한국농화학회지 제 41 권 제 2 호(1998)
Agricultural Chemistry and Biotechnology
Vol. 41, No. 2, pp. 119~124(1998)

전통식품(청국장)으로 부터 fibrin용해 세균의 분리 동정

허 석 · 이시경* · 주현규[1]

건국대학교 응용생물화학과, [1]선문대학교 식량자원학부

초 록 : 체내혈액의 응고기작에 의해 생성된 단백질인 fibrin을 분해할 수 있는 효소를 분비하는 균을 청국장으로부터 분리하여 동정하였다. 청국장으로부터 protein 분해능이 있는 균주를 분리하고 분리한 균주들 중에서 혈전용해능이 가장 우수한 균주인 KCK-7를 선발하였다. 이 균주는 호기성으로 포자를 형성 하는 Gram(+)균이었으며 Gas chromatography에 의한 세포의 지방산 분석은 $C_{15:0}$ anteiso형이 40.85%, $C_{15:0}$ iso형이 19.47% 이었다.이 균주는 생리, 생화학적 특성 및 세포지방산 분석을 통하여 *Bacillus subtilis*로 동정되었다. *Bacillus subtilis* KCK-7의 fibrinolytic enzyme 생성을 위한 최적 배양 온도와 pH는 각각 37℃, 8.0이었다.(1997년 12월 11일 접수, 1998년 2월 16일 수리)

서 론

최근 들어 서구화된 식문화의 형성으로 많은 성인병이 발생되고 있으며 그중 순환기계통 질환이 사망요인의 다수를 차지하고 있다. 그중 뇌혈관 질환은 상처 발생시 생긴 fibrin이 뇌혈관 등에 분해되지 않고 축적되어 혈액순환을 차단함으로써 발생된다. 따라서 이들 질환의 예방 및 치료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 그의 일환으로 혈전의 생성을 억제하는 항혈전제의 개발과 생성된 혈전을 용해시키는 혈전 용해제의 개발에 초점을 두고 있다. 항 혈전제로서는 유기합성제제인 coumarin과 warfarin제제가 있고, 거머리에서 생성되는 hirudin제제가 있다.[1-5]

혈전(fibrin)이 용해되는 것을 fibrinolysis라고 하며 응고 후 수일이내에 plasmin에 의해서 용해가 이루어 진다. plasmin은 plasminogen activator인 urokinase, streptokinase, tissue-type plasminogen activator(tPA) 등에 의해 plasminogen으로부터 전환된다(Fig. 1).[6]

현재 여러가지 혈전용해제가 연구되고 있는데 이들은 주로 plasminogen을 plasmin으로 전환시키는 tPA이다.[7-8] 혈관주사되는 tPA외에 병행요법으로 사용하기 위하여 직접 경구 투여함으로써 혈액내의 혈전 용해능을 증가시키는 제제에 관심을 갖기 시작하고 있으나 아직 그 성과는 미미한 실정이다.[9] 현재 경구투여용 제제로는 6가지의 혈전 용해 효소를 함유하고 있는 것으로 알려진 *Lumbricus lubellus*의 건조 분말이 캡슐화되어 한국과 일본에서 시판되고 있다.[10-11] 일본의 전통발효 식품인 natto를 섭취할 때 생체내의 혈전 용해능이 증가됨을 발견하고, 이 natto로부터 혈전 용해효소를 분리하여 8일간 장내 투여한 결과 혈전 용해능이 점차 증가하여 4일째 가장 높은 수치를 나타내었다. 또한, 혈중 fibrin분해산물 항원량은 2일째 가장 높은 수치를 나타내다가 점차 감소하였으며, tPA의 항원량은 4일째까지 점차 증가하다가 8일째는 다소 감소된다고 보고하여,[12-13] 식품을 섭취함으로써 여러 혈관질환을 치료 및 예방할 수 있다는 점에서 관심을 끌고 있다.

