

## 과일과 전통발효제로부터 추출한 단백질분해 조효소의 비교 특성

유선아 · 서승호 · 현서연 · 손홍석<sup>†</sup>

동신대학교 식품영양학과

### Characteristics of Crude Protease from Fruits and Traditional Korean Fermentation Starters

Seon-A Yoo, Seung-Ho Seo, Seo-Yeon Hyun, and Hong-Seok Son<sup>†</sup>

Dept. of Food and Nutrition, Dongshin University, Jeonnam 520-714, Korea

**ABSTRACT** In this study, we ascertained the characteristics of crude protease extracted from fruits (fig, kiwifruit and pineapple) as well as traditional Korean fermentation starters (bio nuruk, traditional nuruk, meju and rice koji) to determine their suitability for industrial application. Crude protease extracted from traditional Korean fermentation starters was found to have a higher optimum temperature (70°C) and salt concentration (1~3%) but a lower optimum pH (3~6) value compared to the corresponding values for the protease extracted from fruits. On comparison, the total activities of protease per gram unit follow the order: bio nuruk> rice koji> traditional nuruk> fig> pineapple> meju> kiwifruit. Based on our results, we conclude that protease extracted from traditional Korean fermentation starters has potential for application in food industry, for example, as a meat tenderizer for sausage manufacturing and as a protease for cheese production.

**Key words:** protease, fruit, fermentation starter, enzyme activity, optimum condition

## 서 론

육류의 연한 정도는 소비자에게 의한 품질 평가 시에 가장 중요하게 고려되는 요소 중의 하나로 꼽힌다. 육류 식육을 연화시키는 방법에는 기계적인 방법, 수화력 증가, 숙성, 단백질분해효소의 이용방법 등이 있다(1-4). 이들 중 단백질분해효소를 이용하는 것은 추출원이 자연에서 얻은 것이므로 식품첨가물로서 안전하여 많이 이용되어 왔다. 기존의 단백질분해효소에 관한 연구들은 파파야(5), 무화과(6), 아스파라거스(7), 키위(8-12), 파인애플(13,14), 배(14,15), 능이버섯(16), 닥나무 열매(17) 등 많은 식물성 원료에 함유되어 있는 효소를 대상으로 하고 있다. 반면 식육의 연화 이외의 목적으로 사용되는 단백질분해효소는 대부분 미생물에서 기원한 효소를 주로 사용하며 수입에 의존하고 있는 실정이다. 미생물 기원 단백질분해효소는 조미료의 제조, 맥주·청주의 혼탁방지, 치즈의 숙성과 같은 식품공업, 소염진통제나 소화제 등의 제약산업, 세제산업과 피혁공업 등 다양한 분야의 분야에서 적용되고 있다(18). 미생물성 단백질분해효소는 원하는 목적에 따라 곰팡이, 세균, 방선균 등 다양한 미생물로부터 효소를 얻어내고 있으며, 경제적 측면에서의 장점을 근거로 산업적 규모로 대량 생산되고 있다.

한국의 전통식품을 제조하기 위해 사용하는 원료 중 메주나 누룩, 입국 같은 전통발효제들은 단백질분해효소를 함유하고 있지만 이러한 발효제들이 포함하고 있는 효소를 이용하여 전통발효식품 이외의 식품공업에 적용하는 경우는 거의 없다. 메주는 간장, 고추장 및 된장과 같은 장류의 원료로 대두 발효식품을 제조하기 위해 필수적으로 사용되는 발효제이다(19,20). 개량메주 제조 시 *Aspergillus(A.) oryzae* 혹은 *A. sojae* 곰팡이가 중국으로 주로 사용되지만, 전통메주의 경우에는 *Bacillus subtilis*에서 유래한 세균성 단백질분해효소를 비롯한 다양한 곰팡이와 효모 유래 효소가 존재한다. 특히 subtilisin은 *Bacillus* 속의 미생물이 분비하는 효소로 콩단백질이나 어육단백질 등을 분해하는 식품용으로 사용되고 있다(21). 누룩은 거칠게 빻은 낱밀에 물을 가하고 성형하여 배양실에서 자연의 미생물을 번식시킨 것으로, 전통적인 술의 양조에서 발효제로 사용된다(22). 입국은 증자한 쌀에 곰팡이를 인위적으로 접종한 후 배양한 것으로 탁주, 약주 및 청주의 양조에 이용되는 대표적인 발효제이다. 전통적인 탁주와 약주의 제조에서는 누룩이 유일한 발효제로 사용되었으나, 품질 컨트롤이 어렵고 당화효율이 낮으며 특유의 누룩취를 보이므로 현재 산업적인 양조에서는 미생물을 접종하여 제조한 입국이 주로 이용되고 있다(23). 입국이나 개량누룩 제조 시에는 주로 *A. kawachii* 같은 *Aspergillus* 속 균주를 사용하며, 여러 종류의 단백질분해효소를 생산하고 다양한 pH 범위에서 활성을 나타낸다(24).

