

## 전통메주로부터 Protease 생산 균주의 분리, 동정 및 효소 생산조건

변영각 · 김성호<sup>1</sup> · 주현규<sup>2</sup> · 이갑상<sup>3</sup> · 임무현\*<sup>1</sup>

전국대학교 농화학과, <sup>1</sup>대구대학교 식품공학과, <sup>2</sup>선문대학교 식량자원학부, <sup>3</sup>원광대학교 농화학과

**초 록** : 대두단백질 가수분해물의 이용과 특성 등을 향상시키기 위한 연구의 일환으로, 쓴맛성분이 적고 향미가 우수한 가수분해물의 제조에 이용되는 protease를 생산하기 위하여, 전국 각지역의 메주에서 대두 단백질 분해 효소의 생산이 우수한 균을 분리하였고, 형태학적, 생화학적 특징을 검토한 결과, *Bacillus subtilis*로 동정 되었고, *Bacillus subtilis* YG-95로 명명하였다. 단백질분해효소 생산을 위한 배지의 최적 조건을 검토한 결과 soluble starch 3.5%, soy protein isolate 3.0%, dextrose 0.25%, NaCl 0.5%, dipotassium phosphate 0.25%의 배지의 조건에서 배양 최적 pH는 7.6, 최적 배양온도는 45°C, 최적 배양시간은 60시간으로 배양했을 때 효소의 생산에 최적조건이었다.(1998년 8월 6일 접수, 1998년 8월 28일 수리)

### 서 론

우리나라의 조미식품인 간장, 된장 등의 장류는 삶은 콩에 미생물이 자연점종되어 만들어진 메주를 이용한 고유의 전통 발효식품이다.<sup>1)</sup> 장류는 전통적 방법에 의하여 일반 가정에서 제조하여 왔으나, 국민소득의 향상에 따른 주거양식의 변화 및 생활의 간소화 등으로 품질과 제조방법 개선에 대한 연구가 이루어져 왔다.<sup>2,3)</sup> 또한 전통발효식품의 이용에 대한 새로운 인식과 관심으로 메주를 이용한 전통장류에 대한 연구도 활발하다.<sup>4,5)</sup>

메주의 자연 숙성중의 microflora에 대한 연구보고로서 김 등<sup>6)</sup>은 재래식 메주에서 *Mucor mucedo*, *Rhizopus japonicus*, *Penicillium glaucum*, *Penicillium* sp., *Saccharomyces coreanus* 등을 분리하였고, 조 등<sup>7)</sup>은 재래식 메주에서 *Mucor abundans*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium lanosum*의 곰팡이들을 분리하였으며, 세균은 *Staphylococcus aureus*가 일부 분리되었으나 대부분 *Bacillus* sp.가 존재한다고 보고하였다. 또한, 허 등<sup>8)</sup>은 재래식 메주중의 산생성균을 분리하여 보고하였는데, 호기성 산 생성균은 *Micrococcus* sp.이고, 혐기성 생성균으로는 *Streptococcus* sp., *Pediococcus* sp. 및 *Lactobacillus* sp.이며, 호기성 일반 세균은 *Bacillus* sp.가 주종을 이루었다고 보고하였다.

장류 등은 숙성 과정에서 효소의작용으로 원료 단백질에서 유래되는 peptide와 아미노산이 구수한 맛과 풍미를 결정한다. 따라서, 맛을 결정하는 유리 아미노산의 함량은 담금원료, 숙성온도, 숙성기간에 따라 차이가 있으나, 메주의 효소활성이 유리아미노산의 함량이나 풍미에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.<sup>9,10)</sup>

대두단백질을 분해하는 효소는 protease로 단백질 또는 peptide에 작용하여 peptide 결합의 가수분해를 촉매하는 효소로 미생물에 널리 분포되어 있다. 이들 protease가 담당하

는 생리적 역할로는 생물의 중, 생합성되는 조직, 세포 등에 따라서 매우 다양하지만, 공통적으로 extracellular protease의 경우는 외부의 영양물을 이용하기 위해서 외부 단백질을 가수분해시켜 고분자 형태의 단백질을 세포내로 흡수가 가능한 단위인 아미노산 또는 저분자의 peptide단위로 분해하기 위해서 분비된다.<sup>11)</sup>

대두단백질의 가수분해물은 단백질의 가수분해정도, peptide의 구조, 크기 및 아미노산의 염기배열 등에 따라서 기호성 및 기능성 등이 다르게 나타나게 된다. 특히, 대두 단백질의 효소적 가수분해물의 peptide 등은 산성음료의 용해도 증가, 일부 환자의 내 allergy성, 기능성 특성의 향상 등에 대한 응용이 가능하다.<sup>12)</sup> 효소에 의한 부분적인 가수분해를 통해 단백질의 용해도 증가,<sup>13)</sup> 유화 형성능 개량,<sup>14)</sup> 고미생성물의 제거<sup>15)</sup> 등의 여러 가지 연구결과가 보고되고 있다.

