

한국재래간장으로 부터 분리한 *Bacillus subtilis* CCKS-1110이 생성하는 Protease의 분리 및 정제

최 청* · 김 성 · 임성일¹ · 이희덕 · 이선호 · 손준호 · 최희진 · 김영활²

*영남대학교 식품가공학과, ¹한국식품개발연구원 생물공학연구부, ²대구보건전문대학 임상병리과

초록 : 한국재래간장으로 부터 분리한 *Bacillus subtilis* CCKS-111이 생성하는 protease를 분리 정제하였다. 황산 암모늄 염석, DEAE cellulose ion-exchange chromatography, Sephadex G-100 및 HPLC를 이용한 겔여과법에 의해 비활성도 24.3 unit/mg, 정제배수 50.6배로 효소를 정제하였으며 high performance liquid chromatography (HPLC)에 의하여 단일 단백질임을 확인하였다. 정제효소의 분자량은 HPLC에 의하여 분자량 28,000 정도의 monomer로 추정되었고, 본 효소의 아미노산 잔기수는 251.3으로, 분해되기 쉬운 threonine, serine, glycine을 제외한 아미노산 잔기수는 *Bacillus subtilis* subtilisin DY 잔기수(274)와 유사한 것으로 나타났다. 아미노산 조성은 alanine, serine, glycine 및 arginine의 함량이 많았다. Reverse phase (RP)-HPLC로 분리한 주 peak로 N-말단에서 32번 까지 아미노산 배열을 확인한 결과 *Bacillus subtilis* subtilisin DY와 동일하였다.(1997년 1월 16일 접수, 1997년 3월 28일 수리)

서 론

한국 전통간장 덧발효와 숙성시 단백질 분해력은 메주 미생물의 대부분을 구성하는 *Bacillus*속 유래의 세균류¹⁻⁷⁾와 곰팡이⁸⁻¹²⁾가 분비하는 protease가 제품특성에 깊이 관여한다고 알려져 있으며, 같은 *Bacillus*속의 protease라도 효소단백질의 특성이 다양하다는 것이 보고되었다.¹³⁻¹⁵⁾

장 등¹⁶⁾은 간장의 맛 성분 중 아미노산이 맛의 주체를 이루는데 이 아미노산은 대두 중 단백질이 *B. licheniformis*의 neutral proteinase에 의해 주로 분해되어 생성된다고 하였고 Iwasaki 등¹⁷⁻²¹⁾은 일본식 간장에서 발효미생물중 국균은 *Aspergillus oryzae*와 *A. sojae*, 젖산균은 *Pediococcus halophilus*, 알콜발효 및 향기생성균으로 *Zygasaccharomyces rouxii*를 고정화하여 발효함으로써 발효기간을 단축하였을 뿐만 아니라 맛과 향이 우수한 제품을 얻을 수 있었다고 하였다.

최 등²²⁻²⁴⁾은 간장에서 분리한 *Bacillus*속의 각종 생육 특성과 효소적 양상의 결과를 보고 하였으나, 내염성을 가지며 색소를 형성하고 protease활성이 높고 전통재래간장의 제조 조건에 부합되는 특성을 가진 우수균주의 개발분야는 미진하여 이 분야의 연구가 더욱 절실히 요구되고 있는 바이다.

그러므로, 본 연구에서는 전통간장 제조법을 가정에서 자연접종에 의하여 메주를 만드는 대신 순수 분리한 간장 미생물을 발효조에서 starter culture로 배양하여 단기간에 대량 배양하고 발효시키는 방법을 사용함으로써 간장 발효 숙성기간의 단축, 품질의 고급화 및 균일화가 가능한 표준발효장치와 공정을 개발하고자 한다. 따라서 우리기호에 맞는 전통

간장을 산업적으로 대량 제조하기 위하여 전통간장 제조조건에 적합하게 단백질분해활성이 강한 *Bacillus subtilis* CCKS-111가 생성하는 protease를 분리 정제하였다.

