

청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis* K-5401 분비하는 혈전용해효소의 정제 및 특성

유천권 · 서원상 · 이철수¹ · 강상모*
건국대학교 미생물공학과, ¹한국식품위생연구원

Purification and Characterization of Fibrinolytic Enzyme Excreted by *Bacillus subtilis* K-54 Isolated from Chung Guk Jang. Yoo, Cheon-Kwon, Weon-Sang Seo, Chul-Su Lee¹, and Sang-Mo Kang*. Department of Microbiological Engineering, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea, ¹Institute of Food Hygiene, Seoul 156-050, Korea - The strain K-54, the best producer of fibrinolytic enzyme, was isolated from Korean traditional food Chung Guk Jang and identified as *Bacillus subtilis*. Fibrinolytic enzyme was purified and characterized, and its molecular weight was determined. The fibrinolytic enzyme activity was increased about 66.9 times via purification with recovery yield of 10.1%. The optimum pH and temperature of this enzyme were 11 and 65°C. The enzyme was stable within a pH range 8-12 and unstable at 90°C. The molecular weight was estimated to be 29,000 dalton in the form of monomer with no other subunit. The isoelectric point was calculated 8.67. N-terminal sequence was identified Ala-Gly-Ser-Val-Pro-Try-Gly-Ser. Km value of the enzyme for α -casein was calculated to be 0.31 (3.1 mg/ml). The enzyme activity highly inhibited by PMSF at 1 nM.

Key words: Chung Guk Jang, fibrinolytic enzyme, *Bacillus subtilis*

혈액의 응고는 혈액의 상태를 액상에서 gel상으로 전환하는 현상으로 지혈작용의 일부이다. 생체내에서 지혈 현상은 반드시 손상된 혈관 주변에서만 일어나게 되며, 여러 응고인자들의 선택적인 결합과 혈장내에 존재하는 여러 가지 단백질 가수분해 억제인자들과 길항적인 작용을 하는 일련의 효소반응에 의하여 정교하게 조절되고 있다[10, 15]. 이처럼 정교한 조절에도 불구하고 다양한 병적 또는 외부적 원인에 의하여 생체내 혈액응고와 용해의 균형이 깨지게 되면 과도한 혈전이 형성되어 뇌혈전증이나, 심장마비를 유발하게 된다[9]. 따라서 혈전의 형성을 방지하고 혈전을 용해하는 치료제를 개발하기 위한 연구가 범세계적으로 활발히 진행되고 있다.

Fibrinogen은 수용성 혈장 단백질의 일종으로 분자량이 340 kDa이며 체내에는 약 2.5 mg/ml의 농도로 존재하는 hexaprotein로 thrombin(E.C. 3.4.2.5)에 의해 fibrin이 된다[5]. 이렇게 생성된 fibrin은 혈액응고에 있어 중요한 역할을 하며 혈전의 기본 물질이기도 하다. 체내에서 응고된 fibrin의 분해, 2-antiplasmin의 저해, 손상된 조직의 복원, macrophage의 활성화 등의 역할은 plasmin이 수행한다[6]. Plasmin은 보통 plasminogen이라는 zymogen의 형태로 존재하며 Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶²이 plasminogen activator에 의해 분해되었을 경우 활성형으로 변하여 fibrinolytic activity를 나타낸다[19, 22]. 이러한

fibrinolytic system은 혈관내 fibrin의 침착에 대한 일종의 방어적 기능이며 이러한 기능에 의해 혈전으로부터 생체를 보호하는 기능을 한다. 이러한 fibrinolytic activity를 갖는 효소는 plasmin같은 serine protease가 대부분이며 *Bacillus subtilis* 등의 미생물은 다양한 종류의 serine protease를 생산한다[5, 13].

*Bacillus subtilis*는 많은 종류의 protease를 균체 밖으로 분비하고 이러한 효소는 다양한 기질에 반응하는 성질을 가지고 있다. 이중 일부 alkaline protease는 fibrin을 강력히 분해하는 성질을 가지고 있다. 그 동안 많은 연구자들에 의해 *Bacillus*가 생산하는 protease가 확인된 바 있고 최근 일본의 전통식품인 natto에서 분리된 *B. subtilis* var natto (*B. natto*)가 강력한 fibrinolytic activity를 갖는 alkaline serine protease가 분비하는 것으로 보고된 바 있다[8, 23]. 국내에서는 전통적인 콩 발효식품인 청국장에서 natto균과 유사한 성질을 갖는 *Bacillus* 균주가 분리되고 있으며 분리균에서 fibrinolytic activity를 갖는 alkaline serine protease가 보고된 바 있다[12].

본 연구에서는 청국장으로부터 fibrinolytic activity를 갖는 균주를 분리하여 동정하였고, 그 효소를 정제하여 효소학적인 연구를 시도 하였다.

