

**Bacillus licheniformis SSA3-2M1이 生産하는 Proteinases**장영채 · 이경형 · 김성영<sup>1</sup> · 조윤래 · 김종규\*영남대학교 응용미생물학과  
<sup>1</sup>경상대학교 식품공학과

한국 재래식 간장의 독특한 맛을 생성하는 *B. licheniformis* SSA3-2M1의 배양액으로부터 proteinase를 정제한 결과 2종의 proteinase의 역가를 확인할 수 있었다. Proteinase I의 역가는 II보다 두배가량 되며 최적 pH가 7-11.5이었다. Proteinase II의 최적 pH는 7-9이며 proteinase II는 I보다 pH 3-5 부근의 산성에서 더 안정하고 활성이 강하였다. Proteinase I과 II의 최적온도는 각각 50°C였으며, proteinase II의 온도안정성은 30-45°C 온도범위에서 proteinase I 보다 더 안정하였다. Proteinase I은 45°C에서 60%가 실활되었으며 proteinase II는 45°C에서 5% 가량 실활되었다. 염에 대한 영향은 proteinase I이 염의 농도 25-35% 범위에서 proteinase I 보다 효소활성이 높은 것으로 나타났다. Proteinase  $K_m$ 치는 casein을 기질로 사용하였을 경우, proteinase I은 6.89 mg/ml, proteinase II는 9 mg/ml의  $K_m$ 치를 나타내었고, soy protein의 경우, Proteinase I은 3.98 mg/ml, Proteinase II는 11.44 mg/ml의  $K_m$ 치를 나타내었다. 이 결과는 proteinase I이 II보다 기질에 대한 친화력이 높은 것으로 나타났다. 각종 금속이온의 농도 1 mM에서는  $Pb(CH_3COO)_2$ 는 효소활성을 증가시켰고  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $K_2SO_4$ ,  $HgSO_4$  등은 저하시켰으며, 5 mM 이상에서는  $HgSO_4$ 와  $ZnSO_4$ 가 다른 염에 비해서 특히 효소활성을 많이 저해하였다. Proteinase I과 II는 대두단백을 가수분해하여 peptide와 아미노산을 생성하였으며 peptide를 다시 아미노산으로 분해하였다. Proteinase I과 II는 한국 재래식 간장의 중요 맛성분인 아미노산을 생성하는 주요효소들로 밝혀졌다.

KEY WORDS □ *Bacillus licheniformis* SSA3-2M1, peptidase, proteinases

*Bacillus*속 세균이 분비하는 protease로서는 중성 protease와 몇 종의 subtilisin 등이 잘 알려져 있다 (22-26). *Bacillus licheniformis* SSA3-2M1은 한국 재래식 간장향기와 된장향기를 생성할 뿐만 아니라 간장의 독특한 맛을 생성한다(1, 6). 한국 재래식 간장의 맛은 아미노산을 비롯한 유기산, 유리당 등 다양한 성분들의 종합적인 조화의 맛에 기인한다(3). 특히 아미노산들은 그 종류에 따라 지미(旨味), 고미(苦味), 감미(甘味) 등의 한국 재래식 간장의 중요한 맛(7, 10)을 낼 뿐만 아니라, peptides도 그 종류에 따라 다양한 맛을 낸다(11-14, 17-19). *B. licheniformis* SSA3-2M1이 분비하는 proteinase(6)와 peptidase(2)는 대두단백질로부터 아미노산 및 peptides를 생산하며 한국 재래식 간장의 맛에 관여하는 아미노산 및 peptide들의 조성에 크게 관여할 것으로 생각되어 지고 있다. 그러나 *Bacillus licheniformis* SSA3-2M1이 생산하는 proteinase의 효소학적 성질은 아직 규명되어 있지 않다.

저자들은 한국 재래식 간장의 맛 성분의 생산에 이들 효소가 어떻게 관여하는지와 그 효소들 중 한국

재래식 간장의 독특한 맛 성분 생산에 크게 관여하는 효소를 밝혀 앞으로의 균 육종에 이용하고자 한다.

**재료 및 방법****사용배지**

배지는 24시간 물에 담근 대두 100 g을 파쇄한 후 증류수 700 ml를 첨가하여 2시간 동안 끓인 다음 100 mesh 체로 여과한 액을 배지로 사용하였다.

