

된장으로 부터 fibrin용해 세균의 분리에 관한 연구

이시경* · 허 석 · 주현규¹ · 송기방²

전국대학교 응용생물화학과, ¹선문대학교 식량자원학부, ²생명공학연구소

초록 : fibrin 단백질을 분해할 수 있는 효소를 분비하는 균을 된장으로부터 분리하여 동정하였다. 된장으로부터 protein 분해능이 있는 균주를 분리하고 분리한 균주들 중에서 혈전용해능이 가장 우수한 균주인 KDO-13을 선발하였다. 이 균주는 호기성으로 포자를 형성하는 Gram(+)균 이었으며 gas chromatography에 의한 세포의 지방산 분석은 C_{15:0} anteiso fatty acid가 47.7%, C_{15:0} iso fatty acid가 13.5%, C_{17:0} anteiso fatty acid가 13.6% 이었다. 이 균주는 생리, 생화학적 특성 및 세포지방산 분석을 통하여 57.7%의 similarity를 갖는 *Bacillus atrophaeus*로 잠정 동정되었다. *Bacillus atrophaeus* KDO-13의 fibrinolytic enzyme 생성을 위한 최적 배양 온도와 pH는 각각 37°C와 6.0 이었다.(1998년 11월 26일 접수, 1999년 1월 20일 수리)

서 론

식생활의 서구화와 스트레스로 인하여 동맥경화증, 심근경색, 뇌졸중, 혈전증과 같은 성인병 발생이 날로 증가되고 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 혈전용해제의 개발에 초점을 두고 있다. 항 혈전제로서는 유기합성제제인 coumarin과 warfarin제제가 있고, 거머리에서 생성되는 hirudin제제가 있다.^{1,2)}

혈전(fibrin)이 용해되는 것을 fibrinolysis라고 하며 응고 후 수일 이내에 plasmin에 의해서 용해가 이루어 진다. plasmin은 plasminogen activator인 urokinase, streptokinase, tissue-type plasminogen activator(tPA) 등에 의해 plasminogen으로부터 전환된다.³⁾

현재 여러가지 혈전용해제가 연구되고 있는데 이들은 주로 plasminogen을 plasmin으로 전환시키는 tPA이다.⁴⁾ 혈관주사되는 tPA 외에 병행요법으로 사용하기 위하여 직접 경구 투여함으로써 혈액내의 혈전 용해능을 증가시키는 제제에 관심을 갖기 시작하고 있으나 아직 그 성과는 미미한 실정이다. 현재 경구투여용 제제로는 6가지의 혈전 용해 효소를 함유하고 있는 것으로 알려진 *Lumbricus lubellus*의 건조 분말이 캡슐화되어 한국과 일본에서 시판되고 있다.^{5,6)} 또한 일본의 전통발효 식품인 natto를 섭취할 때 생체내의 혈전 용해능이 증가됨을 발견하고, 이 natto로부터 혈전 용해 효소를 분리하여 8일간 장내 투여한 결과 혈전 용해능이 점차 증가하여 4일째 가장 높은 수치를 나타내었다고 보고하여,^{8,9)} 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 이루어진다. 장류의 맛과 영양에 있어서 중요한 요인은 protease와 amylase를 강력히 생산하는 미생물이며 특히, 된장은 콩을 주원료로한 우리 고유의 발효식품이다. 된장의 품질은 대부분이 발효과정중의 화학적, 생물학적 변화에 의해 결정되며 미생물의 작용이 중요한 구실을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾

한편 서 등¹¹⁾과 신 등¹²⁾은 된장중에 혈압조절에 관여하는 Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해물질에 대해 연구하였으며 박¹³⁾은 aflatoxin에 의한 발암억제 효과가 재래식 된장에서 컷다고 보고하여 식품으로서 된장의 기능적인 효과를 짐작할 수 있다.

