광도를 측정 후 tyrosine 표준곡선에 의거하여

*Corresponding author
Tel. 042-821-6834, Fax. 042-821-6834
E-mail: cbsohn@cuvic.chungnam.ac.kr

분해 용출된 tyrosine 양을 산출하였다.

활성단위는 효소액 1 ml가 1분 동안 tyrosine 1 µg을 생성하는 능력을 1 unit로 하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 Bradford 방법에 의해 수행되었고[5] 이때 표준단백질은 bovine serum albumin을 사용하였고 Bio-Rad사의 protein assay kit를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 크로마토그래프를 수행하는 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈전용해효소의 정제

Bacillus sp. S19를 2% soluble starch, 2% skim milk, 3% NaCl(pH 7.5)의 배지에 접종하고 37°C에서 24시간 배양하여 얻은 조효소액에 ammonium sulfate를 35% 포화되게 가하였다. 생성된 침전물을 12,000g에서 20분간 원심분리하여 제거한 후 얻은 상층액을 다시 ammonium sulfate로 70%까지 포화시켜 4°C에서 12시간 방치하였다. 그 후 12,000g에서 30분간 원심분리하여 단백질 침전물을 확보하였다. Ammonium sulfate 침전 단백질을 소량의 20 mM potassium phosphate 완충 용액(pH 8.0)에 현탁하여 동일 완충 용액으로 4°C에서 투석하였고 원심분리하여 불용성 물질을 제거한 후 미리 20 mM potassium phosphate 완충 용액(pH 8.0)으로 평형화시킨 DEAE-Sephadex A-50 column(2.7 × 22 cm)에 조효소액을 기하고 NaCl를 0 M에서 0.6 M의 농도구배를 만들어 1시간당 20 ml의 유속으로 효소를 용출하였다. 효소활성분획을 모아 다음 정제과정을 위해 한외여과막으로 농축하여 20 mM potassium phosphate 완충 용액(pH 8.0)으로 미리 평형화시킨 CM-Sepharose CL 6B column(2.7 × 22 cm)에 가한 후, NaCl를 0 M에서 0.6 M의 농도구배를 만들어 1시간당 20 ml의 유속으로 용출하였다. 효소활성을 나타내는 분획을 모아 한외여과막으로 농축하여 20 mM potassium phosphate 완충 용액(pH 8.0)으로 미리 평형화시킨 Sephadex G-75 column에 가하여 동일완충용액으로 시간당 10 ml의 유속으로 chromatography를 수행하였다. 혈전용해효소 활성을 나타내는 분획들은 한외여과하여 농축한 후 -20°C에 저장하였다. 정제정도는 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 수행하여 확인하였다.

효소의 분자량 측정

효소의 분자량은 10% 젤을 사용하여 Laemmli의 방법[12]으로 SDS-PAGE를 수행 후 표준 단백질과 이동속도를 비교하여 측정하였다. 이 때 표준단백질로는 Bio-Rad의 Prestained SDS-PAGE Standards[phosphorylase B(M.W. 102,000), bovine serum albumin(M.W. 81,000), ovalbumin(M.W. 46,900), carbonic anhydrase(M.W. 32,700), soy-

bean trypsin inhibitor(M.W. 30,200)]를 사용하였다.

N-말단 아미노산 분석

정제된 효소의 N-말단 아미노산 서열 분석은 Edman 방법을 사용하여 단백질을 분해한 후 Applied Biosystems model 476A Protein/Peptide sequencer(Applied Biosystems Inc., CA, USA)로 분석하였다.

효소활성에 대한 pH의 영향

효소반응의 최적 pH를 검토하기 위해 정제된 혈전용해효소를 각 pH 완충 용액에 가하여 40°C에서 60분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하여 비교하였다. 이때 사용한 완충 용액은 0.5 M glycine-HCl(pH 2-3), 0.5 M acetate(pH 4-5), 0.5 M Tris-malate(pH 6), 0.5 M Tris-HCl(pH 7-8), 0.5 M glycine-NaOH(pH 9-10) 완충 용액을 사용하였다.

