

된장의 혈전용해효소 활성과 미생물 분포와의 상관관계

김동호¹ · 송현파¹ · 김기연² · 김정옥³ · 변명우^{1*}

¹한국원자력연구소 방사선식품·생명공학연구팀

²대전보건대학 전통조리과

³세종대학교 생활과학과

A Correlation Between Fibrinolytic Activity and Microflora in Korean Fermented Soybean Products

Dong-Ho Kim¹, Hyun-Pa Song¹, Ki-Youn Kim², Jung-Ok Kim³ and Myung-Woo Byun^{1*}

¹Dept. of Radiation Food Science and Biotechnology, Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-353, Korea

²Dept. of Traditional Cookery, Daejeon Health Science College, Daejeon 300-711, Korea

³Dept. of Human Life Science, Sejong University, Seoul 143-747, Korea

Abstract

A correlation between fibrinolytic activity and microflora in Korean traditional soybean fermented food was investigated. The fibrinolytic activities of traditional soybean pastes and commercially processed samples were 2.42 ± 1.01 unit/g and 1.58 ± 0.98 unit/g, respectively. The cell density of *Bacillus* in traditional soybean pastes was about 10^7 CFU/g and its commercially processed one was 10^6 CFU/g. Acid producing bacteria, fungi and yeast group were higher in commercially processed one. The correlations of fibrinolytic activity and microflora in traditional and commercial *Doenjang* were positively correlated in *Bacillus* ($R^2 \approx 0.69$), negatively correlated in fungal group ($R^2 \approx 0.40$), and there were no significant correlations in acid forming bacteria and yeast group ($R^2 < 0.16$). Fibrinolytic activities in *Meju* and *Koji* were 6.54 ± 1.97 unit/g and 1.46 ± 0.43 unit/g respectively, and were positively correlated with *Bacillus*. Yeast and acid forming bacteria were grown by 5~6 decimal induction during fermentation period of *Doenjang*, but *Bacillus*, fungal cells and fibrinolytic activity were nearly stable. Results indicate that fibrinolytic activity of *Doenjang* depends on enzyme induction in *Meju* or *Koji* processing by *Bacillus*, not *Doenjang* fermentation process.

Key words: *Bacillus*, *Doenjang*, fibrinolytic enzyme

서 론

혈관 중의 혈전(fibrin clots)은 심혈관질환의 주요 원인이 되며 혈전의 제거는 심혈관질환의 예방과 치료에 중요한 요소이다. 혈전은 일반적으로 인체의 혈관이 손상을 받아 출혈이 일어난 후 혈액이 혈관 또는 조직 내에서 응고됨으로서 생성된다. 혈전의 생성은 최종적으로 활성화된 thrombin에 의하여 혈장 단백질인 fibrinogen이 fibrin으로 전환됨으로써 유도된다(1). 정상적인 경우 혈전(fibrin clots)은 plasmin 등과 같은 혈전용해효소(fibrinolytic enzyme)에 의해 체내에서 자연적으로 분해된다(2). 그러나 혈관이나 조직 내에 과도한 양의 혈전이 축적되거나 혈전용해와 관련된 생리학적 기구가 정상적이지 못할 경우에는 혈액의 흐름이 제한되고 결국은 특정조직에 산소와 영양물질을 공급하지 못하게 되는 혈전증(thrombosis)을 유발하여 결국 장애나 사망에 이르기

한다(2).

혈전증의 치료제는 streptokinase, urokinase, 그리고 tissue-type plasminogen activator(tPA)처럼 혈액의 plasminogen을 활성화된 plasmin으로 전환시켜주는 plasminogen activator type과, plasmin처럼 생체 내에서 선택적으로 혈전을 용해시켜 줄 수 있는 fibrinolytic enzyme type으로 구분한다(2,3). 그러나 이러한 물질들은 가격이 매우 높을 뿐만 아니라 urokinase를 제외하고는 경구투여가 불가능하며 상당한 부작용이 수반되기도 한다(4). 따라서 최근에는 보다 경제적이고 경구투여가 가능하며 혈전을 선택적으로 용해시킬 수 있는 혈전용해물질의 탐색이 다양한 동식물 자원을 대상으로 활발하게 진행되어 조류(5,6), 지렁이(7,8), 뱀 독(9,10), 미생물(11) 등에서 혈전용해물질이 분리된 바 있다. 특히, 미생물이 생산하는 혈전용해효소는 특이성이 높고 산업화가 용이하며 발효나 유전자 조작(12-14) 등을 통하여 대량생산이 가

*Corresponding author. E-mail: mwbyun@kaeri.re.kr
Phone: 82-42-868-8060, Fax: 82-42-868-8043

능하므로 이에 대한 연구결과가 많이 발표되고 있다. Sumi 등(15,16)과 Fujita 등(17,18)은 일본의 전통대두 발효식품인 natto와 절임식품인 shiokara(19)에서 혈전용해효소 생산 균주를 분리하고 효소를 정제하였으며 이의 경구 투여시 생체 내의 혈전용해능을 높일 수 있다고 보고하였다.

