

## 간장으로부터 Angiotensin Converting Enzyme 활성 저해물질 생성 균주의 분리 동정

차명화 · 박정룡<sup>†</sup>

영남대학교 식품영양학과

### Isolation and Characterization of the Strain Producing Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor from Soy Sauce

Myung-Hwa Cha and Jyung-Rewng Park<sup>†</sup>

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

#### Abstract

This study was attempted to isolate and identify the strain revealing high angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity from various soy fermented foods, i.e. *meju*, soybean paste and soy sauce. Forty-two strains with morphologically different characteristics were selected and the ACE inhibitory and proteolytic activities were examined. Of the strains tested, SS103 which was isolated from soy sauce showed the highest ACE inhibitory and proteolytic activities and was finally selected for further studies. The SS103 strain showed motility, rod form and ellipsoidal spores. The shape of colonies on the agar media was irregular, mucoid and surface dull. The strain could grow under aerobic conditions of pH 5~9 and 10~50°C. Main cellular fatty acid was C<sub>15:0</sub> anteiso, C<sub>17:0</sub> cis and C<sub>17:0</sub> iso, which was 33.9%, 18.8% and 16.5%, respectively. Based upon these morphological, biochemical and cultural properties, SS103 was identified as a *Bacillus subtilis*. Optimum cultural condition of *Bacillus subtilis* SS103 was pH 8.0, 37°C and 48 hr.

Key words: *Bacillus subtilis*, ACE inhibitory activity, soy sauce

#### 서 론

간장, 된장을 비롯한 대두 발효식품은 오랜 역사를 가진 식품으로서 채식 위주의 식생활을 해 온 우리 민족에게는 단백질 급원으로서 그 영양학적 의의가 높은 식품이며, 이들은 각 지역의 기후나 식품에 대한 기호성 등에 따라 변화하며 오랜 시일 동안 내려왔다(1). 특히 우리 나라에서 제조되는 대두 발효식품은 전적으로 발효법에 의하여 만들고 있으므로 발효 미생물의 연구는 그 기초가 된다. 메주와 간장 중에서 서식하는 세균은 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* 및 *Bacillus citreus* 등이고 사상균은 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* 및 *Penicillium kaupscinskii* 등이며 효모는 *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces acidifaciens* 등이 보고되고 있다(2,3). 이들은 여러 가지 효소를 생성하여 발효식품의 맛이나 향기에 영향을 미칠 뿐만 아니라, 단백질과 같은 고분자 물질을 분해하여 각종 분해산물을 생성함으로써 이들의 다양한 생리활성 발현에도 영향을 미친다. 더욱이 최근 대두발효식품의 연구방향이 맛과 영양이라는 1차적인 관점에서 생리적 기능성으로 전환되

면서 발효미생물에 대한 인식도 새로워졌다(4). 즉, 강력한 생리적 기능성분을 생산하는 균주 선별은 우리나라 전통식품의 과학화와 발전이라는 효과는 물론 생리적 기능성이 강화된 발효식품의 개발이라는 측면에서도 효과를 기대할 수 있을 것이다. 특히 주요 성인병 중의 하나인 고혈압 예방효과를 갖는 혈압 강하 활성 펩티드의 존재가 된장 등의 대두발효식품에서 보고된 바 있고(1), 이들의 생성은 대두 발효식품에 존재하는 단백질을 가수분해하는 발효 균주에 의한 것일 가능성이 높다. 따라서 본 연구에서는 대두발효식품으로부터 혈압 저하 활성을 주도하는 우수한 균을 분리해 동정하였으며, 그 배양조건을 특성을 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재료 및 시약

균주 스크리닝에 이용된 메주, 된장, 간장은 대구/경북지역의 가정과 상점에서 구입하였다. ACE 저해활성 측정시 사용한 ACE(EC 3.4.15.1)는 rabbit lung powder(Sigma Co.)를 사용하였고, 기질로는 hippuryl-L-histidine-L-leucine(HHL,

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: jrpark@yu.ac.kr  
Phone: 82-53-810-2873. Fax: 82-53-813-3813

Sigma Co.)을 사용하였다.

