

*Bacillus subtilis*를 이용한 대두 발효식품의 혈전용해능

정 영 기

동의대학교 미생물학과

A strain producing strongly fibrinolytic enzyme was isolated from soil and was identified to be *Bacillus subtilis* by biochemical and physiological characterization. The optimal culture conditions for the production of fibrinolytic enzyme was determined to be 1.0% tryptone, 1.5% soluble starch, 0.5% peptone, 0.5% NaCl, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Initial pH and temperature were pH 8.0 and 30°C, respectively. The highest enzyme production was observed at 30 hours of cultivation at 30°C. The fibrinolytic enzyme was purified to homogeneity by DEAE Sephadex A-50 ion exchange column chromatography, 70% ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-200 and G-75 gel filtration column chromatography. The molecular weight of the purified enzyme was 28,000 as determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. A gene encoding the fibrinolytic enzyme was cloned into a plasmid vector pBluescript, transforming *E. coli* XL-1 Blue. The clone was able to degrade fibrin. This indicated that the gene could encode a fibrinolytic enzyme. The nucleotide sequence of the 2.7 kb insert was determined in both direction. One open reading frame composed of 1023 nucleotides was found to be a potential protein coding region. There was the putative Shine-Dalgarno sequence and TATA box upstream of the open reading frame. The homology search data in the genome database showed that both the 2.7 kb insert and 1 kb open reading frame carried no significance in the nucleotide sequence of known fibrinolytic enzyme from *Bacillus serovars*. The recombinant cell harboring the novel gene involved in fibrinolysis was subjected to protein purification. The molecular mass of the purified fibrinolytic enzyme was

determined to be 31864 Dalton, which was highly in accordance with the molecular mass(33 kDa) of the fibrinolytic gene deduced from the insert. The fibrinolytic enzyme was purified 50.5 folds to homogeneity in overall yield of 10.7% by DEAE Sephadex A-50 ion exchange, 85% ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-50, Superdex 75 HR FPLC gel filtration. In conclusion, a novel fibrinolytic gene from *Bacillus subtilis* was identified and characterized by cloning a genomic library of *Bacillus subtilis* into pBleuscript. For the soybean fermented by this strain, it is found that there increased assistant protein about 20% compared to the soybean not fermented and increased about 30% according to amino acid analysis and, in particular, essential amino acid increased about 40%. When keeping this fermented soybean powder at room temperature for about 70days, it showed very high stability maintaining almost perfect activity and, therefore, it gave us great suggestion its possibility of development as a new functional food.

서 론

혈전은 생체에 상처가 발생 시 혈액을 응고시켜 과도한 출혈을 방지하고 상처의 복구를 위한 복잡한 혈전 생성기작에 의해서 이루어지고 있다. 이러한 혈전은 혈액을 구성하는 성분중의 하나인 fibrinogen이 혈액내의 활성화된 thrombin에 의하여 fibrin으로 전환되어 불용성의 중합체를 형성함으로써 생성된다[1]. 이렇게 형성된 혈전이 혈액 내에 존재 할 경우 혈액의 흐름을 방해하거나 혈관을 따라 이동하면서 뇌혈관과 같은 미세혈관을 막아 순환기계의 성인병을 유발한다. 즉, 혈전증(thrombosis)이라고 하면 뇌경색, 심근 경색이라고도 하여 혈관에 혈전이 쌓여 혈액의 흐름을 방해 함으로써, 세포의 성장 장애 및 기능장애를 유발시키는 등의 원인으로 여러 형태의 성인병을 일으키는 증상을 말한다.

혈전을 용해시켜 혈액순환을 용이하게 할 수 있는 작용 물질로서는 혈전을 바로 용해시키는 혈전 용해효소(fibrinolytic enzyme)와 혈액 중의 plasminogen을 활성화

하여 생성된 plasmin으로 하여금 혈전을 분해시키도록 하는 plasminogen activator의 두 부류로 나눌 수 있다. 현재 사용되고 있는 혈전용해제로는 urokinase(UK)[2~6], streptokinase(SK)[7], tissue type plasminogen activator(tPA)[8~12]등이 후자에 해당된다. 하지만 이와 같은 제품은 반감기가 짧고, 가격이 매우 높은 단점을 지니고 있다. 이러한 단점을 보강하고 대량생산을 하기 위한 일환으로 연구가 활발히 진행되어 최근 들어 *Bacillus* sp. 유래의 혈전용해효소가 많이 보고되고 있다.

따라서 본 연구는 대두의 발효과정에서 분리한 미생물을 동정하고, 이 생산균으로부터 혈전용해효소를 정제하여 제 성질을 밝혔다. 그리고 gene cloning에 의하여 유전자를 확인하고 염기서열을 규명함과 동시에 대두를 발효하여 건강식품으로의 평가를 시도하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주, 플라스미드 및 배지

Fibrinolytic enzyme gene의 공여 균주로는 *Bacillus subtilis* A1을 사용하였으며, fibrinolytic enzyme의 발현을 위해 cloning vector인 pBluescript II SK(+)를 사용하였다. 숙주 균주로는 *E. coli* XL-1 blue를 사용하였다. cloning된 *E. coli* XL-1 blue의 배양을 위해서 ampicillin 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 LB(Lauria Bertani)배지를 사용하여 37°C에서 18시간 배양하였다.

DNA 조작 및 sequencing

재조합균주에서 plasmid DNA는 Sambrook 등의 alkaline lysis 방법에 따라 추출하였으며[13], 추출된 plasmid를 주형으로 하여 PCR을 수행하여 증폭시킨 다음, Perkin Elmer사의 ABI377A 자동 염기서열 결정기에 주입하였다.