Received 9 May 2013; Accepted 9 July 2013

<sup>†</sup>Corresponding author.

E-mail: hsson@dsu.ac.kr, Phone: 82-61-330-3225

전통누룩의 경우에는 *Aspergillus* 속 곰팡이 이외에도 *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia* 속 곰팡이 및 효모 등이 단백질 분해효소 분비에 관여한다.

효소는 생물계 전반에 걸쳐 분포하지만 이 중 동·식물은 원래 효소 생산을 목적으로 해서 사육 혹은 재배되는 것이 아니며, 세대시간이 길고, 지리적, 계절적, 환경적 변화에 따라 수확량이 달라지는 단점이 있다. 반면 미생물의 경우에는 효소 생산을 목적으로 하는 우량균주를 쉽게 얻을 수 있으며, 배양방법을 고안해서 생산량을 증대시킬 수 있는 장점이 있다(24). 이러한 장점을 근거로 효소의 자원을 미생물에서 구하는 것이 현재의 추세이지만, 실제 식품현장에서는 미생물을 순수 배양하여 원하는 효소를 분리 정제하기 위해서는 숙련된 기술력이 요구되므로 어려움이 존재한다. 따라서 본 연구에서는 식육연화 목적을 위한 기초 연구로 기존에 이용되고 있는 식물 유래 단백질분해효소와 우리 주변에서 쉽게 구할 수 있는 전통발효식품의 제조를 위해 사용되는 발효제에서 추출한 단백질분해효소의 활성을 비교 분석하였다. 단백질분해효소 활성이 강한 키위와 파인애플 그리고 무화과로부터 추출한 단백질분해효소와 전통발효제인 메주, 누룩, 입국으로부터 추출한 단백질분해효소의 활성을 비교하여 최적의 효소반응 조건을 찾고, 나아가 한국의 전통발효제로부터 추출한 단백질분해효소의 식품 산업에의 적용 가능성을 검토해 보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 원료의 기원

본 실험에서 사용한 키위는 뉴질랜드산, 망고와 파인애플은 필리핀산, 무화과는 전남 영암에서 재배된 것을 2012년 10월에 광주광역시 L마트에서 구입하여 사용하였다. 전통누룩은 광주광역시 (주)송화곡자, 메주는 경상북도 성주군의 문화메주, 개량누룩으로는 바이오 누룩(bio nurook, Hankuk hyoso, Hwasung, Korea), 입국은 경기도 이천시의 백암 양조장에서 제조한 것을 사용하였다. 파파인(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 등 실험에 사용한 시약은 일급 이상의 등급을 사용하였다.

### 조효소의 추출

과일의 단백질분해효소는 Cho 등(12)의 방법을 참고하여 추출하였다. 과육의 껍질을 박피하고 가식부분을 잘게 썰 후 2배(w/v)의 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0), 5 mM cysteine, 2 mM EDTA를 가하여 blender로 균질화하고 cheese cloth로 여과하였다. 여과액을 5,500 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 발효제로부터 효소의 추출은 건조된 발효제를 곱게 파쇄한 후 20배(w/v)의 증류수를 넣고 blender로 균질화한 뒤 shaking incubator(SI-300R, Jeio Tech, Daejeon, Korea)에서 30°C, 140 rpm의 조건으로 60분간 추출하고