**주효소의 조제**

본 연구실에서 분리하여 육종한 *B. licheniformis* SSA3-2M1을 대두배지에 접종, 약 10일간 진탕배양하여 6,000 × g에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 투석막(Union Carbide No. 36)을 사용하여 투석한 뒤 동결건조하여 粗酵素(crude enzyme)로 사용하였다.

**Proteinase의 역가측정**

Proteinase의 역가측정은 Theo Hofman의 방법을 변형하여 측정하였다(15). 효소의 기질로는 2% casein을 사용하였다. Casein은 soy protein 기질 보다 염농도에 따라 그 역가가 감소되는 경우를 고려하여 (27) 금속이온의 영향에 대한 역가측정은 soybean

\*Corresponding author

protein을 기질로 사용하였다. 먼저 기질용액 0.3 ml와 0.05 M sodium phosphate 완충용액(pH 7.5) 2 ml에 효소액 0.3 ml를 첨가하여 37°C 에서 30분간 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid 용액(TCA, w/v, H<sub>2</sub>O) 2 ml를 가하여 반응을 중지시킨 후 생성된 침전물을 2,000×g로 10분간 원심분리하여 상등액을 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. Proteinase의 역가는 280 nm에서 흡광도 0.1의 증가를 1 unit로 계산하였다.

**단백질 정량**

단백질 농도는 각 정제 과정별로 효소활성 부위를 모아 24시간 동안 투석한 후 동결건조하여 건조 중량을 단백질량으로 하였다.

**Peptidase의 역가측정**

Peptidase의 역가측정은 Kozo Narita 등의 방법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다(21). 즉, 효소액 0.5 ml와 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 7.0) 0.8 ml 및 기질 0.05 M glycyL-glycine 0.2 ml를 혼합하여 37°C 에서 10분간 반응시킨 다음 10% TCA 0.2 ml를 가하여 30분간 실온에서 방치한 후 반응액 0.5 ml에 1.5 % NaOH 0.5 ml를 첨가하여 산을 중화시켰다. 그리고 4 M sodium acetate 완충용액(pH 5.5) 1 ml를 첨가하여 pH를 조정하고 ninhydrin solution(methyl cellosolve에 5% ninhydrin을 녹인 용액 50 ml, Methyl cellosolve 250 ml, 그리고 0.01 M KCN 5 ml를 혼합한 용액) 1 ml를 가하여 끓는물에서 10분간 발색시킨 다음 즉시 4°C 냉각수에 10분간 방치한 후 여기에 60% ethanol 5 ml를 첨가하여 완전히 혼합한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Proteinase의 정제**

조효소 용액에 acetone을 25%(v/v)되게 가하여 단백질을 침전시킨 후 7,000×g로 원심분리하여 상등액을 취하고 여기에 acetone을 60%되게 다시 가하여 재원심분리한 후 생긴 침전물을 소량의 0.05 M sodium phosphate 완충액(pH 7.5)에 녹여 cellulose막(Union Carbide No. 36)으로 24시간 동안 투석하여 동결건조한 효소 0.5 g을 소량의 0.05 M sodium phosphate 완충액(pH 7.5)에 녹여 Sephadex G-150 column(5×60 cm)에 흡착시킨 후 0.05 M sodium phosphate 완충액(pH 7.5)으로 유출시켰다. 유출속도는 60 ml/hr로 하였으며, 10 ml씩 분획하여 효소활성과 단백질량을 측정하여 효소활성이 있는 부분을 모아 동결건조 하였다. 이를 소량의 0.05 M sodium phosphate 완충용액(pH 7.5)에 녹여 DEAE Sephadex A-50 column(2.5×50 cm)에 흡착시킨 후 0.05 M sodium phosphate 완충용액(pH 7.5)에 NaCl을 0.1 M, 0.3 M, 1 M이 되게 첨가한 용액을 300 ml씩 순차적으로 유출시켰으며, 이 때 유출속도는 20 ml/hr로 하고 10 ml씩 분획하였다.

**대두단백에 대한 작용**

대두단백질은 Sigma사제 대두분말을 120°C 에서 1 시간 동안 열처리 하여 단백질, 특히 trypsin inhibitor 등을 열변성 시킨 후 사용하였다. 각종 proteinase와

peptidase가 함유된 조효소와 상당히 정제된 proteinase I 및 peptidase가 함유된 조효소와 상당히 정제된 proteinase I 및 II를 1% 대두단백질 100 ml에 각각 140 unit씩 가하여 pH 9, 50°C 에서 반응시키면서 반응액의 맛을 관능검사하고 아미노산성 질소의 함량을(16) 조사하였다.

