

## 전통 메주로부터 분리한 *Bacillus subtilis* PCA 20-3 유래 Protease의 정제

임성일 · 유진영  
한국식품개발연구원 생물공학연구부

### Purification of a Protease Produced by *Bacillus subtilis* PCA 20-3 Isolated from Korean Traditional *Meju*

Seong-Il Lim and Jin-Young Yoo

Division of Chemistry and Biotechnology, Korea Food Research Institute

#### Abstract

*Bacillus subtilis* PCA20-3 was isolated from *meju* and was found to produce a protease. The strain produced the maximum amount of enzyme in the medium containing soytone (0.2%), soluble starch (2%),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.1%),  $\text{CaCl}_2$  (0.1%), yeast extract (0.01%),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0.1%), and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.1%). Protease was first concentrated by ammonium sulfate (80% saturation, w/v) precipitation of culture supernatant. Then the enzyme was purified by column chromatography using CM Sephadex C-50. The collected proteins were rechromatographed using Sephadex G-100 gel filtration column. The fraction with protease active from Sephadex G-100 gel chromatography was found to be pure when examined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and YMC-pak reverse phase chromatography. Specific activity, yield and purity were 76 U/mg, 2.7%, and 7.6 fold, respectively. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 31.5 kDa by SDS-PAGE. The number of amino acids calculated from molecular weight was evaluated about 321 residues. N-terminal sequence of the enzyme was Val<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Gln<sup>7</sup>-Gly<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Ala<sup>10</sup>.

Key words : *Bacillus subtilis* PCA 20-3, protease, purification

#### 서 론

한국의 전통간장 덧 발효와 숙성 시 메주 미생물의 대부분을 구성하는 *Bacillus*속 세균<sup>(1-7)</sup>과 곰팡이<sup>(8,9)</sup>가 분비하는 protease가 제품의 특성에 깊이 관여한다고 알려져 있으며, *Bacillus*속의 균종에 따라서 protease 효소의 특성이 다양하다는 것이 보고된 바 있다<sup>(10,11)</sup>. *Bacillus*속 세균이 분비하는 protease로서는 중성 protease와 몇 종의 subtilisin 등이 알려져 있다<sup>(12-16)</sup>. 장등<sup>(17)</sup>은 간장의 맛 성분 중 단백질이 *B. licheniformis*의 neutral protease에 의해 주로 분해되어 생성된다고 하였고, Iwasaki 등<sup>(18,22)</sup>은 일본식 간장에서 발효미생물중 국균은 *Asp. oryzae*와 *Asp. sojae*, 젖산균은 *Pediococcus halophilus*, 알콜발효 및 향기생성균으로 *Saccharomyces rouxii*를 고정화하여 발효함으로써 발효

기간을 단축하였을 뿐만 아니라 맛과 향이 우수한 제품을 얻을 수 있었다고 하였다.

최근, 대두단백질 펩타이드의 기능성 연구가 활발히 진행되고 있는데, 대두단백질의 가수분해 정도, 펩타이드의 크기 및 아미노산의 염기배열 등에 따라서 기능성과 기호성 등이 나쁘게 나타난다고 보고된 바 있다<sup>(23,24)</sup>. 특히, 대두단백질 펩타이드는 산성음료의 용해도 증가, 일부 환자의 내 allergy성, 기능성의 향상 등에 대한 응용이 가능하다고 한다<sup>(25)</sup>. 한편, 효소에 의한 부분적인 가수분해를 통해 단백질의 용해도 증가<sup>(26)</sup>, 유화 형성능<sup>(27)</sup>, 고미의 제거<sup>(28)</sup> 등의 연구결과도 보고된 바 있다. 이와 같은 일련의 대두단백질 펩타이드에 관한 연구를 위해서는 전통 장류 유래의 미생물 protease에 대한 연구가 뒷받침되어야 한다.

따라서 본 연구자들은 이미 메주의 산업화에 유리한 강력한 protease를 생산하는 균주 개발의 일환으로 한국의 재래식 메주에서 protease 활성이 강한 균주를 분리하고 그 효소적 특성을 조사한 바 있다<sup>(29)</sup>. 본 연

Corresponding author : Division of Chemistry and Biotechnology, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyundong, Songnam, Kyonggido 463-420, Korea.

