

새우젓에서 혈전용해효소 생산균주의 분리, 동정 및 효소생산 배지의 최적화

장순애 · 김명희* · 이명선 · 이명자 · 지옥화 · 오태광* · 손천배
충남대학교 식품영양학과, *생명공학연구소 환경생물소재연구실

Isolation and Identification of Fibrinolytic Enzyme Producing Strain from Shrimp *Jeot-Gal*, a Tiny Salted Shrimps, and Medium Optimization for Enzyme Production

Sun-Ae Jang, Myung-Hee Kim*, Myung-Sun Lee, Myung-Ja Lee,
Ok-Hwa Jhee, Tae-Kwang Oh*, and Cheon-Bae Sohn

Department of Food and Nutrition, Chungnam National University,

*Environmental Bioresources Lab., Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

Abstract

A strain of potential producer of fibrinolytic enzyme was isolated from shrimp *Jeot-Gal*, a tiny salted shrimps, and identified as *Bacillus* sp.. The preliminary experiment showed an enzyme yield of 18 U/mL in medium for screening. The carbon, nitrogen and salts significantly influenced the fibrinolytic enzyme production. An optimized medium containing 2% skim milk, 2% soluble starch and 3% NaCl (pH 7.5) after 72 hrs fermentation time at 37°C yielded 3-fold increase in enzyme production, 62 U/mL.

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

서 론

혈전(Fibrin)은 생체에 상처가 발생시 혈액을 응고시켜 과다한 출혈을 방지하고 상처를 복구하기 위해 복잡한 기작에 의해 생성되는 것으로 혈류중의 fibrinogen이 활성화된 thrombin에 의해서 fibrin으로 전환되어 불용성의 중합체를 형성함으로써 생성된다⁽¹⁾. 이렇게 생성된 혈전은 상처가 회복된 후 수일 이내에 plasmin과 같은 혈전용해효소(fibrinolytic enzyme)에 의해서 용해된다. 그러나 혈전이 과도하게 축적되거나 혈전의 용해작용이 원활하지 못할 경우에는 혈전증이 나타나 혈액순환이 차단되어 인체에 치명적인 손상을 야기시킬 수 있다. 이러한 혈전증의 치료를 위하여 사용되는 치료제로는 현재, 항혈전제로, 유기합성제제인 coumarin과 warfarin 제제, 거머리에서 생성되는 hirudin 제제가 사용되고 있고⁽²⁻⁶⁾, 혈전 용해제로는, urokinase, streptokinase, tissue-type plasminogen activator (t-PA)등이 일

반적인 치료제로 사용되고 있으나 이러한 치료제들은 비경제적이고 urokinase를 제외하고는 경구투여가 어려운 문제점을 가지고 있다. 현재 경구투여용 제제로서는 6가지의 혈전 용해효소를 함유하고 있는 것으로 알려진 지렁이(*Lumbricus lubellus*)의 건조 분말을 캡슐화해서 한국과 일본에서 시판되고 있다^(7,8). 그러나, 이와 같은 제품은 반감기가 짧고, 가격이 높은 단점을 지니고 있다.

최근 우리나라에서는 전통 발효 식품인 청국장들을 섭취할 때 생체내의 혈전 용해능이 증가됨이 밝혀졌고^(9,10), 또한 젓갈로부터 혈전용해효소를 생산하는 균주를 분리하여 동정하였으며⁽¹¹⁾, 이러한 식품을 섭취함으로써 여러 혈관질환을 치료 및 예방할 수 있다는 점에서 관심이 고조되고 있다. 특히 오래전부터 섭취하고 있는 젓갈류는 육류 단백질분해효소를 분비하는 균이 존재한다는 것으로 보고되고 있어⁽¹²⁾ 혈전용해능이 있는 효소를 분비하는 균주들의 존재 가능성이 높을 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 젓갈류 중 새우젓에서 혈전 용해능이 우수한 균을 분리하고 형태학적, 생리생화학

Corresponding author : Cheon-Bae Sohn, Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Taejon 301-764, Korea

적 특성들을 조사하여 분리된 균주를 동정하였다. 또한 선별된 균주로부터 혈전분해효소를 효과적으로 생산하기 위한 배지 최적화를 수행하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 선정

