

Bacillus subtilis YG-95가 생산하는 protease의 정제와 특성

변영각 · 김성호¹ · 주현규² · 이갑상³ · 임무현*¹

건국대학교 농화학과, ¹대구대학교 식품공학과
²신문대학교 식량자원학부, ³원광대학교 농화학과

초 록 : *Bacillus subtilis* YG-95가 생산하는 protease를 ammonium sulfate(35~85%) precipitation, DEAE-sepharose 6B, sephadex G-100을 통해 분리, 정제하였고 정제된 효소의 특성을 조사하였다. SDS-PAGE로 확인된 효소의 분자량은 약 43 kilodalton이었다. 효소반응의 최적 pH 및 최적온도는 각각 약 pH 10.0와 55°C이었으며, 효소는 pH 5~12 까지 넓은 pH 범위에서 안정성을 보였고, 45°C까지의 온도에서 안정하였다. 본 효소는 Fe³⁺와 Al³⁺에 의해서 활성이 저해되었으며, 저해제 중에서는 O-Phenanthroline, PMSF, SDS에 의해서 80%이상 저해를 받았고 SPI에 대한 기질 친화도는 K_m은 1.28 mg/mL이었다.(1998년 8월 6일 접수, 1998년 8월 29일 수리)

서 론

단백질의 기능성은 제조, 저장, 조리, 소비 중에 식품에서의 단백질의 동태(behavior)에 영향을 주는 물리화학적 성질을 말한다. 그 중에서 특히 대두 단백질은 간장과 된장등 우리나라의 전통적 식품에서 널리 이용되어 그 우수한 기능성이 인정되고 있다. 또한 영양적 가치뿐 아니라 식품의 조리, 가공과정에서 나타내는 여러 가지 특성 및 기능성으로 인하여 탈지박, 농축단백 그리고 분리단백등의 대두 단백질은 각종 대두제품을 제조하는데 이용이 되고 있으나, 대두 취, 조직, 열 안정성 등의 문제로 인하여 콩 단백질의 용도와 용량이 제한되고 있기 때문에 이의 개선을 위한 연구가 이루어지고 있다.¹⁾

대두단백은 pH, 염농도, 온도등과 같은 조건에 의해 단백질의 변화와 이용의 제한성을 가지므로, 가공조건과, 목적에 따라 대두단백질의 기능성을 조절하려는 시도도 있다.²⁾ 대두단백질의 특성변화로 인한 이용성과 적용 가능성이 가장 큰 방법으로서 대두단백질에 단백분해효소를 처리한 분해물에 대한 다양한 기능성의 연구가 행해지고 있다.^{3,4)} 단백분해효소에 의한 부분적인 가수분해를 통한 단백질의 용해도 증가,⁵⁾ 유화 형성능 개량,⁶⁾ 고미 생성물의 제거⁷⁾ 등의 연구가 보고되고 있다. 또한, 대두 단백질의 효소적 가수분해물의 peptide 등은 산성음료의 용해도 증가, 일부 환자의 내 allergy성, 기능성 특성의 향상 등에 대한 응용⁸⁾이 가능할뿐만 아니라, 기능성의 변화⁹⁾와 새로운 식품으로서가능성도 보고¹⁰⁾되고 있다. 특히, 단백분해효소처리에 의해 생성된 두유비지 가수분해물로부터 콜레스테롤 저하기능을 가지는 peptide분리의 연구⁹⁾와 최근 탈지대두의 산분해에 의한 장유의 제조과정상의 문제점에 대한 연구^{11,12)}도 활발히 진행되고 있다.

이에 본 연구에서는 대두단백질의 가수분해물은 단백질의 가수분해정도, peptide의 구조, 크기 및 아미노산의 염기 배열등에 따라서 기호성 및 기능성이 다양하게 나타나게 되므로, 단백분해물의 기능특성의 개선과 식품에의 이용성을 증가시키기 위하여, 기존의 단백분해효소와는 다른 우리나라의 전통 메주에서 분리한 균주가 생산하는 protease에 의해 분해되는 대두단백 가수분해물의 특성과 이용성 연구의 일환으로, 전보¹³⁾의 우리나라 전통메주에서 분리, 동정된 *Bacillus subtilis* YG-95가 생산하는 protease를 분리, 정제후 그 효소의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

전보¹³⁾에서 분리, 동정된 *Bacillus subtilis* YG-95를 이용하여 protease를 생산하였다.

