

## 청국장에서 분리된 *Bacillus licheniformis*의 Protease 생산을 위한 배지 최적화

윤기홍\* · 신혜영  
우송대학교 식품생물과학과

**Medium Optimization for the Protease Production by *Bacillus licheniformis* Isolated from Cheongkookjang. Yoon, Ki-Hong\* and Hye Young Shin.** Department of Food Science & Biotechnology, Woosong University, Daejeon 300-718, Korea – *Bacillus licheniformis* fermenting soybean product with highest score in consumer acceptance had been isolated from homemade Cheongkookjang. In order to develop the medium composition, effects of ingredients including nitrogen sources, carbon sources, metal ions and phosphate were examined for protease production of the isolate. Potato starch increased the protease productivity, while glucose repressed it. Yeast extract was the most effective nitrogen source for enzyme production. The calcium was found to increase protease activity slightly while cell growth and enzyme production was completely inhibited by divalent ions such as  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Co^{2+}$ . The maximum protease productivity was reached approximately 800 unit/mL in the optimized medium consisting of potato starch (1.5%), yeast extract (1.5%),  $CaCl_2$  (0.7%),  $K_2HPO_4$  (0.03%) and  $KH_2PO_4$  (0.03%). The protease activity of culture filtrate was gradually decreased after incubation for 28 h.

**Key words:** *Bacillus licheniformis*, protease productivity, medium, optimization

### 서 론

Protease는 단백질을 저분자 peptide와 아미노산으로 분해하는 효소로 동물, 식물과 미생물을 포함하는 모든 생물에서 생산된다. 미생물 protease는 산업용 효소 시장의 60%를 차지하며, 반응특성이 다양하여 최적 반응pH에 따라 산성, 중성, 알칼리성 protease로 구별된다. 또한 미생물 유래의 protease는 casein 분해능 뿐 아니라 케라틴 분해능, 혈전 용해능, 젤라틴 분해능을 갖는 것으로 보고되었으며 세제, 식품, 농약, 제약, 피혁, 섬유, 사료산업 등에 널리 이용되고 있다[6, 17]. 산업용 효소로써 protease의 유용성을 확보하기 위해 protease 생산에 적합한 배지 조성 및 발효조건이 여러 종류의 미생물을 대상으로 연구되었다. 특히 *Bacillus*속 분리 균주를 대상으로 탄소원, 질소원 및 무기염류와 같은 배지조성과 접종량, 배양액 pH, 배양온도, 배양시간, 교반속도 등의 배양조건을 달리함으로써 protease 생산성을 최적화한 결과가 다수 보고되었으며 효소 활성 단위에 대한 정의가 서로 달라 전체적으로 비교하기는 어려우나, casein 기질을 기준으로 볼 때 액상배양 1 mL당 수백에서 수천 units를 생산하는 균주와 그 배양조건이 알려졌다[7, 19, 20, 24]. 폐수처리 고형물이나 농산부산물을 배지성분으로 하여 protease를 생산함으로써 효소 생산의 경제성을 높이고자 하는 시도가

있었으며[7, 18], 동물의 털 또는 깃털을 배지에 첨가하였을 때는 대부분 *Bacillus*속 균주에서 keratinase의 생산성이 증가되는 것으로 알려졌다[3, 4].

대두 발효 식품에는 대두단백질을 분해하는 protease 생산균이 다수 존재하고 있어 우리나라의 전통발효 식품인 간장, 된장, 청국장으로부터 혈전용해 효소를 생산하는 *B. amyloliquefaciens* D4-7[11], *B. amyloliquefaciens* K-42 [25], *B. subtilis* BK-17[15], *B. subtilis* KCK-7[21], *B. subtilis* KDO-13[16], *B. subtilis* LSH805[13], *Bacillus* sp. D-1[10] 등이 분리되었으며, 중국의 대두 발효식품으로부터 *B. amyloliquefaciens* DC-4[22]가 분리된 바 있다. 또한 낫또에서 분리된 *Bacillus*는 새우 양식의 생균제로 사용되어 소화기관에서 단백질 분해능을 높임으로써 새우 증식율을 높이는 것으로 알려졌다[17].

