

Bacillus subtilis BK-17 유래 혈전용해효소(Bacillokinase)의 고체배양

정영기^{1,3*} · 백현² · 서민정³ · 김민정³ · 이혜현³ · 주우홍⁴ · 김정인⁵ · 최영현⁶ · 정경태⁷

¹동아대학교 생명공학과, ²아마란스화장품, ³동아대학교 의생명과학과, ⁴창원대학교 생물학과
⁵인제대학교 식품생명과학부, ⁶동의대학교 한의학과, ⁷동의대학교 임상병리학과

Received September 11, 2009 / Accepted October 1, 2009

Solid Cultivation of Fibrinolytic Enzyme (Bacillokinase) from *Bacillus subtilis* BK-17. Yong-Kee Jeong^{1,3*}, Hyun Beak², Min Jeong Seo³, Min Jeong Kim³, Hye Hyeon Lee³, Woo Hong Joo⁴, Jeong In Kim⁵, Yung Hyun Choi⁶ and Kyung Tae Chung⁷. ¹Department of Biotechnology, Dong-A University, ²Institute, Amaranth Cosmetics, ³Department of Medical Bioscience, Dong-A University, Busan, Korea, ⁴Department of Biology, Changwon National University, Changwon, Korea, ⁵School of Food and Life Science, Inje University, Gimhae, Korea, ⁶Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine, ⁷Department of Clinical Laboratory Science, Dong-Eui University, Busan, Korea - A solid-state culture based on grain materials was attempted to produce a fibrinolytic enzyme for blood circulation improvement using *Bacillus subtilis* BK-17. The spore, rather than vegetative cell inoculation, of *B. subtilis* BK-17 on the solid-state culture was effective in the production of a fibrinolytic enzyme. Maximum spore production was obtained with a SFM medium (0.8% nutrient broth, 0.05% yeast extract, 10⁻¹ M MgCl₂, 10⁻³ M FeCl₃, 10⁻⁴ MnCl₂, 10⁻⁵ M dipicolic acid, pH 6.5). Optimal pH and temperature were pH 6 and 30°C, respectively. The spore production reached a maximum at 60 hours of incubation. *Bacillus subtilis* BK-17 on the mung bean solid-state culture produced greater fibrinolytic activity, and less activity was seen in other grains such as kidney bean, soybean and corn. Protein and lipid contents of fermented soybeans were about 10 - 30% more than those of unfermented soybeans. Amino acid content was also 5 - 20% more than that of unfermented soybeans. These results indicated that fermented solid-state culture medium, fermented soybean in this case, can be utilized as a food supplement.

Key words : *Bacillus subtilis*, fibrinolytic enzyme, solid culture, fibrin, fermented soybean

서 론

인간의 혈액 성분은 적혈구, 백혈구, 혈소판 등과 같은 혈구 세포가 있어 중요한 기능을 담당하고 있지만 혈액응고를 유발하는 물질도 있다. 즉 피브리노젠(fibrinogen)은 혈액 중에 액체 상태로 존재하나 활성화된 트롬빈(thrombin)의 작용을 받으면 피브린(fibrin) [4,11,13,15]으로 변한다. 피브린은 혈전이라고도 불리며 우리 혈액 내에서 응고된 덩어리로 존재하며 이들은 다시 뭉쳐서 polymer를 형성하게 되어 혈액순환을 방해하며, 고혈압, 동맥경화, 혈전성뇌졸중 등의 성인병을 유발하는 원인이 된다.

이 혈전은 혈액내의 plasmin에 의하여 분해되는데 plasmin은 tissue plasminogen activator (tPA) [16]에 의하여 plasminogen이 활성화 된 것이다. 그 외에 잘 알려진 plasminogen activator는 사람의 뇌에서 분리한 urokinase [16], *Streptococcus hemolyticus*에서 분리한 streptokinase [11], *Staphylococcus aureus*에서 분리한 staphylokinase [1,10] 등이

있다.

