

전통장류로부터 혈전용해 활성이 우수한 효모균주의 분리

이재형^{1*}, 허남기¹, 최병곤¹, 박은희², 권세영², 김명동², 홍운표³, 여수환⁴, 백성열⁴

¹강원도농업기술원 농식품연구소

²강원대학교 식품생명공학과

³레인보우 바이오테크(주)

⁴농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효식품과

Received: March 14, 2014 / Revised: April 18, 2014 / Accepted: April 22, 2014

Isolation of Fibrinolytic Yeasts from Korean Traditional Fermented Soybean

Jae-Hyoung Yi^{1*}, Nam-Kee Heo¹, Byung-Gon Choi¹, Eun-Hee Park², Se-Young Kwun², Myoung-Dong Kim², Wun-Pyo Hong³, Soo-Hwan Yeo⁴, and Seong-Yeol Baek⁴

¹Agro-food Research Institute, Gangwondo Agricultural Research and Extension Services, Chuncheon 200-822, Republic of Korea

²Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

³Rainbow Biotech Co., Chuncheon 200-161, Republic of Korea

⁴Fermentation and Food Processing Division, Department of Agrofood Resources, NAAS, RDA, Suwon 411-853, Republic of Korea

Yeast strains demonstrating fibrinolytic activity were isolated from traditional fermented soybean in Gangwon province, Korea. The AFY-1 strain isolated from fermented soybean paste showed the highest fibrinolytic activity (3.5 U/mg protein) corresponding to a 1.75 fold higher fibrinolytic activity compared with the plasmin (2.0 U/mg protein). The optimum temperature for the growth of AFY-1 strain was 32°C. Analysis of 18S rRNA gene sequence and carbon source utilization pattern indicated that the AFY-1 strain shares the highest homology (99%) with *Saccharomyces* sp.

Keywords: Fermented soybean, yeast, fibrinolytic enzyme activity

된장과 같은 발효식품은 콩에 포함되어 있는 단백질, 지방 등이 다양한 미생물의 작용에 의해 소화·흡수가 쉬운 형태로 변환되어 인체의 면역력을 향상시키거나 질병을 예방하는 기능이 있는 것으로 알려져 있다[20, 38]. 그 중에서도 전통장류는 메주를 숙성시키는 과정에서 다양한 미생물이 성장하게 되고, 이들 미생물에 의하여 숙성과정에서 콩에 함유된 당질은 단당류로 분해되고 단백질은 펩타이드와 아미노산으로 분해된다[18]. 일부 아미노산은 장류 특유의 향기성분 주원인으로 알려져 있으며 이로 인해 풍미를 높여 주는 역할을 한다[38]. 메주의 숙성에 관여하는 미생물로는 *Aspergillus sojae*, *A. oryzae*, *Rhizopus* 속 등 곰팡이류가 보고되었으며, 유산균으로는 *Lactobacillus*, *Streptococcus* 속 등이 관여하며, 세균은 *Bacillus subtilis*, *B. natto*, 그리고 효모로는

Saccharomyces cerevisiae, *Zygosaccharomyces rouxii* 등이 관여한다는 연구가 보고된 바 있다[18].

현대인은 식생활의 서구화와 스트레스로 인한 동맥경화증, 뇌졸중, 혈전증과 같은 성인병이 점차 증가하고 있으며, 그 중 뇌혈관 질환은 혈전이 분해되지 않고 축적되어 혈액순환을 차단함으로써 발생된다[7]. 혈전의 생성은 활성화된 thrombin에 의해 혈장 단백질인 fibrinogen이 fibrin으로 전환됨으로써 유발된다[21]. 일반적인 경우 혈전은 plasmin 등과 같은 혈전용해 효소에 의해 체내에서 자연적으로 분해되지만[7], 혈관 내에 과도한 혈전이나 혈전용해에 관련된 생리적 기능이 비정상적일 경우 혈액의 흐름이 차단되고, 특정조직에 산소와 영양물질을 공급하지 못해 혈전증을 유발하여 심각한 장애를 유발하기도 한다[6].

