

청국장으로부터 Fibrin 분해 세균의 분리 및 이를 이용한 발효 청국장의 생리활성

이동근 · 김남영 · 장민경 · 유병홍¹ · 김기영¹ · 김성구¹ · 정영기² · 이상현*
신라대학교 의생명과학대학 제약공학과, ¹(주)바이오포트 코리아, ²동아대학교 생명공학과

Isolation of a Fibrinolytic Bacterium from Cheongkukjang and Characterization of Its Bioactivity. Lee, Dong-Geun, Nam-Young Kim, Min-Kyung Jang, Byung Hong Yoo¹, Ki Young Kim¹, Sung Goo Kim¹, Yong-Kee Jeong², and Sang-Hyeon Lee*. Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan 617-736, Korea, ¹Bioport Korea Corp. Busan 617-736, Korea, ²Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea – In this study, we have isolated and identified a proteolytic bacterium from conventional Cheongkukjang. We also characterized several bioactivity of Cheongkukjang, which was fermented by an isolated strain. One strain out of about 10⁴ strains obtained from Cheongkukjang showed relatively high proteolytic activity was selected and named as a *Bacillus subtilis* LSH805 strain. White soy-bean Cheongkukjang possessed less odor and more viscous substance than black soy-bean Cheongkukjang. Cheongkukjang showed fibrinolytic activity, and about 1,500 mg fibrin was degraded after 20 h incubation. Although nitric oxide (NO) assays of soy-bean and Cheongkukjang were almost the same, their activities were significantly higher than that of no treatment. Activity of water fraction of Cheongkukjang was somewhat higher than that of soy-bean. Fibrinolytic and NO assays of Cheongkukjang suggest that Cheongkukjang, which was fermented by an isolated strain may be a useful candidate for natural fibrinolytic and macrophage-stimulating agents.

Key words: *Bacillus subtilis*, Cheongkukjang, fibrinolytic activity, nitric oxide assay

현재 우리나라의 사망률 1위를 기록하는 원인은 심혈관 질환이다. 심혈관 질환의 주요 원인인 혈전증의 치료제로 현재까지 개발된 것은 streptokinase, tissue-type plasminogen activator, lumbrikinase[20] 등이 있다. 하지만 이들은 비교적 고가이고 활성 반감기가 짧을 뿐만 아니라 전신출혈 등의 부작용을 나타내며 경구용으로 사용하기에는 부적합한 단점이 있다[7, 20]. 이에 따라 식품섭취를 통해 혈전증 등을 사전에 예방하거나 개선할 수 있는 신물질을 찾기 위한 노력이 진행 중에 있다[7, 17, 24, 26].

콩발효 식품에는 우리나라의 청국장과 된장, 일본의 미소와 낫토, 인도네시아의 템페 등이 있으며, 이들은 항산화[22], 혈압강화와 정상 작용[23] 등의 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 일본의 콩발효 식품인 낫토에서 유래한 nattokinase의 경구 투여로 생체내 혈전 용해능을 높일 수 있다는 보고도 있어[7, 24] 심혈관 질환 예방 및 치료를 위한 건강기능성 식품으로 각광받고 있다.

청국장 발효과정에서 균들이 생산하는 효소들에 의해 콩 껍질 등 섬유소 성분과 세포 내 당류 그리고 단백질 등이 분해되어 소화율이 향상되며, 청국장 발효과정에서 폴리클루

타민산과 다당류인 프락탄이 결합된 물질인 끈적끈적한 점액질 성분이 형성되기 때문에 발효의 정도를 알 수 있다[18]. 청국장의 혈전용해 활성[5]과 면역증강활성[15]은 세균에 의한 것으로 알려져 있으며[5] 우수 균주를 분리하여 의약품 또는 식품첨가물의 재료로 이용할 수 있어 산업적으로 유망하다.

Nitric oxide(NO)는 생체내에서 혈관이완 및 자궁이완, 신경계에서의 신호전달기능, 유전자의 발현조절, 세포내 병원성 미생물에 대한 방어기능 및 일부 종양세포들에서 세포독성을 나타내는 등, 매우 다양한 기능을 가지고 있다[1, 14, 25]. 또한 염증반응에 동원되는 세포들과 기타 대식세포(macrophage) 등 면역세포들로부터 생성되는 NO는 주로 여러 cytokine의 자극을 받은 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 효소작용에 의해 생성된 것으로서 이를 세포면역성의 분자생물학적 지표로 인정하고 있다[6, 8, 21, 25]. 한편, 반감기가 극히 짧은 NO 대신에 그 대사물인 nitrite 및 nitrate를 측정함으로써 NO의 생성을 정량적으로 유추할 수 있게 되었다[4, 9].