Bacillus sp. 가 생산하는 protease와 혈전용해효소는 nattokinase [12]를 비롯하여 *B. amylosaccharolyticus* 유래의 protease의 일종인 subtilisin [17], subtilisin J [16], subtilisin E [3] 등 다수 발견하여 보고되어 왔다. 특히 *Bacillus subtilis* 유래의 혈전용해효소는 부작용이 없으며 nattokinase와 더불어 식품으로도 사용가능하므로 많은 연구가 진행되고 있다. 저자의 연구팀도 *Bacillus subtilis* strain A1으로부터 33 kDa의 혈전용해효소를 클로닝하고 이를 정제하여 bacillokinase II로 명명하여 보고[4]한 바가 있다. 그리고 *B. subtilis* BK-17로부터 31kDa의 혈전용해효소[5]를 정제하여 이를 baillokinase 17 (BK-17)로 명명하였으며, 이 균주로부터 혈전용해효소를 bioreactor에서의 생산조건을 보고한 바 있다[9]. 또한 멸치젓갈에서 신규 혈전용해효소를 정제하여 myulchikinase [6]라 명명하였으며, 멸치젓갈로부터 내염성세균인 *Bacillus sp.* KA38을 분리하여 이로부터 41 kDa의 혈전용해효소를 정제하여 보고하였다[8].

본 논문에서는 저자가 발표한 *Bacillus subtilis* BK-17 유래의 혈전용해효소[5]를 혈전개선작용을 가진 기능성 식품으로 개발하기 위하여 곡물을 이용하여 고체배양을 시도한 결과를 보고하고자 한다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-5788, Fax : +82-51-206-0848

E-mail : ykj9912@dau.ac.kr

재료 및 방법

사용균주 및 배양

Bacillus subtilis BK-17 균주는 전보[5]에서 Jeong 등이 사용한 균주를 사용해 기본 배양은 1% Bacto-tryptone (Sigma, USA), 1% Sodium chloride와 0.5% Bacto-yeast extract (Sigma, USA)를 함유하는 Luria-Bertani 배지를 사용하여 37°C에서 호기적으로 배양하였다. 보관 균주는 동일한 배지에서 1.5% agar를 첨가한 사면배지에 이식하여 냉장보관하면서 1개월마다 계대하여 사용하였다.

혈전용해능의 활성측정

혈전용해능의 활성정도를 측정하기 위하여 Jeong 등의 방법[7]에 따라 fibrin을 기질로 하는 fibrin plate법을 응용하였다. 즉 0.2%의 fibrinogen 용액 10 ml을 petri-dish에 넣고 bo-rate saline buffer (pH 7.8)에 녹인 thrombin 용액(40 unit/ml)을 총 20 units되게 가하여 균일하게 혼합되도록 잘 흔들어 준다. 서서히 fibrinogen이 fibrin으로 되면서 굳어지는데 이 plate를 실온에서 30분 정도 방치한 후 사용하였다. 활성 측정은 시료를 fibrin plate위에 분주하여 37°C incubator에서 시간 별로 반응하여 fibrin이 분해되어 생기는 면적을 측정한다.

고체배양과 기질

고체배양을 위한 전분기질은 밀, 쌀, 옥수수를 사용하였고 식물단백질 기질로서는 강남콩, 검정콩, 대두, 팥, 녹두를 사용하였다. 이들 기질은 각각의 곡물을 분쇄하여 만든 가루상태와 크기가 일정한 날알 상태로 500 ml의 삼각fask에 50 g씩 넣고, 멸균증류수에 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.5% NH₄Cl, 0.0007% FeSO₄·7H₂O의 무기질을 함유한 mineral medium이나 0.8% NaCl용액 30 ml을 가하여 잘 섞은 후 멸균하였다. 이것은 식힌 후 대수증식기에서 집균한 영양세포나 포자 현탁액 1 ml을 고체 배지에 고루 이식하였다. 배양은 37°C 배양기에서 1~3일간 효소활성을 매일 측정하면서 배양하였다.

