

## 혈전 분해효소 생산균의 탐색 및 효소생산 최적조건의 조사

최 무 영

상지대학교 식품영양학과

### Screening of Fibrinolytic Enzyme Producing from Microorganisms and Optimum Conditions of Enzyme Production

Moo-Young Choi

Dept. of Food Science and Nutrition, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

#### Abstract

A strain of potential producer of fibrinolytic enzyme was isolated from Korean fermented food. The isolated bacterium was identified and named as *Bacillus brevis* KJ-23. The optimal condition of the medium for the production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus brevis* KJ-23 was nutrient broth with 0.5% D-ribose, 0.5% malt extract and 0.3%  $K_2HPO_4$ . The optimum pH, temperature and fermentation time for the enzyme production were pH 7.0, 30°C and 24 hr, respectively.

**Key words:** *Bacillus brevis* KJ-23, fibrinolytic enzyme, optimal condition

#### 서 론

순환계질환의 대부분은 혈액 내에서 생기는 혈전이 대부분이며 이로 인하여 유발되는 질병을 혈전증(thrombosis)이라고 한다. 혈전은 혈관벽이 손상을 입었을 때는 혈전 유출방지를 위한 정상적인 기능을 하고 있지만, 평소에 생성되어온 혈전은 혈관을 좁게 만들어 혈압을 상승시키며, 또 뇌혈관에 생성되었을 경우에는 뇌 혈전증을 일으켜 뇌출혈을 유발하여 생명에 지장을 준다(1).

현재 이러한 혈전증의 치료에 사용되는 것으로는 plasminogen activator로서의 작용을 하는 urokinase, streptokinase, 사람의 악성종양인 melanoma에서 유래된 tPA(tissue-type plasminogen activator), 지렁이의 체단백질 유래의 lumbrokinase 등이 이용되고 있으나 urokinase(2,3)는 경구투여가 가능한 반면 고가이며 급성혈전증환자에게만 한정되고 streptokinase(4)는 urokinase보다 반감기는 길고 전신에 작용을 하지만 가격이 비싸며 oral injection이 불가능하고 출혈 유발의 우려가 많다. 또한 tPA(5)는 혈전과의 친화력이 강하나 혈중 반감기가 짧으며, lumbrokinase(6-8)는 혈전에 대한 용해는 강하나, 일반단백질에도 작용을 한다는 제한성을 가지고 있다. 따라서 혈전용해제의 대부분은 일종의 단백질 분해효소이기 때문에 기질의 특이성 또는 체내에서의 면역 반응 유발여부 등이 부작용을 줄일 수 있다.

최근 일본에서는 일본 전통식품인 낫두에서 nattokinase(9,10)라는 혈전용해효소분리에 성공을 하였으며, 우리나라

에서도 토양 또는 장류에서 혈전분해능 균주를 분리하는 연구가 진행되고 있다(11-17).

따라서 본 연구에서는 손쉽게 대량생산이 가능하고, 부작용이 없으며, fibrin에만 특이적으로 반응을 하는 혈전 분해 균주를 우리나라 전통발효식품에서 분리, 동정하고 혈전용해효소 대량생산을 위한 최적 생산조건을 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 균주의 분리

강원도 일대에서 생산되고 있는 전통발효식품인 젓갈류, 장류 등의 시료 1 g을 10 mL 멸균수에 현탁하고 그 현탁액 중 1 mL을 취하여 기본배지인 nutrient agar 배지에 평판분기법을 이용하여 30°C에서 24~48시간 배양하여 단일 균락을 분리하였다. 생육된 colony들 중 형태, 색깔 등 외관상 상이한 균주들을 순수분리하여 사면배양한 후 4°C에서 보관하면서 fibrin 용해활성의 검색에 이용하였다.

##### Fibrin plate의 제조

Astrup법(18)을 변형하여 20 mM 인산완충용액(pH 7.8)으로 fibrinogen 최종농도가 0.3%(w/v)되도록 용해시킨 후, 용액 5 mL에 동량의 1% agarose를 첨가하여 혼합하였다. 혼합용액에 thrombin(100 NIH unit/mL) 0.1 mL을 첨가하여 충분히 혼합한 후 즉시 petri dish에 평판분기한 후 고화시켜 fibrin plate를 제조하였다.