Cell-free extracts의 조제

LB배지에서 *E. coli*를 접종후 18시간 배양 후 배양액을 8,000 rpm에서 10분간 원

심분리하여 집균하고 20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 현탁하여 -80°C 에서 30분간 얼린 다음 37°C 에서 15분간 녹이는 것을 9회 반복하였다. 세포추출물은 13,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 그 상등액을 cell-free extracts로 사용하였다.

단백질 측정

효소정제과정 중의 단백질의 농도는 분광광도계를 사용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈전용해 효소활성 측정

혈전용해 활성정도를 측정하기 위해 Astrup 등의 방법[14]에 따라 fibrin을 기질로 하는 fibrin 평판법을 응용하였다. 즉 0.6%의 fibrinogen 용액 10 ml를 petri dish에 넣고 borate saline buffer(pH 7.8)에 녹인 thrombin용액(40 units/ml)을 총 20 units되도록 가하여 균일하게 혼합되도록 잘 흔들어 주면, 서서히 fibrinogen이 fibrin으로 되면서 굳어진다. 활성측정은 측정할 시료를 fibrin plate 위에 얹고 37°C incubator에서 반응시켜 fibrin이 분해되어 생기는 환의 면적을 측정하였다.

효소의 정제

효소의 정제는 제조된 cell-free extracts를 DEAE Sephadex A-50 column에 주입하여 NaCl(0.1~0.5 M)을 이용하여 단계별로 용출한 후, 활성 분획을 회수하여 85% ammonium sulfate로 침전시켜 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물은 탈염 후, 20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 용해시켜 동일 완충액으로 평형화시킨 Sephadex G-50 column과 Superdex 75 HR FPLC column에 통과시켰다.

Fibrinolytic enzyme의 분자량 측정

Laemmli 등의 방법[15]에 따라 각각 0.1% SDS가 포함된 12% acrylamide 농도의

separating gel과 4% acrylamide 농도의 stacking gel을 사용하여 SDS-PAGE에 의해 정제된 효소의 분자량을 측정하였다.

결과 및 고찰

생산균의 분리 및 동정

대두를 발효하여 Fig. 1.에서 보이는 바와 같이 혈전용해능이 있는 발효대두로부터 미생물을 분리하였다. 분리된 균주를 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"에 준하여 동정한 결과 Fig. 2.와 같은 내생포자를 형성하는 gram positive 간균으로서 *Bacillus subtilis*로 동정하였다. 이후 본 생산균은 *Bacillus subtilis* A1으로 명명하여 연구를 진행하였다.

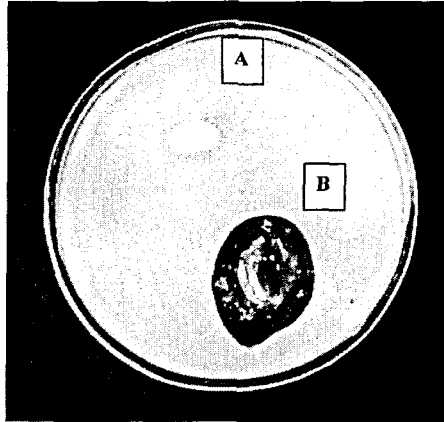


Fig. 1. Fibrinolytic enzyme activity of non-fermented soybean and solid state fermented soybean.

A: Non-fermented soybean B: Solid state fermented soybean

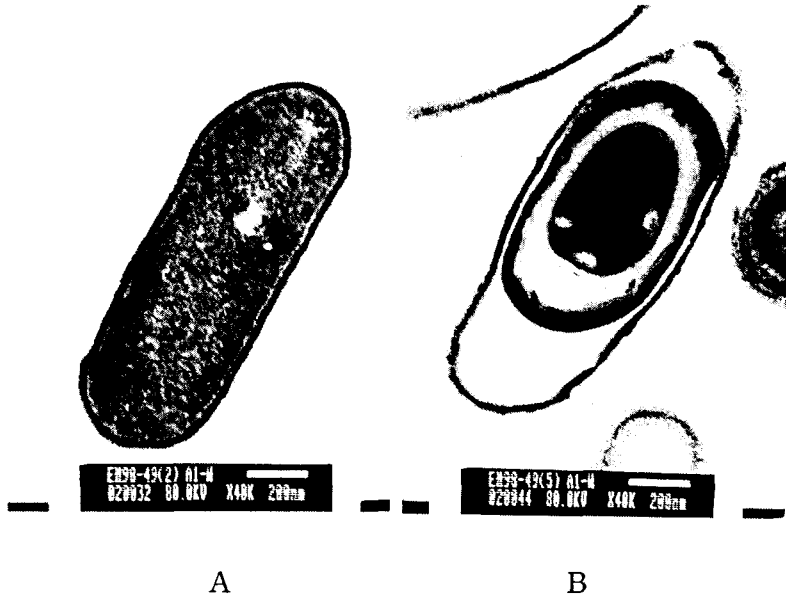


Fig. 2. Transmission electron micrograph of *Bacillus subtilis* A1

A: Vegetative cell(24hours)

B: Spore forming cell(72hours)

혈전용해효소의 정제

혈전용해효소 생산균, *Bacillus subtilis* A1을 최적배양조건으로 30시간 배양하여 원심분리한 후 조효소를 포함하고 있는 상등액을 취했다. 모든 정제과정은 4°C 또는 실온 하에서 실시하였으며, 각 정제 단계의 개요는 Table 1.에 나타나있다. DEAE Sephadex A-50 ion exchange column chromatography의 경우 목적효소를 수지에 흡착시키는 것보다 오히려 불순 단백질과 색소 등을 수지에 흡착시키고 목적 효소는 batch법과 같이 그냥 통과시키는 것이 훨씬 더 높은 수율로 정제를 행할 수 있었다. 혈전용해활성이 있는 분획을 모은 후 이를 70% ammonium sulfate 침전을 실시하여 4°C에서 24시간 방치한 후 원심분리하여 얻어진 침전물을 투석과 농축을 행한 후 이를 Sephadex G-200과 Sephadex G-75 gel filtration column chromatography를 행하였다. 얻어진 활성 분획을 12% SDS-PAGE를 행한 결과 단일 band의 정제된 혈전용해효소를 확인할 수 있었다. Table 1.에서 보는 바와 같이 최종적으로

18.8%의 수율을 얻을 수 있었으며 그 정제도는 약 960배였다.

