

Effect of Tryptic Soy Broth (TSB) and Luria-Bertani (LB) Medium on Production of Subtilisin CP-1 from *Bacillus* sp. CP-1 and Characterization of Subtilisin CP-1

Chang-Su Park*

Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Kungpook 712-702, Korea

Received April 4, 2012 / Revised May 24, 2012 / Accepted May 25, 2012

A bacterial strain producing a fibrinolytic enzyme, subtilisin CP-1, was isolated from *Doen-Jang*, a Korean traditional fermentation food. Based on the analysis of gene sequence of 16S rRNA and biochemical analysis, the strain was identified as *Bacillus* sp. and named as *Bacillus* sp. CP-1. To investigate the effect of the medium on the production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. CP-1, two commercial bacterial culture media, tryptic soy broth (TSB) and Luria-Bertani (LB), were applied to the cultivation of *Bacillus* sp. CP-1. The strain secreted only one proteolytic enzyme (subtilisin CP-1) in the culture broth. The molecular weight of subtilisin CP-1 was estimated to be 28 kDa. Subtilisin CP-1 was optimally active at pH 9.0 and 45°C, and exhibited high specificity for Meo-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA (S-2586), a synthetic chromogenic substrate for chymotrypsin. The first eight amino acid residues of the N-terminal sequence of the enzyme are AQSVPYGI; this sequence is identical to that of subtilisin NAT and E.

Key words : *Bacillus*, culture medium, extracellular protease, fibrinolytic enzyme, subtilisin

서 론

혈전용해효소(fibrinolytic enzyme)에 의해 분해되는 혈전의 주성분인 피브리노는 트롬빈의 작용을 받아 피브리노겐으로부터 형성되며, 혈관에서 이러한 피브리노 응고체들이 용해되지 않고 축적되었을 때 심근경색을 비롯한 다양한 심혈관계 질환을 초래하는 혈전증의 원인이 된다[3,12]. 그러므로 혈전분해를 위한 연구가 다양한 방법으로 진행되고 있으며 특히, 미생물 유래 혈전분해효소를 이용한 혈전분해특성을 규명하는 연구가 지속적으로 수행되고 있다[4,7-9,21]. 미생물 유래 효소를 이용한 연구에 있어서 미생물에 의한 효율적인 효소 생산은 무엇보다도 중요한 연구분야라고 할 수 있으며 미생물 유래 혈전용해효소에 관한 연구에 있어서는 효소특성 규명에 관한 연구는 많은 보고가 이루어지고 있지만 효율적인 효소 생산을 위한 연구는 반드시 선행되어야 할 중요한 연구분야임에도 불구하고 현재까지 연구 보고가 매우 미흡한 실정이다. *Bacillus* sp.는 산업적으로 유용한 다양한 효소를 생산하는 균주로서 알려져 있으며, 특히, serine alkaline protease (subtilisin), neutral metalloprotease와 같은 protease를 비롯하여 다양한 esterase가 *Bacillus* sp. 유래의 유용한 효소로서 보고되어져 있다[14,18]. 최근에는 발효 식품으로부터 단리된 *Bacillus* sp. 유래의 다양한 혈전용해효소가 보고되고 있으므로 [11, 12,17,20] 본 연구에서도 한국 전통 발효 식품인 된장을 시료로 이용하여 혈전용해 효소를 생산하는 균주를 단리하고

동정(*Bacillus* sp. CP-1)하였다. 그리고, 2 종류의 시판용 박테리아용 배지[tryptic soy broth (TSB) 와 Luria-Bertani (LB)]를 이용하여 혈전용해효소의 생산에 적합한 *Bacillus* sp. CP-1 배양 배지에 대하여 비교 검토하였으며, *Bacillus* sp. CP-1 유래 혈전용해 효소의 N-말단 아미노산배열 분석을 통하여 혈전용해효소의 동정과 함께 혈전 용해를 위한 효소의 특성에 대하여도 검토하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

Fibrin plate의 제조에 이용한 fibrin과 bovine 유래의 thrombin은 Sigma (St. Louis, MO, U.S.A)로부터 구입을 하였으며, fibrin plate 제조를 위한 agarose와 전기영동을 위한 모든 시약 및 기구는 Bio-Rad (Hercules, CA, U.S.A)로부터 구입을 하였다. 그리고, 본 연구에서 사용한 시약은 모두 특급 등급을 이용하였다.