본 연구에서는 대두단백질의 가수분해물의 이용과 특성을 향상시키기 위하여 쓴맛성분이 적고 향미가 우수한 가수분해물의 제조에 이용될 수 있는 protease를 생산하는 미생물을 분리하여 이용하기 위하여 우리나라의 각지방별로 전통메주를 수집하여 이들로부터 protease의 생산능이 우수한 세균을 분리, 동정하고, 이들 세균이 생산하는 protease 생산조건을 검토하였다.

### 실험재료 및 방법

#### 재료

실험에 이용된 재료중 SPI(Soy Protein Isolate) 및 defatted soybean meal은 Purina사 제품을 시중에서 구입하여 사용하였다.

#### 시약

Trytone, Soytone, TSB(Trypticase Soy Broth) 등은 Difco

찾는말 : *Bacillus subtilis*, Me-Ju, Protease. Protein hydrolysis

\*연락처자

사 제품을 SDS-PAGE용 시약은 Sigma사 제품을 그의 시약은 시판용 특급 및 1급 시약을 사용하였다.

### 균주의 분리 및 선별

전국 20개의 지역에서 1996년 10~11월에 각 가정에서 제조한 메주를 수집하여 시료로사용하였다(Table 1). 수집한 메주 시료를 표면으로부터 두께 2 cm까지의 부분인 외부층과 그 안쪽의 내부층으로 나누어서 마쇄기로 갈아 분말로 만든 다음, 멸균 생리식염수에 희석 현탁시키고, 그 상등액을 균주 분리용 배지(Table 2)에 도말하여 32°C에서 24시간 동안 배양한 후, 생육이 잘되고 colony 모양이 상이한 균주를 1차 선별 한 후, 다시 동일 성분의 액체배지에 배양을 시킨 후, 배양액을 원심분리(5000×g, 15 min)한 뒤 상등액을 단백질 가수분해 효소 측정용 고체배지<sup>16)</sup>(casein 1.0 g, agar 1.5 g/100 ml)에 넣고 35°C에서 2시간 반응 했을 때 투명환이 1cm이상인 것을 2차로 선별하였다. 2차로 선별된 균주를 분리대두단백(SPI, Soy Protein Isolate)이 0.5% 함유된 TSB배지(Table 2)에 1 백금이 접종한 후 30°C에서 24시간 진탕 배양한 것을 효소액으로 사용하여 protease activity를 측정하여 7개를 선별하였고, 최종 선별은 액체 배양하여 5,000×g로 원심분리하고, 상등액을 이용하여 효소 활성을 측정하여 상대적으로 단백질 분해 활성이 높은 것과 6%

**Table 1. The list of collected traditional Me-Ju samples**

Sample No.	Sampling areas	
	Places	Provinces
1	Ka-Pyong	Kyunggido
2	Yong-In	"
3	An-Song	"
4	Sung-Nam	"
5	Bang-Hak	Seoul
6	Ui-Jong-Bu	"
7	Non-San(Gayae)	Choong-Nam
8	So-San	"
9	Tang-Jin	"
10	Yong-Chung	Kyung-Puk
11	Ko-Ryong	"
12	Sung-Seo	"
13	Ja-In	"
14	Kum-Ho	"
15	Ha-Yang	"
16	Ko-Chang	Chun-Puk
17	Sun-Chang	"
18	Bu-An	"
19	Yeo-Su	Chun-Nam
20	Kwang-Ju	"

**Table 2. The composition of isolation medium of TSB medium**

	TSB medium		Isolation medium	
Tryptone	17 g	Peptone	0.3 g	
Soytone	3.0 g	Beef extract	0.5 g	
Dextrose	2.5 g	Casein	2.0 g	
NaCl	5.0 g	Agar	1.5 g	
Dipotassium phosphate	2.5 g	Distilled water	100.0 ml	
Distilled water	1 l	pH	7.0	

SPI 3 ml에 조효소 1 ml 첨가하여 50°C에서 1시간 반응 후 100°C에서 10분간 활성을 정지 시킨것을 ultra filtration (0.45 μm)후, 전기영동(SDS-PEAG)으로 전개하여, 가수분해물의 잔여 고분자성 peptide의 band의 수가 적고, 형태가 상이한것을 단백질의 분해 정도가 상대적으로 높은것으로 최종선별하였다.

### 분리 균주의 동정

분리된 균주를 TSB agar배지(Table 2)에 계대 배양하여 보존하면서 Bergey's manual of systematic bacteriology<sup>17)</sup>와 Microbiological Applications<sup>18)</sup>에 따라서 균주의 형태적, 생리적 특성을 조사하여 동정하였다.