우리나라도 일본의 natto와 마찬가지로 옛부터 된장, 고추장, 간장, 청국장 등의 장류를 제조하였고, 장류의 고유한 맛은 콩단백질의 가수분해물인 아미노산에서 오는 구수한 맛들의 조화에서 이루어졌다. 장류의 맛과 영향에 있어서 중요한 요인은 protease와 amylase를 강력히 생산하는 미생물이며 특히, 청국장은 삶은 콩에 볏짚을 이용하여 재래식으로 발효시키거나[14] *Bacillus subtilis*를 이용하여 단기간 발효 숙성시켜 제조되며[15] 실모양의 끈끈한 점질물이 생성되고 특유한 향기와 맛을 내게 된다. 本草綱目[16]에 의하면 청국장은 除熱, 解毒作用, 구강내의 염증과 피부화농에 효과

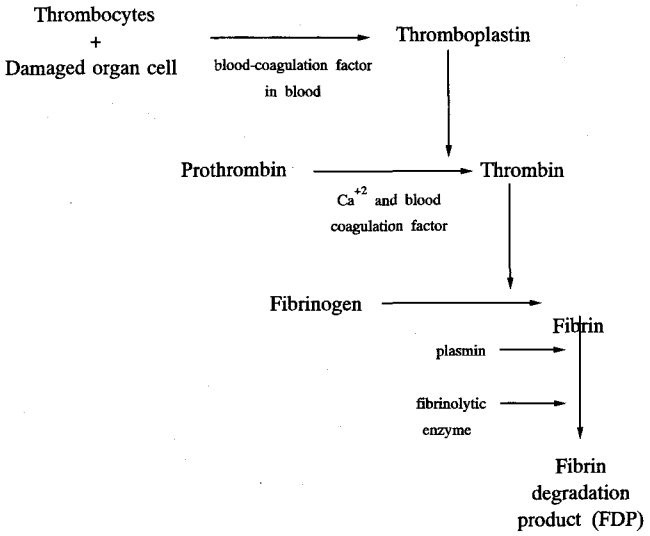


Fig. 1. Mechanism of blood coagulation and fibrinolysis in the human body.

찾는말 : 청국장, 세균, 혈전용해효소, 동정
*연락저자

가 있으며, 특히 임신하혈과 임신요혈 등에도 효과가 있다고 하여 청국장의 혈액순환계통에 대한 치료효과를 짐작할 수 있다.

오래전부터 우리나라의 전통식품인 청국장 및 된장에서도 높은 단백질 분해 효소를 분비하는 균이 존재하는 것으로 보고되고 있어[17-19] 혈전용해능이 있는 효소를 분비하는 균의 존재 가능성이 높다. 따라서 본 연구에서는 청국장으로부터 혈전 용해능이 우수한 균을 분리한 후 다양한 생화학적 특성을 조사하였으며 균체의 지방산 분석을 통하여 동정하였다.

재료 및 방법

재료

청국장 : 건국대학교 응용 생물화학과 실험실에서 제조한 청국장과 전국의 몇군데 주요시장에서 수집한 10종의 청국장을 사용하였다.

시험 균주 : 청국장에서 분리한 단백질 분해능이 있는 10개 균주를 선별하여 사용하였다.

배지

균 분리용 배지는 nutrient agar(skim milk 2%)를 사용하였으며 균 동정을 위한 생화학 시험에서는 motility 배지, Voges Proskauer시험은 MR-VP배지, casein hydrolysis에는 skim milk(pH 7.0), gelatin hydrolysis에는 0.4% nutrient gelatin배지(pH 7.0), starch hydrolysis에는 0.2% nutrient starch 배지, tryptophane hydrolysis(indole test)에는 tryptone broth (1%), urea hydrolysis에는 Stuart's urea broth를 사용하였다.[20] Carbohydrate fermentation test에는 phenol red 기초 배지에 당을 1%첨가하여 사용하였으며, citrate test에는 Simmons citrate agar배지, nitrate reduction test에는 nitrate broth배지, oxidase test에는 TSA(trypticase soy agar)배지를 사용하였다.[20]

균주분리

청국장에서 단백질 분해능이 있는 균을 분리하기 위해서 각각의 시료 10 g에 생리 멸균수 90 m*l*를 취해서 진탕하고 10^{-5}~10^{-7}으로 희석한 후 미리 준비한 nutrient agar skim milk(2%) 배지에 도말한 후 37°C에서 48시간 배양한 후 배지에 나타난 colony의 크기와 모양 및 환의 크기에 따라 10균주(KCK-1~KCK-10)를 분리하였다.

