

재래식 된장으로부터 혈전용해활성을 나타내는 세균의 분리 및 동정

현광욱 · 이종수¹ · 함정희² · 최신양*

한국식품연구원, ¹배재대학교 유전공학과, ²함씨네 토종콩 종합식품

Isolation and Identification of Microorganism with Potent Fibrinolytic Activity from Korean Traditional Doenjang. Hyun, Kwang-Wook, Jong-Soo Lee¹, Jung-Hee Ham², and Shin-Yang Choi*. Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea, ¹Department of Genetic Engineering, Paichai University, Daejeon 302-735, Korea, ²Hamssine native bean company, Jeollabukdo 561-840, Korea – A bacterial strain D-1 found to have potent fibrinolytic activity was isolated from Korean traditional Doenjang. It was identified as *Bacillus* sp. based on its 16S rRNA sequence analysis, morphological and physiological characteristics.

Key words : *Bacillus* sp., fibrinolytic activity, 16S rRNA sequence, Doenjang.

현대사회의 서구화된 식문화는 많은 성인병 발생의 원인이 되고 있으며 그중 순환기계통 질환이 사망요인의 다수를 차지하고 있다. 이중 심혈관계질환인 혈전증(Thrombosis)은 상처 복구시 생체내의 복잡한 blood cascade mechanism에 의해 활성화된 thrombin에 의하여 fibrinogen이 fibrin으로 전환되어 서로 중합체를 형성함으로써 생성된다[24]. 체내에 형성된 혈전의 용해는 plasminogen으로부터 plasminogen activator에 의하여 활성화된 plasmin (EC 3.4.21.7)의 작용에 의해서 용해되며[17], 이렇게 혈전이 제거되는 과정을 fibrinolysis라고 한다. 이러한 혈전의 생성과 용해과정은 체내의 조절계에 의하여 정상적으로 조절되고 있으나[6], 조절계에 의하여 정상적으로 가수분해 되지 않고 혈관에 축적될 때 뇌혈관질환, 심근경색 및 심장마비 등이 초래된다[5]. 이러한 혈전에 의한 성인병을 예방하거나 치료하기 위한 혈전용해제의 연구가 활발히 진행되어 오고 있다.

현재까지 많이 사용되고 있는 혈전용해제로는 plasmin을 절단시키는 효소인 urokinase와 tissue-type plasminogen activator (t-PA)가 있으며[22], 심장병과 발작치료에 이용되는 미생물 기원의 streptokinase도 사용되고 있다[19]. 그러나 urokinase 및 streptokinase 등은 가격이 고가일 뿐만 아니라 정맥주사로 투여되어, 혈중에서 반감기가 매우 짧고[18], urokinase를 제외하고는 경구투여가 불가능하다는 단점을 가지고 있다. 이에 식품의 섭취를 통해 뇌졸중, 심근경색, 혈전증 등을 미연에 방지하거나 개선시킬 수 있는 새로운 물질을 찾는 연구가 활발히 진행 중이다.

이미 일본의 전통발효식품인 낫도 (natto)에서 분리한 serine protease 유형의 nattokinase[6]는 경구 투여시 생체내의 혈

전용해능을 높일 수 있다고 보고 되어있다. 이 nattokinase는 콩을 발효시킬 때 *Bacillus natto*가 대두의 영양분을 섭취, 생육하면서 생성하는 혈전용해효소로서, 직접적이고 강력한 혈전분해 능력과 pro-urokinase 활성화 능력을 갖고 있는 것으로 알려지고 있다[7, 8, 9]. 우리나라의 전통식품 중에는 청국장, 된장과 간장 등의 발효시에 *Bacillus subtilis*가 혈전용해효소[10, 11, 12, 13]를 생산하는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 혈전용해능이 우수한 효소를 생산하는 균주를 분리하여 이를 전통 장류에 응용하고자 전통된장으로부터 혈전용해활성이 우수한 세균을 분리하여 16S rRNA 서열분석 등을 통하여 동정하였다.

재료 및 방법

시료

균주 분리에 사용한 nutrient medium, trypticase soy medium 그리고 skim milk는 Difco사의 제품을 사용하였으며, 된장은 전국의 주요 재래시장에서 시판되고 있는 제품을 수집하여 사용하였다. Fibrinogen, Fibrin, Thrombin 등은 Sigma 사의 제품을 구입하여 사용하였으며 그 외의 시약은 특급시약을 사용하였다.