포자 생성조건 설정

배지조성과 포자 생성율

혈전용해효소 생산균주에 대한 최적배지를 위하여 nutrient broth (NB), LB배지, nutrient yeast extract sporulation medium (NYSM), spore forming medium (SFM)의 조성을 중심으로 포자 생성율을 검토하였다. 포자 생성율은 Chevanet [2] 등의 방법에 따라 60°C에서 90분간 열처리한 후 멸균식염수로 단계별 희석하고 nutrient agar plate에 도말하여 얻은 colony를 계측하여 그것을 colony forming unit (CFU)로 하였고, 그 unit를 포자수로 하였다.

pH 및 온도설정

pH설정은 0.05% yeast extract를 첨가한 NB배지에서 12시

간 전 배양한 생산균을 pH 2에서 pH 12까지 조정된 포자생성용 배지에 접종한 후 30°C에서 60시간 동안 진탕배양(160 rpm) 하여 생산균의 총균수와 포자의 수를 전술한 방법으로 측정하였다.

온도설정은 포자생성용배지에 생산균을 접종한 후 10°C에서 50°C까지 각 온도별로 60시간 동안 진탕배양(160 rpm)하여 생산균의 총균수와 포자의 수를 측정하였다. 포자 생성율을 검토한 후 가장 알맞은 배양 온도를 정하였다.

포자생성 시기의 결정

생산균의 최적 포자 생성 시기를 조사하기 위하여 spore forming medium에서 배양 후 120시간까지 배양하면서 12시간마다 총균수와 포자수를 조사하였다.

고체배양조건 설정

대두를 기질로 하여 고체 배양하면서 포자가 영양세포로 발아하는 시기와 최적온도를 알아보기 위하여 SFM배지에 배양한 배양액을 60°C에서 90분간 처리한 후 LB 한천배지에 접종하여 28, 33, 37, 41, 45°C에서 각각 배양한다. 배양 6시간째부터 plate상에 colony수를 3시간마다 계수하여 발아온도와 시간을 측정하였다. 발아조건을 결정된 다음, 이 조건에 따라 포자체를 접종하여 결정된 발아온도에서 발아 시킨 후 온도를 28, 33, 37, 41, 45°C로 각각 조정하여 배양하면서 발효 6시간째부터 fibrin plate method로 활성을 측정하여 최적 발효온도를 결정하였다.

발효대두의 영양학적 기초성분조사

일반 성분분석은 수분, 조단백질, 조지방, 회분, 탄수화물 등을 식품공전에 수록된 방법에 따라 분석하였다. 아미노산 분석을 위하여 시료 5.84 g을 50 ml의 cap tube에 넣고 6 N HCl용액 20 ml을 가하여 녹인 후 밀봉하여 110°C에서 24시간 가수분해 시켰다. 이를 50 ml의 원심관에 옮겨 2N NaOH용액 2 ml을 넣고 중화한 다음 5,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취하여 60°C의 수욕상에서 질소가스를 통과시키면서 농축하고 잔류물을 0.02N HCl 20 ml에 녹이고 이를 pore size 0.45 μm filter로 여과한 후 시료액으로 사용하였다. 정량은 아미노산 혼합 표준용액과 시료액을 각 20 ml씩 HPLC (Pharmacia Biotech model : Biochrom 20) 에 주입하여 분석하였다. HPLC의 조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Conditions of HPLC for the analysis of amino acids

HPLC	Pharmacia Biotech Model : Biochrom 20
UV-detector	220 nm
Mobil phase	0.2 M lithium buffer (pH 2.8)
Column	Ultracpac 8, Ø46×250 mm
Reation coil tem	135°C
Flow rate	20 ml/hr
Loading Volume	20 μl

결과 및 고찰

포자생성용 배지

포자의 생성조건을 검토하기 위하여 LB, NB, spore forming medium (SFM), nutrient yeast extract sporulation medium (NYSM) 등의 배지를 사용하여 *B. subtilis* BK-17 균주를 이식한 후 70시간 동안 배양하여 포자 생성능을 검토하였다. 그 결과 Fig. 1에서와 같이 4가지 배지 중 SFM과 NYSM에서 높은 Cell growth를 보였고 그 중 SFM가 포자생성에 있어서는 약 10배 이상 높은 것으로 나타났다. 이상의 결과로 포자생성을 위한 배지로는 spore forming medium (SFM)을 사용하기로 하였다.