구는 계속 과제로서 메주 유래의 균주가 생산하는 protease에 의해 분해되는 대두단백질 가수분해물의 특성과 이용성 연구의 일환으로, 우리 나라 전통메주에서 분리·동정한 *Bacillus subtilis* PCA 20-3<sup>(30)</sup>이 생산하는 protease를 분리·정제하였기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 효소생산 및 정제

효소의 생산은 전보<sup>(29)</sup>에서 보고한 바와 같이 효소 생산용 배지[0.2% soytone, 2% soluble starch, 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% CaCl<sub>2</sub>, 0.01% yeast extract, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]를 이용하여 *B. subtilis* PCA 20-3을 최적배양조건인 30°C에서 20시간 배양하여 protease를 생산하였다. 효소의 정제는 배양액을 16,000 × g에서 1시간 원심분리하여 균체를 제거하고, 그 상정액을 80% 포화 황산암모늄으로 4°C에서 14시간 염석한 후, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 4°C에서 72시간 투석하였다. 투석액을 ISCO사의 ProTeam LC™ system 210을 이용하여 정제하였다. 먼저 CM Sephadex C50 column(2.6×55 cm) 이온교환 크로마토 그래피를 하여 활성단백질을 흡착시킨 후, 0.5 M NaCl로 용출하고 투석한 다음, 상기 buffer로 평준화시킨 Sephadex G-100 column(2.6×55 cm)을 이용하여 2차례에 걸쳐 gel filtration하여 protease를 정제하였다.

### Protease 활성측정

효소활성측정은 Hagihara의 방법<sup>(31)</sup>에 준하여 측정하였다. 즉, 효소액 0.5 mL에 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 1 mL를 가한 다음, 기질용액(0.6% H.ammarsstein casein, pH 8.0)를 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.44 M trichloroacetic acid(TCA) 2.5 mL를 넣어 반응을 중지시키고 실온에서 10분간 방치한 다음 원심분리시킨 상등액 1 mL에 0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 10 mL와 1 mL의 1 N Folin & Ciocalteus 시약을 넣어 37°C에서 30분간 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 단위는 37°C에서 1분동안에 1 μg/mL의 tyrosine을 유리시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

### 단백질의 정량

단백질의 양은 Lowry 방법<sup>(32)</sup>에 따라 측정하였고, bovine serum albumin을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 단백질 함량을 계산하였으며, 효소 정제과정중의 단백질의 농도는 spectrophotometer를 사용하여 280 nm에서 흡광도로 측정하였다.

### 전기영동

단백질 가수분해 효소의 분리 정도와 분자량을 구하기 위하여 Laemmli<sup>(33)</sup>의 방법에 준하여 Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 수행하였고, Comassie brilliant blue R-250 (Comassie brilliant blue R-250 2.5 g/1L의 methanol : acetic acid : water = 5 : 1 : 5의 용액)을 사용하여 단백질 밴드를 염색하고, 탈색은 용액I(methanol : acetic acid : water = 5 : 1 : 5)으로 15분간 세척후, 계속해서 용액II(methanol : acetic acid : water = 2 : 1 : 7)로 30분, 10% acetic acid로 하루 밤 탈색하였다. 이때 gel은 Sigma사로부터 구입하였으며 stacking gel과 separating gel의 농도는 각각 4.5%, 12%이었다. 분자량 marker는 Sigma사로부터 구입한 prestaining marker로서 phosphorylase B(102 kDa), bovine serum albumin(81 kDa), ovalbumin(46.9 kDa), carbonic anhydrase(32.7 kDa), soybean trypsin inhibitor(30.2 kDa), egg lysozyme(24 kDa)이 premix된 것을 사용하였다.

### Reverse phase HPLC(RP-HPLC)

정제효소액에 2%가 되도록 trifluoroacetic acid(TFA)를 가하여 5분간 효소활성을 실행시킨 다음 RP-HPLC를 행하였다. HPLC는 Jasco사의 PU-987 intelligent prep. pump와 UV-975 intelligent UV/VIS detector (UV-975)를 이용하였다. 전개방법은 0.1% TFA(A buffer)로 평형화시킨 YMC-Pack column(250×4.4 mm)을 이용하여 함수유기용매 [acetonitrile/TFA(99.9%/0.1%), B buffer]로 1.0 mL/min의 유속으로 B buffer 10~60%(0-50 min, linear)까지의 직선농도구배로 전개하였다. 이때 detection은 UV 220 nm에서 행하였다.

