

Bacillus sp. DF2180이 생산하는 내열성 단백질 분해효소

이정희 · 배동훈*
단국대학교 식품공학과

A Thermostable Protease Produced from *Bacillus* sp. DF 218

Joung-Hee Lee and Dong-Hoon Bai*
Department of Food Engineering, Dankook University

Microorganism (strain DF 218) producing thermostable protease was isolated from Korean soil and compost. It was Gram-positive, rod-shaped, aerobic, and spore-forming with yellowish white colony color. Temperature range for growth at pH 6.5 was 30-65°C, with optimum growth at 60°C. pH range for growth at 60°C was 5-7 with optimum of 6.5, which indicates strain DF 218 to be thermophilic. The 16S rDNA sequence of strain DF 218 had 95% sequence similarity with that of *Bacillus flexus*. Based on physiological properties and phylogenetic analysis, we proposed the isolated strain as *Bacillus* sp. DF 218. Protease was produced aerobically at 60°C for 32 hr in a medium (pH 6.5) containing 1% each trypton, glucose, and NaCl. Its molecular weight was estimated as 61 kDa, with optimum temperature and pH of 60°C and 7.5, respectively.

Key words: thermostable microorganism, protease

서 론

현대 산업사회가 발달함에 따라 단백질 분해효소, 전분 분해효소와 같은 각종 효소의 공업에의 이용도가 급격히 증가하고 있다. 단백질 분해 효소는 조미료 제조, 식육의 연화, 맥주, 청주의 혼탁방지, 치즈 숙성 등의 식품공업과, 소화제 소염진통제 등 제약공업, 세제공업, 피혁가공공업 및 환경공업 등에 다용도로 응용되고 있으며, 그 시장규모가 효소 전체 시장의 60%를 차지하고 있다. 이와 같이 광범위하게 이용되고 있는 단백질 분해효소는 Peckman(1)과 Crewth(2)가 최초로 *Aspergillus*속에서 분리한 이후 그 기능과 활성 면에서 Massaki 등(3)에 의해 serine protease, thiol protease, metal protease 등으로 분류되었으며 Kageyma(4)와 Nunokwa(5) 등은 그 작용 pH의 영향에 따라 acid protease, neutral protease 및 alkaline protease로 분류하였다. 1971년에 *Bacillus* sp.로부터 알칼리성 단백질 분해효소(6)가 발견된 후부터 대부분의 연구진들은 세제, 연육가공, 탈모공정 등에 있어 단백질 분해효소의 탁월한 유용성(7) 때문에 활성이 높고, 안정된 성질을 갖는 새로운 균주 선별에 많은 노력(8-10)을 기울여왔다.

최근 들어 고온 내산성 또는 호알칼리성 성질을 지닌 단백질 분해효소에 관한 연구들이 많이 진행되고 있다. 그 중에서 고온성 균주가 생산하는 내열성 단백질 분해효소에 관한 연

구(11)에 따르면 이들은 식품가공과정에서 손쉽게 얻을 수 있는 탈지 대두박으로부터 고가의 정미성분을 만들어내고자 토양으로부터 물에 대한 용해도가 낮은 탈지 대두박을 잘 분해하는 단백질 가수분해 효소를 생산하는 미생물을 탐색하였고 그 결과 탐색된 고온성 *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4이 생산하는 내열성 단백질 분해효소를 분리 정제하고 효소의 생화학적 특성을 조사하였다. 내열성 단백질분해효소의 다른 예(12)를 보면 단백질 분해효소 활성을 가진 균주인 *Methanococcus jannaschii*는 심해에서 분리한 methane 생산균에서 탐색되었으며 효소활성을 116-130°C에서 갖는다.

본 연구에서는 고온 조건에서 성장하면서 내열성 단백질 분해효소를 생산하는 미생물을 탐색하고 탐색된 세균으로부터 단백질 분해효소 활성이 높은 미생물을 선택한 후 동정하였으며 선별된 균주가 생산하는 효소를 정제하고, 그 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 배지 및 시약

Azocasein은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Screening을 위한 배지로는 skim milk가 1% 포함된 LB agar(Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하였으며 효소 정제를 위한 resin과 단백질 전기영동을 위한 시약은 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

균주 분리 및 선별

내열성 단백질 분해효소 활성 균주를 탐색하기 위하여 전국

*Corresponding author : Dong-Hoon Bai, Department of Food Engineering, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea
Tel: 82-41-550-3562
Fax: 82-41-550-3566
E-mail: baidh@dku.edu

각지로부터 토양과 두엄을 채취해 60°C 이상에서 생육하는 균주들을 분리하였고 다시 이들로부터 60°C 이상의 고온에서 단백질 분해 활성을 보이는 균주들을 선별하였다.