오래전부터 우리나라의 전통식품인 청국장 및 된장에서도 높은 단백질 분해 효소를 분비하는 균이 존재하는 것으로 보고되어 있고^{14,15)} 혈전용해능이 있는 효소를 분비하는 균의 존재 가능성이 높아 청국장으로 부터 많은 혈전용해 균주를 분리한 바 있으나,^{16,17)} 된장에서는 최근에 와서야 혈전용해효소의 존재가 보고되고 있다.¹⁸⁾ 따라서 본 연구에서는 된장으로부터 casein을 첨가한 nutrient agar상에서 단백질 분해능이 있는 균주를 1차 screening하여 분류하고, 이들 균주중 casein용액과 fibrin용액을 각각 이용하였을 때 casein 분해력 보다 혈전 용해능이 우수한 균을 분리한 후 다양한 생화학적 특성을 조사하였으며 균체의 지방산 분석을 통하여 동정하였다.

재료 및 방법

된장

전국의 몇 군데 주요시장에서 수집하고, 임의로 선별한

찾는말 : 된장, 세균, 혈전용해효소, 동정
*연락처

전국 10가구에서 재래식으로 가정에서 제조한 된장을 수집하여 사용하였다.

시험 균주

된장에서 분리한 단백질 분해능이 있는 15개 균주를 선별하여 사용하였다.

배지

균 분리용 배지는 nutrient agar(skim milk 2%)를 사용하였으며 균 동정을 위한 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 starch배지, tryptophane hydrolysis(indole test)에는 tryptone broth(1%), urea hydrolysis에는 Stuart's urea broth를 사용하였다.¹⁹⁾ Carbohydrate fermentation test에는 phenol red 기초 배지에 당을 1%첨가하여 사용하였으며, citrate test에는 Simmons citrate agar배지, nitrate reduction test에는 nitrate broth배지, oxidase test에는 TSA(trypsinase soy agar)배지를 사용하였다.¹⁹⁾

균주분리

된장에서 단백질 분해능이 있는 균을 분리하기 위해서 각각의 시료 10 g에 생리 멸균수 90 ml를 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 15균주(KDO-1~KDO-15)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 투명한 환의 크기를 측정하였다.

Fibrinolytic activity assay

Fayek 등²⁰⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. fibrin을 0.1 M McIlvain buffer(pH 7.0)에 0.6%농도가 되도록 용해하여, 기질 용액 3 ml에 조효소액 0.5 ml를 가한후 40°C에서 10분간 반응시켰다. 그후 0.4 M TCA용액 3 ml를 첨가하여 반응을 종료시키고 30분간 정치한 후 Whatman filter paper No. 2로 여과하였다. 이 여액 1 ml를 취하여 0.4M 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 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 KDO-1~KDO-15를 Horikoshi²¹⁾의 protease 생산배지를 변형시켜

(glucose 1%, polypeptone 0.5%, yeast extract 0.5%, soybean meal 1.0%, MgSO₄·7H₂O 0.02%)사용하여 37°C에서 배양하였다. 배양액을 원심분리후 상등액을 조효소로 하여 0.6% fibrin 용액과 casein 용액을 각각 기질로 하여 활성을 측정 한 후 fibrin 분해능이 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.²²⁾

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 KDO-13균주를 48시간 동안 배양하여 현미경 관찰을 통한 형태학적 특징 및 생리적, 생화학적 특성조사하였으며, KIST유전자 은행실에 보관중인 600여 library의 표준 균주의 지방산 조성과의 비교조사 등으로 Bergey's manual of systematic bacteriology²³⁾와 MacFaddin²⁴⁾의 Biochemical tests for identification of medical bacteria에 준하여 동정하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리

