

대두단백질 분해균주 *Bacillus subtilis* EB464의 선발 및 분해 특성

박찬수 · 민대규 · 안용선 · 이지훈 · 홍순광¹ · 김정환² · 강대경*

이지바이오시스템 생물자원연구소, ¹명지대학교 생명과학과, ²서울보건대학 조리예술과

Isolation and Characteristics of Soy Protein-degrading Strain, *Bacillus subtilis* EB464. Park, Chan-Soo, Dae-Kyu Min, Yong-Sun Ahn, Jihoon Lee, Soon-Kwang Hong¹, Jung-Hoan Kim², and Dae-Kyung Kang*. Bio-Resources Institute, EASY BIO System, Inc., Uiwang 437-020, Korea, ¹Department of Biological Sciences, Myongji University, Yongin 449-728, Korea, ²Department of Culinary Art, Seoul Health College, Sungnam 461-713, Korea. – A bacterium degrading soy protein was isolated from Korean traditional fermented foods. The isolated strain was identified as *Bacillus subtilis*, and named as *B. subtilis* EB464. The optimum pH and temperature of the protease produced by *B. subtilis* EB464 were pH 9.0 and 50°C, respectively. The protease was stable in the range of pH 6~10 and below 40°C. The content of water-soluble protein and free amino acid of the medium were increased from 4.2% to 20.6% and from 1.9% to 22.0%, respectively, by solid-state fermentation of soybean meal with *B. subtilis* EB464 for 72 h.

Key words: *Bacillus subtilis*, isolation, identification, protease, soy protein

대두는 대표적인 식물성 단백질과 지방질의 공급원으로서 간장, 된장과 같은 전통발효식품 제조, 식용유, 두부 및 두유 생산뿐만 아니라 동물의 단백질 공급원으로도 이용되어 왔다. 한편, 대두단백질의 효율적인 이용을 위해 산이나 알칼리 처리 또는 알코올로 처리함으로써 단백질 함량을 높인 분리대두단백질 또는 농축대두단백질을 제조하기도 한다. 이러한 대두단백질은 유아식, 스포츠 드링크, 우유나 육류 대체식품, 곡류강화식품 등 생리화학적 기능을 주는 식품에 사용되어 왔는데, 최근 들어 심장병, 비만, 암, 당뇨 등과 관련이 있는 생리활성물질들을 함유하고 있는 것으로 보고됨에 따라 관심이 급증하고 있다[4, 7]. 또한, 대두단백질은 효소의 작용에 의하여 부분적으로 가수분해되어 대두펩타이드 또는 아미노산 형태로 될 수 있는데, 대두펩타이드는 항암, 혈압 강하, 혈중콜레스테롤 강하, 면역 증강, 칼슘흡수 촉진 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다[6, 21, 22].

대두의 탈지가공 후의 부산물로 생산되는 대두박은 단백질 함량이 45-50% 정도로서 현재는 가축사료로 주로 이용되고 있다[1, 3, 8, 20]. 일반적으로 대두박은 콩을 분쇄한 후 hexane으로 대두유를 추출하고 남은 부산물로 정의되며, 아미노산 조성이 우수하고 대량으로 생산되기 때문에 중요한 식물성 단백질 공급원중의 하나이다. 그러나, 대두박에 함유된 대두단백질은 수용액상에는 소량만 녹을 수 있고, 또 불용성 탄수화물과 혼합되어 있기 때문에 단백질 이용률이

낮은 단점이 있다[10, 11, 16]. 대두박을 직접 식품이나 사료로 이용할 경우에 대두단백질이나 대두펩타이드의 소화력이 떨어지는 이유는 수용액에 용해도가 낮은 점과 대두박에 포함된 트립신 저해물질 때문이다. 따라서, 대두박에 열처리를 하거나 단백질 가수분해효소를 처리하여 대두펩타이드와 아미노산의 체내 흡수를 증가시키는 연구들이 진행되고 있는데[5, 9], 상업화된 단백질 분해효소제로는 Novo사의 Alcalase와 Flavourzyme 등이 있다. 상업적으로 이용되는 단백질 분해효소들은 주로 미생물 발효를 통해서 정제하여 판매하고 있으나, 정제된 효소의 가격이 고가이므로 저가의 대두박에 적용하는 것은 경제성이 낮다. 한편, 한국 전통발효식품중에는 대두발효식품들이 많고, 이 중에는 GRAS (Generally Recognized As Safe)로 인정된 균주로서 단백질 분해효소를 분비하는 미생물들이 다수 존재하고 있다.

