

Neutral Protease를 생산하는 *Bacillus* sp. DS-1 균주의 분리와 효소 생산성

전대식 · 강대경¹ · 김하근*

배재대학교 생명과학부, ¹이지바이오시스템 생물자원연구소

Isolation and Enzyme Production of a Neutral Protease-Producing Strain, *Bacillus* sp. DS-1. Dae-Sik Chun, Dae-Kyung Kang¹, and Ha-Kun Kim*. Division of Life Science and BioMed RRC, Pai Chai University, Daejeon 302-735, Korea, ¹Easy Bio System Inc., Chungnam 330-820, Korea – A bacterium producing the neutral protease was isolated from soil, and was identified as *Bacillus* sp. DS-1 by 16S rRNA sequence comparison and biochemical determinations. The production of protease from *Bacillus* sp. DS-1 was increased 20% and 30% by the additions of 1% glucose and 1% yeast extract, respectively. The optimum pH and temperature for the protease activity were pH 7.0 and 55°C. *Bacillus* sp. DS-1 produced a metalloprotease as a major protease in culture medium, since the protease activity in culture supernatant was inhibited by the presence of 1 mM EDTA significantly.

Key Words: *Bacillus*, 16S rRNA, neutral protease production, EDTA inhibition

단백질 가수분해과정을 활성화하는 protease는 전 세계에서 판매되고 있는 효소 시장 중 약 60%를 점유하고 있는 산업적으로 매우 중요한 효소이다 [9]. 산업적으로 protease는 세제산업과 식품공업 뿐 아니라 피혁산업, 환경 정화, 제약 산업 등 여러 분야에서 응용되고 있다 [9]. 생명체가 살아가기 위해서는 protease가 반드시 필요하므로 식물, 동물, 미생물 등에서 다양하게 존재하고, 이들로부터 기원한 여러 종류의 protease가 산업적으로 이용되고 있다. 식물로부터 유래한 protease는 papain, bromelain, keratinase 등이 있고, 동물로부터 유래한 protease는 trypsin, chymotrypsin, pepsin, rennin 등이 있다. 식물과 동물로부터 유래한 protease는 다양한 산업적 수요를 충족하기에 공급이 제한되어 있으므로, 미생물로부터 산업적으로 유용한 protease를 생산하기 위해 많은 노력을 기울이고 있다. 실제 미생물로부터 유래한 protease가 전 세계 효소 시장의 40%를 점하고 있다[3].

세균으로부터 유래한 protease는 *Bacillus* 속으로부터 주로 neutral protease와 alkaline protease가 상업적 응용 목적으로 생산된다. 세균으로부터 유래한 neutral protease는 일반적으로 작용 pH 범위가 좁으며(pH 5.0~8.0), 낮은 열 안정성을 갖고있다. 그러나, 세균으로부터 유래한 neutral protease는 동물에서 유래한 것 보다 단백질을 분해할 때 쓴 맛이 적고, 열 안정성이 낮기 때문에 효소 반응을 컨트롤하기가 용이한 장점이 있으므로 식품산업에서 유용하게 사용된다. 세균으로부터 유래한 alkaline protease는 알칼리 조건

에서 작용하고 기질 특이성이 높은 편이며 비교적 고온에서 작용하는 특성 때문에 세제산업에서 주로 이용된다[9]. *Bacillus* 속 이외에도 *Mucor pusillans*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus* sp. 등의 곰팡이로부터 유래한 protease 들도 chymosin 대용효소 혹은 조미액 제조용 단백질 분해 효소로서 식품산업에 이용되고있다 [6].

Protease는 효소의 작용부위에 따라서 폴리펩티드 사슬의 말단 부위에서 작용하는 exopeptidase와 N-말단과 C-말단으로부터 떨어진 폴리펩티드 내의 펩티드 결합에 작용하는 endopeptidase 로 분류된다. 또한, 효소의 활성부위에서 작용하는 기능기에 따라서 serine protease, aspartic protease, cystein protease, metalloprotease 등으로 구분된다[4].