청국장에 관한 연구는 크게 균주와 발효조건에 따른 제품 품질 변화에 관한 연구, 청국장의 생리활성 물질에 관한 연구로 나눌 수 있다[18]. 이에 본 연구에서는 항혈전 효과가 우수한 균주를 분리하고 이를 이용한 발효청국장의 항혈전 및 대식세포주에 대한 NO 생성 효과를 보고한다.

*Corresponding author

Tel: 82-51-999-5624, Fax: 82-51-999-5636

E-mail: slee@silla.ac.kr

재료 및 방법

미생물의 분리 및 배양

단백질 분해효소를 생산하는 미생물을 분리하기 위하여 재래시장에서 판매하는 청국장을 시료로 이용하였다. 시료 1 g을 100 ml의 인산완충용액(pH 7.0)에 현탁시킨 후 희석시켰고 2%(w/v) casein(Sigma, U.S.A.)을 포함하는 영양한천(nutrient agar)배지에 도말하여 30°C에서 24시간 배양하였다. Casein 분해에 의해 생기는 clear zone의 크기를 측정하여 단백질 분해활성이 높은 후보 균주를 선택하였다. Casein 함유 배지로 분해활성이 있는 균주만을 분리하여 순수배양하였다.

분리균주의 동정

단백질 분해활성이 가장 우수한 균주의 동정을 위하여 16S rDNA 염기서열분석을 실시하였다. 분석된 염기서열은 Blast를 사용하여 공시균주와 유사도를 검토하였으며, 윈도우 버전의 Clustal 프로그램(ClustalX ver. 1.8)을 이용하여 다중염기배열(multiple alignment)을 수행한 후 neighbor-joining method와 bootstrap method(n=1000)로 분석하여 계통분류학적 위치를 파악하였다.

선별된 균주를 이용한 청국장 발효

청국장 발효를 위하여 백태와 흑태 콩을 각각 1 kg씩 이용하였다. 흐르는 수돗물에 콩 1 kg을 씻고 4°C 물에 24시간 담근 후 20분간 물을 제거하였다. 콩에 함유된 고초균 등의 멸균을 위하여 121°C에서 40분간 멸균을 2번 수행하였다. 실온으로 냉각된 콩에 미리 배양한 분리균주 배양액을 3%(v/w)로 균일하게 접종하고 37°C에서 24시간 발효를 행하였다. 본발효 후에 4°C에서 하룻밤동안 후발효를 행하였다.

청국장의 발효취와 점액질 성분의 진 길이 측정

분리된 균주를 이용하여 백태 및 흑태를 대상으로 발효를 행한 청국장 시료들의 발효취를 비교하여 청국장의 기호성을 판단하기 위하여, 물질의 냄새를 측정하여 그 값을 수취로 나타내는 휴대용 냄새 측정기(Model # OMX-GR, Shinyei, Japan)를 이용하여 발효된 청국장들의 냄새를 측정하여 비교하였다. 청국장 점액질 성분의 양에 따라 나타나는 진의 길이의 차이를 측정하기 위하여 백금이를 이용하여 발효 청국장 표면을 문지른 후 천천히 떼어 내면서 점액질 물질이 끊어지지 않고 늘어나서 따라오는 최대 길이를 구하였다.

청국장의 혈전분해활성

청국장의 혈전에 대한 분해활성은 인간 fibrin plate를 이용하여 Astrup와 Mullertz의 방법을 토대로 측정하였다 [3]. 100 mm petri dish에 thrombin 용액(50 unit/ml, Sigma)을 200 µl 주입한 후, 여기에 0.1 M phosphate(pH 7.5)

buffer에 0.5%(w/v)가 되도록 녹인 fibrinogen(Sigma) 용액 10 ml를 주입하고 잘 섞어주었다. fibrin이 굳을 때까지 실온에서 30분간 방치하여 fibrin plate를 제작하였다. 제작된 fibrin plate의 중앙에 발효된 청국장 0.5 g을 놓고 37°C에서 20 h까지 반응을 행하며 5회에 걸쳐 분해되는 액체의 무게를 측정하고 그 누적치를 그래프에 나타냈다.

