

## 전통 메주에서 분리한 *Bacillus subtilis* MJ-226이 생산하는 혈전용해효소의 특성

임성미

동명대학교 식품공학과

전통 메주로부터 plasmin의 혈전용해 활성보다 약 58% 더 높은 활성을 나타내는 MJ-226을 분리하여 동정한 결과, *Bacillus subtilis*와 유사한 형태학적, 생화학적 및 당 발효능을 나타내었다. *B. subtilis* MJ-226은 Tryptic Soy Broth (TSB) 배지 상에서 최대의 혈전용해효소 활성을 나타내었고, 37°C에서 24~26시간 배양했을 때 가장 높은 활성을 나타내었고, TSB 배지 내에 glucose와 fructose 2.0%와 peptone 및 yeast extract 1.0% 각각을 첨가한 경우 활성이 증가되었다. 하지만 lactose, sucrose, beef extract, casein 및 tryptophan 등에 의해 활성이 오히려 감소되었다. *B. subtilis* MJ-226이 생산하는 혈전용해효소는 pH 6.0~8.0 및 온도 35~40°C에서 매우 안정하였으며, 또한 MnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KCl 및 NaCl 5 mM 농도의 금속이온에 대해서도 비교적 안정함을 유지하였다. 그러나 CuSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>와 BaCl<sub>2</sub>에 등의 금속이온과 iodoacetic acid, leupeptin, phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF), sodium dodecyl sulfate (SDS), thiourea, trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N',N'- tetraacetic acid (CDTA) 및 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 등의 저해제들과 반응한 경우에는 매우 불안정한 것으로 나타났다.

**Key words** □ *B. subtilis*, fibrinolytic enzyme, *Meju*

바쁜 현대인들을 위해 짧은 시간 내에 간편하게 조리할 수 있는 인스턴트식품이나 패스트푸드는 우리 일상생활 가까이에서 손쉽게 접할 수 있는 식품의 한 형태로서 오늘날 많은 사람들에게 의해 소비되고 가공기술의 발달로 그 시장규모가 급성장하였다. 하지만 최근 들어 소비자들의 건강에 대한 관심이 고조됨에 따라 보다 안전하고 몸에 좋은 웰빙식품을 선호하는 추세이며, 또한 가공식품들이 영양불균형을 초래하고 성인병 발생의 원인이 될 수 있다는 연구결과에 따라 패스트푸드보다는 오히려 조리과정 중에 많은 시간과 정성을 들여 좋은 재료로 만든 슬로우푸드에 대한 관심이 집중되고 있다. 슬로우푸드의 대표적인 예인 콩 발효식품은 오랜 기간 숙성과정을 거치는 동안 다양한 생리활성 기능성물질이 생성되어 콜레스테롤치 저하, 면역기능강화, 항암 효과와 항균활성 및 항산화와 항돌연변이 효과가 보고되고 있다 (5, 19, 23, 24).

한편, 고열량 및 고지방식의 서구화된 식습관과 과다한 염분 섭취, 운동부족, 스트레스, 과음 및 흡연 등에 의해 손상된 동맥은 평활근 내피층 부위에 플라그(plaque)가 축적되어 동맥 혈관벽이 좁아지고 탄성을 잃게 되어 혈액의 흐름을 방해하고, 순환하는 혈액 내의 혈소판이 플라크에 쌓이면서 형성된 혈전으로 인해 결국 혈관이 막히게 되어 고혈압, 고지혈증, 심근경색 등의 합병증을 유발하게 된다(12, 17, 26). 현재 많이 사용되는 혈전용해제(fibrinolytic agents)인 serine protease는 plasminogen을 plasmin으

로 전환시켜 혈전 내에 있는 fibrin을 분해하는 작용을 한다. Alteplase, reteplase, urokinase prourokinase, tenecteplase, lanoteplase, tissue type plasminogen activator 외에 흡혈박쥐에서 유래한 plasminogen, 거머리로부터 생산한 hementin과 은행잎 추출물(ginkgo) 등 다양한 생물에서 유래하는 혈전용해제가 개발되고 있다. 또한 β-용혈성이 있는 streptococci (streptokinase)와 *Staphylococcus* (staphylokinase) 등의 미생물들도 혈전용해효소를 생산하는 것으로 알려져 있다(11, 14, 15). 최근 연구결과에 따르면, 일본이나 중국의 전통식품(Natto, Tofuyo 및 shrimp paste)이나 우리나라의 된장과 간장 및 청국장에서 유래한 *Bacillus* 속 균주가 subtilisin이나 nattokinase와 같은 혈전용해효소를 생산하여 뇌졸중, 동맥경화 및 심장마비 등의 뇌혈관계질환이나 관상동맥질환 예방에 탁월한 효과가 있는 것으로 알려지고 있다(2, 9, 30). 전통 된장에서 분리된 *B. amyloliquefaciens*, *B. pantothenicus* 및 *B. subtilis*는 두유박이나 비지 등의 기질 하에서도 높은 혈전용해능을 나타내므로 산업화 과정에서 생산단가를 낮춰 고부가가치의 제품을 단 시간 내에 대량 생산하여 의약품이나 발효식품과 음료 및 제과 등의 식품산업에 응용될 것으로 보고하고 있다(4). 그리고 청국장에서 추출한 혈전용해효소를 마이크로캡슐화하여 체내 위산이나 고온의 가열 하에서도 안정한 활성을 유지할 수 있는 기술도 보고된 바 있다(21).