배지 상의 환의 크기 측정

분리된 각각의 균주를 skim milk(2%) nutrient agar와 casein (2%) nutrient agar배지에 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후 투명환의 크기를 측정하였다.

Fibrinolytic activity assay

Anson의 방법[21]을 변형하여 사용하였다. fibrin을 0.1 M McIlvain buffer(pH 7.0)에 0.6%농도가 되도록 용해하여, 기질 용액 3 m*l*에 조효소액 0.5 m*l*를 가한후 40°C에서 10분간 반응시켰다. 그후 0.4 M TCA용액 3 m*l*를 첨가하여 반응을 종료시키고 30분간 정치한 후 Whatman filter paper No. 2로 여과하였다. 이 여액 1°C를 취하여 0.4 M Na_2CO_3 5°C를 첨가한 후 1N-Folin reagent 1 m*l*를 가하여 상온에서 30분간 방치후 660 nm에서 흡광도를 측정하여 tyrosine 표준곡선에 의하여 분해 용출된 tyrosine양을 구하였다. 활성단위는 조효소액 1 m*l*가 1분동안 tyrosine 1 μg을 생성하는 능력을 1 unit로 하였다.

균의 선별

Nutrient agar skim milk(2%)와 casein(2%)배지로 평판배양하여 환의 크기를 비교하여 우수한 균주로 분리된 KCK-1~KCK-10을 Horikoshi[22]의 protease 생산배지를 변형시켜 (glucose 1%, polypeptone 0.5%, yeast extract 0.5%, soybean meal 1.0%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%)사용하여 37°C에서 배양하였다. 배양액을 원심분리후 상등액을 조효소로 하여 0.6% fibrin 용액을 기질로 하여 활성을 측정하여 효소활성이 가장 높은 균을 선별하였다.

Cellular fatty acid 조성 측정

균주의 cellular fatty acid 조성을 측정하기 위하여 trypticase soy broth agar(TSBA) 배지(3.0% trypticase soy broth, 1.5% agar)에서 배양한 세포들을 집균하고, 이들 세포의 지질로부터 fatty acid를 유리시키기 위해 배양균체 약 50 mg (wet weight)에 50% methanol과 15% NaOH를 첨가하여 100°C에서 30분간 가열하여 용해시켰다. Fatty acid에 methyl ester를 형성시키고 수용상에서 유기상으로 fatty acid를 추출한 후, 유기추출물을 수용상으로 세척하였다.[23]

추출된 시료의 fatty acid methyl esters는 gas chromatography에 의해 분석되었으며, 이의 profile은 Microbial Identification System Software(Microbial ID, Inc., Delaware, USA)를 이용했다.

균의 동정

선별된 KCK-7균주를 48시간 동안 배양하여 현미경 관찰을 통한 형태학적 특징 및 생리적, 생화학적 특성을 조사하였으며, KIST유전자 은행실에 보관중인 600여 library의 표준균주의 지방산 조성과의 비교조사 등으로 Bergey's manual of systematic bacteriology[24]와 MacFaddin[25]의 Biochemical tests for identification of medical bacteria에 준하여 동정하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리

전국의 주요시장에서 수집한 10종의 청국장으로 부터 skim milk 2%를 첨가한 nutrient agar배지에 평판 희석 배양법으로 도말하여 37°C에서 48시간 배양한 후 투명환(halo zone)이 나타난 균주를 선별하여 60여종의 균주를 분리하였으며 배지상에 나타난 colony 모양과 크기에 따라 10종으로

Table 1. Ratio of halo zone diameter (mm) and colony diameter (mm) shown by bacteria isolated from Chungkookjang

time / strain	skim milk (2%)-NA medium			casein (2%)-NA medium		
	12 hour	24 hour	36 hour	12 hour	24 hour	36 hour
KCK-1	2	1.5	2.08	1.86	2.83	2.09
KCK-2	2	1.5	1.92	2	2.36	1.96
KCK-3	ND	ND	2	ND	1.7	1.5
KCK-4	ND	ND	1.44	ND	1.56	1.4
KCK-5	2	1.65	1.85	2	2.8	1.87
KCK-6	3.5	3.2	3.14	2.17	2.79	2.5
KCK-7	2	2.86	2.7	2.25	2.25	1.96
KCK-8	1.75	2.5	2.7	2	1.95	1.76
KCK-9	2	2.22	2.29	2.07	2.19	1.75
KCK-10	2.29	2.5	2.45	2.3	2.18	2

*ND: not determined.