우리나라에서도 청국장(20,21), 젓갈(22), 된장(23), 김치(24) 등의 발효식품에서 혈전용해효소 생산균주가 분리되었는데 특히 된장에서 분리된 *Bacillus*는 natto나 청국장에서 분리된 균주보다 높은 혈전용해능을 가진다고 보고된 바 있다. 이러한 발효식품 중의 혈전용해 효소는 식품으로 직접 섭취할 수 있으므로 심혈관질환의 예방에 유효한 효과를 기대할 수 있으며 산업적으로는 고부가가치의 기능성 식품 생산과 전통발효식품의 소비촉진 등이 기대된다. 따라서 최근 중국에서 보고된 혈전용해효소 생산균주의 고상발효(solid state fermentation)를 이용한 효소의 대량생산 공정 연구(25)나 nattokinase의 상품화 등은 주목할 만하다. 특히 우리나라 전통장류는 일본이나 중국의 발효식품보다 월등히 높은 혈전용해 활성을 나타낸다고 알려져 있으며(23) 생체 내의 혈전용해와 밀접한 관계에 있는 angiotensin converting enzyme(ACE)에 대한 저해활성도 높아(26,27) 기능성 측면에서의 상승효과가 기대된다. 따라서 된장을 비롯한 우리나라의 장류를 과학화할 경우 심혈관질환 예방을 위한 세계적인 기능성식품으로서의 발전 가능성이 매우 크다. 그러나 우리나라의 미생물 혈전용해효소에 관한 연구는 효소의 분리 정제와 생화학적 특성 규명(20,21,23) 등이 주를 이루고 있을 뿐이며 이를 이용한 산업적 제품생산 연구에는 미치지 못하고 있다.

본 연구는 미생물을 이용하여 우리나라 전통발효식품의 혈전용해효소 활성을 높임으로써 고부가가치의 발효식품 및 기능성제품을 생산하기 위한 산업적인 기술개발의 방법으로, 일차적으로 된장 제품 및 제조공정에서의 혈전용해효소 활성과 microflora의 상관관계를 조사하였다.

재료 및 방법

시료

혈전용해효소 활성과 미생물 분포 조사를 위한 시료는 자가제조형의 전통재래식 된장 20종, 산업체 생산 시판된장 10종, 메주 10종, Koji 10종을 시판매장, 민가, 장류 제조업체로부터 수집하여 사용하였다. 된장 발효공정 중의 혈전용해효소 활성과 미생물 성장 변화는 메주를 이용한 전통제조방법과 Koji를 이용한 miso type의 제조공정을 비교하여 담금 직후부터 2주 간격으로 분석하였다. 전통된장은 메주:소금:물=1:1:3의 무게비로 간장을 담가 25°C에서 1개월 동안 저장한 다음 메주를 건져내어 균일하게 혼합하고 이를 다시 25°C에서 숙성시켰다. 이 때 전통된장의 염도는 18.3%이었으며 수분은 52.6%이었다. Koji 된장은 소맥분 Koji와 증자대

두를 4:6으로 혼합하고 수분 50%, 염도 11%가 되도록 염수를 가한 다음 균일하게 혼합하여 25°C에서 숙성시켰다.

미생물 분석

미생물 분석을 위한 시험액은 분석시료 각 10 g을 마쇄한 다음 멸균 식염수(NaCl, 3%) 90 mL를 가하여 4°C에서 30분간 교반하고 냉장상태에서 2시간 정치한 후 여과(Whatman No. 2)하여 제조하였다. 제조된 시험액 1 mL를 멸균 식염수로 1/10씩 연속 희석하여 각각 *Bacillus*, 산생성세균, 효모, 곰팡이의 선택배지에 pour plating method로 접종·배양하여 미생물 검사를 실시하였다. 이 때, *Bacillus*(28)는 dextrose tryptone agar(Difco)에 시료를 접종한 다음 50°C에서 3일간 배양하여 생성된 colony의 수를 계수하였으며, 산생성세균(29)은 MRS 배지(Difco)에 시료를 접종한 다음 25°C에서 3일간 배양하여 생성된 colony를 colony counter(IPI Inc., Microcount 1008, USA)로 계수하였다. 효모와 곰팡이(29)는 10% tartaric acid를 첨가하여 pH를 3.5로 조정된 potato dextrose agar(Difco) 배지에 시료를 접종하여 25°C에서 3일간 배양한 다음 균사를 형성한 것은 곰팡이로, colony를 형성한 것은 효모로 구분하여 계수하였다.