한편 청국장에서 protease 활성이 높은 균주로 분리된 *B. subtilis* S2는 청국장의 이취를 감소시키고 맛을 향상시킨다고 보고되었고[9], 청국장내 유리 아미노산 함량을 증가시켜 청국장의 관능성을 개선하는 효과를 갖는 *B. pumilus*도 보고되었다[12]. 또한 가정에서 제조된 청국장으로부터 분리된 균을 이용하여 청국장을 제조한 후에 관능평가를 통해 소비자 기호도가 높은 발효균을 선발하고 이들의 protease 생산성을 검토한 결과 청국장의 소비자 기호도가 발효균의 protease 생산성과 일치하는 경향이 있는 것으로 확인되었다[14]. 본 연구에서는 소비자 기호도가 높은 청국장 제조균의 protease 생산성을 증가시키기 위해 배지조성을 검토하였다.

\*Corresponding author

Tel: 82-42-630-9742, Fax: 82-42-636-2676

E-mail: ykh@wsu.ac.kr

## 재료 및 방법

## 결과 및 고찰

### 배지와 시약

Protease 생산균으로는 청국장으로부터 분리한 *B. licheniformis* YB915 균주를 사용하였으며, protease 활성측정을 위한 기질로 사용된 Hammarsten casein은 Merck 회사로부터 구입하였고, L-tyrosine, trichloroacetic acid(TCA), sodium carbonate, anhydrous sodium acetate, acetic acid와 Folin-Ciocalteus phenol은 Sigma 회사 제품을 사용하였다.

### 분리균 당이용성

분리균의 생화학적 특성을 조사하기 위해 배양균체 현탁액을 API 20E와 API 50 CHB(Biomereux사, France) kits에 제조사의 지침을 따라 접종하고 37°C에서 배양하면서 1일과 2일째 각각 관찰하여 탄수화물 이용능과 생화학적 특성을 판별하였다.

### Protease 활성측정

Protease 활성을 측정하기 위한 효소반응은 Hammarsten casein(0.6%) 2.5 mL, 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 0.3 mL을 혼합하여 반응온도인 50°C에서 5 분간 방치한 후 분리균의 배양상등액을 조효소액으로 0.2 mL 첨가하여 30 분간 실시하였다. 반응액에 2.5 mL의 trichloroacetic acid 용액(18 g trichloroacetic acid, 18.1 g anhydrous sodium acetate, 18.8 g acetic acid per liter)을 첨가하여 혼합함으로써 반응을 중지시키고 40°C에서 30분간 방치한 후 실온에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리된 상등액을 1 mL 취하여 실험관에 옮기고 여기에 0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.5 mL, 증류수로 2배 희석한 Folin-Ciocalteus phenol 시약 0.5 mL을 첨가하여 교반한 후 40°C에서 30분간 방치하였다. 이를 실온에서 일정시간 방치하여 식힌 후 660 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. Protease 활성 1 unit는 반응시간 1 분동안 1 µg tyrosine을 생성하는 효소량으로 정의하였다.

### Protease 생산성 분석

분리균의 protease 생산성에 미치는 배지성분의 영향을 조사하기 위해서는 탄소원, 질소원, 인, 무기금속이온의 종류와 첨가량을 달리하고 pH 7.2로 조절한 본배양 배지에 LB 배지에서 하룻밤 전 배양된 균액을 1%(v/v)가 되도록 접종한 후 37°C에서 24시간 동안 200 rpm으로 진탕배양 하였다. 배양용기는 baffled flask를 사용하였으며 배양액의 부피가 배양용기의 15% 이내가 되도록 하여 배양하였다. 배양액을 원심분리한 후 배양상등액을 조효소액으로 사용하여 protease 활성을 측정함으로써 protease 생산성을 조사하였다.

### 청국장 제조균의 특성

관능평가를 통해 소비자 기호도가 높고 protease 생산성이 높은 청국장 발효균으로 분리된 YB915 균주의 16S rRNA 염기서열은(GenBank accession No. GQ996726) *B. licheniformis* 및 *B. subtilis*와 동일한 것으로 확인되었으나, YB915 분리균이 혐기적인 조건에서도 성장하는 특성을 지니고 있어 *B. licheniformis*에 가까운 것으로 판단되어 *B. licheniformis* YB915로 명명하였다[24]. API 50CHB와 API 20E kit를 사용하여 분리균의 생화학적 특성을 조사한 결과 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* 및 *B. megaterium*과 유사도가 있는 것으로 확인되었으나, 어느 균주에 대해서도 높은 상동성을 보이지는 않았으며 *B. licheniformis*의 탄수화물 이용성과는 galactose, amygdaline, arbutin, esculine, salicine, cellobiose, D-turanose와 D-tagatose의 이용성에 차이가 있는 것으로 나타났다. 따라서 당 이용성으로 볼 때 분리균은 분류학적으로 특징적인 특성을 보이지 않았다. 또한 분리균은  $\alpha$ -amylase, cellulase,  $\beta$ -galactosidase, arginine dehydrolase와 gelatinase 활성을 보였으며, citrate를 이용하고 acetoin을 생산하는 것으로 나타났다. 그러나 lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, urease와 tryptophane deaminase 활성은 없으며, 황화수소와 indole을 생성하지 못하였다.

