

고온성 *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4가 생산하는 내열성 Protease의 특성

김형권 · 김기현 · 이정기 · 김영옥 · 남희섭¹ · 오태광*
유전공학연구소, ¹(주)농심

Characterization of a Thermostable Protease from Thermophilic *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4

Hyung-Kwoun Kim, Kee-Hyun Kim, Jung-Kee Lee,
Young-Ok Kim, Hee-Sop Nam¹ and Tae Kwang Oh*

Applied Microbiology Research Group, Korea Research Institute of Bioscience
and Biotechnology, P.O. Box, 115, Yusung, Taejon 305-600, Korea
¹Research and Development Center, Nong Shim Co., Ltd., Kyung-Ki 435-030, Korea

Abstract — A thermophilic bacteria showing proteolytic activity against defatted soybean was isolated from soil. It was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* based on its morphological and physiological characteristics. The *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4 was cultivated at 50°C by rotary shaking in a medium containing defatted soybean. An extracellular protease from this strain was purified to homogeneity by ammonium sulfate precipitation, ion exchange, and hydrophobic interaction chromatographies. The molecular weight of the enzyme was estimated to be approximately 30,000 by SDS-PAGE and the N-terminal amino acid sequence of the enzyme was turned out to be AQSVPYGISQIKAPA. The optimum temperature and pH for the enzyme reaction were 60°C and 11, respectively, and its thermostability was increased by the addition of calcium ion. The enzyme was inactivated by phenylmethylsulfonyl fluoride, suggesting it be a serine protease. Comparing with other commercial proteases, the enzyme showed relatively high proteolytic activity against defatted soybean, a water-insoluble protein substrate.

단백질 가수분해효소(EC 3.4.21.14)는 식품공업, 의약공업, 세제공업, 피혁가공공업 및 환경공업 등에 다용도로 응용되고 있는데, 그 시장규모가 효소 전체 시장의 60%를 차지하고 있다. 이와같은 산업적 중요성으로 인해 이 효소에 대한 연구가 현재 활발히 진행되고 있다(1). 단백질가수분해효소가 산업적으로 널리 이용되기 위해서는 효소의 역가가 높아야 될 뿐만 아니라 여러가지 극한 조건에서 안정해야 된다. 예를 들면 세제용 효소로 이용되기 위해서는 알칼리 내성과 계면활성제에 대한 내성등을 가져야 되며(2-4) 비수계에서 효소촉매로 이용되기 위해서는 유기용매에 대한 내성, 기질 특이성과 광학활성 특이성 등이 요구된다(5-7). 또한 효소반응을 효율적으로 수행하기 위해서 위의 특성과 함께 열에 대한 내성도 필수적으로 요구된다(8, 9). 따라서 이와같은 특성을 갖는

단백질가수분해효소의 탐색이 활발히 진행되고 있다. 최근에는 유전공학기술과 단백질공학기술을 이용해서 기존의 효소에 새로운 특성을 부여하는 연구도 이루어지고 있다(4, 10, 11).

본 연구에서는 식품가공과정에서 손쉽게 얻을 수 있는 탈지대두박으로부터 고가의 정미성분을 만들어 내고자, 토양으로부터 물에 대한 용해도가 낮은 탈지대두박을 잘 분해하는 단백질가수분해효소를 생산하는 미생물을 탐색하였다. 탐색 결과 탈지대두박에 대한 기질특이성이 높은 내열성 단백질가수분해효소를 생산하는 균을 찾게 되어서, 이 균으로부터 효소를 분리정제하고 그 효소의 생화학적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

온천지역에서 채취한 토양을 멸균식염수(0.85% NaCl)에 현탁시키고, 그 상층액을 균주 선정용 고체

Key words: Protease, thermostability, *Bacillus amyloliquefaciens*

*Corresponding author

배지(polypeptone 5 g, yeast extract 5 g, defatted soybean 5 g, K_2HPO_4 2 g, KH_2PO_4 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, agar 15 g/1000 ml)에 도말하여 50°C에서 15시간 동안 배양하였다. 생성된 colony를 동일 배지에서 액체배양한 뒤, 배양상등액을 탈지대두박(defatted soybean)을 기질로 사용한 단백질 가수분해효소 측정용 고체배지(defatted soybean 1 g, agar 1.5 g/100 ml)에 넣고서 55°C에서 1시간 반응했을 때 직경이 1 cm 이상의 투명환을 만드는 것을 1차로 선발하였다. 선발된 균주에 대해서 단백질 가수분해효소의 열안정성 시험과 액체배양시 지속적으로 역가가 유지되는 가를 근거로 2, 3차로 균주를 선별하였고, 균주를 마우스의 복강에 주사했을 시 독성이 없는 균주를 택하는 4차의 선정작업을 통해서 NS 15-4 균주를 선택하였다.

이 균주를 동정하기 위해서 이 균의 형태적, 배양학적, 생리적 특성을 Bergy's manual(12)에 준하여 조사하였고, 균주의 세포내 지방산 조성을 GC-MS로 분석한 후, MIDI 시스템(13)의 데이터와 비교하였다.

효소의 생산

선발된 균를 효소생산용 배지(defatted soybean 5 g, yeast extract 5 g, K_2HPO_4 2 g, KH_2PO_4 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g/1000 ml)에 접종하여 50°C에서 8시간 종배양하였다. 효소생산용배지 3리터에 종배양을 2% 수준으로 접종한 후 50°C에서 공기투입량 1.0 vvm, 교반속도 400 rpm의 발효조건으로 12시간 동안 본배양하였다.

효소의 정제

배양상등액에 ammonium sulfate를 30% 포화되게 가하고, 생성된 침전물을 원심분리하여 제거하고 다시 ammonium sulfate를 80% 포화되게 가하여 생성된 침전물을 취하였다. 이 침전물을 소량의 완충액(30 mM Tris-HCl, pH 8.0)으로 용해시킨 후, 같은 완충액으로 3리터씩 3차례 투석하였다. 투석된 효소액을 30 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 평형화한 DEAE-sepharose column(3.2×17.2 cm)에 넣고 동일 완충액으로 비흡착 단백질을 용출시킨 후, KCl을 0 M부터 0.5 M의 농도까지 증가시키면서 흡착단백질을 순차적으로 용출시켰다. DEAE-sepharose column를 통해 얻은 활성분획을 모아 농축한 후 투석을 수행하여 완충액을 10 mM potassium phosphate(pH 7.0)로 치환한 후, 동일한 완충액으로 평형화시킨 CM-sepharose column(3.2×17.2 cm)에 넣고 비흡착 단백질을 용출시킨 후, KCl을 0 M부터 0.3 M의 농도까지 증가시키면서 흡착단백질을 순차적으로 용출시켰다.

