

김치로부터 단백질 분해 효소활성이 우수한 *Bacillus subtilis* 균주의 분리

최찬영, 김명동*
강원대학교 식품생명공학과

Received: November 25, 2016 / Revised: January 7, 2017 / Accepted: January 10, 2017

Isolation of a Potent Protease Producing *Bacillus subtilis* from Kimchi

Chan-Yeong Choi and Myoung-Dong Kim*

Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

Microbial strains exhibiting proteolytic activity were isolated from kimchi, one of traditional fermented foods in Korea. Eight strains formed clear zones around their colonies when grown on TSA plates supplemented with skim milk. MBE/L865 exhibited 2.6-fold higher protease activity than that of control strain (*Bacillus subtilis* KCTC13112). MBE/L865 was identified as *B. subtilis* and deposited in the Korean Collection for Type Cultures under the accession number of KCCM43059. The optimum growth conditions for *B. subtilis* KCCM43059 were determined to be 37°C and pH 8. The strain showed maximum protease activity (429.37 ± 18.65 U/mg protein) at 60°C and pH 6. Further, *B. subtilis* KCCM43059 had a higher salt (NaCl) tolerance than that of the control strain.

Keywords: *Bacillus subtilis*, protease activity, salt tolerance, fermented foods, kimchi

서론

단백질 분해 효소는 전체 효소시장의 약 60%를 차지하고 있으며[1], 식품산업, 세제산업, 피혁산업, 환경산업 등 각종 분야에서 광범위하게 응용되고 있다[1, 2]. 단백질 분해 효소는 동물이나 식물로부터 추출하기도 하나, 미생물을 이용하여 생산하는 방법은 안정성, 생산성, 비용절감 등 경제적으로 유리한 장점이 있다[3]. 또한 미생물 유래의 단백질 분해 효소는 반응 특성이 다양하여 반응조건에 따라 산성, 중성, 알칼리성으로 구별되며, casein, keratin, gelatin, 혈전 등을 분해할 수 있는 것으로 보고되었다[4–6].

단백질 분해 효소의 생산에 이용되는 미생물로는 고초균(*Bacillus* sp.)을 비롯한 세균, 캔디다(*Candida* sp.)를 포함한 효모, *Aspergillus* sp. 및 *Rhizopus* sp. 등의 곰팡이를 들 수 있다[2, 7–9]. 이 중 세균은 단백질 분해 효소를 주로 균

체 외부로 분비하며, 열 안정성 및 상대적으로 넓은 pH 범위에서 활성을 보유하여 산업적으로 널리 사용되고 있다[10]. 고초균은 1971년에 알칼리성 단백질 분해 효소가 발견된 이후 알칼리 반응조건에서 활성과 안정성이 높은 단백질 분해 효소에 대한 연구가 지속되고 있다[11, 12]. *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus* 및 *B. cereus* 등의 균주에서 알칼리성 단백질 분해 효소의 생산이 보고되었으며[1, 13–15], 내열성, 내산성 또는 내알칼리성 특성을 지닌 단백질 분해 효소[2, 7, 16, 17], 내열성이 우수한 균주로부터 정제한 단백질 분해 효소가 116–130°C에서 효소활성을 나타내는 연구결과 등이 보고된 바 있다[18, 19].

김치를 비롯한 전통 발효식품에서 분리된 고초균의 경우 대부분 높은 NaCl 농도에서 성장이 가능한 내염 또는 호염성균이기 때문에 효소 생산공정에 이용할 경우 잡균의 오염을 줄일 수 있는 장점이 있으며[19, 20], 김치에서 분리된 *B. subtilis* 균주의 항균 및 항진균 활성이 보고된 바 있다[21]. 일본의 발효식품인 낫토에서 분리된 *B. subtilis* var. *natto*에서 높은 섬유소 용해성을 갖는 알칼리성 단백질 분해 효소를 생산하는 연구가 진행되었으며[22], 국내에서도 전통

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6458, Fax: +82-33-259-5565

E-mail: mdkim@kangwon.ac.kr

© 2017, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

장류로부터 분리된 *B. subtilis* 균주에서 단백질 분해 효소, 전분질 분해 효소, 섬유소 분해 효소, 지방질 분해 효소 등과 같은 효소들이 생산되는 것으로 보고되었다[1, 23–25]. 최근 김치로부터 섬유소 분해 및 전분질 분해 효소활성을 나타내는 *B. subtilis* 균주에 대한 연구결과가 보고되었으나 [4, 26], 단백질 분해 효소에 대한 연구는 상대적으로 미비한 실정이다.

