

GOVP1199810934

제 2차년도  
최종보고서

전통 발효 식품으로부터 혈전용해능을 가지는  
새로운 기능성 식품의 개발에 관한 연구

Development of new functional food with fibrinolytic  
activity from traditional food product

연구기관  
부산대학교

농 립 수 산 부



## 제 출 문

농림수산부 장관 귀하

본 보고서를 “전통 발효 식품으로부터 혈전용해능을 가지는 새로운 기능성 식품의 개발에 관한 연구”의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 1.

주관연구기관명 : 부산대학교

총괄연구책임자 : 박 성 훈

연 구 원 : 정 영 기

연 구 원 : 공 인 수

협동연구기관명 : (주)종근당

협동연구책임자 : 정 구 헌

## 요 약 문

### I. 제 목

전통 발효 식품으로부터 혈전용해능을 가지는 새로운 기능성 식품의 개발에 관한 연구

### II. 연구개발의 목적 및 중요성

인간이 건강한 생활을 영위하기 위해서는 순환계의 원활한 유통이 매우 중요하다. 신체내에서 혈액은 혈관을 통하여 각 조직에 영양물질이나 산소를 공급하므로써 생명을 유지해 나가는 것이다. 평상시에 혈액으로부터 생성되는 혈전은 과다생성되면 혈류를 방해하는 요인이 되며 혈관벽에 부착·누적되어 혈관을 좁힘으로써 혈류를 방해할 뿐 아니라 혈류를 따라 뇌혈관과 같은 미세혈관에 침입하여 이를 폐쇄하므로써 고혈압, 뇌졸중, 동맥경화, 협심증, 심근경색, 폐경색 등의 각종 순환계 성인병을 유발하게 된다.

현재 국내에서 혈류 개선제로서 몇몇 알려져 있는 물질이 있으나 혈전에 직접 작용하기 보다는 간접적으로 작용하는 것이 대부분이다. 뿐만 아니라 이들 거의가 동물이나 식물 유래의 물질이기 때문에 대량 생산하기에 매우 어렵고, 생산비가 높은 단점이 있다. 예를 들어 경구투여용 혈전용해제로 시판되고 있는 명심(심풍제약)과 용심(대도제약)은 모두 지렁이의 체단백질 유래의 물질로 약의 원료인 지렁이를 대량 생육하는 것이 용이하지 않으므로 고가로 지렁이의 가루를 일본으로부터 대량 수입하는 것으로 알려져 있다. 따라서 혈전용해제를 생산하는 미생물을 개발하고 물질을 대량 생산하여 생산비를 낮출 수 있다면 제품의 가격을 낮추는 것은 물론, 수입에 따른 외화의 소모를 줄일 수 있다.

한편, 혈전성 성인병은 병징이 나타나기 시작한 후에는 치료가 매우 어려운 한계가 있다. 그러므로 혈전을 감소시키는 식품이나 약품을 상시 섭취하여 혈전에 의한 성인병을 미리 예방하는 것이 최선이다. 식품에 의한 성인병 예방에는 이미 몇몇 알려진 사례가 있다. 유산균을 이용한 유제품인 요구르트를 매일 식품으로 섭취하여 소화기계의 정상작용과 변비의 치료에 이용하는 것이나 기능성 oligo당을 식품에 첨가하여 비만방지를 위한 식품을 개발하는 것 등이 그 좋은 예이다. 이러한 예들을 참고해 볼 때 혈전용해효소를 생산하는 미생물을 이용하여 성인병의 예방과 이용 차원에서 식품화하는 것이 매우 바람직하다고 사료된다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 계획의 최종목표는 신기능성 식품소재를 개발하는 것이다. 이 목표를 달성하기 위하여 수행하여야 하는 세부 목표는 다음과 같다. 첫째, 경제적인 대량생산 방법을 확립하여야 한다. 본 혈전용해효소는 미생물을 배양하면 체외로 분비하는 효소이므로 물질의 회수는 그만큼 용이하다 할 수 있겠다. 그러므로 바이오리액터를 이용하여 미생물을 대량 배양하면서 혈전용해효소를 대량생산할 수 있는 방법을 확립하여 경제성을 높여야 한다. 둘째, 대량생산한 효소를 정제할 수 있는 방법을 확립하고 효소의 생화학적 특성 및 동물 실험을 통한 유효성을 타진한다. 발효탱크에서 대량회수한 혈전용해효소는 대규모의 정제과정을 거쳐 식품첨가제나 의약품으로 사용할 수 있으므로 이 과정에서 효율적인 대량정제 방법을 개발하여야 한다. 그리고 약제나 식품첨가제로 이용하기 위해서는 효소의 안정성이 뛰어나고 생체의 혈관내에서 혈전용해능을 발휘할 수 있어야 한다. 셋째, 정제된 효소를 식품으로 이용하기 위한 형태를 개발하고 이와 동시에 개발된 식품에 대해 풍미를 개선한다. 넷째, 대량생산 및 정제를 용이하게 할 수 있도록 유전자를 확보하고 재조합

균주를 얻는다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 가. 연구결과

###### ① 배지 및 환경요인의 최적화

플라스크 실험에서 현재까지의 최적조건(Soybean flour 1.5%, D-glucose 0.5%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%)의 조성을 갖는 배지(37℃, initial pH 9, 160 rpm)에서 28 시간 배양하였을 때 약 1,400 unit/ml의 활성을 얻을 수 있었다. Bioreactor 실험에서 플라스크 배양에서 최적화한 배지성분의 2배의 농도에서 배양하여 aeration을 좋게 하고(800 rpm, 1.2 vvm), 온도를 25℃로 하였을 때 20 시간 전후에서 약 1,500 unit/ml의 최대효소활성을 얻을 수 있었다.

###### ② 혈전용해효소 정제 조건의 검토 및 부분 정제

결과를 요약하면 EtOH 침전과 DEAE A-50 두 단계만으로도 140 배의 농축이 가능하였다. 수율이 83%로 매우 높았으므로 이 단계에서 상품화가 가능할 것으로 판단되며, gel filtration을 거칠 경우 약 900 배의 농축이 가능하나 수율은 30%정도 감소함을 알 수 있다. 정제 효소의 N-말단 아미노산 염기서열을 결정한 결과 A-Q-S-V-P-Y-G-V-S-Q-I-K-A-P로 타혈전용해효소와 다른 물질임은 물론 타 단백질 분해효소와도 동일하지 않는 신물질로 판단되었다.

###### ③ 식품형태의 개발

발효된 대두를 powder화하여 효소 안정성을 조사한 결과 약 80 일 정도 경과 후에도 활성을 그대로 유지하였다. 영양학적으로 볼 때에도 발효된 대두는 발효되지 않은 대두보다 20%의 단백질과 지방을

더 함유하고 있었으며 이로부터 발효대두는 기능성 식품으로의 가치가 충분하다는 것을 알 수 있었다. 발효된 대두가루를 정형화하여 tablet과 capsule을 만드는 데에 성공하였으며 이때 대두 특유의 냄새를 제거할 수 있었다.

#### ④ 혈전용해효소 클로닝

20,000株의 transformants로부터 Luria-Bertani에 tooth pick를 사용 replication하고 그 위에 fibrin layer를 덮어 fibrin clot을 분해하는 positive clone을 1차 screening하였다. Positive clone으로부터 plasmid를 분리한 뒤 cloning에 사용한 *Hind*III enzyme으로 digestion하여 ligation시킨 결과 3.4 Kb의 insert을 확인할 수 있었다. 분리한 recombinant plasmid가 host cell에서 안정된 활성을 가지는 fibrinolytic enzyme을 expression시킬 수 있는가를 확인하기 위하여 정제된 plasmid를 retransformation시킨 후 생성되는 transformant의 fibrinolytic activity를 측정한 결과 활성을 나타냄을 확인하였다.

#### 나. 활용에 대한 건의

식품 첨가제로 활용하여 발효 유제품, 청량제 음료 등 다양한 식품과 혼합하여 새로운 건강식품으로 기능성을 부여하거나, 기존의 드링크제에 첨가하여 차별화된 음료로 개발할 수 있다. 뿐만 아니라 대두 발효 분말을 정형화하여 본 연구개발 제품 자체를 발효식품으로 판매할 수 있다. 그러나 상품화는 제품에 대한 행정적 승인, 마케팅 전략, 기업의 의지 등과 밀접한 관계가 있으며 제품화를 위한 연구에 기업의 주도적 역할이 필요하다.

## SUMMARY

The production and purification of a fibrinolytic enzyme(BK-17) from *Bacillus subtilis* BK-17 was studied for the commercial application of the enzyme. In the flask culture, soybean flour was the best nitrogen source and the concentration of 1.5% resulted in the highest enzyme yield. For carbon source and inorganic salt, 0.5% D-glucose and 0.05%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  gave the best result. Optimal temperature and optimal initial pH were 37°C and 9, respectively. Enzyme production was greatly enhanced with increasing agitation speed in the range of 100~300 rpm or decreasing flask working volume in the range of 25~100 ml. The maximum enzyme production under the optimal flask culture condition was 1400 unit/ml with urokinase as standard.

In the bioreactor culture, cell growth, enzyme activity, glucose concentration, pH and DO were monitored. With proper preculture no lag phase was observed in cell growth. During exponential phase, DO and pH rapidly decreased and the maximum specific growth rate was  $1 \text{ hr}^{-1}$ . Enzyme production started at late exponential phase and continued for 5~6 hr with rapid glucose consumption. With increasing agitation speed in 400~800 rpm and air flow rate in 0.4~1.5 vvm, enzyme production started earlier and its maximum activity in the culture medium increased. Optimal medium composition was ; 3% soybean flour, 1% glucose, and 0.1%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Under the optimal bioreactor culture conditions, the same maximum enzyme yield as flask result, 1400 unit/ml, was obtained.

For the purification of BK-17, culture broth was precipitated by



55-70% EtOH. Precipitated proteins were fractionated by DEAE sephadex A-50 chromatography in tris-buffer(20 mM, pH 7.5). Specific activity increased by 139-fold. When the enzyme solution was further purified by sephadex G-75 gel filtration, specific activity increased by 900-fold. The molecular weight of purified enzyme as determined by SDS-PAGE was 31,000 Da. The enzyme was thermostable and had pH stability in pH 6.0 ~9.0. The enzyme had a high specificity on fibrin and lysed fibrin directly.

Solid fermentation using cooked soybean was also carried out. The fermented bean showed a high fibrinolytic activity on fibrin plate and the enzyme activity of the dried powder was maintained for over 80 days at 4°C. On nutritional analysis fermented soybean had a 20% more protein and lipid than the unfermented one. It was possible to make tablet or capsule from the dried powder with starch and some other additives.

For cloning the BK-17 gene, chromosomal DNA of *B. subtilis* BK-17 and plasmid vector pUC19 were digested by the restriction enzyme *Hind* III. These fragments were mixed and T<sub>4</sub> ligase was added. After ligation, the recombinant plasmid was transferred into *E. coli* sure cell, and the transformant having a fibrinolytic activity was obtained. The size of insert fragment in the recombinant plasmid was 1.4 Kb.

# CONTENTS

## Chapter 1. INTRODUCTION

section 1. Background of the Study .....	10
section 2. Objectives and Scope .....	11
section 3. Trend of the Study .....	13

## Chapter 2. FERMENTATION OF *Bacillus subtilis* BK-17

section 1. Introductionv .....	15
section 2. Materials and Methods .....	15
section 3. Results and Discussions .....	21

## Chapter 3. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF FIBRINOLYTIC ENZYME

section 1. Introduction .....	63
section 2. Materials and Methods .....	63
section 3. Results and Discussions .....	67

## Chapter 4. DEVELOPMENT AS SELLABLE PRODUCTS

section 1. Introduction .....	85
section 2. Materials and Methods .....	85
section 3. Results and Discussions .....	89

## Chapter 5. GENE CLONING

section 1. Introduction .....	95
section 2. Materials and Methods .....	95
section 3. Results and Discussions .....	98

## 목 차

제 1장 서론	
제 1절 연구개발의 배경 .....	10
제 2절 연구개발의 목적과 범위 .....	11
제 3절 현재의 연구 동향 .....	13
제 2장 효소의 대량발효생산 분야	
제 1절 서설 .....	15
제 2절 재료 및 방법 .....	15
제 3절 결과 및 고찰 .....	21
제 3장 효소정제 및 특성 분야	
제 1절 서설 .....	63
제 2절 재료 및 방법 .....	63
제 3절 결과 및 고찰 .....	67
제 4장 식품형태개발 분야	
제 1절 서설 .....	85
제 2절 재료 및 방법 .....	85
제 3절 결과 및 고찰 .....	89
제 5장 유전자 조작 분야	
제 1절 서설 .....	95
제 2절 재료 및 방법 .....	95
제 3절 결과 및 고찰 .....	98
참고문헌 .....	103

## 제 1장 서론

### 제 1절 연구개발의 배경

인간이 건강한 생활을 영위하기 위해서는 순환계의 원활한 유통이 매우 중요하다는 것은 잘 알려진 사실이다. 실제로 우리 몸의 혈액은 혈관을 통하여 각 조직 구석구석까지 영양물질이나 산소를 공급하므로서 생명을 유지해 나가고 있다. 이러한 순환계에서 혈류를 방해하여 성인병을 유발하는 요인 중의 하나로 혈전을 들 수 있다.

평상시에 혈액에서 형성되는 혈전은 혈관벽에 부착·누적될 경우 혈관을 좁게 만들어 혈류를 방해할 뿐 아니라 혈류를 타고 뇌혈관과 같은 미세혈관에 침입, 이를 폐쇄하므로 각종 순환기계 성인병을 유발하게 된다. 즉, 고혈압, 뇌졸중, 동맥경화, 협심증, 심근경색, 폐경색 등 많은 악성 질환을 유발하게 된다.

현재 우리나라 국민의 사망률을 원인별로 분류한 통계를 보면 순환계 질환에 의한 사망률이 전체 원인의 약 43%로서, 암(19.4%), 교통사고(14.9%), 간질환(5.5%), 호흡계 질환(5.2%) 등의 중요 사고나 질환에 비하여 월등히 높아 그 대책이 절실하게 요구되고 있다. 더우기 점점 고령화되어 가는 우리 사회의 실정과 노인성 치매환자의 60%가 혈전에서 기인한다는 사실을 감안할 때 순환계 질환에 대한 대책은 간과할 수 없는 중요한 문제라 생각된다. 더 나아가 이러한 문제는 이웃나라 일본을 비롯하여 세계 거의 모든 나라의 공통된 현상이므로 의약 및 식품성 혈전용해제의 개발에 대한 중요성과 필요성은 아무리 강조해도 지나치지 않다.

현재 국내에서 혈류 개선제로서 몇몇 알려져 있는 물질이 있으나 혈류에 직접 작용하기 보다는 간접적으로 작용하는 것이 대부분이다. 뿐만 아니라

이들 거의가 동물이나 식물 유래의 물질이기 때문에 대량 생산하기에 매우 어렵고, 또 생산비도 높다. 예를 들어 경구투여용 혈전용해제로 시판되고 있는 명심(심풍제약)과 용심(대도제약)은 모두 지렁이의 체단백질 유래의 물질로 알려져 있다. 약의 원료인 지렁이를 대량 배양하는 것이 용이하지 않으므로 고가로 지렁이의 가루를 일본으로부터 대량 수입하는 것으로 알려져 있다. 만일 혈전용해제를 생산하는 미생물을 개발하고 물질을 대량 생산하여 생산비를 낮출 수 있다면 제품의 가격을 낮추는 것은 물론, 지렁이 가루 수입에 따른 외화의 소모를 줄일 수 있다.

한편, 혈전성 성인병은 병징이 나타나기 시작한 후에는 치료가 매우 어려운 한계가 있다. 그러므로 혈전을 감소시키는 식품이나 약품을 상시 섭취하여 혈전에 의한 성인병을 미리 예방하는 것이 최선이다. 식품에 의한 성인병 예방에는 이미 몇몇 알려진 사례가 있다. 한가지 예로 유산균을 이용한 유제품 중 요구르트는 매일 식품으로 섭취하면 소화기계의 정상작용과 변비의 치료에 매우 좋은 효과를 거둘 수 있다. 최근에는 기능성 oligo당을 식품에 첨가하여 비만방지를 위한 식품을 개발하고 있다. 이러한 예들을 참고해 볼 때 혈전용해효소를 생산하는 미생물을 이용하여 성인병의 예방과 이용차원에서 식품화하는 것이 매우 바람직하다고 사료된다.

성인병 관련 식품으로 혈전 용해 기능을 갖는 제품은 국내는 물론 전세계적으로 존재하고 있지 않다. 그만큼 시장 잠재력도 크다고 할 수 있다. 따라서 혈전용해 기능을 갖는 새로운 식품을 개발하게 되면 위에서 예를 든 바 있는 유산균을 이용한 유제품(요구르트 등)이나 oligo당을 이용한 식품 못지 않은 높은 사업성이 예상된다.

## 제 2절 연구개발의 목적과 범위

본 연구는 혈전용해효소를 대량생산·정제하여 신기능성 식품으로 개발하는

것을 최종목표로 한다. 대량 생산하여 정제된 효소를 식품으로 이용하기 위하여 효소의 생화학적 특성 조사, 동물 실험을 통한 독성·유효성 조사, 풍미 개선 등의 연구를 수행하였으며 보다 나은 효소생산 균주의 개발을 위하여 gene cloning을 시도하였다.

첫째, *Bacillus subtilis* BK-17 균주가 체외로 분비하는 혈전용해효소를 경제적으로 획득하기 위하여 플라스크 배양을 통하여 배지조성과 환경조건을 최적화하였다. 질소원, 탄소원, 무기염류원 등의 배지 조건을 최적화하였으며, 온도, pH, 교반 속도 등의 환경 조건이 효소 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 플라스크 규모에서 확립한 최적생산조건을 바탕으로 생물반응기에서도 혈전용해효소 발효조건을 최적화를 시도하였다.

둘째, 발효탱크에서 대량회수한 혈전용해효소를 대규모의 정제과정을 거쳐 식품첨가제나 의약품으로 사용할 수 있도록 효율적인 대량정제 방법을 개발하고자 하였다. 목표로 하는 물질은 완벽하게 정제된 pure한 것이 아니어도 좋으므로 정제과정을 몇 단계로 줄여 경제성을 높이고 효율성을 극대화하는 것에 초점을 맞추었으며 정제된 효소의 보존 안정성 등의 여러가지 생화학적 특성을 조사하였다. 그리고 식품으로 이용되어 생체내에서 그 역할을 나타내어야 하므로 정제된 효소의 생화학적 특성을 조사하였고 쥐를 이용한 동물실험으로 혈액에서 혈전용해능이 나타나는지를 확인하였다.

셋째, 본 연구의 궁극적인 목표는 혈전용해능을 가지는 신기능성 식품소재를 개발하는 것이므로 식품으로 개발할 때의 효소 안정성을 타진하고 혈전용해의 기능과 더불어 식품영양학적으로도 가치를 가지는 식품으로 개발하고자 하였다. 발효대두의 시제품화 형태로 tablet과 capsule의 두가지 형태로 제조하였으며 소비자가 모두 선호할 수 있도록 풍미개선을 시도하였다.

넷째, *Bacillus subtilis* BK-17 균주의 효소생산관련 유전자를 shot-gun 방법을 이용하여 cloning하였다. Vector로는 plasmid를 이용하였고 숙주 세포로는 여

러 종류의 *E. coli* 를 사용하였다.

### 제 3절 현재의 연구 동향

미국의 Sobel 등이 사람 또는 동물의 뇨 중에서 정제한 urokinase(1~7)는 현재까지 정맥 주사용으로 시판, 사용되고 있다. 그러나 urokinase는 가격이 고가이고 주사제로만 사용되며, 급한 환자에게만 사용이 한정되고 있다.

Fletcher 등은 용혈성 연쇄상구균(*Streptococcus* sp.)에 의하여 생산되는 물질 중에서 혈전용해의 효과가 있는 streptokinase(8)를 정제하였다. Streptokinase는 혈전을 직접 분해하는 활성을 가진 것이 아니고 혈액 중의 plasminogen을 활성화하여 plasmin을 생기게 하여 간접적으로 효과를 나타낸다. 그러나, streptokinase는 출혈 등의 부작용이 큰 문제로 알려져 있다.

사람의 악성 종양인 melanoma 유래의 tissue plasminogen activator(이 물질은 혈관 내피세포와 같은 사람의 정상세포에서도 생산되며 TPA라고 총칭함)가 현재 혈전용해제로서 임상에 사용되고 있다(9). TPA는 혈전과의 친화력이 강하며 fibrin 분해력이 큰 것이 특징이나 혈 중에서 반감기가 짧고 가격이 고가이기 때문에 경제성이 문제가 된다. 이를 해결하기 위하여 Genentech를 비롯한 여러 기업에서 가격이 저렴하고 안정성이 증대된 TPA 유도체의 개발을 시도하고 있으며 최근 상당한 진전이 있는 것으로 알려져 있다(10).

최근에 일본의 Mihara등이 지렁이의 체단백질로부터 혈전용해작용이 강한 효소를 분리정제하여 보고한 바 있다(11~13). Lumbrokinase(LK)라고 명명한 이 효소는 혈전용해작용도 강하지만 일반 단백질의 분해작용이 그 이상 강한 것으로 보고되고 있다. 그러므로 일본에서는 판매가 허가되지 않고 있으나 우리나라에서는 생약성분으로 하여 판매가 허가되고 있다. 현재 국내의

2개 제약회사 제품으로 고가로 시판 중에 있다.

또한, 최근에 일본의 Sumi 등은 납두(한국의 청국장에 해당함)에서 혈전용해효소를 정제하여 nattokinase(NK)라 명명하여 발표한 바 있다(14). NK는 효소학적 연구와 경구투여시의 효과에 대해서는 연구하여 보고하고 있으나(15), 이 물질로부터 기능성식품이나 의약품 개발에 관한 정보는 아직 없다.

현재 국내에서는 혈전용해제로 인간의 노에서 정제된 urokinase를 정맥주사 치료제로 시판하고 있다. 그 외에 최근부터 경구치료제로서 신풍제약과 대도제약이 각각 '명심'과 '용심'이라는 상품명으로 제품화하여 판매중에 있다. 이들 두 제품은 일본 미야자키의대에서 미하라등에 의하여 연구된 바 있는 lumbrokinase를 주성분으로 한 것이다. 이 제품은 지렁이의 가루자체로서 일본에서는 판매가 허가되지 않았으나 우리나라에서는 생약제제로서 허가되어 판매하고 있다. 지렁이는 토양환경중의 중금속을 다량 함유하고 있어 이들 제재를 섭취할 경우 중금속의 섭취를 염려하는 소리가 높다. 또한, lumbrokinase는 fibrin(혈전성분)만 분해하는 기질 특이성이 약하며 오히려 일반 단백질의 분해능이 fibrin분해능보다 월등히 높아 다량 섭취할 경우 부작용을 초래할 수 있는 문제점이 있다. 그 외에 녹십자등에서는 지네의 체단백질 중에서 혈전용해효소를 추출하는 연구를 진행중에 있고 롯데에서도 혈전용해효소의 연구를 시작하고 있으나 아직 상용화와는 상당한 거리가 있다.



## 제 2장 효소의 대량발효생산 분야

### 제 1절 서설

플라스크에서 혈전용해효소 생산에 영향을 주는 각종 배지 성분과 환경요인의 영향을 조사하였다. 본 연구진이 *Bacillus subtilis* BK-17을 대두에서 분리하여 본 연구 진행 초기 L-broth에서 액체배양을 하면서 효소활성을 측정하였을 때 최대 생산량이 약 200 unit/ml 정도였는데, 아래에 구체적으로 서술한 flask 배양 최적화 실험을 통해 약 7배정도 증가된 1400 unit/ml의 생산량을 얻을 수 있었다. Flask 배양에서의 여러 가지 배양 조성을 기본으로 하여 최적 온도, pH 등을 포함한 여러 가지 환경조건이 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다. 250 ml 삼각 flask 배양에서 최적화한 배양조건을 바탕으로 한 bioreactor 배양에서 배지 농도와 pH, 그리고 온도를 변화시켰을 때 본 균주의 대사작용과 효소생산의 양상을 조사하여 효율적으로 효소의 생산성을 높이려고 하였다. 특히, 교반 속도와 air 유량을 증가시킬수록 높은 효소 활성을 얻을 수 있었다.

### 제 2절 재료 및 방법

#### 1. 균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 발효된 대두로부터 분리한 *Bacillus subtilis* BK-17이며, 그 전자현미경 사진과 생리학적 성질을 Fig. 1과 Table 1에 각각 나타내었다. 전배양 배지는 L-broth배지(bactotrypton 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, pH 6.8)를 사용하였으며 본배양에서는 flask에서 최적화



Fig. 1. Electron micrograph of isolated strain  
*Bacillus subtilis* BK-17

Table 1. Biochemical properties of *Bacillus subtilis* BK-17

Biochemical Properties	Result	<i>B.subtilis</i>
Gram staining	+, Rod	+, Rod
Spore	+	+
Arginine	-	-
Lysine	-	-
Ornithine	-	-
Citrate	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-
Urease	-	-
Esculine	+	+
Gelatin	+	+
V-P	+	+
Indole	-	-
Glucose(Fer)	-	-
Glucose(Ox)	+	-
Mannitol	+	+
Inositol	-	-
Sorbitol	-/+	-
Rhamnose	-	-
Sucrose	+	-
Maltose	+	-
Amygdaline	+	-
Arabinose	+	+
Mannose	+	-
Gluconate	+	-
Caprate	-	-
Malonate	+	-
N-acetyl Glucosamine	+	-
<i>o</i> - nitrophenyl Galactoidase	-	-
Nitrate reduction	+	-

한 배지(soybean flour 1.5%, D-glucose 0.5%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%)를 기본 배지로 하였다.

