

## 한국재래메주에서 분리한 *Scopulariopsis brevicaulis*가 생성하는 Protease의 특성 및 작용양상

최 청\* · 최광수 · 김 성 · 이선호 · 손준호 · 최희진 · 이상선<sup>1</sup> · 안봉전<sup>2</sup>

영남대학교 식품가공학과, <sup>1</sup>한국교원대학교 생물교육학과

<sup>2</sup>동국전문대학향장공업과

**Characteristics and Action Pattern of Protease from *Scopulariopsis brevicaulis* in Korean Traditional Meju.** Cheong Choi\*, Kwang-Soo Choi, Sung Kim, Seon-Ho Lee, Jun-Ho Son, Hee-Jin Choi, Sang-Seon Lee<sup>1</sup> and Bong-Jeon An<sup>2</sup>. Department of Food Science & Technology, Yeungnam University, Kyongsan, 712-749, Korea, <sup>1</sup>Department of Biological Science and Education, The Korea National University of Education, Chongwon-Gun, Chungpook, 363-791, Korea, <sup>2</sup>Department of Cosmetic Engineering, Dong Kook Junior College, Taegu, 702-800, Korea - An alkaline protease producing microorganism was isolated from korean traditional Meju and identified as *Scopulariopsis brevicaulis*. The optimum culture condition of *Scopulariopsis brevicaulis* for the production of alkaline protease was as follow: 2% soluble starch, 0.2%, tryptophan, 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, 0.2% NaHPO<sub>4</sub>, pH 7.5, 35 °C. The optimum pH and temperature for the enzyme activity of alkaline protease producing *Scopulariopsis brevicaulis* were pH 9.0 and 50 °C, respectively. The enzyme was relatively stable at pH 6.0~11.0 and at temperature below 40 °C. The activity of the enzyme was inhibited by Hg<sup>2+</sup> whereas Cu<sup>2+</sup> gave rather activating effects on the enzyme activity. Phenylmethanesulfonyl fluoride inhibited the enzyme activity. This result indicates that serine is very important role in this enzyme. Km value for casein was 1.2410<sup>-4</sup> M/L, V<sub>max</sub> value for casein was 25.99 µg/min. This enzyme hydrolyzed casein more rapidly than the hemoglobin.

우리나라 전통간장제조에 관여하는 미생물군에 대하여(1-7), 또한 간장발효 중의 성분변화(8-12), 기호성(13), 안전성(14-18) 등에 대하여 단편적으로 상당한 연구결과가 축적되어 있으나, 지금까지의 전통간장에 대한 연구는 실험실 규모의 연구일 뿐이라서 이 결과등을 바로 산업화에 적용하기 어려운 상태이다. 최근 재래메주로부터 다양한 접합균류, 불완전균류 등이 분리되었으며, 이들을 이용한 재래식 간장의 맛(19-27)과 향기(28-32), 간장 발효미생물의 육종(33-36) 및 효소특성(37, 38) 등에 대하여 집중 연구하여 오고 있다. 최 등(39)은 간장에서 분리한 *Bacillus*속의 각종 생육특성과 효소적인 차원에서 연구결과를 보고하였으나, 내염성을 가지며 색소를 형성하고 protease 활성이 높은, 특히 전통재래간장의 제조 조건에 부합되는 특성을 가진 우수 균주의 개발은 더욱 절실히 요구되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 전통간장 제조법을 가정에서 자연접종에 의하여 메주를 만드는 대신 순수 분리한 간장 미생물을 발효조에서 starter culture로 배양하여 단기간에 대량 배양하고 발효시키는 방법을 사용하므로써 숙성기간의 단축, 품질의 고급화 및 균일화가 가능한 표준공정의 개발

을 도모하고자 한다. 그러므로 우리기호에 적합한 전통 간장을 산업적으로 대량 제조하기 위하여 재래간장제조 조건에 적합하며 단백질분해활성이 강한 균주를 분리하고, 이 균주가 생성하는 효소의 특성과 작용 양상을 규명하여 전통장류의 산업화를 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주

한국재래 메주로 부터 분리동정한 균주 *Scopulariopsis brevicaulis*를 한국교원대학교에서 분양받아 영남대학교 식품가공학과에서 계대배양하며 사용하였다.

#### 효소생산을 위한 배지 및 배양방법

Czapek-Dox broth에서 예비배양한 후 효소생산용 배지(0.2% soytone, 2% starch, 0.2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.05% KCl)에 1% 되게 접종하여 35 °C에서 14 시간 배양하였다.

#### 효소 생산 조건

효소생산 최적조건을 조사하기 위하여 탄소원, 유기질소원, 무기질소원, 무기염류의 영향과 초기 pH, 온도의 영향을 조사하였다. 탄소원은 2%, 유기질소원은 0.2%,

\*Corresponding author

Tel. 82-53-810-2952, Fax. 82-53-815-1891

Key words: *Scopulariopsis brevicaulis*, Protease, Soy sauce

무기질소원은 0.1%, 무기염류는 0.2%의 농도로 효소생 산용배지에 첨가하고, 초기 pH는 5~9이 범위에서, 배양 온도는 25~45 °C 범위로 배양한 후 protease활성을 측정하였다.

**부분정제 효소액의 조제**

배양된 배지를 원심분리하여 상청액을 조효소액으로 사용하고, 조효소액에 황산 암모늄을 70% 포화되게 가하고 4 °C에서 12시간 방치하여 효소단백질을 응집, 침전시켰다. 침전된 효소단백질은 원심분리하여 회수하였고, 반투막에 넣어 0.2 M boric acid-borax buffer(pH 9.0)안에서 24 시간 동안 투석하였다. 투석 후 동결건조하여 농축하고, Sephadex G-25에 통과시켜 저분자의 불순물질을 제거한뒤 부분정제효소로 사용하였다. 이때 효소의 specific activity는 조효소액이 0.77 unit/mg에서 부분정제 효소의 7.25 unit/mg까지 약 9.4배가량 정제되었다.

**효소활성 측정법**

효소활성은 Anson-Hakihara의 방법(40)을 이용하여 측정하였다. 부분정제효소액 0.5 ml에 0.2 M boric acid-borax buffer (pH 9.0) 1 ml를 가한 다음 기질용액(0.6% w/v, Harmmarstein milk casein, pH 9.0) 2.5 ml를 넣고 37 °C에서 30 분간 반응시켰다. 반응 후 0.44 M tri-chloroacetic acid 2.5 ml를 넣어 반응을 중지시키고 실온에서 10 분간 방치한 다음 여과하여 얻은 여액 1 ml에 0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 10 ml와 1 ml의 Folin-ciocalteu용액을 넣어 37 °C에서 30 분간 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소단위는 효소액 1 ml가 1 분간 1 µg의 tyrosine을 생성하는 것으로 정하였다.

**단백질의 정량**

Lowry 등의 방법(41)에 따라 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 단백질량을 측정하였다.