실험재료 및 방법

분리방법 및 선발

혈전용해 효소를 분비하는 균주를 분리하기 위하여 각

*Corresponding author
Tel. 82-2-450-3524, Fax. 82-2-450-3517
E-mail: kangsm@kkucc.ac.kr

재래시장에서 시판하는 청국장을 시료로 하였다. 시료 1 g을 100 ml 멸균생리식염수(0.85%NaCl)에 현탁하여 skim milk 1%를 첨가한 LB agar에 도말한 후 37°C에서 24시간 배양하여 투명환을 보이는 균주를 선별하였다. 선별된 균주를 LB broth에서 액체배양한 후 fibrin plate에 5 uL를 점적하여 fibrinolytic activity 측정하였다. 시험 분리주 중 활성이 높은 5주를 선별하였고 가장 활성이 우수한 1주를 대상으로 실험하였다.

미생물의 동정

분리된 균주의 동정은 Bergery's manual of determinative bacteriology[21]에 기재된 방법을 참조하였고 VITEK™(Biomerux co.) system을 이용하여 동정하였다.

사용 배지 및 시약

Plasmin은 Sigma사로부터 구입하여 사용하였으며 fibrinogen은 녹십자에서 생산되는 사람 fibrinogen을 사용하였고 thrombin은 NIH unit가 정해진 Sigma사 제품을 구입하여 사용하였다. 균 screening을 위한 배지로는 skim milk 1%가 포함된 LB agar를 사용하였으며 효소 정제를 위한 resin은 Pharmacia사(Sweden), 단백질 전기영동을 위한 시약은 Bio-Rad사(USA) 제품을 사용하였다. 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

Fibrinolytic enzyme 활성의 측정

Fibrin plate를 이용한 fibrinolytic activity 측정 Astrup 방법을 변용하여 사용하였다[1]. 사람의 fibrinogen 1 g을 barbiturate buffer(0.1M sodium diethyl barbiturate, pH 7.8)에 녹인 후 직경 10 cm petridish에 5 ml 넣은 후 thrombin(100 NIH unit)를 100 ul 넣고 실온에서 30분간 응고시켰다. 여기에 시료를 각 1-5 uL씩 점적 후 18시간 반응하여 용해되는 환의 면적을 측정하였으며, 이때 unit가 알려진 plasmin과 비교 후 plasmin unit로 환산하여 단위를 정하였다.

Fibrin 용액을 이용한 fibrinolytic activity 측정 Ehrlich 방법을 사용하였다[7]. Fibrin 0.6 g을 1N NaOH 80 ml에 녹여 pH를 7.5-7.8로 조정 후 증류수에서 하루동안 투석하여 염을 제거하였다. 염이 제거된 용액을 증류수로 100 ml이 되게 맞추어 0.6% fibrin 용액을 제조하였다. 이 용액과 효소액을 3분간 반응 후 trichloroacetic acid로 반응을 정지시키고 4°C에서 30분간 정치 후 원심분리하여 상등액을 275 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit는 효소 1 ml이 1분 동안 tyrosine 1 M을 생성하는 능력으로 정하였다.

α-casein을 이용한 plasmin unit 측정 Robbin 방법을 변형하여 사용하였다[20]. 2 ml의 4% α-casein 용액에 1.6 ml Tris-lysine-NaCl-EDTA buffer를 넣은 후 측

정하고자하는 시료를 200 uL넣었다. 37°C에서 30분간 반응시킨 후 15% TCA 용액을 6 ml넣고 반응을 정지시키고, 4°C에서 18시간 방치하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 plasmin casein unit(PCU)는 1시간 동안 TCA-soluble tyrosine 450 μg을 유리하는 효소의 양을 1 unit로 정하였으며 그 계산식은 다음과 같다.

$$1 \text{ PCU/ml} = \frac{\text{Absorbance (280 nm)}}{\text{Sample volume(ml)}} \times 2 \times 10 \times 147 \times \frac{1}{450}$$

Fibrinolytic enzyme의 정제

Ammonium sulfate fraction 조효소액을 ammonium sulfate를 75%까지 포화시킨 후 침전분리한 효소단백질을 소량의 10 mM PBS(pH 7.2)에 용해한 후 동일완충 용액으로 24시간 투석하였다.

Ion exchange chromatography 10 mM phosphate buffer(pH 7.2)로 충분히 평형화시킨 후 투석한 농축액을 Hi-Load Sepharose Q column에 loading하고 4 ml/min의 속도로 동일 완충액으로 세척하였다. 용출은 NaCl 농도를 0~1 M로 증가시키며 linear gradient를 실시하였다. 활성을 보이는 분획은 모아 동결건조하여 농축하였다.

Gel filtration chromatography 농축된 용액을 10 mM PBS(pH 7.2)으로 평형화시킨 후 Superdex G-75 column에 loading하고 동일한 buffer로 1 ml/min의 속도로 흘러주었다. 다시 활성을 보이는 분획을 모아 동결건조 후 농축하여 1 M ammonium sulfate가 들어있는 10 mM phosphate buffer(pH 7.2)에 평형시켰다.

Hydrophobic interaction chromatography 1 M ammonium sulfate로 평형된 농축 용액을 alkyl superose column에 흡착시킨 후 ammonium sulfate를 0 M까지 점진적으로 낮추면서 효소를 1 ml/min의 속도로 용출하였다.

