

청국장에서 분리한 혈전용해효소 생산세균의 분리 및 동정

손병희¹, 오계현^{1*}

Isolation and Characterization of the Fibrinolytic Enzyme Producing Bacterium Isolated from Naturally Fermented Chungkookjang

Byung-Hee Sohn¹ and Kye-Heon Oh^{1*}

요약 본 연구의 목적은 상업적으로 사용하기 위하여 혈전용해효소를 생성하는 세균인 MK-15를 분리하고 동정하는 것이다. 먼저 세균 MK-15는 자연 발효된 콩으로부터 농화분리하였으며, 이 세균에 대한 형태학적 및 다양한 생리학적 특성 조사를 실시하였다. MK-15의 배양 상등액으로부터 혈전용해효소 활성을 fibrin plate 방법으로 solid fibrinolytic activity를 측정하였다. 그 결과, 콩배지에서 자란 MK-15의 혈전용해활성은 대조군으로 사용된 plasmin의 혈전용해활성에 비하여 약 2.5배 높았다. 16S rRNA를 분석한 결과 균주 MK-15는 *Bacillus subtilis* 군과 99.9% 유사성을 나타내었다. 따라서, 이 세균은 *Bacillus* sp. MK-15로 명명하였으며, 균주 MK-15는 GenBank에 [DQ163021]로 등록하였다.

Abstract The aim of this work was to perform the screening and identification of the bacterium, MK-15 having the activity of fibrinolytic enzyme for the commercial use. Initially, strain MK-15 was enriched and isolated from naturally fermented soybean. Morphological and various physiological characteristics of the strain MK-15 was examined. The activity of fibrinolytic enzyme derived from supernatants of test culture MK-15 was performed by fibrin plate method for solid fibrinolytic activity. As the result, the fibrinolytic activity of MK-15 grown on the soybean media was about 2.7 times greater than that of plasmin used as standard. 16S rRNA analyses revealed that strain MK-15 was 99.9% similar to *Bacillus subtilis* species cluster, and the bacterium was designated as *Bacillus* sp. MK-15. Strain MK-15 was registered in GenBank as [DQ163021].

Key Words : 혈전용해효소, 청국장, 콩발효, *Bacillus* sp. MK-15

1. 서론

혈전은 생체에 상처가 생겼을 때 혈액을 응고시켜 과다한 출혈을 방지하고, 상처의 복구를 위한 복잡한 혈전 생성기작에 의해서 이루어진다. 혈전은 혈액에서 thrombin에 의해서 fibrinogen이 fibrin으로 전환되어 불용성의 중합체를 형성함으로써 생성된다 [1].

혈전용해제는 사람의 소변에서 분리한 urokinase와

streptokinase가 가장 많이 사용되고 있으며 [2], 동물의 종양세포에서 유래하는 tissue type plasminogen activator도 효과적인 혈전용해제로서 많은 관심이 집중되고 있다 [3,4,5]. 그러나 이와 같은 물질들은 반감기가 짧고, 가격이 매우 높은 단점을 지니고 있다. 현재 경구투여용 혈전용해제로서는 여러 가지의 혈전용해효소를 함유하고 있는 것으로 알려진 지렁이인 *Lumbricus lubellus*를 건조시켜 분말로 만들어 캡슐화하여 상품화하였다 [6,7].

최근 한국과 일본에서 미생물에 의한 콩 발효를 통해 얻어지는 혈전용해제가 건강기능물질로서 주목을 받고 있다. 콩 발효식품인 일본의 낫토(natto)로부터 혈전용해효소를 얻기 위한 연구가 수행되고 있으며 [8], 특히 일본

이 논문은 2006년 산업자원부 고부가 생물소재 산업화지원 지역혁신센터의 지원에 의하여 연구되었음.

¹순천향대학교 유전공학과

*교신저자: 오계현(kyecheon@sch.ac.kr)

의 전통발효식품인 낫토(natto)에서 분리한 serine protease 유형의 nattokinase는 경구 투여시 생체내의 혈전용해능을 높일 수 있다고 보고된 바 있다 [9-11]. 우리나라도 일본의 낫토와 마찬가지로 예로부터 된장, 고추장, 간장, 청국장 등의 장류를 제조하였고, 이러한 전통발효식품으로부터 혈전용해제가 생산된다는 연구가 보고되고 있다 [12,13]. 특히 다양한 콩 발효식품 가운데, 청국장은 콩이 발효되면서 발효에 관여하는 유익한 세균이 다량의 점질을 생성하며, protease, amylase, lipase 등의 효소활성을 가지며, 또한 다양한 생리활성 물질들을 생성하는 것으로 알려져 있다 [14]. 최근에는 청국장에서 발견된 혈전용해제가 건강에 상당히 유익하다는 인식이 확산되면서 청국장에 대한 새로운 차원에서 관심이 고조되고 있다.

