Korean J. Food Preserv.
Vol. 12, No. 6. pp. 643-649, December 2005

사단법인 한국식품저장유통학회
THE KOREAN SOCIETY OF FOOD PRESERVATION

된장 유래 혈전분해효소 생산균주의 분리 및 최적 효소생산 조건 탐색

옥 민 · 조영수[1†]
서라벌대학 기능식품컨설팅과, [1]동아대학교 응용생명공학부

Screening of Fibrinolytic Enzyme Producing from Microorganisms in Korean Fermented Soybean Paste and Optimum Conditions of Enzyme Production.

Min Ok and Young-Su Cho[1†]
Department of Functional Food Consulting, Sorabol college, Gyeong Ju 780-711, Korea,
[1]Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604- 714, Korea

Abstract

This study was investigated to find out optimal medium maximizing the production of fibrinolytic enzyme by *Bacillus* sp. isolated from Korean fermented soybean paste, which could hydrolyze the fibrin produced through the blood coagulation mechanism in human body. Among carbon sources tested, galactose was most effective for the enzyme production, and the level of the concentration for the optimal enzyme production was 4%(w/v). For nitrogen sources tested, malt extract was most effective for the enzyme production, and level of the concentration for optimal enzyme production was 4%(w/v). For mineral sources tested, K_2HPO_4 was most effective for enzyme production. The enzyme was maximally produced by cultivating the organism at the liquid medium of the initial pH 6 and temperature of 40℃.

Key words : *Bacillus*, fibrinolytic enzyme, korean fermented soybean paste

서 론

최근 생활수준의 향상과 더불어 건강에 대한 관심이 급속히 높아져가고 있는 추세이며, 이에 따른 여러 가지 생활습관병에 대한 예방과 치료에 관심이 높아져 가고 있다. 선진국의 통계에 의하면 혈관 순환기계 질환이 현대인 사망 원인 첫 번째를 차지하고 있으며, 이에 대한 많은 연구가 수행 중에 있다.

이러한 혈관계 질환 중 특히 혈전에 의한 질환의 경우, 현재 의학적으로 많은 관심과 함께 활발한 연구가 진행되고 있다. 생체 내에서 혈액은 응고와 용해작용이 항상 균형을 이루고 있으며 정상적으로 순환하고 있는 동안 생성된 혈전은 즉시 분해되어 인체에 영향을 주지 않는다. 그러나 여러 가지 원인으로 균형이 깨지면 생성되는 혈전이 분해되는 혈전보다 많아지고 분해되지 않는 혈전은 혈관을 막게 되므로 혈액의 순환이 방해되어 조직으로의 영양분 및 산소공급이 중단되게 되며 뇌졸중 및 심장질환의 원인이 되기도 한다. 이러한 혈전증의 시작은 혈관 벽에서 발생하는 노화에 따라 진행되어지지만, 혈관 중의 혈소판 응집력의 항진에 의한 혈전의 형성이 직접적인 원인이 되기도 한다. 이미 생성된 혈전의 경우에는 혈전을 용해하여 혈전을 치료하는 혈전용해제가 필요하다(1).

혈전은 혈류중의 피브리노겐이 활성화된 트롬빈에 의해서 피브린으로 전환되어 불용성의 중합체를 형성함으로서 생성된다. 이렇게 형성된 피브린은 혈액응고에 있어 중요한 역할을 하며 혈전의 기본물질이기도 하다. 혈전분해효소는 작용기전에 따라 혈전에 직접 작용하여 용해시키는 단백질 분해효소제와 인체의 혈액 분해계를 활성화시키는 효소제로 크게 분류된다(2).

현재 사용되어지는 혈전분해효소는 urokinase (UK) (3,4, 5,6), streptokinase (SK)(7), tissue type plasminogen activator

†Corresponding author. E-mail : choys@dau.ac.kr,
Phone : 82-51-200-7586, Fax : 82-51-200-7505

(tPA)(2) 등이 있다. 이와 같은 제품은 반감기가 짧고, 가격이 비싼 단점을 지니고 있다.

이를 해결하기 위하여 여러 기업에서 가격이 저렴하고 안정성이 증대된 tPA유도체의 개발을 시도하고 있으며 최근 상당한 진전이 있는 것으로 알려져 있다. 일본의 Mihara 등이 지렁이의 체단백질로부터 혈전용해작용이 강한 lumbrokinase(LK)를 분리 정제하여 보고한 바 있다(8,9,10). LK는 현재 국내의 2개 제약회사 제품으로 고가로 시판중에 있다. 그 이외에도 *Fusarium pallidoroseum*, *Katsuwonus pelamis*와 *Staphylococcus aureus*등의 여러 미생물로부터 혈전용해효소를 분리한 바 있으나 이들은 부작용을 일으키는 단점이 있다고 알려져 있다(11,12).