원심분리한 뒤 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

### 효소 활성 측정

효소의 활성은 Kim 등(6)의 방법을 변형하여 효소액 1 mL를 시험관에 취하고 0.6% casein 용액 5 mL를 가하여 잘 흔들고 10분간 30°C 항온수조에서 반응시킨 후 0.44 M trichloroacetic acid(TCA) 5 mL를 넣어 반응을 중지시키고 항온수조 내에 약 30분간 방치시켰다. 침전이 완료되면 와트만 여과지(#40)로 여과하여 여액 1 mL를 0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액 5 mL와 Folin 시약 1 mL를 넣어서 혼든 후 30°C에서 30분간 방치시키고 UV spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 660 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다(6). 효소 활성도는 일정량의 효소가 촉매하는 반응의 속도로 나타내며, 효소 활성도의 단위는 기준 측정 조건하에서 단위시간(1분) 동안에 1 μmol의 기질을 전환하는 효소 활성을 1 국제단위(international unit, IU)로 나타내었다(24). 본 연구에서는 tyrosine 함량을 기준으로 표준곡선( $y=1.5719x+0.0205$ ,  $r^2=0.9957$ )을 작성하였으며, 다음과 같은 공식에 의해 효소 활성도를 계산하였다.

$$\text{Enzyme activity (unit)} = (E-B) \times \frac{11}{2} \times \frac{1}{10} \times F$$

E=실험구의 tyrosine 환산 함량

B=대조구의 tyrosine 환산 함량

F=효소액의 희석배수

### 효소의 특성

온도에 따른 효소 활성을 측정하기 위해 0.1 M sodium phosphate buffer 용액에 casein 0.6%를 녹이고 pH를 7.0으로 조정된 뒤, 20~70°C의 온도에서 효소액과 10분간 반응시켜 효소 활성을 측정하였다(8). 효소의 최적 pH는 pH가 2~9가 되도록 조정된 buffer 용액에 casein 0.6%를 녹인 후 30°C에서 효소액과 10분간 반응시켜 효소 활성을 측정하였다(10). 효소의 최적 염 농도는 0.1 M sodium phosphate buffer 용액에 casein 0.6%를 녹이고 pH를 7.0으로 조정된 후 0~4% 농도로 NaCl을 첨가하고, 30°C에서 효소액과 10분간 반응시켜 효소의 활성을 측정하였다(6).

## 결과 및 고찰

### 조효소의 최적 온도

과일에서 추출한 단백질분해효소의 온도에 대한 활성은 Fig. 1(A)와 같다. 키위의 경우 50°C에서 가장 높은 활성을 보인 후 급격히 활성이 감소되었다. 이는 50°C까지는 키위 단백질분해효소의 역가의 변화가 거의 없으며 그 이상의 온도에서는 급격히 활성의 감소를 보인다는 연구결과와 일치한다(8). 무화과와 파인애플에서 추출한 조효소의 경우 온도가 증가함에 따라 활성이 점차 증가하였으며 60°C 이후에

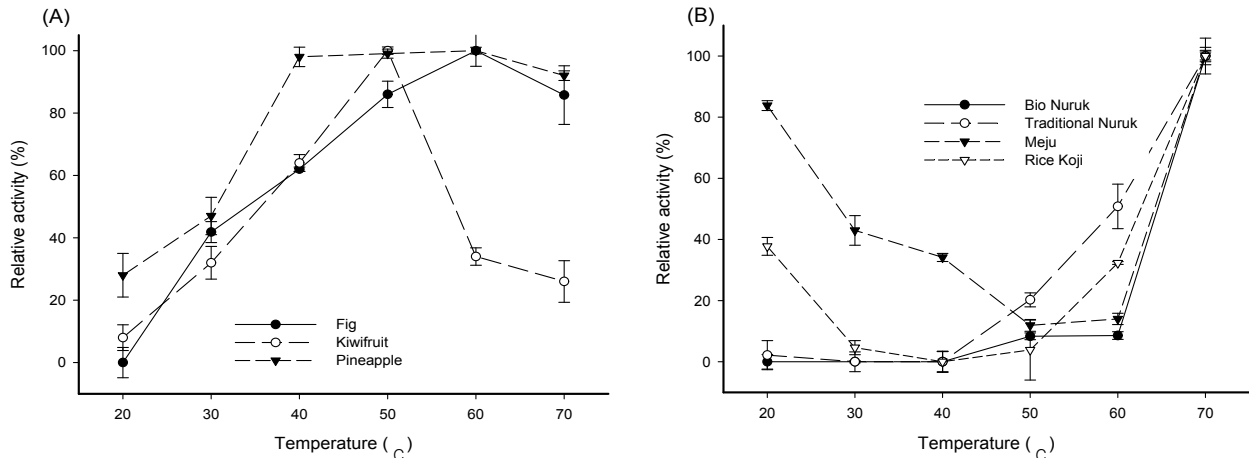


Fig. 1. Effect of temperature on the relative activity of crude protease extracted from fruits (A) and traditional Korean fermentation starters (B).