각각의 토양과 두엄 시료를 1g씩 취하여 생리 식염수 10 mL에 현탁하고 이들 상등액 100 µL를 취하여 LB 평판배지에 균일하게 도말하였다. 60°C 배양기에서 1-3일간 배양하여 생육한 균주를 1차로 고온생육 균주로 선정하고 이들 1차로 선별된 균주들을 다시 casein이 현탁된 LB 평판배지에 접종하였다. 이들을 60°C 배양기에서 배양하여 균락 주위에 casein이 분해되어 투명환이 형성된 균주를 protease 활성을 갖는 균주로 2차 선정하였다. 2차 선정된 균주는 다시 LB 액체 배지를 사용하여 60°C에서 1일간 진탕 배양 후, 100 µL의 배양 상등액을 paper disc에 흡수시킨 후 기질인 casein이 현탁된 LB평판배지 위에 올려놓은 다음, 일정 시간 반응 후 disc 주변의 clear zone을 관찰하여 상등액의 단백질 분해 효소활성 유무를 다시 확인하였다.

미생물 동정

생화학적 성질: 균주의 생화학적 특성은 Bergey's manual of systematic bacteriology(13)와 Biochemical tests for identification of medical bacteria(14)에 준하여 시행하였다.

16S rDNA의 염기서열 분석: 16S rDNA를 분석하기 위해 본 연구에 사용하는 균주 DF 218을 LB 배지에 접종하여 60°C, 200 rpm으로 24시간동안 진탕 배양하였다. 배양액을 원심 분리하여 균체를 회수한 후 chromosomal DNA를 lysozyme-sodium dodecyl sulfate-proteinase K(15) 방법으로 분리하였다. 분리된 chromosomal DNA를 template로 사용하여 polymerase chain reaction(PCR)을 실시하였다. PCR에 사용된 primer는 16S rDNA sequencing에 사용하는 universal한 primer [forward primer (Eubacterial 27F): 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3', reverse primer(Universal 1492R): 5'-GGATACCTTGTTACGACTT-3']를 사용하였다. PCR 반응액의 조성은 10 µL template(50 ng/µL), 5 µL 10×reaction buffer(100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 500 µg/mL BSA, pH8.3), 5 µL 1.5 mM MgCl₂, 5 µL deoxynucleoside triphosphates(2.5 mM each), primer 각 1 µL(100 pmol/µL)씩, 22 µL 멸균된 3차 증류수로 총 50 µL로 만들었다. 이 혼합액을 Thermocycler(Perkin-Elmer Co, Norwalk, CT, USA)를 사용하여 증폭하였다. PCR 조건은 94°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분 30초 동안 polymerization시키는 조건으로 30 cycle을 행하였으며 최종적으로 72°C에서 10분간 증폭시켰다. PCR 산물은 0.8% agarose gel에서 크기를 확인하였다. 확인된 1,400 bp의 PCR product는 Bio 101 gene cleaning kit(Bio rad Co., Hercules, CA, USA)사용 정제한 후 Topo vector(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)에 ligation 시킨 후 cloning하였다. 선별된 균주로부터 다시 plasmid DNA를 분리하여 이를 T-vector sequencing primer(M13 forward, M13 reverse)를 이용하여 ALFRed automated sequencer(Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 사용하여 rDNA의 염기서열을 결정하였다. 그 결과는 Blastn프로그램을 이용하여 Gene bank와 RDP(RNA database project)의 염기서열과 비교하여 동정하였다.