미생물 균주의 분리 및 동정

혈전용해효소를 분비하는 균주를 분리하기 위하여 대구의 재래시장 (서문시장)에서 구입한 전통재래식 된장을 시료로 사용하였다. 단리된 미생물을 동정하기 위하여 미생물의 16S rRNA 유전자 분석은 솔젠타(Daejeon, Korea)에 의뢰하였으며 생화학적 분석에 의한 균주의 형태학적 특성은 그람염색[6] 후 광학현미경(Olympus BX60, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 생리·생화학적 특성은 API 50 CHB kit (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)을 사용하여, 제조사의 지시대로 결과를 판독

*Corresponding author

Tel : +82-53-850-3216, Fax : +82-53-850-3219
E-mail : senboku@cu.ac.kr

하였다.

Bacillus sp. CP-1 배양 및 효소 활성 비교

본 연구에서 사용한 *Bacillus* sp. CP-1는 한국전통발효식품인 된장으로부터 단리되었으며, 본 균주는 100 ml의 tryptic soy broth (TSB) (Difco, Sparks, MD, U.S.A.) 배지와 Luria-Bertani (LB) (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) 배지에서 37°C에서 배양되었다. 배양 후 1 ml의 배양액을 채취하여 10,000× g에서 10분간 원심분리 후 채취한 배양 상층액을 효소 활성 측정 및 단백질 분석을 위한 시료로 사용하였으며, 균체 중량은 균체건조중량을 측정하여 검토하였다. 혈전용해효소의 활성을 검토하기 위한 fibrin plat 제조는 이전에 보고된 방법으로 조제하였으며[1], 혈전용해효소 활성은 다음과 같이 검토하였다. 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 녹아있는 0.6% (w/v) fibrinogen 용액 5 ml를 동량의 2% agarose 용액 그리고 0.1 ml의 thrombin 용액(10 NIH unit/ml)과 함께 petri dish에서 섞어서 시료를 제조하였다. 이렇게 제조한 시료 20 µl를 capillary glass tube (5 mm diameter)를 이용하여 사전에 제조한 hole속으로 적정한 후, 37°C에서 12시간 반응하였다. 이때 동량의 plasmin (1.0 NIH unit/ml)을 표준 혈전용해효소로서 이용하였으며, 효소활성은 clear zone의 직경을 측정함으로써 비교 검토하였다.

SDS-PAGE 및 fibrin zymography

본 연구에서 SDS-PAGE는 Laemmli 방법[13]에 의해 수행하였다. 단백질 분석을 위한 시료 제조는 배양 상층액에 함유되어 있는 단백질을 40 g을 10% TCA를 이용하여 변성 침전시킨 후 침전된 단백질을 sample buffer (0.5 M Tris, pH 6.8, 10% SDS, 20% glycerol 그리고 0.03% bromphenol blue)로 5배 희석한 후 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 본 연구에서 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)를 표준시료로 이용하여 Bradford 방법[2]으로 측정하였다.

