

한국재래간장으로 부터 분리한 *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118이 생성하는 protease의 특성 및 작용양상

최 청* · 최광수 · 조영제¹ · 임성일 · 이선호 · 손준호 · 최희진 · 이희덕

*영남대학교 식품가공학과, ¹상주산업대학교 식품공학과

초록 : 한국재래간장으로 부터 분리한 *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118가 생성하는 protease 생산 최적조건은 2% soluble starch, 0.2% yeast extract, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.2% MgSO₄, pH 7.5, 35°C에서 20시간이었다. 효소의 최적작용 pH와 온도는 pH 9.0, 50°C였으며, pH 6.0~11.0의 범위와 40°C이하에서 안정하였다. 금속이온중 Cu²⁺에 의하여 활성이 증대되었으나 Hg²⁺ 등에 의하여 효소활성이 저해되었다. Phenylmethylsulfonyl fluoride, ethylenediaminetetraacetic acid 처리에 의해 활성이 저해되어 금속이온의 영향을 받는 serine protease로 확인되었다. Km값은 1.899×10⁻⁴M, V_{max}값은 34.36 μg/min이었으며, hemoglobin보다 casein을 더 잘 가수분해하였다.(1996년 9월 20일 접수, 1996년 10월 18일 수리)

서 론

단백질 및 peptide를 가수분해시키는 protease는 물리, 화학적인 가수분해에 비해 부가반응이 없고 촉매 활성이 크기 때문에 에너지 소모가 적고 가공 후에 제거할 필요가 없어 이용도가 급격히 증가하고 있다. Protease는 조미료제조, 식육의 연화, 맥주, 청주의 혼탁방지, 치즈숙성, 소포제, 소염진통제, 피혁가공, 세제용 등 다방면으로 이용되고 있으며^{1,2)} 제조산업분야에서 그 요구가 더해 가고 있어서 높은 시장성을 점유하고 있는 실정이다.³⁾ 이러한 protease 중 하천 오염에 의한 환경오염에 대비한 세제용으로 개발되고 있는 alkaline protease는 활성 중심에 serine 잔기를 포함하고 있어서 diisopropyl fluorophosphate (DFP)나 phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) 등 serine과 특이적으로 반응하는 물질에 의해 쉽게 활성을 잃는 serine protease로 알려져 있다.^{4,5)} *Bacillus* sp.이 생산하는 alkaline protease는 여러 연구자에 의해 연구⁶⁻⁸⁾ 보고한 바 있으나 같은 *Bacillus* sp.의 protease라도 효소단백질의 본능이 다르다.⁹⁻¹³⁾ 그러므로 환경오염방지의 차원에서 보다 강력하고 안정성이 우수한 효소세제자원의 개발은 계속 추진되어야만 하는 실정이고 이의 실용화 단계에 까지 연구는 진전되어야 한다고 생각된다.

따라서 본연구자들은 산업화에 유리한 강력한 alkaline protease를 생산하는 균주 개발의 일환으로 한국 재래간장에서 protease 활성이 강한 균주를 분리하고 그 균주가 생성하는 효소의 특성과 작용양상을 규명하였다.

재료 및 방법

찾는말 : *Bacillus subtilis globigii*, protease, soy sauce
*연락처자

공시균주

한국 재래 간장에서 protease 활성이 높은 1균주를 선발하여 미국 Analytical Services Inc. 의뢰하여 동정한 *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118을 사용하였다.

효소 생산 조건

효소 생산에 미치는 배지의 조성을 조사하기 위하여 탄소원, 유기질소원, 무기질소원, 무기염류, 초기 pH, 온도를 조사하였다. 먼저 탄소원은 기본배지(0.2% NH₄NO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.01% yeast extract)에 각 탄소원을 2%되게 조정하여 35°C에서 14시간 배양한 후 protease 활성을 측정하였으며, 유기질소원은 0.2%, 무기질소원은 0.1%, 무기염류는 0.2% 되도록 조정하여 위와 같은 방법으로 측정하였다. 초기 pH는 5~9, 배양온도는 25~45°C 범위에서 효소생산용 배지(0.2% soytone, 2% starch, 0.2% (NH₄)₂S₂O₈, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.1% yeast extract)에서 실시하였다.