균주의 배양 및 선발

혈전용해효소를 생산하는 균주를 분리하기 위하여 재래식 된장시료 1 g을 멸균수 10 ml에 현탁하여 37°C에서 1시간 동안 반응시키고, 이 반응액 100 µl을 nutrient agar medium (NA)에 도말하여 24시간 배양하였다. NA 배지에 생성된 colony 각각을 2% skim milk를 첨가한 plate count agar medium (PCA)에서 18시간 배양하였고, 균의 생육과정에서 단백질 분해효소를 생산하여 투명환 (clear zone)을 나타내는 균주를 1차 선별하였다. 선별된 균주들은 다시

*Corresponding author

Tel: 82-31-780-9107, Fax: 82-31-780-9107

E-mail: choisy@kfri.re.kr

trypticase soy broth medium (TSB)에 배양 후 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 혈전용해효소 활성을 측정하여 이중 가장 활성이 높은 균주를 선발하였다.

혈전용해효소 활성의 측정

Fibrin 용액을 이용한 혈전용해효소 활성 측정 : Ehrlich 방법 [3]을 이용하여, 먼저 0.6% fibrin용액을 3 ml의 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 넣고 조효소액 500 μ l를 첨가하여 40°C에서 10분간 반응시켰다. 이 반응액에 0.4 M TCA 용액 3 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 여과하였다. 이 여과액 중 1 ml를 sodium carbonate 4 ml에 첨가하고 여기에 1 N folin 시약 1 ml를 가하여 발색된 tyrosine량을 정량 하였으며, 이때 효소 1 unit은 조효소액 1 ml가 1 분 동안 tyrosine 1 μ g을 생산하는 활성으로 하였다.

Fibrin plate를 이용한 혈전용해효소 활성 측정 : Astrup 방법 [1]을 변형하여, 먼저 0.6% fibrinogen을 10 ml의 0.15 M NaCl이 함유된 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 현탁하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 페트리디쉬에 붓고, thrombin 10 unit를 넣어 실온에서 10분간 방치시켜 평판배지를 만들었다.

이 fibrin plate에 조효소용액 50 μ l를 흡수시킨 원형 (d=0.8 cm)의 paper disk (Toyo Roshi, Japan)를 놓고 37°C에서 4시간 반응시켰다. 반응 후에 생긴 용해환이 원형인 경우 서로 수직인 두 개의 지름을 측정하며, 용해환이 타원인 경우에는 가장 긴지름 (d₁)과 가장 짧은지름 (d₂)을 측정하여 용해환의 면적 (cm²= $\pi \times d_{1/2} \times d_{2/2}$)을 계산하였다. 그리고 생성된 효소의 활성은 표준 plasmin을 농도별로 다양하게 조절하여 fibrin plate에 50 μ l씩 가하여 형성된 용해환의 면적을 측정한 후 생성한 plasmin 효소의 활성의 표준 곡선과 비교하여 plasmin μ g으로 환산하였다.

분리균주의 동정

분리균주의 세포막 지방산 조성은 우선, 세포막의 지질로부터 지방산을 추출한 후 메틸에스터화 시킨 다음 가스크로마토그래피를 실시하고 얻은 크로마토그램을 Microbial Identification System (Microbial ID, Inc., Delaware, USA)으로 확인하였다.

균주의 탄수화물에 대한 이용성은 API 50CHB (bio-Merieux, France)를 사용하여 측정하였다. 우선, 멸균 swap을 이용한 간이분석 결과에 따라 선택된 지시약이 포함된 kit medium에 접종 후 strip에 분주하여 24시간 경과 후 판독, API analytical profile index로 분석 하였다. 또한, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 하기 위하여 16S rRNA 유전자의 보전적 지역의 염기서열을 primer (27F, 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG; 1492R, 5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T)로 합성하여 분리균의 16S rRNA 유전자 단편을 PCR 반응으로 증폭시켰다. PCR 반응

후 얻어진 반응물을 전기영동하여 DNA 단편을 회수하여 이를 주형으로 하여 PCR 반응에 이용한 primer들과 함께 DNA 염기서열 결정에 사용하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리

청국장과 일본의 낫토 (natto) 등에서 분리되어 혈전용해효소를 생산하는 균으로 알려져 있는 대부분의 *Bacillus* 속 균주가 많은 종류의 protease를 균체 밖으로 분비하며, 이들이 생산하는 alkaline protease는 fibrin을 강력히 분해하는 성질을 가지고 있다고 보고되었다[4, 10, 21]. 따라서 우선 단백질 분해효소를 생산하는 균주를 1차 분리하기 위하여 전국에서 수집한 21개의 재래식 된장으로부터 채취한 시료를 nutrient agar plate에 평판 희석배양법으로 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 각각의 colony를 2% skim milk를 첨가한 NA plate에 spot 하여 37°C에서 24시간 배양했을 때 clear zone을 생성하는 균주를 선별한 결과, 51종의 균주를 분리하였고, 이중 1.5 cm 이상의 투명환을 형성하여 높은 protease 활성을 보였던 27개 균주를 1차 선별하였다 (data not shown).