**기질에 대한 특이성**

본 효소의 기질에 대한 특이성을 알아보기 위하여 각 0.6%의 casein, hemoglobin을 제조하여 시간별 효소활성도를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

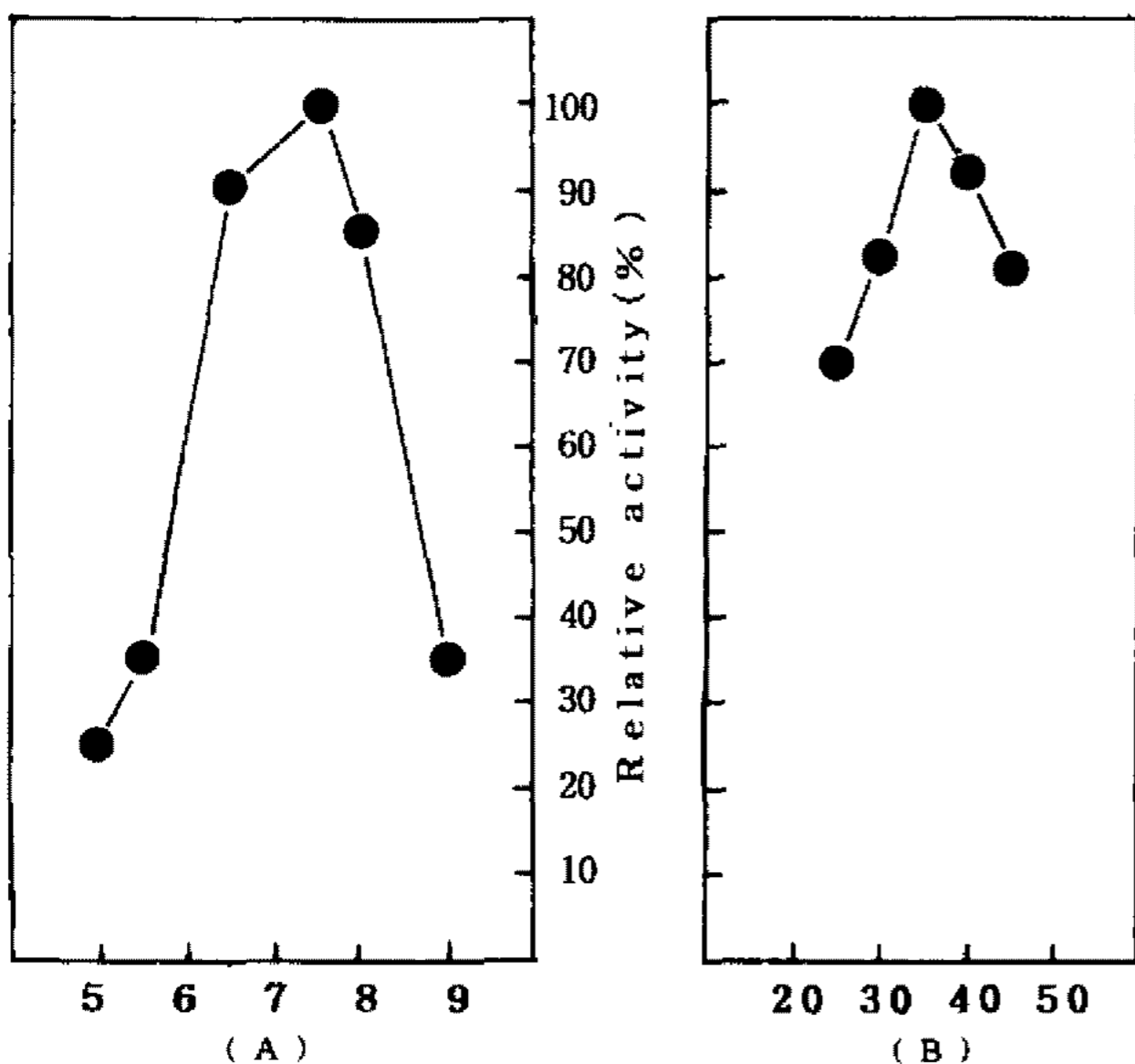
**효소생성을 위한 최적 조건**

**배양온도 및 pH의 영향** Scopulariopsis brevicaulis의 alkaline protease생산을 위한 최적배양온도와 최적배양 pH를 조사한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 pH 7.5에서 35 °C로 배양했을때 최대의 생산을 보였다.

**탄소원의 영향** 효소의 생성에 미치는 탄소원의 영향을 알아보기 위하여 각 탄소원을 2%되게 첨가하고 배양시킨 결과 Table 1에서와 같이 soluble starch첨가시에 약 267% 정도의 활성증가가 있었으며 다른 탄소원에서는 활성 증가가 관찰되지 않았다.

**Table 1. Effect of various sources on protease production**

Source	Component	Relative activity(%)
Carbon (2%, w/v)	glucose	156.4
	soluble starch	267.0
	fructose	176.4
	maltose	147.3
	sucrose	85.5
	lactose	100.0
	xylose	143.6
	galactose	85.5
Organic nitrogen (0.2%, w/v)	yeast extract	92.0
	casein	45.0
	tryptophan	190.6
	peptone	40.9
	skim milk	60.4
Inorganic nitrogen (0.1%, w/v)	soytone	49.7
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	157.7
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	205.8
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	103.8
	NaNO <sub>2</sub>	88.5
	NaNO <sub>3</sub>	100.0
	CaNO <sub>3</sub>	100.0
Inorganic salt (0.2%, w.v)	KNO <sub>3</sub>	84.6
	CaCl <sub>2</sub>	94.1
	CuSO <sub>4</sub>	121.6
	FeSO <sub>4</sub>	88.2
	MgSO <sub>4</sub>	94.1
Control	NaHPO <sub>4</sub>	200.0
	None	100.0



**Fig. 1. Effect of initial pH(A) and incubation temperature(B) on the protease from Scopulariopsis brevicaulis.**

**유기질소원의 영향** 배지에 유기질소원을 첨가하였을 때 효소생산에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 각종 유기질소원을 각 0.2%씩 배지에 첨가하여 35°C에서 1일간 배양한 결과 Table 1과 같이 tryptophan이 가장 효과적이었다.

**무기질소원의 영향** 무기질소원을 배지에 첨가하였을 때 효소생산에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 각종의 무기질소원을 0.1% 농도로 첨가하여 35°C에서 1일간 배양한 결과 Table 1과 같이  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 이 가장 효과적이었다.