CM-sepharose column을 통해 얻은 활성분획을 모아 농축한 후 투석을 수행하여 완충액을 10 mM potassium phosphate, 0.5 M ammonium sulfate로 치환한 후 동일한 완충액으로 평형화시킨 phenyl-sepharose column(3.2×8 cm)에 넣고 ammonium sulfate를 0.5 M에서 0 M의 농도까지 점차 감소시키면서 흡착단백질을 용출시키는 방법으로 효소를 정제하였다.

단백질 정량

Bradford 방법(14)을 이용한 protein assay kit(Bio-Rad Lab., Richmond, Calif, U.S.A)를 사용하여 단백질을 정량하였으며, 이때 표준단백질로 bovine serum albumin을 사용하였다.

단백질가수분해효소의 역가 측정

단백질가수분해효소의 역가는 Matsuzawa 방법(15)에 준하여 Hammarsten casein을 기질로 사용하여 37°C에서 측정하였다. Hammarsten casein을 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 0.6%(w/v)로 녹여 기질용액으로 사용하였다. 기질용액 3 ml에 효소액 0.5 ml을 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 TCA(0.44 M Trichloroacetic acid) 3.2 ml을 가하여 반응을 중지시키고 상온에서 20분간 방치시킨 후, Whatmann filter paper(No. 5)에 여과시켜 얻은 용액의 흡광도(275 nm)를 측정하였다. 효소의 역가 1 unit는 37°C에서 1분 동안 흡광도 0.1을 증가시키는 효소의 양으로 정하였다.

전기영동

단백질 가수분해효소의 분리정도와 분자량을 구하기 위하여 Laemmli 등(16)의 방법에 따라 Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 10%)을 수행하였고, Coomassie brilliant blue R-250 용액(40% methanol, 10% acetic acid, 0.125% Coomassie brilliant blue R-250)을 사용하여 단백질 밴드를 염색하였다.

N 말단 아미노산 서열결정

이 효소의 신규여부를 알기 위해 N 말단의 아미노산 서열을 분석하였다. SDS 전기영동을 수행한 후, Trans-Blot kit(Bio-Rad Lab., Richmond, Calif, U.S.A.)을 사용해서 단백질 밴드를 polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane으로 옮겼다(17). PVDF membrane 상의 단백질에 대해 Edman degradation 방법으로 아미노산 서열을 분석하였다(Applied Biosystems model 471A Protein/Peptide sequencer).

결과 및 고찰

단백질가수분해효소의 생산균주 분리 및 동정

전국의 온천 및 토양으로부터 분리한 1000여 주의 고온성 세균을 대상으로 4차에 걸쳐 탐색한 결과 균주 NS 15-4가 탈지대두박에 대한 분해능이 뛰어나며, 생산하는 단백질가수분해효소의 열안정성이 우수할 뿐 아니라 액체 배양시의 효소역가가 안정하고 마우스를 사용한 독성시험에서도 독성을 가지지 않는 것으로 밝혀졌다. 균주 NS 15-4은 그람양성의 간균이며 세포내에 포자를 갖고 있으며 catalase 활성이 있는 *Bacillus* 속의 세균임을 알 수 있었다. 당이용성과 몇가지 효소의 생산성을 조사한 결과, Table 1에 나타난 바와 같이 *Bacillus amyloliquefaciens*(12)의 특성과 동일하고, 특히 세포벽의 지방산 조성의 경우 Table 2에 나타난 바와 같이 15 : 0 iso, 15 : 0 anteiso, 17 : 0 iso가 주 지방산으로 나타나서 MIDI(13)의 결과와 비교한 결과 *Bacillus amyloliquefaciens*로 확정할 수 있어서 분리된 균주를 *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4로 명명하였다.

Table 1. Microbiological characteristics of the isolate strain NS 15-4

Characteristics	Results
Gram stain	positive
Spores	ellipsoidal
Sporangium swollen	negative
β-galactosidase (ONPG, PNPG)	positive
β-glucosidase (Esculin hydrolysis)	positive
Lysine decarboxylase	negative
Catalase	positive
Indole production	negative
Gelatin liquefaction	positive
Nirtare reduction to nitrite	positive
Motility	positive
Utilization of glucose	positive
arabinose	positive
mannose	positive
mannitol	positive
N-acetylglucosamine	positive
maltose	positive
gluconate	positive
caprate	positive
adipate	positive
malate	positive
citrate	positive
phenyl-acetate	negative

효소의 분리

B. amyloliquefaciens NS 15-4 균주를 12시간 배양한 후, 배양상등액에 ammonium sulfate를 30% 포화되게 가하여, 생성된 침전물을 원심분리하여 제거하고 다시 ammonium sulfate를 80% 포화되게 가하여 생성된 침전물을 취하였다. 이 침전물을 소량의 완충용액으로 용해시킨 후, 같은 용액으로 여러번 투석한 후 효소액을 30 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 평형화한 DEAE-Sepharose column에 가하여 분획한 결과 Fig. 1과 같은 5개의 단백질 peaks를 얻었다. 비흡착 부위인 분획구 11번 부근에서 protease의 활성을 가지는 반면, 나머지 4개의 단백질 peaks에서는 protease 활성을 전혀 보이지 않았다.