B. subtilis 균주는 GRAS (Generally Recognized As Safe) 미생물로서 이 균주가 생산하는 단백질 분해 효소는 안전성이 인정되어 식품 및 의약산업에서 널리 이용되고 있다[27, 28]. 또한 최근에 구명된 유전체 정보 등 다른 균주에 비하여 생리적인 정보가 많이 축적되어 있는 장점도 있다[13].

본 연구는 전통발효식품인 김치로부터 단백질 분해 효소 생산성이 우수한 *B. subtilis* 균주를 분리하고 효소활성의 특성 및 균주의 성장특성을 조사하였다.

재료 및 방법

발효식품 수집 및 균주 분리

강원도(평창, 진부, 대관령, 양구, 삼척, 동해), 경상도(예천, 대구, 부산, 울산, 영덕, 울진), 제주 및 충남 지역에서 김치를 비롯한 전통 발효식품을 수집하였다. 발효식품 1 g과 9 ml의 펩톤수(BD Diagnostic, USA)를 혼합하여 적정 배수로 희석한 후 skim milk (1%, BD Diagnostic, USA)가 포함된 Tryptic Soy Agar (TSA; BD Diagnostic, USA) 평판배지에 도말하였다. 도말한 배지는 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 투명한(clear zone)을 형성하는 균주 8점을 확보하였다[1]. *B. subtilis* KCTC13112 균주를 한국미생물자원센터(KCTC, Korea)로부터 분양받아 대조구 균주로 사용하였다.

효소활성 측정

균주의 효소활성을 정량적으로 평가하기 위하여 단일 집락을 TSA 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 원심분리(15,115 × g, 5분)하여 얻은 상등액은 단백질 농도 및 효소활성 측정을 위한 조효소액으로 사용하였다. 단백질 분해 효소활성의 정량적 측정은 Cupp-Enyard 등의 방법[29]을 일부 변형하여 사용하였다. 인산염 완충액(50 mM, pH 7.5)에 casein (BD Diagnostic, USA)의 농도가 0.65% (w/v)가 되도록 용해한 것을 기질 용액으로 사용하였다. 1 ml의 기질용액에 200 µl의 조효소액을 혼합하여 37°C에서 10분간 반응한 후, 1 ml의 110 mM trichloroacetic acid를 첨가하여 반응을 종료하였다. 반응액을 원심분리(15,000 × g, 10분)한 후 상등액 400 µl를 1 ml의 500 mM sodium carbonate (Sigma-Aldrich, USA), 200 µl의 folin & ciocalteu's

phenol reagent (Sigma-Aldrich, USA)와 혼합하여 37°C에서 30분 동안 반응시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성(1 unit)은 반응조건에서 1분간 1 µmole의 tyrosine을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다[1].

반응조건에 따른 효소활성을 비교하기 위하여 반응온도를 25–70°C 범위로 조정하였으며, 50 mM citric acid-sodium citrate buffer (pH 3.0), acetic acid-sodium acetate buffer (pH 4.0–5.0), phosphate buffer (pH 6.0–8.0), glycine-sodium hydroxide buffer (pH 9.0–10.0)로 반응 pH를 조절하여 효소활성을 측정하였다[30]. 단백질 농도는 조효소액을 적정 농도로 희석하여 bradford dye reagent (Bio-Rad, USA)와 반응한 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, bovine serum albumin (BSA; Biosesang, Korea)을 표준물질로 사용하였다.

균주 동정

분리된 균주를 5 ml의 TSB 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 Sim과 Kim [36] 방법으로 염색체 DNA를 추출하였다. 염색체 DNA를 주형으로 27F(5'-AGAATTTGATCM TGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 수행한 후 증폭한 16S rRNA 유전자의 염기서열을 확보하였다[32]. BLAST (NCBI, USA)를 이용하여 기존에 보고된 균주와의 상동성을 근거로 동정하였다[31].

생리학적 특성

탄소원 대사 및 균주가 보유한 효소계의 특성을 조사하기 위하여 API 50 CHB Kit (BioMérieux, France) 및 API ZYM kit (BioMérieux, France)를 제조사에서 제시한 방법에 따라 사용하였다.