효소생산을 위한 배지 및 배양방법

Nutrient broth에서 예비배양한 후 효소생산용 배지(0.2% soytone, 2% starch, 0.2% (NH₄)₂S₂O₈, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.1% yeast extract)에 1% 되게 접종하여 24시간 배양하여 조효소액으로 사용하였다.

부분정제효소의 조제

배양된 배지를 원심분리하여 상침액을 조효소액으로 사

용하고, 조효소액에 황산암모늄을 70% 포화되게 가하고 4°C에서 12시간 방치하여 효소단백질을 응집, 침전시켰다. 침전된 효소단백질은 원심분리하여 회수하였고, 반투막에 넣어 0.2 M boric acid borax buffer (pH 9.0)안에서 24시간 동안 투석하였다. 투석 후 동결건조하여 농축하고, Sephadex G-25에 통과시켜 저분자의 불순물질을 제거한 뒤 부분 정제효소로 사용하였다.

효소활성 측정법

효소활성은 Anson-Hakihara의 방법¹⁴⁾을 이용하여 측정하였다. 효소액 0.5 ml에 0.2 M boric acid-borax buffer (pH 9.0) 1 ml를 가한 다음 기질용액(0.6% Harm-marstein milk casein, pH 9.0) 2.5 ml를 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.44M trichloroacetic acid 2.5ml를 넣어 반응을 중지시키고 실온에서 10분간 방치한 다음 여과하여 얻은 여액 1 ml에 0.55 M Na₂CO₃ 용액 10 ml와 1 ml의 Folin-ciocalteu용액을 넣어 37°C에서 30분간 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소단위는 효소액 1 ml가 1분간 1 µg의 tyrosine을 생성하는 것으로 정하였다.

단백질의 정량

Lowry 등의 방법¹⁵⁾에 따라 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 단백질량을 측정하였다.

기질특이성

본 효소의 기질에 대한 특이성을 알아보기 위하여 각 0.6%의 casein과 hemoglobin을 제조하여 시간별 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소생성을 위한 최적 조건

(1) 배양온도 및 pH의 영향

Bacillus subtilis globigii CCKS-118의 alkaline protease 생산을 위한 최적배양온도와 최적배양 pH를 조사한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 pH 7.5와 35°C에서 최대의 생산을 보였는데 이는 *Bacillus* 속의 alkaline protease가 pH 7.5와 35°C에서 최대활성을 보였다는 이 등²¹⁾의 보고와 유사하였다.

(2) 배양시간의 영향

배양시간의 영향을 볼때 20시간 배양시 효소생성이 최대에 달하였으며 황¹²⁾은 *Bacillus* 속 유래의 alkaline protease가 24시간 배양시 최대 활성을 나타내었다는 보고와 유사하였다.

(3) 탄소원의 영향

효소의 생성에 미치는 탄소원의 영향을 알아보기 위하여 각 탄소원을 2%되게 첨가하고 배양시킨 결과 Table 1에서와 같이 soluble starch 첨가시에 약 256% 정도의 활성증가가 있었으며 다른 탄소원에서는 활성 증가 작용이 나타나

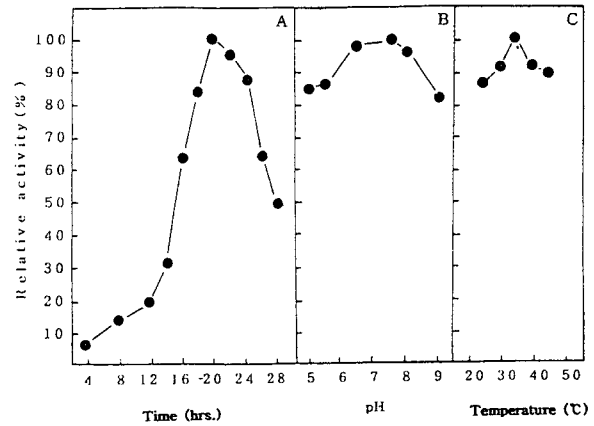


Fig. 1. Effect of incubation time (A), initial pH (B) and incubation temperature (C) on the production of protease from *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118.