*Bacillus*속에 속하는 균주들은 많은 종류의 protease를 균체 외로 분비하고 이러한 효소는 다양한 기질에 반응하는 성질을 가지고 있다(13,14,15). 이중 일부 alkaline protease는 피브린을 강력히 분해하는 성질을 가지고 있다. 그동안 많은 연구자들에 의해 *Bacillus*가 생산하는 protease가 확인된 바 있고 최근 일본의 전통식품인 *natto*에서 분리된 *B. subtilis var natto* (*B. natto*)가 강력한 피브린 분해활성을 갖는 alkaline serine protease를 분비하는 것으로 보고 된 바 있다(16,17,18,19). 국내에서는 전통적인 콩 발효식품인 청국장에서 natto균과 유사한 성질을 갖는 *Bacillus*균주가 분리되고 있으며 분리 균에서 피브린 분해활성을 갖는 alkaline serine protease가 보고 된 바 있다(20).

따라서 본 연구는 혈전용해효소 활성이 우수한 균주를 분리하고, 분리, 동정한 강력한 피브린 분해활성을 나타내는 *Bacillus* sp. 균주로부터 혈전용해효소 생성 조건을 확립하여 기능성 식품산업에 이용할 수 있는 기초 자료를 마련하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 분리

혈전용해효소를 분비하는 미생물을 분리하기 위하여 경상남도 김해시일대의 가정에서 전통된장으로부터 시료를 채집하고, 시료 1 g을 100 mL의 멸균증류수에 현탁한 후 NB(Beef extract 3.0g, peptone 5.0 g/L agar plate에 도말하여 37℃에서 24시간 배양하였다. 이때 형성된 단일 균락을 선택하여 fibrin plate에 계대하였으며 37℃에서 24시간동안 배양한 후 균락 주변에 투명환을 생성하는 미생물 중 투명환의 크기로 미생물을 분리하였다. 선발된 균주를 TSB (pancreatic digest of casein 17.0 g, enzymatic digest of soybean meal 3.09 g, dextrose 2.5 g, dipotassium phosphate 2.5 g, sodium chloride 5.0 g/L) 배지에서 액체배양한 후 fibrin plate에 30 μL를 점적하여 fibrinolytic activity를 측정하여 최종 선발 하였다.

균주의 보관을 위해서는 멸균된 glycerol stock solution (1.5% glycerol)을 사용하여 동결건조 시킨 후 ample 형태로 보관하며 사용하였다.

균주의 동정

선발된 균주는 NA agar배지에서 37℃에서 24시간 동안 배양 한 후 동정에 사용하였다. 분리된 미생물은 형태학적, 생화학적 특성을 조사한 후, API 50 CHB kit(BioMerieux Co, France)를 이용하여 동정을 실시하였다.

그리고 이 균주를 2% glutaraldehyde (0.1% $MgSO_4$ 함유 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2)로 24시간 동안 실온에서 전 고정한 다음 0.1 M cacodylate buffer(pH 7.2)로 2시간 세척하고, 0.2M cacodylate buffer (pH 7.4)에 1% 농도가 되게 녹인 osmic acid(OsO_4) 용액으로 4℃에서 24시간 동안 처리하여 고정시켰다. 고정된 sample에서 용액을 제거한 뒤에 50, 70, 80, 90 및 95% 에탄올에서 각각 10분간 2회씩 탈수시켰다. 탈수한 뒤에 sample을 임계점 건조기에서 건조하고 platinum coating한 다음 주사 전자 현미경 (SEM, JSM-6700F, JEOL, Tokyo, JAPAN) 으로 형태를 관찰하였다.

배양 조건 및 생육측정

고체 평판 배지에 보존된 균을 백금이로 300 mL 삼각플라스크내 100 mL의 LB배지 (Bacto tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 6.8)에 접종하였다. 이 삼각플라스크는 37℃, 180 rpm에서 8시간 동안 배양하였다. 그런 다음 배양액을 다시 500 mL 삼각 플라스크의 100 mL LB액체배지에 접종하여 동일한 조건에서 12시간 배양하였다. 지수성장기 말기에 분광광도계(Spectrophotometer, HP 8452A)를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 (660 nm)가 1.8에 이르렀을 때 이 후 실험을 위한 전배양액으로 사용하였다.

조효소액의 준비

조효소액을 준비하기 위하여 여러 가지 복합배지를 이용하여 균의 성장 및 protease활성이 가장 우수한 배지를 선택하기 위해 MHB, BHI, LB, TSB, NB 배지를 각각 Difco사 (USA)에서 구입하여 각 배지에 표기된 함량으로 각각 500 mL 삼각플라스크에 100 mL의 부피가 되게 조제 후 전배양액을 각각 2%씩 접종하였다.

