

Bacillus subtilis BK-17 유래 혈전용해 효소의 특성

백 현 · 임학섭¹ · 정경태 · 최영현² · 최병태² · 서민정 · 김지은 · 류은주³ · 허만규⁴ · 주우홍⁵ · 정영기*¹

¹동의대학교 자연과학대학 생명응용과학과, ¹(주)천년약속 바이오연구소, ²동의대학교 한의과대학, ³한서대학교 미용학과, ⁴분자생물학과,
⁵창원대학교 생물학과

Received October 18, 2005 / Accepted December 13, 2005

Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus subtilis* BK-17. Baek, Hyun, Hak-Seob Lim¹, Kyung Kae Chung, Yung Hyun Choi², Byung Tae Choi², Min-Jeong Seo, Ji-Eun Kim, Eun-Ju Ryu³, Man Kyu Huh⁴, Woo Hong Joo⁵ and Yong Kee Jeong^{*1}. Department of Life Science and Biotechnology, Dongeui University, Busan 614-714, ¹Institute of BIO, MILLENNIUM PROMISE CO., LTD., Gijang-gu, Busan 619-962, ²College of Oriental Medicine, Dongeui University, Busan 614-052, ³Department of Cosmetology, Hanseo University, Chungnam 356-824, ⁴Department of Molecular Biology, Dongeui University, Busan 614-714, ⁵Department of Biology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea. — A bacterium, producing a fibrinolytic enzyme, was screened from a decaying rice plant. The bacterium was identified as *Bacillus subtilis* by morphological, biochemical, and physiological properties and named *Bacillus subtilis* BK-17. The fibrinolytic enzyme (BK) was purified from supernatant of *Bacillus subtilis* BK-17 culture broth. The molecular weight was 31 kDa as determined by SDS-PAGE. The effect of temperature, pH, and plasminogen on the activity of the bacillokinase (BK) was analysed and the activity was compared with urokinase. The optimal temperature and pH were 50°C and pH 7, pH 8, respectively. The BK activity was inhibited to 45%, 35%, and 23% with 1mM EDTA, Zn²⁺, and Ca²⁺, respectively. However, Mg²⁺, Mn²⁺, and Co²⁺ ions did not have any significant effect on the enzyme activity. The BK showed the activity in the both plates, plasminogen-free fibrin plate and plasminogen-rich fibrin plate. The result indicates that the BK can directly act the fibrin. In comparison of fibrinolytic activity with urokinase on the fibrin plate, the BK shows about 20 folds higher activity than that of the urokinase.

Key words – Fibrinolytic enzyme, Bacillokinase(BK), Fibrin plate, Plasminogen activator, *Bacillus subtilis*

최근 급속한 시대적 변화에 대응하여 간편하고 편리한 식문화 형성으로 인하여 혈액순환 장애에 따른 심·혈관계의 질환 발병률이 증가하고 있으며, 이로 인한 사망률 역시 급속히 증가되고 있다. 상처 혹은 혈전 형성 자극이 유발되면 혈관내피 세포의 변화로 지혈에 관여하는 세포내 단백질들의 분비 및 혈소판 세포 표면의 특성이 변하여 혈전형성 환경이 조성된다. 혈소판 부착 및 활성, 동시에 혈장응고 활성이 트롬빈 형성을 촉진하여 피브린이 축적된다[21]. 일반적으로 혈관내의 피브린 축적으로 인한 혈전의 형성 및 증가로 혈액의 흐름을 방해하거나 혈관을 따라 이동하면서 뇌경색, 심근경색과 같은 질병을 유발한다. 그러므로 혈전은 혈액 순환계 질환의 대표적인 원인중의 하나이다. 혈전은 상처회복 후 프라즈민(plasmin)과 같은 혈전분해 효소(fibrinolytic enzyme)에 의해서 분해된다[14]. 만약 생성된 혈전이 과도하게 축적되거나 혈전용해 기작이 원활하게 작동하지 않을 경우 혈전증(thrombosis)을 유발하여 인체에 치명적인 손상을 줄 수도 있다. 따라서 혈전분해 시스템은 혈관기능 유지 및 혈

관외벽의 피브린 축적의 분해에 있어서 필수적이다. 또한 병리학적 상태에서 다수의 다른 단백질 분해 효소들과 협력하여 세포외 기질들의 분해에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 프라즈민은 혈전분해 시스템에서 피브린 분해의 핵심 단백질 분해제이다[3].