산업적으로 경제성이 높은 protease를 생산하기 위해 과량으로 효소를 분비하는 균주를 자연계로부터 새로 탐색하거나 혹은 protease 생산 균주의 발효조건을 최적화하는 등의 접근 방법을 사용하여왔다[6,7]. 본 연구에서는 탈지분유가 함유된 평판배지에서 탈지분유 분해능을 보이는 균주를 토양으로부터 탐색하여 protease 활성이 높은 균주를 분리하여 16S rRNA의 염기서열 분석과 생화학적 특성 등을 조사하여 *Bacillus* sp.로 동정하였다. 또한, 분리 균주인 *Bacillus* sp. 세포 외로 분비되는 protease의 주된 활성은 중성 pH에서 높은 활성을 보이는 neutral protease로 확인하였고, 더불어서 배지 조성 성분에 의해 *Bacillus* sp.가 생산하는 protease 생산성에 미치는 영향을 조사하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

Protease 생산 균주의 분리 및 배양

자연계에서 protease를 생산하는 미생물을 분리하기 위해

*Corresponding author

Tel: 82-42-520-5389, Fax: 82-42-520-5385

E-mail: hakun@mail.paichai.ac.kr

토양시료 1 g을 증류수 10 ml에 현탁하고 그 현탁액 적당량을 2%의 탈지분유를 첨가한 LB 평판 배지(bacto-tryptone, 0 g; yeast extract, 5 g; NaCl, 10 g; skim milk, 20 g; Bacto-agar 15 g per liter, pH 7.0)에 도말하여 37°C에서 배양하였다. 평판 배지에서 세균에 의해 탈지분유가 분해되어 콜로니 주위에 투명 환을 형성하는 protease 분비균을 선별하였다. 분리된 균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 기술되어 있는 *Bacillus subtilis*의 형태적, 생화학적 특성들을 참조하여 수행하였다[2]. 또한 분리 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 조사하였다. 분리 균주의 배양조건을 검토하기 위한 배지는 LB broth를 기본 배지로 사용하였고, 필요 시 탄소원을 따로 멸균하여 첨가하였다. 균주의 생육은 분광광도계(Shimadzu, UV-2401PC)로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 조사하였다.

Protease 활성 측정

분리 균주가 생산하는 protease 효소 활성에 미치는 pH 및 온도의 영향을 알아보기 위해 LB 액체배지 100 ml에 전 배양액 1%를 접종하여 250 rpm으로 37°C에서 12시간 배양하였다. 효소활성 측정을 위해 배양액을 5,000×g로 원심 분리하여 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 효소활성 측정은 1%의 azocasein 기질용액(0.1 M 인산완충용액, pH 7.0) 450 µl에 활성 측정에 알맞은 정도로 희석된 조효소액 50 µl를 넣고 섞어준 후 50°C에서 30분간 반응시켰다[1]. 반응 후 25%(w/v) trichloroacetic acid 용액 250 µl를 가해 반응을 종료시켰다. 반응 종료 후 15분 동안 반응액을 정지시키고 Eppendorf 원심분리기를 사용하여 10,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여, 그 상등액 600 µl를 취하여 600 µl의 1N NaOH 용액과 섞어 주었다. 효소의 역가 1 unit는 상기 조건에서 1분당 파장 440 nm에서 흡광도 0.01을 증가시키는데 필요한 효소 양으로 하였다.

16S rRNA 유전자 염기서열 분석

분리균의 16S rRNA 유전자 단편을 PCR 반응으로 증폭하려고 세균의 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열을 primer로 합성하였다(9F, 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG; 926R, 5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGR TT). PCR 반응에 사용할 주형 DNA는 평판배지에서 형성한 콜로니를 이쑤시개로 취하여 균체를 직접 PCR 반응 튜브에 넣어 사용하였다. PCR 반응은 10 mM Tris(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP로 구성된 반응물 100 µl에 50 pmol primers와 Taq DNA polymerase 5U를 사용하여 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 2분으로 이루어진 과정을 30번 반복함으로써 16S rRNA의 유전자를 증폭하였다. PCR 반응물을 전기영동 하여 증폭된 DNA 단편을 QIAEXII gel extraction kit로 회수하였고 이를 주형으로 하여 PCR 반응에 이용한 primer들과 함께

DNA 염기서열 결정에 사용하였다.