### 아미노산 조성분석

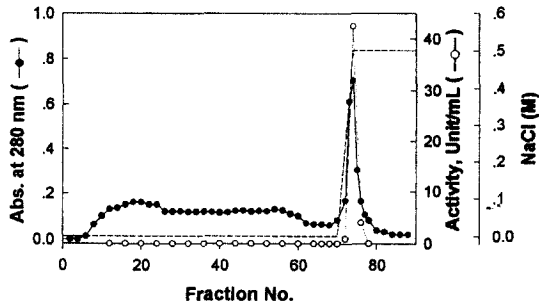
일정량의 시료에 2회 증류한 6 N HCl(2% phenol 함유)용액을 가하고 질소가스를 충전, 밀봉하여 110°C에서 24시간 가수분해시킨 다음 감압농축하여 HCl을 제거하고 0.2 M Na-acetate buffer(pH 2.2) 100 μL에 용해시킨 다음 자동아미노산 분석기(Hitachi Co. L8500S)로 분석하였다.

### N-말단 아미노산 배열 분석

본 효소의 polypeptide chain의 NH<sub>2</sub>-말단 아미노산 배열 분석은 RP-HPLC의 주 peak fraction을 감압 농축한 다음, Applied Biosystem 사의 477A형 protein sequencer를 이용하여 분석하였다. 이때, phenylthiohydantoin(PTH)-amino acid의 분리동정은 PTH-amino acid

**Table 1. Summary of purification of protease from *Bacillus subtilis* PCA20-3.**

Step	T. protein (mg)	T. activity (Unit)	Specific activity (Unit/mg)	Yield (%)	Purity fold (%)
Crude Enzyme	1690	16,900	10	100.0	1.0
Ammonium sulfate 80% ppt	63	3,300	52	19.5	5.2
CM Sephadex C50	9	1,335	148	7.9	14.8
1st Sephadex G-100	8	991	124	5.9	12.4
2nd Sephadex G-100	6	453	76	2.7	7.6



**Fig. 1. CM Sephadex C50 column chromatography.**  
●—● : absorbance at 280 nm, ○—○ : protease activity, ---: concentration of sodium chloride. About 120 mL of the enzyme was applied; column size, 2.6 × 55 cm; flow rate, 70 mL/hr; tube volume, 6.6 mL/tube; elution buffer, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0); active fraction, 73-75.

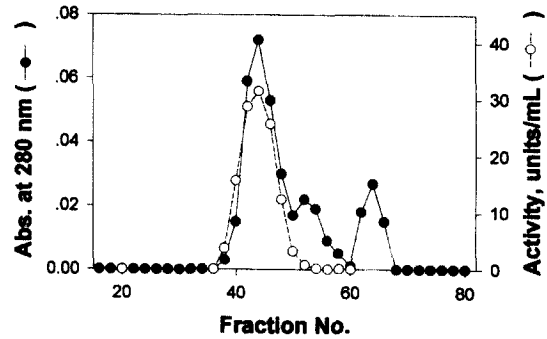
analysis(120A)를 이용한 단일 용매 용출계를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### Protease의 분리 및 정제

*Bacillus subtilis* PCA 20-3의 배양액으로부터 protease를 농축시키기 위해 80% 포화 황산암모늄을 이용하여 염석하고 투석하였고 투석액 300 mL(63 mg)의 전량을 20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 평형화시킨 CM Sephadex C-50 column(2.6×55 cm)에 충전시킨 후 70 mL/hr의 유속으로 6.6 mL씩 용출하였다(Fig. 1). 효소를 흡착시킨 후(fraction No. 5~58), 상기 완충액으로 컬럼을 세척한 다음(fraction No. 59~68), 0.5 M NaCl/20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)을 가해 흡착성 활성 단백질을 분획하였다. 그 결과, 총 단백질의 약 85%에 해당하는 비흡착성 peak 부분에서는 효소활성이 검출되지 않았으나 NaCl 농도용배 개시지점부터 protease 활성이 검출되어 73~75번 분획을 얻었다. 이때의 수율은 7.9%, 정제도는 14.8배였다(Table 1).