**무기염류의 영향** 각종 무기염류를 배지에 각 0.2% 농도로 첨가하고 35°C에서 1일간 배양시킨 결과 Table 1에서와 같이  $\text{NaHPO}_4$ 가 가장 효과적이었다.

### 효소의 특성

**효소작용의 최적 pH** pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 0.2 M Britton-Robinson buffer (pH 3~12)를 사용하여 완충용액 1 ml에 기질 2.5 ml를 혼합한 다음 효소 0.5 ml를 가하여 30°C에서 1시간 방치한 후 효소활성을 측정된 결과 Fig. 2와 같이 효소의 최적 pH는 9.0이었으며, pH 11까지의 알칼리범위에서 활성이 고르게 높았다. 차 등(42)은 *A. fumigatus*의 alkaline protease가 pH 9.0에서 최대 활성을 보였다는 보고와는 비슷하였고, 세균 유래의 alkaline protease (16~19)의 pH 10-12 보다는 다소 낮은 편이었으나 활성의 정도가 7~11까지는 거의 90% 이상으로 유지되어 다른 효소들의 pH양상과는 다소 다르게 나타났다.

**pH 안정성** 본 효소의 pH 안정성을 조사하기 위하여 0.2 M Britton-Robinson buffer (pH 3~12)를 사용하여 각 pH의 buffer 1 ml에 효소 0.5 ml를 가한 다음 각

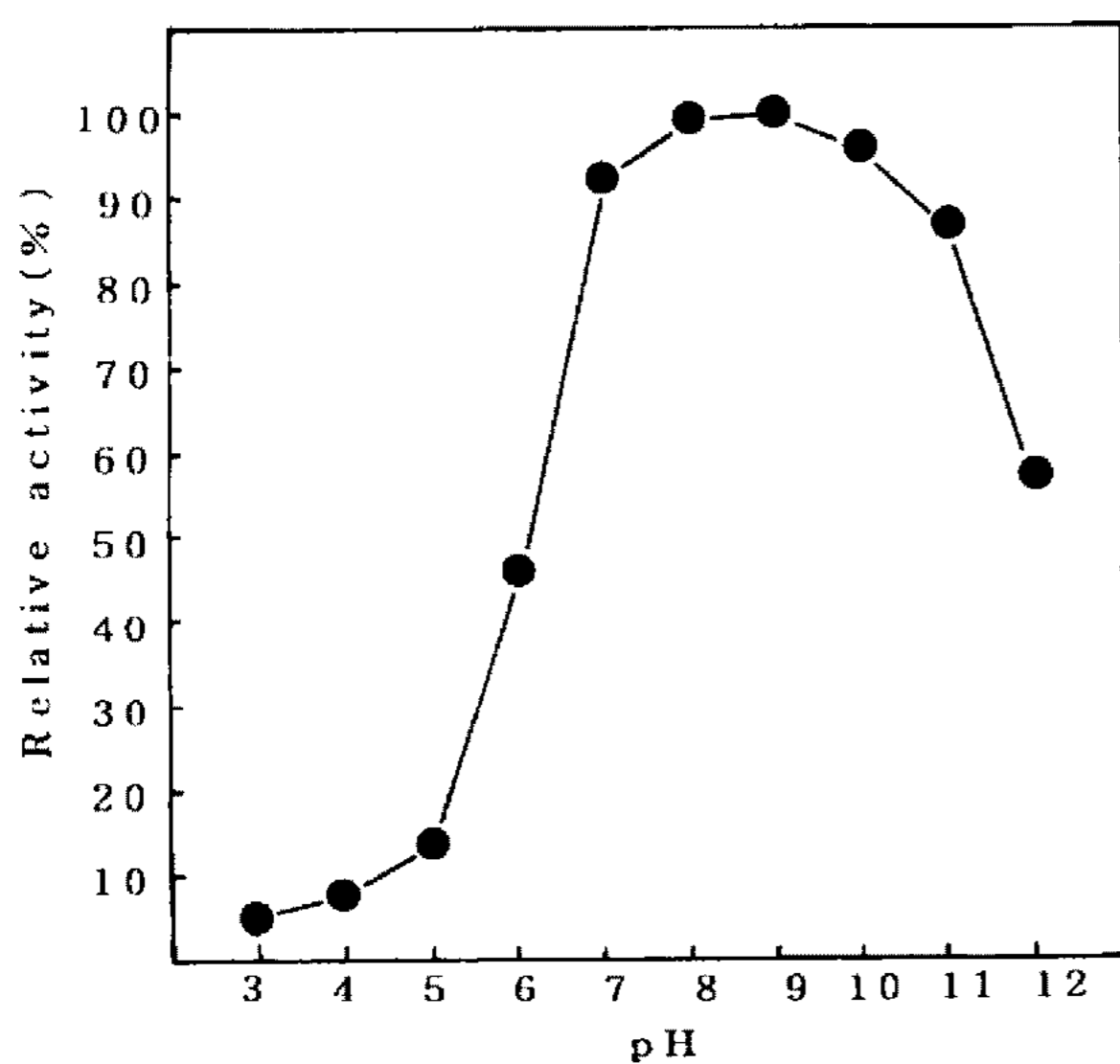


Fig. 2. Effect of pH on the activity of protease from *Scopulariopsis brevicaulis*.

pH를 정확하게 보정하고 30°C에서 1시간 방치한 다음 최적 pH인 9.0으로 조절하고 잔존활성을 측정된 결과 Fig. 3과 같이 pH 6~11까지 그 안정범위가 대단히 넓은 것을 관찰할 수 있어 상당한 내알칼리성을 띠고 있는 것으로 판단되었다. 정 등(43), Tsuru 등(44), Fukasawa 등(45), Toshhiro(46)는 *Myriococcum*속, *B. subtilis*, *V. harvovi*, *Streptomyces*속의 alkaline protease 안정범위가 pH 6~11까지라고 하였으며 본 균주가 생산하는 효소와 유사하였다.

**효소작용의 최적 온도** 효소활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 효소액 0.5 ml에 기질용액 2.5 ml와 1 ml의 boric acid-borax buffer (pH 9.0)를 혼합하여 20~80°C로 반응온도를 변화시키면서 활성을 측정된 결과는 Fig. 4와 같이 50°C에서 최대활성을 보였으나 60°C 이상에서는 급격한 효소활성의 감소가 발생하였다. 정 등(43), Tsuru 등(44)은 *Myriococcum* sp., *B. sub-*

