

멸치 어간장으로부터 분리한 *Bacillus amyloliquefaciens* HTP-8 이 생산하는 단백질 분해효소의 특성

임형택 · 정순경¹ · 김기남 · 하정욱 · 백현동*
경남대학교 생명과학부, ¹양산대학 식품가공제과제빵과

Characterization of Protease Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* HTP-8 Isolated from Korean Fermented Anchovy Sauce. Lim, Hyung-Taek, Sun-Kyung Chung¹, Gi-Nahm Kim, Jung-Uk Ha, and Hyun-Dong Paik*, Division of Life Sciences, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea, ¹Department of Food Processing and Baking, Yangsan College, Yangsan 626-800, Korea – For commercial production of Korean fermented anchovy sauce through rapid fermentation, a bacterial strain which showed the high protease activity was isolated from a commercially fermented anchovy sauce. The isolate was *Bacillus amyloliquefaciens*, and named as *B. amyloliquefaciens* HTP-8. The incubation temperature, initial pH, and cultivation time for optimal production of protease by *B. amyloliquefaciens* HTP-8 were 30°C, 7.0, and 3 days, respectively. In jar fermenter, *B. amyloliquefaciens* HTP-8 showed higher protease activity when grown at pH 7.0. The protease was partially purified by 80% ammonium sulfate precipitation and CM-Sephadex C-50 ion exchange chromatography. The partially purified enzyme had specific activity of 103.3 units/mg, yield of 0.4%, and purification fold of 43.0. The optimal pH and temperature for the protease activity were 10.0 and 50°C, respectively. The protease was relatively stable at the pH range of 7.0-12.0 and at the temperatures below 40°C. The activity of the enzyme was inhibited by Ag⁺, Ba²⁺ and selectively inhibited by PMSF, suggesting that it is a serine protease.

Key words: Korean fermented anchovy sauce, Protease, *Bacillus amyloliquefaciens*

어간장은 어패류를 그 자체의 자가 소화효소나 미생물 효소의 작용으로 일정기간 발효시켜 만든 전통 수산발효식품 중의 하나이다. 어간장은 우리나라 남해안에서도 이용되었으며, 일본 및 동남아 각국에서도 여러 종류의 어패류를 재료로 하여 그들만의 독특한 어간장을 만들어 이용하고 있다. 어간장은 콩간장과 달리 어체내의 단백질 분해효소의 작용으로 생산된 저분자량의 펩타이드류 및 아미노산과 숙성 중에 일어나는 여러 가지 화학변화에 의하여 독특한 풍미를 가지며, 조미료인 동시에 단백질의 공급원으로서 각종 나물무침, 생절이, 국, 찌개 등에 다양하게 이용된다. 그러나 그 독특한 풍미와 영양가치에도 불구하고 콩간장에 비해 그 이용도가 떨어지는 편이다.

국내에서는 생선을 재료로 한 가공공장들이 전국적으로 분포되어 있으며, 이들 생선류 가공공장에서 배출되는 생선의 부산물인 머리, 뼈, 꼬리, 내장, 껍질 등에 단백질, 무기질 등과 같은 유용한 성분이 많이 함유되어 있음에도 불구하고 식용화에 따른 많은 문제점들을 이유로 대부분이 사료나 비료로 이용되고 있다. 현재 이러한 어류가공잔사를 이용한 어간장의 제조에 관한 연구가 많이 이루어지고 있

으며, 이미 말쥐치[8], 고등어[9], 가다랑어[10] 및 정어리[6, 16, 18] 등의 가공잔사를 재료로 한 어간장의 성분분석과 속성발효 및 풍미개선 등의 연구와 그 기능성에 관한 연구결과가 보고된 바 있다. 이러한 어류가공잔사를 이용한 어간장의 제조는 가공잔사의 식품으로서의 활용으로 부산물 활용에 따른 부가가치 향상과 더불어 환경적인 문제 해결에도 도움이 될 것으로 생각된다.