본 연구에서는 전통방법에 의해 발효된 청국장으로부터 발효에 관여하는 세균을 분리하여 생리화학적 특성 조사를 실시하였고, 16S rRNA 염기서열을 통하여 동정하였으며, 이 분리세균이 가지는 혈전용해활성도 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 혈전용해효소 생산세균의 분리

충남 예산지역의 농가에서 전통방법에 의해 제조된 청국장을 채취하여 원심분리용 튜브에 1 g의 청국장 시료와 5 ml 생리식염수에 넣고 진탕배양기에 2시간 방치하였다. 배양기에서 꺼낸 튜브로부터 100 μ l의 청국장 현탁액을 고체 영양배지(nutrient agar)에 도말하고 37°C에서 48 시간동안 배양하여 단일세균인 MK-15를 분리하였다. 이 분리세균을 청국장 생산 균주으로 이용하여 우하여 특성조사를 실시하였다.

2.2 혈전용해효소 생산세균의 배양

청국장에서 분리된 균주는 2% skim milk를 첨가한 plate count agar (PCA) 배지에서 24시간 배양하였다. 균주의 생육과정에서 혈전용해효소를 생산하여 투명환을 나타내는 균주를 1차 선별하여 [15], 132시간 동안 배양하면서 24시간 단위로 배양액을 원심분리한 상등액에 대하여 혈전용해효소활성을 측정하였다. 배양에는 2% skim milk를 첨가한 PCA 배지를 사용하였으며, 효소활성 측정을 위한 단백질 배지는 콩을 믹서로 분쇄한 후, 고운 체(mesh)를 이용하여 거른 뒤, 5 g의 콩가루에 0.02% KH₂PO₄를 섞고, 100°C에서 30분간 끓인 뒤, 여과지(Advantec No. 2)로 걸러 121°C에서 15분간 고압 멸균하

였다.

2.3 혈전용해효소 활성 측정

혈전용해활성 측정은 Astrup 등 [16]의 방법에 의해 0.1 M 인산완충용액에 fibrinogen을 0.3%가 되도록 용해시키고, 완전히 용해된 fibrinogen 용액 5 ml에 동일한 완충용액에 1% agarose 용액 5 ml를 첨가하여 충분히 혼합하였다. 여기에 0.1 ml thrombin을 첨가하여 혼합한 후, 즉시 well plate에 붓고 실온에서 5-10 분간 방치하여 굳힌 다음 cork borer로 구멍을 만들어 fibrin plate를 제조하였다 [17]. 각 시료 50 μ l를 취하여 fibrin plate의 시료구멍에 주입하고 37°C에서 18시간동안 반응시킨 후, fibrin plate의 용해 면적을 측정하였다. 대조구로서는 정제된 혈전용해효소인 plasmin (1.0 unit/ml)을 사용하였으며, 다음과 같은 방법으로 혈전용해 활성을 계산하였다.