*Bacillus*속의 균주들은 혈전분해 효소를 포함하여 다양한 종류의 단백질 분해효소들을 분비하는 특성이 있다[1,6,9]. 최근 한국과 일본을 중심으로 전통발효 식품에서 혈전분해 능을 가진 많은 *Bacillus* 속의 균주들이 분리되고 있으며, 이들이 분비하는 혈전효소에 대한 연구가 진행되어오고 있다 [8,12,16,19]. 특히 일본의 전통대두 발효식품인 natto (nattokinase)와 절임 식품인 Shiokara (katsuwokinase)에서 혈전용해 효소 생산균주를 분리하고 효소를 정제 하였으며, 이의 경구 투여 시 생체내의 혈전 용해능을 높일 수 있다고 보고하였다[16,17,19]. 현재 사용되고 있는 혈전분해제로는 urokinase (UK)[15,18,20,22], streptokinase(SK)[13], tissue type plasminogen activator (tPA)[3]등이 있다. 하지만 이와 같은 제품은 반감기가 짧고, 가격이 매우 비싼 단점을 지니고 있다. 또한 urokinase를 제외하고는 경구투여가 불가능한 실정이다. 따라서 이러한 단점들을 해결하고자 본 연구진은 이

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1534, Fax : +82-51-894-0840
E-mail : ykjeong@deu.ac.kr

전 연구에서 한국인이 오랫동안 먹어오고 있는 식품인 김치 및 멸치 젓갈로부터 혈전용해 효소를 분리하고 그 활성에 대해 보고하였다[5,7]. 본 연구에서는 볶짚으로부터 혈전 용해력을 가진 균주를 분리·동정하고, 이 균주가 생산하는 혈전용해 효소의 특성에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

혈전용해효소 생산균주의 분리

경남 김해 일대에서 채취한 마른 볶짚을 2-3 cm의 크기로 자른 다음 분리용 배지(2.0% glucose, 1.0% bacto peptone, 0.1% K₂PO₄, 0.5% NaCl, pH 7.0)가 들어있는 18 mm 시험관에 넣고 37°C에서 24시간동안 진탕배양한 후 멸균수로 10⁻⁵ 까지 희석한 시료 100 ml를 분리용 고체 배지에 도말봉으로 접종하여, 37°C에서 1-2일간 배양시켰다. 생성된 동일한 colony들을 각 2장의 LB 평판배지(1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% agar)에 나누어 toothpick 하여 37°C에서 24시간 배양 후 그중 한 장의 평판배지에 0.6% fibrinogen solution과 20 unit thrombin으로 조성된 배지를 중층하고 37°C에서 24시간 배양시켰다. 이를 중 fibrin을 분해시켜 clear zone을 형성하는 균주를 확인하고 보관중인 다른 1장의 평판배지에서 동일한 colony를 선택하여 분리용 액체 배지에 배양하여 그 상등액에서 혈전용해 활성을 검토한 후 최종적으로 균을 선별하였다.

미생물의 동정

선발된 균주 BK-17의 분류학적 동정을 위해 전자현미경 활용 및 Bergey's manual of systematic bacteriology 방법에 따라 형태학적, 생화학적 특성을 조사하여 최종적으로 *Bacillus subtilis*로 동정하였다.

혈전용해효소의 분리 및 정제

에탄올 침전

부탄올을 사용하여 *Bacillus subtilis* BK-17의 배양액을 감압 evaporator로 농축하였다. 농축한 배양액을 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 투석한 후 에탄올로 먼저 55%가 되게 농축한 배양액과 혼합하여 4°C에서 4시간 방치한 후 원심분리(12,000 rpm, 20 min, 4°C) 하여 침전물을 제거하고 다시 동일한 방법으로 75%가 되게 농축한 배양액과 혼합하여 4°C에서 24시간 방치한 후 원심분리(12,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 수거한 침전물을 수거하여 상기 buffer에 녹인 다음 투석하여 활성을 검정하고, 다음 정제단계의 시료로 사용하였다.