접종된 삼각 플라스크는 37℃, 180 rpm으로 shaking incubator에서 18시간 배양하여 fibrinolytic enzyme활성 및 균의 생장정도를 확인하였다.

Fibrinolytic enzyme활성 및 균의 생장이 우수한 TSB배지를 500 mL의 삼각 플라스크에 100 mL이 되도록 조제하여 동일한 조건에서 18시간 배양 후 10,000 × g로 20분 동안 원심분리를 실시하고 상등액을 취하여 조효소액으로 하였

다. 단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry법(21)에 따라 측정하였고, 준비된 조효소액은 -20℃에서 냉동보관하면서 사용하였다.

피브린분해활성

효소활성 측정을 위하여 배양액을 원심분리하여 Tris buffer(pH7.2, 20 mM)로 7:3의 비로 희석하였다. 이 효소 희석액 50 μL를 미리 준비한 fibrin plate에 떨어뜨린 후 37℃ 항온기에서 일정시간 반응 시키고, 분해환의 지름으로부터 분해면적을 구하였다. Fibrin plate위에 효소액을 떨어뜨릴 때 지름 8 mm의 paper disk를 이용하여 그 위에 효소액을 떨어뜨렸다.

Fibrin plate는 fibrinogen에 thrombin을 투여하여 만들었다. 즉, Fibrinogen 0.06 g을 0.1 M borate buffer(pH7.5) 10 mL에 넣어 37℃로 맞춘 항온기에서 2시간 동안 두어 완전히 녹였다. 녹은 fibrinogen을 petri dish에 10 mL씩 분주하고 fibrinogen 10mL 당 thrombin (5,000 unit, Sigma Co. St. Louis, USA) 40 unit를 petri dish 전면에 골고루 갈 수 있도록 유의하면서 넣고 상하좌우로 적당하게 흔들어 주면서 투여하였다.

탄소원의 종류 및 농도에 따른 균체생육 및 효소활성 측정

탄소원의 종류에 따른 균체의 생육 및 효소활성을 측정하기 위하여 기본배지인 LB배지에 glucose, maltose, sucrose, lactose, galactose를 각각 2%농도로 첨가하고 배양액의 pH를 6.8로 조정하였다. 그리고, 전 배양된 분리 미생물 *Bacillus* sp. 배양액을 각각 3% 농도로 접종하여 30℃에서 18시간 배양한 후 균체의 생육과 효소활성도를 측정하였다.

또한, 분리 *Bacillus* sp. 배양 시 가장 우수한 fibrinolytic enzyme활성을 나타낸 galactose를 각각 LB배지에 무첨가, 1%, 2%, 3%, 4% 농도가 함유되도록 하여 30℃에서 18시간 배양한 후 균체의 생육과 효소활성도를 측정하였다.

질소원의 종류에 따른 균체의 생육 및 효소활성 측정

질소원의 종류에 따른 균체의 생육 및 효소활성을 측정하기 위해 LB배지에 함유되어지는 1%의 tryptone을 동일농도의 peptone, yeast extract, malt extract, $NaNO_3$, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl, casein, soybean으로 대체하고 배양초기 pH를 동일하게 6.8로 조정한 후 30℃에서 18시간 배양한 후 균체의 생육과 효소활성도를 측정하였다.

측정된 질소원 중에서 가장 우수한 fibrinolytic enzyme활성을 가지는 질소원을 이용하여 무첨가, 2%, 4%, 6%, 8% 농도별로 하여 질소원 농도에 의한 균체의 생육과 효소활성도를 측정하였다.

무기질원 종류에 따른 균체의 생육 및 효소활성 측정

무기질원의 종류에 따른 균체의 생육 및 효소활성을 측정하기 위해 이미 수행된 탄소원과 질소원을 이용한 LB배지의 NaCl을 동일농도의 yeast extract, K_2HPO_4, KH_2PO_4, $MnSO_4$, $MgSO_4$, $ZnSO_4$, $CaCl_2$, $FeSO_4$ 로 대체하고 배양초기 pH를 동일하게 6.8로 조정한 후 30℃에서 18시간 배양한 후 균체의 생육과 효소활성도를 측정하였다.

효소의 fibrin 분해양상에 따른 분류

Fibrin plate를 80℃에서 30분간 열처리하여 plasminogen을 제거한 plate(plasminogen-free fibrin plate)와 열처리하지 않은 fibrin plate(plasminogen-rich fibrin plate)에 조효소액의 반응을 비교하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

경상남도 김해시일대의 가정에서 전통발효식품인 된장으로부터 채집한 시료를 멸균수로 희석한 후 순차적으로 fibin plate 배지에 도말한 뒤 37℃에서 18시간 이상 배양하여 생성된 균주들 중 상대적으로 투명환이 가장 큰 균주를 선별하였다.

