

***Bacillus subtilis Natto*가 생산하는 Nattokinase의 항혈전 및 피브린 용해능 효능평가**

이다령, 홍성유, 장양수, 장형욱¹, 맹창재¹, 유철배¹, 백대현^{1*}

The Evaluation of Antithrombotic and Fibrinolytic Activities of Nattokinase from *Bacillus subtilis Natto*

Da-Lyung Lee, Sung-Yu Hong, Yang-Su Jang, Hyung-Wook Jang¹, Chang-Jae Maeng¹, Chul-Bae Yoo¹, and Dae-Heoun Baek^{1*}

접수: 2012년 ●월 ●일 / 게재승인: 2012년 ●월 ●일

© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: We previously reported that Ultra nattokinase® showed high fibrinolytic activity and revealed antithrombotic effect in rat blood plasma based on its ability to suppress collagen-induced platelet aggregation. This research was carried out to verify the clot lysing activity and blood flow enhancing effects of Ultra nattokinase® via monitoring and comparing the antithrombotic effects in rat artery between oral administration of Ultra nattokinase® and maltodextrin. SD rats were fed with 1.11 mg/kg of Ultra nattokinase® for 4 weeks. The effect on arterial thrombosis was then evaluated using an antithrombotic model after induction by FeCl₃. Detected fibrinolytic activity was proportional to the content of Ultra nattokinase® and statistical extents of the antithrombotic activity was enhanced strongly twice rather than control group. The PT and the aPTT, however, showed only a small difference between two groups. The results suggest that Ultra nattokinase® can effectively treat thromboembolism and enhance blood flow, and that Ultra nattokinase® can also prevent venous occlusion by aiding clot lysis.

연세대학교 의과대학 심혈관제품 유효성평가센터
Cardiovascular product evaluation center Yeonsei university college of medicine, 50 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea

¹케이피엑스바이오텍(주)

¹KPX Bio-Tech Co., LTD., 74-12, Keumhoseonmalgil, Bugang-Myeon, Sejong Special Self-Governing City, 363-942, Korea
Tel: +82-44-277-5551, Fax: +82-44-277-5554
e-mail: dhbaek@kpxbiotech.com

Keywords: *Bacillus subtilis Natto*, Ultra nattokinase®, Antithrombotic effect, Fibrinolytic effect, Platelet aggregation

1. 서론

최근 도시화 및 산업화와 더불어 인구의 노령화에 따른 성인 병의 증가와 식생활의 서구화에 따른 순환기계 질환에 의한 급격한 사망률의 증가가 사회적인 심각성으로 대두되고 있으며, 만성적인 질병으로 고착화 되고 있는 추세에 있어 치료 및 예방을 위한 의약품의 개발과 더불어 비교적 인체 친화성과 안전성 및 효능이 뚜렷한 기능성 식품의 개발에 대한 관심이 고조되고 있다. 최근 일본의 Natto, 발효우유, 한국의 김치, 청국장이나 식용 표고버섯 등 아시아의 전통 음식에서 항응고 및 혈전 용해에 도움이 되는 효소들이 많이 발견되고 있으며 [1], 이러한 기능성 식품에서 추출 가능한 효소는 제조가 간편하고 효율적인 대량생산이 가능하며 장기간의 섭취에도 부작용이 없는 특징으로 인해 만성적인 순환기계 질환 특히 혈전성 질환의 효과적인 예방에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다 [2].

Natto (낫토)는 일본의 전통 음식으로 콩을 발효 시켜 만든 식품으로 심장 및 혈관 질환 예방에 유익한 작용을 하는 것으로 알려지고 있으며, 현재 blood thinner (피를 끓게 하는 작용) 및 혈액 응고 완화 기능이 있는 식품 (Alternative medicine)으로 널리 사용되고 있다 [3,4]. Nattokinase는 natto (낫토)에서 분리된 *Bacillus subtilis* Natto 균이 생산하는 세포외 분비성 효소이며, 이들 균은 대두발효산물에서 추출

및 정제되고 있다 [5,6].