비성장속도 측정

균주의 생육특성을 조사하기 위하여 TSA 배지에 초기 세포흡광도(OD₆₀₀)가 0.1이 되도록 접종한 후 다양한 온도에서 배양하여 대수 증식기에서 비성장속도를 측정하였다. 배지의 pH 변화가 균체 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 완충용액을 사용하여 배지의 pH를 조정한 후 최적 배양온도에서 비성장속도를 측정하였다.

내염성 평가

숙성 김치의 염도를 고려하여 0, 1, 2, 3%의 NaCl이 함유된 TSA 배지를 사용하여 균주를 배양하였다[33, 34]. 대수기로 성장하고 있는 균주 배양액을 적정배수로 희석한 후 TSA 평판배지에 10 µl를 점적하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다.

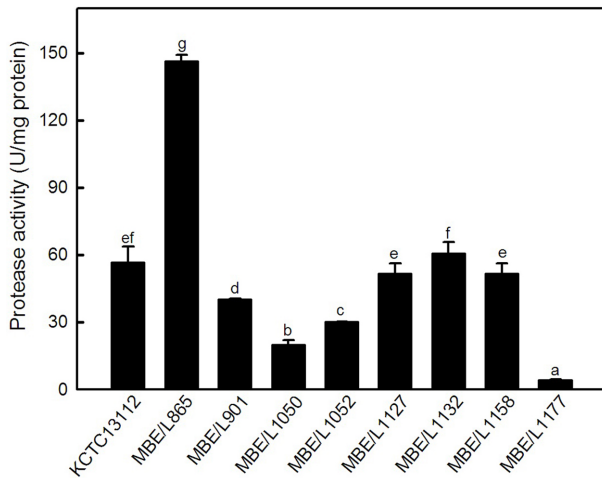


Fig. 1. Determination protease activity for the isolated strains. Extracellular culture supernatant harvested from 24-h shake flask cultivation was used for activity assay performed at 37 °C and pH 7.5. Different letters indicate significant difference between means. *B. subtilis* KCTC13112 was used as control.

통계처리

모든 측정은 3회 반복하였으며 통계처리는 SPSS Statistics (v. 22, IBM, USA)를 사용하여 Duncan의 다중범위검정법으로 유의성을 검정하였다[35].

결과 및 고찰

균주 선발 및 동정

대조구 및 김치로부터 분리한 균주 8점을 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 원심분리(15,000 × g, 10분)하였으며 회수한 상등액을 이용하여 단백질 분해 효소활성을 측정하였다(Fig. 1). MBE/L1177 균주의 효소활성은 4.08 ± 0.34 U/mg protein으로 가장 낮은 효소활성을 나타내었다. MBE/L865 균주의 효소활성은 146.20 ± 3.09 U/mg protein으로 대조구로 사용한 *B. subtilis* KCTC13112 균주의 효소활성 (56.34 ± 7.18 U/mg protein)의 약 2.6배에 해당하는 높은 효소활성을 나타내어 최종 균주로 선정하였다. MBE/L865 균주는 김치유래의 *B. stearothermophilus* 균주에 비해 우수한

Table 1. Characteristics of carbohydrate utilization by *B. subtilis* KCTC13112 and KCCM43059.

Characteristics	KCTC13112	KCCM43059	Characteristics	KCTC13112	KCCM43059
Control	-	-	Esculine	+	+
Glycerol	+	-	Salicine	-	-
Erythritol	-	-	Cellobiose	+	-
D-Arabinose	-	-	Maltose	+	+
L-Arabinose	+	-	Lactose	-	-
Ribose	+	+	Melibiose	-	-
D-Xylose	+	-	Saccharose	-	+
L-Xylose	-	-	Trehalose	+	+
Adonitol	-	-	Inuline	-	-
β-Methyl-xyloside	-	-	Melezitose	-	-
D-Galactose	-	-	D-Raffinose	+	-
D-Glucose	+	+	Amidon	-	-
D-Fructose	+	+	Glycogen	+	-
D-Mannose	+	-	Xylitol	-	-
L-Sorbose	-	-	β-Gentiobiose	-	-
Rhamnose	-	-	D-Turanose	+	-
Dulcitol	-	-	D-Lyxose	-	-
Inositol	+	-	D-Tagatose	-	-
Mannitol	+	-	D-Fucose	-	-
Sorbitol	+	-	L-Fucose	-	-
α-Methyl- D-mannoside	-	-	D-Arabitol	-	-
α-Methyl- D-glucoside	+	-	L-Arabitol	-	-
N-Acetyl-glucosamine	-	-	Gluconate	-	-
Amygdaline	+	-	2-Keto-gluconate	-	-
Arbutine	-	-	5-Keto-gluconate	-	-

+, positive; -, negative.