Table 2. Cellular fatty acid profile of the isolated strain NS 15-4

Fatty acid	Content (%)
14 : 0 iso	1.82
14 : 0	—
15 : 0 iso	27.08
15 : 0 anteiso	32.53
16 : 1 w7c alcohol	0.94
16 : 0 iso	4.06
16 : 1 w11c	2.02
16 : 0	4.91
iso 17 : 1 w10c	3.58
17 : 1 iso I/anteiso B	1.18
17 : 0 iso	13.95
17 : 0 anteiso	7.94

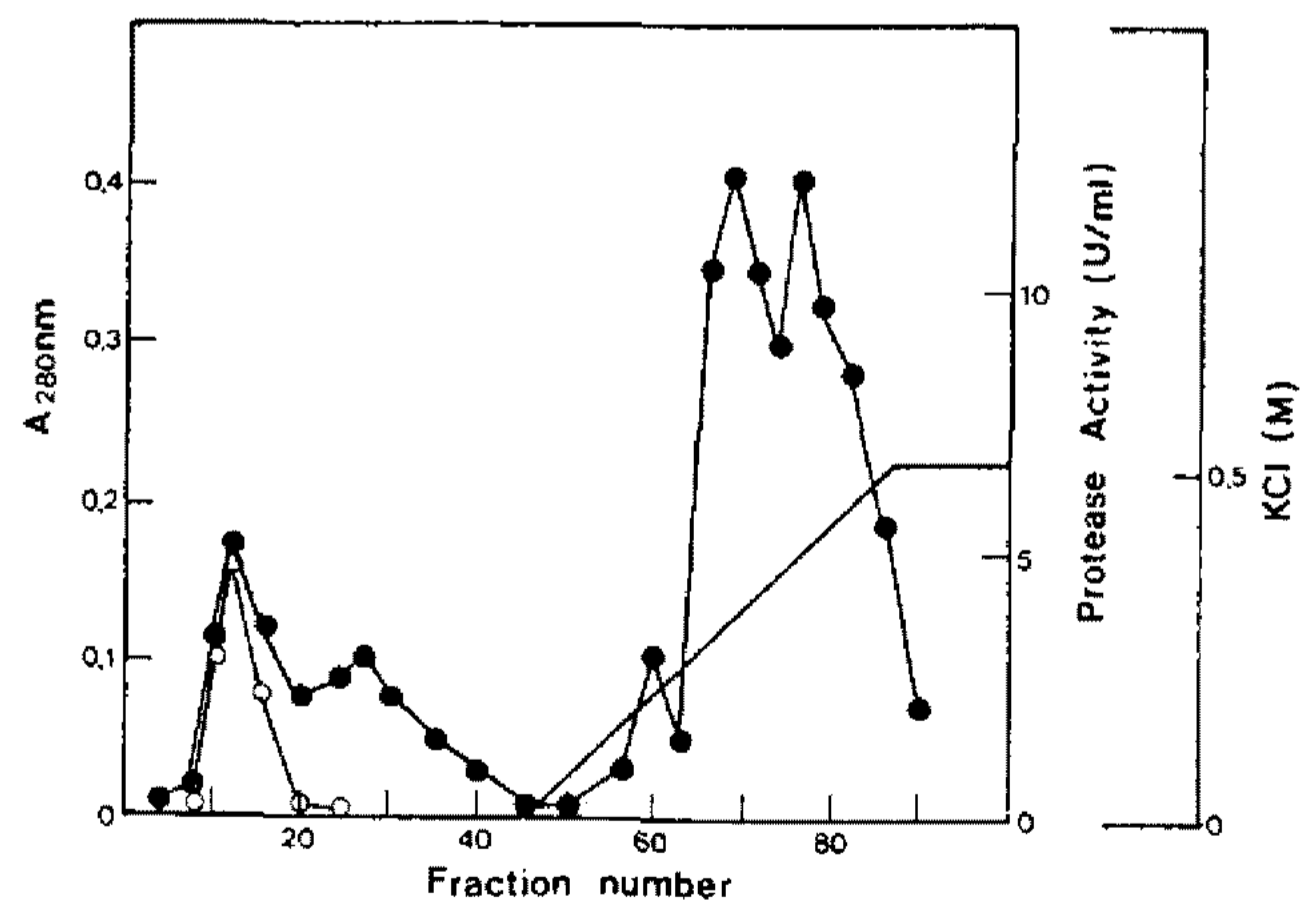


Fig. 1. Chromatography of crude enzyme on DEAE-Sepharose CL-6B column.

Enzyme was eluted with linear gradient of KCl in Tris-HCl buffer, at a flow rate of 50 ml/h and the volume of each fraction was 10 ml.