DEAE-A50 chromatography

투석한 조효소액을 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 평형화된 DEAE Sephadex A-50 column (4×15 cm)에 흡착시키고 동일buffer로 용출하면서 비 흡착된 부분의 분획 중 혈

전용해 활성이 있는 부분만을 다음 정제단계에 사용하였다.

Sephadex G-75 gel filtration

전 단계에서 얻은 효소액을 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer로 투석 후 동결 건조하여 Sephadex G-75로 gel filtration을 행하였다. Sephadex G-75은 100 mM NaCl이 함유된 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer로 평형화 시킨 것을 column (1×120 cm)에 충전하여 사용하였다. 시간당 4.0 ml 정도의 유속으로 1 fraction에 1 ml씩 분취하여 혈전용해 활성과 단백질을 측정하여 활성 분획을 취하였다.

혈전용해 활성의 측정(fibrin plate assay)

Haverkata-Trass의 fibrin plate법[4]에 따라 2% gelatin 용액에 녹인 0.2% fibrinogen 용액 10 ml에 0.2 M borate 완충용액(pH 7.8)에 녹인 thrombin 20 unit를 적하하여 잘 섞은 후 이를 petri-dish에 부어 fibrin막을 만들었다. 효소용액을 100 µl씩 paper disc에 흡입시켜 plate에 놓고 37°C에서 18시간 방치하였다. 효소에 의해 fibrin막이 용해되면 용해면적을 측정하여 상대적인 활성을 측정하였다. Fibrin plate는 plasminogen이 제거된 fibrinogen과 plasminogen이 포함된 fibrinogen을 이용하여 두 가지 방법으로 준비하였다.

분자량 측정

분리된 단백질의 분자량은 전기영동을 실시하여 결정 하였으며 전기영동은 4% stacking gel 과 12.5% separating gel로 이루어진 SDS-PAGE[11]를 사용하여 100V에서 2시간 동안 전기영동한 후 gel을 coomassie로 염색하였다. 분자량 측정을 위해 low molecular weight standard (Bio-rad)를 사용하였다.

효소활성에 대한 pH의 영향

효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위해 농축한 효소를 20 mM sodium citrate buffer (pH 3.0, 4.0, 5.0), 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0, 7.0), 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 20 mM sodium carbonate buffer (pH 9.0, 10.0)로 희석하여 pH 별로 조정한 다음, 4°C에서 24시간 방치한 후 잔존활성을 측정하였고, 최적 반응 pH는 각 pH별로 조정된 효소액을 사용하여 효소활성의 pH 의존성을 검토하였다.

효소활성에 대한 온도의 영향

효소의 최적반응 온도를 결정하기 위해 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 녹인 효소를 점진한 fibrin plate (pH 7.8)를 각 20°C에서 80°C 범위의 배양기에 넣고 4시간 후 plate의

용해면적을 측정하여 효소의 활성을 비교하였다. 온도의 안정성은 효소액을 20°C~80°C까지 각각 30분간 열처리 한 후 효소를 점진한 fibrin plate (pH 7.8)를 37°C에서 4시간 동

안방치한 후 잔존 활성을 측정하였다.

효소활성에 미치는 금속 2가 이온의 영향

정제한 효소의 활성에 대한 금속 이온의 영향을 알아보기 위하여 CaCl_2 , CoCl_2 , CuSO_4 , FeSO_4 , MgSO_4 , ZnSO_4 , EDTA를 최종 농도가 각각 1 mM이 되도록 혈전용해 효소를 녹인 20 mM Tris-HCl buffer (pH7.5)에 첨가한 뒤, 효소와 금속 2가 이온이 포함 혹은 효소만 포함된 용액을 100 μl 씩 paper disc에 흡입시켜 fibrin plate에 접착하고 37°C에서 8시간 반응 후 효소만 포함된 용해된 면적을 100%으로하여 각각의 금속이온이 포함된 효소용액의 용해된 면적을 상대적 측정값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

