

Bacillus subtilis PANH765가 생산하는 Protease의 정제 및 특성

이창호 · 우철주 · 배동호* · 김관필**

경북대학교 식품공학과, *건국대학교 응용생물화학과, **롯데그룹 중앙연구소

Purification and Characterization of Protease from *Bacillus subtilis* PANH765

Chang-Ho Rhee, Cheol-Joo Woo, Dong-Ho Bae and Kwan-Phil Kim

Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

*Department of Applied Biology and Chemistry, Konkuk University, Seoul 143-914, Korea

**Lotte Research and Development, Seoul 150-104, Korea

Abstract

Protease produced by *Bacillus subtilis* PANH765 was purified from culture supernatant by using ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose ion exchange chromatography, and gel filtration with Sephacryl S 200 HR and Sepharose CL-6B. DEAE-cellulose ion exchange column chromatography, separated the protease into one fraction. This fraction was further purified using Sephacryl S 200 HR and Sepharose CL-6B gel filtration. The molecular mass of protease was estimated to be 35.0 kDa by the SDS-PAGE and gel filtration using Sepharose CL-6B. The results indicated that the purified protease are monomeric proteins. Specific activity and purification folds of protease were 6.27 U/mg and 4.35, respectively. The optimum temperature, optimum pH, stable at a temperature range and pH ranges for the purified protease were 65°C, 7.05, 50 ~ 75°C and 6.0 ~ 7.5, respectively. The protease activity was decreased by the presence of PMSF and DFP, which the protease activity was increased by the presence of Na⁺, K⁺, Mg²⁺ and NH₄⁺ ions.

Key words : extracellular protease, *Bacillus subtilis* PANH765, purification

서 론

현대 산업 사회가 발달함에 따라 각종 효소의 이용도가 급격하게 증가하고 있는 가운데 조미료 제조, 식육의 연화, 맥주, 청주의 혼탁 방지, 치즈의 숙성 등의 식품 공업과 소화제, 소염 진통제 등 제약공업, 피혁 가공, 세제 공업 등 여러 분야에 걸쳐 광범위하게 이용(1)되고 있는 단백질 분해 효소는 Peckman(2)과 Crewth 등(3)이 최초로 *Aspergillus*속에서 분리한 이후 그 활성과 기능면에서 Masaaki(4)에 의해 serine protease, thiol protease, metal protease 등으로 분류 되었으며, Kageyama(5)와 Numokawa(6)는 그 작용 pH 영향에 따라 acid protease, neutral protease 및 alkaline protease로 분류하였다.

Protease는 동물이나 식물로부터 추출하기도 하나, 그 수와 양은 한정되어 있으며, 근래 발효공업의 발전에 힘입어 미생물로부터의 protease생산이 경제적인 면이나 공업적 규모로의 활용면에 있어서 월등히 유리한 위치에 있다. 공업적으로 protease 생산에 이용되는 대표적인 균주로는 곰팡이류의 *Aspergillus* sp.(7,8)와 세균류의 *Bacillus* sp.(9)가 있으며,

이 외에도 방선균(10,11)이나 효모(12)에서도 protease가 생성됨이 알려져 있다. 이 중 *Bacillus* sp.(9)를 비롯한 각종 세균류는 공업적 이용에 있어 가장 유리한 장점을 갖고 있어 미생물로부터의 protease는 대부분 세균류에서 생산된다.

특히 protease를 산업적으로 사용하기 위해서는 내열성과 내세제성을 가지며, 알러지 반응이 없어야 하기 때문에 실제 산업적으로 생산 이용되는 종류가 극히 적으며(13), 산업적으로 유용한 효소들에 대한 protease의 생화학적 연구가 많이 요구되고 있으나 이에 대한 연구가 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 현재 산업적으로 광범위하게 이용되고 있는 protease의 특성과 관련하여 중성 영역에서 최적의 활성을 갖는 neutral protease에 대한 연구의 일환으로, 토양으로부터 neutral protease를 생산하는 균주인 *Bacillus subtilis* PANH765가 생산하는 neutral protease를 정제하고 정제효소의 특성에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

사용 균주는 토양에서 분리·동정한 세균인 *Bacillus subtilis*

Corresponding author : Kwan-Phil Kim, Lotte Research and Development, Seoul 150-104, Korea
E-mail : kpkim@lotte.re.kr

PANH765 균주를 실험에 사용하였다. 효소 생산을 위한 배양은 2.0% glucose, 1.0% yeast extract, 0.2% ammonium nitrate, 0.02% ferrous sulfate, 0.02% dipotassium hydrogen phosphate 조성 (pH 7.0)의 최적 배지를 사용하여 30°C에서 진탕 속도 150 rpm으로 36시간 배양하였다.