#### 균주의 분리 및 선정

균주 스크리닝용 시료를 각각 1 g씩 멸균된 병에 담고 생리 식염수(0.85% NaCl) 100 mL를 넣어 shaker로 균질하게 현탁시켜 상징액만을 취해 단계회석한 다음 nutrient agar배지에 평판도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 여기서 분리된 형태적으로 차이가 있는 colony를 Horikoshi(5)가 사용한 균주 선정용 배지(glucose, 1 g; yeast extract, 0.5 g; peptone, 0.1 g; skim milk, 2 g; agar, 0.5 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3 g; MgSO<sub>4</sub>, 0.02 g; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 g; distilled water, 100 mL)에 도말하여 37°C에서 5~7일간 배양한 뒤 colony 주변에 skim milk의 분해로 생기는 투명환의 크기가 1 cm 이상인 것을 선별하였다. 1차 선별된 균주를 Kwon 등(6)이 사용한 향기형성배지(glucose, 1 g; polypeptone, 0.5 g; yeast extract, 0.5 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 g; MgSO<sub>4</sub>, 0.01 g; NaCl 2 g; soybean extract, 10 g; distilled water, 100 mL)에서 37°C, 48시간 동안 진탕배양하여 ACE 저해효과 및 protease활성을 비교조사하여 가장 활성이 높은 1종을 최종적으로 선별하였다.

#### 균주의 동정

선별된 균주는 Biomerieu사(프랑스)의 API 50 CH kit와 Vitek BACIL card를 사용하여 검색한 후 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(7)에 준해서 동정하였으며, 여기서 얻은 결과와 세포내 지방산 조성 분석을 통해서 얻은 결과를 종합해서 최종적으로 균주를 동정하였다. 균주의 지방산 조성 분석은 Stages와 Davis(8)의 방법에 준하였다.

#### 기본배지

효소 생산용 기본 배지는 Horikoshi(5)가 사용한 alkaline protease 생산 배지를 수정하여 사용하였다(Table 1).

#### 효소생산 최적조건

선별된 균주를 nutrient broth에서 24시간 배양한 종배양액을 효소 생산 기본 배지에 1%(v/v) 수준으로 접종하여 배양시간(5, 10, 24, 36, 48, 72, 96 hr), 배양온도(20, 28, 37, 55°C), 초기 배양액의 pH(4~12)에 따른 균체의 생육도, 효소의 생산성 그리고 ACE 저해 효과의 변화를 조사하였다. 또한 효소 생산에 미치는 통기량의 영향을 알아보기 위하여 진탕배양기(200 rpm)에서 500 mL flask에 배양액의 양을 50 mL에서 300 mL까지 조절하여 3회 실험하였다.

Table 1. Composition of basal medium for enzyme production

Constituents	Contents (g/L)
Glucose	10
Polypeptide	5
Yeast extract	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.05

#### 생육도 측정

순수분리된 *B. subtilis* SS103 균주의 종배양액을 1%(v/v) 농도로 접종하여 주어진 조건하에서 진탕배양하면서 일정시간 간격으로 생육도를 측정하였다. 종배양액 1%(v/v)에 해당하는 균체의 양은 1.6×10<sup>7</sup> cell/mL를 기준으로 하였으며 생육도의 측정은 spectrophotometer(Hitachi U-2000, Hitachi Co., Japan)를 사용하여 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 표시하였다.

#### ACE 저해활성의 측정

균주 스크리닝을 위한 각 균주의 ACE 저해 활성 측정 시료액은 균주를 접종하여 일정시간 동안 배양한 배지를 100°C에서 15분간 열처리하여 효소를 불활성화시킨 후 9000 rpm에서 20분간 원심분리하여 그 상징액을 여과(Whatman No. 41)하여 사용하였다. 기질과 ACE 조제는 Cushman과 Cheung의 방법(9)에 준하였으며 ACE 저해 활성 측정은 Horiuchi 등의 방법(10)을 이용하였다. 즉, 시료액 일정량에 Hip-His-Leu를 100 μL 가하여 37°C에서 5분간 preincubation한 후 100 μL의 ACE 효소액을 첨가하고 바로 교반한 다음 37°C의 진탕배양기에서 30분간 반응시켰으며 1 N HCl 0.1 mL로 반응을 정지시켰다. 대조구는 효소를 넣기 전 1 N HCl을 먼저 가하였으며 공시험은 시료액 대신 증류수를 사용하였다. 준비된 반응액을 Table 2의 HPLC 조건으로 측정하여 hippuric acid peak의 면적을 hippuric acid의 양으로 하여 저해율을 계산하였다. IC<sub>50</sub>은 ACE의 활성을 50% 저해할 수 있는 단백질 농도로 나타내었으며, 시료의 단백질 농도는 Lowry법(11)으로 측정하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \frac{B - S}{B - C} \times 100$$