혈전증의 치료제는 streptokinase, urokinase, 그리고 tissue-type plasminogen activator (tPA)처럼 혈액의 plasminogen을 활성화된 plasmin으로 전환시켜주는 plasminogen activator type과 plasmin 같이 생체 내에서 선택적으로 혈전을 용해시

*Corresponding author

Tel: +82-33-248-6531, Fax: +82-33-248-6555

E-mail: toabyss@korea.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

키는 혈전용해 효소형(fibrinolytic enzyme type)으로 구분할 수 있다[32]. 그러나 이러한 물질들은 가격이 비싸고 urokinase를 제외하면 경구투여를 할 수 없어 부작용이 발생할 수 있다는 연구결과가 보고된 바 있다[22, 25, 36].

따라서 최근에는 경구투여로 부작용을 줄이고 보다 경제적인 혈전용해 물질을 탐색하기 위하여 다양한 생물자원을 대상으로 연구가 활발히 진행되고 있다[24, 35, 37]. 특히, 미생물이 생산하는 혈전용해 효소는 특이성이 높고 산업화가 비교적 용이하며 발효 공정 최적화나 유전공학적 기술 등을 이용하여 대량생산이 가능하기 때문에 이에 대한 연구 결과가 급증하고 있다[24, 35, 37]. 일본의 콩 발효식품인 *natto*와 절임식품인 *shiookara*에서 혈전용해 효소를 생산하는 균주가 분리된 바 있으며, 이 미생물에 의하여 생산된 효소는 생체 내에서 우수한 혈전용해능을 나타내는 것으로 보고되었다[23]. 우리나라에서는 청국장[16, 19], 젓갈[14], 된장[15], 김치[27] 등의 발효식품에서 혈전용해 활성이 우수한 균주가 분리되었으며, 주로 *Bacillus*속 미생물에 대한 보고였다[2, 28]. *S. cerevisiae*, *Pichia burtonii*, *P. caribbia* 등 전통 발효식품으로부터 분리한 효모의 혈전용해 활성이 보고되었으나[11], *Bacillus*속에 비하여 활성이 미비하였다. 진균류인 버섯류에서는 혈전용해 물질에 대한 탐색연구가 많이 이루어져 신령버섯 균사체, *Pisolithus tinctorius*, *Agaricus blazei* 등의 활성이 보고되었지만[4, 29], 효모의 혈전용해 활성에 대한 연구는 상대적으로 미흡하다.

본 연구에서는 전통장류의 발효과정에 관여하는 효모를 분리하기 위해서 강원도 각 지역에서 전통방식으로 제조한 장류를 수집하여 미생물을 분리하였고, 분리된 효모 균주 중 혈전용해 효소(fibrinolytic enzyme) 활성이 있는 균주를 선발하였다. 강원도에서 생산되는 전통장류의 발효과정에서 유용한 효소생산에 관여하는 미생물을 선발·동정하여 추후 전통장류 산업의 경쟁력 강화를 위한 기초자료를 제공하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

균주 분리원

본 연구에 사용된 전통장류는 강원도에서 전통적인 방법으로 제조되어 판매되고 있는 된장 10점, 고추장 5점, 막장 5점, 간장 5점, 그리고 청국장 5점 등 총 30점을 수집하여 사용하였다.

균주분리

생리식염수 90 ml에 수집한 장류 시료 10 g을 넣어 교반기(hb-201SF, Hanbaek Scientific, Korea)로 10시간 진탕한 후 정지시키고 상등액 100 μ l를 chloramphenicol (100 μ g/ml)이

첨가된 YEPD (1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose) 고체배지에 도말하여 30°C에서 48시간 배양한 후 단일집락을 형성하는 균주를 1차 선발하였다.

