

플라스크 배양에서 *Bacillus subtilis* BK-17의 혈전용해효소 생산에 대한 환경 및 영양 조건의 영향

최 원 아 · 이 진 옥 · ¹이 경 희 · [†]박 성 훈
부산대학교 공과대학 화학공학과, ¹부산대학교 약학대학 약학과
(접수 : 1998. 3. 12., 게재승인 : 1998. 8. 18.)

Effects of Environmental and Nutritional Conditions on Fibrinolytic enzyme Production from *Bacillus subtilis* BK-17 in Flask Culture

Won-A Choi, Jin-Wook Lee, Kyung-Hee Lee¹, and Sunghoon Park[†]

Department of Chemical Engineering, College of Engineering,

¹Pharmaceutical Department, College of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

(Received : 1998. 3. 12., Accepted : 1998. 8. 18.)

The production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* BK-17 was studied in the shake flask cultures. The important medium components studied include nitrogen source, carbon source and inorganic salts. The environmental conditions include initial pH, temperature, shaking speed and working volume. Among various N-sources, C-sources and inorganic salts tested, soybean flour, D-glucose and Na₂HPO₄ gave the best results, and their optimal concentrations were 1.5%, 0.5% and 0.05%, respectively. The optimal pH and temperature were 9.0 and 37°C. With decreasing working volume in the range of 25~100ml in the 250ml flask or increasing shaking speed in the range of 100~300rpm, the enzyme production was greatly enhanced. The enzyme activity under the optimal conditions was about 1400U/ml with urokinase as a standard.

Key Words : *Bacillus subtilis* BK-17, fibrinolytic enzyme, optimal condition

서 론

우리 신체는 혈관을 통하여 각 조직에 영양물질과 산소를 공급함으로써 신진대사를 유지하므로 순환계의 원활한 유통은 건강한 생활을 영위하기 위해서 매우 중요하다. 이러한 순환계에서 혈류를 방해하는 요인 중의 하나로 혈액에서 형성되는 혈전을 들 수 있는데, 혈전은 thrombin에 의해서 fibrinogen으로부터 생성되고 plasminogen이 활성화되어 생성되는 plasmin에 의해 분해된다. 신체 내에서 혈전의 생성과 분해의 균형이 깨어져 과다 생성되면 혈전은 혈관벽에 부착·누적되어 혈관을 좁히거나 더 나아가 혈류를 따라 미세혈관에 침입하여 이를 폐쇄함으로써 고혈압, 뇌졸중, 동맥경화, 협심증, 심근경색, 폐경색 등의 각종 순환계 성인병을 유발하게 된다.

현재 사용되고 있는 혈전용해제 중에서 사람 또는 동물의 뇨

에서 정제된 urokinase (1~6)는 현재까지 정맥 주사용으로 시판, 사용되고 있으나 가격이 고가이고 급성 혈전증 환자에게만 사용이 한정되고 있다. 용혈성 연쇄상 구균(*Streptococcus haemolyticus*)으로부터 생산되는 streptokinase(7)는 urokinase보다 혈중의 반감기가 길고 전신에 고루 작용하는 이점이 있으나, 혈전을 직접 분해하는 것이 아니라 혈액 중의 plasminogen에 작용하여 plasmin을 형성케 하는 plasmin activator의 역할만 담당하며 또한 출혈 등의 부작용을 나타내는 단점이 있다. 사람의 악성 종양인 melanoma 유래의 tPA(tissue plasminogen activator)(8~9)는 혈전과의 친화력이 강하며 fibrin 분해력이 큰 것이 특징이나 혈중 반감기가 짧고 가격이 고가이기 때문에 경제성에 있어 문제가 된다. 최근에 관심을 끌고 있는 지렁이의 체단백질로부터 분리된 lumbrokinase(10~13)의 경우 혈전용해 작용은 매우 강하지만 일반 단백질에 대한 분해작용도 매우 강한 것으로 밝혀졌다.