분리균주는 Gram staining 결과 양성을 나타내었으며, spore staining에서는 spore가 존재하였고 전자현미경으로 확인한 결과 간균의 형태를 가지고 있었다.(Fig. 1). API 50CHB kit를 이용한 동정 결과 *Bacillus* sp. 임을 확인하였다 (Table 1).

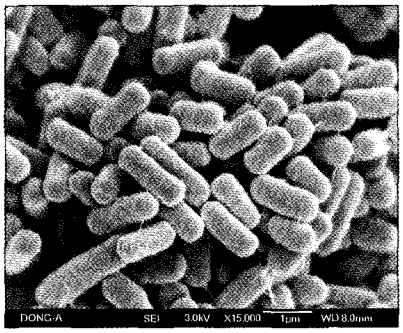

Fig. 1. Scanning electron micrograph of the isolated *Bacillus* sp. (×15,000).

혈전용해효소활성

전통발효식품으로부터 분리된 *Bacillus* sp. 조효소액의 혈전용해활성을 fibrin plate를 이용하여 각각 50 μL와 100 μL를 8 mm paper disk 위에 분무하여 37℃에서 2시간이 지난 후 확인한 결과 분리균에서 우수한 혈전용해활성을 확인 할 수 있었으며, Fibrin plate를 이용한 분리 균의 혈전용해활성은 8시간까지 2시간 간격으로 형성되는 투명환의

Table 1. Physiological characteristics of isolated microorganisms *Bacillus* sp

Gly	+	Cel	+
Ery	-	Mal	+
Dara	-	Lac	+
Lara	+	Mel	+
Rib	+	Sac	+
Dxyl	+	Tre	-
Lxyl	-	Inu	-
Ado	-	Mlz	-
Mdx	-	Raf	+
Gal	-	Amd	+
Glu	+	Glyg	+
Fru	+	Xlt	-
Mne	+	Gen	+
Sbe	-	Tur	-
Rha	-	Lyx	-
Dul	-	Tag	-
Ino	+	Dfuc	-
Man	+	Lfuc	-
Sor	+	Darl	-
Mdm	-	Larl	-
Mdg	+	Gnt	-
Nag	-	2KG	-
Amy	+	5KG	-
Arb	+		
Esc	+		
Sal	+		

[1]used with API 50CHB kit.
[2]+ : positive, - : negative.

면적이 비례적으로 증가하는 경향을 나타내었으며. 이는 Lee 등(22)과 Kil 등(17)이 보고한 결과와 일치하였다.

또한, 이미 보고 되어진 된장 및 청국장으로부터 분리된 *Bacillus* sp. 보다(17,18,20) 생육과 혈전용해능이 우수한 것으로 사료되어진다.

배양시간에 따른 균체의 생육 및 효소활성의 변화

분리 균주의 배양시간별 균체 생육과 효소활성을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 균체의 생육은 배양 6시간부터 급격히 증가하기 시작하여 배양 15시간 이후에 최대성장을 나타내었고 그 이후로 감소하는 경향을 나타내었다. 혈전용해효소의 활성은 균체 생장과 동일한 형태로 활성을 나타나기 시작 하였으며, 이는 Ok 등(23)이 보고한 *Bacillus* sp.의 세포외 protease의 활성과 동일한 결과를 나타내었다. 그리고, Kim(27)이 청국장에서 혈전용해효소 생성균으로 분리한 *Bacillus* sp.의 경우 배양시간이 증가함에 따라 효소활성이 증가하여 배양 8시간에 최대 효소활성을 나타내었다고 한 결과와 유사하였으며, Kembhavi 등(32)이 분리한 *Bacillus* NCM No. 64균주가 배양 38시간에 protease최대 활성이 있었다는 보고와는 상이한 결과를 나타내었다.

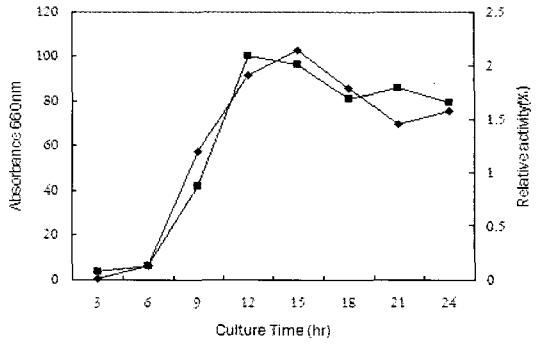

Fig. 2. Time course of fibrinolytic enzyme activity in *Bacillus* sp.
(—■—■—: Relative activity , —◆—◆—: Cell growth).