혈전용해 활성 측정

효모 균주의 혈전분해 효소 활성은 Astrup과 Mullertz의 방법 [1]을 변형하여 측정하였다. Fibrinogen을 최종농도가 0.3% (w/v)가 되도록 PBS 완충액(0.1 M, pH 7.4)에 용해시켜 평판에 부은 후 1.5% (w/v) agarose 용액을 동량 첨가하여 혼합하였고 여기에 thrombin (20 U, Sigma-Aldrich, USA)을 100 μ l 첨가하여 상온에서 정치한 후 균주 배양액 20 μ l를 분주하여 paper disk 방법[10]으로 활성을 측정하였다. 단백질은 Bradford protein assay plus kit (GenDEPOT, USA)을 이용하여 정량하였으며, 양성 대조구로는 plasmin (2 U/mg protein, Sigma-Aldrich)을 사용하였고, 혈전분해 활성이 없는 *S. cerevisiae* BY4742 [17] 균주 배양액을 음성대조구로 각각 20 μ l를 분주하여 사용하였다. 각 균주가 나타내는 혈전용해 활성은 아래 식과 같이 plasmin이 나타내는 혈전용해 활성의 상대활성으로 정의하였다.

$$\text{혈전용해 활성(\%)} = \frac{\text{시료에 의한 용해영역(mm)}}{\text{Plasmin에 의한 용해영역(mm)}} \times 100$$

효모 염색체 DNA 분리

효모 균주를 200 ml의 YEPD 배지에서 12시간 동안 진탕 배양한 후 원심분리(1,200 \times g, 5분)하여 회수한 균체를 STES 완충용액(0.5 M NaCl, 0.2 M Tris-HCl, 0.01 M EDTA, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), pH 7.6)으로 세척하고 30 μ l의 STES 완충용액으로 균체를 현탁하였다. 동일부피의 glass bead (Sigma-Aldrich)를 첨가하고 microtube mixer (Advance, Japan)로 5분간 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄액에 200 μ l의 TE (0.01 M Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) 완충용액과 동량의 phenol/chloroform을 첨가하고 교반한 후 4°C에서 원심분리(1,200 \times g, 10분)하여 상층액을 회수하였다. 3 M sodium acetate (pH 5.2) 용액 30 μ l와 900 μ l의 ethanol을 첨가하고 원심분리한 후 회수한 침전물을 70% ethanol로 세척하였다. RNaseA (1 μ g/ml, Thermo Scientific, USA)가 첨가된 TE 완충용액을 100 μ l 첨가하여 염색체 DNA를 얻었다[26].

균주동정

분리된 효모균주의 동정을 위하여 ITS1(5'-TCCGTAGGT GAACCTGCGG-3')과 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 프라이머를 사용하여 18S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하였다[9]. 염색체 DNA (10 ng)를 주형으로 사용하고 1.25 U Taq polymerase (Bioneer, Korea), 10 pmol primers, 0.2 mM

dNTPs와 10배 농축반응용액(10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 105 mM MgCl₂, pH 8.3)을 첨가하고 최종 부피를 50 µl로 하여 94°C에서 3분간 반응시키고 94°C에서 1분, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분 반응을 28회 수행한 후, 최종적으로 72°C에서 10분간 반응시켰다. PCR 반응산물은 1.5% agarose gel을 사용하는 전기영동장치를 이용하여 분석하였고, 약 400 bp의 증폭산물의 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 제공하는 Blast 프로그램을 이용하여 염기서열을 비교하여 계통분류학적 유연관계를 분석한 후, Neighbor-joining method [8]을 사용하여 계통도를 작성하였다. 분리된 균주의 탄소원 이용 특성은 API 20C AUX kit (BioMérieux, France)으로 조사하였다.

