

## *Thermoactinomyces* sp. E79를 이용한 내열성 Alkaline 단백질 분해효소 생산: 환경인자의 영향

정상원 · 박성식 · 박용철<sup>1</sup> · 오태광<sup>2</sup> · 서진호\*

서울대학교 식품공학과, <sup>1</sup>협동과정 생물화학공학전공, <sup>2</sup>생명공학연구소 미생물 효소 RU

**Analysis of Production of Thermostable Alkaline Protease using *Thermoactinomyces* sp. E79.** Jung, Sang Won, Sung-Sik Park, Yong-Cheol Park<sup>1</sup>, Tae Kwang Oh<sup>2</sup>, and Jin-Ho Seo\*, Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea, <sup>1</sup>Interdisciplinary program for Biochemical Engineering & Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea, <sup>2</sup>Microbial Enzyme RU, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea - This research was undertaken to analyze fermentation properties of *Thermoactinomyces* sp. E79 for production of a thermostable alkaline protease, which is able to specifically hydrolyze defatted soybean meal (DSM) to amino acids. The optimum pH for cell growth and protease production was pH 6.7. *Thermoactinomyces* sp. E79 did not grow at pH10 Among carbon sources tested, soluble starch was the best for protease production, while glucose repressed protease production. Tryptone was found to be the best nitrogen source for cell growth and soytone was good for protease production. Oxygen transfer rate played an important role in producing thermostable alkaline protease. Maximum values of 6.58 g/L of dry cell weight and 43.0 U/mL of protease activity were obtained in a batch fermentation using a 2.5 L jar fermentor at  $1.93 \times 10^2 \text{ hr}^{-1}$  of volumetric oxygen transfer coefficient ( $k_{L,a}$ ). Addition of 200 mg/L humic acid to the growth medium resulted in 1.64 times higher protease activity and 1.77 times higher cell growth than the case without humic acid addition.

**Key words:** *Thermoactinomyces* sp., thermostable alkaline protease

미생물을 이용한 효소생산량의 35%를 차지하고 있는 단백질 분해효소는 식품, 약품, 세제공업 등에 다양하게 이용되고 있다. 단백질 분해효소는 serine계, cysteine계, aspartate계, metallo계 등 네 종류로 분류되며, 활성부위에 serine residue를 가지는 serine 계열의 단백질 분해효소(E.C. 3.4.21.14.)가 호일칼리성을 나타낸다. 호일칼리성 serine계열의 효소는 pH 10 정도에서 최적의 역가를 보이고, 방향족 또는 소수성 아미노산 잔기(tyrosine, phenylalanine 또는 leucine 등)의 carboxyl side를 가수분해하는 기질 특이성을 보이며 diisopropyl fluorophosphate(DFP)나 phenylmethyl-sulfonyl fluoride(PMSF)에 의해 선택적으로 불활성화된다[6]. 대부분의 alkaline 단백질 분해효소는 고온에 대한 열안정성이 낮아 내열성 효소들이 갖는 특성인 중온균에 대한 오염방지 및 고온에서의 물질전달속도 증가, 보관안정성의 증대 등을 가지고 있지 못하다. 또한 내열성 protease의 경우 효소의 열 안정성은 계면 활성제나 유기 용매와 같은 denaturing agent에 대한 내성에도 관계를 가지고 있어 유기용매상에서 유용물질의 합성 시 생축매로서 사용될 수 있다[13,15].