다시 분류하고 이를 KCK-1~KCK-10으로 명명하였다.

이를 각각 skim milk(2%)-NA배지와 casein(2%)-NA배지에 멸균된 tooth pick로 접종하여 배양한 후 나타난 투명환의 크기를 측정한 결과는 Table 1과 같다. Casein(2%)-NA 배지상에서 이들을 배양한 결과 투명환 지름(mm)/ 콜로니 지름(mm)의 수치가 배양 24시간에 가장 높았으며, 그중 KCK-1, 5, 6, 2, 7균주 순으로 높게 나타났다. 그러나 skim milk(2%)-NA배지에서는 많은 균주가 배양 36시간에 그 수치가 높았으며, KCK-6, 7, 8번 균주 순으로 높게 나타나 배지 조성에 따라 환의 크기에 다소 차이가 있었다.

또한 이들 분리균주의 fibrin용해능을 알아보기 위하여 Horikoshi[22]의 protease생성 배지를 변형시켜(glucose 1%, polypeptone 0.5%, yeast extract 0.5%, soybean meal 1.0%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%) 사용하여 37℃에서 배양 후 배양시간에 따른 이들의 효소활성을 0.6% fibrin용액을 이용하여 측정하였다.

Table 2에서와 같이 배양시간이 경과함에 따라 fibrin용해 효소의 활성이 증가되어 대부분의 균주가 배양 48시간에 최대 효소활성을 나타내었다. 그러나 KCK-9 균주는 배양 24시간에 최대 효소활성을 나타내었으나, 효소활성은 매우 낮았다. 특히 KCK-7 균주의 경우 환의 크기는 분리 균주중 5번째로 높았으나 fibrin용해 효소의 활성이 가장 높았으며, KCK-1 균주는 casein배지상에서 투명환이 가장 크게 나타났으나 fibrin용해능은 다소 낮게 나타나 투명환의 지름과 fibrin용해효소 활성간에는 다소 차이가 있었다. 이는 casein이나 skim milk배지에서의 각 분리 균주가 생성하는 fibrin용해 효소의 기질 특이성에 기인하는 것으로 생각된다. 이상의 실험에서 fibrinolytic enzyme activity가 가장 높은 KCK-7 균주를 택하여 이를 동정하였다.

Table 2. Fibrinolytic activities of the bacteria isolated from Chungkookjang

time / strain	fibrinolytic activity (unit/ml)		
	24 hour	48 hour	60 hour
KCK-1	55.9	293.7	102.2
KCK-2	23.2	43.2	25.2
KCK-3	19.4	60.9	30.6
KCK-4	46.1	55.7	48.6
KCK-5	35.4	57.4	40.2
KCK-6	48.3	108.9	62.2
KCK-7	345.8	628.3	510.3
KCK-8	276.9	584.9	432.7
KCK-9	65.4	32.2	31.3
KCK-10	40.8	276.7	127.2

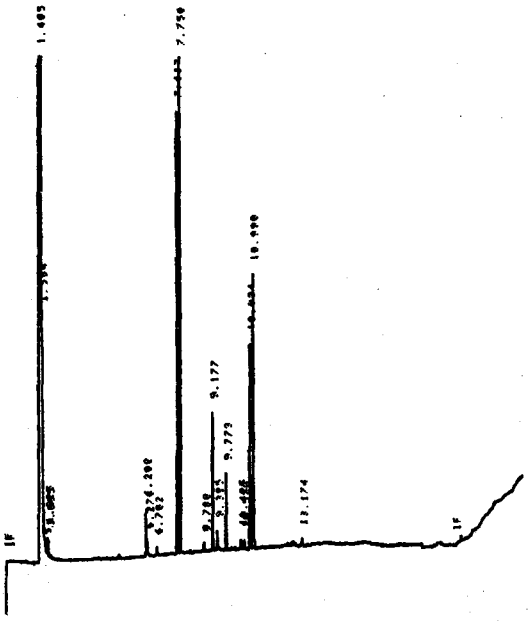
분리 균주의 동정

청국장으로 부터 skim milk agar 배지상에서 단백 분해능이 있는 10종의 균주를 screening하여 이를 halo환의 크기와 fibrinolytic activity를 조사하여 높은 균으로 KCK-7 균주를 선정하였다. 본 균주의 형태학적 특성, 배양특성 및 당류의 발효성, catalase, oxidase 생성 등 균주의 동정에 단서를 제시해 줄 항목들을 선택하여 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