단백질 가수분해 효소의 활성

단백 가수분해 효소의 활성은 전보¹³⁾와 같이 Anson방법¹⁴⁾을 변형하여 실험하였다. 효소활성 단위는 SPI(Soy Protein Isolate)와 Hammarstein casein을 기질로 사용하였으며, 50°C에서 1분동안에 1μg/mL의 tyrosine을 유리시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

효소의 정제 방법

전보¹³⁾의 최적 배지조건에서 배양한 배양액 500 ml를 5000×g에서 20분간 원심분리하고 상등액 324 ml를 35~85% ammonium sulfate로 염석분획하여 단백질성 물질을 회수하고, 3 l의 증류수로 투석하여 동결건조기를 이용하여 농축한 후, 이를 조효소액으로 사용하였다. 전 처리한 조효

찾는말 : *Bacillus subtilis*, Protease, Protein hydrolysis, Purification, Characterization

*연락처

소액은 DEAE-sepharose 6B column(2.5×30 cm, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0)에 흡착시키고 0.05~0.5 M NaCl을 사용하여 gradient로 용출시키면서 시간당 42.0 ml의 유속으로 6.5 ml씩 분획하였다. 효소 활성 분획물은 1 l의 증류수에 10시간 투석시키고, 동결건조하여 농축한 후, 동일 완충액을 평형화 시킨 sephadex G-100 column(1.0×61 cm)을 사용하여 시간당 8.5 ml 유속으로 3.25 ml씩 분획, 정제하였다.

단백질의 정량

효소의 정제과정에서 단백질의 양은 Lowry 방법¹⁹⁾에 따라 측정하였고, bovine serum albumin을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 단백질 함량을 계산하였으며, 효소 정제과정중의 단백질의 농도는 spectrophotometer를 사용하여 280 nm에서 흡광도로 측정하였다.

전기영동 및 분자량의 측정

단백질 가수분해 효소의 분리 정도와 분자량을 구하기 위하여 Sodium dodecylsulfate polyacryamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)을 수행하였고, Coomassie brilliant blue R-250(45% methanol, 10% acetic acid, 0.1% Coomassie brilliant blue R-250)을 사용하여 단백질 밴드를 염색하고, 10% methanol-10% acetic acid 조성의 용액으로 탈색하였다. 이때 사용한 표준단백질로는 Sigma사의 Ovalbumine (M. W. 45,000), Carbonic anhydrase(M. W. 31,000), Trypsin inhibitor(M. W. 21,500), Lysozyme(M. W. 14,400)을 사용하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

배양액 500 ml을 원심분리하여 얻은 상등액을 황산암모늄으로 염석(35~85%) 분획하고 증류수를 사용하여 4°C에서 투석 한 후 얻은 조효소액을 DEAE-sepharose 6B을 이용하여 효소를 흡착, 분리한 결과 3개의 단백질 peak를 얻었으며(Fig. 1), 이중 효소 활성이 강한 분획(No. 18~31)을 모아 다시 sephadex G-100 column에 통과 시킨 결과, 활성 단백질은 분획 8~14번에서 용출되었다(Fig. 2). 총 정제에서 약 10.7배의 정제도를 가졌으며, 회수율은 7.65%였다(Table 1).

정제된 효소의 SDS-PAGE 전기 영동 결과, 약 43,000 dalton으로 추정되었다(Fig. 3). 기타, 본효소단백질의 3차구

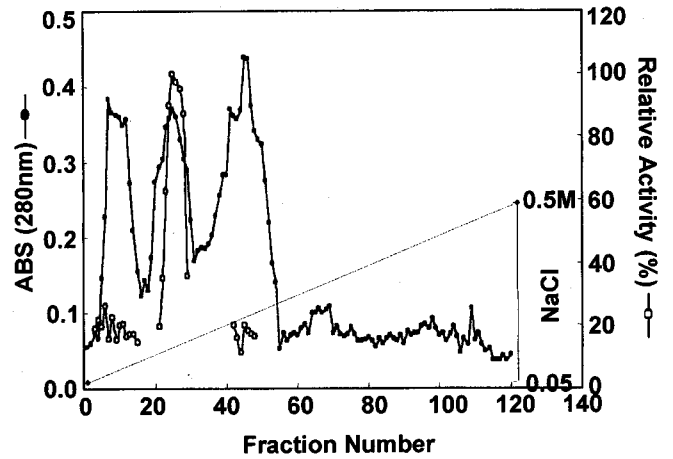


Fig. 1. Chromatogram of the protease from DEAE-Sephadex 6B column; Column size, 2.5×30 cm; flow rate, 42 ml/hr; 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0.