최근 열안정성과 호일칼리 특성을 동시에 보이는 단백질 분해효소를 생산하는 미생물의 선별에 대한 보고가 있는데 Takami 등[11]은 pH 12~13에서 최적의 반응을 보이는 내열성 alkaline 단백질 분해효소를 생산하는 *Bacillus* sp. no. AH-101를 분리하였다. Masui 등[8]은 카세인 가수분해에 대한 최적조건이 pH 12~13, 85°C인 단백질 분해효소를 생산하는 호일칼리 고온성 *Bacillus* sp. Strain B18'을 분리하였다. 또한 유래가 다른 serine protease의 아미노산 서열을 비교한 결과 arginine residue의 수가 증가할 수록 단백질 분해효소의 최적 pH가 높은 것을 알 수 있었고 point mutation을 이용하여 beta-turn 부분의 threonine-203을 proline으로 치환한 경우 효소의 안정성을 크게 증가시켰다는 보고가 있다[5]. Tsuchiya 등[14]은 *Thermoactinomyces* sp. HS682에서 세포 외로 분리되는 내열성 alkaline 단백질 분해효소를 분리하였는데  $\text{Ca}^{2+}$  이온을 반응액에 넣을 경우 pH와 온도에 대한 안정성이 증가되어 최대 역가를 80°C에서 나타내었고 70°C, pH 11.5에서 최대의 안정성을 보였다. Lee 등[7]은 토양에서 내열성 alkaline protease를 생산하는 *Thermoactinomyces* sp. E79를 분리하였는데 최적의 반응조건이 85°C, pH 11.0이었고 탈지대두박에 기질특이성을 보였다. 또한 이 효소는 *Thermoactinomyces vulgaris*에서 유래한 serine protease인 thermitase의 아미노산 서열과 76%

\*Corresponding author

Tel. 0331-290-2583, Fax. 0331-293-4789

E-mail: jhseo94@snu.ac.kr

이상 유사성을 보였다.

본 연구에서는 두염에서 분리한 *Thermoactinomyces* sp. E79에서 세포 외로 분리되는 내열성 alkaline 단백질 분해효소의 생산성 향상을 위하여 발효조건을 최적화하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주

본 연구에서는 두염으로부터 분리, 동정한 내열성 alkaline 단백질 분해효소를 생산하는 *Thermoactinomyces* sp. E79를 생명공학연구소에서 분양받아 사용하였다[7].

### 발효배지 및 배양방법

*Thermoactinomyces* sp. E79를 배양하기 위한 발효배지로 LB 배지(tryptone 10 g/L; yeast extract 5 g/L; NaCl 10 g/L)를 사용하였고 탄소원으로 fructose, glucose, lactose, maltose, soluble starch, sucrose, xylose 등을 각각 2 g/L 첨가하였다. 질소원의 영향을 알아보기 위한 회분식 발효에서는 LB배지 중 10 g/L의 tryptone 성분을 bactopectone, casamino acid, phytone peptone, soytone 등으로 대체한 배지를 이용하였고 탄소원으로 수용성 전분 10 g/L를 사용하였다. 배양조건으로 500 ml baffled 플라스크 배양의 경우 배양액 부피를 200 ml로 하여 진탕 배양기(HK-SI25C, 한국종합기기제작소, Korea)를 이용하여 200rpm, 50°C, pH6.7에서 수행하였다. 산소전달속도에 따른 균체성장 및 효소 발현을 알아보기 위해 탄소원으로 수용성 전분을 10 g/L 첨가한 LB배지를 이용하여 2.5 L jar fermentor (KF-5L, 한국발효기, Korea)에서 배양액부피를 1 L로 50°C에서 공기주입속도를 2vvm으로 고정하고 임펠러의 교반속도를 350 rpm, 500 rpm, 650 rpm 등으로 달리하여 실시하였고 접종량은 2%로 하였으며 pH는 1N HCl 또는 1N NaOH를 첨가하여 pH 6.7를 유지하였다. 배양시 Antiform 289(Sigma Chemical Co., USA)를 첨가하여 거품생성을 억제하였다. 산소전달속도(oxygen transfer rate, OTR)는 산소농도구배와 비례하여 아래와 같은 수식으로 결정되며  $C^*$ 는 산소포화농도이고  $C_L$ 은 실제산소농도이며 상수  $k_La$ 는 volumetric oxygen transfer coefficient ( $hr^{-1}$ )이다.

$$OTR = \frac{dC_L}{dt} = k_La(C^* - C_L)$$

### 단백질 분해효소의 역기측정

세포 외로 배출되는 단백질 분해효소의 역가를 측정하기 위해 배양액을 원심 분리기(VS-15000, 비전과학, Korea)에서 4°C, 10,000rpm으로 5분간 원심 분리한 후 그 상등액을 조효소로 사용하였다. 단백질 분해효소의 역가는 Takami의 방법[12]을 변경하여 측정하였다. 일정 비율로 희석된