**Proteinase의 특성조사**

pH 안정성을 조사하기 위하여 효소용액을 pH 3-13 까지의 범위에서 각 pH별로 4°C 에서 24시간 정지한 후 37°C 에서 30분간 반응시켜 잔존 효소활성을 측정하였으며, 열안정성은 30-90°C 온도 범위에서 정제효소를 각 온도별로 30분씩 열처리한 후 37°C 에서 30분간 반응시켜 잔존 효소활성을 측정하였다.

또한 금속이온에 대한 영향은 여러 가지 금속이온들을 0.1, 0.5, 1 M씩을 각각 첨가한 상태에서 37°C 에서 30분간 반응시켜 측정하였다. 한편, K<sub>m</sub>치 측정을 위한 기질용 대두단백질은 대두분말에 물을 가해 끓인 다음 3,000×g로 10분간 원심분리하여 상등액을 모아 cellulose tube로 투석한 후 동결건조해서 제조하였다.

**결 과**

**Proteinase의 정제**

Proteinase의 정제는 조효소 용액에 acetone을 가해 단백질을 침전시킨 결과 acetone 25-50%(v/v) 범위의 침전물에서 proteinase의 역가를 확인하였으며, 비활성도는 3.5 unit이었다. 이 proteinase 분획을 동결건조한 시료를 0.01 M sodium phosphate 완충용액(pH 7.5)으로 평형시킨 Sephadex G-150에 의한 gel chromatography를 한 결과는 Fig. 1과 같다. 분획 No. 47-63 부위에서 단백질 분해효소활성이 나타났으며 비활성도는 6.0 unit이었다. 이 활성부분을 0.05 M sodium phosphate 완충용액(pH 7.5)으로 평형된

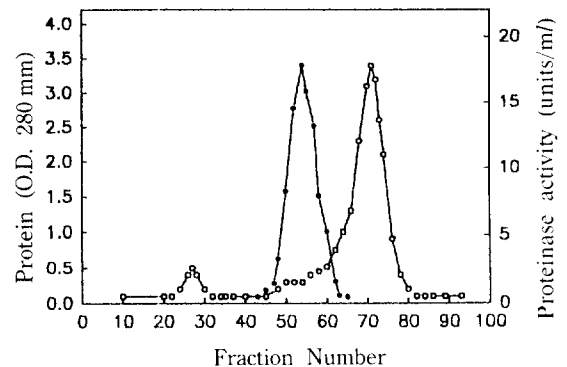
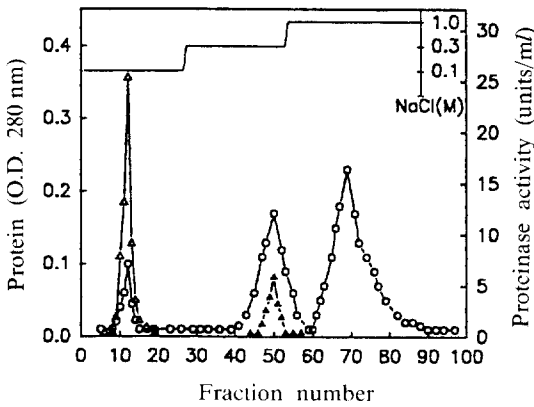
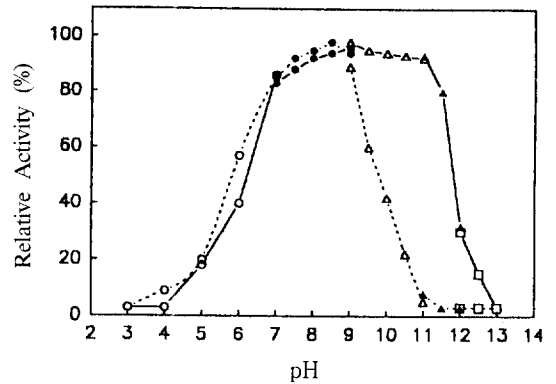


Fig. 1. Gel chromatography of proteinase by Sephadex G-150. Column size : 5×70 cm. Flow rate : 10 ml/tube/10 min. ○○: O.D. at 280 nm, ●●: Proteinase activity.