## 2. 배양조건

Flask 배양은 고체 평판 배지에 보존된 균을 10 ml의 액체 배지에 접종하여 8-10 시간동안 진탕배양기(Model KMC-8450SF, Vision 과학, 서울)에서 1차 전배양한 후 250 ml 삼각 플라스크에서 본배양하였다. 삼각 플라스크 내 배지 부피는 50 ml이고 접종량은 1%였다. 표준 조건으로 교반속도는 160 rpm, 온도는 37°C이었다. Bioreactor 배양에서는 1차 배양액을 500 ml 삼각 플라스크에 접종하여 2차 전배양하였으며, 이 때 배지 부피는 100 ml, 그리고 접종량은 1%로 하였다. 교반 속도와 온도는 플라스크 본배양과 동일하게 하였다. 본배양은 pH 전극(InPro 3000 pH combination electrodes, Mettler Toledo, USA) 및 DO electrode(Transmitter type 170, Mettler Toledo, USA)가 포함된 5 L bioreactor(Model KF-series, 한국 발효기, 서울)에서 시행하였으며, 배지 부피는 3 L, 2차 전배양액 접종량은 100 ml로 하였다. Bioreactor의 온도는 항온순환수조(Model RBC-20, Jeio tech, 서울)를 사용하여 37°C로 조절하였으며, 발효시 생성되는 거품을 제거하기 위하여 antifoam 자동주입장치를 사용하였다.

## 3. 효소활성의 측정

Fibrinogen 0.06 g을 borate buffer(pH 7.5) 10 ml에 넣어 37°C에서 2 시간 정도 두어 완전히 녹도록 한다. 녹은 fibrinogen을 petri dish에 10 ml씩 분주하고 fibrinogen 10 ml당 thrombin 20 unit를 넣어 petri dish 전면이 골고루 갈 수 있도록 유의하면서 넣고 좌우상하로 적당하게 흔들어 준다.

Fibrinolytic activity는 plasminogen free fibrin plate method를 이용하였

으며(16), urokinase(Urokinase 20,000 I.U., 녹십자)를 이용하여 구한 standard curve(Fig. 2)를 이용하여 I.U.로 환산하였다. 배양액을 원심분리하여 그 상등액을 취하여 tris buffer(pH 7-8, 20 mM)에 희석하는데 그 비를 3:7로 한다. Enzyme 희석액 100  $\mu$ l를 fibrin plate에 떨어뜨린 후 37°C incubator에서 3 시간 반응시키고, 분해환의 지름으로부터 분해면적을 구하였다.

#### 4. 생균수(colony forming unit, CFU)의 측정

초기배지로 사용된 LB의 배양액은 수용액이므로 흡광도를 측정함으로써 세포 성장을 관찰할 수 있으나 배지 최적화 과정에서 선정된 soybean flour를 사용한 배양액은 흡광도 측정이 불가능하였다. 따라서 agar 고체 배지상의 생균수 측정(17)을 통하여 세포성장곡선을 얻었다. L-broth에 agar 1.9%를 첨가하여 고압 살균하고, 배지가 굳기 전에 살균된 petri dish에 약 20 ml씩 분주하였다. 배지가 완전히 굳은 후에 37°C incubator에서 12 시간 가량 건조시킨 후 4°C에서 보존하였다. CFU 측정시 적당히 희석된 배양액 100  $\mu$ l를 떨어뜨려 살균된 도말봉으로 배지 표면에 골고루 퍼지도록 주의하면서 도말한다. 측정하는 시간대 별로 각각 3개의 희석 배수로 도말하였으며, 8~12 시간 배양한 후에 생균수를 관찰하였다. 30~300개의 colony가 나타나는 petri dish를 선택하여 그 수를 세었다.

#### 5. Glucose 농도의 측정

Glucose의 농도는 습식 분석법인 DNS법(18)을 사용하여 분석하였다. Glucose의 농도가 1.0 g/L 이하가 되도록 시료를 적절히 희석한 후(최적 농도는 0.3~1.0 g/L), 이 시료 1 ml에 DNS시약 1 ml을 혼합하여 끓는 물에서 10 분간 증탕하였다. 여기에 rochelle염 용액(40%) 1 ml을 가한 후 흐르는 물에서 급냉시키고 증

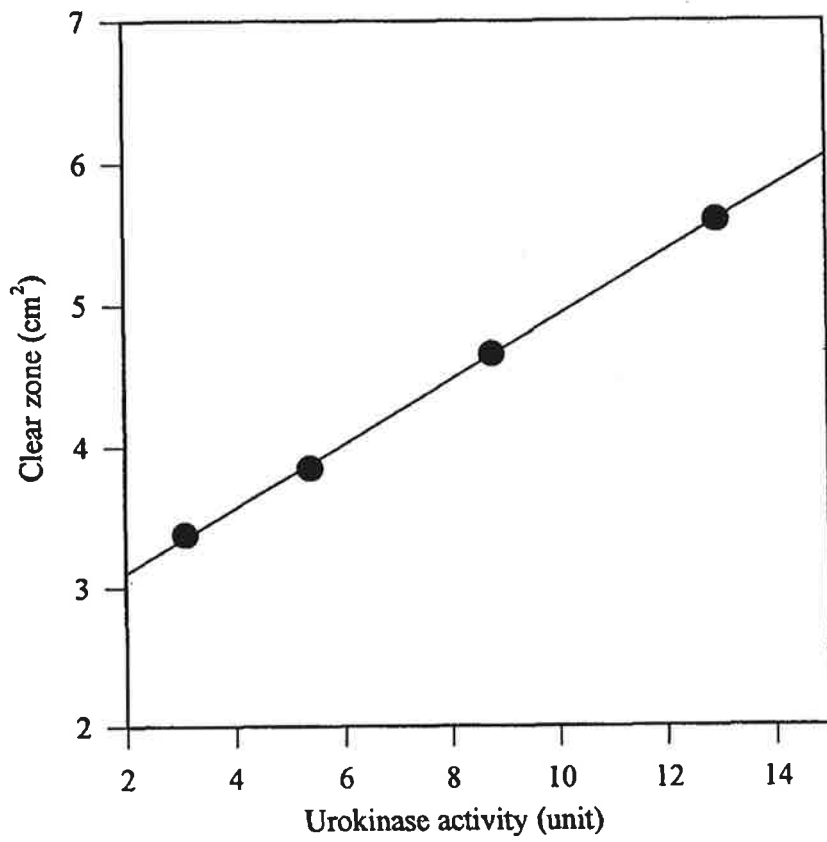


Fig. 2. Calibration curve for determination of enzyme activity.

류수 5 ml을 가하여 희석한 후 파장 575 nm에서 분광광도계(Spectronic 20, Milton Roy Co., USA)로 흡광도를 측정하였다. 이 값을 glucose standard curve를 이용하여 그 농도를 계산하였다(Fig. 3). Glucose standard curve는 glucose 표준 용액(Sigma Chemical Co., USA)을 사용하여 0.2~1.0 g/L의 범위에서 구하였다. DNS시약은 2,3-dinitrosalicylic acid 10 g, phenol 2 g 및 sodium sulfite 10 g을 넣고 1% NaOH용액으로 1 L를 맞추어 제조한 후 갈색병에 넣어 냉장고에서 보관하였으며, DNS 시약이 시간에 따라 변하는 문제를 해결하기 위하여 약 1 주일마다 새로 제조하였다.

### 제 3절 결과 및 고찰

#### 1. 플라스크 배양에서의 배지 및 환경조건의 최적화

##### 가. 유기 질소원의 영향

Tryptone, gelatin, bactotryptone, polypeptone, soybean flour, beef extract 등에 대하여 조사하였다(Fig. 4). 여러가지 유기 질소원을 L-broth에서 yeast extract 대신 0.5% 첨가하여 배양한 결과, soybean flour가 가장 좋은 결과를 보였다. Beef extract도 높은 효소활성을 보였으나 경제적인 측면에서 볼 때 soybean flour가 매우 유리하므로 이를 유기 질소원으로 결정하였다. 질소원은 extracellular enzyme의 생산에 있어 매우 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며(19), 특히 soybean flour가 *Bacillus stearothermophilus*와 *Streptomyces clavuligerus*부터의 protease 생산을 향상시켰다는 보고가 있다(20, 21). Soybean flour 농도를 결정하기 위하여 그 농도를 0.5에서 2.0%로 변화시켰을 때(Fig. 5), 1.5%

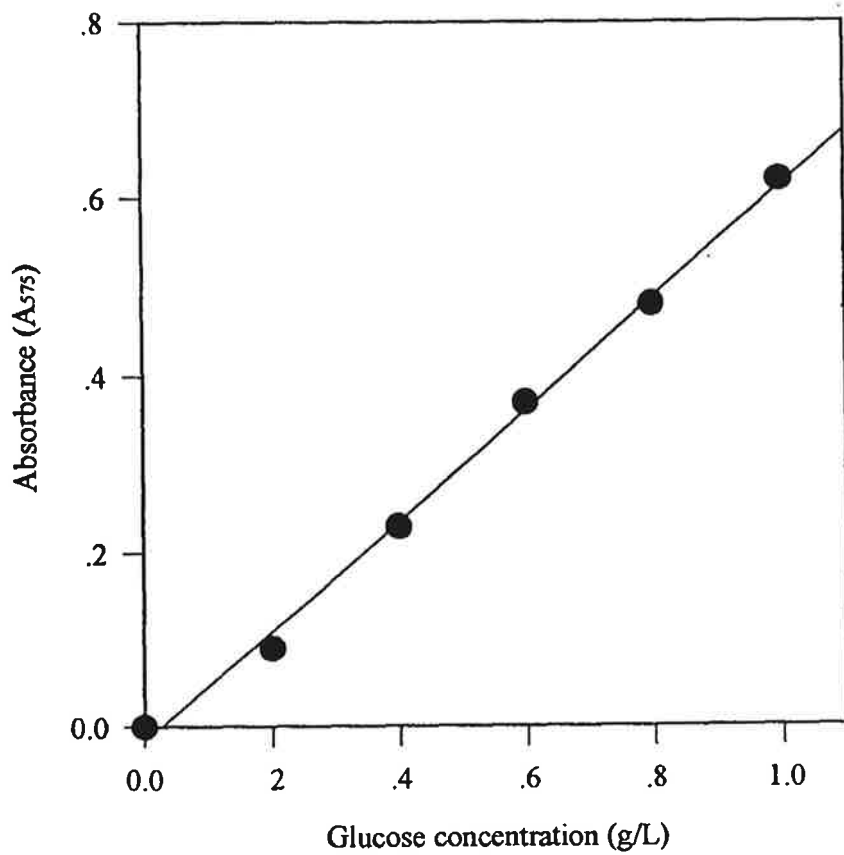


Fig. 3. Calibration curve for determination of glucose concentration.



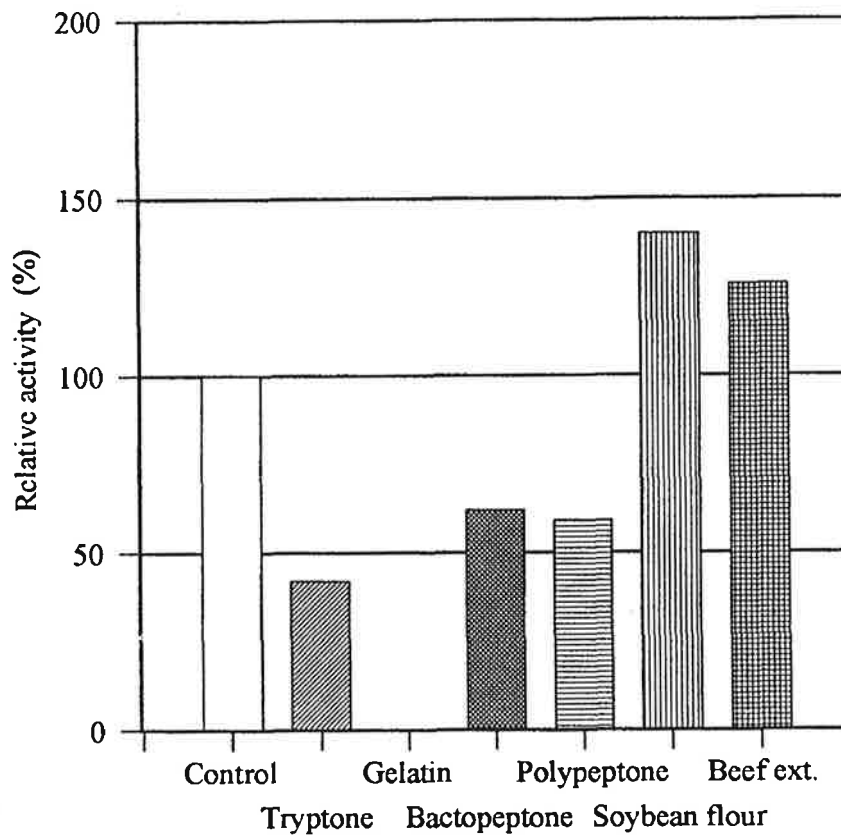


Fig. 4. Effects of organic nitrogen sources on enzyme activity.  
Control was L-broth.

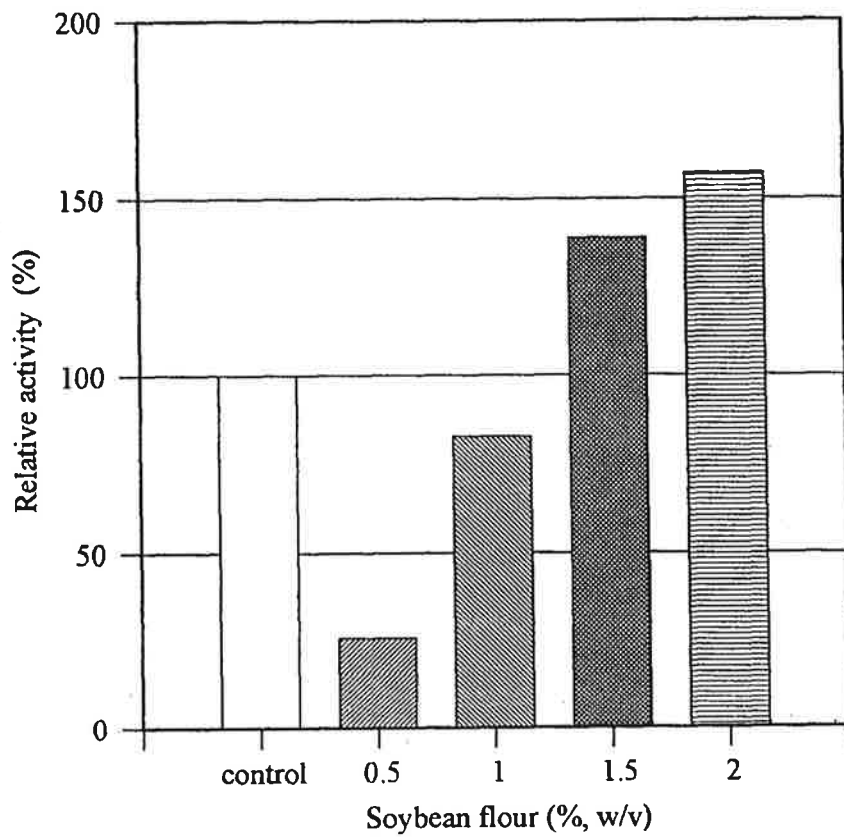


Fig. 5. Effect of soybean flour concentration on enzyme activity. Control was L-broth.

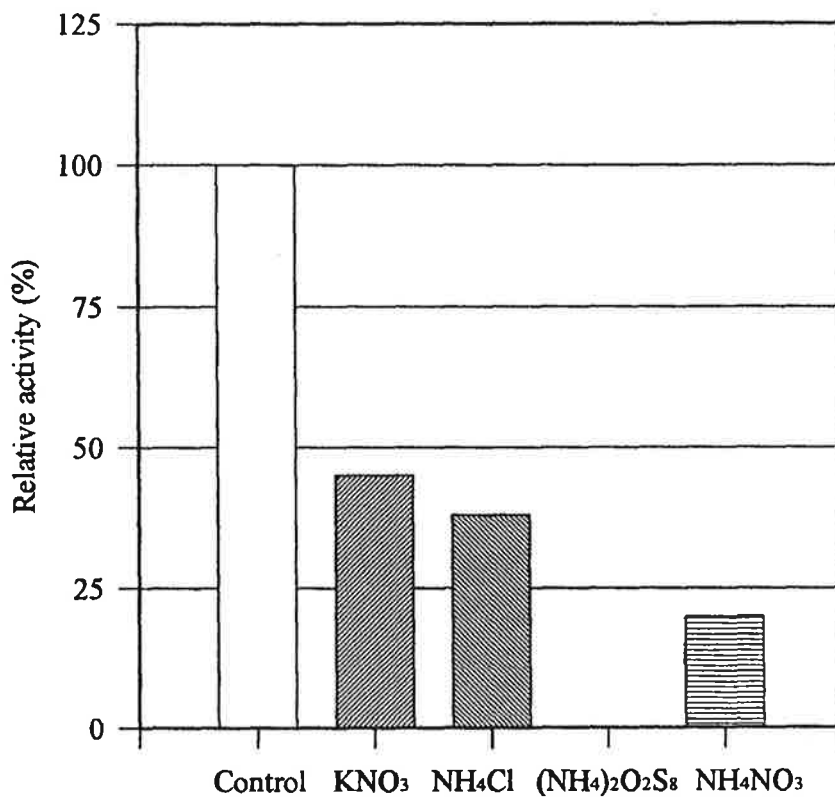
와 2%에서 좋은 결과를 나타내었는데, 1.5%와 2.0%를 비교하였을 때 그 차이가 매우 작았으므로 그 농도를 1.5%로 결정하였다.

#### 나. 무기질소원의 영향

무기 질소원이 효소 활성화에 미치는 영향을  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{O}_2\text{S}_8$  등에 대하여 조사하였다(Fig. 6). 각각의 무기 질소원을 0.2%(w/v) 첨가한 결과 모두 첨가하지 않은 경우보다 낮은 효소 활성을 나타내었지만 그 중  $\text{KNO}_3$ 가 가장 좋은 결과를 보였다. 유기 질소원인 soybean flour가 충분한 질소원으로 공급되기 때문에, 0.2% 이하의 낮은 무기 질소원 농도에서 효소 활성화에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 7). 0.1%에서 최대 활성을 얻었지만 그 값은 첨가하지 않은 경우보다 낮았다. I-Ming, Chu 등도 *Bacillus subtilis* ATCC 14416을 이용하여 alkaline protease를 생산하는 실험에서 무기 질소원이 효소 생산에 저해효과를 나타내는 결과를 얻었다고 보고한 바 있다(22).

#### 다. 탄소원의 영향

탄소원이 효소 활성화에 미치는 영향을 L-arabinose, lactose, soluble starch, sucrose, D-glucose, mannitol, dextrin 등에 대하여 조사하였다(Fig. 8). 탄소원을 0.5%(w/v) 첨가한 결과 L-arabinose, sucrose, D-glucose, mannitol dextrin 등은 탄소원을 첨가하지 않은 경우보다 높은 효소 활성을 보였으며, 특히, D-glucose는 첨가하지 않은 경우의 1.7배의 효소활성을 보였다. D-glucose를 0.2-2%로 변화시켰을 때(Fig. 9) 0.5% 이상에서 좋은 결과를 보였다.



**Fig. 6. Effect of inorganic nitrogen source on enzyme activity.**  
 Each inorganic nitrogen source was added to 0.2%. Control contained :1.5% soybean flour, 0.5% D-glucose, and 0.5% NaCl.

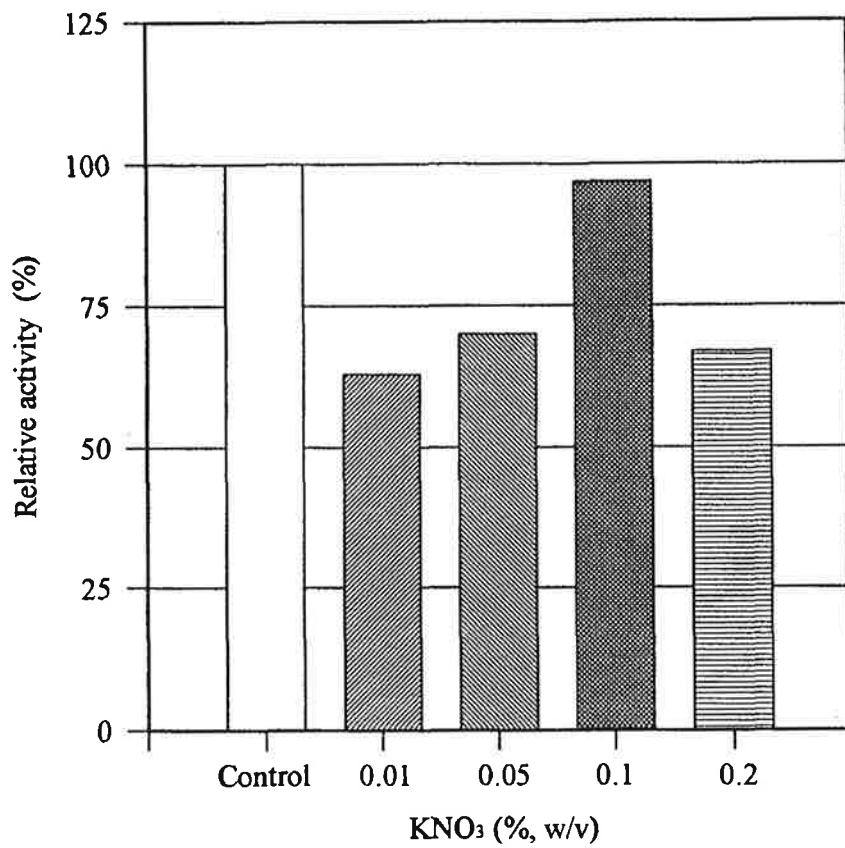


Fig. 7. Effect of KNO<sub>3</sub> concentration on enzyme activity. KNO<sub>3</sub> was added to 0.2%. Control was the same as in Fig. 6.

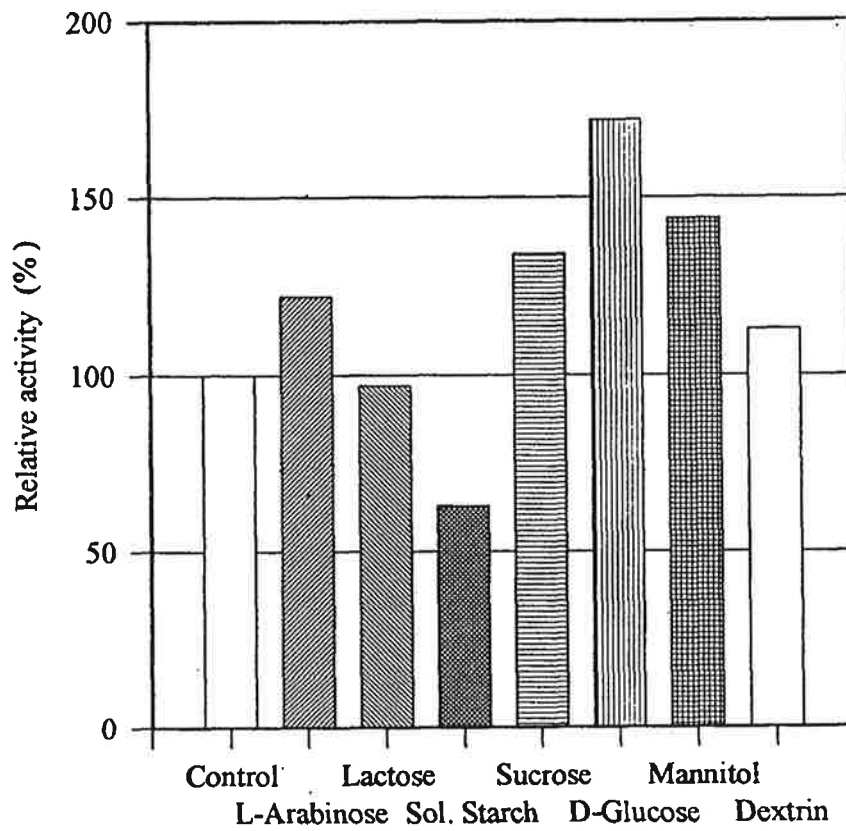


Fig. 8. Effect of carbon source on enzyme activity.  
 Each carbon source was added to 0.5%. Control  
 contained : 1.5% soybean flour and 0.5% NaCl.

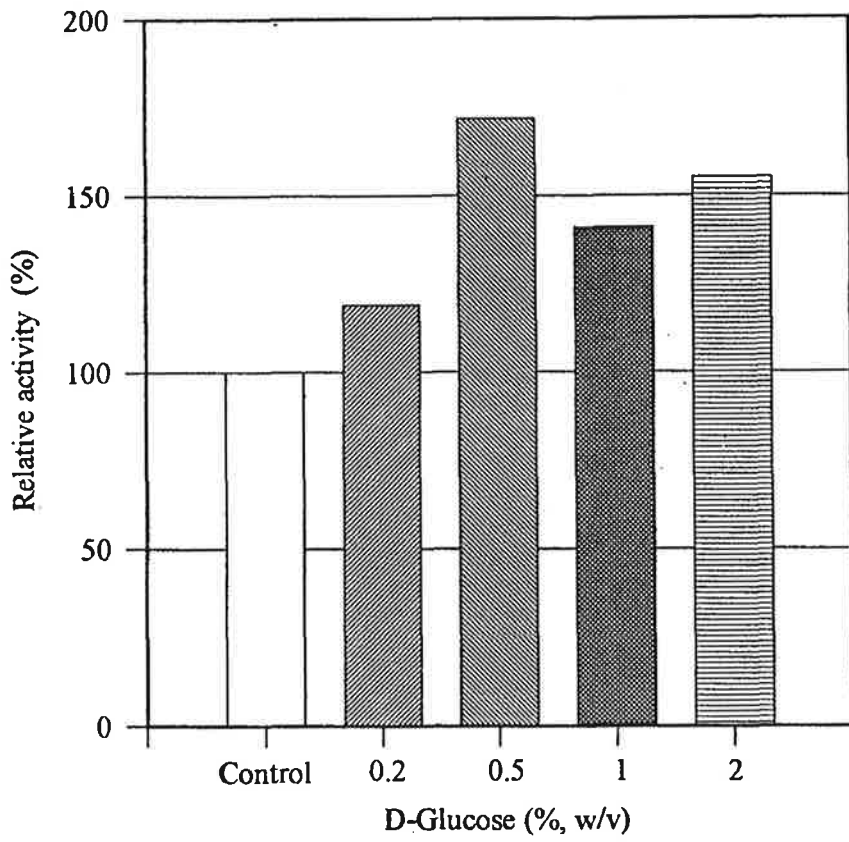


Fig. 9. Effect of D-glucose concentration on enzyme activity.  
Control was the same as in Fig. 8.