KCK-7균주의 형태는 운동성이 있는 Gram 양성의 간균으로서 내생포자를 형성하고 5% NaCl에서 생육가능하였으며 요오드 반응결과 starch 가수분해능이 있었다. 또한 casein과 gelatin을 매우 빠르게 가수분해하였다. Glucose, cellobiose, fructose, mannitol, arabinose를 이용하여 산을 생성하였으며, rhamnose와 lactose는 이용하지 못하였다. 또한 catalase와 oxidase 시험에서는 양성을 나타내었으나, urea를 분해하지 못하였고, tryptophane을 이용해 indole을 생성하

Table 3. Morphological, cultural and biochemical characteristics, and utilization of sugars of the strain KCK-7

1. Morphological characteristics		
- Form	:	rods
- Motility	:	+
- Gram's stain	:	+
- Endospores	:	+
2. Cultural characteristics		
- growth in 2% NaCl	:	+
5% NaCl	:	+
7% NaCl	:	±
10% NaCl	:	-
3. Biochemical characteristic		
- catalase	:	+
- oxidase	:	+
- citrate	:	+
- nitrate reduction	:	+
- acetoin production	:	+
- casein hydrolysis	:	+
- starch hydrolysis	:	+
- gelatin hydrolysis	:	+
- urea hydrolysis	:	-
- indoleproduction	:	-
3. Utilization of sugars		
- glucose(acid/gas)	:	±
- cellobiose	:	+
- fructose	:	+
- mannitol	:	+
- rhamnose	:	-
- arabinose	:	+
- xylose	:	±
- lactose	:	-



D: 1815 H0625 (SA-101) Date of run: 4-DEC-96 03:04:18

Bottle: 67 SAMPLE [AEROBE]

RT	Area	Ar/Ht	Respon	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.496	646434304	0.033	. . .	7.019	SOLVENT PEAK · · · ·	· · ·	< min rt	
1.596	2320	0.023	. . .	7.236	· · · · · · · · · · ·	· · ·	< min rt	
1.835	616	0.025	. . .	7.755	· · · · · · · · · · ·	· · ·	< min rt	
1.891	656	0.027	. . .	7.876	· · · · · · · · · · ·	· · ·	< min rt	
6.239	2760	0.037	0.926	13.617	14:0 ISO · · · · · · · ·	1.94	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
6.307	928	0.041	. . .	13.670	· · · · · · · · · · ·	· · ·		
7.652	28464	0.039	0.901	14.622	15:0 ISO · · · · · · · ·	19.47	ECL deviates 0.001	Reference -0.000
7.785	59776	0.040	0.901	14.712	15:0 ANTEISO · · · ·	40.85	ECL deviates 0.001	Reference -0.000
8.831	680	0.044	0.9.00	15.387	16:1 w7c alcohol · ·	0.46	ECL deviates 0.001	
9.215	9712	0.042	0.901	15.625	16:0 ISO · · · · · ·	6.64	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
9.425	1464	0.046	0.902	15.756	16:1 w11c · · · · · ·	1.00	ECL deviates -0.001	
9.815	5544	0.043	0.905	15.999	16:0 · · · · · · · ·	3.81	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
10.467	816	0.045	0.909	16.387	ISO 17:1 w10c · · ·	0.56	ECL deviates -0.001	
10.617	760	0.048	0.910	16.476	Sum In Feature 5 · ·	0.52	ECL deviates -0.001	17:1 ISO I/ANTEI B
10.875	15376	0.044	0.911	16.630	17:0 ISO · · · · · ·	10.63	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
11.031	20376	0.043	0.912	16.722	17:0 ANTEISO · · · ·	14.10	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
*******	760	· · ·	· · ·	· · ·	SUMMED FEATURE 5 · ·	0.52	17:1 ISO I/ANTEI B	17:1 ANTEISO B/i I

Solvent Ar	Total Area	Named area	% Named	Total Amnt	Nbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL Shift
646434304	146656	145728	99.37	131784	7	0.001	0.002

TSBA [Rev 3.90] Bacillus · · · · · · · · · · · · · · · · · · 0.636

*B. subtilis** · · · · · · · · · · · · · · · · 0.636

Fig. 2. Gas chromatogram of cellular fatty acids of *Bacillus subtilis* KCK-7.