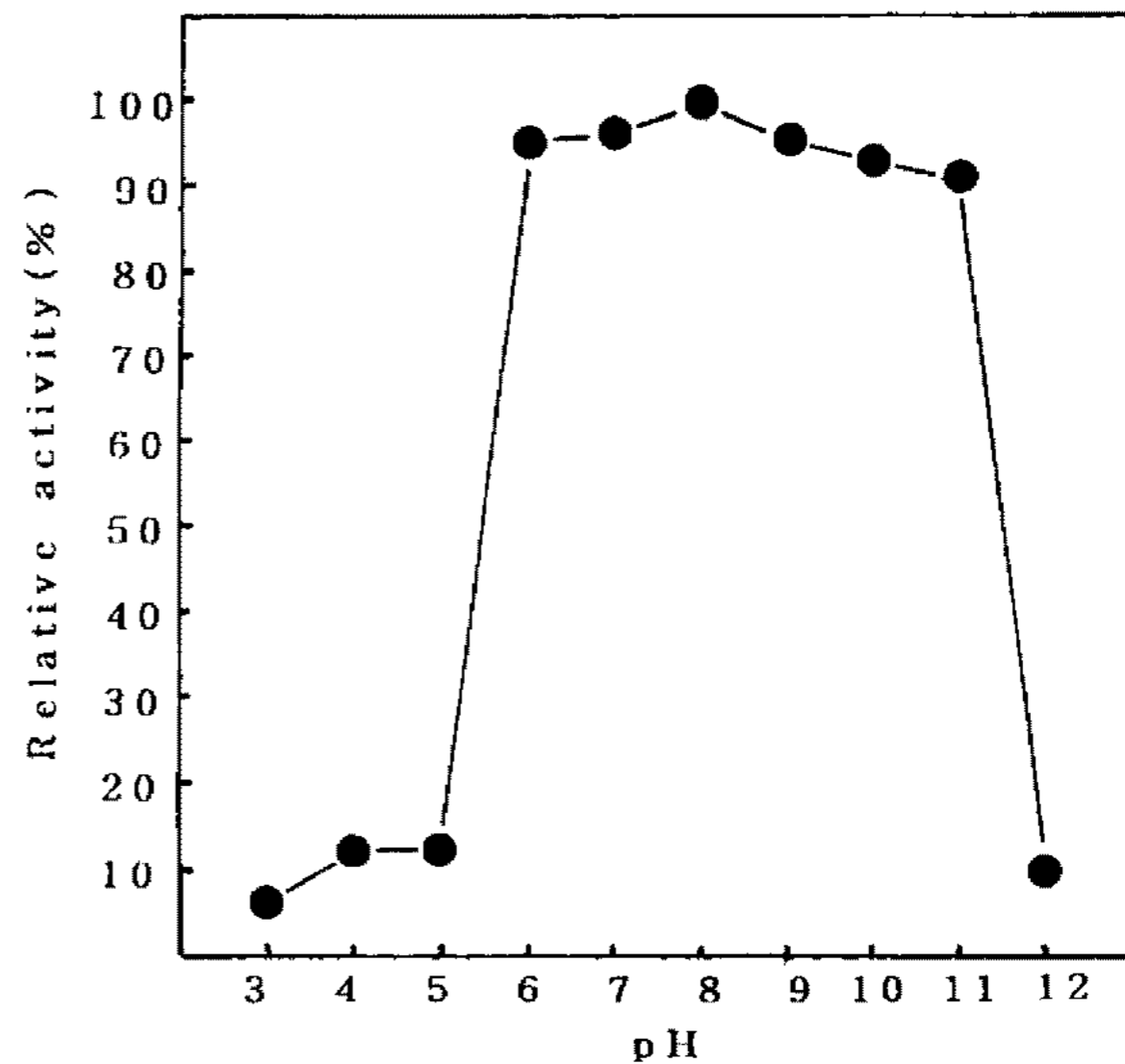


Fig. 3. pH stability of protease from *Scopulariopsis brevicaulis*.

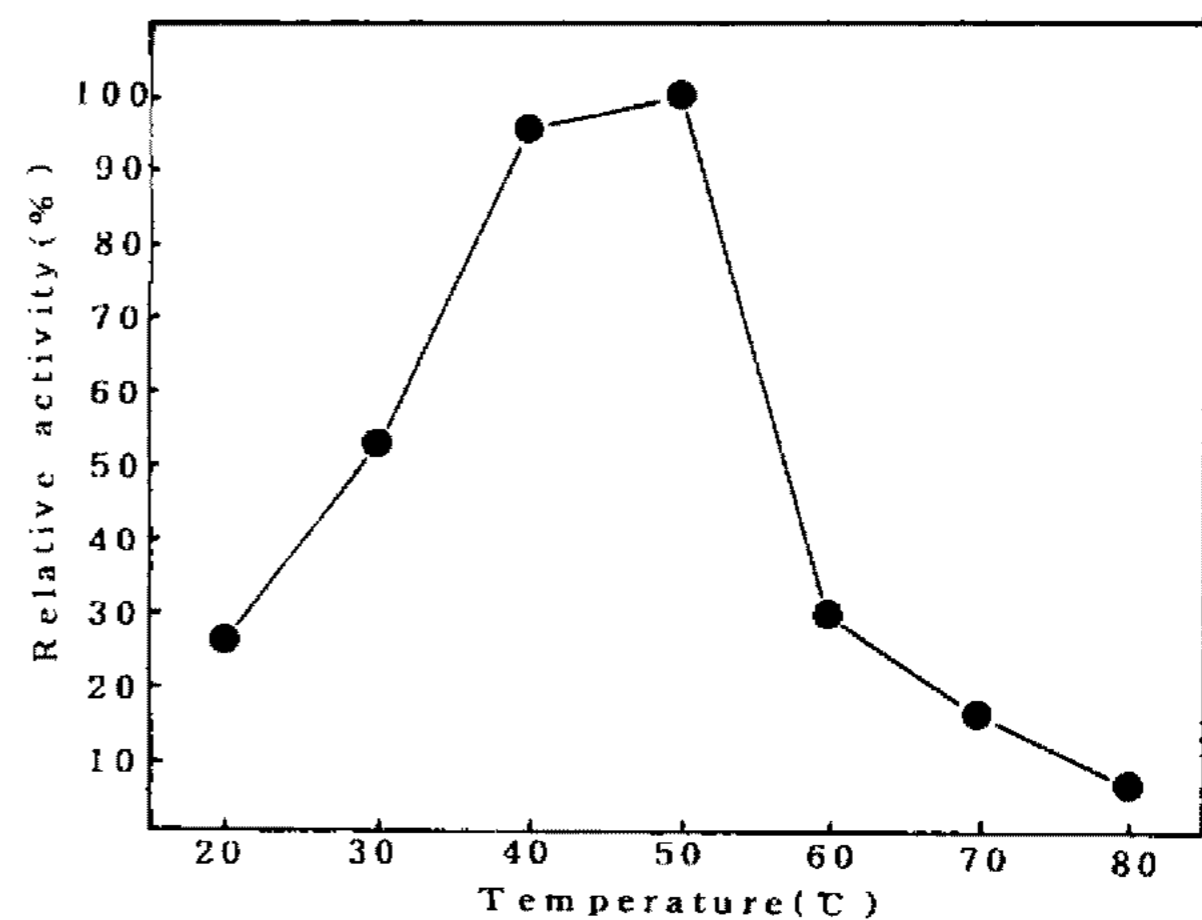


Fig. 4. Effect of temperature on the activity of protease from *Scopulariopsis brevicaulis*.