기존의 혈전용해효소가 가지는 혈전에 대한 비특이성, 부작용, 고가 등의 단점을 해결할 수 있는 새로운 혈전용해효소 개발을 위한 연구는 활발히 진행되고 있다(14). 본 연구실에서도 혈전에 대하여 직접적으로 작용하고 특이성이 높은 혈전용해효소를 개발하기 위하여 *Bacillus subtilis* BK-17 균주가 생산하는 혈전

[†] Corresponding Author · Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Tel : 051-510-2395, Fax : 051-512-8563

e-mail : shpark0@hyowon.pusan.ac.kr

용해효소 BK-17을 연구하여 왔다(15) 이 균주는 발효된 대두로부터 분리된 것으로 효소를 분리정제하여 의약품이나 식품첨가제로 이용할 수 있을 뿐만 아니라 발효대두를 그대로 식품으로 이용할 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 혈전용해효소 개발을 위한 기초연구로 *B. subtilis* BK-17을 이용하여 플라스크 배양에서 BK-17의 생산 조건을 최적화하고자 하였다. 유기 질소원, 무기 질소원, 탄소원, 무기염류 등의 배지조성이 효소생산에 미치는 영향과, 초기 pH, 온도, 조업 부피, 교반 속도 등의 환경요인이 효소생산에 미치는 영향을 조사함으로써 배양조건을 최적화하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 실험에 사용된 균주는 발효된 대두로부터 분리한 *Bacillus subtilis* BK-17이다(17). 전배양을 위해 고체 평판 배지에 보존된 균을 30ml 시험관내 10ml의 L-broth(1% bactotrypton, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 초기 pH 6.8)에 접종하였으며 이 시험관을 진탕배양기(Model KMC-8450SF, Vision 과학, 서울)를 이용하여 37°C, 160rpm에서 8~10시간 동안 진탕하였다. 본배양에는 250ml 삼각 플라스크를 사용하였고 50ml의 L-broth에 500 μ l의 전배양액을 접종하였다. 표준조건은 별도의 조건이 언급되지 않은 경우 37°C, 160rpm이고 배양시간은 30시간 정도였다. 각 실험에 사용되어진 기본배지는 이전단계까지에서 최적화되어진 배지를 사용하였으며 이를 control로 하여 효소활성을 비교하였다.

분석 방법

혈전용해효소 BK-17의 활성은 fibrin plate method의 일종인 Astrup and Müllertz method(16)를 사용하여 측정하였다. Borate buffer(pH 7.8) 10ml 당 0.06g의 fibrinogen을 넣어 37°C에서 약 2시간 동안 방치함으로써 완전히 녹인 후 여기에 20unit의 thrombin을 투입하여 petri-dish에서 fibrin plate를 제조하였다. 효소액을 떨어뜨릴 때 지름 8mm의 paper disk를

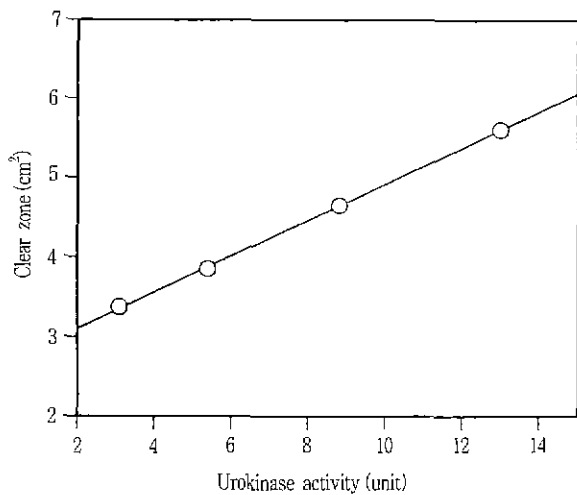


Figure 1. Calibration curve for determination of enzyme activity.

한 개의 petri-dish 당 3~4개씩 있어 이 paper disk 위에 효소액을 100 μ l 떨어뜨렸으며 효소액은 tris buffer(pH 7.4)로 대략 7:3의 비로 희석하였다. 시료를 투입한 후 fibrin plate를 37°C에서 3시간 incubation하고 투명한 분해환의 면적을 측정하여 효소활성을 얻었다. 효소 표준액으로는 정제된 urokinase(5,000 I.U., 녹십자)를 사용하였으며(Figure 1), 2~20 I.U.에 해당하는 범위로 희석하여 사용하였다. 1 I.U.(국제단위)는 1분 동안에 기질 1 μ mole을 변화시키기 위하여 필요한 효소량을 나타낸다.