충청남도 일대의 젓갈 생산지로 유명한 강경, 광천, 대천의 재래시장과 대전지역 시장의 젓갈 상회로부터 수집한 100여종의 새우젓, 멸치젓, 조개젓 0.3 mL을 5 mL의 멸균수에 현탁하고, 50 μ L을 취해 기본배지인 0.8% nutrient broth, 3% NaCl(pH 6.8)에 1% milk casein과 0.3% fibrin을 각각 첨가한 평판배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양한 후 출현한 colony 중 분해환이 넓은 균주를 순수 분리하였다. 다시 1차 선별한 균주들을 5 mL의 0.3% fibrin이 첨가된 액체배지에 접종하여 37°C의 진탕배양기(160 rpm)에서 3일간 배양한 후 배양액을 원심분리하여 얻은 상정액으로 혈전용해효소의 활성을 측정하였다. 그 중 활성이 가장 우수한 균주를 최종 선별하였다.

균주의 동정

최종 분리 선별한 균의 동정은 형태학적, 배양학적, 생화학적 특성을 조사하여 "Biochemical test for identification of medical bacteria"⁽¹³⁾, 및 "Bergey's manual of systematic bacteriology"⁽¹⁴⁾에 제시되어 있는 방법에 의해 수행하였으며, 균주의 세포막 지방산 조성을 GC-MS로 분석한 후 Microbial Identification System (MIDI)^(15,16)의 데이터와 비교하여 동정하였다.

혈전용해효소의 활성도 측정

혈전용해효소의 활성은 Anson의 방법⁽¹⁷⁾을 변형하여 수행하였다. 원심분리하여 균체를 제거한 상정액 0.1 mL에 0.6% fibrin 용액 0.45 mL(pH 8.0)을 넣은 후 40°C에서 20분간 반응시켰다. 반응액에 0.55 M trichloroacetic acid(TCA) 0.45 mL을 넣고 실온에서 30분간 방치한 후 원심분리하여 얻은 상정액 0.1 mL에 0.44 M Na₂CO₃ 1 mL를 첨가하고 Folin reagent 0.2 mL를 가하여 실온에서 30분간 방치하였다. 반응액은 660 nm에서 흡광도를 측정하여 tyrosine 표준곡선에 의거하여 분해 용출된 tyrosine 양을 산출하였다.

효소활성은 조효소액 1 mL가 1분 동안 tyrosine 1 μ g을 생성하는 능력을 1단위로 하였다.

효소생산을 위한 배양조건 검토

효소생산을 위한 최적 배지조성을 검토하기 위해 각종 탄소원과 질소원이 함유된 0.8% nutrient broth와 3% NaCl의 액체배지 50 mL을 250 mL Erlenmeyer flask에서 선별된 균주를 접종하여 37°C에서 3일간(160 rpm) 배양한 후 효소생산을 조사하였고, 또한 NaCl 농도, 초기배양 pH, 배양온도 및 시간에 따른 효소생산을 조사하였다.

결과 및 고찰

균주의 선정 및 동정

앞에서 언급한 방법에 의해 최종 선별된 새우젓으로부터 분리한 균주 S19의 형태학적 특성을 조사한 결과, 포자를 형성하는 그람 양성균으로 Fig. 1에서와 같이 세포의 크기가 0.6-0.8 \times 1.6-2.2 μ m의 간상형 균이었다. 생리학적 특성은 β -galactosidase와 arginine dehydrolase 및 urease는 활성을 보였고, lysine decarboxylase는 활성을 나타내지 않았으며, catalase 활성을 갖는 것으로 나타났다. 또한 glucose, maltose, dextrin, sucrose를 이용하였고 nitrate를 nitrite로 환원할 수 있는 특성을 보였다. 이와 같은 생리학적 특성은 *Bacillus* 속이 갖는 일반적인 특성으로써 분리된 미생물은 *Bacillus* sp.임을 확인하였다. 균체를 수확하여 세포막의 지방산 조성 및 main menaquinone(MK)을 분석한 결과, 지방산 조성은 15:0 anteiso가 38.3%로 가장 함량이 높았고, MK-7을 주요 성분으로 함유하였다(Table 1). 이상의 결과들을 "Biochemical test for identification of medical bacteria"⁽¹³⁾, "Bergey's manual of systematic bacteriology"⁽¹⁴⁾ 및 MIDI system을 이용한 컴퓨터 분석결과로부터 균주 S19는 *Bacillus megaterium*과 가장 근접한 균주로 분석되었으나, 일반적으로 *Bacillus megaterium*의 크기는 2.0-4.0 \times 1.2-1.5 μ m로 다소 큰 세균이고 유사성이 51.2%로 분석되

Fig. 1. Scanning electron micrograph of *Bacillus* sp. S19. Bar indicates 10 μ m length.