정제된 효소의 특성

Gel filtration을 이용한 효소의 분자량 측정 FPLC의 Superose 6 HR column을 이용하여 정제된 fibrinolytic enzyme의 분자량을 측정하였다. 표준 단백질로는 bovine serum albumin(MW 67,000), ovalbumin(MW 45,000), chymotrypsin A(MW 25,000), ribonuclease A(MW 13,700)을 사용하였다.

SDS-PAGE를 이용한 단일성 확인 및 분자량 측정 각 정제 단계에서 얻어진 시료들을 12.5% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 Laemmli 법[14]으로 실시하여 단일성을 확인하였으며 표준 단백질과의 이동속도를 비교하여 분자량을 구하였다.

Isoelectrofocusing을 이용한 등전점 측정 등전점을 측정하기 위하여 Lass 방법[26]을 기본으로 Phast sys-

tem(Pharmacia co. Sweden)을 이용하여 실시하였다. 정제된 효소와 pI 표준단백질을 phast gel IEF 3-9에 loading하여 전기영동 후 20% TCA 용액에 반응시키고 0.1% CuSO₄가 포함된 coomassie brilliant blue로 염색하여 image analyzer로 등전점을 분석하였다.

N-Terminal 아미노산 서열결정 정제된 효소들을 SDS-PAGE 후 blotting buffer에 평형시킨 PVDF 막에 20 V로 90분간 전이시켰다. 효소가 전이된 PVDF막을 coomassie brilliant blue로 염색하여 전이된 단백질을 확인 후, 다시 용출하여 Edman 방법으로 분해시켜 narrow bore C18 column으로 Protein sequencer(ABI, USA)에서 분석하였다.

효소의 최적 온도 및 최적 pH 정제된 효소를 pH 5부터 pH 13까지의 서로 다른 buffer와 혼합 후 plasmin casein법에 의해 상대적인 활성을 비교하였으며 온도를 25℃부터 80℃까지 10℃ 간격으로 가열처리하면서 효소의 잔존활성을 측정하였다.

기질의 반응속도에 미치는 영향 기질농도와 효소 활성과의 관계를 알아보기 위하여 α-casein의 농도를 0.2%부터 1%까지 달리한 후 plasmin casein 법으로 효소의 활성을 측정하여 Km값을 구하였다.

저해제에 의한 효소활성의 영향 정제한 fibrinolytic enzyme의 저해제에 대한 영향을 조사하기 위해 저해제 군별 10개의 저해제를 선택하여 plasmin casein 법에 의해 활성 변화를 측정하였다[3].

결과 및 고찰

분리균주의 선발 및 동정

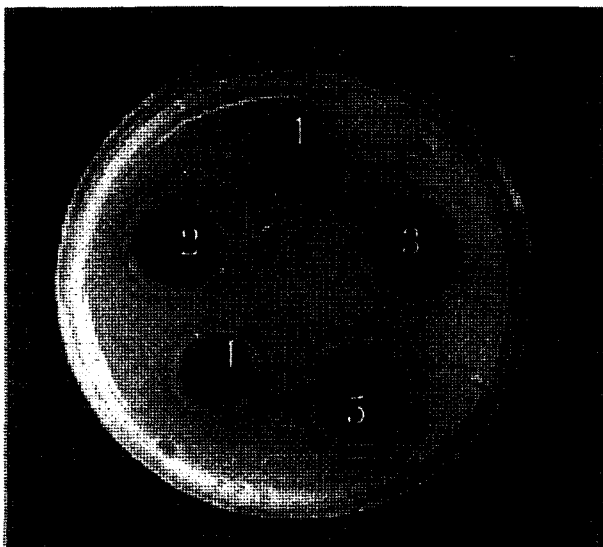


Fig. 1. Formation of lysis zone in fibrin plate to isolates. No. 1, isolate J-10; No. 2, isolate K-63; No. 3, isolate K-72; No.4, isolate K-68, No. 5, isolate K-54.

선발된 균주는 5종이었으며 혈전용해능이 가장 우수한 K-54를 선별하였다(Fig. 1, Table 1). 이들 분리주들의 동정을 위하여 VITEK system을 이용하여 생화학적 특성을 조사하였다. 분리균주 모두 그람양성의 bacilli 형태를 갖고 있으며 catalase 양성, protease 양성, 55℃에서 비성장 등의 동일한 특성을 보였다. 그러나 K-72주는 sucrose를, K-63주는 salicin을 이용하지 않으며 K-54주는 oleandomycin에 내성을 갖는 등 약간씩의 생화학적 차이를 보였으나 모두 *Bacillus* 속의 공통적인 특성을 가지고 있었으며 최종적으로 95%의 정확성을 가지는 *B. subtilis*로 동정되었다. Fibrinolytic activity을 알아보기 위하여 plasmin 1unit와 비교실험을 실시한 결과 (Table 1) K-54주가 생성하는 효소가 186%로 가장 높았으며 J-10주는 151%, K-63주는 162%, K-72주는 159%로 K-54주의 활성이 가장 높았다.