혈전이 생성 되었거나 정상적인 혈관보다 수축된 혈관의 경우 혈류의 흐름이 정상혈류 속도보다 늦어지며, 이 혈류 속도의 변화로 인하여 혈소판 활성화가 증폭되고 혈관 내피 손상이 진행되어 심혈관이 정상적인 기능을 하지 못하게 되는 것으로 확인되고 있다. 이런 혈관의 혈류 이상은 동맥경화, 심근경색, 심뇌혈질환 및 뇌혈관 질환과 같은 혈관계 질환 발병의 원인이 되는 것으로 알려져 있다 [5-8]. 현재까지 혈전 용해제로는 tPA (tissue plasminogen activator)나 urokinase를 혈관에 직접 주입하고 있으며, 이런 혈전 용해제를 사용 시 혈전으로 막힌 혈관이 자극되어 인체의 항상성 기전에 의한 섬유소 용해 작용을 강화 시켜 출혈이나 재관류 부작용을 야기 시킬 수도 있다.

Nattokinase의 “혈행개선 및 혈액응고 억제”에 대한 효능 연구가 일본 및 여러 나라 등지에서 진행 되고 있다. Nattokinase의 항혈전 (섬유소용해) 작용의 기전으로는 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)의 불활성화 및 억제 등이 제시되고 있으며, plasmin과 같이 직접 섬유소 응괴 (fibrin clots)에 작용하여 용해를 야기하는 기전이 함께 존재하는 것으로 보고되고 있다 [9,10].

Natto는 *in vitro*상에서 fibrin을 억제하는 효과가 urokinase나 plasmin 보다 뛰어나다고 알려져 있으며 [1], Nattokinase는 pro-urokinase라는 혈전 용해 효소의 전단계물질 활성화 능력을 가지고 있다. 임상 실험 결과 nattokinase 섭취에 의해 혈소판과 백혈구의 흡착 감소, 혈압 감소, 혈액 유동성 감소, tPA 증가, EFA (euglobulin fibrinolytic activity: 혈전 분해 활성) 상승, FDP (Fibrinogen degradation product: 혈전분해산물) 증가 등의 혈행개선 효과가 나타난다 [5,7,8]. 일본, 미국에서는 nattokinase를 건강기능식품으로 섭취를 하고 있으나, 현재 우리나라에서는 이들 나라에 비해 섭취량이 많지 않은 편이다.

Ultra nattokinase[®]는 *Bacillus subtilis* Natto 균의 대두발효 배양액을 농축·정제하여 만들어진 효소 복합물로서 [11], 1일 권장 섭취량은 44.0~66.7 mg/day (파브린 용해활성으로 1,200 FU)로 확인되었다 (한국기능식품연구원, 연구번호 10-011, 2010년). 본 연구에서는 Ultra nattokinase[®]을 1일 60 kg 성인 최대 섭취용량인 66.7 mg 기준으로 4주간 경구 투여에 의한 동물 모델 적용에 의해 혈행개선 효능 관찰 연구를 진행 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 발효 및 제품 제조

Ultra nattokinase[®]는 *Bacillus subtilis* Natto 균주를 이용하였으며 2% dextrin, 2% soybean meal, 0.5% yeast extract, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.02% CaCl₂, 0.2% K₂HPO₄, 0.02% Na₂HPO₄를 함유하는 배지 조성으로 pH 7.0로 조정 후 37°C에서 10시간 동안 발효 배양하였다. 실험에 사용할 제품은 Ultra nattokinase[®] 제조 공정에 준해 여과·농축한 동결 건조물을 이용하였으며 nattokinase는 Anson법 [12]을 이용하여

효소 역사를 측정하였으며 혈전 용해 활성이 20,000 FU/g인 Ultra nattokinase[®](KPX Bio-Tech Co., LTD)를 제조하였다.

2.2. 동물 및 사료식이

실험에 이용된 Sprague Dawley (SD) rat은 5주령의 수컷 42 (입수시)/40수 (투여시)로 하였으며 체중은 176±6 g의 선별군으로 진행하였다. 검역과 순회는 일주일간 매일 1회 일반증상 관찰을 실시하였으며, 반입 및 검역과 순회기간 종료 시 체중을 측정하여 시험 실시에 적합한 건강한 동물을 선발하였다.