결과 및 고찰

질소원의 영향

질소원의 영향을 크게 유기 질소원과 무기 질소원으로 나누어 조사하였다. 유기 질소원의 경우 tryptone, gelatin, bactotryptone, polypeptone, 대두분, 그리고 beef extract 등에 대하여 조사하였다(Figure 2). L-broth의 yeast extract 대신 유기 질소원을 0.5% 첨가하여 배양한 결과 대두분과 beef extract가 좋은 결과를 보였다. 그러나 beef extract는 값비싼 영양원이므로 추후 실험에서는 대두분을 이용하였다. 질소원은 extracellular enzyme의 생산에 있어 매우 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며(18), 특히 대두분이 *Bacillus stearothermophilus*와 *Streptomyces clavuligerus*로부터 protease 생산을 향상시켰다는 보고가 있다(19, 20). 대두분의 최적농도를 결정하기 위하여 농도를 0.5~2.0%로 변화시켰다(Figure 3). 1.5%까지는 효소생산이 비례적으로 증가하였고, 2.0%에서는 1.5%에 비해 약간 증가하였다. 이것은 Yoshimitsu 등(19)이 *Bacillus stearothermophilus*로부터 protease를 생산하는 실험에서 1.5% 대두분이 최적이라고 보고한 것과 비슷한 결과이다. Figure 3은 대두분의 가수분해물인 soypeptone의 영향을 보여 준다. 대두분은 물에 녹지 않아 흡광도로 세포성장을 측정하기 어려우므로 이 실험을 통하여 대두분을 soypeptone으로 대체할 가능성을 알아보고자 하였다. Figure 4가 보여 주는 바와 같이 soypeptone을 대두분과 같은 양을 넣은 경우, 두배의 양을 넣은 경우, 그리고

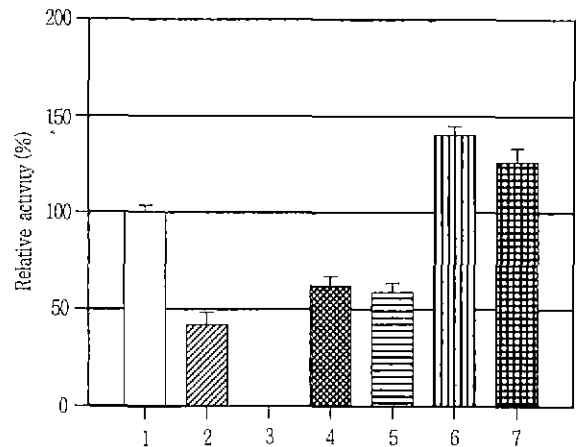


Figure 2. Effect of organic nitrogen source on the production of the fibrinolytic enzyme BK-17. 0.5% of each nitrogen source was added into L-broth lacking yeast extract : 1, control(L-broth) ; 2, tryptone; 3, gelatin; 4, bactopeptone; 5, polypeptone; 6, soybean flour; 7, beef extract.

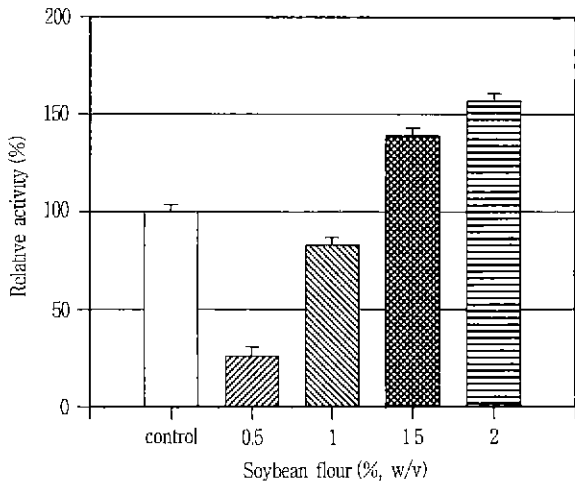


Figure 3. Effect of the concentration of soybean flour on the production of the fibrinolytic enzyme BK-17. Various amount of soybean flour was added into the L-broth lacking yeast extract.

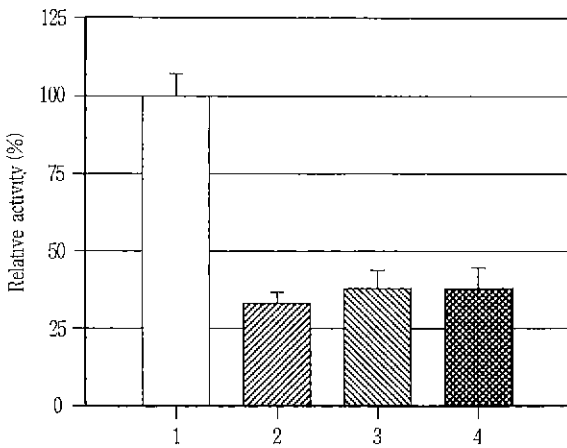


Figure 4. Effect of soypeptone on the production of the fibrinolytic enzyme BK-17. The control(1) contained 0.5% D-glucose, 0.05% Na₂HPO₄ and 1.5% soybean flour. In 2-4, various amount of soypeptone was added to replace soybean flour. 1, control; 2, soypeptone 1.5%; 3, soypeptone 3.0%, soypeptone 3.0%, but added stepwise, 1.5% at t=0 and the other 1.5% at t=13hr.