재료 및 방법

공시균주

한국 재래 간장에서 protease 활성이 높은 1균주를 선발하여 미국 Analytical services Inc.에 의뢰하여 동정한 *Bacillus subtilis* CCKS-111²⁵⁾(이하 BSC)을 사용하였다.

효소 생산을 위한 배지 및 배양방법

Nutrient broth에서 예비배양한 후 효소생산용 최적배지²⁶⁾에 1% 되게 접종하고 35°C에서 24시간 배양하여 원심분리한 후 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

효소활성 측정법

효소활성은 Hakiara의 방법²⁷⁾을 이용하여 측정하였다. 효소액 0.5 ml에 0.2 M boric acid-borax buffer (pH 9.0) 1 ml를 가한 다음 기질용액(0.6% Harmmarstein milk casein, pH 9.0) 2.5 ml를 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.44 M trichloroacetic acid 2.5 ml를 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.

찾는말 : *Bacillus subtilis*, protease, soy sauce

*연락처자

단백질의 정량

Lowry 등의 방법²⁸⁾에 따라 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 단백질량을 측정하였다.

효소의 정제

BSC가 생성하는 protease의 정제는 조효소액을 황산 암모늄으로 70% 포화되게 염석한 후, 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 투석한 다음 저온실에서 DEAE-cellulose를 사용하여 이온 교환 크로마토그래피를 한 다음 동일 완충액으로 Sephadex G-100 칼럼을 사용하여 두 차례 gel filtration하였다(Fig. 1).

High performance liquid chromatography (HPLC)에 의한 protease분리

Sephadex G-100 칼럼으로 분리한 활성단백을 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 용해시켜 TSK-gel (7.8 mm × 30 cm)를 이용한 gel filtration HPLC (유속 0.8 ml/min)로 전개하였다. 이때 활성단백질 분획물은 3차 증류수로 투석한 후 동결건조하여 -80°C에서 보존하였다.

분자량 측정

BSC가 생성하는 protease의 분자량측정은 전 등²⁹⁾의 방법에 의하여 HPLC에 의하여 실시하였다. 정제된 효소를 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 용해하여 분당 0.8 ml의 속도로 전개시켰다. Gel filtration한 후 retention time값에 따라 표준곡선을 이용하여 분자량을 측정하였고, 이때 표준품으로는 phosphorylase B (M.W.: 97,400), bovine serum albumin (M.W.: 66,000), ovalbumin (M.W.: 45,000), carbonic anhydrase (M.W.: 30,000), soybean trypsin inhibitor (M.W.: 20,000) egg lysozyme (M.W.: 14,400)을 사용하였다.

Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

효소정제품을 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)로 용해시킨 다음 RP-HPLC를 행하였다. 이 때 전개방법은 0.1% TFA로 평균화 시킨 C₄ μBondasphere column (3.9 mm × 150 mm)를 이용하여 함수유기용매 [2-propanol : acetonitrile=7 : 3 (v/v), 0.08% TFA중]로 0.8 ml/min의 유속으로 0~60%까지의 직선농도구배로 전개하였다.

아미노산 조성 분석

일정량의 시료에 2회 증류한 6 N HCl (2% phenol함유) 용액을 가하고 질소가스를 충전, 밀봉하여 110°C에서 24 시간 동안 가수분해 시킨 다음 감압 농축하여 HCl을 제거하고 0.2 M Na-acetate buffer (pH 2.2) 100 μ에 용해시킨 다음 자동아미노산 분석기(Hitachi Co. L8500S)로 분석하였다.