주사전자현미경(SEM)

분리된 균주의 형태학적 특성을 확인하기 위하여 균주배양액을 원심분리(10,000 × g, 2분, 4°C) 한 후 상층액을 제거하고 생리식염수로 2회 세척하였다. 주사현미경 관찰을 위한 전처리는 0.1 M sodium phosphate 완충액(pH 7.4)으로 제조한 2.5% glutaraldehyde (TAAB Laboratories Equipment Ltd., UK) 용액으로 세포를 3시간 고정시킨 후 같은 완충액으로 2회 세척한 후 1% osmium tetroxide (Sigma-Aldrich) 용액으로 30분간 고정하였다[31]. 농도구배 에탄올(50-100%)로 각각 5분씩 탈수 후 100% hexamethyldisilazane (Sigma-Aldrich)으로 완전히 탈수한 후 건조시켰다. 전처리한 균주는 주사전자현미경(JSM-35CF, JEOL, Japan)을 사용하여 20,000배 배율로 관찰하였다.

균주의 생육특성

혈전용해 활성이 우수한 효모균주를 YEPD 배지가 포함된 20 L 발효조에서 24시간 동안 다양한 온도(24-40°C)에서 배양한 후 균체농도(균체수)를 측정하였다. 무기염류가 효모균주의 성장에 미치는 영향도 같은 조건에서 수행하였다. 30°C에서 12시간 동안 배양한 종배양액은 초기 세포흡광도(OD₆₀₀)가 0.1이 되도록 접종하였고 배양 중 교반속도는 400 rpm으로 고정하였고 pH와 용존산소는 조절하지 않았다.

결과 및 고찰

혈전용해 활성이 우수한 효모 균주선발

항생제인 chloramphenicol이 함유된 YEDP 고체배지에서 1차 분리된 효모균주 중 혈전용해 활성이 우수한 균주를 선별하기 위하여 효모 균주를 YEPD 배지에서 12시간 배양한 후 원심분리하고 상층액을 조효소액으로 사용하여 혈전용해 활성을 측정하였다(Fig. 1A). 혈전용해활성의 상대적 비교를 위해서 단백질 농도를 측정하여 양성 대조구 농도로 희석한

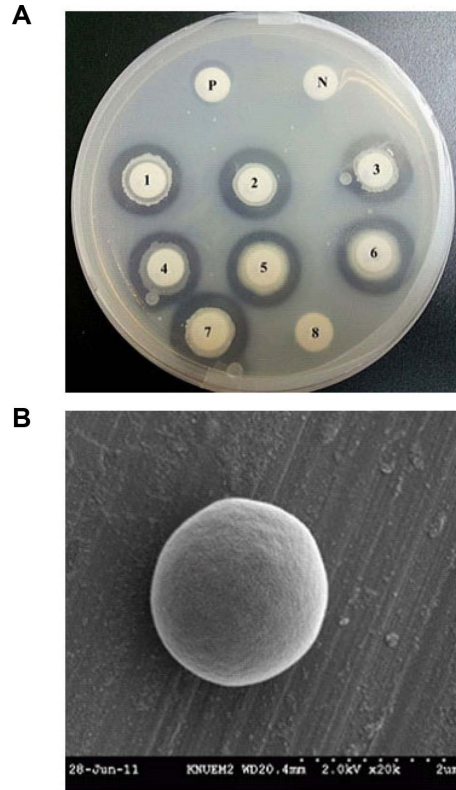


Fig. 1. Fibrinolytic activities of the yeast strains (A) isolated from fermented soybean and SEM (scanning electron microscope) image of the AFY-1 strain (B). P: Plasmin (1.0 U), N: water, 1: C11Y14, 2: KA3Y2, 3: M24Y1, 4: M1Y2, 5: M3Y1, 6: KA3Y1, 7: AFY-1, 8: *S. cerevisiae* BY4742.

Table 1. Relative fibrinolytic activities of the yeast strains isolated from fermented soybeans.

Strain	Relative fibrinolytic activity (%)
C11Y14	139.2 ± 3.5 ^{a)}
KA3Y2	141.2 ± 0.9
M24Y1	135.2 ± 2.2
M1Y2	150.3 ± 2.6
M3Y1	148.1 ± 3.6
KA3Y1	168.6 ± 1.5
AFY-1	172.3 ± 2.3
BY4742	ND ^{b)}

^{a)}Data are averages and standard errors from three independent measurements.
^{b)}ND: not detected.