혈전용해효소활성 측정

Skim milk를 이용하여 단백질 분해능이 높게 확인되었던 1차 선별된 균들의 혈전용해효소 활성을 측정하기 위하여 각각 TSB (trypticase soy broth)에서 18시간 배양하였다. 배양 후 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하여 0.6% fibrin 용액을 기질로 사용하여 혈전용해효소 활성을 측정한 결과 17개 균주에서 활성이 확인되었으며, 이중 D-1균주에서 39.1 unit으로 가장 높은 활성을 보였다(Table 1). 혈전용해효소 활성이 없었던 나머지 10개의 균주들은 fibrin을 분해하지 못하는 protease를 생산하는 것으로 생각되었고, 이중 20 unit 이상의 활성을 보인 6균주들을 2차 선별하였고

Table 1. Fibrinolytic activities of the culture supernatant from secondary screened strains.

Strain No	Fibrinolytic activity (unit ¹)	Strain No	Fibrinolytic activity (unit)
D-1	39.1	D-25	27.5
D-2	24.7	D-31	10.6
D-4	21.4	D-33	1.2
D-7	15.8	D-42	10.7
D-8	12.9	D-47	24.7
D-9	5.2	D-48	8.1
D-13	5.4	D-49	2.4
D-15	6.4	D-51	26.8
D-21	10.1		

¹One unit of the activity was defined as the production of 1 μ g of the tyrosine per min by 1 ml of crude enzyme.

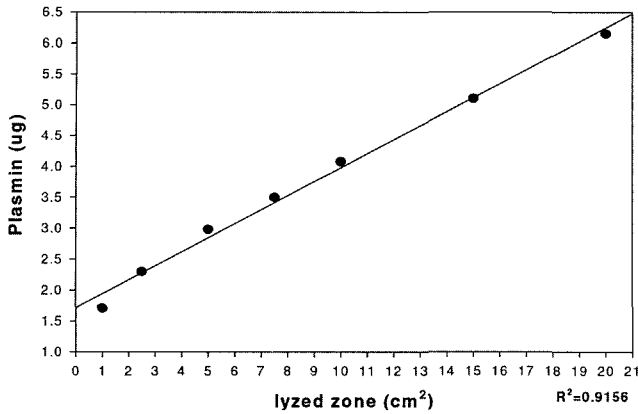


Fig. 1. Fibrinolytic activity of standard curve from plasmin.

fibrin용액에서의 혈전용해효소 활성은 D-1, 25, 51, 2, 47 그리고 4번 균주 순으로 높게 나타났다.

동시에, 2차로 선별된 17 균주 중 혈전용해효소 활성이 높았던 6개 균주를 대상으로 fibrin plate 법을 이용하여 용해환의 면적을 측정 후 생성한 plasmin 효소의 활성의 표준곡선(Fig. 1)과 비교하여 plasmin µg으로 환산하였다. TSB에서 18시간 배양한 배양 상등액을 조효소액으로 4시간 반응시켜 혈전용해효소활성을 측정 한 결과 역시 fibrin 용액에서도 가장 높은 활성을 나타냈던 D-1 균주가 fibrin plate 법에서도 가장 높은 혈전용해효소활성을 보였다. 그러나 fibrin 용액을 기질로 사용하여 활성이 높게 측정되었던 균주 모두가 fibrin plate에서도 높게 측정되지는 않았다. 이것은 fibrin을 수용성 상태로 활성을 측정하는 방법에서 높은 활성을 보인 균들이 불용성 상태로 존재하는 fibrin을 분해하는 능력이 떨어질 수도 있으며 이러한 것들은 생체내 존재할 수 있는 불용성 상태의 fibrin을 용해하는데 효과적이지 못한 것으로 판단되어 fibrin의 수용성 상태와 불용성 상태에서 모두 활성이 높았던 D-1균주를 선별하였다. 따라서 최종적으로 선별된 D-1 균주의 혈전용해효소 활성은 표준물질인 plasmin (2.51 µg)과 비교하였을 때 그 활성이 같았다 (Table 2).

