Food Engineering Progress
Vol. 15, No. 2. pp. 182~187 (2011.05)

산업식품공학
Food Engineering Progress

Research Note

전통 발효식품으로부터 Protease 활성을 보유한 유산균의 분리 및 동정

국무창[1,2] · 조석철[3] · 박훈[4] · 김승섭 · 변유량[2] · 최운용 · 이현용*

[1]안양대학교 해양생명공학과, [2](주) 바이오벤 연구개발팀, [3]경희대학교 피부생명공학센터,
[4]선문대학교 식품과학과, 강원대학교 BT 특성화대학 생물소재공학전공 · 생명공학연구소

Protease Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Korean Traditional Fermented Food

Moo Chang Kook[1,2], Seok Cheol Cho[3], Hoon Park[4], Seung Seop Kim, Yu Ryang Pyun[2], Woon Yong Choi, and Hyeon Yong Lee*

[1]Department of Marine biotechnology, Anyang University, [2]R&D Division, Biovan Co., Ltd., [3]Skin Biotechnology Center, Kyung Hee University, [4]Department of Food Science, Sun Moon University, Department of Biomaterials Engineering, College of Bioscience and Biotechnology, Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University

Abstract

A proteolytic lactic acid bacterium was isolated from Korean traditional fermented foods. The isolate BV-26, which had a protease activity (24 U/mg-crude protein), was identified as *Lactobacillus plantarum* by the API 50CHL kit and 16S rDNA analysis (99.9% of homology), and named as *L. plantarum* BV-26. Cell growth and protease activity of *L. plantarum* BV-26 was determined in MRS broth using 5L jar fermentor at 30°C. The maximum growth of *L. plantarum* BV-26 was reached at 18 hr in MRS broth, while protease activity of BV-26 was detectable at 12 hr and the highest activity was obtained after 16 hr cultivation. Therefore, we expect that the proteolytic lactic acid bacteria, *L. plantarum* BV-26, may be used as a starter for the fermentation of animal feed. Especially, the fermentation of soybean meal with the strain can be applied for improving feed utilization.

Key words: protease, animal feed, lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*

우리나라의 대표적인 발효식품인 김치와 젓갈에는 *Lactococcus* 속, *Lactobacillus* 속, *Pediococcus* 속, *Weissella* 속 등의 다양한 유산균이 존재하고 있다. 이러한 유산균은 복잡한 젖산 발효를 거치면서 각 균의 특성에 따라 다양한 형태의 펩타이드, 유기산 및 효소를 생성하여 발효식품의 맛과 풍미에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며, 우유나 치즈 등에서 분리한 유산균과는 별도로 그 종류가 다양할 뿐만 아니라, 외부 환경에 대한 적응력이 뛰어나, 높은 염 농도, 낮은 pH 환경에서도 생육이 가능하다(Cho et al., 2009). 최근의 연구에 의하면 유산균은 항균, 항고혈압, 항암 등과 같은 각종 생리활성물질의 생산력이 뛰어나고, 특히 조류독감 바이러스(AI virus)의 감염 억제 효과도 있는 것으로 보고되고 있어 기능성식품, 의약품, 화장품, 생균제 및 동물사료에 이르기까지 그 이용 범위를 넓혀가고 있다(Ayebo et al., 1980; Lee et al., 1999; Lee & Park, 1999; Maeng et al., 1997; Mistuoka, 1990; Park, 2002; Yu et al., 2009).

현재 식품공업과 제약공업, 세제공업 등 광범위한 분야에서 각종 효소의 이용도가 증가하고 있으며(Godfrey & Reichelt, 1983), 그 중에서도 단백질에 작용하여 펩타이드 결합을 가수분해하는 단백질가수분해효소는 전 세계적으로 공업 효소 판매량의 약 60%를 차지하고 있다. 단백질가수분해효소인 protease는 식품 및 사료산업에서 발효식품의 풍미증진, 식육의 연화, 주류의 혼탁방지, 아미노산 및 다양한 생리활성을 갖는 펩타이드의 공급 등 여러 측면에서 광범위하게 이용되고 있으며(Cho, 1989; Messina, 1995; Lee et al., 1996), 특히 protease를 활용한 대두단백의 가수분해물인 대두 펩타이드의 경우 콜레스테롤 저하, 항고혈압, 항암, 항산화, 항동맥경화 등 다양한 생리활성을 갖고 있는 것으로 알려지고 있다(Cho, 1989; Messina, 1995; Lee et al., 1996; Back et al., 2010). Protease 생산에 이용되는 미