이러한 일련의 어간장의 속성발효와 풍미개선에 관한 연구를 위하여 어간장 유래의 미생물에서 분비되는 protease에 대한 연구가 뒷받침되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 어간장의 산업화에 유리한 강력한 protease를 생산하는 균주를 순수분리하여 그 효소적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

어간장의 대량 생산을 위해 protease 생산성이 뛰어난 균주를 분리할 목적으로 시판되고 있는 삼미식품의 어간장을 시료로 선택하였다. 채취된 시료를 멸균수로 적당히 희석한 후 일부를 취하여 2% skim milk agar 배지(Difco Laboratory, USA)에 도말하고 30°C에서 2일간 배양하였다. 분리된 여러 종의 균들 중 우유단백질의 분해에 의해 형성되는 투명대의 크기에 따라 1차 선별하고, 선별된 균주는 다시 TSB

*Corresponding author
Tel. 82-55-249-2689, Fax. 82-55-243-8133
E-mail: hdpaik@kyungnam.ac.kr

(Tryptic soy broth, Difco Laboratory, USA)배지에 0.4% yeast extract와 5% NaCl을 첨가한 효소생산용 배지에서 30°C, 3일간 배양하여 얻은 배양 상등액을 이용하여 효소 활성을 측정 한 후, 그 중 활성이 가장 높은 균주를 최종 선발하여 본 실험에 사용하였다.

분리균주의 동정은 형태학적, 생화학적 특성을 조사하고, API 50CHB kit(bioMerieux Co., France)를 이용하여 49 개의 탄소원에 대한 이용성을 검토하여 간이 동정하였다.

효소생산조건

분리균주 HTP-8의 효소생산 조건을 검토하기 위하여 효소생산용 배지에 분리균주를 한 백금이 접종하여 30°C에서 6시간 전배양한 후 본배양 배지에 2%(v/v) 수준으로 접종하여 효소생산을 위한 최적 배양조건, 즉, 최적 배양온도, 최적 초기 pH, 그리고 최적 배양시간 등을 조사하였다.

조효소액은 효소생산용 배지에서 최적 배양조건으로 배양한 후 15,900 × g에서 30분간 원심분리한 상등액으로 하였다.

Jar fermenter 배양

HTP-8 균주를 효소생산용 배지에서 30°C, 6~8시간 동안 교반속도 150 rpm의 조건으로 배양한 것을 종균으로 사용하였다. Jar fermenter 배양은 5 l 발효조(KFC 5 l, Korea Fermenter Co., Korea)에서 3 l의 working volume으로 교반속도는 500 rpm, 통기량은 1.0 vvm, 소포제는 silicone LS-300을 최종농도 25%(v/v)로 첨가하였으며, 30°C에서 pH 7.0으로 조정 한 균과 대조균을 비교하여 각각의 균체증식, pH 변화, 그리고 protease activity를 측정하였다. 균체 증식은 spectrophotometer(model DU-60; Beckman, USA)를 이용하여 660 nm에서 흡광도로 측정하였다.

단백질 분해효소의 부분정제

조효소액을 80% 포화 황산암모늄으로 4°C에서 4~5시간 염석한 후, 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 가하여 용해시키고, 4°C에서 72시간 투석하였다. 투석된 효소액을 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형 화시킨 CM-Sephadex C-50 column(Amersham Biosciences, Sweden; 2.5 × 30 cm)에 넣고 동일 완충액으로 비흡착 단백질을 용출시킨 후, NaCl을 1.0 M의 농도까지 직선적으로 증가시키면서 흡착 단백질을 용출시키는 방법으로 효소를 부분 정제하였다. 이 때 fraction volume은 5 ml, elution rate는 70 ml/h로 유출시켰다.

단백질 분해효소의 활성 측정

분리균주가 생산하는 protease활성 측정은 Hagihara 등의 방법[1]을 변형하여 측정하였다. 조효소액 0.12 ml에 Hammarstein casein 0.6%를 포함한 pH 10.0의 sodium

bicarbonate 완충용액(50 mM) 0.6 ml를 가하고 50°C에서 30분간 반응시킨 후, TCA solution(0.11 M trichloroacetic acid, 0.22 M sodium acetate, 0.33 M acetic acid) 0.6 ml를 가하여 반응을 중지시켰다. 반응액을 실온에서 30분간 방치한 다음 생성된 침전을 0.45 μm filter로 여과하여 얻은 용액으로 275 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Protease의 1 unit는 1분 동안 흡광도 0.1을 증가시키는 데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