Protease 활성 측정

Protease의 활성 측정은 Hull 방법(14)에 따라 다음과 같이 측정하였다. 효소액의 조제는 배양액을 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리한 후 상정액을 효소액으로 사용하였다. 기질 용액은 50 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 7.0)에 기질인 casein을 사용 직전에 0.6% (w/v)로 용해하여 사용하였다. 5.0 mL의 기질 용액에 효소액 0.5 mL을 첨가하여 40°C에서 10분간 반응시킨 다음 0.4 M trichloroacetic acid를 5.0 mL첨가하여 30°C에서 20분간 방치시킨 후, 여과하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

효소의 활성 단위는 1분 동안에 1 µg의 tyrosine을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

단백질의 정량

단백질은 소의 혈청 알부민 (bovine serum albumin, BSA)을 표준 단백질로 하여 Bradford 방법(15)에 따라 595 nm에서 비색 정량 (Spectrophotometer, Model UV-160, Shimadzu Co., Japan)하였다.

효소 분리 및 정제

최적 배지에서 배양한 배양액 2 L를 12,000 rpm에서 30분간 원심 분리하고 상등액에 20 ~ 70% ammonium sulfate로 분획한 후 단백질성 물질을 회수하여 50 mM sodium phosphate 완충 용액 (pH 7.0)을 사용하여 4°C에서 24 시간 투석하였다. 황산 암모늄 염색으로 얻어진 protease 활성 용액을 50 mM sodium phosphate 완충 용액 (pH 7.0)으로 평형화시킨 DEAE-cellulose column (2.0 × 40 cm) 주입하여 흡착시키고, 동일 완충액으로 비흡착 부분을 완전히 세척한 다음, 흡착 부분을 0.5 M NaCl을 사용하여 직선 농도 기울기 법으로 40 mL/hr 유속으로 5 mL/fraction 씩 순차적으로 분획 하였다. 효소활성 분획을 ultrafiltration kit (YM 10 membrane, Amicon Co.)를 사용하여 농축한 후 Sephacryl S 200 HR column (1.8 × 80 cm) 주입하여 15 mL/hr 유속으로 3 mL/fraction씩 순차적으로 용출시켜 protease 활성 물질을 분획하였다. 다시 효소 활성 분획을 ultrafiltration kit (YM 10 membrane, Amicon Co.)를 사용하여 농축한 다음 Sepharose CL-6B column (1.0 × 80 cm) 주입하여 25 mL/hr 유속으로 3 mL/fraction 씩 순차적으로 용출시켜 protease 정제하였다.

전기영동

Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Laemmli의 방법(16)에 따라 15% acrylamide에서 전기 영동 하였으며, 전기 영동 후 Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하고 7% acetic acid-10% methanol 조성의 용액으로 탈색하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

배양액 2 L로부터 얻은 상등액을 염색 및 투석한 후 DEAE-cellulose ion exchange column에 흡착 및 용출 시킨 결과 78~90번 사이에서 효소 활성 peak가 나타났으며 (Fig. 1), 활성이 높게 나타난 효소액을 회수하여 ultrafiltration kit (YM 10 membrane, Amicon Co.)로 농축하였다. 이 농축액을 Sephacryl S 200 HR column에서 용출 시킨 결과 24~36번 사이에서 효소 활성 peak가 나타났으며 (Fig. 2), 활성이 높게 나타난 효소액을 회수하여 ultrafiltration kit (YM 10 membrane, Amicon Co.)로 농축한 다음 Sepharose CL-6B column에서 용출시켜 단백질 peak와 효소 활성 peak가 일치하는 18~28번 분획을 회수하여 (Fig. 3) 정제 효소의 성질 조사에 이용하였다. 이상의 정제 과정을 요약한 결과 (Table 1), 회수율은 28.0%, 4.35배의 정제도를 나타내었다. 이러한 결과는 Ko 등(17)이 보고한 *Beauveria bassiana*의 회수율이 13.6%, 정제도가 41배, Lee(18)가 보고한 *Rhodotorula glutinis*의 회수율이 13.3%, Ahn 등(19)이 보고한 *Bacillus* sp.의 회수율이 3.2%, 정제도가 10.6배, Yun 등(20)이 보고한 *Streptomyces* sp. YSA-130의 회수율이 20%, 정제도가 23.8 배라는 보고와 비교하면 본 균주의 회수율은 비교적 높은 편이었으며, 정제도는 비교적 낮게 나타났다. 정제 과정을 거친 protease를 15% acrylamide가 함유된 SDS-PAGE를 실시한 결과 (Fig. 4)와 같이 단일 단백질 밴드로 나타나 protease가 순수하게 정제되었음을 확인할 수 있었다.