본 연구에서는 정제된 효소를 이용하지 않고 한국 전통식품에서 대두단백질 분해능이 우수한 균주를 분리한 후 대두박의 단백질 분해에 적용하여, 대두박의 수용성단백질 및 유리아미노산의 함량을 증가시킴으로써 대두박의 이용성 향상을 도모하고자 한다.

재료 및 방법

균주 분리

대두단백 분해효소를 분비하는 균주를 분리하기 위하여, 시중에서 구입한 된장 및 청국장 10여종을 생리식염수에 혼탁, 흐석시키고 그 상층액을 분리대두단백(Isolated soy protein)이 2% 함유된 평판배지에 도말하여 37°C에서 배양하였다. 배양 2-3일 후에 투명환을 형성하는 colony를 대두

*Corresponding author
Tel. 031-454-2884, Fax. 031-451-2774
E-mail: daekyung@easybio.co.kr

단백질 분해능을 가진 균주로 추정, 선발한 후에 균주동정을 실시하였다.

균주 동정

선발된 균주는 Nutrient Agar(Merck)에서 37°C에서 24시간동안 배양한 후 균주 동정에 사용하였다. 1차적으로 균주의 형태학적, 생화학적 특성을 조사한 후, API 50CHB kit (bioMerieux Co, France)를 이용하여 49개의 탄소원에 대한 이용성을 조사하여 간이 동정하였다.

사용배지 및 배양방법

종균배양용 배지로는 2% 분리대두단백과 0.5% glucose로 조성된 액체배지를 사용하였고, 본배양용 고체배지로는 멸균한 대두박만을 사용하였다. 분리대두단백이 함유된 액체

배지에 선발된 균주를 접종하고 37°C에서 균수가 10⁸/ml 이상이 될 때까지 배양한 후에, 멸균한 대두박에 10%(v/w) 접종하였다. 대두박의 수분함량은 40%로 조정하고 37°C에서 교반배양하였다.

대두박배지에서의 균수변화

대두박배지에서 고체배양한 시료를 1일 간격으로 취한 후, 시료의 5배에 해당되는 생리식염수를 가하여 4°C에서 30분간 방치하였다. 교반한 후에 0.85% 생리식염수로 단계 희석하여 Nutrient plate에 도말하고 37°C에서 배양한 후 생균수를 측정하였다.

대두박배지에서의 단백질 분해활성 측정

고체배지에서 배양중의 단백질 분해활성의 변화양상을 조

Table 1. Characteristics of the isolated strain, EB464.

Characteristics	Result	Characteristics	Result
Morphological characterization			
Shape	+	Manitol	+
Gram stain	+ ¹⁾	Sorbitol	+
Mobility	+	α-Methyl-D-mannoside	-
Spore formation	+	α-Methyl-D-gluoside	+
Physiological characterization		N-acetyl glucosamine	+
Catalase	+	Amygdalin	-
VP-reaction	+	Arbutine	-
Growth at pH 5.7	+	Esculine	+
Utilization of propionate	-	Salicine	+
Utilization of citrate	+	Cellobiose	+
Egg-yolk lecithinase	-	Maltose	+
Decomposition of casein	+	Lactose	+
Starch hydrolysis	+	Melibiose	+
Carbohydrate degradation ²⁾		Sucrose	+
Glycerol	+	Trehalose	+
Erythritol	-	Inuline	+
D-Arabinose	-	Melezitose	-
L-Arabinose	+	D-Raffinose	+
Ribose	+	Starch	+
D-Xylose	+	Glycogen	-
L-Xylose	-	Xylitol	-
Adonitol	-	β-Gentibiose	-
β-Methyl-D-xyloside	-	D-Turannose	-
Galactose	-	D-Lyxose	-
D-Glucose	+	D-Tagatose	-
D-Fluctose	+	D-Fucose	-
D-Mannose	+	L-Fucose	-
L-Sorbose	-	D-Arabitol	-
Rhamnose	-	L-Arabitol	-
Dulcitol	-	Gluconate	-
Inositol	+	2-Keto-gluconate	-
		5-Keto-gluconate	-