Table 1. Summary of purification step of fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* A1

Step	Total Protein (mg)	Total Activity (units/ml)	Specific Activity (units/ml)	Purification (Fold)	Yield (%)
Culture Broth	9,385.0	15,652	1.7	1	100
DEAE Sephadex A-50	538.4	12,964	24.1	14.2	82.8
70%(NH ₄) ₂ SO ₄ Precipitation	62.7	9,725	155.1	91.2	62.1
Sephadex G-200 Gel filtration	16.2	5,329	329.0	193.5	34.0
Sephadex G-75 Gel filtration	1.8	2,938	1,632.2	960.1	18.8

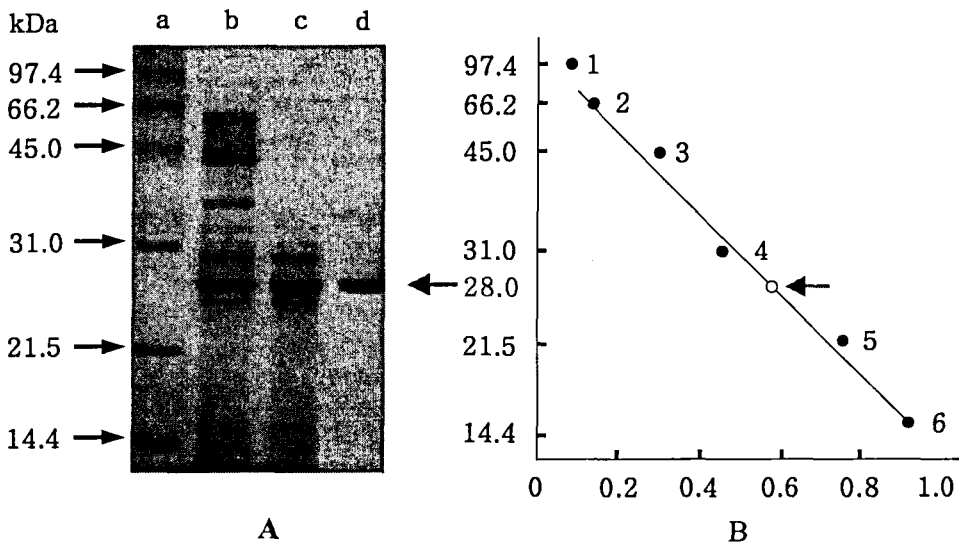


Fig. 3. The molecular weight of the purified fibrinolytic enzyme on SDS-PAGE. A: SDS-PAGE of fractions obtained during purification of *Bacillus subtilis* fibrinolytic enzyme. lanes: a, low molecular weight marker protein; b, culture supernatant; c, DEAE Sephadex A-50 ion exchange column chromatography; d, Sephadex G-75 gel filtration column chromatography(the purified enzyme).

B: Estimation of molecular weight of the purified enzyme on logarithmic graph : 1, phosphatase b(97.4 kDa); 2, serum bovine(66.2 kDa); 3, ovalbumin (45 kDa); 4, carbonic anhydrase(31 kDa); 5, trypsin inhibitor(21.5 kDa); 6, lysozyme(14.4 kDa).

정제효소의 분자량

정제된 효소를 low molecular weight standard(Bio Red. co.)와 함께 12% SDS-PAGE 상에서 단일 band를 확인할 수 있었고 R_f 치를 구하여 표준곡선에 의해 분자량을 측정하였다. 그 결과 정제 효소의 분자량은 Fig. 3.에서 보는 바와 같이 28,000dalton 으로 측정되었다.

재조합 plasmid 제조 및 균주 선별

Bacillus subtilis A1의 chromosome을 대량 분리하여 *Sau3A* 제한효소로 partial digestion시켜 4-10 kb DNA단편을 회수하였다. cloning vector인 pBluescript II SK(+)를 *Bam*HI 제한효소로 절단하여 앞서 분리한 DNA 단편과 연결하여 *E. coli* XL-1 blue에 형질전환시킨 후 ampicillin과 X-gal을 함유한 LB 고체배지에 도말하여 약 1200개의 white colony를 선별하였다. 이들을 1 ml의 액체배지를 함유한 test tube에 37°C에서 18시간 배양 후 그 배양액을 eppendorf tube에 옮긴 다음 약 2분간 원심 분리한 후 상등액 900 μ l는 버리고 나머지는 그 자체에 다시 현탁시킨 후 그 용액 10 μ l를 fibrin plate에 주입하여 37°C에 배양하였다. 이 방법으로 약 4시간 후에 Fig. 4에서 보는 바와 같이 활성이 가장 강한 혈전 용해효소생성 대장균을 선별하였다.