지 못하였다. 이상의 결과로 부터 본 균주는 Bergey's manual상의 *Bacillus* sp.의 특징과 일치하였다.[24]또한, MIS(microbial identification system)를 이용한 지방산 분석에서는 Fig. 2와 같이 주로 iso-branched fatty acid와 anteiso-branched fatty acid로 구성되어 있으며 $C_{15:0}$ iso-fatty acid는 19.47%, $C_{15:0}$ anteiso-fatty acid는 40.85%, $C_{17:0}$ iso-fatty acid는 10.63 %, $C_{17:0}$ anteiso-fatty acid는 14.10%가 포함되어 있었다.

이는 KIST생명공학 연구소 유전자 은행실에 보관 중인 600여 library의 표준 균주와 비교할 때 본 실험 균주는 63.6 % similarity로 *Bacillus subtilis*와 가장 유사한 균주인 것으로 밝혀졌다. 따라서 본 균주를 *Bacillus subtilis* KCK-7로 명명하였다.

배양 최적 pH

Protease생성 배지(glucose 1%, polypeptone 0.5%, yeast extract 0.5%, soybean meal 1.0%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%)를 이용하여 분리 균주의 혈전용해 효소 생성에 미치는 배양 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 배지의 pH를 각각 5~9로 조절하여 37°C에서 48시간 배양후 효소활성을 측정한 결과(Fig. 3) pH 6~9인 배지에서 효소의 활성이 높게 나타

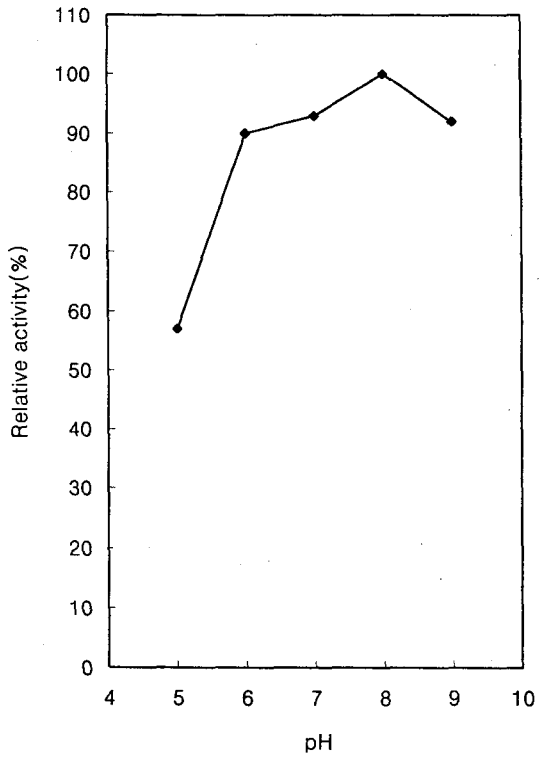


Fig. 3. Effect of initial pH on fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* KCK-7.

났고, 그 중 pH 8에서 가장 높았으며 pH 5에서는 낮았다. 이러한 결과는 Takami 등[26]이 보고한 *Bacillus* sp.의 protease 생산 최적 pH인 9.5보다는 낮았으나 Mao 등[27]이 보고한 protease생산 최적 pH 6.5보다는 높았다. 또한 김[9]이 청국장에서 분리한 혈전 용해 효소를 생성하는 *Bacillus* sp.은 초기 pH 7~9에서 효소 생성량이 높았으며 효소생성을 위한 최적 pH가 8.0으로 본실험의 결과와 유사하였다. 이상의 결과는 대부분의 *Bacillus* sp.은 alkali영역에서 생육과 효소생성이 좋았다는 결과[28-29]와 일치하였다.