**Fig. 2.** Gel chromatography of proteinase by DEAE Sephadex A-50. Column size: 2.5×60 cm. Flow rate: 10 ml/tube/30 min. ○-○: O.D. at 280 nm, △-△: Proteinase I activity, ▲-▲: Proteinase II activity.

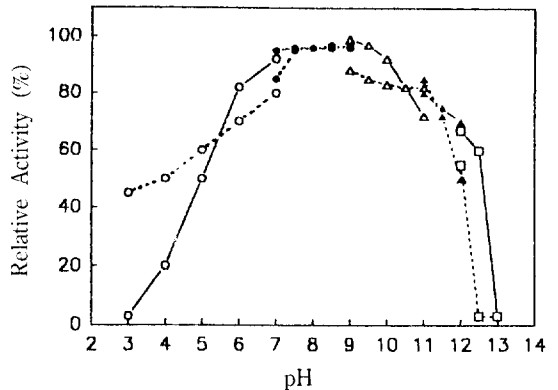


**Fig. 3.** Optimum reaction pH of the proteinase I and II. ○-○: Citrate-phosphate buffer, ●-●: Tris-HCl buffer, △-△: Sodium borate buffer, ▲-▲: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH buffer, □-□: KCl-NaOH buffer, —: proteinase I, - - -: proteinase II.

DEAE Sephadex A-50을 이용한 크로마토그래피 결과는 Fig. 2와 같다. 이 때는 0.1N NaCl 용출에 의한 분획 No. 9-15와 0.2N NaCl 용출에 의한 분획 No. 47-53 부위에서 proteinase의 활성을 확인할 수 있었다. 그래서 이들 각각 분획의 proteinase를 proteinase I 및 II로 칭하였다. Proteinase의 정제 과정별 효소역가는 Table 1에 나타난 바와 같이 단백질 mg당 효소역가는 8-9배가 증가하였으며, 또한 peptidase는 역가가 매우 낮았다.

**분리된 proteinase의 특성**

정제된 proteinase의 최적 pH를 조사한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같이 반응 최적 pH는 proteinase I이 pH 7-11.5이고 proteinase II는 pH 7-9이었다. pH 안정성을 측정된 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Proteinase I은 pH 7-11.5에서 안정한 편이었고 proteinase II는 pH 3-11에서 비교적 안정하였다. Proteinase I과 II의 최적작용 온도는 Fig. 5에 나타난 바와 같이 50°C 부근이었으며, 열안정성을 측정된 결과는 Fig. 6에 나타난 바와 같이 proteinase I은 45°C에서 60%가 실패되었으며 proteinase II는



**Fig. 4.** Effect of pH for the stability of proteinase I and II. ○-○: Citrate-phosphate buffer, ●-●: Tris-HCl buffer, △-△: Sodium borate buffer, ▲-▲: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH buffer, □-□: KCl-NaOH buffer, —: proteinase I, - - -: proteinase II.

**Table 1.** Summary of purification procedure of proteinase and peptidase.

Purification step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude enzyme - proteinase	800	6324	8750	1.403	100	1
- peptidase	800	6234	-	trace	100	1
Acetone precipitation-Pro.	50	1323	4640	3.507	53	2.5
Sephadex G-150-Pro.	140	482	2893	6.0	33	4.3
DEAE Sephadex pro. I	50	73	820	11.23	9.3	8
A-50 pro. II	60	38	480	12.63	5.4	9

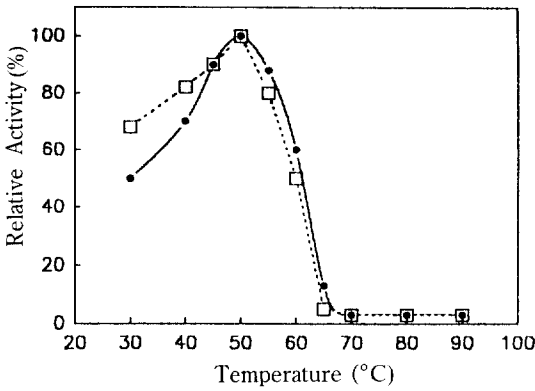


Fig. 5. Optimum reaction temperature of proteinase I and II.

