

청국장으로 부터 분리한 *Bacillus subtilis* KCK-7에 의한 fibrin분해 효소 생산 배지 최적화

이시경* · 허 석 · 배동호 · 최기현¹

건국대학교 농업생명과학대학 응용생물화학과, ¹효성생활산업(주) 기술연구소

Medium Optimization for Fibrinolytic Enzyme Production by *Bacillus subtilis* KCK-7 Isolated from Korean Traditional Chungkookjang. Lee, Si Kyung*, Seok Heo, Dong Ho Bae, and Kee Hyun Choi¹. Department of Applied Biology and Chemistry, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea, ¹Hyosung Indusrtly Co. Technical Research Center, Anyang 430-080, Korea - The medium optimization was investigated to maximize the production of fibrinolytic enzyme by *Bacillus subtilis* KCK-7 isolated from *Chungkookjang*, which could hydrolyze the fibrin produced through the blood coagulation mechanism in human body. The simultaneous addition of 5% soluble starch and 0.5% cellobiose to the medium as carbon sources resulted in the highest production of the fibrinolytic enzyme. Likewise, the optimized composition of medium appeared to be 0.5% peptone, 0.3% beef extract, 0.5% cellobiose, 5% soluble starch, 2% raw soybean meal and 0.02% Na₂HPO₄. In addition, the fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* KCK-7 reached to the maximum level after the cultivation for 48 hr, using the optimized medium.

Key words: *Chungkookjang*, fibrinolytic enzyme, *Bacillus subtilis*, medium optimization

혈전은 생체에 상처가 발생 시 혈액을 응고시켜 과다한 출혈을 방지하고 상처의 복구를 위한 복잡한 혈전 생성기작에 의해서 이루어지고 있다. 혈전은 혈류중의 fibrinogen이 활성화된 thrombin에 의해서 fibrin으로 전환되어 불용성의 중합체를 형성함으로써 생성된다[20]. 최근들어 서구화된 식문화의 형성 등으로 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[4, 14, 18, 21, 27].

혈전 용해제로는 urokinase, streptokinase가 가장 많이 사용되고 있으며 TPA(tissue type plasminogen activator) 등도 개발되고 있다. 그러나 이와 같은 제품은 반감기가 짧고, 가격이 매우 높은 단점을 지니고 있다. 현재 경구투여용 혈전 용해제로서는 6가지의 혈전 용해 효소를 함유하고 있는 것으로 알려진 지렁이(*Lum-*

bricus lubellus)의 건조 불말을 캡슐화해서 한국과 일본에서 시판되고 있다[22, 23]. 최근에 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 나타내었으며, 혈중 fibrin분해 산물 항원량은 2일째 가장 높은 수치를 나타내다가 점차 감소하였고, TPA의 항원량은 4일째까지 점차 증가하다가 8일째는 다소 감소된다고 보고하여[28, 29] 식품을 섭취함으로써 여러 혈관질환을 치료 및 예방할 수 있다는 점에서 관심을 끌고 있다. 일본에서는 natto가 혈전용해능을 지닌 기능성 제품으로 알려져 건강식품으로서 판매량이 증가할 것으로 예상하고 있다.

우리나라도 일본의 natto와 마찬가지로 옛부터 된장, 고추장, 간장, 청국장 등의 장류를 제조하였고, 장류의 고유한 맛은 콩단백질의 가수분해물인 아미노산에서 기인하는 구수한 맛들의 조화에서 이루어졌다. 청국장은 삶은 콩에 벗집을 이용하여 재래식으로 발효시키거나[11] *Bacillus subtilis*를 이용하여 단시간 발효 숙성시켜 제조되며[17] 실모양의 끈끈한 점질물이 생성되고 특유한 향기와 맛을 내게 된다. 또한 청국장의 기능성에 관한 연구도 진행되어 항암효과, 혈압강하 활성, 혈청 콜레스테롤 저하 등에도 효과가 있다고 하여[31] 청국장의 혈액순환계에 대한 치료효과를 짐작할 수 있다.