Table 1. Dosage and selection of test animals

Group	Dosage (mg/kg)	No
Maltodextrin (control)	0.74	16
Ultra nattokinase [®] (sample)	1.11	16

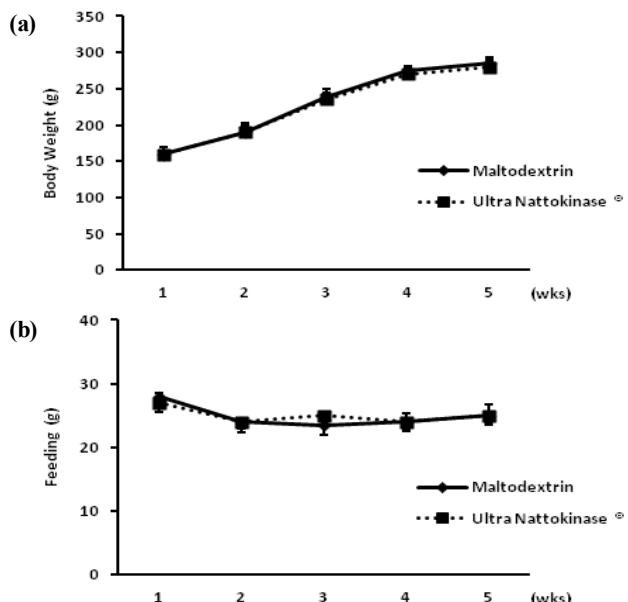


Fig. 1. The body weight increased similarly between the two groups with the accumulated feeding amounts. The feeding rate showed same pattern between the maltodextrin (control) and Ultra nattokinase[®] (sample) group during the 4 weeks of oral administration.

Control group에는 maltodextrin 0.74 mg/kg (*n* = 16), nattokinase group은 Ultra nattokinase[®] 1.11 mg/kg (*n* = 16)을 4주 동안 식이 하였다 (Table 1). 시험 물질의 제조는 시료를 1차 멸균 증류수에 용해하여 Sonde를 이용하여 6일/주를 투여하였고 총 4주간 24일을 경구 투여 하였다. 동물 사육 환경은 온도는 22~24°C, 명암주기는 12시간 Light/12 h dark로 하였으며, 조도는 150~300 lux, 습도는 30~50%, 환기 횟수는 10~15회/시간으로 하였고 사육상자와 밀도는 폴리실론 사육상자 (260 W × 350 L × 210 H, mm)에 3마리의 평가 동물을 사육하였다 (Fig. 1). 사료는 실험동물 고형사료는 Harlan Laboratory Inc. (Indianapolis, Indiana, USA)의 18% 단백질 조성의 사료를 공급하였으며 음수는 0.1 um 필터와 유수살균기를 이용하여 여과 및 살균된 정제수를

고압증기 멸균한 후 급수하였다. 급수는 정제멸균수를 자유 섭취 하였다.

시험군 분리 및 잔여 동물의 처리는 검역, 순환 기간 종료 시 체중 증가량에 이상이 없는 개체를 선별하였으며, 체중을 맞춘 후 군 분리 하였으며, 군 평균 및 표준편차를 계산하여 군간 균등하게 동물을 배치하였다. 평가 진행 전 잔여 동물 2마리는 CO₂를 이용하여 안락사 하였다. 실험군의 마취는 Zoletil® (Virbac, France) 30 mg/kg, Rompun® (바이엘 코리아, 한국) 10 mg/kg로 혼합하여 ip (intraperitoneal) injection 하였다.

2.3. Arterial thrombosis model

Ultra nattokinase®의 경구 투여에 의한 혈행개선 효능 확인은 FeCl₃을 이용한 carotid arterial thrombosis model을 유도하였다 [13,14]. 섭취 전후의 효능 확인은 대조군에 대한 시료물질 투여군간의 혈관 폐색 차이로 검증하였다.

Rat의 목 부분을 소독 후 절개하여 경동맥 부위까지 노출시켰으며 경동맥 옆에 있는 신경을 손상이 가지 않도록 분리하였다. 혈류량을 확인하기 위하여, 혈류측정 probe (Transonic Flowprobe®, Transonic systems Inc., Ithaca, NY, USA)를 노출된 경동맥 중간 부위에 위치하여, 10분간 Flowmeter (TS420, Transonic systems Inc., Ithaca, NY, USA)를 이용하여 측정하였다. 혈류량이 일정하게 흐르는 것을 확인 후, 1 mm × 1 mm whatman paper (Whatman 4, GE, UK)에 70% FeCl₃ (Iron (III) chloride hexahydrate, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 처리하여 5분간 경동맥에 올려놓아 혈전이 생기도록 혈관을 손상시켰다. 5분 동안 경동맥에 손상을 준 후, whatman paper를 제거하였으며, 손상 후 probe를 혈관에 재위치 하여, 혈류를 측정하였다 [13,14].