원료콩 및 청국장 추출분획물 제조

원료콩 및 청국장 추출분획물 제조과정 모식도는 Fig. 4와 같다. 원료콩 및 발효 후 건조시킨 청국장 분말에 10배량(w/v)의 80% ethanol로 약 60°C에서 8시간 동안 추출을 행하였으며, 추출액은 Whatman NO.3 여과지(Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 2회 여과하여 이를 에탄올 추출시료로 하였다. 에탄올 추출시료를 다시 hexane, ethyl ether, butanol, methanol, H₂O 등을 이용하여 Fig. 4에 나타난 방법으로 분획을 행한 후, 농축하여 각각의 용매에 대한 분획물을 제조하였다.

청국장의 대식세포주에 대한 Nitric Oxide(NO) 생성능 측정

생쥐 대식세포 RAW 264.7을 10%의 fetal bovine serum (FBS, BioWhittaker, Walkersville, MD, U.S.A.)이 포함된 RPMI 1640 배지(BioWhittaker)에서 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양한 후 96-well plate(Roche Inc.)에 분주하고 24시간 배양하였다. 배지를 제거한 후 배양세포를 phosphate-buffered saline(PBS, BioWhittaker)로 세정한 후 원료콩 및 청국장 추출분획물들을 PBS(BioWhittaker)에 희석하여 20 µl씩 첨가하였다(최종농도: 0.5, 0.1, 0.01 mg/ml). 대조군은 추출분획물 대신 동량의 PBS(BioWhittaker)를 가하였다. 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양한 후 배양액 100 µl에 reaction diluent 400 µl를 첨가하여 희석을 행하였다. Total NO assay는 Total NO/Nitrite/Nitrate Assay Kit(R&D systems, Minneapolis, MN, U.S.A.)를 이용하여 제조사의 manual을 토대로 행하였으며, Synergy HT Multi-detection microplate reader (Biotek Instruments, Inc.)를 이용하여 540 nm의 파장에서 OD값을 측정하였다.

결과 및 고찰

단백질 분해활성을 나타내는 균주의 분리, 배양 및 동정

재래식 청국장 시료를 이용하여 casein이 함유된 영양배지에서 casein을 분해하여 clear zone을 생성하는 균주의 분리를 행한 결과, 약 10⁴개의 콜로니 중 casein 분해능이 우수한 15종의 균주가 분리되었고 최종적으로 casein 분해능이 가장 우수한 균주를 선택하여 LSH805 균주로 명명하였다. 분리한 LSH805 균주가 나타내는 casein 분해 양상을

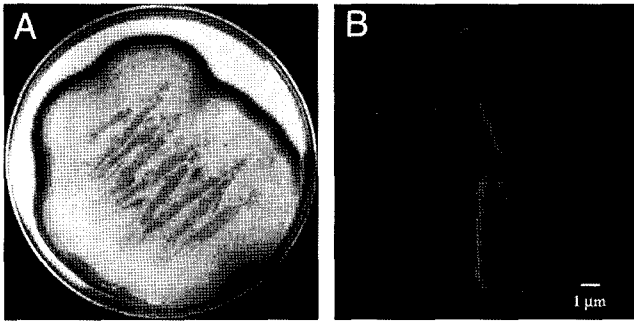


Fig. 1. Casein-degrading activity (A) and scanning electron micrograph (B) ($\times 9,000$) of isolated *Bacillus subtilis* LSH805 strain.

Fig. 1A에 나타냈으며 전자현미경(SEM)으로 균의 형태를 촬영한 사진을 Fig. 1B에 나타냈다.

분리된 LSH805 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열을

분석한 결과, *Bacillus subtilis* WL6(Genbank no. DQ198162)와 가장 높은 유사도(99%)를 보였다(Fig. 2). 따라서 LSH805 균주를 *Bacillus subtilis* LSH805로 명명하였으며, 한국미생물보존센터에 기탁을 완료하였다(기탁번호: KCCM 10739P).