혈전용해효소 생성 유전자를 함유한 대장균으로부터 plasmid를 alkaline lysis 법과 ultra-centrifuge를 이용하여 대량 순수 분리하였다. 클로닝된 DNA 크기를 확인하기 위해 plasmid DNA 1 μ g을 *Xba*I 과 *Pst*I을 각각 1 unit 씩을 사용하여 multicore buffer에서 double digestion 하였다. 1시간 반응후 0.7% agarose gel에 주입하여 DNA size marker와 확인하였을 때 약 8.0 kb의 외래 DNA가 확인되었다. 이 재조합 DNA를 pBFA1이라 명명하고 여러 가지 제한 효소로 mapping하였을 때 *Bam*HI으로 잘랐을 경우 vector를 포함하고 있는 6.0 kb, 3.0 kb 그리고 2.0 kb의 DNA 단편의 확인으로 삽입된 DNA 내에 3개의 *Bam*HI site가 있는 것을 확인하였다. 6.0 kb DNA 단편은 self ligation을 실시하였고 나머지 3.0과 2.0 kb DNA단편은 *Bam*HI으로 절단된 pBluescript II SK(+)에 subcloning하였다(Fig 5). 이들 중 3.0

kb DNA단편이 본래의 8.0 kb DNA(pBFA1)가 가지는 혈전용해 효소활성을 그대로 유지하고 있었다(Fig. 6). 이 subcloning된 재조합 DNA를 pBFA2으로 명명하였다.

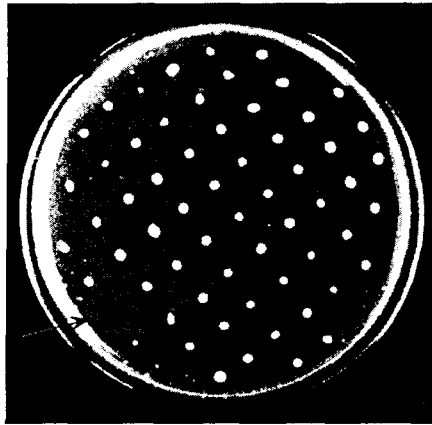


Fig. 4. Gene cloning of fibrinolytic enzyme from genomic library.

The arrow indicates the *E. coli* carrying the fibrinolytic enzyme gene.

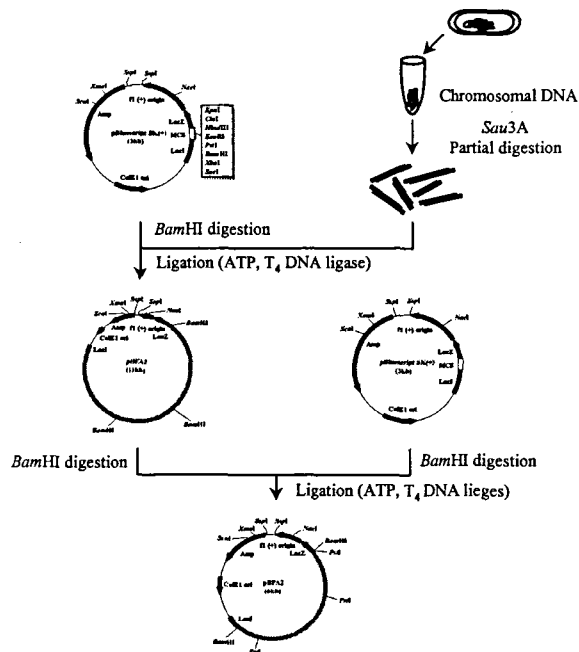


Fig. 5. Overall procedure for generating the construct, pBFA2, encoding the fibrinolytic enzyme derived from *Bacillus subtilis* A1.

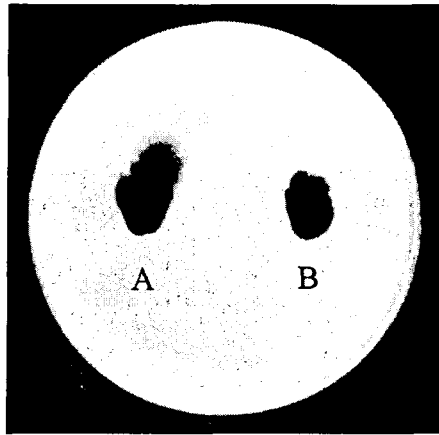


Fig. 6. Comparison of fibrinolytic activity with pBFA1(A: 8.0 kb insert) and pBFA2 (B: 3.0 kb insert).

Agarose gel 전기영동

pBAF2의 외래 DNA를 확인하기 위해 *Bam*HI 제한효소를 이용하여 절단후 8% agarose gel 전기영동 결과를 Fig. 4에서 나타내었다. *Bam*HI 절단후 외래DNA는 약 2.7 kb임을 확인하였다.

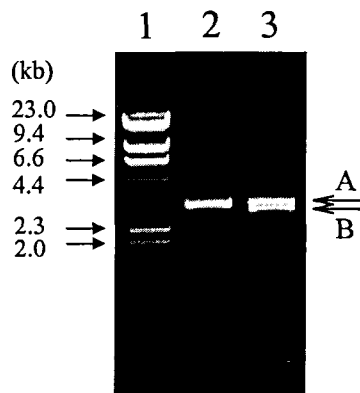


Fig. 7. Agarose gel electrophoresis of pBluescript and recombinant (pBAF2) DNA digested *Bam*HI.

Lane 1; λ /*Hind*III DNA molecular size marker, lane 2; pBluescript II SK(+) digested with *Bam*HI, lane 3; recombinant(pBAF2) DNA digested with *Bam*HI. A: pBluescript II SK(+) which was used as cloning vector. B: insert fragment of cloning.

염기서열 결정

pBluescript II SK(+)의 multicloning site내의 *Bam*H1 제한효소 부위에 삽입된 DNA 단편에 universal primer인 T₇ primer와 reverse primer인 SP6 primer를 시발체로 하여 PCR을 수행한 후, 1차적으로 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열의 약 100~150 bp 정도 후진하여 결정된 염기서열내의 염기와 상보적인 약 20개 정도의 primer를 제작하여 PCR을 수행한 후, 2차 염기서열을 결정하였으며, 같은 방법으로 3차 염기서열을 결정하였다. Fig. 8에서 염기서열 결정전략과 그 결과를 나타내었다.