단백질의 정량

단백질의 정량은 Lowry 방법[14]에 따라 측정하고 bovine serum albumin을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 단백질 함량을 계산하였으며, 효소 정제과정 중의 단백질 농도는 spectrophotometer를 사용하여 280 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

효소의 특성조사

본 효소의 pH에 대한 영향은 universal buffer pH 2.0~13.0의 범위에서 효소와 기질을 혼합하여 50°C, 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였으며, pH 안정성은 효소액을 pH 2.0~13.0의 범위에서 각 pH별로 30°C에서 1시간 정치한 후 pH 10.0로 환원시킨 다음, 50°C에서 30분간 효소액과 기질을 반응시켜 잔존 효소활성을 측정하였다. 효소 활성에 미치는 반응온도의 영향은 표준활성 측정조건에서 온도를 20, 30, 40, 50, 60 및 70°C로 변화시켜 효소활성을 측정하였다. 효소의 온도에 대한 안정성은 각 온도에서 효소를 1시간 정치시킨 다음, 기질과 혼합하여 50°C에서 30분간 반응시킨 후 잔존 효소활성을 측정하였다.

금속이온에 대한 영향은 각종 금속염에 대하여 pH 6.0의 증류수에 녹인 2 mM의 금속이온 용액 0.5 ml와 효소액 0.5 ml를 섞어 30°C에서 1시간 정치한 다음 효소활성을 측정하였으며, 저해제의 영향은 0.5 ml의 각종 저해제(2 mM)와 0.5 ml의 효소액을 30°C에서 30분간 반응시킨 다음 잔존 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 선발

시판 어간장을 멸균수에 균일하게 현탁한 후 분리용 고체배지상에 도말하여 30°C에서 2일간 배양한 후 투명대의 크기가 큰 colony를 1차 선별하였다. 1차 선별된 3균주를 효소생산용 배지에 배양하여 조효소액의 효소활성을 측정 한 결과 HTP-8 균주가 가장 높은 활성을 나타내었으므로 이 균주를 최종 선별하여 본 실험에 이용하였다.

균주의 동정

분리균주인 HTP-8은 Gram 양성 of 간균이며, 호기성이고,

세포내에 포자를 갖고 있으며, catalase test는 양성, oxidase test는 음성인 *Bacillus* 속의 세균임을 알 수 있었다. 당 이용성의 경우 glucose를 발효하였고, 그 외 API 50CHB kit(bioMerieux Co., France)를 이용하여 49개의 탄소원에 대한 이용성을 검토한 결과 87.4%의 유사율로 *Bacillus amyloliquefaciens*로 간이 동정하였다(Table 1).

효소생산을 위한 최적조건

본 균주의 protease 생산을 위한 최적 pH와 배양온도, 배양시간을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 초기 pH 7.0과 30°C에서 배양시 최대의 효소생산을 보였고, 배양시간별 효소활성은 3일간 배양시 최대치를 나타내었으며, 그 후 효소활성을 유지하였으므로 3일을 최적 배양시간으로 정하였다. 이 결과는 전통 메주로부터 분리한 *Bacillus subtilis* PCA 20-3와 토양으로부터 분리된 *Bacillus* sp. WRD-1 유래의 protease가 pH 7.0과 30°C에서 배양시 최대 활성을 나타내었다는 보고와 일치하였으며[12,15], 메주 유래의 *Aspergillus wentii*와 *Syncephalastrum racemosum* PDA 132-2가 생산하는 protease의 경우 각각 pH 8~9, 30°C와 pH 4.0, 20°C인 것으로 나타나 효소생산에 차이가 있는 것으로 나타

났다[11,13]. *B. amyloliquefaciens* HTP-8은 중성 pH에서 균체 증식 및 효소 생산성이 우수하기 때문에 산업적 이용시 일반 조건에서 생산이 가능한 장점을 가지고 있다. 효소 반응의 최적 조건인 pH 10.0보다 낮은 중성 pH에서 균체 증식이 이루어지므로 세포외 배지로 분비되는 protease의 균체 파괴와 같은 성장 저해 효과를 최소화시킬 수도 있다.