결과 및 고찰

Protease 생산균주의 분리 및 동정

자연계에서 protease 활성이 우수한 세균을 분리하기 위해, 토양시료를 희석하여 선별배지에 도말하여 탈지분유를 분해할 수 있는 세균을 탐색하였다. 도말한 토양시료 현탁액으로부터 형성된 콜로니들 중 평판배지 제조시 첨가한 탈지분유를 분해하여 콜로니 주위에 투명 환을 나타내는 균주를 선별하였다. 분리한 세균의 동정을 위해 16S rRNA 유전자의 일부분을 PCR 반응으로 증폭하여 DNA 염기서열을 결정하였다(Fig. 1). 분리균의 16S rRNA 염기서열의 일부분을 NCBI의 BLAST 프로그램을 사용하여 상동성을 조사하여 본 결과 *Bacillus* 속에서 보고된 염기서열과 높은 상동성을 보였다. 비교한 806개의 염기 중 802개가 *Bacillus subtilis*와 일치하여 99.5%의 상동성을 보였고, 이밖에 *Bacillus amyloliquifaciens*, *Bacillus licheniformis* 등과는 각각 798개의 염기가 일치하여 99.0%의 상동성을 보였다(data not shown). 분리 균주는 그람양성이었고, catalase, Voges-Proskauer, citrate 이용 능력, pH 5.7의 Sabouraud dextrose agar에서의 성장 등에서 양성 반응을 나타냈다. 또한 API 50 CHB kit를 이용하여 당 분해 능을 조사한 결과 glycerol, L-arabinose, ribose, D-xylose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, inositol, mannitol, sorbitol, N-acetylglucosamine, esculine, salicine, cellobiose, maltose, lactose, sucrose, trehalose, inuline, D-raffinose, starch 등을 이용할 수 있었으며, 이 결과는 *Bacillus subtilis*의 특성과 매우 유사하였고 따라서 분리 균주는 *Bacillus* sp. DS-1으로 동정되었다[2].

배양시간에 따른 균체의 성장 및 효소 생산량 변화

Bacillus sp. DS-1을 진탕 배양하였을 때 배양시간별 균체 성장과 이에 따라 합성된 protease 활성을 조사하였다(Fig. 2). 전 배양액 1%를 LB 배지에 접종하여 37°C에서 진탕 배

```

1  cttgctccct gtagttagc ggcggacggg tgaiaaac gtggtaacc tgcctgaag
61  actgggataa ctccgggaaa ccggggctaa tacgggatgg ttgtltgaac cgcaltgttc
121 agacataaaa ggtggcttcg gctaccactt acagatggac ccgcccgcga ttagctagtt
181 ggtgaggtaa cggctcacca aggcagcat gctagccga cctgagaggg tgatcgcca
241 cactgggact gagacacggc ccagactcct acgggagga cagatagga atcttcgca
301 atggacgaaa gctgacgga gcaacggcgc gtagatgag aaggttttcg gatcgtaaag
361 ctctgttgtt agggagaac aagtgccgtt caaatagggc ggcacttga cggtaacata
421 ccagaaagcc accgctaact acgtgccagc agcccgggtt aatacgtagg tggcaagctt
481 tgtccggaat tattgggctt aaaggccttc gcagggcgtt tcttaagtct gatglgaaag
541 cccccggctc aaccggggag ggtcattgga aactggggaa ctgactgca gaagaggaga
601 gtggaattcc acgtgtagcg gtagaatgcg tagatgtg gaggaacacc agtggcgaag
661 ggcactctct ggtctgtaac tgacgtgag gagcgaagc gtcgggagcg aaccagatta
721 gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gagtctaaag tgttaggggg ttccgcccc
781 ttagtctgc agctaacgca ttaagc

```

Fig. 1. Nucleotide sequence of the partially amplified 16S rRNA gene from *Bacillus* sp. DS-1 by PCR.

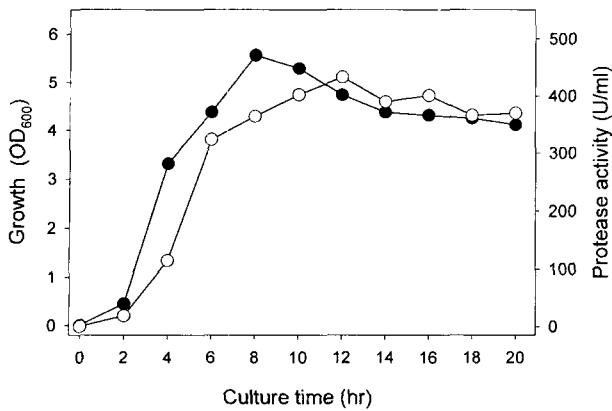


Fig. 2. Growth and protease production of *Bacillus* sp. DS-1. *Bacillus* sp. DS-1 was cultured in LB broth at 37°C with vigorously shaking. The cell growth (closed circles) was determined by measuring the optical density at 600 nm. The protease activities (open circles) were determined with the culture supernatant.