Fibrinolytic enzyme의 정제

B. subtilis K-54가 분비하는 fibrinolytic enzyme의 정제를 위하여 균을 LB broth에 접종 후 24시간 동안 37℃에서 230 rpm으로 배양하였다. 배양 후 상청액을 (NH₄)₂SO₄로 75%까지 포화시킨 후 10 mM phosphate buffer에 투석하여 투석된 용액을 10 mM phosphate buffer로 평형화하였다. HI-Load sepharose Q column에 loading하여 약 100 ml의 10 mM phosphate buffer로 흘린 후 1 M NaCl까지 gradient를 주어 binding된 단백질을 용출시켰다(Fig. 2). 그러나 resin에 binding하지 않은

Table 1. Fibrinolytic activities of isolates from Korean traditional foods

Strain	Fibrinolytic activity (%)
K-54	189
K-63	162
K-68	131
K-72	159
J-10	152
Plasmin (1 unit)	100

Table 2. Summary of purification of fibrinolytic enzyme from *B. subtilis* K-54

Purification step	Total volume (ml)	Total activity (PCU)	Specific activity (PCU/mg)	Yield (%)
Culture supernatant	920	637,232	2,668.9	100
Ammonium sulfate	37	452,467	5,342	71
Ion exchange	44	145,413	6,795	22.8
Gel filtration	31	96,447	8,317	15.1
Hydrophobic interaction	14	64,207	10,356	10.1

*PCU: plasmin casein unit.

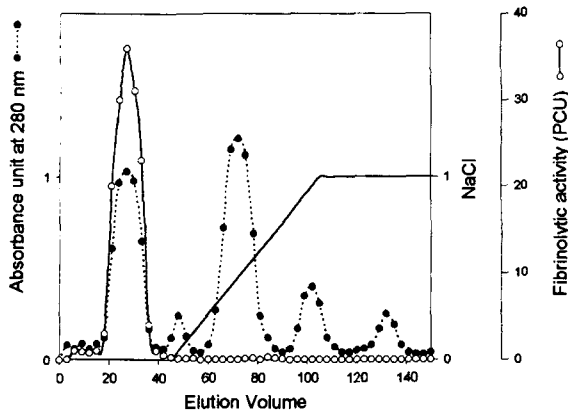


Fig. 2. Ion exchange chromatography (Hi-Load Sepharose Q) of fibrinolytic enzyme from *B. subtilis* K-54.

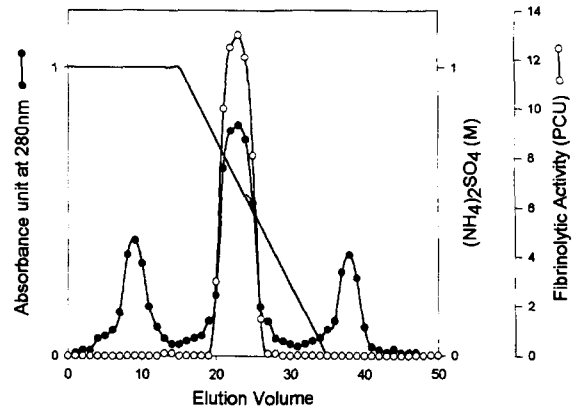


Fig. 4. Hydrophobic interaction chromatography (alkyl superose) of fibrinolytic enzyme from *B. subtilis* K-54.

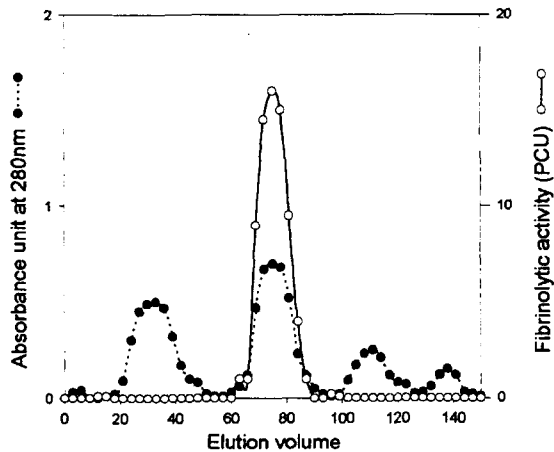


Fig. 3. Gel filtration chromatography (Hi-Load Superdex G-75) of fibrinolytic enzyme from *B. subtilis* K-54.

분획에서 효소의 활성을 보여 이 균주가 분비하는 혈전 용해 효소는 등전점이 7.2 이상인 단백질을 알 수 있었다. 모아진 분획을 다시 농축하여 Hi-Load Superdex G-75 column에 loading하여 분획하였다(Fig. 3). 다시 활성 부위를 모아 동결건조 후 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 들어있는 10 mM phosphate buffer에 용해 후 소수성 작용에 의한 alkyl column에 loading하였다(Fig. 4). 시료는 약 60-40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 구배에서 용출되었다. Fibrinolytic enzyme 정제도는 Table 3과 같다. 효소 정제도는 약 3.8%이며 효소의 비활성은 약 66.9배 증가되었다(Table 2).