효소활성이 감소하는 경향성을 보였으며 이는 기존 연구결과와 유사하다(6,13).

전통발효제의 조효소 활성은 Fig. 1(B)와 같이 개량누룩, 전통누룩, 입국의 경우에는 온도가 증가함에 따라 활성이 증가하는 경향성을 보이며 70°C에서 최고 활성을 보였다. 메주의 경우 특이하게 온도가 낮은 조건에서 활성을 보이다 50~60°C에서 낮은 활성을 나타내고 70°C에서 효소활성이 다시 증가하였다. 이는 메주에 존재하는 곰팡이 중 저온에서 활성화되는 *Mucor*, *Cladosporium*, *Penicillium*과 고온에서 활성화되는 *Lichtheimia*, *Aspergillus*, *Eurotium*, *Scopulariopsis* 등이 함께 존재하기 때문에 낮은 온도와 높은 온도에서 활성이 높은 것으로 사료된다(24). 과일에서 추출한 단백질분해효소의 경우 50°C 전후에서 활성이 높아 식품산업에서의 응용이 제한적이었다면, 전통발효제에서 추출한 단백질분해효소의 경우에는 비교적 높은 온도에서도 효소활성이 높기 때문에 다양한 분야에서 적용 가능할 것으로 사료된다.

### 조효소의 최적 pH

과일에서 추출한 단백질분해효소의 pH에 대한 활성은 Fig. 2(A)와 같다. 카제인 단백질의 등전점은 pH 4.6으로 pH 4와 5의 경우 카제인이 녹지 않아 pH 2, 3, 6~9를 측정하였다(25). 무화과와 파인애플에서 추출한 조효소의 경우 pH 7에서 가장 높은 활성을 보였고 pH 8 이상에서는 효소활성이 급격히 저하되는 모습을 보였다. 키위의 경우 pH 8에서 가장 높은 활성을 보였고 pH 9에서는 활성이 급격히 저하되었다. 과일에서 추출한 단백질분해효소는 pH 6 이하에서 활성이 저하되는 모습을 보였으며 이는 키위는 pH 7.0~8.5에서 안정하며 pH 2~3의 강산에서는 실활되었다는 연구결과와 유사하다(10).

전통발효제의 조효소 활성은 Fig. 2(B)와 같다. 개량누룩의 경우 pH 6까지 활성이 점차 증가하다 pH 7 이후에는 활성이 저하되었다. 전통누룩은 pH 3의 산성조건에서 활성이 가장 좋았으며 중성과 알칼리 조건에서는 활성이 떨어지는 모습을 보였다. 메주는 pH 7~8에서 활성이 가장 좋았으며