또한 효소의 pH 안정성을 살펴보기 위해 정제된 효소액 0.1 ml에 pH별 완충 용액(pH 4.0-12.0) 0.1 ml를 가하여 40°C에서 60분간 보온처리한 후 pH를 8.0으로 조절하여 효소의 잔존활성을 측정하였다.

효소활성에 대한 온도의 영향

정제된 효소액 0.1 ml에 위에서 수행한 최적 pH 완충 용액 0.25 ml과 0.6% fibrin 0.25 ml를 가하여 25°C-70°C 까지 5°C 간격으로 온도를 변화시키면서 60분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하여 비교하였다.

또한 효소의 열안정성을 조사하기 위해 정제된 효소액 0.1 ml에 최적 pH 완충 용액 0.25 ml를 가하여 25°C-70°C 까지 5°C 간격으로 온도를 변화시키면서 각 온도에서 60분간 보온처리한 다음, 급냉하고 0.6% fibrin 용액 0.25 ml를 가하여 효소 반응시킨 후 잔존 효소 활성을 측정하였다.

효소활성에 대한 금속이온 및 저해제의 영향

효소활성에 대한 금속이온 및 저해제의 영향을 알아보기 위해 최종 농도가 1 mM, 5 mM이 되도록 효소액에 첨가하고 상온에서 1시간 동안 방치한 후 효소의 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

Ammonium sulfate 침전 후 투석한 조효소액을 20 mM phosphate 완충용액(pH 8.0)으로 미리 평형화된 DEAE-Sephadex A-50 column에 loading하여 20 mM phosphate 완충용액(pH 8.0)으로 세척하였다. 본 효소는 resin에 흡착되지 않고 세척하는 과정에서 용출되었으며 0-0.6 M의 NaCl gradient과정에서는 용출되지 않았다(Fig. 1). 혈전용해효소의 활성 분획들을 모아 농축하여 20 mM phosphate

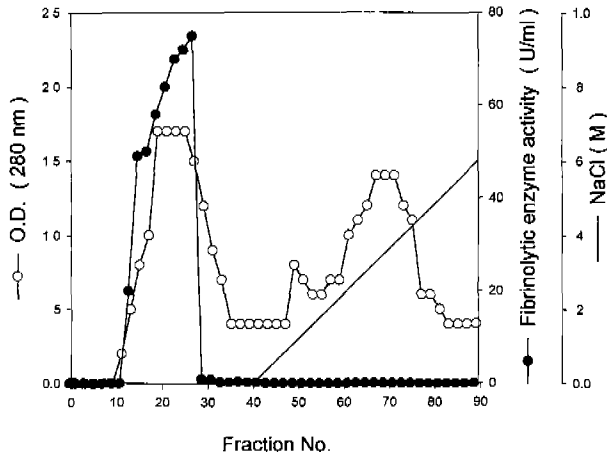


Fig. 1. DEAE-Sephadex A-50 column chromatography of the crude fibrinolytic enzyme. The enzyme was eluted with 20 mM phosphate buffer (pH 8.0) at flow rate of 20 ml/h. The of each fraction was 5 ml.