●-●: proteinase I, □-□: proteinase II.

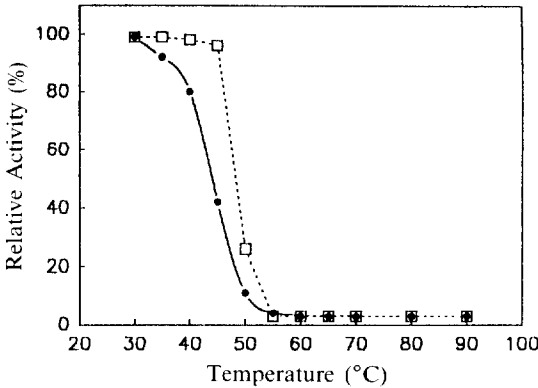


Fig. 6. Effect of temperature on the stability of proteinase I and II.

●-●: proteinase I, □-□: proteinase II.

45°C 에서 5% 가량 실패되었다.

한편, 조효소를 다양한 금속이온과 함께 반응시킨 후 효소활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 각종 금속이온의 농도 1 mM에서는 Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O 는 효소활성을 증가시켰고 ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HgSO<sub>4</sub> 등은 저하시켰으며, 5 mM 이상에서는 HgSO<sub>4</sub>와 ZnSO<sub>4</sub>가 다른 염에 비해서 특히 효소활성을 많이 저해하였다. Proteinase의 활성에 대한 NaCl의 영향은 Fig. 7과 같다. Proteinase I 및 II는 5% NaCl 농도에서는 40-50%, 20% NaCl 농도에서는 80-90% 효소활성이 저해되었다.

대두단백질에 대한 효소의 작용으로 생성하는 반응액의 맛은 Table 3과 같다. 각종 proteinase와 peptidase가 존재하고 있는 조효소로 반응한 액은 반응 30분에서 8시간 동안의 효소반응에서도 쓴맛을 나타내나 proteinase I 및 II의 반응액은 30분에서 2시간 동안 반응액에서만 쓴맛을 나타냈으며 이후의 반응시간에서는 맛을 나타내지 않았다.

Table 2. Effects of metal ions on the proteinase activity.

Reagents	Relative activity		
	1 mM	5 mM	10 mM
None	100	100	100
BaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	107	41	18
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	103	54	26
HgSO <sub>4</sub>	89	10	5
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	84	102	103
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	108	75	43
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	156	27	10
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	51	21	0
NaCl	108	101	97

The reactant were perincubated at 30°C for 30 min.

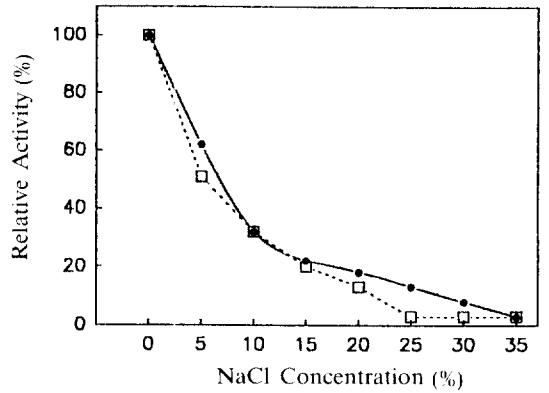


Fig. 7. Effect of NaCl concentration on the activity of proteinase I and II.

●-●: proteinase I, □-□: proteinase II.

대두단백질에 효소의 작용으로 생성한 아미노산성 질소함량은 Table 4와 같다. 조효소의 반응액은 proteinase I의 반응액에 비해 반응 초에는 아미노태 질소의 함량이 많다가 반응시간이 경과함에 따라 보다 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 반응시간이 길어짐에 따라 아미노태 질소는 전반적으로 증가하는 경향을 나타내었다.

Proteinase의 K<sub>m</sub>치는 casein을 기질로 사용하였을 경우, proteinase I은 6.89 mg/ml, proteinase II는 9 mg/ml의 K<sub>m</sub>치를 나타내었고, soy protein을 기질로 사용하였을 경우, proteinase I은 3.98 mg/ml, proteinase II는 11.44 mg/ml의 K<sub>m</sub>치를 나타내었다. 이 결과는 proteinase I이 II 보다 기질에 대한 친화력이 높은 것으로 나타났다.