정제된 fibrinolytic enzyme의 특성조사

효소의 최적 반응 pH 및 반응 온도 정제된 효소들의 최적 반응 온도 및 초발 pH에 따른 반응을 알아보기 위하여 pH를 5부터 13, 온도는 25℃부터 80℃까지 변화를 준 후 효소반응을 측정하였다. 초기 pH의 경우 K-54의 경우 역시 pH 7부터 활성의 급격한 증가를 보였으며 pH 10에서 최고의 활성을 보였다(Fig. 5). 이는 nat-

Table 3. Comparison of lysis activities using casein and fibrin as substrates

Enzyme	α -Casein unit	Fibrin unit	Fibrin/ α -casein(%)
Fibrinolytic enzyme from isolate K-54	297.6	244.4	82.3(100)
Fibrinolytic enzyme from isolate J-10	307.0	282.4	75.7(91.1)
Subtilisin Carlsberg (type VIII)	287.7	36.2	12.6(10.4)
Subtilisin BPN' (type VII)	252.1	103.8	41.2(33.9)
Protease from <i>S. aureus</i> (type XVII-B)	176.3	17.5	9.9(8.1)

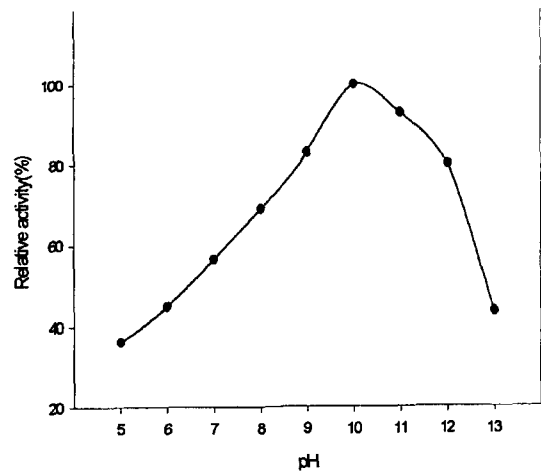


Fig. 5. Effects of initial pH to the fibrinolytic enzyme activity of *B. subtilis* K-54.

kinase의 최적 pH범위인 6-12[8], Carlsberg의 최적 pH인 7-9[17], Kim 등이 보고한 fibrinolytic enzyme의 pH 6-12 등[12]과 비교해볼 때 K-54에서 분리한 효소의 최적 pH 범위가 8-12로 약간 좁았으나, pH 7에서도 50%이상의 활성을 보여 pH가 7이상인 알칼리 범위에서

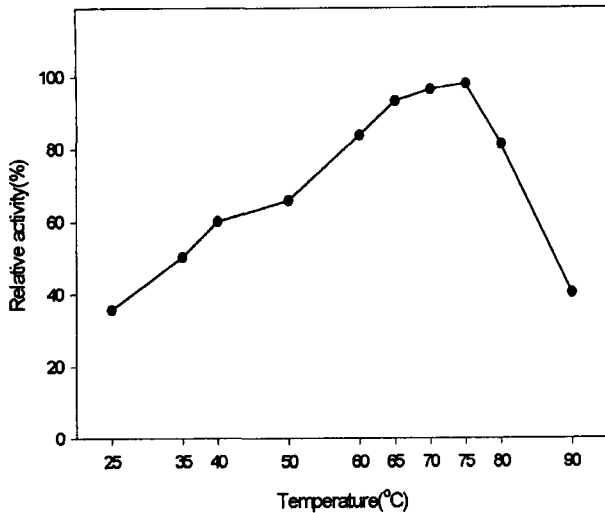


Fig. 6. Effects of temperature to the fibrinolytic enzyme activity of *B. subtilis* K-54.

의 활성이 강하였다. 온도의 경우 K-54에서 정제한 효소는 65°C에서 최고 활성을 보였다(Fig. 6). 이는 Mitsuzawa 등이 보고한 75°C[18], Takii 등이 보고한 60°C[25]와 비교할 때 좀더 고온성 효소로 생각된다. Kim 등[12]이 국내 청국장에서 분리한 혈전용해 효소가 70°C에서 최적 온도를 갖는다는 점을 볼 때 이와는 다른 효소인 것으로 생각된다.

정제한 효소 분자량측정 *B. subtilis* K-54로부터 정제된 효소의 단일성 확인과 분자량의 측정을 위하여 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 실시한 결과(Fig. 7) 단일밴드로 나타나 순수하게 정제되었음을 확

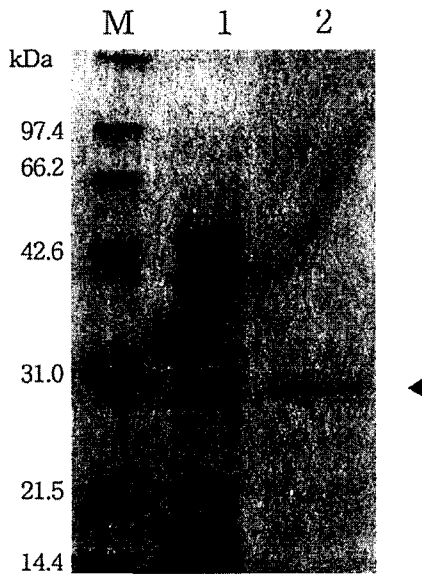


Fig. 7. SDS-PAGE of fibrinolytic enzyme from *B. subtilis* K-54. Lane M, standard low marker; lane 1, after $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ salting out; lane 2, after hydrophobic interaction chromatography.