조효소액 0.1 ml를 0.9 ml의 기질용액(0.6% Hammersten Casein in 10 mM Gly-KCl-KOH buffer, pH 10.0)에 넣고 55°C에서 5 분간 반응시킨 후 2ml의 TCA용액 (0.11 M trichloroacetic acid, 0.22 M sodium acetate, 0.33 M acetic acid)을 가하여 반응을 정지시키고 8,000 g에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 spectrophotometer (UV-2201, Shimazu, Japan)를 이용하여 tyrosine의 양을 측정할 수 있는 파장인 275 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 역기는 조효소 반응액과 대조구의 275 nm에서 흡광도 차이로 결정하였다. 내열성 alkaline 단백질 분해효소의 1 unit는 55°C, pH 10에서 분당 1  $\mu$ mole의 tyrosine을 생산하는 효소의 양으로 정의하였다.

### 분석방법

건조균체농도는 다음과 같은 방법을 이용하여 측정하였다. 균체를 LB배지에서 spectrophotometer(UV-2201, Shimazu, Japan)를 이용하여 600 nm의 파장에서 흡광도가 0.6 이내의 범위가 되도록 배양한 후 배양액을 0.2  $\mu$ m filter paper (NC membrane filter, Whaman, U.S.A.)에 적당량을 통과시켜 균체를 거른 후 filter paper를 건조기에서 말려 무게를 측정하였다. 여기에서 얻은 흡광도와 건조균체농도와의 상관관계로부터 전환계수를 구하였고 이것을 이용하여 배양액의 흡광도에서 건조균체의 농도를 추정하였다.

$$\text{건조균체농도(g/L)} = 0.306(\text{g/L/Abs}_{600\text{nm}}) \times \text{Abs}_{600\text{nm}} \times \text{dilution factor}$$

수용성 전분을 정량하기 위해 일정 비율로 희석시킨 배양액의 상등액 200  $\mu$ l에  $\alpha$ -amylase(Sigma, U.S.A) 10  $\mu$ l를 첨가한 후 반응액을 끓는 물에서 5분간 반응시킨 다음 상온에서 식혔다. 이 반응용액에 starch assay reagent(Sigma, U.S.A) 1  $\mu$ l을 첨가하고 60°C에서 15분간 반응시킨 후 상온까지 식히고 수용성 전분에서 유리된 포도당의 농도를 측정하였다[1]. 포도당 농도는 glucose analyzer (1500G, YSI, U.S.A.)와 Glucose-E-kit (영동제약, Korea)를 이용하여 측정하였다. 배양액 중의 환원당 농도는 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) 분석방법을 이용하여 측정하였다. 2 M NaOH용액에 0.25 g의 3,5-Dinitrosalicylic acid와 75 g의 Sodium potassium tartarate (Rochelle salt)를 녹인 후 증류수를 첨가하여 최종부피를 250 mL로 맞춘 DNS용액 1 mL에 분석시료 100  $\mu$ l를 주입하였다. 100°C에서 10 분간 가열하고 상온으로 급격히 냉각시킨 후 반응액을 spectrophotometer(UV-2201, Shimazu, Japan)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 초기 pH의 영향

배양액의 pH는 다양한 영양분, 유도체, 성장인자 등의 세

포막 이동 속도, 효소반응과 산·염기 평형에 영향을 미치므로 미생물의 생육과 효소생산에도 영향을 미친다. 따라서 균체 성장과 효소 생산에 대한 pH의 영향을 알아보았다. LB배지에 초기 pH를 5.7, 6.7, 8.0, 10.0으로 하여 플라스크 배양을 한 결과 균체 농도는 pH 10.0을 제외한 pH 5.7~8.0에서 1.5~1.9 g/L를 얻었다(Fig. 1). 효소생산도 균체 농도와 유사한 결과를 보여 강염기인 pH 10.0에서는 단백질 분해효소의 발현이 이루어지지 않았다. 특이한 것은 강알칼리인 pH 10.0에서는 균체성장뿐만 아니라 효소생산도 거의 이루어지지 않았다. 그러나 내열성 serine계열의 단백질 분해효소를 생산하는 *B. licheniformis* MIR 29의 경우 pH 9.0 이상에서 성장하였고[4] 같은 속인 *Thermoactinomyces* sp. HS682는 pH 7.5~11.5에서 균체생육을 하였고 pH 10.3~10.5에서 성장속도가 가장 빨랐으며 pH 7.5 이하에서는 균체가 자라지 못했다[3]. 곧 *Thermoactinomyces* sp. E79는 중성 pH에서 세포성장 및 효소생산성이 우수하기 때문에 산업적인 이용 시 mild한 조건에서 운전이 가능한 큰 장점을 가지고 있다. 효소반응의 최적조건인 pH 10.0보다 낮은 중성 pH에서 균체생육이 이루어지므로 세포의 배지로 분비되는 단백질 분해효소의 세포파괴와 같은 성장저해효과를 최소화시킬 수 있다. 균체 성장 및 효소생산에 최적인 발효 pH는 비효소역가가 가장 높은 조건인 pH 6.7이었다.