본 연구에서는 콩 발효식품의 원료인 전통 메주에서 분리된 *Bacillus* 속을 대상으로 가장 높은 혈전용해효소 생산능을 나타내는 균을 선별 및 동정하였고, 최대의 효소활성능을 나타내는 배지의 종류와 성분 및 배양 조건을 확인하였다. 또한 pH, 온도,

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-51-629-1714, Fax: 82-51-629-1709  
E-mail: limsm020@tu.ac.kr

금속이온이나 저해제들에 대한 안정성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 사용배지 및 시약

혈전용해활성 측정에 사용된 시약은 모두 Sigma 사(USA)로부터 구입하였고, 미생물 배양용 배지인 Brain Heart Infusion (BHI), Nutrient Broth (NB), Tryptic Soy Broth (TSB)는 모두 Difco 사(USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 미생물 동정에 사용된 API kit는 bioMérieux 사(France) 제품으로 사용하였고, 조효소액 투석에 사용된 막은 Spectrum Medical Industries (USA)에서 제조한 제품이다. 기타 실험에 사용된 모든 시약은 특급 혹은 1급 제품을 사용하였다.

### 미생물 분리 배양 및 동정

2001~2008년 동안 부산지역 재래시장에서 판매되거나 경남 일대에서 재래식으로 제조된 메주 19종을 수거하여 시료 50 g을 무균적으로 채취하여 450 ml의 0.85% NaCl 용액을 첨가한 후 2분간 마쇄하여 시료 용액을 제조하였다. 시료 중 내열성 포자형성균인 *Bacillus* 속을 선별하기 위해 80°C에서 10분간 가열처리한 후 NA 평판배지에 도말하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 배지 상에서 집락의 색과 형태를 관찰하여 전형적인 *Bacillus* 속으로 추정되는 집락만을 선택한 다음 계대 배양하여 보관하면서 실험균주로 사용하였다. 분리된 균주 중에서 혈전용해능은 Astrup과 Millertz의 방법(10)을 사용하여 검색하였다. 즉 10 mM phosphate buffer 용액(pH 7.8)에 human fibrinogen을 최종농도 0.6%로 완전히 용해시킨 후 thrombin (100 U/ml) 100  $\mu$ l를 넣은 다음 1% agarose 용액 5 ml를 첨가한 후 끌고루 잘 섞어 평판에 분주하고 실온에서 10분간 응고시켜 fibrin plate를 제조하였다. 여기에 NB 배지에서 배양(37°C, 24시간)한 균배양액(5  $\mu$ l)을 fibrin plate에 점적하여 overnight 배양한 다음 집락 주위에 투명환을 확인하였고 이때 대조군으로 plasmin을 사용하였다. 투명환의 크기가 가장 큰 균주를 최종 선택하여 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 준하는 균주의 배양학적 및 생화학적 특성을 조사하였고, 당 발효능은 API 50 CHB를 이용하여 동정하였다.

### 조효소액의 제조 및 혈전용해효소 활성 측정

사용된 균주는 BHI, NB 및 TSB 배지 각각에서 37°C, 24시간 배양한 다음 배양액을 원심분리(12,000 rpm, 20 min, 4°C)한 다음 상등액을 모아 교반하면서 ammonium sulfate (75%)를 첨가하고 12시간 동안 염석시킨 다음 원심분리(12,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 crude enzyme를 회수하였다. 여기에 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 현탁시킨 다음 4°C에서 12시간 이상 spectrapor dialysis membrane을 이용하여 동일한 buffer로 투석시켜 조효소액을 제조하였다. 조효소액의 혈전용해 활성능은 Ehrlich 방법(13)에 따라 측정하였다. 즉 1 N NaOH 80 ml에 fibrin 0.6 g을 녹인 후 pH 7.5로 조정된 다음 증류수에서 24시간 동안 투석하

여 염을 제거한 다음 증류수로 최종 100 ml로 맞추어 0.6% fibrin 용액을 제조하였다. Fibrin 용액과 조효소액을 37°C에서 10분간 반응 시킨 후 0.4 M trichloroacetic acid (TCA)를 처리하여 반응을 정지시킨 다음 원심분리하여 얻은 상등액은 275 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈전용해효소 활성은 3회 측정하여 평균값으로 표시하였다.

### 혈전용해효소 활성에 영향을 미치는 배지성분 및 배양조건

BHI, NB 및 TSB 중에서 가장 높은 활성을 나타내는 배지를 선택한 후 glucose, galactose, fructose, maltose 및 lactose 등의 탄소원 1.0와 2.0% 첨가한 경우와 casein, peptone, tryptophan, beef extract 및 yeast extract 등의 질소원을 0.5 및 1.0% 농도로 첨가한 다음 균을 접종 및 배양하여 혈전용해효소의 활성을 측정하였다. 또한 25, 37 및 45°C의 온도대에서 배양하는 동안 시간대별로 조효소액의 활성을 조사하였다.