#### 라. 무기염류의 영향

무기염류가 효소 생산에 미치는 영향을  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$  등에 대하여 조사하였다(Fig. 10). Soybean flour 1.5%와 glucose 0.5%를 기본으로 0.1%(w/v)의 무기염류를 첨가한 결과  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 가 첨가한 경우가 첨가하지 않은 경우의 약 125%로 가장 좋은 효소 활성을 보였으며, 특이하게도  $\text{ZnCl}_2$ 나  $\text{FeCl}_3$ 가 첨가된 경우 효소활성이 전혀 나타나지 않았다. 무기염류로 선정된  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 의 농도를 결정하기 위하여 0.05~0.2%로 변화시켰을 때(Fig. 11), 0.05%의 농도에서  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 가 첨가되지 않은 control에 비해 약 1.5배의 효소 활성을 얻을 수 있었다.

#### 마. 초기 pH의 영향

초기 pH가 효소 활성에 미치는 영향을 7~10까지의 범위에서 조사하였다(Fig. 12). 37°C, 160 rpm에서 약 30 시간동안 배양하였다. 앞선 실험에서 최적화한 배지(soybean flour 1.5%, glucose 0.5%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.05%)의 pH를 조절하여 고압살균한 결과 살균 전에 비해 pH가 감소하였으므로 본 실험에서는 살균 후 pH를 재차 조정하였다. 초기 pH 9에서 가장 높은 활성을 얻었으며 이는 초기 pH 7의 약 2배의 값이었다. 그림에 나타내지는 않았지만 *B. subtilis* BK-17은 배양 중 초기에 pH가 감소하였다가 정지기에 접어들면서 다시 올라가는 것을 알 수 있었는데, 초기 pH가 낮으면 배양 초기에 pH가 너무 낮아져서 효소 생산에 저해 작용을 하는 것으로 생각된다.



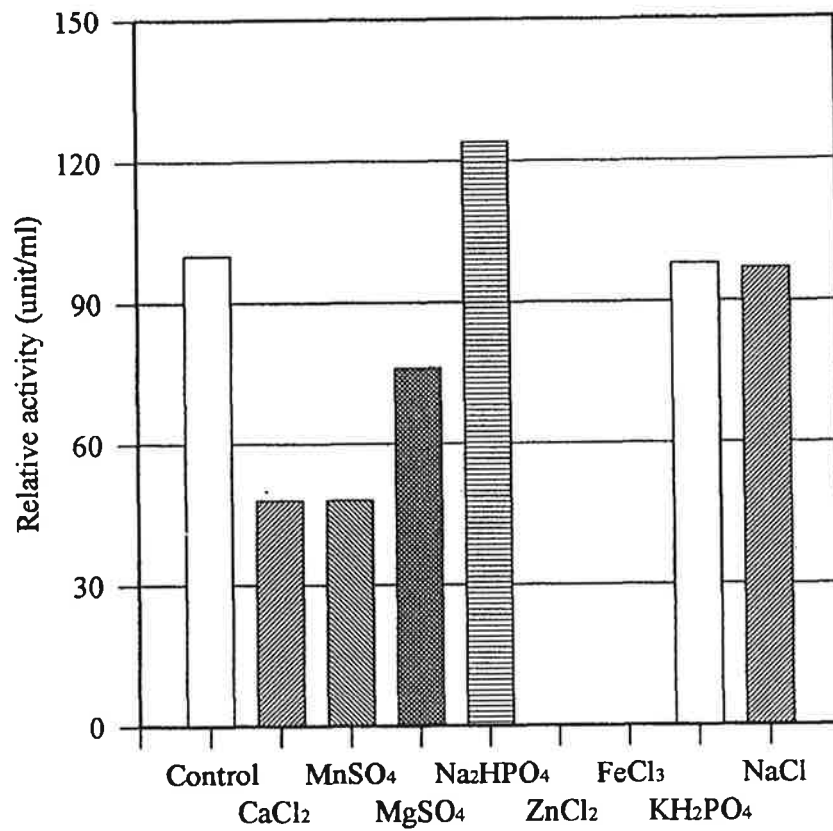


Fig. 10. Effect of inorganic salt on enzyme activity. Each inorganic salts was added to 0.1%. Control contained : 1.5% soybean flour and 0.5% D-glucose.

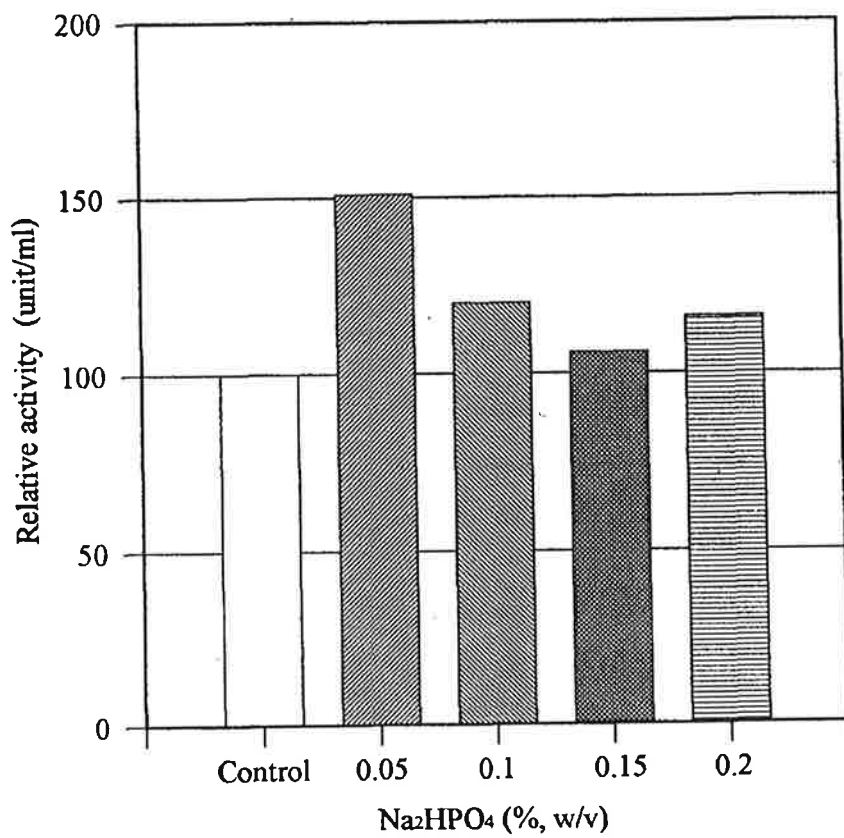


Fig. 11. Effect of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> concentration on enzyme activity. Control was the same as in Fig. 10.

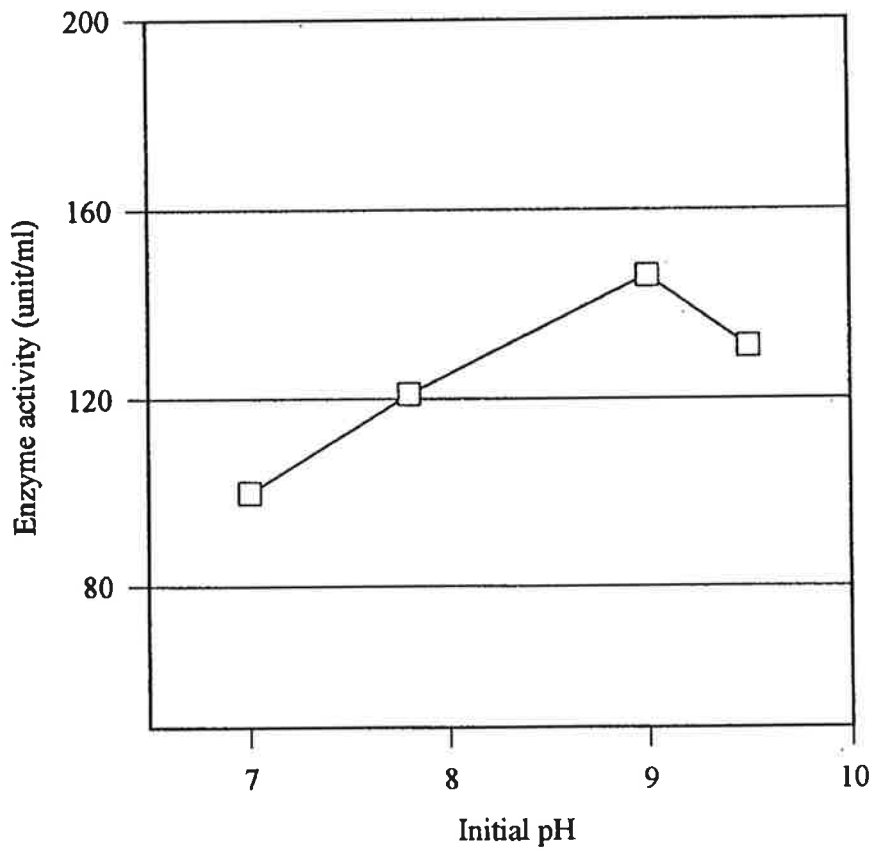


Fig. 12. Effect of initial pH on enzyme activity.

#### 바. 온도의 영향

온도가 효소 활성에 미치는 영향을 25, 30, 37, 40℃의 범위에서 조사하였다 (Fig. 13), 이 때 교반 속도는 160 rpm이고 배양시간은 약 30 시간으로 고정하였다. 일반적으로 *Bacillus*와 같은 중온성 미생물은 30~37℃의 온도에서 세포 성장이나 대사산물의 생산에 있어서 가장 최적의 활성을 나타낸다고 알려져 있으며 본 실험의 결과도 이와 일치하였다. 특히 40℃ 이상에서 효소 활성이 37℃에서의 최대활성의 10%에 수준으로 현저히 감소하였는데 이는 40℃ 이상의 온도에서 혈전용해효소의 비특이적 분해가 촉진되는 이유 이외에도 다른 단백질 가수분해효소의 생성에 따른 혈전용해효소의 급격한 분해 가능성도 배제할 수 없다.

#### 사. working volume의 영향

250 ml flask에서 액체배지 사용량을 25 ml에서 100 ml로 변화시켜 working volume의 영향을 조사하였다(Fig. 14). L-broth를 배지로 하여 160 rpm의 교반속도에서 약 30 시간 진탕배양하였다. 25 ml과 50 ml에서는 높은 효소활성을 나타내었고 75 ml 이상에서 50 ml에 비해 약 30% 이하의 효소활성을 나타내었다. 이 결과는 아래 교반속도의 영향과 함께 aeration의 영향이 매우 중요하다는 것을 보여준다. 이 후 flask실험에서는 working volume을 250 ml의 플라스크에 50 ml로 하였다.

#### 아. 교반 속도의 영향

교반 속도의 영향을 100 rpm~300 rpm의 범위에서 조사하였다(Fig. 15). 235 rpm 이상의 교반속도로 배양하였을 때 높은 효소 활성을 나타내면서 최대 활성치를 보이는 시간 또한 빨랐다. 교반 속도가 200 rpm보다 느린 경우에는 효소 활성이 300 rpm에서 배양한 경우의 약 50% 정도의 수준에 머물렀으며, 최대 활성치를 나타내는 시간도 늦었다. Working volume의 영향에서 얻어진 결과에서도 보여진 바와 같이 *B. subtilis* BK-17 균

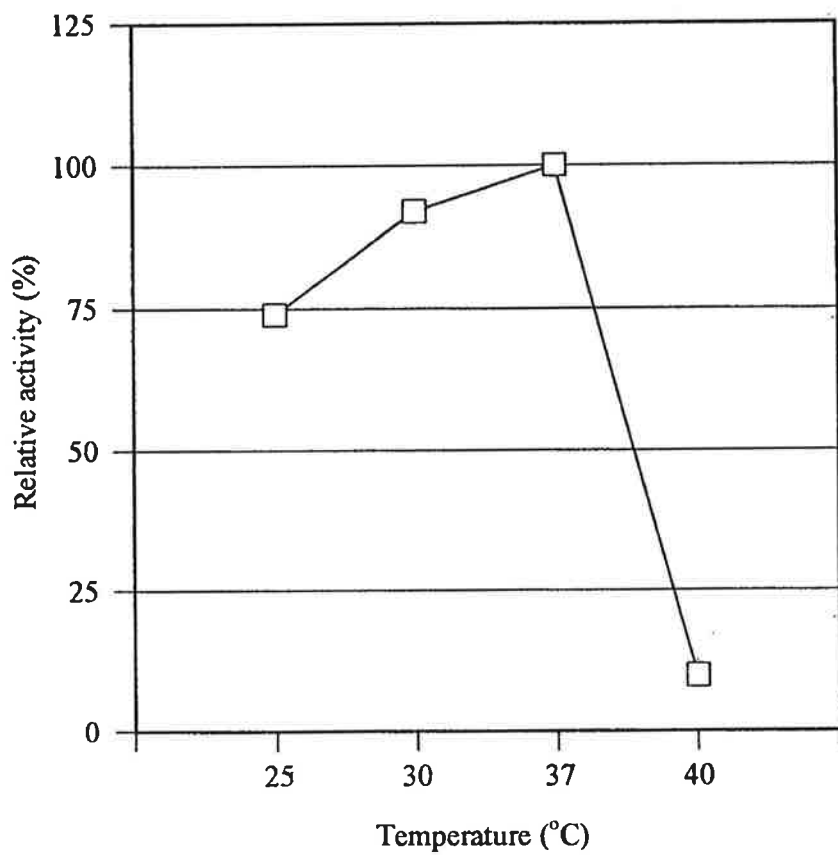


Fig. 13. Effect of temperature on enzyme activity.

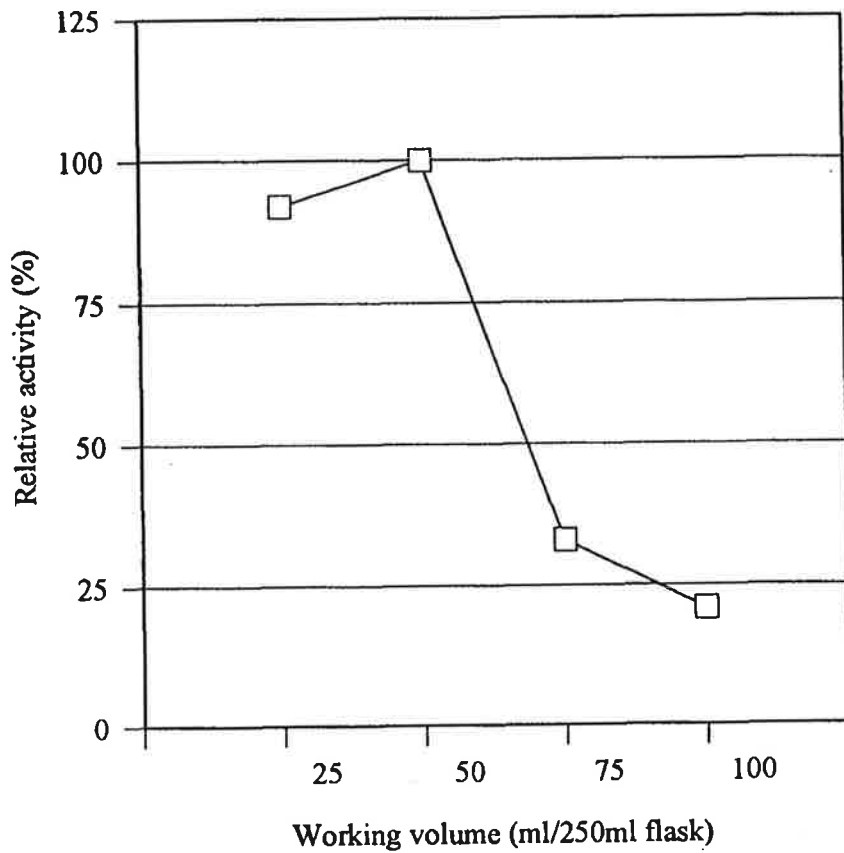


Fig. 14. Effect of working volume on enzyme activity. Cultivation was performed in L-broth at the agitation speed of 160rpm.

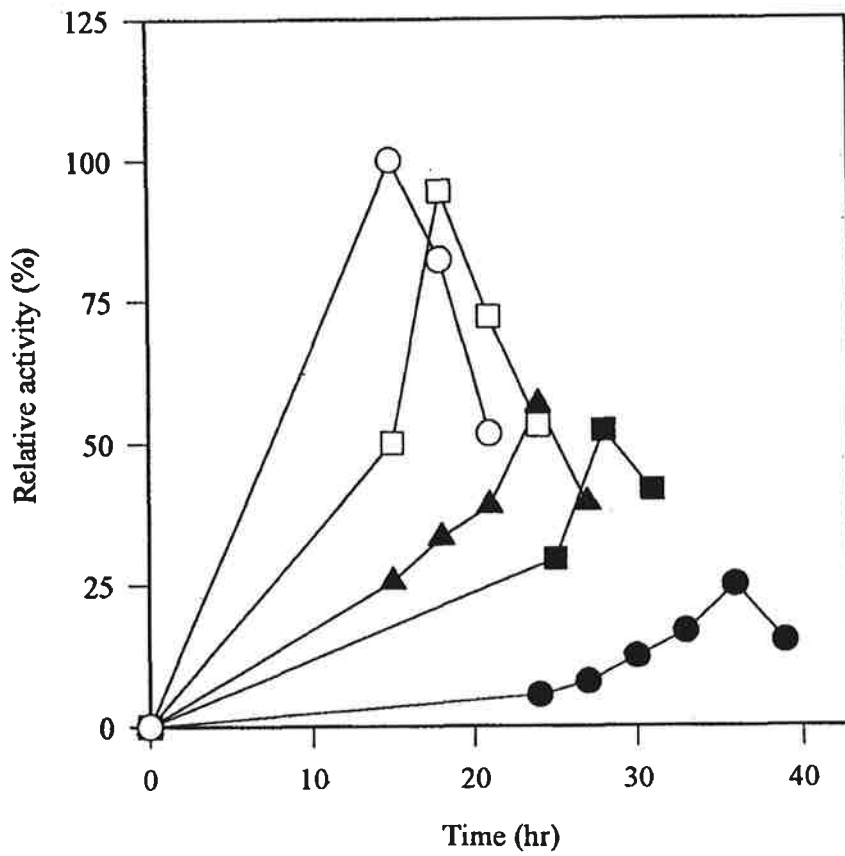


Fig. 15. Effect of agitation speed on enzyme activity:  
 ●, 100 rpm; ■, 160 rpm; ▲, 200 rpm;  
 □, 235 rpm; ○, 300 rpm.

주가 혈전용해효소를 생산하는 데 있어 충분한 산소의 공급이 매우 중요한 인자임을 알 수 있었다.

#### 자. 접종량의 영향

선행된 실험에서 최적화한 배지(soybean flour 1.5%, D-glucose 0.5%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%)에서 37℃, 160 rpm의 조건에서 약 30 시간동안 배양하여 접종량이 효소 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 16). 1차 배양액의 접종량을 1%, 3%, 그리고 5%로 변화시켰다. 세포 접종량이 증가함에 따라 최대효소활성은 감소하는 경향을 보였다.

#### 차. Antifoam 의 영향

플라스크 실험에서와 달리 bioreactor의 운전에서는 공기주입과 과도한 교반 때문에 많은 foam이 생성된다. 따라서 소포제의 사용이 불가피하며 일반적으로 과도한 소포제는 효소 활성의 감소를 가져오므로 bioreactor의 운전에 앞서 플라스크에서 그 영향을 조사하였다(Fig. 17). 배양 조건은 최적화 배지, 37℃, 160 rpm이었고 소포제는 실리콘(DB-110A 실리콘 소포제, (주)한국다우코닝, 서울)을 10배 희석하여 사용하였으며 배양시간은 30 시간으로 고정하였다. 소포제는 한꺼번에 투여하지 않고 150  $\mu$ l와 800  $\mu$ l를 3 시간 간격으로 4회로 나누어 총 600  $\mu$ l와 320  $\mu$ l를 주입하였다. 소포제가 없을 때 최대 활성이 다소 빨리 관찰되었고 이는 산소 전달과 관계가 있는 것으로 추정된다. 그러나 소포제의 양이 증가하여도 큰 영향이 없었다.



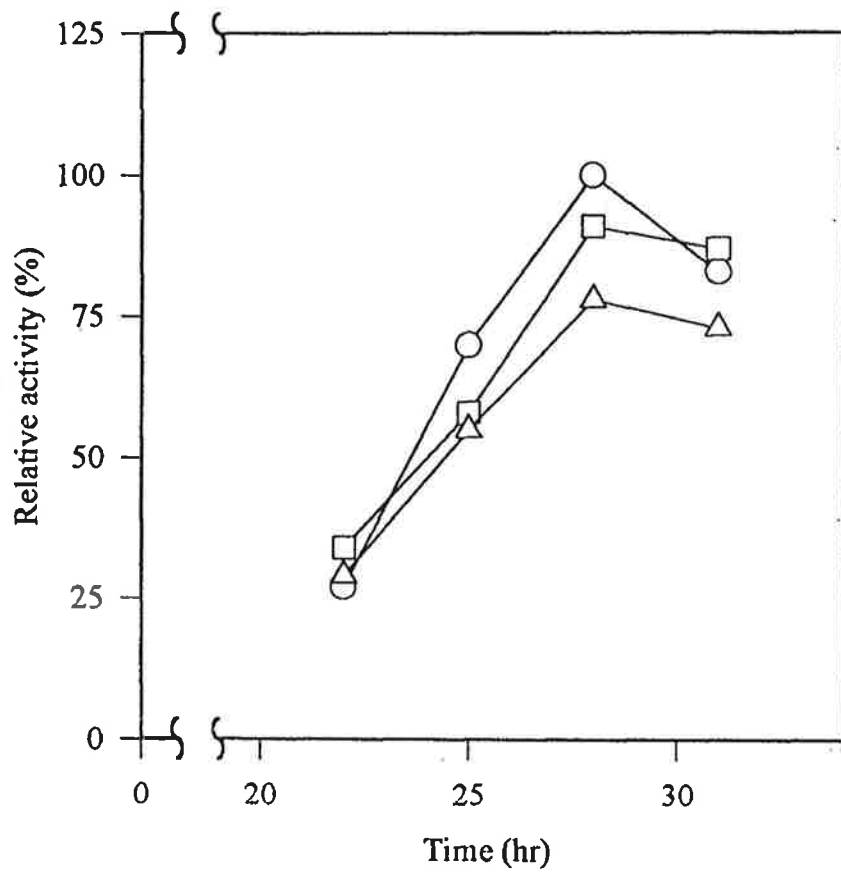


Fig. 16. Effect of inoculum size on enzyme activity  
 ○, 1%; □, 3%; △, 5%.

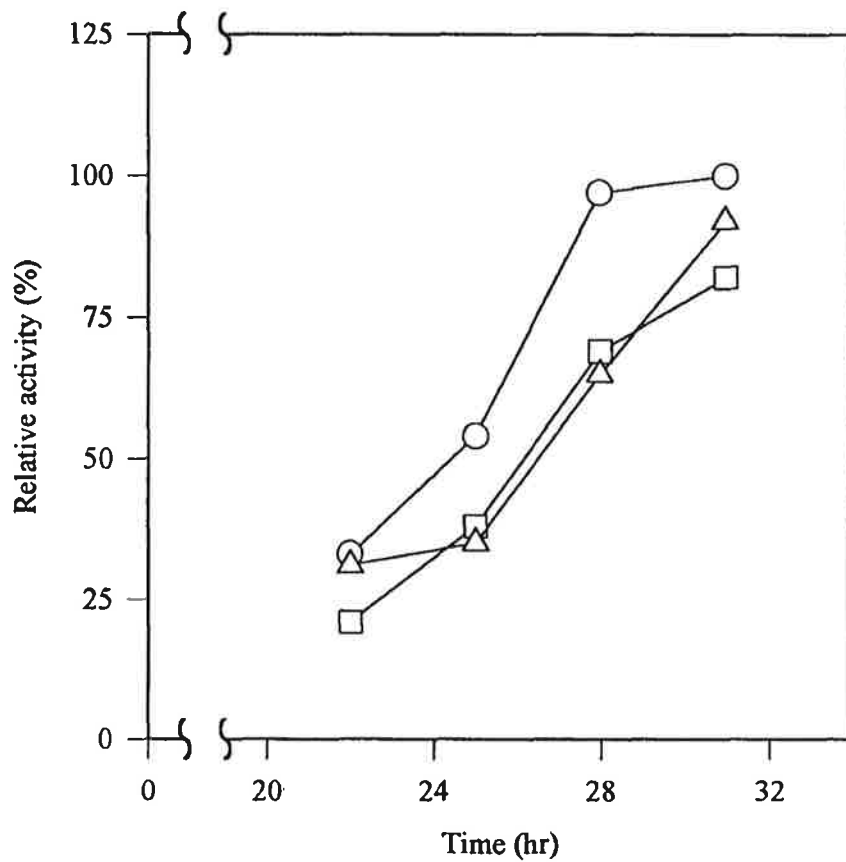


Fig. 17. Effect of antifoam reagent on enzyme activity:  
 ○, no addition; □, 600µl(150µl/addition×4 times);  
 △, 3200µl(800µl/addition×4 times).

