

된장에 존재하는 *Bacillus cereus*의 분리 및 균주가 분비하는 단백질 가수분해효소의 특성에 관한 연구

김성조 · 윤주희 · 이명숙 · 김한복*

호서대학교 자연과학대학 생명과학과

한국의 전통 발효식품인 된장에서 단백질 분해효소를 분비하는 미생물의 존재를 규명하기 위해, skim milk 한천배지를 이용하여 투명환을 보이는 균주들을 얻었고, 각종 생리 및 생화학적 검사, VITEK system, MIDI system을 통해 이들 중, JH-1, SH-5, SH-7의 3 strain이 *Bacillus cereus*임을 동정하였다. JH-1과 SH-5 균주가 분비하는 단백질 분해효소는 pH 9와 40°C에서 최적활성을 보였으며, SH-7 균주는 pH 8과 50°C에서 최적활성을 보였다. 또한 이들 3 균주는 blood agar plate에서 용혈능력을 보였다.

KEY WORDS □ *Bacillus cereus*, extracellular protease, hemolysis

식품을 통한 영양분 섭취는 인간의 생존에 필수적이다. 식품의 단순한 영양학적 기능을 떠나서, 근래에 여러 식품을 이용해서 질병을 예방, 치료하려는 시도가 늘어가고 있다. 식품에 존재하는 미생물의 몇몇 효과가 보고되고 있는데, 이미 일본에서는 자국의 전통 대두발효식품인 Natto로부터 *Bacillus*균을 발견하였다. 거기서 분비되는 Nattokinase라는 효소는 혈전용해 효과가 있다는 보고를 했다(16). 우리나라에서도 전통발효식품인 청국장에서 *Bacillus*계열의 균주를 발견하고 이에 대한 연구가 진행되고 있다(19).

*Bacillus*계열은 이미 다양한 연구가 수행 중인 미생물 중 하나로서 알칼리 조건, 중성 조건 등에 따라 증식하는 species가 각각 다르며 이들이 방출하는 단백질 분해효소는 (10, 11, 18) 이미 세제, 피혁, 식품, 의학적 용도 등 다양한 활용도로 인해 활발히 연구가 진행 중이다(6, 17). 단백질 가수분해 효소는 아미노산으로 구성된 단백질의 peptide bond를 가수분해하는 효소로서 이들은 미생물의 세포질 내부(4, 7) 또는 세포막에 결합하고 있거나(14) 세포질 밖에 존재한다(12). 단백질 분해효소의 종류는 일반적으로 serine protease, metalloprotease, thiolprotease, 그리고 acid protease의 4종류로 구분되어진다. 다른 구분방식으로서 효소의 최적 pH에 의해 acid protease, neutral protease, alkaline protease로 나누기도 한다.

된장은 우리 나라의 전통 대두 발효식품으로 섭취시 항암 효과 및 혈전 용해효과가 있다고 꾸준히 보고되고 있으며, 그 속에는 다양한 미생물들이 서식하는 것으로 알려져 있다. 그러나 된장에 존재하는 미생물에 관한 연구는 주로 된장의 향이나 맛에 관여하는 방향으로 진행되어 왔다(2). 또한 된장의 숙성에 관여하는 미생물에 관한 연구도 진행되어 왔는데, 된장의 풍미에 관여하는 *Bacillus subtilis*(3), *Ba-*

*cillus licheniformis*와, 일부 *Bacillus* 속균 등(1)이 알려져 있는 상태이지만 미생물이 생성하는 물질의 특성에 대해서는 많이 조사되어 있지 않은 실정이다. 섭취 직전의 된장에서도 단백질 분해효소를 분비하는 미생물이 과연 존재하는지, 있다면 어떤 특성의 단백질 분해효소를 분비하는지에 대한 본격적인 연구는 아직까지 찾아보기 힘들었다.