Table 1. Effect of various sources on the production of protease from *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118

Source	Component	Relative activity (%)
Control	none	100.0
Carbon(2 %, W/V)	glucose	81.4
	soluble starch	256.5
	fructose	97.7
	maltose	102.3
	sucrose	115.1
	lactose	79.1
	xylose	100.0
	galactose	94.2
Organic nitrogen (0.2 %, w/v)	yeast extract	244.0
	casein	132.0
	tryptophan	129.3
	peptone	206.7
	skim milk	106.7
	soytone	134.7
Inorganic nitrogen (0.1 %, w/v)	(NH ₄) ₂ SO ₄	160.0
	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	108.8
	NH ₄ NO ₃	78.8
	NaNO ₂	61.2

지 않았다.

(4) 유기질소원의 영향

배지에 유기질소원을 첨가하였을 때 효소생산에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 각종 유기질소원을 각 0.2%씩 배지에 첨가하여 35°C에서 1일간 배양한 결과 Table 1과 같이 yeast extract가 가장 효과적이었다.

(5) 무기질소원의 영향

무기질소원을 배지에 첨가하였을 때 효소생산에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 각종의 무기질소원을 0.1% 농도로 첨가하여 35°C에서 1일간 배양한 결과 Table 1과 같이 (NH₄)₂SO₄가 가장 효과적이었다.

(6) 무기염류의 영향

각종 무기염류를 배지에 각 0.2%농도로 첨가하고 35°C에서 1일간 배양시킨 결과 Table 1에서와 같이 MgSO₄가 가장 효과적이었다. 이는 이 등²¹⁾이 *Bacillus* 속의 alkaline protease가 MgSO₄에 의해 최대활성을 나타낸다고 보고하였으며 본 실험결과와 유사하였다.

부분정제 효소의 비활성역가

공시균을 최적 배양조건에서 배양한 후 원심분리하여 균체를 제거하고 상정액에 황산암모늄을 70% 포화되게 가하여 효소단백질을 응집, 침전시켜 얻은 효소단백질은 회수하여 투석하였다. 투석 후 농축하고, Sephadex G-25에 통과시켜 저분자의 불순물질을 제거한 효소의 단백질양과 효소활성을 측정된 결과, 단백질량은 1920 mg이었고 효소활성은 5666 unit로서 비활성역가가 3.0 unit/mg이었다. 황¹²⁾과 이 등¹¹⁾은 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus sp.*의 protease 비활성역가가 각각 1.38과 0.157 unit/mg이라고 보고하였으며 본 균주의 활성이 2배 이상 높았다.

효소의 특성

(1) 효소작용의 최적 pH

pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 0.2 M Britton-Robinson buffer (pH 3~12)를 사용하여 완충용액 1 ml에 기질 2.5 ml를 혼합한 다음 효소 0.5 ml를 가하여 30°C에서 1시간 방치한 후 효소활성을 측정 한 결과 Fig. 2와 같이 효소의 최적 pH는 9.0이었다. Tsuru 등⁷⁾, 문 등¹⁶⁾, 김 등¹⁰⁾, 황¹²⁾은 *Bacillus sp.*의 alkaline protease의 최적 pH가 10.0 부근이라고 보고 하였으며, 본 균주의 효소는 이들 효소보다는 약알칼리성에서 최적 pH를 나타내었다.

(2) pH 안정성

본 효소의 pH 안정성을 조사하기 위하여 0.2 M Britton-Robinson buffer (pH 3~12)를 사용하여 각 pH의 buffer 1 ml에 효소 0.5 ml를 가한 다음 30°C에서 1시간 방치한 다음 최적 pH인 9.0으로 조절하고 잔존활성을 측정된 결과 Fig. 3과 같이 pH 6~9까지 안정한 것으로 나타났다. 안