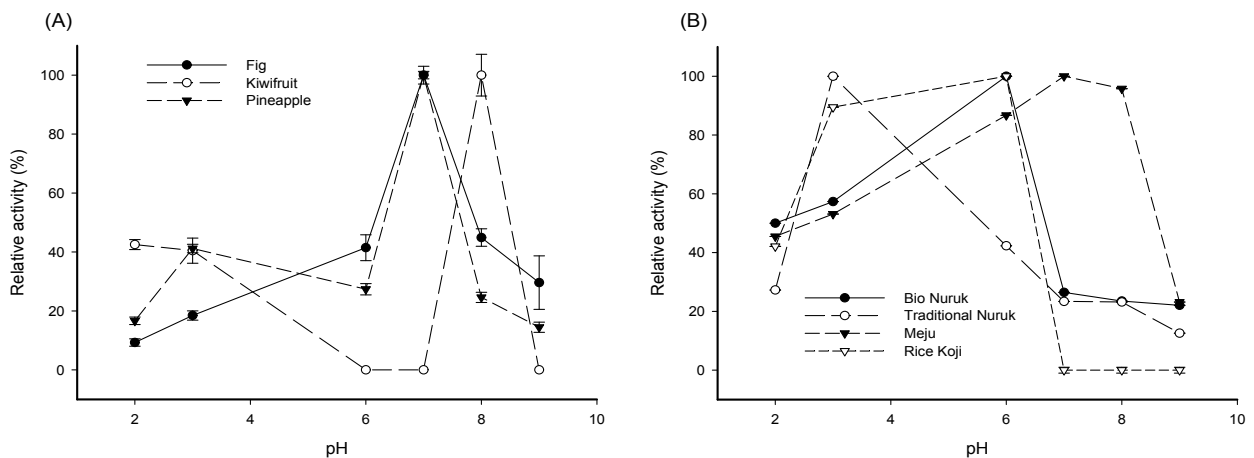
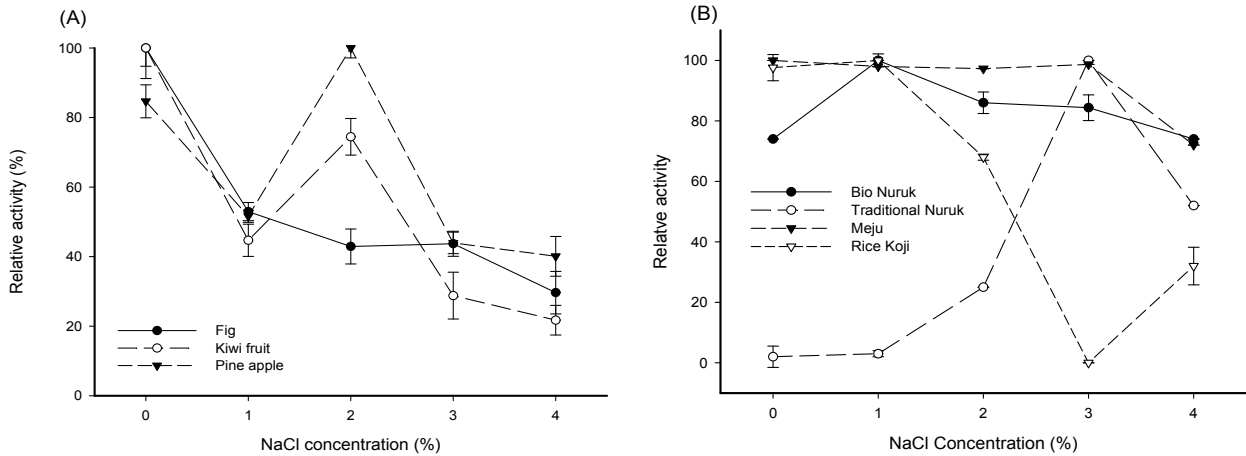


Fig. 2. Effect of pH on the relative activity of crude protease extracted from fruits (A) and traditional Korean fermentation starters (B).



**Fig. 3.** Effect of salt concentrations on relative activity of the crude protease extracted from fruits (A) and traditional Korean fermentation starters (B).

며 pH 9에서는 활성이 급격히 저하되었다. 이는 pH가 7.6인 배지에서 *Bacillus* 균주가 가장 높은 단백질분해효소 생산을 보였다는 연구와 pH 7.2 상태에서 효소 활성이 높게 나타났다는 보고와 유사하다(26,27). 하지만 배양 pH가 10.2일 때 높은 효소 활성을 나타낸다는 보고와는 다소 상이한 결과를 보였다(28). 입국의 경우에는 pH 3~6까지의 산성 환경에서 높은 활성을 보였고, pH 7 이상의 중성과 약알칼리성 환경에서는 활성이 거의 나타나지 않았다.

**조효소의 최적 염 농도**

과일에서 추출한 단백질분해효소의 염 농도에 대한 활성은 Fig. 3(A)와 같다. 무화과에서 추출한 조효소의 경우 염 농도가 높아질수록 효소활성이 감소하였으며, 무화과 단백분해 조효소의 경우 NaCl의 농도가 높아짐에 따라 단백질분해효소 활성이 감소된다는 보고와 일치한다(6). 키위와 과인애플에서 추출한 조효소는 염 농도 2%가 염 농도 1%의 조건보다 활성이 우수했다. 이는 키위의 경우 카제인에 대한 효소활성은 염도가 0.5 M까지 증가하다가 급격히 떨어진다는 연구결과와 유사하다(8).

전통발효제의 조효소 활성은 Fig. 3(B)와 같다. 전통누룩은 염 농도 3%에서 최적 활성을 보였고, 입국의 경우에는 염 농도 1~2%에서 높은 활성을 보였으나 염 농도 3%에서 활성이 급격하게 떨어져 전통누룩과는 대조적인 모습을 보였다. 메주와 개량누룩의 경우에는 염 농도 4%까지는 단백질분해효소 활성이 염 농도의 영향을 크게 받지 않았다. 과일에서 추출한 단백질분해효소에 비해 입국을 제외한 전통발효제에서 추출한 단백질분해효소가 높은 염 농도에서도 활성을 잃지 않았으며, 이는 소시지 제조처럼 염을 가하는 식품산업에서의 활용 가능성을 보여준다.