Fibrin zymography 활성 확인법은 다른 연구자의[10] 방법에 따라 fibrinogen의 농도가 0.12% (w/v)가 되게 polyacrylamide 용액에 혼합한 후 곧바로 thrombin (1.0 NIH unit/ml)을 첨가하여 제조한 fibrin-polyacrylamide 을 제조하였다. 각 lane에 배양 상층액 100 ng의 단백질을 loading 한 후 10 mA의 일정한 전류를 걸어 전기영동을 실시한 다음, SDS에 의해 불활성화 된 효소를 재활성화 시키기 위해 gel을 2.5% Triton X-100를 포함한 Tris 완충용액(50 mM, pH 7.4)에 30분간 침적하여 SDS를 제거하였다. 그리고 증류수로 여러번 세척하여 gel로부터 Triton X-100을 제거하였다. Fibrin 분해능을 지닌 단백질은 활성염색법에 의해 gel 상의 fibrin을 분해하여 Coomassie blue 염색 결과 투명대를 형성하기에 분획된 단백질의 혈전용해 활성은 활성반응 완충용액(200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃가 포함된 30 mM Tris 완충용액,

pH 7.4)에 gel을 침적하여 37°C 배양기에서 12시간 반응을 시킨 후 투명대 형성 유무를 확인함으로써 확인하였다.

합성 기질을 이용한 기질 특이성 연구

혈전용해효소의 기질 특이성을 알기 위하여 Table 2에 나열되어있는 다양한 기질을 이용하여 기질에 대한 효소의 특이성을 알아보았다. 0.5 mM 기질용액 0.2 ml (20 mM Tris-HCl 완충용액, pH 9.0)과 조효소(3.0 ug/0.2 ml)을 37°C water bath에 넣고 1분간 반응시킨 후 50% 초산용액 0.1 ml을 첨가하여 반응을 멈추게 하였다. 시료를 405 nm에서 반응 상층액의 흡광도를 측정하였다. 본 연구에서 효소 활성의 1 unit은 1 분간에 1 µmol의 p-nitroaniline의 생산하는 효소량으로 정의하였다.

N-말단 염기서열 분석

본 연구에서는 단백질의 N-말단 염기서열 분석을 위하여 SDS-PAGE 후에 겔상의 단백질을 electroblotting [15]에 의해 polyvinylidene difluoride membrane로 이동시킨 후 Coomassie blue에 의해 membrane을 염색하였다. 염색된 단백질 시료 중 특정 부분의 단백질들을 단리하여 gas-phase protein sequencer (model Procise 491, ABI, U.S.A.)를 이용하여 Edman-degradation방법에 의해 단백질의 N-말단 염기서열 분석을 분석하였다.

결과 및 고찰

미생물 동정

본 연구에서 단리된 미생물은 동정 결과 *Bacillus subtilis*의 16S rRNA 유전자와 100%의 일치성을 나타내었으나, 생화학적 동정에 있어 *Bacillus subtilis*와 탄수화물의 이용성, urease 생산 유무, lysozyme에 대한 감수성 등 일부 특성에 차이를 보여(data not shown) 본 균주를 종(species)까지의 동정에 어려움이 있어서 본 균주를 *Bacillus* sp. CP-1으로 명명하였다.

배지 종류에 따른 *Bacillus* sp. CP-1 배양 특성 및 생산 효소의 비교

2종류의 시판용 배지(TSB와 LB배지)를 이용하여 *Bacillus* sp. CP-1를 배양 한 후 균체건조중량을 측정한 결과 LB배지에서의 균체건조중량은 최대 약 55 mg/ml이고 TSB배지에서는 최대 약 18 mg/ml의 결과를 나타내었다. 이러한 결과로부터 균주 생육에 있어서는 LB배지에서의 배양이 TSB배지에서의 배양보다 약 3배 정도 높다는 것을 알 수 있었다(data not shown). 그리고, 두 종류의 배지를 이용하여 *Bacillus* sp. CP-1 배양 한 결과 배양 시간에 따른 균주로부터 분비된 전체 단백질량과 혈전용해효소의 활성을 Fig. 1에 나타내었다. 균주 아래의 전체 단백질량은 두 배지 모두 배양 24시간 후에 최대를

