

## 청국장에서 분리한 *Bacillus licheniformis* HK-12의 혈전용해활성과 프로테옴 분석

손병희<sup>1</sup>, 권상철<sup>2</sup>, 오계현<sup>1\*</sup>

### Fibrinolytic Activity and Proteomic Analysis of *Bacillus licheniformis* HK-12 Isolated from *Chungkuk-Jang*

Byung-Hee Sohn<sup>1</sup>, Sang-Chul Kwon<sup>2</sup> and Kye-Heon Oh<sup>1\*</sup>

**요 약** 자연발효된 청국장으로부터 혈전용해활성을 가지는 세균 *Bacillus licheniformis* HK-12를 농화분리하여, 배양 기간 동안 생산된 혈전용해활성을 가지는 단백질에 대해 프로테옴 분석을 실시하였다. *B. licheniformis* HK-12를 액체 영양배지에 접종하여 얻어진 배양상등액을 피브린 평판법(fibrin plate method)을 사용하여 효소활성을 측정하였다. 그 결과, HK-12의 혈전용해 활성은 대조구인 plasmin보다 약 2.3 배 정도 높은 활성을 나타내었다. 효소는 배양상등액을 ammonium sulfate 침전, DEAE-cellulose chromatography, Sephadex chromatography 등을 수행하여 분리정제하였으며, 정제된 혈전용해효소의 분자량은 SDS-PAGE를 통해 약 23 kDa로 측정되었다. 배양시간에 따른 HK-12의 세포외 단백질의 변화를 2-D PAGE 분석을 통하여 분석하였다. 그 결과 36시간배양 후에 가장 현저하게 유도된 spot #1을 분리하였으며, MALDI-TOF MS를 이용하여 단백질 동정을 실시한 결과, 유도된 단백질의 아미노산 서열은 <sup>1</sup>LKKIEKYREEEQRLK<sup>15</sup>으로서, serine protein kinase (PrkA) (AAU22526)로 확인되었다.

**Abstract** The strain HK-12 was enriched and isolated from naturally fermented soybean for the production of fibrinolytic enzyme and the proteome of this enzyme induced during the incubation period was analyzed. The activity of fibrinolytic enzyme derived from supernatants of the HK-12 culture was performed by fibrin plate method for solid fibrinolytic activity. As the result, the fibrinolytic activity of HK-12 grown on the nutrient agar media was about 2.3 times greater than that of plasmin used as standard. The purified enzyme was prepared by a series of purification process including ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose, Sephadex chromatography. The molecular weight of the enzyme was determined to approximately 23 kDa with SDS-PAGE. In order to examine which strain HK-12 proteins increased or decreased during the incubation period, 2-DE analysis was performed. Protein spot #1 significantly expressed on the 2-DE gel of bacteria cultivated for 36-hrs was analysed. As the result of protein sequence analysis using MALDI-TOF MS, one protein was identified as serine protein kinase (PrkA).

**Key Words** : 혈전용해효소, 청국장, 프로테옴, *Bacillus licheniformis* HK-12

### 1. 서론

청국장은 원료인 콩이 가지는 영양소 이외에도 인체의 건강증진을 위한 생리활성 물질로 알려진 식이섬유, 인지질, 사포닌(saponins), 트립신저해물질(trypsin inhibitor) 등의 성분을 포함하고 있어, 동맥경화, 심장병, 당뇨병 예방효과, 노인성 치매 예방효과, 항암효과, 골다공증 억제

등의 성인병 예방효과가 있음이 발표되었다. 청국장은 또한 미생물에 의한 발효과정 중 새로운 생리활성 물질을 생성하여, 혈전용해능, 혈압 상승 억제효과 및 지질 대사 개선 효과, 항 돌연변이성 및 항암성, 항균작용 등을 나타내는 것으로 보고되고 있다 [1].

*Bacillus*에 속하는 종들은 대표적인 대두 발효 주요균으로 알려져 있으며, 여러 종류의 세포외 단백질 분해효소(extracellular protease)와 세포내 단백질 분해효소(intracellular protease)를 생산하는데, 이러한 단백질 분해효소에는 alkaline protease (subtilisin)와 neutral

<sup>1</sup>순천향대학교 생명공학과

<sup>2</sup>(주)참선진종합식품 연구실

\*교신저자 : 오계현(kyheon@sch.ac.kr)

metalloprotease, esterase 등이 알려져 있다 [2-5].

단백질의 프로테오 분석은 세균의 유전자 발현에서의 변화를 조사하는데 강력한 도구이다 [6-8]. 2-Dimensional electrophoresis (2-DE)는 세균이 어떤 환경의 변화에 노출되었을 때, 발현되는 세균의 모든 수용성 단백질을 전개시키기 때문에 선별을 통하여 이들 단백질의 유도 여부를 확인할 수 있다. 따라서 혈전용해효소를 생산하는 세균에 대하여 이 프로테오 분석법을 적용하여 배양기간 동안에 이 효소의 생산을 확인하고, 동정을 하였다.