¹⁾ + : Positive result, - : Negative result

²⁾ API 50CH kit was used

사하기 위해, 대두박배지에서 고체배양한 시료를 1일 간격으로 취한 후, 시료의 5배에 해당되는 Tris 완충용액(pH 7.0)을 가하여 4°C에서 1시간동안 방치하였다. 4,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 0.2 μm filter에 통과시켜 단백질 분해효소 활성측정용 효소액으로 사용하였으며, 식품첨가물공전의 세균성 프로테아제 측정법에 준하여 분석하였다[23]. 효소의 역기는 bacterial protease unit(PC)로서 표시하였으며, 1 PC는 1분당 1.5 μg/ml 의 L-tyrosine을 생성하는 효소의 양에 해당된다.

조효소액의 준비

단백질 분해효소의 특성을 조사하기 위해, 상기의 방법으로 준비한 단백질 분해효소 활성측정용 시료를 사용하여 ammonium sulfate(80%)로 단백질 침전을 유도하였다. 침전이 완료된 시료액을 4°C에서 8,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 침전물을 취하고 Tris 완충용액(pH 7.0)에 용해시킨 다음, 4°C에서 24시간동안 투석하였다. 투석이 완료된 시료액을 4°C에서 3,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상등액을 취하여 조효소액으로 사용하였다.

효소의 최적 온도 및 최적 pH

효소반응의 최적 온도를 알기 위해, 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)에서 0.7 mM casein을 기질로 사용하여 20°C에서 80°C까지 각 온도별로 30분간 반응시킨 후 효소활성을 비교하였다. 또한 최적 pH를 검토하기 위해서는, 조효소액을 아래의 각 pH별 완충용액에 넣고 반응시킨 후 효소의 활성을 조사하였다. 사용한 완충용액으로서, pH 2.0~4.0은 50 mM glycine-HCl buffer, pH 4.0~7.0은 50 mM sodium acetate buffer, pH 7.0~9.0은 50 mM Tris-HCl buffer, pH 9.0~12.0은 50 mM glycine-NaOH buffer를 각각 사용하였다.

효소의 온도 안정성 및 pH 안정성

효소의 온도 안정성을 검토하기 위해, 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)에 조효소액을 첨가하여 20°C에서 80°C까지의 각 온도에서 30분간 처리한 후 잔존효소의 활성을 측정하였다. 효소의 pH 안정성을 조사하기 위해서는, pH 2.0에서 pH 12.0까지의 각 완충액에 조효소액을 첨가하여 4°C에서 24시간동안 보관한 후 잔존 효소활성을 측정하였다.

수용성 단백질 및 유리아미노산의 분석

대두박배지에서 고체배양한 시료를 1일 간격으로 취한 후, 시료의 10배에 해당되는 증류수를 가하여 4°C에서 6시간동안 방치하였다. 8,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 0.2 μm filter에 통과시켜 수용성 단백질 및 유리아미노산 분석용 시료로 사용하였다. 수용성 단백질은 Lowry법[18]에 따라 측정하였으며, 유리아미노산의 분석은 ninhydrin

법[15]을 이용하였다.

결과 및 고찰

대두단백 분해효소 생산균주의 분리 및 동정

전통발효식품인 청국장에서 분리한 EB464 균주는 Gram 양성의 간균으로서, 호기성이고 spore를 형성하며 catalase test에서는 양성으로 나타나 *Bacillus* 속의 세균임을 추정할 수 있었다. API 50CHB kit (bioMerieux Co, France)를 이용하여 49개의 탄소원에 대한 이용성을 조사한 결과, 85.4%의 유사율로 *Bacillus subtilis*로 간이 동정하였다(Table 1). 따라서, 본 균주를 *Bacillus subtilis* EB464로 명명하였다.