경남 김해시 일대에서 채취한 마른 벗짚으로부터 균주를 분리한 다음 이들 중 혈전용해 효소를 생산하는 균주를 선정하였다. 선정된 균주는 Gram 양성의 균주로 그 크기는 약 $0.49 \times 1.59 \mu\text{l}$ 이었으며, 운동성이 있고 호기성이며 내생포자를 형성하였다(Fig. 1). 최적 배양온도는 35°C였고, 20°C에서 45°C까지 생육가능하였다. 생육 가능한 pH의 범위는 5.0~9.0이었고, 생육 최적 pH는 7.0이었다. 생화학적, 생리학적 특성은 Table 1에 나타내었다. 결론적으로 이 균주의 형태학적, 생화학적, 생리학적 특성을 분석해본 결과 *Bacillus subtilis*인 것으로 확인되었다.

분자량 측정

BK는 부탄올 농축, 투석, 에탄올 침전, DEAE Sephadex A-50 chromatography, 그리고 Sephadex G-75 gel filtration

Table 1. Identification of strain BK-17 on their physiological and biochemical characteristics.

Biochemical properties	BK-17	<i>S. subtilis</i>
Gram staining	+, Rod	+, Rod
Spore	+	+
Arginine	-	-
Citrate	+	+
Esculin	+	+
Gelatin	+	+
V-P	+	+
Glucose	+	+
Mannitol	+	+
Sucrose	+	+
Arabinose	+	+
Mannose	+	+
Ortho nitrophenyl galactosidase	-	-
Nitrate reduction	+	-
Growth at		
10°C	-	-
25°C	+	+
35°C	+	+
45°C	+	+
55°C	-	-

The isolated strain BK-17 was identified as *B. subtilis*.

을 이용하여 정제하였다. 이 정제된 효소를 SDS-PAGE 전기영동 결과 단일 band를 확인 할 수 있었으며, 그 분자량은 약 31 kDa 이었다(Fig. 2). *Bacillus subtilis* BK-17 균주가 생산하는 fibrinolytic enzyme(BK)의 분자량은 지금까지 알려진 *Bacillus subtilis* k-54(29 kDa)[24]와 *Bacillus* sp. CK11-4(28 kDa)[10]이 생산하는 fibrinolytic enzyme과 유사하였으나, *Bacillus subtilis* KCK-7(45 kDa)[12], *Bacillus amyloliquefaciens* K42(45 kDa)[25]가 분비하는 혈전분해 효소의 분자량보다 작았다.

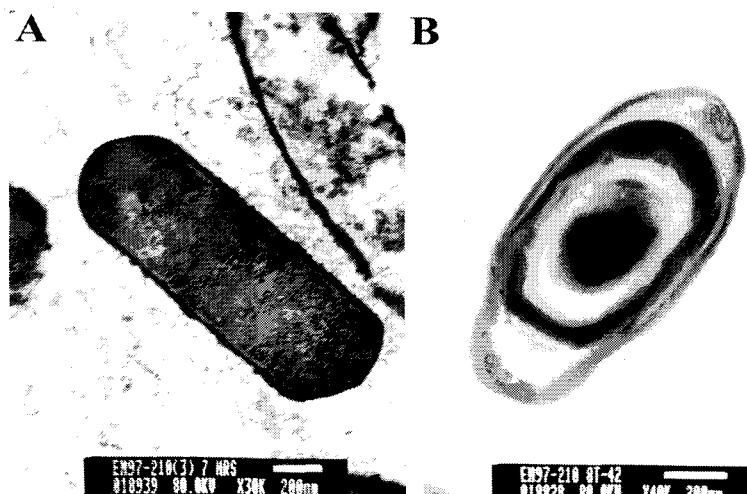


Fig. 1. Transmission electron micrograph of the isolated strain BK-17. A; 8 hr cultivated cell, B; 60 hr cultivated cell.

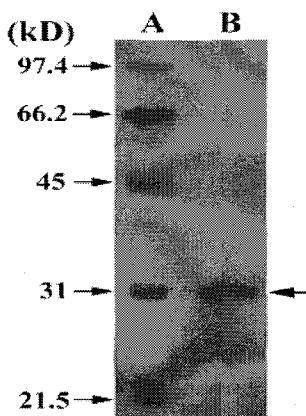


Fig. 2. Molecular weight of purified fibrinolytic enzyme on SDS-PAGE. A; low molecular weight marker protein, B; arrow indicates a purified fibrinolytic enzyme.