본 연구의 궁극적인 목적은 우리나라의 전통 건강 발효식품으로 알려져 있는 청국장의 발효에 관여하는 세균을 이용하여 혈전용해효소를 생산하는데 있다. 이 목적을 수행하기 위하여 기초단계로서 청국장으로부터 혈전용해 활성을 갖는 *Bacillus licheniformis* HK-12를 분리하였으며, 이 세균이 배양시간에 따라 생성하는 단백질을 2-DE와 MALDI-TOF를 활용하여 프로테오 분석을 실시하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 혈전용해효소 생산 세균의 분리와 배양

본 실험에 사용된 균주는 충남 예산지역의 농가에서 전통방법에 의해 제조된 청국장에서 채취하였다. 획득된 청국장 시료 1 g과  $\ell$  당 8 g의 NaCl이 포함된 생리식염수 5 ml를 원심분리용 튜브에 넣고 160 rpm으로 회전하는 진탕 배양기에 2 시간 동안 방치하였다. 배양기에서 꺼낸 튜브로부터 100  $\mu$ l의 청국장 현탁액을 고체 영양배지(nutrient agar)에 도말하고 37°C에서 48 시간동안 배양한 후 생성된 집락을 1% skim milk가 첨가된 plate count agar 배지에서 24 시간동안 배양하였다. 균주의 생육과정에서 protease를 생산하여 투명대(clear zone)를 형성하는 균주를 1차 선별하였고, 혈전용해효소(fibrinolytic enzyme)를 생산하는 균주를 분리하기 위하여 1차 선별균주들을 5 ml의 액체 영양배지(nutrient broth)에 각각 접종하였다. 1차 선별균주들을 48 시간동안 배양한 뒤 균체를 제거한 배양 상등액을 피브린 평판(fibrin plate)에 점적하여 가장 큰 투명대를 형성한 균주를 활성균주로 최종 선별하였으며, 배양액을 원심 분리한 상등액에 대하여 혈전용해 효소 활성을 측정하였다.

### 2.2 혈전용해효소의 활성측정

혈전용해 활성(fibrinolytic activity) 측정은 Astrup 등 [9]의 방법을 따랐다. 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 fibrinogen을 0.6%가 되도록 용해시키고, 완전히 용해된 fibrinogen 용액 5 ml에 동일한 완충용액에 1%

agarose 용액 5 ml를 첨가하여 충분히 혼합하였다. 여기에 100  $\mu$ l thrombin (100 NIH unit/ml) (Sigma Co, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 혼합한 후, 즉시 Petri dish에 붓고 실온에서 5-10 분간 방치하여 굳힌 다음, Pasteur pipette으로 지름 3 mm 구멍을 만들어 fibrin plate를 제조하였다. 각 시료 10  $\mu$ l를 취하여 fibrin plate의 시료구멍에 주입하고 37°C에서 18 시간 동안 반응시킨 후, 생성된 투명대의 서로 수직인 두 개의 지름을 측정하였다. 투명대가 타원인 경우에는 가장 긴지름 ( $d_1$ )과 가장 짧은 지름 ( $d_2$ )을 측정하여 투명대의 면적을  $cm^2 = \pi \times d_1/2 \times d_2/2$ 의 공식에 의거하여 측정하였다. 대조구로서는 정제된 혈전용해 효소인 plasmin (1.0 unit/ml) (Sigma Co, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. 혈전용해 활성은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{혈전용해활성(\%)} = \frac{\text{시료의 용해영역}}{\text{plasmin의 용해영역}} \times 100$$

### 2.3 혈전용해효소의 정제

*B. licheniformis* HK-12를 pH 7로 조정된 액체 영양배지에서 36 시간 동안 배양한 배양액을 100 ml의 원심분리용 튜브에 넣어 11,000  $\times$ g에서 25 분간 원심분리를 통해 균체를 제거하여 얻은 배양 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 준비된 조효소액 100 ml를 75% 포화 황산암모늄(ammonium sulfate)을 만들기 위해 4°C에서 천천히 교반하면서,  $\ell$  당 516 g의 황산암모늄 (Sigma Co. St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 18시간 동안 반응시켰다. 11,000  $\times$ g에서 25 분간 원심 분리하여 침전물을 획득하였고, 침전물을 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 10 ml에 완전히 재현탁 하였다. 완충용액에 녹인 침전물 10 ml를 투석튜브(dialysis tubing) (Sigma Co. St. Louis, MO, USA)에 넣고 1  $\ell$ 의 동일한 완충용액에서 2 시간 간격으로 3번 완충용액을 교환한 뒤 12 시간 동안 투석하였다. 투석을 마친 용액을 -70°C deep freezer에서 12 시간 동안 얼린 후 동결건조기로 농축하였다. 농축된 효소액을 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)로 평형화된 DEAE-cellulose (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) column (1  $\times$  20 cm)에 주입하여 크로마토그래피를 실시하였다. 용출은 NaCl의 농도를 0-0.5 M로 증가시키면서 0.2 ml/min의 유속으로 실시하였다. 용출액은 분획기(fraction collector)로 모아 280 nm에서 자외선 분광광도계로 흡광도를 측정하였고, 피브린 평판법을 통해 활성이 높은 분획을 모은 후 동결건조기로 농축하였다. 이온교환 크로마토그래피로 정제한 효소액을 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)로 평형화된 Sephadex G-75

(Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) column (2.5 × 30 cm)에 주입하여 0.5 ml/min의 유속으로 용출하였다. 용출액은 280 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하였고, 혈전용해 활성을 측정하여 가장 활성이 높은 분획을 모아 동결건조기로 농축하였다. 모든 실험수행은 4°C에서 실시하였다.

#### 2.4 정제효소의 분자량 측정

HK-12 배양에서 생산된 혈전용해 효소의 정제 여부와 분자량을 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 실시하였다 [10]. SDS-PAGE에서 Separating gel은 12% acrylamide gel을 사용하였고, stacking gel은 5% acrylamide gel을 사용하여 전개하였다. Bradford 방법으로 단백질 정량을 실시하여 동일량의 단백질을 준비하였고, 5× sample buffer로 총량을 맞추었다. 준비된 시료를 95°C에서 5분간 열처리하고, 얼음에 냉각한 후에 well에 주입하였다. 표지 단백질은 myosin (198 kDa), β-galactosidase (115 kDa), bovine serum albumin (90.5 kDa), glutamate dehydrogenase (61.5 kDa), ovalbumin (46.2 kDa), carbonic anhydrase (37.8 kDa), myoglobin (26 kDa), lysozyme (18.5 kDa)과 aprotinin (9 kDa) (Prestained Protein Marker, Intron, Inc., Korea)를 사용하였다. 전기영동은 stacking gel에서는 60 V에서 20분간 실시하였고, separating gel에서는 100 V에서 1시간 30분 동안 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 gel staining solution (0.1% Coomassie blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 60분 동안 염색을 실시하였고, 탈염색은 destaining solution I (50% methanol, 10% acetic acid)로 60분간 탈색하고 다시 destaining solution II (5% methanol, 10% acetic acid)로 6시간 동안 탈색하였다.

#### 2.5 2-Dimensional Electrophoresis

정제된 혈전용해 효소의 양상을 이차원 전기영동으로 비교 분석하였다. 정제된 효소액에 40% TCA (trichloroacetic acid)을 동량 첨가하여 단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질은 -20°C에서 보관된 acetone으로 3회 세척한 후, pH 3-10의 범위를 가지는 340 μl의 rehydration buffer (8 M urea, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer [3-10], 0.002% bromophenol blue)로 단백질 표품을 녹여, Immobiline DryStrip gel (pH 3-10, 18 cm) (Amersham Biosciences Co)을 rehydration 시켰다. Rehydration이 끝난 후, 팽윤된 gel을 manifold gel tray (Amersham Biosciences Co)로 옮긴 후, IPGphor (Amersham Biosciences Co., Little Chalfont, England)를

이용하여 300 V에서 30분, 500 V에서 30분, 1000 V에서 1시간 30분, 3000 V에서 1시간 30분, 5000 V에서 1시간 30분, 8000 V에서 2시간, 마지막으로 8000 V에서 1시간 동안 focusing을 실시하였다. IEF (iso electronic focusing)이 끝난 후 gel을 DTT (10 mg/ml)가 첨가된 equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue)에서 15분간 평형화를 실시하였다. SDS-PAGE는 PROTEIN II XL electrophoresis kit (Bio-Rad, Co)를 사용하여 gel 당 5 mA로 1시간 동안 전기영동 하고, 다시 gel 당 10 mA로 13시간 동안 전기영동 하였다. Gel 염색은 silver staining 방법으로 실시하였다. 고정 용액 (50% ethanol, 10% acetic acid)에 1시간 동안 고정시키고, 감광 용액 (0.02% sodium thiosulfate, 30% ethanol, 83 mM sodium acetate)에 30분 동안 gel을 반응시킨 후 증류수로 5분간 3회 세척하였다. 세척 후 gel을 silver reagent (0.25% silver nitrate)에 30분간 반응시키고, 증류수로 1분씩 2회 세척하였다. 현상 용액 (3% sodium carbonate, 40 μl 37% formaldehyde)에서 단백질 spot이 관찰되면 sodium EDTA (14.6 g/l)로 반응을 멈추었다. 염색된 gel은 PD-QUEST Image system (Bio-Rad Co., Hercules, USA)으로 분석하였다.