### 고찰

단백질 분해효소를 생산하는 *B. licheniformis* SSA 3-2M1의 배양액으로부터 조정제한 proteinase의 회

**Table 3.** Taste of soybean protein hydrolyzate hydrolyzed by protease produced from *Bacillus* SSA3-2M1.

Reaction time (hr)	Enzyme		
	Crude enzyme	Proteinase I	Proteinase II
0	unroasted soybean and palatable	unroasted soybean and palatable	unroasted soybean and palatable
0.5	unroasted soybean and weakly bitter	unroasted soybean and weakly bitter	weakly unroasted soybean and bitter
1	unroasted soybean and weakly bitter	unroasted soybean and palatable	weakly unroasted soybean and weakly bitter
2	weakly unroasted soybean and bitter	weakly unroasted soybean and weakly bitter	weakly unroasted soybean and weakly bitter
4	weakly bitter	tasteless	tasteless
8	weakly bitter	tasteless	tasteless

**Table 4.** Amino N in soybean protein hydrolyzate hydrolyzed by proteases produced from *Bacillus* SSA3-2M1

Reaction time (hr)	Amino N (mg/100 ml)	
	Crude enzyme	Proteinase I
0.5	0.42	0.28
1	0.56	0.84
2	1.26	1.12
4	1.54	1.54
8	2.94	3.22

분을 DEAE Sephadex A-50 크로마토그래피를 이용하여 정제한 결과 서로 다른 NaCl 농도에서 용출되는 proteinase 분획을 확인할 수 있었다. 이들을 proteinase I 및 II라 칭하고 이들 분획의 proteinase의 성질을 조사하였다. 이 효소들의 최적 작용 pH는 중성 내지 알칼리성이었으며 proteinase I은 pH 4.0 이하에서는 전혀 작용을 못하며 pH 5에서는 약 20% 정도의 활성을 나타내고 있으며 pH 4에서 10%, pH 5에서 20% 정도의 활성을 나타내고 있으며 pH에 대한 안정성은 산성에 매우 강해서 pH 3에서도 40% 이상의 활성이 잔존하고 있었다. 작용온도 역시 proteinase I이 30°C에서 50%의 활성도를 나타낸 반면 proteinase II는 65% 이상을 나타내었다. 이와 같이 다른 두 분획의 proteinase의 성질은 상당한 차이가 있음을 볼 수 있다. 이것으로 *B. licheniformis* SSA3-2M1 균주의 배양물로부터 확인된 proteinase 역가는 화합한 두 종의 proteinase로부터 기인하는 것으로 사료된다.

정제효소인 proteinase I 및 II가 NaCl에 대해 크게 저해를 받으나 조효소일 때는 5 M의 NaCl 농도에서도 별 영향을 받지 않았다(6). 이들 proteinase는 peptidase의 작용 없이도 단백질을 가수분해하여 peptide와 더불어 아미노산을 생성하였다. 이와 같이

다른 두 분획의 proteinase의 성질상 상당한 차이가 있음을 볼 수 있다. 이것으로 *B. licheniformis* SSA3-2M1 균주의 배양물로부터 확인된 proteinase 역가는 화합한 두 종의 proteinase로부터 기인하는 것으로 사료된다.

일반가정에서 발효한 한국 재래식 간장의 pH가 4.3에서 7.8까지 다양하나, 우리나라의 보건사회부에서 규정하고 있는 간장의 pH는 4.0-5.5이기 때문에(9) *B. licheniformis* SSA3-2M1이 분비하는 단백질 분해효소의 성질상 이 균으로 간장을 제조할 때 기존의 방법처럼 메주나 麴(koji)을 만들어 단백질 분해효소를 먼저 분비시켜 대두의 단백질을 가수분해한 후 발효와 더불어 간장의 pH를 산성이되게 하는 방법이 적당하다고 생각된다.

그러나 새로운 제법인(4) 삶은 대두에 소금물을 가하고 이 균을 접종 배양 함으로써 직접 간장을 제조할 때는 배양초기부터 배양액의 pH를 5 이하의 산성으로 하면 단백질의 가수분해가 어려워진다고 생각된다. 이러한 경우에는 pH 5 부근에서 proteinase I 보다 II가 작용력이 강하므로 이 균에서 proteinase II의 생산력을 증가시킨다든가 산성 proteinase이면서 한국 재래식 된장의 독특한 맛을 생성할 수 있는 proteinase를 생산할 수 있게 육종할 필요가 있다.