Table 1. Purification procedure of protease from *B. subtilis* PANH-765

Fraction	Total protein(mg)	Total activity(U)	Specific activity (U/mg)	Yield(%)	Purification fold
Crude enzyme	982.7	1339.6	1.44	100.0	1.00
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	431.3	979.0	2.27	73.1	1.58
DEAE-cellulose	170.4	686.1	4.03	51.2	2.80
Sephacryl S200HR	94.1	436.5	4.64	32.6	3.22
Sepharose CL-6B	59.9	375.6	6.27	28.0	4.35

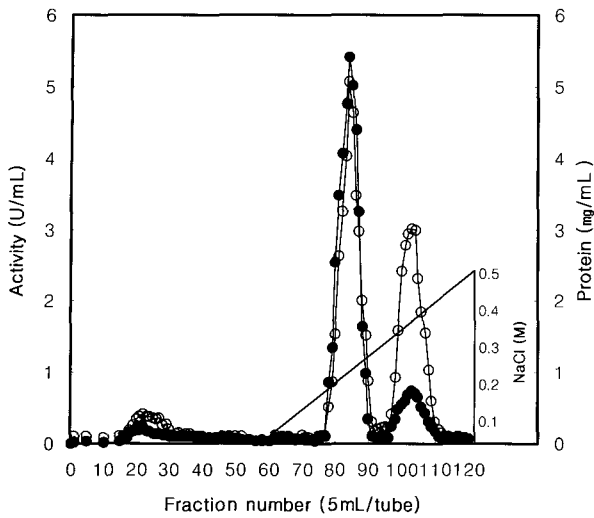


Fig. 1. DEAE-cellulose ion exchange chromatography for the dialyzed enzyme.

DEAE-cellulose ion exchange column was equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0). The column was eluted with a linear gradient of 0 to 0.5 M NaCl in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 30 mL/h and 5 mL/tube of fraction volume. ○ - ○, protein; ● - ●, protease activity; —, NaCl gradient.

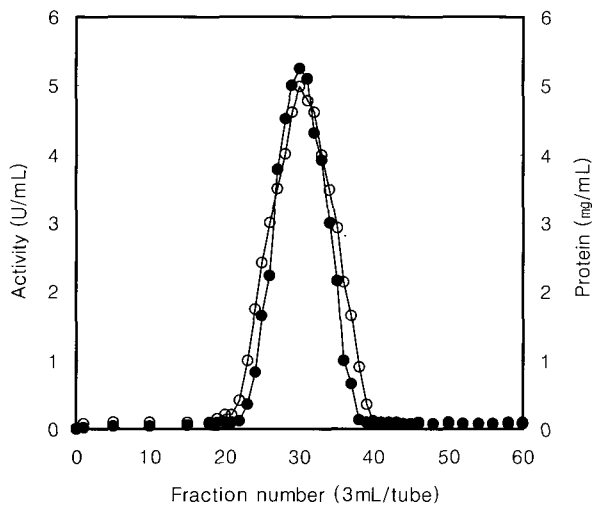


Fig. 2. Gel filtration of enzyme fraction with Sephacryl S 200 HR.