Table 2. Evaluation of enzyme activity of *B. subtilis* KCTC13112 and KCCM43059.

Characteristics	KCTC13112	KCCM43059	Characteristics	KCTC13112	KCCM43059
Control	-	-	Acid phosphatase	+	+
Alkaline phosphatase	-	+	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+
Esterase (C 4)	+	+	α -galactosidase	-	-
Esterase Lipase (C 8)	+	+	β -galactosidase	-	-
Lipase (C 14)	-	-	β -glucuronidase	-	-
Leucine arylamidase	+	+	α -glucosidase	+	+
Valine arylamidase	-	-	β -glucosidase	+	-
Crystine arylamidase	-	+	β -glucosaminidase	-	-
Trypsin	+	-	α -mannosidase	-	-
α -chymotrypsin	+	+	α -fucosidase	-	-

+, positive; -, negative.

단백질 분해 효소활성을 나타내었다[36]. MBE/L865 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석한 결과 *B. subtilis* KFP-17 (GenBank Accession No. KT380826.1) 균주와 가장 높은 상동성(99%)을 나타내어 한국미생물보존센터에 *B. subtilis* KCCM43059로 기탁하였다.

대조구 및 *B. subtilis* KCCM43059 균주의 탄소원 대사능 및 균주가 보유한 효소계의 특성을 조사하였다. 대조구 및 KCCM43059 균주 모두 ribose, glucose, fructose, esculine, maltose, saccharose, trehalose 등의 탄소원을 대사하는 것으로 나타났다(Table 1). 그러나 대조구 균주는 glycerol, arabinose, xylose, mannose, inositol, mannitol, sorbitol 등을 탄소원으로 이용할 수 있는 것으로 나타나 김치에서 분리된 KCCM43059 균주에 비해 상대적으로 더 많은 종류의 탄소원을 대사하는 것으로 판단되었다. 김치로부터 분리된 *Bacillus* sp. JK-43 균주[37]는 glucose, fructose, esculine, maltose 등의 탄소원을 대사하여 본 연구에서 분리된 KCCM43059 균주와 유사한 탄소원 대사특성을 나타내었다.

대조구 및 KCCM43059 균주가 보유한 효소활성을 조사한 결과 esterase, lipase, acid phosphatase, α -glucosidase 등의 효소활성을 보유하고 있는 것으로 나타났다(Table 2). KCCM43059 균주는 alkaline phosphatase, cristine arylamidase 등의 효소활성을 보유하는 것으로 나타내었으며, 대조구 균주는 trypsin, β -glucosidase 등의 효소활성을 나타내어 두 균주가 서로 다른 특성을 나타내었다. 따라서 김치에서 분리된 KCCM43059 균주는 16S rRNA 유전자의 염기서열은 *B. subtilis* 균주와 높은 상동성을 나타내었으나 탄소원 대사특성과 균주가 보유한 효소계는 상이한 것으로 판단되었다.

효소활성 평가

대조구 및 KCCM43059 균주를 37°C에서 24시간 동안 배

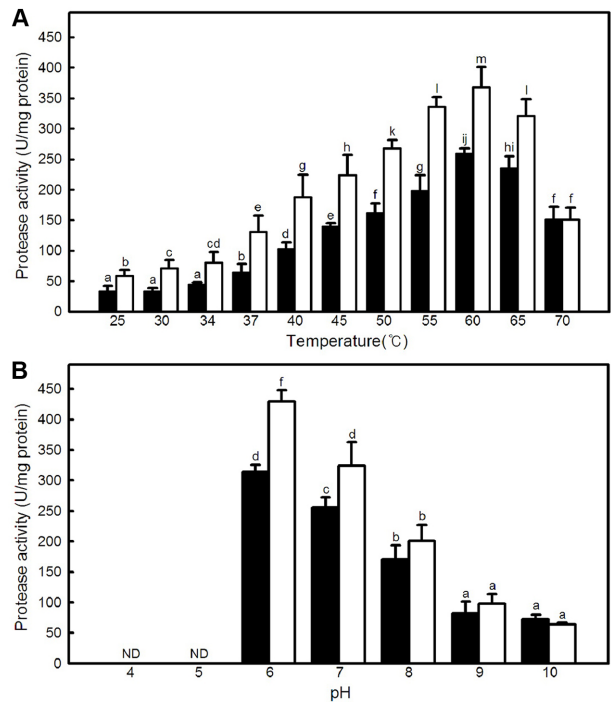


Fig. 2. Influences of temperature (A, pH 7.5) and pH (B, 60 °C) on protease activity of *B. subtilis* KCTC13112 (■) and KCCM43059 (□). Different letters indicate a significant difference between means, ND: not detected.