### 탄소원이 *B. licheniformis*의 protease 생산에 미치는 영향

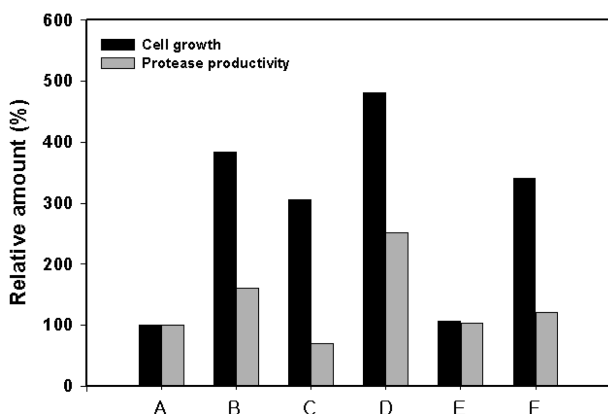
청국장 발효균으로 protease를 생산하는 미생물이 다수 분리되었으며, 청국장의 맛을 증진시키는 발효균은 protease 생산성이 높은 것으로 보고되었다[12, 14]. Protease는 배지내 탄소원과 질소원의 성분에 따라 그 생산량에 차이가 많으며 미생물의 종류에 따라 그 영향이 다르다. 또한 *Bacillus*속 균주가 생산하는 protease 중에서는 CaCl<sub>2</sub>를 배지에 첨가하였을 때와 첨가하지 않았을 때 생산성에 차이가 있으며 또한 효소활성과 안정성에도 영향을 미치는 것으로 알려졌다[8, 23]. 따라서 protease 생산성이 높고 관능평가 결과 소비자 기호도가 높은 것으로 보고된 바 있는 청국장 발효균 *B. licheniformis*의 protease 생산에 적합한 배지 조성을 확립하기 위해 우선적으로 배양상등액을 효소액으로 사용하여 반응온도와 반응 pH 및 CaCl<sub>2</sub>가 protease의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 50-55°C와 pH 7.0에서 효소활성이 가장 높았으며, CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 상태나 첨가하지 않은 상태에서 반응시켰을 때 효소활성에 큰 변화는 없었으므로 배지성분에 따른 효소 생산성을 결정하기 위한 효소반응은 반응액에 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하지 않고 50°C와 pH 7.0에서 활성을 측정하였다.

기본배지 성분으로 yeast extract(5 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.1 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0.1 g/L), CaCl<sub>2</sub>(1 g/L)를 포함하는 배지에 탄소

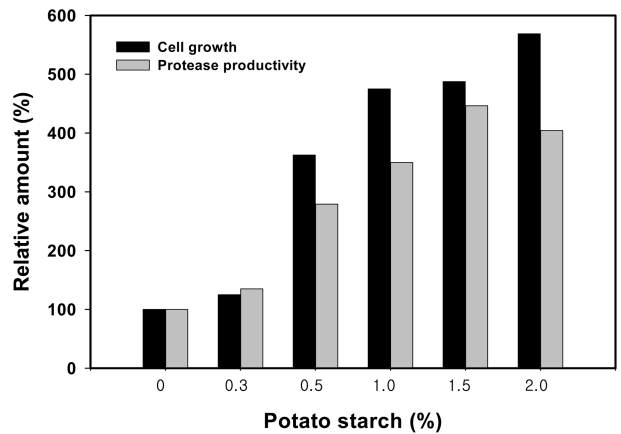
원으로 glucose, sucrose, maltose, lactose와 potato starch를 각각 1%(w/v)씩 포함한 배지에 분리균을 24시간 배양한 후 배양상등액에 존재하는 protease 활성과 균의 성장을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1에 보인바와 같이 potato starch를 포함한 배지에서 균의 성장과 효소 생산성이 가장 높았으며 탄소원을 첨가하지 않은 배지에서의 균 성장도는 600 nm에서 흡광도( $A_{600}$ )가 1.18, protease 생산성은 92 U/mL이었다. Glucose, sucrose, maltose를 첨가한 배지에서는 균의 성장도가 증가된 것으로 확인되었으며, sucrose와 maltose의 경우는 protease 생산성도 증가된 것으로 나타났다. 그러나 glucose를 첨가하였을 때는 균의 성장이 증가하였음에도 불구하고 효소 생산성은 낮아졌다. 이로부터 glucose는 분리균의 protease 생산성을 억제하는 것을 알 수 있다. Glucose를 첨가한 배지에서 *B. cereus*[24]와 *B. licheniformis*[5]도 protease 생산이 억제된다고 보고된 바 있으나 *B. sphaericus* DS11[18]과 *B. clausii*[20]는 glucose에 의해 protease 생산성이 억제되지 않는 것으로 알려졌다. 한편 lactose를 첨가하였을 때는 균의 성장이나 효소 생산성에 변화는 거의 없는 것으로 확인되었는데 이는 API 50 CHB kit에서 lactose를 탄소원으로 이용하지 못하는 결과와 일치하였다.

