

한국 전통 메주 유래의 *Aspergillus wentii*가 생성하는 Protease의 정제 및 특성

임 성 일

한국식품개발연구원, 생물공학연구본부

Purification and Characterization of Protease Produced by *Aspergillus wentii* Isolated from Korean Traditional Meju

Seong-II Lim

Division of Chemistry and Biotechnology, Korea Food Research Institute

Abstract

The protease produced by a newly isolated *Aspergillus wentii* from Korean traditional Meju was purified and characterized. The optimal medium composition and culture conditions for maximum protease production were ; bran :1% glucose solution = 1 : 1, pH 9.0, 30°C, and 4 days of fermentation. Protease was purified by QAE-Sephadex, SP-Sephadex ion exchange chromatography and Sephadex G-100 chromatography. The specific activity and the purification fold of the purified enzyme were 213 unit/mg protein and 27.3, respectively. The molecular weight of purified protease was found to be 32 kDa by SDS-PAGE. Km and Vmax value's for hammastain milk casein were 3.049×10^{-4} M and 151.1 μ g/min, respectively. Kinetic parameters showed that the enzyme has higher affinity to casein than isolated soybean protein, hemoglobin and bovine serum albumin. Optimal pH and temperature for reaction of the purified enzyme were 9.0 and 50°C, respectively. The enzyme was stable at pH 4.0-11.0, below 40°C, and the activity was not stimulated by metal ions. 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride inhibited the enzyme activity by 98.5%. It means that the enzyme is one of serine protease.

Key words : *Aspergillus wentii*, protease, Meju

서 론

콩은 20%의 지질과 단백질 40%, 탄수화물 35% 그리고 5%의 기타성분으로 구성되어 있는 것으로 동양이나 서양에서 우수한 단백질 공급원으로 식품 또는 사료로 이용되어 왔다. 더욱이 동양에서는 단백질의 공급원 이외에 콩 자체를 발효식품으로 다양하게 이용하고 있다. 우리 나라의 전통식품 중 간장, 된장, 고추장, 청국장 등 각종 장류는 일반적으로 콩을 주원료로 곰팡이나 세균 등에 의해 발효된 식품이다. 따라서 여러 장류는 원료인 콩에 들어있는 각종 생리활성 성분과 함께 발효과정 중 생성되는 여러 대사산물이 함께 건강기능성 성분으로 작용하게 된다.

콩이나 콩 가공식품은 여러 가지 건강기능성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 즉 이들 식품은 특히

암, 혈관계 질환, 골다공증, 신장질환 등 각종 성인병에 예방 및 치료 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다⁽¹⁾. 최근에는 콩에서 유래된 여러 성분 중 펩타이드가 항암, 혈압강하, 혈중 콜레스테롤 저하, 혈전 저해 등 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다⁽²⁾. 따라서 전통장류에 대한 인식도가 영양적인 가치뿐만 아니라 장류가 가진 기능성면이 밝혀짐으로서 점차 높아지고 있다.

단백질을 가수분해하는 효소는 미생물의 종에 따라 다양하게 존재하는데 이들 효소의 작용으로 대두단백질의 특성이 변화하여 pH, 염농도, 온도 등과 같은 조건에 의해 단백질의 변화와 이용의 제한성을 가지므로 가공조건과, 목적에 따라 대두단백질의 기능성을 조절하려는 연구도 시도된 바 있다⁽³⁾. 그 예를 보면 대두단백질의 가수분해 펩타이드가 산성음료의 용해도 증가, 일부 환자의 내 알레르기성, 기능성 향상 등에 이미 산업적으로 응용되고 있다⁽⁴⁾.

콩 발효의 주요 균은 널리 알려진 바와 같이 *Bacillus*

Corresponding author : Seong-II Lim, Division of Chemistry and Biotechnology, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Songnam, Kyonggido 463-420, Korea

속 균주들로서 여러 다양한 세포외 및 세포내 protease를 생산하는데, 여기에는 alkaline protease(subtilisin), neutral metalloprotease 그리고 esterase가 있으며^(3,5-7), 특히 subtilisin protease는 세제 및 여러 분야에 응용되고 있다. 그러나 본 연구팀에서는 전통 장류의 과학화 연구에서 메주로부터 *Bacillus subtilis*보다 단백질 가수분해능이 뛰어난 *Aspergillus wentii*를 분리·동정한 바 있다⁽⁸⁾.