Corresponding author: Hyeon Yong Lee, Department of Biomaterials Engineering, College of Bioscience and Biotechnology, Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon-si, Gangwon-do 200-701, Republic of Korea
Tel: +82-33-250-6455; Fax: +82-32-253-6560
E-mail: hyeonl@kangwon.ac.kr
Received October 22, 2010; revised March 03, 2011; accepted March 03, 2011

생물은 *Aspergill*us 속, *Bacillus* 속, 방선균 및 효모류로 알려져 있으나(Peckman, 1951; Crewth, 1963; Mizusawa et al., 1964; Horikoshi, 1971; Rhden et al., 1973; Nakanishi et al., 1974; Meussdoerffer et al., 1980; Impoolsup et al., 1981; Wang et al., 2005), protease를 산업적으로 사용하기 위해서는 내열성 및 알러지 반응 등이 없어야 하므로 실제 protease의 산업적 생산에 이용되는 종류는 극히 제한적이다. 미생물을 이용한 protease의 생산에 관한 대부분의 연구는 주로 세균인 *Bacillus* 속 균주를 대상으로 수행되었으며(Park et al., 2002; Kim et al., 2002; Ahn et al., 2006; Lim et al., 2006), 현재 상업적으로 이용되고 있는 protease의 대부분은 *Bacillus* 균주로부터 생산되는 중성 또는 알카리성 효소들이다(Rao et al., 1998). 그 외에도 *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Vibrio*, *Micrococcus, Lactobacillus* 등과 같은 세균에서도 protease의 활성이 보고되고 있다(Kothry & Kreger, 1985; Fukushima et al., 1989; Rattray et al., 1995; Denkin & Nelson, 1999; You et al., 2005; Cha et al., 2007).

대두의 탈지가공 후 부산물로 얻어지는 대두박은 45~50% 정도의 단백질을 함유하고 있으며 아미노산 조성이 우수하고 대량으로 생산되기 때문에 가축사료로 주로 이용되고 있다(Park, 1987; Kim and Whang, 2000). 하지만, 대두박에 함유된 대두단백질과 대두펩타이드는 수용액에 대한 용해도가 낮으며 대두박에 포함된 트립신 저해물질로 인해 소화흡수율이 낮은 단점이 있다. 정제된 protease 효소처리에 의해 대두단백질의 소화흡수율을 높이기 위한 연구들이 진행되고 있지만, 상업적으로 이용되는 정제된 효소의 가격이 고가이므로 사료로 이용되는 저가의 대두박에 적용하기에는 경제성이 매우 낮다. 따라서, 정제된 효소를 이용하지 않고 전통발효식품에서 분리된 안전한 protease 생산 균주를 스타터로 사용하여 대두박을 발효시킴으로써 대두단백질의 소화흡수율을 높이기 위한 연구가 요구되고 있지만, 현재까지 이에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다(Wallace, 1985).

최근 국내에서는 전통발효식품으로부터 다양한 기능성을 지닌 유산균을 분리하고 이를 활용하기 위한 연구가 광범위하게 진행되고 있다. 특히, 김치와 젓갈 등 전통발효식품에 주로 존재하는 *Lactobacillus plantarum*과 같은 유산균은 발효 중 젖산을 생성하여 유해한 미생물을 제어하고, 발효식품의 풍미를 증진시키며, 다양한 생리활성물질을 생산하는 것으로 알려져 있다(Ammor & Mayo, 2007). 현재 유산균이 생산하는 protease에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이지만, protease 활성을 갖는 유산균의 산업적 적용은 안전한 스타터로서의 이용뿐만 아니라 유산균의 생리활성에 의한 상승 효과를 기대할 수 있을 것이다.

따라서, 본 연구에서는 사료의 발효에 적합한 유산균 스타터를 선발하기 위하여 한국의 전통발효식품으로부터 protease 활성이 우수한 유산균주를 분리·동정 하였으며 분리된 균주의 생장 특성 및 효소활성을 측정하였다.

재료 및 방법

재료

Protease 활성을 갖는 유산균을 분리하기 위한 시료로 가정에서 담근 김치나 시판 김치(전라북도 전주, 익산, 순창, 강원도 속초, 경기도 안성, 서울)를 구입하였으며, 젓갈류는 충청북도 강경, 경기도 인천 등지의 어시장에서 구입하여 사용하였다.