후 각각 20 µl를 분주하여 사용하였다. 각각 된장과 간장으로 부터 분리된 효모인 AFY-1과 KA3Y1균주는 각각 3.5 U/mg protein, 2.2 U/mg protein의 혈전용해 활성을 나타내었다

(Table 1). 대조구로 사용한 실험실 균주인 *S. cerevisiae* BY4742는 혈전용해 활성을 나타내지 않았다.

Table 2. Characteristics of carbon source utilization of the *Saccharomycetales* sp. AFY-1 strain.

Carbon source	Phenotype
Glucose	+
Glycerol	-
2-Keto-gluconate	-
L-Arabinose	-
D-Xylose	-
Adonitol	-
Xylitol	-
Galactose	+
Inositol	-
D-Sorbitol	-
α -Methyl-D-glucoside	-
N-Acetyl-glucosamine	-
Cellobiose	-
Lactose	-
Maltose	-
Sucrose	+
Trehalose	-
Melezitose	-
Raffinose	+
Hyphae/Pseudohyphae	-

Table 3. Growth of *Saccharomycetales* sp. AFY-1 strain in YEPD medium at different growth temperatures.

Cell growth (log cfu/ml) ^{a)}				
24°C	28°C	32°C	36°C	40°C
9.32±0.72	9.51±0.32	9.65±0.24	9.46±0.51	9.26±0.22

^{a)}Cells were grown at each temperature for 24 h. Initial medium acidity was adjusted to pH 5.0. Data are averages and standard errors from three separate cultivations.

Table 4. Effects of salt on the growth of *Saccharomycetales* sp. AFY-1 strain at 32°C.

Salt (% w/v)	Cell growth (log cfu/ml) ^{a)}				
	0	0.05	0.1	0.15	0.2
K ₂ HPO ₄		9.51 ± 0.22	9.69 ± 0.12	9.68 ± 0.06	9.72 ± 0.48
KH ₂ PO ₄	9.65 ± 0.24	9.52 ± 0.43	9.68 ± 0.36	9.69 ± 0.99	9.71 ± 0.27
MgSO ₄ ·7H ₂ O		9.59 ± 0.69	9.60 ± 0.27	9.64 ± 2.19	9.63 ± 0.31

^{a)}Data are averages and standard errors from three separate cultivations grown for 24 h. Initial medium acidity was adjusted to pH 5.0 after addition of each salt.

효모 균주의 동정

강원 전통장류로부터 분리된 혈전분해 효소 활성이 있는 효모균주 6점을 동정하기 위하여 18S rRNA 유전자 염기서열 분석결과를 바탕으로 기존 표준균주들과 상동성을 검토한 결과 C11Y14, KA3Y2, KA3Y1, M1Y2 및 M3Y1로 각각 명명된 균주는 *Zygosaccharomyces rouxii* (100%), M24Y1로 명명된 균주는 *Candida* sp. (100%), AFY-1로 명명된 균주는 *Saccharomycetales* sp. (99%)와 가장 높은 상동성을 나타내었다. 이 중 혈전용해 활성이 가장 우수한 AFY-1 균주는 탄소원 대사특성(Table 2) 및 주사전자현미경 관찰을 통하여 형태학적 특성(Fig. 1B)을 검토한 결과 *Saccharomycetales* sp.로 최종 동정되었으며(Fig. 2) 농촌진흥청 농업유전자원센터에 기탁하였다(균주기탁번호: KACC93155P).