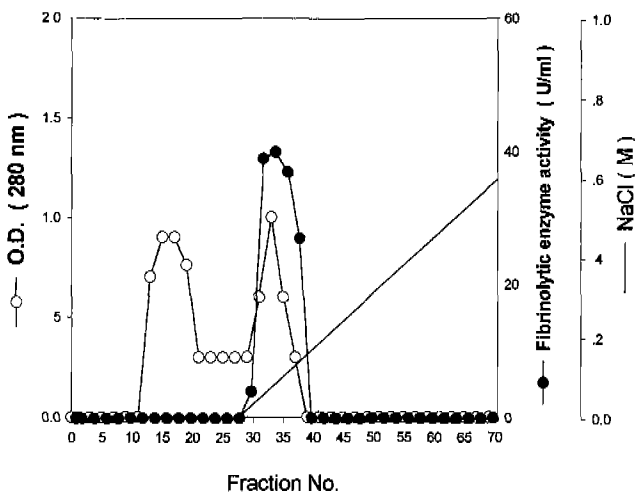


Fig. 2. CM-Sepharose CL-6B column chromatography of the partially purified fibrinolytic enzyme. The enzyme was eluted with 20 mM phosphate buffer (pH 8.0) at a flow rate of 20 ml/h. The volume of each fraction was 5 ml.

완충용액(pH 8.0)로 평형화된 CM-Sepharose CL 6B column chromatography를 수행한 결과도 전 단계에서와 마찬가지로 20 mM phosphate 완충용액(pH 8.0)으로 세척하는 단계에서 용출되었으며, NaCl 0-0.6 M의 농도로 흡착된 단백질을

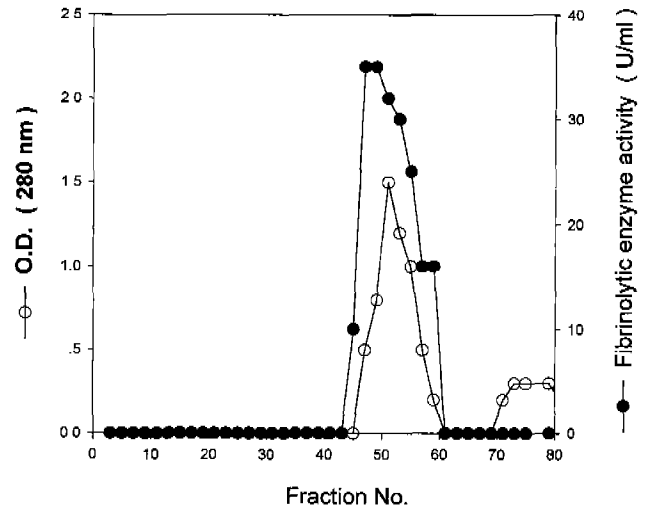


Fig. 3. Sephadex G-75 column chromatography of the partially purified fibrinolytic enzyme. The enzyme was eluted with 20 mM phosphate buffer (pH 8.0) at a flow rate of 10 ml/h. The volume of each fraction was 1 ml.

을 분획하였으나 효소 활성은 나타나지 않았다(Fig. 2). 혈전용해효소의 활성 분획을 농축한 후 20 mM phosphate 완충용액(pH 8.0)으로 충분히 평형화시킨 Sephadex G-75 column chromatography(Fig. 3)를 수행한 결과 단백질 peak와 혈전용해효소의 역가 peak가 일치하는 specific activity 62 units/mg인 순수한 효소 단백질을 얻을 수 있었다. 정제 단계별 결과는 Table 1에 요약하였다.

효소의 분자량

정제된 효소의 단일성 확인과 분자량의 측정을 위해 SDS-PAGE를 수행한 결과 Fig. 4와 같이 단일밴드로 나타나는 분자량 42,000 Da의 단백질을 알 수 있었다. 본 효소는 Kim 등[10]이 보고한 41,000 Da의 혈전용해효소와 유사하였으나 유 등[14]이 보고한 29,000 Da, Kim 등[11]이 보고한 28,200 Da 효소와는 차이를 보였다.