혈전용해효소 활성 측정법

혈전용해효소 활성은 Kim 등(23)의 fibrin plate method로 측정하였다. Fibrin plate는 fibrinogen을 50 mM 인산완충용액(pH 7.4, 0.15 M NaCl 포함)으로 최종농도 0.3%가 되도록 완전히 용해시켜 여과지를 통해 여과한 후, 용액 5 mL에 동량의 2% agarose 5 mL를 첨가하여 혼합하고 혼합 용액에 thrombin(100 NIH Unit/mL) 0.1 mL를 첨가하여 충분히 혼합한 후 즉시 petri dish에 붓고 고화시켜 제조하였다. 조효소액은 미생물 분석용 시험액을 원심분리(10,000×g, 4°C)한 다음 상등액을 회수하여 제조하였다. 혈전용해효소 활성은 fibrin plate에 pasteur pipet으로 지름 5 mm의 구멍을 만들어 각 시료 20 µL를 주입하고 37°C에서 12시간 반응시킨 다음 이 때 생성된 투명한 면적을 계산하였으며 대조구로는 정제된 혈전용해효소인 plasmin(1.0 U/mL)을 사용하였다. 조효소의 혈전용해활성은 대조구의 용해면적에 대한 시료의 용해면적의 상대적인 비율로 환산하여 산출하였다.

결과 및 고찰

장류제품의 혈전용해효소 활성 분포

수집한 시료의 혈전용해 효소활성 분포와 microflora의 상관관계를 조사하였다. 전통된장의 혈전용해 활성은 0.98~4.37 unit/g(평균 2.42 unit/g) 수준으로 공장산 된장의 0.18~3.05 unit/g(평균 1.58 unit/g)보다 1 unit 이상 높은 분포를 나타내었다(Fig. 1). 미생물은 전통된장에서 *Bacillus*의 밀도가 높았고 산생성 세균, 곰팡이, 효모는 모두 공장산 된장이 전통된장보다 높았다.

된장의 *Bacillus* group 분포와 혈전용해효소활성은 전통된장($R^2=0.6901$)과 공장산 된장($R^2=0.6889$) 모두 양의 상관관계를 나타내었으며 $R^2>0.6$ 의 비교적 높은 상관도를 나타내었다(Fig. 1). 전통된장의 *Bacillus* 밀도는 $10^6 \sim 10^8$ CFU/g(평균 5.2×10^7 CFU/g) 수준으로 공장산 된장의 $10^6 \sim 10^8$ CFU/g(평균 4.6×10^6 CFU/g)보다 1 log cycle 정도 높은 분포를 나타내었다. 된장의 곰팡이 분포와 혈전용해효소활성은 전통된장($R^2=0.4161$)과 공장산 된장($R^2=0.3831$) 모두 음의 상관관계를 나타내었다(Fig. 2). 전통된장의 곰팡이 밀도는 $10^4 \sim 10^6$ CFU/g(평균 5.66×10^5 CFU/g) 수준으로 공장산 된장의 $10^5 \sim 10^7$ CFU/g(평균 6.28×10^6 CFU/g)보다 1 log cycle 정도 낮은 분포를 나타내었다. 된장의 산생성 세균 분포와 혈전용해효소활성은 전통된장($R^2=0.0521$)은 음의 상관관계를, 공장산 된장($R^2=0.0903$)은 양의 상관관계를 나타내었으나 $R^2<0.1$ 로 유의적인 상관도는 거의 나타나지 않았다(Fig. 3). 전통된장의 산생성 세균 밀도는 $10^1 \sim 10^6$ CFU/g(평균 6.14×10^6 CFU/g) 수준으로 공장산 된장의 $10^6 \sim 10^7$ CFU/g(평균

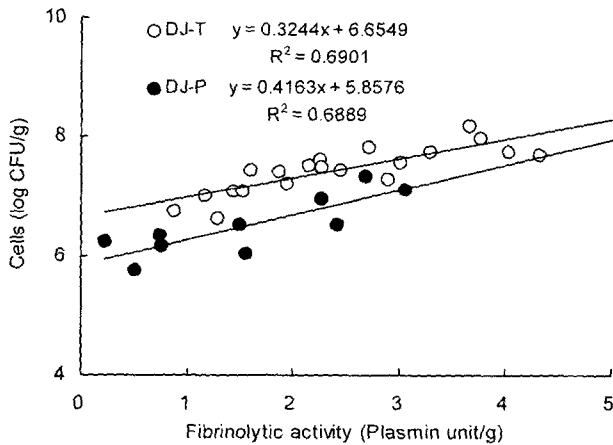


Fig. 1. A correlation between fibrinolytic activity and distribution of *Bacillus* cells in Korean traditional (DJ-T) and commercial (DJ-P) *Doenjang*.