Sephacryl S 200 HR column was equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0). The column was eluted with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 15 mL/h and 3 mL/tube of fraction volume. ○ - ○, protein; ● - ●, protease activity

정제 효소의 특성

효소의 분자량 정제된 protease의 분자량을 SDS-PAGE와 Sepharose CL-6B로 gel filtration으로 표준 단백질과 비교하여 측정된 결과, 정제 효소의 분자량은 약 35.0 kDa 이었으며 (Fig. 4, 5), SDS-PAGE에서와 gel filtration상에서 동일한 분자량을 나타내었으므로 정제한 protease는 monomer protein임을

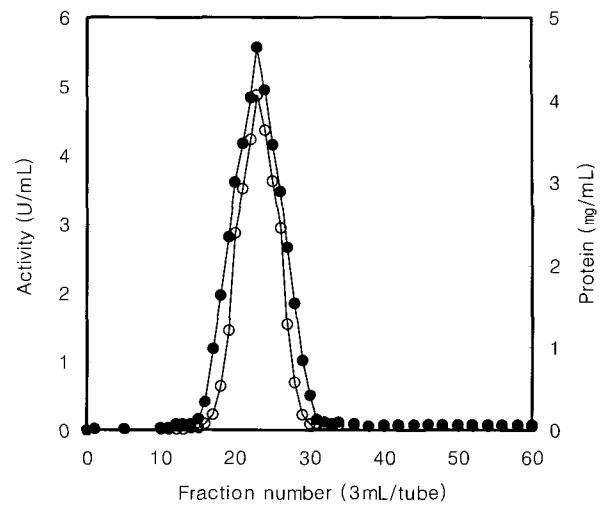


Fig. 3. Gel filtration of enzyme fraction with Sepharose CL-6B.

Sepharose CL-6B column was equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0). The column was eluted with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 15 mL/h and 3 mL/tube of fraction volume. ○ - ○, protein; ● - ●, protease activity.

추정할 수 있었다. 이러한 결과는 Ko 등(17)이 보고한 *Beauveria bassiana*의 분자량이 32.0 kDa, Bae와 Kang(21)이 보고한 *Saccharomycopsis lipolytica*의 분자량이 31.0 kDa, Kim 등(22)이 보고한 *Aspergillus niger*의 분자량이 41.0 kDa, Lee(18)가 보고한 *Rhodotorula glutinis*의 분자량이 43.0 kDa, Yun 등(20)이 보고한 *Streptomyces* sp. YSA-130의 분자량이 30.0 kDa와 비교하면 비슷한 분자량을 나타내었다.

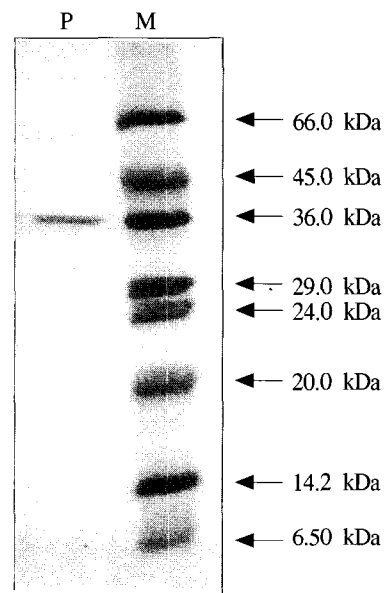


Fig. 4. Electrophoretic profile of purified protease in SDS-PAGE. Proteins were resolved on a 15% SDS-polyacrylamide gel. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. lane M, molecular weight marker protein; lane P, purified protease.

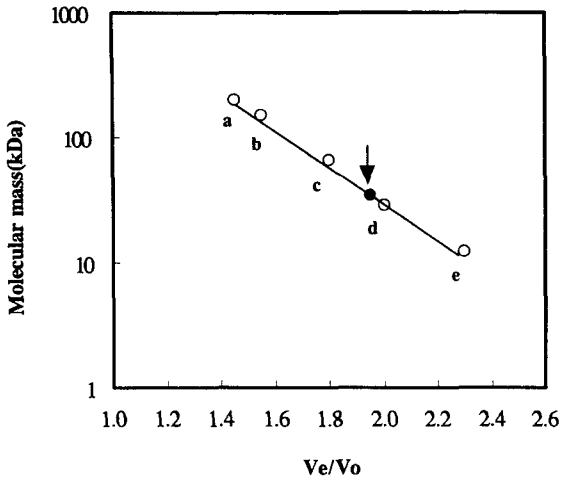


Fig. 5. Estimation of molecular mass of purified protease by Sepharose CL-6B gel filtration.

Ve is the elution volume of each protein and Vo is the void volume of the column. Standard proteins were the molecular weight marker from sigma Co. (MW-GF-200kit) were used as standard proteins. a, β -amylase (200.0 kDa); b, alcohol dehydrogenase (150.0 kDa) c, bovine serum albumin (66.0 kDa); d, carbonic anhydrase (29.0 kDa); e, cytochrome c (12.4 kDa); ↓, purified protease.