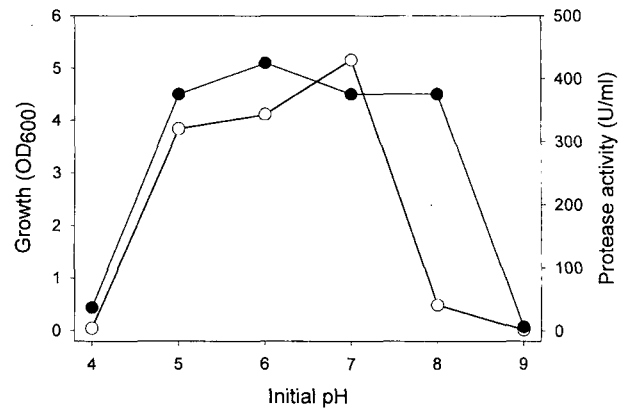


Fig. 3. Effect of initial medium pH on the cell growth and protease activity of *Bacillus* sp. DS-1. *Bacillus* sp. DS-1 was cultured in LB broth adjusted in various pH at 37°C with vigorously shaking for 12 hrs. Closed circles (●) represent the cell growth and open circles (○) represent the protease activities.

양하면서 일정 시간별로 미생물을 취하여 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 미생물의 성장을 관찰하였고, 배양상등액의 protease 활성을 측정하여 효소활성의 변화를 조사하였다. 균체의 생육은 배양 2시간부터 신속히 이루어지며 배양 8시간에서 OD₆₀₀ = 5.5에 이르는 최대 흡광도를 나타내고 10시간부터는 흡광도가 감소하기 시작하였다. 그러나, *Bacillus* sp. DS가 생산하는 protease의 활성은 계속 증가하여 대수성장기가 끝나고 정지기에 이르는 시점인 12시간에서 430U/ml로 최대를 나타내고 이후 점차적으로 감소하였다.

배지 pH에 의한 균체 성장 및 효소 생산성

배지의 초기 pH가 *Bacillus* sp. DS-1의 성장과 효소 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. LB액체 배지의 초기 pH를 4.0~9.0으로 제조한 후 전 배양액 1%를 접종하고 37°C에서 12시간 진탕 배양 후 흡광도를 이용하여 세포의 성장과 이에 따라 생산된 효소활성을 측정하였다(Fig. 3). 배양액의 초기 pH가 5.0~8.0까지는 *Bacillus* sp. DS-1의 성장이 양호하여 12시간 진탕 배양하였을 때 600 nm에서의 흡광도는 큰 차이를 보이지 않았다. 초기 pH를 4.0과 9.0으로 조정된 배지에서는 *Bacillus* sp. DS-1의 성장이 거의 일어나지 못하였다. 효소 생산은 pH 7.0인 배지에서 배양하였을 때 최대치를 보였고 pH 8.0인 배지에서는 성장이 양호하게 이루어졌음에도 효소 생산이 저하됨을 보였다. 배양액의 초기 pH를 5.0~8.0사이로 조정된 배지에서 12시간 성장한 후 배지의 pH는 초기보다 상승하여 전체적으로 pH 8.0 부근의 유사한 값을 나타내었다. 그러나, 초기 pH를 4.0과 9.0으로 조정된 배지에서는 성장이 거의 일어나지 않아 배양 12시간 후의 pH는 각각 4.2와 9.1로 측정되었다. 이 결과로부터 분리 균주 *Bacillus* sp. DS-1은 초기 배지 pH가 중성에서 효율적으로 성장이 일어난다는 것을 알 수 있고, Bergey's Manual of

Systematic Bacteriology에 기술되어 있는 *Bacillus subtilis*의 특성 중 pH 5.5~8.5 사이에서 활발히 성장이 이루어진다는 점과 유사하다[2].