Jar fermenter 배양

본 균주를 효소생산용 배지를 사용하여 working volume 3 l jar fermenter에서 발효과정 동안 pH를 7.0으로 조절한 것과 조절하지 않은 것으로 나누어 30°C에서 배양하면서 배양시간의 경과에 따른 균체 증식, pH, 그리고 protease 활성을 측정하였다(Fig. 2). pH를 조절하지 않은 경우, 배양 시간에 따른 pH의 변화는 초기 pH 7.0에서 배양 6~8 시간 사이에 pH 6.0까지 감소되었다가 서서히 증가하여 pH 8.0~8.5 범위를 유지하였으며, 균체의 증식은 pH의 감소에 영향을 받아 약간 감소하였으나 배양 20시간 이내에 대수적으로 증가하였다. 그리고 protease의 생산은 균체 증식의 대수증식기 말에 pH의 상승과 함께 시작하여, 정지기에 도달하면서 효소활성이 크게 증가하는 경향을 나타내었

Table 1. Microbiological identification of *B. amyloliquefaciens* HTP-8, a protease producer isolated from Korean fermented anchovy sauce

Characteristics	Results	Characteristics	Results
Shape	rod	N Acetyl glucosamine	-
Gram stain	+ ¹⁾	Amygdaline	+
Growth in air	+	Arbutine	+
Spore formation	+	Esculine	+
Catalase	+	Salicine	+
Oxidase	-	Cellulose	+
Utilization of carbon source ²⁾		Maltose	+
Glycerol	+	Lactose	+
Erythritol	-	Melibiose	-
D-Arabinose	-	Saccharose	+
L-Arabinose	+	Trehalose	+
Ribose	+	Inuline	-
D-Xylose	+	Melezitose	-
L-Xylose	-	D-Raffinose	+
Adonitol	-	Amidon	+
β Methyl-xyloside	-	Glycogene	+
Galactose	-	Xylitol	-
D-Glucose	+	β Gentiobiose	+
D-Fructose	+	D-Turanose	-
D-Mannose	+	D-Lyxose	-
L-Sorbose	-	D-Tagatose	-
Rhamnose	-	D-Fucose	-
Dulcitol	-	L-Fucose	-
Inositol	-	D-Arabitol	-
Mannitol	+	L-Arabitol	-
Sorbitol	+	Gluconate	-
α Methyl-D-mannoside	-	2 Keto-gluconate	-
α Methyl-D-glucoside	+	5 Keto-gluconate	-

¹⁾+: positive, -: negative.

²⁾API CHB kit was used.

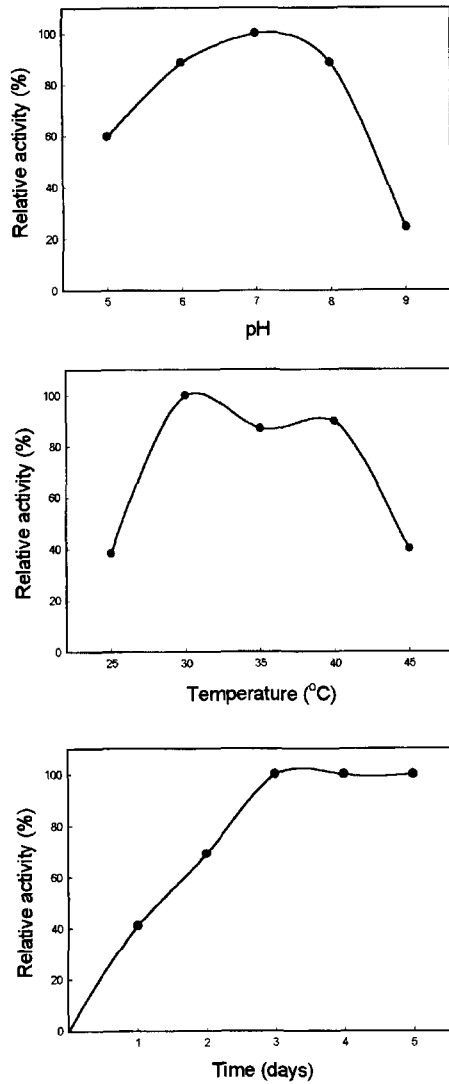


Fig. 1. Effect of initial pH (A), temperature (B), and incubation time (C) on protease production by *B. amyloliquefaciens* HTP-8.

