

*Streptomyces*속 균주가 생성하는 Alkaline Protease의 생산 및 정제

최 청* · 정영건 · 성삼경 · 최광수 · 이재성 · 조영제 · 권오진

영남대학교 식품가공학과

Production and Purification of Alkaline Protease from *Streptomyces* sp.

Choi, Cheong*, Yung-Gun Chung, Sam-Kyung Sung, Kwang-Soo Choi,
Jae-Sung Lee, Young-Je Cho and Oh-Jin Kwon

Department of Food Science & Technology, Yeungnam Univ., Gyongsan 712-749, Korea

Abstract — An alkaline protease producing microorganism was isolated from soil and identified as *Streptomyces griseus* HC-1141. The optimum culture condition of *Streptomyces griseus* HC-1141 for the production of alkaline protease was as follows; 0.5% casein, 0.05% ammonium chloride, 0.1% ferrous sulfate, 2.0% lactose, pH 8.0 and 84 hrs. The enzyme was purified about 53 folds by ammonium sulfate treatment, DEAE-cellulose ion exchange chromatography and gel filtration on Sephadex G-150. The homogeneity of the purified enzyme was verified by polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight was estimated to be 31,000 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. This enzyme consists of glycine and glutamic acid as major amino acids. The N-terminal and C-terminal residues of the alkaline protease were leucine and histidine respectively.

현대 산업사회가 발달함에 따라 각종 효소의 이용도가 급격히 증가하고 있는 가운데 조미료제조, 식육의 연화, 맥주, 청주의 혼탁방지, 치즈 숙성 등의 식품공업과 소화제, 소염진통제 등 제약공업, 피혁가공, 세제산업 등 여러 분야에 걸쳐 광범위하게 이용되고 있는 단백질 분해효소는 Peckman(1)과 Crewth 등(2)이 최초로 *Aspergillus*속에서 분리한 이후 그 활성과 기능면에서 Masaaki(3)에 의해 serine protease, thiol protease, metal protease 등으로 분류되었으며 Kageyma(4)와 Nunokawa(5)는 그 작용 pH 영향에 따라 acid protease, neutral protease 및 alkaline protease로 분류하였다. Alkaline protease는 Röhms(6)이 의류의 단백질 오염물을 제거하기 위하여 protease가 함유된 채장 추출물을 이용한 이후 많은 연구가 계속되어 왔다. 근래에 와서 알칼리성이고 음이온 계면활성이 강한 protease가 첨가된 효소세제

가 개발되어 시판되기 시작하고, 의학적 용도가 넓어짐에 따라 소요량이 급격히 증가하여 현재 단일효소로서는 세계최대의 생산량을 기록하고 있으며(7) 앞으로도 계속 증가될 것으로 생각된다. 대부분의 효소들은 산성이나 중성의 온화한 조건하에서 활성을 나타내는 것이 보통이며 알칼리 영역에서 활용되는 효소들은 극히 제한되어 있는 상태에 있다(8). 미생물이 생성하는 단백질 분해효소는 주로 *Bacillus*속(9-11)이 생성하는 alkaline serine protease가 대부분이었으나 최근 곰팡이(12-15), 방선균(16-19), 효모(20, 21)에 의한 생산이 보고되고 있다. 특히 protease를 세제나 피혁가공에 사용하기 위해서는 알칼리 내성, 내열성 및 세제내성을 가지며, 알러지반응이 없어야 하기 때문에 실제 산업적으로 생산 이용되는 종류는 극히 적으며(22), 산업적으로 유용한 효소들에 대한 protease의 생화학적 연구가 많이 요구되고 있으나 이에 대한 산업적인 연구가 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 alkaline protease를 강하게

Key words: *Streptomyces griseus*, alkaline protease
*Corresponding author

생산하여 피혁 및 세제에 공업적으로 이용할 목적으로 토양으로부터 alkaline protease 생성능이 우수한 *Streptomyces* 속 균주를 동정하여 효소의 생성조건을 검토하였으며, 최적조건에서 생성된 효소를 정제하였다.

재료 및 방법

미생물의 분리 및 선정

본 실험에 사용한 균주는 대구 근교의 토양에서 분리한 방선균을 대상으로 선별하였다. 토양현탁액의 상정액을 분리용 배지(2.0% soluble starch, 0.5% yeast extract, 1.0% soybean meal, 0.3% K_2HPO_4 , 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0% Na_2CO_3 , 1.5% agar, pH 9.0)에 도말한 후, 30°C에서 72시간 배양하여 생성된 alkalophilic strain의 colony를 분리하였다. 이 중에서 protease 생산균주를 분리하기 위해서 skim milk 배지(5% skim milk, 1% Na_2CO_3 , 1.5% agar, pH 9.0)에 접종하여 30°C에서 72시간 배양하여 clear zone을 형성하는 것들을 선정하고, 다시 기본배지(2.0% soluble starch, 1.0% polypeptone, 0.3% K_2HPO_4 , 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0% Na_2CO_3 , pH 9.0)에서 액체배양하여 protease 활성을 측정하여 분리, 선정하였다.

균주의 특성 및 동정

Bergy's manual of determinative bacteriology(23, 24)에 따라 형태적 특성, 배양학적 특성, 생리적 특성, 성분분석을 통하여 동정하였다.

효소활성도 측정

Protease 역가는 Anson-Hagihara 변법(25)을 이용하여 측정하였으며, 이때 효소단위는 1분 동안에 효소용액 1 ml가 tyrosine 1 μ g을 생성시키는 것으로 정하였다.

단백질 정량

Bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry법(26)에 따라 측정하였다.

전기영동

정제된 alkaline protease 순도는 Davis법(27)에 의하여 polyacrylamide gel disc 전기영동으로 검정하였다. 즉 7.5% polyacrylamide gel 컬럼에 시료를

주입하고 실온에서 3 mA/tube의 전류를 통하여 약 4시간 동안 영동한다. 영동이 끝난 gel은 1% amino black 10-B 용액으로 4시간 염색한 다음 7% acetic acid 용액으로 교반 탈색하였다.

분자량 측정

정제 alkaline protease의 분자량은 Weber와 Osborn의 방법(28)에 의하여 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel 전기영동에 의하여 실시하였다. 정제된 효소를 1% SDS, 1% 2-mercaptoethanol을 함유한 0.01 M phosphate buffer(pH 7.0)로 용해하여 37°C에서 2시간 동안 영동시킨다. 영동시킨 후 Rm값에 따라 표준곡선을 이용하여 분자량을 측정하였다. 이때 표준품으로는 bovine serum albumin (MW 66,000), egg albumin(MW 45,000), pepsin(MW 34,700), trypsinogen(MW 24,000), β -lactoglobulin (MW 18,400), lysozyme(MW 14,300)을 사용하였다.

효소의 정제와 결정화

Alkaline protease의 정제는 조효소액을 황산암모늄으로 염색한 후, 0.2 M boric acid-borax buffer로 투석한 다음 저온실에서 DEAE-cellulose 이온교환크로마토그래피를 하고 활성분획만 모아 Amicon ultra-filtration system(RK 8010, diameter 25 mm, membrane YM5,5000 MW)로 농축하여 동일 buffer로 Sephadex G-150 컬럼을 사용하여 gel filtration하였다 (Fig. 1).

정제된 효소는 소량의 0.2 M boric acid-borax buffer(pH 9.0)에 용해하여 냉동 용기속에서 효소액을 냉각시키면서, -20°C에서 저장한 아세톤을 유백색 혼탁이 생길 때까지 서서히 가한 후 파라필름으로 밀봉하고 4°C에 방치하여 결정화시키고 주사전자현미경으로 그 구조를 확인하였다. 주사전자현미경 검사조건은 accelerating voltage 15 kv에서 촬영하였고, 결정화된 효소는 먼저 알미늄제의 mounting block 위에 silver paster로 부착시킨 후 ion coater에 넣어 0.05 mmHg 이하의 진공으로 감압시킨 다음 200Å의 백금을 시료표면에 균일하게 증착시켰다. 백금 증착된 시료는 specimen holder 위에 고정시켜서 주사전자현미경에 넣고 감압시킨 후 원하는 배율에서 결정을 관찰하고 촬영하였다(12, 25).