#### 2.6 MALDI-TOF를 이용한 프로테오믹스 분석

2-DE 상에서 발현의 차이가 나타난 단백질 spot을 동정하기 위해 MALDI-TOF/MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometer, Voyager-DE STR Biospectrometry, Applied Biosystems Inc., Germany)을 통하여 분석하였다. 단백질 spot을 microcentrifuge tube로 옮긴 후 30 mM potassium ferricyanide와 100 mM sodium thiosulfate를 1:1로 혼합한 용액으로 gel에 염색된 silver nitrate를 제거하였다. 50% ACN (acetonitrile)으로 15분, 100% ACN으로 5분간 각각 반응 후, 100 mM ammonium bicarbonate를 넣고 5분간 반응 후 증류수로 2회 세척하였다. 100% ACN을 넣고 gel이 흰색으로 변하면 ACN을 제거하고, 진공 원심분리 농축기를 통해 남아있는 용액을 제거하여 gel을 건조시켰다. 건조된 gel을 200 ng의 trypsin (Promega sequence grade, Madison, WI, USA)으로 16시간 동안 처리하여 gel속에 있는 단백질을 peptide로 분해시켰다. 분해된 peptide를 gel에서부터 추출하기 위해 25 μl elution buffer (50% ACN, 5% TFA [trifluoroacetic acid])를 첨가하여 실온에서 1시간동안 교반시켰다. 반응시킨 elution buffer를 새로운 1.5 ml 튜브로 옮기고 진공 원심분리 농축기로 건조시켰다. Matrix buffer (50% ACN, 0.1%

TFA)로 0.01 g/ml의 matrix ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxy ciannamic acid, CHCA)용액을 만들었다. 동일한 10  $\mu$ l matrix buffer로 추출된 peptide를 녹인 후, matrix 용액과 peptide 용액을 1:1로 혼합하여 PTFE (polytetrafluoroethylene) 필름으로 코팅된 96 well plate (Applied Biosystems)에 주입하였다. Peptide의 분자량은 MALDI-TOF-MS로 분석하였고 분석된 분자량은 분석 프로그램인 Mascot (www.matrixscience.com)와 Tigr (www.tigr.org)의 database를 사용하여 동정하였다.

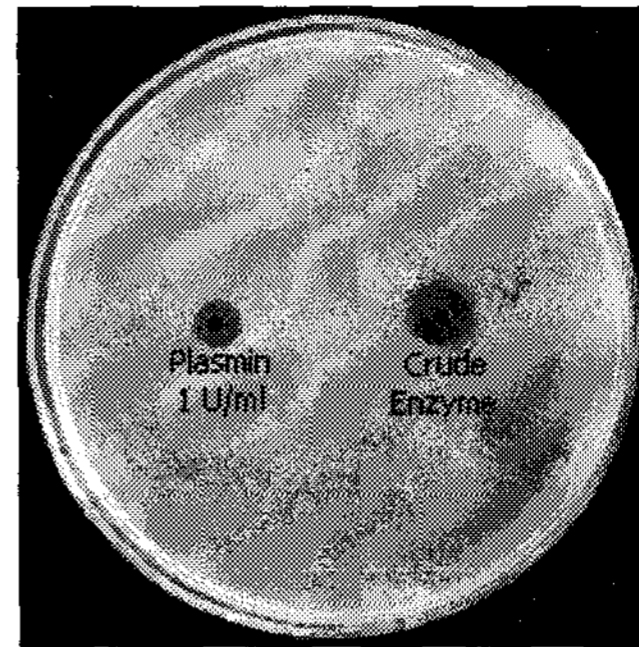
### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 세균의 농화와 분리

충남 예산 지역에서 전통발효 방법으로 생산된 청국장으로부터 발효에 관여하는 세균들을 농화시켜, 혈전용해 효소 생성 및 활성능이 뛰어난 3 개의 세균을 분리하였다. 이들 세균 가운데 1% skim milk가 첨가된 plate count agar 배지에서 3회에 걸친 도말 평판법을 통한 순수배양으로 혈전용해효소 생성 및 활성능이 탁월한 세균인 *Bacillus licheniformis* HK-12를 선별하였다. 동양의 대표적인 콩발효 전통식품으로서 일본의 낫또(natto), 중국의 도치(douchi)와 함께 한국에서는 청국장이 알려져 있으며, 이들 식품들은 콩의 발효과정에서 혈전용해효소를 생산하는 것으로 알려져 있다 [11-14]. 특히 우리나라의 청국장은 발효과정에서 혈전용해능이 우수한 효소를 생산하는 것으로 알려져있어, 선별된 *B. licheniformis* HK-12을 이용하여 생산된 혈전용해효소를 분리정제하고, 프로테옴의 분석에 이용하였다.