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

2.4 혈전용해효소 생산세균의 형태학적 관찰 및 생리 화학적 특성 조사

청국장에서 분리한 균주인 MK-15를 영양평판배지에 도말하여 단일 집락의 형태학적 관찰을 하였고, 그람 염색 후 위상차 현미경으로 세균의 형태학적 특성을 조사하였다. 분리 세균의 생리 화학적 특성을 조사하기 위하여 glucose 이용여부, methyl red-voges proskauer (MR-VP) 시험, citrate와 녹말의 이용여부, indole 생성유무, Klingler iron agar (KIA) 시험, gelatin 이용여부, urease 존재여부, lithmus milk 시험 등을 실시하였다. 탄소원으로 1% glucose가 포함된 액체배지에 분리된 세균을 접종한 후, 색의 변화를 관찰하였으며, 0.5% glucose가 포함된 MR-VP 배지에 분리 세균을 접종한 후 MR 배지에서는 pH 지시약인 methyl red를 3방울 떨어뜨리고, VP 배지에는 α -naphthol 12방울과 40% KOH 6방울을 첨가 후 색깔 변화를 관찰하였다 [18]. 분리 세균의 citrate 이용여부를 조사하기 위하여 Simmon's citrate 평판배지(Difco, Detroit, MI, USA)에 분리세균을 접종한 후, 색 변화를 관찰하였고, 녹말의 분해여부를 알아보기 위하여 녹말 고체평판배지에 세균을 접종하고 그람 요오드 용액을 첨가하여 집락 주위에서 투명대 형성여부를 관찰하였다. Indole 생성 시험은 1% peptone이 포함된 tryptone 액체 배지에 균주를 접종한 후, 20방울의 Kovac 시약을 첨가하여 시험관을 가볍게 흔들여 주면서 배지의 색 변화를 관찰하였다. H₂S의 생성은 KIA (Difco, Detroit, MI,

USA)에 균주를 접종한 후, 고체배지 표면의 색 변화를 관찰하였으며, gelatin 평판배지에 균주를 접종한 후, HgCl₂를 첨가하여 집락 주위에 투명대 형성을 관찰하였고 urease 생성 여부는 색의 변화를 관찰하였다. Lithmus milk 시험은 lithmus milk (Difco, Detroit, MI, USA)에 균주를 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후 펩톤화(peptonization)를 관찰하였다 [19].

2.5 혈전용해효소 생산세균의 동정

청국장에서 분리한 세균인 MK-15의 동정은 여러 가지 생리생화학적 시험과 GP2 Microplate™ Identification System (BIOLOG, Hayward, USA)를 이용하여 동정하였다. 사용된 배지는 BUG agar와 0.2%의 maltose를 혼합하여 만들었다. 세균 현탁액을 Biolog Turbidimeter (BIOLOG, Hayward, USA.)를 이용하여 20%까지 맞추고 GP2 MicroPlate의 96개의 well에 각각 150 μl씩 분주하였고, 30°C에서 4-6시간 동안 배양하였다. 배양된 MicroPlate의 결과는 직접 확인하였으며, MicroLog™ database software를 통해 동정하였다. 또한 분리세균에 대하여 16S rRNA의 염기서열 분석을 실시하여 NCBI의 GenBank program을 사용하여 상동성을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 세균의 분리 및 배양

충남 예산 지역에서 전통발효방법으로 생산된 청국장으로부터 발효에 관여하는 세균들을 농화(enrichment)시켜 우점종이며 발효능이 뛰어난 3 종류의 집락을 분리하였다. 이들 세균 가운데 영양고체평판배지에서 3회에 걸친 도말평판법을 통한 순수배양으로 발효능이 탁월한 세균인 MK-15를 분리하였다. 이 분리세균 MK-15는 진탕 배양기 (40°C, 160 rpm)에 배양유지시키면서, 혈전용해효소 활성을 측정하는 실험에 이용하였다.

3.2 혈전용해활성 확인

콩배지에서 최적조건으로 배양한 청국장 발효균주 MK-15에서 생성하는 solid fibrinolytic activity를 관찰하였다. 대조구로서 plasmin을 이용하였으며, 영양배지(nutrient agar)에서 배양한 경우와 콩배지에서 배양한 경우의 solid fibrinolytic activity를 관찰하였다 [그림 1]. Plasmin을 대조군으로 보았을 때, 콩배지에서 배양한 경우의 solid fibrinolytic activity는 2.2 plasmin unit이었으

며, 이는 영양배지(nutrient agar)에서 배양한 경우의 solid fibrinolytic activity인 1.7 plasmin unit에서보다 높은 혈전용해활성을 보여주었다.

Kim 등 [20]은 한국의 청국장과 일본의 낫토로부터 60 가지 균주의 혈전용해균주를 분리하여 혈전용해능을 측정하였으며, 이들 가운데 가장 우수한 혈전용해능을 나타내는 *Bacillus* sp. CK-11-4가 1.84 plasmin unit을 나타내는 것으로 보고하였다. Yoo 등 [21]은 청국장에서 1.31~1.89 plasmin unit 범위의 혈전용해활성을 가지는 5 가지 균주를 분리하였으며, 특히 *Bacillus subtilis* K-24에서 혈전용해효소 활성은 최대활성 1.89 plasmin unit을 나타내는 것으로 보고하였다. 이들 연구 결과에서 볼수 있는 바와 같이 분리세균 MK-15가 가지는 혈전용해효소 활성은 기존의 보고된 활성과 비교하여 높은 활성을 보여주는 것으로 확인되었다.