●, A_{280nm}; ○, protease activity

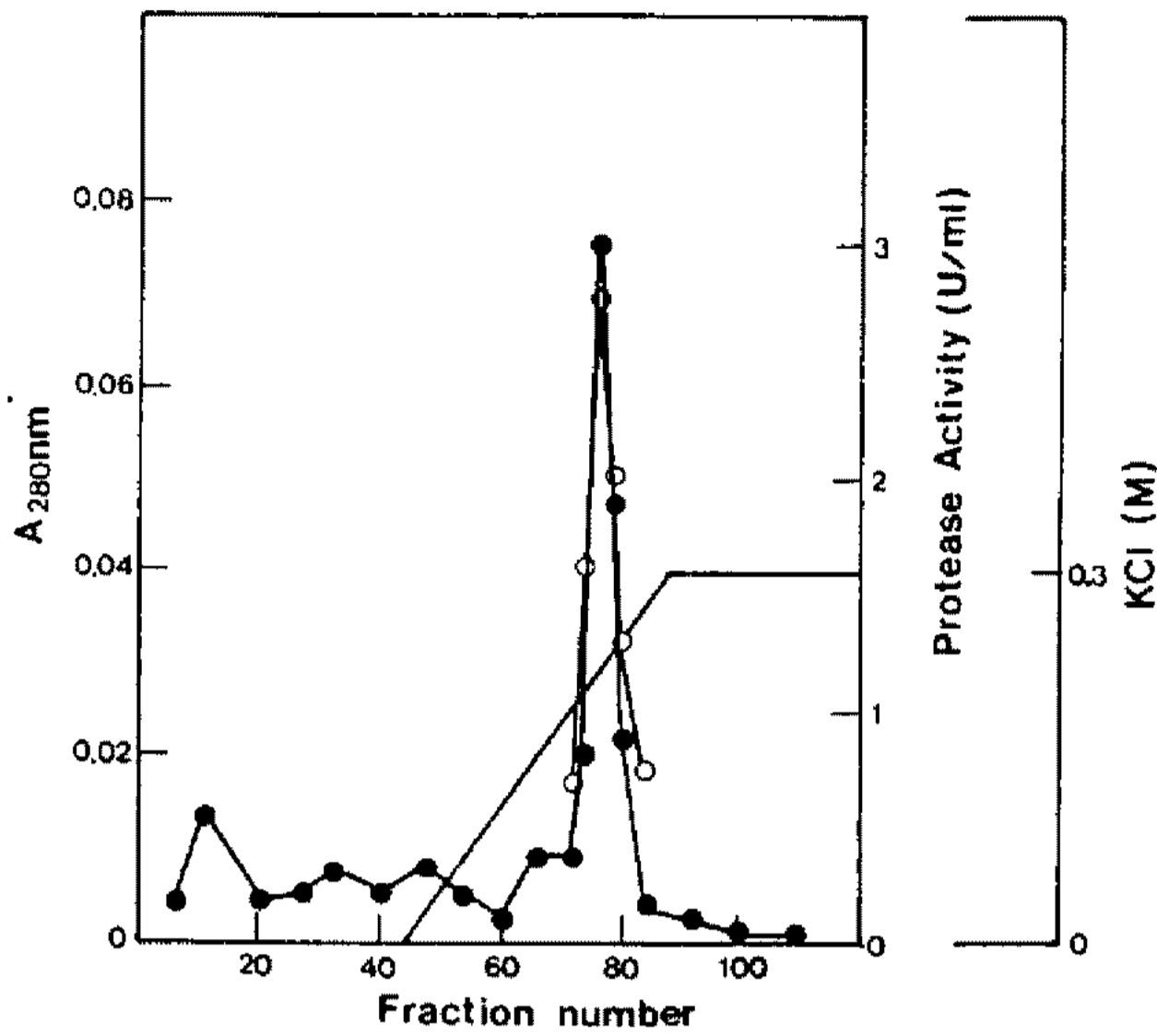


Fig. 2. CM-Sepharose CL-6B chromatography of active fractions from DEAE-Sepharose CL-6B column. Enzyme was eluted with linear gradient of KCl in phosphate buffer, at a flow rate of 50 ml/h and the volume of each fraction was 5 ml.
●, A_{280 nm}; ○, protease activity

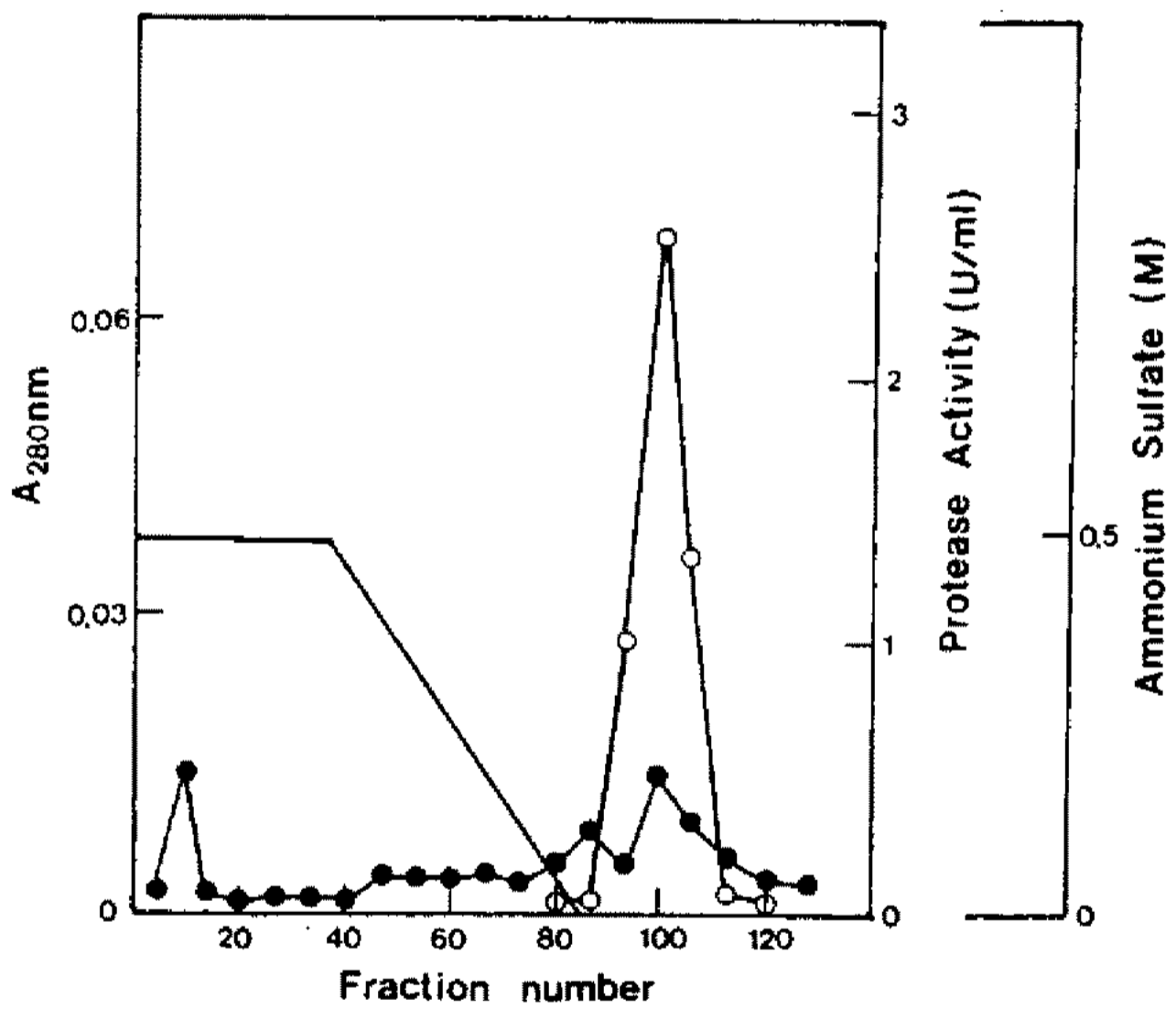


Fig. 3. Phenyl Sepharose CL-4B chromatography of active fractions from CM-Sepharose CL-6B column. Enzyme was eluted with decreasing gradient of phosphate buffer containing ammonium sulfate at a flow rate of 40 ml/h, and the volume of each fraction was 2 ml.
●, A_{280 nm}; ○, protease activity