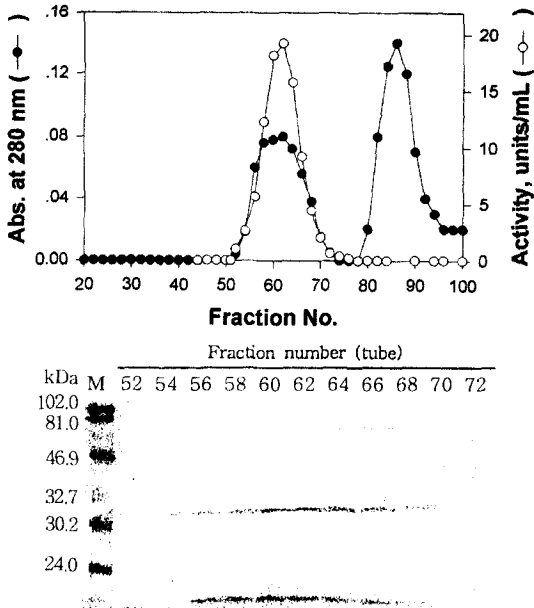
분획물을 투석한 후 동결건조하고 Sephadex G-100 컬럼(2.6×65 cm)에 상기 분획물의 전량인 3 mL(9 mg)를 충전시킨 다음 71.7 mL/hr의 유속으로 5.2 mL씩 분



**Fig. 2. 1st Sephadex G-100 gel filtration chromatography.**  
●—● : absorbance at 280 nm, ○—○ : protease activity. About 3 mL of the enzyme was applied; column size, 2.6 × 55 cm; flow rate, 71.7 mL/hr; tube volume, 5.2 mL/tube; elution buffer, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0); active fraction, 55-63.

획한 결과, Fig. 2에서와 같이 두 개의 peak가 검출되었고 38~50번 분획에서 protease 활성이 검출되었다. SDS-PAGE 분석 결과(data not shown), 40~48번 분획에서 주 밴드가 검출되었다. 64번의 peak는 본 protease의 분해산물 또는 배양물 유래의 peptide인 것으로 추정된다. 따라서 주 밴드를 함유한 protease를 정제하기 위해 40~48번의 분획을 동결건조하였다. 이때의 수율은 각 5.9%였고 정제도는 12.4배였다(Table 1).

동결건조한 후 protease를 순수분리하기 위해서 Sephadex G-100 컬럼(2.6×55 cm)에 전량인 4 mL(8 mg)을 재 충전시켜 rechromatography 하였다. 71.7 mL/hr의 유속으로 3.4 mL씩 분획한 결과, Fig. 3에서와 같이 52~73번 분획에서 protease 활성이 검출되었다. 52~72번 튜브의 fraction을 SDS-PAGE 분석한 결과(Fig. 3), 54~70번 fraction에서 주 밴드가 검출되었으며 밴드의 색이 짙은 55~66번 분획을 정제 protease로 하였다. 이때의 수율은 2.7%였고 정제도는 7.6배, 비활성도는 76 unit/mg였다(Table 1). 2nd gel filtration의 수율이 1st gel filtration의 수율 보다 낮은 것은 Fig. 2에서 낮게 검출된 64번 peak에 상응하는 Fig. 3의 peak(86번)가 활성 단백질 보다 높게 나타남으로서 상당량의 활성단백질이 autocatalysis에 의해 자가분해

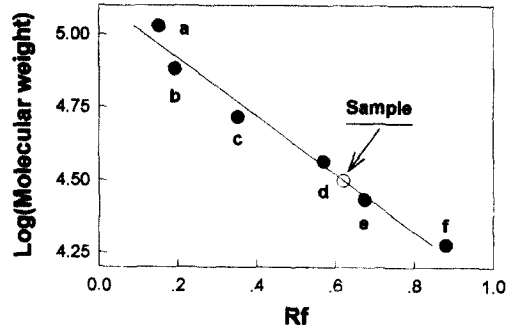


**Fig. 3. 2nd Sephadex G-100 gel filtration chromatography and SDS-PAGE.**  
 ●—● : absorbance at 280 nm, ○—○ : protease activity. About 3 mL of the enzyme was applied; column size, 2.6 × 55 cm; flow rate, 71.7 mL/hr; tube volume, 3.4 mL/tube; elution buffer, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0); active fraction, 56-66.