초기 pH 변화에 의한 균체 생육 및 효소 활성의 변화

분리 균주의 초기 pH변화에 따른 균의 생육과 효소 활성의 변화를 알아보기 위해 배양배지의 초기 pH를 4~10으로 조절한 후 전 배양액을 3%씩 접종하고 30℃에서 24시간 배양한 후 균체생육과 효소활성도는 다음과 같다(Fig. 3). 배양배지의 초기 pH 5~9까지 균체생육은 전체적으로 양호하였지만, 효소활성도는 pH 4부터 증가하기 시작하여 pH 6에서 가장 높게 나타났고 초기 pH가 6~8로 조정 후 배양한 결과 혈전용해활성이 우수하였다. 그러나, 배양 후의 배양액의 pH는 전체적으로 8.6~8.8로 유사하였다.

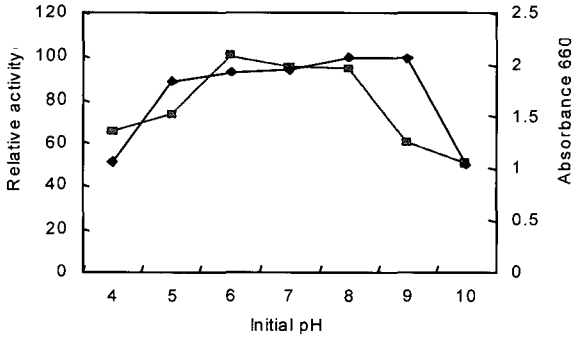

Fig. 3. Effect of initial pH on cell growth and fibrinolytic enzyme activity of *Bacillus* sp.
(—■—■—: Relative activity , —◆—◆—: Cell growth).

탄소원의 종류 및 농도에 미치는 혈전용해능의 비교

분리균주의 탄소원 종류에 따른 혈전용해효소 활성을 비교하기 위해 LB배지에 glucose, starch, sucrose, lactose, galactose를 각각 2%농도로 첨가하여 30℃에서 18시간 배양한 후 8,000×g에서 20분간 원심 분리하여 조제되어진 조효소액을 fibrin plate에 30 μL를 paper disk에 가하여 37℃에서 4시간 후 형성되어진 분해환의 크기를 이용한 혈전용해활성은 다음과 같다(Fig. 4). 사용되어진 탄소원에 대한 혈전용해활성은 galactose를 사용하였을 때 가장 높았으며,

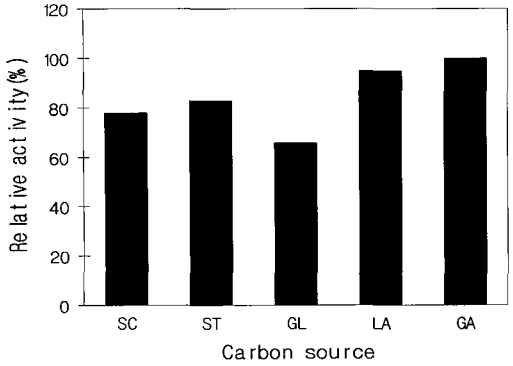

Fig. 4. Effect of carbon source on activity of fibrinolytic enzyme.
(SC: Sucrose, ST: Starch, GL: Glucose, LA: Lactose, GA: Galactose).

galactose농도에 따른 혈전용해활성은 농도에 비례하여 증가하는 경향을 나타내었으며 4%에서 가장 우수하였다(Fig. 5). 이상의 결과는 Koo 등(24)의 *B. licheniformis*를 이용한 protease 생성에 관한 실험에서 탄소원으로 lactose가 좋았다고 하여 본 균주의 galactose와 lactose의 결과가 우수한 것과 유사하였으며, Choi 등(25) 및 Lee 등(26)이 재래식 간장에서 분리한 *Bacillus subtilis globigii*는 탄소원으로 soluble starch 2% 첨가시 효소활성이 첨가한 다른 탄소원에 비해 효소활성이 크게 증가함을 보고한 것과 Kim(27)이 혈전용해효소 생산균주로 분리한 *Bacillus* sp.는 glucose, fructose, lactose, sucrose 등 대부분의 단당류와 이당류를 첨가시 효소생성이 억제되었다고 하여 본 실험에서 분리한 균주와 많은 차이를 보였다.

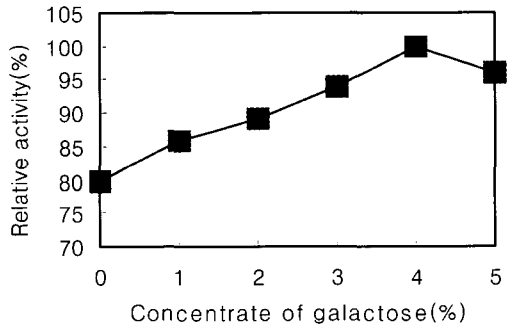

Fig. 5. Effect of galactose concentration on activity of fibrinolytic enzyme.