### 혈전용해효소의 안정성

#### (1) pH 및 온도

혈전용해효소 안정성에 대한 pH의 영향을 살펴보기 위해 pH 2.0, 3.0 및 4.0으로 조정된 50 mM glycine-HCl buffer, pH 4.0, 5.0, 6.0 및 7.0의 50 mM sodium acetate buffer, pH 7.0, 8.0 및 9.0은 50 mM Tris-HCl buffer, pH 9.0, 10.0, 11.0 및 12.0은 50 mM glycine-NaOH buffer에 조효소액을 37°C에서 60분 동안 반응시켜 효소의 안정성을 조사하였다. 한편, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)에 조효소액을 넣고 20~60°C의 온도대에서 5°C 간격으로 60분간 방치한 후 온도에 대한 효소의 안정성을 확인하였다.

#### (2) 금속이온 및 저해제

혈전용해효소 안정성에 대한 금속이온 및 저해제의 영향을 살펴보기 위해  $MnSO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $CuSO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $ZnSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $BaCl_2$ , NaCl 및 KCl 등의 금속이온을 최종 농도 2 mM와 5 mM가 되도록 증류수에 녹인 후 조효소액과 반응시켜 상온에서 12시간 방치한 다음 효소의 안정성을 측정하였다. 또한 사용한 저해제의 종류는 sodium dodecyl sulfate (SDS), phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), leupeptin, trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (CDTA), thiourea, iodoacetic acid 및 acetohydroxamic acid (AHA) 등으로서 이들의 최종 농도 2 mM와 5 mM가 되도록 증류수에 녹이고 이에 조효소액을 첨가하여 상온에서 12시간 방치한 후 효소의 안정성을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 혈전용해효소 생산 균주 분리 및 동정

전통 메주 19종에서 전형적인 *Bacillus* 속 27균주를 분리하여 이들 중 fibrin plate 상에서 혈전용해효소 활성을 가진 5균주를

얻었다. Plasmin의 활성을 100%로 볼 때, MJ-36은 84%, MJ-72는 125%, MJ-128은 114%, MJ-226은 158% 및 MJ-271은 74% 정도로 나타났다(자료 미제시). 그 중 효소활성능이 가장 높은 MJ-226 균주를 선택하여 형태학적, 생화학적 및 당 발효능을 조사한 결과는 Table 1과 같다. MJ-226 균주는 그람양성 간균, 포

자를 형성하며, 운동성이 있으며, glucose로부터 산은 생성하거나 가스를 생성하지 않았고 citrate를 이용하지 않았다. 또한 catalase, urease, lysine과 ornithine decarboxylase 및 tryptophan deaminase 생성능은 있으나, oxidase와 arginine decarboxylase 생성능은 없었다. Casein 가수분해능과 gelatin 액화능을 나타내었

**Table 1.** Morphological, physiological, and biochemical characterization and carbon sources utilization of MJ-226 strain isolated from *Meju*

	Carbon sources	MJ-226	Carbon sources	MJ-226	
Utilization of carbon sources	Control	- <sup>a</sup>	Esculine	+	
	Glycerol	+ <sup>b</sup>	Salicine	+	
	Erythritol	-	Cellobiose	+	
	D-Arabinose	-	Maltose	+	
	L-Arabinose	-	Lactose	-	
	Ribose	+	Melibiose	-	
	D-Xylose	+	Saccharose	+	
	L-Xylose	-	Trehalose	+	
	Adonitol	-	Inulin	-	
	β-Methyl-D-xyloside	-	Melezitose	-	
	Galactose	-	D-Raffinose	+	
	Glucose	+	Amidon	+	
	Fructose	+	Glycogen	+	
	Mannose	-	Xylitol	-	
	Sorbose	-	β-Gentiobiose	-	
	Rhamnose	-	D-Turanose	-	
	Dulcitol	-	D-Lyxose	-	
	Inositol	-	D-Tagatose	-	
	Mannitol	-	D-Fucose	-	
	Sorbitol	+	L-Fucose	-	
	α-Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-	
	α-Methyl-D-glucoside	+	L-Arabitol	-	
	N-Acetyl glucosamine	+	Gluconate	-	
	Amygdaline	+	2-Keto-gluconate	-	
	Arbutine	+	5-Keto-gluconate	-	
	Morphological, physiological and biochemical characterization	Cell morphology	rod	Arginine decarboxylase	-
		Gram staining	+	Lysine decarboxylase	+
		Spore staining	+	Ornithine decarboxylase	+
Motility		+	Tryptophan deaminase	+	
Gas from glucose		-	Casein hydrolysis	+	
Acid from glucose		+	Gelatin	+	
Citrate		-	Voges-Proskauer	-	
Catalase		+	H <sub>2</sub> S production	+	
Oxidase		-	Growth at pH 5-8	+	
Urease		+	Growth at 15-45°C	+	

<sup>a</sup> negative reaction

<sup>b</sup> positive reaction

으며 pH 5~8 범위 내에서 증식 가능하고 15~45°C의 온도 범위 내에서 생육 가능하였다. 당 발효능 조사 결과, glucose, fructose, ribose, xylose, sorbitol, cellobiose, maltose, sucrose, raffinose 및 glycogen 등은 이용할 수 있으나, galactose, arabinose, sorbose, manose, inositol, mannitol, xylitol, lactose, inulin 및 gluconate 등을 이용할 수 없었는데 그 결과 T index 0.72이고 98.6%의 신뢰도를 나타내는 *B. subtilis* MJ-226으로 동정되었다.