2.4. Platelet aggregation assay

Rat에서 채혈한 전혈은 BD Vacutainer® (9NC Plus Blood Collection Tube (Citrate tube) BD, Franklin Lakes, NJ, USA)에 담아서 혈액이 굳지 않게 tube를 10분 동안 훈들어 주었다. Plasma을 얻기 위하여 1,000 rpm으로 15분 동안 원심 분리하여 platelet rich plasma (PRP) 부분만 분리하였고 잔여 전혈 부분은 3,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 platelet poor plasma (PPP)를 분리해 내었다. PPP 1.0 mL을 1.5 mL tube로 옮긴 후 12,000 rpm에서 3분 동안 원심분리하여 PRP와 PPP로 분리시킨다. PPP만 회수하여 1.5 mL tube에 옮기고 Aggregometer (Whole blood aggregometer, Chrono-log, Havertown, PA, USA)를 이용하여 platelet aggregation assay를 진행 하였다. PPP는 platelet aggregation assay의 negative control로 사용하였다. PRP는 test sample로 ADP (Chrono-log, Havertown, PA, USA) 10 uL를 넣어서 platelet aggregation 정도를 확인하였다.

2.5. Blood coagulation assay

Rat의 전혈에서 plasma를 분리 후 sample cup에 1.0 mL의 plasma를 분주하였다. ACL 기기 (ACL-100, Instrumentation

Laboratory, Spain)를 사용하여, normal control plasma와 PT, aPTT reagent (Instrumentation Laboratory, Spain)를 이용하여 control clotting time을 측정 하였다. Sample plasma와 PT 또는 aPTT reagent를 반응시켜 PT (prothrombin time)와 aPTT (activated partial thromboplastin time) clotting time을 측정 하였다.

2.6. Fibrinolytic activity assay

Nattokinase의 fibrin 분해 활성을 확인하기 위한 *in vitro* 실험은 Jang 등 [15]과 Astrup 등 [16]의 방법을 변형하여 확인하였다. 100 mm dish에 50 unit/mL의 thrombin (Hyphen biomed, Neuville sur-oise, France)을 200 uL 떨어트린 후, 0.5% fibrinogen solution (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 10 mL 분주 하였다. Thrombin과 fibrinogen solution이 섞이게 훈들어 준 후 plate를 30분간 실온에 1시간 방치 후 plate가 굳어 fibrin plate가 만들어진 것을 확인하고 tPA (Actylase®, Boeringer Ingelheim Pharma GmbH & Co, Germany), Ultra nattokinase®를 농도별로 20 uL를 plate에 떨어트려 37°C에 4시간 정치시킨 후 plate에서의 fibrin의 용해능을 확인 하였다.

2.7. 통계분석

이 결과는 대조군인 maltodextrin 섭취군과 시험군인 Ultra nattokinase® 섭취군 간의 평균과 표준편차를 산출하여 비교하였다. 통계학적 방법은 일원배치 분산분석 (One-way ANOVA test)을 통하여 군간 유의성을 확인하였으며 결과는 mean ± SD (standard deviation)으로 표시 하였다. 유의성의 인정은 *p* < 0.05인 경우로 하였으며, 통계를 위한 전산 프로그램은 SPSS18을 이용하였다.

2.8. 동물실험윤리규정의 준수

본 연구는 동물 보호법 (제정 1991년 5월 31일 법률 제 4379호, 일부 개정 2008년 2월 29일 법률 제 8852호)에 근거한 우정 BSC 사의 동물윤리위원회에 승인되었다 (동물 실험 승인번호: WJIACUC20120405-1-07).

3. 결과 및 고찰

3.1. Arterial Thrombosis model assay

Ultra nattokinase®가 생체내 혈전 생성을 억제하는지 확인하기 위하여 arterial thrombosis model을 제작하여 혈관의 폐색 시간을 측정 하였다. 혈관이 폐색되는 시간을 측정한 결과, maltodextrin을 식이한 control group의 경우 평균 630 ± 243 sec, Ultra nattokinase®을 식이한 group의 경우 1244 ± 808 sec으로 나왔다. Control group과 비교하였을 때 Ultra nattokinase®를 섭취한 group에서 대동맥의 혈관 폐색되는 시간이 대략 2배 정도 늘어났다. 이는 Ultra nattokinase® 섭취가 혈전 형성 억제에 도움을 주는 것으로 의미된다 (Fig. 2).

기존에 인체 및 설치류를 대상으로 한 nattokinase 혈행개

선 연구에서, nattokinase 경구섭취시 혈압이 저해됨을 확인되었다 [5,7,18-20]. 또한 설치류를 대상으로 한 *in vivo*, *in vitro* 동물모델작용의 결과 중국의 전통 대두발효식품인 Douchi에서 분리된 *Bacillus subtilis*가 생산하는 섬유소 분해 효소에 의해 농도 의존적으로 bleeding time이 최대 1.3배 지연되었고 응고 시간은 1.5배 지연되는 결과를 나타내었다 [20].