선별된 균주를 이용한 청국장 발효

B. subtilis LSH805 균주를 이용하여 배태와 흑태를 대상으로 청국장 발효를 행한 결과를 Table 1에 나타냈다. 콩의 경우 품종별로 청국장 발효를 하였을 때 그 특성이 다르게 나타나는 것으로 알려져 있다[28]. 각각의 청국장에 대한 발효취를 측정된 결과 배태를 이용한 청국장이 흑태를 이용한 것보다 약간 낮은 수치를 기록하였으며, 균주분리에 이용한 재래식 청국장의 발효취 수치가 349이었으므로(자료 미제시) 분리균주를 이용한 청국장 발효에 의해 발효취가 상당히 개선된 것으로 나타났다. 각각의 청국장에 대한 점액물질의 길

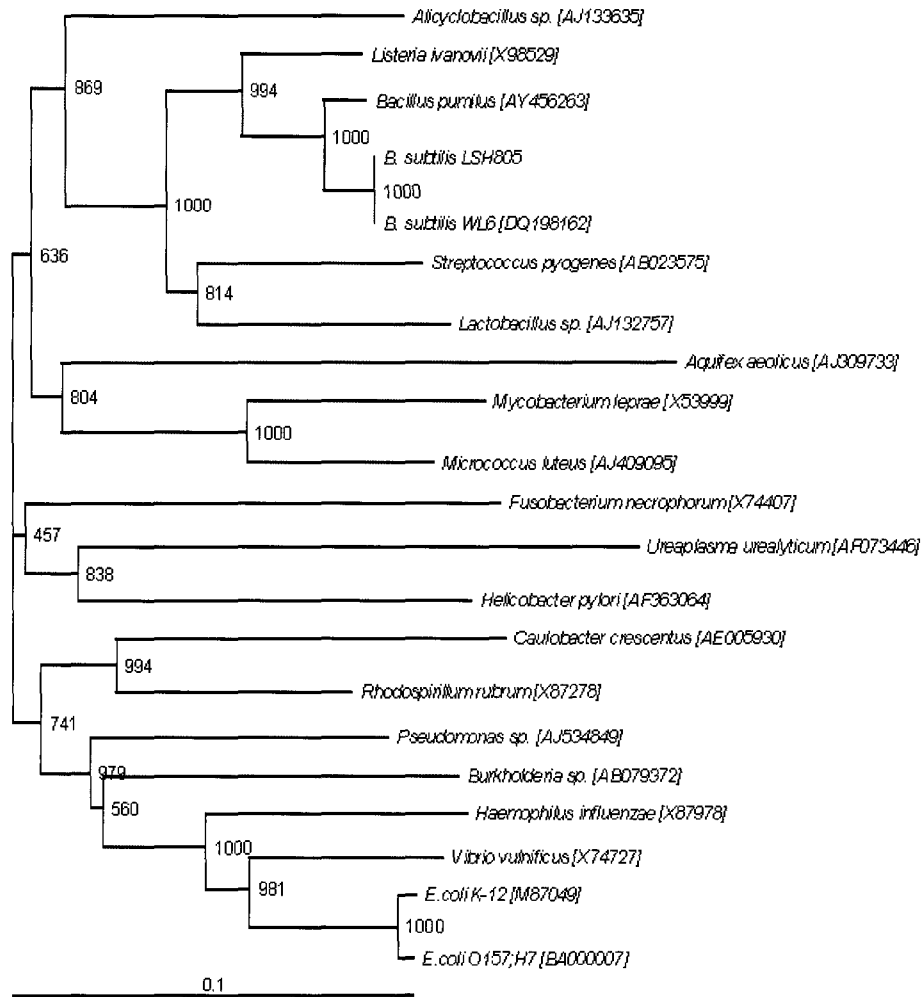


Fig. 2. Phylogenetic tree based on almost complete 16S rDNA sequence comparing with *Bacillus subtilis* LSH805 with members of *Bacillus* sp. and related genera. The numbers at the branch node are bootstrap values and numbers in parenthesis are access numbers in NCBI.

Table 1. Odor and length of viscous substance of Cheongkukjangs.

	Odor	Length of viscous substance (cm)
White soybean Cheongkukjang	83	51
Black soybean Cheongkukjang	90	35

이를 측정하고 결과 역시 백태를 이용한 청국장에서 더 길게 나타났으므로 점액성 물질의 양과 생리활성이 비례한다는 보고[12, 16, 18]와 발효취 결과를 토대로 *B. subtilis* LSH805 균주는 백태를 이용한 청국장 발효에 더욱 적합한 것을 알 수 있었다.