(A) Enzymatic activities at different pH were measured at 30°C for 3 days, (B) Enzymatic activities at different temperatures were measured at pH 7.0 for 3 days, (C) Enzymatic activities at different time intervals were measured at pH 7.0 and 30°C.

다. 반면 pH 7.0으로 조절하여 배양한 경우에는 조절하지 않은 경우보다 효소활성도가 최대에 이르는 시간이 단축되었음을 보여주었다.

단백질 분해효소의 분리 및 부분정제

B. amyloliquefaciens HTP-8의 배양액으로부터 protease를 농축시키기 위해 80% 포화 황산암모늄을 이용하여 염석하고 투석한 후 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화시킨 CM-Sephadex C-50 column(2.5 × 30 cm)에 충전시킨 후 70 ml/h의 유속으로 5 ml씩 용출하였다. 효소

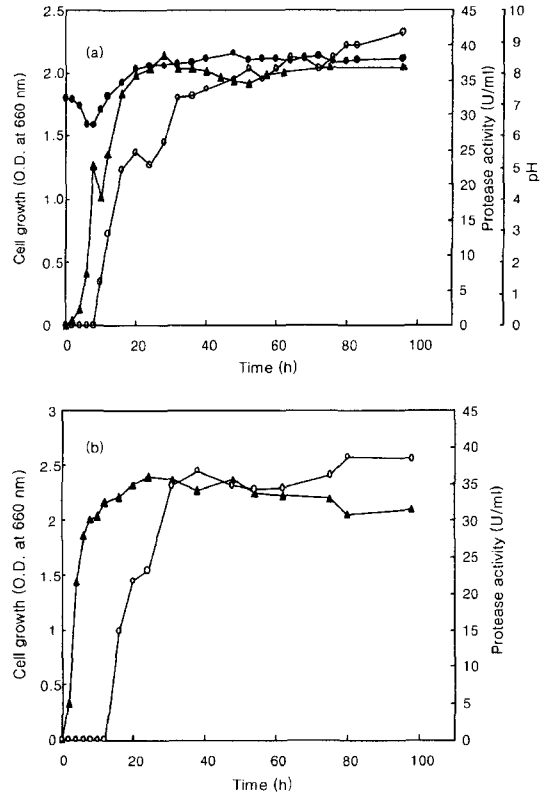


Fig. 2. Effect of pH on growth and protease production by *B. amyloliquefaciens* HTP-8 in jar fermenter.

Cells were grown in a 5 l jar fermenter containing 3 l of enzyme production medium (TSB medium plus 0.4% yeast extract and 5% NaCl), agitated at 500 rpm, aerated at 1 vvm, and controlled at 30 °C. The pH of fermenter was not controlled (a) and controlled at pH 7.0 (b) during fermentation. ●, pH; ○, protease activity; ▲, cell growth

를 흡착시킨 후 1.0 M NaCl 용액을 가해 흡착성 활성 단백질을 분획하였다. 그 결과, Fig. 3에서와 같이 한 개의 peak가 검출되었고 49~55번 사이의 분획에서 효소활성이 검출되었으며 50~54번을 활성 단백질로 분획하였다. 이 때의 수율은 0.4%, 정제도는 43.0배였다.

pH와 온도에 의한 영향

본 효소의 pH에 대한 영향을 조사한 결과, Fig. 4에서와 같이 pH 7.0~11.0까지의 비교적 넓은 pH 범위에서 높은 효소활성을 나타내었으며, 반응 최적 pH가 10.0으로서 본 효소는 alkaline protease인 것으로 나타났다. pH 안정성은 pH 6.0~12.0의 범위에서 80% 이상의 높은 활성을 유지함으로써 알칼리내성 효소로 밝혀졌다. 이 결과는 *Aspergillus wentii*와 *Bacillus subtilis* PCA 20-3이 생산한 protease의 최적 pH와 pH 안정성이 모두 pH 6.0~11.0의 범위로 나타난 것과 유사하였으며[11,12], *Bacillus* sp. KUN-17과 *Bacillus pumilus* JB 05, 그리고 *Pseudomonas* sp. BK7