탄소원에 따른 protease 생산성

Bacillus sp. DS-1이 성장하는 동안 탄소원이 protease 생산성에 미치는 영향을 조사하기 위해 LB 액체배지에 glucose, mannose, mannitol, lactose, sucrose, maltose 등을 1%(w/v) 농도가 되도록 따로 멸균하여 첨가하였다. *Bacillus* sp. DS-1 전 배양액을 1% 접종하여 37°C에서 12시간 진탕 배양하여 세포의 성장과 이에 따라 생산된 효소 활성을 측정하였다(Table 1). 단당류와 이당류를 첨가한 배지들은 미생물에 의해 쉽게 대사 되어 당을 첨가하지 않은 대조구보다 대체로 좋은 성장을 보였다. 이당류의 경우 maltose를 넣었을 때 protease 생산량이 대조구와 비교하여 18% 증가하였다. PTS-dependent 당인 glucose, mannose, mannitol 등의 단당류를 첨가하였을 때 glucose를 첨가한 배지에서 약 20% 효소 생산이 증가되었고, mannose는 대조구와 유사한 효소 활성을 보였다. 그러나 mannitol을 첨가한 배지에서는 대조구와 비교하여 균체 성장은 양호하였으나 효소 활성이 대조구의 42%에 불과하여 protease 생산이 mannitol에 의해 catabolite repression을 받는 것으로 판단된다.

질소원에 따른 protease 생산성

Bacillus sp. DS-1의 protease 생산성에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위해 LB 액체배지에서 질소원인 tryptone을 제거하고 유기질소원으로 peptone, yeast extract, beef extract, casamino acid를, 무기질소원으로는 NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl을 각각 1% 농도로 넣어주어 배지를 제조하였다. *Bacillus* sp. DS-1 전 배양액을 1% 접종 후 37°C에서 12시

간 배양하여 600 nm에서 흡광도를 측정함으로써 질소원이 다른 배지에서 성장한 균체의 성장 정도를 비교하였고, 배양상등액을 이용하여 효소 활성을 측정하였다(Table 2). 유기질소원인 peptone, yeast extract, beef extract, casamino acid 등을 첨가하였을 때 yeast extract를 제외하고 모두 균체의 성장이 대조구인 tryptone에 비해 저하하였다. 그러나 protease의 활성은 peptone을 제외하고는 모두 대조구와 유사하거나 약 10% 향상된 값을 보였다. 특히, yeast extract를 질소원으로 하였을 때 효소 활성은 대조구와 비교하여 약 30% 증가함을 보였다. 또한 casein의 산 가수분해산물인 casamino acid를 첨가한 배지에서 배양하였을 때 상등액의 protease 활성이 대조구와 비교하여 저하되지 않고 오히려 활성이 더 높은 것으로 보아 *Bacillus* sp. DS-1은 단백질 분해 산물에 의해 protease의 생산이 repression되지 않음을 시사한다. 이와는 대조적으로, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl 등 무기질소원을 공급한 배지에서 성장한 세포는 OD₆₀₀ = 0.96~1.77에 그쳤고, protease 생산도 대조구의 55.2~72.6%에 불과하였다.

***Bacillus* sp. DS-1이 생산하는 protease 효소의 특성**

효소가 작용하는데 있어서 최적온도를 조사하였다. 효소 반응액을 25°C부터 65°C의 다른 온도에서 반응시켰을 때 55°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 4). *Bacillus* sp. DS-1이 생산하는 protease 효소 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해 pH 4.0에서 10.0까지의 완충용액을 이용하여

Table 1. Effects of various carbon sources on the cell growth and the protease production.

Carbon sources	Cell growth (OD ₆₀₀)	Protease activity (U/ml)
none	4.6	433.0
glucose	11.9	523.2
mannitol	7.6	183.4
mannose	6.7	469.7
sucrose	10.2	357.8
maltose	6.3	514.2
lactose	6.7	492.5

Table 2. Effects of various nitrogen sources on the cell growth and the protease production.

Nitrogen sources	Cell growth (OD ₆₀₀)	Protease activity (U/ml)
tryptone	4.60	433.0
yeast extract	4.85	567.8
peptone	2.94	392.9
casamino acid	2.97	476.6
beef extract	2.60	474.8
NaNO ₃	0.96	253.7
NH ₄ Cl	1.76	238.9
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.77	314.2

효소 활성을 측정하였다(Fig. 5). 효소활성은 pH 7.0의 중성에서 가장 높은 효소활성을 나타내었다.