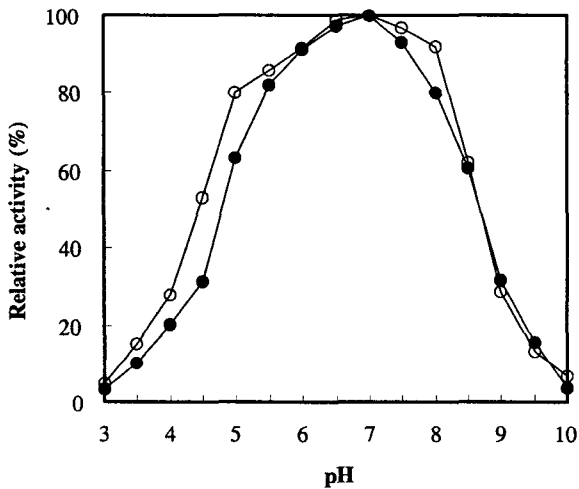


Fig. 6. Effects of pHs on the activity and pH stability of the purified protease.

The buffer used: pH 3.0 ~ 6.0, 50 mM citrate phosphate buffer; pH 6.5 ~ 7.5, 50 mM sodium phosphate buffer; pH 8.0 ~ 9.0, 50 mM Tris-HCl buffer; pH 9.5 ~ 10.0, 50 mM glycine-NaOH buffer. The optimal pH was measured in the standard reaction mixture at the indicated pH for 1 min at 30°C. The pH stability was incubated at 4°C for 24 h in each buffer. After the enzyme solution was adjusted to pH 7.0, the remaining activity was measured. ○ - ○, pH stability; ● - ●, optimal pH.

pH의 영향 정제한 protease의 최적 pH를 조사한 결과, pH 7.0에서 최적 활성을 보였으며(Fig. 6), Kim 등(22)의 *Asp. niger*의 pH가 7.2라는 것과는 비슷하였으며, Ko 등(17)의

*Beauveria bassiana*의 pH가 10.5, Bae와 Kang(21)의 *S. lipolytica*의 pH가 7 ~ 9, Ahn 등(18)의 *Bacillus* sp.의 pH가 12 ~ 13인 것과 비교시는 본 균주가 생산하는 효소의 최적 반응 pH는 낮게 나타났다. pH 안정성을 조사하기 위하여 효소액을 pH 3.0~10.0까지 조절하여 4°C에서 24시간 방치한 후, pH를 7.0으로 조정하여 잔존하는 효소의 활성을 측정된 결과 pH 5.0~8.0까지 비교적 안정하였으며, 특히 pH 7.0부근에서 가장 안정하였다 (Fig. 6).

온도의 영향 반응액의 pH를 7.0으로 조절하고 각 온도에서 반응시킨 결과, 65°C에서 최적 활성을 나타내었다(Fig. 7). *Beauveria bassiana*(17)가 60 ~ 65°C, *Streptomyces* sp. YSA-130(20)가 60°C라는 보고와는 비슷하였으며, *Asp. niger*(22)가 45°C, *Aspergillus awamori*(23)가 45°C, *Bacillus* sp.(18)가 55°C와 비교시는 본 균주가 생산하는 최적 반응 온도가 높게 나타났다. 또한 온도 안정성을 조사하기 위하여 25~90°C에서 1시간 방치한 후 효소의 잔존 활성을 측정된 결과 70°C까지 비교적 안정한 것으로 나타났다(Fig. 7).

금속이온의 영향 금속 이온이 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 이들 각종 금속이온을 최종 농도가 10 mM이 되게 첨가하여 protease의 활성을 조사한 결과 (Table 2), Na^+ , K^+ , Mg^{2+} 및 NH_4^+ 이온이 효소 활성의 activator로 작용하였으며, 그 중에서 Mg^{2+} 가 119.5%로 가장 높게 나타났다. 기타의 금속이온들은 protease의 활성에 저해를 주는 것으로 나타났다.