효소활성의 측정

단백질 분해효소의 활성은 Beynon과 Bond(16)에 의한 azocasein법을 변형하여 사용하였다(17-19). 효소활성을 측정하기 위해 사용한 기질인 azocasein 2g을 10 mM sodium-phosphate buffer(pH7.5) 100 mL에 현탁한 후 azocasein 기질용액 250 µL

에 조효소액 150 µL를 첨가하여 60°C에서 10분간 반응시켜 azo기를 유리시켰고 진존활성을 실험시키고 반응되지 않은 azocasein을 침전시키기 위하여 20% trichloroacetic acid 600 µL와 혼합해 이를 9,000×g에서 10분간 원심분리 하였다. 이 상등액 중 900 µL를 취해 1 N NaOH 1.4 mL와 혼합하여 이를 440 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소활성도 1 unit은 10분 동안 440 nm에서의 흡광도 0.001을 증가시키는 효소의 양으로 규정하였다.

균체의 생산 및 효소 생산 조건의 검토

배양 시간에 따른 균체의 생육과 효소 생산성을 검토하기 위하여 50 mL의 LB배지에 종배양액 1%를 접종하여 60°C, 200 rpm(Vision Science사, Seoul, Korea)에서 진탕 배양하며 4시간마다 배양액을 취하여 균체의 생육도와 배양 상등액의 효소활성을 측정하였다. 균체 생육에 미치는 배양온도의 영향을 알아보기 위하여 100 mL의 LB 배지에 종배양액을 1% 접종하여 40, 50, 60°C에서 200 rpm으로 배양하며 4시간마다 균체의 생육도를 확인하였다. 균체의 생산에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위한 배지는 각각 sodium phosphate와 tris buffer를 사용하여 pH를 재조정된 LB 배지를 조제하여 사용했다.

단백질 분해효소의 정제

효소단백질의 침전: 효소 생산 균주의 배양액을 원심 분리기(Hanil Supra 22K, Korea)로 8,000×g에서 15분간 원심분리하여 균체를 분리하였다. 균체를 분리한 배양 상등액에 4°C에서 미리 냉각 시켜 놓은 acetone을 75% 용액이 되도록 첨가하고 4°C에서 18시간 동안 방치해 효소 단백질을 침전시켰다. acetone 침전액의 상등액을 조심스럽게 제거하고 침전된 효소 단백질을 4°C로 미리 냉각한 10 mM sodium-phosphate buffer(pH 7.5)에 용해시키고 8,000×g에서 10분간 원심분리하여 불용성 단백질을 제거하였다.

DEAE-sepharose column chromatography: 효소액은 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.5)로 완충시킨 DEAE-sepharose column(Sigma사, St. Louis, MO, USA) (35 mm×150 mm)에 흡착시켰다. 흡착 후 column은 10 mM sodium-phosphate buffer(pH 7.5)로 비흡착 단백질이 용출되지 않을 때까지 세척하였다. 세척 후 column에 흡착된 단백질은 동일 완충액에 용해한 0.5 M NaCl 용액을 사용하여 분당 3 mL의 속도로 농도구배를 이용하여 흡착된 단백질을 용출시켰다.

결과 및 고찰

분리 균주의 선발 및 동정

선발된 균주 중 단백질 분해능이 가장 우수한 DF218을 선별하였다(Fig. 1). 이 선별균주의 동정을 위하여 생화학적 특성을 조사하였으며 16S rDNA 분석을 행하였다. 분리 균주의 형태학적 및 생화학적인 특성을 검토한 결과 그림 양성의 간균 형태(0.7×1.3-2.0 µm)를 가지고 있었으며 포자형성능과 함께 운동성을 지님을 확인 할 수 있었으며 catalase 양성, hemolysis β, glucose의 산화와 발효 특성 등을 보여 대조균주로 사용한 *Bacillus subtilis*와 공통적인 특성을 보였다(Table 1). 그러나 균주의 지방 조성을 gas chromatography를 사용하여 분석한 결과 C15:0_{iso} 50.44%, C17:0_{iso} 14.89%, C17:0_{Anteiso} 13.86%로 나타나 대조균주로 사용한 *B. subtilis*의 C15:0_{iso} 25.4%, C17:0_{iso} 9.68%, C17:0_{Anteiso} 8.87%와는 차이를 보였다(Table 2). 16S rDNA 분석