**탄소원의 영향**

LB배지에 여러 종류의 탄소원을 넣어 *Thermoactinomyces* sp. E79로부터 내열성 alkaline 단백질 분해효소의 생산에 효과적인 탄소원을 찾았다. 사용된 탄소원은 soluble starch, fructose, glucose, lactose, maltose, sucrose, xylose 등으로 각각 2 g/L를 첨가하였다. 이 중 수용성 전분의 경우

내열성 alkaline 단백질 분해효소의 생산에 가장 우수한 효과를 보여 9.2 U/mL를 얻을 수 있었으며, lactose의 경우는 수용성 전분의 25%정도의 효소 역가를 보였고, 나머지 5개의 탄소원의 경우는 거의 효소 역가를 나타내지 않았다(Table 1). 같은 속의 *Thermoactinomyces* sp. HS682는 탄소원으로 maltose를 사용할 경우 가장 많은 단백질 분해 효소를 얻을 수 있었고 xylose, fructose, glucose 등에서도 상당한 효소역가를 보였다. 그러나 수용성 전분을 탄소원으로 이용할 경우 효소를 거의 생산하지 않았다[13]. *B. licheniformis* MIR29 경우에는 효소생산을 유도하는 특성을 가진 casein을 가장 효과적인 탄소원으로 이용하였다[4]. 위의 탄소원 중에 쉽게 대사될 수 있는 포도당이나 설탕 등 당당류나 이당류에서 단백질 분해효소 생산이 거의 이루어지지 않았는데, 이는 catabolite repression 때문으로 가장 효과적인 탄소원으로 결정된 수용성 전분은 미생물이 쉽게 대사할 수 없기 때문에 catabolite repression의 영향을 받지 않는 것으로 판단된다. 내열성 alkaline 단백질 분해효소의 생산에 최적 탄소원인 수용성 전분을 농도를 달리한 발효실험결과 10 g/L의 농도에서 최고값을 보였고 이후의 실험에 적용하였다. (data not shown)

**질소원의 영향**

단백질 분해효소의 생산에 결정적인 영향을 미치는 성분은 질소원으로 알려져 있다. 단백질 분해효소 생산균주를 배양할 때, 질소원으로 무기 질소원이나 유리 아미노산 같은 질소원을 사용하면 단백질 분해효소의 생산이 저해를 받는 반면, 유기 질소원은 단백질 분해효소의 생산에 inducer로 작용하는 경우가 많다[2,9,10]. *Thermoactinomyces* sp. E79 유래의 내열성 alkaline 단백질 분해효소 생산에 적합한 유기질소원을 결정하기 위해 플라스크를 이용한 회분식 배양을 하였다. 각각의 농도가 10 g/L인 질소원에 따른 균체 성장에 대해 tryptone과 bactopectone에서 높은 균체농도(4 g/L)를 얻었고 단백질 분해효소 생산의 경우 soytone을 이용한 경우에 다른 질소원에 비해 약 1.7배 효소역가가 높았다(Fig. 2). 균체 성장에 우수한 tryptone과 효소생산