같은 양으로 시작하여 13시간에 다시 농량 첨가하여 두배의 농도로 맞춘 경우 모두 대부분에서 얻어지는 활성의 약 30~35%만 얻어졌다. *Bacillus stearothermophilus*를 사용하여 protease의 생산을 시도한 Chopra 등(21)은 soypeptone에서 최대의 효소활성을 얻었으나, Yoshimitsu 등(19)은 동일한 균주로부터 대부분이 약 2배 높은 효소활성을 나타낸다고 보고한 바 있다. *Bacillus subtilis* BK-17을 사용한 본 연구의 결과도 Yoshimitsu 등(19)의 결과와 일치하는 것으로 soypeptone에 존재하는 아미노산이 protease 생산에 저해작용을 일으킨 것으로 추정된다.

한편, 무기 질소원의 영향을 KNO₃, NH₄Cl, (NH₄)NO₃, (NH₄)₂

O₂S₈ 등에 대하여 조사하였다. 각각의 무기 질소원을 0.2%(w/v) 첨가한 결과 모두 첨가하지 않은 경우보다 낮은 효소활성을 나타내었고 (NH₄)₂O₂S₈의 경우는 특이하게도 전혀 효소활성을 보이지 않았다(실험결과도시 생략). KNO₃는 비교적 저해 정도가 크지 않았으므로 농도를 맞추어 0.01~0.2% 범위에서 그 영향을 조사하였다(실험결과도시 생략) 여전히 KNO₃를 첨가하지 않은 경우보다 낮은 효소활성을 보여 주었으므로 이후의 실험에서 무기 질소원은 첨가하지 않았다.

탄소원의 영향

탄소원이 효소활성에 미치는 영향을 L-arabiose, lactose, 수용성 녹말, 설탕, 포도당, mannitol, dextrin 등에 대하여 조사하였다(Figure 5). 탄소원을 0.5%(w/v) 첨가한 결과 L-arabiose, 설탕, 포도당, mannitol, dextrin 등의 탄소원은 첨가되지 않은

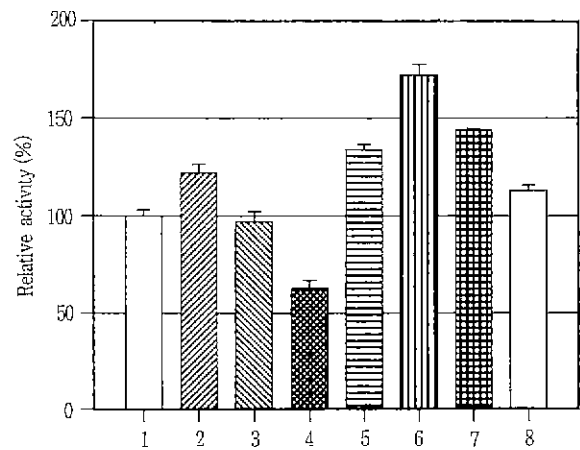


Figure 5. Effect of carbon source on the production of the fibrinolytic enzyme BK-17. 0.5% of each carbon source was added into the control(1.5% soybean flour and 0.5% NaCl) : 1. control; 2 L-arabiose; 3 lactose; 4, soluble starch; 5, sucrose, 6, D-glucose, 7, mannitol; 8, dextrin.

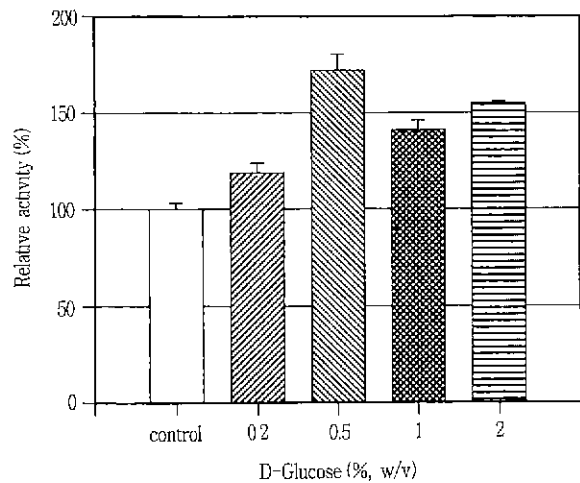


Figure 6. Effect of the concentration of D-glucose on the production of the fibrinolytic enzyme BK-17. Various amount of D-glucose was added into the control(1.5% soybean flour and 0.5% NaCl).