이에 본 연구에서는 대두단백질의 가수분해물의 기능특성의 개선과 식품으로의 이용성을 증가시키기 위하여, 기존의 단백질 분해효소와는 다른 우리나라의 전통 메주에서 분리한 균주가 생산하는 protease에 의해 분해되는 대두단백질 가수분해물의 특성과 이용성 연구의 일환으로, 우리 나라 전통메주에서 분리한 *Aspergillus wentii*가 생산하는 protease를 분리·정제하고 그 특성을 조사하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시균주

재래식 메주 유래의 균주로 유 등⁽⁸⁾이 분리한 *Aspergillus wentii*를 실험에 사용하였다.

효소생산조건

기본배지는 밀기울 배지를 사용하였다. 밀기울 10g과 1% glucose 용액 10 mL를 혼합하여 15 lbs에서 1 hr 가압살균한 후 공시균을 1백금이씩 접종하여 30°C에서 배양하였다. 단 배양시간별 실험 이외에는 배양시간을 4일간으로 하였다. 조효소액은 배양된 밀기울 배지에 3배(w/v)의 20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)를 가하여 균질화 시킨 후, 4°C에서 6시간 교반하여 효소를 추출하고 밀기울을 cheese cloth로 분리한 다음 16,000×g에서 30분간 원심분리하여 얻었다.

단백질 분해 효소의 정제

효소의 정제는 open column이 장착된 ISCO사(미국)의 ProTeam LCTM을 이용하여 정제하였다. 먼저, 원심분리한 조효소액 전량을 20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 평준화시킨 QAE 및 SP Sephadex 이온교환 수지 column(2.6×55 cm)에 통과 시켜 비흡착성 활성단백질을 분획한 다음, 이를 동결건조한 후, 상기 buffer로 평준화시킨 Sephadex G-100 column(2.6×55 cm)을 이용하여 2차에 걸쳐 gel filtration하여 protease 활성이 검출된 부분을 분획하여 *Aspergillus wentii*가 생산하는 protease를 정제하였다.

단백질 가수분해 효소의 활성

효소활성측정은 Hagihara의 방법⁽⁹⁾에 준하여 측정하였다. 즉, 효소액 0.5 mL에 0.1 M phosphate buffer(pH 6.2) 1 mL를 가한 다음, 기질용액(0.6% Hammarstein casein, pH 6.2)를 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.44 M trichloroacetic acid(TCA) 2.5 mL를 넣어 반응을 중지시키고 실온에서 10분간 방치한 다음 원심분리시켜 상등액 1 mL에 0.55 M Na₂CO₃ 용액 10 mL와 1 mL의 1 N Folin & ciocalteus' reagent 용액을 넣어 37°C에서 30분간 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 단위는 37°C에서 효소액 1 mL가 1분 동안에 1 µg의 tyrosine을 유리시키는 것을 1 unit로 하였다.

단백질의 정량

단백질의 정량은 Lowry 방법⁽¹⁰⁾에 따라 측정하여 bovine serum albumin을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 단백질 함량을 계산하였으며, 효소 정제과정중의 단백질의 농도는 spectrophotometer를 사용하여 280 nm에서 흡광도로 측정하였다.

전기영동

단백질 가수분해 효소의 분리 정도와 분자량을 구하기 위하여 Laemmli의 방법⁽¹¹⁾에 준하여 Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 수행하였고, Coomassie brilliant blue R-250(Coomassie brilliant blue R-250 2.5 g/L의 methanol : acetic acid : water = 5 : 1 : 5의 용액)을 사용하여 단백질 밴드를 염색하고, 탈색은 용액 I (methanol : acetic acid : water = 5 : 1 : 5)으로 15분간 세척후, 계속해서 용액 II (methanol : acetic acid : water = 2 : 1 : 7)로 30분, 용액 III (10% acetic acid)으로 하루 밤 탈색하였다. 이때 stacking gel과 separating gel의 농도는 각각 4.5%, 12%이었다. 분자량 marker는 Sigma사로부터 구입한 prestaining marker로서 phosphorylase B(M.W. : 102,000), bovine serum albumin(M.W. : 81,000), ovalbumin(M.W. : 46,900), carbonic anhydrase(M.W. : 32,700), soybean trypsin inhibitor(M.W. : 30,200), egg lysozyme(M.W. : 24,000)이 혼합된 것을 사용하였다.