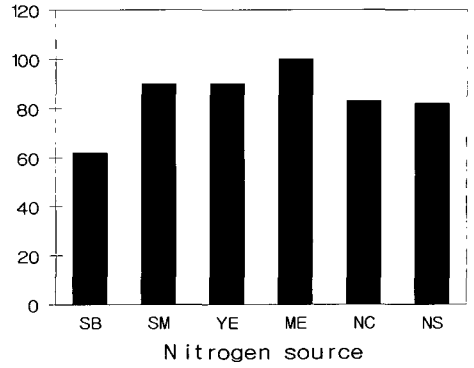

Fig. 6. Effect of nitrogen source on activity of fibrinolytic enzyme.
(SB: Soybean powder, SM: Skim milk, YE: Yeast extract, ME Malt extract, NC: NH_4Cl, NS: $(NH_4)_2SO_4$).

며, 탄소원의 결과에서와 같이 농도에서는 비례적으로 증가하는 경향을 나타내었으며 4%의 농도에서 가장 우수하였다(Fig. 7). 이와 같은 결과는 Kakebina 등(28)이 *Bacillus brevis*를 이용 시 질소원으로 yeast extract가 우수하였다고 보고하였으며, Lee 등(26)도 토양으로부터 분리한 alkaline protease 생성균주는 질소원으로 casein을 이용시 가장 높은 효소 생성 효과가 있어다고 보고한 결과와 유사하였다. 그러나, Kim 등(29)은 *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4를 이용하여 protease를 생산시 soybean meal이 효소 생성이 우수한 효과를 보였다고 한 결과와는 상이하게 본 실험에서는 soybean powder를 이용 하였을 시 오히려 혈전용해효소 활성이 낮게 나타났다.

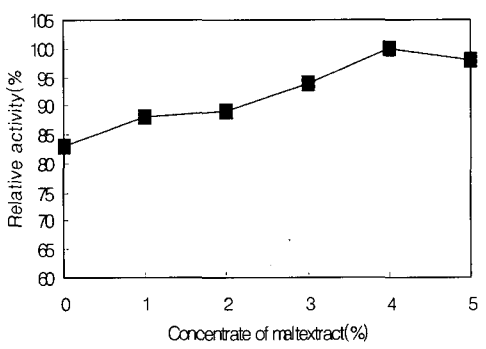

Fig. 7. Effect of malt extract concentration on activity of fibrinolytic enzyme.

질소원의 종류 및 농도에 미치는 혈전용해능의 비교

질소원의 종류에 따른 혈전용해효소 활성을 비교하기 위하여 LB배지에서 질소원인 1% tryptone 대신에 soybean, yeast extract, malt extract, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl을 동일한 농도로 대체하여 30℃에서 18시간 배양한 후 원심분리한 상등액을 이용하여 혈전용해효소 활성을 비교하였다(Fig. 6). 혈전용해효소 활성은 malt extract를 사용하였을 때 가장 높았으

미량원소 종류별 혈전 용해능의 비교

미량원소의 종류에 따른 혈전용해효소 활성을 비교하기 위해 LB배지에서 NaCl을 대신에 yeast extract, K_2HPO_4, KH_2PO_4, $MnSO_4$, $MgSO_4$, $ZnSO_4$, $CaCl_2$, $FeSO_4$를 0.15% 수준으로 대체하여 30℃에서 18시간 배양한 후 원심 분리한 상등액을 이용하여 혈전용해효소 활성을 비교하였다. 혈전용해효소 활성은 K_2HPO_4를 사용했을 때 가장 활성이 높았

다(Fig. 8) 이는 대부분의 *Bacillus* spp.에서는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$가 효소생산과 균체생육에 영향을 준다는 Horikoshi(30)의 보고와 Mn^{2+}, Cu^{2+}를 첨가시 효소생산이 증가한다는 Zlotnik 등(31)의 보고와는 상이하였다.

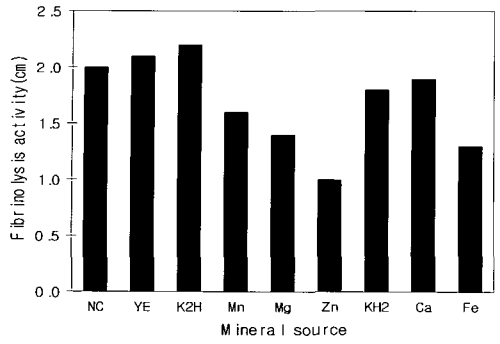

Fig. 8. Effect of mineral source on activity of fibrinolytic enzyme.

(NC: NaCl, YE: Yeast extract, K_2H: K_2HPO_4, Mn: $MnSO_4$, Mg: $MgSO_4$, Zn: $ZnSO_4$, KH_2: KH_2PO_4, Ca: $CaCl_2$, Fe: $FeSO_4$).