전국의 주요시장에서 수집하고 또한 가정에서 제조한 다양한 된장으로 부터 Nutrient Agar에 skim milk 2%를 첨가한 배지에 평판 희석 배양법으로 도말하고 37°C에서 48시간 배양하여 투명한(halo zone)이 나타난 균주를 선별하여 70여종의 균주를 분리하였으나 배지상에 나타난 colony 모양과 크기에 따라 15종으로 다시 분류하고 이를 KDO 1~KDO 15로 명명하였다. 이를 다시 NA배지에 skim milk (2%)와 casein(2%)을 각각 첨가한 배지에 멸균 tooth pick로 접종하여 배양한 후 나타난 투명한 환의 크기를 측정 한 결과는 Table 1과 같다. casein(2%) 배지상에서 이들을 배양한 결과 대부분의 균주가 투명한 지름(mm)/colony지름(mm)의 수치가 배양 24시간에 높게 나타났으며, KDO-13, 1, 8, 4균주 순으로 높게 나타났으나, 이 중 1번과 8번 균주의 경우는 배양 12시간에 환의 수치가 가장 크게 나타났다. 이와 같은 배양시간에 따른 환 크기의 차이는 균의 생육에 따른 protease생성과 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다. 그러나 skim milk배지에서는 KDO-5, 13, 1균주 순으로 높게 나타나 배지 조성에 따라 생성된 투명한 환의 크기에 다소 차이

가 있어 skim milk 배지에서 보다는 casein 배지에서 환의 크기가 크게 나타났다.

또한 이들 분리균주의 fibrin용해능을 알아보기 위하여 Horikoshi²¹⁾의 protease생성 배지를 변형시켜(glucose 1%, polypeptone 0.5%, yeast extract 0.5%, soybean meal 1.0%, MgSO₄·7H₂O 0.02%) 사용하여 37°C에서 배양 후 이들의 효소활성을 0.6%의 fibrin용액을 기질로 이용하여 측정하였다. 이때 caseinolytic activity도 함께 조사하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 배양시간이 경과함에 따라 fibrin용해 효소의 활성이 증가되어 대부분의 균주가 배양 48시간에 최대 효소활성을 나타내었다. 그러나 KDO-2균주는 배양 24시간에 최대 fibrin용해 효소활성을 나타내었으나, 그 효소활성은 미미 하였다. 또한 된장에서 분리된 다양한 균주 중에서 casein 배지상에 투명한 크기가 비교적 크게 나타난 1, 8, 9, 11, 13균주가 혈전용해 효소 활성이 높았다. 그

러나 몇몇 균주는 casein배지에서는 투명한이 형성되었고 caseinolytic activity가 관찰되었으나 fibrinolytic activity는 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 casein 분해능이 높은 protease 효소가 반듯이 fibrin을 많이 분해할 수 있는 것이 아님을 시사해 주는 것이며, 이는 각 균주가 생성하는 효소에 따른 casein과 fibrin의 기질 특이성과 관계가 있는 것으로 생각된다. 이상의 실험 결과로 caseinolytic activity보다 fibrinolytic activity가 가장 높은 KDO-13 균주를 택하여 이를 동정하였으며 본균주의 배양 특성을 조사하였다.

균주의 동정

된장으로 부터 skim milk 및 casein배지상에서 단백 분해능이 있는 15종의 균주를 screening하여 이를 투명한의 크기와 fibrinolytic activity를 조사하여 활성이 가장 높은균으로 선정된 KDO-13 균주의 형태학적 특성, 배양특성 및 당류의 발효성, catalase, oxidase 효소 생성등 균주의 동정에 단서를 제시해줄 항목들을 선택하여 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

KDO-13균주는 운동성이 있는 Gram 양성균의 간균으로 내생포자를 형성하고 5% NaCl에서 생육가능 하고 starch 가수분해능이 있으며 casein과 gelatin은 매우 빠르게 가수분해하였다. 포도당과 과당을 이용하여 산을 생성하였으며, rhamnose와 xylose는 이용하지 못하였다. 또한 catalase와