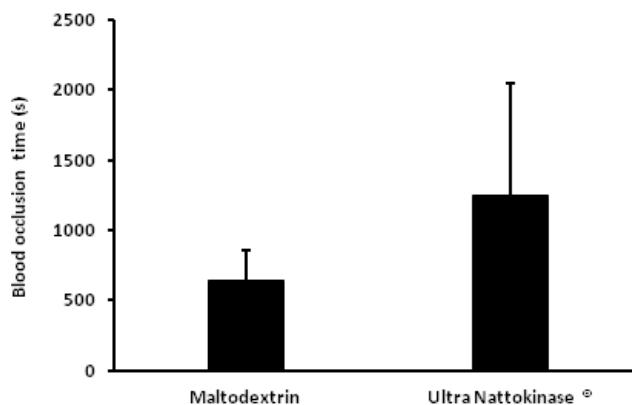


Fig. 2. Arterial thrombosis model was induced using a topically applied filter paper soaked in 70% FeCl₃ for 5 min. Thrombotic occlusion time was presented as the mean \pm SD and any difference was determined by one-way ANOVA ($p < 0.05$). Mean blood occlusion time for sample group (Ultra nattokinase[®]) was inhibited two times more strongly than in the control group.

3.2. Platelet aggregation assay

Ultra nattokinase[®]의 혈전억제 기작을 확인하기 위해 platelet aggregation assay를 하였다. Platelet은 agonist인 thrombin, ADP, collagen 등에 의하여 자극을 받으면 활성화되어 응집 반응이 일어나는데, control group과 Ultra nattokinase[®]를 4주간 섭취한 rat의 platelet aggregation 정도를 확인한 결과, control은 $46 \pm 5\%$, Ultra nattokinase[®]은 $48 \pm 3\%$ 의 결과를 나타냈다. 이 결과는 Ultra nattokinase[®]를 섭취한 group과 control group간의 aggregation 차이를 볼 수 없었으며, 이는 Ultra nattokinase[®]가 platelet에 영향을 주어 혈전 생성 억제에 영향을 미치는 것이 아님을 의미한다 (Fig. 3).

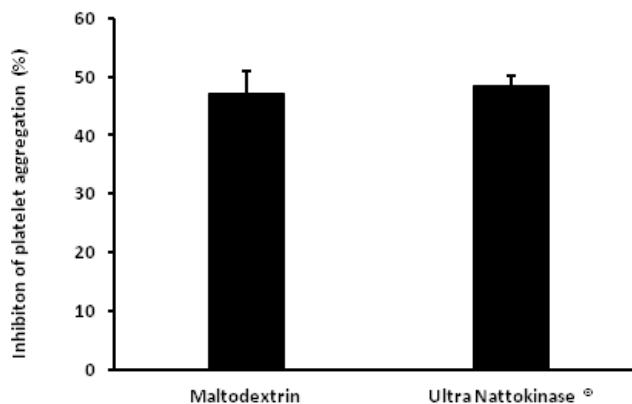


Fig. 3. Inhibition rate of platelet aggregation in rat plasma was similar between the control and sample group, although some small differences were detected.

3.3. Blood coagulation assay

Ultra nattokinase[®]가 blood coagulation cascade에 미치는 영향을 확인하기 위해서 PT, aPPT를 측정하였다. 먼저 응고 인자 Factor V, VII, X에 영향을 받는 extrinsic pathway를 확인하기 위하여 PT를 측정 하였다. 측정 결과 control은 17 ± 0.5 sec, Ultra nattokinase[®]은 17 ± 0.3 sec으로 나왔다. Group 간의 PT의 변화는 크게 나지 않았다. Factor II, V, VIII, IX, X, XI, XII이 관여하는 intrinsic pathway에 영향을 주는지 확인하기 위하여 aPPT를 확인한 결과 control 36 ± 5.2 sec, Ultra nattokinase[®] 37 ± 7.3 sec으로 두 group 간에 차이가 나지 않았다 (Fig. 4). 이는 본 실험에서 사용한 섭취 농도에서 Ultra nattokinase[®]가 blood coagulation cascade에 영향을 미치지 않음을 나타낸다.