이것으로 보아 분리하고자 하는 효소단백질의 pH가 8.0 이상이라고 추정되며, protease 활성이 있는 분획만을 모아 두번째 컬럼으로 CM-Sepharose CL-6B를 사용하여 분획한 결과, Fig.2에서 나타난 바와 같이 KCl 농도가 0.2 M까지 증가시켜서 protease의

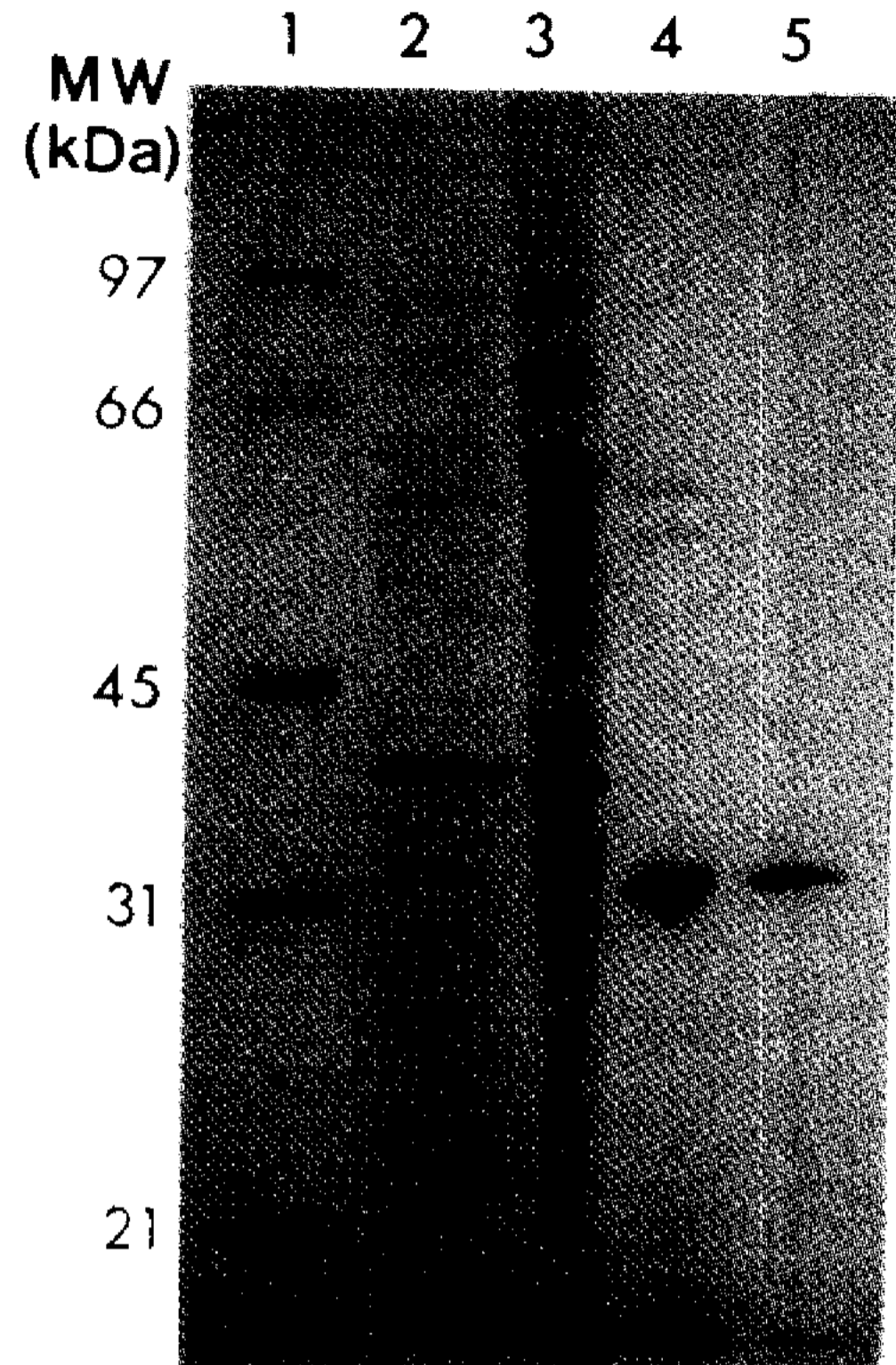


Fig. 4. SDS-PAGE of the protease Lane 1: molecular weight makers, lane 2: culture supernatant, lane 3: after DEAE-Sepharose CL-6B chromatography, lane 4: after CM Sepharose CL-6B chromatography, lane 5: after Phenyl Sepharose CL-4B chromatography.

역가를 갖는 단백질 peak를 얻었고 이 단백질을 모아서 투석 및 농축한 후, 마지막으로 phenyl sepharose CL-4B column을 사용하여 Fig.3에 보는 바와 같이 효소를 순수분리하였다. 순수분리된 효소의 순수도와 분자량을 알기 위하여 분자량을 알고있는 표준단백질과 분리한 protease로 전기영동한 결과, Fig.4와 같이 분리된 효소는 단일의 단백질 밴드를 보여서 순수 분리된 것을 알 수 있었고, 표준단백질과 비교하여 분자량을 결정한 결과 분리된 효소의 분자량은 30,000 임을 알 수 있었다.