Table 1. Ratio of holo zone diameter/colony diameter (mm) showed by bacteria isolated from soybean paste

strains	Skim milk (2%) medium			Casein (2%) medium		
	12 hour	24 hour	36 hour	12 hour	24 hour	36 hour
KDO-1	2.17	2.53	2.36	3.88	3.58	3.5
KDO-2	2.5	1.85	1.82	2.8	2.8	2.44
KDO-3	2.13	2.43	2.5	2.3	2.75	2.37
KDO-4	2.0	1.3	1.62	3.25	3.3	3
KDO-5	1.6	2	3.25	2.9	3.1	2.8
KDO-6	1.6	1.7	1.8	2	2.64	2.28
KDO-7	1.6	1.3	2	2.1	2.8	2.7
KDO-8	2.33	1.58	2.07	3.44	2.63	2.45
KDO-9	2.33	2.1	1.93	2.23	2.9	2.9
KDO-10	2.33	1.9	2.08	3	3.08	3.13
KDO-11	2	2.5	2.2	2.11	3.2	3
KDO-12	1.7	1.7	1.9	2.1	2.7	2.8
KDO-13	2	2.6	2.57	2.42	3.65	4.08
KDO-14	1.7	1.8	1.9	2.5	2.9	2.8
KDO-15	1.5	2	2.2	2.33	2.4	2.9

Table 2. Fibrinolytic and caseinolytic activities of bacteria isolated from soybean paste (unit/ml)

strains	24 hr		48 hr	
	fibrin	casein	frbrin	casein
KDO-1	256	252	667	681
KDO-2	337	231	98	196
KDO-3	92	109	295	334
KDO-4	25	51	52	418
KDO-5	14	300	48	590
KDO-6	ND	347	90	609
KDO-7	ND	91	ND	157
KDO-8	264	312	657	765
KDO-9	259	246	662	617
KDO-10	124	277	607	709
KDO-11	84	183	233	658
KDO-12	ND	21	ND	98
KDO-13	216	375	690	558
KDO-14	ND	42	ND	119
KDO-15	ND	ND	ND	339

ND: Not detected

Table 3. Morphological, cultural characteristics, biochemical characteristics and utilization of sugars of the strain, KDO-13

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 characteristics	
- catalase	+
- oxidase	+
- citrate	+
- nitrate reduction	+
- acetoin production	+
- casein hydrolysis	+
- starch hydrolysis	+
- gelatin hydrolysis	+
- urea hydrolysis	-
- indol production	-
4. Utilization of sugars	
- glucose(acid/gas)	±
- cellobiose	+
- fructose	+
- mannitol	+
- rhamnose	-
- arabinose	±
- xylose	-
- lactose	±

oxidase test에서는 양성을 나타내었으나, urea를 분해하지 못하였으며, tryptophane을 이용해 indole을 생성하지 못하였다. 이상의 결과로 부터 본 균주는 Bergey's manual상의 *Bacillus* sp.의 특징과 일치하였다.²³⁾

또한 MIS(microbial identification system)을 이용한 지방산 분석에서는 Fig. 1과 같이 주로 iso-branched fatty acid와 anteiso-branched fatty acid로 구성되어 C_{15:00} anteiso-fatty acid가 47.66%로 가장 함량이 높았고, C_{17:00} anteiso-fatty acid는 13.61%, C_{15:00} iso-fatty acid가 13.53%, C_{16:00} fatty acid가 11.9% 포함되어 균체의 지방산 성분은 주로 ante iso fatty acid이었다.

이는 KIST 유전자 은행실에 보관중인 600여 library의 표준균주와 비교하였을 때 본 균주는 57.7%의 similarity를 갖고 있는 *Bacillus atrophaeus*와 가장 유사한 것으로 밝혀져, 본 균주를 *Bacillus atrophaeus* KDO-13으로 잠정 동정하였다.