일반적으로 LB나 NB배지에서 약 70시간 이상 배양을 하면 대부분의 포자생성세균의 경우 영양상태나 부산물의 축적 그리고 산소 부족, pH 변화 등으로 생육환경이 열악하여 포자를 생성한다. 그러나 본 연구에서는 가능한 많은 포자 생산을 목표로 하기 때문에 가장 효율성 높은 SFM배지의 포자 생성을 다른 배지에 비해 약 30%의 생산 증가를 보였으며 이 결과는 Yoshimoto, T의 결과[18]와 비슷하였다.

pH와 온도의 영향

상기의 배지를 사용하여 포자생성을 위한 최적배양 pH를 검토하였다. 배지를 pH2에서 pH12까지 조정하여 동일하게 접종 후 37°C에서 70시간 동안 배양 후 총균수와 포자생성을

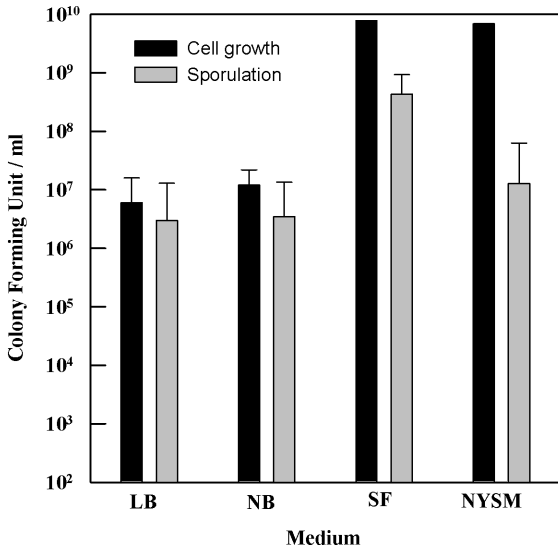


Fig. 1. Comparison of the growth and spore formation from *Bacillus subtilis* BK-17 in various medium. LB: 1% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl; NB: Nutrient Broth; SF: 0.8% nutrient broth, 0.05% yeast extract, 10⁻¹ M MgCl₂, 10⁻³ M FeCl₃, 10⁻⁴ M MnCl₂, 10⁻⁵ M, dipicollic acid, pH 6.5; NYSM: 0.8% nutrient broth, 0.05% yeast extract, 5×10⁻⁵ M MnCl₂, 7×10⁻⁴ CaCl₂, 10⁻³ M MgCl₂, pH 6.5.

을 검토한 결과 Fig. 2와 같이 pH 4.0 이하와 pH9.0 이상에서 생육에 큰 저해를 나타냄을 알 수 있었으나 pH 5.0에서7.0의 중성의 pH에서도 총균수와 포자생성에 큰 변화는 없었다. 그 중 총균수는 pH 7.0에서 가장 높았고 포자생성은 pH 6.0에서 가장 높게 나타났다. 따라서 포자생성시 pH를 6.0으로 결정하였다. 포자형성에 영향을 미치는 온도의 경우, 10°C에서 50°C까지 배양온도를 조정하여 70시간 동안 배양 후 총균수와 포자생성을 검토한 결과 총균수와 포자 생성을 모두 30°C가 최대임을 알 수 있었다. 포자 생성을 모두 30°C가 최적임을 알 수 있었다(data not shown). 이는 일반적인 *Bacillus* sp. 균 포자 생성조건과 크게 차이가 없는 것으로 사료된다.