효소에 대한 온도의 영향

본 균주가 생산하는 protease의 최적활성온도를 조사하기 위하여 20°C에서 80°C까지 각 온도별로 활성을 조사한 결과, Fig.5와 같이 60°C에서 최적활성을 나타냈다. 또한 이 효소의 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 20°C에서 80°C까지 정해진 온도에서 30분간 열처리한 후 그 잔존 활성을 37°C에서 측정한 결과, Fig.5와 같이 40°C 이상의 온도에서 활성이 급격히 감소하였다. 이런 결과는 단백질가수분해효소의 열안정성을 연구할 때 자주 관찰되는 현상인데,

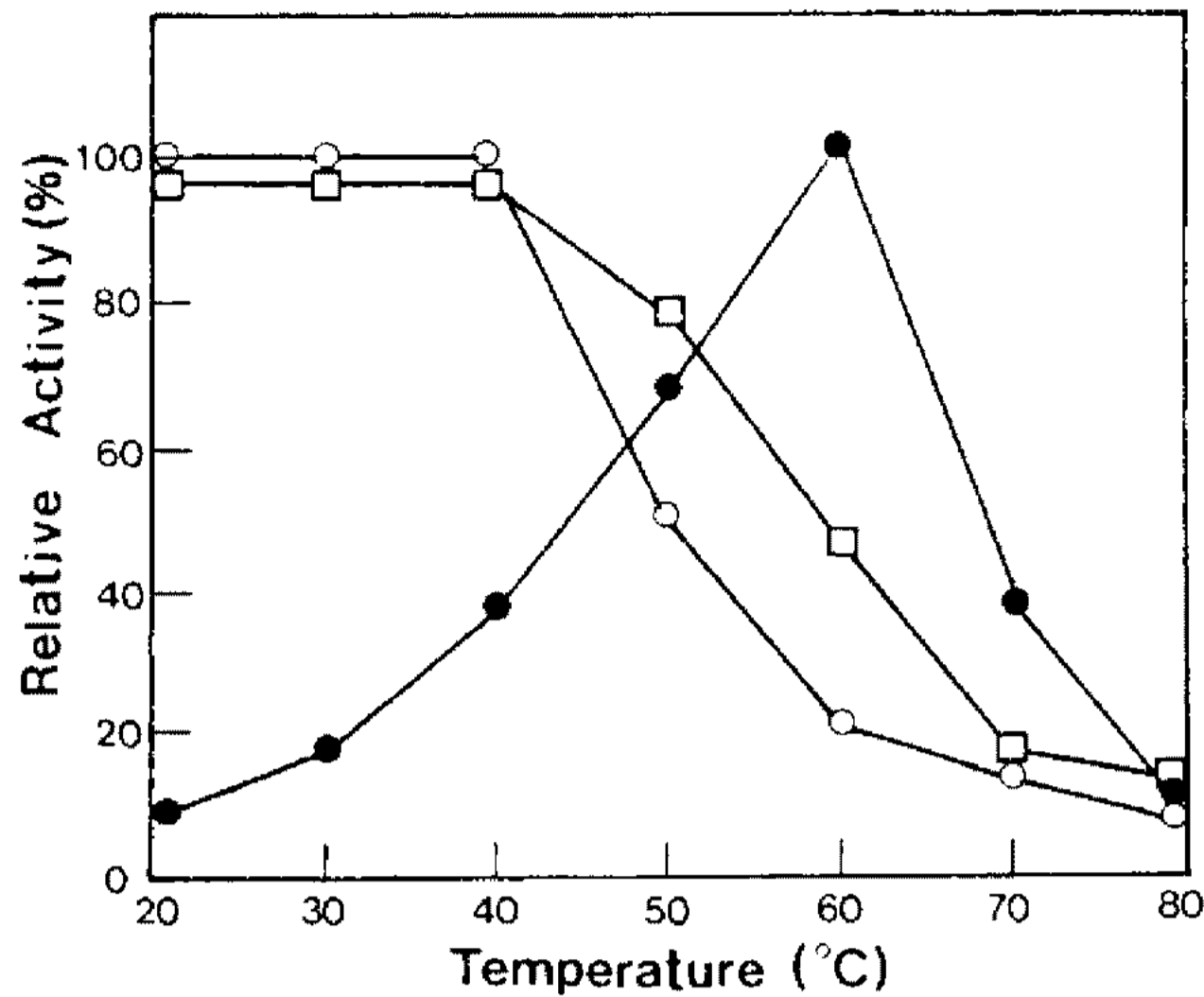


Fig. 5. Effects of temperature on enzyme activity and stability.

The enzyme was assayed at various temperatures and assayed again after incubation at various temperatures for 30 min.

○, stability of purified protease; □, stability of crude protease; ●, protease activity

Table 3. Thermostability of the protease NS 15-4

Heat treatment (10 min.)	Crude enzyme* (%)	Purified enzyme (%)	Purified enzyme + 10 mM CaCl ₂ (%)
None	100	100	100
40°C	100	92	99
50°C	79	49	70
60°C	49	21	25
70°C	15	15	18

*Crude enzyme: culture supernatant

온도의 증가에 따른 단백질구조의 변성 뿐 아니라, autoprolysis의 급격한 증가로 설명되고 있다(18). 실제로, Table 3에서와 같이 crude enzyme과 purified enzyme간의 열안정성이 크게 차이나는데, 이것은 효소가 순수분리될수록 autoprolysis 기회가 증가되기 때문에 일어나는 현상임을 알 수 있다. 한편, 대부분의 내열성효소는 Ca 이온에 의해 열안정성이 증가하는 것으로 보고되었는데(19), 이 효소의 경우에도 10 mM 농도의 Ca 이온에 의해 열안정성이 증가하였다(Table 3). 이것은 이효소의 구조내에 Ca 이온 결합부위가 있으며, Ca 이온과의 결합을 통해 단백질의 3차 구조가 견고해져서 온도증가에 의해 쉽게 변성되지 않기 때문이라 추정된다.