효소의 특성조사

pH의 영향은 universal buffer pH 2.0-12.0까지의 범위에서 효소와 기질을 혼합하여 37°C, 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였으며, pH 안정성은 효소액을 pH 2.0-12.0까지의 범위에서 각 pH별로 30°C에서

1시간 정치한 후 pH 8.0으로 환원시킨 다음, 37°C에서 30분간 효소액과 기질을 반응시켜 잔존 효소활성을 측정하였다. 온도의 영향은 pH 8.0의 0.1M Tris-HCl buffer와 효소, 기질을 혼합한 후, 20, 30, 40, 50, 60, 70°C의 각 온도에서 반응시켜 효소활성을 측정하였으며, 온도의 안정성은 각 온도에서 효소를 1시간 정치시킨 다음, 기질과 혼합 후, 37에서 30분간 반응시켜 잔존 효소활성을 측정하였다.

금속이온에 대한 영향은 각종 금속염을 2×10^{-3} M 되게 pH 6.0의 증류수에 녹이고 금속이온 용액 0.5 mL와 효소액 0.5 mL를 섞어 30°C에서 60분간 정치한 다음 잔존 효소활성을 측정하였으며 저해제의 영향은 0.5 mL의 각 종 저해제(0.2 mM과 2 mM)와 0.5 mL의 효소액을 30°C에서 30분간 반응시킨 다음 잔존활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소생산을 위한 최적조건

*Aspergillus wentii*의 protease 생산을 위한 최적 배양 온도 및 pH, 배양시간을 조사한 결과 Fig. 1에서와 같이 30°C와 pH 8.9에서 배양시 최대의 생산을 보였고 배양시간별 효소활성은 3-5일간 배양시 최대를 나타냈다. 배양시간별 활성은 차 등⁽¹²⁾과 이와 정⁽¹³⁾의 *Asp. fumigatus*와 *Asp. oryzae* KC-15의 alkaline protease가 72시간 배양시 최대활성을 나타내었다는 보고와 유사하였다.

Protease의 분리 및 정제

*Aspergillus wentii*가 생산하는 protease를 정제한 결과는 Table 1과 같다. 즉, *Aspergillus wentii*를 배양한 밀기를 배지로부터 조효소를 추출하고, 조효소액 전량을 20 mM Tris-HCl buffer로 평준화시킨 QAE Sephadex에 충전시켜 비흡착 활성단백질을 분획한 다음, 이를 다시 SP Sephadex 이온교환수지에 충전시켜 비흡착 활성단백질을 분획하였다. 그 결과, 비활성도는 96.1 unit/mg protein, 수율은 87.6%, 정제도는 12.3배였다.

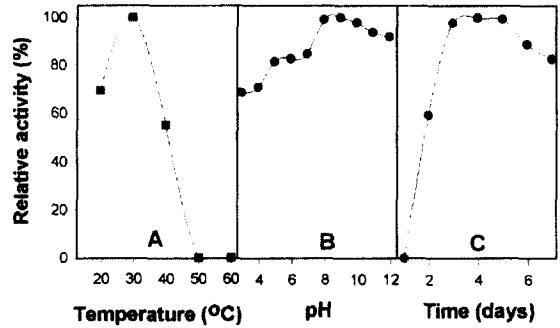


Fig. 1. Effect of temperature(A), initial pH(B) and incubation time(C) on the production of protease from *Aspergillus wentii*.

(A) Enzymatic activities at different temperatures were measured at pH 8.0 for 4 days incubation, (B) Enzymatic activities at different pH were measured at 30°C for 4 days incubation, (C) Enzymatic activities at different time intervals were measured at pH 8.0 and 30°C.

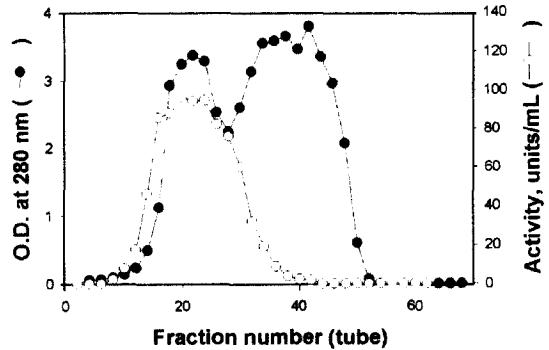


Fig. 2. 1st Sephadex G-100 chromatography.