포자 최대 생산 시기의 결정

B. subtilis BK-17의 배양 시 포자 수를 최대로 생산할 수 있는 배양시간을 조사하기 위하여 120시간까지 12시간별로 총균수와 포자 수를 조사하였다. 그 결과 Fig. 3와 같이 총균수

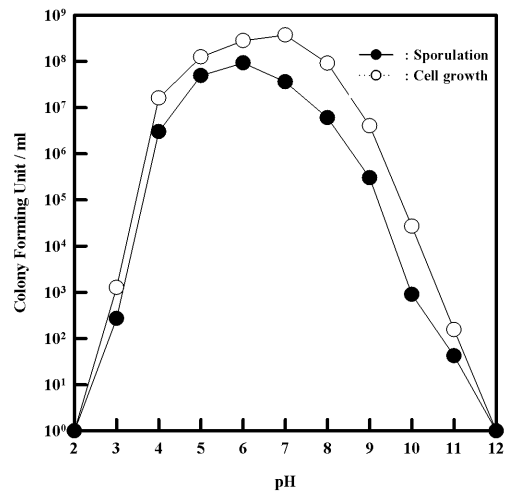


Fig. 2. The effect of pH on the growth and spore formation of *Bacillus subtilis* BK-17 in SF medium.

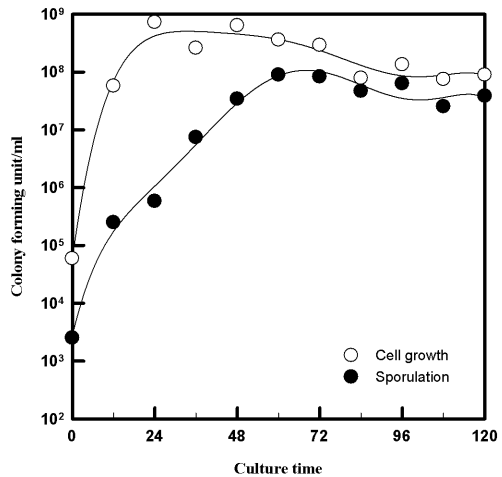


Fig. 3. Time course of the sporulation on *Bacillus subtilis* BK-17.

는 24시간부터 48시간 사이가 가장 높게 나타났으며 포자 수는 60시간에서 가장 높게 나타났다. 따라서 *B. subtilis* BK-17의 포자생성에 필요한 배양을 위해서는 pH 6.0, 30°C에서 60시간 등의 배양조건이 요구된다. 이러한 결과는 일반 배지에서 포자생성이 70-72시간에서 최대로 나타나는 것보다 SFM 배지조건하에서 훨씬 포자생성시간이 빠른 시간에 최대 생산에 달하는 것을 알 수 있다.

각종 곡물기질에 대한 고체배양과 혈전용해효소 생산

각각의 기질(전분질 기질은 밀, 쌀, 옥수수, 식물단백질 기질은 강낭콩, 검은콩, 대두, 팥, 녹두)을 사용하여 포자 접종 후 고체배양을 실시 하였다. 배양은 37°C에서 1-3일간 효소활성을 매일 측정하면서 배양한 결과 Fig. 4에서 보이는 바와 같이 대두, 검은콩, 강낭콩, 녹두, 옥수수의 순으로 혈전용해활성이 높게 나왔다. 곡류 중 탄수화물인 옥수수는 녹두와 거의 같은 수준의 혈전용해활성을 보이는 반면 보리, 밀은 낮은 수준이었다. 콩류 중에도 팥은 제일 낮은 효소활성을 보였다. 이 결과는 혈전용해효소 생산 균주를 곡류에 고체배양으로 응용하여 직접 기능성 식품화 할 목적이므로 대두를 이용한 혈행개선용 기능성 식품개발을 가능하게 할 것으로 사료된다. 특히 Sumi등이 보고한 경구투여에 의한 혈행개선물질의 효과 [15]를 참조할 때 상기 결과를 이용하여 고체배양에 의한 혈행개선제 개발이 기대된다.