**혈전용해활성 미생물의 선별 및 활성측정**

분리한 균주 1 loop를 10 mL의 nutrient broth에 접종 후, 진탕향온수조(24 hr, 120 rpm)에서 배양을 하였다. 배양된 균을 원심분리(12,000×g, 4°C, 10 min)하여 상층액 20 µL를 pasteur pipette으로 미리 구멍을 뚫어놓은 fibrin plate에 이식하여 30°C에서 24시간 반응시킨 후 30%(w/v) trichloroacetic acid를 부가하여 투명환의 크기로 혈전용해균주를 선별하였다. 용해환의 면적계산은 가로×세로 곱한 값에 cm<sup>2</sup>의 단위를 사용하여 측정하였다.

**균주의 동정**

선별된 균주는 미생물 신속동정기(MIDI Sherlock Microbia Identification System, HP 6890 Series GC System, USA)를 이용하여 균체 세포벽의 지방산 조성을 분석하여 동정하였으며 separation column(25 m×0.2 mm×0.33 µm, Ultra 5% phenyl methyl siloxane Capillary column, HP 19091B-10%, USA)을 사용하였다(19). GC분석 조건은 carrier로서 H<sub>2</sub> gas를 사용하고 검출기는 FID detector, 초기온도 100°C, 최종온도 290°C, 검출기 온도는 310°C 그리고 injector의 온도는 280°C로 하였다. Fatty acid methylesters(FAMES) profile은 MIS(microbial identification system) Software를 이용하여 calibration 표준성분의 retention time, peak의 면적 그리고 조성비율과 비교하여 peak 성분을 동정하고 성분의 조성에 따라 균주를 동정하였다.

**효소생산을 위한 배지의 최적화**

효소 생산에 미치는 탄소원, 질소원, 금속염 및 인산염의 영향에 대하여 조사하였다. 즉 시험관(1.8×18 cm)에 10 mL의 nutrient broth를 넣고 분리 균주 1 loop를 접종 후 회전진탕배양(30°C, 24 hr)시킨 1 mL 배양액을 기본 배지인 nutrient broth(100 mL)에 각종 탄소원, 질소원, 금속염 및 인산염의 농도를 달리한 배지에 접종하여 30°C, 24시간동안 배양하여 최종 pH, 함수량(mg/mL), 효소생산능을 측정하였다. 온도는 20~40°C 범위에서 배양하여 최적온도를 설정하였다. 또 pF는 초기 pH를 3~10까지 조정하여 배양한 후 최적 pH를 설정하였으며 시간에 따른 효소생산의 변화는 12시간 주기로 84시간까지 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**균주의 분리, 혈전용해능 측정 및 동정**

강원도 일대에서 생산되고 있는 각종 발효식품에서 시료 일정량을 취하여 희석한 후 평판배양법에 의하여 nutrient agar에 도말한 후, 30°C에서 24시간 배양한 후 단일균락을 분리한 결과 장류에서는 50개의 균주를 젓갈류와 김치에서는 각각 20개의 균주를 분리하였다(date not shown). 최종 선별결과 고추장 9균주, 된장 6균주, 간장 5균주, 젓갈류 5균주, 김치에서 1균주를 각각 분리하였다. 혈전 용해능을 측정한

결과 고추장에서 분리한 균주의 용해능이 다른 시료에 비해 상대적으로 높은 용해능을 보였으며, 그 중 가장 활성이 강한 KJ-23 균주를 선별하였다. 최종 선별된 균주를 Microbial identification system의 Sherlock 95 program(20)을 이용하여 *Bacillus brevis* KJ-23으로 동정하였다.