또한 배양상등액을 이용하여 protease inhibitor에 의해 영향을 받는 정도를 조사하였다(Table 3). *Bacillus* sp. DS-1이 생산하는 protease 효소 활성은 효소 반응액에 serine protease 저해제인 PMSF가 1 mM 존재할 때 대조구와 비교하여 약

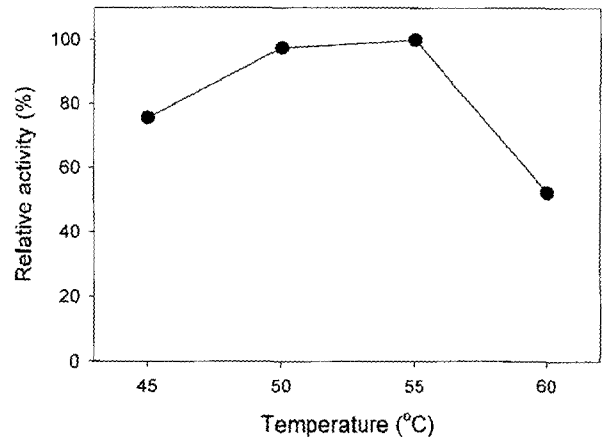


Fig. 4. Effect of reaction temperature on the protease activity.

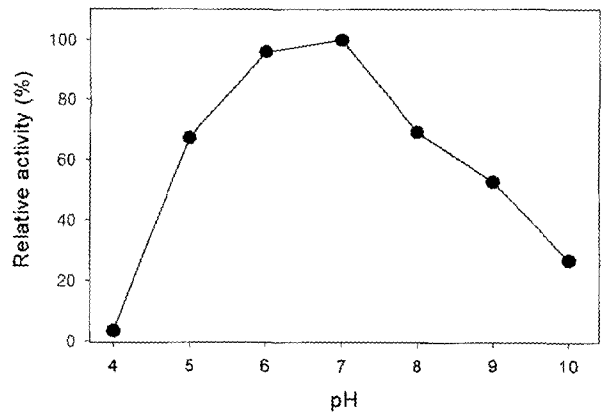


Fig. 5. Effect of pH on the protease activity. The reaction was carried out at 50°C using various buffers to determine the optimum pH for the enzyme reaction. The following buffer systems were used : pH 4.0 to 6.0, 50 mM citrate; pH 6.0 to 8.0, 50 mM sodium phosphate; pH 8.0 to 10.0, 50 mM glycine.

Table 3. Inhibition of protease activity by protease inhibitors

Inhibitors	Conc. (mM)	Remaining protease activity (%)
None		100.0
EDTA	1	16.0
	5	12.5
	10	12.5
PMSF	1	72.7
	5	68.0
	10	57.8

27% 활성이 감소하였고, PMSF를 10 mM 처리하였을 때 대조구에 비해 약 42%의 활성이 감소하였다. 그러나 금속이온과 결합하는 EDTA에 의해서는 PMSF보다 저해효과가 더욱 명확하게 나타나서, EDTA가 1 mM 존재할 때부터 84% 이상의 활성이 저해되는 현상을 나타내었다. McConn 등에 의하면 *Bacillus*의 neutral protease는 활성을 위해 Zn 이온을 필요로 하고, EDTA를 0.5 mM 넣어주면 효소가 불활성화 된다고 보고하였다[8]. 여러 그룹에 의해 *Bacillus subtilis*로부터 protease를 코딩하는 유전자들이 클로닝되어 이들의 발현과정이 보고되어 있다[10-12,15-17]. *Bacillus subtilis*는 대수성장기 말에 neutral protease A[17], subtilisin (alkaline protease)[10], extracellular protease[15], metalloprotease[11], bacillopeptidase F[12,16] 등을 포함하여 적어도 5 종류의 protease를 생산한다고 알려져 있다[13]. 이들 중 subtilisin과 neutral protease가 배지로 분비되는 주요 protease이고 *Bacillus subtilis*가 분비하는 전체 protease 활성의 20%와 70%를 각각 차지한다고 보고되어 있다[5,10,17]. 따라서 10 mM의 EDTA 존재 하에서도 배양상등액의 protease 활성이 12.5% 남아 있는 것은 본 연구에서 사용한 효소가 정제된 것이 아니고, *Bacillus* sp. DS-1의 배양상등액을 조효소원으로 사용하였기 때문인 것으로 판단된다. 이 결과로 보아 본 실험 조건에서 *Bacillus* sp. DS-1은 중성 pH에서 최적활성을 보이는 neutral protease이면서 활성에 금속이온을 필요로 하는 metalloprotease를 주로 생산함을 알 수 있다.