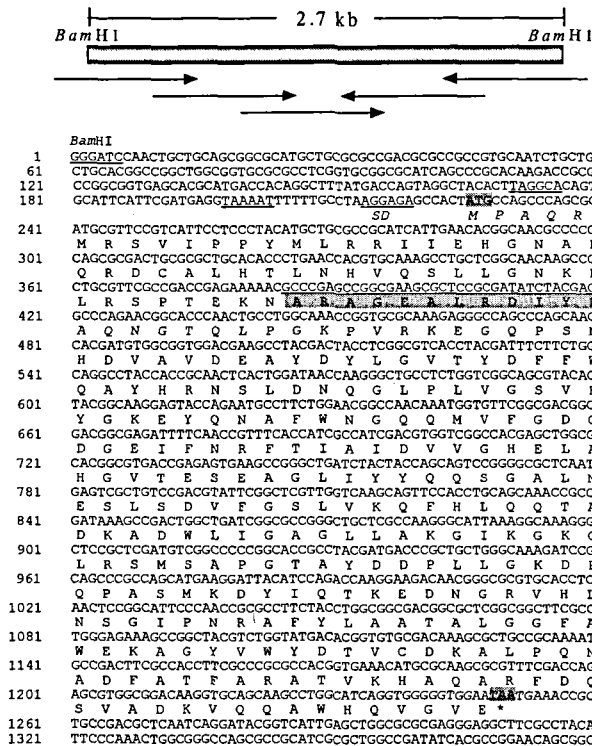


Fig. 8. Nucleotide and amino acid sequences of the fibrinolytic enzyme gene.

The upper figure shows strategy for DNA sequencing. Putative promoter sequences and a ribosome-binding site(SD) are underlined. The N-terminal amino acid sequence revealed with the purified enzyme is indicated by a long box. The short boxes show initiation codon(ATG) and stop codon(TAA) respectively.

염기서열의 비교

기존의 genome database 상동성 비교결과를 Table 2에 나타내었다. 기존의 database와 특별한 상동성을 나타내지는 않았다. 그 중에서 상동성이 비교적 높은 *B. caldolyticus*를 선택하여 Fig. 9에 나타내었다.

Table 2. Comparison of nucleotide sequence representing the gene with other nucleotide sequences.

Strain	Encoding gene	Homology(%)*
<i>B. brevis</i>	Neutral Protease	30.99
<i>B. caldolyticus</i>	Neutral Protease	31.48
<i>B. stearothermophilis</i>	Neutral Protease	31.18
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Neutral Protease	29.03
<i>B. megaterium</i>	Neutral Protease	28.05
<i>B. thermoproteolyticus</i>	Neutral protease	26.78

* Homology(%)=Identity Base No./Input Base No. × 100

SDS-PAGE

숙주인 *E. coli* XL-1 blue는 LB에서, pBluescript II SK(+) 와 fibrinolytic enzyme gene이 cloning된 재조합균주(pBFA2)는 ampicillin 20 µg/ml이 포함된 LB에서 18시간 배양하여 원심분리한 후 균체를 회수하였다. 균체내 단백질을 SDS-PAGE 상에서 비교한 결과 Fig. 10에서와 같이 숙주와 vector에서는 나타나지 않았으나 재조합 균주에서 fibrinolytic enzyme을 확인하였다.

```

>>BCU25629 U25629 Bacillus caldolyticus neutral proteinase (1641 nt)
initn: 539 initl: 372 opt: 562 Z-score: 422.4 expect() 6.4e-17
61.364% identity in 440 nt overlap

      10      20      30      40      50
Query   GCCCCGAGCCGGCGAAGCGCTCCGGATATCTACGACGCCAGAACGGCACCCAACT
BCU256  GCAAGACAATACGGCCGGCAGCGGCATTTTACGTATGACGGACGAAACCGCACCGTTT
      780      790      800      810      820      830
Query   GCCTGGCAAAACCGGTGCGCAAGAGGGCCAGCC-----CAGCAACACGATGTGGCGG
BCU256  GCCCGGC-AGCTTGTGGCCGATGGCGACAACCAATTTTCGCCAGCTATGACGGCGGG
      840      850      860      870      880      890
Query   TGGACGAAGCCTACGACTACCTCGGCGTCACCTACGATTTCTTCTGGCAGGCCTACCACC
BCU256  CCGTGGACGCCATTATTACGCCGGCGTCTGTATGATTACTACAAAATGTGCACGGCC
      900      910      920      930      940      950
Query   -GCAACTCACTG-GATAACCAAGGGCTGCCTCTGGTCGGCAGCTACACTACGGCAAGGA
BCU256  GCGTGAAGCTATGACGGCAGCAACGCCGCCATCCGTTCC--ACCGTCATTATGGCCGTGG
      960      970      980      990      1000     1010
Query   GTACCAGAAATGCCCTTCTGGAAACGGCCAAATGGTGTTCGGCCAGCGGCACGGCGAGA-
BCU256  CTACACAAACCGCTTTGGAAACGGCTTGGCAATGGGTACGGCGATGGCGACGACAGAC
      1020     1030     1040     1050     1060     1070
Query   TTTTCAACCGTTTACCACTGCACATCGACGTGGTGGCCACGAGCTGGCGCACGGCGTGA
BCU256  GTTTTGCCTTT-TCCGGCGCATGACCTGCTGGGCATGGAGTACCCCATGGCGGTGA
      1080     1090     1100     1110     1120     1130
Query   CCGAGAGTGAAGCCGGGCTGATCTACTACCAAGCGAGTCCGGGGCGCTCAATGAGTGGCTGT
BCU256  CCGATTATACGGCCGGCTTGTATTACAAJACGAATCCGGGCCATCAATGAAGGATGT
      1140     1150     1160     1170     1180     1190
Query   CCGACGTATTCCGGCTCGTTGGTCAAGCAGTTC--CACCTGCAGCAAAACCGCGATAAAGC
BCU256  CCGATATTTTCGGCACGCTCGT---GGAGTTCTACGCCAACCGCAACCCGGACTGGGAGA
      1200     1210     1220     1230     1240     1250
Query   CGACTGGCTGATCGGCGCGGGCTGCTCCGCAAGGGCATTAAAGGCANAGGGCTCGGCTC
BCU256  TCGCGAAGACATTTACACGCTGGGATCCCGGCGATGCGGCTCCGCTCGATGTCGGACC
      1260     1270     1280     1290     1300     1310

```

Fig. 9. Nucleotide sequence homology of the gene from *B. subtilis* A1 and *B. caldolyticus*. Query represents the gene.