배양 최적 온도

본 균주에 의한 혈전 용해효소 생성에 미치는 배양 온도의 영향을 조사한 결과 Table 4에서와 같이 37°C에서 배양시 효소활성이 가장 높게 나타났으며 25°C와 40°C에서도 비교적 높은 효소활성을 나타냈다. 그러나 45°C에서 배양시에는 균의 성장은 관찰되었으나 효소활성이 매우 낮았다.

이상의 결과에서 볼 때 본 균은 중온균으로 생각되며 대부분의 *Bacillus* spp. 세균들이 30~37°C에서 생육 최적온도를 갖는 것과 일치하는 결과이지만 Manachini 등[30]이 보고한 alkaline protease생산을 위한 *Bacillus* sp.균주의 최적온도가 45°C이었다는 보고와 황 등[31]의 cyclodextrin glucosyltransferase 생산을 위한 *Bacillus* sp.의 최적온도가 50 °C이었다는 보고보다는 낮았다.

Table 4. Effect of temperature on fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* KCK-7.

time / temperature	fibrinolytic activity (unit/ml) 24 hr	48 hr
25°C	216.4	467.1
30°C	164.3	538.4
35°C	306.4	572.6
37°C	343.6	638.7
40°C	272.1	556.6
45°C	6.1	6.4

감사의 글

본 연구는 1996년 건국대학교 학술진흥처 연구비지원에 의해 수행된 과제의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다. 또한 세포의 지방산분석에 도움을 주신 KIST 배경숙 박사님과 이문수선생님께 감사드립니다.

참고문헌

1. Lee, S. K., J. H. Sohn, E. S. Choi and S. K. Rhee (1993) Screening and Purification of Anticoagulant Proteins from Korean Leeches. *Kor. J. Biochem.* **26**(3), 228-234.
2. Electricwala, A., R. T. Sawyer, J. C. Powell, and T. Atkinson (1991) Isolation of thrombin inhibitor from the leech Hirudinaria manillensis, *Blood Coagulation and Fibrinolysis,* **2**, 83-91.
3. Krstenansky, J. L., T.J. Owen, M. T. Yates, and S. J. T. Mao (1990) The C-terminal binding domain of hirullin P18 Antithrombin activity and comparison to hirudin peptides, *FEBS Letters,* **269**, 425 -431.
4. Markwardt, F. (1957) The isolation and chemical characterization of hirudin. *Hoppe-Seylers Z.Physiol. Chem.,* **308**, 147-152.
5. Steiner, V., R. Knecht, and M. Gruetter (1990) Isolation and purification of novel hirudins from the leech *Hirudinaria manillensis* by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatography,* **530**, 273-279.
6. Marks, D., A. Marks, and C. Smith (1996) *Basic Medical Biochemistry*, Williams & Wilkins, p.107 (1996).
7. 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 kringleless tissue-type plasminogen activator (t-PA) mutant, *Fibrinolysis,* **1**, 75-81.
8. Pannekoek, H., C. de Vries and A.J. van Zonneveld (1988) Mutants of human tissue-type plasminogen activator(t-PA), structural aspects and functional properties, *Fibrinolysis,* **2**, 123-129.
9. Kim, Yong Tack (1995) Characteristics of Fibrinolytic Enzyme Produced by *Bacillus* sp. Isolated from Chungkook-jang. *Sejong Univ. doctoral degree thesis.*
10. Nakajima, N., H. Mihara and H. Sumi (1993) Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus, Biosci. Biotech. Biochem.,* **57**(10), 1730-1736.
11. Mihara, H., H. Sumi, T. Yoneta, H. Mizumoto, R. Ikeda, M. Seiki and M. Maruyama (1991) A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus fubellus, Japanese J. Physiol.,* **41**, 461-468.