### 균의 배양

선발된 균의 효소 생산 조건을 조사하기 위하여 TSB 배지를 300 ml Erlenmeyer flask에 70 ml씩 넣고 121°C에서 15분간 가압 살균후에 시험 균주를 1 백금이 접종하여 37°C에서 24시간 진탕배양 후, 효소 생산용 배지에 2%(v/v)양으로 접종하여 37°C에서 60시간, 교반 속도 150 rpm의 발효조건으로 진탕 배양하였다.

### 균의 생육도 측정

균체의 생육도는 배양액을 원심분리(5,000×g, 20 min) 후, 균체를 멸균 증류수로 현탁하여 660 nm에서 흡광도 값으로 표시하였다.

### 조효소액

효소 생산용 배지에 종균 배양액을 2%(v/v)양으로 접종하여 37°C에서 60시간 진탕 배양한 후에 배양액을 원심분리(5,000×g, 20 min)하여 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

### 단백질 가수분해 효소의 활성

단백 가수분해 효소의 활성은 Anson방법<sup>19)</sup>을 약간 변형하여 실험하였다. 즉, 효소용액 0.5 ml에 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 녹인 0.6% SPI 기질용액 3 ml를 가한 후, 50°C에서 30분간 반응시킨 후, 0.4M-TCA 3 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고, 실온에서 30분간 정치하였다가 여과(Whatman, No. 2)한 후, 여액 1 ml를 취하여 0.4 M-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 ml와 1 N-Folin reagent 1 ml를 신속히 넣고 실온에서 30분간 발색 시킨 후, UV spectrophotometer로 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 단위는 50°C에서 1분동안에 1 μg/ml의 tyrosine을 유리시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

### 효소 생산을 위한 배양조건 검토

효소생산에 대한 배지 및 배양조건을 검토하기 위하여 TSB를 기본배지로 하여 탄소원과 질소원의 영향 및 초기배양 pH, 배양온도 및 배양시간에 대한 효소생산의 영향을 조사하였다.

결과 및 고찰

균주의 선별 및 동정

(1) 균주의 선별

전국에서 수집한 메주 20개에서 분리한 112개의 균주를 1차 선별한 결과, 생육이 잘되고 투명환이 형성된 곰팡이 17균주 세균 23균주를 분리하였다(Table 3). 이들 균주를 동일 배지에 액체 배양시킨 다음에 상등액을 단백질 가수분해 효소 측정용 배지에 넣고서 투명환이 1.5 cm 이상인 7균주를 분리하였다(Table 4). 16번과 97번 균주가 상대적으로 단백질분해효소의 활성이 높았으나, 전기 영동상의 대두단백 분해 형태가 두 균주의 분해밴드는 동일하였으며, 95번 균주는 특이적으로 대두단백에 작용해서 단백질의 분해 pattern이 상이한 YG-95를 최종적으로 선별하여 본 연구에 사용하였다(Fig. 1).

(2) 선별균주의 동정

선별된 균주(YG-95)의 colony 형태는 circular이고 불투명하고, Gram 양성이며, 세포내에 포자를 형성하였고, 운동성이 있는 간균형태를 지녔으며, catalase 활성이 있어 *Bacillus* sp.의 세균으로 추정되었다. 그 외에 당의 이용성과 생화학적 실험의 결과는 Table 5와 같다.

탄소원으로는 glucose, sucrose, inositol, arabinose, xylose, mannitol, maltose 등의 당류를 이용하였지만, tagatose, galactose, raffinose, ribose는 이용하지 못하였으며, V-P test에는 양성이고, 50°C까지 생육이 이루어졌다. 이와 같은 결과로 보아 Bergey's manual of systematic bacteriology<sup>17)</sup> 상의 *Bacillus subtilis*의 특성과 유사하거나, 거의 일치되어 분리

Table 3. The selection of protease producing bacteria.

Strain No.	Clear zone size (cm)	Strain No.	Clear zone size (cm)
3	1.4	97	1.65
6	1.6	28	1.3
9	1.3	61	1.4
11	1.4	63	1.5
16	1.7	48	1.4
64	1.3	102	1.4
67	1.4	96	1.5
68	1.3	101	1.6
71	1.15	95	1.6
79	1.5	108	1.7
105	1.3	55	1.4
106	1.3		

Table 4. The selection of protease producing bacteria by the activity assay

Strain No.	Protease activity (unit)	
	Defatted Soybean	Soy Protein Isolate
6	2435.1	2629.1
16	3323.2	4995.5
68	2816.6	2990.1
95	2737.0	2871.4
97	2890.1	3134.3
101	2806.7	2752.0
108	2723.3	2754.2

