

된장으로부터 Angiotensin 전환효소 저해제 생산 세균의 분리 및 특성

김용석 · 이창호 · 박희동
경북대학교 식품공학과

Isolation and Characterization of a Bacterium from Korean Soy Paste *Doenjang* Producing Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme

Yong-Seok Kim, Chang-Ho Rhee and Heui-Dong Park
Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University

About 100 bacterial strains producing proteolytic enzymes were isolated from Korean traditional soy paste *Doenjang*. Among them, strain SYG3 producing the highest level of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor into the culture medium was selected and identified as *Bacillus pumilus* according to the Bergey's manual of systematic bacteriology. Soybean powder as a nitrogen source and glucose as a carbon source supported high level of ACE inhibitor production. The presence of 3% NaCl also enhanced the production of ACE inhibitor in the medium. The optimum initial pH of the medium and culture temperature for the production of ACE inhibitor were 7.0 and 32°C, respectively. The maximal level of ACE inhibitory effect was obtained after 36 hours of cultivation under the optimized conditions, which was about 98% of inhibition ratio.

Key words: ACE inhibitor, *Bacillus pumilus* SYG3, soybean paste, *Doenjang*

서 론

우유와 대두 등의 천연단백질에서 얻어지는 펩타이드는 생체내에서 각종의 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며 특히 고혈압 억제와 관련된 펩타이드의 기능 특성에 관하여 최근 많은 연구보고가 있다⁽¹⁻⁹⁾. 전체 고혈압 환자의 약 90% 이상을 차지하는 본태성 고혈압은 교감신경계의 활성화, Na⁺ 배설 호르몬 및 Na⁺ 운반 기작, 세포내 Ca²⁺와 Na⁺ 농도의 증가와 그리고 renin-angiotensin system 등의 기작에 의하여 발병하는 것으로 알려져 있다⁽²⁾. Renin은 angiotensinogen을 angiotensin I으로 분해하고 불활성의 angiotensin I은 angiotensin 전환효소(angiotensin converting enzyme, Kininase II, peptidyl dipeptide hydrolase, EC 3.4.1.15, 이하 ACE라 약함)에 의해 COOH 말단 dipeptide(His-Leu)가 절단되어 강력한 혈관 수축 호르몬인 angiotensin II로 변하게 된다⁽²⁾. Angiotensin II는 동맥혈관을 수축하며 혈압을 상승시키고 부신에서의 aldosterone의 분비를 촉진하여 신장의 Na 및 수분

의 재 흡수를 증가시킴으로써 고혈압의 발병에 관여한다^(2,9). 또한 ACE는 혈관확장, 장의 운동성 증대 등의 효과를 가지고 있는 혈액 bradykinin의 dipeptide(Pro-Arg)를 분해하여 불활성의 heptapeptide로 전환시키기도 하는 것으로 알려져 있다⁽³⁾.

따라서 고혈압의 예방과 관련되어 있는 ACE 저해제의 분리 및 동정에 관하여는 많은 연구가 수행되어왔으며 특히 식품으로부터의 직접 추출⁽¹⁰⁻¹²⁾, 단백질 분해효소에 의한 저해제의 생산^(4,7,13-15) 및 활성 peptide의 합성⁽¹⁾에 관하여 많은 연구보고가 있다. 현재 ACE 저해물질로는 casein, 옥수수 내유 α-zein 등 식품 단백질의 가수 분해물^(4,7,13), 정어리 과육 및 오징어의 가수 분해물^(5,14), 담수어의 열수 추출물 및 그 가수 분해물⁽¹⁵⁾, 무화과 유액⁽⁶⁾, 결명자·대추·모과·생강 등의 기호음료 및 식물 생약성분⁽¹²⁾, 알로에의 아세틸 만난⁽¹⁶⁾, 굴 껍질 열수 추출물⁽⁸⁾ 등이 알려져 있으며 최근 우리 나라 전통 발효식품인 된장으로부터 생리활성 peptide의 추출에 대해 발표되고 있다^(10,11).