채래식 메주에서 주로 분리되는 균주로는 *Mucor* 속, *Penicillium* 속, *Rhizopus* 속과 같은 곰팡이와 *Saccharomyces* 속 등의 효모 및 *Bacillus* 속, *Sarcina* 속 및 *Pediococcus* 속과 같은 다양한 미생물들이 분리되고 있으며, *Bacillus* 속 중에는 *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. subtilis* var. *aterinus*, *B. licheniformis* 등이 존재하는 것으로 보고되고 있다(8, 16, 20). 한편 이 등(7)이 의하면 *B. subtilis*를 접종하여 제조한 된장은 숙성이 진행됨에 따라 tyrosinase과 angiotensin converting enzyme (ACE)의 저해 활성 및 항돌연변이 활성도 증가하였으며 된장의 isoflavon 함량도 높게 나타났다고 보고한 바 있어 *B. subtilis*가 콩발효식품 내에서 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한 채래식 된장으로부터 혈전용해능을 가지는 *B. subtilis* D-1 균주의 효소활성은 표준물질인 plasmin (2.51 µg)과 비슷한 수준의 활성을 나타내었다고 하였으나, 본 실험에서 분리된 *B. subtilis* MJ-226은 이보다 좀 더 높은 효소 활성을 보였고, 이들의 당 발효 특성을 비교한 결과, L-Arabinose와 mannose의 발효능에 차이가 있으나, 그 외의 당 이용능은 거의 일치하는 것으로 나타났다(9). 또한 한국 채래 간장에서 유래한 혈전용해효소 생산균인 *B. subtilis* K7과도 생리학적, 생화학적 특성이 유사하게 나타났다(2).

#### 혈전용해효소 활성에 대한 배지 종류와 성분 및 배양 온도의 영향

BHI, NB 및 TSB 배지 중에 배양한 *B. subtilis* MJ-226의 배양액으로부터 황산암모늄을 처리하여 생산한 혈전용해 조효소액의 최대 활성을 나타내는 배지 종류와 배양 온도의 영향을 살펴

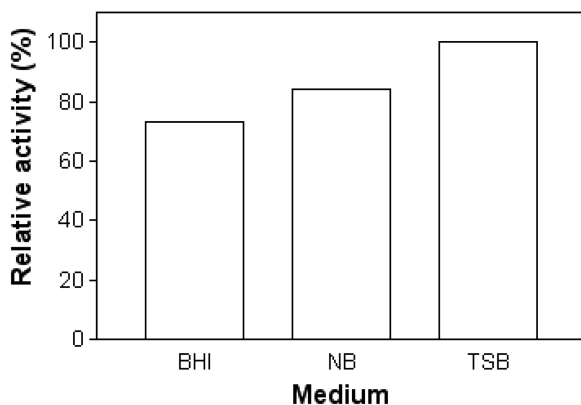


Fig. 1. The effect of culture medium on the fibrinolytic enzyme activity of *B. subtilis* MJ-226.

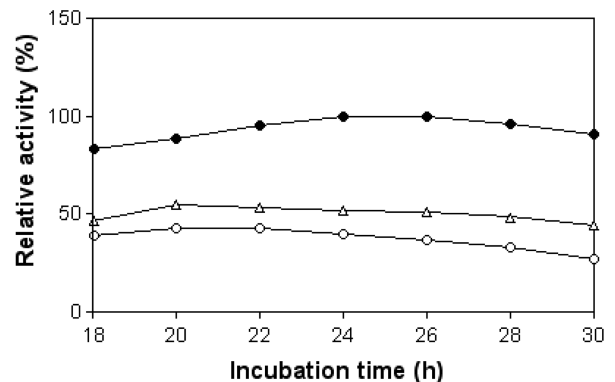
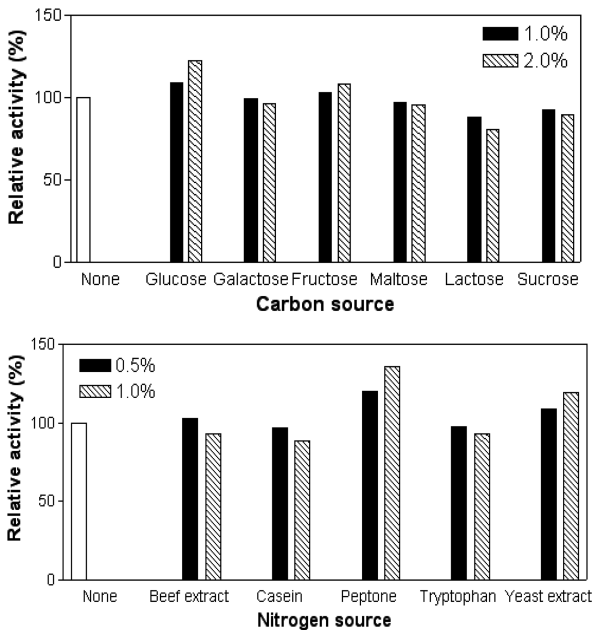


Fig. 2. The effect of incubation temperature and time on the fibrinolytic enzyme activity of *B. subtilis* MJ-226 during the growth in TSB. (○) 25°C, (●) 37°C, (△) 45°C.

본 결과는 Fig. 1 및 2와 같다. 배지 종류의 영향을 살펴볼 때, TSB 배지 상에서 생산된 효소 활성이 가장 높았고, TSB 배지에 비해 NB 내에서 생산된 효소 활성은 약 16%, BHI 상에서의 활성은 약 27% 더 낮게 나타났다. *B. subtilis* MJ-226은 37°C에서 배양할 경우 24~26시간 동안 생산된 효소 활성이 가장 높았고, 45°C에서 20시간 배양시켜 생산된 조효소액은 37°C보다 약 50% 정도 낮은 수준으로 나타났고, 25°C에서 배양한 경우에는 이보다 더 낮은 활성을 나타내었다.