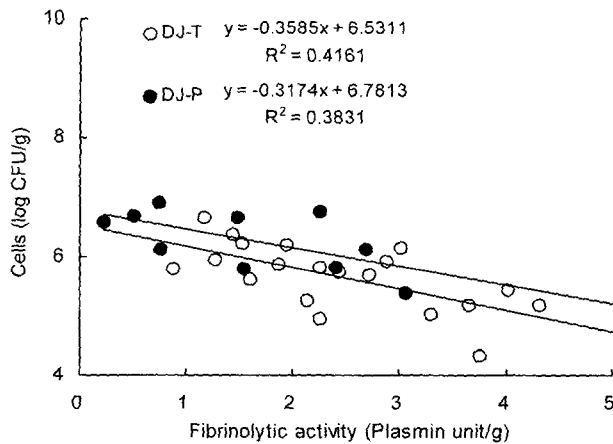


Fig. 2. A correlation between fibrinolytic activity and distribution of fungal cells in Korean traditional (DJ-T) and commercial (DJ-P) *Doenjang*.

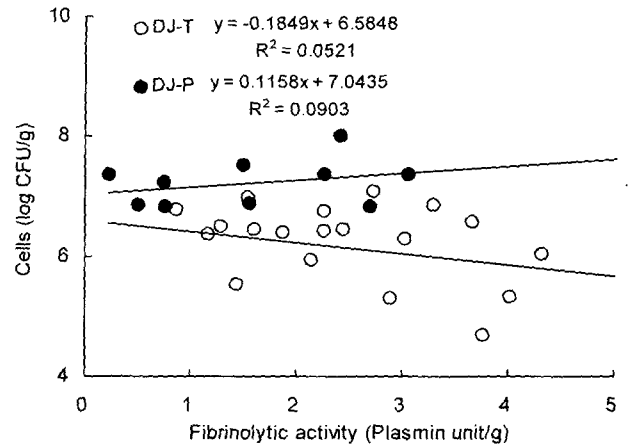


Fig. 3. A correlation between fibrinolytic activity and distribution of acid producing bacterial cells in Korean traditional (DJ-T) and commercial (DJ-P) *Doenjang*.

균 7.23×10^7 CFU/g)보다 1 log cycle 정도 낮은 분포를 나타내었다. 된장의 효모 분포와 혈전용해효소활성은 전통된장($R^2=0.1627$)과 공장산 된장($R^2=0.1141$) 모두 음의 상관관계를 나타내었으나 상관도는 낮았다(Fig. 4). 전통된장의 효모 밀도는 $10^4 \sim 10^6$ CFU/g(평균 5.11×10^5 CFU/g) 수준으로 공장산 된장의 $10^6 \sim 10^8$ CFU/g(평균 5.89×10^6 CFU/g)보다 1 log cycle 정도 낮은 분포를 나타내었다.

이러한 결과로 보아 된장의 혈전용해 활성은 *Bacillus*의 서식밀도가 클수록 높고 곰팡이나 산생성세균, 효모의 분포와는 상관도가 낮음을 알 수 있었다. 전통된장의 혈전용해활성이 공장산 된장보다 높은 것은 두 가지 제품군의 서로 다른 제조공정에 따른 microflora의 차이에 기인하는 것으로 해석된다. 전통된장과 공장산 된장은 원료뿐만 아니라 발효공정에 관여하는 microflora에도 큰 차이가 있다(30). 우리나라의 전통된장은 대부분 메주를 제조한 후 이를 염수에 담가 발효시킨 후 여액을 간장으로 분리하고 고형물질을 된장으로 사용하는 것이 일반적이다. 이에 비하여 대부분의 공장산 된장

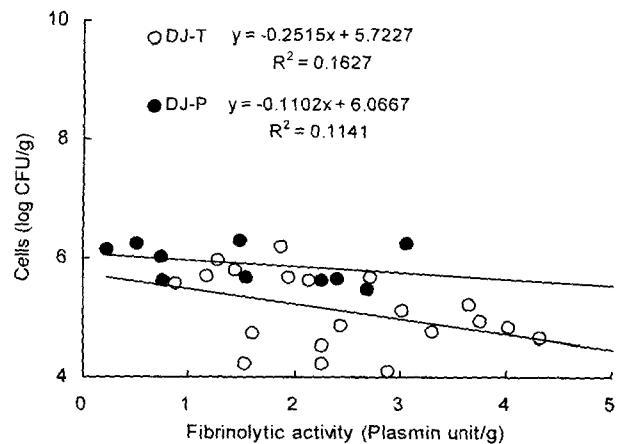


Fig. 4. A correlation between fibrinolytic activity and distribution of yeast cells in Korean traditional (DJ-T) and commercial (DJ-P) *Doenjang*.