오래전부터 우리나라의 전통식품인 청국장 및 된장에

*Corresponding author

Tel. 82-2-450-3759, Fax. 82-2-456-7183

E-mail: lsikyung@kkucc, konkuk.ac.kr

서도 높은 단백질 분해 효소를 분비하는 균이 존재하는 것으로 보고되고 있어[3, 15] 혈전용해능이 있는 효소를 분비하는 균의 존재 가능성이 높아 분리, 동정하였으며 [19] 본 연구에서는 청국장으로 부터 분리된 혈전 용해 능이 우수한 *Bacillus subtilis* KCK-7균주를 이용, 배지 조건을 달리하여 혈전 용해 효소생산을 위한 최적의 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

시험균주

청국장에서 분리한 혈전 용해효소 활성(fibrinolytic activity)이 있는 균으로 선정된 *Bacillus subtilis* KCK-7균주[19]를 사용하였다.

혈전용해 효소활성 측정

NB배지에 각각의 조성을 달리 첨가한 액체 배지에 *Bacillus subtilis* KCK-7균주를 접종한 후 37°C에서 진탕 배양 후 일정량을 취하여 3,000×g에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 조효소액으로 하고 Fayek 등[5]과 김 [12]이 사용한 방법을 변형하여 효소활성을 측정하였다. fibrin(Sigma Co.)을 0.1 M McIlvaine buffer(pH 7.0)로 0.6%가 되도록 용해하여, 기질 용액 3 ml에 조효소액 0.5 ml를 가한후 40°C에서 10분간 반응시켰다. 그후 0.4 M TCA용액 3 ml를 첨가하여 30분간 정치한 후 Whatman filter paper No.2로 여과하였다. 그 여액 1 ml를 취하여 0.4 M Na₂CO₃ 5 ml를 첨가한 후 1 N-Folin reagent 1 ml를 가하여 상온에서 30분간 방치후 660 nm에서 흡광도를 측정하여 tyrosine 표준곡선에 의하여 분해 용출된 tyrosine양을 구하였다. 활성단위는 조효소액 1 ml가 1분 동안 tyrosine 1 µg을 생성하는 능력을 1 unit로 하였다.

배양조건 확립

Bacillus subtilis KCK-7의 효소생산을 위한 배지조성의 최적조건을 규명하기 위하여 nutrient broth(NB, 0.5% peptone, 0.3% beef extract)를 기본배지로하여 각각의 조성을 달리 첨가하여 사용하였으며 종균으로는 NB배지에 24시간 배양된 KCK-7균주를 각각의 멸균배지 100 ml에 1% 접종한 후 37°C에서 160 rpm으로 진탕 배양하면서 배양시간에 따른 효소활성과 균체성장을 측정하였다. 균체성장은 각각 배양 24시간과 48시간에 spectrometer를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

배양시간에 따른 영향

배양시간에 따른 효소생성과 균의 생육을 조사하기 위

Table 1. Effect of carbon sources on the growth and fibrinolytic enzyme production of *Bacillus subtilis* KCK-7

Component	Fibrinolytic enzyme activity (unit/ml)	Cell growth (A ₆₆₀)
Control	82.9	0.790
Mono, disaccharide (0.5%, w/v)		
Glucose	55.2	1.033
L-Rhamnose	80.1	1.070
Fructose	59.2	0.868
Xylose	95.7	1.472
L-Arabinose	81.1	0.580
Lactose	79.8	0.850
Sucrose	51.1	0.647
Cellobiose	243.2	1.969
Mannitol	77.6	0.545
Maltose	99.9	1.912
Sorbitol	90.7	1.374
Glycerol	53.1	0.389
Polysaccharide(5%, w/v)		
Dextrin	142.7	1.846
Soluble starch	483.1	2.632

basal medium: nutrient broth. Cells were grown at 37°C, 150 rpm for 24 hrs (cell growth) and 48 hrs (fibrinolytic activity).