B: 시료 대신 증류수 첨가시의 hippuric acid peak area  
C: 반응 정지 후 효소액 첨가시의 hippuric acid peak area  
S: 시료 첨가시의 hippuric acid peak area

#### 결과 및 고찰

##### 균주의 분리

메주, 간장 및 된장을 균주 분리용 시료로 사용하여 nu-

Table 2. Analytical condition of HPLC for the determination of ACE inhibitory activity

Instrument	Biochrom 20
Column	Cation exchange resin (4.6×200 mm)
Mobile phase	Gradient elution Buffer I: 0.2 N sodium citrate (pH 3.20) Buffer II: 0.2 N sodium citrate (pH 4.25) Buffer III: 0.2 N sodium citrate (pH 6.45) Buffer IV: 0.2 N sodium hydroxide
Flow rate	Buffer solution 35 mL/hr Ninhydrin solution 25 mL/hr
Wavelength	570 nm/420 nm
Sample injection	10 μL

trient agar 배지에서 배양한 뒤 생성된 colony를 분리하였다. Colony를 같은 배지에서 2회 이상 반복하여 배양하면서 분리하여 단일 균주만을 선택하였다. 이들 중 형태학적으로 차이가 있는 42종의 colony를 분리하여 균주 선정용 배지에 순수 배양하였다. 그 다음 clear zone이 1 cm 이상인 균주 16종을 단백질 분해 효소 생성균으로 선정하였다(Fig. 1). 이들 16종의 균주를 향기형성배지에서 ACE 저해활성 및 protease activity를 비교 분석한 결과(Table 3) 가장 높은 활성, 즉 84%의 ACE 저해활성과 0.015 mg/mL의 IC<sub>50</sub>, 그리고 75 units/mL의 protease activity를 갖는 균주 1종을 최종 선발하였다(Fig. 2).

#### 균주의 동정

본 균주의 형태학적 특성, 배양조건, 당 이용 특성 및 생화학적 특성은 Table 4와 같다. 본 균주는 운동성이 있는 gram 양성 간균으로 내생포자를 형성하는 형태학적 특성을 가졌으며, 배양학적 특성으로는 pH 5~9 사이에서 생육하였으며, 생육온도는 10~50°C로 내열성이 약한 중온성 균으로서의 특성을 보였으며, 그리고 10% NaCl에서도 생육이 양호한 호

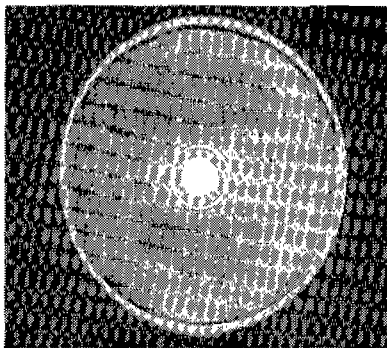


Fig. 1. Protease activity of *B. subtilis* SS103.

Table 3. ACE inhibitory effect of various strains isolated from meju, soybean paste and soy sauce