## 2. Bioreactor 배양에서의 배지 및 환경 조건의 최적화

플라스크 배양에 비해 bioreactor 배양에서는 pH, DO 등 각종 환경 인자들을 잘 측정할 수 있고 분석을 위한 시료도 자주 채취할 수 있으므로 발효 과정을 보다 정밀하게 분석할 수 있는 장점이 있다. 또 공기 공급량이나 교반 속도를 적절히 조절하여 DO level을 일정 수준 유지함으로써 산소 부족에 의한 발효 중단을 막을 수 있다. 특히 고농도의 배지를 사용하여 균체 성장을 빠르게 하거나 고농도 세포 농도를 유지시킬 필요가 있을 때 유가 배양이 가능한 장점이 있다. 본 연구에서는 플라스크 발효 최적화 결과를 바탕으로 bioreactor 발효의 최적화를 시도하였으며 중요 대상 인자는 배지 조성, pH, 온도 등이다.

### 가. 배지 농도의 영향

플라스크에서 최적화한 배지(soybean flour 1.5%, D-glucose 0.5%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.05%)의 농도를 1배, 2배, 3배로 변화시키면서 세포의 성장과 효소 생산, glucose 농도의 변화, 그리고 pH와 DO의 변화를 조사하였다. Working volume은 3 L로 하였고 air 공급은 1.4 vvm, 교반 속도는 800 rpm으로 하였으며, 온도는 37°C였다. pH는 초기에 7.5로 시작하여 최저 6.4에서 최대 7.8 범위로 조절하였다.

플라스크 배양과 같은 농도에서의 발효 결과를 Fig. 18에 나타내었다. 세포 성장의 경우, lag phase가 나타내지 않았으며, 발효를 시작한 후 약 6 시간 동안 exponential phase를 유지하였다. 비성장속도(specific growth rate,  $\mu$ )와 최대 세포 농도는 각각  $0.93 \text{ hr}^{-1}$ 과  $4.1 \times 10^9 \text{ CFU/ml}$ 이었다. 2 시간 동안 stationary phase를 유지하다가 death phase에 접어들었는데, pH와 DO의 변화는 세포 성장과 밀접한 관련성을 보여주었다. 즉, 세포가 지수적으로 증가할 때는 pH와 DO가 급격하게 감소하다가 세

포가 정지기에 접어들면서 pH와 DO가 일정 수준까지 급증하였고 그후 완만하게 증가하였다. 효소 생산 곡선을 살펴보면, 혈전 용해 효소는 발효 초기에 생산되지 않다가 exponential phase 말기부터 급격하게 생산되기 시작하여 세포가 정지기에 있을 때인 발효 10 시간 정도에서 최대값을 나타냈다. 주어진 배지 조건에서 효소생산 시기가 세포 성장 시기와 일치하지 않고 그 성장이 거의 멈추었을 때인 것으로 보아 본 연구에서 목적으로 하는 혈전 용해 효소는 2차 대사 산물일 것으로 생각된다. Glucose는 초기에는 소모 속도가 낮았고 이 때의 glucose yield는  $0.93 \times 10^{12}$  CFU(colony forming unit)/g이었다. Glucose는 효소의 생산이 활발히 일어나는 시기에 급격하게 소모되었는데 이는 혈전 용해 효소를 생산하는 대사 과정에서 glucose가 중요한 역할을 하기 때문이라고 생각된다.

배지 농도를 2배로 하여 배양한 결과를 Fig. 19에 나타내었다. 세포 성장에 있어서 Fig. 18에서와 같이 lag phase가 나타나지 않았으며 전체적으로 같은 경향을 나타내었다. 비성장속도는  $0.96 \text{ hr}^{-1}$ 로 Fig. 18의 경우보다 조금 높았으나 최대 세포 농도는 거의 동일하였다. 세포가 지수적으로 증가할 때 glucose의 yield를 비교해 보면  $1.22 \times 10^{12}$  CFU/g로 더 높았다. 효소 생산의 pattern은 1× 배지의 경우와 같았으나 최대 효소 활성은 약 1.7배 향상되었다.

배지의 농도를 3배로 하여 배양한 결과를 Fig. 20에 나타내었다. 비성장속도는  $0.99 \text{ hr}^{-1}$ 로 더욱 향상되었고, 최대 세포 농도도 약간 높아졌다. 지수성장기에서의 glucose yield는  $13.16 \times 10^{12}$  CFU/g로 가장 높았고, 소모속도는 가장 낮았으나 효소 생산이 활발한 시기에는 급격하게 소모되었다. 최대효소활성은 2× 배지의 경우와 거의 같았다.

#### Glucose의 농도의 영향

Glucose의 농도가 pH와 DO의 변화 및 효소 활성에 미치는 영향을 1%

와 1.5%에서 조사하였다. 앞서 수행된 실험 결과로부터 얻은 2× 배지와 3× 배지 사이에 효소 생산이 거의 같았으므로, 2× 배지 즉 soybean flour 3%, D-glucose 1%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1%(추후 bioreactor 기본 배지라 칭함)에서 D-glucose의 농도만을 1.5%로 하여 발효 결과를 비교하여 보았다.(Fig. 21) 최대 효소 활성은 거의 유사하였으나, 최대의 효소활성치를 나타내는 시간은 1 시간 정도 늦어졌다.

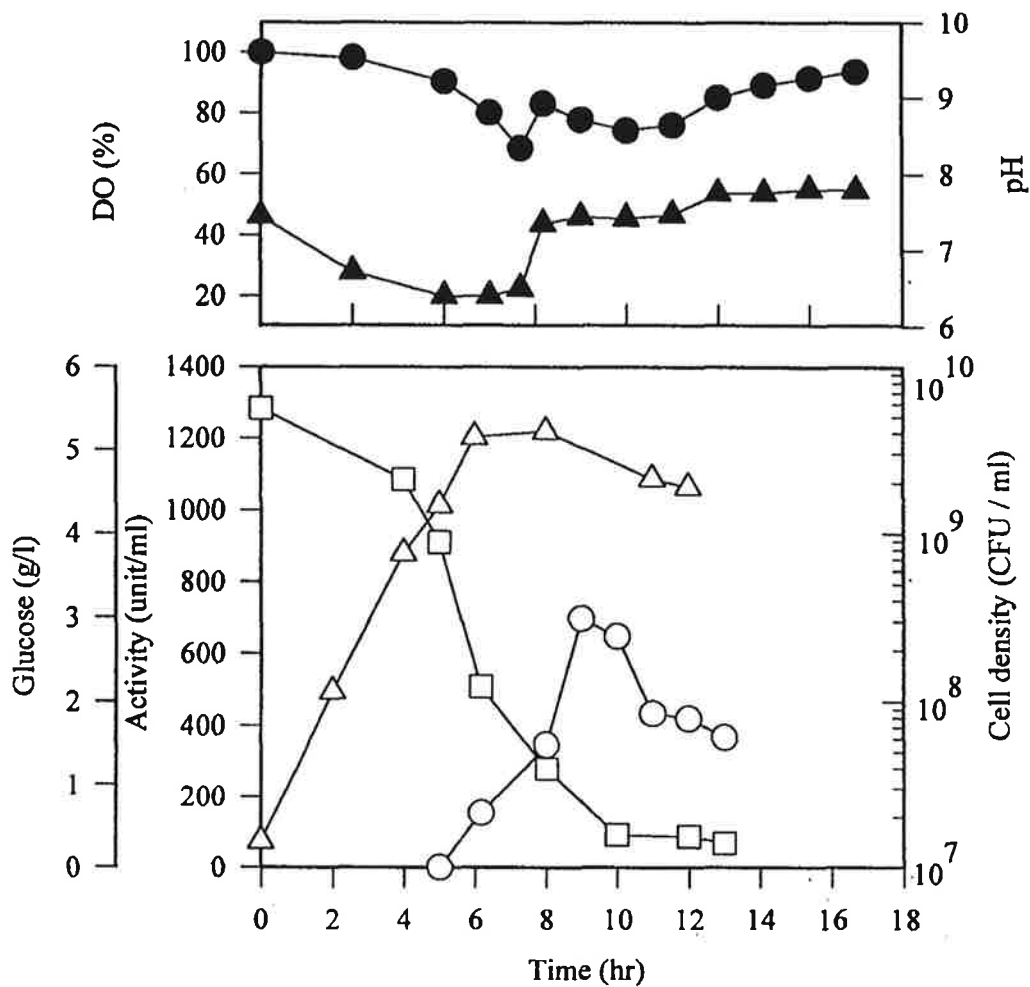


Fig. 18. Time course profiles of cell growth( $\Delta$ ), enzyme activity( $\circ$ ), glucose concentration( $\square$ ), pH( $\blacktriangle$ ), and DO( $\bullet$ ) in the flask-optimized medium (1  $\times$  medium), soybean 1.5%, D-glucose 0.5%, and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.05%

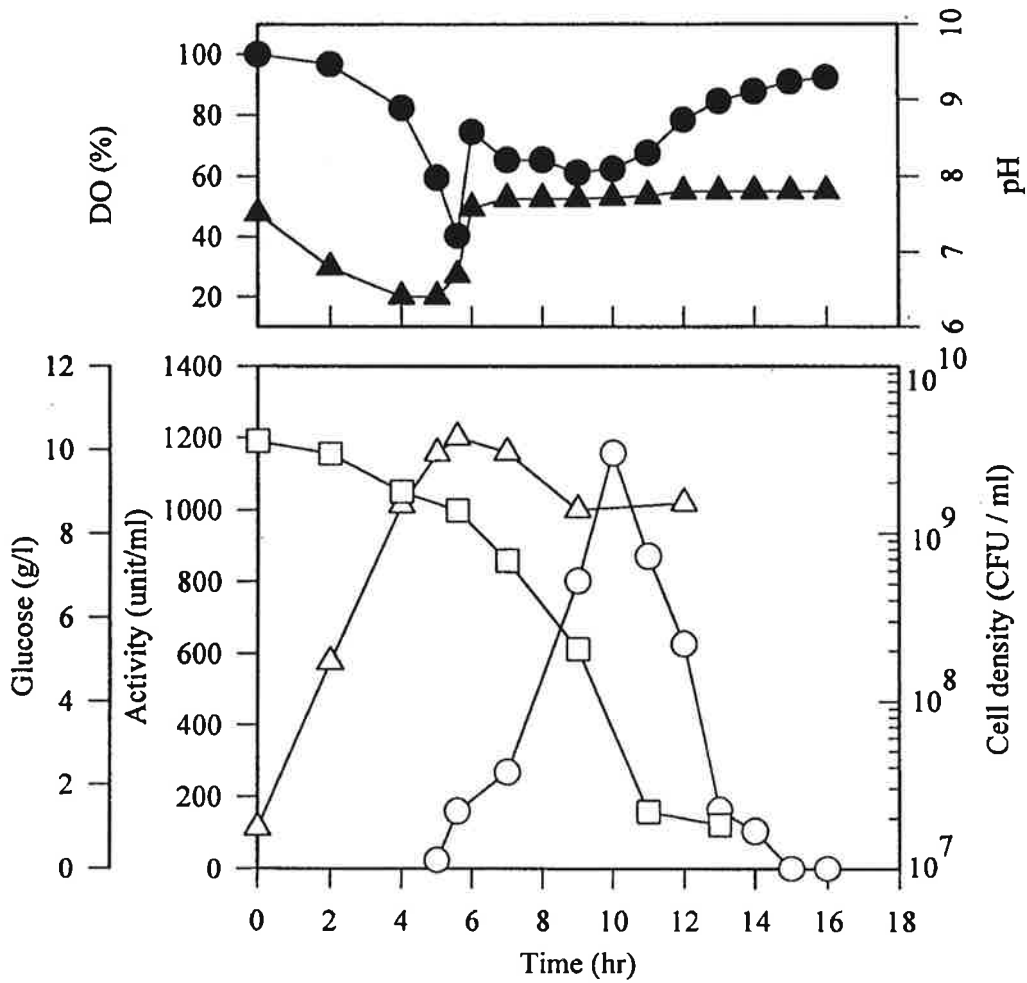


Fig. 19. Time course profiles of cell growth( $\Delta$ ), enzyme activity( $\circ$ ), glucose concentration( $\square$ ), pH( $\blacktriangle$ ), and DO( $\bullet$ ) in the twofold concentrated medium.

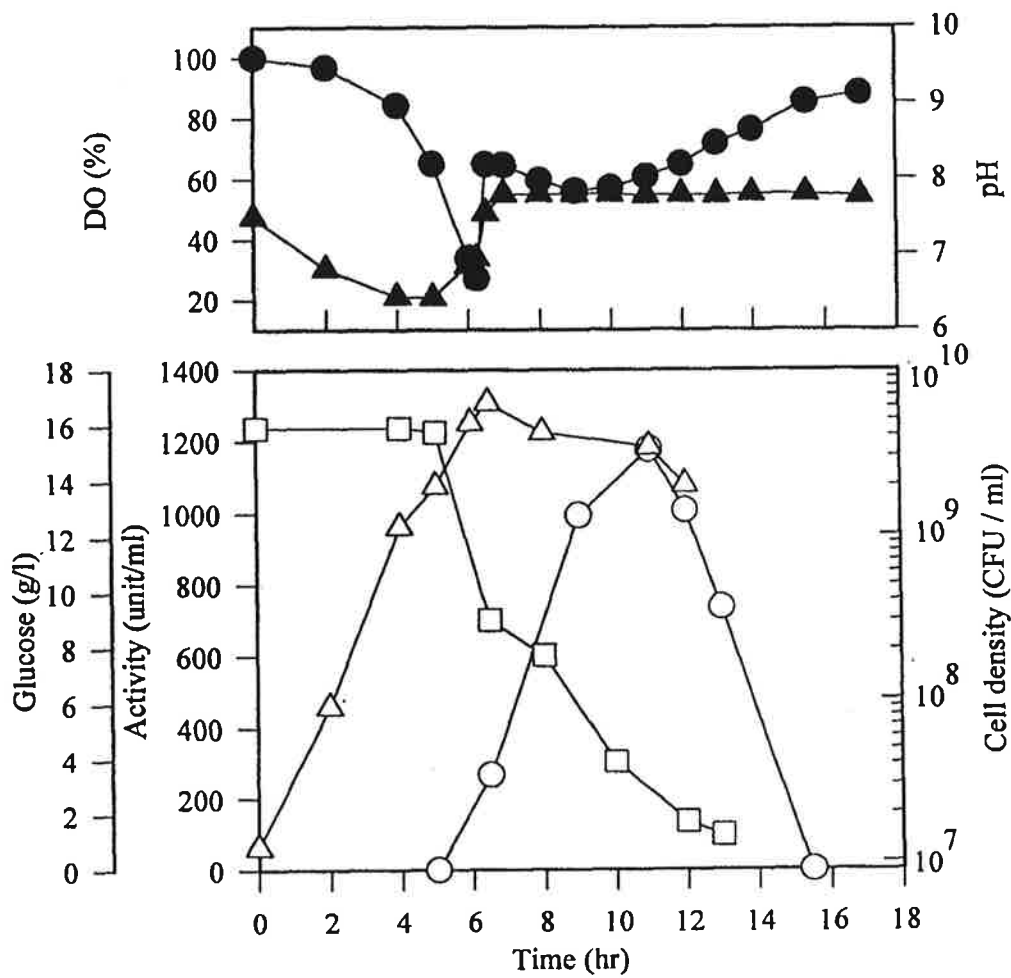


Fig. 20. Time course profiles of cell growth( $\Delta$ ), enzyme activity( $\circ$ ), glucose concentration( $\square$ ), pH( $\blacktriangle$ ), and DO( $\bullet$ ) in the threefold concentrated medium.



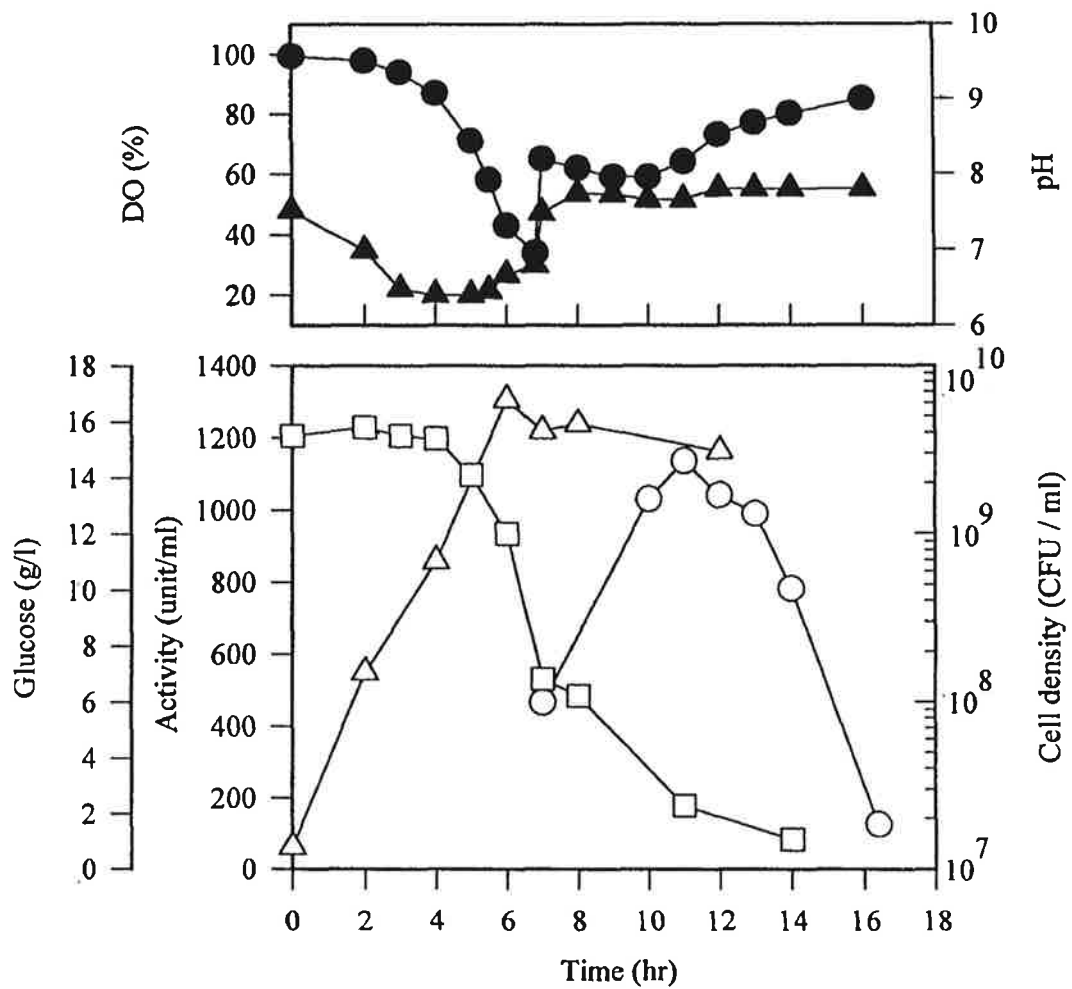


Fig. 21. Time course profiles of cell growth( $\Delta$ ), enzyme activity( $\circ$ ), glucose concentration( $\square$ ), pH( $\blacktriangle$ ), and DO( $\bullet$ ). The medium contained 3% soybean flour, 1.5% D-glucose, and 0.1%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

#### 다. pH의 영향

배양중 pH 변화가 수반되는 효소 생산에 대한 pH의 영향을 살펴보기 위하여 배양 pH의 영향을 6.0, 6.5, 7.0, 7.5에서 조사하였다. 배지는 bioreactor 기본 배지를, 온도는 37°C, 그리고 다른 운전 조건은 앞서의 실험과 동일하게 하였다. pH 조절은 2.5 N HCl과 2.5 N NaOH로 하였고 과다한 산, 염기 주입을 막기 위해 목표 pH값의  $\pm 0.1$  영역에서 제어하였다. 배양 pH에 따른 세포 성장은 최대 성장 속도( $\mu_{max}$ )가  $0.96 \text{ h}^{-1}$ (pH 7.5),  $0.99 \text{ h}^{-1}$ (pH 6.5),  $1.05 \text{ h}^{-1}$ (pH 6.0, pH 7.0)로 거의 유사하였고 모든 경우에 lag phase 없이 세포가 성장하였다. 하지만 pH 6.5를 기준으로 7.0, 7.5로 배양 pH가 상승할수록 지수성장기 동안 비성장속도는 감소하였다. 최대세포농도는 pH 6.5의 경우가  $5.5 \times 10^9 \text{ CFU/ml}$  로 가장 높았고 pH 6.0( $5.3 \times 10^9 \text{ CFU/ml}$ ), pH 7.0( $5.15 \times 10^9 \text{ CFU/ml}$ ), pH 7.5( $4.6 \times 10^9 \text{ CFU/ml}$ )순으로 낮아졌다.

전체적인 DO의 변화는 세포가 증가함에 따라 급격히 감소하여 지수 성장기가 끝나는 시점에서 최소가 되었다. 이는 DO의 변화와 세포 성장과의 밀접한 관련성을 보여준 앞선 실험들의 경향과 일치한다. 이때의 각 배양 pH의 최소 DO는 40% 내외로 거의 동일하였다.

기질로 공급된 glucose의 소모 pattern은 앞선 실험에서처럼 초기에는 소모 속도가 낮다가 세포의 농도가 증가할수록 glucose는 급격히 소모되었다. 정지기 초기에 다시 소모 속도가 낮아졌고 이후 효소 생산과 더불어 다시 급격히 소모되었는데 앞선 실험의 경향과 같았다. 하지만 지수 성장기 동안의 glucose에 대한 세포의 yield를 살펴보면 pH 6.5의 경우  $1.2 \times 10^{12} \text{ CFU/g glucose}$  이었고 pH 7.0과 7.5는 각각  $0.67 \times 10^{12} \text{ CFU/g glucose}$ ,  $0.55 \times 10^{12} \text{ CFU/g glucose}$  로 pH 6.5를 기준으로 하여 배양 pH가 증가할 수록 yield는 낮았다.

효소의 생산은 pH 6.5의 경우가 1170 unit/ml로 가장 좋은 활성을 보였고 pH 6.0(819 unit/ml), pH 7.0(648 unit/ml) , pH 7.5(194 unit/ml)의 순이었다.

pH 실험을 통해 pH가 효소 생산에 중요한 인자임을 확인하였고 효소 생산이 가장 좋고 세포 성장 기간도 짧은 pH 6.5에서의 배양이 pH 실험에서는 가장 최적 조건임을 알 수 있었다.

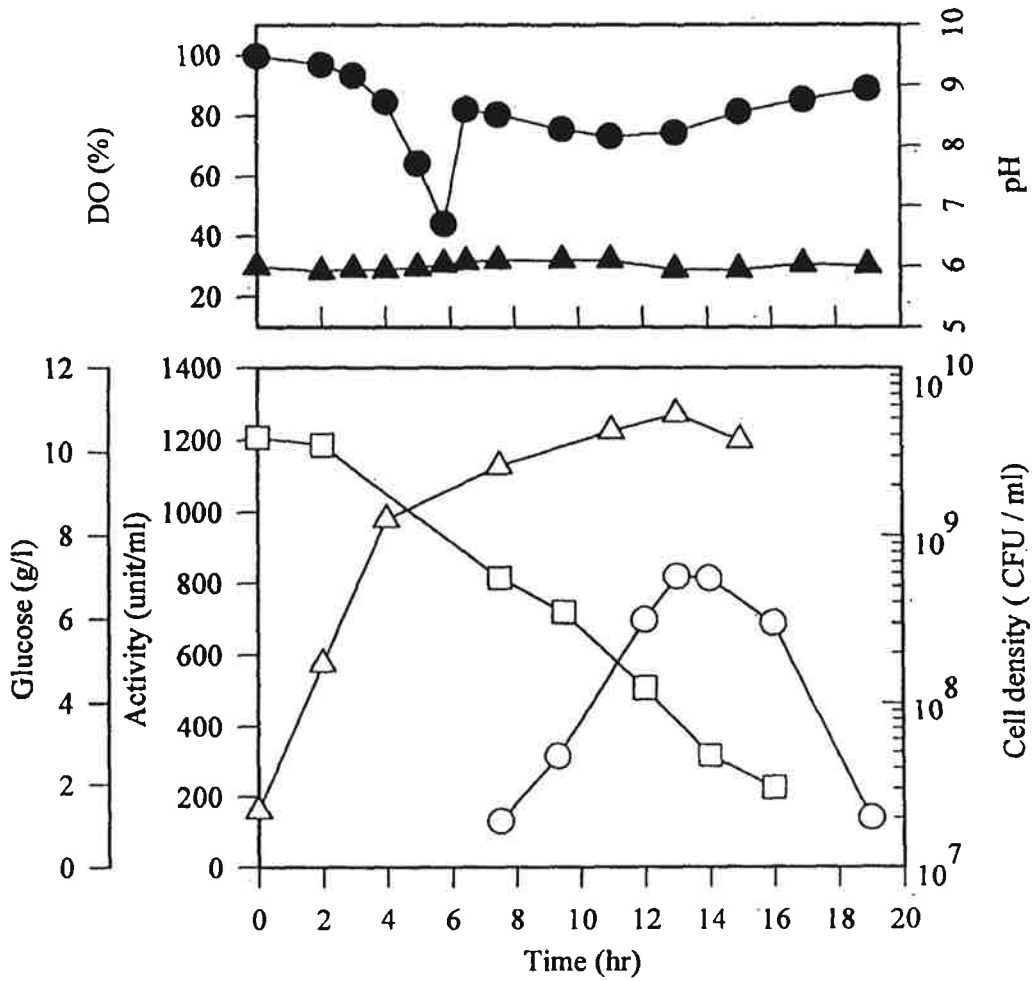


Fig. 22. Time course profiles of cell growth( $\Delta$ ), enzyme activity( $\circ$ ), glucose concentration( $\square$ ), pH( $\blacktriangle$ ), and DO( $\bullet$ ) at pH 6.0

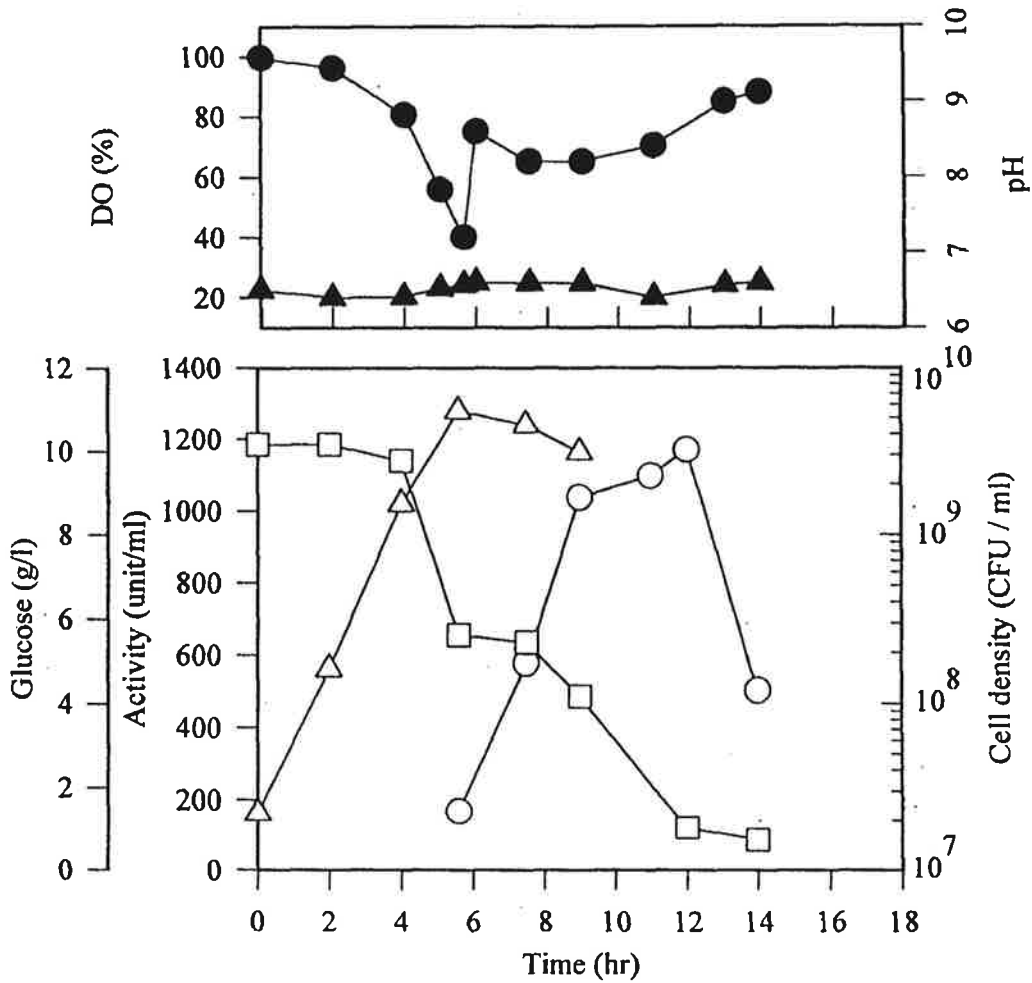


Fig. 23. Time course profiles of cell growth( $\Delta$ ), enzyme activity( $\circ$ ), glucose concentration( $\square$ ), pH( $\blacktriangle$ ), and DO( $\bullet$ ) at pH 6.5.