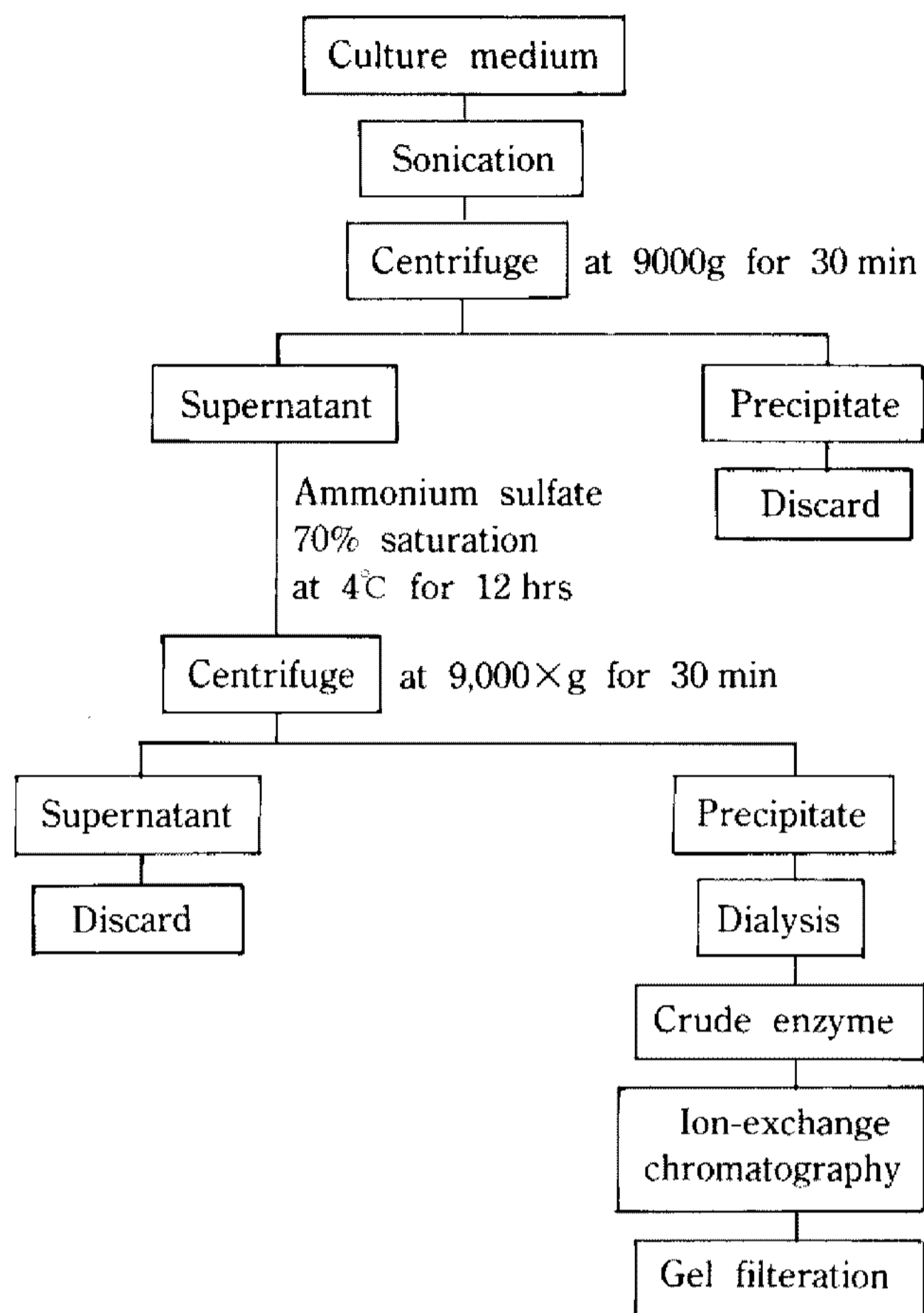


Fig. 1. Purification of alkaline protease from culture medium of *Streptomyces griseus* HC-1141.

아미노산 분석

아미노산 조성은 Nishizawa 등(29)의 방법에 따라 분석을 하였다. 즉, 일정량의 시료에 6 N HCl 용액을 가하고 질소가스를 충전, 밀봉하고 105°C에서 20시간 동안 가수분해시킨 다음 감압 농축하여 HCl을 제거하고 Na-acetate buffer(pH 2.2) 2.0 ml에서 용해하여 아미노산 자동분석기로 분석하였다.

말단 아미노산 분석

본 효소의 polypeptide chain의 N-말단 아미노산 분석은 Koki 등(30)의 과정에 따라 dinitrophenyl (DNP)법으로 실시하였다. 약 100 μ mole에 해당하는 효소액 5 ml에 NaHCO₃ 50 ml를 넣어 용해시키고, ethanol 10 ml에 0.15 ml의 2,4-dinitrofluorobenzene을 혼합한 용액 4 ml를 첨가하여 파라필름으로 밀봉하고 30°C 암소에서 4시간 동안 반응시킨 후 반응생성물인 황색침전을 원심분리한 다음 곧 물, ethanol, ether 순으로 세척하여 감압 건조시킨다. DNP-단백질

약 50 mg에 6 N HCl을 첨가하고 질소가스를 충전, 밀봉하여 105°C에서 12시간 동안 가수분해시킨 후 0.1 N HCl로 세척한 뒤 ether로 추출 건조하였다. Silica-gel thin layer chromatography로 전개시켜 표준품과 비교 확인하였으며 이때 사용한 전개용매는 n-butanol : acetic acid : water = 4 : 1 : 2(V/V/V)를 사용하였고 C-말단 아미노산은 carboxypeptidase A법(31)으로 분석하였다.

Carboxypeptidase A 1 ml에 1% NaHCO₃ 용액 0.1 ml을 가하고 효소액 1 ml을 혼합하여 37°C에서 각각 0분, 15분, 30분, 60분, 20시간 동안 반응시킨 다음 생성아미노산을 아미노산자동분석기로 확인하였다.

결과 및 고찰

Alkaline protease 생산균주 분리 및 동정

대구와 경북지역 약 180개소에서 채취한 토양과 부식토로부터 분리한 43균주를 대상으로 2차에 걸친 효소생산능력 실험을 통하여 alkaline protease 생산능력이 가장 강한 1균주를 선정하였다. 선정한 균주의 형태학적 특성, 배양학적 특성, 생리학적 특성 및 세포벽 구성성분 분석 등을 통해 검토한 결과(Table 1), 본 균주를 *Streptomyces* sp. HC-1141으로 명명하고 이 균주를 영국 C.A.B. International Mycological Institute에 의뢰하여 동정한 결과 *Streptomyces griseus* HC-1141로 명명되었다.

효소의 최적 생산조건

Streptomyces griseus HC-1141의 alkaline protease 생산을 위한 농도와 pH의 영향을 검토하기 위해서 25~35°C 및 initial pH 6.0~12.0 사이로 조절하여 살펴본 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 30°C와 pH 8.0에서 최대의 생산을 보였는데 이는 *Streptomyces* sp.에 대한 윤 등(17)이 보고한 결과보다 낮았다. 배양시간의 영향을 볼 때 40시간 배양시 균의 생육기 최고에 도달하는 반면, 효소의 생성은 60시간에서 최대의 활성을 나타내는 non-growth associated mode 현상을 나타내었다(Fig. 3). 탄소원을 배지에 1.0%되게 첨가하여 protease의 생산을 검토한 결과 glucose, mannose는 protease의 활성이 대조구에 비해 큰 차이가 없었으나, lactose는 효소생산성이 높았다(Table 2). 이중 효소생산이 가장 높은 lactose의 최적농도는 2.0

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of the isolated *Streptomyces griseus* HC-1141.