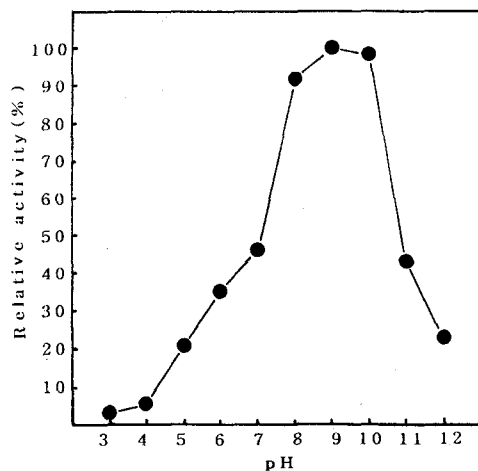


Fig. 2. Effect of pH on the activity of protease from *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118.

등¹³⁾, 장 등⁹⁾, 문 등¹⁶⁾은 *Bacillus subtilis*의 protease의 pH 안정성이 6~12까지이고 오 등⁷⁾은 7~11까지라고 보고한 것에 비해 본 효소의 안정범위는 다소 좁은 편이었다.

(3) 효소작용의 최적온도

효소활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 효소액 0.5 ml에 기질용액 2.5 ml와 1 ml의 boric acid borax buffer (pH 9.0)를 혼합하여 20~80°C로 반응온도를 변화시키면서 활성을 측정된 결과는 Fig. 4와 같이 50°C에서 최대활성을 보였으나 60°C 이상에서는 급격한 효소활성의 감소가 발생하였다. 안 등¹³⁾, 이 등¹¹⁾, Tsuru 등⁷⁾, 오 등¹⁷⁾은 *Bacillus sp.*의 최적 온도가 55°C 라고 보고한 것보다 다소 낮았으나 황¹²⁾이 보고한 40°C 보다는 높은 온도 에서 최대 활성을 나타내었다. 최적반응온도가 비교적 낮다는 것은 효소반응시 많은 에너지 공급 없이도 반응이 잘 일어난다는 점에서 유리하리라 생각된다.

(4) 열에 대한 안정성

본 효소의 열안정성을 조사하기 위하여 20~80°C 범위에서 0.5 ml의 효소와 1 ml의 boric acid borax buffer (pH 9.0)를 혼합하여 각 온도에서 1시간 동안 전처리 시킨 후

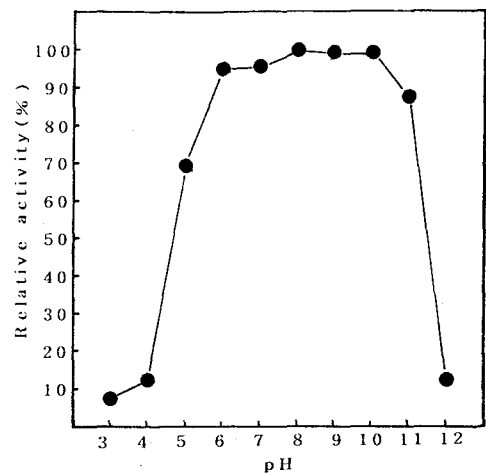


Fig. 3. pH stability of protease from *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118.

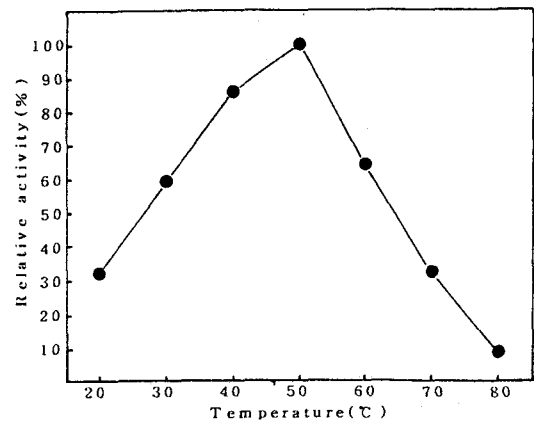


Fig. 4. Effect of temperature on the activity of protease from *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118.