양하여 원심분리한 후 얻은 상등액을 이용하여 다양한 반응 온도 및 pH에서 효소활성을 측정하였다. 완충용액의 pH를 7.5로 고정하고 반응온도를 달리하여 효소활성을 측정한 결과 대조구 및 KCCM43059 균주는 25°C에서 각각 33.41 ± 8.38, 58.61 ± 9.80 U/mg protein 으로 가장 낮은 단백질 분해 효소활성을 나타내었다(Fig. 2A). 반응온도가 증가할수록 KCCM43059 균주의 효소활성이 유의적으로 증가하였으며

60°C에서 가장 높은 효소활성(367.64 ± 33.07 U/mg protein)을 나타내었다. 반응 온도 60°C에서 pH에 따른 효소활성의 변화를 측정한 결과 KCCM43059 균주의 효소활성은 pH 6에서 429.37 ± 18.65 U/mg protein로 대조구 균주(313.74 ± 11.41 U/mg protein)보다 높은 효소활성을 나타내었다(Fig. 2B). 그러나 pH 7부터 효소활성이 현저히 감소하여 pH 10에서 63.59 ± 3.12 U/mg protein으로 대조구인 KCTC13112 균주(72.51 ± 7.56 U/mg protein)보다 유의적으로 낮은 효소활성을 나타내었다. 이러한 결과로부터 *B. subtilis* KCCM43059 균주는 반응 온도 60°C, pH 6 조건에서 가장 높은 단백질 분해 효소활성을 나타내는 것으로 판단되었다.

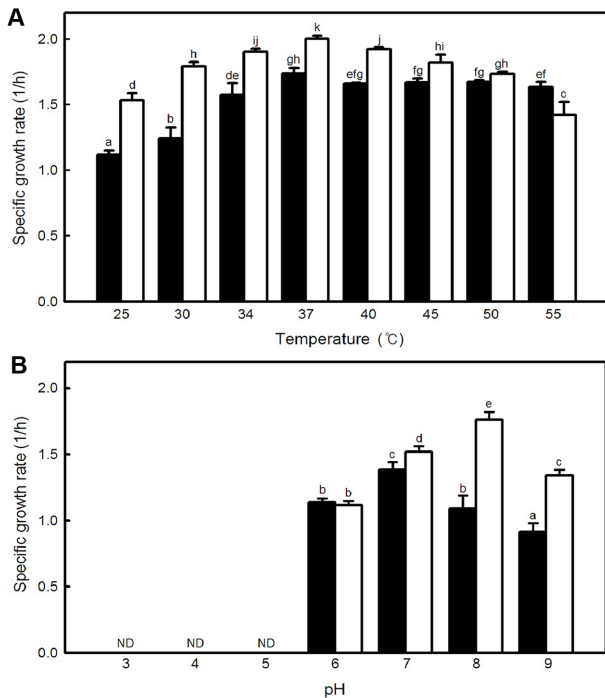


Fig. 3. Effects of temperature (A, pH 7.3) and pH (B, 37 °C) on specific growth rate of *B. subtilis* KCTC13112 (■) and KCCM43059 (□). Cells were grown in TSB at an indicated temperature and pH. Different letters indicate a significant difference between means, ND: not detected.

Bacillus sp. JE 375 균주가 생산하는 단백질 분해 효소의 경우 최적 반응조건은 65°C, pH 6.5로[38], 본 연구의 단백질 분해 효소와 유사한 특성을 나타내었다. *Bacillus* sp.이 생산하는 단백질 분해 효소들의 온도에 대한 활성은 알칼리 효소가 60°C, 중성 효소는 30–37°C에서 최적 활성을 나타낸다고 보고되어[38], 본 연구에서 분리한 KCCM43059 균주가 생산하는 단백질 분해효소 경우 60°C에서 최적 활성을 나타내는 알칼리 효소라고 판단하였다.