되어 수율이 감소된 결과로 생각되며 또한 부분적으로 degradation 되어 그 결과, 비활성도가 감소된 것으로 추정되나, 명확한 이유는 아직 불명이다. 정제효소의 비활성도는 최 등<sup>(34)</sup>의 *B. subtilis* alkaline protease의 비활성도 24.3 unit/mg, 장 등<sup>(17)</sup>의 *B. licheniformis* protease의 12.63 unit/mg 보다 높은 결과였다. 그리고 Fig. 3의 전기영동으로부터 분자량을 측정된 결과(Fig. 4), 주 밴드의 크기는 31.5 kDa로서 세균성 serine protease 분자량 30 kDa<sup>(35)</sup>와 유사하여 본 protease는 monomeric enzyme인 것으로 추정된다. 한편 본 효소는 extracellular serine protease이나 *B. subtilis*의 intracellular protease의 분자량, 31,000 ± 1,000<sup>(36)</sup>와 거의 일치하는 것으로 나타났다. 그러나 최 등<sup>(34)</sup>의 *B. subtilis* CCKS-111 protease의 분자량 28 kDa과 황<sup>(4)</sup>의 *Bacillus* sp.의 protease의 분자량이 38 kDa과는 차이가 있었다.

**RP-HPLC에 의한 정제**

두 차례의 gel filtration을 통해 정제된 효소의 순도를 결정하고 순수분리한 protease의 아미노산분석 및 N-말단 아미노산 배열을 결정하기 위한 시료를 준비



**Fig. 4. Molecular weight estimation of the protease by 12% SDS-PAGE**  
 (Log 10 molecular weight vs. relative mobility) Size marker : a. Phosphorylase B(102 kDa), b. Bovine serum albumin(81 kDa), c. Ovalbumin(46.9 kDa), d. Carbonic anhydrase(32.7 kDa), e. Soybean trypsin inhibitor(30.2 kDa), f. Lysozyme(24 kDa)  
 Sample : 31.5 kDa

하기 위해 reverse phase HPLC한 결과(Fig. 4), retention time 43 min에서 주 peak가 검출되었으며 주 peak가 전체 peak에 대해 95% 이상인 것으로 나타나 정제효소의 순도는 95%이상이었다.

**아미노산 조성분석**

RP-HPLC로 정제된 단백질을 감압농축하여 아미노산 조성을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 총 15종의 아미노산이 검출되었고, SDS-PAGE 분석에 의해 밝혀진 분자량 31.5 kDa를 기준으로 효소단백질의 아미노산 잔기수를 계산한 결과, 본 protease는 321개의 아미노산 잔기로 이루어진 것으로 추정되었으며 아미노산 잔기 중 alanine, glycine, serine, valine, leucine의 함정적인 잔기수가 각각 49, 47, 43, 38, 24로 많이 함유되어 있는 것으로 밝혀졌다. 한편, N-말단 아미노산 배열의 상동성이 높은 *B. subtilis subtilisin* BPN<sup>(37)</sup>의 잔기수가 275개인 것과 비교해 본 효소의 잔기수가 24개 정도 많은 것으로 추정되며 alanine, serine, glycine, valine의 잔기수가 많은 것도 유사하였다.

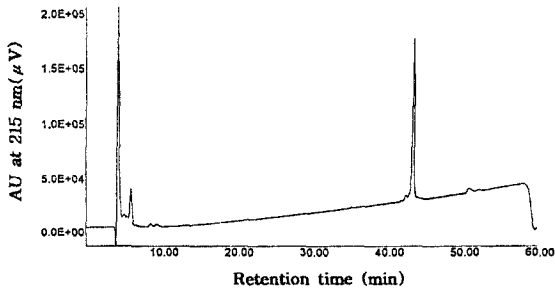
**N-말단 아미노산 배열 결정**

*Bacillus subtilis* PCA 20-3 균주에서 분리한 protease의 N-말단 아미노산 배열을 *Bacillus* sp.의 다른 protease와 비교·분석하기 위하여 RP-HPLC로 순수분리된 protease의 10개 잔기의 N-말단 아미노산 배열을 조사하였다(Fig. 6). 그 결과, Val<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Gln<sup>7</sup>-Ile<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Ala<sup>10</sup>의 배열이 분석되었다. 이 배열은 *B. amyloliquefaciens* 유래의 extracellular protease