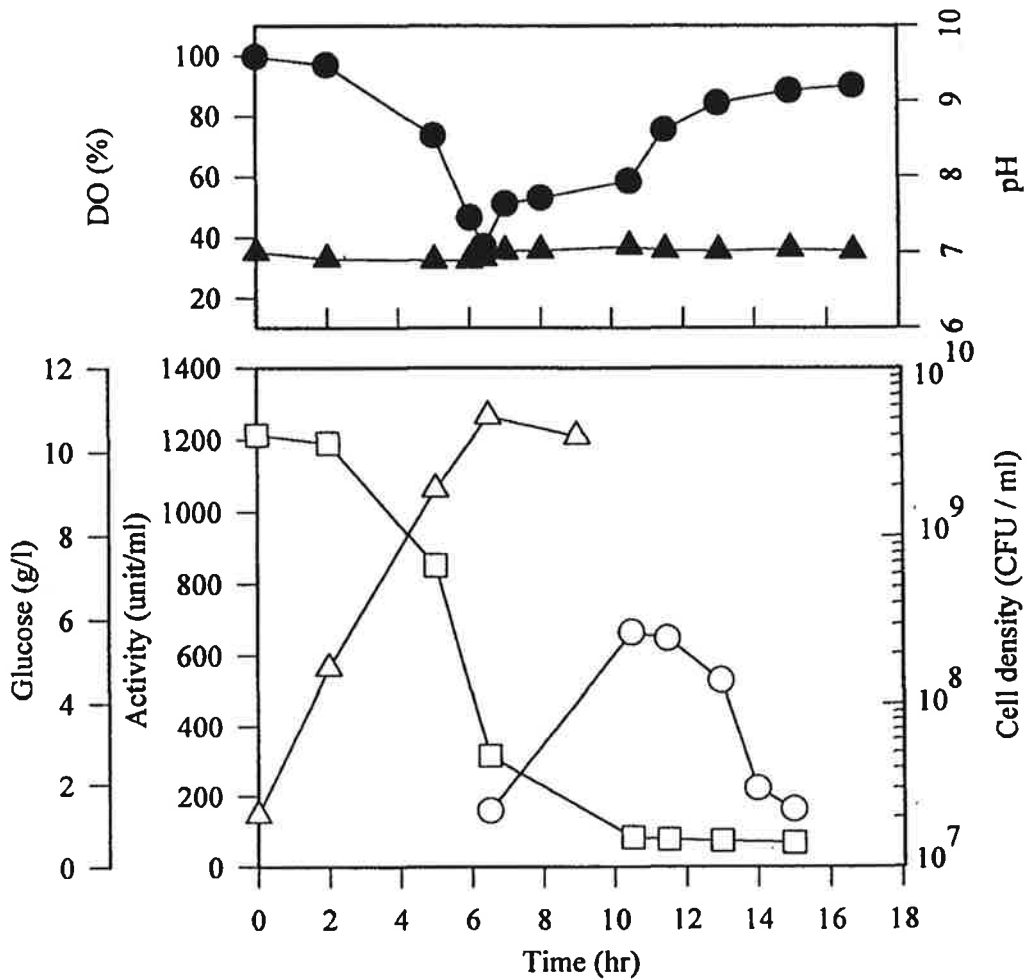


Fig. 24. Time course profiles of cell growth( $\Delta$ ), enzyme activity( $\circ$ ), glucose concentration( $\square$ ), pH( $\blacktriangle$ ), and DO( $\bullet$ ) at pH 7.0.

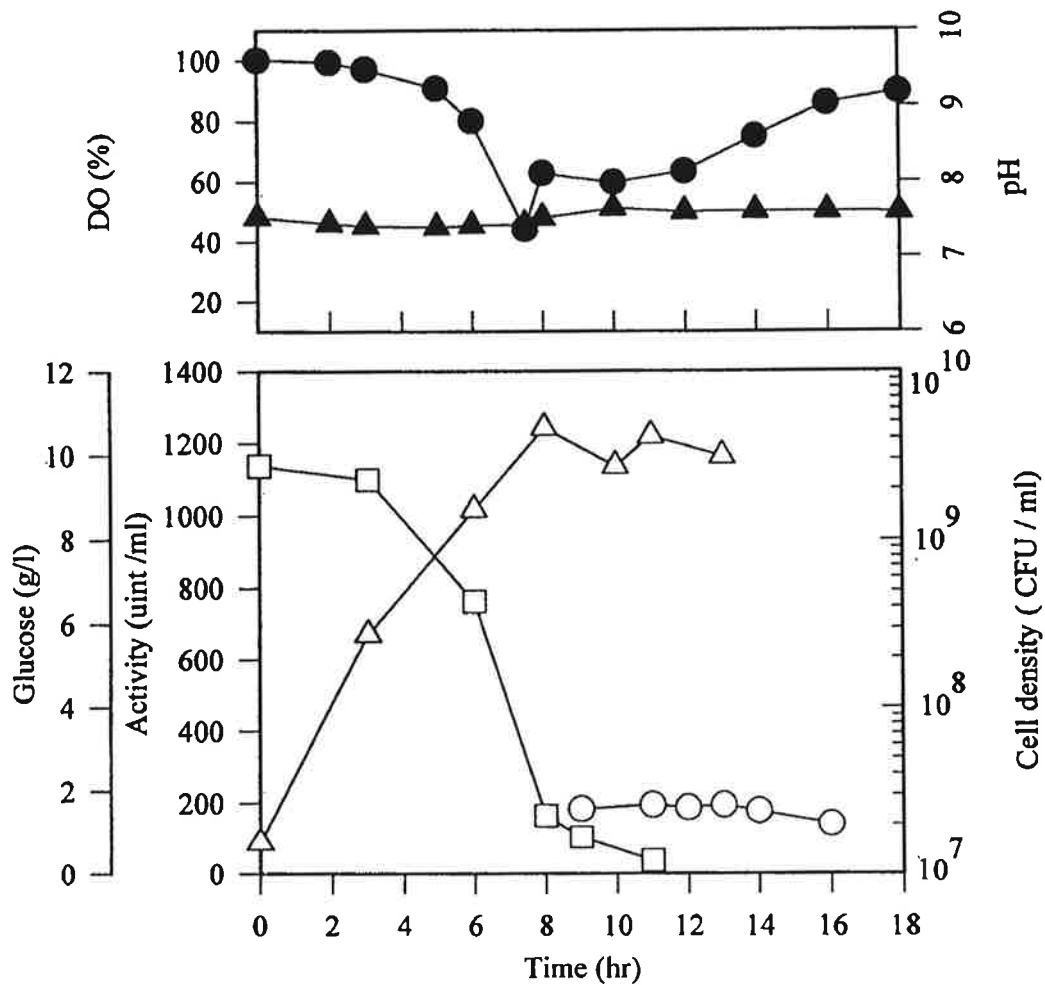


Fig. 25. Time course profiles of cell growth( $\Delta$ ), enzyme activity( $\circ$ ), glucose concentration( $\square$ ), pH( $\blacktriangle$ ), and DO( $\bullet$ ) at pH 7.5.

## 라. 온도의 영향

배양 온도에 따른 영향을 살펴보기 위하여 25℃, 30℃, 34℃, 37℃, 40℃에서 조사하였다(Fig. 26, 27, 28, 29, 30). 공기 공급 유량은 1.4 vvm, 교반 속도 800 rpm으로 하였으며 pH는 초기에 7.5로 시작하여 최저 6.4 최고 7.8의 범위에서 제어하였다.

세포 성장은 lag phase 없이 바로 시작되었으나 지수 성장기간은 약 5시간에서 13시간까지 다양하였다. 온도가 낮을수록 비성장속도가 낮았고 반면 지수 성장 기간은 길게 나타났다. 그러나 최종 CFU는 온도에 관계 없이 거의 일정하였다.

배양중 pH와 DO의 변화를 전반적으로 살펴보면 배지 농도의 영향에서와 같이 세포가 지수적으로 증가할 때는 pH와 DO가 급격히 감소하다 정지기에 접어들면서 급증하고 이후에 완만히 증가하는 경향을 보였다. 그러나 최저 DO값은 온도가 낮을 수록 증가하는 경향을 보였다. 이는 온도 감소에 따른 산소 용해도의 증가와 낮은 온도에서 산소 소모 속도의 감소에 기인한 것으로 생각된다.

효소 생산은 앞선 실험에서와 같이 지수 성장이 끝난 직후 시작되었다. 온도가 낮을수록 성장 속도가 늦고 효소 생산 시간도 늦어졌지만 최고 활성은 증가되는 경향을 보였다. 즉 25℃의 경우 최대 효소 활성은 37℃에 비해 약 30% 증가되었다.

온도 실험의 결과에서 특히 주목되는 것은 효소 활성의 deactivation에 대한 영향이다. 온도가 높을수록 효소의 활성이 최대에 도달한 후 급격히 감소하고 반대로 낮은 온도에서는 비교적 장시간 높은 효소 활성이 유지되었다. 예를 들어 37℃에서는 효소 활성이 배양 시작 10시간만에 최대값에 도달한 후 2~3시간만에 50%이상이 소실된 반면, 25℃의 경우 배양 시작 20시간에 최대값에 도달한 후 약 15시간 경과후까지 최대 활성의



55% 이상이 유지되었다. 효소가 deactivation되는 원인은 온도에 의한 thermal degradation, 혈전분해효소 자신에 의한 self-degradation, 그리고 발효 후반 생성된다고 알려진 alkaline-protease에 의한 분해 등을 들 수 있다. 향후 추가적인 실험을 통해 효소활성 감소의 원인을 규명한다면 효소 생산 증대를 위한 좋은 자료가 될 것이다.

#### 마. Aeration의 영향

Fig. 31과 32는 교반 속도와 공기 공급량의 영향을 보여준다. 온도는 37°C로 고정하였고 pH는 초기 9에서 시작하여 조절하지 않았다. 550 rpm, 1.2 vvm의 조건으로 발효한 경우(Fig. 31) 발효 시작 약 8 시간만에 DO가 거의 0에 도달하였고 이에 따라 최대 효소 활성도 약 820 unit/ml로 나타났다. 반면 650 rpm, 1.5 vvm의 경우(Fig. 32) 발효가 전반적으로 다소 빨리 진행되었고 DO도 30%이상으로 유지되었으며 최대 효소 활성도 약 1100 unit/ml로 전자에 비해 30%이상 높았다. 이 실험 결과는 플라스크에서 working volume과 교반 속도의 영향을 조사한 결과와 일치하는 것으로 *Bacillus subtilis* BK-17균주로부터 혈전용해효소를 생산하는데 있어 충분한 산소 공급이 필수적이라는 것을 알려 준다.

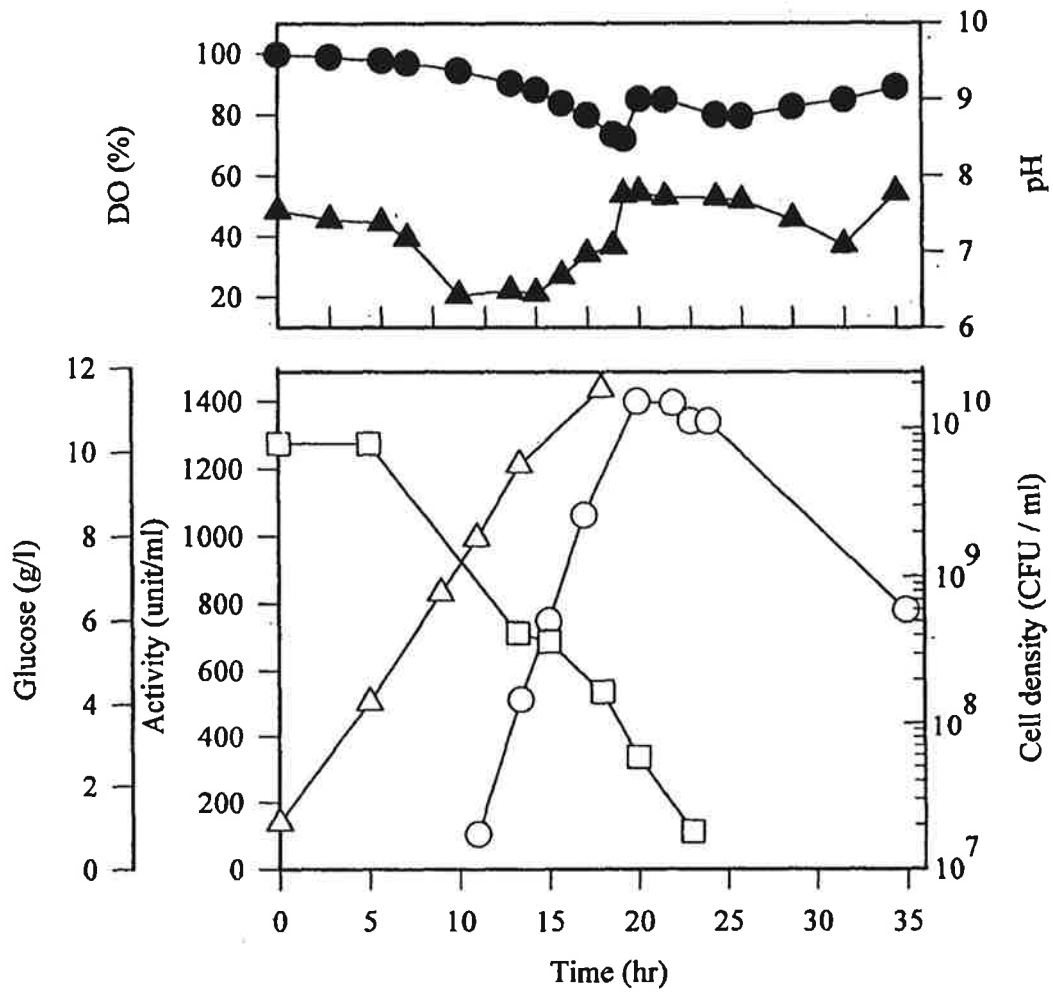


Fig. 26. Time course profiles of cell growth( $\Delta$ ), enzyme activity( $\circ$ ), glucose concentration( $\square$ ), pH( $\blacktriangle$ ), and DO( $\bullet$ ) at 25°C.

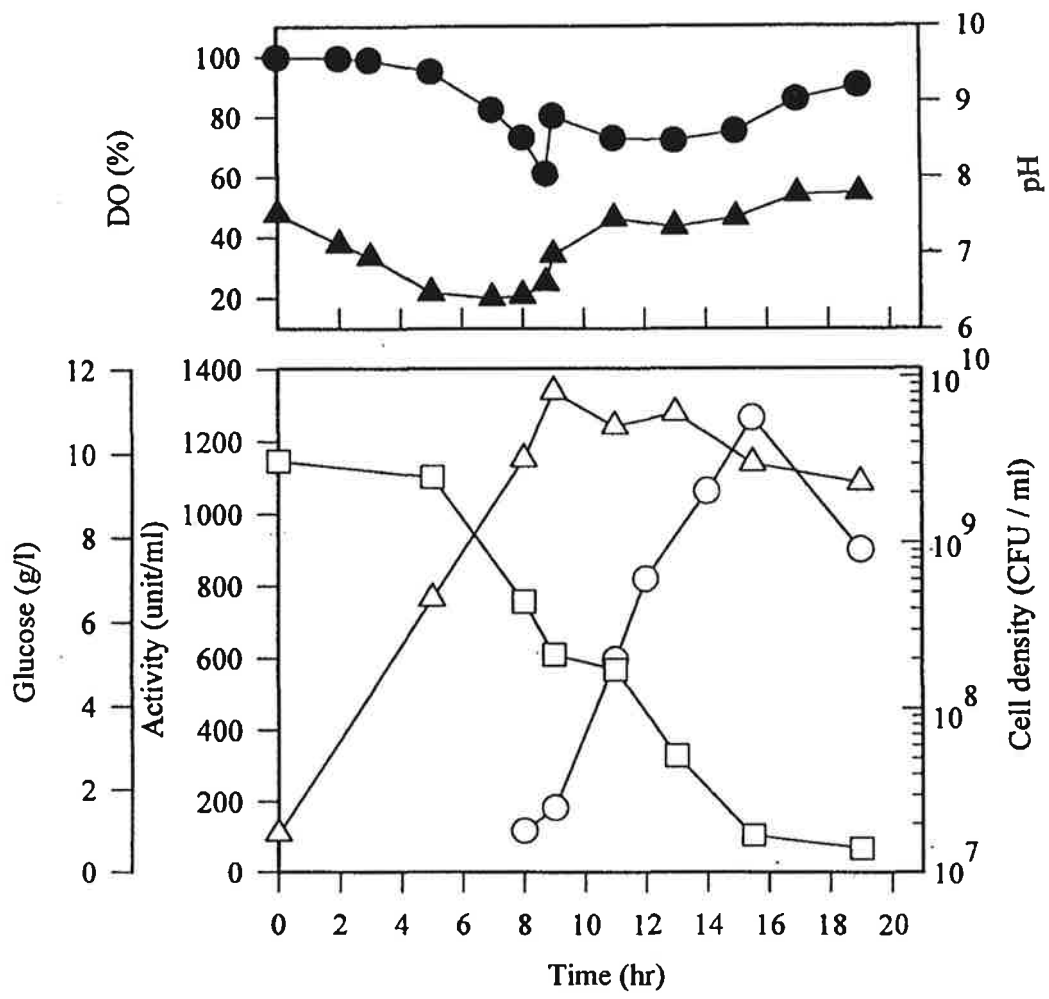


Fig. 27. Time course profiles of cell growth( $\Delta$ ), enzyme activity( $\circ$ ), glucose concentration( $\square$ ), pH( $\blacktriangle$ ), and DO( $\bullet$ ) at 30°C.

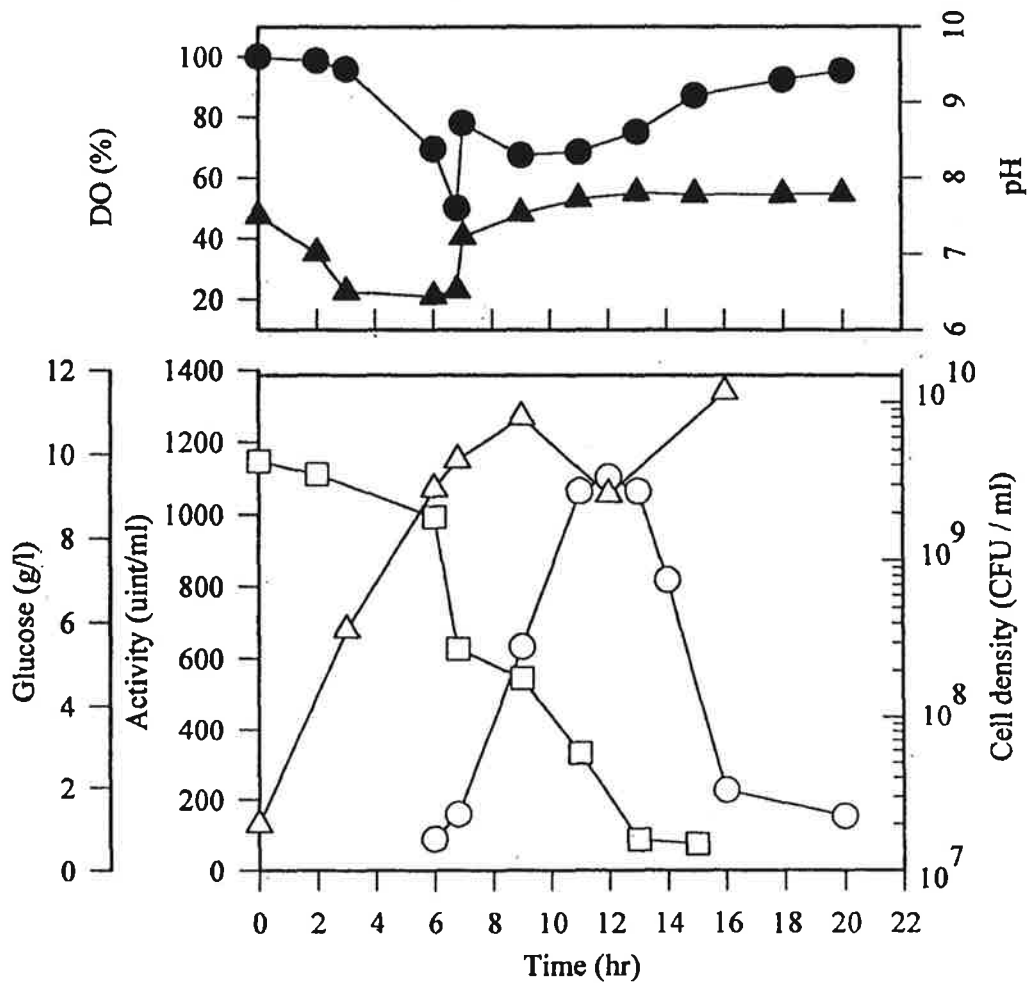


Fig. 28. Time course profiles of cell growth( $\Delta$ ), enzyme activity( $\circ$ ), glucose concentration( $\square$ ), pH( $\blacktriangle$ ), and DO( $\bullet$ ) at 34°C.