대두고체배양조건

대두 고체배지에 포자를 이식한 후 포자발아를 위하여 41°C에서 15시간 동안 접종한 다음 본 발효의 온도를 각각 28, 33, 37, 41, 45°C로 조절하여 시간 별로 혈전용해효소의 활성을 점검하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보이는 바와 같이 배양 온도는 37°C와 41°C에서 효소활성에 큰 차이를 보이지 않았으

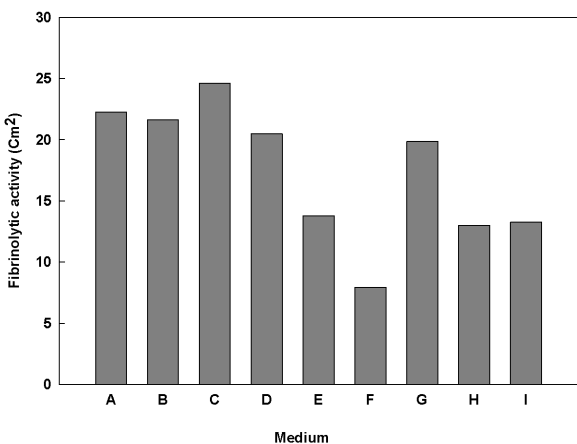


Fig. 4. Production of BK-17 by *Bacillus subtilis* BK-17 on various medium. A: Kidney bean, B: Black soybean, C: Mungbean, D: Soybean, E: Barley, F: Sorghum, G: Corn, H: Small red bean, I: Wheat

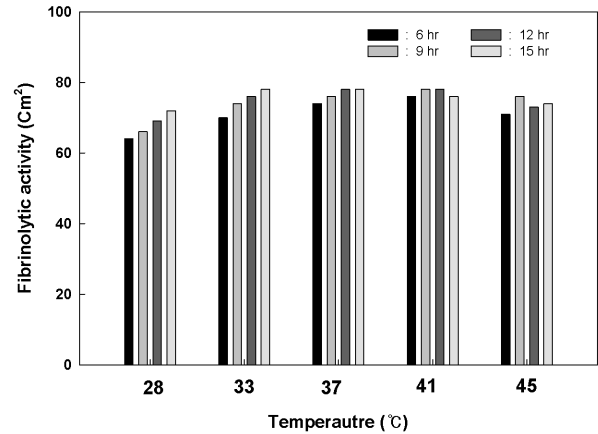


Fig. 5. Optimum fermentation temperature for *Bacillus subtilis* BK-17.

며, 발효시간은 37°C에서 긴 시간을 요구했으나 팔목할 만한 큰 차이를 보이지 않았다. 일반적인 포자 생성균의 경우 포자 발아온도가 배양온도보다 약간 높아 세균의 경우 41°C에서 포자 발아가 양호하나 본 실험에서는 발아온도와 배양온도에서 유의적인 차이가 없는 것이 특징이라 할 수 있다.

발효 대두의 식품영양학적 평가

B. subtilis BK-17로써 발효한 대두를 기능성 식품으로 개발할 수 있는지의 가능성을 타진하기 위하여 식품 및 영양학적 기초조사를 실시하였다. Fig. 6에서와 같이 고체 배양한 대두를 발효하지 않은 대두와 기초성분을 분석 비교한 결과 발효 콩의 단백질과 지방에서 약 20% 정도 성분증가 결과를 보였다. 또한 아미노산 분석 결과를 Fig. 7에서 보면 필수 아미노산이 약 40% 증가하였고 일반 아미노산도 약 30%의 증가를 보였다. 특히, 발효대두에서 단백질의 증가가 두드러지게 나타난 것은 생산균에 의한 효소 생성량이 증가한 결과로 사료되며, 아미노산 분석결과 필수아미노산의 증가폭이 높은 것은 기능

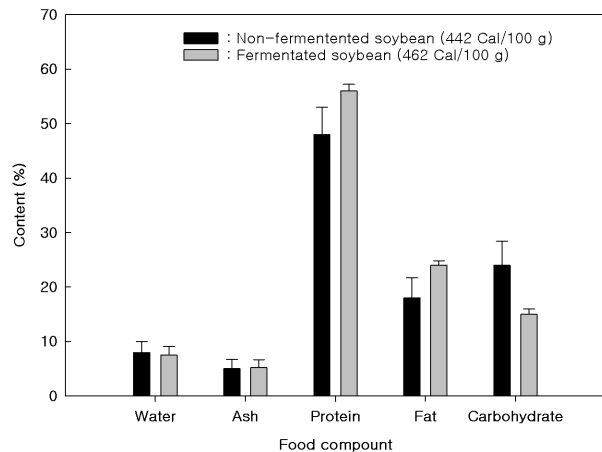


Fig. 6. Analysis of food compound of fermented and non-fermented soybean with *Bacillus subtilis* BK-17.