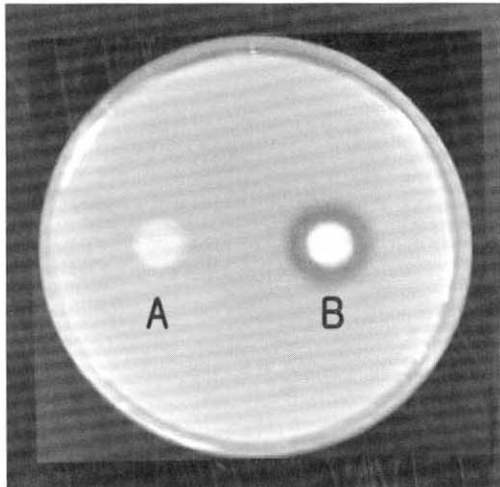


Fig. 1. Formation of digestion clear zone in the LB medium containing 2% casein.

A: Control (*E. coli* JM109), B: Strain DF 218.

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of the strain DF 218

Characteristics	Strain DF 218	
Color of colonies	Yellowish white	
Form	Rods	
Motility	+ ¹⁾	
Gram staining	+	
Spore forming	+	
Catalase	+	
Hemolysis	β	
Growth at 30°C	- ²⁾	
40°C	-	
50°C	+	
60°C	+	
65°C	+	
Oxidation-fermentation	Oxidation	Fermentation
Glucose	+	-
Mannitol	-	-
Arabinose	-	-
Xylose	-	-

¹⁾+: Positive.

²⁾ -: Negative.

결과 *Bacillus flexus*과 16S rDNA sequence가 95% 일치하는 유사성을 보였으나 본 균주는 60°C에서 최적 생육온도를 가지나 *B. flexus*의 경우는 37°C에서 최적 생육온도를 지니며(20) Gene bank data base 상에서 16S rDNA sequence가 일치하는 균주는 검색되지 않았다. 이 같은 실험 결과에 따라 strain DF 218 기준에 발표되지 않은 새로운 균주로 판단되어 *Bacillus* sp. DF 218로 명명하였다(Fig. 2).

균체 생육 및 효소 생산

배양온도를 40-60°C로 각기 달리하여 4시간 간격으로 균체 생육을 측정된 결과 균체 생육은 40°C의 배양온도에서는 균체의 생육이 거의 관찰되지 않았다(Fig. 3). 50°C에서 배양한 결과와 60°C에서 배양한 결과를 비교하여 보면 60°C에서 활발한

Table 2. Cell wall fatty acid composition of the strain DF218

<i>Bacillus</i> sp. DF218		<i>Bacillus subtilis</i>	
Fatty acid	(%)	Fatty acid	(%)
C _{10:0iso}	0.12	C _{14:0iso}	1.20
C _{11:0iso}	0.33	C _{14:0}	0.87
C _{11:0ANTEISO}	0.1	C _{15:0iso}	25.40
C _{14:0iso}	0.6	C _{15:0ANTEISO}	37.41
C _{14:0}	0.83	C _{15:0}	0.20
C _{15:0iso}	50.44	C _{16:0iso}	2.47
C _{15:0ANTEISO}	9.54	C _{16:0}	5.50
C _{16:0iso}	3.61	C _{17:0ANTEISO}	8.87
C _{16:0}	2.95	C _{17:0iso}	9.66
C _{17:0iso}	14.89	C _{18:0}	0.50
C _{17:0ANTEISO}	13.86		
C _{18:0}	0.74		
C _{19:0iso}	0.42		