효소에 대한 pH의 영향

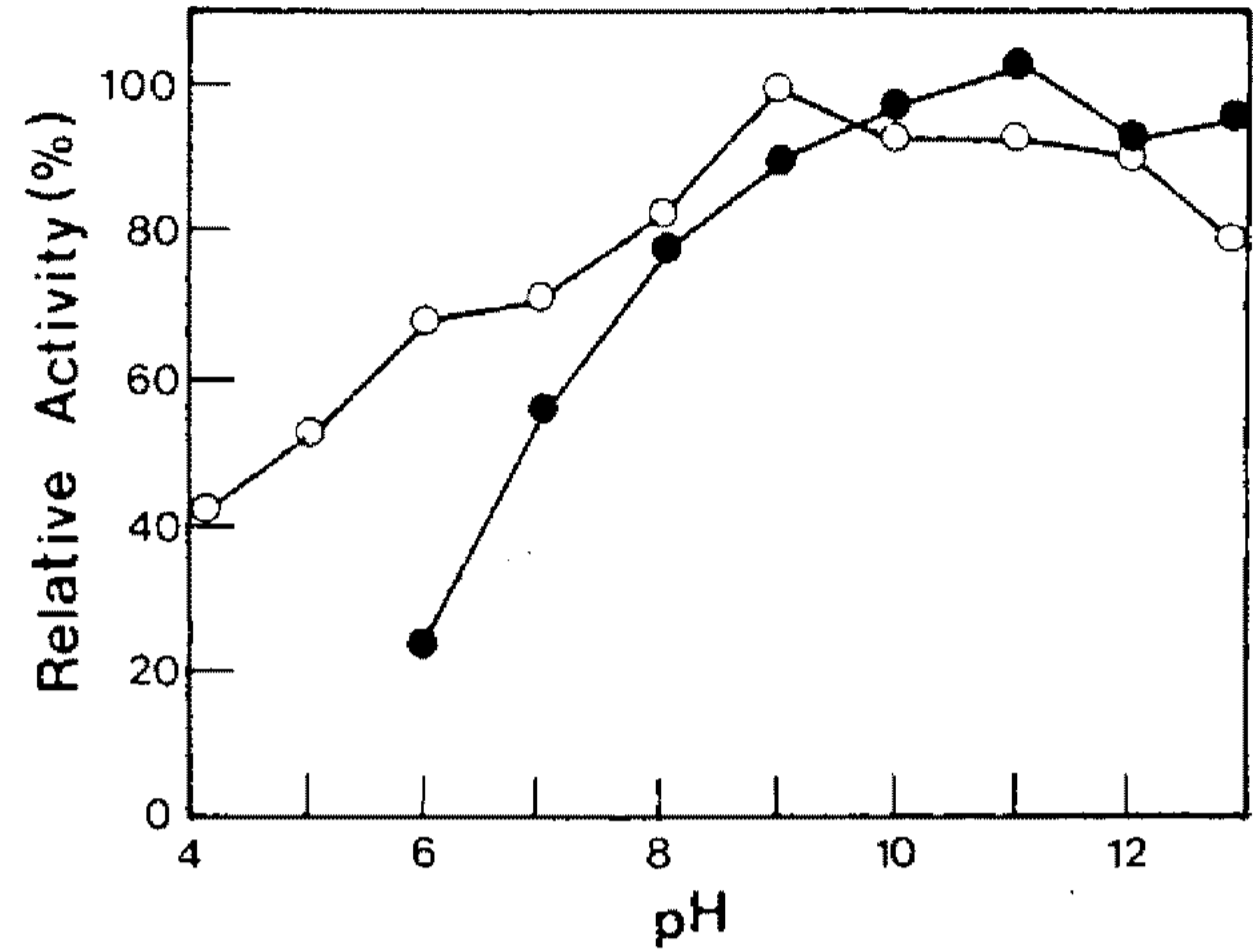


Fig. 6. Effects of pH on enzyme activity and stability. The enzyme was assayed at various pHs and assayed again after incubation at various pHs for 60 min. ○, stability of the enzyme; ●, protease activity

Table 4. Effects of inhibitors and metal ions on protease activity

Reagents	Relative activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100	100
PMSF	1.8	0
EDTA	10	7.2
KCN	99	110
L-Cystein	52	10
N-Ethylmaleimide	100	200
1,10-Phenanthroline	82	80
SDS*	23	2.8
CuCl ₂	60	8.0
CaCl ₂	94	80
ZnCl ₂	44	6.0
HgCl ₂	18	4.0
MnCl ₂	72	13
MgCl ₂	92	88

*SDS were used 1% and 5%, respectively.

pH가 이 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH 6에서 pH 13까지 각 pH별로 그 활성을 조사한 결과, Fig. 6와 같이 효소반응의 최적 pH가 11이었다. 이 효소의 pH 안정성을 조사하기 위하여 pH 4에서 13까지 각각의 pH에서 60분간 방치한 후 잔존활성을 측정된 결과, 이 효소는 pH 8에서 pH 12까지 안정한 알칼리내성 효소임이 밝혀졌다.

단백질가수분해효소저해제의 영향

본 효소에 대한 단백질가수분해효소저해제와 금속이온의 영향을 알아보기 위하여 각각을 최종농도가

Table 5. Comparison of the N-terminal amino acid sequences of NS 15-4 and other proteases

Proteases	N-terminal amino acid sequences	
	+1	+15
Subtilisin Carlsberg	A	Q T V P Y G I P L I V A A V
Subtilisin DY	A	Q T V P Y G I P L I V A A V
Subtilisin Amylosa	A	G S V P Y G I S G I V A P A
Subtilisin BPN'	A	G S V P Y G V S G I V A P A
Apr A	A	G S V P Y G V S G I V A P A
NS 15-4	A	Q S V P Y G I S Q I K A P A

Table 6. Proteolytic activities of various enzymes on defatted soybean and hammarsten casein as substrates

Enzymes	Defatted soybean (unit/ml)	Hammarsten casein (unit/ml)	D.S/H.C (%)
Protease NS 15-4	2.9	3.1	93
Trypsin	5.9	7.9	74
Papain	8.3	9.8	85
Elastase	6.6	9.6	69
Thermolysin	9.4	9.5	99

1 mM, 5 mM 되게 첨가하여 잔존활성을 측정된 결과, metalloprotease의 저해제인 1,10-phenanthroline에 의해서는 효소활성이 크게 저해받지 않았으나 serine기에 작용하는 PMSF에 의해 강하게 저해 받은 것으로부터 효소활성부위에 serine기를 갖는 serine protease로 추정된다(Table 4). 금속이온 중에서는 Zn^{++} , Hg^{++} 이온 등에 의해서 활성이 크게 저해되었다.