About 10 mL of the enzyme solution was applied; column size, 2.6 × 55 cm; flow rate, 36.2 mL/hr; tube volume, 7 mL/tube; elution buffer, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0); active fraction, 14-30.

활성단백질을 동결건조한 후, 전량을 20 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)으로 평준화시킨 Sephadex G-100 칼럼에 전량(738 mg/3 mL)을 충전시킨 다음, 36.2 mL/hr의 유속으로 7 mL씩 분획한 결과, Fig. 2에서와 같이 두 개의 peak가 검출되었고 14~36번 사이의 분획에서 효소활성이 검출되었으며, 14-30번을 활성단백질

Table 1. Summary of purification of protease produced by *Aspergillus wentii*

Step	Total protein(mg)	Total activity(Unit)	Specific activity(Unit/mg)	Yield(%)	Purification(fold)
Crude Enzyme	10,387	81,000	7.8	100.0	1.0
QAE-Sephadex	6,511	80,047	12.3	98.8	1.6
SP-Sephadex	738	70,917	96.1	87.6	12.3
1st Sephadex G-100	350	66,600	190.3	82.2	24.4
2nd Sephadex G-100	305	64,950	213.0	80.2	27.3

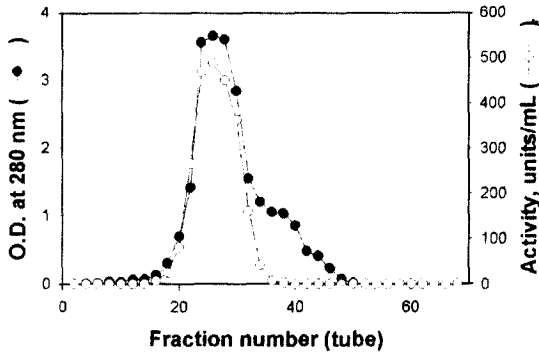


Fig. 3. 2nd Sephadex G-100 chromatography.
About 5 mL of the enzyme solution was applied; column size, 2.6 × 55cm; flow rate, 36.2 mL/hr; tube volumn, 7 mL/tube; elution buffer, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0); active fraction, 24-30.

Fig. 4. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of purified enzyme.
Marker: 1. Phosphorylase B(102 kDa), 2. Bovine serum albumin(81 kDa), 3. Ovalbumin(46.9 kDa), 4. Carbonic anhydrase(32.7 kDa), 5. Soybean trypsin inhibitor(30.2 kDa), 6. Lysozyme(24 kDa)

로서 분획하였다. 이때의 비활성도는 190.3 unit/mg, 수율은 82.2%, 정제도는 24.4배였다.

분획물을 등결전조한 후, protease를 순수분리하기 위해서 Sephadex G-100 칼럼에 전량을 재 충전시켜 rechromatography 하였다. 36.2 mL/hr의 유속으로 7 mL씩 분획한 결과, Fig. 3에서와 같이 20~32번 튜브에서 효소활성이 검출되었으며, 24~30번을 활성단백질로서 분획하였다. 이때의 비활성도는 213 unit/mg, 수

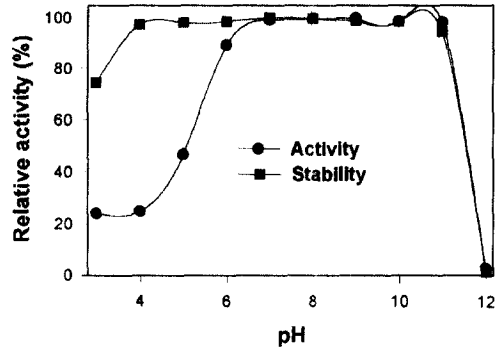


Fig. 5. Effect of pH on activity and stability of the protease from *Aspergillus wentii*.

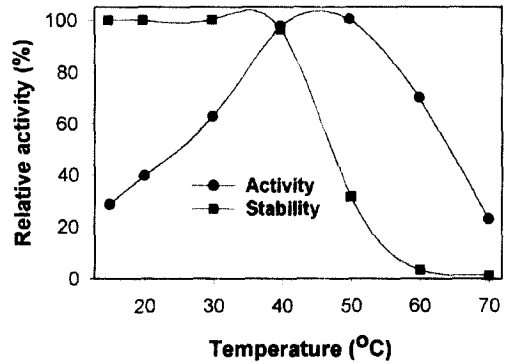


Fig. 6. Effect of temperature on activity and stability of the protease from *Aspergillus wentii*.