Strains	Sources	Protease activity (units/mL)	ACE inhibition rate (%)
MJ203	Meju	43.51 ± 0.71 <sup>1)</sup>	18.77 ± 0.96
MJ204	Meju	27.57 ± 0.75	20.53 ± 0.51
MJ121	Meju	69.93 ± 0.40	65.83 ± 2.45
MJ307	Meju	35.40 ± 0.44	29.27 ± 0.49
MJ311	Meju	22.70 ± 0.46	38.40 ± 0.99
MJ404	Meju	53.83 ± 0.78	42.49 ± 0.76
MJ413	Meju	28.23 ± 0.75	19.02 ± 0.32
SP101	Soybean paste	49.13 ± 0.93	50.57 ± 0.48
SP105	Soybean paste	58.63 ± 0.93	61.21 ± 1.21
SP204	Soybean paste	51.67 ± 0.38	53.55 ± 0.62
SP205	Soybean paste	40.47 ± 0.72	37.56 ± 0.63
SP308	Soybean paste	46.60 ± 1.20	39.37 ± 0.74
SS103	Soy sauce	75.74 ± 0.61	84.32 ± 0.57
SS109	Soy sauce	53.27 ± 0.12	44.73 ± 0.42
SS204	Soy sauce	45.60 ± 0.70	60.11 ± 0.20
SS307	Soy sauce	34.80 ± 0.26	25.92 ± 0.20

<sup>1)</sup>Each value represents the mean ± S.D. of three plates.

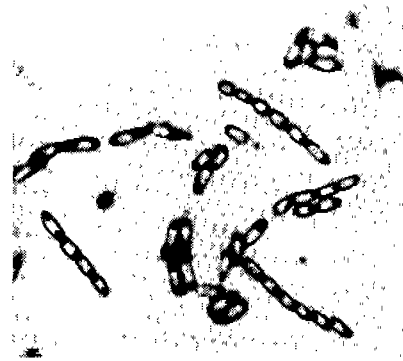


Fig. 2. Morphology of *B. subtilis* SS103.

염성 균의 특성을 나타냈다. 생화학적 특성은 glucose, sucrose, mannitol 및 sorbitol 등을 이용하여 산을 생성하나 galactose와 arabinose 등은 이용하지 못하였으며, starch, casein 및 gelatin을 빠르게 가수분해하였으며, catalase의 활성을 보였다. 질산 환원성은 양성이었으며, citrate와 propionate의 이용성은 음성의 특성을 나타냈다. 이상의 결과로부터 본 균주는 Bergey's manual 상의 *Bacillus sp.*의 특성과 일치하였다(7). 그리고 균체의 지방산 조성 분석 결과는 Table 5와 같이 주로 iso-fatty acid와 anteiso-branched fatty acid로 구성되었으며 C<sub>15:0</sub> iso-fatty acid는 15.2%, C<sub>15:0</sub> anteiso-fatty acid는 33.9%, C<sub>17:0</sub> iso-fatty acid는 16.5%, C<sub>17:0</sub> anteiso fatty acid는 18.8%가 포함되어 있다. 이와 같이 분석한 지방산 조사 결과를 MIDI software program package에 적용한 결과 본 실험 균주는 99.5% similarity로 *Bacillus subtilis*와 가장 유사한 균주인 것으로 동정되었다. 따라서 본 균주를 *Bacillus subtilis* SS103으로 명명하였다. 메주, 된장 및 간장은 여러 종류의 미생물을 이용하여 발효한 대표적인 우리나라의 전통 발효식품으로 이의 과학적인 연구를 위해 발효미생물에 대한 연구가 많이 이루어졌다. Cho와 Lee의 연구결과(2,3) 메주와 간장에 존재하는 세균으로 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* 및 *Bacillus pumilus* 등이 보고되었으며, 특히 채래식으로 제조한 메주는 벗짚 등에서 유래한 *Bacillus sp.*가 분비하는 중성 및 알칼리성 protease가 가장 중요한 단백질 분해효소원이며, *Bacillus* 속의 세균이 대두 발효식품의 향을 결정하는 주요 미생물이라고 보고하였다.