본 연구에서는 한국의 전통 대두 발효식품인 된장에 존재하는 균체 중 생육조건이 까다롭지 않으면서 세포막 외부로 단백질 가수분해 효소를 분비하는 균을 선별하였다. 이들 중 중성 및 알칼리 pH에서 가장 잘 자라며, 또한 단백질 분해효소의 활성도 높은 균체를 선택하여, 이 균체와 단백질 분해효소의 특성을 결정하고 아울러 용혈능을 연구하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 보존

방부제를 사용하지 않고 일반 가정에서 제조한 된장에서 단백질 분해효소를 분비하는 균주를 분리하기 위해 된장을 멸균된 증류수로 순차희석하여 skim milk agar 배지(skim milk 10 g/L, bacto-tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L, bactoagar 15 g/L)에 도말하고 항온배양기에서 37°C로 18시간 이상 배양하였다. Skim milk가 extracellular protease에 의해 분해되어 형성된 투명환(clear zone or halo)의 크기가 큰 colony만을 선택하여 1차로 선별하였고, 이들 중 상대적으로 활성이 강하고 생육정도가 우수한 균주 3종을 선택하여 이후의 실험에 사용하였다. 균주보관을 위해서는 멸균된 glycerol stock solution(15% glycerol)을 사용하여 -70°C 저온냉동고에 보관하였고, 실험에 사용하는 균주는 extracellular protease의 활성유지를 위해 skim milk 배지에서 계대 배양하였다.

*To whom correspondence should be addressed

분리균주의 동정

균주의 동정은 실험실내에서 수행하는 실험의 오차를 최소화하기 위하여 총 3종류의 실험을 수행하였다. 1차로 gram staining test를 실시하여 균체의 형태를 관찰한 후 3%의 KOH를 균체 배양액에 섞은 뒤 발생하는 점성의 유무로 gram staining test의 신뢰도를 재입증하였고(13), spore staining을 하여 포자의 존재여부를 확인하였다. 또한 각 실험에 알맞는 배지를 이용하여 온도별 생육조건 측정, pH에 따른 생육정도 측정, 내염성 등을 측정하였다. 균주동정의 생화학적 특성검사에 적당한 배지 및 시약을 제조하여 catalase test, acid production test, starch hydrolysis test, casein hydrolysis test, gelatin hydrolysis test, indole production test 등을 수행하여 Bergey's manual of systematic bacteriology(9)에 의거 균주를 동정하였다.

2차로는 자동화 균주동정기계인 VITEK system(bioMereux co)을 이용하여 2회에 걸쳐 균주의 생화학적 특성검사를 수행하여, 실험실에서 행한 생화학적 특성검사의 진위를 검증하였고, 3차로 균주의 세포벽 지방산 조성을 조사한 결과를 MIDI(Microbial Identification) system(15)을 이용하여 분석한 결과를 토대로 균주의 동정을 확증하였다.

균주의 배양 조건과 특성

균주를 이용하여 extracellular protease의 생성을 위한 조건과 효소의 특성결정을 위해 액체배양을 실시하였는데, 배지는 LB medium(bactotryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L)을 제조하여 사용하였고 필요시 액체배지에 1-2%(w/v)가 되게 skim milk를 넣어주었다. 각 균체의 성장 정도는 600 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였고, 균주의 pH에 의한 성장영향 정도를 측정하기 위해 pH 4.0-7.0은 citrate-phosphate buffer, pH 7.0-8.0은 phosphate buffer, pH 8.0-9.0은 Tris(hydroxymethyl) aminomethane buffer, pH 9.0-10.0은 glycine-NaOH buffer로 pH를 조정하여 제조한 뒤 별도로 배양한 균주를 동량 접종하여 각각의 배지를 30°C에서 18시간 이상 배양하여 균체의 성장을 관찰하였다.