N-말단 아미노산 배열 분석

본 효소의 polypeptide chain의 NH₂-말단 아미노산 배열

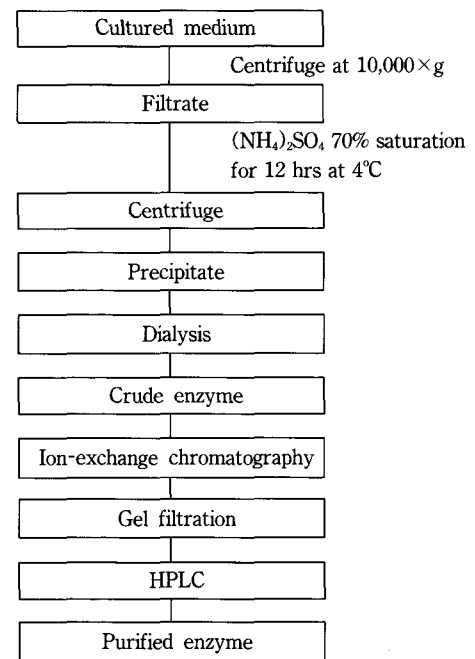


Fig. 1. Purification procedure of a protease from the culture medium of *Bacillus subtilis* CCKS-111.

분석은 RP-HPLC의 주 peak fraction을 감압 농축한 후 Applied Biosystem사의 477A형 protein sequencer에 도입하여 N-아미노산배열을 분석하였다. 이때 phenylthiohydantoin(PTH)-amino acid의 분리동정³⁰⁾은 PTH-amino acid analysis (120A)를 이용한 단일 용매 용출제를 사용하였다.

결과 및 고찰

BSC가 생성하는 protease의 정제

(1) 염석과 투석

균을 배양한 배지로 부터 추출한 조효소액을 황산암모늄으로 70% 포화시켜 12시간 정치하고 소단백질을 응집, 침전시킨 다음 8,000×g로 30 분간 원심분리하였다. 분리된 침전물을 모아 4°C에서 소량의 0.02 M Tris-HCl (pH 8.0)로 용해시킨 다음 3일간 같은 완충액으로 투석시켰다. 이 때 잔존하는 불용성 물질은 8000×g로 15분간 원심분리하여 제거하였으며 정제도 21.3배, 수율 59.0%, 비활성도 10.2 unit/mg으로 효소를 정제할 수 있었다.

(2) DEAE-cellulose column chromatography

농축된 효소액을 DEAE-cellulose column (2.5×50 cm)에 주입한 다음 약 2배의 0.02 M Tris-HCl (pH 8.0)로 통과 시킨다음 전체시료중 1/2을 주입하여 0~1.0 M NaCl의 linear gradient로 2회 용출 시켰다. 이때 유속은 1.02 ml/min이었고 7 ml씩 분획하였으며 활성분획만 모아 농축하였다. DEAE-cellulose column chromatography한 결과 NaCl의 농도구배가 이루어지는 초기에 활성분획이 용출되었으며 수율은 10.9%, 정제도는 31.3배, 비활성도는 15.0 unit/mg로 효소를 정제할 수 있었다(Fig. 2).

(3) First Sephadex G-100 gel filtration

DEAE-cellulose ion exchange 결과 분리된 활성단백은 Amicon membrane PM-10으로 농축하였으며 농축한 효소액을 Sephadex G-100 column (2.5×60 cm)에 주입한 후 30.2 ml/hrs의 유속으로 3 ml씩 분획한 결과 Fig. 3에서와 같이 2개의 단백질 peak중 첫 번째 peak에서 효소활성을 보였다.

(4) Second Sephadex G-100 gel filtration

Sephadex G-100을 통과시킨 효소단백질 중 활성부분만 농축한 다음 2차 Sephadex G-100 column (2.5×90 cm)에

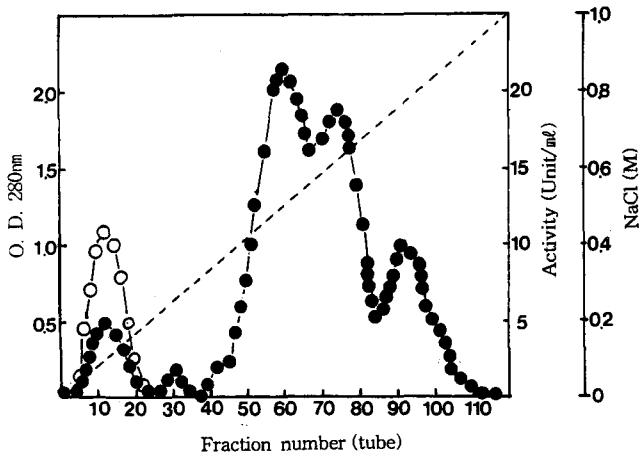


Fig. 2. DEAE-cellulose column chromatography of a protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111. ●—●, protein; ○—○, activity.