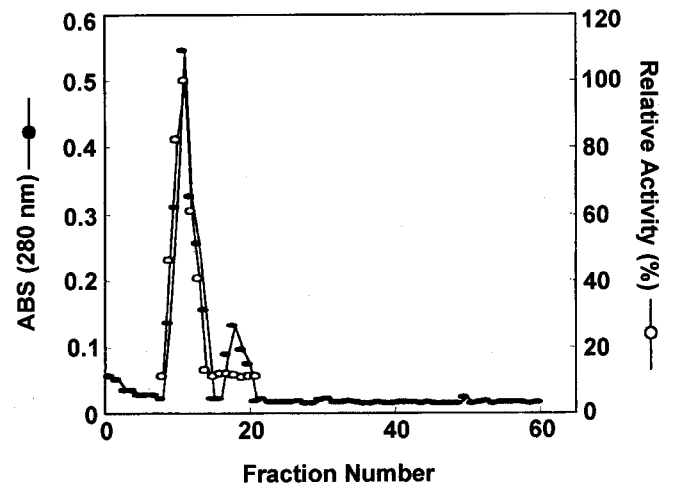


Fig. 2. Chromatogram of the protease from Sephadex G-100; Column size, 1.0×61 cm; flow rate, 8.5 ml/hr; 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0.

조, 아미노산의 조성 및 배열 실험을 통한 효소의 특성연구가 더욱 필요하리라 생각된다.

정제효소의 특성

(1) 정제효소의 최적 pH

정제효소의 최적 pH를 조사하기 위하여 0.6% SPI(Soy Protein Isolate)를 함유한 완충용액을 pH 4에서 pH 13까지 각각 조제하여, 이들 완충용액 2.5 ml에 효소액 0.5 ml를 가한 후 40°C에서 20분간 반응하여, 상대활성으로 표시한

Table 1. Purification of protease from *Bacillus subtilis* YG-95

Purification step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Culture supernatant	87,715	13,457	6.5	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	27,405	1,169	23.4	31.2	3.6
DEAE-sepharose 6B	12,421	297.6	46.4	14.2	7.1
Sephadex G-100	6,714	96.4	69.6	7.7	10.7

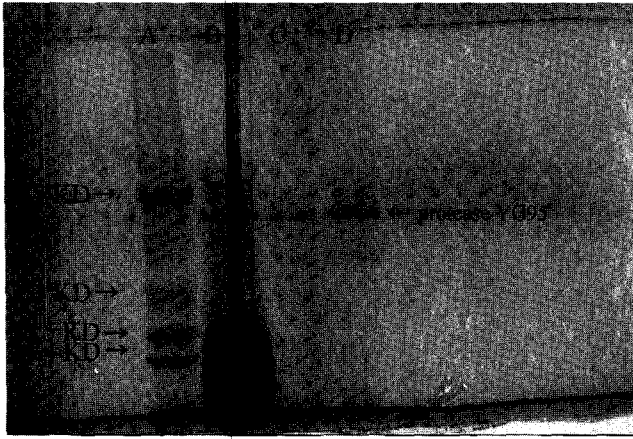


Fig. 3. Electrophoresis of protease from Bacillus subtilis YG-95.
 A: Reference protein: Ovalbumine (45 KD), Carbonic anhydrase (31 KD), Trypsin inhibitor (21.5 KD), Lysozyme (14.4 KD).
 B: After ammonium sulfate precipitation
 C: After DEAE-Sephacrose 6B chromatography
 D: After Sephadex G-100 chromatography