**탄소원의 영향**

발효식품으로부터 분리한 *Bacillus brevis* KJ-23 균주의 최적 조건을 찾기 위하여 먼저 탄소원을 첨가하였다. Nutrient broth에 탄소원으로 Table 1과 같이 각종 탄소원(0.5%, w/v)을 첨가 후 배양하여 혈전용해활성을 검토하였다. 그 결과 Table 1에서 보여주는 것과 같이 D-ribose, xylose, D-sorbitol, 가용성전분 등이 다른 탄소원보다 효소의 생성에 적합하였다. 그 중 D-ribose를 탄소원으로 배양하였을 경우에 혈전용해활성이 7.01 cm<sup>2</sup>로 가장 높은 활성을 보여 D-ribose를 탄소원으로 결정하였다. 이 결과는 Choi 등(12)이 대두에서 분리한 균주 *Bacillus subtilis* BK-17의 경우 탄소원으로 D-glucose, Jang 등(16)은 새우젓에서 분리한 *Bacillus* sp. S-19의 탄소원인 가용성전분, 또 Chung(13)은 장류에서 분류해 낸 *Bacillus* sp. S7-16 균주의 탄소원으로 polypeptide이용 등과 비교하였을 때 본 실험 균주의 탄소원과 다른 결과를 보였다. D-ribose의 효소생성을 알아보기 위해 Fig. 1과 같이 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5%(w/v)로 농도를 달리하여 생성능을 알아보았다. 그 결과 0.5%에서 효소의 생성이 가장 적합하였다.

**질소원의 영향**

질소원으로는 Table 2와 같이 nutrient broth에 각종 질소원(0.5%, w/v)을 첨가한 후 배양하여 혈전용해활성을 측정하였다. 그 결과 malt extract, yeast extract, NH<sub>4</sub>Cl 등이 다른 질소원보다 비교적 높은 활성을 보였다. 그 중 malt extract의 혈전용해활성능이 7.47 cm<sup>2</sup>로 가장 높은 활성능을 보여

**Table 1. The effect of carbon sources on the production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus brevis* KJ-23**

Carbon sources (0.5%)	Final pH	Wet weight (mg/mL)	Fibrinolytic activity (cm <sup>2</sup> )
None <sup>1)</sup>	8.10	7	6.95
D-Fructose	6.67	22	3.81
D-Galactose	7.96	15	6.38
Dextrose	6.89	20	2.13
D-Mannose	6.75	17	5.92
D-Ribose	7.34	16	7.01
Xylose	7.84	25	6.50
Glycerin	7.00	15	3.48
D-Sorbitol	7.15	15	6.08
Maltose	6.72	16	5.80
L-Sorbose	8.13	14	5.24
Mannitol	6.75	3	5.64
Lactose	7.46	17	5.79
Sucrose	6.63	20	3.89
Soluble starch	7.22	12	6.76

<sup>1)</sup>Nutrient broth.

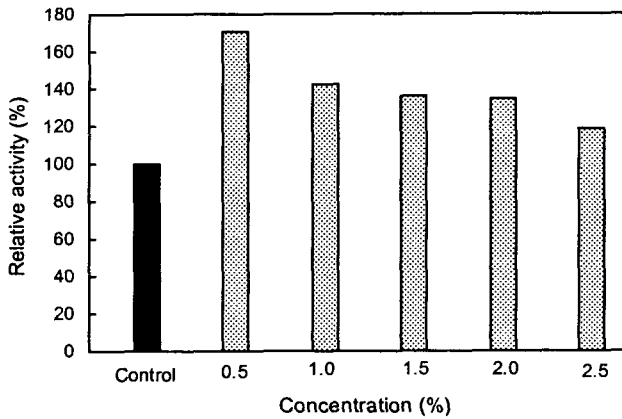


Fig. 1. Effect of the concentration of D-ribose on the production of the fibrinolytic enzyme from *Bacillus brevis* KJ-23.

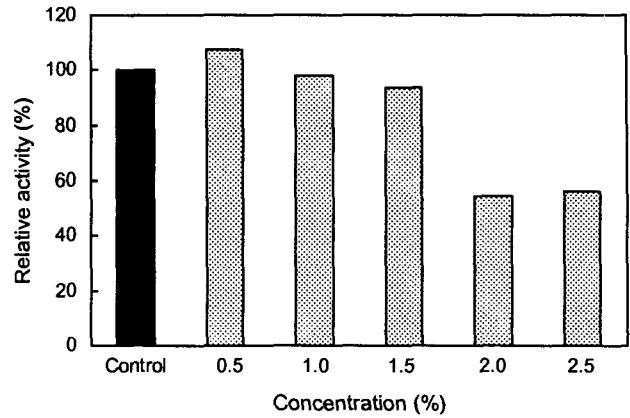


Fig. 2. Effect of the concentration of malt extract on the production of the fibrinolytic enzyme from *Bacillus brevis* KJ-23.