#### 효소생산 최적조건

효소생산 기본배지를 이용하여(37°C, pH 7.0) 배양시간에 따른 *B. subtilis* SS103의 생육 정도와 단백질 분해 효소의 생성을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. SS103의 증식은 배양 24시간에 이르러 최대치를 나타내었으나 단백질 분해효소의 활성은 배양 48시간이 경과한 이후에 최대활성을 보였고 균체가 거의 사멸한 이후에도 활성은 거의 유지되는 것으로 조사되었다. 본 균주인 SS103이 분비하는 효소는 균체의 대수증식 기간 동안에는 효소의 활성이 검출되지 않았다. 이는 SS103이 포자형성균으로서 포자 형성기에 효소 단백질의 분비가

**Table 4. Morphological, cultural and biochemical characteristics of *B. subtilis* SS103 isolated from soy sauce**

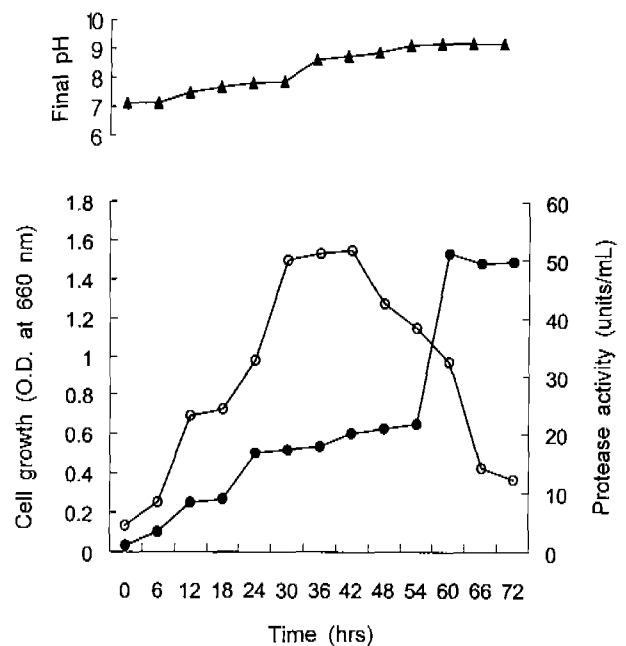
<b>Morphological characteristics</b>	
Form: rods	Mobility: (+)
Gram stain: (+)	Spores: (+) (ellipsoidal, central)
Sporangium swollen: (-)	Parasporal crystals: (-)
Colonies on agar media: irregular, mucoidal and surface dull	Size: 2.5~3.0 μm×0.6~0.7 μm
<b>Cultural characteristics</b>	
Growth pH: 5~9	pH in VP broth: 5.8(+), 7.2(-)
Growth at pH 6.8 nutrient broth: (+)	pH 5.7 nutrient broth: (+)
Anaerobic growth: (-)	NaCl and KCl required: (-)
Acid forms:	Growth temperature: 10~50°C
D-Glucose: (+)	Thermophilic: (-)
D-Xylose: (+)	Anaerobic growth: (-)
D-Mannitol: (+)	Growth in NaCl 0~10%: (+)
<b>Utilization of sugar</b>	
D-Glucose: (+)	Sucrose: (+)
D-Mannitol: (-)	Sorbitol: (+)
D-Ribose: (-)	D-Xylose: (-)
Lactose: (-)	D-Fructose: (+)
Tagatose: (-)	Inositol: (-)
Galactose: (-)	Arabinose: (-)
Maltose: (+)	Raffinose: (-)
Salicine: (+)	Amygdalin: (-)
Inulin: (-)	Trehalose: (+)
Palatinosc: (+)	Mandelic acid: (+)
Arabitol: (-)	Polyaminohydrosterepin: (+)
N-acetyl glucosamine: (+)	Esculin: (+)
<b>Biochemical characteristics</b>	
Starch hydrolysis: (+)	Casein hydrolysis: (+)
Urea: (-)	Gelatin hydrolysis: (+)
Catalase: (+)	Indol: (-)
Gas from glucose: (-)	Gas from nitrate: (-)
KIA: K/A	Citrate utilization: (-)
Nitrate reduced to nitrate: (+)	Propionate utilization: (-)

**Table 5. Cellular fatty acid profile of *B. subtilis* SS103**

Fatty acid	Contents (%)
15:0 iso	15.2
15:0 anteiso	33.9
16:0 iso	6.2
16:0 anteiso	5.5
17:0 iso	16.5
17:0 cis	18.8
18:1 cis	0.4
18:1 cis & 18:1 trans	1.0
18:0	0.3
unknown	2.0

급격히 증가하는 양상을 나타내는, 다시 말해 균체의 lysis로 인하여 단백질 분해 효소가 유리되어 활성이 검출되는 것으로 사료된다(12). 이는 Yukio 등(13)이 *Bacillus sp.* 유래의 serine protease 생산에 대한 연구에서 균체의 증식과 효소의 생성 사이에 time lag 현상을 나타낸 결과와 유사한 양상이다.