**Table 2. Composition of amino acids of protease from *Bacillus subtilis* PCA20-3.**

Amino acids	mg%	%	Molecular weight*	Residues***	Residues of BPN***
Asp+Asn	1.849	11.265	115.00	31(30.9)	28
Ser	1.954	11.905	87.07	43(43.1)	37
Glu+Gln	0.794	4.838	127.50	12(11.9)	15
Gly	1.399	8.524	57.05	47(47.1)	33
His	0.202	1.231	137.14	3( 2.8)	6
Thr	0.332	2.023	101.10	6( 6.3)	14
Arg	0.609	3.710	158.18	7( 7.4)	2
Ala	1.807	11.010	71.07	49(48.8)	37
Pro	0.850	5.179	97.11	17(16.8)	14
Tyr	1.180	7.189	163.17	14(13.9)	9
Val	1.951	11.887	99.14	38(37.8)	30
Ile	0.552	3.363	113.15	9( 9.4)	13
Leu	1.436	8.749	113.15	24(24.3)	15
Lys	1.157	7.049	128.17	17(17.3)	11
Phe	0.341	2.078	147.17	4( 4.4)	3
Total	16.414	100	31,500**	321	275

\*molecular weight of amino acid \*\*molecular weight of enzyme by SDS-PAGE\*\*\*number of expected residues \*\*\*\*BPN': *Bacillus subtilis* subtilisin BPN'

**Fig. 5. Reverse phase-HPLC pattern.**

A solution, 0.1% TFA; B solution, 0.1% TFA/acetonitrile; gradient, 10-60% B solution(50 min); flow rate, 1 mL/min.

인 subtilisin BPN'의 4~13까지의 배열과 100% 일치하였으며, 그 밖의 다른 extracellular subtilisin의 N-말단 아미노산 잔기와는 homology가 70%로 매우 높은 것으로 나타나, 본 protease는 전형적인 extracellular subtilisin의 일종으로서 N-말단 3개 잔기인 Ala<sup>1</sup>-Gln<sup>2</sup>-Thr(or Ser)<sup>3</sup>가 degradation 된 것으로 추측된다. 그러나 본 protease는 분자량이 31.5 kDa로서 subtilisin BPN'의 분자량 28 kDa<sup>(36)</sup>와 비교해 상당한 차이가 있어, subtilisin BPN'과는 다른 protease일 가능성도 있는 것으로 나타났다.

## 요 약

재래식 메주로부터 분리한 *Bacillus subtilis* PCA20-3이 생산하는 protease를 분리·정제하였다. 먼저 효소 생산용 배지(0.2% soytone, 2% soluble starch, 0.1%

	1	5	10	13
PCA 20-3		Val-Pro-Tyr-Gly	Val-Ser-Gln	Ile-Lys-Ala
BPN'	Ala-Gln-Ser	Val-Pro-Tyr-Gly	Val-Ser-Gln	Ile-Lys-Ala
Carls	Ala-Gln-Thr	Val-Pro-Tyr-Gly	Ile-Pro-Leu	Ile-Lys-Ala
DY	Ala-Gln-Thr	Val-Pro-Tyr-Gly	Ile-Pro-Leu	Ile-Lys-Ala
NAT	Ala-Gln-Ser	Val-Pro-Tyr-Gly	Ile-Ser-Gln	Ile-Lys-Ala

**Fig. 6. Comparison of N-terminal amino acid sequences of the *Bacillus subtilis* PCA20-3 protease with those of other proteases.**

PCA20-3, extracellular protease from *Bacillus subtilis* PCA20-3(this study); BPN', subtilisin BPN', extracellular protease from *Bacillus amyloliquefaciens*; Carls, subtilisin carlsberg, extracellular protease from *Bacillus licheniformis*; DY, subtilisin DY, extracellular protease from *Bacillus subtilis*; NAT, subtilisin NAT, extracellular protease from *Bacillus subtilis*(natto).