하여 균의 생육은 NB배지에 0.5% cellobiose, 2% soluble starch, 0.02% Na₂HPO₄를 첨가하여 사용하였고, 효소생성을 위해서는 NB배지에 0.5% cellobiose, 5% soluble starch, 2% 생대두분, 0.02% Na₂HPO₄를 첨가하여 사용하였다.

결과 및 고찰

탄소원의 영향

청국장으로 부터 분리된 *Bacillus subtilis* KCK-7 균주의 fibrinolytic enzyme의 생산을 위한 탄소원의 효과를 조사하기 위하여 NB배지를 기본배지로 하여 glucose, fructose, xylose, arabinose 등의 단당류와 lactose, maltose, cellobiose 등의 이당류를 각각 0.5%가 되도록 첨가한 후 효소활성 및 균체 성장을 측정한 결과는 Table 1과 같다.

본 균은 탄소원으로 다당류인 dextrin과 soluble starch를 각각 5%씩 첨가시에 균의 성장과 효소활성이 높게 나타났으며, 특히 soluble starch의 경우는 첨가한 탄소원 중 가장 높은 효과를 보여 대조구에 비하여 5배 이상 높은 효소활성을 나타내었다. 또한 이당류인 cellobiose와 오탄당인 xylose를 첨가시 대조구보다 균의 성장과 효소활성이 높게 나타났다. cellobiose는 다당류와 혼합 첨가한 경우 단독으로 첨가한 경우보다 효소활성이 더 증가되었으며 특히 Table 2에서와 같이 soluble starch와 혼

Table 2. Comparison of sugar addition effects on fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* KCK-7

Component	Fibrinolytic enzyme activity (unit/ml)	Cell growth (A ₆₆₀)	
		24 hr	48 hr
Control	80.9	0.759	0.698
Glucose 0.5%+ Dextrin 5%	137.7	0.612	0.514
Glucose 0.5%+ Soluble starch 5%	496.5	2.790	2.987
Cellobiose 0.5%+ Dextrin 5%	164.9	2.344	2.517
Cellobiose 0.5%+ Soluble starch 5%	730.1	3.151	3.149

합 첨가한 경우가 dextrin과 함께 첨가한 경우보다 높게 나타나, 본 균주의 탄소원으로 cellobiose와 soluble starch를 각각 0.5%와 5%씩 혼합사용시 효소생산에 적합한 것으로 나타났다. 그러나, glucose와 fructose를 첨가시에는 균의 성장은 다소 높았으나 효소활성은 심하게 억제되었다. 또한 glycerol을 첨가시에 더욱 심하게 억제되었음이 관찰 되었다. glucose의 경우는 다당류와 혼합사용시 glucose나 다당류의 단독 사용할 때와 비교하였을 때 효소 활성의 증가 효과가 거의 없었다. 이상의 결과는 구 등[13]의 *B. licheniformis*를 이용한 protease 생성에 관한 실험에서 탄소원으로 lactose가 좋았다고 하여 본 균주와 상이하였으나 최 등[3]이 재래식 간장에서 분리한 *B. subtilis globigii*은 탄소원으로 soluble starch 2% 첨가시 효소활성이 첨가한 다른 탄소원에 비해 효소활성이 크게 증가함을 보고하였고 이 등[16]은 alkaline protease를 생성하는 균주의 분리와 배양실험에서 starch를 탄소원으로 첨가시 분리된 대부분 균주의 효소생성이 starch를 첨가하지 않은 대조구에 비해 증가하였다고 하여 본 실험의 결과와 유사하였다. 그러나 이들은 단당류와 이당류의 첨가 실험에서는 분리된 여러 균주간에 다소 상이한 결과를 얻었다고 하였다. 김[12]이 혈전 용해효소 생산균주로 분리한 *Bacillus* sp.는 탄소원으로 dextrin과 soluble starch를 2% 첨가시는 효소생성이 증가되었으나 soluble starch보다는 dextrin이 효소생성에 효과적이었다고 하였다. 또한 glucose, fructose, lactose, sucrose 등 대부분의 단당류와 이당류를 첨가시 효소생성이 억제되었다고 하여 본 실험에서 분리한 균주와 많은 차이를 보였다.