이상의 결과는 허 등¹⁷⁾이 청국장으로 부터 분리한 fibrinolytic bacteria의 균체 지방산 조성은 C_{15:00} anteiso-fatty acid가 40.85%, C_{15:00} iso-fatty acid가 19.47%, C_{17:00} anteiso-

fatty acid 14.1%순으로 높았다고 하여 본 실험에서 사용한 균주와 균체 지방산 조성에 있어 차이가 있었다. 또한 김 등¹⁸⁾은 최근에 된장으로 부터 다양한 fibrin 분해균주를 분리하고 이를 *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus* 등으로 동정하여 *B. atrophaeus*가 fibrin을 분해할 수 있는 균임이 밝혀져 본 실험의 결과와 일치하였으나, *B. atrophaeus* 균주의 경우 casein 배지 상에 나타난 투명환이 fibrin 배지상에 나타난 투명환 보다 컸다고 하여 다소 차이가 있었다. 이는 미생물이 분리된 된장시료, 배지 조성 등의 배양조건 차이에서 기인되는 것으로 생각된다.

배양초기 pH의 영향

Protease 생산배지(glucose 1%, polypeptone 0.5%, yeast extract 0.5%, soybean meal 1.0%, MgSO₄·7H₂O 0.02%)를 이용하여 분리 균주의 혈전 용해효소 생성에 미치는 배양 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 배지의 pH를 각각 5~9로 조절하여 효소활성을 각각 24시간과 48시간에 측정된 결과(Table 4) pH 6에서 가장 높게 나타났고 pH 9에서는 가장 낮게 나타났다. 이러한 결과는 Takami 등²⁵⁾이 보고한 *Bacillus* sp.의 protease생산을 위한 최적 pH는 9.5이었으며, 김¹⁶⁾과 허 등¹⁷⁾이 청국장에서 분리한 *Bacillus* sp.의 혈전용해 효소 생산을 위한 배양최적 pH가 8이었다고 하여 된장에서 분리된 본 균주와 차이가 있었다. 그러나 *B. licheniformis* PW-109의 protease생산을 위한 배지의 pH가 6.5이었다는 보고²⁰⁾에서와 같이 배양액의 초기 pH가 산성영역일 때 최대의 효소생성을 나타내었다고 하여 본 실험에서 사용한 균과 유사한 결과였다.

온도에 따른 영향

된장에서 분리한 *Bacillus atrophaeus* KDO-13균주의 혈전 용해효소 생성에 미치는 배양 온도의 영향을 조사한 결과 Table 5에서와 같이 37°C에서 가장 높게 나타났으며 25,

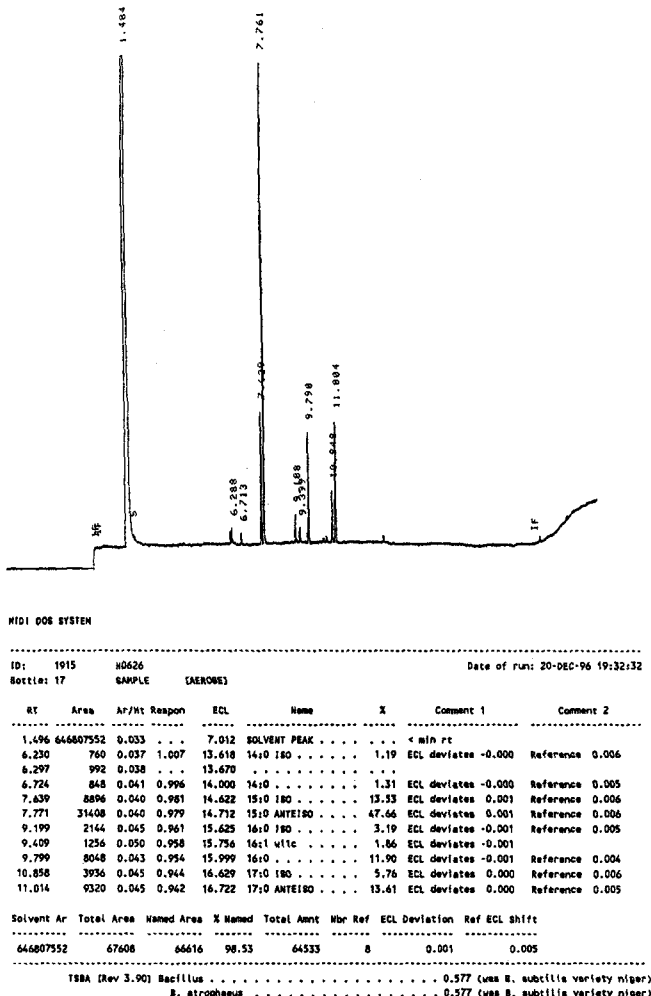


Fig. 1. Gas chromatogram of cellular fatty acids of *Bacillus* sp. KDO-13.