효소의 Fibrin 분해양상에 따른 분류

혈전용해효소는 fibrin을 분해하는 양상에 따라 두 가지 형태로 나눌 수 있다. 그 하나는 혈액 중 plasminogen을 active type인 plasmin으로 변화시켜 plasmin으로 하여금 fibrin을 분해하도록 하는 plasminogen activator type과 이와 무관하게 효소자체가 직접 혈전을 분해하는 direct active type이 있다. 이에 본 효소의 분해기작을 확인하기 위해 plasminogen-rich fibrin plate와 plasminogen-free plate를 사용하였다. 본 혈전용해효소는 plasminogen을 제거한 plasminogen-free plate에서도 plasminogen-rich fibrin plate와 마찬가지로 활성을 발현하는 결과를 보였다. 그러므로 본 효소는 fibrin을 직접 분해하는 direct active type으로 판단되었다(Fig. 9).

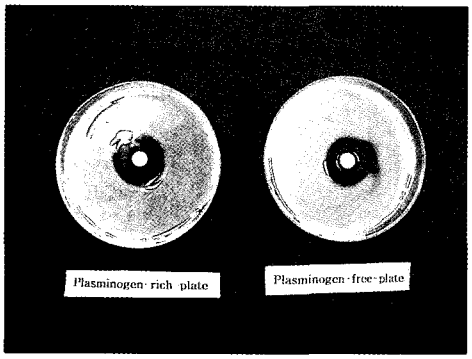

Fig. 9. Fibrinolytic activity of *Bacillus* sp. in plasminogen-free and plasminoen-rich fibrin plates.

Plasminogen-rich fibrin plate contained 5 U(0.5 U/mL) of plasminogen per plate.

요 약

전통발효식품인 된장으로부터 높은 활성의 fibrinolytic enzyme를 생산하는 미생물을 수십 종 분리하였다. 산업적으로 우수한 균종을 선별하기 위하여 분리된 미생물중 fibrinolytic enzyme활성과 성장 속도면에서 가장 우수한 균주를 선별하여 하였으며, 형태학적, 생화학적 및 생리학적 특성을 조사한 후 *Bacillus* sp.로 동정되었다.

Fibrinolytic enzyme생산을 위한 최적 배양조건은 초기 pH 6~8일 때 상대활성도가 80%이상을 나타내었고, 배양 12시간째에 가장 높은 활성도를 나타내었다. Fibrin plate를 이용한 혈전용해능을 확인한 결과 높은 혈전용해능을 가지고 있었다. 탄소원으로 galactose를 4% 첨가 하였을 때 가장 우수하였으며, 질소원은 malt extract를 4% 첨가 하였을 때 가장 우수하였다. 무기염은 K_2HPO_4를 첨가하였을 때 가장 우수한 활성을 나타내었다.

참고문헌

1. Abe, T., Kazama, M., Kinoshita, T. Naito, I. Ogushi, T., Yoshimura, Y., Teruya, J. and Shimizu, N. (1982) Shift of fibrinolysis system at oral administration of urokinase in human subjects; Double blind cross over study, Blood and Vessels(in Japanese), 13, 472-479
2. Collen, D., Lijnen, H.R. and Gold, H.K. (1991) Towards better thrombolytic therapy, Progress in Cardiovascular Diseases 34, 101-112
3. Sumi, H., Toki, N., Sasaki, K. and Robbins, K.C. (1980) Oral administration of urokinase, Thromb. Res., 20, 711-714
4. Sumi, H., Maruyama, M., Yoneta, T. and Mihara, H. (1983) Activation of plasma fibrinolysis after intrarectal administration of high molecular weight urokinase and its derivative, Acta Haematol., 70, 289-295
5. Sasaki, K., Moriyama, S., Sumi, H., Toki, N. and Robbins, K. C. (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
6. Toki, N., Sumi, H., Sasaki, K., Boreish, I. and Robbins, K.C. .(1985) Transport of urokinase across the intestinal tract of normal human subjects with stimulation of synthesis and/or release of urokinase-type proteins, J. Clin. Invest., 75, 1212-1222
7. Reed, G.L., Lin, F.F., Parhaml-seren, B. and Kussie, P. (1995) Identification of plasminogen binding region in streptokinase that is necessary for the creation of streptokinase plasminogen activator complex. Biochem.,