대두박 고체배양 시간에 따른 효소활성 비교

2% 분리대두단백이 함유된 액체배지에 균주를 접종하고 균수가 10⁸ cfu/ml일 때까지 37°C에서 배양한 후 멸균한 대두박에 10% (v/w) 첨가하고 배양시간에 따른 균수의 변화 및 단백질분해효소의 역가 변화를 측정한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 배양 24시간까지는 단백질분해효소의 활성이 균수의 증가와 일치하였고, 최대활성을 나타낸 시기는 배양 24시간 후로서 300 PC/g였으며, 균수도 최대에 달하였다(10¹⁰ cells/g). 배양 24시간 이후부터는 균수 및 단백질분해효소역가가 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 사용되는 배지에 따라 최대활성에 도달하는 시간이 달라질 수 있으나, Kembhavi 등[12]이 분리한 *Bacillus* NCM No.64는 배양 38시간만에 단백질분해효소의 활성이 최대에 도달하였다는 보고 및 Lee 등[17]이 청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis* KCK-7는 배양 48시간만에 단백질분해효소의 활성이 최대에 도달하였다는 보고와 비교할 경우, 본 실험에 사용한 균주는 보다 짧은 시간에 효소의 활성이 최고에 도달하는 것을 알 수 있었다. 한편, 중균배양용 액체배지에서의 효소 최대활성은 10 PC/ml로서 고체배양에 비교하여 효소

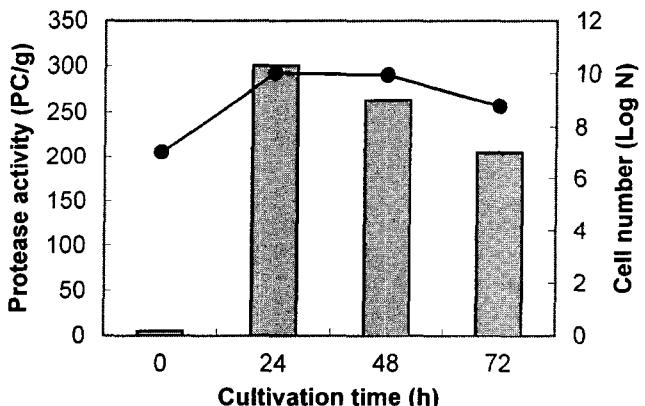


Fig. 1. Growth and protease production of *Bacillus subtilis* EB464 during solid-state fermentation. Cells were grown in soybean meal medium (initial water content: 40%). ●: cell growth, ■: protease activity

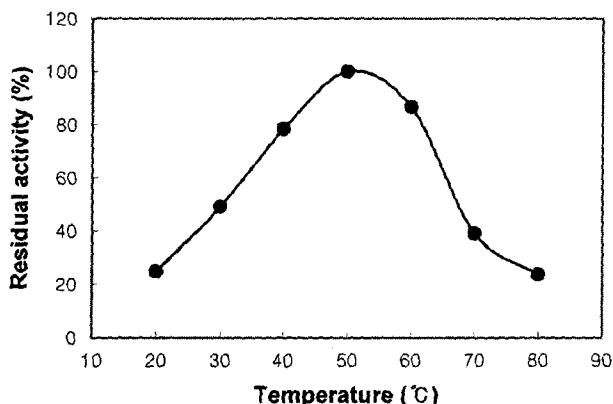


Fig. 2. Effect of temperature on the protease activity produced by *Bacillus subtilis* EB464. The crude enzyme activity was measured at various temperatures, and their residual activities were represented as percents to the maximum protease activity at 50°C.