효소활성과 안정성에 대한 pH의 영향

BK의 활성 및 안정성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해 pH 4.0~10.0까지 조정한 반응액을 이용하여 활성 및 안정성을 검토한 결과(Fig. 3), BK의 활성은 pH 7과 8에서 최대였다. pH 7 및 8에서의 활성을 100%로 하였을 때, pH 4.5, 6.4에서 각각 50%, 75%, 95%의 활성을 유지했으며 pH 9와 10에서는 각각 85%와 80%의 활성을 나타내었다. 따라서 BK는 산성에서보다 알칼리에서 더 좋은 활성을 유지하였다(Fig. 3). 이 결과는 양[23]등이 보고한 멸치액젓 유래의 MK와 백[12]등이 보고한 *Bacillus subtilis* KCK-7가 분비하는 fibrinolytic enzyme과 비슷한 양상을 보였다. BK의 pH에 대한 안정성은 활성이 보인 양상과 비슷하였다(Fig. 3). 결론적으로 BK의 최적 활성 및 안정성을 보여주는 pH는 7과 8로 나타났다.

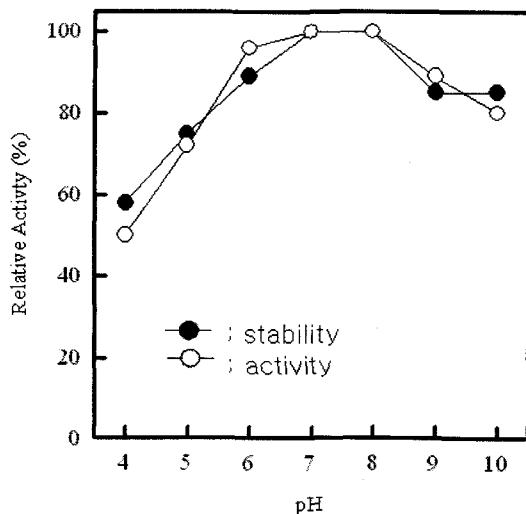


Fig. 3. Effect of pH on the stability and activity of the purified fibrinolytic enzyme.

효소의 활성 및 안정에 대한 온도의 영향

BK의 활성 및 안정성에 미치는 온도의 영향을 검토하기 위해 반응온도를 20°C~60°C 범위에서 10°C 간격으로 30분 동안 반응시켜 BK의 상대활성 및 안정성을 표시한 결과, BK는 50°C에서 반응최적 온도를 보였다(Fig. 4). 20°C에서 50°C까지 BK의 활성은 점진적으로 증가되었으며, 그 이상의 온도에서는 급격히 감소하여 50°C에서 BK의 활성을 100%로 보았을 때, 60°C에서 40%, 80에서 20%의 활성을 보였다. 이 결과는 윤[25]등이 보고한 *Bacillus amyloliquefaciens* K42가 생산하는 fibrinolytic enzyme과 백[12]등이 보고한 *Bacillus subtilis* KCK-7이 분비하는 fibrinolytic enzyme과 비슷한 양상을 보였다. BK의 온도에 대한 안정성은 20°C~50°C 범위에서 아주 높았으며, 60°C~80°C 범위에서는 급격히 감소되었다. 이 결과 역시 윤[25]등, 백[12]등이 보고한 결과와 유사하였다. BK의 최적 활성 및 안정성의 온도는 50°C이었다.

효소활성에 대한 금속 이온의 영향

금속이온이 첨가되지 않았을 때의 활성을 100%로 하여 그 상대적인 활성을 측정하였을 때, 1 mM의 Mg²⁺와 Mn²⁺에 100% 활성을 유지 하였으며, Zn²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Co²⁺에 대해서는 각각 65%, 77%, 77%, 82%, 95%의 활성을 나타내었다(Table 2). 반면 동일농도의 EDTA에 의해서 45%의 활성저해를 보였다. 이러한 사실은 기존의 대두발효식품인 natto와 청국장, 된장에서 분리한 fibrinolytic enzyme이 대부분 serine enzyme[1,2]인 것인데 반해 본 연구의 *B. subtilis* BK-17이 생산하는 fibrinolytic enzyme은 metallo enzyme인 것으로 생각된다.