Table 1. Microbiological characteristics of the strain S19

| | | |
|---|----------------------|--|
| 1. Morphological characteristics | | |
| Cell shape | rod | |
| Size | 0.6-0.8 × 1.6-2.2 μm | |
| Color | grey | |
| Gram stain | + | |
| Spore stain | + | |
| Surface | smooth | |
| Edge | undulate | |
| 2. Biochemical and cultural characteristics | | |
| Nitrate reduction | + | |
| Indole test | - | |
| Voges-Proskauer test | + | |
| Catalase | + | |
| Urease | + | |
| Lysine decarboxylase | - | |
| Arginine dehydrolase | + | |
| β-Galactosidase | + | |
| Hydrolysis of casein | + | |
| gelatin | + | |
| starch | + | |
| Growth in NaCl | | |
| 10% | + | |
| 12% | + | |
| Acid from | | |
| glucose | + | |
| maltose | + | |
| dextrin | + | |
| xylose | - | |
| sucrose | + | |
| 3. Cellular chemical parameters | | |
| Main menaquinone | MK-7 | |
| Fatty acid composition (%) | | |
| 14 : 0 _{Iso} | 0.9 | |
| 14 : 0 | 1.4 | |
| 15 : 0 _{Iso} | 19.1 | |
| 15 : 0 _{Anteiso} | 38.3 | |
| 15 : 0 | 0.9 | |
| 16 : 0 _{Iso} | 3.0 | |
| 16 : 0 | 13.8 | |
| 17 : 0 _{Iso} | 11.0 | |
| 17 : 0 _{Anteiso} | 11.7 | |

어 본 실험에서 분리된 균주 S19를 *Bacillus* sp. S19로 명명하였다. *Bacillus* sp. S19는 장 등⁽¹¹⁾이 전어창젓에서 분리한 *Bacillus subtilis* KJ-48 균주와 비교시 세포막 지방산 조성과 형태학적, 생리생화학적 특성에서 차이가 있는 것으로 조사되었다. 따라서 본 *Bacillus* sp. S19 균주는 지금까지 보고되지 않은 새로운 젓갈류 유래 균주로 이 균주로부터 생산되는 혈전용해효소 또한 새로운 특성을 소유할 가능성을 보였다.

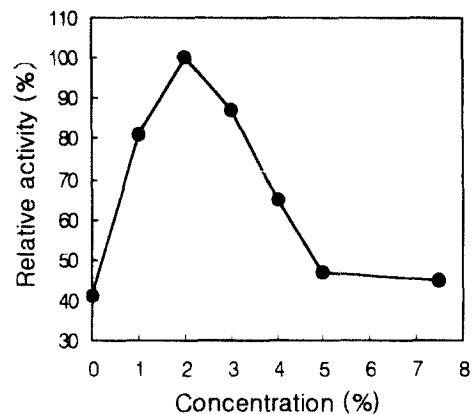
탄소원의 영향

Bacillus sp. S19는 0.3% fibrin, 0.8% nutrient broth, 3% NaCl, pH 6.8의 배지로 37°C에서 3일간 배양하였을 때 18 U/mL의 효소 활성을 나타내었다. 본

Table 2. Effects of various carbon sources on enzyme production

| Carbon source | Relative activity (%) |
|----------------|-----------------------|
| None | 24 |
| Glucose | 31 |
| Sucrose | 49 |
| Maltose | 22 |
| Lactose | 26 |
| Soluble starch | 100 |
| Xylose | 81 |
| Mannitol | 73 |

Bacillus sp. S19 was cultured at 37°C for 3 days in the medium containing 0.8% nutrient broth and 3% NaCl with various carbon sources of 2.0%.