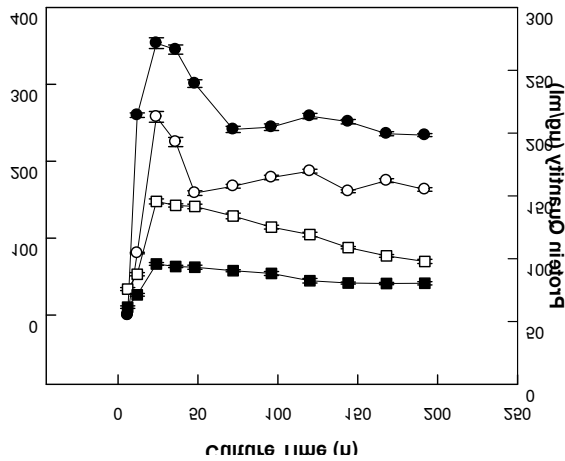


Fig. 1. Protein quantity and fibrinolytic activity in the TSB and LB of *Bacillus* sp. CP-1. The symbols of circle and square exhibit the total activity and protein quantity in the culture medium of *Bacillus* sp. CP-1, respectively. The close and open symbols mean the values in the TSB and LB of *Bacillus* sp. CP-1, respectively. Data represent the means of three experiments and error bars represent standard deviation.

나타내었으며 전체 단백질량은 LB배지에서 배양이 TSB배지에서의 배양보다 약 1.51배 많은 양의 단백질을 분비하였다. 하지만, 혈전용해효소의 활성은 TSB배지에서 배양한 배양 상층액이 LB배지 유래의 배양 상층액보다 약 1.37배 높은 효소 활성을 나타내었으며, fibrin plate상에서 clear zone의 분석에 있어서도 LB배지 유래의 배양액보다 TSB배지 유래 배양액의 clear zone이 더욱더 크고 명확한 형태를 나타내었다(Fig. 2). 이러한 결과로부터 비록 *Bacillus* sp. CP-1의 생육과 전체 생산 단백질량에 있어서는 LB 배지에서의 균주 배양이 효과적이지만 혈전용해효소의 활성을 위해서는 TSB배지에서의 균주 배양이 보다 효과적이라는 것을 알 수 있었다.

배지 종류에 따른 *Bacillus* sp. CP-1 유래 단백질의 분석 및 특성 규명

두 배지에서 배양된 *Bacillus* sp. CP-1 유래의 단백질 분석을 위하여 배양시료 40 g에 함유되어 있는 단백질을 최종 10% 농도의 TCA를 이용하여 침전시킨 후 SDS-PAGE상에서 분석하였다(Fig. 3). 또한, fibrin zymography 방법을 이용하여 *Bacillus* sp. CP-1 유래의 세포외 혈전용해효소 양상을 알아보았다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 *Bacillus* sp. CP-1는 gel상의 상단 부분에서 하나의 효소 활성을 확인하였다. 이는 이전에 보고된 subtilisin의 binding mode와 일치하는 결과임을 확인하였다[5]. SDS-PAGE 에 의한 분석에 있어서는 특징적으로 두 배지 배양액 모두에서 54 kDa와 28 kDa 부근에 명확한 단백질 밴드가 확인되었다. 따라서, 두 종류의 단백질 단편의 명확한 규명을 위하여 두 단백질에 대한 N-말단 염기서열 분

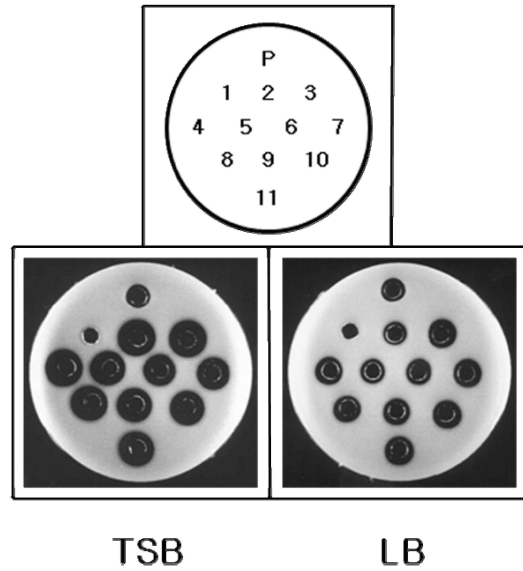


Fig. 2. Fibrinolytic activity assay on the fibrin plate (0.3%) with culture supernatant of *Bacillus* sp. CP-1 cultured in the TSB and LB media. The number 1-11 represents the culture time as described in Table 1. P means plasmin (1.0 NIH unit/ml) as a control of fibrinolytic activity.