된장에는 대두 단백질을 분해할 수 있는 다양한 종류의 미생물이 서식하고 있으며 이들에 의하여 된장이 발효·숙성되어진다. 된장의 숙성에 관여하는 미생물에 관한 연구로는 된장의 풍미에 관여하는 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*와 일부 *Bacillus*속 등이 알려져 있다⁽¹⁷⁻²¹⁾. 최근 우리 나라 된장에도 ACE 저해물질이 함유되어 있다고 보고된 바 있

Corresponding author : Heui-Dong Park, Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, 1370 Sankyuk, Taegu 702-701, Korea
Tel: 82-53-950-5774
Fax: 82-53-950-6772
E-mail: hpark@knu.ac.kr

으나^(10,11) 이들의 생산에 관여하는 된장 미생물의 특성에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 우리나라 전통 발효식품인 된장의 새로운 기능성을 확인하기 위해 된장으로부터 ACE 저해제 생산능이 우수한 균주를 분리·동정한 후 이 균주의 특성과 ACE 저해 물질 생산 최적 조건을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

경상북도 일원의 일반가정에서 전통적인 방법으로 발효시킨 된장을 균원 시료로 하여 멸균 생리식염수(0.85% NaCl)로 3단 희석한 후, 분리용 배지(0.01% yeast extract, 0.01% glucose, 0.01% soybean powder, 1.5% skim milk, 2.0% NaCl, 1.5% agar)에 도말하여 30°C에서 2일간 배양한 후 균체 주변에 투명환이 형성되는 균주를 1차 분리하였다. 1차 선별한 분리 균주를 angiotensin 전환효소(ACE) 저해물질 생산용 배지(5.0% soybean powder, 0.5% glucose, 0.01% KH₂PO₄, 0.001% MgSO₄ · 7H₂O, 2.0% NaCl)에 30°C에서 120 rpm으로 24시간 배양한 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액의 ACE 저해 활성을 측정하여 활성이 가장 높은 균주를 최종 선별, 본 실험의 공시균주로 사용하였다.

분리균주의 동정

분리된 균주의 동정은 균의 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성을 조사하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 색인⁽²²⁾에 따라 동정하였다.

ACE 저해활성 측정

ACE의 조제를 위해 토끼 폐의 아세톤 분말 10 g을 50 mM sodium borate 완충액(pH 8.3) 100 mL에 현탁하여 4°C에서 24시간 교반한 후, 15,000×g로 30분간 원심 분리한 다음, 상등액을 냉동 보관하면서 ACE로 사용하였다⁽²⁾. ACE 저해활성의 측정은 Cushman과 Cheung 방법⁽⁹⁾을 사용하여 다음과 같이 행하였다. 배양 상등액 0.05 mL에 기질로서 15 mM Hippuryl-Histidine-Leucine 용액 0.05 mL를 가한 후, 37°C에서 5분간 방치하였다. 여기에 ACE 효소액을 0.05 mL 가하고 다시 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 1 N HCl 0.25 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 공시험은 배양 상등액 대신 증류수 0.05 mL를 사용하였으며 대조구는 1 N HCl을 0.25 mL 가한 후 효소액을 첨가하였다. 여기에 ethyl acetate 1.5 mL를 가하여 15초간 혼합한 후 5,000×g에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 1 mL 취하였다. 이 상등액을 80°C의 온도에서 완전히 건조시킨 후, 1 M NaCl을 3 mL 가하여 용해하여 228 nm에서 흡광도(Spectrophotometer, Model Hitachi U-2000, Japan)를 측정하여 다음 식에 의해 ACE 저해율을 환산하였다.

$$\text{Inhibition ratio(\%)} = (B-A)/(B-C) \times 100$$

A: The optical density in the presence of ACE and ACE inhibitory component

B: The optical density without ACE inhibitory component

C: The optical density without ACE

배양액의 각 분획별 ACE 저해활성의 비교

분리 균주의 배양 상등액이 나타내는 ACE 저해 활성이 본균이 생산하는 protease에 의한 ACE의 분해 때문인지 아닌지를 확인하기 위하여 배양액을 원심 분리하여 얻은 상등액을 사용하여 각 분획을 제조하였다. 각 분획은 배양 상등액과 membrane filter(YM10 membrane, Amicon, USA)로 여과한 여과액을 사용하였으며, 또한 이들을 95°C에서 10분간 열처리한 후 20,000×g로 10분 원심분리하여 얻은 상등액을 사용하여 ACE 저해 활성을 측정하였다.