균주의 동정

최종 선정된 D-1 균주를 동정하기 위하여 우선 생화학적 특성을 조사하였다. 이를 위하여 API system (bio-Merieux, France)을 사용하여 분석한 결과, 그람 양성균의 간균이며 호기성으로 Catalase test에서는 양성으로 나타났다. 또한, 49 종류의 탄수화물에 대한 이용성을 API analytical profile index 이용하여 분석한 결과, 83%이상의 신뢰도를 보이는

Table 3. Assimilation of carbon sources of D-1 strain.

Carbohydrate	D-1 strain	Carbohydrate	D-1 strain
Glycerol	+	Salicin	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	-	Lactose	-
Ribose	+	Melibiose	-
D-Xylose	+	Sucrose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	-
β-Methyl-D-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	-	Raffinose	+
Glucose	+	Amidon(starch)	+
Fructose	+	Glycogen	+
Manose	+	Xylitol	-
Sorbose	-	Gentiobiose	-
Rhamnose	-	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
Mannitol	-	D-Fucose	-
Sorbitol	+	L-Fucose	-
α-Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α-Methyl-D-glucoside	+	L-Arabitol	-
N-Acetyl glucosamine	+	Gluconate	-
Amygdalin	+	2-keto-gluconate	-
Arbutin	+	5-keto-gluconate	-
Esculin	+		

+ : utilized, -: not utilized.

*Bacillus subtilis*로 분석 되었다(Table 3).

세포막 지방산 조성은 세균을 분류하고 동정하는데 주요한 지표가 되고 있기 때문에[16], Microbial Identification System을 사용하여 D-1균주의 세포막 지방산 조성을 분석하였다. 그 결과, C15:0iso가 25.6%, C17:0iso가 12.48%, C15:0anteiso가 36.57%, C17:0anteiso가 9.49% 이었으며, Library를 이용하여 조성의 유사성을 분석한 결과 59.3% 유사성을 보였으며 *Bacillus subtilis*와 유사한 균으로 나타났다(data not shown). 이와 같이 탄수화물 이용성과 세포막 지방산 분석을 통해서 동정한 결과는 *Bacillus subtilis*로 동정되었으나 판정의 기준이 95% 이상의 신뢰도를 보이지 못하는 수준이었다. 하지만 생화학적 특성과 세포막 지방산 분석 결과로 *Bacillus subtilis*와 유사한 균으로 동정할 수 있었다.

마지막으로 16S rRNA 유전자의 일부분을 PCR 반응으로 증폭하여 DNA 염기서열을 결정하였다(Fig. 2). D-1균의 16S rRNA 염기서열을 NCBI의 GenBank 프로그램을

Table 2. Fibrinolytic activities of the culture supernatant from final screened strain.