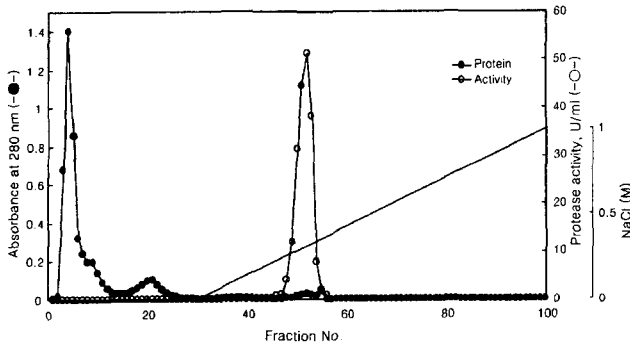


Fig. 3. CM-Sephadex C-50 column chromatography of protease from *B. amyloliquefaciens* HTP-8.
The enzyme (2 ml) was loaded to the column (2.5×30 cm). Flow rate, 70 ml/h; fraction volume, 5 ml/tube; elution buffer, 10 mM phosphate buffer pH 7.0. ●, absorbance at 280 nm; ○, protease activity; -, concentration of NaCl.

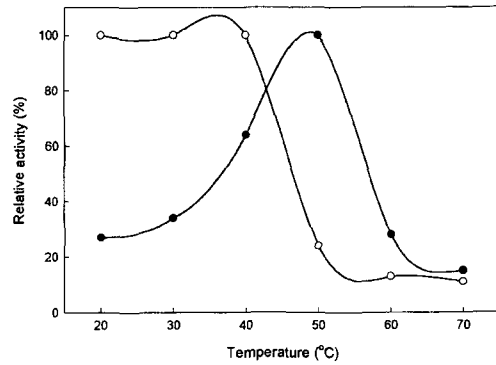


Fig. 5. Effect of temperature on activity and stability of protease from *B. amyloliquefaciens* HTP-8.
The reaction was carried out at pH 10.0 for 30 min at various temperatures. For thermal stability, the enzyme was incubated at pH 10.0 for 1 h at various temperatures and the residual activities were measured at standard assay condition. ●, optimal temperature; ○, thermal stability.

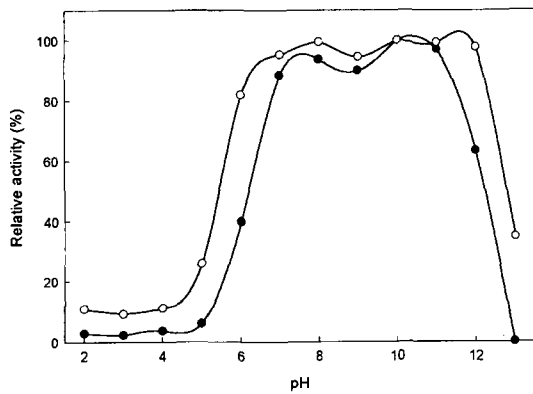


Fig. 4. Effect of pH on activity and stability of protease from *B. amyloliquefaciens* HTP-8.
The reaction was carried out at 50°C for 30 min at various pHs. For pH stability, the enzyme was incubated at 30°C for 1 h at various pHs and the residual activities were measured at standard assay condition. ●, optimal pH; ○, pH stability.

의 alkaline protease의 최적 pH가 각각 10.5, 10.5와 10.0인 것과도 일치하였다[3,4,7].

효소활성에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과, Fig. 5와 같이 50°C에서 최적활성을 나타내었으며, 열에 대한 안정성은 40°C 이상에서 급격히 효소활성이 감소하는 것으로 보아 내열성이 약한 것으로 사료된다. *Pseudomonas* sp. BK7과 *Aspergillus wentii*, 그리고 *Syncephalastrum racemosum* PDA 132-2가 생산한 protease의 최적온도가 50°C를 나타내며, 열안정성이 40°C 이후 급격히 저하되어 60°C에서는 완전히 실활될 정도로 고온에서 불안정하다는 결과는 본 균주가 생산하는 효소와 매우 유사하였다[7,11,13].