은 일본의 miso 제조공정을 이용하여 증자된 대두 또는 탈지 대두에 탄수화물 원료인 소맥분 Koji를 혼합하여 발효시킨다. 우리나라의 전통메주는 메주의 표면으로부터 자연상태의 미생물이 착생하여 내부로 번식해감으로써 발효가 진행되며(31) 이 과정에서 메주의 표면에는 *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* 등의 곰팡이가 서식하고 내부에는 *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* 등의 *Bacillus*가 주로 성장하게 되는데 이 때, *Bacillus*의 밀도는 $10^7 \sim 10^8$ CFU/g 수준에 이르게 된다(32,33). 산업화된 된장에 사용되는 Koji의 제조는 주로 *A. oryzae*나 *A. sojae* 계통의 곰팡이를 starter로 하고 *Bacillus*의 생장은 억제시킨다(30). 따라서 본 연구에서 나타난 전통된장과 공장산 된장의 *Bacillus* 및 곰팡이 밀도의 차이는 메주와 Koji의 microflora 차이에 의한 것으로 해석할 수 있다. 전통된장과 공장산 된장의 효모와 산생성 세균의 밀도차이는 원료의 성분 차이에서 기인하는 것으로 사료된다. 콩만을 원료로 하고 비교적 염도가 높은(15~20%) 전통된장보다는 소맥분 등의 탄수화물 원료가 첨가되고 상대적으로 염도가 낮은(10~12%) 공장산 된장에서 효모와 산생성 세균의 성장률이 높은 것으로 보고되고 있다(30).

한편, 메주의 발효에 관여하는 *Bacillus*는 주로 가수분해 효소를 생산하여 영양물질을 분해하는 역할을 하며 소금이 첨가되는 된장의 발효과정에서는 거의 활성을 나타내지 못한다고 알려져 있으나(30) 실제로 장류에서 분리된 혈전용해 효소 생산균주의 대부분은 *Bacillus*속 미생물들이다(20,21,23). 따라서 된장의 혈전용해 효소 활성은 된장 발효과정보다는 메주나 Koji 제조과정에서 결정될 것으로 생각되어 된장의 원료인 메주와 Koji, 그리고 사입 이후 된장 발효과정에서의 혈전용해 활성 변화를 측정하였다.

메주와 Koji의 혈전용해효소 활성

전통된장의 주원료인 메주와 공장산 된장의 주원료인 소맥분 Koji의 혈전용해 효소활성 분포와 *Bacillus* 및 곰팡이의 밀도를 조사하였다. 메주의 혈전용해 활성은 3.67~9.79 unit/g(평균 6.54 unit/g) 수준으로 Koji의 0.86~3.47 unit/g(평균 1.46 unit/g)보다 5 unit 이상 높은 분포를 나타내었다. *Bacillus* group 분포와 혈전용해효소활성은 메주($R^2=0.8394$)와 Koji($R^2=0.5317$) 모두 양의 상관관계를 나타내었으며 특히 메주의 상관관계가 유의적으로 높았다(Fig. 5). 메주의 *Bacillus* 밀도는 $10^6 \sim 10^8$ CFU/g(평균 6.5×10^7 CFU/g) 수준으로 Koji의 $10^3 \sim 10^5$ CFU/g(평균 2.2×10^4 CFU/g)보다 3 log cycle 정도 높은 분포를 나타내었다(Fig. 5). 곰팡이의 서식밀도와 혈전용해효소활성은 메주($R^2=0.0041$)와 Koji($R^2=0.0224$) 모두 음의 상관관계를 나타내었으나 상관도는 매우 낮았다(Fig. 6). 메주의 곰팡이 밀도는 $10^5 \sim 10^7$ CFU/g(평균 8.6×10^5 CFU/g) 수준으로 Koji의 $10^6 \sim 10^8$ CFU/g(평균 4.6×10^7 CFU/g)보다 2 log cycle 정도 낮은 분포를 나타내었다(Fig. 6).

된장 제조과정 중의 혈전용해효소 활성 변화

메주를 이용한 전통된장과 Koji를 이용한 된장의 발효과

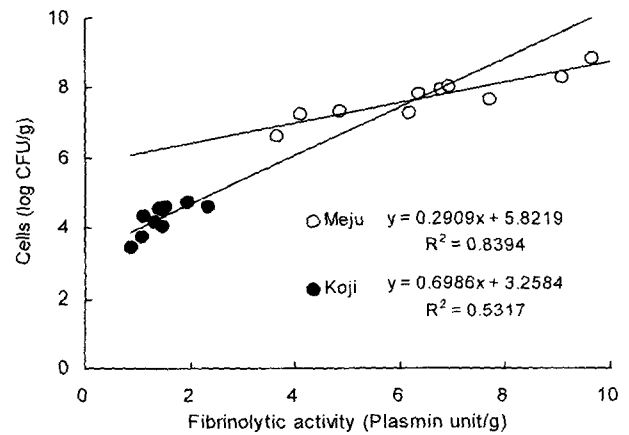


Fig. 5. A correlation between fibrinolytic activity and distribution of *Bacillus* cells in Meju and Koji.