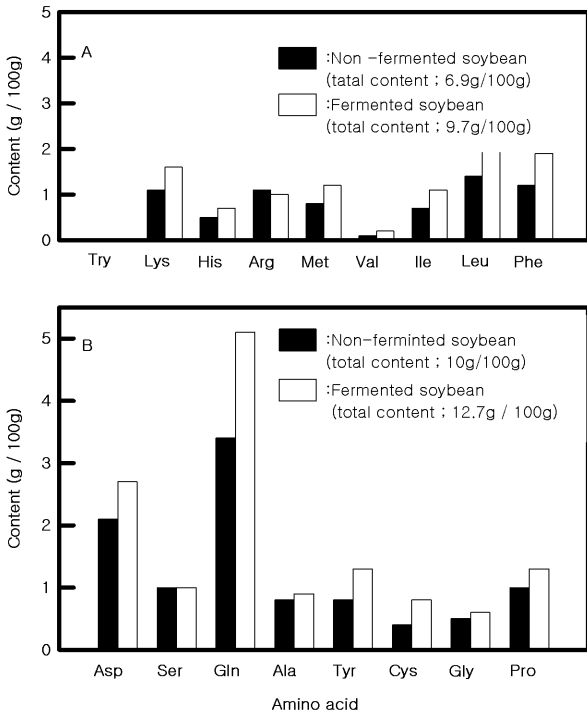


Fig. 7. Analysis of amino acid of fermented and non-fermented soybean. A: Essential amino acid, B: Non-essential amino acid

성 식품으로서 가치를 높이는 결과라 사료된다.

감사의 글

본 논문은 동아대학교 연구비 지원에 의하여 수행하였습니다.

요 약

곡물을 소재로 혈행개선에 효과 있는 물질을 개발하기 위하여 *Bacillus subtilis* BK-17을 이용하여 고체 배양을 시도하였다. 고체배양에 집중하는 미생물은 영양세포보다 포자 집중이 혈전용해효소 생산에 효과적이었다. 포자 생산을 위한 배지는 SFM (0.8% nutrient broth, 0.05% yeast extract, 10^{-1} M $MgCl_2$, 10^{-3} M $FeCl_3$, 10^{-4} M $MnCl_2$, 10^{-5} M dipicolic acid, pH 6.5)이 최적이었으며, 포자 생성에 대한 최적 pH 와 온도는 각각 pH 6과 30°C 였으며 포자는 배양 후 60 시간에서 가장 많은 생산을 보였다.

각종 곡물을 기질로 하였을 때 녹두가 혈전용해능이 가장 높았으며 강낭콩, 검정콩, 대두, 옥수수 녹두의 약 90% 수준의 활성으로 높은 혈전용해능을 보였다. 반면에 보리와 밀과 같은 탄수화물 곡물은 낮은 활성을 보였다. 고체 배양한 발효 대두는 단백질과 지질 함량에 있어 발효하지 않은 대두보다 약 10% 이상의 높은 수치를 보였다. 또한 필수 아미노산과 일반 아미노산의 함량 역시 발효 대두 쪽이 약 5 - 20% 높은

것으로 보아 혈행개선기능성 뿐만 아니라 식품으로 실용 가능성이 높은 것으로 사료된다.