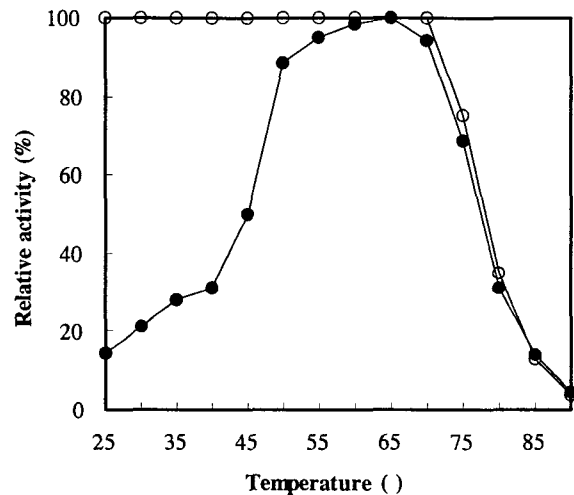


Fig. 7. Effects of temperature on the activity and thermal stability of the purified protease.

The optimum temperature was assayed in the standard reaction mixture of the indicated temperature for 1 min at pH 7.0. Thermal stability was incubated in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) for 60 min at each temperature and the remaining activity was measured under the standard conditions. ○ - ○, thermal stability ; ● - ●, optimum temperature.

Table 2. Effect of metals ions on the protease activity

Metal ion(10 mM)	Relative activity(%)
NH ₄ Cl	104.9
CuSO ₄	24.3
MnCl ₂	11.5
CoCl ₂	3.7
BaCl ₂	5.4
CaCl ₂	52.7
MgCl ₂	119.5
MnSO ₄	34.1
LiCl	76.4
KCl	94.5
NaCl	109.6
MgSO ₄	69.5
None	100.0

저해제의 영향 Protease의 저해제로 TLCK (N-tosyl-L-lysyl-chloromethyl ketone, trypsin inhibitor), TPCK (N-tosyl-L-phenylalanyl chromethyl ketone, chymotrypsin inhibitor), DTT (dithiothreitol, thiolprotease inhibitor), EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, metaloprotease inhibitor), PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride, serine protease inhibitor) 및 DFP (diisopropyl fluorophosphate, serine protease inhibitor)를 사용하여 효소 활성 저해 효과를 측정된 결과 (Table 3), 정제된 protease는 PMSF 및 DFP에 의해 저해되었고 특히 DFP 보다는 PMSF 첨가시 뚜렷한 저해를 나타내었다. 한편 TPCK와 TLCK EDTA 및 DTT는 효소활성에 영향을 미치지 않았다.

Table 3. Effects of protease inhibitors on the proteolytic activity of purified protease

Inhibitor	Relative activity(%)		
	1 mM	5 mM	10 mM
None	100.0	100.0	100.0
PMSF ¹⁾	12.7	2.6	0.9
DFP ²⁾	36.1	12.7	3.4
TPCK ³⁾	102.8	101.1	102.4
TLCK ⁴⁾	99.4	97.8	96.2
EDTA ⁵⁾	104.9	103.5	103.2
DTT ⁶⁾	97.8	96.4	95.9

¹⁾Phenylmethylsulfonyl fluoride; ²⁾Diisopropyl fluorophosphate; ³⁾N-tosyl-L-phenylalanyl chromethyl ketone; ⁴⁾N-tosyl-L-lysyl-chloromethyl ketone; ⁵⁾Ethylenediaminetetraacetic acid; ⁶⁾Dithiothreitol

요 약

Bacillus subtilis PANH-765 균주가 생산하는 protease를 황산암모늄에 의한 염석, DEAE-cellulose ion exchange

chromatography, Sephacryl S 200 HR 및 Sepharose CL-6B gel filtration을 이용하여 정제하였다. DEAE-cellulose ion exchange chromatography를 행한 결과, 흡착 단백질 부분에서 활성이 높은 분획을 얻었다. 이 분획을 Sephacryl S 200 HR 및 Sepharose CL-6B gel filtration을 행한 결과 protease 활성을 가지는 단일 분획을 얻을 수 있었다. 정제한 protease의 분자량을 SDS-PAGE와 Sepharose CL-6B gel filtration으로 측정된 결과, 분자량은 35.0 kDa으로 추정되었으며, 각 효소의 비활성도는 6.27 U/mg이었으며, 회수율은 각각 28.0%, 정제도는 4.35배로 나타났다. 최적 반응 온도는 65°C, 최적 반응 pH는 7.05로 나타났으며, 온도 안정성은 50~75°C, pH 안정성은 6.0~7.5로 나타났다. 금속 이온의 영향은 Na⁺, K⁺, Mg²⁺ 및 NH₄⁺ 이온이 효소 활성을 촉진하였으며, 그 중에서 Mg²⁺가 119.5%로 가장 높게 나타났다. 저해제인 경우 PMSF 및 DFP에 의해 저해되었고 특히 DFP 보다는 PMSF 첨가시 뚜렷한 저해를 나타내었다.