청국장의 혈전분해

Bacillus subtilis LSH805 균주를 이용한 백태 콩의 발효 청국장을 fibrin plate의 중앙에 놓고 37°C에서 반응을 행한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. 발효청국장의 혈전분해 활성을 fibrin plate 상에서 육안으로 관찰할 수 있었고(Fig. 3A), 이를 정량화하기 위하여 반응시간 2, 4, 6, 15, 20시간이 경과한 후에 분해된 fibrin의 무게를 측정하였다(Fig. 3B). 반응 시작 15시간이 경과된 후 혈전분해량이 눈에 띄게 증가하였으며 20시간 반응 후에는 약 1,500 mg의 분해된 혈전을 얻을 수 있었다. 분리한 균주는 윤 등[29]과 같이 casein과 fibrin을 동시에 분해하는 균주였다. 콩발효식품에서 분리된 *Bacillus* 속에 속하는 세균들의 혈전분해활성은 많이 보고되었으며[10, 11, 27, 29] 현 등[10]은 조효소액을 이용한 연구에서 조효소 1 ml가 1분당 39.1 µg의 혈전을 분해하는 균주를 분리하였는데 본 연구에서는 청국장 1 g이 1분당 2.78 mg의 혈전을 분해하였다. 본 연구에서는 살아있는 균주가 포함된 청국장에 의하여 높게 나왔던 것으로 생각된다. 삼투압 등의 발효조건 변화[13]와 첨가된 탄소원 종류별로 청

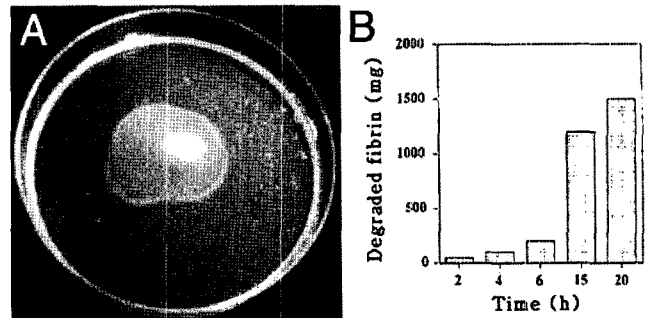


Fig. 3. Photograph of fibrin degradation (A) and mass of degraded fibrin (mg) for different reaction times (B).

국장 발효에서 혈전용해활성이 증가하는 보고[19]도 있어 추후의 연구를 통하여 혈전분해활성을 증가시키는 것이 가능할 것으로 판단된다.

원료콩과 청국장의 각 용매별 분획물 제조

원료콩과 청국장 시료 400 g에 대한 에탄올 추출을 행하고 이를 Rotary evaporator(EYELA Inc., Tokyo, Japan)로 농축을 행하여 최종적으로 1.8 L의 원료콩 에탄올 추출시료와 1.6 L의 청국장 에탄올 추출시료를 얻었다. 이를 hexane, ethyl ether, butanol, methanol, H₂O 등을 이용하여 분획을 행하고(Fig. 4), 얻어진 분획물들을 Centrifugal evaporator (Sovall RC 5C+, Asheville, NC, U.S.A.)를 이용하여 용매 제거 및 농축을 행한 결과, 원료콩의 경우 회수량 2.8 g(추출효율 0.7%) 전후, 청국장 시료의 경우 회수량 1.8 g(추출효율 0.45%) 전후의 비슷한 양으로 각각의 분획물 시료들을 얻을 수 있었다.

청국장 추출분획물의 NO 생성능

생취 대식세포주(RAW 264.7)에 대한 청국장 추출분획물

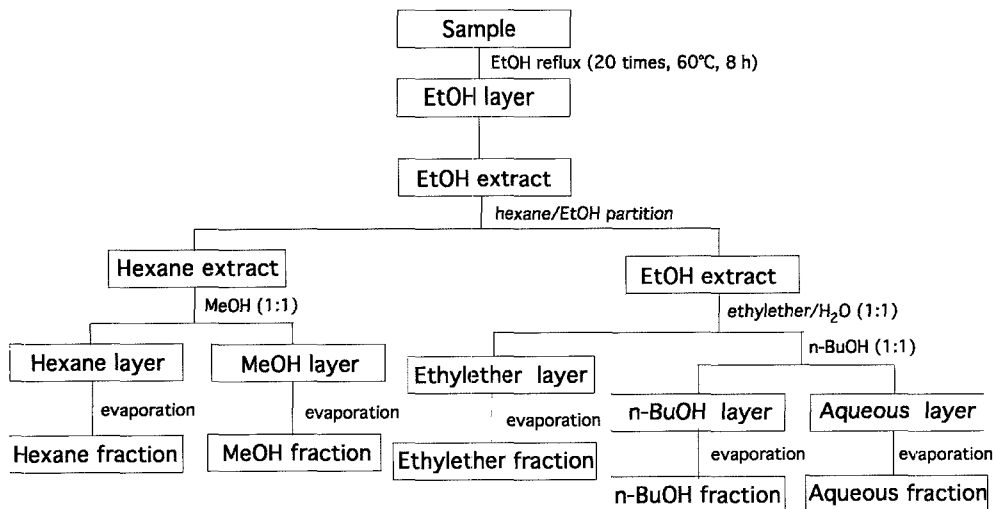


Fig. 4. Schematic diagram of sample extraction and fractionation from soybean and Cheongkukjang.