**Fig. 2. Effects of concentration of soluble starch on enzyme production.**

균주로부터 효소 생산을 더욱 증가시키기 위해 먼저 효소 생산 배지 중 탄소원의 영향을 살펴보았다. 기본 배지를 0.8% nutrient broth와 3% NaCl로 하고 각각의 탄소원을 2% 수준으로 사용하여, 탄소원 종류별 효소 생산량을 조사한 결과 Table 2와 같은 결과를 얻었다. Mannitol, xylose 및 soluble starch를 탄소원으로 사용한 경우에 효소의 생산량이 높게 나타났으며, 특히 soluble starch를 사용한 경우에 가장 많이 생산되어 효소생산용 탄소원을 soluble starch로 하였다. 또한 soluble starch의 최적 농도는 Fig. 2에서 나타낸 바와 같이 2%가 가장 높은 효소 활성을 보였다. 이러한 결과는 최⁽¹⁸⁾가 보고한 재래식 간장에서 분리한 *Bacillus*의 경우 탄소원으로 2% soluble starch 첨가시 효소활성이 크게 증가함을 나타내어 유사한 결과를 보였고, 이 등⁽⁹⁾이 청국장에서 분리한 *Bacillus* KCK-7은 5% soluble starch일 때 효소 생산량이 높게 나타난 것으로 보고하여 다른 결과를 보였다.

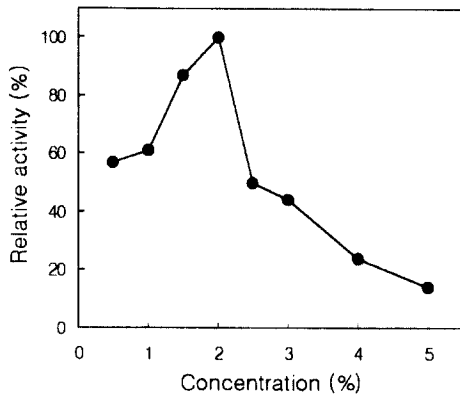


Fig. 3. Effects of concentration of skim milk on enzyme production.

Table 3. Effects of various nitrogen sources on enzyme production

| Nitrogen source | Relative activity (%) |
|---|-----------------------|
| Nutrient broth | 58 |
| Yeast extract | 64 |
| Peptone | 46 |
| Skim milk | 100 |
| Fibrin | 34 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 20 |
| Urea | 25 |
| Wheat bran | 51 |

Bacillus sp. S19 was cultured at 37°C for 3 days in the medium containing 2% soluble starch and 3% NaCl with various nitrogen sources of 0.8%.

질소원의 영향

질소원이 효소생산에 미치는 영향을 살펴보기 위해서 탄소원으로 2% soluble starch를 사용하여 각종 질소원들을 0.8%하여 효소생산량을 조사하였다. 그 결과 Table 3과 같이 yeast extract, skim milk를 사용한 경우에 효소생산량이 높게 나타났고, 특히 skim milk에서 가장 많은 효소를 생산하였다. 또한 skim milk의 최적 농도는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 2%에서 가장 높은 효소활성을 보였다. 이러한 결과는 Kalebina 등⁽⁹⁾이 보고한 혈전용해효소 생산 균주인 *Bacillus brevis*는 질소원으로 yeast extract를 잘 이용한다는 결과와 다르게 나타났다.

NaCl 농도

본 연구에서 분리한 *Bacillus* sp. S19는 고농도의 염이 존재하는 새우젓 유래 균주로 효소생산이 염의 농도에 영향을 받을 것으로 판단하여 2% soluble starch와 2% skim milk의 배지에 농도를 달리한 NaCl를 첨가하여 균을 접종하고 37°C에서 3일간 진탕 배양한 후

Table 4. Effects of NaCl concentration on enzyme production

| NaCl (%) | Relative activity (%) |
|----------|-----------------------|
| None | 41 |
| 1 | 42 |
| 2 | 54 |
| 3 | 100 |
| 4 | 37 |
| 5 | 53 |
| 7.5 | 60 |
| 10 | 36 |

Bacillus sp. S19 was cultured at 37°C for 3 days in the medium containing 2% soluble starch and 2% skim milk with NaCl of various concentrations.