단백질 가수분해효소의 활성측정

기질은 0.6%(w/v) casein을 특정 pH의 buffer에 용해하여 사용하였으며, 균체배양액을 12,000 g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 조효소용액으로 사용하였다. 단백질 가수분해 효소의 활성은 Hagihara의 방법을 변형하여 사용하였다(8). 기질용액 1 ml과 조효소용액 500 µl를 측정온도의 water bath에 넣고 1시간 동안 반응시킨 후 단백질 침전시액인 TCA mixture(0.11 M CCl₃COOH, 0.22 M CH₃COONa, 0.33 M CH₃COOH) 1 ml와 혼합하여 다시 동일온도의 water bath에 30분간 방치하고 4°C, 12,000 g에서 5분간 원심분리하여 그 상층액만을 회수하여 sample 용액을 제조하였다. 대조군으로서 blank는 조효소용액 500 µl에 TCA mixture 1 ml을 넣고 측정온도에서 1시간 방치하여 효소의 활성을 제거한 후, 여기에 기질용액을 1 ml 넣고 다시 30분간 반응시킨 뒤, 4°C, 12,000 g에서 5분간 원심분리하여 그 상층액만을 회수하여 제조하였다. 이렇게 제조된 각각의 sample과

blank는 Bradford reagent(5)와 동량 섞은 뒤 595 nm에서 흡광도를 측정하여 상대적 효소활성을 결정하였다. 또한 단백질 가수분해 효소의 pH 변화에 의한 분해능력 변화 확인을 위해 pH 4.0-7.0은 0.02 M citric acid-sodium phosphate dibasic buffer, pH 7.0-8.0은 0.02 M sodium phosphate mono-basic-sodium phosphate dibasic buffer, pH 8.0-9.0은 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 9.0-11.0은 0.02 M glycine-NaOH buffer를 이용하여 각 pH대 별로 0.6% casein(w/v) 기질용액을 제조하여 조효소 용액과 혼합하여 1시간 동안 반응시킨 후, 단백질 분해능 확인법에 따라 측정하였다. 온도변화에 따른 효소활성의 변화를 보기 위해 기질용액을 각 균주가 최적활성을 갖는 pH로 조정하고 이를 조효소 용액과 섞어서 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C로 온도를 변화시키며 효소의 활성을 측정하였다. 그리고 균주의 배양시 배양액내의 기질공급 여부에 따른 효소의 생산 유도효과를 측정하기 위해 배양액내에 1% casein(w/v)을 공급해준 배지와 공급하지 않은 배지를 제조해 pH 8, 37°C에서 균주를 배양하며 4, 8, 12, 16, 20, 24시간에서 조효소용액을 취하여 효소활성을 측정하였다.

균주의 용혈능력 검사

균주의 용혈능력 시험을 위해 skim milk agar 배지에서 1차 배양한 균주를 sheep blood agar 배지(Korea Media LTD)에 식균하고 colony의 크기와 투명환의 크기를 특정 시간대 별로 측정하여 상대적 활성도를 측정하였다.

결과 및 고찰

단백질 가수분해 효소 생성 균주의 분리

일반가정에서 제조된 된장을 멸균된 증류수로 순차희석하여 skim milk 배지에 도달한 뒤 37°C에서 18시간 이상 배양하여 생성된 균주들 중 상대적으로 투명환이 큰 균주들만을 1차 선별한 뒤, 다시 skim milk 배지에 도달하여 최종적으로 알칼리에서 생육조건이 좋고 투명환이 큰 균주 2군과 중성에서 생육조건과 투명환이 큰 균주 1군을 선별하여 각각을 JH-1, SH-5, 그리고 SH-7으로 명명하였다.

분리균주의 동정

분리된 균주들을 gram staining한 결과 3 균주가 모두 양성을 나타내었으며 막대형의 균주임을 알 수 있었다. 또한 KOH string test(13) 결과 음성을 나타내어 gram staining의 결과를 재확인 할 수 있었다. Spore staining을 한 결과 spore가 존재하였으며 원형의 colony형태를 가지고 있었다. 균주의 배양적인 특성과 생화학적 특성(Table 1)을 조사한 결과 3 균주 모두 catalase를 가지고 있으며 30, 37, 45°C에서 자랐으며 5, 10°C에서는 자라지 못하였다. 내염성을 측정한 결과 2, 5%의 NaCl에서는 자랐으나 7%의 NaCl에서는 자라지 못하는 특성이 관찰되었다. 성장 pH를 조사한 결과 pH 6, 7, 8에서 잘 자랐고 casein과 gelatin을 우수하게 분해하는 능력을 가지고 있으며, hemolysis를 시키는 능력을 보유하고 있었다. 하지만 JH-1의 경우 55°C에서도 자라며 SH-