균주의 분리 및 동정

균주 분리는 Ahn et al.(2006)의 방법을 변형하여 실시하였다. 먼저 채취한 시료 10 g을 10 mL의 살균생리식염수에 혼합하여 무균적으로 잘게 다진 다음 그 중 1 g의 다진 시료액을 취하여 9 mL의 살균생리식염수에 현탁하고 순차적으로 희석하여 0.5%(w/v) HCl/L-cystein(Sigma, St. Louis MO., USA), 0.2%(w/v) bromophenol blue(Sigma, St. Louis MO., USA), 2%(w/v) casein(Sigma, St. Louis MO., USA)을 포함한 *Lactobacilli* MRS 한천 배지(Dfico, Detroit, USA: 1% bacto-peptone, 1% beef extract, 0.5% yeast extract, 2% glucose, 0.1% polysorbate 80, 0.5% sodium acetate, 0.2% ammonium citrate, 0.2% K_2HPO_4, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.02% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 1.5% agar powder 1.5%; 이하 modified MRS broth)에 도말하였다. Protease 활성을 갖는 유산균을 분리하기 위하여 30°C에서 3-5 일간 배양한 후 halo가 나타나는 유산균 집락을 선별하였다(Fig. 1). 선발된 균주는 MRS 한천배지에 도말 하여 30°C에서 24 시간 배양 후 균주 동정에 사용하였다. 선발된 균주는 1 차적으로 균주의 형태를 관찰하였으며, 생화학적 특성을 조사하기 위해 Gram 염색법 및 Berge`s manual of

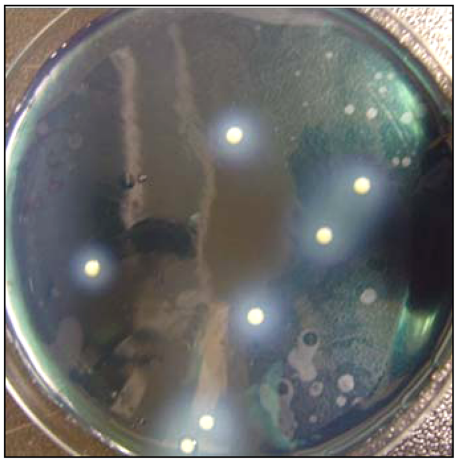


Fig. 1. Protease activity of isolated strain from Korean traditional fermented food on modified MRS agar plate containing 2% level of milk casein. Halo zones were shown by isolates with protease.

systematic bacteriology(Sneath et al., 1994)에 의하여 catalase activity test를 수행하였다. API 50CHL kit (BioMerieux Co., Marcy-I'Etoile, France)을 이용하여 선발된 균주의 당 이용성을 조사하였다. 최종적으로 분리된 균주의 동정을 위하여 한국 종균 협회에 16S rDNA 분석을 의뢰하여, 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 본 실험 균주의 chromosomal DNA을 Wizard genomic DNA purification kit(Promega, Madison, USA)를 이용해 분리한 후 16S rRNA sequencing에 사용하는 universal primer인 27F(5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGATACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 PCR 증폭하였다(Yoon et al., 1996). 증폭된 PCR 산물은 Wizard SV Gel and PCR clean-up system(Promega, Madison, USA)을 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Life Technologies, California, USA)를 이용하여 염기서열을 분석 하였다. 그 결과는 BLASTN 프로그램을 이용하여 GENEBANK의 ribosomal DNA sequence와 비교하였으며, sequence의 상동성은 ClustalW와 Mega 4 program을 이용하여 비교 분석하였다(Thompson et al., 1994).

분리 동정된 균은 30% glycerol을 이용하여 동결 보존한 후 사용하였으며, 본배양에 접종되기 전 MRS 고체 배지 및 액체 배지를 이용하여 계대 배양을 수행한 후 종균으로 사용하였다.