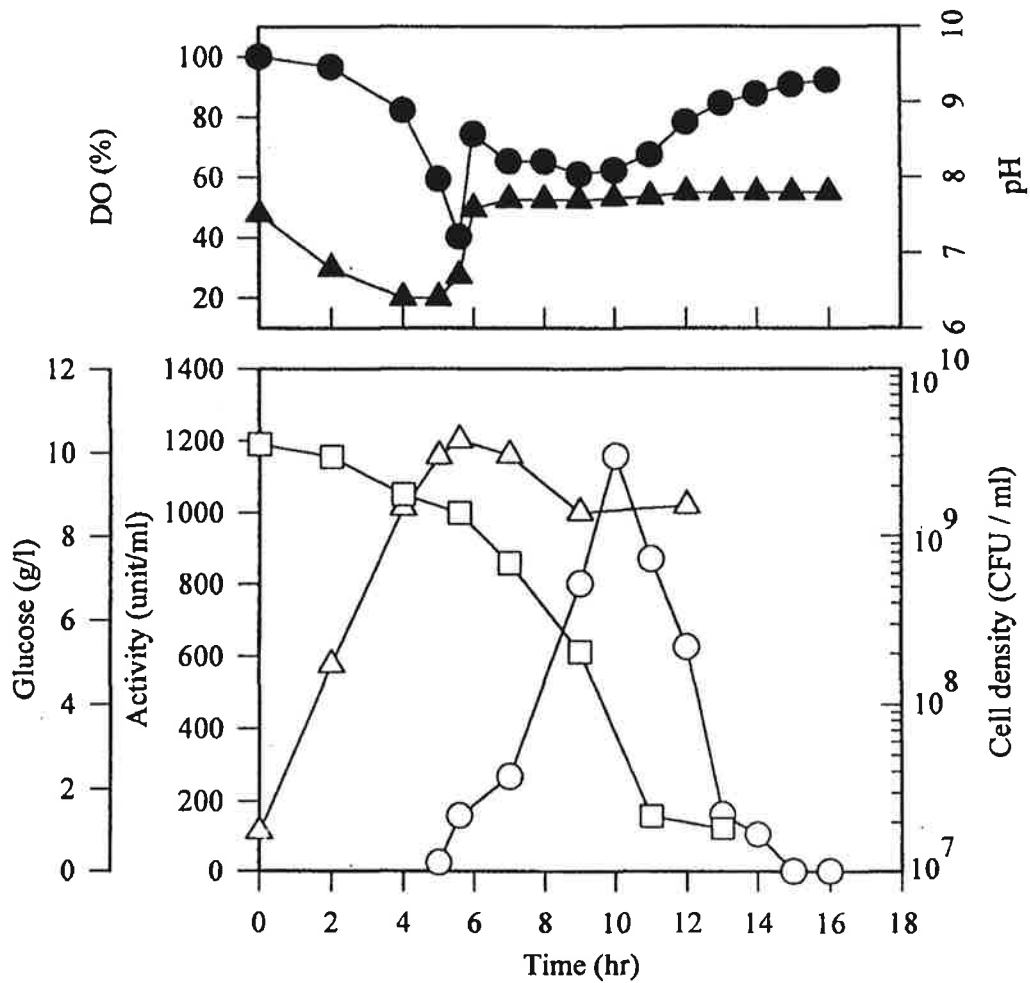


Fig. 29. Time course profiles of cell growth( $\Delta$ ), enzyme activity( $\circ$ ), glucose concentration( $\square$ ), pH( $\blacktriangle$ ), and DO( $\bullet$ ) at 37°C.

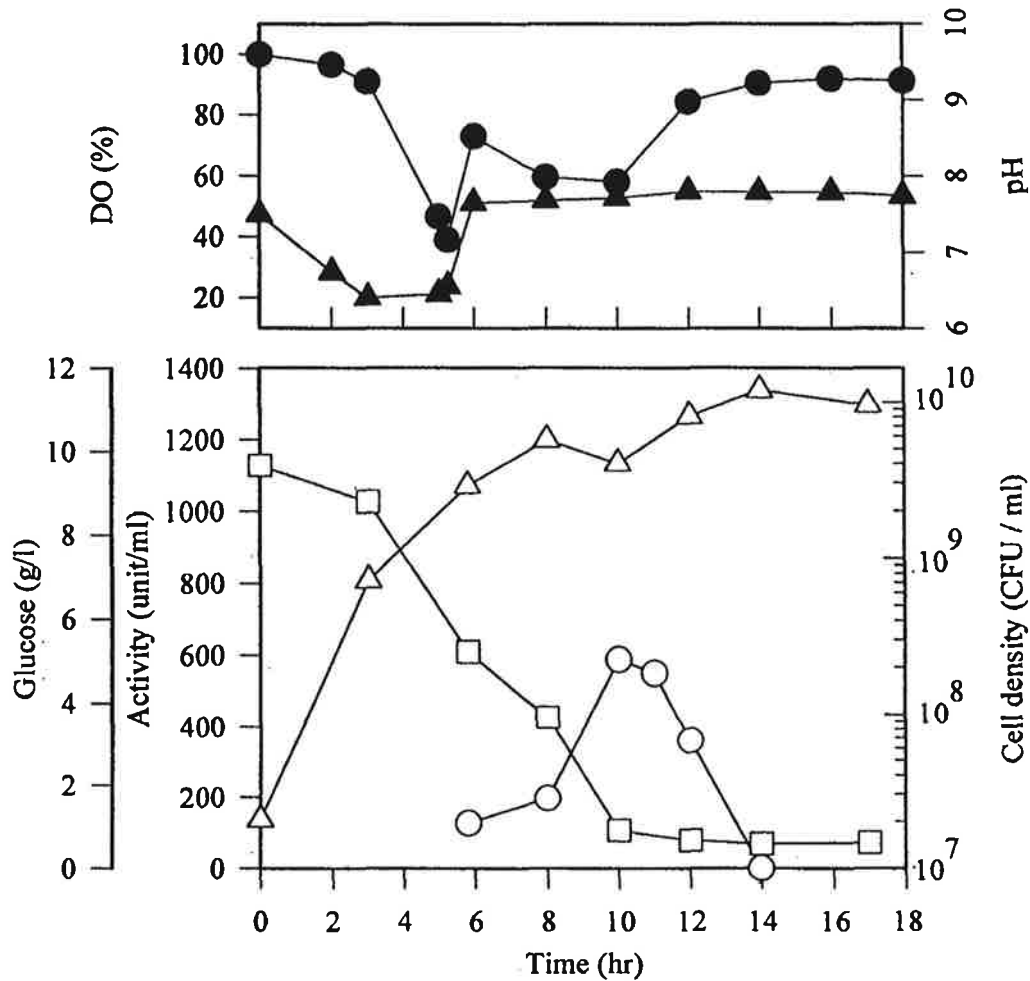


Fig. 30. Time course profiles of cell growth( $\Delta$ ), enzyme activity( $\circ$ ), glucose concentration( $\square$ ), pH( $\blacktriangle$ ), and DO( $\bullet$ ) at 40°C.

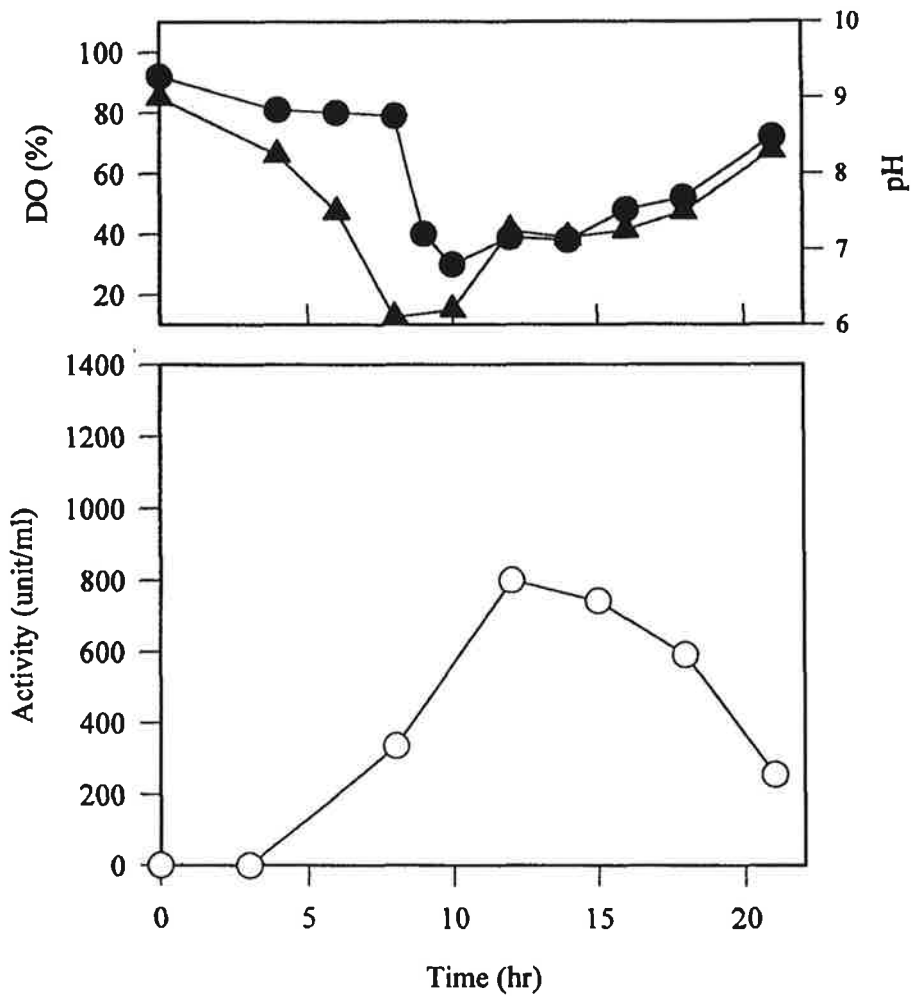


Fig. 31. Time course profile of enzyme activity( $\circ$ ), pH( $\blacktriangle$ ); and DO( $\bullet$ ) in the condition of 550rpm and 1.2vvm.

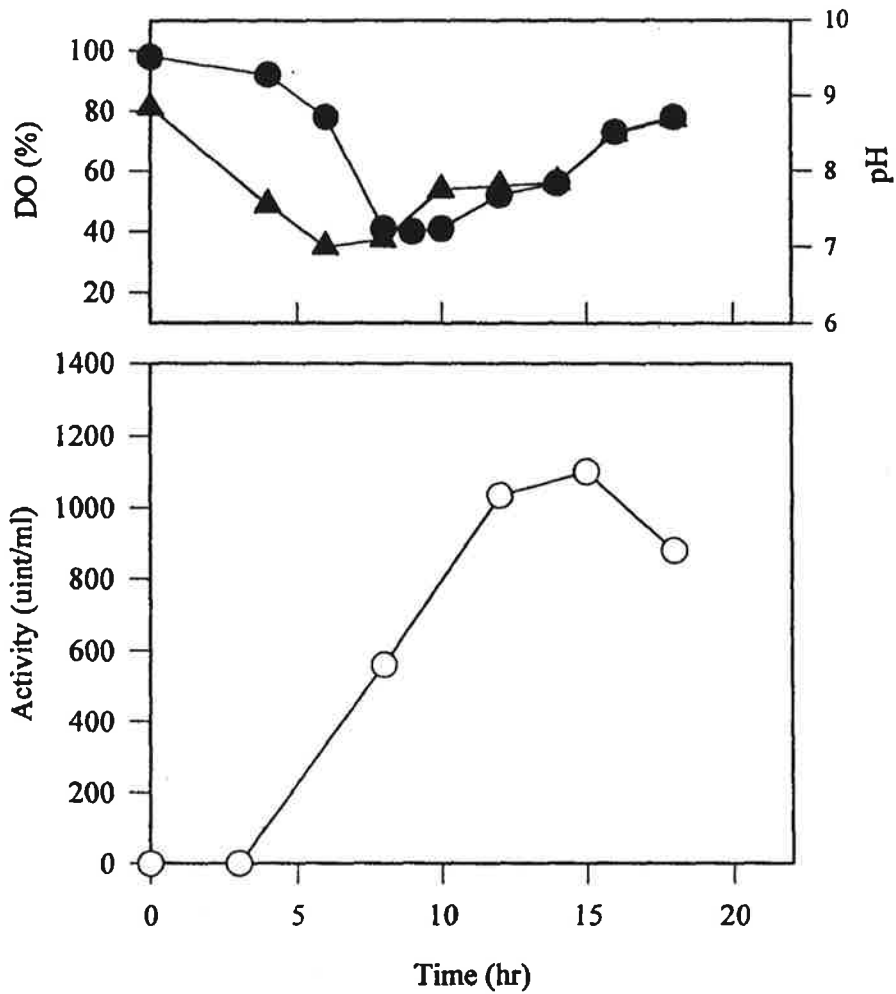


Fig.32. Time course profile of enzyme activity(○ ), pH(▲ ), and DO(● ) in the condition of 650rpm and 1.5vvm.



## 제 3장 효소정제 및 특성 분야

### 제 1절 서설

세포 배양액을 원심분리하여 침전물을 50%, 70%의 ethanol에 침전시킨 후, 침전물을 회수하여 DEAE-sepharose A-50 이온교환수지에 흡착, 0.2 M 의 NaCl로서 용출한 활성분획을 모아 Sephadex G-200과 Sepharose 6B 의 gel 여과를 하여 순수한 물질을 얻을 수 있었다. 그러나 식품으로 사용하는 경우 효소를 완벽하게 정제하지 않아도 좋으므로 정제과정을 단축하여 경제성을 높이고 효율성을 극대화하였다. 또한 생물반응기를 이용하여 대량생산된 발효액으로부터의 대량정제 방법을 확립하고자 하였다. 분리정제된 단백질의 보존 안정성을 조사하였고, 쥐를 이용한 동물 실험을 통하여 생체내의 효소능을 확인하였다.

### 제 2절 재료 및 방법

#### 1. EtOH precipitation

BuOH를 사용하여 배양액을 감압 evaporation으로 농축하였다. 농축한 조효소액을 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 투석하여 EtOH로 55-75% 분별 침전한 다음 원심분리(12,000 rpm, 20 분)하여 침전물을 수거하여 상기 buffer에 녹인 다음 투석하고 활성을 검정한 다음 정제단계에 사용하였다.

#### 2. DEAE-sephadex A-50 Column chromatography

20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 충분히 평형화한 후 DEAE-sephadex A-50 Column에 ethanol 침전한 효소액을 통과 시킨 다음 흡착부분의 단백질

질은 NaCl을 0~0.5 M 까지의 농도로 용출하여 각 fraction 별로 활성을 점검하였다. 또한, 비흡착 부분의 단백질로 활성을 검정하였다. 그 중 활성이 강하면서 비활성 단백질이 많이 제거된 분획을 택하였다.

### 3. Sephadex G-75 gel filtration

전단계에서 얻은 효소액을 20 mM tris-HCl buffer(pH 7.5)로 투석시킨 후 동결건조한 다음 sephadex G-75로 gel filtration을 행하였다. 시간당 4 ml 정도의 유속으로 한 fraction에 1 ml씩 분취하여 효소활성과 단백질을 측정하여 활성 분획을 취하였다.

### 4. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis에 의한 분자량의 측정

Leammli 등의 방법(23)에 따라 각기 0.1% SDS가 포함된 12.5% acrylamide 농도의 separating gel과 4% acrylamide 농도의 stacking gel을 사용하였다. 100 V에서 약 2 시간가량 전기영동을 한 후 gel을 coomassie 염색에 의해 단백질 band를 확인하였다. 분자량 측정을 위한 marker로는 Bio-rad사의 Low molecular weight standard를 사용하였다. 각각의 분자량은 lysozyme (14,400), soybean trypsin inhibitor(21,500), carbonic anhydrase(31,000), ovalbumin(45,000), bovine serum albumin(66,200), phosphorylase b(97,400)이었다.

### 5. N-terminal amino acid 배열

SDS-PAGE 후 polyacrylamide gel 상의 정제효소를 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane에 electroblotting에 의해 transfer한 후 5% acetic acid가 포함된 ponceau S 용액으로 염색한다. 그 염색된 부분을 절단하여 직접 N-terminal sequencing에 사용한다(24).

## 6. pH에 따른 영향

pH안정성의 측정은 정제 효소액의 pH를 각종 buffer로 4~10까지 조절된 다음 4℃에서 24 시간 방치한 후 잔존활성을 측정하였고, 최적 반응 pH는 각 pH별로 조절된 효소액을 사용하여 효소활성의 pH 의존성을 검토하였다.

## 7. 온도에 따른 영향

온도안정성은 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 투석한 효소액을 20~80℃까지 각각 30 분간 열처리한 후 잔존활성을 측정하였고, 최적반응온도는 각각의 온도로 조절된 incubator에서 동량, 동시간 기질과 효소반응을 반응한 후 활성을 측정하였다.

## 8. 금속이온 및 저해제의 영향

각종 금속이온 및 EDTA의 최종농도가 효소 반응시 1 mM이 되도록 효소액을 첨가한 다음 효소활성을 측정하여 활성유지에 대한 영향을 검토하였다 또한, 각종 저해제를 다양한 농도로 조정하여 정제효소와 혼합한 다음 4℃에서 30분간 방치한 다음 fibrin plate 상에서 효소반응을 행하였다. 멸균증류수로 희석한 효소액의 fibrin분해면적을 control로 하여 저해된 정도를 %별로 환산하여 나타내었다.

## 9. 기질특이성

본 정제효소를 여러 단백질을 기질로 한 plate상에서 반응시켜 분해양상을 점검하였다. 즉, fibrin, skimmilk, gelatin, casein을 기질로 한 plate상에서 정제효소를 동량, 동시간 반응하여 기질의 분해 정도를 상호 비교하였다.

#### 10. 합성 peptider 기질특이성

본 정제효소 50  $\mu$ l를 100  $\mu$ M의 peptide 기질이 함유된 0.01 M Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 첨가하여 total volume이 1 ml가 되게 한 다음 50°C에서 10 분동안 반응을 행하였다. 3 ml의 2% citric acid를 첨가하여 효소반응을 정지한 다음 spectrophotometer 405 nm에 para-nitroaniline의 생성량을 측정하였다. 기질특이성을 규명하기 위한 효소-기질 친화성을 결정은 측정된 흡광도의 수치를 각종 합성 peptide 분해의 표준곡선에 의하여 반응액 1 ml당 1분에 반응되는 기질을  $\mu$ M로 환산하여 정하였다.

#### 11. Urokinase와 specific activity 비교

정제된 urokinase와 본 효소를 정량한 다음 fibrin plate상에서 분해활성을 측정하였다. 이 값을 mg당 효소활성(I.U.)으로 환산하여 상호 비교하였다. Urokinase는 정맥주사제로 사용되고 있는 녹십자사의 제품을 사용하였다.

#### 12. 효소의 fibrin 분해양상에 따른 분류

Fibrin plate를 80°C에서 30 분간 열처리하여 plasminogen을 제거한 plate (plasminogen-free fibrin plate)와 열처리하지 않은 fibrin plate(plasminogen-rich fibrin plate)에 정제 효소액을 반응, 비교하였다(25).

#### 13. 동물실험에 의한 경구투여의 효과

시료 powder 3 g(2,000 IU에 해당)를 saline 3 ml에 섞어 경구투여 시료로 하였다. 동물은 생후 4주의 rat(평균체중 140 g) 16 마리를 실험에 사용하였다. 그중 1마리는 대조구로서 효소가 함유되지 않은 saline 3 ml을 경구투여 하였다. 그리고 0 시간에서 4 시간까지 1 시간마다 실험하되 3 마리의 rat을 사용하여 그 평균값을 구하였으며, 0 시간의 군은 상기의 시료를 먹이지 마

자 곧 rat의 심장을 통하여 채혈하였다. 채혈한 후 곧 3.8%의 sodium citrate를 가하여 원심분리(3,000 rpm, 30 min, 4℃)하여 상등액 1 ml을 취하여 이 상등액에 10mM acetic acid buffer(pH 5.3) 19 ml을 가하면 침전물이 생성되는데 원심분리(12,000 rpm, 20 min, 4℃)에 의해 침전물을 회수하였다. 이 침전물을 0.01 M phosphate buffer(pH 7.0)에 녹여 euglobulin으로 사용하였다. 대조구군의 혈액과 시료는 각각 100  $\mu$ l를 fibrin plate에 투여하여 반응시킨 후 분해 정도를 측정하였다(26).

### 제 3절 결과 및 고찰

#### 1. Fibrinolytic enzyme의 정제

본 효소의 각 정제단계의 개요는 Table 2에 나타내었다. 배양액을 EtOH 55~75% 분별침전할 때 가장 효과적이었으며, 이 침전물을 투석 후 DEAE A-50 Chromatography하였을 때 조효소액의 pass에 의해서 139배 정도의 정제효과를 볼 수 있었다. 최종적으로 sephadex G-75 gel filtration을 수행하여 정제하였으며, 이때 900배 이상의 정제 효과를 볼 수 있었다(Fig. 33).

#### 2. 분자량

본 정제효소는 SDS-PAGE 상에서 단일 band를 확인할 수 있었고, 이를 Bio-Rad사의 low molecular weight standard를 함께 영동하여 Rf치를 구하여 표준 곡선에 의한 분자량을 측정하였다. 그 결과 정제효소의 분자량은 Fig. 34에서 보는 바와 같이 31,000이었다.

### 3. N-terminal amino acid sequence의 결정

N-terminal 아미노산 서열은 기존의 protease들과 유사한 곳이 많았으나 지금까지 보고된 *Bacillus subtilis* 유래의 protease에도 본 정제 효소와 같은 것이 없었으므로 신규 효소일 가능성을 시사하였다. 특히 Nattokinase와 동일한 구조로 밝혀진 Subtilisin NAT와는 여덟번째 아미노산만이 상이한 것으로 밝혀졌다(Table 3).

Table 2. Summary on purification of fibrinolytic enzyme from strain BK-17.

Purification Step	Total protein (mg)	Total activity (I.U)	Specific activity (I.U/mg)	Fold	Yield (%)
Culture broth	5099.0	345000	68	1	100
EtOH precipitation	477.5	300400	630	9.3	87
DEAE A-50 chromatography	30.5	289000	9475	139	83
Spadex G-75 gel filtration	1.58	9980	63165	929	29

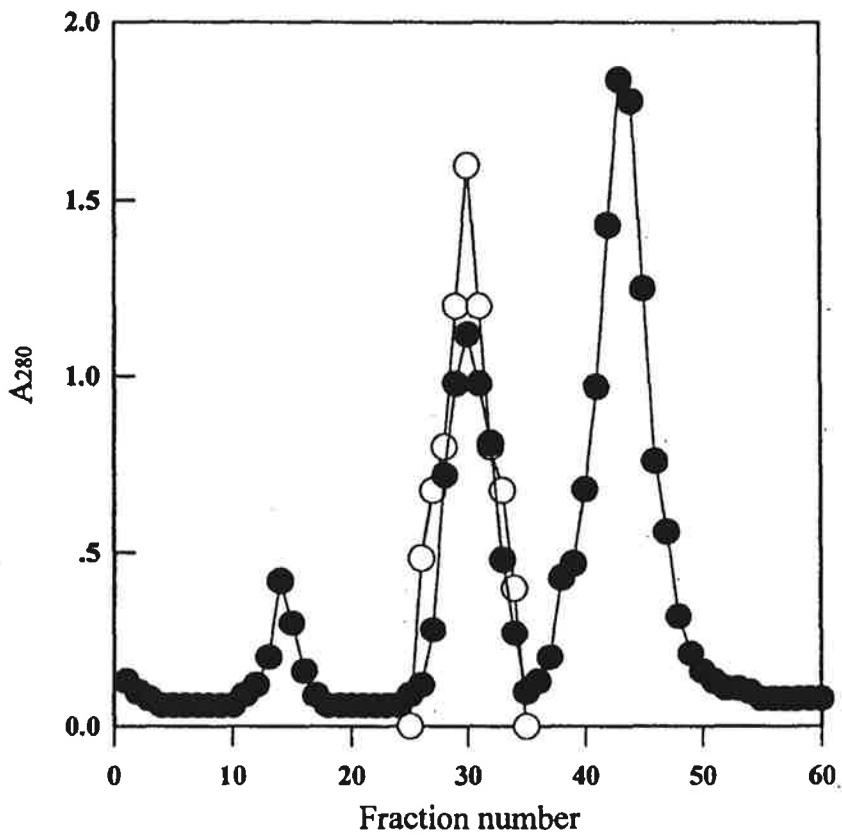


Fig. 33. Gel filtration profile of BK-17 on sephadex G-75:  
 —●— , A<sub>280</sub>; —○— , fibrinolytic activity(cm<sup>2</sup>).



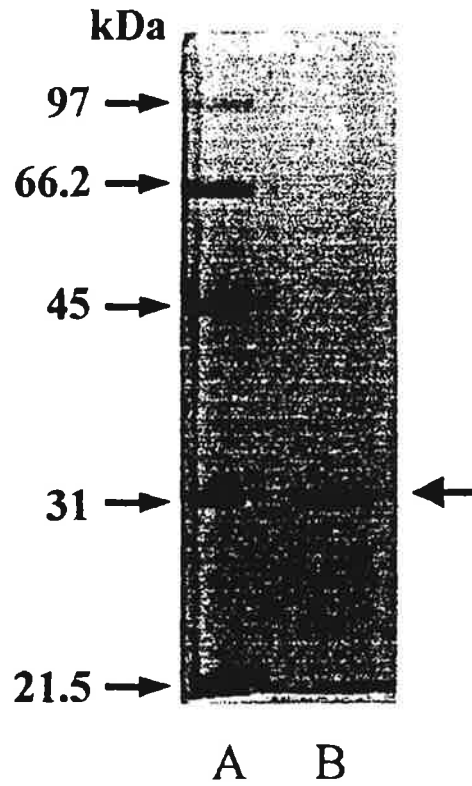


Fig. 34. SDS-PAGE of purified fibrinolytic enzyme BK-17  
 A : Marker protein  
 B : Purified BK-17

Table 3. Comparison of N-terminal amino acid sequences of various subtilisins

Protease	N-terminal amino acid sequence	
	+1	+15
Subtilisin Carlsberg	A Q T V P Y G I P L I	V A A V
Subtilisin DY	A G T V P Y G I P L I	V A A V
Subtilisin Amylosa	A G S V P Y G I S G I	V A P A
Subtilisin BPN'	A G S V P Y G V S G I	V A P A
Subtilisin NAT	A Q S V P Y G I S Q I	K A P A
Apr A	A G S V P Y G V S G I	V A P A
NS-15-4	A Q S V P Y G I S Q I	K A P A
E	A Q S V P Y G I S Q I	K A P A
BK-17	A Q S V P Y G V S Q I	K A P

#### 4. pH와 온도의 영향

본 정제효소는 pH 6.0~9.0 범위에서 거의 80%의 활성을 유지하였고 특히 pH 7.0과 8.0에서는 100%의 안정성을 나타내었다. 그리고 최적반응 pH는 7.0과 8.0에서로 나타났다(Fig. 35). 본 정제효소의 온도 안정성은 20℃에서 50℃까지 약 100%정도 유지되었으나 60℃에서는 약 30%정도, 그 이상의 온도에서는 거의 활성이 저해되는 것을 보였다. 그리고 본 효소의 최적 반응온도는 50℃임을 알 수 있었다(Fig. 36)

#### 5. 금속이온과 EDTA의 영향

정제 효소에 대한 최종농도가 1 mM이 되게 첨가하여 EDTA와 2가 금속 양이온의 효과에 대하여 검토하였다. 그 결과 대부분의 금속이온에 대해서는 결정적인 저해나 활성화의 양상은 보이지 않았으나  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ 는 약간 활성 저해가 나타났다(Table 4).