Protease 생산성을 가장 높게 증가시키는 탄소원인 potato starch의 첨가량을 0, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%로 달리한 배지에서 배양한 결과 균의 성장은 potato starch의 첨가량에 따라 증가하는 것으로 나타났으며, protease 생산성은 potato starch가 1.5% 첨가되었을 때 이를 첨가하지 않았을 때보다 4배 이상 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 potato starch를 2% 하였을 때는 균의 성장은 증가하였으나, 효소생산성은 1.5%를 첨가하였을 때보다 낮아졌다. *B. cereus*도 starch를 첨가하였을 때 protease 생산성이 높은 것으로 보고되었다[19, 24].

**질소원이 *B. licheniformis*의 protease 생산에 미치는 영향**  
 질소원의 영향을 조사하기 위해서 potato starch의 첨가량

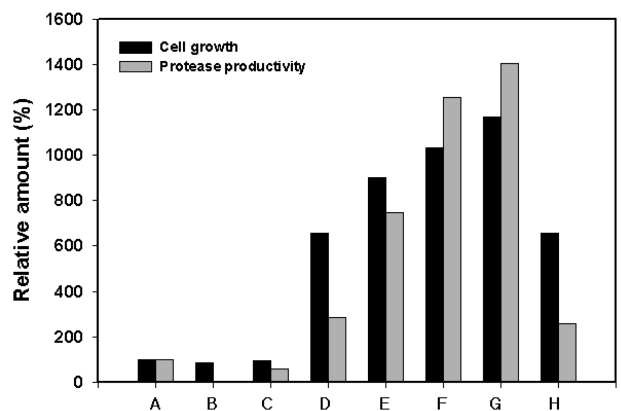


**Fig. 1. Effect of carbon sources on growth and protease production.** Additional carbon sources used: A; none, B; maltose, C; glucose, D; potato starch, E; lactose, F; sucrose.



**Fig. 2. Effect of potato starch concentration on growth and protease production.**

을 1.5%로 고정하고 질소원을 제외한 성분( $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $CaCl_2$ )은 동일한 조성으로 하여 종류가 다른 질소원(ammonium sulfate, yeast extract, casein, tryptone, urea, bacto peptone, soy peptone)을 각각 0.5%씩 첨가한 후 배지를 pH 7.2로 조절하였다. 탄소원의 영향을 조사한 동일한 배양조건으로 배양한 후 균의 성장과 효소생산성을 조사하였다. 그 결과 질소원을 첨가하지 않았을 때의 균 성장도( $A_{600}$ )는 0.58, protease 생산성은 20 U/mL으로 확인되었고, 무기질소원을 첨가하였을 때는 유기질소원을 첨가하였을 때보다 균의 성장과 효소 생산성이 매우 낮았으며, yeast extract, soy peptone, tryptone, bacto peptone, casein의 순서로 균의 성장도와 효소생산성이 동일하게 높은 수준을 나타냈다(Fig. 3). 이로부터 유기질소원에 의한 protease의 생산성은 균의 성장도에 의해 결정되는 것을 알 수 있다. *B. licheniformis* NH1[8], *B. pseudofirmus* Mn6[1]과 *B. sphaericus* DS11[18]도 무기질소원 보다는 유기질소원에서 효



**Fig. 3. Effect of nitrogen sources on growth and protease production.** Nitrogen sources used: A; none, B; urea, C; ammonium sulfate, D; bacto peptone, E; tryptone, F; soy peptone, G; yeast extract, H; casein.