Factors	Characteristic	
Gram staining	+	
Oxygen requirement	+	
Catalase production	+	
Hydrolysis of casein	+	
starch	+	
gelatin	+	
Melanine pigment formation	+	
Decomposition of tyrosine	+	
xanthine	-	
Acid formation	-	
Urease test	Slightly sensitive	
Utilization of carbon compound		
	pH 7.5	pH 10.0
Glucose	+	+
Fructose	-	-
Galactose	+	+
Sucrose	-	-
Xylose	-	-
Rhamnose	-	-
Raffinose	-	-
Mannitol	+	+
Sorbitol	-	-
NaCl tolerance		
5%	++	++
7%	++	++
9%	+	+
12%	-	+
15%	-	-

%로 나타났다(Table 3).

Protease 생산에 대한 질소원의 영향을 검토하기 위해 질소원을 1%되게 첨가하여 검토한 결과 poly-pepton과 albumin은 대조구와 큰 차이가 없었으나, casein을 사용한 경우에 효소활성이 증대되었으며 (Table 2), 이중 효소생산성이 가장 높은 casein의 최적농도를 검토한 결과 0.5%로 나타났다(Table 3). 무기질소에 의한 영향을 검토하기 위하여 무기질소를 0.2%되게 첨가하여 검토한 결과 NH₄Cl이 protease의 활성이 가장 높았고(Table 2), NH₄Cl의 농도가 0.05%일 때 최고의 활성을 나타내었다(Table 3). 무기염의 영향을 검토하기 위하여 농도가 0.2%되게 첨가하여 검토한 결과 FeSO₄가 protease의 활성이 최고에 달했고(Table 2), FeSO₄의 최적 농도는 0.1%이었다

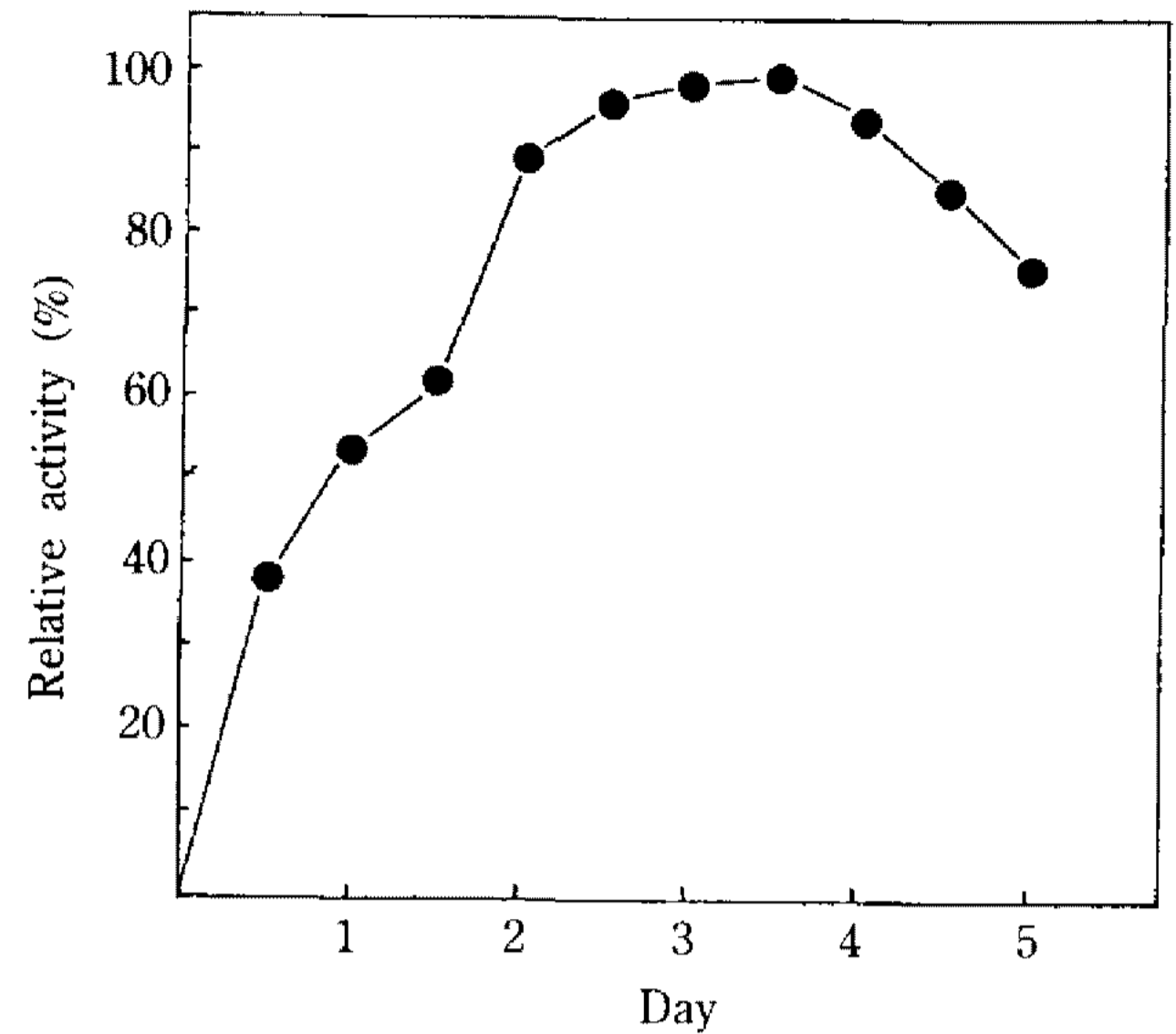


Fig. 2. Effect of culture time on production of alkaline protease by *Streptomyces griseus* HC-1141.