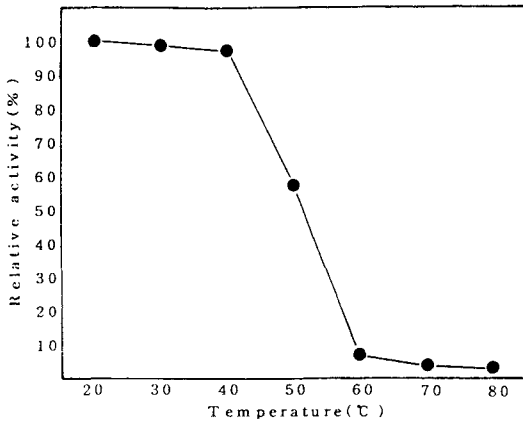


Fig. 5. Temperature stability of protease from *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118.

Table 2. Effect of metal ions on the activity of protease from *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118

Ion	Metal	Relative activity (%)
Control	-	100
Ca ²⁺	CaCl ₂	104
Pb ²⁺	Pb(CH ₃ COO) ₂	103
K ⁺	K ₂ CO ₃	111
Ag ⁺	AgNO ₃	100
Zn ²⁺	ZnSO ₄	100
Hg ²⁺	HgCl ₂	59
Cu ²⁺	CuSO ₄	128
Ba ²⁺	BaCl ₂	100
Mn ²⁺	MnSO ₄	104
Mg ²⁺	MgSO ₄	98
Fe ²⁺	FeSO ₄	100

The reaction mixture, consisted of 0.25 ml enzyme solution and 0.25 ml metal ion solution ($2 \times 10^{-3}M$), was incubated for 30 min. at 30°C and the residual activities were assayed.

최적온도인 50°C에서 30분간 안정화 시킨 다음 잔존활성을 조사한 결과 Fig. 5와 같이 40°C까지는 급격한 감소는 없었으나 50°C에서 부터 급격한 실활을 보여 열에는 상당히 불안정한 것으로 판단되었다. 이는 Tsuru 등⁷⁾, 오 등¹⁷⁾, 김 등¹⁰⁾, 황¹²⁾이 *Bacillus sp.*의 alkaline protease의 열 안정성이 40~45°C 정도라고 보고한 것과 유사하였다.

(5) 금속이온의 영향

본 효소에 미치는 금속이온의 영향을 조사하기 위하여 각종 금속염을 각각 $2 \times 10^{-3}M$ 되게 pH 9.0의 증류수에 녹이고 금속이온용액 0.5 ml와 효소액 0.5 ml를 섞어 30°C에서 60분간 방치한 다음 효소활성을 측정 한 결과 Table 2와 같이 Cu²⁺과 Hg²⁺에 의해서만 각각 128%와 41%의 활성증감이 관찰 되어 이 효소는 금속이온에 의해서는 크게 영향을 받지않는 것으로 판단되었다. Tsuru 등⁷⁾, 장 등⁹⁾, 김 등¹⁸⁾, 황¹²⁾은 alkaline protease가 Hg²⁺에 의해 효소활성이 저해된다고 하였으며 김 등¹⁰⁾은 Cu²⁺에 의해서 활성이 증대된다고 보고한 것과 유사하였다.

효소의 작용양상

Table 3. Effect of various inhibitors on the protease from *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118

Reagent	Relative activity (%)
Control	100.0
Ethylendiaminetetraacetic acid	49.9
ε-Aminocaproic acid	93.8
H ₂ O ₂	87.4
Sodium citrate	94.7
Phenyl hydrazine	58.0
2,4-Dinitrophenol	102.6
Iodine	76.1
ρ Chloromercuribenzoic acid	84.1
Phenylmethanesulfonyl fluoride	8.3

The reaction mixture, consisted of 0.5 ml enzyme solution and 0.5 ml inhibitor solution (2 mM), was incubated for 30 min. at 30°C and the residual activities were assayed.

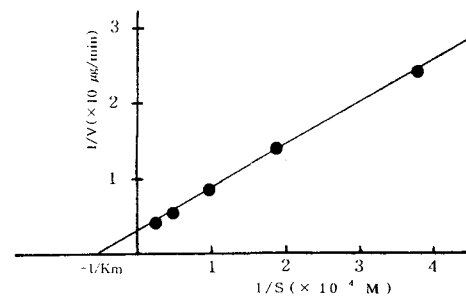


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot for hydrolysis of casein by protease from *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118.