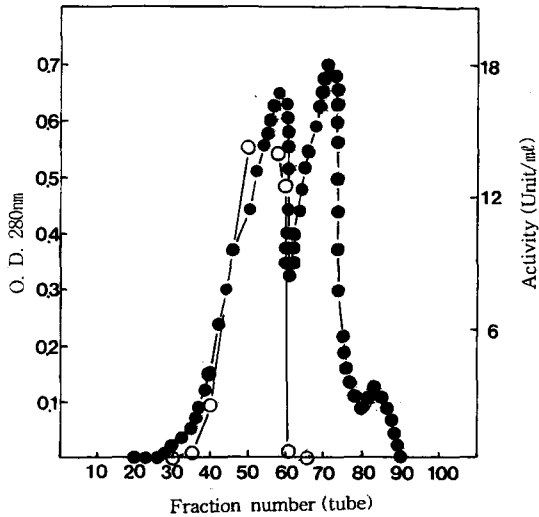


Fig. 3. First Sephadex G-100 column chromatography of a protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111. ●—●, protein; ○—○, activity.

주입하고 15.6 ml/hrs의 유속으로 3 ml씩 분획한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 3개의 단백질 peak가 나타났다. 그 중 앞의 peak에서 효소활성을 보였으며 정제도는 43.8배, 수율은 2.0%, 비활성도는 21.0 unit/mg이었다(Table 1). 이는 김 등³⁹⁾이 토양에서 분리한 호알카리성 *Bacillus*속 균주가 생성하는 alkaline protease의 비활성도 보다 낮았다.

HPLC에 의한 효소의 정제

효소를 최종 정제하기 위해 Sephadex G-100 column에 의한 활성분획물을 gel filtration HPLC [TSK gel (7.8 mm×30 cm)]로 0.8 ml/min의 속도로 전개하여 chromatography를 수행하였다. sephadex G-100 gel filtration 하여 정제과정을 거친 효소액을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis한 결과 본 효소는 단일 band로 나타났으므로 정제 되었음을 확인할 수 있었으나²⁵⁾ HPLC에 의한 효소의 순도는 14.09분의 retention time에서 단일 peak가 검출되었으며 이 peak의 순도는 96%로 확인되었다(Fig. 5).

분자량 측정

효소의 분자량을 측정하기 위해 gel filtration HPLC [TSK gel (7.8 mm×30 cm)]를 이용하여 protease의 분자량을 측정한 결과 약 28,000 daltons이었다(Fig. 6). 이는 황²⁰⁾이 보고한 *Bacillus*속 KUN-17균주가 생성하는 protease의 분자량 38,000 daltons보다 낮았다.

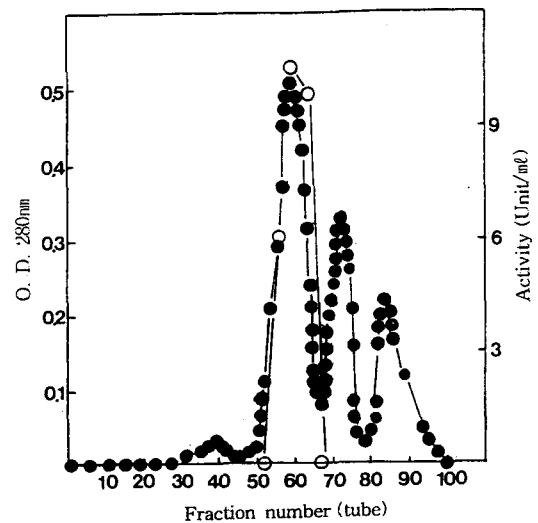


Fig. 4. Second Sephadex G-100 column chromatography of a protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111. ●—●, protein; ○—○, activity.