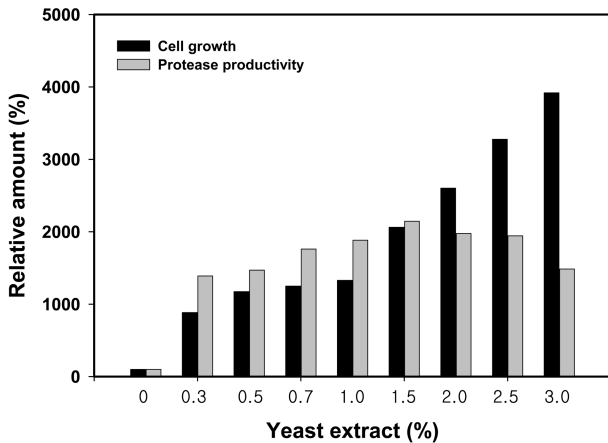


Fig. 4. Effect of yeast extract concentration on growth and protease production.

소생산성이 높았으며, 유기질소원 중에서도 *B. licheniformis* NH1는 yeast extract, *B. pseudofirmus* Mn6는 peptone, *B. sphaericus* DS11는 casein을 각각 질소원으로 사용하였을 때 효소생산성이 높은 것으로 나타났다. 한편 *B. cereus* MCM B-326은 대두분을 질소원으로 사용하였을 때 protease 생산성이 가장 높았으나, 특이하게도 yeast extract, casein, tryptone, bacto peptone과 같은 유기질소원 보다는 ammonium chloride를 질소원으로 사용하였을 때가 효소생산성이 더 높은 것으로 보고되었다[19].

Yeast extract의 첨가량을 달리하여 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0%까지 증가시킨 배지에서 배양한 후 균의 성장과 효소 생산성의 관계를 조사한 결과 Fig. 4에 보인 바와 같이 yeast extract의 첨가량이 많을수록 균 성장이 증가하였다. 그러나 protease 생산성은 0.3%-1.5% 첨가량 범위에서는 yeast extract 첨가량에 따라 증가하지만, 2.0% 이상에서는 yeast extract 첨가량이 증가할수록 효소 생산성은 감소하는 것으로 나타났다. *B. cereus* SH-8도 yeast extract를 첨가한 배지에서 protease 생산성이 높으나, 0.6% 이상을 첨가하였을 때는 균이 성장은 증가하지만 효소생산성은 급격히 저하되는 현상을 보였다[24].

인과 무기금속이온이 protease 생산에 미치는 영향

탄소원과 질소원의 양을 고정하고 무기 금속염의 종류를 달리하여 protease 생산성을 분석하였다. Potato starch(15 g/L), yeast extract(15 g/L),  $K_2HPO_4$ (0.1 g/L),  $KH_2PO_4$ (0.1 g/L)을 포함한 배지에 무기금속염( $CaCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $MgSO_4$ ,  $CuSO_4$ ,  $MnSO_4$ )을 개별 멸균하여 0.1%의 농도로 첨가한 후 YB915를 동일한 조건으로 배양하였다. 그 결과 금속염을 첨가하지 않았을 때의 균 성장도( $A_{600}$ )는 15.8이었고  $MnSO_4$ ,  $MgSO_4$ 와  $CaCl_2$ 를 첨가한 배지에서는 성장이 이보다 향상되었으나, 나머지 금속염이 첨가되었을 때는 성장이 거의 일어나지 않았다(Fig. 5). 배양액내의 protease 활

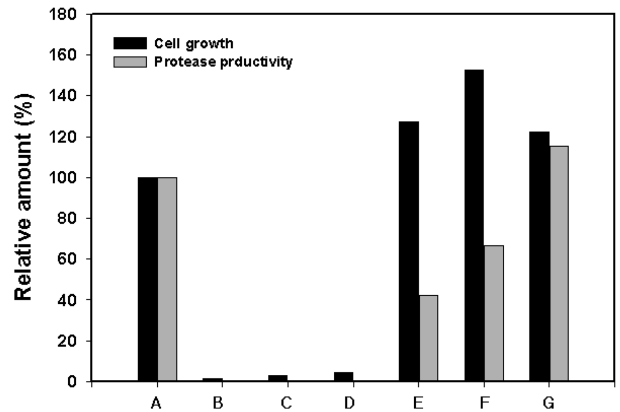


Fig. 5. Effect of various metal ions on growth and protease production. Metal ions used: A; none, B;  $CoCl_2$ , C;  $CuSO_4$ , D;  $ZnCl_2$ , E;  $MnSO_4$ , F;  $MgSO_4$ , G;  $CaCl_2$ .