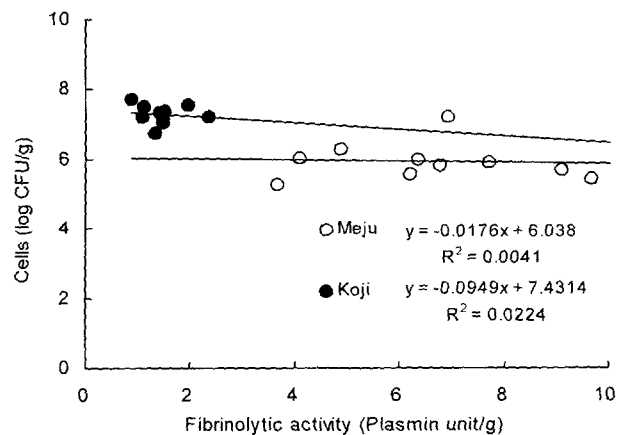


Fig. 6. A correlation between fibrinolytic activity and distribution of fungal cells in Meju and Koji.

정 중 혈전용해효소 활성과 미생물 생장을 조사하였다. 전통된장의 혈전용해 활성은 발효초기 3.2 unit/g이었으며 발효기간의 경과에도 변화를 나타내지 않았다(Fig. 7). *Bacillus* group의 밀도는 10^7 CFU/g을, 곰팡이의 밀도는 10^5 CFU/g을 유지하여 전통된장의 발효 중 *Bacillus*와 곰팡이는 휴지

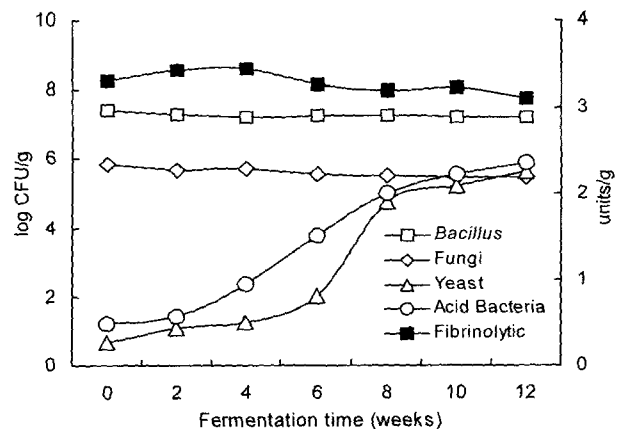


Fig. 7. Changes of fibrinolytic activity and microflora during a fermentation process of Korean traditional Doenjang.

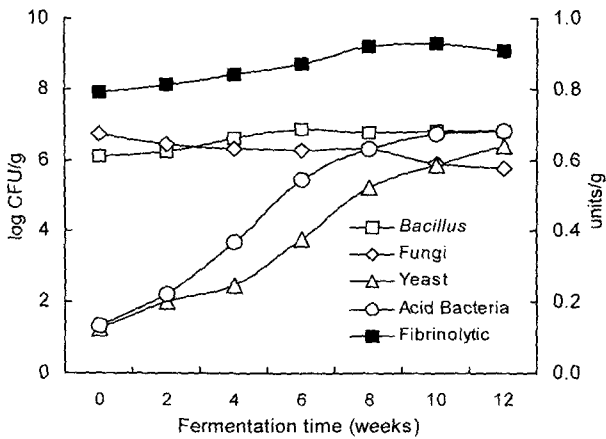


Fig. 8. Changes of fibrinolytic activity and microflora during a fermentation process of commercial *Doenjang*.