#### 7. 저해제의 영향

각종 protease 저해제에 대한 실험 결과를 Table 5에서 나타내었다. Mercuric chloride만이 본 효소를 1 mM에서 41%정도 저해했으며 5 mM에서는 완전히 저해하였으나 그외의 저해제는 뚜렷이 저해하는 효과를 보이지 않았다. 그리고 chymotrypsin의 저해제인 chymostatin은 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 낮은 농도에서도 50%의 저해 효과를 보였으며 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 완전히 저해하는 결과를 나타내었다.

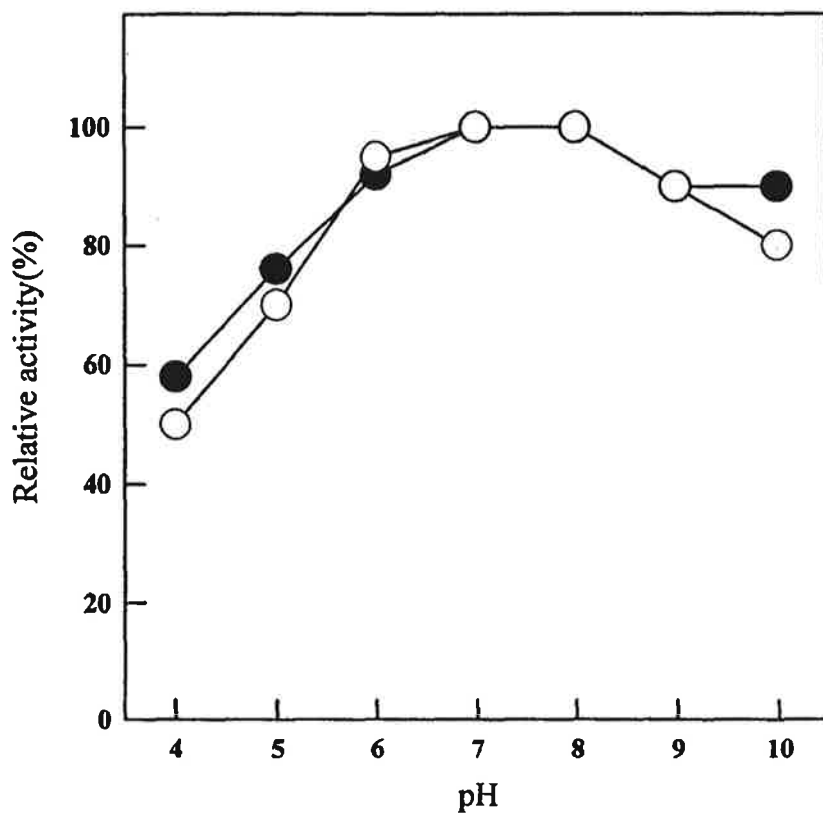


Fig. 35. pH stability and optimal pH of the purified fibrinolytic enzyme BK-17. Buffers used were citrate(0.05 M, pH 4), sodium acetate(0.05 M, pH 5), tris-HCl(0.05 M, pH8-9), and glycine-NaOH(0.05 M, pH 10):—●—, pH stability; —○—, optimal pH.

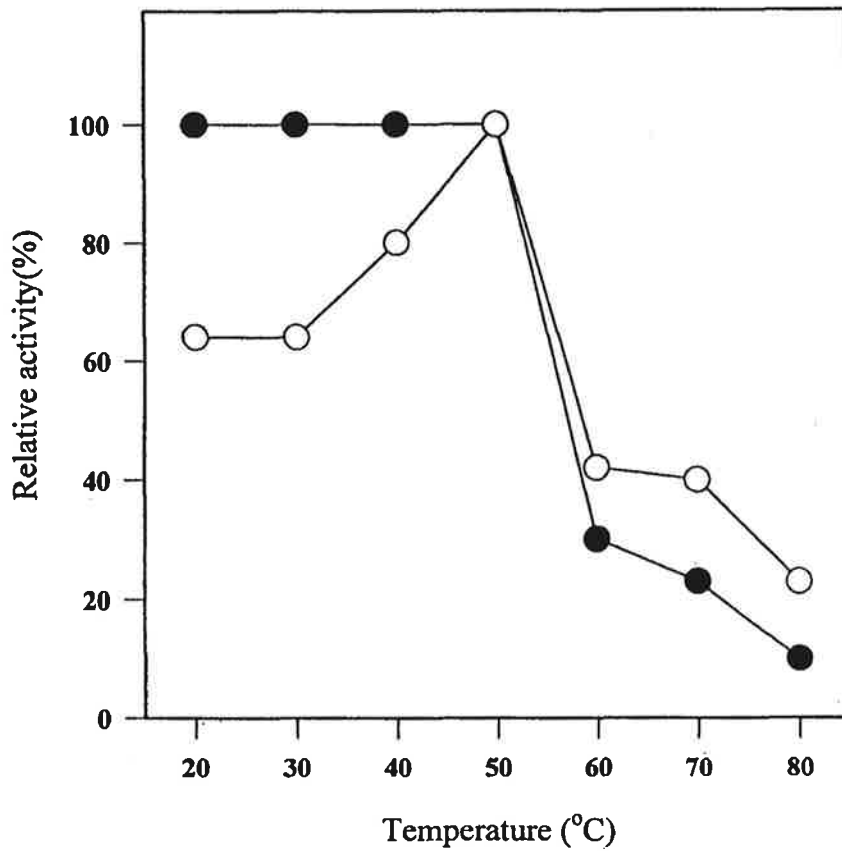


Fig. 36. Temperature stability and optimal temperature of the purified fibrinolytic enzyme BK-17:

- , temperature stability;
- , optimal temperature.

Table 4. Effect of various metal ions on the activity of the purified fibrinolytic enzyme BK-17.

Metal ions	Concentration(mM)	Relative activity(%)
Control	0	100
Ca <sup>2+</sup>	1	77
Co <sup>2+</sup>	1	95
Cu <sup>2+</sup>	1	82
Fe <sup>2+</sup>	1	77
Mg <sup>2+</sup>	1	100
Mn <sup>2+</sup>	1	100
Zn <sup>2+</sup>	1	65
EDTA	1	100

Table 5. Effect of various protease inhibitors on BK-17.

Inhibitor	Inhibition(%) <sup>1</sup>
<b>DFP</b> (Diisopropyl-fluorophosphate)	0
<b>TLCK</b> (Tosyllysine chloromethyl-ketone)	0
<b>PMSF</b> (Phenylmethane sulphonyl fluoride)	0
<b>ε-ACA</b> (ε-Aminocaproic acid)	0
<b>t-AMCHA</b> (t-4-aminomethyl-cyclohexanecarboxyl acid)	0
<b>TAME</b> (ρ-Tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride)	5

Inhibitor	Inhibition(%) <sup>2</sup>
<b>Aprotin</b>	0
<b>SBTI</b> (Soybean trypsin inhibitor)	0
<b>Chymostatin</b>	100
<b>Leupeptin</b>	0
<b>Antipain</b>	0
<b>t-ESLB</b> (t-Eoxysuccinyl-L-leucyl amino-4-glutaminobutane)	0

1. Concentration was 1mM
2. Concentration was 0.1mg/ml

## 8. 기질특이성

본 정제효소가 기질인 fibrin 외에 다른 기질(skimmilk, gelatin, blood agar)에 대하여 분해의 정도를 검토하였다. 그 결과 skimmilk와 gelatin에는 매우 약간의 활성을 보였으나 fibrin에 비교할 정도가 되지 못할 만큼 약한 분해 양상을 보였다. 그리고 blood agar plate에서는 전혀 분해활성을 나타내지 않았다. 이로서 본 정제효소는 비교적 fibrin에 대해 강한 특이성이 있다는 것을 알 수 있었다(Fig. 37).

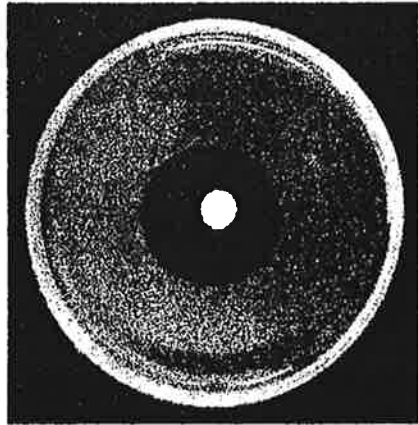
## 9. 합성peptide기질에 대한 특이성

본 정제효소의 합성 peptide기질에 대한 특이성을 살펴본 결과는 Table 6과 같이 plasmin기질인 S-2251에 가장 친화성이 좋았으며 이때의 값을 100%로 볼 때 thrombin기질에 대해서는 11%, kallikrein기질에 대해서는 47%, serin protease기질에 대해서는 50%의 분해정도를 보였고, urokinase기질에 대해서는 전혀 분해하지 못하였다.

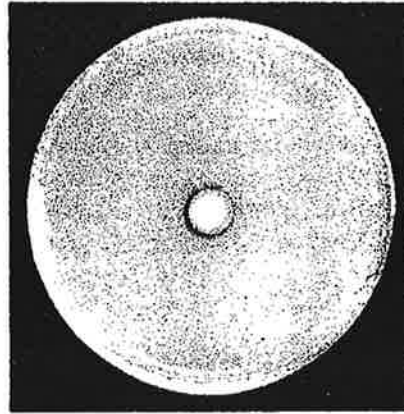
## 10. Urokinase와 specific acitivity의 비교

본 정제효소 urokinase에 대해 mg당 효소활성을 비교한 결과 Table 7에서 보이는 바와 같이 urokiase에 비해 약 20배 정도의 specific activity를 보였다 이으로써 *in vitro*상에서 본 정제효소가 urokinase보다 fibrin분해에 대한 친화력이 더 높은 것을 알 수 있었다.

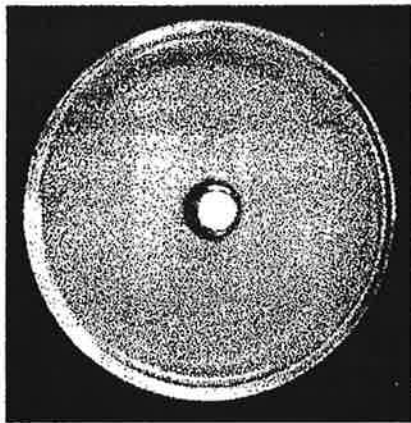




A



B



C



D

A : Fibrin plate

B : Skim milk plate

C : Gelatin

D : Blood agar plate

Fig. 37. Comparison of fibrinolytic activity on various substrates

Table 6. Comparison of specificity of BK-17 with AI, CK, and Nattokinase with chromogenic synthetic substrate.

Substrate	Enzyme activity		
	BK (nmol/min/ml)	Nattokinase (nmol/min/ml)	CK ( $\mu$ mol/min/ml)
H-D-Val-Leu-Lys-pNA	90(100)	68.5(100)	424.3(100)
Bz-DL-Arg-pNA	ND	18.0(25.3)	0(0)
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	9.9(11)	14.0(20.4)	21.7(5.1)
H-D-Val-Leu-Arg-pNA	42.30(47)	13.5(19.7)	16.9(4.0)
pyro-Glu-Gly-Arg-pNA	0(0)	0(0)	0(0)
H-D-He-Pro-Arg-pNA	45(50)	ND	ND

- ※ H-D-Val-Leu-Lys-pNA(S-2251) : Synthetic substrate for plasmin  
 Bz-DL-Arg-pNA(S-2238) : Synthetic substrate for trypsin  
 H-D-Phe-Pip-Arg-pNA(S-2266) : Synthetic substrate for thrombin  
 pyro-Glu-Gly-Arg-pNA(S-2444) : Synthetic substrate for urokinase  
 H-D-He-Pro-Arg-pNA(S-2288) : Synthetic substrate for serin protease

Table 7. Comparison of the fibrinolytic activity with urokinase.

Enzyme	Spesipic acrivity (K IU/mg)
UK	1.5
BK	30.1

## 11. 효소의 Fibrin 분해양상에 따른 분류

혈전용해효소는 fibrin을 분해하는 양상에 따라 두 가지로 나눌 수 있다. 그 하나는 혈액 중 plasminogen을 active type인 plasmin으로 변화시켜 plasmin으로 하여금 fibrin을 분해하도록 하는 plasminogen activator type과 이와 무관하게 효소자체가 직접 혈전을 분해하는 direct active type이 있다. 이에 본 효소의 분해기작을 확인하기 위하여 plasminogen-rich fibrin plate와 plasminogen-free plate를 사용하였다. Fig. 38에서 보는 바와 같이 본 정제 효소는 plasminogen을 제거한 plasminogen-free plate에서도 plasminogen-rich fibrin plate와 마찬가지로 활성을 발현하는 결과를 보였다. 그러므로 본 효소는 fibrin을 직접 분해하는 direct active type으로 판단되었다.

## 12. 경구투여의 효과

실험방법에서 제시한 과정을 거쳐 경구투여 후 채혈한 rat군의 혈액으로부터 제작된 euglobin 100  $\mu$ l를 fibrin plate에 투여하여 반응시킨 후 fibrin의 분해정도를 대조구와 비교하였다. Fig 39에서 보는 바와 같이 경구투여 1 시간째부터 약하지만 혈전용해활성이 검출되기 시작하였다. 그 활성은 2 시간째부터 증가하다가 4 시간째에는 대조구와 같은 수준으로 활성이 떨어지는 결과를 보였다. 전체적으로 활성이 약하게 나타났으므로 투여량을 조절하는 등 방법을 달리하여 재실험을 해야 할 필요성이 있으나 혈액내에서 활성검출이 가능하므로 결국은 경구투여의 효과를 기대할 수 있다.

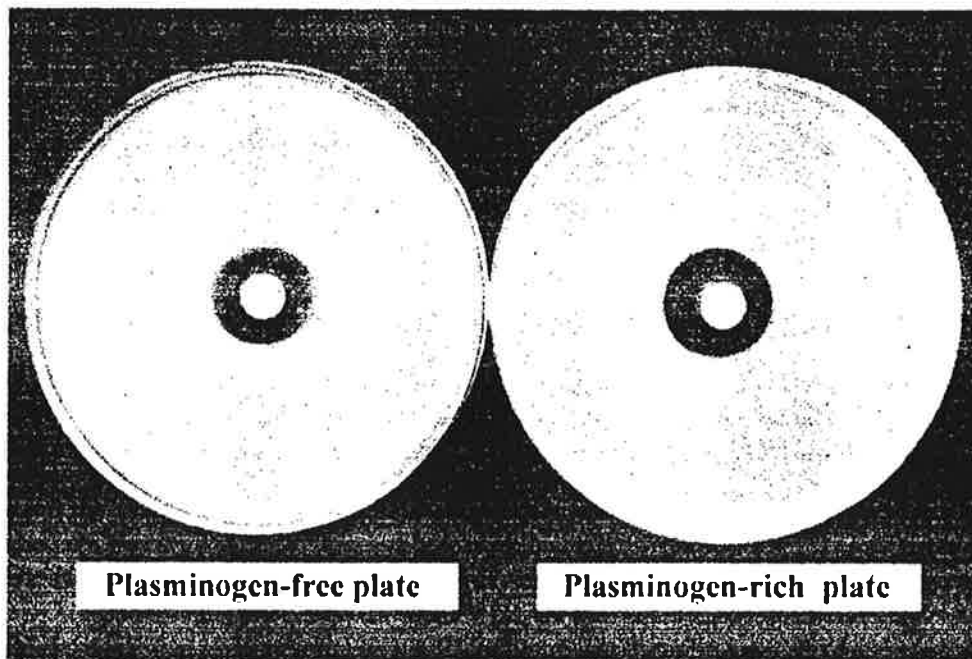


Fig. 38. Fibrinolytic activity of BK-17 in plasminogen-free and plasminogen-rich fibrin plates.

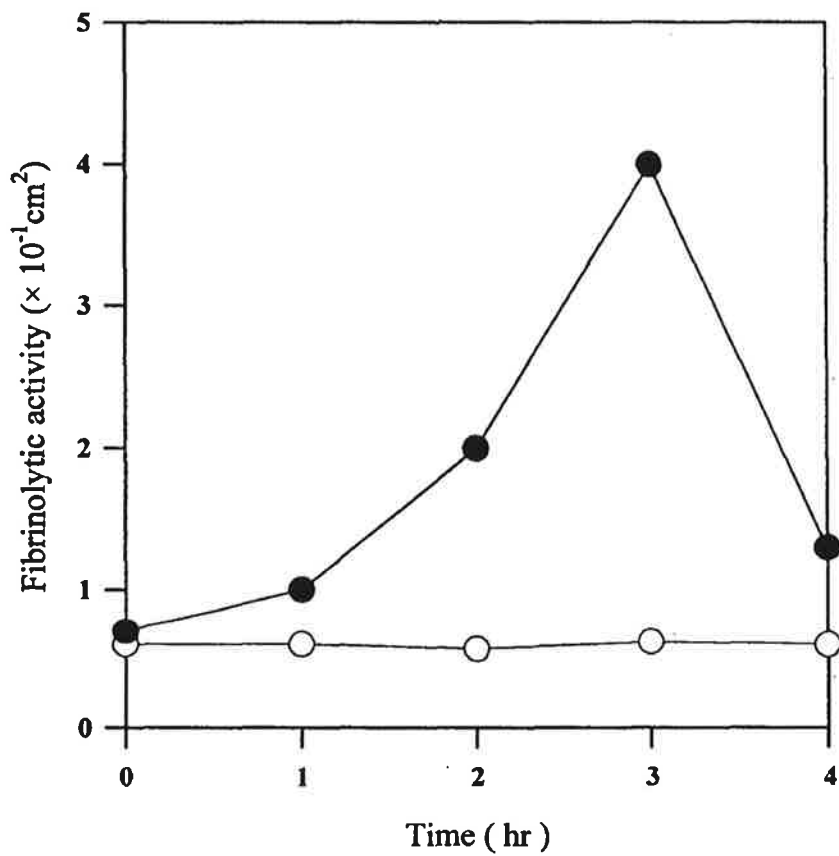


Fig. 39. Fibrinolytic activity in rats plasma following oral administration of BK-17:

—○— , control; —●— , after administration.

## 제 4장 식품형태개발 분야

### 제 1절 서설

대량 정제된 효소는 순수 정제하여 약제 및 식품 첨가제로 이용할 수 있지만 발효된 대두 자체를 섭취함으로써 기능성 식품으로 이용할 수 있다. 혈전용해효소가 어떠한 형태로 이용되든지 우리가 그것을 섭취할 때 혈전용해능을 가지고 있어야 한다. 따라서 식품으로 개발된 제품은 효소활성을 지속할 수 있어야 하며 누구나 선호할 수 있는 풍미를 가져야 한다. 이 장에서는 혈전용해제의 형태를 개발하였으며, 소비자가 모두 선호할 수 있는 제품이 되도록 풍미개선을 시도하였다.

### 제 2절 재료 및 방법

#### 1. 대두의 발효와 혈전용해효소활성 안정성

대두를 선별하여 깨끗이 세척하고 냉수에 16~18 시간 동안 충분히 침수시킨 후 100℃에서 약 1 시간동안 충분히 삶는다. 삶은 대두는 autoclave (120℃, 15 psi, 20 min)를 2회하여 식힌 다음 포자화된 균체를 대두 전체에 고루 섞어 접종한다. 37℃ 배양기에서 각 시간별로 배양하면서 효소 활성을 측정하여 가장 양호한 배양 시간을 택하여 발효한 다음 45℃로 조정된 dry oven에서 초기건조를 시킨후 다시 -70℃의 deep freezer에서 overnight동안 동결하여 freezing dryer로 완전히 건조시켜 homogenizer를 이용하여 powder로 만든 후 -20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

## 2. 발효대두 powder의 혈전용해효소활성 안정성 검사

최적조건으로 고체 배양한 시료를 동결 건조하여 잘 갈아서 분말로 만든 powder를 한쪽은 냉장실(4℃)에서 보관하고 다른 한쪽은 실온에서 보관하면서 약 70 일간 일정시기마다 fibrin plate method로서 각 시료의 활성을 비교하였다(27).

## 3. 발효대두의 영양학적 평가

일반 성분분석은 수분, 조단백질, 조지방, 회분, 탄수화물 등을 식품공전에 수록된 방법(28)에 따라 분석하였다. 아미노산 분석을 위하여 시료 5.84 g을 50 ml의 cap tube에 넣고 6 N HCl용액 20 ml를 가하여 녹인 후 밀봉하여 110℃에서 24 시간 가수분해 시켰다. 이를 50 ml의 원심관에 옮겨 2 N NaOH용액 2 ml를 넣고 중화한 다음 5,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취하여 60℃의 수욕상에서 질소가스를 통과시키면서 농축하고 잔류물을 0.02 N HCl 20 ml에 녹이고 이를 pore size 0.45 μm filter로 여과한 후 시료액으로 사용하였다. 정량은 아미노산 혼합 표준용액과 시료액을 각 20 ml씩 HPLC(Pharmacia Biotech model:Biochrom 20)에 주입하여 분석하였다. HPLC의 조건은 Table 8과 같다.

## 4. 대두발효 powder의 정형화

발효대두를 동결 건조하여 분말로 만든 다음 아래와 같은 조성으로 발효 대두를 시제품화하였다. 대두는 지방성분 때문에 대두자체로의 성형이 힘들고 견고하지 못해 부형제(Table 9)를 사용하였다. 시제품은 tablet과 capsule로 만들었다.



Table 8. HPLC conditions for the analysis of amino acids.

HPLC	Pharmacia Biotech model : Biochrom20
UV-detector	220nm
Mobil phase	0.2M lithium buffer(pH 2.8)
Column	Ultropac 8, Ø46×250nm
Reation coil temp.	135°C
Flow rate	20ml/hr
Loading volume	20 $\mu$ l

Table 9. Composition of a sample product made from fermented soybean powder.

Compund	Weight(g)
Fermented soybean powder	200
미결정 Cellulose	60
HPC(hydroxy propyl cellulose)	15
Vanilla	50
HPC M type	15
Stearinate magnesium	30

### 제 3절 결과 및 고찰

#### 1. 대두의 발효와 혈전용해효소활성 안정성

발효한 대두를 1차 45℃에서 건열 건조 시킨 후 동결건조하여 homogenizer로 powder화 하여 이것을 4℃조건에서의 냉장보관과 실온에서 보관 하면서 77 일간 혈전용해효소의 활성을 측정하였다. 그 결과 약간의 오차는 있었지만 77 일간 거의 동일한 수준으로 효소의 활성이 유지되었다. 이는 본 발효대두 powder를 제품화하였을 때 혈전용해능이 매우 안정하여 기능성 건강 보조 식품으로 개발할 때 제품의 안정성이 충분히 보장된다는 것을 보여 준다(Fig. 40).

#### 2. 기능성 식품개발을 위한 발효대두의 기초성분 조사

발효한 대두를 기능성 식품으로 개발할 수 있는지의 가능성을 타진하기 위하여 식품 및 영양학적 기초조사를 실시하였다. Table 10에서와 같이 고체 배양한 대두를 발효하지 않은 대두와 기초성분을 분석 비교한 결과 단백질과 지방에서 약 20%정도 성분증가 결과를 보였다. 또한 아미노산 분석 결과를 Table 11에서 보면 필수 아미노산이 약 40% 증가하였고 일반 아미노산도 약 30%의 증가를 보였다. 이는 대두를 발효할 경우 혈전용해효소를 생산함과 동시에 식품 및 영양학적 가치도 크게 증가하여 기능성 식품으로서의 개발 가능성이 있다는 것을 시사하는 결과라고 사료된다.

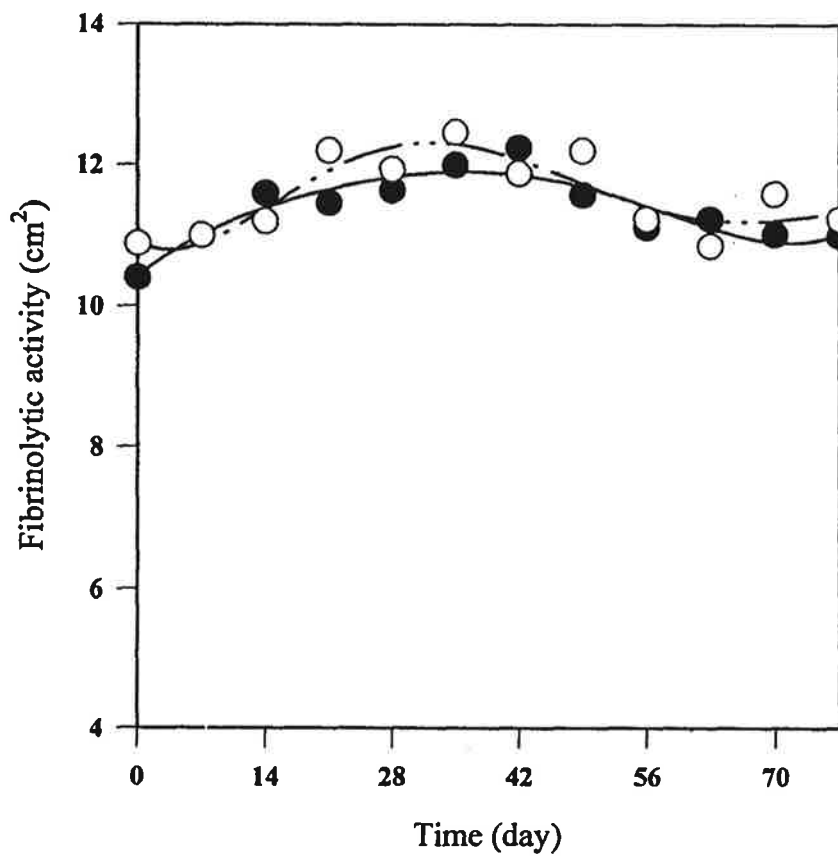


Fig. 40. Stability of fermented soybean powder:  
 ● ; room temp., ○ ; 4°C

Table 10. Nutritional compositions of fermented and non-fermented soybean.

	non-fermented (%)	fermented (%)
Water	7.46	7.29
Ash	4.86	4.94
Protein	46.15	55.73
Fat	17.85	21.80
Carbohydrate	23.68	10.24
Calorific value	442 cal	462 cal

Table 11. Analysis of amino acid contents of fermented and non-fermented soybean.