또한 용존산소의 양에 따라 *B. licheniformis* SSA3-2M1의 배양액의 pH가 4.2-8.3까지 다양해지므로 발효할 때 이러한 성질을 이용함으로써 단백질을 용이하게 분해시키고 간장(배양물)의 pH도 산성으로서의 조정이 가능하리라 사료된다(8).

재래식 간장의 경우 peptide가 간장맛에 대한 기여에 관한 보고는 없고 단지 아미노산, 유기산, 유리당 등이 맛에 크게 기여한다고 보고된 바 있다(3). 또 *Bacillus* SSA3-2M1은 전형적 한국 재래식 간장 맛을 생성할 수 있는 균인데(6) 이 균이 생성한 proteinase로 단백질을 가수분해 하여 peptide와 아미노산을 생성하고, 생성된 peptide에 의한 효소반응 시간이 2시간 이상 경과함에 따라 苦味가 감소하는 사

실로 보아 peptide의 맛은 한국 재래식 간장의 독특한 맛을 생성하는데 크게 기여하지 못하리라 사료된다. 이와 같은 사실은 간장을 발효할 때 전형적으로 peptide만 생성하는 proteinase 보다는 아미노산도 동시에 생성할 수 있는 proteinase가 더욱 유효하며 그렇지 않을 경우 여러 종류의 peptide를 분해할 수 있는 peptidase가 필요하리라 사료된다.

한편 *Bacillus* SSA3-2M1의 배양물에는 peptide 기질을 분해하는 peptidase의 역가가 매우 낮은 점(2)과 proteinase의 역가는 높고 또한 Table 1에서와 같이 peptidase 역가가 제거된 정제 proteinase가 단백질을 아미노산까지 분해하는 점으로 미루어 보아 이 균이 생성하는 한국 재래식 간장 맛 중 아미노산에 의한 맛은 주로 proteinase에 의해 생성되리라 사료된다. *Bacillus subtilis*나 *B. licheniformis*는 호알칼리성 protease인 subtilisin을 많이 분비하며 이러한 subtilisin은 단백질을 가수분해하여 peptide 및 아미노산을 분해함이 보고된 바 있다(20).

## 사 사

본 연구는 1989년도 교육부 지원 한국학술진흥재단 학술연구조성비에 의해 수행된 일부의 연구입니다.