Strain No	D-1	D-2	D-4	D-25	D-47	D-51
Plasmin (µg)	2.51	1.01	0.81	1.40	0.47	0.81

1	<u>CUGCUCAGGACGAACGCUGGCGGCGUGCCUAAUACAUGCAAGUCGAGAGG</u>	50
51	<u>ACAGAUGGGAGCUUGCUC<u>CCUGAUGUUAGCGGGCGGACGGGUGAGUAACAC</u></u>	100
101	<u>GUGGGUAACCUGCCUGUAAGACUGGGUAACUCCGGGAAACCGGGGCUA<u>A</u></u>	150
151	<u>UACCGGAUGCUUGUUUGAACCGCAUGGUUCAAACAUAAAAGGUGGCUUC</u>	200
201	<u>GGCUACCACUUACAGAUGGACCCGCGGCGCAUUAGCUAGUUGGUGAGGUA</u>	250
251	<u>ACGGCUCACCAAGGCGACGAUGCGUAGCCGACCUGAGAGGGUGAUCGGCC</u>	300
301	<u>ACACUGGGACUGAGACACGGCCCAGACUCCUACGGGAGGCAGCAGUAGGG</u>	350
351	<u>AAUCUUCCGCAAUGGACGAAAGUCUGACGGAGCAACGCCGCGUGAGUGAU</u>	400
401	<u>GAAGGUUUUCGGAUCGUAAAGCUCUGUUGUUAGGGAAGAACAAGUGCCGU</u>	450
451	<u>UCAAAUAGGGCGGCACCUUGACGGUACCUAACCAGAAAGCCACGGCUAAC</u>	500
501	<u>UACGUGCCAGCAGCCGCGGUAUACGUAGGUGGCAAGCGUUGUCCGGAU</u>	550
551	<u>UAUUGGGCGUAAAGGGCUCGCAGGCGGUUCUUAAGUCUGAUGUGAAAGC</u>	600
601	<u>CCCCGGCUC<u>AACCGGGGAGGGUCAUUGGAAACUGGGGAACUUGAGUGCAG</u></u>	650
651	<u>AAGAGGAGAGUGGAAUCCACGUGUAGCGGUGAAAUGCGUAGAGAUGUGG</u>	700
701	<u>AGGAACACCAGUGGCGAAGGCGACUCUCUGGUCUGUAAACUGACGCUGAGG</u>	750
751	<u>AGCGAAAGCGUGGGGAGCGAACAGGAUUAGAUACCCUGGUAGUCCACGCC</u>	800
801	<u>GUAAACGAUGAGUGCUAAGUGUUAGGGGUUCCGCCCCU<u>UAGUGCUGCA</u></u>	850
851	<u>GCUAACGCAUUAAGCACUCCGCCUGGGAGUACGGUCGCAAGACUGAAAC</u>	900
901	<u>UCAAAGGAAUUGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGUGGAGCAUGUGGUUAAU</u>	950
951	<u>UCGAAGCAACGCGAAGAACCUUACCAGGUCUUGACAUCCUCUGACAAUCC</u>	1000
1001	<u>UAGAGAUAGGACGUCC<u>CCUUCGGGGGCAGAGUGACAGGUGGUGCAUGGUU</u></u>	1050
1051	<u>GUCGUCAGCUCGUGUCGUGAGAUGUUGGGUUAAGUCCCGCAACGAGCGCA</u>	1100
1101	<u>ACCCUUGAUCU<u>UAGUUGCCAGCAUUCAGUUGGGCACUCUAAGGUGACUGC</u></u>	1150
1151	<u>CGGUGACAAACCGGAGGAAGGUGGGGAUGACGUCAA<u>UACAUGCCCU</u></u>	1200
1201	<u>UAUGACCUGGGCUACACACGUGCUACAAUGGGCAGAACAAGGGCAGCGA</u>	1250
1251	<u>AACCGCGAGGUUAAGCCAAUCCCAAAUCUGUUCU<u>CAGUUCGGAUCGCA</u></u>	1300
1301	<u>GUCUGCAACUCGACUGCGUGAAGCUGGAAUCGCUAGUAAUCGCGGAUCAG</u>	1350
1351	<u>CAUGCCGCGGG</u>	1360

Fig. 2. Nucleotide sequence of the partially amplified 16S rRNA gene from *Bacillus* sp. D-1 by PCR.

* *Bacillus* sp. AH-E-1 sequence are underline.

사용하여 상동성을 조사하여 본 결과, *Bacillus* 속에서 보고된 염기서열과 높은 상동성을 보였다. 비교한 1360개의 염기 중 1353개가 *Bacillus* sp. AH-E-1와 일치하여 99.5% 상동성을 보였고, 이밖에 *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* 등과는 각각 97% 이상의 상동성을 보였다(data not shown). 탄수화물 이용성, 세포막 지방산 분석 그리고 16S rRNA sequence를 통하여 *Bacillus* 속으로 최종 동정 할 수 있었고, 이에 된장으로부터 분리한 혈전용해효소를 생산하는 D-1균주를 최종적으로 *Bacillus* sp. D-1으로 명명하였다.

요 약

전통 된장으로부터 단백질 분해능이 있으면서 혈전용해활

성이 우수한 D-1 균주를 분리하였다. 분리된 D-1 균주는 표준물질인 plasmin 2.51 μ g과 같은 혈전용해효소활성을 보였으며 이 균주를 동정하기 위하여 세포막 지방산 조성 분석과 탄수화물 이용성을 조사한 결과 김 등[12], 허 등[7]이 청국장에서 혈전용해효소활성을 보이는 균주로 보고된 *Bacillus subtilis*로 유사하게 나타났다. 탄수화물 이용성, 세포막 지방산 분석 그리고 16S rRNA sequence를 통하여 *Bacillus* 속으로 동정 할 수 있었고, 이에 된장으로부터 분리한 혈전용해효소를 생산하는 D-1균주를 최종적으로 *Bacillus* sp. D-1으로 명명하였으며 앞으로 이 균주를 이용하여 혈전용해효소를 함유하는 기능성 된장과 청국장 제조에 큰 효과를 보일 것으로 기대된다.