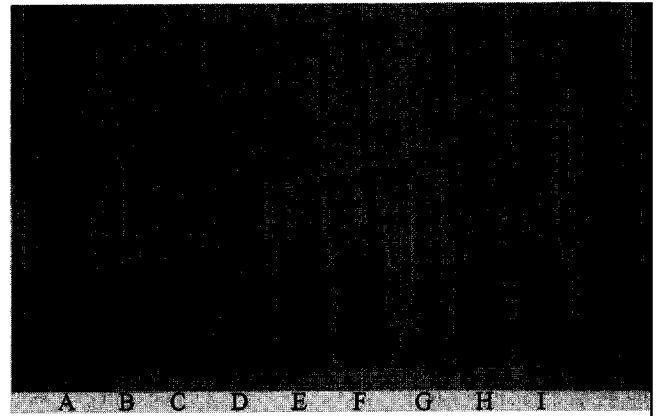


Fig. 1. SDS-PAGE of native SPI and SPI hydrolysate.

- A: native SPI
- B: SPI hydrolyzed with 0.1 N HCl for 15 min, 80°C
- C: SPI hydrolyzed with 0.1 N HCl for 30 min, 80°C
- D: SPI hydrolyzed with 0.1 N HCl for 65 min, 80°C
- E: SPI hydrolyzed with crude enzyme of Strain 6 for 60 min, 40°C
- F: SPI hydrolyzed with crude enzyme of Strain 16 for 60 min, 40°C
- G: SPI hydrolyzed with crude enzyme of Strain 95 for 60 min, 40°C
- H: SPI hydrolyzed with crude enzyme of Strain 97 for 60 min, 40°C
- I: SPI hydrolyzed with crude enzyme of Strain 101 for 60 min, 40°C

Table 5. Morphological and biochemical characteristics of the strain YG-95

Characteristics	Results
Gram stain	+
Shape	Rod Shape
Spores	Endospore
Catalase	+
Oxidase	+
Urease	-
Voges-Proskauer test	+
Methy-red test	-
β-Glucosidase	+
Hydrolysis of casein	+
gelatine	+
starch	+
tyrosine	-
Gas from glucose	-
Acid from glucose	+
sucrose	+
tagatose	-
inositol	+
galactose	-
arabinose	+
xylose	+
mannitol	+
raffinose	-
ribose	-
maltose	+
Growth in 2% NaCl	+
5% NaCl	+
7% NaCl	+
10% NaCl	-
Growth at 30°C	+
40°C	+
50°C	+
60°C	-

된 균주를 *Bacillus subtilis* YG-95로 명명하였다.

**효소생산의 배양 조건 검토**

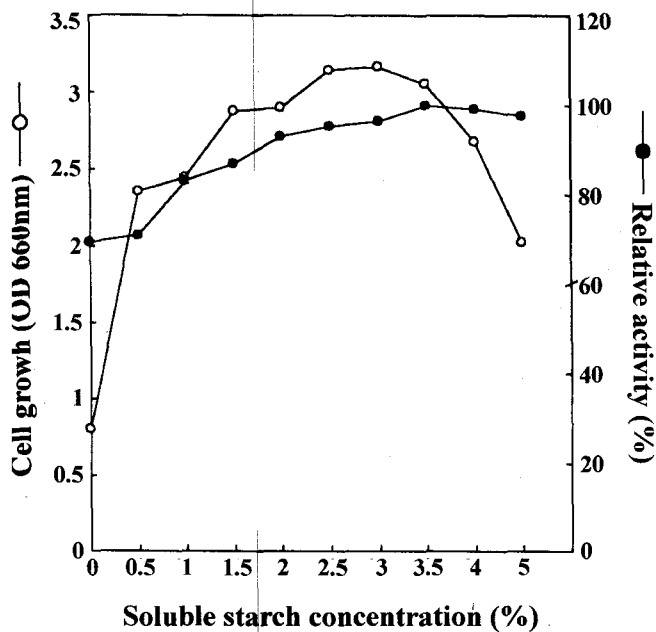
**(1) 탄소원의 영향**

TSB를 기본배지로 하여 각종 탄소원 1%를 첨가하여 *Bacillus subtilis* YG-95균주의 효소활성을 조사한 결과는 Table 6과 같다. Protease 생산에 가장 우수한 효과를 보인 탄소원은 soluble starch이었으며, soluble starch를 0~5.0%로 조정하여 효소의 활성을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. Soluble starch의 농도가 3.5% 첨가시에 대두단백분해 효소의 활성이 가장 높았으며, 그 이후로는 완만한 감소를 나타내어 구 등<sup>20)</sup>이 *Bacillus lichemiformis*에서의 protease 생산시 탄소원으로 lactose가 이용되었고, 이 등<sup>21)</sup>이 탄소원으로

**Table 6. Effect of carbon sources on the growth and protease production of *B. subtilis* YG-95**

C-source	Final pH	Growth (660 nm)	Relative activity (%)
None	7.85	0.515	100.0
Dextrose	6.22	0.685	111.3
Lactose	7.65	0.429	110.6
Sacharrose	6.39	1.423	117.7
Cellobiose	6.66	1.057	108.6
Fructose	6.31	0.605	110.6
Xylose	6.74	0.588	109.7
Arabinose	7.34	0.460	112.5
Maltose	6.78	0.677	108.6
Mannitol	6.34	0.781	114.9
Rhamnose	7.79	0.437	115.4
Soluble starch	6.97	2.912	135.0
Dextrin	7.01	0.869	124.1

Cell were grown at 30°C for 24 hours in a 300 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of medium supplemented with 1% of each carbon source.