ACE 저해물질 생산을 위한 최적조건 조사

분리 균주의 ACE 저해물질 생산을 위한 배지 조성의 최적 조건을 규명하기 위하여 ACE 저해제 생산용 배지를 기본 배지로 하여 각각의 조성을 다르게 첨가하여 사용하였다. 또한 ACE 저해 활성 물질의 생산에 미치는 배양온도의 영향을 검토하기 위하여는 초기 pH 7.0, 120 rpm으로 하고 배양 온도를 28, 30, 32, 34, 36°C로 조절하여 활성을 비교하였으며, 초기 pH의 영향은 배양온도 32°C, 진탕 속도를 120 rpm으로 하여 초기 pH를 5.0에서 10.0까지 1.0간격으로 조절하여 활성을 비교하였다. 진탕 속도의 영향을 조사하기 위하여 회전 진탕 속도를 0, 90, 120, 150, 180 rpm으로 각각 달리하여 초기 pH 7.0, 배양 온도 32°C로 하여 활성을 비교하였다.

결과 및 고찰

균의 선별

Angiotensin 전환효소(ACE) 저해제 생산 균주의 분리를 위해 경상북도 일원의 일반가정에서 전통적인 방법으로 발효시킨 된장 11종을 균원 시료로 사용하여 균 분리용 배지에 도말하여 30°C에서 2일간 배양 후 투명환이 생성된 균주 100 여종을 1차로 선별하였다. 1차 선별한 균주를 LB배지(tryptone 1.0%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%)에 도말하여 30°C에서 24시간 재 배양한 후, 균 분리용 배지에 도말하여 동일 조건으로 배양하여 투명환이 상대적으로 큰 균주 29종을 2차 분리하였다. 2차 분리된 균주들을 ACE 저해제 생산용 액체배지에서 30°C, 24 h, 120 rpm으로 진탕 배양하여 원심분리(10,000×g, 10 min)한 후, 상등액을 시료로 하여 ACE 저해 활성을 비교하여 저해활성이 가장 높은 균주 SYG3를 최종 선별하여 공시 균주로 사용하였다.

배양액의 각 분획별 ACE 저해활성

공시 균주를 배양한 배양액의 분획별 ACE 저해활성의 측정 결과는 Table 1과 같다. ACE 저해 활성은 각 분획별로 큰 차이를 나타내지 않고 모두 95% 이상의 저해 활성을 나타내었다. 열처리한 분획에서도 ACE 저해 활성이 유사하게 나타난 결과로 볼 때 본균이 생산하는 ACE 저해 활성 물질은 protease 때문이 아님을 알 수 있었다.

균의 동정

ACE 저해활성이 가장 우수한 균주 SYG3는 장간균으로서 운동성의 Gram 양성 세균이었다. 생리학적 성질로는 casein

Table 1. Comparison in the ACE inhibitory activity of culture supernatant and its filtrate prepared from culture broth of the isolated strain SYG3

Fraction		Inhibition ratio(%)
Culture supernatant	Non-treated	96.5
	Heat treated	96.0
Filtrate	Non-treated	97.2
	Heat treated	96.5

After the bacteria were cultivated at 30°C for 24 hours in the liquid media composed of 5.0% soybean powder, 0.5% glucose, 0.01% KH_2PO_4 , 0.001% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 2.0% NaCl, culture supernatant was prepared by centrifugation of the culture broth. The culture supernatant was then filtered through a membrane filter (YM10 membrane, Amicon, USA) to obtain filtrate. ACE inhibitory activities of the culture supernatant and its filtrate were assayed directly or after heat treated at 95°C for 10 min. This experiment was repeated twice in triplicate. The data are significantly different from the control at the level $P < 0.05$.