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% CaCl<sub>2</sub>, 0.01% yeast extract, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)를 이용하여 30°C에서 20시간 배양한 다음, 원심분리하여 상침액을 분획한 후, 80% 포화 황산암모늄에 의한 염석과 CM Sephadex C-50 및 Sephadex G-100을 이용하여 비활성도 76.0 unit/mg, 수율 2.7%, 정제배수 7.6 배로 효소를 정제하였다. 정제 단백질의 YMC-pack protein-RP column chromatography에 의한 순도검증에서 순도가 95% 이상인 것으로 나타났다. SDS-PAGE 분석에서 주 밴드의 분자량은 약 31.5 kDa이었고 아미노산 조성은 alanine, glycine, serine, valine의 함량이 많았으며 분자량 31,500 Da를 기준으로 하였을 경우 본 protease의 잔기 수는 321잔기였다. RP-HPLC로 분획한 main peak의 N-terminal amino acid sequence를 확인한 결과 Val<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Tyr<sup>3</sup>-Gly<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Gln<sup>7</sup>-Gly<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Ala<sup>10</sup>인 것으로 밝혀졌다.

## 감사의 글

본 연구는 1997년도 과학기술처 선도기술과제 연구비에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 이에 깊이 감사드립니다.

## 문헌

- Ju, H.K., Ju, S.K. and Im, M.H. Studies on the fermentation of soy sauce by bacteria. Korean J. Food Sci. Technol. 4: 276 (1972)
- Lee, T.S., Chu, Y.H., Shin, B.K. and Yu, J.H. Studies on the preservation of soy sauce, Part I. The periodical change of chemical composition and microflora. Korean J. Food Sci. Technol. 7: 200 (1975)
- Lee, B.W., You, Y.S., Im, G.H. and Choi, C.U. Purification and properties of protease from *Bacillus* LY-353. J. Kor. Soc. Food Nutr. 20: 21 (1991)
- Hwang, S.Y. Purification and characterization of extracellular serine protease produced by *Bacillus* sp. KUN-17. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 53 (1995)
- Kim, J.K., Jo, Y.R. and Kyun, D.J. Expression vector of *Bacillus* sp. SSA3. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 637 (1992)
- Horikoshi, K. and Kitada, M. Alkaline protease production from methylacetate by alkalophilic *Bacillus* sp. J. Ferment. Technol. 54: 383 (1976)
- Guffanti, A.A., Finkelthal, O.D.B., Hicks, L., Falk, A., Sidhu, A.G. and Krulwich, T.A. Isolation and characterization of new facultatively alkalophilic strains of *Bacillus* species. J. Bacteriol. 167: 766 (1986)
- Cho, D.H. and Lee, W.J. Microbiological studies of Korean native soy-sauce fermentation - A study on the microflora of fermented Korean *meju* loaves. J. Korean Agric. Chem. Soc. 13: 35 (1970)
- Lee, W.J. and Cho, D.H. Microbiological studies of Korean native soy-sauce fermentation - A study on the microflora changes during Korean soy-sauce fermentation. J. Korean Agric. Chem. Soc. 14: 137 (1971)
- Ki, W.K., Kim, J.K., Kang, D.H. and Cho, Y.U. Development of excellent mutants for manufacture of ordinary Korean soybean and soybean paste. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 172 (1993)
- Kim, J.K. and Kim, S.D. Genetic breeding of Korean soy sauce-fermenting *Bacillus* by UV mutation. J. Kor. Agric. Chem. Soc. 31: 346-350 (1988)
- Kakuo, H. Comparison of biochemical characteristics in proteases produced by *Bacillus* spp. Nippon Nogeikagaku Kaishi 65: 50-55 (1991)
- Muram, T. Characteristics and physiological significance of intracellular protease of *Bacillus* spp. Nippon Nogeikagaku Kaishi 65: 56-59 (1991)
- Yoshinoto, T. Exopeptidases produced by *Bacillus* spp. Nippon Nogeikagaku Kaishi 65: 60-62 (1991)
- Takagu, H. Protein engineering of subtilisin. Nippon Nogeikagaku Kaishi 65: 63-67 (1991)
- Omaki, T. Use and problems of bacterial proteases. Nippon Nogeikagaku Kaishi 65:68-70 (1991)
- Chang, Y. C., Lee, K. H., Kim, S. Y., Jo, Y. L. and Kim, J. K. Proteases produced by *Bacillus licheniformis* SSA3-2M1. Korean J. Microbiol. 30: 239-245 (1993)