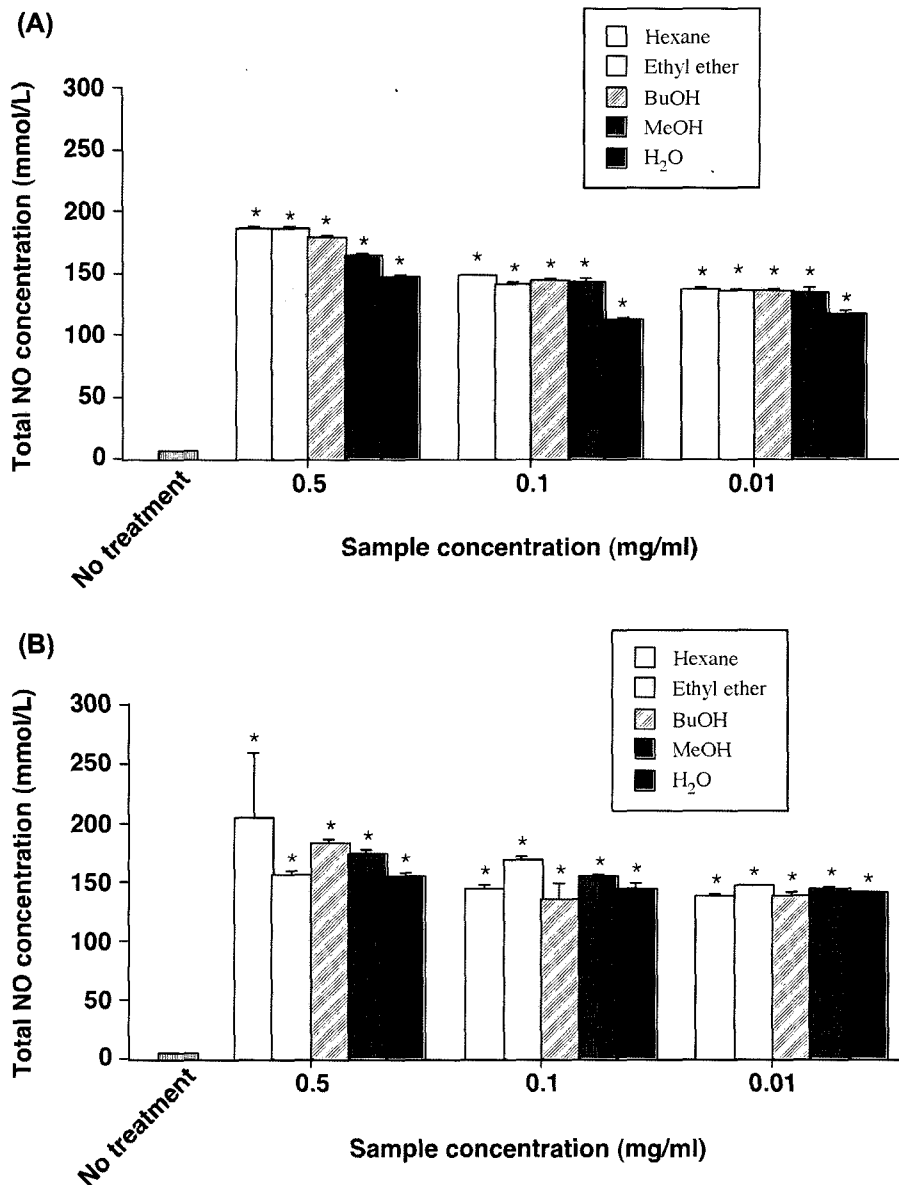


Fig. 5. NO concentrations of rat macrophage cell line RAW 264.7 to the fractions of soybean (A) and Cheongkukjang (B) extracts. Means \pm SEM for three wells are shown as fold compared with no treatment. *ANOVA $p < 0.0001$ compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice.