Table 2. Morphological and physiological characteristics of the isolated strain SYG3

Classification	SYG3
Morphological characteristics	
Form	Rod
Gram staining	+
Spore formation	+
Motility	+
Physiological characteristics	
Hydrolysis of casein	+
Hydrolysis of starch	-
Liquifaction of gelatin	+
Nitrate reduction	-
Indole production	-
Hydrogen sulfide production	+
Methyl red reaction	-
Citrate Utilization	+
Urease test	-
Catalase test	+
Oxidase test	-
O/F test	fermentation
Voges-Proskauer test	+
Optimum temperature for growth	30~35°C
Optimum pH for growth	6.0~8.0

+ ; positive, - ; negative

분해능, gelatin 액화능, 황화수소 생성능, catalase 시험, Voges-Proskauer 시험에서는 양성을 나타내었으며, indole 생성능, oxidase 시험, methyl red 시험, urease 시험에서는 음성을 나타내었다(Table 2). 탄소원 이용성을 조사한 결과 glucose, fructose, mannose, arabinose, xylose, ribose, glycerol, mannitol, maltose, salicine, cellobiose 및 trehalose 등에서는 산을 생성하였으나, lactose, galactose, rhamnose, sorbitol, sorbose, raffinose, inositol 및 xylitol 등에서는 산을 생성하지 않았으며 이상의 모든 탄소원으로부터 가스를 생성하지 않았다(Table 3). 이상의 형태 및 생리학적 특성을 토대로 하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 기

Table 3. Carbon utilization and fermentation by the isolated strain SYG3

Carbon sources	Acid production
Glucose	+
Sucrose	+
Lactose	-
Glycerol	+
D-Xylose	+
L-Xylose	-
Fructose	+
Galactose	-
D-Arabinose	-
L-Arabinose	+
Mannose	+
Ribose	+
Rhamnose	-
Sorbose	-
Maltose	+
Raffinose	-
Cellobiose	+
Melibiose	-
Trehalose	+
Gentiobiose	-
Dextrin	-
Starch	-
Sorbitol	-
Inositol	-
Xylitol	-
Mannitol	+
Erythritol	-
Dulcitol	-
Amygdalin	+
Salicin	+
Inulin	-
Ethanol	-
Methanol	-

+ ; positive, - ; negative

술된 분류 기준⁽²²⁾에 따라 동정한 결과, *Bacillus pumilus* 또는 그 유연군으로 동정되어 분리 균주를 *B. pumilus* SYG3라 명명하였다.

ACE 저해물질 생산 최적 조건의 조사

배지의 조성: *B. pumilus* SYG3 균주의 ACE 저해물질 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 ACE 저해물질 생산용 배지에 glucose, fructose, sucrose, lactose, maltose 및 soluble starch를 각각 최종농도가 0.5%(w/v)되게 첨가한 배지에 균을 배양하여 상등액 중의 ACE 저해활성을 측정하였다(Fig. 1A). 당의 종류에 따른 ACE 저해활성은 큰 차이는 없었으나 다른 탄소원에 비하여 sucrose의 경우에 그 활성이 다소 낮았으며 glucose의 경우에 94%로 가장 높은 저해활성을 나타내었다.

ACE 저해물질 생산에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위하여 질소원을 각각 5%되게 첨가한 배지에서 ACE 저해