성을 측정된 결과  $CaCl_2$ 를 첨가한 배지에서 효소 생산성이 가장 높았으며  $MgSO_4$ 와  $MnSO_4$ 를 첨가한 배지에서는 첨가하지 않았을 때의 생산성(375 U/mL) 보다 효소 생산성이 낮았다. *B. cereus* SH-8[24], *B. cereus* MCM B-326[19]와 *B. amyloliquefaciens* An6[2]도 칼슘 이온이 첨가된 배지에서 protease 생산성이 증가하였으며, *B. mojavensis* A21[7], *B. sphaericus* DS11[18]과 *B. pseudofirmus* Mn6[1]은 마그네슘 이온이 첨가된 배지에서 효소 생산성이 증가하는 것으로 알려졌다.

$CaCl_2$ 의 양을 달리 첨가하여 효소 생산성을 검토하기 위해 상기 배지성분의 배지에  $CaCl_2$ 를 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0% 첨가하여 배양하였다. 그 결과 균의 성장은  $CaCl_2$ 의 첨가량에 관계없이 큰 변화가 없었으며 배양액내의 protease 활성은  $CaCl_2$ 를 첨가하지 않은 것보다 첨가하였을 때 향상되었으며 첨가량이 0.7%일 때 최대 생산성을 보였다(Fig. 6). 최종적으로 인의 영향을 조사하고자 배지의 기본조성을

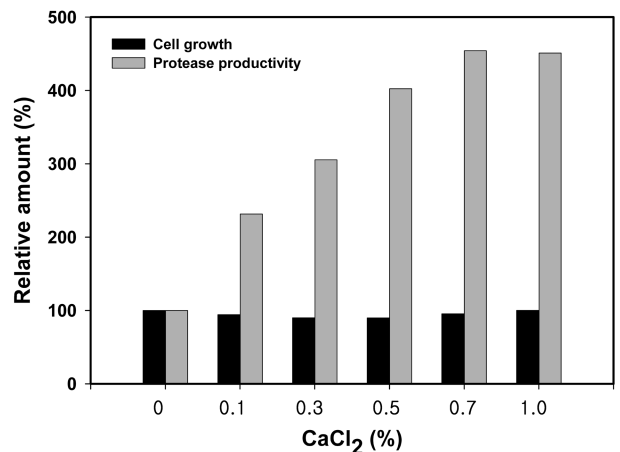


Fig. 6. Effect of calcium chloride concentration on growth and protease production.

potato starch(15 g/L), yeast extract(15 g/L), CaCl<sub>2</sub>(7 g/L)로 하고 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 각각 0%, 0.01%, 0.03%, 0.05%, 0.1%가 되도록 혼합하여 첨가하였다. 동일한 조건에서 배양한 후 균의 성장과 효소생산성을 조사한 결과 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 첨가하지 않은 배지에서는 균 성장도(A<sub>600</sub>)는 17.2이고 protease 생산성은 737 U/mL로 나타났고 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 첨가량에 의한 변화가 크지 않았지만 0.03%가 첨가된 배지에서 균의 성장과 효소 생산성이 가장 우수하였다(Fig. 7).

**균의 성장과 효소생산성**

*B. licheniformis* YB915의 protease 생산성을 증가시키는 것으로 확인된 배지성분(potato starch 15 g/L, yeast extract 15 g/L, CaCl<sub>2</sub> 7 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3/0.3 g/L(pH 7.2))을 이용하여 배양시간에 따른 효소 생산성과 균 성장간의 관

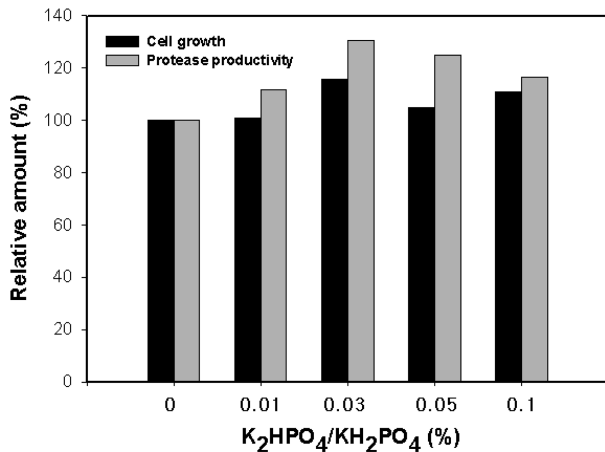


Fig. 7. Effect of potassium phosphate concentration on growth and protease production.