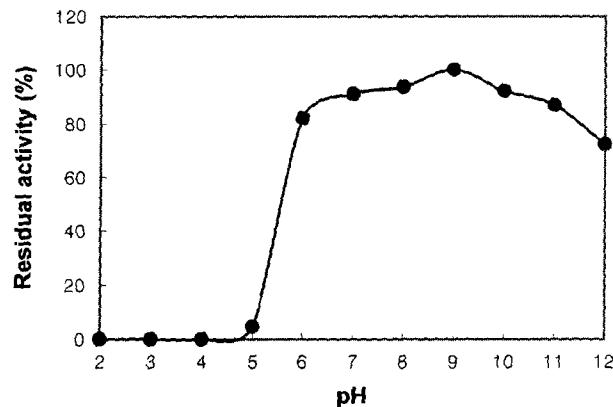


Fig. 3. Effect of pH on the protease activity produced by *Bacillus subtilis* EB464. The crude enzyme activity was measured at various pHs, and their residual activities were represented as percents to the maximum protease activity at pH 9. The buffer systems used were described in Materials and Methods.

활성이 매우 낮았다.

효소의 최적 온도 및 pH

본 효소의 활성에 미치는 반응 최적온도를 조사하기 위하여, 20°C에서 80°C까지 각 온도에서의 효소활성을 측정하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 반응 최적온도는 50°C로 나타났는데, 이는 Kim 등[14]과 Ahn 등[2]이 보고한 *Bacillus* sp.의 protease 반응 최적 온도와 유사하였으며, Kim 등[13]이 보고한 고온성 *Bacillus* sp.의 protease 반응 최적 온도보다는 낮았다.

효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여, 조효소액을 pH 2.0~12.0까지의 각 완충용액을 사용하여 37°C에서 기질과 반응시킨 후 활성을 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 pH 9.0에서 효소의 활성이 가장 우수한 것으로 나타났으며, 이 결과는 *Bacillus* 유래의 알칼리성 protease

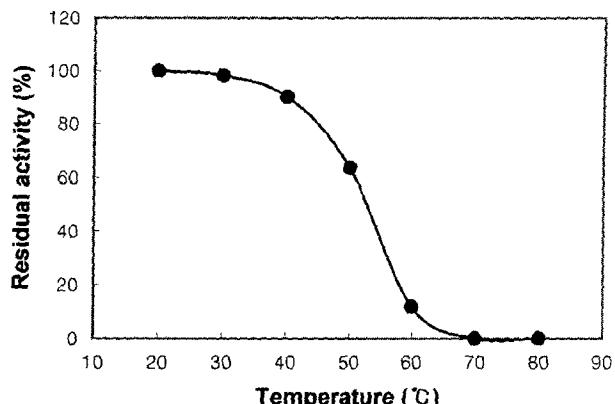


Fig. 4. Stability of the protease produced by *Bacillus subtilis* EB464 at various temperatures. The crude enzyme solution was preincubated for 30 min in 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.0) at various temperatures, and then the residual protease activity was measured. The residual protease activities were represented as percents to the untreated protease activity.

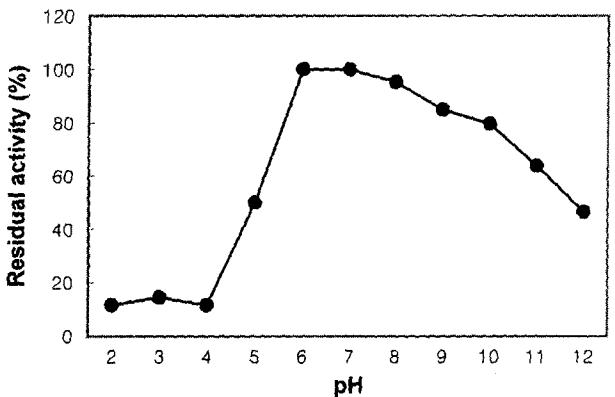


Fig. 5. Stability of the protease produced by *Bacillus subtilis* EB464 at various pHs. The crude enzyme solution was preincubated at various pHs at 4°C for 24 hr, and then the residual protease activities were measured. The residual activities were represented as percents to the maximum protease activity at pH 7.0. The buffer systems used were described in Materials and Methods.

의 최적 pH 범위인 pH 9-11과 유사하였기 때문에[2, 13, 14], *Bacillus subtilis* EB464가 생산하는 protease는 알칼리성 효소로 추정할 수 있었다.