**효소의 최적 활성**

효소는 촉매작용을 위한 최적의 pH와 온도가 있으며, 이러한 최적 조건하에서 활성이 가장 높아지고, pH, 온도, 염

농도의 변화에 따라 효소활성은 많은 차이를 보여준다. 과일에서 추출한 단백질분해효소의 경우 pH 7~8의 조건에서 최적의 활성을 보인 반면, 전통발효제에서 추출한 단백질분해효소의 경우에는 pH 7 이하의 산성 조건에서 최적의 활성을 보였다. 최적 pH는 효소 촉매 부위 근처의 양전하(proton) 수여기 또는 양전하 수용기가 필요로 하는 최적 이화학 상태와 관련되어, 기질과의 결합이 용이한 pH 범위를 벗어나면 촉매반응을 하기 어려워 반응에 중요하다(24). 전통발효제에서 추출한 단백질분해효소의 경우에는 과일에서 추출한 단백질분해효소보다 활성을 나타내는 pH 구간이 넓었으며 비교적 산성인 조건에서 최적의 활성을 보이므로 식품산업에의 응용가능성이 높을 것으로 사료되지만, 최적 pH 조건은 기질의 종류에 따라 달라지므로 실제 현장에서는 기질에 따른 추가적인 연구가 필요하다.

과일에서 추출한 단백질분해효소의 경우에는 50~60°C 사이에서 최적의 활성을 보인 반면, 전통발효제에서 추출한 단백질분해효소는 70°C에서 최적의 활성을 보였으며, 이는 70°C까지는 전통발효제의 효소가 열 변성으로 실활되지 않는다는 것을 보여준다. 일반적으로 미생물에서 유래한 효소의 최적 온도는 그 미생물의 생육 최적 온도보다 높다고 알려져 있으며, 일부 내열성 효소는 80°C의 고온에서 최적의 활성을 보이는 경우도 있다(24). 식품산업 현장에서 온도는 중요한 요소 중 하나이며 전통발효제에서 추출한 단백질분해효소의 경우, 보다 높은 온도를 요구하는 산업에서 적용 가능할 것으로 사료된다.

과일에서 추출한 단백질분해효소의 경우 염 농도가 증가함에 따라 활성이 저하되는 경향성을 보였지만, 전통발효제에서 추출한 단백질분해효소는 입국을 제외하고는 염 농도 2~3%에서 실활되지 않았다. 미생물 유래 효소들이 염 농도에 내성을 갖는 이유는 정확하게 밝혀지지 않았지만, 염을 2% 이상 사용하는 소시지 제조나 기타 발효식품 제조 시에 적용 가능할 것으로 사료된다.

Table 1은 pH 7, 37°C의 같은 조건에서 추출한 단백질분

**Table 1.** Specific activity of crude protease extracted from fruits and traditional Korean fermentation starters

Source	Sample	Protease activity (U/mL) <sup>1)</sup>	Total activity (U)	Total weight (g)	Specific activity (U/g) <sup>2)</sup>
Fruits	Fig	0.69 <sup>3)</sup>	189	100	1.89
	Kiwifruit	0.11	30	100	0.30
	Pineapple	0.57	155	100	1.55
Traditional Korean fermentation starters	Bio nuruk	0.30	30.45	5	6.09
	Traditional nuruk	0.10	9.80	5	1.96
	Meju	0.06	5.46	5	1.09
	Rice koji	0.12	11.76	5	2.35
	Papain (0.01%)	0.07	7.00	0.01	700

<sup>1)</sup>Protease activities were measured at 37°C, pH 7 and 0% NaCl concentration.

<sup>2)</sup>Specific activities are expressed as total activity per g of materials.

<sup>3)</sup>Data represent average of triplicate determination. Standard deviations and statistical analysis are omitted for simplicity.