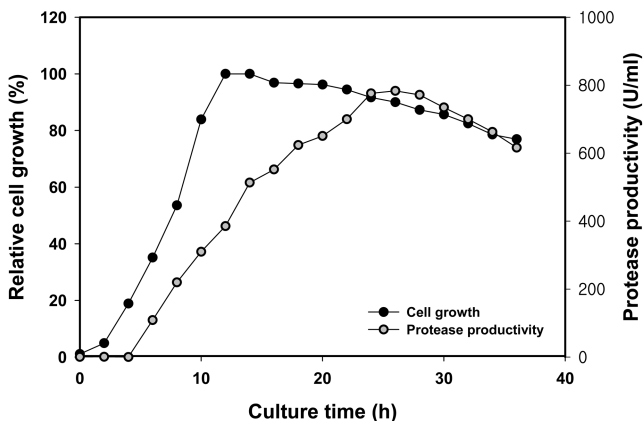


Fig. 8. Growth and protease production of *B. licheniformis* YB915. *B. licheniformis* was grown in the optimized medium consisting of potato starch (1.5%), yeast extract (1.5%), CaCl<sub>2</sub> (0.7%), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.03%) and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.03%) at 37°C with vigorous shaking.

계를 조사하였다. Fig. 8에 나타낸 바와 같이 배양시간 12 시간 정도부터 균의 성장은 정지기에 이르렀으며, 효소 생산성은 약 24-28시간 배양 후 약 800 U/mL로 최대에 이르는 것으로 나타났으며, 이후에는 서서히 배양액내의 protease 활성이 감소하였다. 효소활성의 단위를 동일하게 정의하여 보고된 균주의 protease 생산성과 비교해 보면 대수기 말기에서 정지기 조기의 생육단계(24-36시간)에 이르렀을 때 효소생산성이 최대 127 U/mL인 *B. cereus* MCM B-326[19] 또는 24시간이 되었을 때 436 U/mL의 최대 생산성을 보인 *B. cereus* SH-8보다는 높았으며[24], 24-56시간 배양후 약 1,850-2,100 U/mL의 효소생산성을 보이는 *B. mojavensis* A21[7]이나 배양시간 15시간 만에 1,520U/mL의 최대생산성을 보인 *B. clausii*[20]보다는 낮았다.

한편 *B. licheniformis* YB915의 protease 생산성을 증가시키는 것으로 확인된 성분은 모두 식용가능한 성분이므로 청국장 제조시 이의 첨가량을 조정할 경우 청국장 발효능을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

**요 약**

청국장의 기호도를 개선하는 발효균으로 분리된 protease 생산균은 *Bacillus licheniformis*로 확인되었다. Protease 생산을 위한 배지를 최적화하기 위한 탄소원, 질소원, 인, 금속이온의 성분을 변화시키면서 균의 성장과 효소 생산성을 비교하였다. Glucose를 탄소원으로 사용하였을 때는 균의 성장은 정상적으로 일어나지만, protease 생산이 심하게 억제되는 것으로 나타났으며, Potato starch를 탄소원으로 사용하였을 때 효소 생산성이 가장 높았다. 질소원으로는 yeast extract가 효소 생산에 가장 적합하였다. 한편 2가 금속이온 중 Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>을 배지에 첨가하였을 때는 균의 성장이 심하게 저해되었으며, 효소 생산도 되지 않았다. CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 배지에서는 균이 성장과 효소 생산성이 증가되었다. Potato starch(1.5%), yeast extract(1.5%), CaCl<sub>2</sub>(0.7%), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(0.03%)와 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0.03%)를 포함하는 것으로 구성된 최적화 배지에서 최대효소 생산성은 800 U/mL로 나타났으며 28시간 이후에는 배양액내 효소활성이 서서히 감소하였다.

**REFERENCES**

1. Abdel-Fattah, Y. R., H. A. El-Enshasy, N. A. Soliman, and H. El-Gendi. 2009. Bioprocess development for production of alkaline protease by *Bacillus pseudofirmus* Mn6 through statistical experimental designs. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 378-386.
2. Agrebi, R., N. Hmidet, M. Hajji, N. Ktari, A. Haddar, N. Fakhfakh-Zouari, and M. Nasri. 2010. Fibrinolytic serine protease isolation from *Bacillus amyloliquefaciens* An6