질소원에 따른 영향

효소생산을 위한 다양한 질소원에 대한 영향을 조사하기 위하여 기본배지에 무기질소원과 유기질소원을 각각 0.5%씩 첨가하여 효소활성 및 균체 성장을 측정된 결과 Table 3과 같다.

Table 3. Effect of nitrogen sources on the growth and fibrinolytic enzyme production of *Bacillus subtilis* KCK-7

Component (0.5%)	Fibrinolytic enzyme activity (unit/ml)	Cell growth (A ₆₆₀)	
		24 hr	48 hr
Control	80.9	0.911	0.743
NH ₄ Cl	20.1	0.996	1.763
NH ₄ NO ₃	68.7	1.464	0.718
(NH ₄) ₂ SO ₄	16.9	1.105	1.688
(NH ₄) ₂ HPO ₄	56.1	1.605	0.687
NaNO ₃	75.6	0.898	0.706
KNO ₃	64.1	1.273	0.679
Urea	43.8	0.864	0.662
Glycine	19.4	0.690	0.580
Polypeptone	85.7	2.283	1.949
Yeast extract	60.1	2.189	1.943
Casein	22.2	0.094	1.916
Peptone	119.7	1.348	1.526
Beef extract	73.7	2.913	1.696
Soybean meal	130.3	-	-

유기 질소원으로 soybean meal, peptone, polypeptone을 각각 첨가시 기본배지에서 보다 높게 나타났으며 특히, soybean meal을 첨가시에 가장 높은 것으로 나타났으나 무기 질소원으로 황산암모늄을 이용시 효소활성이 가장 낮았다. 이는 콩을 주 원료로한 청국장에서 분리한 균임을 고려할 때 대두 성분이 본 효소를 생성하는데 적합한 것으로 생각된다. 탈지 대두분의 첨가효과를 알아보기 위하여 soybean meal의 종류와 농도를 각각 1%, 2%, 3%로 달리하여 효소활성을 측정된 결과 Table 4에서와 같이 생 대두분 2% 첨가시에 효소생성이 가장 높게 나타나 대조구에 비해 4배 이상의 증가효과를 보였다. protease생산에 있어서 Kalebina 등[8]은 *Bacillus brevis*를 이용시 질소원으로 yeast extract가 우수하였다고 하였으며, 이 등[16]도 토양으로부터 분리한 alkaline protease생성 균주는 질소원으로 beef extract와 casein을 이용시 가장 높은 효소생성 효과가 있었다고 보고하였으나 본균의 경우 beef extract를 첨가시 오히려 효소생성이 감소하여 상이한 결과였다. 그러나 김 등[10]은 *B. amyloliquefaciens* NS 15-4를 이용하여 protease를 생산시 soybean meal이 효소생성에 우수한 효과를 보였다

Table 4. Effect of various soybean meals on fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* KCK-7 (unit/ml)

Sorts	Concentration	1%	2%	3%
Raw soybean meal		138.0	183.7	165.1
Defatted soybean meal		116.1	176.6	127.3
α-Raw soybean meal		136.2	159.1	112.7
α-Defatted soybean		100.5	77.3	52.8

Table 5. Effect of mineral sources on the growth and fibrinolytic enzyme production of *Bacillus subtilis* KCK-7