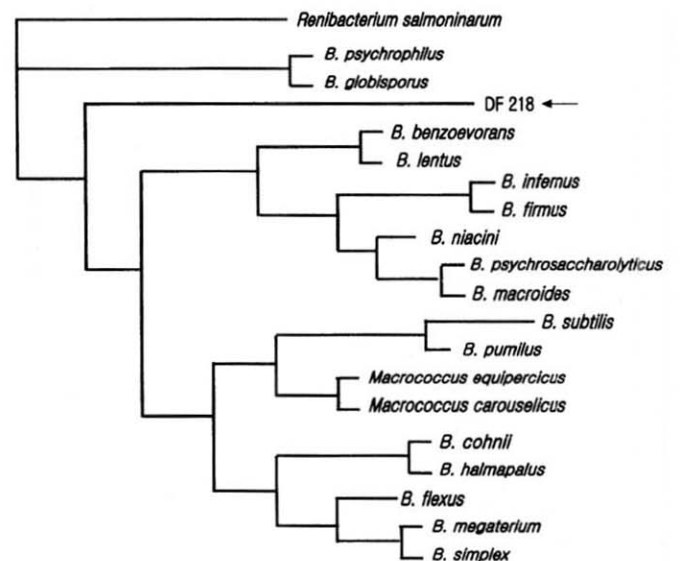


Fig. 2. Dendrogram of the *Bacillus* sp. DF 218 through 16S rDNA gene sequence homology.

생육을 보였으며 50°C에서 배양하였을 경우 대수증식기의 말기에 있어서 최대 균체의 생육정도도 60°C에 비하여 1/2 이하밖에 생육하지 않는 결과를 보였다. 이후 60°C에서 배양시간에 따른 효소의 활성은 12시간 이후부터 증가하기 시작하여 배양 32시간에 최대의 효소생산을 보였으며 그 후 감소하기 시작하여 44시간 이후에는 균체의 사멸이 증가하였으며 배양 상등액에서의 효소활성도 급격히 감소하였다(Fig. 4). 한편으로 60°C 이상에서 균체를 배양하면서 균체의 생육도를 관찰하여본 결과 65°C의 경우는 50°C에서의 배양결과와 비슷한 결과를 보였으나 70°C에서는 72시간 배양에서도 균체의 생육은 이루어지지 않았다. 이러한 결과에 따라 본 미생물은 60°C를 중심으로 약 10°C의 좁은 생육범위에서만 증식을 하는 특징을 가지는 균체임을 알 수 있었다. 배양온도를 60°C로 하고 pH를 달리한 각각의 배양액에서 32시간 배양한 배양액의 균체 생육과 효소 활성을 측정된 결과(Fig. 5) pH 5이상에서부터 생육하여 pH 6.5에서 최대 생육을 보였고 pH 8이상에서는 균체의 생육이 급격히 저하됨을 확인하였고 배양액내의 효소 활성 또한 pH 6.5에

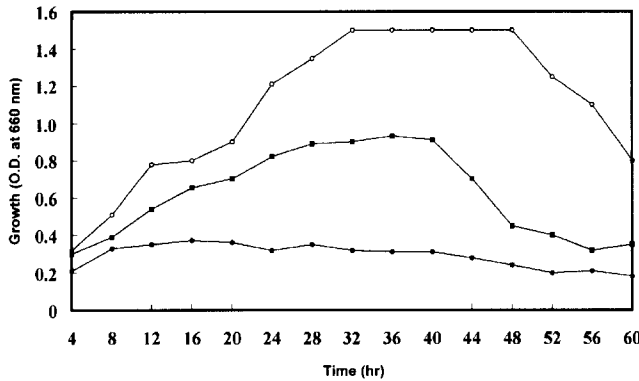


Fig. 3. Effect of culture temperature on the growth of *Bacillus* sp. DF 218.
○: 60°C, ■: 50°C, ●: 40°C.

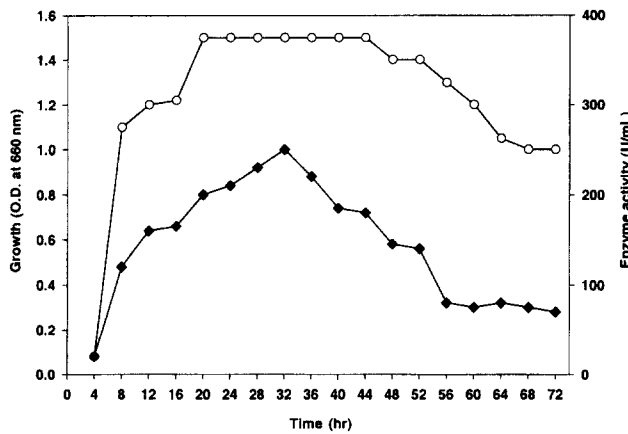


Fig. 4. Effect of culture time on the growth and protease production from *Bacillus* sp. DF 218.
○: Growth, ◆: Enzyme activity.