**Fig. 2. Effect of soluble starch concentration on the growth and protease production of *B. subtilis* YG-95. *B. subtilis* YG-95 was grown at 45°C for 60 hours on the TSB.**

fructose를 첨가 했을 때 활성이 가장 높았다는 보고와는 상이한 결과를 나타내었으나, 이 등<sup>22)</sup>과 최 등<sup>23)</sup>이 soluble starch를 탄소원으로 첨가하였을 때 효소 생산량이 우수하였다는 보고와는 유사한 결과를 보였다.

**(2) 질소원의 영향**

Soluble starch 3.5%를 첨가한 기본배지에 각종 질소원 1%를 첨가한 후, *Bacillus subtilis* YG-95 균주의 protease의 생산에 미치는 질소원의 영향을 조사한 결과(Table 7), SPI (Soy Protein Isolate)와 soybean meal이 protease생산에 가장 우수한 효과를 보인 질소원으로 나타났고, 대체로 유기 질소원이 무기질소원에 비하여 protease의 활성이 높은 것으로 보아, 이는 본균주가 콩을 주원료로 한 메주에서 분리한 균임을 고려할 때 대두 성분이 본 효소를 생산하는데 적합한 것으로 생각된다.

Protease활성이 가장 높은 SPI를 0.1~5.0%로 조정하여 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 3와 같다. SPI 3.0%에서 가장 높은 protease생산성을 나타내었으며, 대체로 높은 농도에서 효소의 활성이 높게 나타났다.

최 등<sup>23)</sup>이 yeast extract첨가시에 가장 효과적으로 효소를 생산하였다는 보고와 최 등<sup>24)</sup>이 *Streptomyces* sp. 균주의 효소 생산에 질소원으로 casein 0.5% 첨가시 효소의 활성이 가장 높게 나타났다고 보고하여, 본 실험의 결과와는 상이한 결과를 보였으나, 구 등<sup>20)</sup>의 *Bacillus licheniformis*으로부터 효소의 생산조건중 질소원으로 defatted soybean meal과 phytone, peptone에서 protease의 생산이 현저히 높았다고 보고와 김 등<sup>16)</sup>이 protease생산에 soybean meal이 우수하였다는 보고와는 일치하였다.

**(3) 배양 pH가 protease의 생산에 미치는 영향**

효소 생산에 미치는 배양액의 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 최대 효소생산을 나타내는 SPI 3%와 soluble starch 3.5%로 첨가한 배지를 멸균 후 pH를 5~13까지 각각 보정하여 효소의 활성도를 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 선

**Table 7. Effect of nitrogen source on the growth and protease production of *B. subtilis* YG-95**

N-source	Final pH	Growth (660 nm)	Relative activity (%)
None	7.90	0.456	100.0
Beef Extract	8.5	2.292	174.1
Yeast Extract	8.09	3.418	220.0
Polypeptone	8.45	2.412	161.4
Peptone	8.25	2.435	136.7
Tryptone	8.40	2.076	151.3
Soybean Meal	8.26		237.4
Soy Protein Isolate	8.54		244.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.44	0.403	99.3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	6.11	0.021	115.2
NH <sub>4</sub> Cl	7.53	1.014	99.0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	7.54	0.836	104.6
KNO <sub>3</sub>	8.01	0.444	99.8
NaNO <sub>3</sub>	7.81	0.378	103.9

Cell were grown at 30°C for 24 hours in a 300 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of medium supplemented with 1% of each nitrogen source.