균주의 생육특성

혈전용해 활성이 가장 우수한 AFY-1 균주의 대량배양을 위해 균주의 생육특성을 조사하였다. 배양온도가 AFY-1 균주의 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 24-40°C의 온도에서 24시간 배양한 후 균체농도를 측정된 결과 32°C에서 균체농도는 9.65 ± 0.24 log cfu/ml로 가장 우수한 균체성장을 나타내었다(Table 3). 무기염류가 균체성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 K₂HPO₄, KH₂PO₄, 및 MgSO₄·7H₂O를 0-0.2% (w/v)의 농도로 첨가하여 32°C에서 24시간 동안 배양한 후 균체농도를 측정된 결과 K₂HPO₄ 및 KH₂PO₄는 0.2% (w/v) 농도에서, MgSO₄·7H₂O는 0.15% (w/v)에서 각각 균체성장이 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Table 4).

기존의 전통발효 식품 유래 미생물 중 *B. subtilis*의 경우 37°C에서 Na₂HPO₄를 0.05% (w/v) 첨가하였을 때 1.5배 높은 혈전용해 효소 활성을 나타냈으며[5], *B. licheniformis*의 경우 CoCl₂·6H₂O, ZnCl₂, HgCl₂, FeSO₄·7H₂O, AgNO₃과 같은 무기염류는 균체의 생육을 저해하는 것으로 나타났다[34]. 현재까지 우리나라를 포함한 일본, 중국 등에서 콩을 이용한 발효식품의 혈전용해능 등 다양한 생리기능성이 보고되고 있으며[3], 특히 태국의 콩 발효식품에서 분리한 *B. licheniformis*와 *B. subtilis* 등이 알레르기를 감소시킨다는 연구결과도 최근 보고된 바 있다[30]. 또한 전통장류에서 분리한 균주가 분

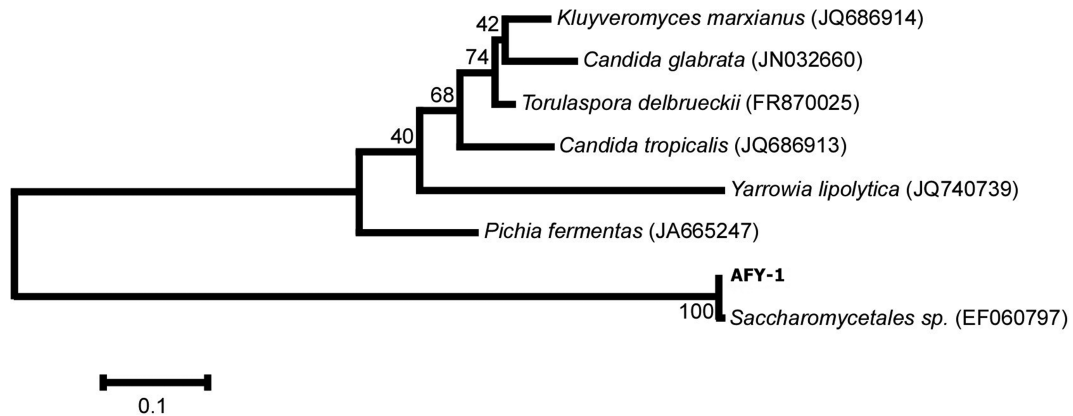


Fig. 2. The phylogenetic tree of the 18S rRNA sequence of *Saccharomyces* sp. and other homologs from other yeasts. The numbers on the nodes correspond to the bootstrap percentages based on 1,000 pseudoreplicates. The bar denotes the relative branch length. 18S rRNA gene sequences are identified by their GenBank accession number in parentheses.

비하는 혈전용해 효소의 특성에 관한 연구도 활발히 진행되고 있으며 균주 배양 시 첨가된 배지로 첨가된 질소원, 탄소원 등의 종류에 따라 혈전용해 활성이 변화된다는 보고도 있다[33].

전통식품 유래의 혈전용해 활성 미생물에 대한 연구는 지속적으로 이루어져 왔으나 대부분 *Bacillus*나 곰팡이에 국한되어 있었다[12, 13]. 본 연구에서 전통 장류로부터 혈전용해 능이 우수한 효모를 분리·확보함으로써 장류의 명품화 및 제조공정의 과학화에 기여할 것으로 사료된다.