Table 1. Summary of purification of a protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purity (fold)
Culture supernatant	19608	9460	0.48	100	1
70% saturated(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitate	550	5583	10.2	59.0	21.3
DEAE-cellulose	69	1035	15	10.9	31.3
1st Sephadex G-100	43.9	817	18.6	8.6	38.8
2nd Sephadex G-100	8.9	187.3	21.0	2.0	43.8
HPLC (TSK gel)	3.3	80.3	24.3	0.8	50.6

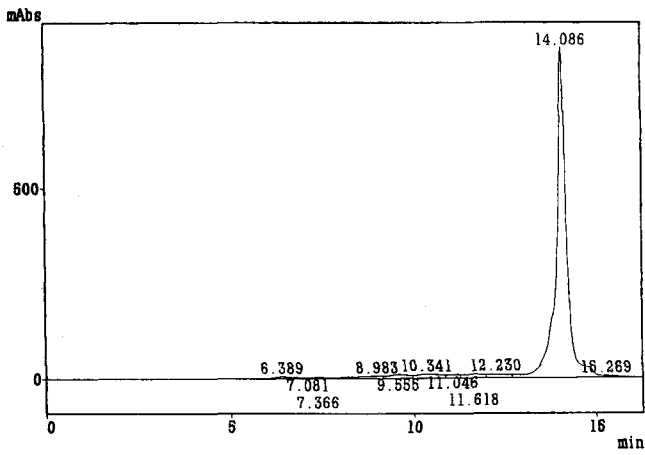


Fig. 5. Gel filtration HPLC pattern of purified enzyme from *Bacillus subtilis* CCKS-111.

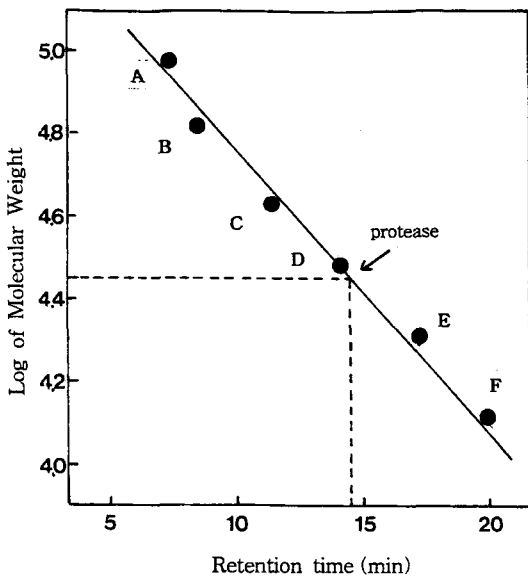


Fig. 6. The calibration curve for the determination of molecular weight of the purified protease by gel filtration HPLC. A, phosphorylase B (97.4 kD); B, bovine serum albumin (66 kD); C, ovalbumin (45 kD); D, carbonic anhydrase (30 kD); E, soybean trypsin inhibitor (20 kD); F, egg lysozyme (14.4 kD).

아미노산 조성 분석

효소의 아미노산 조성을 분석한 결과와 gel filtration HPLC에 의해 밝혀진 분자량으로 부터 계산하여 본 효소의 잔기수를 추정한 결과는 Table 2와 같다. 그 결과 HPLC에 의한 분자량이 28,000임을 기준으로 하였을 때 본 효소의 아미노산 잔기수는 251.3으로, 분해되기 쉬운 threonine, serine, glycine을 제외한 아미노산 잔기수는 *Bacillus subtilis* DY유래³⁰⁾의 BSSDY (*Bacillus subtilis* subtilisin DY)의 잔기수와 유사한 것으로 나타났다.