요 약

토양으로부터 protease 활성이 우수한 균주를 선별하여 형태학적, 생화학적 동정과정 및 16 rRNA 염기서열 분석 등의 방법을 이용하여 *Bacillus* sp. DS-1으로 동정하였다. *Bacillus* sp. DS-1은 초기 배지의 pH가 7.0인 조건에서 정지기에서 가장 높은 활성을 나타내었다. *Bacillus* sp. DS-1으로부터 protease를 생산하기 위해 탄소원으로는 1% glucose, 질소원으로는 1% yeast extract를 첨가할 때 대조구와 비교하여 각각 20%와 30% 더 효과적인 것으로 나타났다. *Bacillus* sp. DS-1이 생산하는 protease의 최적활성은 55°C와 pH 7.0이었다. 1 mM의 EDTA 첨가에 의해 protease 활성이 84% 실패 되었고 이 결과로부터 *Bacillus* sp. DS-1의 상등액에 존재하는 주된 protease 활성은 metalloprotease임을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 배재대 지역협력연구센터(Bio-Med RRC, Pai Chai University) 과제로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Charney, J. and Tomarelli, R. M. 1947. A colourimetric method for the determination of proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chem.* **171**: 501-505.
2. Claus, D. and R. C. W. Berkeley 1986. Genus *Bacillus*, pp. 1105-1139. In Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore.
3. Godfrey, T. and S. West. 1996. *Industrial enzymology*, pp.3. 2nd ed. Macmillian Publishers Inc., New York, N.Y., U.S.A.
4. Hartley, B. S. 1960. Proteolytic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **29**: 45-72.
5. Kawamura, F. and R. H. Doi. 1984. Construction of *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral protease. *J. Bacteriol.* **160**: 442-444.
6. Kim, D.S., H. R. Kim, T. J. Nam, and J. H. Pyeun. 1999. Medium Composition of *Aspergillus oryzae* PF for the Production of Proteolytic Enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 404-409.
7. Kim, H. R. and P. S. O. 1991. Isolation of neutral Protease Hyperproducing *Bacillus* sp. KN103N and Some Properties of the Enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 116-121.
8. McConn, J. D., D. Tsura, and K. T. Yasunobu. 1964. *Bacillus subtilis* neutral protease. *J. Biol. Chem.* **239**: 3706-3709.
9. Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge, and V. V. Deshpande. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Protease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 597-635.
10. Stahl, M. L. and E. Ferrari. 1984 Replacement of the *Bacillus subtilis* subtilisin structural gene with an *in vitro*-derived deletion mutation. *J. Bacteriol.* **158**: 411-418.
11. Sloma, A., A. Ally, D. Ally, and J. Pero. 1988. Gene encoding a minor extracellular protease in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **170**: 5557-5563.
12. Sloma, A., G. A. Rufo Jr., C. F., Rudolph, B. J. Sullivan, K. A. Theriault, and J. Pero. 1990. Bacillopeptidase F of *Bacillus subtilis*: purification of the protein and the cloning of the gene. *J. Bacteriol.* **172**: 1470-1477.
13. Tran, L. and S. -L. Wong. 1991. Cloning and expression of a novel protease gene encoding an extracellular neutral protease from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **173**: 6364-6372.
14. Tsura, D., K. Heizokira, and T. Yammamoto. 1966. Studies on bacterial proteinase part 16. Purification, crystallization, and some enzymatic properties of alkaline protease of *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*. *Agr. Biol. Chem.* **30**: 1261-1268.
15. Wong, S.-L., C. W. Price, D. S. Goldfarb, and R. H. Doi. 1984. The subtilisin E gene of *Bacillus subtilis* is transcribed from a σ^{37} promoter *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1184-1188.
16. Wu, X.-C., S. Nathoo, A. S. -H. Pang, T. Carne, and S. -L. Wong. 1990. Cloning, genetic organization, and characterization of a structural gene encoding bacillopeptidase F from

Bacillus subtilis. *J. Biol. Chem.* **265**: 6845-6850.

7. Yang, M. Y., E. Ferrari, and D. J. Henner. 1984. Cloning of the neutral protease gene of *Bacillus subtilis* and the use of

the cloned gene to create an *in vitro*-derived deletion mutation. *J. Bacteriol.* **160**: 15-21.

(Received Aug. 2, 2002/Accepted Oct. 14, 2002)