Protease 활성 측정

Protease 활성 측정은 Hull법(Hull, 1974)을 변형하여 실시하였다. 전술한 한천 배지를 이용하여 시료를 배양한 후 halo가 나타난 균주를 선별하여 modified MRS casein 액체 배지(MRS broth, 0.5%(w/v) HCl/L-cystein(Sigma, St. Louis MO., USA), 2%(w/v) casein(Sigma, St. Louis MO., USA)에서 전배양된 균주를 1%(v/v) 수준으로 접종한 후, 30°C에서 배양하고 그 상등액을 조효소액으로 사용하여 protease의 활성을 측정하였다. 기질로 0.5% casein 액을 사용하였으며, 조효소액 0.25 mL을 기질 0.25 mL에 첨가하여 37°C에서 한 시간 반응시킨 후 15% TCA(trichloroacetic acid, Sigma, St. Louis MO., USA) 용액을 첨가하고 50°C에서 20 분간 정치하여 효소반응을 종결시킨 다음 12,000 rpm에서 20 분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액을 0.45 μm filter(Waters, Minnesota, USA)로 여과시킨 후 UV/VIS spectrophotometer DU®530(Beckman Instruments Inc., California, U.S.A)을 이용하여 290 nm에서 흡광도을 측정하였으며, 표준 효소액으로 tyrosinase(50,000 units, Sigma, St. Louis MO., USA)를 이용하여 정량하였다.

MRS 배지를 이용한 생장 특성

분리된 균의 생장 특성을 MRS 액체 배지를 이용하여 확인하였다. 즉, 분리된 균을 5 L jar fermentor(BK511, Kobiotech, Incheon, Korea)를 이용하여 MRS 배지에서 배양하였으며, 발효 중 생장 및 pH 변화를 측정하였다. 균체의 생장 변화를 알아보기 위해 UV/VIS spectrophotometer DU®530(Beckman Instruments, Inc., California, USA)을 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 최종 생균수는 배양액을 살균 생리식염수에 순차적으로 희석시킨 다음 MRS 한천 배지에 0.1 mL씩 분주하여 도말한 후 최적의 온도에서 배양하고 콜로니 형성단위(colony forming unit)를 측정하여 계산하였다. 발효 중 pH의 변화는 MP 220 pH meter(Mettler Toledo, Zurich, Switzerland)를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

김치 및 젓갈 등의 150 여 전통발효식품을 시료로 하여 protease 활성을 갖는 유산균을 분리하여 1 차 선별한 결과 10 여주의 protease 활성을 갖는 유산균을 분리하였다(data not shown). 선별된 균주를 modified MRS 액체 배지에 접종하여 증균 배양시킨 후 protease 활성을 측정하였으며, *L. casei* ATCC 393을 대조군으로 하여 분리 균주 간의 효소 활성을 비교하였다. 선별된 균주 중에서 BV-26의 protease 활성이 가장 높게 나타났으며, BV-26의 활성은 대조군인 *L. casei* ATCC 393(20 U/mg-crude protein) 보다 높은 수준인 24 U/mg-crude protein의 활성을 나타내었다(Fig. 2). Bergy's Manual of Systematic Bacteriology에 따라 최종 선별된 균주의 형태학적 및 생리학적 특성을 조사한 결과, BV-26 균주는 Gram 양성의 간균으로 spore을 형성하지 못하며 catalase 양성을 나타내는 것으로 확인되었다(data not shown). API 50CHL kit를 이용하여 BV-26의 당 이용성을 분석한 결과 *Lactobacillus plantarum*과 99.9%의 상동성을 보였으며(Table 1), 최종적으로 16S rDNA 염기서열을 분석하고 homology를 검색한 결과 역시

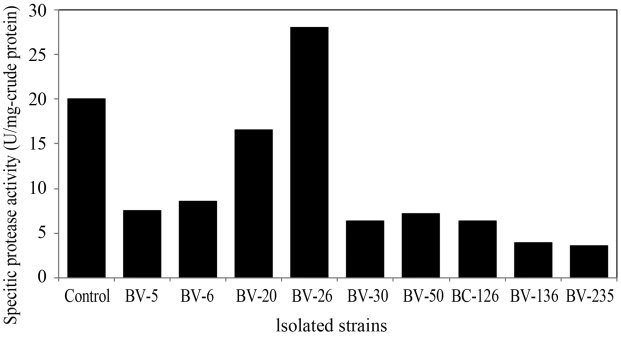


Fig. 2. Specific protease activity of isolated strain from Korean traditional fermented food. Control used *L. casei* ATCC 393. Data are means of triplicates. Standard errors were less than 5.0% of the means.