ACE inhibitory 활성은 최대 protease 활성을 나타내는 배양 48시간에 최대값을 나타내었는데 이는 ACE 저해 효과가 특정구조와 길이를 가진 peptide에 의한 것이라는 여러 연구 결과를 바탕으로 비교해 볼 때, 일단 protease에 의한 단백질



**Fig. 3. Time course of protease activity, cell growth and final pH.**

○ Cell growth, ● Protease activity.

의 가수분해로 peptide의 생산이 선행되어야 한다는 점을 전제로 하므로 protease의 활성이 높은 경우에 ACE inhibitory activity도 향상되는 것으로 사료된다(Fig. 4). 그리고 배양시간에 따른 최종 pH를 검토한 결과 protease의 생산이 시작되면서 pH가 증가하기 시작하여, protease가 생합성되는 동안 pH의 상승 속도가 빨라지지만 protease의 생산이 중단되면서 pH의 상승 속도가 둔화되어 Yukio 등(13)의 연구결과와 일치하였다.

효소생성 기본배지에 nutrient broth에서 24시간 배양한 1%(v/v)의 종균을 접종한 후 48시간 배양하여 SS103의 생육도와 protease 활성에 미치는 배양 초기의 pH의 영향을 조사한 결과(Fig. 5) pH 7.0~9.0인 경우 높은 protease 활성을 나타내었다. 특히 pH 8.0에서 protease 활성이 60.7 units/mL로 최고에 이르렀으나 pH 10.0은 14.3 units/mL로 급격히 감소하였고 pH 6.0 이하에서는 활성이 나타나지 않았다. Yukio 등(13)은 pH 7.0~9.0의 범위에서 균체 생성량과 효소의 활성

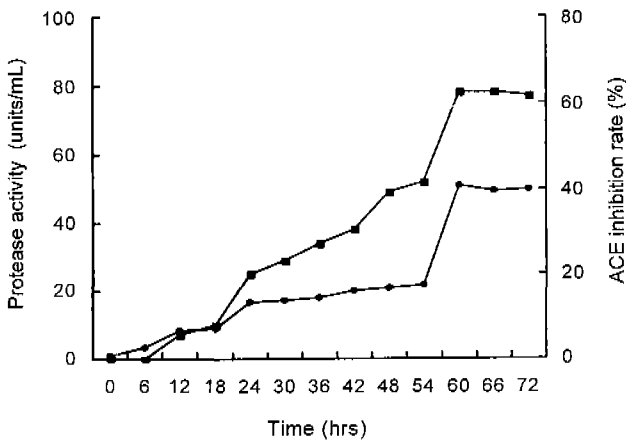


Fig. 4. Time course of protease activity and ACE inhibition rate.  
● Protease activity, ■ ACE inhibition rate.

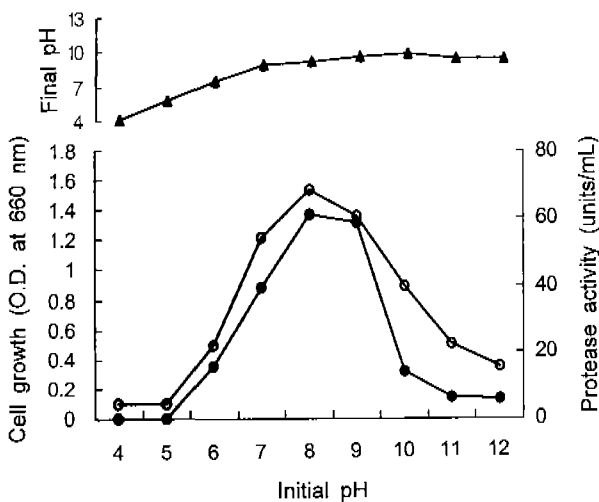


Fig. 5. Effect of initial pH on cell growth and protease activity.  
○ Cell growth, ● Protease activity.