가장 높은 혈전용해효소 활성을 나타낸 TSB 배지를 대조군으로 하여 37°C에서 24시간 배양하는 동안 첨가한 탄소원과 질소원의 종류와 농도에 따른 효소 활성 변화를 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다. 탄소원 중에서 혈전용해효소 활성을 높이는 것은 glucose와 fructose로서 2.0% 첨가 시 대조군에 비해 약 10~20% 활성이 증가되었으나, galactose는 활성에 거의 영향을 미치지 않았으며, lactose와 sucrose 2.0% 하에서는 오히려 활성이 10~20% 감소되었다. 질소원의 경우 peptone 첨가 농도에 따라 서서히 증가되어 1.0% 농도 하에서 활성은 대조군에 비해 약 35% 증가되었고 yeast extract도 활성을 높이는데 도움이 되었다. 하지만 beef extract, casein 및 tryptophan에 의해서 활성이 다소 낮아지는 경향을 나타내었다.

Naik와 Baral (28)에 의하면 *B. subtilis*의 혈전용해효소는 pH 10.0으로 조정된 Glucose Yeast extract Peptone Glycerol Casein (GYPGC) 배지에서 35, 18시간 배양한 경우 최대 활성을 나타내었다고 보고하였다. 한편, 청국장에서 분리된 *B. amyloliquefaciens* D4-7이 분비한 혈전용해효소는 본 결과와 유사하게 NB 보다는 TSB에서 활성이 더 높게 나타났으나, TSB 보다는 2% 분리대두액배지에서 활성이 10% 가량 더 증가하였고, 48시간 배양했을 때 효소의 활성이 가장 높았다고 보고하였다. 그리고 분리대두배지에 2% 농도의 glucose, mannose, sucrose 등을 첨가했을 때 균체의 증식에 유의적인 차이가 나타나지 않았고 오히려 효소활성은 저하되었는데 이는 catabolite repression에 의한 것으로 추정하였다(3). 청국장에서 분리한 *Bacillus* sp. KP-6408의 혈전용해효소 생산에 관한 배지 성분과 배양조건을 살펴본



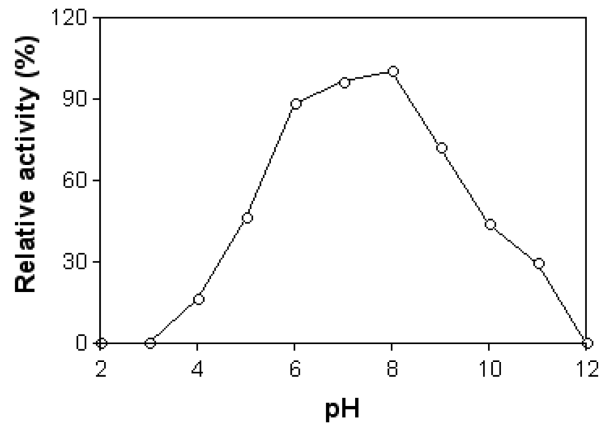
**Fig. 3.** The effect of carbon and nitrogen sources on the fibrinolytic enzyme activity of *B. subtilis* MJ-226 when cultured for 24 h at 37°C in TSB.

결과, 2.0% glucose와 0.2% yeast extract 첨가 시에 최대의 활성을 나타내었고, 배양 시 초기 pH 8.0로 조정된 액체배지를 사용하여 40°C에서 배양했을 때 활성이 가장 높았다고 하였다(1). 그리고 Liu 등(25)에 따르면, *B. natto* NLSSE는 유기질소원으로 soy peptone 존재 하에서 활성이 높은 nattokinase를 생산하였으나, 무기질소원은 활성을 높이지는 데 그다지 효과가 없는 것으로 확인되었다. 또한 탄소원의 경우에는 maltose에 의해 최대 활성을 나타내었으며 glucose와 sucrose도 활성에 도움을 주었으나, xylose와 glycerol은 효소 생산에 효과가 거의 없었다고 하여 본 결과와 비교해 볼 때 효소 생산량을 증가시키기 위한 탄소원 및 질소원의 종류와 첨가량은 다소 차이가 있었다.

**pH 변화에 대한 혈전용해효소의 안정성**

*B. subtilis* MJ-226의 혈전용해효소 활성에 대한 pH의 영향을 살펴보기 위해 pH 2.0~12.0으로 조정된 buffer 내에 37°C에서 60분간 반응시킨 후 효소 안정성을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. *B. subtilis* MJ-226이 생산한 혈전용해효소는 pH 6.0~8.0의 범위 내에서 비교적 안정한 것으로 확인되었으므로 이는 neutral protease인 것으로 생각된다.

혈전용해효소를 생산하는 균주마다 안정한 pH 범위가 다소 다르게 나타났는데 Naik와 Baral (28)이 보고한 *B. subtilis*의 혈전용해효소는 pH 7.0~11.0의 광범위한 pH 범위 내에서 비교적 안정하였고, 한국 재래 간장에서 분리한 *B. subtilis* K7의 효소는 pH 5.0~12.0 내에서 활성이 유지되었고 그중에서 최대 활성은 pH 9.0에서 나타났으며(9), 청국장에서 분리한 *B. amyloliquefaciens* D4-7의 효소는 pH 10.0에서 최고의 활성을 나타내었다고 하여 본



**Fig. 4.** The effect of pH on the fibrinolytic enzyme stability of *B. subtilis* MJ-226.

실험 결과와는 약간의 차이가 있었다.