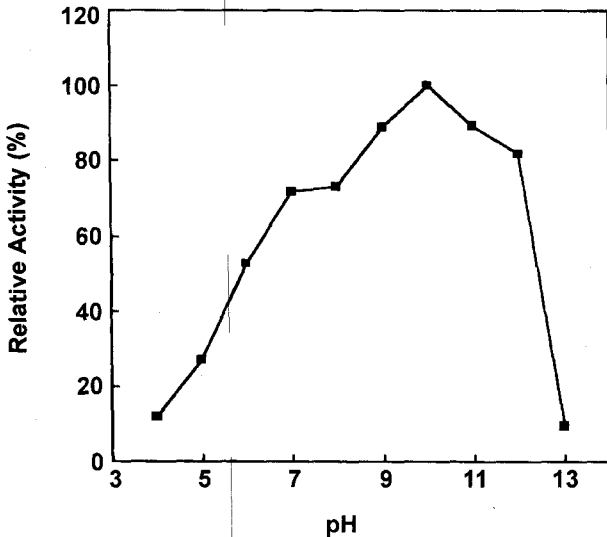


Fig. 4. Optimum pH of the purified protease. The reaction was carried out at the pH indicated at 40°C for 20 min and protease activity was measured in the presence of 0.6% SPI as substrate : Buffer solution used McIlvaine buffer (pH 4~7), Tris-HCl buffer (pH 8~9), Sodium bicarbonate buffer (pH 10~11), KCl-NaOH buffer (pH 12~13).

결과(Fig. 4), 정제효소의 활성은 pH 8이상에서 높은 활성을 보이기 시작하여 pH 9에서 약 90%의 상대활성을 보였으며, 정제효소의 최적 pH는 10.0으로 나타나, 김 등¹⁶⁾의 호알카리성 *Bacillus* sp. 균주의 Alkaline protease의 최적 pH가 10이었다는 보고와는 일치하는 경향을 보였으나, 심 등¹⁷⁾의 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M이 생산하는 protease는 모두 pH 12.0이었다는 보고에 비하여 본효소의 최적 pH가 낮은 것으로 나타났다(Table 5).

(2) 정제효소의 pH 안정성

정제 효소의 pH 안정성은 pH 4~13까지의 완충용액을 각각 0.5 ml씩 취하고, 동량의 효소액을 첨가하여, 40°C에

Table 2. Effect of inhibitors on the protease activity

Inhibitor	Relative activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100.0	100.0
PMSF	18.6	16.0
EGTA	55.6	100.5
KMnO4	68.1	66.0
O-Phenanthroline	16.1	12.0
Oxalic acid	74.6	17.8
EDTA	28.2	55.8
KCN	41.0	38.1
L-Cystein	76.5	72.1
SDS	28.8	14.1
Sodium Azide	47.1	78.1

Table 3. Effect of inorganic salts on the protease activity

Inorganic salts	Relative activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100.0	100.0
BaCl ₂ · 2H ₂ O	125.7	216.5
MgCl ₂	126.5	102.9
FeCl ₃	111.6	23.6
KCl	94.2	91.7
CaCl ₂	132.3	108.7
CoCl ₂ · 6H ₂ O	122.2	77.3
AlCl ₃ · 6H ₂ O	121.2	25.8
NiCl ₂ · 6H ₂ O	106.8	54.5

Table 4. Proteolytic activities of various enzymes on SPI and Hammarstein casein as substrates

Enzymes	HC* (units/ml)	SPI* (units/ml)	SPI/H.C. ratio
papain	21.3	15.1	0.71
subtilisin TPY	5.01	4.1	0.82
protease YG-95	3.6	4.9	1.35

*HC: Hammarstein casein, SPI: Soy Protein Isolate

서 30분간 방치 후 50 mM NaHCO₃ 완충용액(pH 10.0)으로 20배 희석한 효소용액 0.5 ml를 0.6% SPI 3 ml에 혼합하여 40°C에서 20분간 반응 후 protease의 잔존 활성을 측정된 결과(Fig. 5), pH 5~12까지 안정성을 나타내었으나, pH 5와 pH 13에서는 활성이 저하되는 것으로 나타나, 본실험의 결과는 심 등¹⁷⁾이 pH 4.0~12.0범위에서 효소가 안정하고, pH 13.0에서는 잔존활성이 전혀 없었다는 보고와 유사하였으나, 안 등¹⁸⁾의 *Bacillus* sp.가 생산하는 알칼리성 protease는 pH 6.0~12.0까지 안정하였다는 보고에 비해 본 실험의 효소의 pH안정 영역이 다소 넓은 결과를 보였다 (Table 5).