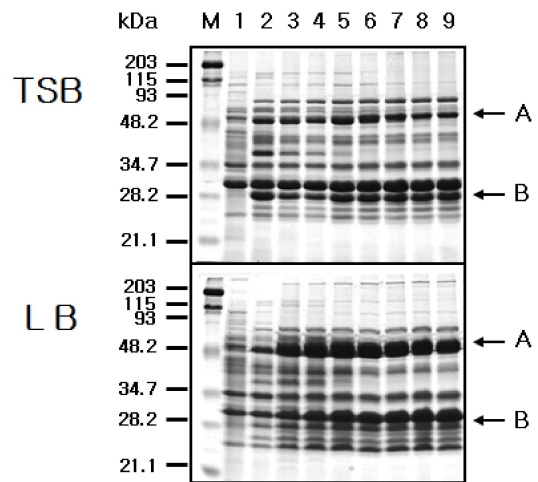


Fig. 3. Comparison of extracellular protein pattern of *Bacillus* sp. CP-1 cultured in the TSB and LB media. After TCA precipitation, the samples (40 µg) were loaded on the SDS gel (12%), and the gels were stained with Coomassie blue. Molecular weight of protein was calculated by comparison with seven standard proteins (M). The samples were 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, and 168 hr cultivation (lanes 1-9), respectively.

석을 실행하였다. 먼저, 28 kDa 단백질의 N-말단 염기서열 분석을 분석한 결과 처음 8개가 AQSVPYGI (subtilisin CP-1로 명명)로 분석되었으며 이 배열은 *B. subtilis* 유래 subtilisin NAT (P35835)와 동일한 배열임을 나타내었다[10,13]. 반면,

Table 1. Comparative amidolytic activity of the subtilisin CP-1 for the hydrolysis of several synthetic substrates

Synthetic substrate (0.5 mM)	Substrate hydrolysis (nmol/ml/min)
H-D-Pro-Phe-Arg- β NA ^a (Plasma kallikrein)	0
N- α -Benzylloxycarbonyl-D-Arg-Gly-Arg- β NA (Factor Xa, trypsin)	1.3
H-D-Phe-Pip-Arg- β NA (Thrombin)	0.2
H-D-Ile-Pro-Arg- β NA (broad spectrum of serine protease)	0.8
Meo-Suc-Arg-Pro-Tyr- β NA (Chymotrypsin)	21.1
Glu-Gly-Arg- β NA (Urokinase)	0
H-D-Val-Leu-Lys- β NA (Plasmin, Plasminogen)	1.4

^a β NA, β Nitroaniline

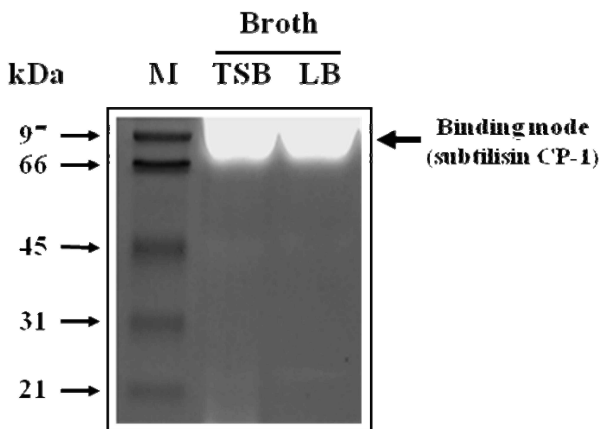


Fig. 4. SDS-fibrin zymography (12% polyacrylamide gel) of culture supernatants from *Bacillus* sp. CP-1. TSB and LB mean culture supernatant from tryptic soy broth and Luria-Bertani mediums, respectively, and M means markers of protein molecular mass.