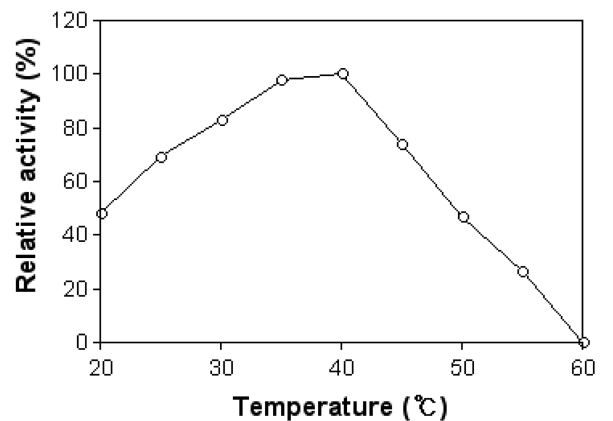
**온도 변화에 대한 혈전용해효소의 안정성**

20~60°C 온도 범위 내에서 60분 동안 방치한 후의 혈전용해효소의 안정성을 측정된 결과를 Fig. 5에서 보듯이 *B. subtilis* MJ-226이 생산한 혈전용해효소는 35~40°C의 온도 대에서 가장 안정한 것으로 나타났다.

*B. subtilis* K7의 효소는 40°C에서 최적의 반응속도를 나타내었으나, 50°C 이상에서는 급격히 실활 되었다고 하여 본 실험과 유사하게 열에는 불안정한 활성을 나타내었는데 이는 온도 증가에 따른 단백질 구조의 변성과 autoproteolysis가 급격하게 증가된 것으로 보고되고 있다(9, 27). 하지만 Naik와 Baral (28)이 보고한 *B. subtilis*의 효소는 80°C에서 4시간 반응시켜도 잔존 활성이 약 90% 정도 유지되었다고 하여 열에 매우 안정한 효소인 것으로 보고되었다.

**금속이온의 종류에 대한 혈전용해효소의 안정성**

*B. subtilis* MJ-226이 생산한 조효소액을 다양한 종류의 금속이



**Fig. 5.** The effect of temperature on the fibrinolytic enzyme stability of *B. subtilis* MJ-226.

**Table 2.** The effect of various metal ions on the fibrinolytic enzyme stability of *B. subtilis* MJ-226

Metal ions	Relative activity (%)	
	2 mM	5 mM
None	100.0	100.0
CuSO <sub>4</sub>	107.1	95.2
FeSO <sub>4</sub>	97.4	63.2
MgSO <sub>4</sub>	95.8	91.5
MnSO <sub>4</sub>	99.5	103.2
ZnSO <sub>4</sub>	94.6	91.6
BaCl <sub>2</sub>	85.9	67.1
CaCl <sub>2</sub>	105.8	102.5
KCl	108.5	101.9
NaCl	116.0	120.7

온과 반응시켜 효소의 안정성을 확인한 결과는 Table 2와 같다. MnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KCl 및 NaCl 5 mM 농도 하에서 *B. subtilis* MJ-226이 생산한 혈전용해효소는 안정함을 유지할 수 있었으나, CuSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> 및 BaCl<sub>2</sub> 등의 금속이온 하에서는 비교적 불안정하다는 것을 확인하였다.

Naik와 Baral (28)이 보고한 *B. subtilis*의 혈전용해효소는 MnSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> 및 CoCl<sub>2</sub>의 존재 하에서 활성이 증가되었다고 하였으며, *B. subtilis* K7의 효소는 Ca<sup>2+</sup>에 의해 활성이 증가되었지만, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ag<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>에 의해 강한 저해를 받았다고 보고한 바 있다(9). 한편 *Bacillus* sp. KA38의 혈전용해효소는 Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> 및 Fe<sup>3+</sup>에 의해 활성이 감소되었으나, Na<sup>+</sup>와 K<sup>+</sup>는 활성에 영향을 주지 않았고, Zn<sup>2+</sup>에 의해 대조구에 비해 활성이 오히려 50% 이상 증가되었다고 하여 균주가 생산하는 효소의 종류에 따라 금속이온의 영향도 매우 다양하게 나타났다(18).

#### 저해제의 종류에 대한 혈전용해효소의 안정성

*B. subtilis* MJ-226이 생산한 조효소액에 저해제를 처리한 후 효소의 안정성을 측정 결과는 Table 3과 같다. AHA의 처리에 대한 영향은 다소 약했으나, iodoacetic acid, leupeptin, PMSF, SDS, thiourea, CDTA 및 EDTA 등의 저해제에 매우 불안정하였으므로 *B. subtilis* MJ-226이 생산한 효소는 metalloprotease인 것으로 여겨진다.