(3) 정제효소의 최적 온도

정제 효소의 최적온도를 알아보기 위하여 0.6% SPI기질 용액 3 ml에 효소액 0.5 ml를 가한 후 30°C에서 70°C까지 5°C간격으로 하여 10분간 반응시켜, 효소의 상대활성으로 표시한 결과(Fig. 6), 정제효소는 55°C에서 반응 최적온도를 보였으며, 45~60°C에서도 비교적 높은 활성을 나타냈으나,

Table 5. Comparison of protease characteristics among the *Bacillus* spp.

Strains	Charact.				
	Optim. pH	pH Stab.	Optim. Temp.	Temp. Stab.	Ref.
<i>Bacillus</i> sp.	10	8~11	60°C	50°C	16.
<i>Bacillus</i> sp. SH-8	12	4~12	40°C	40°C	17.
<i>Bacillus</i> sp.	12	6~12	55°C	55°C	18.
<i>Bacillus subtilis</i> YG-95	10	5~12	55°C	45°C	This work

그 이상에서는 활성이 급격히 떨어지는 것으로 나타나, 안 등¹⁸⁾의 *Bacillus* sp.에서 최적 활성 온도가 55°C였다는 보고와 유사하였으나, 심 등¹⁷⁾이 *Bacillus* sp.의 효소의 최적 온도

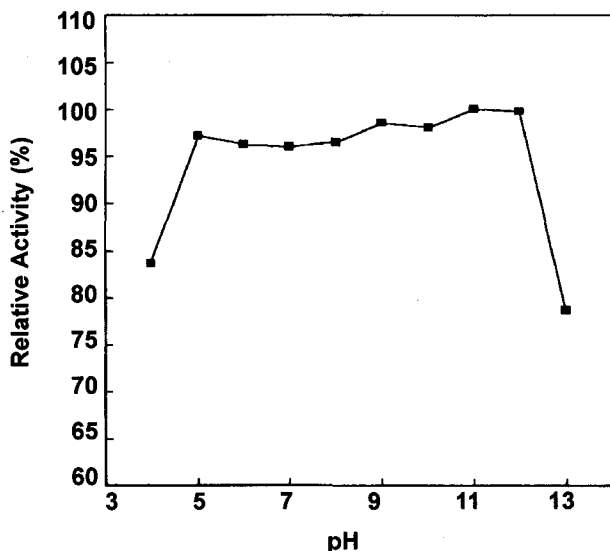


Fig. 5. pH stability of the purified protease. The reaction mixture were indicated at 40°C for 20 min, and the residual activity was measured in the presence of 0.6% SPI as substrate: Buffer solution used Mcllvaine buffer (pH 4~7), Tris-HCl buffer (pH 8~9), Sodium bicarbonate buffer (pH 10~11), KCl-NaOH buffer (pH 12~13).

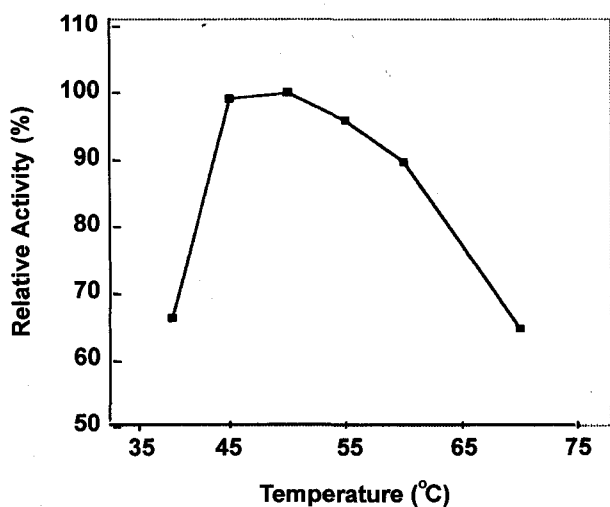


Fig. 6. Optimum temperature of the purified protease. The reaction carried out at the temperature indicated for 10 min at the pH 10.0 and protease activity was measured in the presence of 0.6% SPI as substrate.