경우보다 높은 효소활성을 보였으며, 이는 적당량의 탄소가 세포의 성장을 충분하게 하여 이에 따라 효소생산량을 증대시킨 것으로 생각된다. 특히, 포도당은 첨가되지 않은 경우에 비해 1.7배의 높은 효소활성을 보였으며 포도당을 0.2~2%로 변화시켰을 때(Figure 6) 0.5% 이상에서 좋은 결과를 보였다.

무기염류의 영향

무기염류가 효소생산에 미치는 영향을 CaCl₂, MnSO₄, MgSO₄, Na₂HPO₄, ZnCl₂, FeCl₃, KH₂PO₄, NaCl 등에 대하여 조사하였다(Figure 7). 대두분 1.5%와 포도당 0.5%를 기본으로 0.1%(w/v)의 무기염류를 첨가한 결과, Na₂HPO₄를 첨가한 경우가 첨가하지 않은 경우보다 약 1.3배 좋은 효소활성을 보였으며, 특이하게도 ZnCl₂나 FeCl₃가 첨가된 경우 효소활성이 전혀 나타나지 않았다. Na₂HPO₄의 최적농도를 결정하기 위하여

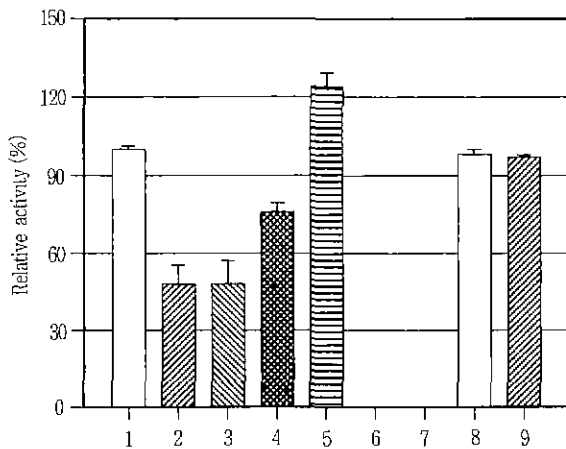


Figure 7. Effect of inorganic salt on the production of the fibrinolytic enzyme BK-17. 0.1% of each salt was added into the control(1.5% soybean flour and 0.5% D-glucose) : 1, control; 2, CaCl₂; 3, MnSO₄; 4, MgSO₄; 5, Na₂HPO₄; 6, ZnCl₂; 7, FeCl₃; 8, KH₂PO₄; 9, NaCl

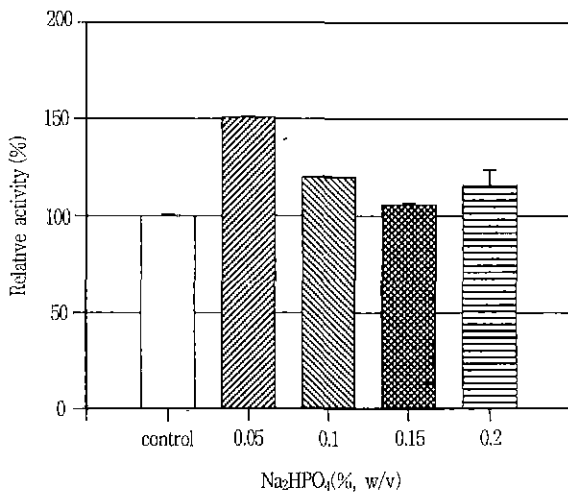


Figure 8. Effect of the concentration of Na₂HPO₄ on the production of the fibrinolytic enzyme BK-17. Various amount of NaHPO₄ was added into the control(1.5% soybean flour and 0.5% D-glucose).

0.05~0.2%로 변화시켰을 때(Figure 8), 0.05%의 농도에서 무기염류를 첨가하지 않은 경우보다 15배 높은 효소활성을 나타내었다

초기 pH와 온도의 영향

초기 pH가 효소활성에 미치는 영향을 pH 7~10 범위에서 조사하였다(Figure 9) 이 때의 온도와 진탕속도는 37°C, 160 rpm 이었다. 앞선 실험에서 최적화된 배지(0.5% 대두분, 0.5% 포도당, 0.05% Na₂HPO₄)를 사용하여 고압살균한 결과 pH가 약 2 정도 떨어졌으므로 본 실험에서는 최적배지를 고압살균한 후 1N의 NaOH를 60~360μl 첨가함으로써 pH를 조절하였다. 초기 pH 9에서 가장 높은 활성을 얻었으며 이는 초기 pH 7의 약 2 배의 값이었다. 그림에 나타내지는 않았지만 *B. subtilis* BK-17의 배양초기에 pH가 감소하였다가 세포성장이 정지기에 접어들면서 다시 증가하는 것을 알 수 있었는데, 초기 pH가 9 이하일 때는 지수성장기에 pH가 6 이하로 지나치게 하락하므로 효소생산에 저해작용을 하는 것으로 생각된다 이러한 경향의 pH 변화는 지수성장기까지는 포도당발효 결과 유기산이 축적되다가 정지기에 접어들면서 포도당이 고갈되어 유기산이 에너지원으로