균주의 생육특성

배지 pH 7.3에서 배양 온도를 달리하여 대조구 및 KCCM43059 균주의 비성장속도를 측정한 결과, KCCM43059 균주의 비성장속도는 2.00 ± 0.02(1/h)로 대조구인 KCTC13112 균주(1.74 ± 0.04(1/h))보다 높은 비성장속도를 나타내었다(Fig. 3A). 배양 온도 40°C부터 KCCM43059 균주의 비성장속도가 감소하였으며 55°C에서의 비성장속도는 1.42 ± 0.10 (1/h)로 대조구인 KCTC13112 균주(1.63 ± 0.03 (1/h))보다 낮은 비성장속도를 나타내었다.

배양 온도 37°C에서 완충용액으로 배지의 pH를 조정하여 균주의 비성장속도를 측정한 결과 pH 3, 4 및 5 조건에서 두 균주 모두 성장하지 못하였다(Fig. 3B). KCCM43059 균주는 pH 8에서 1.76 ± 0.06(1/h)로 대조구 균주에 비하여 높은 비성장속도를 나타내었다. 결과적으로 KCCM43059 균주는 배양 온도 37°C, pH 8에서 가장 높은 비성장속도를 나타내었다.

NaCl 농도에 따른 대조구와 KCCM43059 균주의 균체 성장을 비교하여 내염성을 평가하였다(Fig. 4). KCCM43059 균주는 1%의 NaCl이 함유된 TSA 평판배지에서 가장 우수한 성장을 나타내었으며, 2%의 NaCl이 함유된 TSA 평판배지에서도 성장이 확인되었다. 그러나 대조구 균주는 NaCl의 첨가에 의하여 성장이 현저히 감소하였으며, 3%의 NaCl이 함유된 배지에서는 두 균주 모두 성장이 어려운 것으로 나타났다. 결과적으로 KCCM43059 균주가 대조구 균주에 비하여 상대적으로 내염성이 우수한 것으로 판단하였다.

메주에서 분리된 *B. licheniformis* NH20 균주는 NaCl 농도 0–5%에서 생육이 가능하였으며, 최적 농도는 2–3%이었

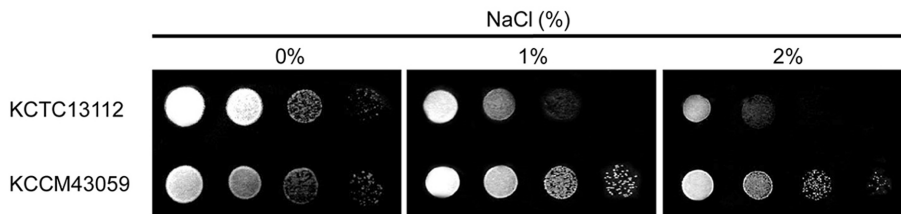


Fig. 4. Tolerance of *B. subtilis* KCTC13112 (■) and KCCM43059 (□) to NaCl. Cultures were grown to exponential phase in TSB and diluted to an OD₆₀₀ of 0.1 with the same medium and spotted on TSA plate supplemented with NaCl. Cells were incubated at 37 °C and photographed after 24 h.

다[39]. 본 연구에서 분리한 KCCM43059 균주의 성장을 위한 최적 NaCl 농도가 1~2%인 것을 고려하면 유사한 결과라고 판단되었다. 장류, 젓갈 등 고염도의 발효식품에서 분리된 고초균은 10%의 NaCl 농도에서도 성장하는 특성을 나타내었는데[19, 40], 이는 분리원의 특성이 균주의 내염성에 영향을 미치는 것으로 추정되었다.

본 연구에서는 김치 유래의 *B. subtilis* 균주의 단백질 분해 효소활성 및 균주의 성장특성을 구명하였다. 최근에도 고초균의 생육특성 및 단백질 분해 효소활성 특성에 관한 연구가 지속적으로 보고되고 있으며[1, 41, 42], 추가연구를 통하여 산업적으로 활용이 가능한 균주로서 개발이 기대된다.