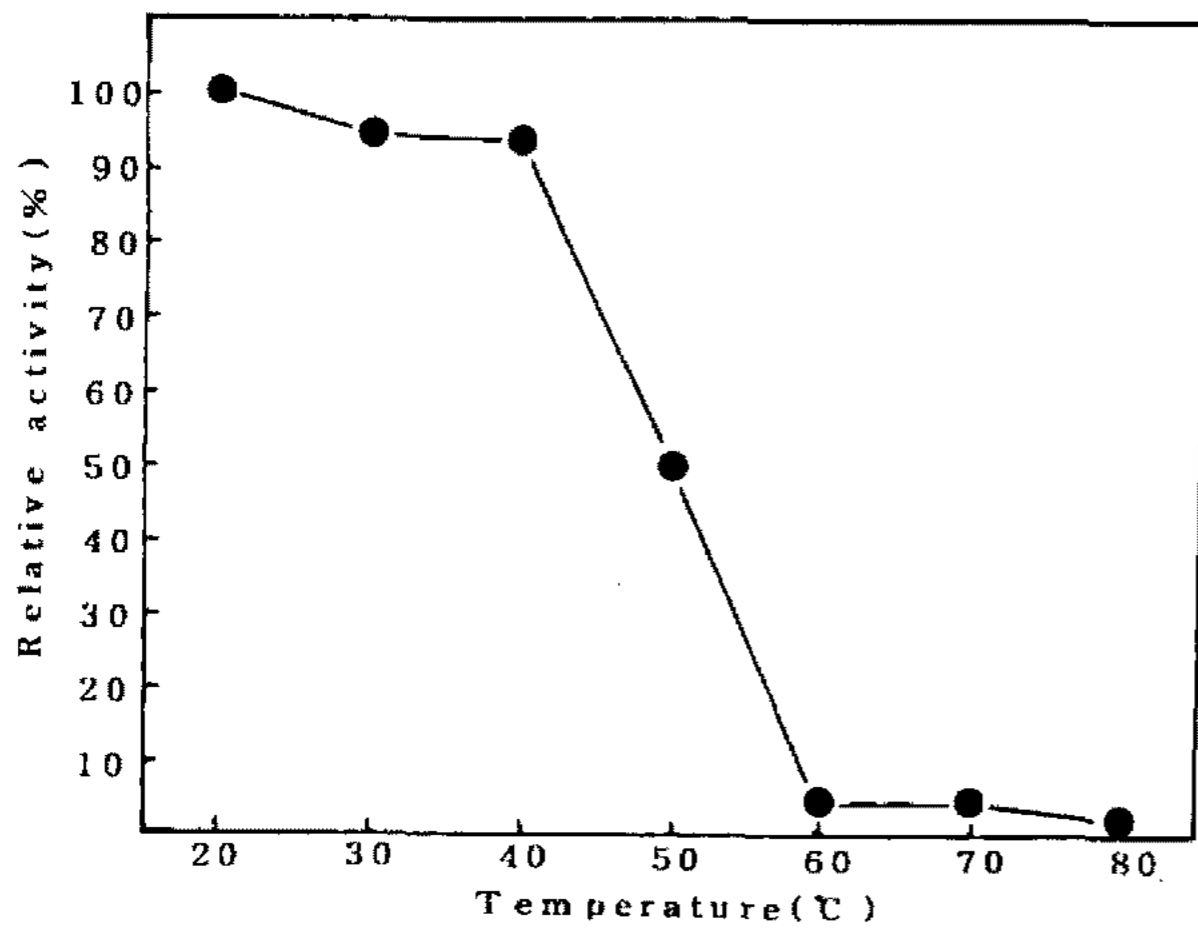


Fig. 5. Temperature stability of protease from *Scopulariopsis brevicaulis*.

*tilis*의 alkaline protease는 최적 반응온도가 55°C라고 보고 하였고, Kobayashi 등(47), Tsuchiya 등(48)은 *E. superba*와 *Cephalosporium*속의 alkaline protease의 최적 온도가 45°C라고 보고한 것과는 다소 차이가 나지만, 차 등(42)이 *A. fumigatus*의 alkaline protease의 최적온도가 50°C라고 보고한 것과는 유사하였다.

**열에 대한 안정성** 본 효소의 열안정성을 조사하기 위하여 20~80°C 범위에서 0.5 ml의 효소와 1 ml의 boric acid-borax buffer (pH 9.0)를 혼합하여 각 온도에서 1시간 동안 전처리 시킨 후 최적온도인 50°C에서 30분간 안정화 시킨 다음 잔존활성을 조사한 결과 Fig. 5와 같이 40°C까지는 급격한 감소는 없었으나 50°C에서 부터 급격한 실활을 보여 열에는 상당히 불안정한 것으로 판단되었다. 이와같은 결과는 Tsuchiya 등(48), Tsuru 등(49), Charles 등(50)이 *Cephalosporium*속, *B. subtilis*, *S. marcescens*가 분비하는 효소가 50~60°C에서 거의 실활한다고 보고한 것과 유사하였으나, 차 등(42)의 *A. fumigatus*의 alkaline protease보다는 다소 열안정성이 떨어지는 것으로 생각되었다.

**금속이온의 영향** 본 효소에 미치는 금속이온의 영향을 조사하기 위하여 각종 금속염을 각각 2 mM 되게 pH 9.0의 증류수에 녹이고 금속이온용액 0.5 ml와 효소액 0.5 ml를 섞어 30°C에서 60 분간 방치한 다음 효소활성을 측정된 결과 Table 2와 같이  $\text{Cu}^{2+}$ 과  $\text{Hg}^{2+}$ 에 의해서만 각각 121%와 58%의 활성증감이 관찰되어 이 효소는 금속이온에 의해서는 크게 영향을 받지않는 것으로 판단되었다. 최 등(51)은 *Aspergillus*속의 alkaline protease가  $\text{Cu}^{2+}$ 에 의해 활성이 촉진되고  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ 에 의해 활성이 저해된다고 보고 하였으며, 본 실험 결과와 유사한 양상을 나타내었다.

### 효소의 작용양상

**저해제의 영향** 효소활성에 영향을 미치는 화학적 저

Table 2. Effect of metal ions on the activity of protease from *Scopulariopsis brevicaulis*

Ion	Metal	Relative activity (%)
Contrl	-	100
$\text{Ca}^{2+}$	$\text{CaCl}_2$	106
$\text{Pb}^{2+}$	$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	98
$\text{K}^+$	$\text{K}_2\text{CO}_3$	97
$\text{Ag}^+$	$\text{AgNO}_3$	96
$\text{Zn}^{2+}$	$\text{ZnSO}_4$	90
$\text{Hg}^{2+}$	$\text{HgCl}_2$	42
$\text{Cu}^{2+}$	$\text{CuSO}_4$	121
$\text{Ba}^{2+}$	$\text{BaCl}_2$	92
$\text{Mn}^{2+}$	$\text{MnSO}_4$	103
$\text{Mg}^{2+}$	$\text{MgSO}_4$	98
$\text{Fe}^{2+}$	$\text{FeSO}_4$	80

The reaction mixture, consisted of 0.5 ml enzyme solution and 0.5 ml metal ion solution(2 mM), was incubated at 30 °C for 30 min and the residual activities were measured.