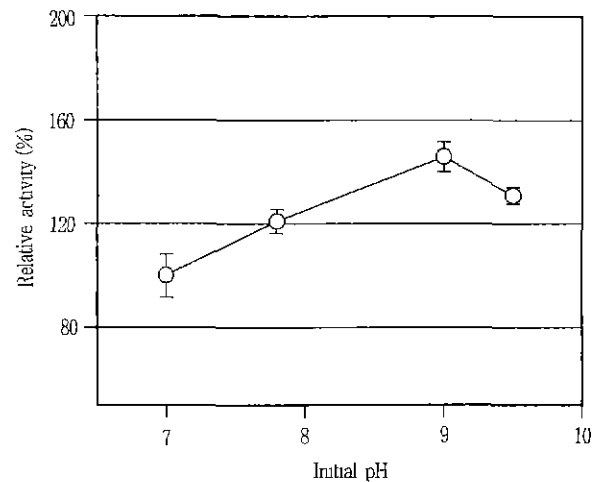


Figure 9. Effect of initial pH on the production of the fibrinolytic enzyme BK-17.

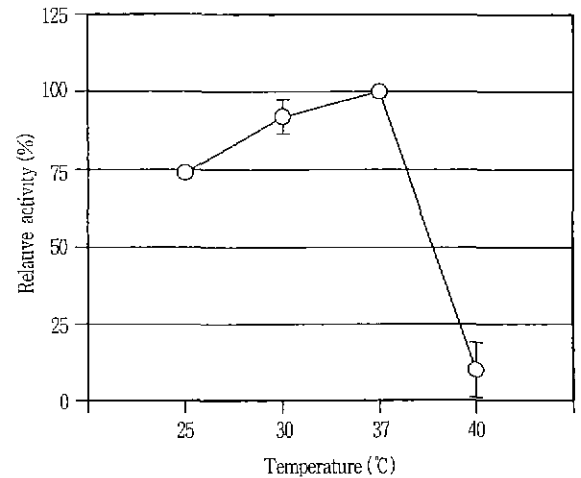


Figure 10. Effect of temperature on the production of the fibrinolytic enzyme BK-17.

소비되기 때문으로 생각된다. 본 연구에서 관찰되는 큰 폭의 pH 변화는 앞서 최적화된 배지가 충분한 완충능력을 갖추지 못한 것을 의미하며 추후 pH 조절이 가능한 bioreactor 실험에서 이를 보완할 필요가 있는 것으로 생각된다.

Figure 10은 온도의 영향을 보여준다. 초기 pH는 9.0, 교반속도는 160rpm으로 하여 온도를 25~40°C의 범위로 변화시켰다. 일반적으로 증온성 *Bacillus*는 30~37°C의 온도에서 세포 성장이나 대사산물의 생산에 있어서 최적의 활성을 나타내지만 호열성 *Bacillus*는 50°C 이상에서 활발한 대사를 하는 것으로 알려져 있다(22). 30~37°C의 범위에서 효소활성이 좋았으며, 온도가 높을수록 최대활성에 도달하는 시간이 단축되었다. 그러나 40°C 이상에서 효소활성이 37°C에서의 최대활성의 10% 수준으로 현저히 감소하였다

조업부피와 교반속도의 영향

250ml flask에서 액체배지 사용량을 25~100ml의 범위로 변화시키면서 조업부피의 영향을 조사하였다(Figure 11). 배지는 L-broth를 사용하였고 교반속도는 160rpm으로 고정하였다.