NO 생성능 측정결과를 Fig. 5에 나타냈다. 대식세포의 NO 생성 정도는 원료콩의 경우 hexane층과 ethyl ether층에서 높은 수치를 나타냈으며(Fig. 5A), 청국장 제품의 경우 hexane층에서 가장 높은 수치를 나타냈다(Fig. 5B). 이러한 NO 생성능은 추출물의 농도의존적 경향을 나타냈지만 농도에 따른 큰 차이는 관찰되지 않았다. 미처리 대조군에 비하여 시료 전반에 걸쳐 탁월한 NO 생성능을 나타냈다. 원료콩에 비해서 청국장의 면역세포활성이 높다는 보고[5, 15]도 있었는데, 본 연구에서는 분획 전반에 걸쳐 청국장 제품 시료와 원료콩 시료에서 비슷한 정도의 NO 생성능이 나타났다. 따라서 *Bacillus subtilis* LSH805 균주를 이용한 청국장 생산과

정에서 유의적인 NO 생성능의 차이는 관찰되지 않았지만 원료콩 자체에 포함되어 있는 유효성분에 의해 대식세포에 대한 NO 생성이 나타난 것으로 생각되었다. 또한 원료콩에 비해 청국장에서 수층의 NO 생성능이 증가하는 것으로 나타나 NO 생성능을 보이는 성분의 생물화학적 변화를 예상할 수 있었다(Fig. 5). 권 등[15]은 청국장의 면역증강활성을 대조군에 비해 4.1배 증가시키는 균주를 분리하였지만 본 연구에서는 20배 이상 증가하였다. 권 등[15]은 면역세포증식률을 측정하였고 본 연구에서는 NO 생산량을 측정한 것에 의한 차이가 있었고 권 등[15]은 원료콩의 면역증강활성을 측정하지 않아 본 연구결과와 정확한 비교는 어려웠다. 장

등[5]은 균주에 따른 청국장에서의 대식세포의 NO 생산량의 변화를 보고하였지만 원료콩에 대한 분석을 수행하지 않았다.

본 연구결과, 단백질 분해활성이 있는 청국장 발효세균인 *Bacillus subtilis* LSH805 균주를 분리 동정하였고, 원료콩 고유의 대식세포주에 대한 NO 생성능 및 분리된 균주를 이용하여 발효 생산된 청국장의 혈전용해활성을 활용하여 중장년층을 대상으로 하는 심혈관 장애를 예방할 수 있는 건강기능성 식품의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