Table 1. Cultural and biochemical characteristics of the isolates

| Characteristics | Results | | |
|----------------------|---------|------|------|
| | JH-1 | SH-5 | SH-7 |
| Catalase | + | + | + |
| Growth at 5°C | - | - | - |
| 10°C | - | - | - |
| 20°C | + | + | + |
| 30°C | + | + | + |
| 37°C | + | + | + |
| 45°C | + | + | + |
| 50°C | + | + | - |
| 55°C | + | - | - |
| 65°C | - | - | - |
| Growth at 2% NaCl | + | + | + |
| 5% NaCl | + | + | + |
| 7% NaCl | - | - | - |
| Growth at pH 5 | + | + | +/- |
| pH 6 | + | + | + |
| pH 7 | ++ | + | ++ |
| pH 8 | + | ++ | + |
| pH 9 | + | + | +/- |
| pH 10 | - | - | - |
| Formation of indole | - | - | - |
| Hydrolysis of starch | +/- | - | + |
| casein | + | + | + |
| gelatin | + | + | + |
| Hemolysis | + | + | + |
| Voges-Proskauer test | - | + | + |

Table 2. VITEK system test

| Characteristics | Results | | |
|-----------------------------------|---------|------|------|
| | JH-1 | SH-5 | SH-7 |
| Acid from sucrose | + | + | + |
| tagatose | - | - | - |
| glucose | + | + | + |
| inositol | - | - | - |
| galactose | - | - | - |
| arabinose | - | - | - |
| xylose | - | - | - |
| mannitol | - | - | - |
| raffinose | - | - | - |
| salicin | - | - | - |
| amygdalin | - | - | - |
| inulin | +/- | - | +/- |
| ribose | - | - | - |
| maltose | + | + | + |
| trehalose | + | + | - |
| palatinose | - | - | - |
| sorbitol | - | - | - |
| NAG | + | + | + |
| amylopectin | + | +/- | + |
| arabitol | - | - | - |
| Hydrolysis of esculin | + | + | + |
| Reduction of tetrazolium red | - | - | - |
| Utilization of acetate from NAA | - | - | +/- |
| Glucose fermentation on inhibitor | | | |
| KSCN | + | + | + |
| NaCl | - | - | - |
| Mandelic acid | + | + | + |
| Oleandomycin | + | - | - |
| PAS | + | + | + |
| Nalidixic acid | -/+ | -/+ | -/+ |

NAG: N-acetyl-D-glucosamine; NAA: Sodium acetate; KSCN: Potassium thiocyanate; PAS: Polyamidohydrostreptin. +: positive; -: negative; +/-, -/+: the 1st 2nd experimental results were different.

5의 경우는 50°C까지 성장하는 반면 SH-7의 경우는 45°C까지만 성장하는 차이점을 보였다. 또한 pH 5와 9에서 SH-7은 다른 균주에 비해 생장이 지체되는 것을 관찰할 수 있었고, Voges-Proskauer test 결과 JH-1은 음성의 결과를 보여, 각 균주가 조금씩의 차이를 가지고 있음을 알 수 있었다. 위의 검사한 결과를 종합하여 Bergey's manual of systematic bacteriology와 비교한 결과 genus가 *Bacillus*임이 확실해졌고 실험내용과 생화학적 특성이 가장 비슷한 균주 *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pasteurii*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*의 5종이 선별되었는데 *B. anthracis*는 hemolysis 특성이 없고, *B. mycoides*는 agar 배지상에서 성장시 rhizoid 형태의 colony를 나타내며, *B. pasteurii*는 NH₃를 가진 알칼리성 배지를 생장시 필요로 한다. 따라서 이 실험에 사용된 균주는 *B. cereus* 또는 *B. thuringiensis*로 추정되어졌다. 이러한 균주동정의 확증을 위해 자동화 균주동정 기계인 VITEK system을 이용하여 2회의 검사를 실시(Table 2) 하였다. 3균주 모두 sucrose, glucose, maltose 등을 이용하여 acid를 생성하였지만, tagatose, inositol, galactose, arabinose를 이용하지는 못했다. 3균주 모두 tetrazolium red를 환원시키지 못했고, 금속염 존재하에서 esculin을 가수분해하였다. Inhibitor 존재시 3균주 모두 potassium thiocyanate, mandelic acid, polyamidohydrostreptin에서는 각각 glucose를 fermentation하였지만, NaCl에서는 glucose를 fermentation할 수 없었다. JH-1의 경우 oleandomycin 존재하에서 glucose fermentation을 할 수 있었지만, SH-5와 SH-7은 glucose fermentation을 할 수 없었다.