효소의 N-말단 아미노산 서열

Bacillus sp. S19로부터 정제한 혈전용해효소의 N-말단 아미노산 서열은 Ala-Gln-Asp-Ala-Thr-Val-Asn-Ile-Ser-Ala-

Table 1. Summary of purification steps of the fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. S19

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Culture supernatant	111,000	124,000	1.1	1	100
Ammonium sulfate precipitation	3,565	85,560	24	22	69
DEAE-Sephadex A-50	992	29,760	30	27	24
CM-Sepharose CL 6B	485	22,320	46	42	18
Sephadex G-75	260	16,120	62	56	13

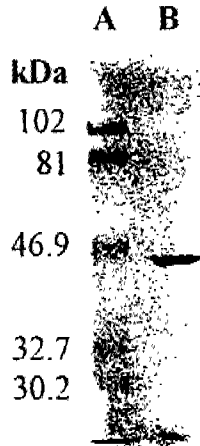


Fig. 4. SDS-PAGE of the purified fibrinolytic enzyme. Lane A; molecular weight marker, lane B; the purified fibrinolytic enzyme.

Strain	N-terminal sequence	Reference
<i>Bacillus</i> sp. S19	AQDATVNISAERQVI	This study
<i>Bacillus</i> sp. CK 11-4	AQTVPYGIP -----	11
<i>Bacillus subtilis</i> K-54	AQSVPYGVS -----	14
<i>Bacillus</i> sp. KA38	VYFPFGPIPN -----	10
Trypsin	IVGGYNCEEN -----	6
Plasmin	SFDCGKPQVE -----	6

Fig. 5. Comparisons of the N-terminal amino acid sequence of *Bacillus* sp. S19 fibrinolytic enzyme with other fibrinolytic enzymes from *Bacillus*.

Glu-Arg-Gln-Val-Ile 이었다. Fig. 5는 *Bacillus* sp. S19의 혈전용해효소와 다른 *Bacillus*가 생산하는 혈전용해효소들의 N-말단 아미노산 서열을 비교한 결과이다. 그림에서 보여주듯이 본 효소는 다른 보고된 *Bacillus* 유래 효소와 매우 낮은 상동성을 보였고 특히 Kim 등[10]이 보고한 것갈 (a salty fermented fish)에서 분리한 *Bacillus* 유래 혈전용해효소와는 매우 낮은 상동성을 보여 새로운 혈전용해효소 일 가능성을 시사하였다.

효소활성에 대한 pH의 영향

정제된 효소의 활성과 안정성에 대한 pH 영향에 대해 조사한 결과는 Fig. 6과 같다.

정제된 혈전용해효소는 pH 8.0에서 최적 활성을 보였다. 또한 pH 6.0-9.0 범위에서 매우 안정한 활성을 나타냈고, pH 10에서는 급격히 감소하여 34%의 상대활성을 나타내는 pH 안정성을 보였다. 이러한 결과는 Kim 등[10]의 *Bacillus* sp.의 혈전용해효소는 pH 7.0, 유 등[14]의 *Bacillus subtilis* 혈전용해효소는 pH 11, 그리고 Kim 등[11]의 *Bacillus* sp. 혈전용해효소는 pH 10.5에서 최적 활성을 나타내는 결과들과 상당히 다른 결과이다.

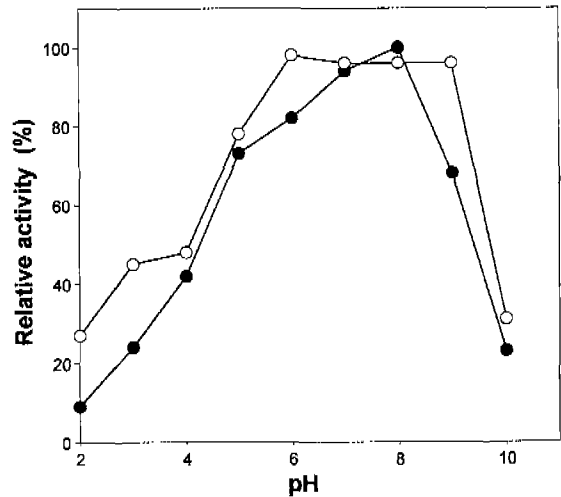


Fig. 6. Effects of pH on the fibrinolytic enzyme activity (●) and stability (○). The enzyme was assayed at various pHs for the measurement of enzyme activity and assayed after incubation at various pHs for 60 min for the pH stability.