Naik와 Baral (28)이 보고한 *B. subtilis*의 혈전용해효소는 EDTA에 의해서 활성이 완전히 손실되었다고 하여 *B. subtilis* MJ-226의 효소와 유사한 metalloprotease인 것으로 확인되었다. 또한 *B. subtilis* K7의 효소는  $\rho$ -chloromercuribenzoic acid 20 mM에 의해 35%의 활성이 감소되었고 iodoacetate 10 mM 이상의 농도에서 약 80% 이상 활성이 강하게 저해되었으며, 효소 활성단에 있는 금속이온과 킬레이트를 형성하여 활성저하를 일으키는 EDTA와 CDTA에 의해서도 50% 이상의 활성이 감소되었다고 하여 이는 금속이온을 가지는 metalloprotease 혹은 serine

**Table 3.** The effect of various chemical inhibitors on the fibrinolytic enzyme stability of *B. subtilis* MJ-226

Chemical inhibitors	Relative activity (%)	
	2 mM	5 mM
None	100.0	100.0
AHA	97.2	95.0
CDTA	66.0	31.5
EDTA	33.7	0.6
Iodoacetic acid	89.2	75.8
Leupeptin	93.1	88.5
PMSF	92.5	87.2
SDS	98.5	85.1
Thiourea	86.7	72.5

protease로 추정하였다(9). 그리고 *Bacillus* sp. KA38의 혈전용해효소는 serine protease 저해제인 diisopropyl fluorophosphate (DFP), tosyl-L-lysine-chloromethylketose (TLCK), tosyl-L-phenylalanyl-chloromethylketose (TPCK) 및 PMSF와 trypsin 저해제인 SBT1와 aprotinin은 효소 활성에 거의 영향을 주지 않았으나 금속킬레이트제인 EDTA와 metalloprotease인 2,2-bipyridine과 o-phenanthroline에 의해 활성이 크게 감소되었다. 특히 EDTA의 양이 증가됨에 따라 효소활성은 점진적으로 감소되었지만 Zn<sup>2+</sup>의 존재 하에서는 EDTA에 의한 저해현상이 완화되어 이는 Zn<sup>2+</sup>가 있는 활성부위를 가지는 metalloprotease인 것으로 밝혀졌다(18).

하지만 *B. subtilis* OK-2의 효소활성은 1 mM PMSF에서 완전히 저해되었다고 하였고(22), 청국장에서 분리한 *B. subtilis* K-54의 혈전용해효소의 활성도 serine protease의 억제제인 DFP와 PMSF에 의해서 강력하게 저해되어 serine protease인 것으로 보고된 바 있다(6). 또 다른 serine protease로 알려진 subtilisin DFE는 benzamidine hydrochloride, leupeptin, pepstatin A에 의해 활성이 부분적으로 저해되었고, EDTA, EGTA 및 apoptin에 의해 전혀 저해되지 않았다고 보고한 바 있다(29).

기존에 사용되고 있는 일부 혈전용해제들은 가격이 비싸고 전신출혈이나 관상동맥폐색 등과 같은 부작용이 보고되고 있어 근래에는 발효식품에서 분리되는 미생물에 의한 혈전용해능 검색에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 전통 메주에서 분리된 *B. subtilis* MJ-226의 균주도 혈전용해효소를 생산하는 것으로 확인되었으므로 향후 다양한 식품 제조에 starter로서 활용하거나, 가열처리나 위산에 대해 보다 안정한 효소 활성을 유지하기 위해 마이크로캡슐화 기술을 적용한 효소를 제조함으로써 혈전용해효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

#### 참고문헌

1. 길지은, 김기남, 박인식. 1998. 새로운 혈전용해효소의 생성 및 특성 : 청국장에서 분리한 *Bacillus* sp. KP-6408로부터