율은 80.2%, 정제도는 27.3배였다.

활성 분획물을 SDS-PAGE한 결과, Fig. 4에서와 같이 단일 밴드가 검출되어 정제 단백질임이 확인되었으며 본 효소의 분자량은 32 kDa인 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 메주에서 분리한 *Syn. racemosum*⁽¹⁴⁾ protease의 분자량 34 kDa, 토양에서 분리한 *Syn. racemosum*⁽¹⁵⁾, *Asp. fumigatus*⁽¹⁶⁾ 유래의 fungal protease의 분자량 38 kDa, 63 kDa와는 차이가 있었다.

효소의 특성

본 효소의 pH에 대한 영향을 조사한 결과, Fig. 5에서와 같이 최적 pH가 7.0~11.0으로서 본 효소는 alkaline protease인 것으로 나타났다. 이와 정⁽¹³⁾은 *Asp. oryzae*로부터 3종의 protease가 검출하였으며 최적 pH는 각각 3.4, 7.2, 9.0이었다고 보고한 바 있는데 본 연구에서 정제한 효소는 *Asp. oryzae*의 알칼리성 protease와 유사한 결과였다. pH 안정성은 Fig. 5에서와 같이 pH 4.0~11.0으로서 광범위한 pH 영역에서 효소가 안

Table 2. Effects of metal ions on the protease activity

Ion	Metal	Relative activity(%)
	None	100
Ag ⁺	AgNO ₃	99
Ba ⁺⁺	BaCl ₂ · 2H ₂ O	86
Ca ⁺⁺	CaCl ₂	105
Cu ⁺⁺	CuSO ₄ · 5H ₂ O	98
Fe ⁺⁺	FeCl ₃ · 6H ₂ O	103
K ⁺	K ₂ CO ₃	106
Mg ⁺⁺	MgSO ₄ · 7H ₂ O	103
Mn ⁺⁺	MnSO ₄	101
Pb ⁺⁺	Pb(CH ₃ COO) ₂	103
Zn ⁺⁺	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	100

Table 3. Effects of various inhibitors on the protease activity

Reagent	Relative activity(%)	
	0.2 mM	2 mM
Control	100	100
Phenylmethanesulfonyl fluoride	84	14
Ethylenediaminetetraacetic acid	95	93
2,4-Dinitrophenol	100	99

The reaction mixture, consisted of 0.5 mL enzyme solution and 0.5 mL inhibitor solution (2 mM), was incubated at 30°C for 30 min and the residual activity was determined.

정한 것으로 나타났다. 이와 정⁽¹³⁾의 *Asp. oryzae* 유래의 alkaline protease의 pH 안정범위는 6.0~11.0이었으며 *Asp. saitoi*의 protease II의 pH 4.5~10.5에서 protease 활성이 최대로 유지되어 *Asp. wentii* 유래의 protease와 pH 안정범위와 유사한 결과였다.

효소활성에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과, Fig. 6과 같이 최적온도는 50°C였으며 50°C 이상에서 점차 효소활성이 감소하였다. *Asp. oryzae*⁽¹³⁾의 alkaline protease의 최적온도는 40°C이며, *Asp. awamori* U-3⁽¹⁷⁾의 산성 protease는 45°C로서 대부분의 사상균 protease의 최적온도가 40~55°C인 것과 유사한 결과를 얻었다. 한편, 열에 대한 안정성을 조사한 결과, Fig. 6과 같이 40°C 이상에서 급격히 실활되어 고온에서 불안정한 것으로 나타났다. *Asp. oryzae*의 산성 protease와 알칼리성 protease의 경우 60°C에서 10분간 처리로 완전히 실활⁽¹⁸⁾되었으며 *Asp. awamori* U-3의 protease는 60°C에서 10분간 처리로 약 55%가 실활⁽¹⁷⁾되는 것과 비교해 보면 본 균주가 생산하는 효소는 이들과 유사하였다.

금속이온에 대한 영향은 Table 2와 같이 본 효소는 금속이온에 대부분 영향을 받지 않았다. Kazuo 등⁽¹⁸⁾은 *Asp. niger*가 분비하는 알칼리성 protease가 Ca²⁺에 의해서 활성이 증대 또는 보호된다는 보고한 바 있

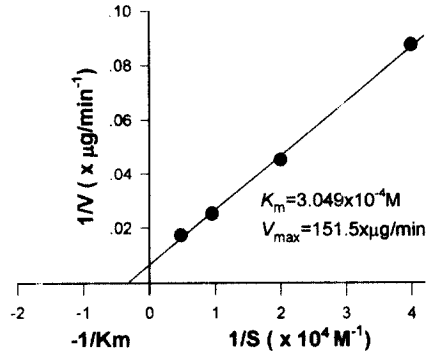


Fig. 7. Lineweaver-burk plot for hydrolysis of Hammarstein casein by protease from *Aspergillus wentii*.