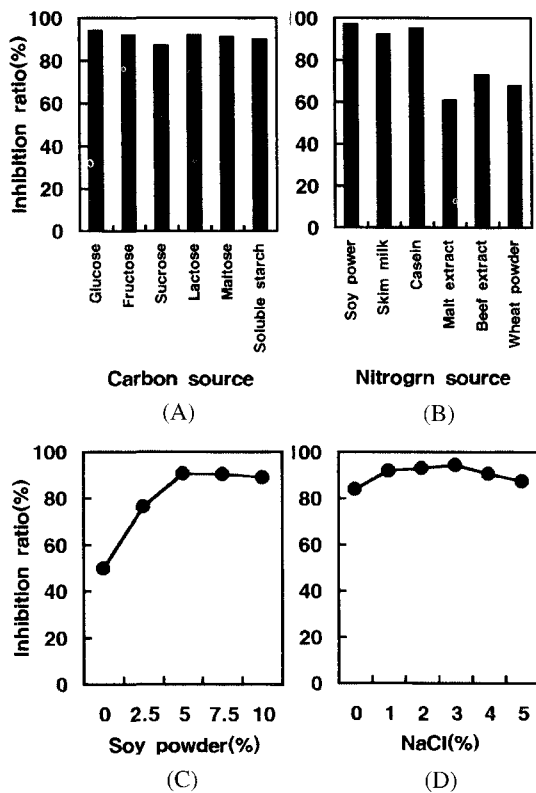


Fig. 1. Effect of various carbon (A) and nitrogen sources (B) as well as concentrations of soybean powder (C) and NaCl (D) on the production of ACE inhibitor by *B. pumilus* SYG3

활성을 측정하였다(Fig. 1B). 저해활성은 soybean powder 첨가시 97%로 가장 높은 활성을 나타내었으며, skim milk와 casein이 90% 이상의 활성을 나타내었으며, 이외의 질소원은 60~70% 정도의 저해활성을 나타내었다. ACE 저해물질 생산에 미치는 soybean powder의 영향을 조사하기 위하여 ACE 저해물질 생산용 배지에 soybean powder의 농도를 0~10% (w/v)까지 2.5% 농도간격으로 변화시켜 ACE 저해활성을 측정하였다(Fig. 1C). Soybean powder의 농도 5%(w/v)에서 가장 높은 저해활성을 나타내었으며 그 이상의 농도에서는 저해활성의 변화가 거의 없었다.

ACE 저해물질 생산에 미치는 NaCl의 영향을 조사하기 위하여 NaCl 농도를 0~5%(w/v)까지 1% 농도간격으로 조절된 배지에서 ACE 저해활성을 조사한 결과는 Fig. 1D와 같다. NaCl을 전혀 함유하지 않은 배지에서는 ACE 저해활성이 약 83%로 낮게 나타났으나 3%의 NaCl까지는 농도가 증가함에 따라 저해활성이 서서히 증가하는 경향을 보였다. 3% NaCl 농도에서 가장 높은 저해활성을 나타내었으며 그 이상의 농도에서는 감소하였다.

배양조건의 영향

초기 pH를 5.0에서 10.0까지 1.0 간격으로 조정하여 균을 배양한 후 ACE 저해활성을 측정한 결과(Fig. 2A) pH 5.0~9.0 사이에서 93~97%의 높은 활성을 나타내었으며 pH 7.0에서 활성이 가장 높았다. 그러나 초기 pH 10.0에서는 저해활성이 약 82%로서 활성이 급격히 감소하였다. 된장에서 분

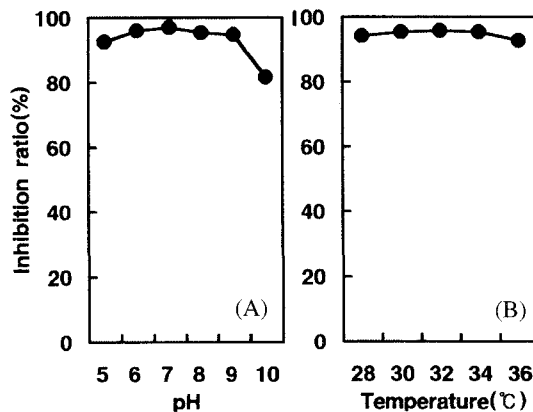


Fig. 2. Effect of initial pH (A) and temperature (B) on the production of ACE inhibitor by *B. pumilus* SYG3

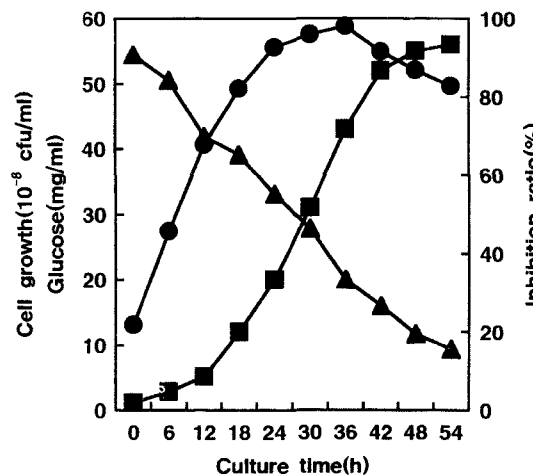


Fig. 3. Time course of the ACE inhibitor production by *B. pumilus* SYG3

During the bacterial culture for 54 hour under the optimized culture conditions, cell growth, ACE inhibition ratio and residual sugar content were monitored every 6 hour.