Table 4. Effect of pH on fibrinolytic enzyme production by KDO-13 strain (unit/ml)

pH	fibrinolytic activity	
	24 hr	48 hr
pH 5	176	412
pH 6	195	637
pH 7	139	320
pH 8	74	220
pH 9	43	157

Table 5. Effect of temperature on fibrinolytic activity by KDO-13 (unit/ml)

Temperature	fibrinolytic activity	
	24 hr	48 hr
25°C	75	403
30°C	136	475
37°C	165	642
45°C	76	82

30°C에서는 비교적 낮은 효소활성을 나타냈다. 한편 45°C에서 배양시에는 균의 성장은 관찰되었으나 효소활성이 매우 낮았다. 이는 높은 온도에서의 효소 실활에 기인하는 것으로 생각된다. 이상의 결과는 대부분의 *Bacillus* sp. 세균들이 30~37°C에서 생육 최적온도를 갖는 것과 일치하였다. 김¹⁶과 허 등¹⁷은 혈전용해효소 생산균주로 청국장으로부터 분리한 *Bacillus* sp.의 최적 온도도 본 균주에서와 같이 37°C라고 하여 같은 결과였다. 그러나 Manachini 등²⁰이 보고한 alkaline protease 생산을 위한 *Bacillus* sp.의 최적온도가 45°C이었다는 보고 보다는 낮았다.