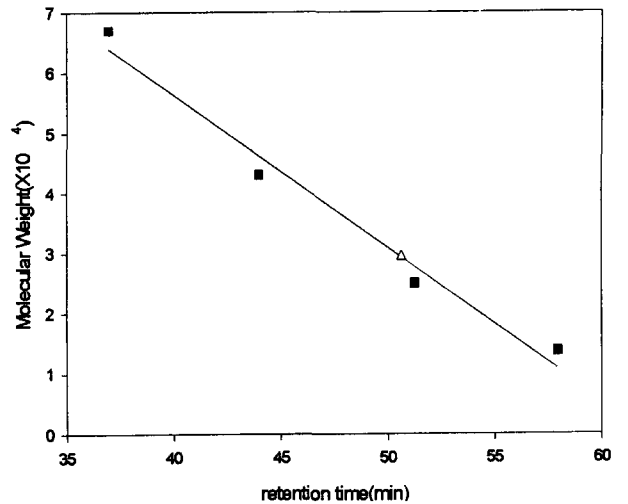


Fig. 8. Relationship between the retention time and molecular weight of fibrinolytic enzyme from *B. subtilis* K-54(Δ).

인할 수 있었다. K-54로부터 정제된 효소는 분자량이 약 29,000 Da의 단백질로 확인되었다. K-54주의 경우 Kim 등[12]이 보고한 28,200 Da의 fibrinolytic enzyme과 유사하였으나 Chung 등[4]이 보고한 30,000 Da, Manachini 등[16]이 보고한 45,000 Da, Kim 등[11]이 보고한 41,000 Da와는 차이를 보였다. 분자량을 알고 있는 단백질을 사용하여 gel filtration을 한 결과 최소자승법으로 $y=4.14 \times e^{-0.008x}$ 의 표준방정식을 얻었고 이 관계식을 이용하여 정제된 효소의 분자량을 계산한 결과 29,300 Da (Fig. 8)을 구하였고 이는 SDS-PAGE에 의해 결정된 분자량인 29,000 Da와는 큰 차이를 보이지 않아 본 효소는 하나의 subunit으로 이루어진 효소임을 알 수 있었다.

등전점 결정 정제된 효소의 등전점을 알아보기 위하여 Phast IEF 3-9 gel을 이용하여 실험을 실시하였다. 정제된 효소는 약 8.67의 값을 보여(Fig. 13) nattoninase의 8.9[8]보다 약간 낮았다. 그러나 *Bacillus* 속 균이 생산하는 대부분의 serine protease 계열 효소의 최적 활성 pH가 알칼리성인 것을 볼 때 *B. subtilis* K-54에서 정제한 효소도 같은 계열의 효소로 생각된다.

N-말단 아미노산 분석 정제된 효소의 아미노산 서열의 차이점을 알아보기 위하여 아미노산 서열 분석기를 이용하여 N 말단부터 8개씩 염기서열을 분석하였다. 정제한 효소의 아미노산 서열은 Ala-Gly-Ser-Val-Pro-Try-Gly-Val-Ser 이었다. 이들 서열을 다른 N-말단 서열이 알려진 효소들과 비교해본 결과 Fig. 10과 같았다. K-54에서 정제한 효소의 N-말단의 경우 nattokinase와는 8번째 아미노산 서열이 valine과 isoleucine으로 서로 달랐으며 Kim[12] 등이 청국장에서 분리한 CK-11과는 3번째와 9번째 아미노산이 서로 달랐다. 그러나 subtilisin BPN'와는 8개 아미노산이 동일하였으나 효소 활

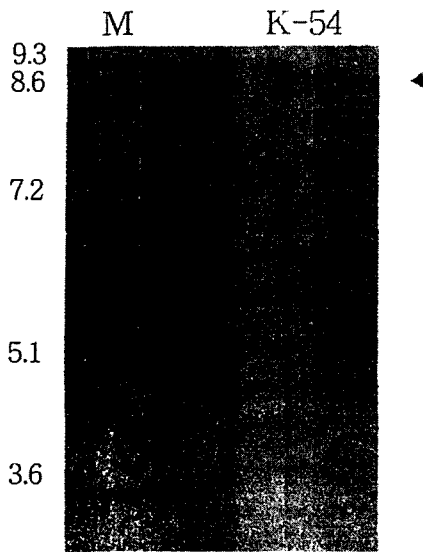


Fig. 9. Isoelectrofocusing of fibrinolytic enzyme from *B. subtilis* K-54.

성의 최적 온도 및 pH 등과 비교해 볼 때 다른 효소임을 알 수 있었다.