리한 *B. pumilus*의 protease는 현재까지 두 종류가 알려져 있다. 하나는 최적 pH가 9.0인 *Bacillus cereus*의 알칼리성 protease이며⁽²³⁾ 다른 하나는 최적 pH가 중성 부근인 *Bacillus* sp. SCB-3 균주와 *Bacillus* sp. KN 103N 균주가 분비하는 중성 protease이다⁽²⁴⁾. 본 연구에서 분리한 *B. pumilus* SYG3의 protease 역시 최적 pH가 7.0으로서 중성 protease일 것으로 추정된다.

ACE 저해물질 생산에 미치는 배양 온도의 영향을 조사하기 위하여 28°C에서 36°C의 온도 범위에서 균을 배양한 후 ACE 저해 활성을 측정하였다(Fig. 2B). ACE 저해활성은 32°C에서 약 96%로서 가장 높게 나타났으며, 28°C에서 36°C까지의 온도 범위에서 모두 90%이상의 높은 저해활성을 보여 온도에 따른 영향이 낮았다.

배양시간에 따른 ACE 저해활성의 변화

이상의 실험에서 얻어진 최적조건에서 *B. pumilus* SYG3의 배양시간에 따른 ACE 저해활성을 경시적으로 측정한 결과 ACE 저해활성은 균의 생육과 직접적인 관련이 있음을 알 수

있었다(Fig. 3). ACE 저해활성은 배양시간의 경과에 따라 큰 생육과 더불어 계속 증가하여 배양 36시간에 약 98%로서 최고에 도달하였으며 그 이후 다소 감소하는 경향을 나타내었다.

요 약

우리 나라 전통발효식품인 된장으로부터 angiotensin 전환 효소(angiotensin converting enzyme, ACE) 저해활성이 우수한 균주 SYG3를 분리하여 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성을 조사한 결과 *B. pumilus* 또는 그 유연군으로 동정되었다. 분리 균주의 ACE 저해물질 생산조건을 알아보기 위해 각종 배양조건에 따른 저해활성을 조사한 결과, 탄소원으로는 glucose, 질소원으로는 soybean powder에서 가장 높은 저해활성을 나타내었으며, skim milk와 casein에서도 비교적 높은 저해활성을 나타내었다. Soybean powder 농도에 따른 저해활성은 5%(w/v) 첨가시 가장 높은 저해활성을 나타내었으며, 그 이상의 농도에서는 저해활성의 변화가 거의 없었다. NaCl 농도는 3%(w/v) 첨가시 저해활성이 가장 높은 것으로 나타났으며 배양온도는 32°C, 초기 pH 7.0에서 가장 높은 저해활성을 나타내었다. 최적배지조건에서의 배양시간에 따른 ACE 저해활성은 배양 36시간에 약 98%로서 최고에 도달하였다.