Table 2. The effect of nitrogen sources on the production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus brevis* KJ-23

Nitrogen sources (0.5%)	Final pH	Wet weight (mg/mL)	Fibrinolytic activity (cm <sup>2</sup> )
None <sup>1)</sup>	7.95	45	6.95
NH <sub>4</sub> Cl	7.96	81	7.33
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	7.88	62	5.69
(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	8.15	45	4.06
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.82	47	4.09
KNO <sub>3</sub>	8.12	53	5.88
NaNO <sub>3</sub>	7.71	57	3.25
Polypeptone	8.05	46	5.68
Yeast extract	8.05	49	6.95
Malt extract	7.30	55	7.47
Beef extract	8.12	49	4.06
Casamino acid	8.26	54	4.70

<sup>1)</sup>Nutrient broth and 0.5% D-ribose.

질소원으로는 malt extract로 결정하였다. 이는 Jang 등(16)이 새우젓에서 분리한 균주의 질소원으로 yeast extract를 이용하였고, Choi 등(12)이 *Bacillus subtilis* BK-17의 질소원으로 soypeptone과 beef extract를 이용한다는 연구결과와 비교하였을 때 다른 결과를 보였다. 탄소원 D-ribose 0.5%를 nutrient broth에 첨가한 후 질소원으로 결정된 malt extract를 %별로 나누어 관찰한 결과 Fig. 2와 같이 0.5%첨가가 효소생성에 가장 적합하였다.

인산염의 영향

*Bacillus brevis* KJ-23에 대한 인산염의 영향을 알아보기 위하여 Table 3과 같이 각각의 인산염을 0.1%씩 nutrient broth에 첨가한 결과 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>이 가장 높은 활성을 보였다. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도를 결정하기 위하여 nutrient broth에 D-ribose 0.5%, malt extract 0.5%를 첨가한 후 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%~0.4%까지 농도를 달리하여 측정된 결과 Fig. 3과 같이 0.3%까지는 계속 효소 생산이 증가함을 보였으며, 0.4%의 농도에서는 감소경향을 보임으로써 최종 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도를 0.3%로 결정하였다. 이 결과는 Lee 등(21)이 보고한 *Bacillus subtilis* KCK-7의 균주 최적배지화 경우 인산염중 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>이 효소

Table 3. The effect of phosphorus source on the production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus brevis* KJ-23

Phosphorus (0.1%)	Relative activity (%)
None <sup>1)</sup>	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	225
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	150
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	180
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	108
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	183
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	250

<sup>1)</sup>Nutrient broth, 0.5% D-ribose and 0.5% malt extract.

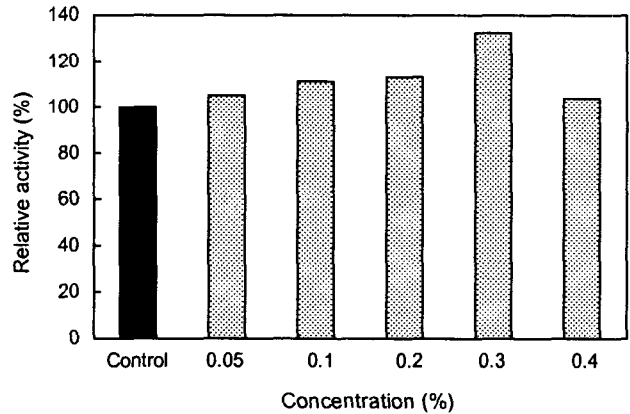


Fig. 3. Effect of the concentration of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> on the production of the fibrinolytic enzyme from *Bacillus brevis* KJ-23.

활성에 영향을 미친다는 보고와 같은 결과를 보였다.