정제된 효소의 기타 단백질분해 효소와의 fibrinolytic activity 비교 *B. subtilis* K-54의 fibrinolytic activity와 proteolytic activity을 비교한 결과(Table 3) 활성비는 82.8였으며 대표적인 *Bacillus* 속 균 생산하는 protease 인 Subtilisin Carlsberg와 Subtilisin BPN'의 경우 활성비는 각각 12.6과 41.2로 낮아 fibrin에 대한 분해능이 적었다. *S. aureus*에 의한 protease도 활성비가 낮아 K-54에서 생산되는 효소가 fibrin에 대한 기질 특이성이 높음을 확인할 수 있었다.

반응속도에 미치는 기질의 영향 α -Casein의 농도를 0.2%-10%까지 조절하여 효소와 반응시킨 후, 효소의 활성을 측정하여 Lineweaver-Burk plot상에서 조사한 결과 Fig. 11과 같다. 정제한 fibrinolytic enzyme의 V_{max} 값은 47.16%, K_m 값은 0.31(3.1 mg/ml)였다. 보고된 alkaline protease의 K_m 값과 비교해 볼 때 Bae 등[2]이 보고한 1.3 mg/ml보다는 높았으나 Chung 등[4]과 Takami 등[25]이 보고한 4.8 mg/ml, 8.2 mg/ml보다는 낮

	1		5		9				
K-54	A	Q	S	V	P	Y	G	V	S
Carlsberg	A	Q	T	V	P	Y	G	I	P
BPN'	A	Q	S	V	P	Y	G	V	S
Nattokinase	A	Q	S	V	P	Y	G	I	S
CK-11	A	Q	T	V	P	Y	G	I	P

Fig. 10. Comparison of N-terminal sequence of fibrinolytic enzyme from Nattokinase and K-54.

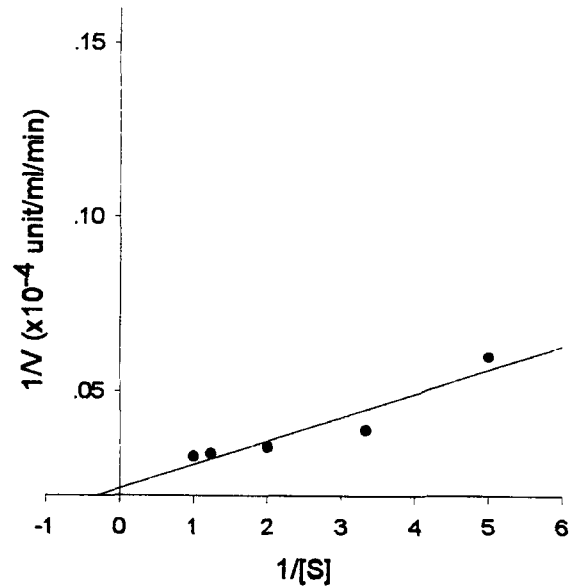


Fig. 11. Lineweaver-Burk plot of various concentration of α -casein on enzyme reaction rate.

았다.

저해제에 의한 효소 활성의 영향 화학적 저해제가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 저해제 군 별로 모두 10종에 대하여 실험한 결과는 Table 4와 같다. Cysteine protease의 억제자인 E-64, iodoacetate에서는 활성의 감소가 거의 나타나지 않았으며 cysteine과 serine protease의 일반 억제제인 leupeptin에서는 잔존 활성이 87.3%로 약간의 활성 감소를 보였다. 그러나 serine protease의 억제제인 DFP에서는 잔존 효소 활성이 2.6%로 강하게 저해되었으며 PMSF에서도 0.95%로

Table 4. Effects of inhibitors on fibrinolytic enzyme purified from *B. subtilis* K-54

Inhibitor	Relative activity (%)
None	100.0
Cysteine class	
E-64 (10 μ M)	101.1
Iodoacetate (1 mM)	96.2
Cysteine and serine class	
Leupeptin (100 μ M)	87.3
TPCK (100 μ M)	95.7
TLCK (100 μ M)	91.4
Serine class	
DFP (100 μ M)	2.6
PMSF (1 mM)	0.95
Aspartic class	
Pepstatin A (1 μ M)	96.2
Metallo class	
EDTA (50 mM)	96.2
1,10-phenanthroline (1 mM)	102.6

효소 활성이 강하게 억제되었다. Nattokinase는 serine protease의 일종으로 serine protease 억제제인 PMSF에 강하게 억제되며[8] Kim 등[12]은 청국장에서 분리한 *Bacillus* CK-11주에서 정제한 fibrolytic enzyme도 PMSF에서 강한 활성 억제능을 보인다고 보고하였다. 그러나 Kim 등[11]이 젓갈류에서 분리한 KA38주에서 정제한 fibrinolytic enzyme의 경우 EDTA에서 활성의 90%이상이 억제되는 metalloprotease로 보고한 바 있다.