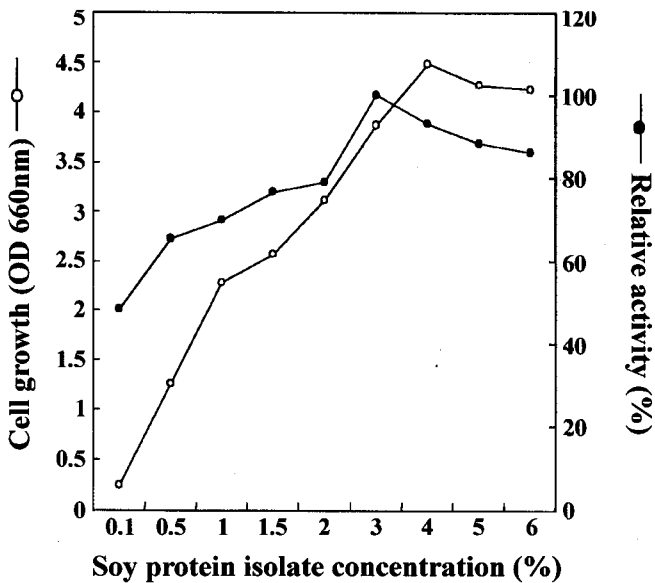


Fig. 3. Effect of SPI concentration on the growth and protease production of *B. subtilis* YG-95. *B. subtilis* YG-95 was grown at 45°C for 60 hours on the optimized media with different soy protein isolate concentration.

별된 균주의 배지의 초기 pH가 7.6인 배지에서 가장 빠른 성장속도 및 효소 생산을 보였으며 pH 10이상에서는 대체로 낮은 효소 생산을 보여 구 등<sup>20</sup>과 최 등<sup>23</sup>이 pH 7.2 상태에서 효소 활성이 높게 나타났다고 보고와 유사한 결과를 보였으나, 심 등<sup>25</sup>과 장<sup>26</sup>이 배양 pH 10.2일 때 높은 효소 활성을 나타낸다는 보고와는 다소 상이한 결과를 보였다.

(4) 배양온도가 protease이 생산에 미치는 영향

*B. subtilis* YG-95의 효소 생산에 미치는 온도의 영향은

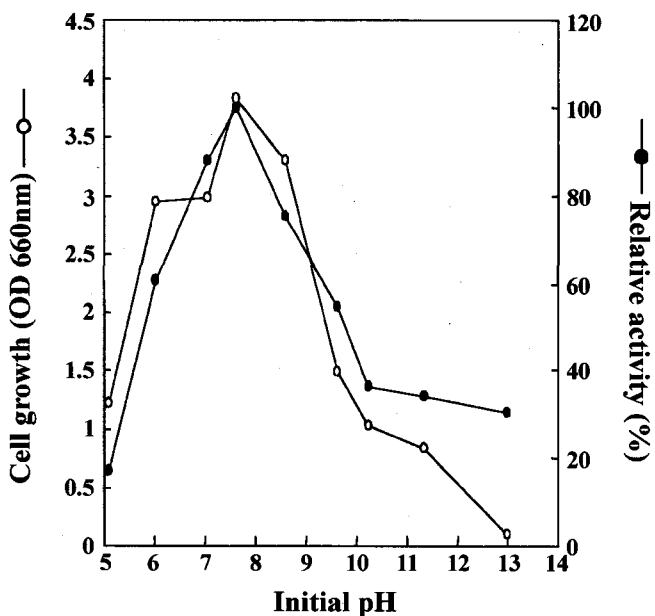


Fig. 4. Effect of initial pH on the growth of *B. subtilis* YG-95 and protease production. *B. subtilis* YG-95 was grown at 45°C for 60 hours on the optimized media with different initial pH.

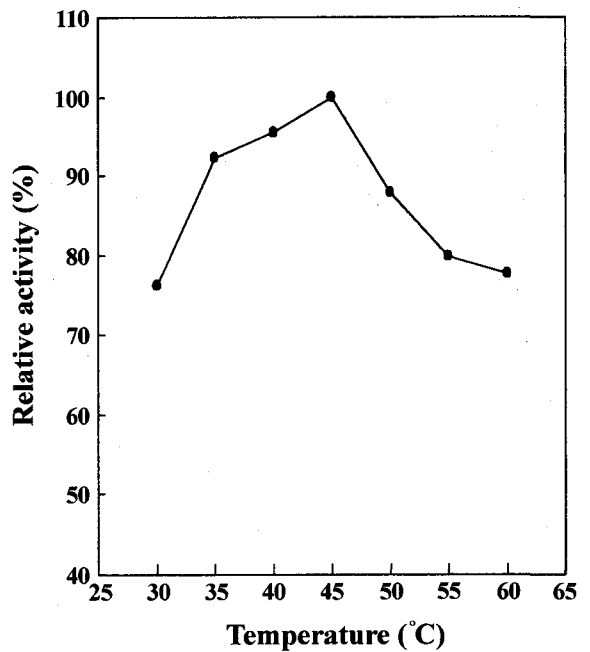


Fig. 5. Effect of temperature on the protease production of *B. subtilis* YG-95. The cultivation was carried out at various temperature for 60 hours, pH 7.2.