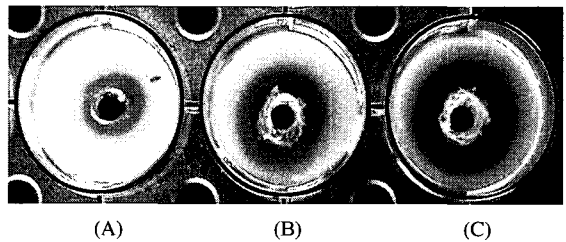


그림 1. 고형 혈전용해활성: (A) 대조군으로서 plasmin (1.0 plasmin unit), (B) 고체영양배지에서 자란 MK-15 (1.7 plasmin unit); (C) 콩배지에서 자란 MK-15 (2.2 plasmin unit)

3.3 혈전용해 활성세균의 형태 및 생리화학적 특성조사

혈전용해활성을 가지는 세균인 MK-15에 대하여 형태학적 관찰과 생리화학적 특성을 조사하였다. 이 세균은 위상차 현미경으로 관찰한 결과는 간상형으로 나타났으며, 그람염색을 실시하여 그람 양성임이 확인되었다. 이 분리세균의 형태학적 및 생리화학적 특성은 [표 1]과 같다. 청국장이나 된장의 발효에 관여하는 세균들은 주로 내생포자를 형성하는 간상형으로 다소 높은 염 농도에서도 잘 견디는 것으로 알려져 있으며, 이와 관련된 세균으로서는 *Bacillus* 속(genus)가 보고되고 있다. 실제 재래식 된장으로부터 혈전용해활성을 가지는 세균으로 *Bacillus amyloliquefaciens*가 분리된 바 있으며 [22], 청국장에서는 *Bacillus subtilis*가 발효에 관여하는 것으로 보고되었다 [20,21].

표 1. 분리세균인 MK-15의 형태학적 및 생리학적 특성

<u>Morphological characteristics</u>	
Cell Shape	Rod
Gram stain	Positive
<u>Physiological characteristics</u>	
Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	+
Catalase	+
Oxidase	-
Simmon's citrate	+
H ₂ S (KIA)	-
Lithmus milk	-

+: Positive reaction, -: Negative reaction

3.4 혈전용해 활성세균의 동정

형태학적 및 생리학적 특성을 관찰한 혈전용해 활성세균인 MK-15에 대한 동정(identification)을 실시하였다. 먼저 이 세균에 대하여 다양한 탄소원 이용여부를 확인하는 BIOLOG system을 사용하였다. 96 well plates에 각각 다른 종류의 탄소원을 넣고, MK-15를 접종하여 탄소원 이용여부를 조사하였으며, MicroLog™ database software를 이용하여 분석한 결과, 이 세균은 98% 이상의 신뢰도를 보이는 *Bacillus subtilis*로 동정되었다 [표 2]. 또한 이 혈전용해 활성세균에서 16S rRNA 유전자의 일부를 PCR 반응으로 증폭하여 염기서열을 결정하였다 [그림 2]. MK-15세균에 대한 16S rRNA 염기서열을 NCBI의 GenBank program을 사용하여 상동성을 조사한 결과, 이 세균은 이미 보고된 *Bacillus* 속(genus)의 염기서열과 비교하여 볼 때, 매우 높은 상동성을 나타냈다. 이들 분석 결과들을 토대로 하여 최종적으로 혈전용해 활성세균인 MK-15는 *Bacillus subtilis*로 동정되었으며, *Bacillus* sp. MK-15로 명명되었다. 얻어진 염기서열 분석 결과는 GenBank에 [DQ163021]로 등록되었다.