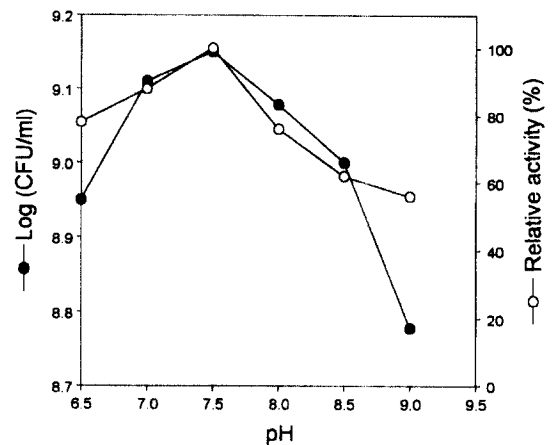


Fig. 4. Effects of pH on enzyme production and cell growth.

효소 활성을 비교한 결과, Table 4와 같이 효소 활성은 3% NaCl를 첨가한 배지에서 가장 높게 나타났다. 이와 같은 결과는 길 등⁽¹⁰⁾이 청국장으로부터 분리한 *Bacillus*의 경우 NaCl 첨가시 효소 생산에 영향을 미치지 못한다는 보고와 다른 결과를 보였다.

초기 배양 pH

배지의 초기 pH가 효소생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 최적배지 2% soluble starch, 2% skim milk, 3% NaCl에 1 N HCl과 1 N NaOH의 첨가량을 달리하여 배양액의 pH를 6.5-9.0로 조정하고, 균을 접종하여 37°C에서 3일간 배양하였다. Fig. 4와 같이 pH를 7.5로 하여 배양하였을 때 가장 우수한 활성을 보였고, pH 8.0 이상에서는 활성이 급격히 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 허 등⁽²⁰⁾이 청국장으로부터 분리한 *Bacillus*의 경우 pH 6-8에서 효소 생산량이 높았으며 효소생산을 위한 최적 pH는 8.0이었다고 보

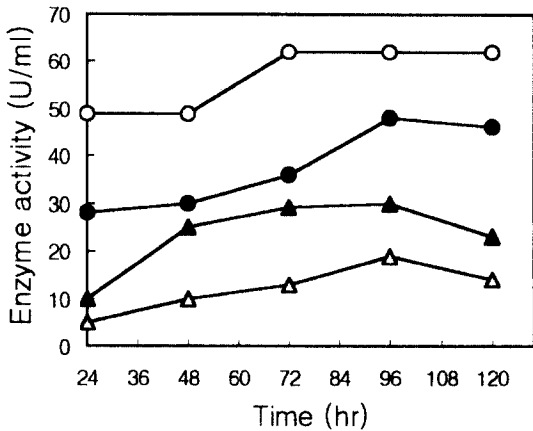


Fig. 5. Effects of temperature and time on enzyme production.

30°C (●), 37°C (○), 45°C (▼), and 50°C (▽).

고하여 본 실험의 결과와 다른 경향을 보였다.

배양 온도 및 시간의 영향

배양 온도 및 시간이 효소 생산에 미치는 영향을 검토하기 위해 최적 조성의 배지(2% soluble starch, 2% skim milk, 3% NaCl, pH 7.5)에 균을 접종하고 30-50 °C에서 4일간 배양하였다. Fig. 5와 같이 효소 생산에 효과적인 최적 배양온도는 37°C로 나타났고, 40°C 이상에서는 효소의 생산이 현저하게 감소하였다. 또한 효소 생산에 대한 배양 시간의 영향을 조사한 결과, 37°C에서 24-96시간 배양하였을 때, 72시간 배양시 가장 높은 효소 생산(62 U/mL)을 결과하였다. 이러한 결과는 허 등⁽²⁰⁾이 청국장으로부터 분리한 *Bacillus*는 배양 최적 온도가 37°C로 본 연구 결과와 일치하는 반면, 배양 시간은 48시간에 가장 활성이 높게 나타나 본 실험과 차이를 보였고, 길 등⁽¹⁰⁾이 보고한 *Bacillus*의 최적 배양온도 35°C와 최적 배양 시간 24시간과 다르게 나타나 혈전용해효소를 생산하는 *Bacillus*들간의 효소 생산을 위한 발효특성이 다름을 시사하였다.