요 약

전국에서 수집한 발효식품으로부터 단백질 분해 효소활성을 보유한 균주를 분리하였다. Skim milk를 첨가한 TSA 평판배지에서 투명환을 형성한 8점의 균주 중 김치에서 분리된 MBE/L865 균주가 대조구인 KCTC13112 균주에 비하여 약 2.6배의 효소활성을 나타내었으며 *Bacillus subtilis*로 동정하여 한국미생물보존센터에 KCCM43059 균주로 기탁하였다. *B. subtilis* KCCM43059 균주의 최적 배양조건은 37°C, pH 8으로 대조구인 KCTC13112 균주의 비성장속도보다 우수하였다. 반응조건 60°C, pH 6에서 429.37 ± 18.65 U/mg protein의 최적 효소활성을 나타내었으며 동일조건에서 대조구 균주보다 효소활성이 우수하였다. 또한 *B. subtilis* KCCM43059 균주는 대조구 균주에 비하여 NaCl에 상대적으로 높은 내성을 나타내었다.

Acknowledgments

This work was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ009993)" Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Kim MN, Si JB, Wee YJ. 2016. Identification of a newly isolated protease-producing bacterium, *Bacillus subtilis* FBL-1, from soil. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 185-193.
- Lee JH, Bai DH. 2004. A thermostable protease produced from *Bacillus* sp. DF 218. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**: 105-110.
- Bang SH, Jeong IS. 2011. Characterization of an alkaline protease from an alkalophilic *Bacillus pseudofirmus* HS-54. *Korean J. Microbiol.* **47**: 194-199.
- Yang SJ, Kang EJ, Lee RH, Jung HK, Park CS, Hong JH. 2014. Characterization of amylase produced by *Bacillus subtilis* KMKW4 isolated from *Kimchi*. *J. Chitin Chitosan.* **19**: 21-28.
- Lee SK, Heo S, Bae DH, Choi KH. 1998. Medium optimization for fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* KCK-7 isolated from Korean traditional *Chungkookjang*. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 226-231.
- Kim HK, Kim GT, Kim DK, Choi WA, Park SH, Jeong YK, et al. 1997. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermented fish. *J. Ferment. Bioeng.* **84**: 307-312.
- Yoshihiro O, Hiroki T, Seiji M, Yutaka I, Kohji M, Atsushi M, et al. 1990. Secretion of *Aspergillus oryzae* alkaline protease in an osmophilic yeast, *Zygosaccharomyces rouxii*. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 2521-2519.
- Banerjee R, Bhattacharyya BC. 1993. Kinetic properties of extracellular alkaline protease of *Rhizopus oryzae*. *J. Ferment. Bioeng.* **75**: 380-382.
- Nelson G, Young TW. 1987. Extracellular acid and alkaline proteases from *Candida olea*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1461-1469.
- Yoon KH, Lee MS, Park BW, Park YH, Kim HI, Kim JH, et al. 2006. Enzyme production of a protease-producing strain, *Bacillus* sp. SH-8 isolated from insect-eating plant. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 323-328.
- Horikoshi K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 1407-1414.
- Yi HK, Chun YJ, Kim HB. 1999. Characterization of *Bacillus cereus* SH-7 extracellular protease. *J. Microbiol.* **37**: 213-217.
- Banerjee U, Sani R, Azmi W, Soni R. 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process. Biochem.* **35**: 213-219.
- Dhandapani R, Vijayaragavan R. 1994. Production of a thermophilic, extracellular alkaline protease by *Bacillus stearothermophilus* AP-4. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 33-35.
- Banik R, Prakash M. 2004. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiol. Res.* **159**: 135-140.
- Lee HJ, Yoo JS, Park YS, Bai DH. 2015. Identification of an alkalophilic bacterium producing an alkaline protease from soil. *Food Eng. Prog.* **19**: 414-419.
- Prasanth M, Nitin M, Shubham J, Saharika S, Ramankannan A, Shanthini T, et al. 2016. Potential of *Bacillus subtilis* to produce acidic protease under mutagenic condition. *Int. J. Pure App. Biosci.* **4**: 126-132.
- Kim HK, Kim KH, Lee JK, Kim YO, Nam HS, Oh TK. 1995. Characterization of a thermostable protease from thermophilic *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 322-328.
- Kim EY, Kim DG, Kim YR, Choi SY, Kong IS. 2009. Isolation and identification of halotolerant *Bacillus* sp. SJ-10 and characterization of its extracellular protease. *Korean J. Microbiol.* **45**: 193-199.
- Jeong SC, Hyun KW, Kim JH, Lee JS. 2001. Isolation of a halotolerant yeast and the production of extracellular protease. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**: 158-162.
- Lee NK, Kim SY, Choi SY, Paik HD. 2013. Probiotic *Bacillus subti-*