Table 1. Carbon utilization of the isolated strain BV-26 using API 50CHL kit

Substrate	BV-26	Substrate	BV-26
Control	-	Esculin	-
Glycerol	-	Salicin	+
Erythhritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	-	Lactose	+
D-Ribose	+	Melibiose	+
D-Xylose	-	Sucrose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
D-Adonitol	-	Inulin	-
Methyl-BD-xylopyranosicle	-	Melezitose	+
G-Galctose	+	Raffinose	+
D-Glucose	+	Starch	-
D-Fructose	+	Glycogen	-
D-Manose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	Gentibiose	+
Rhamnose	+	D-Turanose	+
Dulsitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
Manitol	+	D-Frucose	-
Sorbitol	+	L-Fructose	-
α-Methyl-D-Mannoside	-	D-Arabitol	+
α-Methyl-D-Glucoside	-	L-Arabitol	-
N-Acethyl-Glucosamine	+	Gluconate	+
Amygdalin	+	2-keto-Gluconate	-
Arbutin	+	5-keto-Gluconate	-

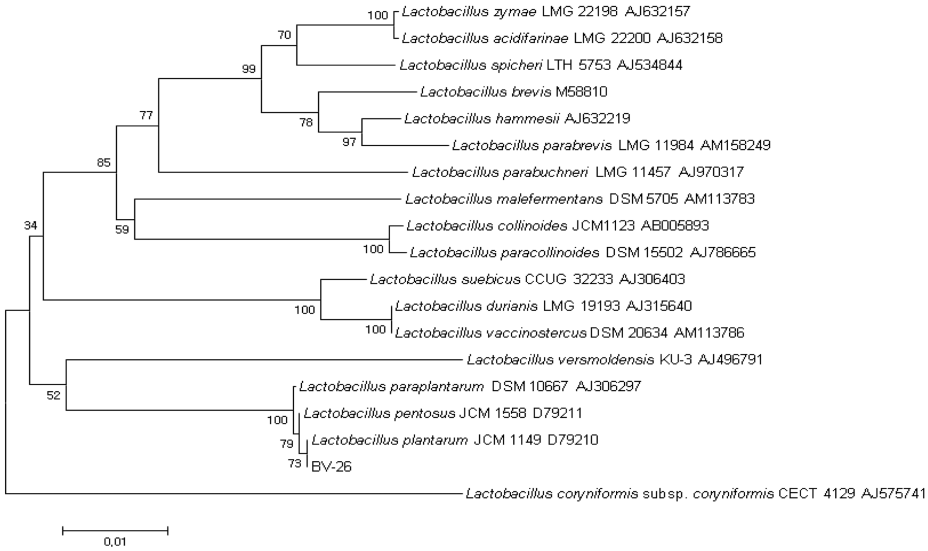
*L. plantarum*과 99%의 상동성을 나타내는 것으로 확인되어(Fig. 3), 최종 분리한 균주를 *Lactobacillus plantarum* BV-26으로 표기하였다.

현재까지 *L. casei, L. sanfrancisco, L. helveticus* 및 *L. plantarum* 등과 같은 유산균이 protease를 생산한다고 보고되었으며(Gobbetti et al., 1996; Minervini et al., 2003; Valasaki et al., 2008; Cho & Oh, 2010), 이들 유산균중에서 *L. plantrum* 균주는 유산을 생성하여 제품의 pH를 낮추어 주고 풍미를 부여하는 등 생균제로서 유익한 역할을 하는 유산균으로 알려져 있다(Ammor & Myo, 2007). *L. plantarum* BV-26은 전통적인 발효식품으로 그 안전성이 입증된 전통발효식품에서 분리된 유산균으로 동물사료의 발효시 안전한 스타터로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

MRS 배지를 이용한 생장 특성

L. plantarum BV-26의 생장과 protease 활성 변화를 측정하기 위하여 5 L jar fermentor(BK511, Kobiotech, Incheon, Korea)를 이용하여 MRS 배지에서 발효를 수행하였다. 배양 조건은 30°C, 교반속도는 50 rprm으로 유지하였으며, DO 및 pH는 조절하지 않았다. 발효 중 pH와 균체 농도의 변화는 Fig. 4(a)에 나타내었다. 발효 중 pH는 4.0까지 감소되었으나, 18 시간이 경과한 이후 pH의 변화는 관찰되지 않았다. *L. plantarum* BV-26의 생장은 발효 6 시간 이후 활발하게 진행되어 18 시간에 최고의 균체 농도인 2.5×10^9 CFU/mL(data not shown)에 도달하였으며, 그 후 정체기에 진입하는 것으로 나타났다.