- grown on *Mirabilis jalapa* tuber powders. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **162**: 75-88.
3. Fakhfakh, N., S. Kanoun, L. Manni, and M. Nasri. 2009. Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPK. *Can. J. Microbiol.* **55**: 427-436.
  4. Fakhfakh-Zouari, N., A. Haddar, N. Hmidet, F. Frikha, and M. Nasri. 2010. Application of statistical experimental design for optimization of keratinases production by *Bacillus pumilus* A1 grown on chicken feather and some biochemical properties. *Process Biochem.* **45**: 617-626.
  5. Ferrero, M. A., G. R. Castro, C. M. Abate, M. D. Baigori, and F. Sineriz. 1996. Thermostable alkaline protease *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 327-332.
  6. Gupta, R., O. K. Beg, and P. Lorenz. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 13-32.
  7. Haddar, A., N. Fakhfakh-Zouari, N. Hmidet, F. Frikha, M. Nasri, and A. S. Kamoun. 2010. Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone. *J. Biosci. Bioeng.* **110**: 288-294.
  8. Hadj-Ali, N. E., R. Agrebi, B. Ghorbel-Frikha, A. Sellami-Kamoun, S. Kanoun, and M. Nasri. 2007. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme Microb. Technol.* **40**: 515-523.
  9. Hong, S. W., J. Y. Kim, B. K. Lee, and K. S. Chung. 2006. The bacterial biological response modifier enriched Cheongkukjang fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **38**: 548-553.
  10. Hyun, K. -W., J. -S. Lee, J. -H. Ham, and S. -Y. Choi. 2005. Isolation and identification of microorganism with potent fibrinolytic activity from Korean traditional Deonjang. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 24-28.
  11. Kim, S. S., J. -H. Lee, Y. -S. Ahn, J. -H. Kim, and D. -K. Kang. 2003. A fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* D4-7 isolated from Chungkook-jang; its characterization and influence of additives on thermostability. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 271-276.
  12. Kwon, H. -Y., Y. -S. Kim, G. -S. Kwon, C. -S. Kwon, and H. -Y. Sohn. 2004. Isolation of immuno-stimulating strain *Bacillus pumilus* JB-1 from Chungkook-jang and fermentation characteristics of JB-1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 291-296.
  13. Lee, D. -G., N. -Y. Kim, M. -K. Jang, B. H. Yoo, K. Y. Kim, S. G. Kim, Y. -K. Jeong, and S. -H. Lee. 2006. Isolation of a fibrinolytic bacterium from Cheongkukjang and characterization of its bioactivity. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 299-305.
  14. Lee, G. H. and K. -H. Yoon. 2009. Sensory comparison of fermented soybeans (Cheongkookjang) inoculated with various *Bacillus* species by principal component analysis. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **52**: 726-730.
  15. Lee, J., S. Park, W. -A. Choi, K. -H. Lee, Y. -K. Jeong, I. -S. Kong, and S. Park. 1999. Production of a fibrinolytic enzyme in bioreactor culture by *Bacillus subtilis* BK-17. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 443-449.
  16. Lee, S. -K., D. -H. Bae, T. -J. Kwon, S. -B. Lee, H. -H. Lee, J. -H. Park, S. Heo, and M. G. Johnson. 2001. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KDO-13 isolated from soybean paste. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 845-852.
  17. Liu, C. H., C. S. Chiu, P. L. Ho, and S. W. Wang. 2009. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *J. Appl. Microbiol.* **107**: 1031-1041.
  18. Liu, S., Y. Fang, M. Lv, S. Wang, and L. Chen. 2010. Optimization of the production of organic solvent-stable protease by *Bacillus sphaericus* DS11 with response surface methodology. *Bioresour. Technol.* **101**: 7924-7929.
  19. Nilegaonkar, S. S., V. P. Zambare, P. P. Kanekar, P. K. Dhakephalkar, and S. S. Sarnaik. 2007. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresour. Technol.* **98**: 1238-1245.
  20. Oskouie, S. F. G., F. Tabandeh, B. Yakhchali, and F. Eftekhari. 2008. Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. *Biochem. Eng. J.* **39**: 37-42.
  21. 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. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 829-835.
  22. Peng Y., Q. Huang, R. -H. Zhang, and Y. -Z. Zhang. 2003. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from *douchi*, a traditional Chinese soybean food. *Compar. Biochem. Physiol.* **134**: 45-52.
  23. Veltman, O. R., G. Vriend, H. J. C. Berendsen, B. van den Burg, G. Venema, and V. G. H. Eijssink. 1998. A single calcium binding site is crucial for the calcium-dependent thermal stability of thermolysin-like proteases. *Biochem.* **37**: 5312-5319.
  24. Yoon, K. -H., M. S. Lee, B. W. Park, Y. -H. Park, H. Kim, J. H. Kim, and M. S. Kim. 2006. Enzyme production of a protease-producing strain, *Bacillus* sp SH-8 isolated from insect-eating plant. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 323-328.
  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.

(Received Sep. 27, 2010/Accepted Oct. 22, 2010)