Table 3. Effect of various inhibitors on the protease from *Scopulariopsis brevicaulis*

Reagent	Relative activity (%)
Control	100.0
Ethylendiaminetetraacetic acid	53.0
$\epsilon$ -Aminocaproic acid	92.1
$\text{H}_2\text{O}_2$	91.3
Sodium citrate	94.1
Phenyl hydrazine	52.7
2,4-Dinitrophenol	112.3
Iodine	94.9
$\rho$ -Chloromercuribenzoic acid	92.5
Phenylmethanesulfonyl fluoride	2.3

The reaction mixture, consisted of 0.5 ml enzyme solution and 0.5 ml inhibitor solution(2 mM), was incubated at 30 °C for 30 min and the residual activities were measured.

해제 중 ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA),  $\epsilon$ -aminocaproic acid,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sodium citrate, phenyl hydrazine, 2,4-di-nitrophenol(2,4-DNP), iodine,  $\rho$ -chloromercuribenzoic acid (PCMB), phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF)를 선정하여 *Scopulariopsis brevicaulis*의 protease활성에 미치는 영향을 검토하였다. Table 3에서 보는바와 같이 serine protease에 특이적 저해를 일으키는 PMSF에 의해 현저한 저해를 보였으며 EDTA와 phenyl hydrazine에 의해서도 일부 활성저해가 관찰되어 이 효소는 효소활성부위에 serine잔기와 금속이온을 가지는 metallo serine protease로 추정되었다.

**효소반응속도론** 기질농도와 효소활성과의 관계를 검토하기 위하여 Hammarstein milk casein을 0.025~0.5 mM로 기질농도를 달리하였을 때 효소활성의 변화를 측정된 후 Lineweaver-Burk plotting한 결과 Fig. 6에서와 같이  $K_m$ 값이 0.124 mM/L;  $V_{max}$ 값은 25.99  $\mu\text{g}/\text{min}$ 이

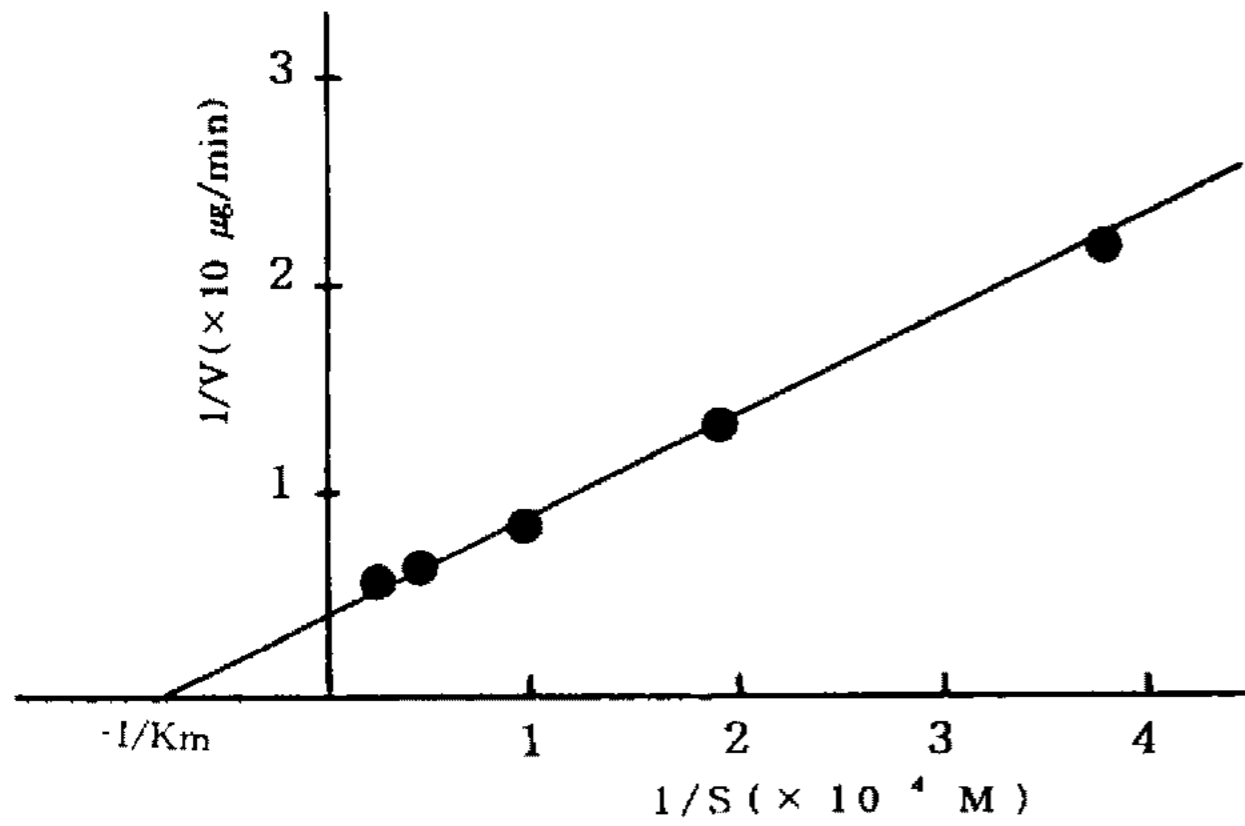


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot for hydrolysis of casein by protease from *Scopulariopsis brevicauli*.