참고문헌

- Godfrey, T, and Reichelt, J. (1983) Industrial enzymology. The application of enzymes in industry. The Nature Press. 127-172
- Peckman, E.V. (1951) *Aspergillus protease*. Biochemistry, 5, 321-325
- Crewth, W.C. (1963) The effect of pH and cations on the thermal denaturation of trypsin. Aus. J. Biol., 6, 597-601
- Masaaki, Y., Kazuo, S. and Mitsuo, M. (1984) Purification and properties of acid protease from *Monascus* sp. No. 3405. Agric. Biol. Chem., 48, 1637-1645
- Kageyama, K. (1955) Studies on *Aspergillus oryzae* strain for sake brewing. J. Ferment. Technol., 33, 53-57
- Nunokawa, Y., Namba, Y. and Watanabe, S. (1961) A study of the rice Koji protease. J. Soc. Brew., 53, 930-933
- Impoolsup, A., Bhumiratana, A. and Flegel, T.W. (1981) Isolation of alkaline and neutral proteases from *Aspergillus flavus* var. *columnaris*, a soy sauce Koji mold. Appl. Environ. Microbiol., 42, 619-628
- Horikoshi, K. (1971) Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms, Part I, alkaline proteinase produced by *Bacillus* No. 221, Agric. Biol. Chem., 35, 1407-1414
- Mizusawa, K., Ichishima, E. and Yoshida, F. (1964) Studies on the proteolytic enzymes of thermophilic *Streptomyces*. Agric. Biol. Chem., 28, 884-895
- Nakanishi, T., Matsumura, Y., Minamura, N., Minamiura, N. and Yamamoto, T. (1974) Purification and some

- properties of an alkalophilic aroteinase of a *Streptomyces* sp., Agric. Biol. Chem., 38, 37-44
11. Meusdoerffer, F., Tortora, P. and Holzer, H. (1980) Purification and properties of proteinase A from yeast, J. Biological Chem., 255, 12087-12093
 12. Rhden, A.C., Lindberg, M. and Philipson, L. (1973) Isolation and characterization of two protease - producing mutants from *Staphylococcus aureus*, J. Bacteriol., 116, 25-32
 13. Choi, C., Chung, Y.G., Sung, S.K., Choi, K.S., Lee, J.S., Cho, Y.J. and Kwon, O.J. (1992) Production and purification of alkaline protease from *Streptomyces* sp. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 20, 169-177
 14. Hull, M.E. (1974) Studies on milk proteins II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. J. Dairy Sci., 30, 881-884
 15. Bradford, M.M. (1964) A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254
 16. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685
 17. Ko, H.J., Kim, H.K., Kim, B.G., Kang, S.C. and Kwon, S.T. (1997) Purification and characterization of protease from entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Agric. Chem. Biotech., 40, 388-394
 18. Lee, T.H. (1983) Effect of protease inhibitor(S-PI) on physiological changes of microorganism(II)- Purification and properties of intracellular acid protease I in *Rhodotorula glutinis*. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 11, 117-122
 19. Ahn, J.W., Oh, T.K., Park, Y.H. and Park, K.H. (1989) Partial purification and characterization of the alkaline protease from *Bacillus* sp. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech., 18, 344-351
 20. Yun, S.W., Lee, K.P., Yu, J.H., Shin, C.S. and Oh, D.H. (1989) Purification and properties of alkaline protease from *Streptomyces* sp. YSA-130. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 17, 358-364
 21. Bae HY. Kang KH. 1989. Studies on extracellular protease from *Saccharomycopsis lipolytica*(*Candida lipolytica*) - Purification and properties of enzyme. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 15, 286-293
 22. Kim, K.W., Yun, T.U. and Kim, J.P. (1991) Properties of *Aspergillus niger* protease isolated from Katsuobushi. Kor. J. Food Sci. Technol., 23, 400-404
 23. Lee, M.J. and Chung, M.J. (1980) Studies on the production of protease by *Asperigillus oryzae* KC-15 and characteristics of the enzymes. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech., 8, 77-82

(접수 2003년 4월 15일, 채택 2003년 5월 20일)