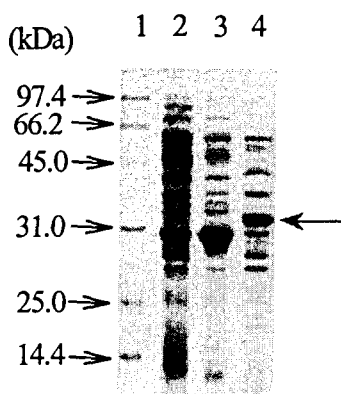


Fig. 10. SDS-PAGE of host, vector, and recombinant protein
Lane 1; low molecular marker protein, lane 2; *E. coli* XL-1 blue, lane 3; *E. coli* XL-1 blue carrying pBluescript II SK(+), lane 4; recombinant (pBFA2) carrying the fibrinolytic enzyme gene. The arrow indicates fibrinolytic enzyme.

효소의 정제

DEAE Sephadex A-50 adsorption cell-free extracts는 20 mM Tris-HCl 완충액으로 평형화된 DEAE Sephadex A-50 column에 주입하여 흡착시킨 후 동일 완충액으로 충분히 세정한 다음 0.1 M-0.5 M까지의 NaCl 염농도하에서 단계별로 1.5 ml/min의 용출속도로 tube당 7 ml씩 분획하여 용출시킨 결과는 Fig. 11.과 같다. 본 효소는 NaCl 약 0.25 M에서 용출되기 시작하여 0.35 M에서 완전히 용출되었다. 용출된 분획중 활성이 있는 분획을 모아 농축 및 탈염하여 정제실험에 이용하였다.

Ammonium sulfate 침전 얻어진 효소액은 4°C에서 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 포화시켜 침전된 단백질을 20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 현탁한 후 동일한 완충용액으로 24시간 동안 투석하였으며, 투석된 효소액을 13,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 취하였다.

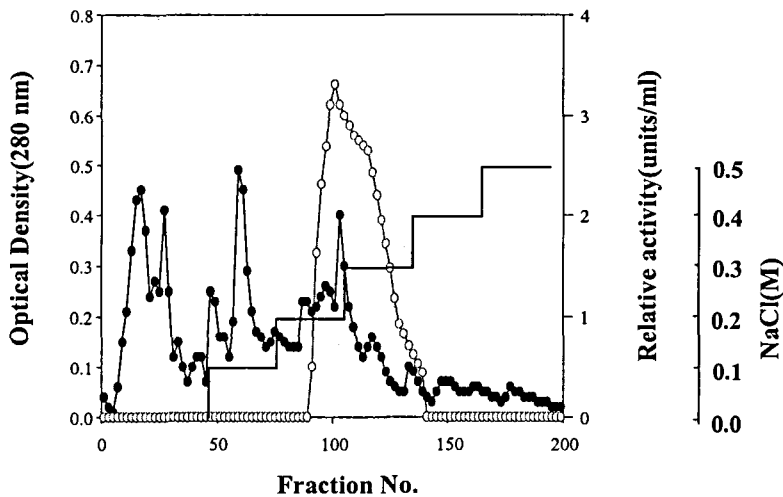


Fig. 11. DEAE Sephadex A-50 column chromatography of the fibrinolytic enzymes from recombinant *E. coli* XL-1 blue.

Symbols: ●; protein concentration, ○; fibrinolytic enzyme, —; NaCl concentration

Gel filtration

1st Sephadex G-50 농축된 효소액을 0.2 M NaCl을 함유하는 20 mM Tris-HCl 완충액으로 평형화된 Sephadex G-50 column에 주입하여 동일 완충액으로 분획당 2 ml씩 0.1 ml/min의 속도로 용출시킨 결과는 Fig. 12.과 같다. 용출된 분획중 활성이 있는 분획을 모아 농축 및 탈염하였다.

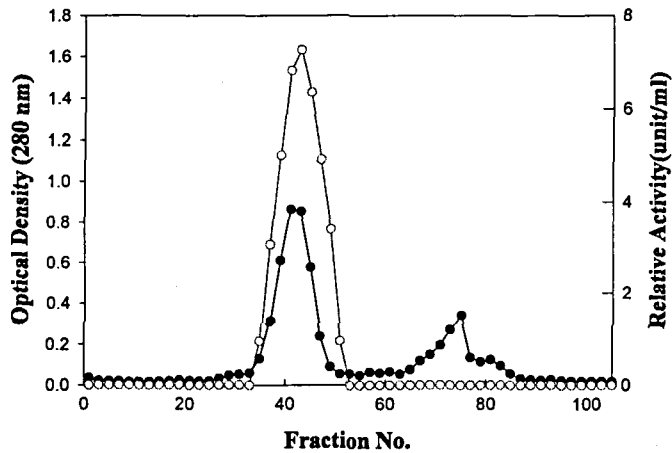


Fig. 12. Chromatography of the fibrinolytic enzyme on a Sephadex G-50.
Symbols: ●; protein concentration, ○; fibrinolytic enzyme.