- 터 효소 생성의 최적조건. 한국식품영양과학회지 27, 51-56.
2. 김두영, 이은탁, 김상달. 2003. 한국재래간장 발효균 *Bacillus subtilis* K7 유래의 혈전용해 Protease의 정제 및 특성. 한국응용생명화학회 46, 176-182.
  3. 김상숙, 이주훈, 안용선, 김정환, 강대경. 2003. 청국장으로부터 분리한 *Bacillus amyloliquefaciens* D4-7이 분비하는 혈전용해효소의 특성 및 열안정성에 미치는 첨가물의 효과. 한국미생물생명공학회 31, 271-279.
  4. 김승호. 1998. 된장의 기능성에 대한 새로운 연구방향. 한국콩연구회 15, 8-15.
  5. 박건영. 1997. 한국 전통발효식품(된장, 김치)의 발암안정성, 항돌연변이 및 항암 기능성. 식품과학과 산업. 식품과학과 산업 30, 89-102.
  6. 유천권, 서원상, 이철수, 강상모. 1998. 청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis* K-54이 분비하는 혈전용해효소의 정제 및 특성. 한국미생물·생명공학회 26, 507-514.
  7. 이창호, 김원찬, 이인구, 박희동. 2008. 메주 제조시 *Bacillus subtilis*의 첨가가 재래식 된장의 발효에 미치는 영향. 한국식품저장유통학회 15, 598-605.
  8. 최경근, 최승필, 함승시, 이득식. 2003. 메주발효에 관여하는 우량균주의 분리, 동정 및 생육특성. 한국식품영양과학회 32, 818-824.
  9. 현광욱, 이종수, 함정희, 최신양. 2005. 재래식 된장으로 부터 혈전용해활성을 나타내는 세균의 분리 및 동정. 한국미생물·생명공학회지 33, 24-28.
  10. Astrup, T. and S. Millertz. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 40, 346-351.
  11. Baruah, D.B., R.N. Dash, M.R. Chaudhari, and S.S. Kadam. 2006. Plasminogen activators: a comparison. *Vascular Pharmacol.* 44, 1-9.
  12. Christopher, J.O. and R. Elosua. 2008. Cardiovascular risk factors. insights from framingham heart study. *Rev. Esp. Cardiol.* 61, 299-310.
  13. Ehrlich, H.J., N.U. Bang, S.P. Little, S.R. Jaskunas, B.J. Weigel, L.E. Mattler, and C.S. Harms. 1987. Biological properties of a kringless tissue plasminogen activator mutant. *Fibrinolysis* 1, 75-77.
  14. Gardell, S.J., L.T. Duong, R.E. Diehl, J.D. York, T.R. Hare, R.B. Register, J.W. Jacobs, R.A.F. Dixon, and P.A. Friedman. 1989. Isolation, characterization and cDNA cloning of a vampire bat salivary plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 64, 17947-17952.
  15. Georgianne, V. and E.V. Giardina. 2002. Benefits, adverse effects and drug interactions of herbal therapies with cardiovascular effects. *J. Am. College Cardiol.* 39, 1083-1095.
  16. Jung, Y.S. 1963. Microbiological studies of soysauce: identification and isolation of bacteria from traditional soysauce. *Kor. J. Microbiol.* 1, 30-35.
  17. Karin, S.G. 2009. Risk factors for cardiovascular disease in women. *Maturitas* 63, 186-190.
  18. 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.
  19. Kim, N.Y., E.J. Song, D.Y. Kwon, H.P. Kim, and M.Y. Heo. 2008. Antioxidant and antigenotoxic activities of Korean fermented soybean. *Food Chem. Toxicol.* 46, 1184-1189.
  20. Kim, S.R. and D.J. Huh. 1954. Studies on improvement of traditional condiment. *Nat. Defense Sci. Inst.* 56, 9277-9281.
  21. Ko, J.A., S.Y. Koo, and H.J. Park. 2008. Effects of alginate microencapsulation on the fibrinolytic activity of fermented soybean paste (Cheonggukjang) extract. *Food Chem.* 111, 921-924.
  22. Ko, J.H., J.P. Yan, L. Zhu, and Y.P. Qi. 2004. Identification of two novel fibrinolytic enzymes from *Bacillus subtilis* QK02. *Comp. Biochem. Physiol.* 137, 65-74.
  23. Lim, S.M. and D.S. Im. 2009. Screening and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from Korean fermented foods. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 178-186.
  24. Lim, S.M., G.J. Lee, S.M. Park, D.H. Ahn, and D.S. Im. 2006. Characterization of *Lactobacillus cellobiosus* D37 isolated from soybean paste as a probiotic with anti-cancer and antimicrobial properties. *Food Sci. Biotechnol.* 15, 792-798.
  25. Liu, J., J. Xing, T. Chang, Z. Ma, and H. Liu. 2005. Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods. *Process Biochem.* 40, 2757-2762.
  26. Lowe, G.D.O. and A. Rumley. 1999. Coagulation, fibrinolysis and cardiovascular disease. *Fibrinolysis Proteol.* 13, 91-98.
  27. Martin-Hernandez, M.C., A.C. Alting, and F.A. Exterkate. 1994. Purification and characterization of the mature, membrane-associated cell-envelope proteinase of *Lactobacillus helveticus* L89. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 828-834.
  28. Naik, D. and S.R. Baral. 2009. Purification and characterization of fibrinolytic thermostable meatalloprotease from and alkalophilic *Bacillus subtilis*-CSN. *New Biotechnol.* 255, S90-S91.
  29. Peng, Y., Q. Huang, R. Zhang, and Y. Zhang. 2003. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. *Comp. Biochem. Physiol.* 134, 45-52.
  30. Yoshinori, M., A.H.K. Wong, and B. Jiang. 2005. Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods. *Food Re. Int.* 38, 243-250.

(Received September 18, 2009/Accepted October 12, 2009)

---

**ABSTRACT: Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced by *Bacillus subtilis* MJ-226 Isolated from *Meju***

**Sung-Mee Lim** (Department of Food Science and Technology, Tongmyong University, Busan 608-735, Republic of Korea)

Among 27 *Bacillus* sp. isolated from *Meju*, a traditional Korean soybean fermented food, a strain MJ-226 was selected due to its strong fibrinolytic activity, and it was identified to be *Bacillus subtilis* MJ-226 according to morphological and biochemical characterization and sugar utilization. The fibrinolytic enzyme of *B. subtilis* MJ-226 was maximally produced by cultivating in the Tryptic Soy Broth (TSB) for 24~26 h at 37°C, and the enzymes activity was promoted with adding glucose, fructose, peptone or yeast extract to TSB. The fibrinolytic enzyme was stable at the range of pH from 6.0 to 8.0, and between 35 and 40°C. Also, when the crude enzyme was exposed to various metal ions and chemical inhibitors for 12 h, the enzyme stability was maintained by MnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KCl, and NaCl. However, the stability was destroyed by treatment with CuSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, and BaCl<sub>2</sub>, and the enzyme was unstable in the presence of chemical inhibitors such as iodoacetic acid, leupeptin, phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF), sodium dodecyl sulfate (SDS), thiourea, trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N',N',N'-tetraacetic acid (CDTA) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).