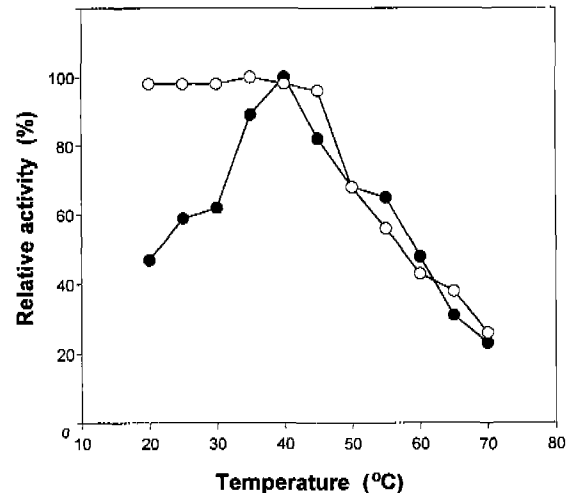


Fig. 7. Effects of temperature on the fibrinolytic enzyme activity (●) and stability (○). The enzyme was assayed at various temperatures for the measurement of enzyme activity and assayed after incubation at various temperature for 60 min for the thermal stability.

효소활성을 대한 온도의 영향

정제된 혈전용해효소의 활성과 안정성에 대한 온도의 효과를 검토한 결과는 Fig. 7과 같다.

혈전용해효소는 40°C에서 최적 활성을 나타냈고 45°C에서는 80%의 활성을 보였으며 50°C 이상에서는 활성이 급격한 감소를 보였다. 이러한 결과는 Kim 등[10]이 보고한 *Bacillus* sp.의 혈전용해효소가 40°C에서 최적 활성을 나타낸 것과 같으며, 유 등[14]의 *Bacillus subtilis* 혈전용해효소는 65°C, Kim 등[11]이 보고한 효소는 70°C에서 최적 활성을 나타내고 있는 결과와는 차이를 나타내고 있다. 또

Table 2. Effects of metal ion on the purified fibrinolytic enzyme

Metal	Relative activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100	100
CdCl ₂	55	41
CoCl ₂	117	98
MgCl ₂	107	97
SrCl ₂	98	89
NiCl ₂	119	107
CuCl ₂	147	147
BaCl ₂	34	34
CaCl ₂	97	97
CoSO ₄	107	104
FeCl ₂	101	94
ZnCl ₂	94	85

Table 3. Effects of inhibitor on the purified fibrinolytic enzyme

Reagent	Relative activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100	100
PMSF	110	102
EDTA	70	32
DTT	28	6
Iodine	24	0
β-Mercaptoethanol	0	0

PMSF; phenylmethylsulfonylfluoride, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, DTT; 1,4-dithiothreitol.

한 본 효소는 45°C까지는 매우 안정하였으나 50°C 이상에서는 급격하게 활성이 감소하다가 60°C 이상에서는 거의 활성을 상실하는 열안정성을 보였다.

금속 이온과 저해제의 영향

정제된 효소의 금속 이온의 대한 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 본 효소는 Cu²⁺에 의해 활성이 증가되었고 Cd²⁺과 Ba²⁺에 의해서는 활성이 저해되는 결과를 보였다. 이러한 결과는 Kim 등[10]이 보고한 것갈(a salty fermented fish) 유래 혈전용해효소에서는 Cu²⁺에 의해 활성이 오히려 강하게 저해 받고 Zn²⁺에 의해 활성화되는 결과와 매우 다른 결과를 보인다. 또한 저해제의 대한 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같이 DTT, iodine, β-mercaptoethanol에 의해 거의 실활되었다. 또한 PMSF에 의해서는 저해를 받지 않은 반면, 5 mM EDTA에 의해서 약 68%의 저해를 받아 본 효소는 metalloprotease일 것으로 생각된다.