- lis* KU201 having antifungal and antimicrobial properties isolated from *Kimchi*. *Food Sci. Biotechnol.* **22**: 1375-1379.
22. Fujita M, Nomura K, Hong K, Ito Y, Asada A, Nishimuro S. 1993. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**: 1340-1347.
 23. Yang SJ, Lee DH, Park HM, Jung HK, Park CS, Hong JH. 2014. Amylase activity and characterization of *Bacillus subtilis* CBD2 isolated from *Doenjang*. *Korean J. Food Preserv.* **21**: 286-293.
 24. Kim DY, Lee ET, Kim SD. 2003. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus subtilis* K7 isolated from Korean traditional soy sauce. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**: 176-182.
 25. Eiggert T, Brockmeier U, Droge MJ, Quax WJ, Jaeqer KE. 2003. Extracellular lipases from *Bacillus subtilis*: regulation of gene expression and enzyme activity by amino acid supply and external pH. *FEMS Microbiol. Lett.* **225**: 319-324.
 26. Ahn MJ, Ku HJ, Lee SH, Lee JH. 2015. Characterization of a novel fibrinolytic enzyme, BsfA, from *Bacillus subtilis* ZA400 in *Kimchi* reveals its pertinence to thrombosis treatment. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 2090-2099.
 27. Jeong SJ, Yang HJ, Jeong SY, Jeong DY. 2015. Identification of characterization and statistical optimization of constituent for *Bacillus subtilis* SCJ4 isolated from Korean traditional fermented food. *Korean J. Microbiol.* **51**: 48-60.
 28. Park CS, Min DK, Ahn YS, Lee JH, Hong SK, Kim JH, et al. 2002. Isolation and characteristics of soy protein-degrading strain, *Bacillus subtilis* EB464. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 210-215.
 29. Cupp-Enyard C. 2008. Sigma's non-specific protease activity assay - casein as a substrate. *J. Vis. Exp.* **17**: 899.
 30. Muyan C, Xiumei Z, Tianxiang G, Chao C. 2006. Effects of temperature pH and NaCl on protease activity in digestive tract of young turbot, *Scophthalmus maximus*. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* **24**: 300-306.
 31. Sim HS, Kim MD. 2016. Antipathogenic activity of *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from Korean traditional rice wine. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 98-105.
 32. Hongoh Y, Yuzawa H, Ohkuma M, Kudo T. 2003. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS Microbiol. Lett.* **221**: 299-304.
 33. Moon SW, Park SH, Kang BS, Lee MK. 2014. Fermentation characteristics of low-salt *Kimchi* with starter on fermentation temperature and salt concentration. *Korean J. Food Nutr.* **27**: 785-795.
 34. Ko MS, Hur SW, Kim MR, Jung SJ, Lee H, Cho MS. 2015. The quality properties of rapidly fermented *Mukeun* (long-term fermented) *kimchi* with different salinity and fermented temperature. *Korean J. Food Nutr.* **28**: 335-342.
 35. Duncan DB. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics.* **11**: 1-42.
 36. Min SG, Kim JH, Kim TW, Kim KN. 2003. Isolation and identification of protease producing bacteria in *kimchi*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**: 666-670.
 37. Jun HK, Bae KM, Kim YH, Baik HS. 2000. Production and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. JK-43 isolated from *Kimchi*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**: 41-48.
 38. Kim JE, Bai DH. 2006. A thermostable protease produced from *Bacillus* sp. JE 375 isolated from Korean soil. *Korean J. Food. Sci. Technol.* **38**: 419-426.
 39. Choi KK, Cui CB, Ham SS, Lee DS. 2003. Isolation, identification and growth characteristics of main strain related to *Meju* fermentation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**: 818-824.
 40. Lee SY, Kim JY, Baek SY, Yeo SH, Koo BS, Park HY, et al. 2011. Isolation and characterization of oligotrophic strains with high enzyme activity from buckwheat *Sokseongjang*. *Korean J. Food. Sci. Technol.* **43**: 735-741.
 41. Lee HJ, Yoo JS, Bai DH. 2016. Purification and characterization of an alkaline protease produced by alkalophilic *Bacillus* sp. DK122. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 333-340.
 42. Wang C, Yu S, Song T, He T, Shao H, Wang H. 2016. Extracellular proteome profiling of *Bacillus pumilus* SCU11 producing alkaline protease for dehairing. *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 1993-2005.