기질에 대한 특이성

혈전용해효소는 fibrin을 분해하는 양상에 따라 2가지로

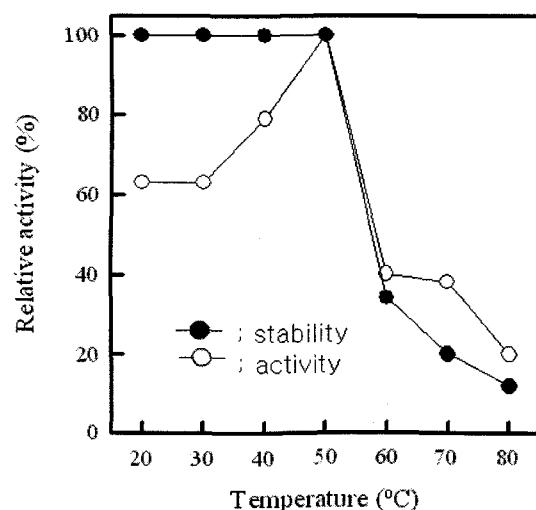


Fig. 4. Effect of temperature on the stability and activity of the purified fibrinolytic enzyme.

Table 2. Effect of various metal ions on activity of fibrinolytic enzyme purified from *Bacillus subtilis* BK-17

Metal ions	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control	0	100
Ca ²⁺	1	77
Co ²⁺	1	95
Cu ²⁺	1	82
Fe ²⁺	1	77
Mg ²⁺	1	100
Mn ²⁺	1	100
Zn ²⁺	1	65
EDTA	1	55

나눌 수 있다. 그 중 하나는 혈액 중 plasminogen을 active type인 plasmin으로 변화시켜 plasmin으로 하여금 혈전(fibrin)을 분해하도록 하는 plasminogen activator type과 이와 상관없이 효소자체가 직접 혈전을 분해시키는 direct active type이 있다. 이를 확인하기 위하여 plasminogen-rich fibrin plate와 plasminogen-free fibrin plate를 사용하였다.

그 결과 본 정제효소는 plasminogen-rich fibrin plate에서 뿐만 아니라 plasminogen이 제거된 plasminogen-free fibrin plate에서도 비슷한 fibrin 분해 활성을 보였다(Fig. 5). 그러므로 본 효소는 plasminogen을 plasmin으로 activation하여 plasmin에 의하여 혈전(fibrin)을 분해하도록 하는 plasminogen activator type이라기보다는 fibrin에 직접 활성을 가지는 것으로 생각된다. Fig. 5에 나타난 것처럼, plasminogen rich plate에서 약 10%의 활성이 더 높은 것으로 보아 다소의 plasminogen activator 역할도 할 것으로 사료된다. 첨가적으로 다양한 종류의 기질을 포함한 fibrin plate, red blood agar plate, gelatin plate, skim milk plate, casein plate 등을 이용한 효소활성을 검토한 결과, Fig. 6에 나타난 것과 같이 본 정제 효소는 fibrin plate에서만 clear zone이 형성되었지만, 나머지 plate에서는 전혀 활성을 보이지 않았다. 따라서 BK는 Fig. 6에 나타난 것처럼 fibrin을 특이적으로 분해함이 밝혀졌다.

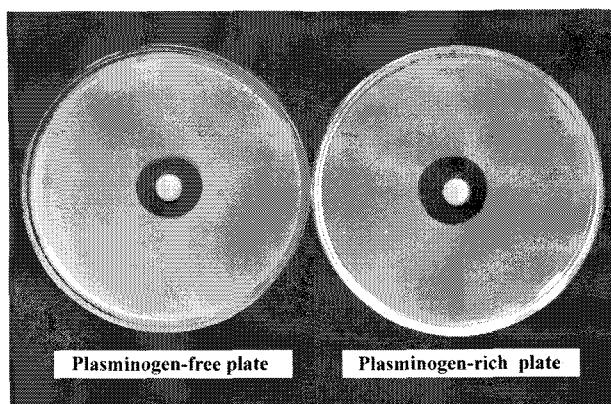


Fig. 5. Comparison of the fibrinolytic enzyme activity on the plasminogen-free fibrin plate and plasminogen-rich fibrin plate.