Component (0.02%)	Fibrinolytic enzyme activity (unit/ml)	Cell growth (A ₆₆₀)	
		24 hr	48 hr
Control	85.8	0.759	0.698
CuSO ₄ · 5H ₂ O	6.5	0.081	0.081
MgSO ₄ · 7H ₂ O	103.8	1.256	1.130
K ₂ HPO ₄	106.2	0.743	1.102
Na ₂ HPO ₄	119.9	1.091	1.018
KH ₂ PO ₄	109.4	1.060	1.016
CaCl ₂	108.7	0.159	1.049
CoCl ₂ · 6H ₂ O	19.8	0.097	0.097
MnCl ₂	79.1	0.887	0.826
KCl	98.6	1.007	0.089
NaCl	99.6	0.858	1.135

는 보고와 Takami 등[30]이 *Bacillus* sp.를 이용한 alkaline protease 생산에서 soybean meal이 높은 효과를 보였다고 하여 본 실험의 결과와 일치하였다.

무기질원에 따른 영향

효소 생산과 균체 증식에 있어서 미량원소로서 무기질의 영향을 조사하기 위하여 NB기본배지에 각각의 무기질을 0.02%씩 첨가한 결과는 Table 5와 같이 Na₂HPO₄를 첨가시 효소생산이 가장 높게 나타났고 CaCl₂첨가시에도 효소생산에 높은 효과를 보였으나 CuSO₄ · 5H₂O와 CoCl₂ · 6H₂O의 첨가시에는 효소생산 및 균체생육이 강력히 억제되었다. 이러한 결과는 대부분의 *Bacillus* spp.에서는 MgSO₄ · 7H₂O가 효소생산과 균체생육에 영향을 준다는 Horikoshi[6] 및 Horikoshi 등[7]의 보고와 일치하였으나, Mn²⁺, Cu²⁺를 첨가시 효소생산이 증가한다는 Zlotnik 등[32]의 보고와는 상이하였다. 또한 Na₂HPO₄를 0.02% 첨가시 효소생성의 증가는 Santos 등[25] 및 Horikoshi[6]의 0.02%와 일치하지만, Raman 등[24]의 0.5% 보다는 월등히 낮았다.

배양시간에 따른 효소의 생산

이상의 실험에서 NB배지를 기본배지로 하여 최적화된 배지, 즉 nutrient broth에 cellobiose 0.5%, soluble starch 5%, 생대두분 2%, Na₂HPO₄ 0.02%를 첨가한 후 *Bacillus subtilis* KCK-7균주를 배양시 배양시간에 따른 혈전 용해 효소의 생성을 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. 균의 성장과 함께 혈전용해 효소의 생성이 증가하였으며 배양 48시간에 1,357 unit/ml의 최대활성을 보인 후 그 후 부터 감소하는 경향을 보였다. 본 균주를 이용하여 최적화된 배지를 사용하였을 때 Horikoshi의 변형배지를 사용시[19] 보다 효소활성이 2배 이상의 증가효과가 있었다. 이상의 결과는 alkaline protease 생산을 위해 Schin-