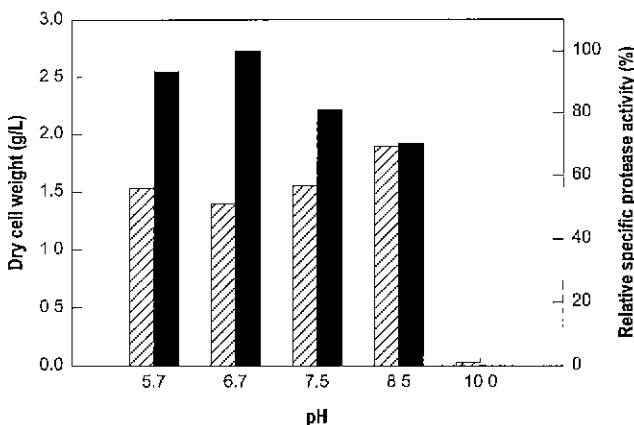


Fig. 1. Influences of medium pH on growth and protease production by *Thermoactinomyces* sp. E79 grown in LB medium at 50°C and 200 rpm.

▨ dry cell weight, ■ relative specific protease activity

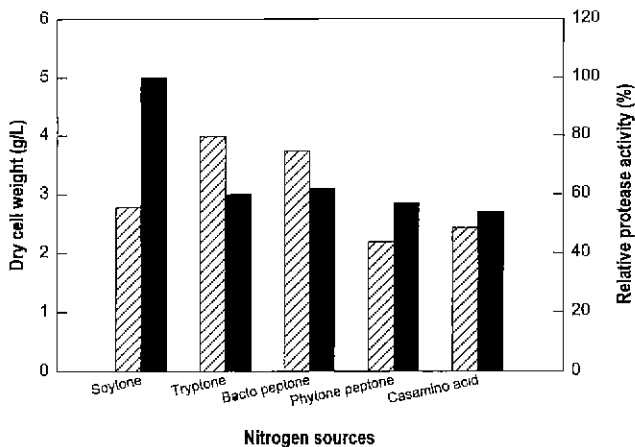
Table 1. Effects of carbon sources on cell growth and protease production by *Thermoactinomyces* sp. E79 grown in LB medium at 50°C, 200 rpm and initial pH6.7

Carbon sources	Dry cell weight (g/L)	Protease activity (U/mL)
Fructose	1.04	0.17
Glucose	0.84	0.09
Lactose	0.81	2.35
Maltose	0.94	0.12
Soluble starch	1.31	9.20
Sucrose	1.03	0.00
Xylose	1.17	0.46

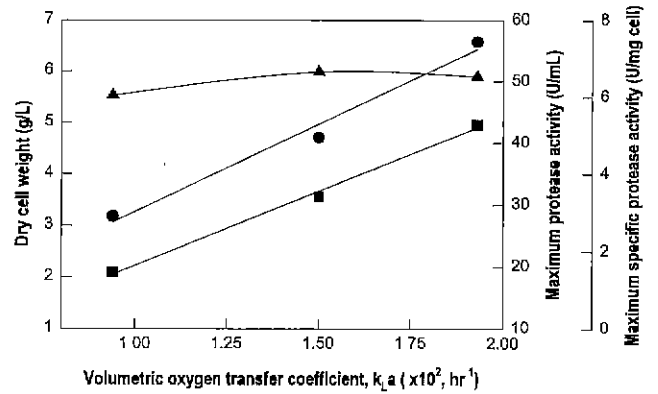
에 적합한 soytone의 최적농도를 결정하면 각각 10 g/L와 5g/L였다(data not shown). 질소원 농도에 대한 발효실험에서 일정 농도 이상의 질소원이 첨가되면 효소생산이 감소하는 현상을 보였는데 이는 질소원에 포함된 저분자 펩타이드가 과량으로 존재하여 효소생산을 억제하는 것으로 추측된다. 이와 같은 결과로 Fujiwara 등[5]은 *Bacillus* sp.를 이용한 단백질분해효소의 생산에서 질소원의 농도가 높아질수록 단백질 분해효소에 의해 생성되는 아미노산이나 저분자 형태의 펩타이드의 농도가 상대적으로 높아져 product inhibition과 비슷한 형태로 내열성 alkaline 단백질 분해효소의 생산이 저해된다고 했다.