References

1. Arai, K., J. Mimuro, S. Madoiwa, M. Matsuda, T. Sako, and Y. Sakata. 1995. Effect of staphylokinase concentration of plasminogen activation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1245**, 69-75.
2. Chevant, T. C., F. Besson, and G. Michel. 1986. Effect of various growth on conditions of spore formation and bacillomycin L production in *Bacillus subtilis*. *Can. J. Microbiol.* **32**, 254-258.
3. Jain, S. C., U. Shinde, Y. Li, M. Inouye, and H. M. Berman. 1998. The crystal structure of an autoprocessed Ser 221 Cys-subtilisin. E-propeptide complex at 2.0-A resolution. *J. Mol. Biol.* **284**, 137-144.
4. Jang, J. S., D. O. Kang, M. J. Chun, and S. M. Byun. 1992. Molecular cloning of a subtilisin J gene from *Bacillus stearothermophilus* and its expression in *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 277-282.
5. Jeong, Y. K., J. Park, H. Baek, S. H. Park, I. S. Kong, D. W. Kim, and W. H. Joo. 2001. Purification and biochemical characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* BK-17. *World. J. Microb. Biot.* **17**, 89-92.
6. Jeong, Y. K., W. S. Yang, K. K. Kim, K. T. Chung, W. H. Joo, J. H. Kim, D. E. Kim, and J. W. Park. 2004. Purification of a fibrinolytic enzyme (myulchikinase) from pickle anchovy and its cytotoxicity to the tumor celllines. *Biotechnol. Lett.* **26**, 393-397.
7. Jeong, Y. K., W. S. Yang, J. U. Kang, I. S. Kang, and J. O. Kim. Fibrinolysis of Fermented Kimchi. 1995. *J. Life Sci.* **5**, 203-210.
8. Kim, H. K., G. T. Kim, D. K. Kim, W. A. Choi, S. H. Park, Y. K. Jeong, and I. S. Kong. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermented fsh. 1997. *J. Ferment. Bioeng.* **84**, 307-312.
9. Lee, J. W., S. Y. Park, W. A. Chol, K. H. Lee, Y. K. Jeong, I. S. Kong, and S. H. Park. 1999. Production of a Fibrinolytic enzyme in bioreactor culture by *Bacillus subtilis* BK-17. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 443-449.
10. Lijnen, H. R., B. van Hoef, F. de Cock, K. Okada, S. Ueshima, O. Ma6tsuo, and D. Collen. On the mechanism of Fibrin-specific plasminogen activation by staphylokinase. 1999. *J. Biol. Chem.* **274**, 826-832.
11. Medved, L. V., D. A. Solovjov, and K. C. Ingham. Domain structure, stability and interactions in streptokinase. 1966. *Eur. J. Biochem.* **239**, 333-339.
12. Nakamura, T., Y. Yamagata, and E. Ichishima. 1992. Nucleotide sequence of the subtilisin NAT gene, aprN of *Bacillus subtilis* (natto). *Biosci. Biotech. Bionch.* **56**, 1869-1871.
13. Pennica, D., W. E. Holmes, W. J. Kohr, R. N. Harkins, G. A. Vehar, C. A. Ward, W. F. Bennett, E. Yelverton, P. H. Seeburg, H. L. Heyne-ker, D. V. Goeddel, and D. Collen. 1983. Cloning and expression of human tissue-type plasmi-

- nogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* **301**, 214-221.
14. Sasaki, K., S. Moriyama, Y. Tanaka, H. Sumi, N. Toki, and K. C. Robbins. 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**, 69-75.
 15. Sumi, H., H. Hanada, K. Nakamishi, and H. Hiratani. 1990. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol.* **84**. 139-143.
 16. Sumi, H., M. Maruyama, T. Yoneta, and H. Mihara. 1983. Activation of plasma fibrinolysis after intrarectal administration of high molecular weight urokinase and its derivative. *Acta Haematol.* **70**, 289-295.
 17. Toki, N., H. Sumi, K. Sasaki, I. Boreisha, and K. C. Robbins. 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.
 18. Yoshimoto, T., H. Oyama, T. Honda, H. Tone, T. Takeshita, T. Kamiyama, and D. Tsuru. 1988. Cloning and expression of subtilisin amylosacchariticus gene. *J. Biochem.* **103**, 1060-1065.