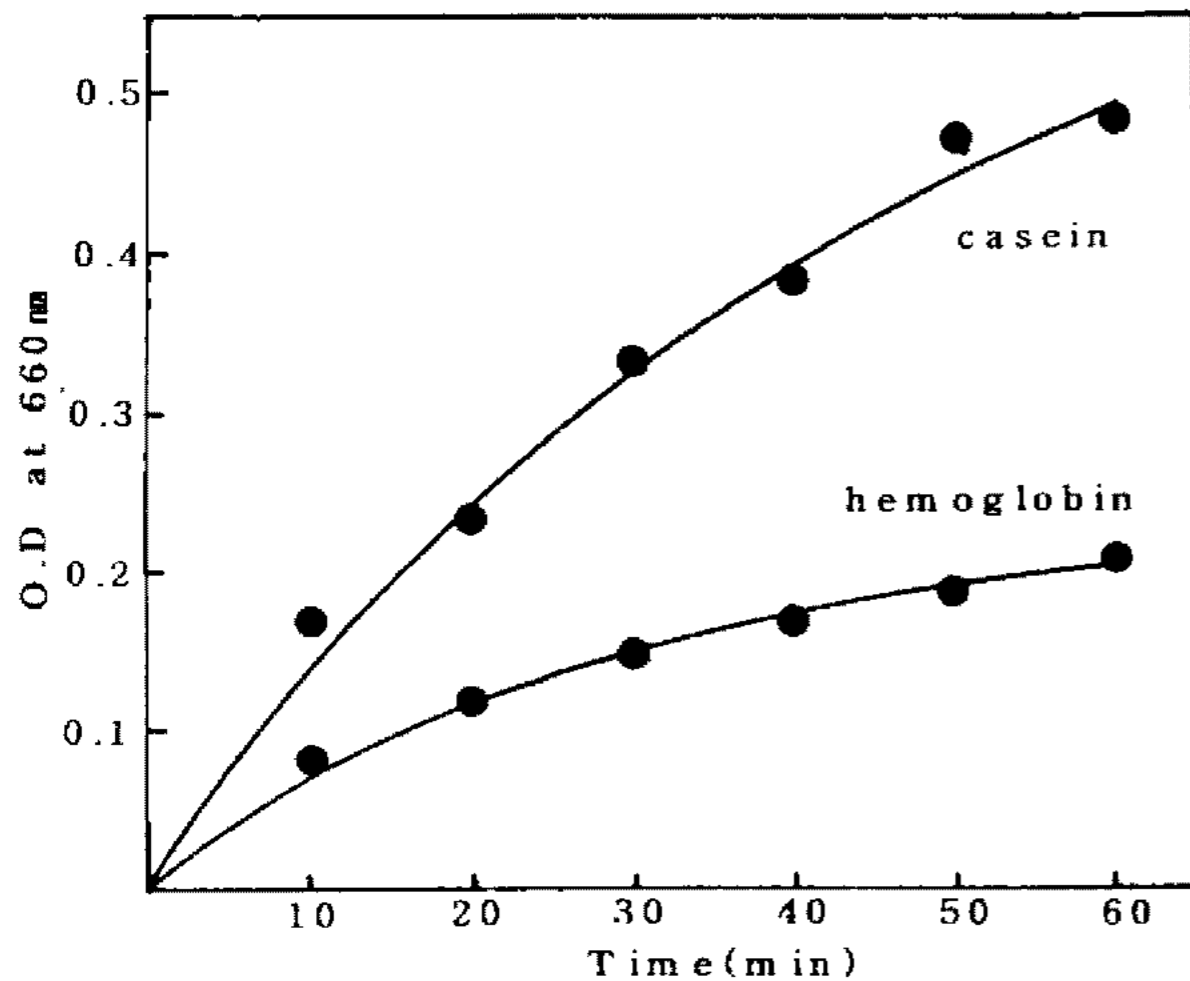


Fig. 7. Hydrolysis of casein and hemoglobin by protease from *Scopulariopsis brevicauli*.

었다.

**기질에 대한 특이성** 본 효소의 기질에 대한 특이성은 Fig. 7에서와 같이 기질로써 hemoglobin보다 casein을 더 잘 가수분해하였다. 이는 최 등(52)이 *Streptomyces griseus*의 protease와 차 등(41)이 *Aspergillus fumigatus*의 alkaline protease가 hemoglobin보다 casein에 기질특이성을 가진다고 보고한 것과 유사하였다.

## 요 약

한국재래간장에서 분리한 *Scopulariopsis brevicaulis*가 생성하는 protease생산의 최적배양조건은 2% soluble starch, 0.2% tryptophan, 0.1%  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , 0.2% Na HPO<sub>4</sub>, pH 7.5, 35 °C에서 배양 했을때이다. 효소의 최적 작용 pH와 온도는 pH 9.0, 50 °C였으며, pH 6.0~11.0의 범위와 40 °C이하에서 안정하였다. 금속이온중 Cu<sup>2+</sup>에 의하여 활성이 증대되었으나, Hg<sup>2+</sup>등에 의하여 효소활성이 저해되었다. Phenylmethanesulfonyl fluoride와 ethylenediaminetetraacetic acid 처리에 의해 활성이 저해되

어 금속이온의 영향을 받는 metallo serine protease로 확인되었다. Km값은 0.124 mM/L, V<sub>max</sub>값은 25.99 μg/min이었으며, hemoglobin보다 casein을 더 잘 가수분해하였다.

## 감사의 글

본 연구는 1995년도 과학기술처 선도기술과제 연구비에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 이에 깊이 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 한용석, 박병득. 1957. 간장 제조에 관한 연구(제1보), 재래 메주 및 곡자중의 *Aspergillus oryzae*에 대하여. 공업연구소 연구보고 8: 75.
2. 한용석, 박병득. 1959. 간장 제조에 관한 연구(제3보) 재래 곡자중의 *Rhizopus*속 및 *mucor*속에 대하여. 공업연구소 연구보고 9: 147.
3. 한용석, 박병득. 1962. 간장 제조에 관한 연구 (제4보) 재래 곡자중의 *Rhizopus*속 및 *mucor*속에 대하여. 공업연구소 연구보고 11: 52.
4. 한용석, 김기주. 1962. 간장 제조에 관한 연구(제5보), 재래식 메주중의 *Rhizopus*속 및 *mucor*속에 대하여. 공업연구소 연구보고 11: 141.
5. 조덕현, 이우진. 1970. 한국 재래식 간장의 발효 미생물에 관한 연구, 한국 재래식 메주의 발효 미생물군에 관하여. 농화학회지 13: 35.
6. 이택수, 이석건. 1971. 간장 발효에 관여하는 효모에 관한 연구(1보) 제국중 생육하는 효모에 대하여. 농화학회지 13: 97.
7. 이우진, 조덕현. 1971. 한국 재래식 간장의 발효미생물에 관한 연구(제2보) 한국 재래식 간장의 담금주에 있어서의 발효미생물군 소재에 관한 연구. 농화학회지 14: 137.
8. 박계인, 김기주. 1970. 한국 간장 제조에 관한 연구 (제1보), 중앙공업연구소 연구 보고 20: 89.
9. 이철호. 1976. 재래식 간장과 된장 제조가 대두 단백질의 영양가에 미치는 영향(2보) 메주장의 숙성중에 일어나는 성분변화. 한국식품과학회지 8: 19.
10. 최춘언, 송필순. 1960. 대두발효식품에 있어서의 riboflavin생성에 관하여 과연회보 5: 129.
11. 장지현. 1966. 재래식 한국 간장중의 유리당류. 농화학회지 7: 35.
12. 장지현. 1967. 한국 간장중의 유기산에 관하여. 농화학회지 8: 1.
13. 김종규, 양성호. 1989. 한국 재래식 간장의 맛에 영향을 미치는 인자분석. 신일전문대학 논문집 3: 524.
14. 박건영, 이은숙, 문숙희, 최홍식. 1989. 간장 및 모델시스템에서 간장 갈색 물질과 슛이 aflatoxin B<sub>1</sub>의 파괴에 미치는 영향. 한국식품과학회지 21: 419.
15. 최홍식, 이창용. 1993. Melanoidin의 항산화성 및 항돌연변이원성. 한국영양과학회지 22: 246.
16. 최홍식, 이정수, 문갑순, 박건영. 1993. 양조간장에서 분