금속염의 영향

*Bacillus brevis* KJ-23에 대한 금속염의 영향을 알아보기 위하여 Table 4와 같이 각각의 금속염을 0.1%씩 nutrient broth에 첨가한 후 활성도를 알아본 결과 대조군보다는 다소 활성이 감소되었으나 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O이 가장 우수한 활성을 보였다. 반면 FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 첨가군에서는 활성이 없었다. 이는 Choi 등(12)이 *Bacillus subtilis* BK-17의 혈전용해실험에서도 FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O

Table 4. The effect of metal salts on the production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus brevis* KJ-23

Metal salts sources (0.1%)	Relative activity (%)
None <sup>1)</sup>	100
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0
KCl	44
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	79

<sup>1)</sup>Nutrient broth, 0.5% D-ribose and 0.5% malt extract and 0.3% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

가 활성을 보이지 않았던 실험결과와 동일한 결과를 보였다. 최종 금속염의 농도를 결정하기 위하여 nutrient broth에 D-ribose 0.5%, malt extract 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3%(w/v)를 첨가한 후 금속염으로 결정된 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O를 0.05%~0.3%까지 농도를 달리하여 효소생산을 측정하였다. 측정 결과 Fig. 4와 같이 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O의 양을 증가시킴에 따라 활성은 대조군보다 감소하는 경향을 보여 본 균주의 최적배지화 실험에서는 금속염을 첨가하지 않도록 결정하였다.

초기 pH의 영향

최적 배지화 조건에서 확인된 D-ribose 0.5%, malt extract 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3%을 첨가하여 살균(121°C, 15분)한 후 pH의 변화를 감안하여 1 N NaOH와 HCl을 이용하여 Fig. 5와 같이 pH를 3~10까지 조절한 후 최적 pH를 확인하였다. pH 3~4사이에서는 효소생산이 전혀 나타나지 않았으며, pH 7.0에서 가장 큰 생산을 보였으나 pH 9~10에서도 비교적 안정적인 효소생산을 보였다. 이는 Choi 등(12)이 pH 9.0에서 *Bacillus subtilis* BK-17균이 가장 큰 생산을 보였으나 pH 7~10까지는 비교적 안정한 효소생산을 보였다는 보고와 일치함을 보였으며, Chung(13)이 보고한 *Bacillus* sp. S7-16균주의 최적 pH가 7.0이라는 보고와 동일한 결과를 보였다.

효소생산에 미치는 배양온도의 영향

배양온도가 효소 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여

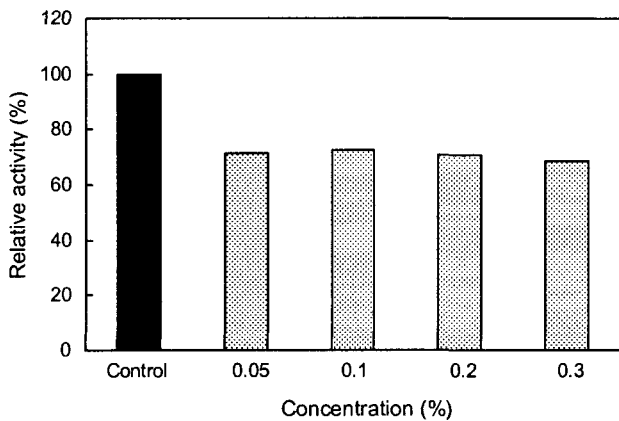


Fig. 4. Effect of the concentration of MgSO<sub>4</sub> on the production of the fibrinolytic enzyme from *Bacillus brevis* KJ-23.

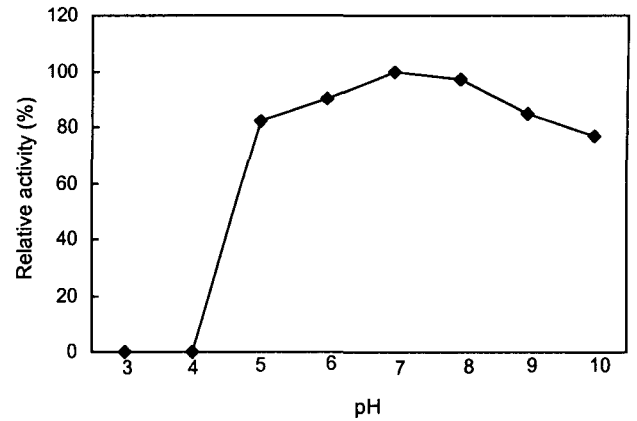


Fig. 5. Effect of pH on the production of the fibrinolytic enzyme from *Bacillus brevis* KJ-23.

nutrient broth배지에 최적화 조건인 D-ribose 0.5%, malt extract 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3%, pH 7.0에서 Fig. 6과 같이 25~40°C까지 온도를 달리한 후 최적 배양온도를 결정하였다. 30°C와 35°C에서 비교적 높은 효소생산을 보였으며, 25°C 40°C는 상대적으로 적은 효소생산을 보였다. 본 실험에서는 30°C에서 가장 큰 효소생산을 보여, 37°C에서 가장 큰 효소생산을 확인한 Choi 등(12), Jang 등(16), Chung(13)과는 상이한 결과를 보였다.