이 최대를 나타내는 *Bacillus sp.*를 보고한 바 있고 그 밖에 여러 연구에서(14,15) *Bacillus sp.*의 alkaline protease가 초기 배양 pH가 알칼리인 영역에서 최대활성을 갖는다고 보고되어 있어 본 실험의 결과와 유사하였다.

효소생성 기본배지의 pH를 8.0으로 조정된 다음 20~55°C에서 48시간 배양한 결과(Fig. 6) 효소의 활성은 37°C에서 가장 높은 값을 나타내었는데 이는 *Bacillus sp.*의 alkaline protease가 35°C에서 최대활성을 보였다는 Lee 등(16)의 연구 및 40°C에서 최대활성을 보고한 Shim 등(17)의 연구 결과와 유사한 결과이고, SS103균의 성장이 20°C, 28°C 및 55°C에서도 관찰되었으나 효소의 활성이 매우 낮았던 점으로 미루어 보아 본 균은 중온균으로 판단되었다.

Protease 생성을 위한 최적의 조건을 설정하기 위하여 500 mL flask에 배지를 50~300 mL까지 첨가하여 37°C에서 48시간 배양하여 protease 활성을 측정하여 통기량의 영향을 검토하였다. Table 6에서와 같이 배양배지를 100 mL로 한 경우 높은 protease 활성을 나타낸 결과로 미루어 보아 생육을 위해 산소를 요구하는 호기성균임을 알 수 있었다.

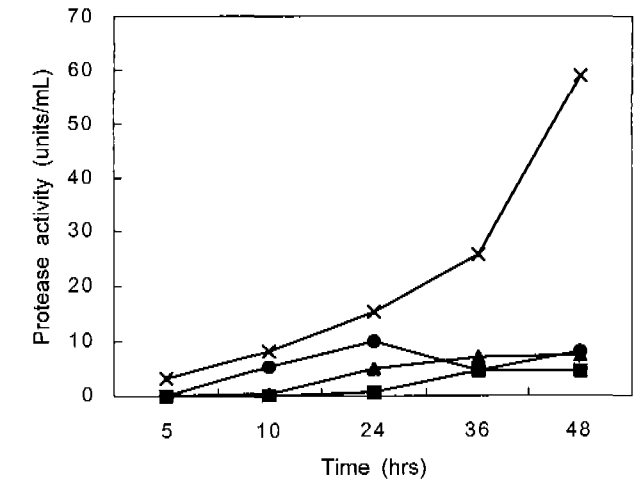
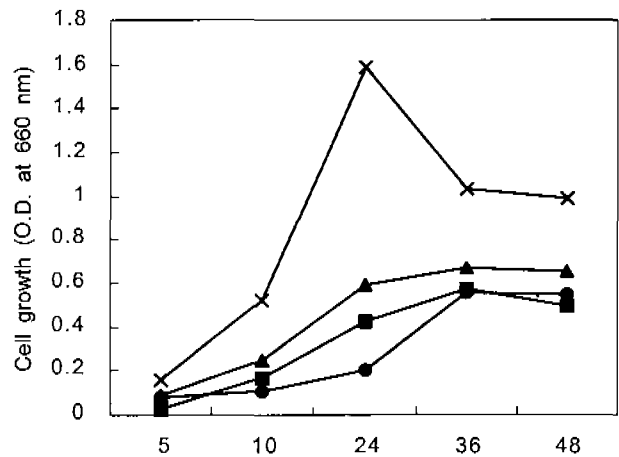


Fig. 6. Effect of temperature on cell growth and protease activity.

■ 20°C, ▲ 28°C, × 37°C, \* 55°C.

**Table 6. Effect of aeration on the production of *B. subtilis* SS103 protease**

Volume of medium (mL)	Cell growth (O.D. at 660 nm)	Protease activity (units/mL)
50	0.942±0.42 <sup>1)</sup>	47.3±0.45
100	1.023±0.23	50.9±0.51
150	0.775±0.35	28.0±0.27
200	0.643±0.47	25.9±0.32
250	0.536±0.62	21.4±0.67
300	0.520±0.11	20.9±0.20

<sup>1)</sup>Each value represents the mean±SD of three plates.