1	gcctaataca	tgcaagtcca	gcgacagat	gggagcttgc	tcctgatgt	tagcgcgga
61	cgggtgagta	acacgtgggt	aacctgcctg	taagactggg	ataactccgg	gaaaccgggg
121	ctaataccgg	atggtgttt	gaaccgatg	gtcaaacat	aaaagtggc	ttcggctacc
181	acttacagat	ggaccgcgg	cgcatagct	agttggtgag	gtaacggctc	accaaggcga
241	cgatcgtag	ccgacctgag	agggtgatcg	gccacactgg	gactgagaca	cggcccagac
301	tcctacggga	ggcagcagta	gggaatcttc	cgcaatggac	gaaagtctga	cggagcaacg
361	ccgctgagt	gatgaaggtt	ftcggatcgt	aaagctctgt	tgtagggaa	gaacaagtac
421	cgttcaata	ggcgggtacc	ftgacggtac	ctaaccagaa	agccacggct	aactactgtc
481	cagcagccgc	ggtaatacgt	aggtagcaag	cggtgtccgg	aattattggg	cgtaaaaggg
541	tcgcagccgg	ttcttaagt	ctgatgtgaa	agccccggc	tcaaccgggg	agggtcattg
601	gaaactgggg	aacttgatg	cagaagagga	gagtggaatt	ccacgtgtag	cggtgaaatg
661	cgtagagatg	tgaggaaca	ccagtggcga	aggcgactct	ctggtctgta	actgacgctg
721	aggagcgaaa	gcgtggggag	cgaacaggat	tagatacct	ggtagtccac	gccgtaaacg
781	atgagtcta	agtgttaggg	ggttccgcc	ccttagtct	gcagctaacg	cattaagcac
841	tcgcctggg	gagtacgctc	gcaagactga	aactcaagg	aattgacggg	ggcccgcaca
901	agcgtggag	catgtggtt	aaltcgaagc	aacgcaaga	acctaccag	gtctgacat
961	ccttgacaa	tcctagagat	aggacgtccc	ctcgggggc	agagtacag	gtggtgatg
1021	gtgtcgtca	gctcgtgtcg	tgagatgtg	ggtaagtcc	cgcaacgagc	gcaacccttg
1081	atcttagttg	ccagcattca	gttgggcact	ctaaggtagc	tgccggtgac	aaaccggagg
1141	aaggtgggga	tgacgtcaaa	tcatcatgcc	ccttatgacc	tggtctacac	acgtgtcaca
1201	atggacagaa	caaagggcag	cgaaacccgg	aggttaagcc	aatcccacaa	atctgtctc
1261	agttcgatc	gcagtctgca	actcgactgc	gtgaagctgg	aatcgctagt	aatcgcggat
1321	cagcatgccg	cggtgaatac	gttcccgggc	ctgtacaca	ccgccgctca	caccacgaga
1381	gtttgtaaca	cccgaagtgc	gtgaggaaac	cttaggagc	cagcccggga	agg

그림 2. 분리세균인 MK-15의 16S rRNA 유전자의 부분 염기서열

표 2. BIOLOG 분석시스템을 이용한 분리세균 MK-15의 생리학적 및 생화학적 특성조사

Physiological & biochemical tests			
Water	-	D-Tagatose	-
α -Cyclodextrin	+	D-Trehalose	+
β -Cyclodextrin	+	Turanose	+
Dextrin	+	Xylitol	-
Glycogen	-	D-Xylose	-
Inulin	-	Acetic acid	-
Mannan	-	α -Hydroxybutyric acid	-
Tween 40	-	β -Hydroxybutyric acid	-
Tween 80	-	γ -Hydroxybutyric acid	-
N-Acetyl-D-glucosamine	-	ρ -Hydroxyphenyl acetic acid	-
N-Acetyl-D-mannosamine	-	α -Ketoglutaric acid	-
Amygdain	-	α -Ketovaleric acid	-
L-Alabinose	-	Lactamide	-
D-Arabitol	-	D-Lactic acid methylester	-
Arbutin	+	L-Lactic acid	-
Cellobiose	+	D-Malic acid	-
D-Fructose	+	L-Malic acid	+
L-Fucose	-	Methylpyruvate	+
D-Galactose	-	Mono-methylsuccinate	-
D-Galacturonic acid	-	Propionic acid	-
Gentiobiose	+	Pyruvic acid	+
D-Gluconic acid	-	Succinamic acid	-
α -D-Glucose	+	Succinic acid	-
m-Inositol	-	N-Acetyl L-glutamic acid	-
α -D-Lactose	-	Alaninamide	-
Lactulose	-	D-Alanine	+
Maltose	+	L-Alanine	-
Maltoriose	+	L-Alanyl-glycine	-
D-Mannitol	+	L-Asparagine	+
D-mannose	+	L-Glutamic acid	+
D-Melezitose	-	Glycyl-L-glutamic acid	-
D-Melibiose	-	L-Pyroglutamic acid	-
α -Methyl D-galactoside	-	L-serine	-
β -Methyl d-galactoside	-	Putrescine	-
3-Methyl glucose	+	2,3-Butanediol	-
α -Methyl D-glucoside	-	Glycerol	+
β -Methyl D-glucoside	+	Adenosine	+
α -Methyl D-mannoside	-	2-Deoxyadensine	-
Palatinose	+	Inosine	+
D-Psicose	+	Thymidine	+
D-Raffinose	-	Uridine	+
L-Rhamnose	-	Adenosine-5'-monophosphate	-
D-Ribose	-	Thymidine-5'-monophosphate	-
D-Salicin	+	Uridine-5'-monophosphate	-
Sedohepulosan	-	Fructose-6-phosphate	-
D-Sorbitol	+	Glucose-6-phosphate	-
Stachyose	-	Glucose-6-phosphate	-
Sucrose	+	D-L- α -Glycerolphosphate	+