효소생산에 미치는 배양시간의 영향

배양시간이 효소생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 nutrient broth배지에 최적화 조건인 D-ribose 0.5%, malt extract 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3%, pH 7.0, 30°C에서 12시간 주기로 84시간까지 배양을 시키면서 효소생산의 경시 효과를 Fig. 7과 같이 관찰하였다. 그 결과 24시간~48시간까지는 활성이 최대를 보였지만, 60시간~80시간에는 서서히 활성이 감소되는 경향을 보였다. 이는 Chung(13)이 발표한 *Bacillus* sp. S7-16의 최대 활성 시간이 24시간이었으며, Lee 등(21)이 발표한 *Bacillus subtilis* KCK-7균의 최대 활성 시간이 48시간이었던 것과 비교하였을 때 동일한 결과를 나타내었다.

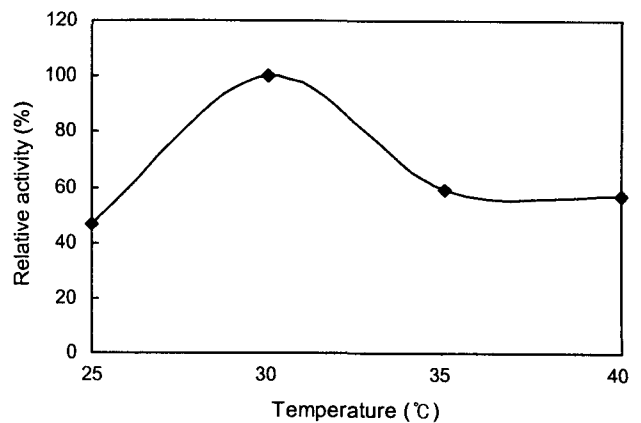


Fig. 6. Effect of temperature on the production of the fibrinolytic enzyme from *Bacillus brevis* KJ-23.

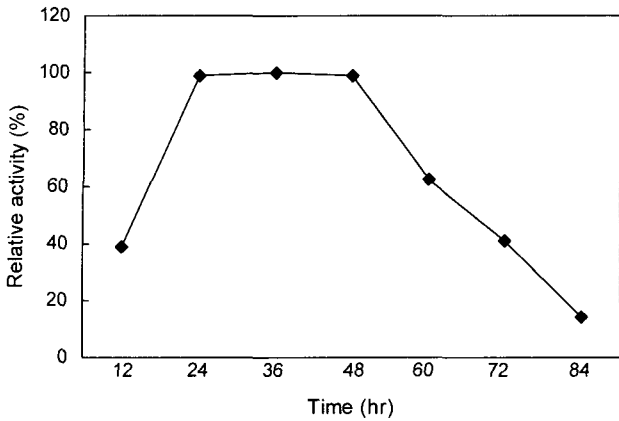


Fig. 7. Time course of fibrinolytic enzyme production from *Bacillus brevis* KJ-23.

요 약

전통식품(고추장, 된장, 쌈장, 젓갈류, 김치)으로부터 혈전 용해능이 있는 미생물을 분리한 후 그 중 fibrin용해능이 가장 우수한 균주 KJ-23을 최종 선발하였다. 최종 선발한 균주 KJ-23을 Microbial identification system(MIS)의 Sherlock 95 program을 이용하여 동정한 결과 *Bacillus brevis* KJ-23으로 동정하였다. *Bacillus brevis* KJ-23균주의 최대혈전용해생산을 위한 최적배지화 조건을 검토한 결과 nutrient broth, D-ribose 0.5%, malt extract 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3% 첨가시 최고의 활성을 보였으며, 금속염을 첨가했을 경우에는 오히려 활성이 감소하는 경향을 보여 금속원은 최적 배지화 조건에서 첨가하지 않았다. 또한 pH 7.0, 30°C에서 진탕배양했을 경우 최대활성을 보였으며, 시간별 경시효과에서는 24시간에서 혈전용해능이 최대를 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 상지대학교 평가대비 연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사 드립니다.