**산소 공급의 영향**

*Thermoactinomyces* sp.는 일반적으로 호기성 균으로 알려져 있으며 균사체를 형성하면서 응집현상을 일으키므로 세포 성장이 이루어짐에 따라 산소 전달의 문제가 발생한다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위해 산소전달속도에 따른 균체농도와 효소생산의 상관관계를 알아보았다(Fig. 3). 교반속도 350, 500, 650 rpm에 대해 각각의 volumetric oxygen transfer coefficient( $k_L a$ )는  $0.94 \times 10^1$ ,  $1.50 \times 10^2$ ,  $1.93 \times 10^2 \text{ hr}^{-1}$ 이었다. 균체농도는 volumetric oxygen transfer coefficient와 비례관계를 보이고 비효소역가는 6.04~6.65U/mg-cell로 산소전달속도가 증가하여도 큰 변화를 보이지 않았다. 산소전달속도와 균체성장속도는 1차함수의 관계를 나타내므로 Fig. 3과 같이 효소생산량도 산소전달속도와 비례하여 증가하였다. 결과적으로 volumetric oxygen transfer coefficient를  $0.94 \times 10^1 \text{ hr}^{-1}$ 에서  $1.93 \times 10^2 \text{ hr}^{-1}$ 로 증가시킬 경우 균체농도는 2.1배 증가하여 6.58 g/L, 최대효소역가는 2.2배 증가하여 43.0 U/mL를 얻을 수 있었다. 산소전달



**Fig. 2. Effects of nitrogen sources on thermostable alkaline protease production by *Thermoactinomyces* sp. E79 grown in LB medium with 10 g/L of soluble starch at 50°C, 200 rpm and initial pH6.7.**  
(▨ dry cell weight, ■ relative protease activity)



**Fig. 3. Relation of volumetric oxygen transfer coefficient with cell growth and protease production.**  
(● dry cell weight, ■ maximum protease activity, ▲ maximum specific protease activity)

이 균체생산과 단백질 분해효소 생산에 미치는 영향에 대해 *B. licheniformis*를 이용한 serine계열의 alkaline 단백질 분해효소 생산에 있어서 유사한 결과가 보고되었는데 임펠러 회전속도를 각각 150, 500, 750min<sup>-1</sup>로 할 경우 750min<sup>-1</sup>에서 기질소모속도, 500min<sup>-1</sup>에서 단백질 분해효소의 역가가 최대를 보였다[3].

**Humic acid의 영향**

Humic acid는 토양의 현탁액에서 상정액을 취해 분말화한 것으로 토양의 성질을 개선하는데 이용되어진다. 또한 비료의 영향을 개선시키고 살충제의 역가를 증가시키며 영양분의 흡수를 원활하게 해주어, 식물뿌리에서 미네랄을 교환하고 유지하는 기능을 보완해주고 토양 유래 미생물의 세포성장과 product 생성에 많은 영향을 준다고 알려져 있다. Humic acid의 단백질 분해 효소 생산에 미치는 영향을 살펴보기 위해서 각각 0~300 mg/L의 humic acid를 LB배지에 첨가하고 탄소원으로 수용성 전분 10 g/L를 이용한 회분식 배양을 하였다(Table 2). 균체 농도는 200 mg/L의 humic acid를 첨가한 것이 가장 큰 값(4.58 g/L)을 보였으나 50~300 mg/L에서 거의 유사한 값을 얻었고 단백질분해효소의 역가를 비교하면 100 mg/L에서 가장 큰 역가를 보여

**Table 2. Effects of humic acid on cell growth and protease production by *Thermoactinomyces* sp. E79 grown in LB medium with 10 g/L of soluble starch at 50°C, 200 rpm**

Concentration (mg/L)	Dry cell weight (g/L)	Protease activity (U/mL)
0	2.59	17.1
50	3.63	22.6
100	3.67	28.0
200	4.58	20.8
300	4.08	22.1

28 U/mL를 얻었다. 이 결과는 humic acid를 첨가하지 않은 LB배지에서 배양한 결과에 비해 최대 균체농도, 효소역가가 각각 1.77배, 1.64배 증가한 것이다.

이와 같이 pH와 탄소원, 질소원, 산소전달속도, humic acid 등의 첨가와 같은 배지 최적화 결과를 이용하여 *Thermoactinomyces* sp. E79 유래의 내열성 alkaline 단백질 분해효소의 산업적 생산을 위한 유가식 배양을 계획하고 있다.