Fig. 4(b)에 보여지는 바와 같이 *L. plantarum* BV-26은 배양 12 시간부터 protease 활성을 나타내기 시작하여, 배양 16 시간에 최고의 활성인 24 U/mg-crude protein에 도달하는 것으로 확인되었다. 앞서 언급한 것처럼 *L. plantarum* BV-26의 최고 protease 활성은, 대조군인 *L. casei* ATCC 393의 활성과 비교하여 약 20% 높은 활성을 보였으며, 이전의 연구 결과(You et al., 2005)와 비교할 때 *L. plantarum* BV-26은 다른 유산균에 비해 현저하게 빠른 생장 속도와 높은 protease 활성을 나타내는 것으로 확인되었으며, 분리



Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of strain BV-26

Fig 3. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the positions of strain BV-26 isolated from Korean fermented food.

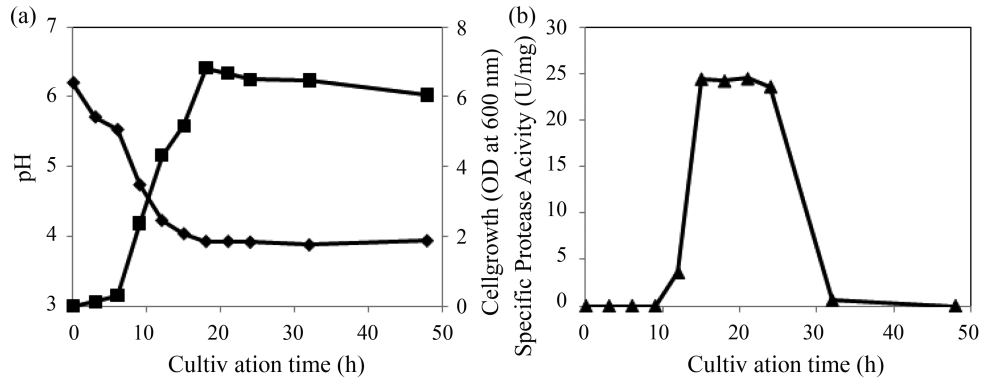


Fig. 4. Cell growth (a) and protease activity (b) of *L. plantarum* BV-26 on MRS broth using 5 L jar fermentor at 30°C. ■ : cell growth at 600 nm; ◆ : pH ; ▲ : Specific proteas acitivy (U/mg-protein). Data are means of triplicates. Standard errors were less than 5% of the means.

대두단백(ISP) 및 대두박에서의 단백질 분해능을 확인하였다(data not shown). 따라서, *L. plantarum* BV-26은 상업용 스타터로 활용하기에 충분한 발효학적 특성을 갖는 것으로 판단된다.

전분, 단백질, 또는 지방과 같은 영양소의 소화흡수율을 높여줄 수 있는 효소를 분비하는 생균을 발효스타터로 이용할 경우 인체나 동물에서 영양소의 이용률을 개선시킬 수 있으며, 이로 인해 음식물 또는 사료의 가치를 증가시킬 수 있다(Walsh et al., 1993; Cho et al., 2007). 특히, 전통적인 발효식품으로부터 분리된 유산균인 *L. plantarum*은 증식이 빠르고 pH를 낮추는 특성을 나타내므로 발효시 유해한 미생물의 증식을 억제 시킬 수 있는 장점이 있을 뿐만 아니라(Ammor & Mayo, 2007), 한국인에게 보다 친화적인 안전한 발효 스타터로 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구결과에서 확인된 바와 같이 빠른 생육 속도와 높은 protease 활성을 갖는 *L. plantarum* BV-26 균주를 사료용 스타터로 사용할 경우 유산균 생균제로서의 장점을 확보할 수 있을 뿐만 아니라, 특히 대두박의 발효시 안전한 스타터로 이용되어 사료의 영양적 가치를 높일 수 있을 것으로 기대된다(Kim and Whang, 2000).