요 약

새우젓으로부터 혈전용해효소를 생산하는 균주를 분리하여 *Bacillus* sp.로 동정하였다. *Bacillus* sp. S19는 screening 배지에서는 18 U/mL의 효소를 생산하였다. 그러나 2% soluble starch, 2% skim milk, 3% NaCl (pH 7.5)의 최적화된 배지로 37°C에서 72시간 동안 배양하였을 경우 효소활성이 약 3배 증가된 62 U/mL의 효소 생산을 결과하였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 핵심전문연구과제(과제번호 981-0609-041-2)로 수행된 결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Voet, D. and Voet, J.G. Biochemistry, pp. 1087-1091. John Wiley and Sons, New York (1990)
2. Electricwala, A., Sawyer, R.T., Powell J.C. and Atkinson, T. Isolation of thrombin inhibitor from the leech *Hirudinaria manillensis*. Blood Coagulation and Fibrinolysis 2: 83-91 (1991)
3. Krstenansky, J.L., Owen, T.J., Yates, M.T. and Mao, S.J. The C-terminal binding domain of hirullin P18. Antithrombin activity and comparison to hirudin peptides. FEBS Lett. 269: 425-429 (1990)
4. Lee, S.K., Sohn, J.H., Choi, E.S. and Rhee, S.K. Screening and purification of anticoagulant proteins from Korean leeches. Kor. J. Biochem. 26: 228-234 (1993)
5. Markwardt, F. The isolation and chemical characterization of hirudin. Physiol. Chem. 308: 147-152 (1957)
6. Steiner, V., Knecht, R., Gruetter, M., Raschdorf, F., Gassmann, E. and Maschler, R. Isolation and purification of novel hirudins from the leech *Hirudinaria manillensis* by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 530: 273-282 (1990)
7. Mihara, H., Sumi, H., Yoneta, T., Mizumoto, H., Ikeda, R., Seiki, M. and Maruyama, M. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus lubellus*. Jpn. J. Physiol. 41: 461-472 (1991)
8. Nakajima, N., Mihara, H. and Sumi, H. Characterization of potent fibrinolytic enzyme in earthworm, *Lumbricus lubellus*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57: 1726-1730 (1993)
9. Lee, S.K., Heo, S., Bae, D.H. and Cho, K.H. Medium optimization fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* KCK-7 isolated from Korean traditional Chungkookjang. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26: 226-231 (1998)
10. Kil, J.O., Kim, G.N. and Park, I.S. Production and characterization of fibrinolytic enzyme : Optimal condition for production of the enzyme from *Bacillus* sp. KP-6408 isolated from Chungkook-jang. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 51-56 (1998)
11. Jang, Y.R., Kim, W.K., Kwon, I.B. and Lee, H.Y. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from Jeot-Gal, saltfermented fish. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 655-659 (1998)
12. Park, G.H. and Ju, S.J. Proteolytic digestion of boiled pork by soured shrimp. Korean J. Nutr. 19: 363-378 (1986)
13. Macfaddin, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria, pp. 36. 2nd ed., Williams and Wilkins Press (1980)

14. Krieg, N.R. and Holt, J.G. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 2, pp.1104-1133. Williams and Wilkins Press (1986)
15. Stager, C.E. and Davis, J.R. Automated systems for identification of microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 5: 302-327 (1992)
16. Yang, P. L., Vauterin, L., Vancaneyt, M., Swings, J. and Kersters, K. Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. Syst. Appl. Microbiol. 16: 47-51 (1993)
17. Anson, M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol. 22: 79-85 (1939)
18. Choi, K.J. Separation of *Bacillus* sp. and changes of NH₂-N, NH₃-N, and protease activity in Chong-gukchang meju adding with mugwort (*Artemisia asiatica* N.) extract. M.S. thesis, Kon-Kuk Univ., Korea (1995)
19. Kalebina, T.S., Galina, N.R., Selyakh, I.O., Khodova, O.M. and Kulaev, I.S. Serine proteinase from *Bacillus brevis*. Appl. Microbiol. Biotech. 82: 531-537 (1988)
20. Heo, S., Lee, S.K. and Joo, H.K. Isolation and identification of fibrinolytic bacteria from Korean traditional Chungkookjang. Korean J. Agr. Chem. Biotech. 41: 119-124 (1998)

(1999년 9월 28일 접수)