- 리한 갈색물질의 항산화성. 한국영양식량학회지 **22**: 565
17. 최홍식, 이정수, 이창용. 1993. 양조간장에서 분리한 멜라노이딘 관련 물질의 항산화성 작용특성. 한국영양식량학회지 **22**: 570.
  18. 박건영, 이규복. 1987. 재래식 된장, 간장 제조중 aflatoxin의 파괴에 대한 연구. 부산대학교 가정대학 연구보고지 **13**: 49.
  19. 김종규. 1978. 한국 재래식 간장의 맛 성분에 관한 연구(제1보), 간장 숙성중 아미노산 변화에 대하여. 경상대학 논문집 **17**: 177.
  20. 김종규. 1978. 한국 재래식 간장의 맛 성분에 관한 연구(제2보), 간장 숙성중 핵산관련 물질에 관하여. 농업 연구소보 **12**: 55.
  21. 김종규, 강대호. 1978. 한국 재래식 간장의 맛 성분에 관한 연구(제3보), 간장 숙성중 당류에 관하여. 한국 영양식학회지 **7**(2): 21.
  22. 김종규, 강대호. 1978. 한국 재래식 간장의 맛 성분에 관한 연구(제4보), 간장 숙성중 비휘발성 amines. 한국 영양식학회지 **7**(2): 25.
  23. 김종규, 신갑철, 강대호. 1979. 한국 재래식간장의 맛 성분에 관한 연구(제5보), 간장 숙성중 유기산에 관하여. 경상대학교 논문집 **18**: 143.
  24. 허점혜, 김종규. 1979. 한국 재래식 간장의 맛 성분에 관한 연구(제6보), 관능 검사. 진주교육대학 논문집 **19**: 291.
  25. 김종규, 김창식. 1980. 한국 재래식 간장의 맛 성분에 관한 연구. 한국농화학 회지 **32**: 89.
  26. 김종규, 이낙훈, 이부권, 정승영. 1984. 한국 재래식 간장 맛의 특징. 농업연구소보 **18**: 73.
  27. 김종규, 정영건, 양성호. 1985. 한국 재래식 간장의 맛에 영향을 미치는 성분. 한국산업미생물학회지 **13**(3): 285.
  28. 김종규, 김성영, 기우경, 조승영. 1990. 한국 재래식 간장의 휘발성분 중의 중성획분. 경상대학교 농어촌 개발연구소보 **8**: 41.
  29. 김종규, 김광수, 장세균, 박선미, 김성영. 1990. 한국재래식 간장중의 휘발성 유기산의 분포와 생성균. 영남대학교자원문제연구논문집 **9**(1): 63.
  30. 김종규 지원대, 이은주, 김성영. 1992. 한국 재래식 간장의 특징적 향기성분. 한국농화학회지 **35**(5): 346.
  31. Kim, J.K., W.D. Ji, E.J. Lee, S.M. Park. 1989. Aroma Characteristics of Dimethyl trisulfide and Its producing Microorganisms in Traditional Korean Soy Souce Fifth the Federation of Asian and Ocdanian Biochemists, MO: 105.
  32. Kim, J.K., H.G. Chang, J.S. Seo, S.J. Lee. 1993. Character Impact Compounds in Flavors of Korean Soy Souce Manufactured with the Traditional and the Improved Meju. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **4**: 270.
  33. 김종규, 권호진, 기우경, 강동학, 조영운. 1986. 한국 재래식 간장 및 된장 제조를 위한 우량변이주 개발. 한국산업미생물학회지 **15**(1): 21.
  34. 김종규, 김상달. 1988. 돌연변이에 의한 한국 간장균의 육종. 한국농화학회지 **31**(4): 346.
  35. 김종규. 1990. 세포융합에 의한 간장 발효균의 육종. 식품기술 **3**(1): 33.
  36. 김종규, 조윤래, 권대준. 1992. *Bacillus* sp. SSA3 균주의 Expression Vector 개발. 한국산업미생물학회지 **20**(6): 637.
  37. 김종규, 조윤래, 장영채, 이경형, 김성영. 1992. *Bacillus licheniformis* SSA3-2M1이 생산하는 Proteinases. 한국미생물학회지 **30**(4): 239.
  38. 김종규, 이경형. 1993. *Bacillus subtilis* PM3가 생산하는 중성 Proteinase의 성질. 영남대학교 자원문제연구논문집 **12**(1): 71.
  39. 최광수, 최청, 김종규. 1995. 전통발효식품의 과학화 연구. 전통간장의 대량생산을 위한 기반요구. 과학기술처 95년도 연차 보고서: 40.
  40. Hakiyara, B. 1956. 酵素研究法. vol. II (朝昌書店:東京), 1: 237.
  41. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, L.A. Farr and R.J. Randal, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265.
  42. 차원섭, 최청. 1989. *Aspergillus fumigatus*가 생산하는 alkaline protease의 특성과 작용양상. 한국식량영양학회지 **18**(3): 348.
  43. 정동효, 이계호. 1970. 고온성 사상균의 효소에 관한 연구. 한국농화학회지 **13**(3): 223.
  44. Tsuru, D., K. Heizo, Y. Takehiko and F. Juichiro. 1966. Studies on bacterial protease. *Agr. Biol. Chem.* **30**(12): 1261.
  45. Fukasawa, S., K. Nakamura, M. Miyahira and M. Kurata. 1988. Some properties of two proteinases from a luminous bacterium, *Vibrio harveyi* strain FLN-108. *Agr. Biol. Chem.* **52**(12): 3009.
  46. Toshihiro, N., M. Yoshikazu, M. Noshi and Y. Takehiko. 1974. Purification and some properties of an alkalophilic proteinase of a *Streptomyces* species. *Agr. Biol. Chem.* **38**(1): 37.
  47. Kobayashi, K., Y. Toshihiro and M. Kazuo. 1985. Purification and characterization of chymotrypsin-like proteinase from *Euphausia superba*. *Agr. Biol. Chem.* **49**: 1599.
  48. Tsuchiya, K., A. Tsutomu, S. Kazuyuki and K. Tetsu. 1987. Purification and some properties of alkaline protease from *Cephalosporium* sp. KM-388. *Agr. Biol. Chem.* **51**: 2959.
  49. Tsura, D., K. Heizokira and T. Yamamoto, 1966. Studies on bacterial proteinase part 16. purification. Crystalization and some enzymatic properties of alkaline protease of *Bacillus subtilis* var. amylosacchariticus. *Agr. Biol. Chem.* **30**: 1261.
  50. Charles, J.D., A.B. Evest, D.L. Alworth and D.B. Hugh. 1979. Purification and characterization of the extracellular proteinases of *Serratia marcescens*. *Biochimica et Biophys. Acta.* **569**: 293.
  51. 최 청, 김두기, 조영제, 성태수. 1990. *Aspergillus* sp. CC-29가 생성하는 alkaline protease의 정제 및 특성. 한국영양식량학회지 **19**(5): 434.
  52. 최 청, 정영건, 성삼경, 최광수, 이재성, 조영제, 천성숙. 1992. *Streptomyces griseus* HC-1141이 생성하는 alkaline protease의 특성 및 작용양상. 한국산업미생물학회지 **20**(3): 295.

(Received 24 September 1996)