## 참 고 문 헌

- 권오진, 김종규, 정영건, 1986. 한국 재래식 간장 및 된장에서 분리한 세균의 특성. 한국농화학회지. **29**, 422-428.
- 김점향, 1991. *Bacillus licheniformis* SSA3-2M1이 분비하는 peptidase의 분리와 특성. 영남대학교 석사학위논문.
- 김종규, 1984. 한국 재래식 간장의 유리아미노산, 유기산 및 유리당 조성의 분석자료. 경상대농업연구소보 **18**, 85-88.
- 김종규, 특허출원번호 1990년. 새로운 색소를 생산하는 미생물 및 그의 한국 재래식 간장의 제조 및 이용. 특허출원 제 7678호.
- 김종규, 기우경, 강동학, 조용운, 1987. 한국 재래식 간장 및 된장 제조를 위한 우량변이주 개발. 한국산업미생물학회지. **15**, 21-28.
- 김종규, 김상달, 1988. 돌연변이에 의한 한국 간장균의 유전적 육종. 한국농화학회지. **31**, 346-350.
- 김종규, 정영건, 양성호, 1985. 한국 재래식 간장의 맛에 영향을 미치는 성분. 한국산업미생물학회지. **13**, 285-287.
- 김종규, 조운래, 1991. 한국 간장. 된장 제조용 *Bacillus* SSA3-2M1 및 Hybridoma ST723-F31을 이용한 간장의 발효. 학술진흥재단의 1989년도 자유공모과제 최종보고서.
- 보건사회부, 1988. 식품공전. 272.
- 양성호, 김종규, 1989. 한국 재래식 간장의 맛에 영향을 미치는 인자 분석. 신일전문대학 논문집. **3**, 524-534.
- Clegg, K.M. and C.L. Lim, 1974. The structure of a bitter peptide derived from casein by digestion with papain. *J. Dairy Sci.* **41**, 183.
- Fujimaki, M., H. Kato, S. Arai and E. Tamaki, 1968. Proteolytic enzyme treatment of soybean protein and its effect on the flavor. *Food Technol.* **22**, 889.
- Hamiton, J.S., R.D. Hill and H. van leeuwen, 1974. A bitter peptide from Cheddar cheese. *Agric. Biol. Chem.* **38**, 375.
- Hill, R.D. and H. van leeuwen, 1974. Bitter peptides from hydrolysed casein coprecipitate. *Aust. J. Dairy Technol.* **19**, 32.
- Hofmann, T., 1976. Penicillopepsin. In *Method in Enzymology* Vol. XLV (by Laszlo Lorand), pp. 434-452, Academic press. New York Sanfrancisco London.
- Horwitz, W., 1980. Method of analysis of the AOAC. pp. 381, George Banta Compa., Vol. 30, Washington DC.
- Matoba, T. and T. Hata, 1972. Relationship between bitterness of peptides and their chemical structures. *Agric. Biol. Chem.* **36**, 1423.
- Matoba, T., R. Hayashi and T. Hata, 1970. Isolation of bitter peptides from tryptic hydrolyzate of casein and their chemical structure. *Agric. Biol. Chem.* **34**, 1235.
- Minamiura, N., Y. Matsumura, J. Fukumoto and T. Yamamoto, 1972. Bitter peptides in cow milk casein digests with bacterial proteinases. *Agric. Biol. Chem.* **36**, 588.
- Okunuki, K., H. Matsubara, S. Nishimura and B. Hagihara, 1956. Specificity of crystalline bacterial proteinase. *J. Biochem.* **43**, 857.
- Tsumasawa, S. and K. Narita, 1976. Acylamino Acid-releasing Enzyme from Rat Liver. In *Method in Enzymology* Vol. XLV (by Laszlo Lorand), pp. 552-561, Academic press. New York Sanfrancisco London.
- 鶴大典, 1991. *Bacillus*屬 細菌の分泌するプロテアーゼの比較生化学. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* **65**, 50-55.
- 村尾澤夫, 1991. *Bacillus*屬 細菌の菌體內プロテアーゼの特性と生理的意義. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* **65**, 56-59.
- 芳本忠, 1991. *Bacillus*屬 細菌の生産するエキソペプチダーゼ. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* **65**, 60-62.
- 高木博史, 1991. サチライシシ (subtilisin)의蛋白質工學. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* **65**, 63-67.
- 小巻利章, 1991. 細菌プロテアーゼの利用とその問題點. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* **65**, 68-70.
- 門倉清, 1992. 醬油醸造と食鹽. *Nippon Jozokyo Kaishi.* **5**, 321.

(Received April 21, 1992)

(Accepted May, 28, 1992)

---

**ABSTRACT: Proteinases Produced by *Bacillus licheniformis* SSA3-2M1**

**Chang, Young-Chae, Kyeong-Hyeong Lee, Soung-Young Kim<sup>1</sup>, Youl-Lae Jo and Jong-Kyu Kim** (Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea, <sup>1</sup>Department of Food Science and Technology Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea)

*Bacillus licheniformis* SSA3-2M1 which is responsible for the special taste of traditional Korean soy sause produced two kinds of proteinase. The activity of the proteinase I was higher about two fold than that of proteinase II. The optimal reaction pH of proteinase I and II were found to be 7-11.5 and 7-9, respectively. Proteinase II was more stable and active than proteinase I at pH ranges around 3 to 5. The optimal temperature of proteinase I and II were 50°C. The temperature stability of proteinase II was more stable than proteinase I at temperature range around 30-45°C. Activities of proteinase I and II gradually declined above 30°C and 45°C, respectively. Proteinase I was more active than proteinase II at salt concentration range around 25-35%. The  $K_m$  values of casein and soy protein for proteinase I were 6.89 mg/ml and 3.98 mg/ml. In case of proteinase II, they were 9.00 mg/ml and 11.44 mg/ml, respectively. The activity of the crude enzyme was increased by 1 mM  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  but was decreased by 5 mM and 10 mM of  $\text{HgSO}_4$  and  $\text{ZnSO}_4$ . The two proteinases produced amino acids and peptides from the soybean protein. The peptides were digested into amino acids. Both proteinases were found to be the main enzymes that produced amino acids which make the main taste of traditional Korean soy sause.