전통발효식품인 청국장이나 된장은 옛날부터 우리의 식탁에 올려져 우리의 건강과 영양을 위한 식품으로서 널리 애용되어 왔다 [23]. 최근에는 이러한 청국장이나 된장이 우리 몸에서 혈액순환개선, 성장작용, 항산화, 항암, 면역증강, 비만조절, 혈압강하 등의 다양한 효과가 있다는 결과가 보고 되면서 [24-26], 웰빙(well-being) 식품으로서 커다란 관심의 대상이 되고 있다. 본 연구를 통하여 콩 발효식품으로부터 혈전분해효소 활성이 우수한 세균인 *Bacillus* sp. MK-15를 분리하였으며, 이 균주의 생리화학적 특성조사를 실시하였다. 향후 *Bacillus* sp. MK-15의 의한 혈전용해 활성을 최적화하기 위한 배양조건 확립과 혈전용해효소의 특성을 규명하기 위한 연구가 진행될 것이다.

4. 결론

본 논문에서는 전통방법에 의해 발효된 청국장으로부터 혈전용해활성을 가지는 MK-15 세균을 분리하여 동정하였다. 혈전용해활성을 가지는 이 세균에 대한 다양한 생리화학적 특성조사를 실시하였으며, 혈전용해활성을 측정하였다. Biolog 시험과 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 *Bacillus subtilis*로 동정되었으며, 얻어진 분석결과는 GenBank에 [DQ163021]로 등록되었다.