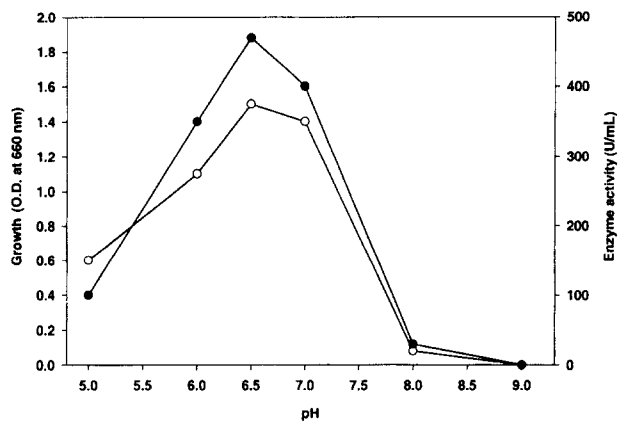


Fig. 5. Effect of initial pH of medium on the growth and production of the protease from *Bacillus* sp. DF 218.
○: Growth, ●: Enzyme activity.

서 최대로 생산되는 결과를 보였다. 이상의 결과로부터 효소생산을 위한 배양온도와 배지의 pH는 각각 60°C와 6.5로 정하였다.

Thermostable protease의 정제

배양 상등액으로부터 효소를 침전 농축하기 위하여 acetone을 75% 용액이 되도록 배양상등액에 첨가하고 4°C에서 18시

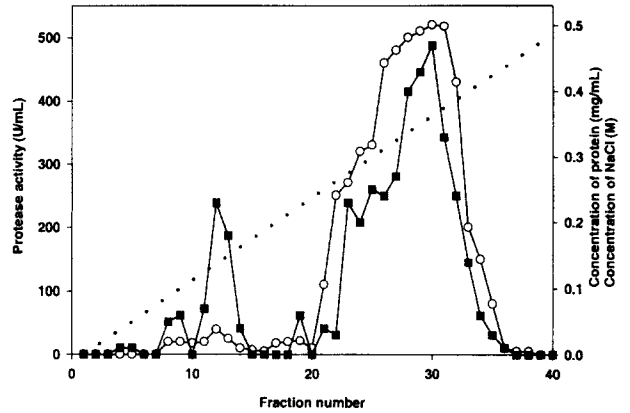


Fig. 6. DEAE-sepharose column chromatogram of protease from *Bacillus* sp. DF 218.
.....: Concentration of NaCl (M), ■: Enzyme activity (unit/mL), ○: Concentration of protein (mg/mL).

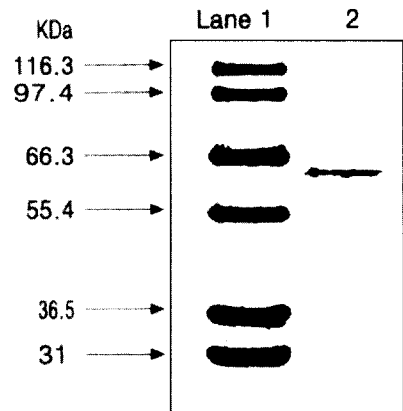


Fig. 7. SDS-PAGE of the protease from *Bacillus* sp. DF 218.
Lane 1: Protein marker, Lane 2: Protease from DEAE-sepharose chromatography.

간 방치 후 효소단백질을 7,500×g에서 20분간 원심분리하여 침전 회수하였다. 효소활성을 지닌 침전물은 소량의 10 mM sodium-phosphate buffer(pH 7.5)에 다시 잘 용해시키고 동일 buffer 용액에 대하여 충분히 투석하여 평형화시킨 다음 DEAE-sepharose를 충전시킨 column에 흡착시켰다. 0.5 M NaCl이 포함된 10 mM sodium phosphate buffer를 사용하여 흡착된 단백질을 용출시킨 결과 0.15 M과 0.3 M의 NaCl 농도에서 각각 2개의 효소활성 분획이 용출되었으며 이들 중 대부분의 단백질 분해효소 활성은 0.3 M의 NaCl 분획에서 검출되었다(Fig. 6). 단백질 분해효소 활성이 높은 분획인 30번 부근의 분획을 모아서 농축하여 SDS-polyacrylamide 전기영동법에 의하여 분석한 결과 분자량 61 kDa의 위치에서 단일 단백질 band를 확인할 수 있었다(Fig. 7). 이상의 acetone 침전과 DEAE-sepharose column chromatography에 의하여 배양 상등액으로부터 1.90 배의 정제도를 가진 단백질을 28% 회수하였다(Table 3).