(1) 저해제의 영향

효소활성에 영향을 미치는 화학적 저해제 중 ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), ε-aminocaproic acid, H₂O₂, sodium citrate, phenyl hydrazine, 2,4-dinitrophenol(2,4-DNP), iodine, ρ-chloromercuribenzoic acid (PCMB), phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF)를 선정하여 *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118의 protease 활성에 미치는 영향을 검토하였다. Table 3에서 보는바와 같이 serine에 특이적 저해를 일으키는 PMSF에 의해 현저한 저해를 보였으며 EDTA에 의해서도 상당한 활성저해가 관찰되어 이 효소는 효소활성부위에 serine잔기를 가지는 serine protease로 추정되며 금속이온도 활성부위에서 효소활성에 관여하는 것으로 판단되었다.

(2) 효소반응속도론

기질농도와 효소활성과의 관계를 검토하기 위하여 Hammarstein milk casein을 $1.0 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-4}M$ 로 기질농도를 달리하였을 때 효소 활성의 변화를 측정 한 후 Lineweaver-Burk plotting한 결과 Fig. 6에서와 같이 Km값이 $1.242 \times 10^{-4}M$, V_{max}값은 25.99 μg/min이었다.

(3) 기질에 대한 특이성

본 효소의 기질에 대한 특이성은 Fig. 7에서와 같이 기질로써 hemoglobin보다 casein을 더 잘 가수분해하였다. 이는 최 등¹⁹⁾이 *Streptomyces griseus*의 protease와 차 등²⁰⁾이 *Aspergillus fumigatus*의 alkaline protease가 hemoglobin보다

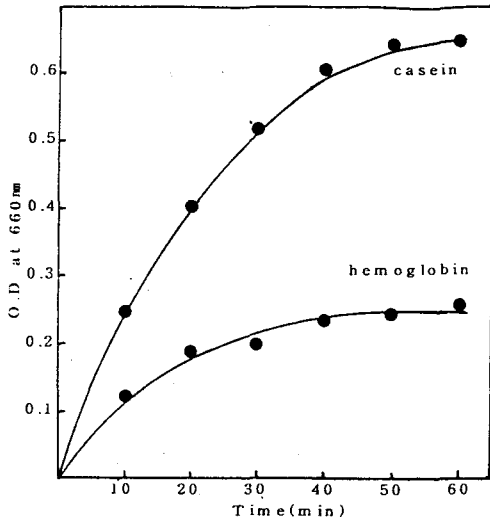


Fig. 7. Hydrolysis of casein and hemoglobin by protease from *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118.

casein에 기질특이성을 가진다고 보고한 것과 유사하였다.

감사의 글

본 연구는 1995년도 과학기술처 선도기술과제 연구비에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 이에 깊이 감사드립니다.