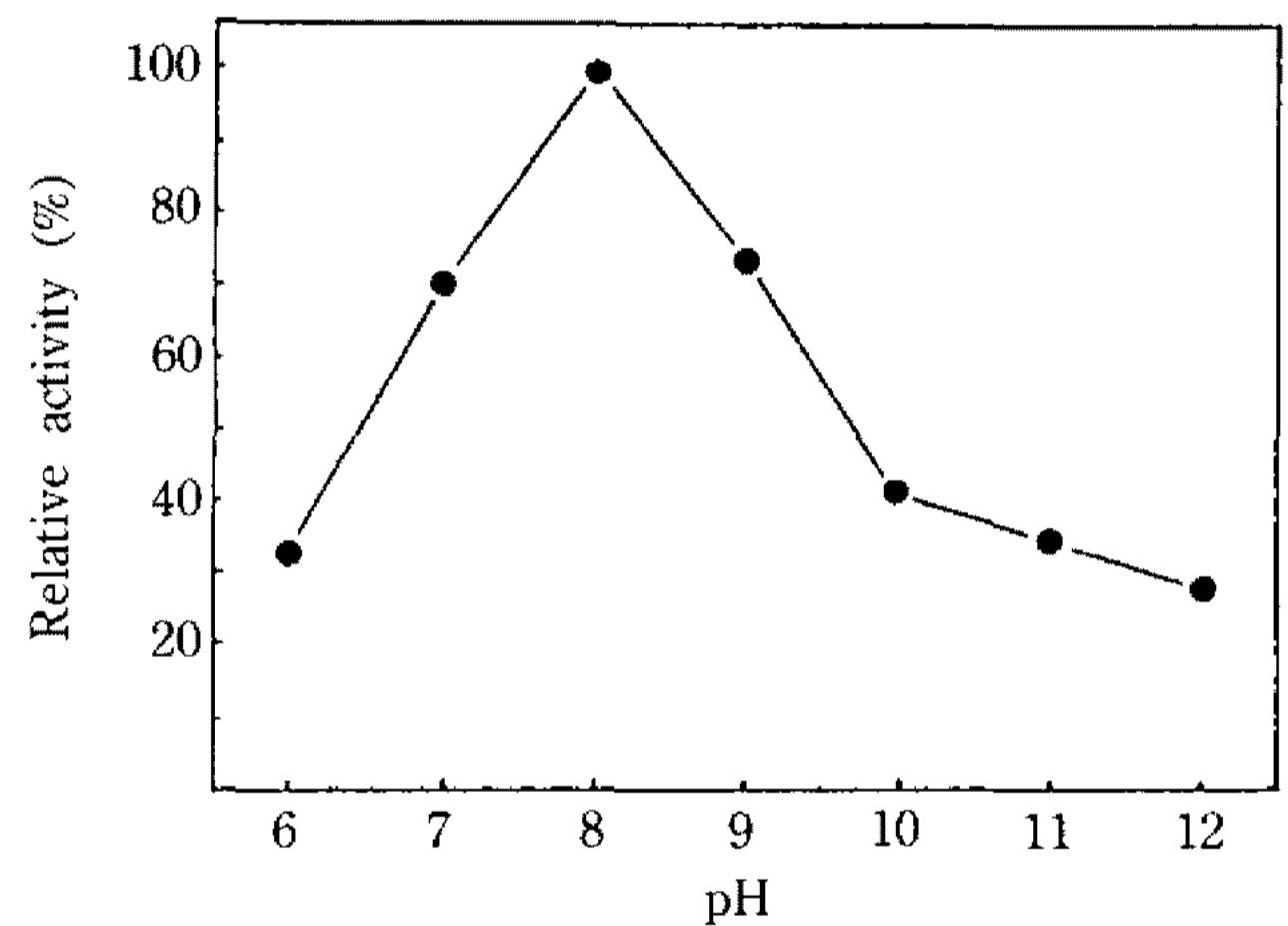


Fig. 3. Effect of culture pH on production of alkaline protease by *Streptomyces griseus* HC-1141.

(Table 3).

Alkaline protease의 정제

염석과 투석 : 균을 배양한 배지로부터 균체를 제거하고 회수한 조효소액에 황산암모늄을 70% 포화시키고 12시간 정치하여 효소단백질을 침전시킨 다음 9,000×g로 30분간 원심분리하여 침전을 회수하였다. 분리된 침전물을 모아 4°C에서 소량의 0.2 M boric acid-borax buffer(pH 8.0)로 용해시킨 다음 24시간 동안 buffer로 투석시켰으며 잔존하는 불용성물질은 원심분리로서 제거하였다. 그 결과 효소의 비활성 역가가 183.55 unit/mg으로 약 6배가량 정제되었다.

DEAE-cellulose column chromatography : 투석

Table 2. Effect of various sources on alkaline protease production

Source	Component	Relative activity (%)
Organic nitrogen (0.1%, w/v)	Polypeptone	100.93
	Casein	247.69
	Urea	131.48
	Albumin	118.06
	Glycine	127.32
Inorganic nitrogen (2.0%, w/v)	(NH ₄) ₂ HPO ₄	86.70
	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	69.46
	NaNO ₂	—
	(NH ₄) ₂ C ₂ H ₄ ·H ₂ O	51.72
	Ca(NH ₄) ₂ ·4H ₂ O	—
	NaC(CH ₂ OH) ₃	—
	(NH ₄) ₂ SO ₄	105.91
	NH ₄ Cl	118.72
Inorganic salt (0.2%, w/v)	KNO ₃	—
	MnCl ₂	—
	CaCl ₂	104.91
	CuSO ₄	—
	FeSO ₄	280.80
	MgSO ₄	123.21
	KH ₂ PO ₄	122.32
	NaCl	165.63
	K ₂ HPO ₄	115.18
	Na ₂ HPO ₄	116.52
Carbon (2.0%, w/v)	NaH ₂ PO ₄	115.63
	MgCl ₂	113.84
	Fructose	184.04
	Glucose	108.45
	Lactose	259.16
	Glycerol	135.68
	Arabinose	125.35
	Sorbitol	149.77
	Mannitol	117.84
	Maltose	105.63
	Starch	130.52
	Galatose	156.34
Control	Citrate	100.00

Table 3. Effect of various component concentration on the alkaline protease production

Component	Concentration (%)	Relative activity (%)
Casein	0.05	78.47
	0.10	262.19
	0.50	269.84
	1.00	212.43
	2.00	248.80
Ammonium chloride	0.005	135.24
	0.010	184.53
	0.050	218.66
	0.100	166.84
	0.200	132.71
Ferrous sulfate	0.300	133.97
	0.005	96.45
	0.010	259.35
	0.050	311.22
	0.100	328.51
Lactose	0.200	246.38
	0.300	194.51
	0.05	182.96
	0.10	186.65
	0.50	275.36
Control	1.00	274.27
	2.00	306.78
		100.00

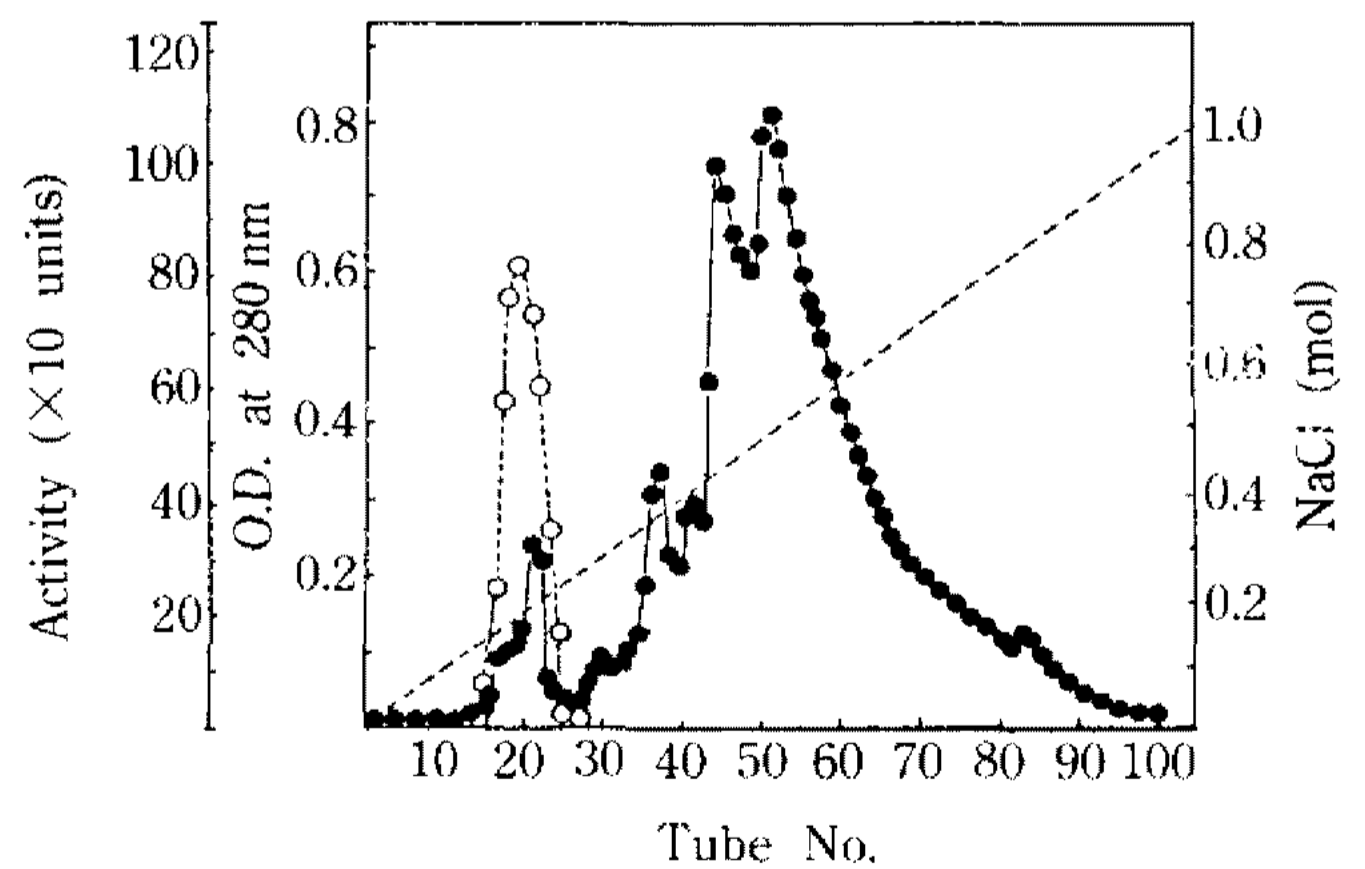


Fig. 4. DEAE-cellulose ion exchange chromatography of alkaline protease from *Streptomyces griseus* HC-1141. ●—● Protein, ○—○ Activity