문 헌

1. Noh KA, Kim DH, Choi NS, Kim SH. 1999. Isolation of fibrinolytic enzyme producing strains from kimchi. *Korean J Food Sci Technol* 31: 219-223.
2. Sasaki K, Moriyama S, SumiH, Toki N, Robbins KC. 1985. The transport of 125I-labeled human high molecular weight urokinase across the intestinal tract in a dog model with stimulation of synthesis and/or release of plasminogen activators. *Blood* 66: 67-75.
3. Wun TC, Schleuning WD, Reich E. 1982. Isolation and characterization of urokinase from human plasma. *Biol Chem* 257: 3276-3283.
4. Lijnen H, Van Hoef R, Coolen D. 1992. Interaction of strep-

- tokinase with different molecular forms of plasminogen. *Biochem Biophys, ACTA* 144: 1118-1122.
5. Pennica DW, Holmes E, Kohr WJ, HarkinsRN, VeharGA, Ward CA, Bennett WF, Yelberton E, Seeburg PH, Heyneker HL, Goeddel DV, Collen D. 1983. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* 301: 214-221.
6. Mihara H, Sumi H, Yontta T, Mizumoto H, Ikeda R, Sei'ki M, Maruyama M. 1991. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Jap J Physiology* 41: 461-472.
7. Nobuyoshi N, Mihara H, Sumi H. 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci Biotech Biochem* 57: 1726-1730.
8. Sumi H, Nakajima N, Mihara H. 1993. A very stable and potent fibrinolytic enzyme found in earthworm. *Lumbricus rubellus*, *Comp Biochem Physiol* 106: 763-766.
9. Fujita M, Nomura K, Hong K, Ito Y, Asada A, Nishimuro S. 1993. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochem Biophys Res Comm* 197: 1340-1347.
10. Sumi H, Hamade H, Tsushima H, Mihara H, Muraki H. 1987. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto, a typical and popular soybean fermented food in Japanese diet. *Experientia* 43: 1110-1111.
11. Jang YK, Yang OS, Kang JO, Kong IS, Kim JO. 1995. Fibrinolysis of fermented kimchi. *Korean J Life Science* 5: 203-210.
12. Choi WA, Lee JO, Lee KH, Park SH. 1998. Effects of environmental and nutritional conditions on fibrinolytic enzyme production from *Bacillus subtilis* BK-17 in flask culture. *Korean J Biotechnol Bioeng* 13: 491-496.
13. Chung YJ. 1999. Isolation and characterization of a bacterium with a fibrinolytic activity. *Korean J Biotechnol Bioeng* 14: 103-108.
14. Choi NS, Seo SY, Kim SH. 1999. Screening of mushrooms having fibrinolytic activity. *Korean J Food Sci Technol* 131: 553-557.
15. Heo S, Lee SK, Joo HK. 1998. Isolation and identification of fibrinolytic enzyme producing strain from traditional food. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* 41: 119-124.
16. Jang SA, Kim MH, Lee MS, Lee MJ, Ji OH, Oh TK, Sohn CB. 1999. Isolation and identification of fibrinolytic enzyme producing strains from shrimp *Jeot-Gal*, a tiny salted shrimps, and medium optimization for enzyme production. *Korean J Food Sci Technol* 131: 1648-1653.
17. Kim YT, Kim OK, Oh HI. 1995. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from chungkook-jang. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 23: 1-5.
18. Astrup T, Mullertz S. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Archs Biochem Biophys* 40: 346-347.
19. Chang YH, Kim JK, Kim HJ, Yoon JH, Kim WY, Choi, YW Lee WJ, Kim YB, Park YH. 1999. Characteristics of *Lactobacillus reuterii* BSA-131 isolated from swine intestine. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 27: 23-27.
20. MIDI, Inc. Operating manual Ver. 6. Sherlock Microbial Identification System.
21. Lee SK, Heo S, Bae DH, Choi KH. 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.

(2003년 3월 18일 접수; 2003년 8월 28일 채택)