요약

본 연구에서는 강원전통장류로부터 혈전용해 활성이 우수한 효모를 분리하였다. 된장에서 분리한 AFY-1 균주는 혈전용해 활성 측정결과 양성대조구인 plasmin 보다 약 1.75배 높은 활성을 나타내었다. 분리한 효모는 18S rRNA 염기서열 및 탄소원 이용 특성 분석을 통하여 *Saccharomyces* sp.로 동정되었으며, AFY-1 균주의 생육 최적온도는 32°C였다. 본 연구에서 분리된 혈전용해능이 우수한 효모균주는 안전성 검증 등 추가연구를 통해 발효식품 제조용 스타터로서 활용이 가능할 것으로 기대된다.

Acknowledgments

This work was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ009477)" Rural Development Administration, Republic of Korea. E. H. Park and M. D. Kim were supported by the "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ009993)" Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Astrup T, Mullertz S. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**: 346-351.
- Baek SY, Yun HJ, Choi HS, Koo BS, Yeo SH. 2010. Isolation and physiological characteristics of microorganism producing extracellular enzymes from Korean traditional soybean sauce and soybean paste. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 379-384.
- Choi NS, Chung DM, Han YJ, Kim SH, Song JJ. 2009. Purification and characterization of a subtilisin D5, a fibrinolytic enzyme of *Bacillus amyloliquefaciens* DJ-5 isolated from Doenjang. *Korean J. Food Sci. Technol.* **15**: 500-505.
- Choi NS, Seo SY, Kim SH. 1999. Screening of mushrooms having fibrinolytic activity *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**: 553-557.
- Choi WA, Lee JW, 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.
- Gomez CC, Simoncarballo R, Coma AC, Sanchez de Leon T, Montero DE, Rodriguez PR. 1991. The relationship between lipid peroxidation and platelets aggregation in atherosclerotic patients. *Angiologica* **4**: 241-246.
- Harlan JM, Harker LA. 1981. Hemostasis, thrombosis, and thromboembolic disorders. *Med. Clin. North. Am.* **65**: 855-857.
- Hasegawa M, Fujiwara M. 1993. Relative efficiencies of the maximum likelihood, maximum parsimony, and neighbor-joining methods for estimating protein phylogeny. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2**: 1-5.
- Hsiao CR, Huang L, Bouchara JP, Barton R, Li HC, Chang TC. 2005. Identification of medically important molds by an oligonucleotide array. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 3760-3768.
- Hwang JH. 2010. The fermentative characteristics of cheong-