청국장에서 분리한 *Bacillus* sp. strain CK 11-4 유래의 CK (AQTVPYGI)와 비교했을 때 3번째 서열에서 차이를 보였다 [12]. Subtilisin CP-1의 효소 특이성을 알아 본 결과, pH 9.0 및 45°C에서 최적의 효소활성을 나타내었으며(data not shown), chymotrypsin 에 대한 특이적 기질인 Meo-Suc-Arg-Pro-Tyr- β NA (S-2586)에 대하여 가장 높은 기질 특이성을 보여 subtilisin CP-1의 경우 chymotrypsin 유사 알칼리성 혈전용해효소로 분류되었다(Table 1).

그리고, 50 kDa 단백질의 처음 6개의 N-말단 염기서열 분석의 결과는 MSSNKL로 분석되었으며 이 배열은 *B. subtilis* 유래 vegetative catalase (CAB04807)와 동일한 배열인 것으로 확인되었다. Catalase는 산화적 스트레스에 의해 유도되어지는 효소로서 *B. subtilis*에서는 적어도 3 종류의 catalase, catalase 1 (*KatA*, 55 kDa), catalase 2 (*KatE*, 80 kDa), 그리고 catalase 3가 유래한다고 보고되어져 있다[3]. 특히 *KatA* 는 glucose의 결핍에 의해 합성되어지는 효소로서 이는 LB 배지에 glucose가 함유되어 있지 않은 관계로 LB 배지에서 특히 50 kDa 단백질이 많이 생산되어 있었으며, 50 kDa 단백질에는 catalase 중에서도 *KatA*가 많이 존재 할 것이라는 것이 추정되어졌다.

Subtilisin은 아시아 지역의 발효 식품인 낫토우[19, 20], 청국장[12], 된장[11] 그리고 Douchi [17] 등에서 단리된 *Bacillus* sp. 유래의 주요 혈전용해효소로서 보고되어져 있으며, 본 연구에서는 subtilisin CP-1의 효율적인 생산의 관점에서 *Bacillus* sp. CP-1의 배양을 위해 TSB 배지 및 LB배지를 이용하여 검토한 결과 효소 생산의 관점에 있어서는 TSB 배지가 더욱 더 효율적임을 확인하였다. 이러한 결과는 본 연구에서 규명한 subtilisin CP-1의 활성 특성과 함께 발효식품유래의 대표적인 혈전용해효소인 subtilisin의 생산 및 적용 연구에 활용 될 수 있을 것으로 기대되어진다.

감사의 글

본 논문은 2011년도 대구가톨릭대학교 교내연구비 지원에 의한 것으로 감사드립니다.

References

- Asrup, T. and Müllertz, S. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 346-351.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-252.
- Engelmann, S. and Hecker, M. 1996. Impaired oxidative stress resistance of *Bacillus subtilis sigB* mutants and the role of *katA* and *katE*. *FEMS Microbiol. Lett.* **145**, 63-69.
- Cheng, G., Zhao, P. X. and Tang, F. B. 2009. Identification and characterization of a novel spore-associated subtilase from *Thermoactinomyces* sp. CDF. *Microbiology* **155**, 3661-3672.
- Choi, N. S., Chung, D. M., Ryu, C. H., Yoon, K. S., Maeng, P. J. and Kim, S. H. 2006. Identification of three extracellular proteases from *Bacillus subtilis* KCTC 3014. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 457-464.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams. S. T. 1994. Group 18: Endospore-forming Gram-positive rods and cocci, pp. 559-564. *In* Holt, J. G., Schleifer, K. H., Tully, J. G., Ursing, J., Bryant, M., Krieg,