온도 및 pH 변화에 대한 효소의 안정성

본 효소의 온도 안정성을 조사하기 위하여, 20°C에서 80°C까지 각 온도별로 조효소액을 30분간 처리한 후, 급냉각시켜 37°C에서 잔존 효소 활성을 측정하였다. 본 효소의 온도 안정성은 Fig. 4에 나타난 바와 같이 40°C에서 30분까지는 거의 안정하였으나, 50°C 이상에서는 효소활성이 급격히 실 활되었다. 이와 같은 결과는 Kim 등[13]이 보고한 고온성 *Bacillus* sp.의 protease와 유사함을 알 수 있었다. 이러한 현상은 단백질 가수분해효소의 열 안정성을 연구할 때 자주 관

Table 2. Conversion of the soy protein into the water-soluble protein and the free amino acid by protease produced from *Bacillus subtilis* EB464.

Incubation Time (hr)	Water-soluble Protein (%)	Free Amino Acid (%)
0	4.2	1.9
24	15.1	9.2
48	18.2	18.8
72	20.6	22.0

찰되는 현상으로 온도의 증가에 따른 단백질 구조의 변성과 autoproteolysis가 급격히 증가되기 때문이다[19].

한편, pH에 대한 효소의 안정성을 조사하기 위하여, pH 2.0에서 pH 12.0까지 pH가 다른 여러 종류의 완충용액과 조효소액을 혼합하고 4°C에서 24시간 처리한 후, 효소의 잔존 활성을 측정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이, pH 6.0에서 10.0의 범위에서 80% 이상의 높은 활성을 유지함으로써, 본 연구에 사용된 protease는 주로 알칼리성 효소로 추정되었으며, 이 결과는 Kim 등[14]이 보고한 alkaline protease의 pH 안정성과 유사하였다.

수용성 단백질 및 유리아미노산의 측정

청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis* EB464를 대두박 고체배지에 접종하여, 37°C에서 배양하면서 생성된 수용성 단백질 및 유리아미노산의 함량을 조사하였다. 배양시간별로 시료를 취하여 중류수로 추출한 후, Lowry법에 따라 수용성 단백질 함량을 측정하였고 ninhydrin법으로 유리아미노산의 함량을 측정하였다. 그 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이, 배양전의 대두박내 수용성단백질의 함량은 4.2%이었으나, 배양 24시간 후에는 15.1%로 급격히 증가하였고, 72시간 후에는 20%를 초과하였다. 한편, 유리아미노산의 함량도 배양 전의 1.9%에서 배양 24시간 후에는 9.2%까지 증가하였으며, 이후에도 꾸준히 증가하여 72시간 후에는 22.0%까지 도달하였다.

이상과 같이 대두단백질에 특이적으로 분해능력이 우수한 protease 분비균주를 접종하여 대두박의 수용성 단백질 및 유리아미노산의 함량을 증가시킴으로써, 대두박의 이용성 향상을 도모할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

동물사료로 주로 이용되고 있는 대두박의 이용성을 높히기 위한 방안으로서, 전통발효식품에서 대두단백질 분해능력이 우수한 균주를 분리하여 동정하였으며 *Bacillus subtilis* EB464로 명명하였다. 분리된 *B. subtilis* EB464를 대두박에 접종하여 고체배양할 경우, 단백질 분해효소의 최고활성은 배양 24시간 후에 300 PC/g에 달하였으며, 72시간 배양후의 수용성 단백질 함량은 20.6%, 유리아미노산의 함량은

22.0%에 달하였다. *B. subtilis* EB464 균주가 분비하는 단백질분해효소의 최적 pH는 9.0, 최적 온도는 50°C로 확인되었다. 본 효소는 40°C에서는 안정하였으나 50°C 이상에서는 효소활성이 급격히 실활되었으며, pH 6.0에서 10.0까지의 광범위한 pH에서 상당히 안정한 것으로 나타났다.