2nd Superdex 75 HR FPLC 얻은 농축 효소액을 0.15 M NaCl을 함유하는 20 mM Tris-HCl 완충액으로 평형화된 Superdex 75 HR FPLC column에 주입하여 분획당 0.1 ml씩 0.5 ml/min의 속도로 용출시켰다. 이상의 정제과정은 Table 3과 같이 최종수율은 10.7%, 효소의 정제도는 약 50.5 배였다.

Table 3. Purification of fibrinolytic enzyme from recombinant *E. coli* XL-1 blue.

Purification Step	Total Protein (mg)	Total Activity (units/ml)	Specific Activity (units/ml)	Purification (Fold)	Yield (%)
Crude Enzyme	237.6	479	2	1	100
DEAE Sephadex A-50	19.6	362	18.5	9.2	75.6
85%(NH ₄) ₂ SO ₄ Precipitation	7.3	201	27.3	13.5	41.9
Sephadex G-50 Gel Filtration	3.5	189	54.5	26.9	39.4
Sephadex 75 HR FPLC	0.5	51	102.06	50.5	10.7

효소의 단일성 및 분자량 측정

Superdex 75 HR FPLC로 정제한 fibrinolytic enzyme의 분자량을 측정하기 위하여 12% polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동한 결과 Fig. 12와 같이 단일 band를 보였으며, gel 상에서 표준단백질과 상대이동거리를 측정하여 표준 단백질의 대수값과 비교한 결과는 Fig. 13. 과 같이 약 33,000 dalton 정도였다.

N-말단 아미노산 서열 결정

정제된 fibrinolytic enzyme의 N-말단 아미노산 잔기의 차이를 알아보기 위하여 아미노산 서열 분석기를 이용하여 분석하였다. 정제효소의 아미노산 서열은 ARAGEALRDIY이었다. 이들 서열을 다른 N-말단 서열이 알려진 효소들과 비교해 본 결과는 Fig. 14.와 같다. 정제된 효소의 N-말단은 첫 번째 아미노산인 Alanine만 일치하였으므로 기존에 연구된 여러 fibrinolytic enzyme과는 다른 것으로 여겨진다.

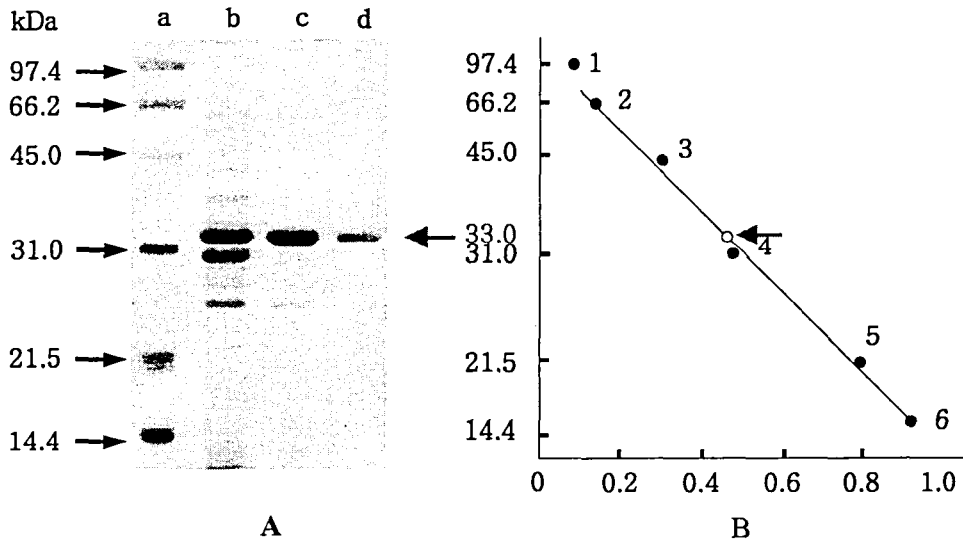


Fig. 13. SDS-PAGE pattern A and molecular weight determination B of purified fibrinolytic enzyme from recombinant *E. coli* XL-1 blue.

Lane a, Size marker: Phosphorylase(97.4), Bovine serum albumin(66.3), Ovalbumin(45), Carbonic anhydrase(31), Trypsin inhibitor(21.5), Lysozyme (14.4); b, Crude enzyme; c, DEAE Sephadex A-50; d, purified enzyme.

Protease	N-terminal amino acid sequence										
Subtilisin Carlsberg	A	Q	T	V	P	Y	G	I	P	L	I
Subtilisin DY	A	G	T	V	P	Y	G	I	P	L	I
Subtilisin Amylosa	A	G	T	V	P	Y	G	I	S	G	I
Subtilisin BPN	A	G	S	V	P	Y	G	V	D	G	I
Subtilisin NAT	A	Q	S	V	P	Y	G	I	S	Q	I
A1-R	A	R	A	G	E	A	L	R	D	I	Y

Fig. 14. Comparison of N-terminal sequence of the purified protease, A1-R with other proteases.

발효대두의 식품학적 평가

발효한 대두를 기능성 식품으로 개발할 수 있는지의 가능성을 타진하기 위하여 식품 및 영양학적 기초조사를 실시하였다. Fig. 15에서와 같이 고체 배양한 대두를 발효하지 않은 대두와 기초성분을 분석 비교한 결과 단백질과 지방에서 약 20%정도 성분증가 결과를 보였다. 또한 아미노산 분석 결과를 Fig. 16.에서 보면 필수 아미노산이 약 40% 증가하였고 일반 아미노산도 약 30%의 증가를 보였다. 이는 대두를 *Bacillus subtilis* A1으로 발효할 경우 혈전용해효소를 생산함과 동시에 식품 및 영양학적 가치도 크게 증가하여 기능성 식품으로서의 개발 가능성이 있다는 것을 시사하는 결과라고 사료된다.