N-말단 아미노산 배열 결정

본 효소의 N-말단 아미노산 배열을 결정하기 위해 gel filtration HPLC로 정제한 효소 정제품의 전처리 단계로 reverse phase chromatography(C₄ μBondasphere)를 행하였다 (Fig. 7). 이 때 용출시간 26분의 주 peak를 분획하여

Table 2. Composition of amino acids of *Bacillus subtilis* CCKS-111 protease

Amino acids	nmol	Molecular weight	Residues	Residues of *BSSDY
Lysine	1.808	128.17	13.9	12
Histidine	0.336	137.14	2.6	4
Tryptophan	0.133	186.20	1.0	1
Arginine	0.445	158.18	3.4	3
Aspartic acid+Asparagine	3.321	230.00	25.6	27
Threonine	1.928	101.10	14.9	19
Serine	3.989	87.07	30.7	35
Glutamic acid+Glutamine	1.549	255.00	11.9	13
Proline	1.107	97.11	8.5	9
Glycine	3.978	57.05	30.6	34
Alanine	4.421	71.07	34.0	37
Valine	3.275	99.14	25.2	29
Methionine	0.339	131.19	2.6	3
Isoleucine	1.335	113.15	10.3	14
Leucine	2.090	113.15	16.0	17
Tyrosine	2.033	163.17	15.7	14
Phenylalanine	0.558	147.17	4.3	3
Total			251.3	274

*BSSDY : *Bacillus subtilis* subtilisin DY³⁰⁾

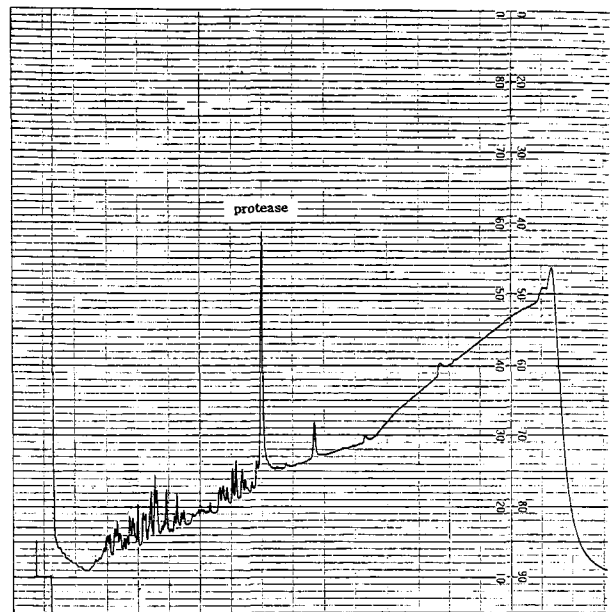


Fig. 7. Reverse phase HPLC pattern of purified enzyme from *Bacillus subtilis* CCKS-111.

아미노산 조성분석과 아미노산 배열을 결정하였다. 그 밖의 peak에 관하여서는 아미노산 조성을 분석한 결과 아미노산이 검출되지 않음으로써 비단백질성 peak임이 확인되었다.

RP-HPLC로 분리한 주 peak로 N-말단 아미노산 배열을 분석한 결과는 Fig. 8과 같다. N-말단에서 32번 까지 아미노산 배열을 분석한 결과 N-말단 아미노산은 alanine이었으며 32번 위치의 아미노산은 aspartic acid이었다. 이와 같은 아미노산 배열은 *Bacillus subtilis* DY³⁰⁾가 분비하는 serine protease와 N-말단은 동일하였으나 Table 2에서 보는 바와 같이 본 효소의 아미노산 잔기수가 다르나 *Bacillus*

	1	5	10
BSCCKS	Ala - Gln - Thr - Val - Pro - Tyr - Gly - Ile - Pro - Leu -		
	11	15	20
	Ile - Lys - Ala - Asp - Lys - Val - Gln - Ala - Gln - Gly -		
	21	25	30
	Tyr - Lys - Gly - Ala - Asn - Val - Lys - Val - Gly - Ile -		
	31		
	Ile - Asp -		