금속이온의 영향

금속이온에 대한 영향은 Table 2에서와 같이 Ag⁺와

Table 2. Effect of metal ions on protease activity from *B. amyloliquefaciens* HTP-8

Metal ion concentration (2 mM)	Relative activity (%)
Control	100
Ag ⁺	24
Ba ²⁺	44
Ca ²⁺	97
Cu ²⁺	88
Fe ²⁺	89
K ⁺	94
Mg ²⁺	94
Mn ²⁺	93
Pb ²⁺	87
Zn ²⁺	109

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 60 min and the residual activities were assayed.

Ba²⁺ 첨가시 효소활성이 24%, 44%로 현저히 감소되었다. 그러나, Zn²⁺의 첨가에서는 효소활성이 109%로 약간 증가하였으며, Pb²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺ 등의 금속이온의 경우 다소 감소하는 경향을 보였다. 이 결과는 *Syncephalastrum racemosum* PDA 132-2에서 Ag⁺ 첨가시 31%로 그 활성이 감소되었으며, *Streptomyces* sp. YSA-130의 alkaline protease의 경우 Ag⁺와 Hg²⁺에 의해 각각 40%와 5%의 잔존활성을 가진다는 결과와 유사하였다[13,19]. 반면, alkaline protease가 Ca²⁺에 의해서 활성이 증대 또는 보호된다는 보고와는 반대의 결과를 나타내었다[5,17].

저해제의 영향

효소활성에 영향을 미치는 화학적 저해제 중, serine protease 저해제인 PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride),

Table 3. Effect of several inhibitors and chemicals on protease activity from *B. amyloliquefaciens* HTP-8

Reagents (2 mM)	Relative activity (%)
Control	100
EDTA	75
2,4-DNP	100
PCMB	84
PMSF	66

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

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride, PCMB: *p*-chloromercuribenzoic acid, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, 2,4-DNP: 2,4-dinitrophenol.

thiol protease 저해제인 PCMB(*p*-chloromercuribenzoic acid), metal protease 저해제인 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), 말단 아미노산 잔기가 활성부위인 효소활성 저해제인 2,4-DNP(2,4-dinitrophenol)를 선정하여 본 효소의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과, PMSF에 의하여 선택적으로 저해되었다(Table 3). 지금까지 연구된 거의 모든 알칼리성 protease는 PMSF 및 DFP(diisopropyl fluorophosphate)에 의해 선택적으로 불활성화되므로 이 효소의 활성부위에 serine 잔기를 가지고 있다고 알려져 있다[2]. 그러므로, 본 균주가 분비하는 protease도 활성부위에 serine 잔기를 갖고 있는 일종의 serine protease로 사료된다. 이러한 결과는 *Bacillus* sp. KUN-17과 *Aspergillus niger*가 생산한 serine protease와 *Bacillus pumilus* JB 05와 *Streptomyces* sp. YSA-130가 생산한 alkaline protease의 화학적 저해제에 대한 영향과 유사하였다[3,4,5,19].

요 약

저염상태에서 속성 발효를 통한 멸치 어간장의 대량 생산을 위하여 시중 어간장에서 단백질 분해효소 생산이 우수한 균주를 분리 동정하여, *B. amyloliquefaciens* HTP-8로 명명하였다. 효소생산을 위한 배양 최적온도, 초기 pH, 그리고 배양시간은 각각 30°C, pH 7.0과 3일이었다. Jar fermenter 배양시 pH를 7.0으로 조절한 경우가 조절하지 않은 경우에 비해 효소활성이 최대에 이르는 시간이 단축되었다. 효소의 부분정제는 조효소액을 80% ammonium sulfate에 의한 염석과 CM-Sephadex C-50을 이용하여 정제한 결과, 수율이 0.4%, 정제배수가 43.0배였다. 정제효소의 최적 pH와 온도는 pH 10.0과 50°C였으며, pH 7.0~12.0의 pH 범위와 40°C 이하에서 안정하였다. 금속이온 중 Ag⁺, Ba²⁺에 의하여 효소활성이 저해되었다. 한편, 본 효소는 PMSF에 의하여 선택적으로 활성이 억제됨으로써 활성부위에 serine을 가진 serine protease에 속하는 것

으로 판단되었다.