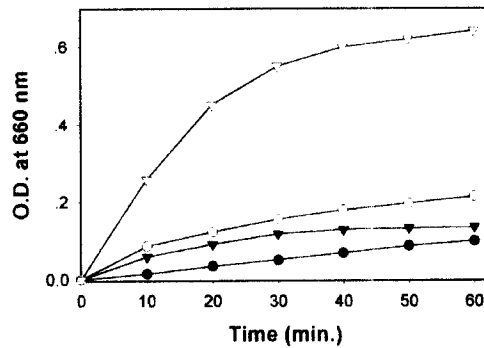


Fig. 8. Hydrolysis of various substrate by the protease from *Aspergillus wentii*.

나 본 효소는 이와 상이한 결과로 나타났다.

효소활성에 영향을 미치는 저해제 중, serine protease 저해제인 phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF), metal protease 저해제인 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 말단 아미노산잔기가 활성부위인 효소의 저해제인 2,4-dinitrophenol(2,4-DNP)를 선정하여 *Asp. wentii*가 생산하는 protease 활성에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 Table 3와 같이 본 protease는 PMSF에 의해 특이적으로 저해되어 활성이 86% 실활되는 것으로 나타나 본 효소는 촉매부위에 활성 serine을 가진 serine protease인 것으로 시사되었다.

기질농도와 효소활성과의 관계를 검토하기 위하여 Hammarstein casein을 0.25 × 10⁻⁴~4.0 × 10⁻⁴ M로 기질농도를 달리하였을 때 효소활성의 변화를 측정 한 후 Lineweaver-Burk plotting한 결과, Fig. 4와 같이 Km값이 3.049 × 10⁻⁴ M, Vmax값은 151.1 µg/min이었다. 이와 같은 결과는 차와 최⁽¹²⁾의 *Asp. fumigatus*가 생산하는 protease의 Km값이 8.33 × 10⁻⁴ M, Vmax값이 47.62 µg/min인 결과와 임 등⁽¹⁹⁻²¹⁾의 재래식 메주에서 분리한 *Muc.*

racemosus (K_m 값, $0.9 \times 10^{-4} M$; V_{max} 값, $5.93 \mu g/min$), *Syn. racemosum* (K_m 값, $0.6 \times 10^{-4} M$; V_{max} 값, $2.14 \mu g/min$), *B. subtilis* (K_m , $5 \times 10^{-4} M$; V_{max} , $100 \mu g/min$)의 H. casein을 이용한 protease의 kinetic parameter와 비교해 볼 때 효소반응속도가 높은 것으로 나타났다.

본 효소의 기질특이성은 0.6%의 H. casein과 bovine serum albumin(BSA)을 제조하여 시간별 효소활성을 측정하여 조사한 결과, Fig. 5에서와 같이 BSA 보다 H. casein을 기질로써 더 잘 가수분해하였다. 이는 차와 취⁽¹²⁾가 *Asp. fumigatus*의 alkaline protease가 hemoglobin 보다 casein에 기질특이성을 가진다고 보고한 것과 유사하였다.

요 약

한국의 재래식메주로부터 분리·동정한 *Aspergillus wentii*가 생산하는 protease를 정제하고 그 특성을 조사하였다. 기본배지[밀기울 : 1% glucose 함유 $H_2O = 1 : 1$ (w/v)]에서의 효소생산 최적조건은 pH 9.0, 30°C, 4일이었다. 효소의 정제는 먼저 배양 밀기울로부터 20 mM phosphate(pH 8.0)로 효소를 추출하고 QAE-Sephadex와 SP-Sephadex의 ion exchange chromatography로 비흡착성 활성단백질을 분리한 후 두차례의 Sephadex G-100 gel filtration로서 분자량 약 32,000(SDS-PAGE분석 : 단일밴드)의 비활성도 213 unit/mg, 정제배수 27.3배로 효소를 정제하였다. 본 효소의 K_m 값은 $3.049 \times 10^{-4} M$, V_{max} 값은 $151.1 \mu g/min$ 이었으며 ISP, hemoglobin, bovine albumin 보다 casein에 대해 가수분해력이 높은 것으로 나타났다. 정제효소의 최적작용 pH와 온도는 pH 9.0, 50°C였으며 pH 4.0~11.0의 범위와 40°C이하에서 안정하였으며 효소활성은 금속이온에 의해 영향을 받지 않았고 2 mM의 phenylmetanesulfonyl fluoride에 의해 86% 실활되었다. 이 결과로부터 본 효소는 효소활성부위가 serine의 OH기인 serine protease인 것으로 밝혀졌다.