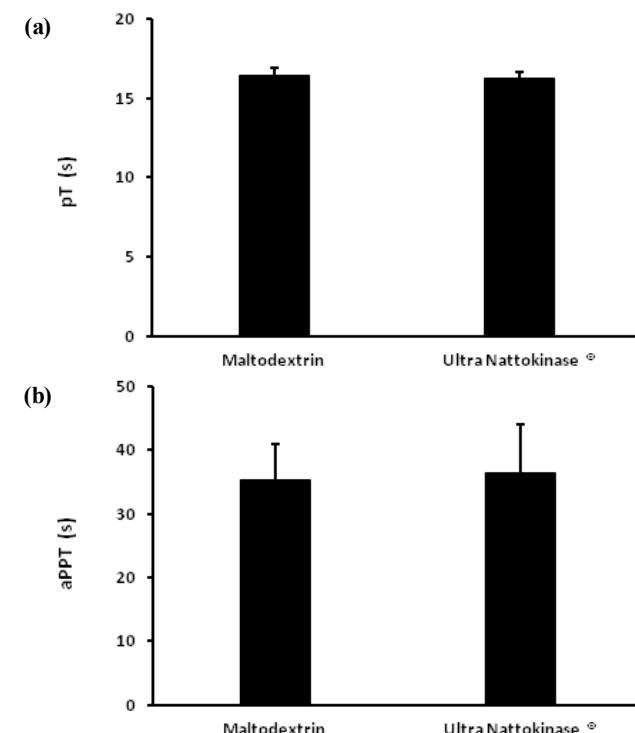


Fig. 4. Variation of prothrombin time (PT) and activated partial prothrombin time (aPPT) value of the maltodextrin and Ultra nattokinase[®] group. The PT values ($n = 8$, mean \pm SD) for maltodextrin group was 16.59 ± 0.54 sec, Ultra nattokinase[®] group was 16.48 ± 0.33 sec (a). The aPPT values ($n = 8$, mean \pm SD) for maltodextrin group was 36.14 ± 5.2 sec, Ultra nattokinase[®] group was 37.13 ± 7.27 sec (b).

3.4. Fibrinolytic activity

혈전용해제로 잘 알려져 있는 tPA는 plasminogen을 plasmin으로 activation 시켜 fibrin을 가수분해하여 fibrin clot을 녹이는 약물로 알려져 있다. Ultra nattokinase[®]가 tPA처럼 fibrin을 lysis시키는지 확인하기 위하여, tPA 2 unit/mL 와 성인 평균 섭취 기준 66.7 mg/day를 기준으로 Ultra nattokinase[®]를 0.5 % fibrin plate에 처리하여 fibrinolytic activity를 확인하였다. 그 결과, tPA와 Ultra nattokinase[®]는 fibrinolytic activity 반응을 보였다 (Fig. 5).

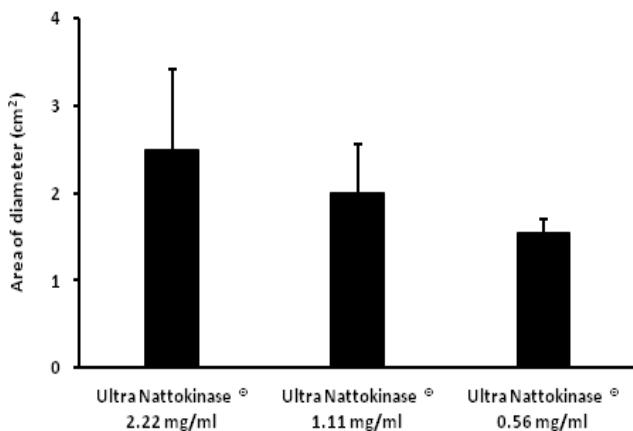


Fig. 5. Detection of the fibrinolytic activity of Ultra nattokinase[®] on plate containing 0.5% fibrin. Size of the clear zone produced by the fibrinolytic enzyme was proportional to the concentration of nattokinase after incubation for 4 hr at 37°C.

Fibrin은 불용성 단백질로 혈전 형성의 인자 [21]이며 혈관 내에 축적될 경우 혈액의 흐름을 방해한다. Fibrin에 대한 nattokinase의 작용 기작에 대한 생리 기작에 대한 연구에 의하면 nattokinase는 fibrin을 직접적으로 분해하거나, 혈관 기저세포에서 유래되는 urokinase에 의한 plasminogen 활성화를 통한 plasmin 유도 및 tPA 활성화를 통한 fibrin 분해 활성을 도와 [22] 혈전을 용해하여 혈행개선을 유도하는 것으로 알려져 있다. 위 실험 결과에 의하면 Ultra nattokinase[®]가 fibrin을 직접적으로 분해하는 것으로 확인되었으며, 이는 Ultra nattokinase[®]가 fibrin을 분해하여 혈행을 개선시키는 것을 의미한다.