요 약

재래시장에서 시판되는 청국장을 이용하여 단백질 분해활성이 높은 *Bacillus subtilis* LSH805 균주를 분리 동정하였고, 이 균주를 이용하여 생산된 청국장의 혈전용해활성 및 대식세포주에 대한 NO 생산능 등을 비교하였다. 백태를 이용해 발효된 청국장의 경우 점액성 물질의 길이가 흑태를 이용한 것보다 1.5배 정도 길었으며 발효취가 낮은 청국장을 얻었다. 백태를 이용한 발효 청국장의 혈전분해활성은 배양 후 15시간이 경과한 시점에서 급격한 증가를 보였으며 20시간이 경과한 후에는 약 1,500 mg의 분해된 혈전을 얻을 수 있었다. 청국장의 대식세포주의 NO 생산증진은 원료콩에 비해 큰 차이를 나타내지 않았지만 활성을 보이는 분획의 경향변화를 확인할 수 있었다. 본 연구결과로 식품섭취를 통해 혈전증 등을 사전에 예방하거나 개선할 수 있는 건강기능성 식품의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Amber, I. J., J. B. Hibbs, R. R. Taintor, Z. Vavrin. 1988. Cytokine induce an L-arginine-dependent effector system in nonmacrophage cells. *J. Leuko. Biol.* **44**: 58-65.
- Anson, M. L. 1939. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* **22**: 79-85.
- Astrup, T. and S. Mullertz. 1952. The fibrin method for estimating of fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**: 346-351.
- Bartholomew, B. 1984. A rapid method for the assay of nitrate in urine using the nitrate reductase enzyme of *Escherichia coli*. *Food Chem. Toxicol.* **22**: 541-549.
- Chang J. H., Y. Y. Shim, S. H. Kim, K. M. Chee, and S. K. Cha. 2005. Fibrinolytic and immunostimulating activities of *Bacillus* spp. strains isolated from Chungkuk-jang. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **37**: 255-260.
- Evans, T. G., L. Thai, D. L. Granger, and J. B. Jr. Hibbs. 1993. Effect of *in vivo* inhibition of nitric oxide production in murine Leishmaniasis. *J. Immunol.* **151**: 907-915.
- Fujita, M., 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.* **18**: 1387-1391.
- Green, S. J., M. S. Meltzer, J. B. Hibbs, and C. A. Nacy. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J. Immunol.* **144**: 278-283.
- Hibbs, J. B. Jr., Z. Vavrin, R. R. Taintor, and E. M. Rachlin. 1988. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**: 87-94.
- Hyun, K. W., J. S. Lee, J. H. Ham, and S. Y. Choi. 2005. Isolation and identification of microorganism with potent fibrinolytic activity from Korean traditional Deonjang. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 24-28.
- Kim, S. B., D. W. Lee, C. I. Cheigh, E. A. Choe, S. J. Lee, Y. H. Hong, H. J. Choi, and Y. R. Pyun. 2006. Purification and characterization of a fibrinolytic subtilisin-like protease of *Bacillus subtilis* TP-6 from an Indonesian fermented soybean, Tempeh. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 436-444.
- Kim, S. C., S. H. Lee, and S. J. Wi. 2002. The effects of natto mucilage on the components of serum lipid in rats. *J. Kor. Oil Chemists' Soc.* **19**: 63-67.
- Kim, S. S., J. H. Lee, Y. S. Ahn, J. H. Kim, and D. K. Kang. 2003. A fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* D4-7 isolated from chungkook-jang; Its characterization and influence of additives on thermostability. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 271-276.
- Kolb, H. and V. Kolb-Bachofen. 1992. Nitric oxide: A pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunol. Today* **13**: 157-160.
- Kwon, H. Y., Y. S. Kim, G. S. Kwon, C. S. Kwon, and H. Y. Sohn. 2004. Isolation of immunostimulating strain *Bacillus pumilus* JB-1 from chungkookjang and fermentaional characteristics of JB-1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 291-296.
- Lee, B. Y., D. M. Kim, and K. H. Kim. 1991. Physicochemical properties of viscous substance extracted from chungkook-jang. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **23**: 599-604.
- Lee, D. G., M. K. Jang, N. Y. Kim, J. H. Jeon, J. H. Lee, J. H. Lee, S. J. Kim, and S. H. Lee. 2006. Screening and characterization of a novel fibrinolytic metalloproteinase from a metagenomic library. *Biotechnol. Lett.* in press.
- Lee, J. O., S. D. Ha, A. J. Kim, C. S. Yuh, I. S. Bang, and S. H. Park. 2005. Industrial application and physiological functions of chonggukjang. *Food Sci. Indus.* **38**: 69-78.
- Lee, S. K., S. Heo, D. H. Bae, and K. H. Choi. 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.
- Nakajima, N., H. Mihara, and H. Sumi. 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**: 1726-1730.
- Nathan, C. F. and J. B. Hibbs. 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* **3**: 65-70.

22. Ryu, S. H. 2002. Studies on antioxidative effects and antioxidative components of soybean and chongkukjang. Doctorial thesis, Inje University of Korea, 23-122.
23. Shon, M. Y., S. H. Kwon, S. K. Park, and J. S. Chor. 2001. Changes in chemical components of black bean Chungkukjang added with kiwi and radish during fermentation. *Kor. J. Posthavest Sci. Technol.* **8**: 449-455.
24. Sumi, H., H. Hamada, K. Nakanishi, and H. Hiratani. 1990. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol.* **84**: 139-143.
25. Snyder, S. H., D. S. Bredt. 1992. Biological roles of nitric oxide. *Scientific Am.* **May**: 68-77.
26. Wang, C. T., B. P. Ji, B. Li, R. Nout, P. L. Li, H. Ji, and L. F. Hong. 2006. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 750-758.
27. Woo, S. M. J. H. Kwon, and Y. J. Jeong. 2006. Selection and fermentation characteristics of Cheonggukjang strain. *Kor. J. Food Preser.* **13**: 77-82.
28. Yoo, S. M. and C. M. Chang. 1999. Study on the processing adaptability of soybean cultivars for Korean traditional chonggugjang preparation. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **42**: 91-98.
29. Yun, G. H., E. T. Lee, and S. D. Kim. 2003. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus amyloliquefaciens* K42 isolated from Korean soy sauce. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 284-291.

(Received Nov. 15, 2006/Accepted Nov. 28, 2006)