가 40°C라는 보고와 최 등¹⁹⁾이 *Streptomyces griseus* HC-1141의 효소활성이 60°C에서 최대의 활성을 보였다는 결과보다 다소 낮은 것으로 나타났다(Table 5).

(4) 정제효소의 온도 안정성

정제효소의 열안정성을 조사하기 위해서 30~70°C까지 5°C간격으로 하여 30분간 효소용액을 처리한 후, 55°C에서 기질과 반응시켜 그 잔존활성을 측정된 결과(Fig. 7), 45°C까지는 정제효소가 안정하였으나 그 이상에서는 급격히 효소의 실활이 되어 60°C이상에서는 약 80%의 실활을 보여 김 등¹⁶⁾의 효소가 50°C까지 비교적 안정하였다 보고와 유사한 결과를 나타내었으나(Table 5), Kunitate 등²⁰⁾의 *Bacillus thuringiensis*에서 열안정성 serine protease가 60°C까지 안정하였다는 보고와는 본 실험의 열안정성이 다소 낮게 나타났다.

(5) 정제효소의 저해제의 영향

정제효소에 대한 효소 저해제의 영향을 알아보기 위하여 최종 농도가 1mM 및 5 mM이 되도록 각종 저해제를 첨가한 결과(Table 2), O-Phenanthroline, PMSF(Phenylmethylsulfonyl fluoride)와 SDS(Sodiumdodecylsulfate)에 의해 각각 80%이상 저해되었으며, EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid),

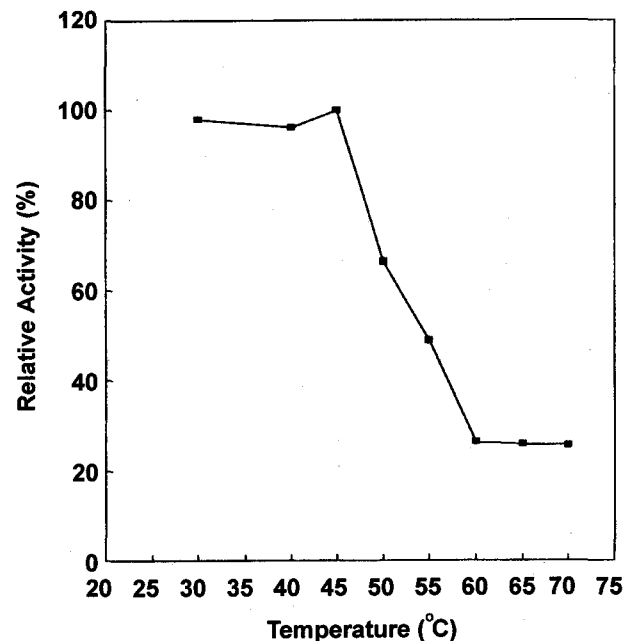


Fig. 7. Temperature stability of the purified protease. The enzyme was incubated at the temperature indicated for 30 min and residual activity was measured in the presence of 0.6% SPI as substrate.

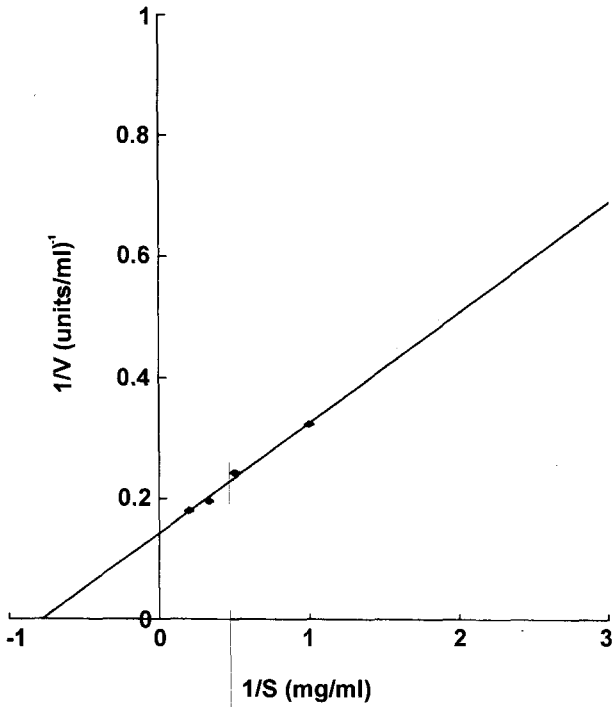


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot of various concentrations of SPI on the enzyme reaction rate.