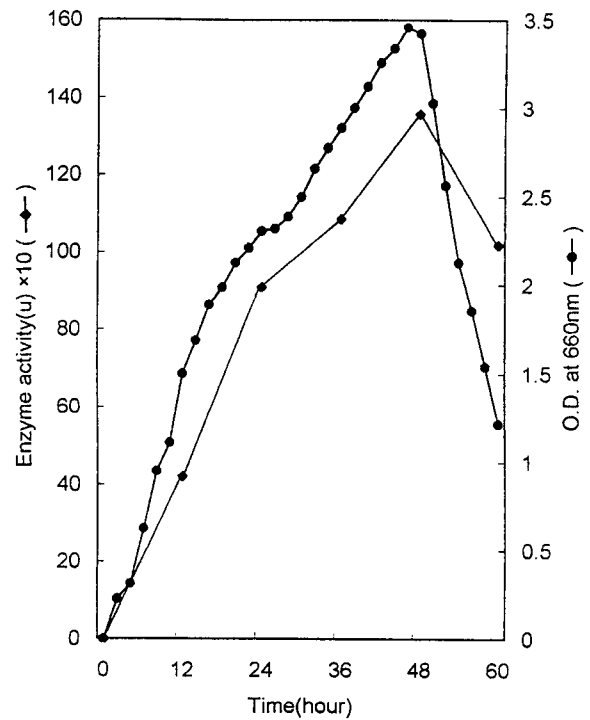


Fig. 1. Time course of cell growth and fibrinolytic enzyme production of *Bacillus subtilis* KCK-7.

ner 등[26]이 *Pseudomonas* sp.을 이용시 배양 96시간에 최대 효소활성을 보였다는 보고나 장[1]이 *Xanthomonas* sp.를 이용하였을 때 배양 84시간에 alkaline protease의 최대 활성을 보였다는 보고와 많은 차이가 있었으나, 이는 이들이 사용한 균주가 저온성 세균에 기인 하는 것으로 생각된다. 한편 김[12]이 청국장에서 혈전용해 효소 생성 균으로 분리한 *Bacillus* sp.의 경우 배양시간이 증가함에 따라 효소활성이 증가하여 배양 8시간에 최대 효소활성을 나타내었다고 하여 배양시간에 따른 본균의 효소 생성 pattern과 많은 차이가 있었다. 그러나 Kembhavi 등[9]이 분리한 *Bacillus* NCM No. 64균주가 배양 38시간에 protease 최대 활성이 있었다는 보고와는 유사하였다.

요 약

청국장으로부터 분리한 체내혈액의 응고기작에 의해 생성된 단백질인 fibrin을 분해할 수 있는 효소를 분비하는 *Bacillus subtilis* KCK-7을 이용하여 fibrinolytic enzyme의 생성을 위한 최적 배지조건을 조사하였다. 탄소 원으로서 soluble starch 5%와 cellobiose 0.5% 첨가시 가장 높은 효소생성을 보였으며, 질소원으로는 peptone, 생대두분이 우수하였고 특히, 생대두분 2%첨가시에 가장 높은 효과를 보였다. 최적 배지조건은 0.5% peptone, 0.3% beef extract, 0.5% cellobiose, 5% soluble starch,