상태를 유지함을 알 수 있었다. 산생성 세균과 효모는 발효 12주 후 10^6 CFU/g 수준까지 성장하였다. Koji 된장의 혈전용해 활성은 발효초기 0.79 unit/g이었으며 발효기간의 경과에 따라 0.93 unit/g 까지 다소 증가하는 양상이었으나 효소 활성은 전통된장의 25% 수준이었다(Fig. 8). Koji 된장의 *Bacillus* group 밀도는 발효초기 10^6 CFU/g에서 발효후기에 10^7 CFU/g 수준까지 다소 증가하였으며 곰팡이의 밀도는 발효초기 10^6 CFU/g에서 발효후기에 10^7 CFU/g 수준으로 점차 낮아지는 양상이었다. 산생성 세균과 효모는 발효 12주 후 10^6 CFU/g 수준까지 성장하였다. 한편, Koji의 혈전용해효소 활성이 메주에 비하여 상대적으로 낮음에도 불구하고(Fig. 6) 공장산 된장 중에도 전통된장보다 높은 혈전용해활성을 갖는 제품이 조사되었는데(Fig. 1) 이는 생산업체별로 전통 메주나 *Bacillus*로 제국한 대두를 첨가하기 때문인 것으로 조사되었다(data not shown). 산업체에서는 대부분 대량생산 및 자동화가 용이한 일본식된장(miso) 제조공정을 적용하고 있지만 Koji와 증자대두 또는 탈지대두만을 원료로 사용할 경우 관능특성이 일본식된장(miso)에 가깝게 되므로 소비자의 선호도를 고려하여 제품에 따라 메주분말 등을 첨가하고 있으며 그 첨가량도 각기 다르다. 이상의 결과로 보아 된장의 혈전용해활성은 된장 담금 이전의 원료 구성에 따라 결정되며, 메주나 Koji에서 유래된 혈전용해 효소는 된장의 발효과정에서도 계속 활성을 유지하는 것으로 사료된다.

따라서 혈전용해효소 활성이 높은 된장을 제조하기 위해서는 된장 발효 이전의 공정, 즉 메주나 Koji의 제조공정에서 최대한 효소활성을 유도하여 된장 담금 시 첨가하는 공정의 설정이 유효할 것으로 생각되며 이를 위해서는 향후 우량균주의 분리, 효소생산 최적화 공정 등에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

전통된장과 공장산 된장 제품, 메주와 Koji, 그리고 된장

발효과정에서의 혈전용해효소 활성과 microflora의 상관관계를 조사하였다. 전통된장의 혈전용해 활성은 평균 2.42 unit/g으로 공장산 된장의 평균 1.58 unit/g보다 1 unit 이상 높은 분포를 나타내었으며 전통된장에서는 *Bacillus*의 밀도가 높았고 acid producing bacteria, 곰팡이, 효모는 모두 공장산 된장에서 높은 밀도를 나타내었다. 된장의 *Bacillus* group 분포와 혈전용해효소활성은 양의 상관관계를 나타내었으며 fungal group 분포와 혈전용해효소활성은 음의 상관관계를 나타내었다. 메주의 혈전용해 활성은 평균 6.54 unit/g 수준으로 Koji의 1.46 unit/g보다 5 unit 이상 높은 분포를 나타내었으며 *Bacillus*의 서식밀도와 높은 상관관계를 보였다. 된장 발효과정 중 *Bacillus*와 곰팡이는 휴지 상태를 유지하였으며 혈전용해효소 활성도 담금 초기의 수준을 유지하였다. 결과적으로 된장의 혈전용해활성은 된장 담금 이전의 원료 구성에 따라 결정되며, 메주나 Koji에서 유래된 혈전용해 효소는 된장의 발효과정에서도 계속 활성을 유지하는 것으로 확인되었다. 본 실험 결과, 혈전용해효소 활성이 높은 된장을 제조하기 위해서는 메주나 Koji의 제조공정에서 효소활성을 유도하여 된장 담금 시 첨가하는 공정의 설정이 유효할 것으로 제안하였다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업에 의하여 수행되었으며 그 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Furie B, Furie BC. 1988. The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 53: 505-518.
2. Rijken DC, Sakharov DV. 2001. Basic principles in thrombolysis: regulatory role of plasminogen. *Thrombosis Research* 103: S41-S49.
3. Loskutoff DJ, Schleef RR. 1988. Plasminogen activators and their inhibitors. *Methods in Enzymology* 163: 293-303.
4. Sumi H, Seiki M, Morimoto N, Tsushima H, Maruyama M, Mihara H. 1985. Plasma fibrinolysis after intraduodenal administration of urokinase in rats. *Enzyme* 33: 121-127.
5. Matsubara K, Sumi H, Hori K, Miyazawa K. 1998. Purification and characterization of two fibrinolytic enzyme from a marine green alga, *Codium latum*. *Comp Biochem Physiol* 119B: 993-999.
6. Matsubara K, Hori K, Matsuura Y, Miyazawa K. 1999. A fibrinolytic enzyme from a marine green alga, *Codium latum*. *Phytochemistry* 52: 993-999.
7. Fan Q, Wu C, Li L, Fan R, Wu C, Hou Q, He RQ. 2001. Some features of intestinal absorption of intact fibrinolytic enzyme III-1 from *Lumbricus rubellus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1526: 286-292.
8. Wu C, Li L, Zhao J, Fan Q, Tian WX, He RQ. 2002. Effect of α_2M on earthworm fibrinolytic enzyme III-1 from *Lumbricus rubellus*. *International J Biological Macromolecules* 31: 71-77.
9. Koh YS, Chung KH, Kim DS. 2001. Biochemical character-