조사한 실험 결과는 Fig. 5와 같다. Protease의 생산은 온도 45°C에서 가장 높았으며 대체로 40~50°C까지 효소의 생산은 높았으나, 그 이상의 온도에서는 효소의 생산은 점차 감소하는 결과를 보여 Manachini 등<sup>27</sup>의 alkaline protease 생산을 위한 *Bacillus* sp. 균주의 최적온도가 45°C이었다는 보고와 유사한것으로 나타났다. 그러나 최 등<sup>23</sup>의 *Bacillus subtilis*에 의한 protease 생산시 배양 30°C에서 최대의 효소

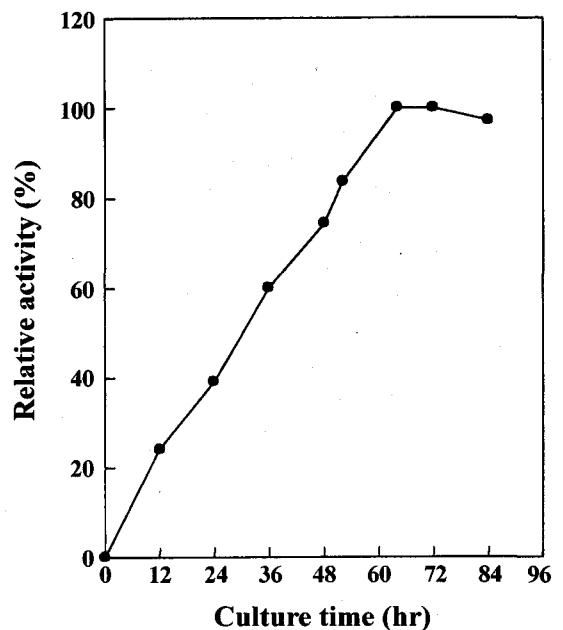


Fig. 6. Effect of incubation times on the protease production of *B. subtilis* YG-95. *B. subtilis* YG-95 was grown at 45°C, pH 7.6 on the optimized media with different initial pH.

생산을 나타났다고 보고와는 상이한 결과를 보였다.

(5) 배양시간이 protease의 생산에 미치는 영향

*B. subtilis* YG-95의 배양시간별로 효소 활성을 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 배양시간이 경과함에 따라 효소활성이 지속적으로 증가하였고, 배양 60시간에 최고의 효소 생산을 나타냈으며, 그 이후부터는 감소하는 경향을 보여, 장 등<sup>28)</sup>의 *Bacillus subtilis* 균주의 효소생산의 경우 배양 18~24시간에서 최대 활성이 나타났다는 보고와 이 등<sup>29)</sup>이 5일에서 효소 생산이 가장 높았다는 보고와는 효소생산을 위한 배양시간의 차이가 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 한국과학재단 특정기초연구비(96-04-02-05-01-3)지원으로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lee, C. Y. (1989) Korean soy seasonings and culture, *Food Science and Industry*, **22**(4), 3-7.
2. Park, C. K. and I. K. Hwang (1975) Consumption pattern of korean traditional soy sauce and consumer sensory evaluation, *Kor. J. Soc. Food Sci. Nutri.*, **11**(5), 521-526.
3. Kim, J. K. and C. S. Kim (1980) The taste components of ordinary korean soy sauce, *Agric. Chem. Biotechnol.*, **23**(2), 89-105.
4. Seo, J. S. and T. S. Lee (1992) Free amino acid in traditional soy sauce prepared from meju under different formations, *Korean J. Dietry culture*, **7**(4), 323-328.
5. Kim, S. S. (1978) Effect of meju shapes and strains on the quality of soy sauce, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **10**(1), 63-72.
6. Park, J. M. and H. I. Oh (1995) Changes in microflora and enzyme activities of traditional *Kochujang Meju* during fermentation, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**(1), 56-62.
7. Cho, D. H. and W. J. Lee (1970) A study on the fermentive microoflora of korean traditional soy sauce, *J. Korean Agric. Chem. Biotechnol. Soc.*, **13**(1), 35-42.
8. Hu, S. H. and D. M. Ha (1991) Occurance of acid producing bacteria in Meju loaves, *J. Korean Agric. Chem. Biotechnol. Soc.*, **34**(2), 130-133.
9. Cho, J. S. (1989) Supply and demand of products, present condition and the point of issue of research of korean soy seasonings, *Food Science and Industry*, **22**(4), 28-36.
10. Lee, J. S., S. J. Kwon, S. W. Chung, Y. J. Choi, J. Y. Yoo and D. H. Chung (1996) Changes of microorganisms enzyme activitis and major component during the fermentation of korean traditional *Doenjang* and *Kochujang*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**(2), 247-253.
11. Neurath H. (1989) *Proteolytic Enzyme, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1-13.
12. Shon, D. H. (1994) Physiological activies peptide from food protein, *Food Technology*, **7**(3), 25.