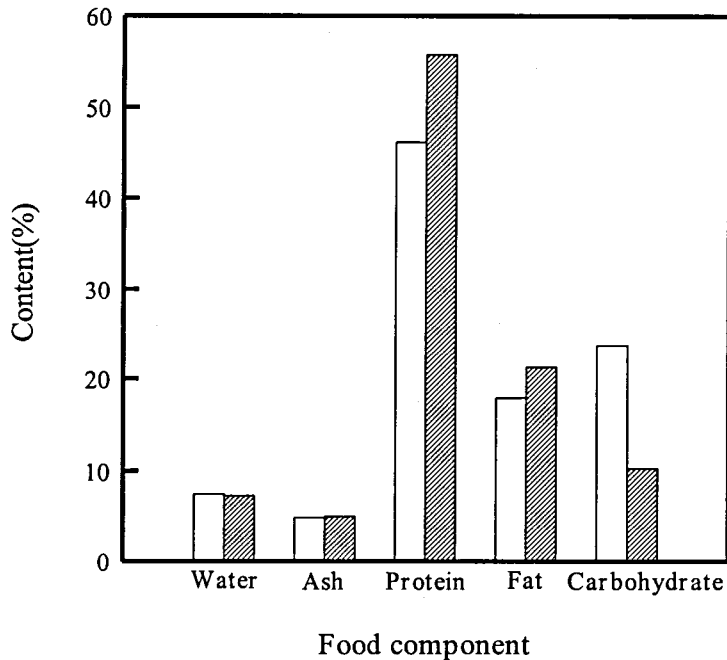


Fig. 15. Analysis of food component of fermented and non-fermented Soybean with the *Bacillus subtilis* A1.

□ : Non-fermented soybean (442Cal/100g)

▨ : Fermented soybean (462Cal/100g)

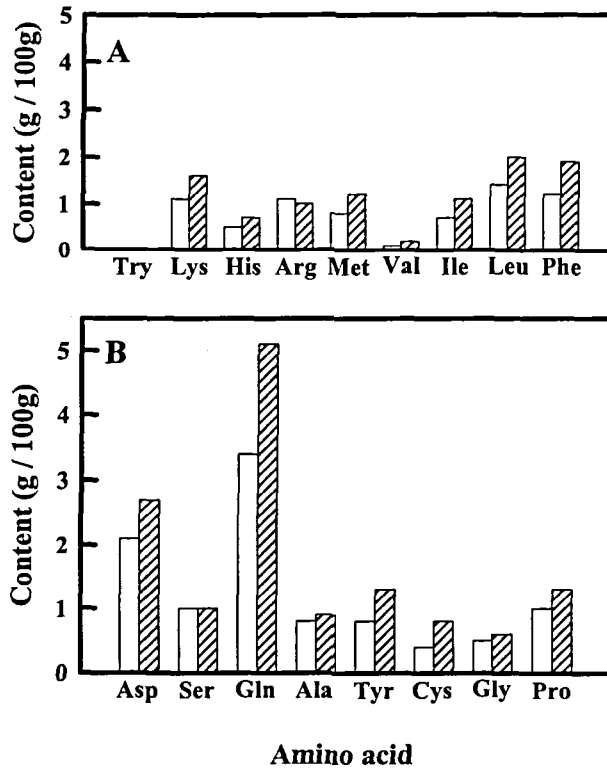


Fig. 16. Analysis of amino acid of fermented soybean from the strain *Bacillus subtilis* A1 and non-fermented soybean.

A : Essential amino acid

□ : Non-fermented soybean (total content ; 6.9g/100g)

▨ : Fermented soybean (total content ; 9.7g/100g)

B : Non-essential amino acid

□ : Non-fermented soybean (total content ; 10.0g/100g)

▨ : Fermented soybean (total content ; 12.7g/100g)

참 고 문 헌

Voet, D. and J. G. Voet. 1990. Biochemistry. Willy Press.

Sumi, H., H. Mihara and N. Toki. 1982. *Thromb. Haemostas.* 48: 342.

Sumi, H. and K. C. Robbins. 1983. *J. Bio. Chem.* 258: 8014.

- Sumi, H., N. Toki, K. Sasaki and H. Mihara. 1983. pp. 165. *In Progress in Fibrinolysis (IV)(1)(ed.)* by J. F. Davidson, Churchill Livingstone. London.
- Yeh, D. B. and J. G. Su. 1983. *Proc. Natl. Sci. Counc. B. Roc.* **7**: 131.
- Miwa, N., T. Sawada and A. Suzuki. 1984. *Biochem. Biophys. Acta.* **791**: 1.
- Sumi, H. 1997. Oral streptokinase. Japan Tokyo Koho. JP. 54-28804.
- Dennica, D., W. E. Holmes and D. Collen. 1983. *Nature.* **301**: 214.
- Hoylaerts, M., D. C. Rijken, H. F. Lijnen and D. Collen. 1982. *J. Biol. Chem.* **257**: 2912.
- Rijkin, D. C., I. H. Vague, F. D. Cock and D. Collen. 1983. *J. Lab. Clin. Med.* **101**: 274.
- Bergsdorf, N., T. Nilsson and P. Wallen. 1983. *Thromb. Haemostas.* **50**: 740.
- White, W. F., G. H. Barlow, and M. M. Mozen. 1966. The isolation and characterization of plasminogen activator(urokinase) from human urine. *Biochem.* **5**: 2160-2169,
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning*, 2nd (ed.). Cold Spring Harbor. New York.
- Astrup, T. and S. Mullerts. 1952. *Arch. Biochem.* **40**: 346.
- Laemmli, U. K. 1970. cleavage of structural protein during the assembly of the bacteriophage T₄. *Nature.* **227**: 680-685.