SH-7의 경우 trehalose에서 acid를 생성하지 못하였지만, JH-1과 SH-5는 acid를 생성하였다. VITEK system에서는 JH-1과 SH-7은 똑같이 96% *B. cereus*, 3% *B. thuringiensis*로 판명되었고, SH-5는 42% *B. cereus*, 57% *B. thuringiensis*로 판명되었다. 또한 분리된 균주의 세포벽 지방산 조성을 확인(Table 3)한 결과 JH-1, SH-5, SH-7모두 13:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0의 fatty acid를 가지고 있었다. 특히 15:0 iso의 fatty acid는 공통적으로 가장 높은 세포벽 조성을 나타내었고 17:0 iso의 fatty acid는 두 번째로 높은 조성을 나타내었다. 그리고 SH-5의 경우 JH-1과 SH-7에 존재하는 13:0 anteiso, 17:1 anteiso A, 17:0 anteiso가 없으며, SH-7의 경우 다른 두 균주에는 없는 12:0 iso, 15:0, 16:1 7c alcohol이 존재하는 차이를 보였다. MIDI system에서 JH-1은 76% *B. cereus*, 64% *B. thuringiensis*로 판명되었고, SH-5는 67% *B.*

Table 3. Cellular fatty acid profile of the isolates

| Fatty acid | Compositions (%) | | |
|-----------------------|------------------|-------|-------|
| | JH-1 | SH-5 | Sh-7 |
| 12:0 iso | - | - | 0.76 |
| 13:0 iso | 8.93 | 8.45 | 6.89 |
| 13:0 anteiso | 1.16 | - | 1.22 |
| 14:0 iso | 3.90 | 4.81 | 5.98 |
| 14:0 | 2.49 | 2.31 | 2.51 |
| 15:0 iso | 34.36 | 34.95 | 29.76 |
| 15:0 anteiso | 4.98 | 5.77 | 6.27 |
| 15:0 | - | - | 1.09 |
| 16:1 ω7c alcohol | - | - | 1.02 |
| 16:1 iso I/14:0 3OH | 2.82 | 3.96 | 4.43 |
| 16:0 iso | 5.71 | 6.27 | 8.42 |
| 15:0 iso 2OH/16:1 ω7c | 8.49 | 9.35 | 7.83 |
| 16:0 | 4.97 | 4.49 | 4.14 |
| iso 17:1 ω10c | 2.87 | 2.73 | 1.99 |
| iso 17:1 ω5c | 5.45 | 6.98 | 4.17 |
| 17:1 anteiso A | 0.98 | - | 1.26 |
| 17:0 iso | 11.31 | 9.92 | 9.79 |
| 17:0 anteiso | 1.57 | - | 2.46 |

cereus, 60% *B. thuringiensis*로 판명되었다. 또한 SH-7은 43% *B. cereus*, 43% *B. thuringiensis*, 25% *B. anthracis*로 판명되었다. 이러한 자료를 기초로 하여 이들 3균주는 *Bacillus cereus* group에 속한 균주임을 확증할 수 있었다.