감사의 글

본 연구는 1999년도 농림기술개발사업 3차 기획과제 연구비에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 이에 깊이 감사드립니다.

문 헌

1. Messina, M. Modern applications for an ancient bean

- soybeans and the prevention and treatment of chronic disease. *J. Nutr.* 125: 567-571 (1995)
2. Lee, H.J. Health functional peptides from foods. Proceed. IUFOST '96 Regional Symp. on Non-Nutritive Health Factors for Future Foods. pp192-200, Oct. 10-11. Seoul, Korea (1996)
 3. Hiroshi, S and Kadota, H. Intracellular protease of *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.* 40: 1047-1052 (1976)
 4. Shon, D.H. Physiological active peptide from food protein. *Food Technology* 7: 25-29 (1994)
 5. Mantsala, P. and Zalkin, H. Extracellular and membrane-bound proteases from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 141: 493-497 (1980)
 6. Prestidge, L., Gage, V. and Spizizen, J. Protease activities during the course of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 107: 815-819 (1971)
 7. Strongin, A.Y., Izotova, L.S., Abramov, Z.T., Gorodetsky, D.L., Ermakova, L.H., Baratova, L.A., Belyanova, L.P. and Stepanov, V.M. Intracellular serine protease of *Bacillus subtilis*: sequence homology with extracellular subtilisin. *J. Bacteriol.* 133: 1401-1404 (1978)
 8. Yoo, J.Y., Jung, H.J., Ahn, C., Whang, J.J., Lee, S.S. Study on the commercial scale production of *Meju* for Korean fermented soybean products. Research report of MOST (1998)
 9. Hakiyara, B. Method of enzyme vol. II, Asahousyoten, Tokyo (1956)
 10. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-269 (1951)
 11. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970)
 12. Cha, W.S. and Choi, C. Characteristics and action pattern of protease from *Aspergillus fumigatus*. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 18: 348-355 (1989)
 13. Lee, M.J. and Chung, M.J. Studies on the production of protease by *Aspergillus oryzae* KC-15 and characteristics of the enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 8: 77-85 (1980)
 14. Lim, S.I. and Yoo, J.Y. Purification of the protease from *Syncephalastrum racemosum*. *Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 44th fall symposium (1998)
 15. Ho, H.C., Chen, L.Y., and Liao, T.H. Identification of a fungal protein of *Syncephalastrum racemosum* as Aspartic protease. *Arch. Biochem. Biophys.* 334: 97-103 (1996)
 16. Cha, W.S., Cho, Y.J., and Choi, C. The production of alkaline protease by *Aspergillus fumigatus* and purification of enzyme. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 18: 279-286 (1989)
 17. Fukumoto, J., O. Tsuru and Yamamoto, T. Studies on mold protease. Part I. Purification, crystallization and some enzymatic properties of acid protease of *Rhizopus chinesis*. *Agric. Biol. Chem.* 31: 710-717 (1967)
 18. Kazuo, S., Kyo, S. and Kinichi, M. Purification and some properties of serine protease from a mutant of

- Aspergillus niger*. J. Ferment. Technol. 63: 479-485 (1985)
19. Lim, S.I., Kwon, D.Y. and Yoo, J.Y. Production and characterization of the protease from *Mucor racemosus* in Korean traditional meju. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. '98 fall symposium (1998)
20. Lim, S.I. and Yoo, J.Y. Characterization of the protease from *Syncephalastrum racemosum* in Korean traditional meju. Kor. Soc. Food Sci. Nutr., 44th fall symposium (1998)
21. Lim, S.I. and Yoo, J.Y. Characterization of the protease from *Bacillus subtilis* in Korean traditional meju. Kor. J. Food Sci. Technol., 61st symposium (1998)
-
- (1999년 6월 28일 접수)