단백질 가수분해효소의 반응온도와 반응 pH

정제된 효소를 반응액 pH 5-9 범위에서 효소 활성을 측정 비교하여 본 결과 pH 7.5에서 최대 활성을 보였고(Fig. 8) 반응온도의 영향을 측정한 결과는 40°C 이상에서부터 활성을 나타내어 60°C까지는 점차적으로 증가하였으나 65°C 이상에서는 효소의 활성이 급격히 감소하여 70°C에서는 거의 활성을 나타

Table 3. Purification of the protease from *Bacillus* sp. DF 218

Step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Fold
Culture broth	330.5	425,400	1287.1	100	1
Acetone precipitation	143.7	191,430	1332.15	45	1.04
DEAE-sepharose chromatography	48.8	119,112	2440.81	28	1.90

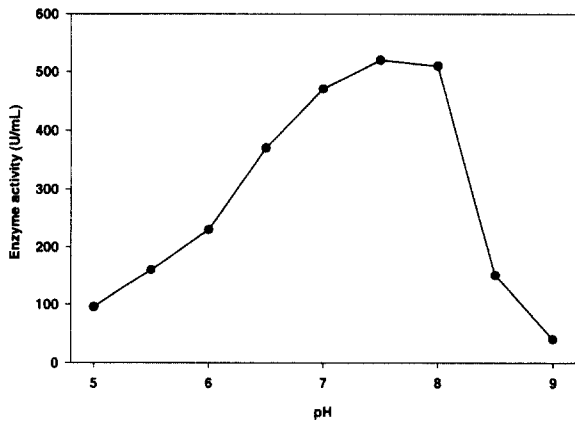


Fig. 8. Effect of pH on the protease activity from *Bacillus* sp. DF 218.

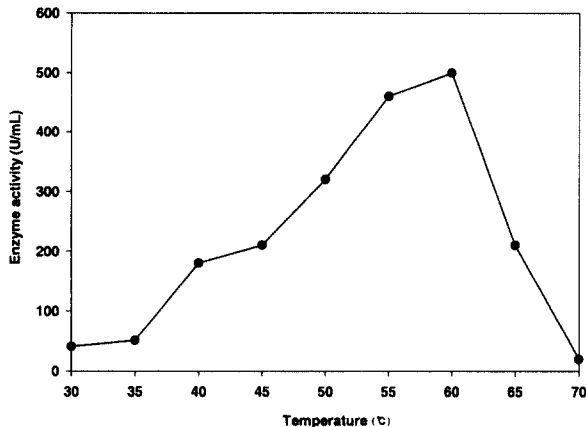


Fig. 9. Effect of temperature on the protease activity from *Bacillus* sp. DF 218.

내지 않는 결과를 보였다(Fig. 9). 이는 균체가 60°C에서 최대의 생육을 나타내고 그 보다 10°C 높은 70°C에서는 생육을 하지 않는 결과와 동일한 현상을 나타내므로 앞으로 본 균주가 생산하는 다른 종류의 효소들의 작용 온도들도 검토할 필요가 있다고 생각되어진다.

요 약

전국 각지에서 채집한 토양과 두엄에서 분리한 25종의 내열성 균주 중 내열성 단백질 가수분해효소 활성을 갖는 균주 DF 218을 선별하였다. 본 균주는 Gram 양성 간균의 특징을 나타냈으며 Bergey's manual of systematic bacteriology와 Biochemical tests for identification of medical bacteria에 준하여 생화학 적 특성을 검토한 결과 catalase 양성, 포자형성, motility 양성, glucose 발효, hemolysis β균임을 나타내어 *Bacillus* sp.으로 추