요 약

Bacillus sp. S19가 생산하는 혈전용해효소를 DEAE-

Sephadex A-50, CM-Sepharose CL 6B, Sephadex G-75 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 수율 13%로 정제하였다. 정제된 효소는 SDS-PAGE를 수행한 결과 분자량이 약 42,000 Da일 것으로 나타났다. 그것의 최적 활성온도와 pH는 각각 40°C와 pH는 8.0으로 나타났고, pH 6-9 범위와 45°C까지 안정된 활성을 보였다. 본 효소의 N-말단 아미노산 서열은 Ala-Gln-Asp- Ala-Thr-Val-Asn-Ile-Ser-Ala-Glu-Arg-Gln-Val-Ile으로 분석되었다. 또한 본 효소는 Cu²⁺에 의해 활성이 증가되는 반면에 Cd²⁺와 Ba²⁺ 등의 금속이온에 의해서는 강하게 저해되었다. 게다가 본 효소는 EDTA에 의해서는 현저하게 저해를 받는 반면, PMSF에 의해서는 저해되지 않아 metalloprotease일 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 핵심전문연구과제(과제번호 981-0609-041-2)로 수행된 것으로 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

1. Akassoglou, K., K. W. Kombrinck, J. L. Degen, and S. Strickland. 2000. Tissue plasminogen activator-mediated fibrinolysis protects against axonal degeneration and demyelination after sciatic nerve injury. *J. Cell Biol.* **149**: 1157-1166.
2. Anson M. L., 1939. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin, *J. Gen. Physiol.* **22**: 79-85.
3. Arocha-Pinango, C. L., J. Perales, and Z. Carvajal. 1981. Studies on the degradation of fibrinogen by proteolytic enzymes from the larvae of *Lanomia achelous* (Cramer). *Thromb. Haemost.* **45**: 233-236.
4. Blasiak, J., B. Smolarz, and D. Piestrzeniewicz. 1999. Urokinase plasminogen activation system and its role in cancer progression. *Postepy Biochem.* **45**: 42-50.
5. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
6. Eisele, J. W., and E. Mihalyi. 1975. Studies of the advanced stages of the plasmin and trypsin digestion of bovine fibrinogen. *Thromb Res.* **6**: 511-522.
7. Flynn, G., T. J. Hackett, L. McHale, and A. P. McHale. 1994. Encapsulation of the thrombolytic enzyme, brinase, in photosensitized erythrocytes: a novel thrombolytic system based on photodynamic activation. *J. Photochem. Photobiol. B.* **26**: 193-196.
8. Harlan, J. M. and L. A. Harker. 1981. Haemostasis, thrombosis and thromboembolic disorder. *Med. Clin. North Am.* **65**: 855-857.
9. Jang, S. A., M. H. Kim, M. S. Lee, M. J. Lee, O. H. Jhee, T. K. Oh, and C. B. Sohn. 1999. Isolation and identification of fibrinolytic enzyme producing strain from shrimp Joet-Gal, a

- tiny salted shrimps, and medium optimization for enzyme production. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**: 1648–1653.
10. Kim, H. K., G. T. Kim, D. K. Kim, W. A. Choi, S. H. Park, Y. K. Jeong, and I. S. Kong. 1997. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermented fish. *J. Ferment. Bioeng.* **84**: 307–312.
 11. Kim, W. E., K. H. Choi, Y. T. Kim, H. H. Park, J. Y. Choi, Y. S. Lee, H. I. Oh, I. B. Kwon, and S. Y. Lee. 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2482–2488.
 12. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
 13. Nakashima, A., T. Okada, and I. Sugie. 1990. Fibrin-dependent activation of plasminogen by a proteolytic digest of streptokinase. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* **1**: 279–284.
 14. Yoo, C. K., W. S. Seo, C. S. Lee, and S. M. Kang. 1998. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme excreted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from Chung Guk Jang. *Korean. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 507–514.

(Received August 17, 2000)