한 효소액을 농축하여 DEAE-cellulose 칼럼(3×50 cm)에 주입하고 약 1.5배의 0.2 M boric acid-borax buffer(pH 8.0)로 비활성단백질을 제거한 뒤 흡착된 단백질을 0~1 M NaCl linear salt gradient로 용출

하였다(Fig. 4). 이때 유속은 32 ml/min였고 7 ml/tube씩 분획하였으며, 그 결과 5개의 분획이 검출되었으며 0.16 M 정도의 NaCl에서 활성분획이 검출되

었다. DEAE-cellulose column chromatography한 결과 정제도는 약 40배로 증가되었으며, 비활성 역가는 1170 units/mg이었다.

Sephadex G-150 gel filtration : DEAE-cellulose를 통과시킨 효소액을 농축하여 0.2 M boric acid-borax buffer(pH 8.0)로 평형화된 Sephadex G-150 column(2×90 cm)에 주입하여 동일 buffer로 4.03 ml/10 min의 유속으로 5 ml/tube씩 분획하였으며, 그 결과 Fig. 5에서와 같이 1개의 활성분획이 검출되었다. Sephadex G-150을 통과시킨 결과 효소의 비활성 역가는 1,573 units/mg으로 증가하였으며 정제 배수는 53배, 수율은 29%이었다. 이상의 정제과정을 요약하면 Table 4와 같으며 이는 윤 등(17)이 *Streptomyces* sp. YSA-130의 alkaline protease를 23.8배, 정 등(32)이 *Streptomyces* sp. SMF-301의 alkaline protease를 24.7배 정제하였다고 보고한 것보다는 정제배수가

높으며 Tetsuo 등(33)이 *S. griseus*의 alkaline protease를 125배 정제하였다고 보고한 것보다는 다소 낮았다.

Polyacrylamide gel electrophoresis : 정제된 protease를 Davis법(27)에 따라 polyacrylamide gel 전기영동을 실시한 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 단일밴드를 나타내었다.

효소의 분자량 측정

분자량 측정을 위하여 Weber와 Osborn의 방법(28)에 따라 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 한 결과 Fig. 7에 나타난 바와 같이 본 정제효소의 분자량은 약 31,000이었다. 이같은 결과는 Tetsuo 등(33)의 *S. griseus*, 정 등(32)의 *Streptomyces* sp. SMF-301

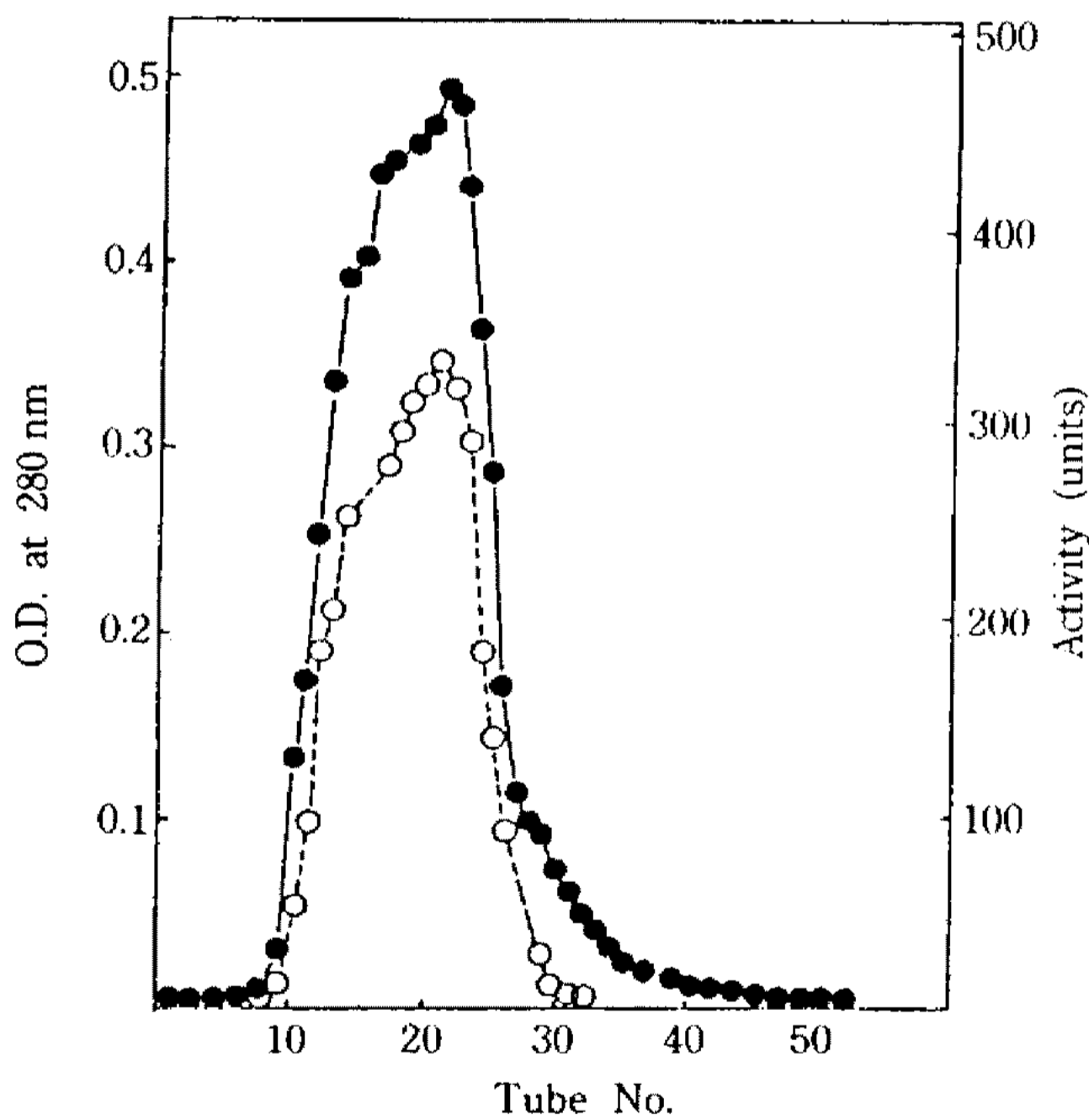


Fig. 5. Gel filtration of alkaline protease from *Streptomyces griseus* HC-1141.