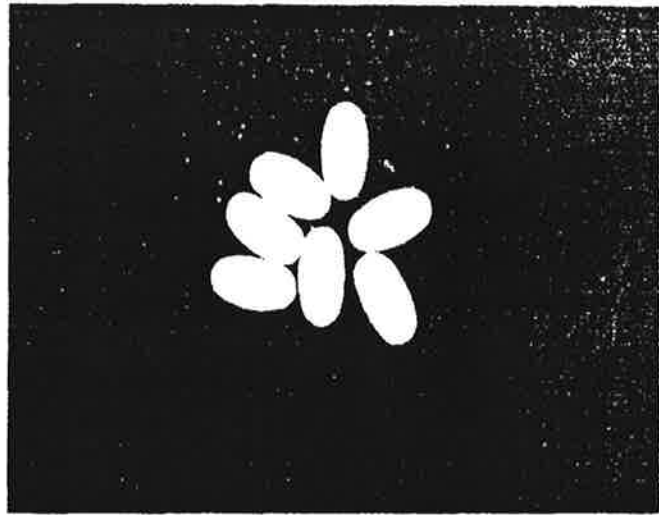
Amino acid	Non-fermented (g/100g)	Fermented(g/100g)
Essential		
Try	-	-
Lys	1.1	1.6
His	0.5	0.7
Arg	1.1	1.0
Val	0.8	1.2
Met	0.1	0.2
Ile	0.7	1.1
Leu	1.4	2.0
Phe	1.2	1.9
Total	6.9	9.7
Non-Essential		
Asp	2.1	2.7
Ser	1.0	1.0
Gln	3.4	5.1
Gly	0.8	0.9
Ala	0.8	1.3
Cys	0.4	0.8
Pro	0.5	0.6
	1.0	1.3
Total	10.0	12.7

### 3. 발효대두의 시제품화 검토.

안정성 검정 때와 동일한 방법으로 발효대두를 분말로 만든 후 일정량의 부형제를 첨가하여 시제품을 두 가지로 제조하여 보았다(Fig. 41). 하나는 약 0.8 g의 tablet형태이고 다른 하나는 약 0.25 g의 capsule형태였다. 발효대두 자체의 지방성분 때문에 고형화가 힘들어 부형제의 양이 전체의 46% 정도 혼합되었다. 부형제의 대부분은 결합제(미결정 cellulose, HPC, HPC M type)이며 스테아린 산 마그네슘은 활택제로서 정제의 표면을 매끄럽게 해주며 서로 접촉 시 붙지 않게 해 주는 역할을 한다. 그리고 본 시료의 정형화된 발효대두 powder 역시 fibrin plate method에 의한 활성 검정을 해 본 결과 정형하기 전의 시료와 거의 동등한 혈전용해효소활성을 유지하고 있음을 알 수 있었다.



(A)



(B)

A : capsule (250mg)

B : Tablet (800mg)

Fig. 41. Sample products made from fermented soybean powder

A : Capsule (250mg) B : Tablet (800mg)



## 제 5장 유전자 조작 분야

### 제 1절 서설

*Bacillus subtilis* BK-17 균주를 액체배양하여 염색체를 분리하고 *Hind*III로 분해하였다. 또 플라스미드 벡터 pUC19를 취하여 역시 *Hind*III로 분해하고 self ligation을 막기 위해 CIP처리를 하였다. 염색체 및 pUC19 분해물을 같이 섞고 T<sub>4</sub> ligase로 반응시킨 후 *E. coli* sure cell에 transform시켰다. 그리고 X-gal존재 하에 white colony를 선택, 혈전 용해 효소 활성 측정용 평판 배지에서 37℃, 12 시간 배양하여 혈전용해효소능을 갖는 균주를 분리하고자 하였다(Fig. 42).

### 제 2절 재료 및 방법

#### 1. Chromosomal DNA 분리

*Bacillus subtilis*로부터의 genomic DNA는 phenol-chloroform extraction 방법에 의해 분리하였다(29). 20 시간 배양된 culture broth(100 ml)를 centrifugation하여 얻은 pellet을 25%(w/v) sucrose solution(in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)으로 현탁하였다. 생성된 cleaned lysates를 proteinase K로 60℃에서 90 분간 처리한 후 phenol과 chloroform을 사용하여 단백질 및 효소를 불활성화시킨 후 원심분리하였다. DNA가 존재하는 aqueous solution을 취한 후 2배 부피의 cold ethanol을 첨가하여 chromosomal DNA를 분리하였다. 70%(v/v) ethanol로 washing한 후 DNase free panoreatic RNase (50 µg/ml)가 함유된 TE buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.0 containing 1 mM EDTA)에 녹였다. 보관은 -20℃에서 이루어졌다.

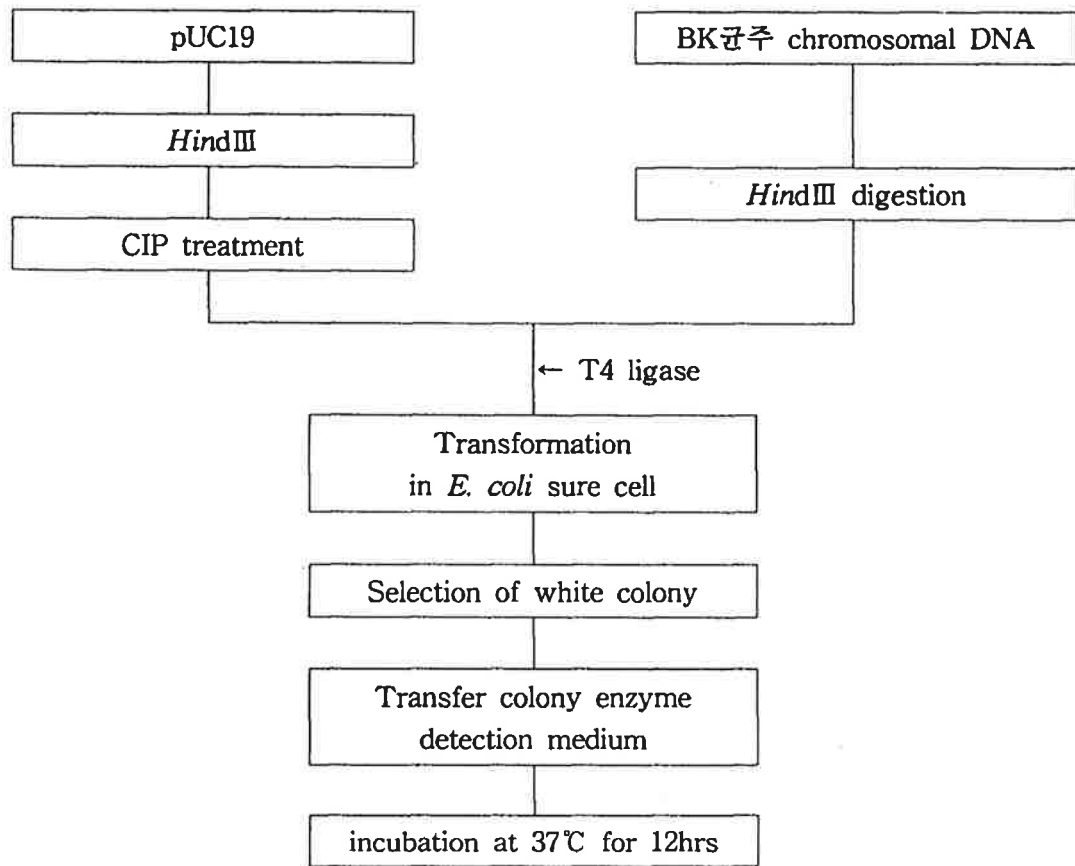


Fig. 42. Gene cloning procedure for BK-17

## 2. Plasmid 분리

Plasmid DNA는 Ish-Horowicz et al.의 변형된 방법을 사용하였다(30). *E. coli*(pUC19) strain은 100 ml의 L-broth에서 O.D.<sub>550</sub> 0.8이 될 때까지 배양하였다. 배양액을 centrifugation하여 pellet은 ice-cold STE(0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)에 현탁하였다. Pellet에 solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA)을 처리하였고 0.2 ml lysozyme(10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH 8.0)을 처리한 뒤 4 ml의 solution II (0.2 N NaCl, 1% SDS)를 첨가하였다. 이 mixture를 상온에서 10 분간 방치한 후 3 ml의 ice-cold solution III(60 ml of potassium acetate, 11.5 ml of glacial acetic acid, 28.5 ml of H<sub>2</sub>O)를 첨가하였다. 10분간 ice에서 방치한 후 centrifugation(10,000 rpm, 5 min)하여 윗층만을 모아 새 tube에 옮겼다. 여기에 0.6배 부피의 isopropanol을 첨가하여 원심분리한 뒤 TE buffer에 녹임으로써 plasmid DNA를 얻을 수 있었다. Plasmid의 minipreparation은 Holmes와 Quilgey method를 사용하였다.

## 3. Restriction enzyme digestion, ligation and transformation

*Bacillus subtilis* genomic DNA fragment를 endonuclease *Hind*III로 partial digestion하였다. Plasmid DNA pUC19은 *Hind*III에 의해 full digestion시킨 후 intestine alkaline phosphatase로 5' 말단의 phosphate를 제거하였다. Ligation을 위해 ligation buffer(Tris-HCl 660 mmol/L; MgCl<sub>2</sub> 50mmol; dithiothreitol 10 mmol; ATP 10 mmol; pH 7.5)와 T<sub>4</sub> DNA ligase가 restriction enzyme 처리된 genomic DNA와 plasmid DNA mixtures에 첨가되어 16°C에서 12~18 시간 반응시켰다. Ligation 반응이 끝난 mixture를 *E. coli* sure cell에 transformation하였다.

Transformation에 사용된 *E. coli*의 competent cell은 Mandel과 Higa 방법

에 의한 CaCl<sub>2</sub> method를 사용하였다(31). *E. coli* sure cell LB 액체배지에서 O.D.<sub>550</sub> 값이 0.5가 될 때까지 배양하였다. 배양액을 centrifugation한 후 pellet은 20 mM ice-cold sterile 50 mM CaCl<sub>2</sub>에 현탁하여 ice에서 30 분간 방치하였다. 그 후 다시 5,000 rpm에서 centrifugation하여 0.4 ml의 동일 solution에 suspension시켜 competent cell을 제조하였다.

Competent cell 300  $\mu$ l와 ligation mixture 3  $\mu$ l를 혼합하여 ice에서 40 분간 방치한 뒤 42°C에서 3 분간 heat shock을 주었다. 여기에 1 ml의 LB 배지를 첨가시켜 1 시간 배양한 뒤 LB agar medium(isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside(IPTG) 0.1 mM; 5-bromo-4-chloro-3-indoly- $\beta$ -D-galactoside(X-gal) 0.125 mM; ampicillin 50  $\mu$ g/ml)에 도말하여 37°C에서 12~16 시간 배양하였다. 배양 후 white colony만을 선택하여 acitivity를 가지는 colony를 선별하였다.

### 제 3절 결과 및 고찰

#### 1. Isolation of positive clone and retransformation of recombinant plasmid

20,000주의 transformants로부터 Luria-Bertani에 tooth pick를 사용하여 replication하고 그 위에 fibrin layer를 덮어 fibrin clot을 분해하는 positive clone을 1차 screening하였다.

#### 2. Recombinant plasmid 분리

Positive clone으로부터 plasmid를 분리한 뒤 cloning에 사용한 *Hind*III enzyme으로 digestion한 결과 1.4 kb의 insert을 확인할 수 있었다(Fig. 43).

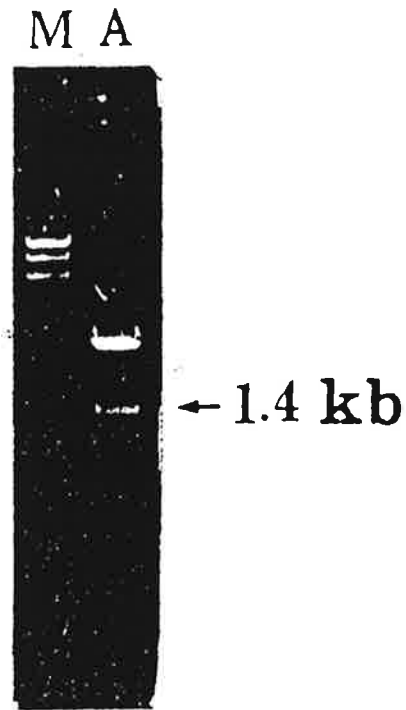


Fig. 43. Agarose gel electrophoresis of the recombinant plasmid pBK15.

M : *Hind*III digest of  $\lambda$ -DNA(size marker)

A : *Hind*III digest of pBK15

### 3. Retransformation of recombinant plasmid

분리한 recombinant plasmid가 host cell에서 안정되게 활성이 있는 fibrinolytic enzyme을 expression시킬 수 있는가를 확인하기 위하여 정제된 plasmid를 retransformation시킨 후 생성되는 transformant의 fibrinolytic activity를 측정한 결과 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 44).

### 4. DNA sequence

클로닝된 1.4 kb DNA 단편의 DNA sequence에서 open reading frame(ORF)은 218 개의 아미노산으로 구성되어 있으며, DNA sequence로부터 계산된 molecular weight는 22 kDa이다(Fig. 45). 클론된 DNA가 과연 BK-17의 유전자인가 그리고 BK-17의 발현에 필요한 모든 정보를 포함하고 있는지 여부는 지속적인 연구를 필요로 한다.

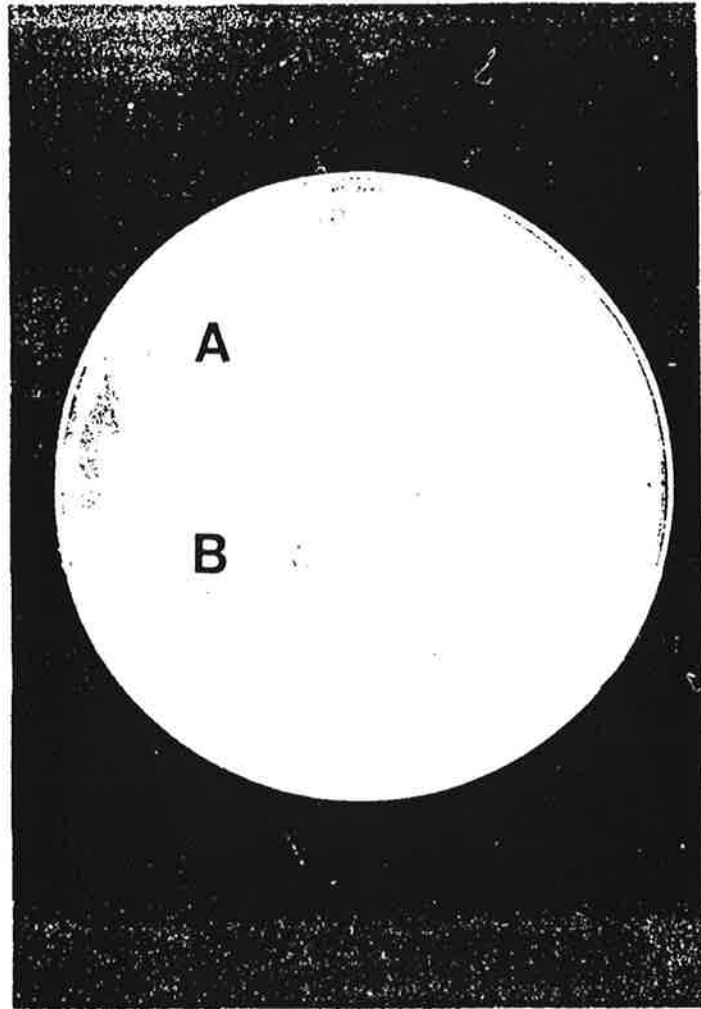


Fig. 44. Expression of fibrinolytic activity in *E. coli* transformant

A : host cell (*E. coli* sure cell)

B : transformant harboring pBK15

```

//i=111111
CCGCGGATCCCTCTATAGTCCACCTGCAGCCATTCCATGACGGCCATTATGAGTCTCCTCAGCAAACTTGCCAGGTTTGACCGTTTATATGAGTACCTGCACAAATTGCGGCTCT - 144
                                  M R S S N V A F A K L A N E K L G F D R F N E Y L H K F G L
ATCAAAAACAGGGATTGATCTGCCCCGGTBMAGTATCAAGTMAATTACTACAAATATGATTTTGACAAGCCGTCTACGGCTTACGGCCACAGCATCGGCATACGCCCATCCAGCAGCTTCAAGGCCCGTCAAGGGCGAATTGCCA - 288
Y Q K T G I D L P E V S S K I N Y K Y D F D K A S T A Y G O A S A I T F I O Q L Q A V T A I A
ATACGGCCMAAATGATGAAACCTTACGTCAITGATCAATATGTCGACCCCGATACGMAAAMAGTCGTCAAGCAGCAGAAACCCAGAGCAAGTAGGCCACGCCGATTTTCAGCCCGATACGGCGMAAAMAGTCCGGAATCTGCTCGGAG - 432
N N G K M K P Y V I D H I V D P D T K K V V K Q T K P E Q V G T P I S A D T A K K V R N L L G
AAGTCCTGACGTCAGACATCGGAACGGANACCTTATMAAATTTGAGGATTTTGACGTCCCGGGTMAACGGGAAACCCGACAAATGTCGGGACGCGGATATTTAAGAGGAAAGCAGCACTATGTTTTCATTCATGCGGCA - 576
E V V T S D I G T G K P Y K I E G F D V A G K T G T A O I A G T G Y L R G T S N Y V F S F M G
TGGCGCCGMAAATGATCCTAAGCTCGTCACTATGTAGCCGTGACAGCAGCCGCAATTAAGCGGGGCAAAAGCAGCTCTGATCCCTGTCGCGGMAATCTTTAACCCGACCGATGMAAAGAGTCCCACTACATGANTATCGAAC - 720
M A P K N D P K L V I Y V A V O O P O L K A G O S S D P V A E I F N P T H K N S S T I *
GTACTSMAAACAAGATTCCGGTTCAGSAGMAAGSMAAGCCMAAGATGCTGACCTGCACAGTAMGACGGTCAAGAGCGCTGAGAGAGSMAAATGMAAATCTCACACCGATTTGCATCGGCCAGTGATGTTGCCGTAAAA - 864
GAGACTATCCGACAGCCGAGAGATGTAATGTAACCCATCCATGAGGAGGAAAGTACCAAGTCCAGGATGACGATGCGGATGACGATGCGGATGACGATGCGGATGACGATGCGGATGACGATGCGGATGACGATGCGGATGACGAT - 1008
TGTGTCAGCCGTGAGGTTACGGCTTCAAGCCAAAGTGTGMAAAMAGGCCAAGCACTGMAAGMAAATACCGTGATCCAGGGTGAATTAAMAATCCTGATTAAGCCGACAGAGAGTGCCCGCATGCCCGCGCTCTCTTTT - 1152
TATGTCGCKKCGTTCTATGTGTCCAGGCTGAGGCAATMAATGMAACAGCCCTAATAMGAGTGGACGGTCCCTTGCCGGTTTCAAAATGTMAGGGTTTCAAAATGTMAGGGTTTCTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT - 1296
GATCATTTGACAGCAGATTAGGCCTATGTCMAATTTGTGTTGGAGAAAMAGCTGACCTTCCAGTAMGGAATTCCTGGAGCCGAAATTTGCCGTTTGAAGCTGAGGAGAGATCCTTTGACCGMAACGGCGTGAAGCTGAGCTAC - 1440
TAAATAMMGCCGGCCGACCGTCTTGTGTATACCGCCGCAATCCGAGGTCCCAT

```

Fig. 45. Nucleotide sequence of pBK15 and deduced amino acid sequence.  
 The ORF composed of 218 amino acid and predicted molecular mass as 22kDa.



## 참고 문헌

1. Wun, T. C., Schleuning, W. D. and Reich, E.: Isolation and characterization of urokinase from human plasma. *J. Biol. Chem.*, **257**, 3276-3283 (1982)
2. Sumi, H., Maruyama, M., Yoneta, T. and Mihara, H.: Activation of plasma fibrinolysis after intrarectal administration of high molecular weight urokinase and its derivative. *Acta Haematol.*, **70**, 289-295 (1983)
3. Sasaki, K., Moriyama, S., Sumi, H., Toki, N. and Robbins, K. C.: The transport of  $^{125}\text{I}$ -labeled human high molecular weight urokinase across the intestinal tract in a dog model with stimulation of synthesis and/or release of plasminogen activators. *Blood*, **66**, 67-75 (1985)
4. Abe, T., Kazama, M., Kinoshita, T., Naito, I., Ogushi, T., Yoshimura, Y., Teruya, J. and Shimizu, N.: Shift of fibrinolysis system at oral administration of urokinase in human subjects; Double blind cross over study. *Blood and Vessels(in Japanese)*, **13**, 472-479 (1982)
5. Sumi, H., Toki, N., Sasaki, K. and Robbins, K. C.: Oral administration of urokinase. *Thromb. Res.*, **20**, 711-714 (1980)
6. Sumi, H., Seiki, M., Morimoto, N., Tsushima, H., Maruyama, M. and Mihara, H.: Plasma fibrinolysis after intraduodenal administration of urokinase in rats. *Enzyme*, **33**, 121-127 (1985)
7. Toki, N., Sumi, H., Sasaki, K., Boreisha, I. and Robbins, K. C.: Transport of urokinase across the intestinal tract of normal human

- subjects with stimulation of synthesis and/or release of urokinase-type proteins. *J. Clin. Invest.*, **75**, 1212-1222 (1985)
8. Reed, G. L., Lin, L. F., Parhami-Seren, B. and Kussie, P.: Identification of plasminogen binding region in streptokinase that is necessary for the creation of functional streptokinase-plasminogen activator complex. *Biochemistry*, **34**, 10266-10271 (1995)
  9. Pennica, D., Holmes, W. E., Kohr, W. J., Harkins, R. N., Vehar, G. A., Ward, C. A., Bennett, W. F., Yelverton, E., Seeburg, P. H., Heyneker, H. L., Goeddel, D. V. and Collen, D.: Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E.coli.* *Nature*, **301**(20), 214-221 (1983)
  10. Voet, D. and Voet, J. G.: *Biochemistry*. Willy Press, 1087-1095 (1990)
  11. Hisashi Mihara, Hiroyuki Sumi, Tomoyuki Yoneta, Hideaki Mizumoto, Ryuzo Ikeda, Masao Seiki, and Masugi Maruyama.: A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Jap. J. Physiology*, **41**, 461-472(1991)
  12. Nobuyoshi Nakajima, Hisashi Mihara, and Hiroyuki Sumi.: Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**(10), 1726-1730(1993)
  13. Hiroyuki Sumi, Nobuyoshi Nakajima, and Hisashi Mihara. : A very stable and potent fibrinolytic enzyme found in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Comp. Biochem. Physiol.* (1993).
  14. Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Muraki, H.: A novel fibrinolytic enzyme(nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a

- typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia.*, **43**, 1110-1111 (1987)
15. Hiroyuki Sumi, Hiroki Hamada, Koichiro Nakanishi, Hajime Hiratani. : Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematologica*, **84**, 139-143(1990).
  16. Astrup, T. and Müllertz, S.: The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem. Biophys.*, **40**, 346-351 (1952)
  17. Jamds G. Cappuccinoa and Natalie Sherman ; *Microbiology a laboratory manual*, 75-78(1987)
  18. G. L. Miller ; Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem.*, **31**, 426-428(1959)
  19. Victria Bascaran, Carlos Hardisson, and Alfredo F. Brana ; Regulation of extracellular protease production in *Streptomyces clavuligerus*, *Apply. Microbiol Biotechnol.*, **34**, 208-213(1990).
  20. Yoshimitsu Uemura and Atsushi Hirano ; Effets of culture conditions on growth and protease production of *Bacillus stearothermophilus* YG 185, *J. of Chem. Eng. of Japan*, **27**, 425-428(1994).
  21. A. L. F. Porto, G. M. Campos Takaki, and J. L. Lima Filho ; Effects of culture cinditions on protease production by *Streptomyces clavulitherus* growing on soybean flour medium, *Appl. Biochem and Biotech.*, **60**, 115-122(1996).
  22. I-Ming Chu, Champion Lee, Tsu-Shun Li ; Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416, *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 755-761(1992).
  23. Leammli, U. K. ; Cleavage of structural proteins during the assembly

- of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>, *Nature*, **227**, 680-685.
24. Matsudaira, P. ; Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene membrane, *J. Biol. Chem.*, **262**, 10035-10038(1987).
25. Sumi, H., Taya, N., and Hiratani H. ; (1992)
26. H. Sumi ; Activation of plasma fibrinolysis after intrarectal administration of high molecular weight urokinase and its derivative, **70**, 5, 289-295(1983).
27. Astrup T., and Stremdorff, I. ; The plasminogen activator in animal tissue, *Acta, Physiol. Scand.*, **36**, 250(1956).
28. 보건복지부 ; 식품공전, 637(1995).
29. R. C. Caswell, P. Gacesa, K. E. Lutrett and A. J. Weightman ; Molecular cloning and heterologous expression of klebsiella pneumonia gene encoding alginate lyase, *Gene*, **75**, 127-134(1989).
30. Ish-Horowicz, D. and J. E. Furke ; Rapid and efficient cosmid cloning, *Nucleic Acid Res.*, **9**, 2989(1981).
31. Mendel, M. and A. Higa ; Calcium dependent bacteriophage DNA infection, *J. Mol. Biol.*, **53**, 159-162(1970).