REFERENCES

1. Astrup, T. and S. Muullertz. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Archs. Biochem. Biophys.* **40**: 346.
2. Daka, M. D. and C. P. Semba. 1995. Thrombolytic therapy in venous occlusive disease. *J. Vasc. Interv. Radiol.* **6**: 73-77.
3. Ehrlich, H. J., N. U. Bang, S. P. Little, S. R. Jaskunas, B. J. Weigel, L. E. Mattler, and C. S. Harms. 1987. Biological properties of a kringless tissue plasminogen activator mutant. *Fibrinolysis* **1**: 75-77.
4. Fujita, M., K. Nomura, K. Hong, Y. Ito, A. Asada, and S. Nishimuro. 1993. Purification and characterization of strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**: 1340-1347.
5. Gomez, C. C., R. Simoncarballo, A. C. Coma, T. Sanchez de Leon, D. E. Montero, and P. R. Rodriguez. 1991. The relationship between lipid peroxidation and platelets aggregation in atherosclerotic patients. *Angiologia* **43**: 241-246.
6. Harlan, J. M. and L. A. Harker. 1981. Haemostasis, thrombosis and thromboembolic disorder. *Med. Clin. North Am.* **65**: 855-857.
7. Huh, S., S. K. Lee, and H. G. Ju. 1998. Isolation and identification of the fibrinolytic bacterial from traditional food (*Chungkookjang*). *Kor. J. Agri. Chem. Biotechnol.* **41**: 119-124.
8. Jang, Y. R., W. K. Kim, I. B. Kwon, and H. Y. Lee. 1998. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from Jeot-Gal, salt-fermented fish. *Kor. J. Food. Sci. Tech.* **30**: 655-659.
9. Kil, J. O., G. N. Kim, and I. S. Park. 1998. Production and characterization of fibrinolytic enzyme: optimal condition for production of the enzyme from *Bacillus* sp. KP-6408 isolated from *Chungkook-jang*. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **27**: 51-56.
10. Kim, W. E., K. H. Choi, Y. T. Kim, H. H. Park, J. Y. Choi, Y. S. Lee, H. I. Oh, I. B. Kwon, and S. Y. Lee. 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK11-4 screened from *Chungkook-jang*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2482-2488.
11. Kim, W., N. S. Choi, W. Y. Lee, J. W. Lee, and D. H. Kim. 1998. Isolation of *Bacillus* strains secreting fibrinolytic enzymes from *Doen-Jang*. *Kor. J. Microbiol.* **34**: 87-90.
12. Kim, Y. T., W. K. Kim, and H. I. Oh. 1995. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from *Chungkook-jang*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 1-5.
13. Lee, J. S., H. S. Baik, and S. S. Park. 2002. Optimal production and characterization of fibrinolytic enzyme from *Fomitella fraxinea* Mycelia. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 325-331.
14. Lee, S. K., D. H. Bae, and K. H. Choi. 1998. Medium optimization for fibrinolytic enzyme by *Bacillus subtilis* KCK-7 isolated from Korean traditional *Chungkookjang*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 52-55.
15. Lee, S. K., D. H. Bae, T. J. Kwon, S. B. Lee, H. H. Lee, J. H. Park, S. Heo, and M. G. Jhonson. 2001. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KDO-13 isolated from soybean paste. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 845-852.
16. Mitsugu, F., K. Hong, Y. Ito, R. Fujii, K. Kariya, and S. Nishimuro. 1995. Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat. *Biol. Pharm. Bull.* **18**: 1387-1391.
17. Mullertz, S. 1987. Fibrinolysis, general aspects, characteristic features and perspectives, Int'l Committee for fibrinolysis Prize Lecture. *Fibrinolysis* **1**: 3-12.
18. Nakajima, N., H. Mihara, and H. Sumi. 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 1730.
19. Nakashima, A., T. Okada, and I. Sugie. 1990. Fibrin-dependent activation of plasminogen by a proteolytic digest of streptokinase. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **1**: 279-284.
20. Sumi, H., H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara, and H. Muraki. 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.
21. Sumi, H., H. Hamada, N. Nakanishi, and H. Hiratani. 1990. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol.* **84**: 139-143.
22. Voet, D. and J. G. Voet 1990. *Biochemistry*. pp.1087-1091 John Wiley & Sons, New York, USA.
23. Yoo, C. K., W. S. Heo, C. S. Lee, and S. M. Kang. 1998. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme excreted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from Chung Guk Jang. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 507-514.

(Received Feb. 1, 2005/Accepted Mar. 14, 2005)