감사의 글

이 논문은 두뇌한국21 사업 핵심분야에 의하여 지원되었으므로, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Hagihara, B., H. Matrubara, M. Nakai, and K. Okunuki. 1958. Crystalline bacterial proteinase. 1. Preparation of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis*. *J. Biochem.* **45**: 185-194.
- Horikoshi, K. and T. Akiba. 1982. *Alkalophilic Microorganisms*. pp 93-101. Scientific Societies Press, Tokyo.
- Hwang, S. Y. 1995. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Bacillus* sp. strain KUN-17. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 53-59.
- Johnvesly, B. and R. N. Gajanan. 2001. Production of bleach-stable and halo-tolerant alkaline protease by an alkalophilic *Bacillus pumilus* JB 05 isolated from cement industry effluents. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 558-563.
- Sakka, K., K. Shimada, and K. I. Matsushima. 1985. Purification and some properties of serine proteinase from a mutant of *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Technol.* **63**: 479-483.
- Kim, S. J., D. B. Shin, and B. H. Ryu. 1993. Continuous rapid fermentation of sardine soy sauce by using column type reactor packed immobilized yeast cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* **25**: 154-159.
- Lee, E. G., E. H. Park, and H. H. Hyun. 2000. Purification and characterization of two alkaline proteases produced by *Pseudomonas* sp. BK7. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 677-684.
- Lee, E. H., C. B. Ahn, J. S. Kim, C. W. Lim, S. W. Lee, and Y. A. Choi. 1988. Processing and taste compounds of fish sauces from filefish scrap. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **17**: 326-335.
- Lee, E. H., H. S. Park, C. B. Ahn, and G. C. Hwang. 1986. Preparation of fish sauce from mackerel scrap. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **15**: 201-206.
- Lee, E. H., T. H. Lee, J. S. Kim, and C. B. Ahn. 1989. Processing and taste compounds of the fish sauce from skipjack scrap. *Bull. Korean Fish. Soc.* **22**: 25-35.
- Lim, S. I. 2000. Purification and characterization of protease produced by *Aspergillus wentii* isolated from Korean traditional *meju*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**: 161-167.
- Lim, S. I., H. K. Kim, and J. Y. Yoo. 2000. Characteristics of protease produced by *Bacillus subtilis* PCA 20-3 isolated from Korean traditional *meju*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**: 154-160.
- Lim, S. I. and J. Y. Yoo. 1999. Purification and characteristics of protease produced by *Syncephalastrum racemosum*

- PDA 132-2 from Korean traditional *meju*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**: 1010–1016.
14. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265–275.
15. Ok, M., M. S. Kim, W. S. Seo, J. Y. Cha, and Y. S. Cho. 2000. Characterization of extracellular protease of *Bacillus* sp. WRD-1 isolated from soil. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 329–333.
16. Ryu, B. H., S. J. Kim, and D. B. Shin. 1992. Lactic acid, ethylalcohol and 4-ethylguaiacol contents of rapid fermentation of sardine soy sauce prepared by using immobilized whole cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* **24**: 456–462.
17. Kobayashi, T., A. Ogasawara, S. Ito, and M. Saitoh. 1985. Purification and some properties of alkaline proteinase produced by *Pseudomonas maltophilia*. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 693–698.
18. Yeum, D. M., T. G. Lee, J. R. Do, O. K. Kim, Y. B. Park, S. B. Kim, and Y. H. Park. 1993. Characteristics of angiotensin-I converting enzyme inhibitors derived from fermented fish product. 2. Characteristics of angiotensin-I converting enzyme inhibitors of fish sauce prepared from sardine, *Sardinops melanosticta*. *Bull. Korean Fish. Soc.* **26**: 416–423.
19. Yun, S. W., K. P. Lee, J. H. Yu, C. S. Shin, and D. H. Oh. 1989. Purification and properties of alkaline protease from *Streptomyces* sp. YSA-130. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 358–364.

(Received Nov. 17, 2001/Accepted Jan. 17, 2002)