균주가 분비하는 단백질 가수분해 효소의 활성결정

Bacillus cereus JH-1, SH-5, SH-7이 분비하는 단백질 가수분해효소의 pH에 의한 활성변화를 측정하기 위해 기질용액의 pH를 4에서 11까지 변화시켜 조효소용액과 반응하여 활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 이를 통해 *Bacillus cereus* JH-1과 SH-5는 pH 9와 10에서도 75% 이상의 효소활

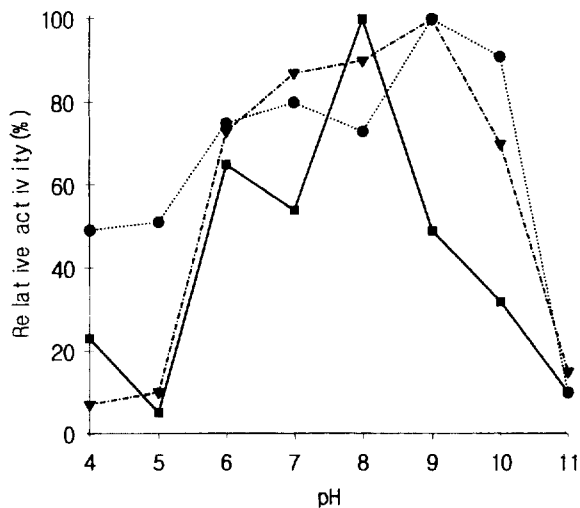


Fig. 1. Effect of pH on the extracellular protease activities of *B. cereus*. For *B. cereus* strain JH-1 (●), SH-5 (▼), and SH-7 (■), protease activity was determined from pH 4 to 11 under the standard conditions. Maximal activity was shown as 100%.

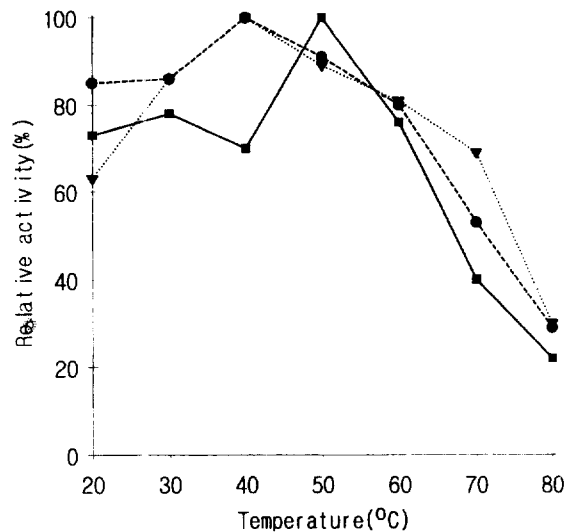


Fig. 2. Effect of temperature on the extracellular protease activities of *B. cereus*. For *B. cereus* strain JH-1 (●), SH-5 (▼), and SH-7 (■), protease activity was determined from 20 to 80°C under the standard conditions. Maximal activity was shown as 100%.

성이 존재하지만 SH-7의 경우 pH 9 이후에서는 효소활성이 급격히 감소하는 양상을 관찰할 수 있었다. SH-7의 최적 pH는 8이었고, JH-1과 SH-5의 최적 pH는 9이었다. 따라서 JH-1과 SH-5가 분비하는 단백질 분해효소는 알칼리성으로 사료되었다. 이들 3 균주는 20-60°C 사이에서 적어도 60% 이상의 활성을 보여 상온 및 고온에서 안정성이 있는 단백질 분해효소로 보였다. JH-1과 SH-5의 단백질 분해효소의 최적온도는 40°C였으며 SH-7의 것은 50°C이었다(Fig. 2).