#### 3.2 혈전용해 활성 확인

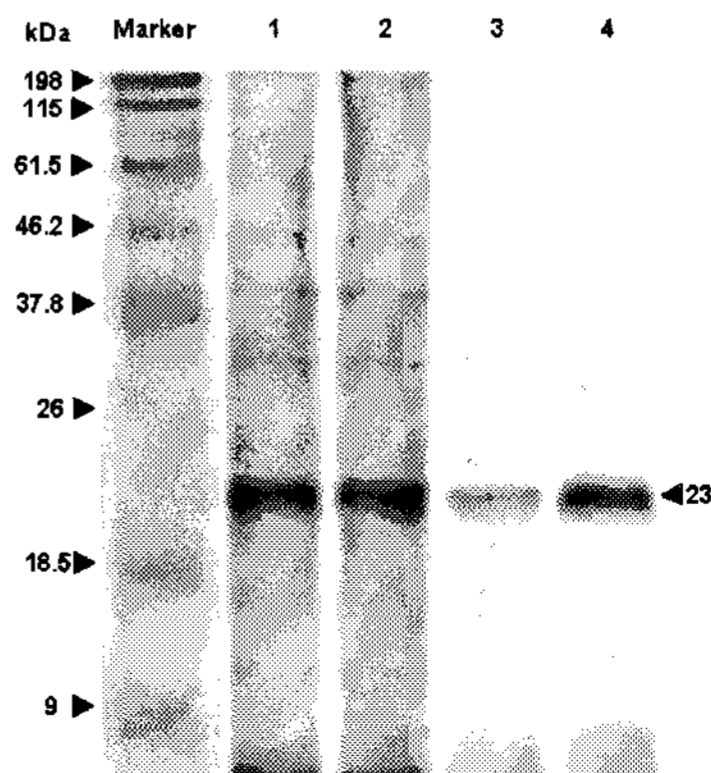
영양 액체배지에서 배양한 *B. licheniformis* HK-12의 혈전용해 활성을 측정하기 위하여 피브린 평판에 배양액을 점적하여 활성을 측정하였다. Plasmin (1 unit/ml)을 대조군으로 보았을 때, HK-12의 혈전용해 활성은 약 2.3 plasmin unit으로 나타났다 [그림 1]. 혈전용해효소의 활성은 배양 온도, 배양초기 pH, 금속이온, 저해제 등의 다양한 물리화학적 요인들에 의하여 영향을 받는 것으로 보고되고 있다. 여기에서는 선별된 *B. licheniformis* HK-12에서 생산되는 혈전용해효소의 특성을 규명하기 위하여 수행하였으며, 분리된 효소를 정제하여 분자량의 크기를 측정하였고, 혈전용해능을 가지는 단백질을 동정하기 위한 연구로 범위를 한정하였다.



[그림 1] *B. licheniformis* HK-12의 배양상등액 plasmin (1 U/ml)의 혈전용해를 나타내는 투명대(clear zone)

#### 3.3 혈전용해효소의 정제 및 분자량 측정

*B. licheniformis* HK-12 배양에서 생성된 혈전용해효소의 SDS-PAGE와 분자량을 측정하기 위하여 단백질 정제를 실시하였다. 그 결과 침전을 통해 얻어진 총단백질의 양은 3.06 mg/ml였으며, 정제최종단계인 Sephadex G-75 column chromatography를 거치면서 2.5 mg/ml가 되었다. HK-12 배양액에서 얻어진 조효소(crude enzyme)로부터 황산암모늄 침전, DEAE-cellulose ion exchange chromatography, Sephadex G-75 chromatography를 이용한 정제단계를 거쳐 분리·정제한 결과 혈전용해 효소의 특이활성은 47.4 unit/mg으로 배양 상등액에 비해 5.8 배 증가하였다 [표 1]. 정제 효소의 농축 정도와 분자량을 확인하기 위하여 단계별로 분비된 각각의 단백질 시료를 12% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시하였다. SDS-PAGE를 통해 정제 단계별로 증가되는 밴드와 제거되는 밴드를 관찰하였다 [그림 2].