## 요 약

두업에서 분리한 *Thermoactinomyces* sp. E79는 탈지 대두박(defatted soybean meal)을 특이적으로 분해하는 내열성 alkaline 단백질 분해효소를 생산한다. 이 효소를 생산하기 위한 환경인자를 조사하였는데 배지의 초기 pH가 6에서 8까지는 유사한 균체농도를 얻을 수 있었고 pH10에서는 단백질분해효소의 발현이 되지 않았다. 탄소원은 수용성 전분을 이용할 경우 최적의 값을 보여 9.2 U/mL의 효소역가를 얻었고 포도당을 탄소원으로 사용한 경우 단백질 분해효소의 발현이 억제되었다. 최적의 효소발현을 위해 tryptone을 세포성장에 soytone을 단백질 분해효소 생산에 가장 적합한 질소원으로 선택하였다. 호기성 세균인 *Thermoactinomyces* sp. E79의 산소요구성을 알아보기 위해 산소전달속도를 달리하여 발효인자를 결정하였고 volumetric oxygen transfer coefficient가  $1.93 \times 10^2 \text{ hr}^{-1}$  일 때 균체농도 6.58 g/L, 효소역가 43.0 U/mL의 최대값을 보였다. 또한 효소역가를 증강시키기 위해 200 mg/L의 humic acid를 첨가한 경우 비첨가 대조구에 비해 단백질 분해효소 역가는 1.64배, 세포성장은 1.77배 증가하였다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술부의 선도기술과제와 교육부의 BK21 프로그램의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

## REFERENCES

- Akamaru, K., T. Yagi, and S. Yamamoto. 1991. Purification and properties of *Bacillus coagulans* cyclomalto-dextrin glucanotransferase. *J. Ferment. Bioeng.* **71**: 322-328.
- Brömer, D. and R. Kleine. 1984. Use of microbial peptide inhibitors for characterization of the substrate specificity of thermitase, a thermostable serine protease from *Thermoactinomyces vulgaris*. *Current Microbiol.* **11**: 317-320.
- Calík, P., G. Calík, and T.H. Özdamar. 1998. Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis*: use of citric acid as the carbon source. *Enzyme Microb Technol.* **23**: 451-461.
- Ferrero, M.A., G.R. Castro, C.M. Abate, M.D. Baigori, and F. Sineriz. 1996. Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: Isolation, production, and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 327-332.
- Fuziwara, N., A. Masui, and T. Imanaka. 1993. Purification and properties of the highly thermostable alkaline protease from an alkalophilic and thermophilic *Bacillus* sp. *J. Biotechnol.* **30**: 245-256.
- Godfrey, T. and J. R. Reichelt. 1983. *Industrial enzymology*, Nature Press, USA pp. 1-7.
- Lee, J.K., Y.O. Kim, H.K. Kim, Y.S. Park, and T.K. Oh. 1996. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from *Thermoactinomyces* sp. E79 and the DNA sequence of the encoding gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**: 840-846.
- Masui, A., N. Fujiwara, and T. Imanaka. 1994. Stabilization and rational design of serine protease AprM under highly alkaline and high-temperature conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3579-3584.
- Moon, S.H. and S.J. Parulekar. 1991. A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 467-483.
- Shalini, S. and T. Satyanarayana. 1993. Optimization of alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis* S-40. *Indian J. Microbiol.* **33**: 43-47.
- Takami, H., T. Akiba, and K. Horikoshi. 1992. Substrate specificity of thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH101. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 333-334.
- Takami, H., T. Akiba, and K. Horikoshi, 1990. Characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 519-523.
- Tsuchiya, K., Y. Nakamura, H. Sakashita, and T. Kimura. 1991. Production of thermostable alkaline protease by alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 3125-3127.
- Tsuchiya, K., Y. Nakamura, H. Sakachita, and T. Kimura, 1992. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**: 246-250.
- Yun, S.W., K.P. Lee, J.H. Yu, C.S. Shin, and D.H. Oh. 1989. Purification and properties of alkaline protease from *Streptomyces* sp. YSA-130. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 358-364.

(Received May 16, 2000)