정되었다. 16S rDNA sequence 분석 결과 DF 218 균주는 *Bacillus flexus*과 sequence가 95% 일치하는 유사성을 보였으나 gene bank data base 상에서 16S rDNA sequence가 일치하는 균주는 검색되지 않았다. 이 같은 실험 결과에 따라 strain DF 218은 기존에 발표되지 않은 새로운 균주로 판단되어 *Bacillus* sp. DF 218로 명명하였다. *Bacillus* sp. DF 218은 1% trypton, 1% NaCl, 1% glucose의 배지조성과 배양온도 60°C에서 32시간 동안 배양하였을 때 최대의 단백질 분해효소를 생산하였다. *Bacillus* sp. DF 218로부터 단백질 분해효소를 acetone으로 침전시키고 DEAE-sepharose column chromatography를 통하여 효소를 정제하고 정제된 단백질을 SDS-PAGE를 통해 분석한 결과 61 kDa 크기의 단일 band를 확인할 수 있었다. 이 효소의 최적 반응온도는 60°C이었으며 최적 pH는 7.5로 측정되었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 정책연구 지역기술개발 용역사업(충남 0101)의 수행에 의한 연구결과와 일부이며 지원해준 과학기술부에 감사드립니다.

문 헌

1. Peckman EV. *Aspergillus* proteinase. *Biochemistry* 5: 321-325 (1951)
2. Crewth WC. The effect of pH and cations on the thermal denaturation of trypsin. *J. Biol. Chem.* 6: 597-601 (1963)
3. Massaki Y, Kazuo S, Mitsuo M. Purification and properties of acid protease from *Monascus* sp. No. 3405. *Agric. Biol. Chem.* 48: 1637-1645 (1984)
4. Kageyama K. Studies on *Aspergillus oryzae* strain for sake brewing. *J. Ferment. Technol.* 33: 53-57 (1955)
5. Nunokawa Y, Namba Y, Watanabe S. A study of the rice koji protease. *J. Soc. Brew.* 53: 930-933 (1961)
6. Horikoshi K. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* sp. No. 221. *Agric. Biol. Chem.* 35: 1407-1414 (1971)
7. Ward OP. Proteolytic enzymes, Vol. III, pp. 789-818. In: *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier, New York, NY, USA (1986)
8. Durham DR, Stewart DB, Stellwag EJ. Novel alkaline and heat stable serine protease from alkalophilic *Bacillus* sp. strain GX6638. *J. Bacteriol.* 169: 2762-2768 (1987)
9. Kobayashi T, Ogasawara A, Ito S, Saitoh M. Purification and some properties of alkaline proteinase produced by *Pseudomonas maltophilia*. *Agric. Biol. Chem.* 49: 693-698 (1985)
10. Nakadai T, Nasuno S, Iguchi N. Purification and some properties of alkaline proteinase from *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* 37: 2685-2694 (1973)
11. Kim HK, Kim KH, Lee JK, Kim YO, Nam HS, Oh TK. Characterization of a thermostable protease from thermophilic *Bacillus amyloliquefaciens* NS 15-4. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 322-328 (1995)
12. Michels PC, Douglass C. Pressure-enhanced activity and stability of a hyperthermophilic protease from a deep-sea methanogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3985-3991 (1997)
13. Kreig NR, Halt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

- Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD, USA (1984)
14. MacFaddin JF. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1990)
 15. Davis LG, Dibner MD, Batty JF. *Basic Method in Molecular Biology*. Elsevier, New York, NY, USA. p. 42 (1986)
 16. Beynon RJ, Bond JS. *Proteolytic Enzymes-a Practical Approach*, IRL press, Oxford, UK (1989)
 17. Banerjee UC, Sani RK, Azimi W, Soni R. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochem.* 30: 213-219 (1999)
 18. Tasi Y, Juang R, Lin S, Chen S, Yamasaki M, Tamura G. Production and further characterization of an alkalophilic elastase produced by alkalophilic *Bacillus* strain Ya-B. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 3156-3161 (1998)
 19. Vazquez D, Cantera MB. A simple and rapid technique for postelectrophoretic detection of protease using azocasein. *Electrophoresis* 16: 1894-1897 (1995)
 20. Priest FG, Goodfellow M, Todd C. A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1847-1882 (1988)
-
- (2003년 10월 31일 접수; 2003년 12월 30일 채택)