- N. R., Liston, J., Moulder, J. W., Murray, R. G. E., Niven, C. F. and Pfenning, N. (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 9th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland, USA.
7. Jaouadi, B., Ellouzi-Chaabouni, S., Rhimi, M. and Bejar, S. 2008. Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. *Biochimie* **90**, 1291-1305.
 8. Jo, H. D., Lee, H. A., Jeong, S. J. and Kim, J. H. 2011. Purification and characterization of a major fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* MJ5-41 isolated from Meju. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 1166-1173.
 9. Fakhfakh, N., Kanoun, S., Manni, L. and Nasri, M. 2009. Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPK. *Can. J. Microbiol.* **55**, 427-436.
 10. Kim, S. H., Choi, N. S. and Lee, W. Y. 1998. Fibrin zymography: a direct analysis of fibrinolytic enzyme on gels. *Anal. Biochem.* **263**, 115-116.
 11. Kim, S. H. and Choi, N. S. 2000. Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp. strain DJ-4 screened from Doen-Jang. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1722-1725.
 12. Kim, W., Choi, K., Kim, Y., Park, H., Choi, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon, I. and Lee, S. 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.
 13. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
 14. Mäntsälä, P. and Zalkin, H. 1980. Extracellular and membrane-bound proteases from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **141**, 493-501.
 15. Matsudaira, P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membrane. *J. Biol. Chem.* **262**, 10035-10038.
 16. Nakamura, T., Yamagata, Y. and Ichishima, E. 1992. Nucleotide sequence of the subtilisin NAT gene, aprN, of *Bacillus subtilis* (natto). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1869-1871.
 17. Peng, Y., Huang, Q., Zhang, R. and Zhang, Y. 2003. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from *douchi*, a traditional Chinese soybean food. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **134**, 45-52.
 18. Prestidge, L., Gage, V. and Spizizen, J. 1971. Protease activities during the course of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **107**, 815-823.
 19. Sumi, H., Hamada, K., Nakanishi, K. and Hiratani, H. 1990. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol.* **84**, 139-143.
 20. 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.
 21. Toyokawa, Y., Takahara, H., Reungsang, A., Fukuta, M., Hachimine, Y., Tachibana, S. and Yasuda, M. 2010. Purification and characterization of a halotolerant serine proteinase from thermotolerant *Bacillus licheniformis* RKK-04 isolated from Thai fish sauce. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 1867-1875.

초록 : *Bacillus* sp. CP-1 유래 subtilisin CP-1 생산에 있어 tryptic soy broth (TSB)와 Luria-Bertani (LB)배지가 미치는 영향 및 subtilisin CP-1의 특성

박창수*

(대구가톨릭대학교 식품가공학전공)

본 연구에서는 된장으로부터 혈전용해효소(subtilisin CP-1) 생산 균주를 단리하여 16S rRNA 유전자 분석과 생화학적 분석을 통하여 동정하여 *Bacillus* sp. CP-1로 명명하였으며, TSB와 LB 배지를 이용하여 혈전용해효소의 생산에 적합한 *Bacillus* sp. CP-1 배양 배지에 대하여 검토하였다. 그 결과 균주 생육과 균주 유래 전체 단백질의 생산에는 LB 배지가 더욱더 효과적임에 반해 높은 혈전용해효소 활성은 TSB 배지에서 *Bacillus* sp. CP-1 배양하였을 때 얻어졌다. *Bacillus* sp. CP-1의 배양 상층액의 fibrin zymography에 의한 분석에서 gel상의 상단 부분에 하나의 명확한 혈전용해 활성을 확인하였으며, 분자량은 약 29-30 kDa으로 추정되며, pH 9.0와 45°C에서 최적의 효소활성을 보였다. 그리고, 기질 특이성 검토에 있어서는 chymotrypsin에 대한 특이적 기질인 Meo-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA (S-2586)에 대하여 가장 높은 기질 특이성을 나타내었다. Subtilisin CP-1단백질의 N-말단 염기 서열을 분석한 결과 처음 8개가 AQSVPYGI로 분석되었으며 이 배열은 subtilisin NAT 및 E와 동일하였다.