- Iwasaki, K.I., Nakajima, M. and Sasahara, H. Porous alumina beads for immobilization of lactic acid bacteria and its application for repeated-batch fermentation in soy sauce production. J. Ferment. Bioengineering. 73: 375 (1992)
- Iwasaki, K.I., Nakajima, M. and Sasahara, H. Rapid ethanol fermentation for soy sauce production by immobilized yeast cells. Agric. Biol. Chem. 55: 9 (1991)
- Iwasaki, K.I. and Ueno, N. Porous alumina ceramics for immobilization of soy sauce yeast cells Nippon seramikku kyokai gakujutsu ronbunshi. 98: 1186 (1990)
- Iwasaki, K.I., Nakajima, M. and Sasahara, H. Rapid continuous lactic acid fermentation by immobilized lactic acid bacteria for soy sauce production. Process Biochemistry. 28: 39 (1993)
- Iwasaki, K.I., Nakajima, M. and Sasahara, H. Rapid ethanol fermentation for soy sauce production using a microfiltration membrane reactor. J. Ferment. Bioengineering. 72: 373 (1991)
- Kang, Y.J. Enzymatic modification of soy proteins, Effects of functional properties of soy isolate upon proteolytic hydrolysis. Korean J. Food Sci. Technol. 16: 211-217 (1984)
- Yoo, Y.S. and Lee, S.R. Efficacy of enzyme treatment for the quality improvement of soy milk. Korean J. Food Sci. Technol. 20: 426-432 (1988)
- Shon, D.H. Physiological active peptide from food protein. Food Technology. 7: 25 (1994)
- Kang, Y.J., Lee, K.C. and Park, Y.H. Hydrolysis of 7S and 11S soy proteins by commercial proteases. Korean J. Food Sci. Technol. 20: 338-343 (1988)
- Choi, H.K., Cho, W.I. and Moon, T.W. Preparation of enzymatic hydrolysis of soymilk residue protein and fractionation of bile acid-binding components. Food and Biotechnology 5: 64-69 (1996)
- Kim, S.H. and Lee, H.J. Characteristics of bitterness peptide from the cheese and soy paste. Korean J. Food Sci. Technol. 17: 276-282 (1985)
- Lim, S.I. Kim, H.K. and Yoo, J.Y. Production and Characteristics of Protease from *Bacillus subtilis* PCA 20-3 in Korean Traditional *Meju*. Korean J. Food Sci. Technol. (submitted)
- Yoo, J.Y. Study on the commercial scale production of *meju* for Korean fermented soybean products. Research report of MOST (1998)
- Hakihara, B. Methods in enzymology vol. II (Asahousyoten:Tokyo) (1956)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265 (1951)
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during

- the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970)
34. Choi, C., Kim, S., Lim, S.I., Lee, H.D., Lee, S.H., Son, J.H., Choi, H.J. and Kim, Y.H. Separation and purification of protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111 in Korean traditional soy sauce. *Agric. Chem. Biotechnol.* 40: 178-183 (1997)
35. Coleman, G. and Whitby, P.W.A. comparison of the amino acid sequence of the serine protease of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* with those of other subtilisin-type enzymes relative to their substrate-binding sites. *J. Gen. Microbiol.* 139: 245-249 (1993)
36. Strongin, A.Y., Izotova, L.S., Abramov, Z.T., Gorodetsky, D.I., Ermakova, L.M., Baratova, L.A., Belyanova, L.P. and Stepanov, V.M. Intracellular serine protease of *Bacillus subtilis*: sequence homology with extracellular subtilisins. *J. Bacteriol.* 133: 1401-1411 (1978)
37. Smith, E.L., Markland, F.S., Kasper, C.B., Delange, R.J., Landon, M. and Evans, W.H. The complete amino acid sequence of two types of Subtilisin, BPN<sup>r</sup> and Carlsberg. *J. Biolog. Chem.* 241: 5974-5976 (1966)

---

(1999년 8월 6일 접수)