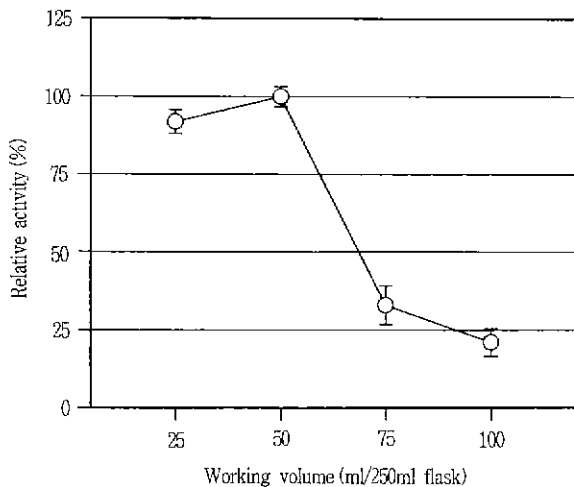


Figure 11. Effect of working volume on the production of the fibrinolytic enzyme BK-17.

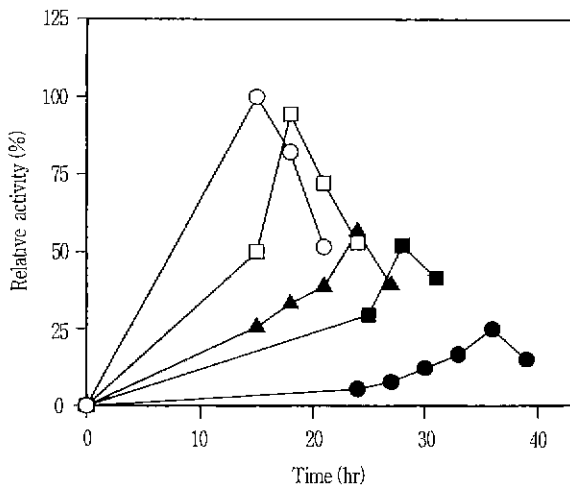


Figure 12. Effect of shaking speed on the production of the fibrinolytic enzyme BK-17 : ●, 100 rpm; ■, 160 rpm; ▲, 200 rpm; □, 235 rpm; ○, 300rpm.

25ml과 50ml에서는 높은 효소활성을 나타내었고 75ml 이상의 조업부피에서는 50ml에 비해 약 30% 이하로 효소활성이 낮아졌다 이 실험 결과로 미루어 볼 때 본 균주로부터의 효소생산은 aeration의 영향을 매우 많이 받는 것으로 생각된다.

교반속도의 영향은 100~300rpm의 범위에서 조사하였다(Figure 12) 이 때 조업부피는 50ml로 고정하였다. 235rpm 이상에서는 최대효소활성이 높게 나타났고 또 최대 활성에 도달하는 시간도 빨랐다. 교반속도가 200rpm 이하인 경우에는 300rpm에 비해 효소활성이 약 50% 정도의 수준에 머물렀다. 이 결과는 조업부피를 결정하는 실험과 함께 *B. subtilis* BK-17 균주가 혈전용해효소를 생산하는 데 있어 충분한 산소의 공급이 매우 중요한 인자라는 것을 보여 준다.

요 약

Bacillus subtilis BK-17의 혈전용해효소 생산에 미치는 여러 가지 매지성분 및 환경요인의 영향을 조사하였다. 유기 질소원으로 대두분은 좋았고 L-broth에서보다 약 1.4배 높은 효소활성을 얻을 수 있었다. 대두분의 가수분해물인 수용성의 soyp-epitone을 사용하였을 때에는 대두분을 사용한 경우에 비해 30~35%의 활성만 얻어졌다. 탄소원으로 포도당을 첨가하였을 때 효소활성이 현저히 향상되었고 특히 최적농도 0.5%에서 포도당을 첨가하지 않은 경우에 비해 효소활성이 1.7배 증가하였다. 여러가지 무기 질소원 중에서 Na₂HPO₄만이 효소활성을 높일 수 있었고 최적농도는 0.05%였다. 플라스크 배양의 최적매지는 대두분 0.5%, 포도당 0.5%, Na₂HPO₄ 0.05%였다. 환경요인이 효소생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 최적온도와 초기 pH는 각각 37°C와 pH 9였다. 또한 산소전달의 영향이 크게 나타났는데, 교반속도가 빠를수록, 그리고 조업부피가 적을수록 높은 효소활성이 관찰되었다. 최적 플라스크 배양에서 효소생산량은 urokinase 활성을 기준으로 할 때 1400 I.U./ml이었고 이는 최적화되지 않은 초기 L-broth에서 얻어진 효소활성 200 I.U./ml의 약 7배 향상된 값이었다.