해효소의 활성을 보여준다. 효소 표준품의 활성도를 나타내는 데 사용되는 비활성도(specific activity)는 효소활성도를 단백질 함량으로 나눈 값인 units/mg protein으로 나타내지만, 본 연구에서는 조효소의 활성을 units/g material로 나타내었으며 상대적 비교를 위해 0.01%(w/v) 파파인 용액을 제조하여 비교하였다. 파파인은 파파야에서 유래한 단백질분해효소로 최적 pH는 7.0~7.5의 범위이며, 육류가공 등의 식품산업에서 연육제로 사용되고 있다(15). 본 연구조건과 같은 용매의 양과 추출 조건을 사용한 경우 메주를 제외하면 전통발효제에서 추출한 단백질분해효소 활성(Unit/mL)이 0.01% 파파인 용액보다 높았다. 얻어진 효소액(mL)과 사용한 원료(g)를 고려하여 원료 g당 효소활성(Unit)을 비교하면 과일에서 추출한 단백질분해효소의 경우에는 0.30~1.89 U의 값을 보였고, 전통발효제에서 추출한 단백질분해효소의 경우에는 1.09~6.09 U의 분포를 나타내었다.

대개 동물은 나이가 들수록 근육 내의 결합조직의 함량 비율이 높아지고, 급속냉각에 의한 저온단축, 열안정성이 높은 결합조직의 증가 등으로 인해 고기가 질겨지며, 고기의 연화를 위해 식물성 원료인 파파야, 파인애플, 무화과에서 추출한 효소인 파파인(papain), 브로멜라인(bromelain), 피신(ficin)을 이용한다. 이들 효소는 시스테인계 단백질분해효소로 결합조직 내 단백질인 콜라겐과 근원섬유 단백질에 강한 활성을 가지고 있어 육류 연화효소로 사용되고 있다(24). 이러한 식물 유래 단백질분해효소는 열안정성이 비교적 낮고 염 농도가 증가할수록 효소활성이 저해되는 문제가 있는 반면, 전통발효제에서 추출한 단백질분해효소는 효소의 최적 온도가 높고 다양한 pH 범위에서 활성을 보였으며, 염 농도가 증가해도 효소활성이 저해되지 않았다. 또한 같은 조건에서의 효소활성이 식물유래 단백질분해 조효소보다 높았으며 우리 주변에서 구하기 쉬운 재료이므로 고기 연화의 목적으로 사용 가능하고, 나아가 치즈가공, 맥주와 와인 제조, 제빵 등의 다양한 식품분야에서 적용 가능성이 있을 것으로 사료된다. 향후 실제 식품산업에 적용하기 위해서는 원하는 목적에 따라 효소의 정제, 안전성, 기질특이성, 효소의 첨가량, 반응시간 등의 세부공정에 대한 추가 연구가 필

요하다고 사료된다.

## 요 약

본 연구에서는 과일(무화과, 키위, 파인애플)에서 추출한 단백질분해 조효소와 전통발효제(개량누룩, 전통누룩, 메주, 입국)에서 추출한 단백질분해 조효소의 특성을 비교하였다. 전통발효제에서 추출한 단백질분해 조효소는 과일에서 추출한 단백질분해조효소보다 높은 온도(70°C), 높은 염 내성(1~3%), 그리고 낮은 pH(3~6)에서 활성을 보였다. 같은 조건에서 활성을 비교하였을 때, 바이오 누룩>입국>전통누룩>무화과>파인애플>메주>키위 순으로 활성이 높았다. 이러한 결과는 과일에서 추출한 단백질분해 조효소보다 전통발효제에서 추출한 단백질분해 조효소의 활성이 우수하고 고온, 산성, 그리고 염의 조건에서도 활성이 저하되지 않으므로, 소시지나 치즈 제조 등의 다양한 식품산업에 이용될 수 있는 가능성을 보여준다.

## 감사의 글

본 연구는 제주광역시경제권 선도산업의 연구비 지원 하에 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Tsuji RF, Hamono M, Koshiyama I, Fukushima D. 1987. Conditioning of meat with raw soy sauce and its proteinases: Their effects on the quality of beef. *J Food Sci* 52: 1177-1179.
2. Wenham LM, Locker RH. 1976. The effect of marinating on beef. *J Sci Food Agric* 27: 1079-1084.
3. Kim JP, Suh JS, Kim JS. 1986. Isolation and purification of ficin from Fig Latex. *J Korean Food Sci Technol* 18: 270-277.
4. Kang CK, Rice EE. 1970. Degradation of various meat fractions by tenderizing enzymes. *J Food Sci* 35: 563-565.
5. Tappel AL, Miyada DS, Sterling C, Maier VP. 1956. Meat tenderization. II. Factors affecting the tenderization of beef