N 말단 아미노산의 서열분석

이 효소의 N 말단의 아미노산서열을 분석한 결과 Ala-Gln-Ser-Val-Pro-Tyr-Gly-Ile-Ser-Gln-Ile-Lys-Ala-Pro-Ala으로 밝혀졌다(Table 5). *B. amyloliquefaciens*는 metalloprotease와 serine protease를 생산하는 것으로 알려져 있는데(20). 이 중에서 serine protease의 일종인 subtilisin BPN'의 분자량과 최적반응 pH 그리고 pH 안정성에 있어서 본 연구의 단백질 가수분해효소인 protease NS 15-4와 유사하였다. 그러나 Table 5에서 알 수 있듯이 protease NS 15-4는 subtilisin BPN'과는 N 말단의 아미노산 서열이 다른 신규 단백질가수분해효소로 판명되었다.

한편, protease NS 15-4는 Hammarsten casein에

대한 탈지대두박의 분해능이 다른 protease에 비해 상대적으로 높았다(Table 6). 이것은 이효소가 탈지대두박과 같이 유기용매에 변성되어 물에 잘 녹지 않은 단백질을 쉽게 분해하는 기질특이성을 갖기 때문이다. 따라서 이 효소는 탈지대두박으로부터 정미성분을 개발하는 데에 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 3차 구조연구를 통해 효소와 기질의 결합기작을 밝히는 정보를 제공할 수 있다고 사료된다.

요 약

탈지대두박의 분해능이 뛰어난 단백질가수분해 효소를 생산하는 고온성 세균을 토양으로부터 분리하였다. 이 균은 형태적, 생리적 특성으로부터 *Bacillus amyloliquefaciens*로 동정되었다. 이 균을 탈지대두박이 포함된 배지에 접종하고 50°C에서 진탕배양한 후, 균이 생산한 단백질가수분해효소를 ammonium sulfate 침전, DEAE-, CM-sepharose, phenyl-sepharose column을 통해 분리하였다. SDS-PAGE로부터 이 효소의 분자량이 약 30,000 임이 밝혀졌으며 N 말단의 아미노산 서열이 AQSVPYGISQIKAPA인 것으로 분석되었다. 이 효소의 반응최적온도는 60°C, 반응최적 pH는 11이었고, Ca^{++} 에 의해 효소의 열안정성이 증가하였다. 또한 이 효소는 PMSF에 의해서 효소활성이 저해되는 serine protease로 판명되었다. 특히 기존의 다른 단백질가수분해효소와 비교하였을 때 물에 대한 용해도가 낮은 탈지대두박에 대해서 가수분해 역가가 큰 것으로 밝혀졌다.

참고문헌

1. Bio product. 1994. Protease. *Bio Industry*. **11**: 48-52.
2. Takani, H., T.T. Akiba and K. Horikoshi. 1990. Characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. no AH-101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 519-523.
3. Aehle, W., H. Sobek, A. Amory, R. Vetter, D. Wilke and D. Schomburg. 1993. Rational protein engineering and industrial application: structure prediction by homology and rational design of protein-variants with improved washing performance-the alkaline protease from *Bacillus alcalophilus*. *J. Biotechnol.* **28**: 31-40.
4. Von der Osten, C., S. Branner, S. Hastrup, L. Hedegaard, M.D. Rasmussen, H. Bisgaard-Frantzen, S. Carlsen and J.M. Mikkelsen. 1993. Protein engineering of subtilisins to improve stability in detergent formulations. *J. Biotechnol.* **28**: 55-68.

5. Antonini, E., G. Carrea and P. Cremonesi. 1981. Enzyme catalyzed reactions in water-organic solvent two-phase systems. *Enzyme Microb. Technol.* **3**: 291-296.
6. Morihara, K. 1987. Using proteases in peptide synthesis. *Trends in Biotechnol.* **5**: 164-171.
7. Hirose, Y., K. Kariya, I. Sasaki, Y. Kurono and K. Achiwa. 1993. Protease-catalyzed enantioselective synthesis of optically active 1,4-dihydropyridines. *Tetrahedron Lett.* **34**: 3441-3444.
8. Peek, K., R.M. Daniel, C. Monk, L. Parker and T. Coolbear. 1992. Purification and characterization of a thermostable proteinase isolated from *Thermus* sp. strain Rt41A. *Eur. J. Biochem.* **207**: 1035-1044.
9. Fujiwara, N. and A. Masui. 1993. Purification and properties of the highly thermostable alkaline protease from an alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. *J. Biotechnol.* **30**: 245-256.
10. Narhi, L.O., Y. Tabinsky, M. Levitt and M. Zukowski. 1991. Enhanced stability of subtilisin by three point mutations. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **13**: 12-24.
11. Estell, D.A. 1993. Engineering enzymes for improved performance in industrial applications. *J. Biotechnol.* **28**: 25-30.
12. John, G.H., N.R. Krieg and P.H.A. Sneath. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
13. Stages, C.E. and J.R. Davis, 1992. Automated systems for identification of microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**: 302-327.
14. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
15. Matsuzawa, H., K. Tokugawa, M. Hamaoki, M. Mizoguchi, M. Taguchi, H. Terada, S.T. Kwon and T. Ohta. 1988. Purification and Characterization of aqualysin I (a thermophilic alkaline serine protease) produced by *Thermus aquaticus* YT-1. *Eur. J. Biochem.* **171**: 441-447.
16. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
17. Matsudaira, P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**: 10035-10038.
18. Martin-Hernandez, M.C., A.C. Alting and F.A. Exterkate. 1994. Purification and characterization of the mature, membrane-associated cell-envelope proteinase of *Lactobacillus helveticus* L89. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 828-834.
19. Rahman, R.N.Z.A., C.N. Razak, K. Ampon, M. Basri, W.M.Z.W. Yunus, A.B. Salleh. 1994. Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 822-827.
20. Margesin, R., N. Palma, F. Knauseder and F. Schinner. 1992. Purification and characterization of an alkaline serine protease produced by a psychrotrophic *Bacillus* sp. *J. Biotechnol.* **24**: 203-206.

(Received 10 February 1995)