배양액내에 기질의 존재에 의하여 효소생산이 증가하는지의 여부를 알기 위해 배양액내에 1%(w/v) casein 용액을 넣고 배양한 것과 그렇지 않은것을 제조하여 pH 8, 37°C에서

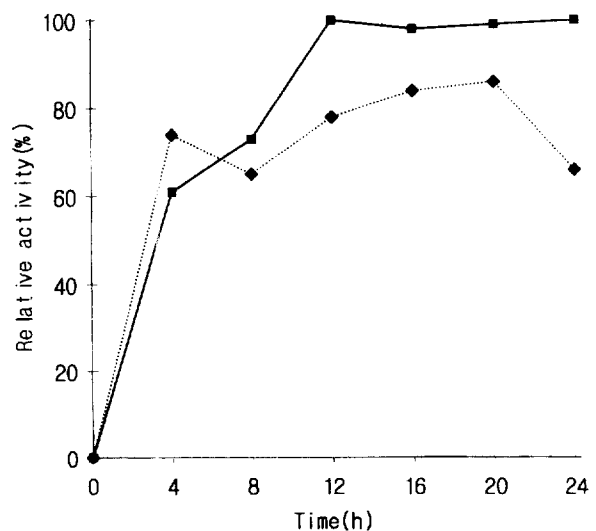


Fig. 3. Extracellular protease activity of *B. cereus* SH-7 cultured with or without skim milk. ■: cultured with skim milk; ◆: without skim milk.

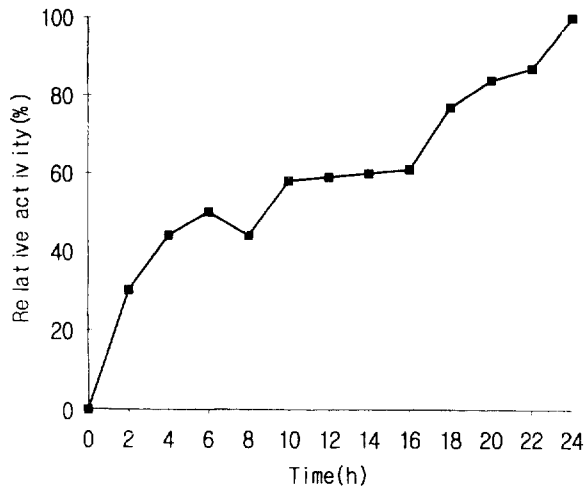


Fig. 4. Haemolytic activity of *B. cereus* SH-7. *B. cereus* SH-7 was inoculated on blood agar media, and a ratio of halo zone to colony size at different culture time was used as haemolytic activities.

4시간 단위로 24시간 동안 측정된 결과(Fig. 3) 배양액 내에 기질인 casein 용액을 공급해준 실험군의 효소활성이 상대적으로 높음을 확인하였다. 또한 배양액에 기질을 공급하지 않은 실험군은 배양후 20시간이 지났을 때 최고의 효소활성을 보이다가 20시간 이후에 효소활성이 하강하였다. 반면에 기질을 공급해준 실험군은 20시간이 지나 24시간째가 되어 서도 최고 활성을 유지하는 것으로 관찰되었다. 따라서 배양액에 기질을 공급해 주는 것이 효소활성의 증가에 다소 도움이 되는 것으로 사료되었다.

균주의 용혈능력 실험을 위해 skim milk 배지에서 1차 활성화시킨 균주를 blood agar 배지에 접종하고 2시간 단위로 colony의 크기와 용혈작용으로 생성된 투명환의 크기를 대비하여 상대적 활성도를 구하였다(Fig. 4). 시간이 경과함에 따라 용혈효과가 점차적으로 증가하는 양상을 볼 때 배지내에 용혈작용을 유발하는 기질이 존재하면 지속적으로 용혈 인자가 분비됨을 알 수 있었다. 또한 본 균주는 인간의 혈전을 용해할 수 있음을 확인하였으며(data 제시않음), 이는 혈전용해제의 개발로 연결될 수 있을 것이다.

된장속에서는 *Bacillus*속 중 각기 다른 5-6 종이 본 실험에서 발견되었는데(data 제시않음), 이들이 어떤 식으로든 상호작용을 할 것으로 추정된다. 된장이란 생태계에서 *Bacillus cereus*가 어떤 역할을 하고 있는지, 또한 된장의 향압, 혈전용해 효과에 *Bacillus cereus*의 관련여부를 규명하기 위한 연구가 보다 깊이 진행되어야 할 것이다.