- by papain. *J Food Sci* 21: 375-383.
6. Kim MH, Rho JH, Kim MJ. 2011. Stabilizing and optimizing properties of crude protease extracted from Korean figs. *Korean J Food Cookery Sci* 27: 29-37.
  7. Yamaguchi T, Yamashita Y, Takeda I, Hisashi K. 1982. Proteolytic enzymes in green asparagus, kiwi fruit and mint: Occurrence and partial characterization. *Agric Biol Chem* 46: 1983-1986.
  8. Kim MH, Rho JH, Song HN. 2010. Stability and optimization of crude protease extracted from Korean kiwifruits. *Korean J Food Sci Technol* 42: 554-558.
  9. Oh SJ, Kim SC, Koh SC. 2002. Properties and thermostability of gelatin-degrading proteinases in the fruit of *Actinidia chinensis* (kiwifruit). *Korean J Life Sci* 12: 752-758.
  10. Kim BJ. 1989. Purification and characterization of kiwifruit protease. *Korean J Food Sci Technol* 21: 569-574.
  11. Yoon S, Choi HJ, Lee JS. 1991. Modification of functional properties of casein by kiwifruit protease. *Korean J Soc Food Sci* 7: 93-101.
  12. Cho SJ, Chung SH, Suh HJ, Lee H, Kang DH, Yang HC. 1994. Purification and characterization of a protease actinidin isolated from Cheju kiwifruit. *Korean J Food & Nutr* 7: 87-94.
  13. Kim EM, Choe IS, Hwang SG. 2003. Effects of singular manner or mixed type treatment of proteases isolated from pear, pineapple and kiwifruit on actomyosin degradation. *Korea J Food Sci Anim Res* 23: 193-199.
  14. Yang CY. 2006. Physicochemical properties of chicken jerky with pear, pineapple and kiwi extracts. *Korean J Culinary Res* 12: 237-250.
  15. Bai YH, Rho JH. 2000. The properties of proteolytic enzymes in fruits (pear, kiwifruit, fig, pineapple and papaya). *Korean J Soc Food Sci* 16: 363-366.
  16. Lee JH, Jang HR. 2005. Proteolytic properties of *Sarcodon aspratus* on beef loin. *Korean J Culinary Res* 11: 110-124.
  17. Yun SJ, Oh PS, Jang MS. 1993. The properties of proteolytic enzymes from the fruit of *Broussonetia kazinoki* Siebold. *J Korean Soc Food Nutr* 22: 803-806.
  18. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 597-635.
  19. Lee KH, Kim ND, Yoo JY. 1997. Survey on the manufacturing process of traditional *Meju* for and of *Kanjang* (Korean soy sauce). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 390-396.
  20. Oh HI, Park JM. 1997. Changes in quality characteristics of traditional *kochujang* prepared with a *meju* of different fermentation period during aging. *Korean J Food Sci Technol* 29: 1166-1174.
  21. Park CS. 2012. Effect of tryptic soy broth (TSB) and luria-bertani (LB) medium on production of subtilisin CP-1 from *Bacillus* sp. CP-1 and characterization of subtilisin CP-1. *J Life Sci* 22: 823-827.
  22. Cho HK, Seo WT, Lee JY, Cho KM. 2012. Quality characteristics of cereal *makeolli* rice *nuruk* prepared *Rhizopus oryzae* CCS01. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1002-1008.
  23. Kwon YH, Lee AR, Kim HR, Kim JH, Ahn BH. 2013. Quality properties of *makeolli* brewed with various rice and *koji*. *Korean J Food Sci Technol* 45: 70-76.
  24. Jang PS, Noh BS, Yoo SH, Kim MJ, Kim YW. 2010. *Food enzyme technology*. Soohaksa Publisher, Seoul, Korea. p 323-355.
  25. Bae HJ, Kim BY, Kim MH. 1992. The rate and extent of acid induced coagulation of milk protein and physical characteristics of resultant coagulum. *J Korean Agric Chem Soc* 35: 65-75.
  26. Koo JH, Choi IJ, Nam HS, Lee HJ, Shin ZI, Oh TK. 1997. Medium optimization for production of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* NS70. *Kor J Appl Microbiol Biotchnol* 25: 207-211.
  27. Choi C, Choi KS, Cho YJ, Lim SI, Lee SH, Son JH, Choi HJ, Lee HD. 1996. Characteristics and action pattern of protease from *Bacillus subtilis globigii* CCKS-18 in Korean traditional soy sauce. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 39: 460-465.
  28. Shim CW, Jeong KS, Shin WC, Yu JH. 1994. Effect of pH on the production and characteristics of protease by *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M. *Kor J Appl Microbiol Biotchnol* 22: 59-64.