요 약

김치 및 젓갈 등의 150여 전통 발효 식품을 시료로 하여 protease 활성을 갖는 유산균을 분리한 결과, 24 U/mg-crude protein의 높은 활성을 갖는 젖산균 BV-26 균주을 분리하였다. API 50CHL kit를 이용하여 BV-26 균주의 당 이용성을 분석하고 16S rRNA 염기서열(99.9% 상동성)을 비교한 결과, 분리된 균주를 *L. plantarum* BV-26으로 표기하였다. *L. plantarum* BV-26의 생장과 protease 활성 변화를 MRS 배지를 이용하여 측정한 결과, *L. plantarum* BV-26의 생장은 배양 6 시간 이후 활발하게 진행되어 18 시간에 최고의 균체 농도를 보였으며, protease 활성은 배양 후 12 시간부터 생성되기 시작하여 16 시간에서 최고의 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구에서 분리된 *L. plantarum* BV-26을 동물사료의 발효용 스타터로 이용할 경우 유산균이 갖는 유익한 장점 및 안전성을 확보할 수 있을 뿐만 아니라, 특히 대두박의 발효시 사료의 영양적 가치를 높일 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2008년도 중소기업청 산학협력실 지원사업(과제번호:120080620)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

Ahn YS, Kim YS, Shin DH. 2006, Isolation, identification, and fermentation characteristics of *Bacillus* sp. with high protease activity from traditional *Cheonggukjang*. Kor. J. Food. Sci. Technol. 38: 82-87.

Ammor MS, Mayo B. 2007, Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. Meat Sci. 76: 138-1462.

Ayebo AD, Angelo IA, Shahani KM. 1980, Effect of ingesting *Lactobacillus* milk upon flora and enzyme activity in humans. Milchwissenschaft. 35: 730-733.

Back SY, Do JR, Do GP, Kim HK. 2010, Effect of angiotensin-Ⅰ converting enzyme inhibitory from hydrolysate of soybean protein isolate. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 39: 8-13.

Cha IT, Oh YS, Roh DH 2007, Isolation and Characterization of *Micrococcus* sp. HJ-19 secreting extracellular protease. Kor. J. Microbiol. 43: 222-226.

Cho JS. 1989, Supply and demand of products, present condition and the point of issue of research of Korean soy seasonings. Food Sci. Ind. 22: 28-36.

Cho KK, Li GH, Cho SJ, Yoon YC, Hwang SG, Heo KC, Choe IS. 2007, The identification and physiological properties of *Lactobacillus plantarum* JK-01 isolated from Kimchi. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 27: 363-370.

Cho YH, Park SN, Jeong SH. 2009, A study of the physiological

activity and industrial prospects of plant-origin lactic acid bacteria. Kor. J. Dairy Sci. Technol. 27: 53-57.

Cho YH, Oh SJ. 2010, Casein phosphopeptide-producing activity and proteolytic ability by some lactic acid bacteria. Kor. J. Food Sci. Ani. Resour. 30: 443-448.

Crewth WC. 1963, The effects of pH and cations on the thermal densturation of trypsin. Aus. J. Biol. 6: 597-601.

Denkin SM, Nelson DR. 1999, Induction of protease activity in *Vibrio anguillarum* by gastrointestinal mucus. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3555-3560.

Fukushima J, Yamato J, Morihara K, Atsumi Y, Takeuchi H, Kawamoto S, Okuda K. 1989, Structural gene and complete amino acid sequence of *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3455 elstase. J. Bacteriol. 171: 1698-1704.

Fuller R, Gibson GR. 1997, Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. Scand. J. Gastroenterol. 222: 28-31.

Gobbetti M, Smacchi E, Corsetti A. 1996, The proteolytic system of *Lactobacillus sanfrancisco* CB1: Purification and characterization of a proteinase, a dipeptidase and an aminopeptidase. Appl. Envir. Microbiol. 62: 3220-3226.

Godfrey, T, Reichelt J. 1983, Industrial enzymology, The application of enzymes in industry. The Nature Press, p 127-172.

Horikoshi K. 1971, Production of alkaline enzymes by alklophilic microorganisms, Part I, akaline proteinase produced by *Bacillus* No. 221. Agric. Biol. Chem. 35: 1407-1414.

Hull ME. 1974, Study on milk proteins II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. J. Dairy Sci. 30: 881-884

Impoolsup A, Bhumiratana A, Flegel TW. 1981, Isolation of alkaline and neutral protease from *Aspergillus flavus* var, *columnaris*, a soy sauce Koji mold. Appl. Environ. Microbiol. 42: 619-628.

Kim HS, Whang KY. 2000, Nutritional value of soybean meal on non-ruminant feed. Korean Soy. Digest. 17: 40-54.

Kim KP, Kim NH, Rhee CH, Woo CJ, Bae DH. 2002, Isolation and characterization of protease producing bacteria from soil. J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr. 31: 754-759.

Korhary MH, Kreger AS. 1985, Production and partial characterization of an elastorytic protease of *Vibrio vulnificus*. Infect. Immum. 50: 534-540.