참고 문헌

1. 檜垣寅雄 (1985) 酵素利用技術の新展開, CMC Co. Tokyo.
2. Gadbrey, T. and Reichett, J. (1983) Industrial Enzymology The application of enzyme in industry. The nature Press Co.
3. 鶴大典 (1969) 科學と工業, pp.43.
4. Ward, O. P. (1985) Proteolytic Enzymes. in Comprehensive Biotechnology 1st ed. by M.Y. Murray, Pergamon press, 789.
5. Johansen, J. T., Otteson, M., Svendsen, I. and Wybrant, G. (1968) Degradation of the B-chain of oxidized insulin by two subtilisins and their succinylated and N-carbamylated derivatives. Calsberg Res. Commun., **36**, 365.
6. Ichishima, E., Takada, V., Taira, K. and Takeuchi, M. (1986) Specific of extracellular and ribosomal serine proteinases from *Bacillus natto*. a food microorganism. Biochemica et Biophysica. Acta., **896**, 178
7. Tsura, D., Heizokira, K. and Yamamoto, T. (1966) Studies on bacterial proteinase part 16. purification. Cry-stalization and some enzymatic properties of alkaline protease of *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*. Agr. Biol. Chem., **30**, 1261.
8. Makio, K. and Koki, H. (1976) Alkaline proteinase production from methyl acetate by alkalophilic *Bacillus* sp. J. Ferment. Technol., **54**, 6, 383.
9. 장신제, 김윤숙, 성하진, 최용준, 양한철 (1988) *Bacillus subtilis*가 생산하는 alkaline protease에 관한 연구. 한국농화학회지, **31**, 356.
10. 김태호, 박성희, 이동선, 권택규, 김종국, 홍순덕 (1990) 호알칼리성 *Bacillus*속 균주가 생산하는 alkaline protease의 특성. 한국산업미생물학회지, **18**, 159.
11. 이병우, 유영선, 임근형, 최준연 (1991) *Bacillus* sp. LY-353이 생산하는 protease의 정제 및 특성. J. Korean Soc. Food Nutr., **20**(1), 21.
12. 황세영 (1995) *Bacillus* sp. KUN-17 균주가 생산하는 균체의 serine protease의 정제 및 특성. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **23**(1), 53.
13. 안장우, 오태광, 박용하, 박관화 (1990) *Bacillus* sp.가 생산하는 호알칼리성 protease의 부분정제 및 특성. Kor. J. Appl. Microbiol., **18**(4), 344.
14. Haginhara, B. (1956) 酵素研究法. vol. II (朝昌書店:東京), **1**, 237.
15. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L. A. and R. J. Randal, (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265.
16. Moon, S. Y., Oh, T. K. and Rho, H. M. (1994) Purification and characterization of an extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* RM615. Korea Biochem. J. **27**(4), 323.
17. Oh, S. H. and Oh, P. S. (1991) Screening of *Bacillus* sp. M-71 with high alkaline protease productivity and some properties of the enzyme. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **19**(1), 1.
18. 김형권, 김기현, 이정기, 김영옥, 남희섭, 오태광 (1995) 고온성 *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4가 생산하는 내열성 protease의 특성. 한국산업미생물학회지, **23**(3), 322.
19. 최청, 정영건, 성삼경, 최광수, 이재성, 조영제, 천성숙 (1992) *Streptomyces griseus* HC-1141이 생성하는 alkaline protease의 특성 및 작용양상. 한국산업 미생물학회지, **20**(3), 295.
20. 차원섭, 최청 (1989) *Aspergillus fumigatus*가 생산하는 alkaline protease의 특성과 작용양상. 한국식량영양학회지, **18**(3), 348.
21. 이우제, 조영제, 손규목, 최청 (1991) *Bacillus* sp. CW-1121이 생성하는 alkaline protease의 특성 및 작용양상. 한국생화학학회지, **24**(6), 537.

Characteristics and Action Pattern of Protease from *Bacillus Subtilis Globigii* CCKS-118 in Korean Traditional Soy Sauce

Cheong Choi*, Kwang-Soo Choi, Young-Je Cho¹, Sung-Il Lim, Seon-Ho Lee, Jun-Ho Son, Hee-Jin Choi and Hee-Duck Lee (**Dep. of Food Science & Technology, Yeungnam University, Gyungsan 712-749, Korea*; ¹*Dep. of Food Engineering, Sangju Polytechnic University, Sangju 742-170, Korea*)

Abstract : The production of bacterial protease and its characteristics were investigated with *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118 which was isolated from Korean traditional soy sauce. The optimum culture condition of the strain for the production of alkaline protease was as follow : 2% soluble starch, 0.2% yeast extract, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.2% MgSO₄, pH 7.5, 35°C and 20h rs. The optimum pH and temperature for the enzyme action of alkaline protease producing *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118 were pH 9.0 and 50°C, respectively. The enzyme was relatively stable at pH 6.0~9.0 and at temperature below 40°C. The activity of the enzyme was inhibited by Hg²⁺ whereas Cu²⁺ gave rather activating effects on the enzyme activity. The enzyme was inhibited by phenylmethane-sulfonyl fluoride indicating serine protease metal ion group are required for the enzyme activity. Km value was 1.242×10⁻⁴M, V_{max} value was 25.99 µg/min. This enzyme hydrolyzed casein more rapidly than the hemoglobin.

*Corresponding author