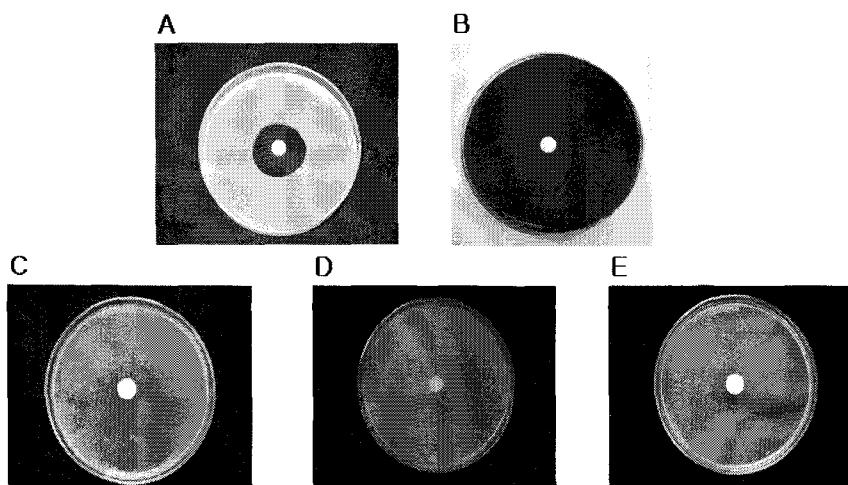


Fig. 6. The fibrinolytic enzyme activities toward various substrates. A; fibrin plate, B; red blood agar plate, C; gelatin plate, D; skim milk plate, E; casein plate