참고문헌

- [1] D. Mark. et al., "Basic Medical Biochemistry", Williams & Wilkins, Baltimore. p. 107, 1996. 1.
- [2] N. S Choi, et al., "Screening of Mushrooms Having Fibrinolytic Activity", *Kor. J. Food Sci. Technol.* 31(2), pp. 533-557, 1999.
- [3] H. Sumi, et al., "A Novel Fibrinolytic Enzyme Extracted Form the Earthworm, *Lumbricus fubellus*", *Jap. J. Physiol.* 43, pp. 1110-1111, 1991.
- [4] C. T. Esmen, "The Regulation of Natural Anticoagulant Pathway", *Science* 235, pp. 1348-1355, 1987.
- [5] H. K. Youn, et al., "Antimicrobial Activities of Viscous Substance from Chungkukjang Fermented with Different *Bacillus* spp.", *J. Fd. Hyg. Safety* 16(3), pp. 188-193, 2001.
- [6] N. Nakajima, et al., "Characterization of Potent Fibrinolytic Enzymes in Earthworm. *Lumbricus rubellus*", *Biosci. Biotech.. Biothem.* 57(10), pp. 1726-1730, 1993.
- [7] Y. Park, et al., "Rapid Purification and Biochemical Characteristics of *Lumbrokinase III* from Earthworm for Use as a Fibrinolytic Agent", *Biotechnol. Lett.* 20(2), pp. 169-172, 1998.
- [8] H. Sumi, et al., "Enhancement of the Fibrinolytic Activity in Plasma by Oral Administration of NK", *Acta Haematol.* 84, pp. 139-143, 1990.
- [9] H. Yi, et al., "Characterization of *Bacillus cereus* SH-7 Extracellular Protease", *Kor. J. Microbiol.* 37, pp. 213-217, 1999.
- [10] F. Mitsugu, et al., "Thrombolytic Effect of Nattokinase on a Chemically Induced Thrombosis Model in Rat", *Biol. Pharm. Bull.* 18, pp. 1387-1391, 1995.
- [11] H. Sumi, et al., "A Novel Fibrinolytic Enzyme (nattokinase) in the Vegetable Cheese Natto; a Typical and Popular Soybean Food in the Japanese Diet", *Experimentia.* 43, pp. 1110-1111, 1987.
- [12] Y. T. Kim, et al., "Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus* sp. Strain CK 11-4 Screened from Chungkook-Jang", *Appl. Environ. Microbiol.* 23, pp. 2482-2488, 1996.
- [13] S. H. Kim, et al., "New Trends of Studying on Potential Activities of Doen-Jang", *Korea Soybean Digest.* 15(1): 8-15. 1998.
- [14] I. J. Kim, et al., "Study of Functional Chungkukjang Contain Fibrinolytic Enzyme", *Kor. J. Life Sci.* 12, pp. 357-362, 2002.
- [15] K. W. Hyun, et al., "Isolation and Identification of Microorganism with Potent Fibrinolytic Activity from Korean Traditional Deonjang", *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 33(1), pp. 24-28, 2005.
- [16] T. Astrup, et al., "The Fibrin Plate Method for Estimating Fibrinolytic Activity", *Arch. Biochem. Biophys.*, 40, pp. 346-351, October, 1952.
- [17] F. Harverkate, et al., "Dose-response Curves in the Fibrin Plate Assay. Fibrinolytic Activity of Protease". *Thromb. Haemost.* 32, p. 356, 1974.
- [18] H. J Benson, "Microbiological Applications", McGraw-Hill Companies, Inc. USA, pp. 155-163, 1998. 1.
- [19] 오계현. "최신 미생물 실험", 신광문화사, pp. 109-131, 2005. 9.
- [20] T. Y. Kim, et al., "Screening and Identification of the Fibrinolytic Bacterial Strain from Chungkook-jang", *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, pp. 1-5, 1995.
- [21] C. K. Yoo, et al., "Purification and Characterization of Fibrinolytic Enzyme excreted by *Bacillus subtilis* K-54 Isolated from Chung Guk Jang", *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 26(6), pp. 507-514, 1998.

- [22] N. S. Choi, et al., "The Effect of Sodium Chloride on the Serine-type Fibrinolytic Enzymes and the Thermostability of Extracellular Protease from *Bacillus amyloliquefacines* DJ-4", *J. Biochem. Mol. Biol.* 34, pp. 134-138, 2001.
- [23] J. O. Lee, et al., "Industrial Application and Physiological Functions of Chongkukjang", *Food Sci. Ind.* 38(2), pp. 69-78, 2005.
- [24] J. J. Lee, et al., "Antioxidant Activity of Substance Extracted by Alcohol from *Chungkukjang* Powder", *Kor. J. Microbiol.* 37(3), pp. 177-181, 2001.
- [25] Y. J. Cho, "Production and Separation of Anti-hypertensive Peptide during *Chungkukjang* Fermentation with *Bacillus subtilis* CH-1023", *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 43(4), pp. 247-252, 2000.
- [26] C. Takahashi, et al., "Possible Antitumor-promoting Activity of Components in Japanese Soybean Fermented Foods, Natto: Effect on Gap Junctional Intracellular Communication", *Carcinogenesis*, 16, pp. 471-476, 1995.

오 계 헌(Kye-Heon Oh)

[정회원]



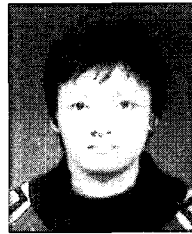
- 1980년 2월 : 고려대학교 생물학과 (이학사)
- 1986년 2월 : 고려대학교 생물학과 (이학석사)
- 1991년 3월 : (美)Ohio State University 미생물학과 (이학박사)
- 1991년 8월 ~ 현재 : 순천향대학교 유전공학과 교수

<관심분야>

기능성 생물소재, 환경오염정화, 식품 및 산업미생물학.

손 병 희(Byung-Hee Sohn)

[준회원]



- 2006년 2월 : 순천향대학교 유전공학과 (이학사)
- 2006년 3월 ~ 현재 : 순천향대학교 유전공학과 석사과정

<관심분야>

기능성 생물소재, 환경오염정화, 식품 및 산업미생물학.