2% soybean meal, 0.02% Na₂HPO₄이었다. 본 배지를 효소생산용 배지로 사용할 때 배양 48시간에 효소생성이 가장 높은 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 건국대학교 학술진흥처 연구비 지원에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Chang, H. S. 1997. A study on the alkaline protease from *Xanthomonas* sp. YL-37. Kon-Kuk Univ. Doctoral Degree Thesis.
- Choi, C., K. S. Choi, Y. J. Cho, S. I. Lim, S. H. Lee, J. H. Son, H. J. Choi, and H. D. Lee. 1996. Characteristics and action pattern of protease from *Bacillus subtilis* globigii CCKS-118 in Korean traditional soy sauce. *Kor. Agr. Chem. Soc.* **39**: 460–465.
- Choi, Kyung Joo. 1995. Separation of *Bacillus* sp. and changes of NH₂-N, NH₃-N, and protease activity in *Chonggukchang* meju adding with mugwort (*Artemisia asiatica* N.) extract. Kon-Kuk Univ. Master's Degree Thesis.
- Electricwala, A., R. T. Sawyer, J. C. Powell, and T. Atkinson. 1991. Isolation of thrombin inhibitor from the leech *Hirudinaria manillensis*. *Blood Coagul. Fibrin.* **2**: 83–85.
- Fayek, K. I. and S. T. El-Sayed. 1980. Purification and properties of fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis*. *Zeit. fur Allgem. Mikrobiol.* **20**: 375–382.
- Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzyme by alkalophilic microorganism. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 1783–1791.
- Horikoshi, K. and T. Alkiba. 1982. *Alkalophilic Microorganisms*, p. 35 Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Kalebina, T. S., N. R. Galina, I. O. Selyakh, O. M. Khodova, and I. S. Kulaev 1988. Serine proteinase from *Bacillus brevis*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **28**: 531–533.
- Kembhavi, A. A., A. Kukalni, and A. Pant. 1993. Salt tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. NCIM No. 64. *Appl. Biochem. Biotech.* **38**: 83–89.
- Kim, H. K., K. H. Kim, J. K. Lee, Y. O. Kim, H. S. Nam, and T. K. Oh. 1995. Characterization of a thermostable protease from thermophilic *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 322–328.
- 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.
- Kim, Yong Tack. 1995. Characteristics of fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus* sp. isolated from Chungkookjang. Sejong Univ. Doctoral Degree Thesis.
- Koo, J. H., I. J. Choi, H. S. Nam, H. J. Lee, Z. I. Shin, and T. K. Oh. 1997. Medium optimization for production of thermostable alkaline proteases from *Bacillus licheniformis* NS70. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 207–211.
- Krstenansky, J. L., T. J. Owen, M. T. Yates, and S. J. T. Mao. 1990. The C-terminal binding domain of hirullin P 18 antithrombin activity and comparison to hirudin peptides. *FEBS Letters* **269**: 425–431.
- 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. Soc.* **29**: 422–428.
- Lee, E. G., E. H. Park, H. H. Lee, and H. H. Hyun. 1996. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. producing alkaline protease. *Kor. J. Microbiol.* **22**: 289–297.
- Lee, K. H., H. J. Lee, and M. K. Chung. 1971. Studies on *Chungkookjang*(Part I) on the changes of soybean protein in manufacturing *Chungkookjang*. *Kor. Agr. Chem. Soc.* **14**: 191–196.
- 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**: 228–234.
- Lee, S. K., S. Heo, and H. K. Joo. 1998. Isolation and identification of fibrinolytic bacteria from Korean traditional *Chungkookjang*. *Kor. Agr. Chem. Soc.* **41**(in press).
- Marks, D., A. Marks, and C. Smith. 1996. *Basic Medical Biochemistry*, p. 107. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Markwardt, F. 1957. The isolation and chemical characterization of hirudin. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **308**: 147–152.
- 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 fu-bellus*. *Jap. J. Physiol.* **41**: 461–468.
- Nakajima, N., H. Mihara, and H. Sumi. 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm. *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 1730–1737.
- Rahman, R. N. Z. A., C. N. R. Kamaruzaman, A. M. Basri, W. M. Z. W. Yunus, and A. B. Salleh. 1994. Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 822–827.
- Santos, J. A. L., J. M. S. Cabral, and C. L. Cooney. 1992. Recovery of alkaline protease by membrane filtration. *Bioprocess Eng.* **7**: 205–211.
- Schinner F. and R. Maregensin. 1992. Production and properties of an extracellular metalloprotease from a psychophilic *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biotech.* **24**: 207–210.
- Steiner, V., R. Knecht, and M. Gruetter. 1990. Isolation and purification of novel hirudins from the leech *Hirudinaria manillensis* by high-performance liquid chromatography.

- graphy. *J. Chromatography* **530**: 273–279.
28. Sumi, H. 1990. Nattokinase and health-development of natto. *Bioindustry* **7**: 725–730.
 29. 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**: 1110–1111.
 30. Takami, H., T. Akiba, and K. Horikoshi. 1989. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. *Appl. Microbiol. Biotech.* **30**: 120–124.
 31. Yoo, Jin Young. 1997. Present status of industries and research activities of Korean fermented soybean products. *The Microorganism and Industry* **23**: 13–30.
 32. Zlotnik, H., V. L. Schramm, and H. R. Buckley. 1984. Purification and partial characterization of a *Nocardia brasiliensis* extracellular protease. *J. Bacteriol.* **157**: 627–631.

(Received January 26, 1998)