●-● Protein, ○---○ Activity

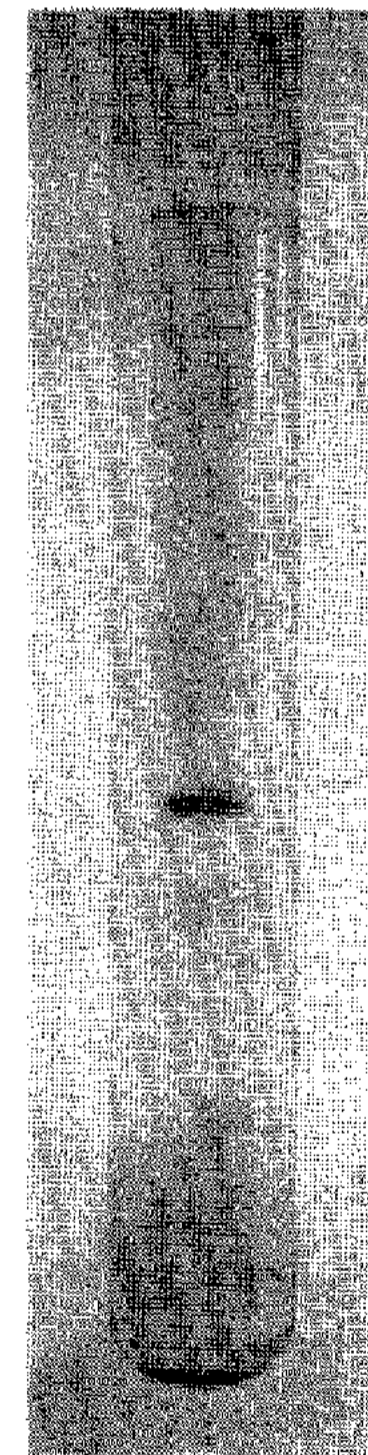


Fig. 6. Polyacrylamide gel electrophoresis of alkaline protease from *Streptomyces griseus* HC-1141.

Table 4. Summary of purification of alkaline protease from *Streptomyces griseus* HC-1141

Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Fold
Crude enzyme solution	366.44	11713.00	29.55	100.00	1.00
Ammonium sulfate	26.69	4898.83	183.55	41.82	6.21
DEAE-cellulose	3.76	4399.62	1170.11	37.56	39.60
Sephadex G-150	2.16	3397.39	1572.86	29.01	53.23

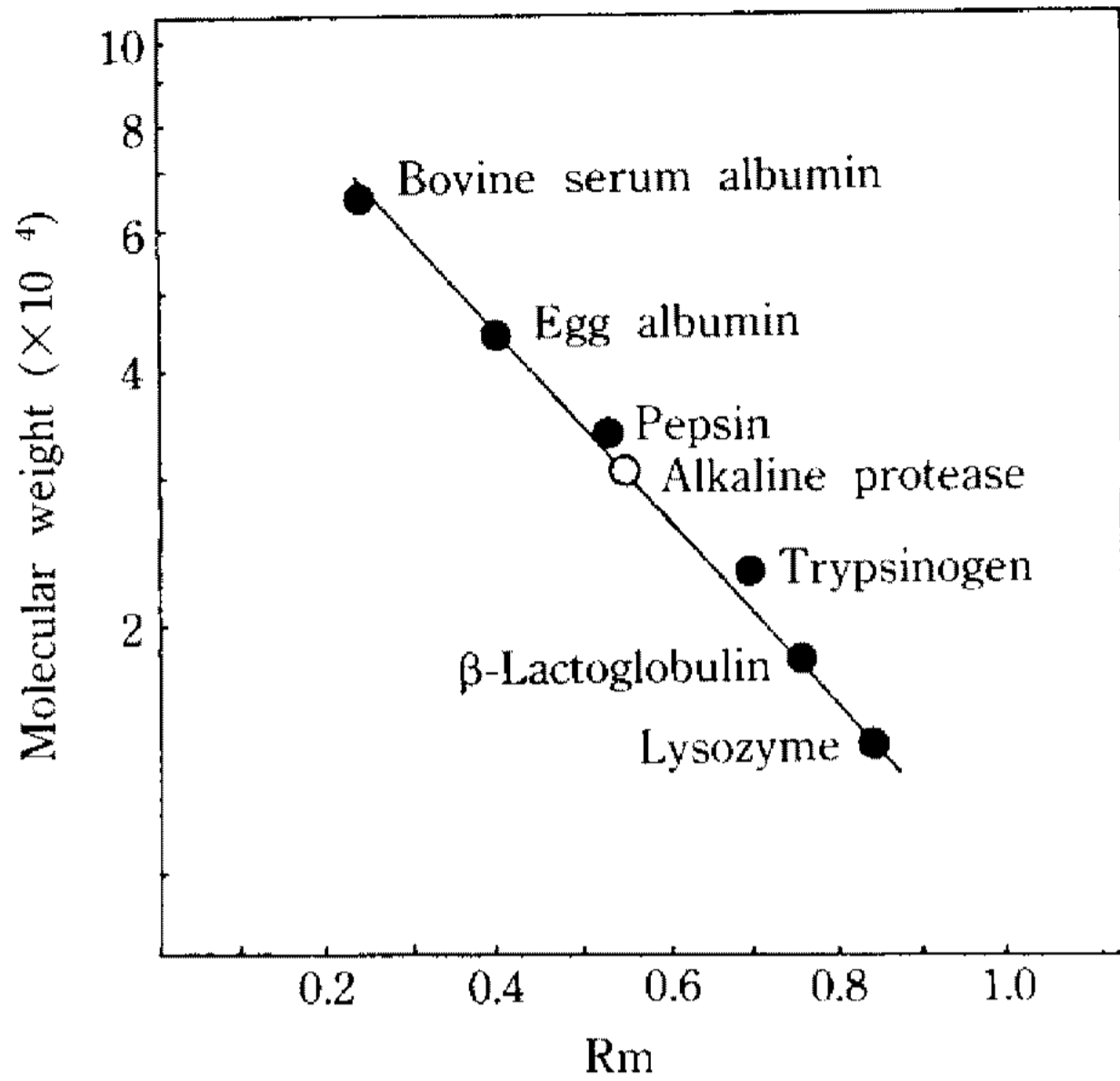


Fig. 7. The calibration curve for determination of the molecular weight of alkaline protease by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