참고문헌

1. 권오동, 김종규, 정영진. 1986. 한국 재래식 간장 및 된장에서 분리한 세균의 특성. 한국농화학회지. **29**, 422-428.
2. 송재영, 안철우, 김종규. 1984. 한국 재래식 된장 발효중 관여 미생물이 생성하는 향기성분. 한국산업미생물학회지. **12**, 147-152.
3. 윤일섭, 김현오, 윤세억, 이갑상. 1977. 한국된장의 발효과

정에 따른 N-Compounds의 소장에 관한 연구. 한국식품과학회지. **9**, 131-137.

4. Alexander, Y.S., I.G. Dmitaii, and A.K. Irina. 1979. Intracellular protease of *B. subtilis* strain Marburg 168. *J. Biochem.* **179**, 333-339.
5. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
6. Godfrey, T. and J. Reichelt. 1983. Industrial enzymology the application of enzymes in industry. The Nature Press. New York.
7. Goldberg, A.L., K.H. Swamy, C.H. Chung, and F.S. Larimore. 1982. *Meth. Enzymol.* **80**, 680-702.
8. Hagihara, B., H. Matrubaraa, M. Nakai, and K. Okunuki. 1958. Crystalline bacterial proteinase. 1. Preparation of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis*. *J. Biochem.* **45**, 185-194.
9. Holt, J.G., M.E. Sharpe, N.S. Mair, and P.H. Sneath. 1986. Bergey's manual of systematic Bacteriology(Vol. 2). Williams & Wilkins Co. Baltimore.
10. Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part 1. alkaline protease produced by *Bacillus* No. 221. *Agr. Biol. Chem.* **35**, 1407-1414.
11. Manachini, P.L., M.G. Fortina, and C. Parini. 1988. Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermoruber*-a new species of *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 409-413.
12. Morihara, K. 1962. Studies on the protease of *Pseudomonas* VII. *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)* **26**, 842-847.
13. Powers, E.M. 1995. Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining gram reactions of foodborne and waterborne bacteria and yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(10), 3756-3758.
14. Reginer, P. 1981. The purification of extracellular protease IV of *E. coli* and the demonstration that it is an endoproteolytic enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99**, 1369-1376.
15. Stager, C.E., and J.R. Davis. 1992. Automatted systems for identification of microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**, 302-327.
16. Sumi, H., H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara, and H. Muraki. 1987. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia.* **43**, 1110-1111.
17. Tsuru, D., H. Kira, T. Yamamoto, and J. Fukumoto. 1966. Studies on bacterial protease. *Agr. Biol. Chem.* **30**(12), 1261-1268.
18. Tsuru, D., H. Kira, T. Yamamoto, and J. Fukumoto. 1966. Studies on bacterial protease. Part 16. purification, crystallization and some enzymatic properites of alkaline protease of *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*. *Agr. Biol. Chem.* **30**, 1261-1268.
19. Kim, W., K. Choi, Y. Kim, H. Park, J. Choi, Y. Lee, H. Oh, I. Kwon, and S. Lee. 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened form Chungkook-Jang. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2482-2488.

(Received April 31, 1997/Accepted June 30, 1997)

ABSTRACT: Isolation and Characterization of *Bacillus cereus* Secreting Proteases from Korean Soybean Paste

Sung Jo Kim, Joo Hee Yoon, Myoung Sook Lee, Han Bok Kim* (Department of Life Science, Hoseo University, Asan 336-795, Korea)

To elucidate whether there are bacteria excreting proteases in Korean traditional fermented food, soybean paste (Doen-Jang) or not, well growing bacteria with halos were isolated on the skim milk agar media. The strains were identified as *Bacillus cereus* JH-1, *B. cereus* SH-5, *B. cereus* SH-7 through various physiological and biochemical tests, VITEK system, and MIDI system. The extracellular proteases of the strain JH-1 and SH-5 were optimal at pH 9, 40°C, and the protease of strain SH-7 at pH 8 and 50°C. Also hemolysis activities of the three strains were observed on the blood agar media.