요 약

마른 벗짚으로부터 fibrinolytic enzyme (BK)을 분비하는 균주를 분리하여 동정한 결과, *Bacillus subtilis* 속으로 분류되었다. 분리된 균주(*Bacillus subtilis* BK-17)를 배양하여 그 배양액으로부터 에탄올 침전, ion exchange, gel filtration 등의 과정을 거쳐 fibrinolytic enzyme (BK)를 분리 및 정제하였다. 이 정제된 효소를 SDS-PAGE gel 전기영동한 결과 분자량은 약 31 kDa 이었다. BK의 활성 및 안정성에 대한 pH의 영향을 조사해본 결과, pH 6~8 범위에서 매우 높았고, 최적 pH는 7과 8이었다. 본 효소의 활성 및 안정성에 대한 최적 온도는 50°C 이었으며, 20°C~50°C 범위에서는 안정성이 그대로 유지되었지만 60°C~80°C 범위에서는 현저히 감소하여 50°C에 비해 20%~40%의 활성을 보였다. BK에 대한 활성 역시 안정성과 비슷한 양상을 보였고, 다만 20°C에서 약 62%의 활성을 보였고, 그 이후 50°C까지 지속적으로 증가하여 50°C에서 최대의 활성을 보였다. 실험한 금속이온들 중 1 mM의 Zn²⁺와 Ca²⁺에서 각각 35%와 23%의 저해활성을 보였지만 나머지 이온들에서는 의미 있는 영향이 없었다. 동일농도의 EDTA에 대해서는 45%의 저해활성을 보였기 때문에 BK는 metallo enzyme으로 생각된다. Fibrinogen-rich fibrin plate와 plasminogen-free fibrin plate에서의 분해활성을 검토해본 결과, 두 plate에서 비슷한 분해활성을 보였다. 따라서 본 효소는 plasminogen activator type 보다는 fibrin에 직접 활성을 가지는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Chang, C. T., M. H. Fan, F. C. Kuo and H. Y. Sung. 2000. Potent fibrinolytic enzyme from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3210-3216.
- Cho, S. Y., B. S. Hahn and Y. S. Kim. 1999. Purification and characterization of a novel serine protease with fibrinolytic activity from *Tenodera sinensi* (Chinese Mantid) egg cases. *J. Biochem. Mol. Biol.* **32**, 579-584.
- Collen, D. and H. R. Lijnen. 1991. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* **78**, 3114-3124.
- Haverkate, F. and D. W. Traas. 1974. Dose-response curves in the fibrin plate assay. Fibrinolytic activity of protease. *Thromb. Haemostas.* **32**, 356-365.
- Jeong, Y. K., W. S. Yang, J. O. Kang, I. S. Kong and J. O. Kim. 1995. Fibrinolysis of fermented Kimchi. *J. Life Science* **5**, 203-207.
- Jeong, Y. K., J. U. 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. *J. Microbiol. & Biotechnol.* **17**, 89-92.
- Jeong, Y. K., W. S. Yang, K. H. Kim, K. T. Chung, W. H. Joo, J. H. Kim, D. E. Kim and J. U. Park. 2004. Purification of a fibrinolytic enzyme (mulchikinase) from pickled anchovy and its cytotoxicity to the tumor cell lines. *Biotechnol. Lett.* **26**, 393-397.
- Kim, D. Y., E. T. Lee and S. -D. Kim. 2003. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus subtilis* K7 isolated from Korean traditional soy sauce. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 176-182.
- Kim, H. H., G. T. Kim, D. K. Kim, W. A. Choi, S. H. Park, Y. K. Jeong and Kong, I. S. 1997. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus sp.* KA38 originated from fermented fish. *J. Ferment. and Bioeng.* **84**, 307-312.
- Kim, W. K., K. H. Choi, Y. T. Kim, H. H. Park, J. Y. Lee, Y. S. Choi, H. I. Oh, I. B. Kwon and S. Y. Lee. 1996. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus sp.* strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2482-2488.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Paik, H. -D., S. -K. Lee, S. Heo, S. -Y. Kim, H. -H. Lee and T. -J. Kwon. 2004. Purification and characterization of the fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus subtilis* KCK-7 from ChungKookjang. *Kor. J. Micro. Biotech.* **14**, 829-835.
- Reed, G. L., F. F. Lin, B. Parhami-Seren and P. Kussie. 1995. Identification of plasminogen binding region in streptokinase that is necessary for the creation of streptokinase-plasminogen activator complex. *Biochemistry* **34**, 10266-10271.
- Samis, J. A., G. D. Ramsey, J. B. Walker, M. E. Nesheim and A. R. Giles. 2000. Proteolytic processing of human coagulation factor IX by plasmin. *Blood* **95**, 943-951.
- 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.
- Sumi, H., H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara and H. Muraki. 1987. A novel fibrinolytic enzyme (NK) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia* **43**, 1110-1111.
- Sumi, H., H. Hamada, K. Nakanishi and H. Hiratani. 1990. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of NK. *Acta Haematol.* **84**, 139-143.
- 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.
- Sumi, H., N. Nakajima and C. Yatagai. 1995. A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwo kinase) in skipjack Shiokaza, a Japanese traditional fermented food. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **112**, 543-547.
- Sumi, H., N. Toki, K. Sasaki and K. C. Robbins. 1980. Oral administration of urokinase. *Thromb. Res.* **20**, 711-714.
- Susan, S. 2000. Risk factors for thromboembolism: pathophysiology and detection. *CMAJ.* **163**, 991-994.
- Toki, N., H. Sumi, K. Sasaki, I. Boreisha and K. C.

- Robbins. 1985. Trans-port 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.
23. Yang, W. -S., H. -S. Lim, Y. -H. Kim, K. K. Chung, M. K. Huh, B. T. Choi, Y. H. Choi and Y. K. Jeong. 2005. Characterization of a fibrinolytic enzyme from pickled anchovy. *Kor. J. Life Science.* **15**, 434-438.
24. Yoo, C. -K., W. -S. Seo, C. -S. Lee and S. -M. Kang. 1998. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme excreted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from Chung Guk Jang. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 507-514.
25. Yun, G. -H., E. -T. Lee and S. -D. Kim. 2003. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus amyloliquefaciens* K42 isolated from Korean soy sauce. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 284-291.