13. Kang, Y. J., K. C. Lee and Y. H. Park (1988) Hydrolysis of 7S and 11S soy proteins by commercial proteases, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **20**(3), 338-343.
14. Choi, H. K., W. I. Cho and T. W. Moon (1996) Preparation of enzymatic hydrolysis of soymilk residue protein and fractionation of bile acid-binding components, *Foods and biotechnology*, **5**(1), 64-69.
15. Kim, S. H. and H. J. Lee (1985) Characteritics of bitterness peptide from the cheese and soy paste, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **17**(4), 276-282.
16. Kim, H. K., K. H. Kim, J. K. Lee, Y. O. Kim, H. S. Nam and T. K. Oh (1995) Characterization of a thermostable protease from thermophilic *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**(3), 322-328.
17. John, G. H., N. R. Krieg and P. H. A. Sneath (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th (ed.), Williams and Wilkins, Baltimore.
18. Harold J. Benson (1994) *Microbiological Applications*, WCB, 6th(ed.), Whasington D. C..
19. Anson, M. L. (1938) The estimation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobin, *J. Gen. Physio.*, **22**, 79-95.
20. Koo, J. H., I. J. Choi, H. S. Nam, H. J. Lee, Z. I. Shin and T. K. Oh (1997) Medium optimization for production of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* NS70, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotchnol.*, **25**(2), 207-211.
21. Lee, W. J., K. M. Shon and C. Choi, (1991) Producing and purification of alkaline protease produced by *Bacillus* sp. CW-1121, *J. Korean Soc. Food Nutri.*, **20**(4), 388-394.
22. Lee, Y. K., Y. H. Park, H. H. Lee, and H. H. Hyun (1996) Isolation and characteristics of alkaline protease produced by *Pseudomonas* sp., *Kor. J. Microbiol.*, **22**(4), 289-297.
23. Choi, C., K. S. Choi, Y. J. Cho, S. I. Lim, S. H. Lee, J. H. Son, H. J. Choi and H. D. Lee (1996) Characteristics and action pattern of protease from *Bacillus subtilis* Globigii CCKS-118 in korean traditional soy sauce, *J. Korean Agric. Chem. Biotechnol. Soc.*, **39**(6), 460-465.
24. Choi, C., Y. K. Jung, S. K. Sung, K. S. Choi, J. S. Lee, Y. J. Cho and O. J. Kwon (1992) Producing and purification of alkaline protease produced by *Streptomyces* sp., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotchnol.*, **20**(2), 169-177.
25. Shim, C. W., K. S. Jeong, W. C. Shin and J. H. Yu (1994) Effect of pH on the production and characteritics of protease by *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**(1), 59-64.
26. Jang, H. S. (1997) *Studies on the Alkaline Protease Produced by Xanthomonas* sp. KJ-35, Ph. D. Thesis, Kunkook Univ., Seoul, Korea, 65-68.
27. Manachini, P. L., Fortina, M. G. and Parini, C. (1989) Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thomurbera* new species of *Bacillus* sp., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 409-413.
28. Jang, S. J., Y. S. Kim, H. J. Sung, Y. J. Choi and H. C. Yang (1989) *Studies on the alkaline protease produced by Bacillus subtilis*, *J. Korean Agric. Chem. Biotechnol. Soc.*, **31**(4), 356-360.

---

**Isolation and Identification of Protease Producing Bacteria, *Bacillus subtilis* YG-95 from the Traditional *Me-Ju* and Its Production Conditions**

Young-Gag Byun, Seong-Ho Kim<sup>1</sup>, Hyun-Kyu Joo<sup>2</sup>, Gap-Sang Lee<sup>3</sup> and Moo-Hyun Yim\*<sup>1</sup>(*Department of Agricultural Chemistry, Kon-kuk University, Seoul, 133-701, Korea; <sup>1</sup>Department of Food Science & Technology, Tae-Gu University, Kyungsan, 712-714, Korea; <sup>2</sup>Division of Food Resources, Sun-Moon University, Asan 336-840 and <sup>3</sup>Department of Agricultural Chemistry, Won-Kwang University, Iksan, 570-640, Korea*)

**Abstract** : A bacteria producing protease against soy protein was isolated from various traditional *Me-Ju*, in order to improve utilization and characteristics of soy protein hydrolysates reduced bitterness and advanced flavors. The optimal culture conditions for protease production was investigated. The isolated bacteria was identified as *Bacillus subtilis* by morphological and physiological characteristics and named *Bacillus subtilis* YG-95. The optimal culture condition of liquid medium for protease production by *Bacillus subtilis* YG-95 composed of 3.5% soluble starch, 3.0% soy protein isolate, 0.25% dextrose, 0.5% NaCl, 0.25% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, with an initial pH of 7.6, for 60 hrs at 45°C.

---

**Key words** : *Bacillus subtilis*, *Me-Ju*, Protease, Protein hydrolysis

\*Corresponding author