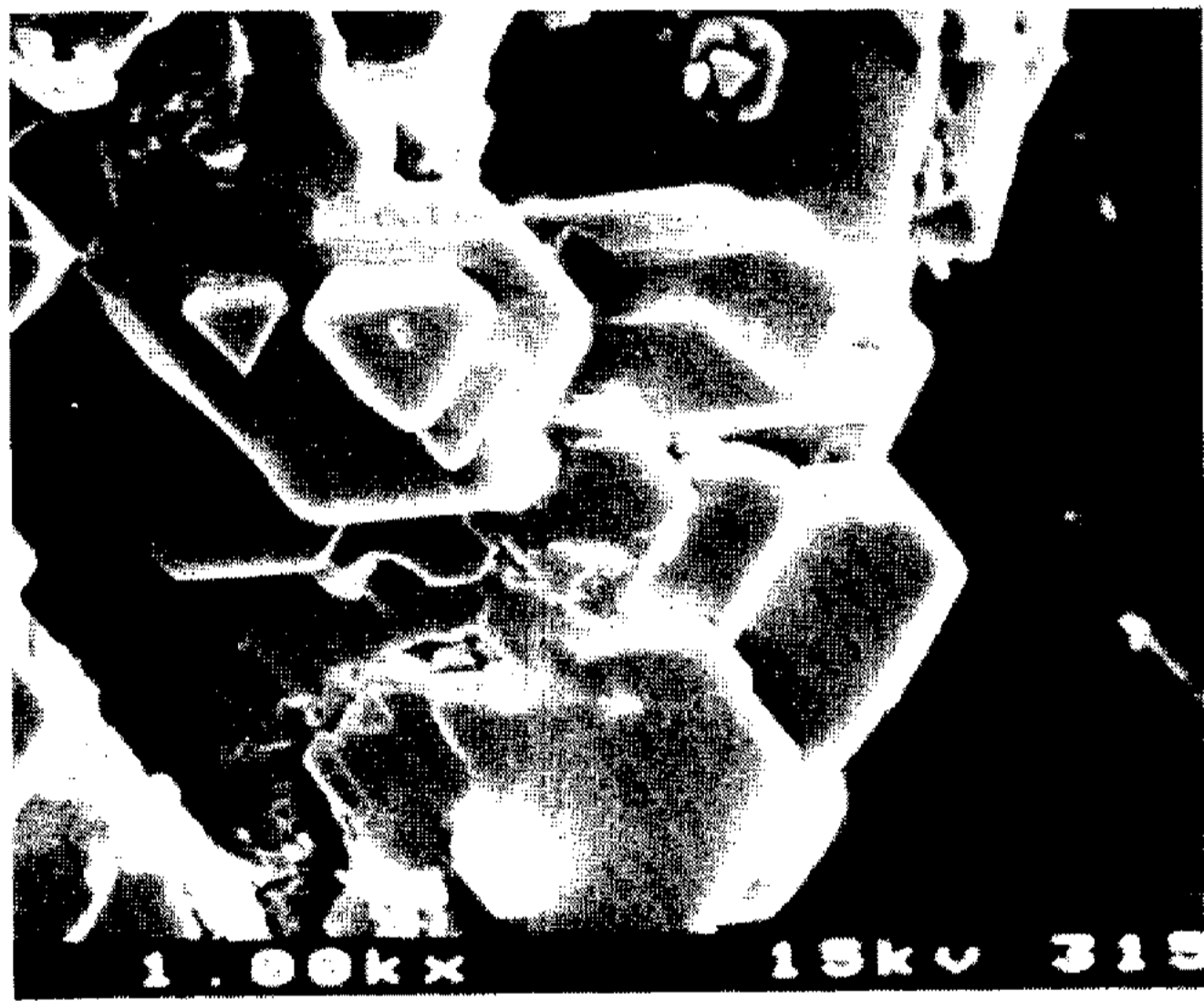


Fig. 8. Scanning electron microphotograph of crystal alkaline protease from *Streptomyces griseus* HC-1141.

의 alkaline protease의 분자량이 각각 25,000, 23,500 이었다고 보고한 것보다는 다소 높았으며 윤 등(17)이 *Streptomyces* sp. YSA-130의 alkaline protease의 분자량이 약 30,000이라고 보고한 것과는 비슷하였다.

효소의 결정화

정제된 효소를 4°C에서 결정화시켜 scanning microscopy로 그 구조를 확인한 결과 Fig. 8와 같이 판상 형태를 이루고 있었으며, 이는 서(34)의 직사각형 형태, 윤 등(17)의 바늘 형태와는 다소 차이가 있었으며

Table 5. Amino acid composition of alkaline protease from *Streptomyces griseus* HC-1141

Amino acid	Content (mg/g)
Aspartic acid	100.12
Threonine	62.75
Serine	96.12
Glutamic acid	122.34
Proline	18.94
Glycine	134.40
Alanine	80.22
Cystine	trace
Valine	54.57
Methionine	7.33
Isoleucine	47.33
Leucine	73.92
Tyrosine	34.52
Phenylalanine	35.81
Histidine	85.28
Lysine	57.96
Arginine	15.22

Juichiro 등(35)의 *Cephalosporium* sp.에서 얻은 결정의 평편한 모양과는 유사한 것으로 관찰되었다.

효소단백질의 아미노산 조성

정제된 효소단백질의 아미노산 조성은 Table 5에서와 같이 glycine과 glutamic acid가 많이 함유되어 있고, cystine, arginine 등이 적게 함유되어 있었다. 이와같은 결과는 glycine이 많이 함유되어 있다는 Koki와 Doi(30)의 보고와 유사하였다.

효소분자의 말단아미노산의 분석

본 효소단백질의 말단 아미노산을 분석하기 위하여 N-말단 아미노산을 DNP법에 의해 확인한 결과 leucine으로 밝혀졌으며 Koki와 Doi(30)와 Harry 등(36)은 *B. subtilis*가 생성하는 protease의 N-말단 아미노산이 alanine이라고 보고하였고, Reinhard(37)은 *Candida albicans*의 protease의 N-말단 아미노산이 tryptophan이라고 보고하였으며, 차 등(12)은 *A. fumigatus* AC-21의 alkaline protease의 N-말단 아미노산이 lysine이라고 보고한 것과는 차이가 있었다. C-말단 아미노산은 carboxy peptidase를 이용하여 15, 30, 60분 간격으로 가수분해시킨 후 자동아미노산 분석기로 조사한 결과 Fig. 9에서와 같이 histidine,

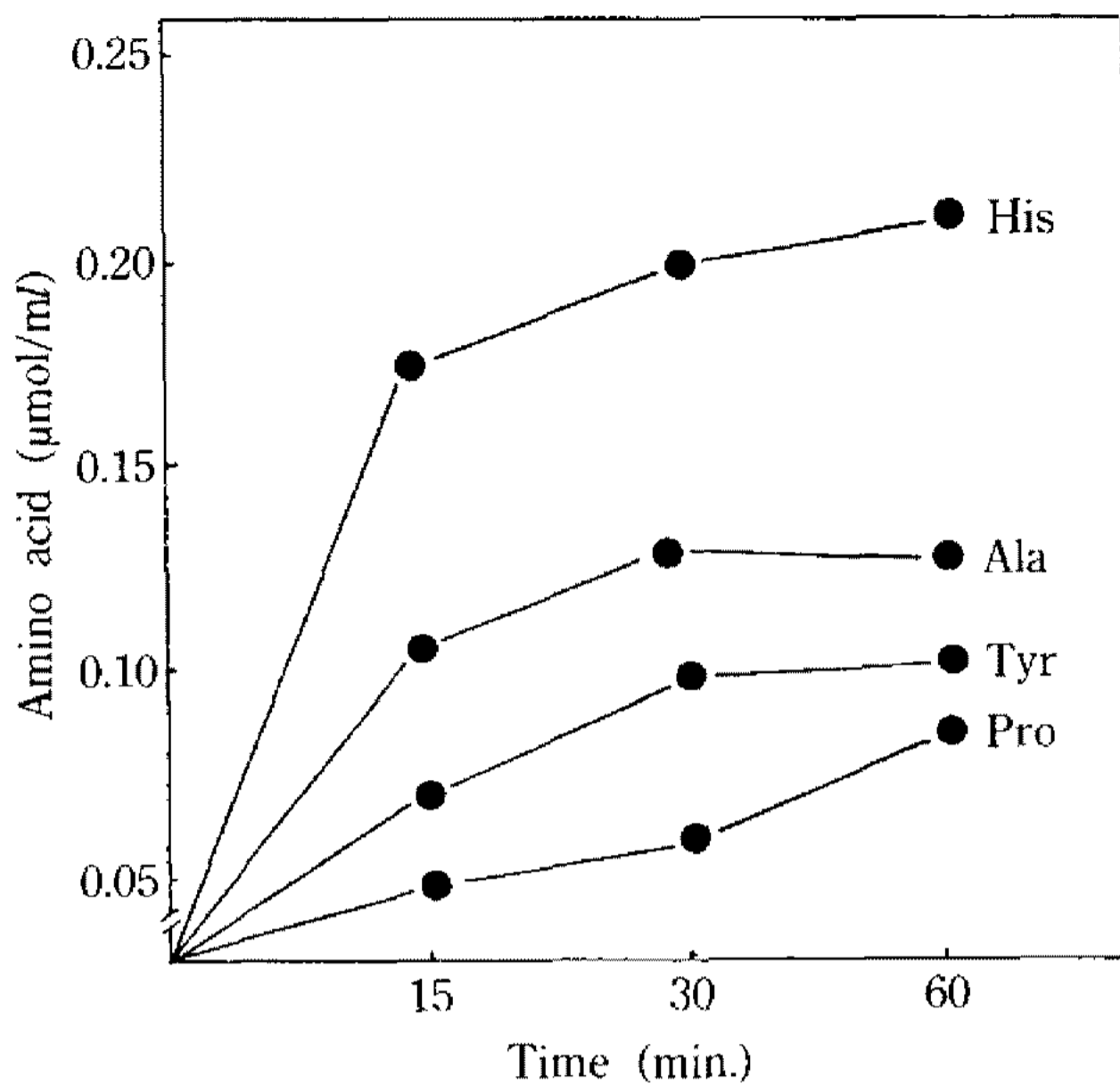


Fig. 9. Rate of release of amino acids by the action of carboxypeptidase on the alkaline protease protein.

alanine, tyrosine, proline의 순서로 되어 있었다. Harry 등(36)이 *B. subtilis* 생성 protease의 C-말단 아미노산이 leucine이라고 한 것과 Reinhard(37)의 *Candida albicans*의 생성 protease C-말단 아미노산이 leucine이라고 한 보고와는 다소 차이가 있었으며, 차 등(12)이 *A. fumigatus* AC-21의 alkaline protease의 C-말단이 histidine이라고 보고한 결과와는 유사하였다.