## 요 약

혈압상승을 주도하는 효소인 angiotensin converting enzyme(ACE)의 활성을 저해하는 펩타이드를 생산하는 protease 분비 균을 간장으로부터 분리하여 동정하였다. 여러 대두 발효식품으로부터 단백질 분해능이 있는 균주를 분리하고, 분리된 균주들 중에서 ACE 저해활성이 가장 높은 균주인 SS103 균주를 선정하였다. 선정된 SS103 균주는 운동성이 있는 gram 양성 간균으로 내생포자를 형성하는 호기성 균이었으며, pH 5~9 사이에서 생육하고 생육온도는 20°C~50°C로 내열성이 약한 중온균의 특성을 보였으며, glucose, sucrose, mannitol 및 sorbitol 등의 당 이용 특성을 보였다. 그리고 세포의 지방산 조성은 C<sub>15:0</sub> anteiso, C<sub>17:0</sub> cis 형 및 C<sub>17:0</sub> iso 형이 주된 지방산으로 각각 33.9%, 18.8% 및 16.5%의 분포를 나타내었다. 이상과 같은 분석 결과를 토대로 SS103 균주는 *Bacillus subtilis*로 동정되었다. *Bacillus subtilis* SS103 균주의 최적 배양 조건은 37°C, 초기배양액 pH 8.0에서 배양시간 48시간으로 나타났으며, 이때 통기량이 높은 경우 효소활성도 높은 특성을 보였다.

## 문 헌

- Shin, Z.I., Ahn, C.W., Nam, H.S., Lee, H.J. and Moon, T.H. : Fractionation of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from soybean paste. *Korean J. Food Sci. Tech.*, **29**, 230-234 (1995)
- Cho, D.H. and Lee, W.J. : Microbiological studies of Korean native soy sauce fermentation (I). *J. Kor. Agric. Chem. Soc.*, **13**, 35-38 (1970)
- Cho, D.H. and Lee, W.J. : Microbiological studies of Korean native soy sauce fermentation (II). *J. Kor. Agric. Chem. Soc.*, **14**, 137-141 (1971)
- Kim, S.H. : New trends of studying on potential activities of doen-jang. *Korea Soybean Digest*, **15**, 8-15 (1998)
- Horikoshi, K. : Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I, alkaline protease produced by *Bacillus* No. 221. *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1407-1414 (1971)
- Kwon, O.J., Kim, J.K. and Chung, Y.G. : The characteristics of bacteria isolated from ordinary Korean soy sauce and soybean paste. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.*, **29**, 422-428 (1986)
- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins Co., Baltimore (1986)
- Stages, C.E. and Davis, J.R. : Automated systems for identification of microorganism. *Clin. Microbiol. Rev.*, **5**, 302-327 (1992)
- Cushman, D.W. and Cheung, H.S. : Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637-1648 (1970)
- Horiuchi, M., Fujimura, K.I., Terashima, T. and Iso, T. : Method for determination of angiotensin-converting enzyme activity in blood and tissue by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography*, **233**, 123-130 (1982)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- Matsubara, H. and Feder, J. : Other bacterial, mold, and yeast protease. In *The Enzyme*, 3rd ed., Academic Press, New York, Vol. 3, p.721-789 (1971)
- Yukio, T., Kuriyama, N. and Suzuki, Y. : Alkaline serine protease produced from citric acid by *Bacillus alcalophilus subsp. halodurans* KP 1239. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 57-62 (1990)
- Manachini, P.L., Fortina, M.G. and Parini, C. : Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermoruber* - a new species of *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 409-413 (1988)
- Takii, Y. : Alkaline serine protease produced from citric acid by *Bacillus alcalophilus subsp. halodurans* KP 1239. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **3**, 57-60 (1990)
- Lee, B.W., Yoi, Y.S., Im, G.H. and Choi, C.U. : Purification and properties of protease from *Bacillus subtilis* LY-353. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **20**, 21-26 (1991)
- Shim, C.W., Jeong, K.S., Shin, W.C. and Yu, J.H. : Effect of pH on the production and characteristics of protease by *Bacillus sp.* SH-8 and *Bacillus sp.* SH-8M. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 59-64 (1994)

(2001년 3월 24일 접수)