감 사

본 연구는 95년도 농림수산 특정과제 연구비로 수행되었으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

참 고 문 헌

- 1 Wun, T. C., W. D. Schleuning, and E. Reich (1982). Isolation and characterization of urokinase from human plasma, *Biol. Chem.*, **257**, 3276-3283
- 2 Sumi, H., M. Maruyama, T. Yoneta, and H. Mihara (1983). Activation of plasma fibrinolysis after intrarectal administration of high molecular weight urokinase and its derivative, *Acta. Haematol.*, **70**, 289-295.
3. Sasaki, K., S. Moriyama, H. Sumi, N. Toki, and K. C. Robbins (1985). The transport of ¹²⁵I-labeled human high molecular weight urokinase across the intestinal tract in a dog model with stimulation of synthesis and/

- or release of plasminogen activators, *Blood*, **66**, 67-75.
4. Abe, T., M. Kazama, T. Kinoshita, I. Naito, T. Ogushi, Y. Yoshimura, J. Teruya, and N. Shimizu (1982), Shift of fibrinolysis system at oral administration of urokinase in human subjects; Double blind cross over study, *Blood and Vessels(in Japanese)*, **13**, 472-479
 5. Sumi, H., N. Toki, K. Sasaki, and K. C. Robbins (1980), Oral administration of urokinase, *Thromb. Res.*, **20**, 711-714
 6. Toki, N., H. Sumi, K. Sasaki, I. Boreisha, and K. C. Robbins (1985), Transport of urokinase across the intestinal tract of normal human subjects with stimulation of synthesis and/or release of urokinase-type proteins, *J. Clin Invest.*, **75**, 1212-1222
 7. Reed, G. L., L. F. Lin, B. Parhami-Seren, and P. Kussie (1995), Identification of plasminogen binding region in streptokinase that is necessary for the creation of functional streptokinase-plasminogen activator complex, *Biochemistry*, **34**, 10266-10271
 8. Penmca, D., W. E. Holmes, W. J. Kohr, R. N. Harkins, G. A. Vehar, C. A. Ward, W. F. Bennett, E. Yelverton, P. H. Seeburg, H. L. Heyneker, D. V. Goeddel, and D. Collen (1983), Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E.coli*, *Nature*, **301**(20), 214-221.
 9. Voet, D. and J. G. Voet (1990), *Biochemistry*, Willy Press, 1087-1095.
 10. Mihara H., H. Sumi, T. Yoneta, H. Mizumoto, R. Ikeda, M. Seiki, and M. Maruyama (1991), A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*, *Jap. J. Physiology*, **41**, 461-472
 11. Nobuyoshi N., H. Mihara, and H. Sumi (1993), Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*, *Biosci Biotech Biochem.*, **57**(10), 1726-1730
 12. Sumi H., N. Nakajima, and H. Mihara (1993), A very stable and potent fibrinolytic enzyme found in earthworm, *Lumbricus rubellus*, *Comp. Biochem Physiol.* **106**(3), 763-766
 13. Arai, K., J. Mimuro, S. Madorwa, M. Matsuda, T. Sako, and Y. Sakata (1995), Effect of staphylokinase concentration of plasminogen activation, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1245**, 69-75.
 14. Kim Hyun-Kuk, Gu-Taek Kim, Dae-kyung Kim, Won-A Choi, Sung-Hoon Park, Yong-Kee Jeong, and In-Soo Kong (1997), Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermented fish, *J. Ferment. Bioeng.*, **84**, 307-312.
 15. 박성훈, 정영기, 공인수 (1997), 진통 발효 식품으로부터 혈전용해능을 가지는 새로운 기능성 식품의 개발에 관한 연구, 농림수산부
 16. Jung Young-Kee, In-Soo Kong, and Sung-Hoon Park (1996), Fibrinolytic enzyme isolated from *Bacillus subtilis*, Korea Patent Number 96-8674.
 17. Astrup, T. and S. Mullertz (1952), The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity, *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**, 346-351.
 18. Bascaran, V., C. Hardisson, and A. F. Brana (1990), Regulation of extracellular protease production in *Streptomyces clavuligerus*, *Appl. Microbiol Biotechnol.*, **34**, 208-213
 19. Yoshimitsu U. and H. Atsushi (1994), Effects of culture conditions on growth and protease production of *Bacillus stearothermophilus* YG 185, *J. of Chem. Eng. of Japan*, **27**, 425-428.
 20. Porto, A. L. F., G. M. Campos Takaki, and J. L. Lima Filho (1996), Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soybean flour medium, *Appl. Biochem and Biotech.*, **60**, 115-122.
 21. Chopra A. K. and D. K. Mathur (1983), *J. Food protection*, **46**, 1020-1025.
 22. 김형원, 김기현, 이정기, 김영옥, 남희섭, 오태광 (1995), 고온성 *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4가 생산하는 내열성 protease의 특성, *한국생물공학회지*, **23**(3), 322-328