12. 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, *Experimentia,* **43**, 1110-1118.
13. Sumi, H. (1990) Nattokinase and Health-Development of Natto. *Bioindustry*, **7**(11), 725-730.
14. Kim, K. J., M. K. Ryu and S. S. Kim (1982) Chungkookjang Koji Fermentation with Rice Straw. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **14**, 301-308.
15. Lee, K. H., H. J. Lee and M. K. Chung (1971) Studies on Chung-Kook-Jang (Part I)-on the changes of soy-bean protein in manufacturing Chung-Kook-Jang. *Kor. Agr. Chem. and Biotechnol.* **14**, 191-196.
16. Bonchokangmok (3ed) (1983) Cereals Part, Fermentation Materials, **25**(14), Komun publisher, Seoul, p.889.
17. Choi, Kyung Joo (1995) Separation of *Bacillus* sp. and Changes of NH_2-N, NH_3-N, and protease activity in Chonggukchang meju adding with mugwort (*Artemisia asiatica* N.) extract. *Kon-Kuk Univ. master's degree thesis.*
18. Kwon, O. J., J. K. Kim and Y. G. Chung (1986) The Characteristics of Bacteria Isolated from Ordinary Korean Soy Sauce and Soybean Paste. *Kor. Agr. Chem. and Biotechnol.* **29**(4), 422-428.
19. Choi, C., K. S. Choi, Y. J. Cho, S. I. Lim, S. Kim, J. H. Son, H. D. Lee and Y. H. Kim. (1996) Characteristics and action pattern of protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111 in Korean traditional soy sauce. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **25**(6), 915-921.
20. Harold J. Benson (1994) Microbiological Applications 6th, Wm. C. Brown Publishers, p. 143-168.
21. Anson M. L. (1939) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin, *J. Gen. Physiol.*, **22**, 79-85.
22. Horikoshi, K.(1971) Production of alkaline enzyme by alkalophilic microorganism, *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1783-1791.
23. Miller, L. T. (1982) Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acid, *J. Clin. Microbiol.*, **18**, 861 -867.
24. Butler, J. P. (1986) Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams & Wilkins, Volume II, p.1104-1133.
25. MacFaddin, J. F. (1980) Biochemical tests for identification of medical bacteria, 2nd ed., Williams & Wilkins, p.36.
26. Takami, H., T. Akiba and K. Horikoshi (1990) Characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 519-523.
27. Mao, W., R. Pan and D. Feedman (1992) High production of alkaline protease by *B. licheniformis* in a fed-batch fermentation using a synthetic medium, *J. Ind. Microbiol.*, **11**, 1-7.
28. Takii, Y. (1990) Alkaline serine protease produced from citric acid by *Bacillus alcalophilus* subsp. *halodurans* KP 1239, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 57-62.
29. Chu, I. M., C. Lee and T. S. Li (1992) Production and degradation of alkaline protease in batch culture of *B. subtilis* ATCC 14416, *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 755-761.
30. Manachini, P. L., M. G. Fortina and C. Parini (1988) Thermostable alkaine protease produced by *Bacillus thermoruber*, a new species of *Bacillus, Appl. Microbiol. Biotechnolog.*, **28**, 409-413.
31. Hwang, J. B., S. H. Kim, T. K. Lee and H. C. Yang (1990) Production of cyclomaltodextrin from *Bacillus stearothermophillus, Kor. J. Appl. Micrbiol. Biotech.* **18**, 578-584.

Isolation and Identification of Fibrinolytic Bacteria from Korean Traditional Chungkookjang

Seok Heo, Si kyung Lee* and Hyun Kyu Joo[1](*Department of Applied Biology and Chemistry, KonKuk University and [1]Divsion of Food Resources, Sun Moon University*)

Abstract : In this study, the bacteria which could hydrolyze the fibrin produced through the blood coagulation mechanism in the human body, were isolated from Chungkookjang. The KCK-7 strain was selected among the isolated bacteria as the best strain for fibrinolytic activity. It was spore forming and Gram positive. $C_{15:0}$ anteiso fatty acid and $C_{15:0}$ iso fatty acid were 40.85% and 19.47%, respectively as major component among its cellular fatty acid composition. It showed the similarity of 63.6%, compared with standard strain. It was thus identified to be *Bacillus subtilis* according to Bergey's manual of systematic bacteriology and its fatty acid profiles of Gas chromatography. The optimum culture temperature and pH were 37℃ and 8 for the production of fibrinolytic enzyme by *Bacillus subtilis* KCK-7.

Key words : Chungkookjang, bacteria, fibrinolytic enzyme, identification
*Corresponding author