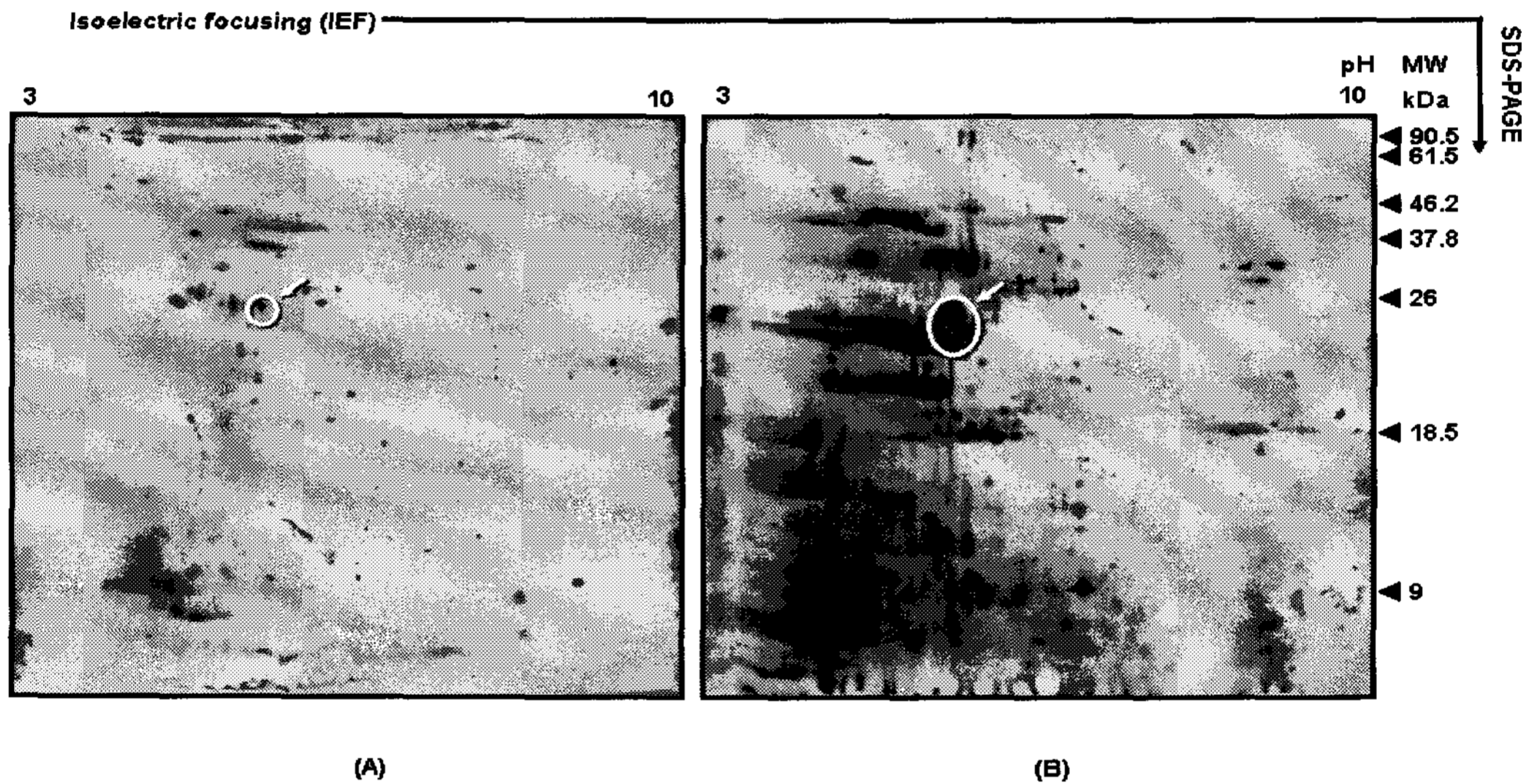


[그림 2] SDS-PAGE에 의한 정제단계별 혈전용해효소의 SDS-PAGE [1: 조효소(crude enzyme), 2: 75% ammonium sulfate 침전단계를 거친 조효소, 3: DEAE-cellulose chromatography를 거친 혈전용해효소, 4: Sephadex G-75 chromatography를 거친 혈전용해효소]



[표 1] *B. licheniformis* HK-12에서 분리된 혈전용해효소의 정제

Purification step	Vol (ml)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg)	Recovery of activity (%)	Purification (fold)
Culture supernatant	250	23.1	8.2	100	1
Ammonium sulfate	5	15.3	11.9	32	1.5
DEAE-cellulose	2.5	8.8	20.8	9.8	2.6
Sephadex G-75	1.5	3.8	47.4	3.2	5.8



[그림 3] *B. licheniformis* HK-12의 배양시간에 따른 세포외 효소의 2-DE gel. (A) 12 시간배양; (B) 36 시간배양.