- ization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolytic serine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom. *Toxicon* 39: 555-560.
10. Liang X, Chen J, Zhou Y, Qiu P, Yan G. 2001. Purification and biochemical characterization of F II_a, a fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon acutus* venom. *Toxicon* 39: 1133-1139.
 11. Peng Y, Huang Q, Zhang RH, Zhang YZ. 2003. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 134: 45-52.
 12. Nakamura T, Yamagata Y, Ichishima E. 1992. Nucleotide sequence of the subtilisin NAT gene, *aprN*, of *Bacillus subtilis* (natto). *Biosci Biotech Biochem* 56: 1869-1871.
 13. Sloma A, Rufo GA, Rudolph CF, Sullivan BJ, Theriault KA, Pero J. 1990. Bacillopeptidase F of *Bacillus subtilis*: Purification of the protein and cloning of the gene. *Journal of Bacteriology* 172: 1470-1477.
 14. Wu XC, Nathoo S, Pang ASH, Carne T, Wong SL. 1990. Cloning, genetic organization, and characterization of a structural gene encoding bacillopeptidase F from *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 6845-6850.
 15. Sumi H, Hamada H, Tsushima H, Mihara H, Muraki H. 1987. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia* 43: 1110-1111.
 16. Sumi H, Hamada H, Nakanishi K, Hiratani H. 1990. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol* 84: 139-143.
 17. Fujita M, Hong K, Ito Y, Misawa S, Takeuchi N, Kariya K, Nishimuro S. 1995. Transport of nattokinase across the rat intestinal tract. *Biol Pharm Bull* 18: 1194-1196.
 18. Fujita M, Nomura K, Hong K, Ito Y, Asada A, Nishimuro S. 1993. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochem Biophys Res Comm* 197: 1340-1347.
 19. Nakajima N, Taya N, Sumi H. 1993. Potent fibrinolytic enzyme from the lysate of *Katsuwonus pelamis* digestive tract (Shiokara): purification and characterization. *Biosci Biotech Biochem* 57: 1604-1605.
 20. Kim WK, Choi KH, Kim YT, Park HH, Choi JY, Lee YS, Oh HI, Kwon IB, Lee SY. 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl Environ Microbiol* 62: 2482-2488.
 21. Lee SK, Heo S, Bae DH, Choi KH. 1998. Medium optimization for fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* KCK-7 isolated from Korean traditional Chungkookjang. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 26: 226-231.
 22. Kim HK, Kim GT, Kim DK, Choi WA, Park SH, Jeong YK, Kong IS. 1997. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA 38 originated from fermented fish. *J Fermentation and Bioengineering* 84: 307-312.
 23. Kim SH, Choi NS, Lee WY, Lee JW, Kim DH. 1998. Isolation of *Bacillus* strains secreting fibrinolytic enzymes from Doenjang. *The Korean Journal of Microbiology* 34: 87-90.
 24. Noh KA, Kim DH, Choi NS, Kim SH. 1999. Isolation of fibrinolytic enzyme producing strains from Kimchi. *Korean J Food Sci Technol* 31: 219-223.
 25. Sun T, Liu B, Li P, Liu D, Li Z. 1998. New solid-state fermentation process for repeated batch production of fibrinolytic enzyme by *Fusarium oxysporum*. *Process Biochemistry* 33: 419-422.
 26. Vaughan DE. 2002. Angiotensin and vascular fibrinolytic balance. *American Journal of Hypertension* 15: 3S-8S.
 27. Kim YS, Rhee CH, Park HD. 2001. Isolation and characterization of a bacterium from Korean soy paste Doenjang producing inhibition of angiotensin converting enzyme. *Korean J Food Sci Technol* 33: 84-88.
 28. Collins CH, Lyne PM, Grange JM. 1989. *Microbiological methods*. 6th ed. Butterworths, London. p 330-334.
 29. Difco Laboratories. 1984. *Difco Manual*. 10th ed. Detroit Michigan, USA. p 492.
 30. Kim DH. 1998. Studies on the model systems of Korean traditional soy sauce using the soybean cereals fermented. *PhD Thesis*. Chonnam National Univ., Korea.
 31. Lee KH, Kim ND, Yoo JY. 1997. Survey on the manufacturing process of traditional *meju* for and of *kanjang* (Korean soy sauce). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 390-396.
 32. Yoo JY. 1998. Characteristics of *meju* and its microorganisms. 1st Symposium and Expo for Soybean Fermentation Foods. The Research Institute of Soybean Fermentation Foods, Yeungnam Univ., Korea.
 33. Kim DH, Lim DW, Bai S, Chun SB. 1997. Fermentation characteristics of whole soybean *Meju* model system inoculated with 4 *Bacillus* strains. *Korean J Food Sci Technol* 29: 1006-1015.

(2003년 6월 28일 접수; 2003년 9월 19일 채택)