Fig. 8. N-Terminal amino acid sequence of *Bacillus subtilis* CCKS-111 (BSCCKS).

subtilis subtilisin DY 균주와 유사한 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 1996학년도 영남대학교 학술연구조성비에 의한 것이며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 주현규, 노신규, 임무현 (1972) 세균을 이용한 간장제조에 관한 연구, 한국식품과학회지, **4**, 276.
2. 이택수, 주영하, 신보규, 우주현 (1975) 제품간장의 보존에 관한 연구(제1보), 일반성분 및 미생물의 경시적 변화, 한국식품과학회지, **7**, 200.
3. 이병우, 유영선, 임근형, 최춘언 (1991) *Bacillus* LY-353이 생산하는 protease의 정제 및 특성, 한국영양식량학회지, **20**(1), 21.
4. 황세영 (1995) *Bacillus* sp. KUN-17 균주가 생산하는 균체의 serine protease의 정제 및 특성, 한국산업미생물학회지, **23**(1), 53.
5. 김종규, 조윤래, 권대준 (1992) *Bacillus* sp. SSA3균주의 Expression Vector개발, 한국산업미생물학회지, **20**, 637.
6. Horikoshi, K. and M. Kitada (1976) alkaline proteinase production from methylacetate by alkalophilic *Bacillus* sp., *J. Ferment. Technol.*, **54**(6), 383.
7. Guffanti, A. A., O. D. B. Finkelthal, L. Hicks, A. Falk, A. G. Sidhu and T. A. Krulwich (1986) Isolation and characterization of new facultatively alkalophilic strains of *Bacillus* species, *J. Bacteriol.*, **167**, 766.
8. 한용석, 박병득 (1957) 간장제조에 관한 연구(제1보), 재래메주 및 곡자 중의 *Aspergillus oryzae*에 대하여, 공업연구소 연구보고, **7**, 51.
9. 조덕현, 이우진 (1970) 한국 재래식 간장의 발효미생물에 관한 연구(제1보), 한국농화학회지, **13**, 35.
10. 이우진, 조덕현 (1971) 한국 재래식 간장의 발효미생물에 관한 연구(제2보), 한국농화학회지, **14**, 137.
11. 이상선, 박광호, 최경진, 원순애 (1993) 메주에서 분리한 접합균(*Zygomycetes*)의 분리동정, 한국균학회지, **21**(3), 172.
12. 이상선, 박광호, 최경진, 원순애 (1993) 메주에서 분리한 불완전균류(*Hyphomycetes*)에 관한 연구, 한국균학회지, **21**(4), 247.
13. 김종규, 권희진, 기우경, 강동학, 조여운 (1986) 한국 재래식 간장 및 된장제조를 위한 유량변이주 개발, 한국산업미생물학회지, **15**, 21.
14. 김종규, 김상달 (1988) 돌연변이에 의한 한국 간장균의 육종, 한국농화학회지, **31**, 346.
15. 김종규 (1990) 세포융합에 의한 간장 발효균의 육종, 식품기술, **3**, 33.
16. 장영체, 이경형, 김성영, 조윤래, 김종규 (1993) *B. licheniformis* SSA3-2M1이 생성하는 proteinase. 한국미생물학회지, **30**, 239.
17. Iwasaki, K. I., M. Nakajima and H. Sasahara (1992) Porous alumina beads for immobilization of lactic acid bacteria and its application for repeated-batch fermentation in soy sauce production, *J. Ferment. and Bioengineering*, **73**, 5, 375.
18. Iwasaki, K. I., M. Nakajima and H. Sasahara (1991) Rapid ethanol fermentation for soy sauce production by immobilized yeast cells, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 9, 2201.
19. Iwasaki, K. I. and N. Ueno (1990) Porous alumina ceramics for immobilization of soy sauce yeast cells, *Nippon seramikkyo kyokai gakujutsu ronbunshi*, **98**, 11, 1186.
20. Iwasaki, K. I., M. Nakajima and H. Sasahara (1993) Rapid continuous lactic acid fermentation by immobilised lactic acid bacteria for soy sauce production, *Process Biochemistry*, **28**, 39.
21. Iwasaki, K. I., M. Nakajima and H. Sasahara (1991) Rapid ethanol fermentation for soy sauce production using a microfiltration membrane reactor, *J. Ferment. and Bioengineering*, **72**, 5, 373.
22. 최홍식, 이정수, 이창용 (1993) 양조간장에서 분리한 멜라노이딘 관련물질의 항산화성 작용특성, 한국영양식량학회지, **22**, 570.
23. 최홍식, 이정수, 문갑순, 박건영 (1993) 양조간장에서 분리한 갈색물질의 항산화성, 한국영양식량학회지, **22**, 565.
24. 최홍식, 이창용 (1993) Melanoidin의 항산화성 및 항돌연변이원성, 한국영양식량학회지, **22**, 246.
25. 최청, 최광수, 조영제, 임성일, 김성, 손준호, 이희덕, 김영활 (1997) 한국재래간장으로 부터 분리한 *Bacillus subtilis* CCKS-111이 생성하는 protease의 특성 및 작용양상, 한국식품영양과학회지, **25**(6), 915.
26. Horikoshi, K. (1971) Production of alkaline enzyme by alkalophilic microorganism, *Arg. Biol. Chem.*, **35**, 1407.
27. Hakiyara. B. (1956) 酵素研究法. vol. II (朝倉書店:東京), **1**, 237.
28. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, L. A. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
29. 전순배, 박종천, 배석, 임선영, 이진중, 이향 (1993) *Schwanniomyces castellii* CBS 2863(ATCC 26077)으로부터 α -amylase정제 및 특성, 한국산업미생물학회지, **21**, 6, 582.
30. Perona, J. J. and C. S. Craik (1994) Structural basis of substrate specificity in the serine proteases, *Protein Science*, **4**, 337.
31. 김태호, 박성희, 이동선, 권택규, 김종규, 홍순덕 (1990) 호알칼리성 *Bacillus*속 균주가 생산하는 alkaline protease의 특성, 한국산업미생물학회지, **18**, 159.
32. 황세영 (1995) *Bacillus* sp. KUN-17 균주가 생산하는 균체의 serine protease의 정제 및 특성, 한국산업미생물학회지, **23**(1), 53.