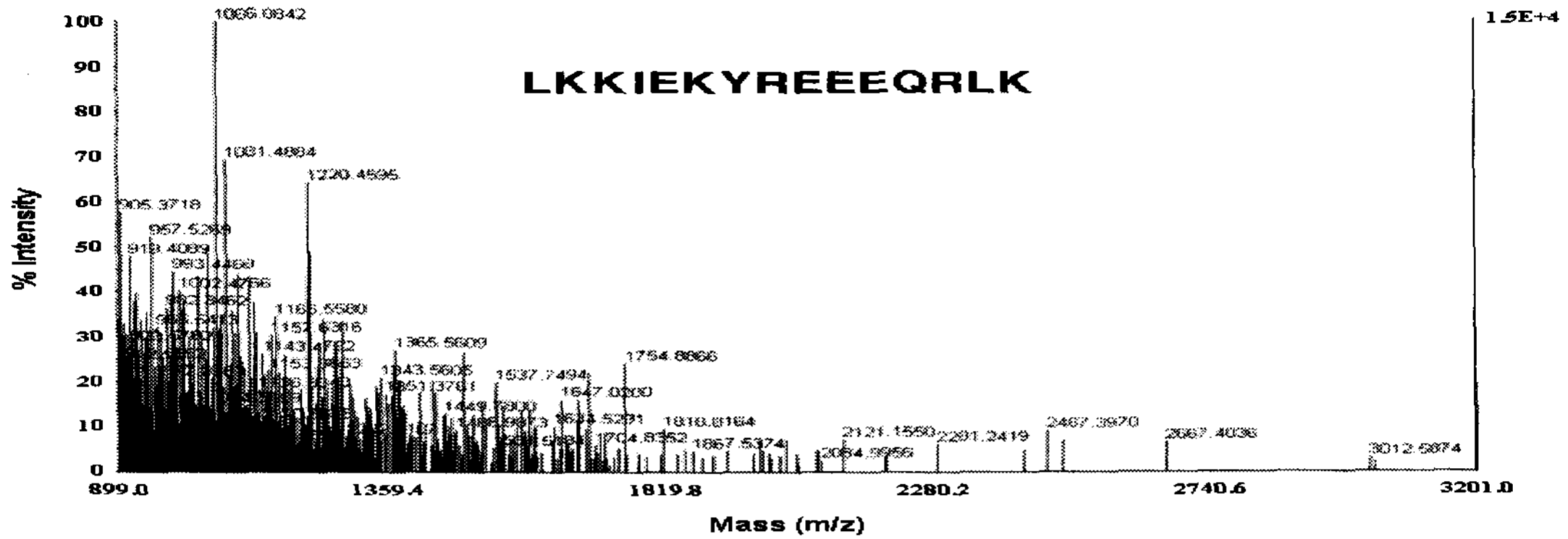
그 결과 혈전용해효소의 분자량은 약 23 kDa으로 측정되었다. *B. licheniformis* HK-12에서 생성되는 혈전용해효소는 이전에 보고된 *B. subtilis* K-54 (29 kDa) [13] 또는 *Bacillus* sp. CK 11-4 (28 kDa) [15]가 생산하는 혈전용해효소의 분자량과 비슷하였지만, *B. subtilis* KCK-7 (45 kDa) [12]와 *B. amyloliquefaciens* K 42 (45 kDa) [16]가 생산하는 혈전용해 효소의 분자량 보다는 작은 것으로 나타났다.

### 3.4 2-D PAGE 및 MALDI-TOF MS 분석

*B. licheniformis* HK-12에서 생산되는 혈전용해 관련 효소의 배양시간에 따른 발현율을 확인하기 위하여 2-DE를 수행하였다. 배양 12 시간과 36 시간에서 생성되는 세포외 단백질의 발현을 비교한 결과, 배양 시간이 경과함에 따라 생성되는 세포외 단백질의 종류와 발현양이 점차 증가하는 것이 관찰되었고, 특히 spot #1은 배양 36 시간에서 급격히 발현양이 증가되었다. spot #1은 12 시간 배양 이후부터 서서히 발현되다가 36 시간에 최대로 발

현되었다 [그림 3].

2-D PAGE상에서 급격히 증가된 spot #1에 trypsin을 처리하여 peptide 절편으로 만든 후, MALDI-TOF mass spectrometry를 실시하였다 [그림 4]. MALDI-TOF 분석 결과 나타난 spot #1의 peptide 분자량을 분석 프로그램 Mascot (www.matrixscience.com)에서 확인한 결과, serine protein kinase (PrkA)로 동정되었다. 이 serine protein kinase (PrkA)의 amino acid sequence를 Tigr (www.tigr.org)의 database에서 검색한 결과, Accession No. AAU25526임을 확인하였다 [표 2]. 많은 연구에서 콩의 발효과정에서 생산되는 혈전용해효소는 serine protease로 알려져 있다. 특히 청국장에서 분리한 혈전용해능을 가지는 균주인 *B. licheniformis* CK 11-4에서 생산하는 혈전용해효소는 alkaline thrombophilic serine protease로서 [17], 본 연구에서 확인된 *B. licheniformis* HK-12도 serine protease 계열의 혈전용해효소를 생성하는 것으로 판단된다. 향후 본 연구를 통해 *B. licheniformis* HK-12에서 생산되는 혈전용해효소의 프로



[그림 4] MALDI-TOF MS에 의한 단백질 spot #1의 동정

[표 2] *B. licheniformis* HK-12에서 분리된 단백질 spot #1의 동정

spot No	Identified Protein	Gene Symbol	Functions	Amino acid Sequence	GenBank Accession No.
#1	Serine Protein Kinase	<i>prkA</i>	Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides	LKKIEKYREEEQRLK	AAU22526

테오믹스 분석에서 얻어진 결과를 바탕으로, 이 단백질에 대한 효소학적 및 분자유전학적 특성을 규명하는 방향으로 진행될 것이다.