Lee CH, Park HD. 1999, Isolation and characterization of lactic acid bacteria producing antimutagenic substance from Korean KimChi. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27: 15-22.

Lee JS, Kwon SJ, Chung SW, Choi YJ, Yoo JY, Chung DH. 1996, Changes microorganism enzyme activities and major component during the fermentation of Korean traditional *Doenjang* and *Kochujang*. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 247-253.

Lee YK, Kim JH, Oh MK, Shin SY, Choi KC, Rhee YH. 1999, Selection and physico-chemical characteristics of lactic acid bacteria which had cholesterol lowering Activities. J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 42: 83-90.

Lim SI, Kim HK, Yoo JY. 2006, Characteristics of protease produced by *Bacillus subtilis* PCA 20 -3 isolated from Korean traditional Meju. Kor. J. Food. Sci.Technol. 32: 154-160.

Maeng LJ, Kim JS, Ji GE, Kim JH. 1997, Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from human intestines and the characteristics of their bacteriocins. J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr. 28: 1228-1236.

Messina M. 1995, Modern applications for an ancient bean: soybeans and the prevention and treatment of chronic disease. J. Nutr. 125: 567.

Meussdoerffer, F., Tortora, P. and Holzer, H. (1980) Purification and properties A from yeast. *J. Biological. Chem*. **255**, 12087-12093.

Minervini F, Algaron F, Rizzello CG, Fox PF, Monnet V, Gobbetti M. 2003, Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. Appl. Envir. Microbiol. 69: 5297-5306.

Mistuoka T. 1990, Bifidobacteria and their role in human health. J. Ind. Microbiol. 6: 263-268.

Mizusawa K, Ichishima E, Yoshida F. 1964, Studies on the proteolytic enzymes of thermophilic *Streptomyces.* Agric. Biol. Chem. 28: 884-895.

Nakanishi T, Matsumura Y, Minamura N, Miniura N, Yamamoto T. 1974, Purification and some properties of an alkalophilic aroteinase of a *Streptomyces* sp.. Agric. Bio. Chem. 38: 37-44.

Park CS, Min DK, Ahn YS, Lee JH, Hong, SK, Kim JH, Kang DK. 2002, Isolation and characterization of soy protein-degrading strain, *Bacillus subtilis* EB464. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 30: 210-215.

Park HS. 1987, Soybean meal production and the use in animal feeding. Kor. J. Soybean Digest, 4: 20-26.

Park KY. 2002, Korean traditional food their anticancer effects. Kor. Soc. Plant. People Environ. 5: 41-45.

Peckman EV. 1951, *Aspergillus* protease. Biochemistry. 5: 321-325.

Rhden AC, Lindberg M, Philipson L. 1973, Isolation and characterization of two protease – producing mutants from *staphylococcus aureus.* J. Bacteriol. 116: 25-32.

Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. 1998, Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Rev., 62: 597-635.

Rattray FP, Bockelmann W, Fox PE. 1995, Purification and characterization of an extracellular proteinase from *Brevibacterium linens* ATCC9174. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3454-3456.

Sneth PHA, Mair NS, Elisabeth SM, Holt JG. 1994, Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. 9th ed.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalies and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680.

Valasaki K, Staikou A, Theodorou LG, Charamopoulou V, Zacharaki P, Papamichael EM. 2008, Purification and kinetics of two novel thermophilic extracellular proteases from *Lactobacillus helveticus* from kefir with possible biotechnological interest. Bioresour. Technol. 99: 5804-5813.

Wallace RJ. 1985, Absorption of soluble proteins to rumen bacteria and the roie of absorption in proteolysis. Br. J. Nutr. 53: 326.

Wang RC, Sing RC, Law CW. 2005, Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. Process Biochem. 40: 217-227.

Yoon JH, Lee ST, Park YH. 1996, Inter-and intraspecific phylogenetic analysis of the genus Nocardioides and related taxa based on 16S rDNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 187-194.

You SJ, Cho JK, Hwang SG, Heo KC. 2005, Probiotic characteristics of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from kefir. Korean J. Food. Sci. Ani. Resour. 25: 357-364.

Yu MH, Im HG, Im NK, Hwang EY, Choi JH, Lee EJ, Kim JB, Lee IS, Seo HJ. 2009, Anti-hypertensive activities of *Lactobacillus* isolated from *Kimchi*. Kor. J. Food. Sci. Technol. 41: 428-434.