EGTA(Ethyleneglycol-bis-β-aminoethyltetraaceticacid) 및 Sodium azide 등은 농도가 1 mM 보다 5 mM의 경우 효소의 저해정도가 적게 일어났는데, 이에 대해서는 본 효소의 특성에 대한 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다. 이러한 저해제에 대한 결과는 Keay²¹⁾의 protease 정제효소가 EDTA에 저해를 받지 않았다는 보고와, 김 등²²⁾의 *Bacillus amylo-liquefaciens* NS 15-4의 내열성 protease가 PMSF에 의해 강하게 저해 받았다고 보고와도 유사한 결과이었다.

(6) 정제 효소의 금속염의 영향

정제 효소의 활성에 미치는 금속이온의 영향을 검토하기 위해서 각각의 금속 이온을 최종농도가 1 mM과 5 mM이 되도록 반응액에 첨가하여 효소 활성을 측정 한 결과(Table 3), 모든 금속에서 활성의 저하가 거의 없는 것으로 나타나, 김 등¹⁶⁾의 효소가 Hg²⁺와 Ag²⁺를 제외한 기타 금속이온은 별 다른 영향을 미치지 못했다는 보고와 유사한 결과를 보였다. 한편, BaCl₂·2H₂O만 제외하고는 모든 금속이온의 농도가 5 mM로 높아졌을 때 효소활성이 저하되었으며, 특히 Fe³⁺와 Al³⁺의 3가 금속염은 1 mM일 때 보다 80~90%이상의 저해를 보였고, Co₂₊는 45%정도 실패를 보여, 김 등²²⁾의 내열성 protease가 Mn²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ 등의 2가 금속염등을 1 mM 첨가때보다 5 mM 첨가시 40~50%이상의 저해를 보인 보고와 유사한 결과이었으며, 이에 대한 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

(7) 정제 효소의 기질 농도의 영향

기질 농도에 따르는 효소의 반응 속도를 측정하기 위하여 1~10 mg/ml의 SPI 용액에 정제 효소를 작용 시켰을 때의 반응속도를 측정 한 후 1/S에 대한 1/V의 Lineweaver-Burk법으로 plot한 결과(Fig. 8), SPI에 대한 Km치는 1.28

mg/ml로 나타나 최 등¹⁹⁾의 *Streptomyces griseus*에서 alkaline protease의 Km값이 2.299×10⁻⁴ M, V_{max}값은 46.08 μg/min이었다고 보고와 김 등¹⁶⁾의 *Bacillus* sp.에서의 protease의 casein에 대한 Km값은 10 mg/ml라 보고한 것보다는 낮은 값을 나타내었고, Banerjee 등²³⁾의 *Rhizopus oryzae*의 Km값이 1.11 mg/ml이라는 보고와 배 등²⁴⁾이 1.3 mg/ml로 보고한 결과와 유사한 수치를 나타내었다.

(8) 정제 효소의 기질 특이성

본 정제효소의 SPI에 대한 기질 특이성을 알아보기 위해서 다른 protease와 비교하여 본 결과(Table 4), papain과 subtilisin은 hammarstein casein을 더욱 잘 분해하였지만, 본 효소는 SPI에 대한 활성이 casein보다 높게 나와 대두 단백질은 쉽게 분해하는 기질 특이성을 갖는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구비(97-04-02-05-01-3) 지원으로 수행된 연구의 일부이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Cha, M. H. and S. Yoon (1993) Modification of funtional properties of soy protein isolate by proteolytic enzymes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **25**(1), 39-45.
2. Pour-El, A. (1981) Protein Funtionality Definition and Methodology, In Protein Funtionality in Foods, Cheery, J. P. (ed), American Chemical Society Symposium Series 147, Washington D. C., 11.
3. Kang, Y. J. (1984) Enzymatic modification of soy proteins, Effects of funtional properties of soy isolate upon proteolytic hydrolysis, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **16**(2), 211-217.
4. Yoo, J. S. and S. R. Lee (1988) Efficacy of enzyme treatment for the quality improvement of soymilk, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **20**(3), 426-432.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Shon, D. H. (1994) Physiological activies peptide from food protein, *Food Technology*, **7**(3), 25.
9. Puskin, G. (1975) Modification of the funtional properties of soy proteins by proteolytic enzyme treatment, *Cereal Chem*, **52**, 655.
10. Alder-Nissen, J. (1978) Enzymatic hydrolysis of soy protein for nutritional fortification of low pH food, *Ann. Nutri. Alim.*, **32**, 205.
11. Chae, H. J., M. J. In and M. H. Kim (1997) Characteristic