문 헌

- Masanoli, K., Noriki, N. and Yasuo, A. Inhibitor of angiotensin converting enzyme by synthetic peptide fragments of human κ -casein. *Agric. Biol. Chem.* 54: 835-839 (1990)
- Cushman, D.W., Cheung, H.S., Sabo, E.F. and Ondetti, M.A. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin converting enzyme: carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry* 16: 54-84 (1977)
- Cohen, J.J. and Madias, N.S. Bradykinin-mediated effects of ACE inhibitor. *Kidney International* 42: 1020-1025 (1992)
- Maruyama, S. and Suzuki, H. A peptide inhibitor of angiotensin converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agri. Biol. Chem.* 46: 1393-1394 (1982)
- Matsui, T., Matsufuji, H., Seki, E., Osajima, K., Nakashima M. and Osajima, Y. Inhibition of angiotensin I converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolysates derived from sardin muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 922-927 (1993)
- Miyoshi, S., Ishikawa, H. and Tanaka, H. Angiotensin converting enzyme inhibitors derived from *Ficus carica*. *Agric. Biol. Chem.* 53: 2763-2767 (1989)
- Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. and Maruyama, S. Structure and activity of angiotensin converting enzyme inhibitors in an α -zein hydrolysate. *Agri. Biol. Chem.* 55: 1313-1318 (1991)
- Yoshihara, M., Hideo, M. and Katsumi, Y. Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in *Citrus unshiu* peelings. *Agric. Biol. Chem.* 49: 909-914 (1985)
- Cheung, H.S. and Chushman, D.W. Spectrometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20: 1637-1641 (1971)
- Suh, H.J., Suh, D.B., Chung, S.H., Whang, J.H., Sung, H.J. and Yang, H.C. Purification of ACE inhibitor from soybean paste. *Agri. Chem. Biotech.* 37: 441-446 (1994)
- Shin, Z.I., Ahn, C.W., Nam, H.S., Lee, H.J., Lee, H.J. and Moon, T.H. Fractionation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean paste. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 230-234 (1995)
- Do, J.R., Kim, S.B., Park, Y.H. and Kim, D.S. Angiotensin-I converting enzyme activity by the component of traditional tea material. *Korean J. Food Sci. Technol.* 25: 456-460 (1993)
- Yenm, D.M., Roh, S.B., Lee, T.G., Kim, S.B. and Park, Y.H. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of food proteins. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 22: 226-233 (1993)
- Suh, H.J., Cho, S. J., Whang, J.H., Lee, H. and Yang, H.C. Characterization of angiotensin converting enzyme inhibitor from squid hydrolysate. *Foods Biotechnol.* 6: 122-124 (1997)
- Kim, T.J., Yoon, D.H., Lee, D.S., Jang, Y.S., Suh, S.B. and Yeum, D.M. Angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of hot-water extract and enzymatic hydrolysates of fresh water fish. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 25: 871-877 (1996)
- Ryu, I.W. and Shin, Y.S. Inhibition effect of ACE (angiotensin converting enzyme) and kinetics of aloe acethylmannan. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 1269-1274 (1997)
- Park, J.S., Lee, M.Y., Kim, K.S. and Lee, T.S. Volatile flavor component of soybean paste (Doenjang) prepared from different type of strains. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26: 255-260 (1994)
- Shin, S.Y., Kim, Y.B. and Yu, T.J. Flavor improvement of soybean paste by the addition of *Bacillus licheniformis* and *Saccharomyces rouxii*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 17: 8-14 (1985)
- Song, J.Y., Ahn, C.W. and Kim, J.K. Flavor components produced by microorganism during fermentation of Korean ordinary soybean paste. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12: 147-152 (1984)
- Yoon, I.S., Kim, H.O., Youn, S.E. and Lee, K.S. Studies on the changes of N-compounds during the fermentation process of the Korean Doenjang. *Korean J. Food Sci. Technol.* 9: 131-137 (1977)
- Kwon, O.J., Kim, J.K. and Chung, Y.G. The characteristics of bacteria isolated from ordinary Korean soy sauce and soybean paste. *Agric. Chem. Biotechnol.* 29: 422-428 (1986)
- Murray, R.G.E., Brenner, D.J., Bryant, M.P., Holt, J.G., Krieg, N.R., Moulder, J.W., Pfennig, N., Sneath, P.H.A. and Staley, J.T. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 8th ed. Vol. II. Williams and Wilkins, Baltimore, USA (1986)
- Kim, S.J., Yoon, J.H., Lee, M.S. and Kim, H.B. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* secreting protease from Korean soybean paste. *Korean J. Microbiol.* 33: 136-141 (1997)
- Kim, H.R. and O, P.S. Isolation of neutral protease hyper-producing *Bacillus* sp. KN 103N and some properties of the enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19: 116-121 (1991)

(2000년 1월 20일 접수)