4. 결론

Ultra nattokinase[®]가 혈행개선효능이 있는지 확인하기 위해 Ultra nattokinase[®]를 성인 섭취량 기준 (66.7 mg/day)에 맞춰 rat에 4주간 섭취 시킨 후 arterial thrombosis model, platelet aggregation assay, blood coagulation assay 및 fibrinolytic activity test를 하였다. 그 결과 Ultra nattokinase[®]가 혈관폐색 시간을 대략 2배 정도 증가 시킨 반면, platelet aggregation 및 aPPT, PT에는 영향을 미치지 않았다. 또한 fibrin plate에 처리하였을 때 Ultra nattokinase[®]를 처리한 경우 fibrin을 lysis 시켰는데 이는 Ultra nattokinase[®]가 혈전 생성 예방 또는 혈행개선에 효능이 있음을 의미 한다. Ultra nattokinase[®]가 platelet aggregation 및 aPPT, PT에 영향을 미치지 않을 것을 보아 Ultra nattokinase[®]가 platelet 응고 과정 및 blood coagulation cascade에는 관여 하지 않고, fibrin을 직접적으로 용해시켜 혈행개선 효과를 나타내는 것으로 판단된다. 이 결과를 통하여 Ultra nattokinase[®]는 항 혈전 효과와 피브린 용해 효과를 가지고 있는 것으로 확인되었으며, Ultra nattokinase[®]를 섭취할 경우 fibrin clot에 의한 혈관 폐쇄가 진행 되는 것을 예방 하거나, 또는 완전한 혈관 폐쇄 진행이 되는 것을 지연 시켜 줄 것으로 예상 된다.

인체에 적용하여 혈행개선을 위한 식품 보조제 및 의약품 원료로서 가능성을 확인 한 nattokinase는 식품으로 섭취된 장점이 있고, 저렴한 제조 공정과 상품화의 용이성을 가지고 있으며, 혈전용해제 의약품인 tPA나 urokinase의 부작용인 출혈이나 재관류 같은 부작용에 대한 보고가 없어 그 효용성과 안전성이 부각되고 있으므로 식품 및 의약품으로의 적용 가능성이 높은 것으로 예상 된다.

이상의 결과를 바탕으로 Ultra nattokinase[®]는 의약품으로 사용되고 있는 tPA나 urokinase와 같이 혈관의 기저세포의 손상으로 인한 염증 유발 등에 대한 부작용에 대한 보고가 없고, 오랫동안 식품으로 섭취되어 왔던 장점과 생체친화적인 특성 및 전통적인 방법에 의한 손쉽고 저렴한 제조 공정에 의한 상품화의 용이성으로 인해 더욱 그 효용성과 안전성이 부각되고 있어 [4,23] 식품 및 의약품으로의 적용 가능성이 더욱 확대 될 것으로 판단되며 Ultra nattokinase[®]가 혈전 생성 예방이나 억제 및 제거를 위한 건강보조식품으로 활용 가능성이 높은 것으로 확인되었다. 더욱이 장관막간 nattokinase의 효과적이고 안전한 전달 과정에 대한 규명 확인과 [18] 이들 효소가 나타내는 온도 및 pH에 대한 높은 안정성에 비추어 [15] 인체적용 및 경구투여 목적의 혈행개선을 위한 식품보조제 및 의약품원료로서의 가능성도 높은 것으로 확인되었다.