요 약

국내 전통식품인 청국장으로부터 강력한 fibrinolytic activity를 갖는 K-54주를 분리, 동정한 결과 *B. subtilis*로 확인되었으며 이 균으로부터 강력한 갖는 효소를 정제하였다. 정제도는 약 66.9배 증가하였으며 약 10.1%의 수율을 보였다. *B. subtilis* K-54에서 분리한 fibrinolytic enzyme의 최적 활성 pH가 8-12사이였으며 50-75℃사이에서 최적 활성을 보였다. 정제된 효소의 분자량은 약 29 kDa이었고, 등전점은 8.67로 나타났으며 Vmax값은 47.16%, Km값은 0.31(3.1 mg/ml)였다. N-말단 아미노산 서열 분석 결과 *B. subtilis* K-54주에서 정제한 fibrinolytic enzyme는 Ala-Gly-Ser-Val-Pro-Try-Gly-Ser이었으며 serine protease 저해제인 PMSF에 강력한 활성 저해를 보여 serine protease 계열의 효소임을 확인할 수 있었다.

REFERENCES

1. Astrup, T. and S. Mullertz. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *The National Danish Society against Rheumatic Disease* 346-351.
2. Bae, M. and P. R. Park. 1989. Purification and characterization of thermostable alkaline protease by alkalophilic *Bacillus* sp. No. 8-16. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 17: 545-551.
3. Beynon, R. J. and J. S. Bond. 1989. *Proteolytic Enzymes, A Practical Approach*, pp. 241-249. IRS press.
4. Chung, M. S. 1985. Production and properties of thermostable alkaline prorease from thermophilic *Bacillus* sp. MS-22. *Master thesis*, Konkuk University.
5. Craik, C. S., S. Rocznik, C. Largman, and W. J. Rutter. 1987. The catalytic role of the active site aspartic acid in serine protease. *Science* 237: 909-913.
6. Daka, M. D. and C. P. Semba. 1995. Thrombolytic therapy in venous occlusive disease. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 6: 73S-77S.
7. Ehrlich, H. J., N. U. Bang, S. P. Little, S. R. Jaskunas, B. J. Weigel, L. E. Matzler, and C. S. Harms. 1987. Biological properties of a kringless tissue plasminogen activator mutant. *Fibrinolysis* 1: 75-77.

8. Fujita, M., K. Nomura, K. Hong, Y. Ito, A. Asada, and S. Nishimuro. 1993. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a populay soybean fermented food in Japan. *Biochem. Biophy. Res. Commun.* 197(3): 1340-1347.
9. Gomez, C. C., R. Simoncarbollo, A. C. Coma, T. Sanchez de Leon, D. E. Montero, and P. R. Rodriguez. 1991. The relationship between lipid peroxidation and platelets aggregation in atherosclerotic patients. *Angiologia* 43: 241-246.
10. Harlan, J. M. and L. A. Harker. 1981. Haemostasis, thrombosis and thromboembolic disorder. *Med. Clin. North Am.* 65: 855-857.
11. Kim, H. K., G. T. Kim, D. K. Kim, W. A. Choi, S. H. Park, Y. K. Jeong, and I. S. kong. 1997. Characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermented fish. *J. Ferment. Biotech.* 84(4): 307-312.
12. 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(3): 2482-2488.
13. Kraut J. 1977. Serine protease: Structure and mechanism of catalysis. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 331-358.
14. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
15. Lapentina, E. G., B. Geep, N. G. Read, and S. Moncada. 1986. Adhesion of human platelet to collagen in the presence of prostacyclin, inometacin and compound BW 775C. *Thromb. Res.* 37: 325-330.
16. Manachini, P. L., M. G. Fortina, and C. Parini, 1988, Thermostable alkaline protease produced by *B. thermoruber*, a new species of *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 409-413.
17. Millet, J. 1969. Characterization of proteinase excreted by *B. subtilis* Marberg strain during sporulation. *J. Appl. Bacteriol.* 33: 207-219.
18. Mitsusawa, K., E. Ichishima, and F. Yoshida. 1964. Studies on the proteolytic enzyme of thermophilic *Streptomyces*. *Agric. Biol. Chem.* 28: 884-895.
19. Mullertz, S. 1987. Fibrinolysis, general aspects, characteristic features and perspectives, Int'l Committee for Fibrinolysis-kabi Prize Lecture. *Fibrinolysis.* 1: 3-12.
20. Robbins, K. C. and L. Summaria. 1966. Human plasminogen and plasmin. *Method in Enzymol.* 101: 184-187.
21. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 2. Williams and Wilkins Press, Baltimore.
22. Straub, P. W. 1963. A study of fibrinogen production by human liver slices *in vitro* by immunoprecipitation method. *J. Clin. Invest.* 42: 130-135.
23. Sumi, H., H. Hamada, N. Nakanishi, and H. Hiratami.

1990. Enhancement of the fibrolytic activity in plasma by oral administration of NK. *Acta Haematol.* **84**: 139–143.
24. Takami, H., T. Akiba, and K. Horikoshi. 1990. Characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 519–523.
25. Takii, Y., N. Kuriyama, and Y. Suzuki. 1990. Alkaline serine protease produced from citric acid by *B. alcalophilic* subsp. *halodurans* KP 1239. *Appl. Environ. Biotechnol.* **34**: 37–62.
26. William, K. W. and L. Soderberg. 1979. A carrier ampholyte for isoelectric focusing. *Int'l Labrator.* Jan/Feb.

(Received September 16, 1998)