- gukjang prepared by starter culture of *Bacillus* sp. with fibrinolytic activity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**: 1832-1838.
11. Jang IJ, Kim YH, Yi SH, Lim SI, Lee JS. 2011. Screening of a new fibrinolytic substances-producing yeast. *Korean J. Mycol.* **39**: 227-228.
 12. Jang YR, Kim WK, Kwon IB, Lee HY. 1998. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from Jeot-Gal, salt-fermented fish. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**: 655-659.
 13. Kim DH, Song HP, Kim KY, Kim JO, Byun MW. 2004. A correlation between fibrinolytic activity and microflora in Korean fermented soybean products. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**: 41-46.
 14. Kim HK, Kim GT, Kim DK, Choi WA, Park SH, Jeong YK, et al. 1997. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermented fish. *J. Ferment. Bioeng.* **84**: 307-312.
 15. Kim SH, Choi NS, Lee WY, Lee JW, Kim DH. 1998. Isolation of *Bacillus* strains secreting fibrinolytic enzymes from Doenjang. *Korean J. Microbiol.* **34**: 87-90.
 16. Kim WK, Choi KH, Kim YT, Park HH, Choi JY, Lee YS, et al. 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.
 17. Kumar C, Sharma R, Bachhawat AK. 2003. Investigations into the polymorphisms at the ECM38 locus of two widely used *Saccharomyces cerevisiae* S288C strains, YPH499 and BY4742. *Yeast* **20**: 857-863.
 18. Lee CY. 1989. Korean soy seasonings and culture. *Food Sci. Ind.* **22**: 3-7.
 19. Lee SK, Heo S, Bae DH, Choi KH. 1998. Medium optimization for fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* KCK-7 isolate from Korean traditional Chungkookjang. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 226-231.
 20. Masuda S, Yamaguchi H, Kurokawa T, Shirakami T, Tsuji RF, Nishimura I. 2008. Immunomodulatory effect of halophilic lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus* Th221 from soy sauce moromi grown in high-salt medium. *Int. J. Food Microbiol.* **121**: 245-252.
 21. Mullertz S. 1987. Fibrinolysis, general aspects, characteristic features and perspectives: International committee for fibrinolysis kabi prize lecture. *Fibrinolysis* **1**: 3-12.
 22. Nakajima N, Mihara H, Sumi H. 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**: 1726-1730.
 23. Nakajima N, Taya N, Sumi H. 1993. Potent fibrinolytic enzyme from the lysate of *Katsuwonus pelamis* digestive tract (Shio-kara): purification and characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**: 1604-1605.
 24. Nakamura T, Yamagata Y, Ichishima E. 1992. Nucleotide sequence of the subtilisin NAT gene, *aprN*, of *Bacillus subtilis* (natto). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**: 1869-1871.
 25. Nakashima A, Okada T, Sugie I. 1990. Fibrin-dependent activation of plasminogen by a proteolytic digest of streptokinase. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **1**: 279-284.
 26. Nicolet CM, Craig EA. 1989. Isolation and characterization of ST11, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 3638-3646.
 27. Noh K, Kim D, Choi N, Kim S. 1999. Isolation of fibrinolytic enzyme producing strains from Kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**: 219-223.
 28. Oh YS, Park JE, Oh HJ, Kim JH, Oh MC, Oh CK, et al. 2010. Isolation and Characteristics of microorganisms producing extracellular enzymes from Jeju traditional fermented soybean paste(Doenjang). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**: 47-53.
 29. Park JS, Hyun KW, Seo SB, Cho SM, Yoo CH, Lee JS. 2003. Detection of platelet aggregation inhibitors and fibrinolytic substances from mushrooms. *Korean Soc. Mycology* **31**: 114-116.
 30. Phromraksa P, Nagano H, Boonmars T, Kamboonruang C. 2008. Identification of proteolytic bacteria from Thai traditional fermented food and their allergenic reducing potentials. *J. Food Sci.* **73**: 189-195.
 31. Rhee KH. 2011. Isolation and identification of a *Streptomyces* sp. that produces antibiotics against multidrug. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 37-42.
 32. Rijken DC, Sakharov DV. 2001. Basic principles in thrombolysis: regulatory role of plasminogen. *Thromb. Res.* **103**: 41-49.
 33. Ryu BH. 2003. Development of functional Doenjang for antioxidative and fibrinolytic activity. *Korean J. Life Sci.* **13**: 559-568.
 34. Seo DS, Ko JA, Gal SW, Lee SW. 2010. Characterization of *Bacillus licheniformis* KJ-9 isolated from soil. *J. Life Sci.* **20**: 403-410.
 35. Sloma A, Rufo GA, Jr., Rudolph CF, Sullivan BJ, Theriault KA, Pero J. 1990. Bacillopeptidase F of *Bacillus subtilis*: purification of the protein and cloning of the gene. *J. Bacteriol.* **172**: 5520-5521.
 36. Voet D, Voet JG. 1990. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, New York.
 37. Wu XC, Nathoo S, Pang AS, Carne T, Wong SL. 1990. Cloning, genetic organization, and characterization of a structural gene encoding bacillopeptidase F from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **265**: 6845-6850.
 38. Yoshikatsu M, Mitsuo Y. 2008. Traditional healthful fermented products of Japan. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 791-798.