REFERENCES

- Adeola, O. 1996. Bioavailability of tryptophan in soybean meal for 10-kg pigs using slope-ratio assay. *J. Animal Sci.* **74**: 2411-2419.
- Ahn, J. -W., T. -K. Oh, Y. -H. Park, and K. -H. Park. 1990. Partial purification and characterization of the alkaline protease from *Bacillus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**: 344-351.
- Boonyaratpalin, M., P. Suraneiranat, and T. Tunpibal. 1998. Replacement of fish meal with various types of soybean products in diets for the Asian seabass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture*. **161**: 67-78.
- Bradford, M. M. 1983. Nutritional properties of soy protein concentrate. *Cereal Foods World*. **28**: 457-459.
- Caine W. R., W. C. Sauer, S. Tamminga, M. W. Verstegen, and H. Schulze. 1997. Apparent ileal digestibilities of amino acids in newly weaned pigs fed diets with protease-treated soybean meal. *J. Animal Sci.* **75**: 2962-2969.
- Carroll, K. K. 1982. Hypercholesterolemia and atherosclerosis: Effect of dietary protein. *Fed. Proc.* **41**: 2792.
- Duane, W. C. 1999. Effects of soybean protein and very low dietary cholesterol on serum lipids, biliary lipids, and fecal sterols in humans, Metabolism. *Clinical and Experimental*. **48**: 489-494.
- Emmert, J. L. and D. H. Baker. 1997. A chick bioassay approach for determining the bioavailable choline concentration in normal and overheated soybean meal, canola meal and peanut meal. *J. Nutrition*. **127**: 745-752.
- Fischer, M., L. V. Kofod, H. A. Schols, S. R. Piersma, H. Gruppen, and A. G. Voragen. 2001. Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates: heat and humidity effects. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 4463-4469.
- Hackler, L. R., B. R. Stillings, and B. J. Ploimeni. 1973. Correlation of amino acid indexs with nutritional quality of several soybean fraction. *Cereal Chem.* **44**: 638-644.
- Hackler, L. R., D. B. Hand, K. H. Steinkraus, and J. P. Van Buren. 1963. A comparison of nutritional value of protein from several soybean fraction. *Nutrition*. **80**: 205-210.
- Kembhavi, A. A., A. Kukalni, and A. Pant. 1993. Salt tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. NCIM No. 64. *Appl. Biochem. Biotech.* **38**: 83-96.
- Kim, H. -K., K. -H. Kim, J. -K. Lee, Y. -O. Kim, H. -S. Nam, and T. -K. Oh. 1995. Characterization of thermostable protease from thermophilic *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 322-328.
- Kim, T. -H., S. -H. Park, D. -S. Lee, T. -K. Kwon, J. -K.

- Kim, and S. -D. Hong. 1990. Properties of alkaline protease production by an alkalophilic *Bacillus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**: 159-164.
15. Krishnaswamy, P. R., Rao D. Rajagopal, and H. N. Ananthaswamy. 1965. Rosen's ninhydrin method for amino acid analysis. *Anal Biochem.* **11**: 582-584.
16. Lee, G. J. 1984. Changes in carbohydrate composition during the fermentation of soybean curd residue with enzymes. *Kor. Biochem. J.* **17**: 44-50.
17. Lee, S. K., S. Heo, D. H. Bae, and K. H. Choi. 1998. Medium optimization for Fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* KCK-7 isolated from Korean traditional Chungkookjang. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 226-231.
18. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, L. A. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Biol. Chem.* **193**: 265-275.
19. Martin-Hernandez, M. C., A. C. Alting, and F. A. Exterkate. 1994. Purification and characterization of mature, membrane-associated cell-envelope protein of *Lactobacillus helveticus* L89. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 828-834.
20. Metcalf, J., A. Wray-Cahen, D. Chettle, E. E. Sutton, J. D. Beever, D. E. Crompton, L. A. MacRae, J. C. Bequette, and F. R. Backwell. 1996. The effect of dietary crude protein as protected soybean meal on mammary metabolism in the lactating dairy cow. *J. Dairy Sci.* **79**: 603-611.
21. Nohihara, K. 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 49-53.
22. Sirtori, C. R. 1998. Soy protein products as regulators of liver low-density lipoprotein receptors. I. Identification of active-conglycinin subunits. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 2474-2480.
23. 한국식품공업협회. 2000. 식품첨가물공전 . pp792-794.

(Received May 20, 2002/Accepted Aug. 13, 2002)