Separation and Purification of Protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111 in Korean Traditional Soy Sauce

Cheong Choi*, Sung Kim, Seong-Il Lim¹, Hee-Duck Lee, Seon-Ho Lee, Jun-Ho Son, Hee-Jin Choi and Yeung-hweal Kim²,(**Dep. of Food Science & Technology, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea*; ¹*Korea Food Research Institute*; ²*Dep. of Clinical Pathology, Daegu Junior College, Daegu 702-240, Korea*)

Abstract : A protease was purified from *Bacillus subtilis* CCKS-111 by ammonium sulfate treatment, DEAE-cellulose ion-exchange chromatography, Sephadex G-100 gel filtration and high performance liquid chromatography (HPLC). The specific activity of the purified enzyme was 24.3 unit/mg protein and the purification fold of enzyme was 50.6. Molecular weight of the purified enzyme estimated about 28,000 by HPLC gel filtration. The amino acid residues of this enzyme were 251.3 except threonine, serine and glycine. This result was similar to *Bacillus subtilis* subtilisin DY. From the first N-terminal amino acid to the 32th amino acid, the amino acid sequence was estimated after RP-HPLC elution. N-terminal and the 32th amino acids were alanine and aspartic acid. Alanine, serine, glycine and arginine were four major acids in the enzyme.

Key words : *Bacillus subtilis*, protease, soy sauce

*Corresponding author