34, 10266-10271
8. 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 rubellus*. Jap. J. Physiol., 41, 461-472
9. Nakajima, N., Mihara, H. and Sumi, H. (1993) Characterization of potent fibrinolytic enzyme in earthworm, *Lumbricus rubellus*. Biosci. Biotech. Biochem., 57, 1726-1730
10. Nakajima, N., Taya, N. and Sumi, H. .(1993) Potent fibrinolytic enzyme from the lysate of *Katsuwonus pelamis* digestive tract(Shiokara) : Purification and characterization, Biosci. Biotech. Biochem., 57, 1604-1605
11. Samy, A. and Aassar, E.I. (1995) Production and properties of fibrinolytic enzyme in solid state cultures of *fusarium pallidoroseum*, Biotech. Lett., 17, 943-948
12. Fletcher, A.P. and Johnson, A.J. (1995) Methods employed for purification of streptokinase, Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 94, 233
13. Guntelber, A.V. and Ottesen, M. (1952) Preparation of crystals containing the plakalbumin forming enzyme from *Bacillus subtilis*. Nature(London), 170, 802
14. Hagihara, B., Matrubaraa, H., Nakai, M. and Okunuki, K. (1958) Crystalline bacterial proteinase. 1. Preparation of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis*. J. Biochem., 45, 185-194
15. Horikoshi, K.(1966) Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganism. part 1. alkaline protease produced by *Bacillus* No.221. Agr. Biol. Chem., 35, 1407-1414
16. Hwang, S.Y. (1995) Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Bacillus* sp. strain KUN-17. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 23, 53-59
17. Kil, J.O., Kim, G.N. and Park, I.S. (1998) Production and characterization of fibrinoloytic enzyme : Optimal condition for Production of the Enzyme from Bacillus sp. KP-6408 Isolated from *Chungkook-jang*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 27, 51-56
18. Kim, H.K., Kim, G.T., Kim, D.K., Choi, W.A., Park, S.H., Jeong, Y.K. and Kong, I.S. (1997) Purification and charaterization of a novel fibrinolytic Enzyme from *Bacillus* sp. KA38 Originated from Fermented Fish. J. Ferment. *Bioeng*., 84, 307-312
19. Kim, S.J., Yoon J.H., Lee, M.S. and Kim, H.B. (1997) Isolation and charaterization of *Bacillus cereus* secreting protease from korean Soybean Paste. *Kor.* J. Microbiol., 33, 136-141
20. Kim, W.K., Choi, K.H., Kim, Y.T., Park, H.H., Choi, J.Y., Lee, Y.S., Oh, H.I., Kwon, I.B. and Lee, S.Y. (1996) Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. Strain CK 11-4 Screened from *chungkook - jang*, Appl. Environ. Microbiol., 62, 2482-2488
21. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) : Protein mesurement with the Folin phenol regent. J. Bio. Chem., 193, 265
22. Lee, S.K., Heo, S., Bae, D.H. and Choi, K.H. (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
23. Ok, M., Seo, W.S., Cha, J.Y. and Cho, Y.S. (2001) Isolation and characterization of *Bacillus* sp. WRD-2 extracellular protease from soil. J. Korean Soc. Agri. Chem. Biotechnol., 44, 246-25
24. Koo, J.H., Choi, I.J., Nam, H.S., Lee, H.J., Shin, Z.I. and Oh, T.K. (1997) Medium optimization for production of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* NS70. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 207-211
25. Choi, K.J. (1995) Separation of *Bacillus* sp. and changes of NH_2-N, NH_3-N, and protease activity in *chonggukchang meju* adding with mugwort extract. Kon-Kuk Univ. Master's Degree Thesis.
26. Lee, E.G, Park, E.H., Lee, H.H. and Hyun, H.H. (1996) Isolation and characterization of *pseudomonas* sp. producing alkaline protease. Kor. J. Microbiol., 22, 289-297
27. Kim, Y.T. (1995) Characteristics of fibrinolytic enzyme produced by Bacillus sp. isolated from *Chungkookjang*. Sejong Univ. Doctoral Degree Thesis.
28. Kalebina, T.S., Galina, N.R., Selyakh, I.O., Khodova, O.M. and Kulaev, I.S. (1998) Serine protease from *Bacillus brevis*. Appl. Microbiol. Biotech., 28, 531-533
29. Kim, H.K, Kim, K.H., Lee, J.K., Kim, Y.O., Nam H.S. and Oh, T.K (1995) Characterization of a thermostable protease from thermophilic *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 23, 322-328
30. Horikoshi, K. (1971) Production of alkaline enzyme by alkalophilic microorganism. Agric. Biol. Chem., 35, 1783-1791
31. Zlotnik, H., Schramm, V.L. and Buckley, H.R. (1984) Purification and partial characterization of a *Norcardia brasiliensis* extracellular protease. J. Bacteriol., 157, 627-631
32. Kembhavi, A.A., Kukalni, A. and Pant, A. (1993) Salt tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. NCIM No. 64. Appl. Biochem Biotech., 38, 83-89

(접수 2005년 9월 16일, 채택 2005년 11월 29일)