References

- Fujita, M., K. Nomura, K. Hong, Y. Ito, A. Asada, and S. Nishimuro (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. Commun.* 197: 1340-1347.
- Dieri R., S. Alban, S. Béguin, and H. C. Hemker (2004) Thrombin generation for the control of heparin treatment, comparison with the activated partial thromboplastin time. *J. Thromb. Haemost.* 2: 1395-1401.
- Omura, K., M. Hitosugi, X. Zhu, M. Ikeda, H. Maeda, and S. Tokudome (2005) A newly derived protein from *Bacillus subtilis* natto with both antithrombotic and fibrinolytic effects. *J. Pharmacol. Sci.* 99: 247-251.
- Sumi, H., H. Hamada, K. Nakanishi, and H. Hiratani (1990) Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematologica*. 84: 139-143.
- Kim, J. Y., S. N. Gum, J. K. Paik, H. H. Lim, C. K. Kim, K. Ogasawara, K. Inoue, S. Park, Y. Jang, and J. H. Lee (2008) Effects of nattokinase on blood pressure: a randomized, controlled trial. *Hypertens. Res.* 31: 1583-1588.
- Mollerm, F. and M. Tranholm (2010) A ferric chloride induced arterial injury model used as haemostatic effect model. *Haemophilia* 16: 216-222.
- Hiroyuki, S., Y. Yanagisawa, C. Yatagai, and J. Saito (2004) Natto Bacillus as an oral fibrinolytic agent: nattokinase activity and the ingestion effect of *Bacillus subtilis* natto. *Food Sci. Tech. Res.* 10: 17-20.
- Suzuki, Y., K. Kondo, Y. Matsumoto, B. Q. Zhao, K. Otsuguro, T. Maeda, Y. Tsukamoto, T. Urano, and K. Umemura (2003) Dietary supplementation of fermented soybean, natto, suppresses

- intimal thickening and modulates the lysis of mural thrombi after endothelial injury in rat femoral artery. *Life Sci.* 73: 1289-1298.
9. Maat, M. P., A. C. de Bart, B. C. Hennis, P. Meijer, A. C. Havelaar, P. G. Mulder, and C. Kluft (1996) Interindividual and intraindividual variability in plasma fibrinogen, TPA antigen, PAI activity, and CRP in healthy, young volunteers and patients with angina pectoris. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16: 1156-1162.
 10. Yamamoto, K., K. Takeshita, T. Kojima, J. Takamatsu, and H. Saito (2005) Aging and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) regulation: implication in the pathogenesis of thrombotic disorders in the elderly. *Cardiovasc. Res.* 66: 276-285.
 11. Kim, J. B., C. B. Yoo, H. M. Shin, J. K. Jung, and H. W. Jang (2011) Evaluation of nattokinase for antithrombotic effect and pharmacological efficacy by a biological test and clinical trial. *KSBB Journal* 26:393-399.
 12. Anson, M. L. (1939) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 78-89.
 13. Day, S. M., J. L. Reeve, D. D. Myers, and W. P. Fay (2004) Murine thrombosis models. *Blood* 92: 486-494.
 14. Farrehi, P. M, C. K, Ozaki, P. Carmeliet, and W. P. Fay (1998) Regulation of arterial thrombolysis by plasminogen activator inhibitor-1 in mice. *Circulation* 97: 1002-1008.
 15. Yin, L. J., H. H. Lin, and S. T. Jang (2010) Bioproperties of potent nattokinase form *Bacillus subtilis* YJ1. *Agric. Food Chem.* 58: 5737-5742.
 16. Astrup, T. and S. Mullertz (1952) The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Archs. Biochem. Biophys.* 40: 346-347.
 17. Fay, W. P., A. C. Parker, M. N. Ansari, X. Zheng, and D. Ginsburg (1999) Vitronectin inhibits the thrombotic response to arterial injury in mice. *Circulation* 93: 1825-1830.
 18. Fujita, M., K. Hong, Y. Ito, S. Misawa, N. Takeuchi, K. Kariya and S. Nishimuro (1995) Transport of nattokinase across the rat intestinal tract. *Biol. Pharm. Bull.* 18: 1194-1196.
 19. Kim, Y. K., S. M. Kim, J. Y. Kim, and O. Kwon (2011) The culture filtrates from *Bacillus subtilis* natto lowers blood pressure via renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats fed with a high-cholesterol diet. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 54: 959-965.
 20. Yuan, J., J. Yang, Z. Zhuang, Y. Yang, L. Lin, and S. Wang (2012) Thrombolytic effects of douchi fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* LD-8547 *in vitro* and *in vivo*. *BMC Biotechnology* 12: 1-9.
 21. Kotb, E. (2012) Fibrinolytic bacterial enzymes with thrombolytic activity. *Springer XII*, 74P, ISBN: 978-3-642-24979-2.
 22. Martin, M. and K. Makise (2002) Natto and its active ingredient nattokinase: a potent and safe thrombolytic agent. *Alternative & Complementary Therapies* 157-164.
 23. Borawski, J. and M. Myśliwiec (2001) Plasma fibrinogen level is an important determinant of prolonged euglobulin clot lysis time in hemodialysis patients. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 7: 296-299.