- properties of enzymatically hydrolyzed soy proteins for the use in protein supplements, *Agric. Chem. Biotechnol.* **40**(5), 404-408.
12. Chae, H. J., M. J. In and M. H. Kim (1997) Characteristic of enzymatically hydrolyzed soy sauce prepared from enzymatically hydrolyzed vegetable protein, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **26**(5), 784-787.
 13. Byun, Y. G., S. H. Kim, H. G. Joo, G. S. Lee and M. H. Yim (1998) Isolation and identification of protease producing bacteria, *Bacillus subtilis* YG-95 from the traditional Me-Ju, and its production conditions, *J. Korean Agric. Chem. Biotechnol. Soc.*
 14. Anson, M. L. (1938) The estimation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobin, *J. Gen. Physiol.*, **22**, 79-95.
 15. Lowry, O. H., N. J. Rosebrogh, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-271.
 16. Kim, T. H., S. H. Park, D. S. Lee, T. K. Kwon, J. K. Kim and S. D. Hong (1990) Properties of alkaline protease produced by an alkalophilic *Bacillus* sp., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**(2), 159-164.
 17. Shim, C. W., K. S. Jeong, W. C. Shin and J. H. Yu (1994) Effect of pH on the production and characteristics of protease by *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**(1), 59-64.
 18. 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. Biotechnol.*, **18**(4), 344-351.
 19. Choi, C., Y. G. Chung, S. K. Sung, K. S. Choi, J. S. Lee, Y. J. Cho, and S. S. Chun (1992) Characteristics and action pattern of alkaline protease from *Streptomyces griseus* HC-1141, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**(3), 295-301.
 20. Akane Kunitate, Masaji Okamoto and Iwao Ohmori (1988) Purification and characterization of a thermostable serine protease from *Bacillus thuringiensis*, *Agri. Biol. Chem.*, **53**(12), 3251-3256.
 21. Leonard Keay (1972) Protease of the genus *Bacillus*, *Ferment. Technol. Today*, 289-298.
 22. 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.
 23. Banerjee, R., and B. C. Bhattacharya (1993) Kinetic properties of extracellular alkaline protease of *Rhizopus oryzae*, *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 380-382.
 24. Bae, M. and P. R. Park (1989) Purification and characterization of thermostable alkaline protease by alkalophilic *Bacillus* sp., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**(6), 545-551.

Purification and Characterization of Protease Produced by *Bacillus subtilis* YG-95

Young-Gag Byun, Seong-Ho Kim¹, Hyun-Kyu Joo², Gap-Sang Lee³ and Moo-Hyun Yim^{*}(*Department of Agricultural Chemistry, Kon-kuk University, Seoul, 133-701, Korea; ¹Department of Food Science & Technology, Tae-Gu University, Kyungsan, 712-714, Korea; ²Division of Food Resources, Sun-Moon University, Asan 336-840; ³Department of Agricultural Chemistry, Won-Kwang University, Iksan, 570-640, Korea*)

Abstract : The protease produced by *Bacillus subtilis* YG-95 was purified by precipitating with ammonium sulfate, DEAE-sepharose 6B and Sephadex G-100 column chromatographies and its purified enzymological characteristics were investigated. The molecular weight of purified protease was estimated about 43kilodalton by SDS PAGE. The optimum pH and temperature for the purified protease activity were pH 10.0 and 55°C, respectively. The enzyme was stable in broad range of pH 5.0 to 12.0. and at the below 45°C. The purified enzyme activity was inhibited by Fe³⁺ and Al³⁺. The activity was significantly inhibited more than 80% by O-Phenanthroline, PMSF and SDS. The K_m value of the purified enzyme against Soy Protein Isolate as a substrate was 1.28 mg/ml.

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

^{*}Corresponding author