요 약

토양으로부터 alkaline protease 생성능이 강한 *Streptomyces griseus* HC-1141을 분리하였으며, 효소생산의 최적 배양조건은 0.5% casein, 0.05% ammonium chloride, 0.1% ferrous sulfate, 2.0%의 lactose, pH 8.0에서 84시간 배양했을 때이다. 효소의 정제는 ammonium sulfate 침전, DEAE-cellulose ion exchange chromatography, Sephadex G-150 gel filtration, crystallization으로 하여 53.23배 정제할 수 있었으며 polyacrylamide gel 전기영동상 단일밴드를 나타내었다. 정제효소의 분자량은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 31,000 정도로 추정되었고, 결정구조는 판상형태이었으며 아미노산 조성은 glycine과 glutamic acid 함량이 많고 arginine 함량이 적었으며, 또한 말단아미노산 분석에서 N-말

단은 leucine이고 C-말단은 histidine이었다.

감사의 말

이 논문은 1990년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 지원 학술연구조성비에 의하여 연구된 일부이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Peckman, E.V. 1951. *Aspergillus* proteinase. *Biochemistry* **5**: 321-325.
2. Crewth, W.C. 1963. The effect of pH and cations on the thermal denaturation of trypsin. *Aus. J. Biol.* **6**: 597-601.
3. Masaaki, Y.S., Kazuo and M., Mitsuo. 1984. Purification and properties of acid protease from *Monascus* sp. No. 3405. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1637-1645.
4. Kageyama, K. 1955. Studies on *Aspergillus oryzae* strain for sake brewing. *J. Ferment. Technol.* **33**: 53-57.
5. Nunokawa, Y., Y. Namba and S. Watanabe. 1961. A study of the rice Koji protease. *J. Soc. Brew.* **53**: 930-933.
6. Röhm, O. 1913. *Ger. Pat.* **283,923**.
7. 鶴大典. 1969. 科學と工業, pp. 43.
8. Horikoshi, K. and Y. Atsukawa. 1973. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. *Arg. Biol. Chem.* **35**: 1407-1414.
9. 장신재, 김윤숙, 성하진, 최용준, 양한철. 1988. *Bacillus subtilis*가 생산하는 alkaline protease에 관한 연구. *한국농화학회지* **31**: 356-360.
10. 김태호, 박성희, 이동선, 권택규, 김종국, 홍순덕. 1990. 호알칼리성 *Bacillus*속 균주가 생산하는 alkaline protease의 특성. *한국산업미생물학회지* **18**: 159-164.
11. Ichishima, E., V. Takada, K. Taira and M. Takeuchi. 1986. Specificities of extracellular and ribosomal serine proteinases from *Bacillus natto*, a food microorganism. *Biochimica et Biophysica Acta.* **869**: 178-184.
12. 차원섭, 조영제, 최 청. 1989. *Aspergillus fumigatus*에 의한 alkaline protease의 생산과 정제. *한국영양식량학회지* **18**: 279-286.
13. McConn, J.D., D. Tsura and K.T. Yasunobu. 1964. *Bacillus subtilis* neutral proteinase. *J. Biol. Chem.* **239**: 3706-3709.
14. Tsura, D., K. Heizokira and T. Yamamoto. 1966. Studies on bacterial proteinase part 16. Purification, crystallization and some enzymatic proper-

- ties of alkaline protease of *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*. *Agr. Biol. Chem.* **30**: 1261-1268.
15. Ito, M. and M. Sugiura. 1968. Studies on *Aspergillus* proteinase. *Yakugaku Zasshi* **88**: 1576-1582.
 16. 김경미, 이태경, 양한철. 1989. *Streptomyces rimous*가 생성하는 protease의 정제와 특성. *한국산업미생물학회지* **17**: 407-411.
 17. 윤성우, 이강표, 윤주현, 신철수, 오두환. 1989. *Streptomyces* sp. YSA-130이 생성하는 alkaline protease의 정제와 특성. *한국산업미생물학회지* **17**: 358-364.
 18. Siegel, S., A.H. Brady and W.M. Awad. 1972. The proteolytic enzymes of the K-1 strain of *Streptomyces griseus* obtained from commercial preparation. *J. Biol. Chem.* **247**: 4155-4159.
 19. 김경신, 한강완, 김형로. 1984. *Streptomyces alboniger*가 생산하는 protease의 특성에 관한 연구. *한국농화학회지* **27**: 174-179.
 20. 배인휴, 강국희. 1987. *Saccharomycopsis lipolytica* (*Candida lipolytica*)의 균체의 protease에 관한 연구. *한국산업미생물학회지* **15**: 286-293.
 21. 강국희, 배인휴, 이춘화. 1987. *Saccharomycopsis lipolytica*의 균체외 protease에 관한 연구(효소의 생산조건). *한국산업미생물학회지* **15**: 279-285.
 22. Horikoshi, K. and T. Akiba. 1982. *Alkalophilic Microorganisms, A New Microbial World*, Japan Sci. Soc. Press
 23. Buchaman, R.E. and K.K. Gibbons. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th ed., The Williams Wikins Co. Baltimore, U.S.A.
 24. Harrigan, W.F. and M.E. McCance. 1966. *Laboratory Methods in Microbiology*, Academic Press, New York and London.
 25. Haginhara, B.. 1956. 酵素研究法, Vol. II(朝昌書店: 東京) **1**, 237.
 26. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, L.A. Farr and R.J. Randal. 1951. Protein Measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
 27. Davis, B.J. 1964. Disc electrophoreis II. Method and application of human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.* **121**: 404-427.
 28. Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determination sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **224**: 4406-4412.
 29. Nishizawa, M., Y. Maruyama, and M. Nakamusa. 1980. Purification and Characterization of invertase isozymes from *Fusarium oxysporum*. *Agr. Biol. Chem.* **44**: 489-493.
 30. Koki, H. and R.H. Doi. 1968. The NH-terminal residues of *Bacillus subtilis* proteins. *J. Biol. Chem.* **243**(9): 2381-2384.
 31. Hirs, C.H.W. 1967. *Methods in Enzymology* XI, Academic Press Co., New York.
 32. 정병철, 신형승, 이계준. *Streptomyces* sp. SMF-301에서 분리한 단백질분해효소의 성질. *한국산업미생물학회지* **16**(6): 526-531.
 33. Tetsuo, M., M. Takumi, T. Yoshio, M. Tai, and O. Shigetaka. 1991. Purification and Some Properties I having transfer action from *Streptomyces griseus* var. *alcalophilus*. *Agr. Biol. Chem.* **55**(2): 307-314.
 34. 서항원. 1972. 컬럼 크로마토그래피에 의한 아스퍼질러스 계통의 α -아밀라제 및 프로테아제의 결정화. *한국미생물학회지* **10**: 105-108.
 35. Juichiro Y., Y. Takashi, K. Yoshiaki, H. Seijiro, O. Masaaki, S. Hiichi, J. Kazuyoshi, and Mutsuya Ajisaka. 1972. Alkaline protease from *Cephalosporium* sp. *J. Ferment. Technol.* **50**: 810-815.
 36. Harry, P.W. Raoaoirt, S. Riggsby, and A.H. David. 1965. A *Bacillus subtilis* proteinase. *J. Biol. Chem.* **240**: 78-86.
 37. R. Reinhard. 1981. Properties of a purified proteinase from the yeast *Candida albicans*. *Biochemica et Biophysica Acta.* **659**: 99-113.

(Received January 11, 1992)