#### 4. 결론

본 논문에서는 충남 예산지역의 농가에서 전통발효 방법으로 제조된 청국장으로부터 *Bacillus licheniformis* HK-12를 분리하여 혈전용해활성과 프로테오믹스 분석을 실시하였다. *B. licheniformis* HK-12의 배양상등액을 ammonium sulfate에 의한 침전, DEAE-cellulose chromatography, Sephadex G-75 chromatography를 사용하여 정제하였으며, SDS-PAGE를 통하여 혈전용해효소의 분자량을 결정하였다. *B. licheniformis* HK-12의 배양 시간에 따른 혈전용해효소 생산의 차이를 2-DE를 통하여 확인하였으며, 현저히 증가된 혈전용해효소의 단백질 spot #1을 MALDI-TOF MS 분석을 통하여 serine protein kinase (PrkA)로 동정하였다.

#### 참고문헌

[1] S. H. Kim, et al., "Physiological Functions of Chongkukjang", *Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 4(2), pp. 40-46, 1999.

[2] S. Hiroshi, et al., "Intracellular Protease of *Bacillus subtilis*", *Agric. Biol. Chem.* 40, pp. 1047-1049, 1976.

[3] H. P. Mantsala, et al., "Extracellular and Membrane-bound Protease from *Bacillus subtilis*", *J. Bacteriol.* 141, pp. 493-501, 1980.

[4] L. Prestidge, et al., "Protease Activities During the Course of Sporulation in *Bacillus subtilis*", *J. Bacteriol.* 107, pp. 815-823, 1971.

[5] A. Y. Strongin, et al., 1978. "Intracellular Serine Protease of *Bacillus subtilis*: Sequence Homology with Extracellular Subtilisins", *J. Bacteriol.* 133, pp. 1401-1411, 1978.

[6] P. R. Jungblut, et al., "Comparative Proteomes Analysis of *Helicobacter pylori*", *Mol. Microbiol.* 36, pp. 710-725, 2000.

[7] P. R. Jungblut, et al., "Comparative Proteomes Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG Strains: Toward Functional Genomics of Microbial Pathogens", *Mol. Microbiol.* 33, pp. 1103-1117, 1999.

[8] R. Schmid, et al., "Identification of Vegetative Proteins for a Two-dimensional Protein Index of *Bacillus subtilis*", *Microbiology* 143, pp. 991-998, 1997.

[9] T. Astrup, et al., "The Fibrin Plate Method for Estimating Fibrinolytic Activity", *Arch. Biochem. Biophys.* 40, pp. 346-351, 1952.

- [10] D. M. Bollag, et al., "Protein Method", 2nd ed., Wiley-Liss, Inc., NY, USA, 1996.
- [11] 손병희, "청국장에서 분리한 혈전용해효소 생산세균의 분리 및 동정" 한국산학기술학회 7(3), pp. 476-482, 2006.
- [12] H. D. Paik, et al., "Purification and Characterization of the Fibrinolytic Enzyme Produced by *Bacillus subtilis* KCK-7 from Chungkookjang", *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 14, pp. 289-835, 2004.
- [13] C. K. Yoo, et al., "Purification and Characterization of Fibrinolytic Enzyme Excreted by *Bacillus subtilis* K-54 Isolate from Chung Guk Jang", *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26, pp. 507-514, 1998
- [14] Y. Peng, et al., "Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 Screened from Douch, a Traditional Chinese Soybean Food. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 134, pp. 45-52, 2003.
- [15] Y. T. Kim, et al., "Purification and Characterization of Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus* sp. Strain CK 11-4 Screened from Chungkook-jang", *Appl. Environ. Microbiol.* 62, pp. 2482-2486, 1996.
- [16] G. H. Yun, et al., "Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus amyloliquefaciens* K42 Isolated from Korean Soy Sauce", *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31, pp. 284-291, 2003.
- [17] 권익부, 청국장의 혈전용해능. 제2회 영남대학교 부설 장류 연구소 심포지움. pp. 103-129, 1998.

**손 병 희(Byung-Hee Sohn)**

[준회원]



- 2006년 2월 : 순천향대학교 생명공학과 (이학사)
- 2008년 2월 : 순천향대학교 생명공학과 (이학석사)

<관심분야>

기능성 생물소재, 환경오염정화, 식품 및 산업미생물학

**권 상 철(Sang-Chul Kwon)**

[정회원]



- 1995년 2월 : 충주대학교 식품공학과(공학사)
- 1999년 2월 : 성균관대학교 식품생명과학과(농학석사)
- 2003년 2월 : 성균관대학교 식품생명과학과 (이학박사)
- 1995년 10월 ~ 현재: (주)참선진 종합식품 실장

<관심분야>

기능성 생물소재, 식품위생(HACCP), 식품미생물학.

**오 계 현(Kye-Heon Oh)**

[정회원]



- 1980년 2월 : 고려대학교 생물학과(이학사)
- 1986년 2월 : 고려대학교 생물학과(이학석사)
- 1991년 3월 : (美)Ohio State University 미생물학과(이학박사)
- 1991년 8월 ~ 현재 : 순천향대학교 생명공학과 교수

<관심분야>

기능성 생물소재, 환경오염정화, 식품 및 산업미생물학.