감사의 글

본 연구는 1996년 미원(주) 음식문화 연구원의 연구비 지원에 의해 수행된 과제의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Lee, S. K., Sohn, J. H., Choi, E. S. and Rhee, S. K. (1993) Screening and purification of anticogulant proteins from Korean Leeches. *Kor. J. Biochem.* **26**(3), 228-234.
- Electricwala, A., Sawyer, R. T., Powell, J. C. and Atkinson, T. (1991) Isolation of thrombin inhibitor from the leech *Hirudinaria manillensis*. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* **2**, 83-91.
- Steiner, V., Knecht, R. and Gruetter, M. (1990) Isolation and purification of novel hirudins from the leech *Hirudinaria manillensis* by high performance liquid chromatography. *J. Chromatography* **530**, 273-279.
- Marks, D., Marks, A. and Smith, C. (1996) Basic Medical Biochemistry, Williams & Wilkins, p.107.
- Ehrlich, H. J., Bang, N. U., Little, S. P., Jaskunas, S. R., Weigel, B. J., Mattler, L. E. and Harms, C. S. (1987) Biological Properties of a kringless tissue-type plasminogen activator (tPA) mutant. *Fibrinolysis* **1**, 75-81.
- Nakajima, N., Mihara, H. and Sumi, H. (1993) Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**(10), 1730-1737.
- Mihara, H., Sumi, H., Yoneta, T., Mizumoto, H., Ikeda, R., Seiki, M. and Maruyama, M. (1991) A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus fubellus*. *Japanese J. Physiol.* **41**, 461-468.
- Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Muraki, H. (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.
- Sumi, H. (1990) Nattokinase and health; development of Natto. *Bioindustry* **7**(11), 724-730.
- Kim, G. E., Kim, M. H., Choi, B. D., Kim, T. S. and Lee, J. H. (1992) Flavor compounds of domestic meju and Doenjang. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **21**(5), 557-565.
- Suh, H. S., Suh, D. B., Chung, S. H., Whang, J. H., Sung, H. J. and Yang, H. C. (1994) Purification of ACE inhibitor from soybean paste. *Kor. Agr. Chem. Biotechnol.* **37**(6), 441-446.
- Shin, Z. I., Ahn, C. W., Nam, H. S., Lee, H. J. and Moon, T. H. (1995) Purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from soybean paste. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**(2), 230-234.
- Park, K. Y. (1996) Destruction of aflatoxin during manufacture of Doenjang by traditional method and anticancer activities, The 1st International Symposium on the Functional and Physiological Activities of Korean Traditional Soybean Fermented Food. Food Reserch Institute, Konkuk Univ., 35-58.
- Choi, K. J. (1995) Separation of *Bacillus* sp. and changes of NH₂-N, NH₃-N and protease activity in Chungkookjang meju adding with mugwort extract. M.S. Thesis, Konkuk University, Seoul.
- Kwon, O. J., Kim, J. K. and Chung, Y. G. (1986) The characteristics of bacteria isolated from ordinary Korean soybean sauce and soybean paste. *Kor. Agr. Chem. Biotechnol.* **29**(4), 422-428.
- Kim, Y. T. (1995) Characteristics of fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus* sp. isolated from Chungkookjang. Ph. D. Thesis, Sejong University, Seoul.
- Heo, S., Lee, S. K. and Joo, H. K. (1998) Isolation and Identification of fibrinolytic bacteria from Korean traditional Chungkookjang. *Kor. Agr. Chem. Biotechnol.* **41**(2), 119-124.
- Kim, S. H., Choi, N. S., Lee, W. Y., Lee, J. W. and Kim, D. H. (1998) Isolation of *Bacillus* strains secreting fibrinolytic enzyme from Doenjang. *Kor. J. Microbiol.* **34**, 87-90.
- Harold J. Benson, (1994) Microbiological Applications 6th, Wm. C. Brown Publishers, p. 143-168.
- Fayek, K. I. and El-Sayed, S. T. (1980) Purification and properties of fibrinolytic enzyme from *B. subtilis*. *Zeit fur Allgem. Mcrobiol.* **20**, 375-382.
- Horikoshi, K. (1971) Production of alkaline enzyme by alkalophilic microorganism. *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1783-1791.
- 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.
- Butler, J. P. (1986) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams & Wilkins, Volume II, p.1104-113.
- MacFaddin, J. F. (1980) *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, 2nd ed, Williams & Wilkins, p. 36.
- Takami, H., Akiba, T. and Horikoshi, K. (1990) Charaterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 519-523.
- Mao, W., Pan, R. and Feedman, D. (1992) High production of alkaline protease by *B. licheniformis* in a fed-batch fermentation using a synthesis medium. *J. Ind. Microbiol.* **11**, 1-7.
- Manachini, P. L., Fortina, M. G. and Parini, C. (1988) Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermoruber*-a new species of *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 409-413.

The study on isolation of fibrinolytic bacteria from soybean paste

Si Kyung Lee*, Seok Heo, Hyun Kyu Joo¹ and Ki Bang Song²(*Department of Applied Biology and Chemistry, KonKuk University; ¹Division of Food Resources, Sun Moon University; ²Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology*)

Abstract : The bacteria which could hydrolyze the fibrin produced through the blood coagulation mechanism in the human body, were isolated from soybean paste. The KDO-13 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, C_{15:0} iso fatty acid and C_{17:0} anteiso fatty acid were 47.7, 13.5 and 13.6%, respectively as major component among its cellular fatty acid composition. It showed the similarity of 57.7%, compared with standard strain. It was thus identified to be *Bacillus atrophaeus* according to Bergey's manual of systematic bacteriology and its fatty acid profiles of gas chromatography. The optimum culture temperature and pH were 37°C and 6 for the production of fibrinolytic enzyme by *Bacillus atrophaeus* KDO-13.

Key words : soybean paste, bacteria, fibrinolytic enzyme, identification

*Corresponding author