The Korean Journal of Microbiology, Vol. 43, No. 4, December 2007, p. 331-336
Copyright©2007, The Microbiological Society of Korea

단 보

알칼리성 Protease를 생산하는 *Bacillus subtilis* JK-1의 분리 동정 및 효소 특성

김 지 연
인제대학교 기초대학

청국장으로부터 알칼리성 protease 생성이 우수한 균주를 분리한 후 형태적, 생리·생화학적 특성 및 16S rRNA 유전자 염기서열을 통한 계통분석을 이용하여 동정을 실시한 결과 *Bacillus subtilis* JK-1으로 판명되었다. *B. subtilis* JK-1이 생산하는 protease의 최적 활성 pH와 온도는 각각 9.0과 55°C이었으며, 40~80°C의 온도에서 안정하였다. 본 균주는 배지 중에 탄소원과 질소원, 무기염으로 1.0% (w/v) xylose와 1.0% (w/v) yeast extract, 0.3% (w/v) $CuSO_4$를 사용하였을 경우 최대의 알칼리성 protease 생산성을 나타내었다. *B. subtilis* JK-1의 생육은 배양 후 12시간 만에 최대 성장을 나타냈으며, 효소 활성은 8시간부터 급격히 증가하여 16~20시간에 최대 활성을 나타내었다.

Key words ☐ **alkaline protease, *B. subtilis* JK-1, characterization, enzyme production, identification**

Protease는 단백질을 저분자 peptide와 아미노산으로 분해하는 효소이며 전 세계적으로 공업효소 판매량의 60%를 차지하고 있을 정도로 산업적인 측면에서 중요한 위치를 차지하고 있다(19). 이는 조미료 제조, 농축어류 단백질의 정미증진과 쓴맛 제거, 식육의 연화, 주류의 혼탁방지, 치즈 숙성, 대두산물의 생산 등의 식품공업, 환상 및 상처치료제, 소화제, 소염진통제 등의 제약공업, 그리고 세제, 피혁가공, 환경에 관련된 각종 산업분야에 널리 응용되고 있다(6, 19). Protease의 구분 방식으로는 활성부위에 존재하는 주요 기능기에 따라 serine protease와 aspartic protease, cysteine protease, metallo protease의 4종류로 구분하거나 효소반응의 최적 pH에 따라 acid protease와 neutral protease, alkaline protease로 나누기도 한다(12, 17).

Protease는 동 · 식물과 세균, 곰팡이, 효모 등 다양한 미생물에서 생산되는데, 동물과 식물로부터 유래한 protease는 다양한 산업적 수요를 충당하기에 공급이 제한되어 있다(18). 그러므로 안정성과 생산성, 비용절감 등 경제적인 면이나 공업적 규모의 활용측면에서 많은 장점이 있는 미생물 유래의 protease를 생산하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다(9).

한편, *Bacillus* 속 균주는 생육이 양호하고 다양한 특성을 가지고 있어서 유전자 및 효소 수준, 그리고 산업적으로 폭넓게 연구되고 있으며, *Bacillus* 속으로부터 알칼리성 protease가 발견된 이후로 효소 활성이 높고 넓은 pH 범위에서 활성을 나타내며 열안정성이 우수한 효소를 생산하는 균주의 탐색 및 선별에 많은 연구가 시도되고 있다(10, 16). 상업적 응용을 목적으로 생산되고 있는 세균 유래의 protease는 대부분 *Bacillus* 속 유래의 중성 또는 알칼리성 효소들이다. 알칼리성 protease에 관한 연구로는 Horikoshi (13)가 *Bacillus* sp.를 분리하여 효소학적 특성을 발표한 이후, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. cereus* 등을 포함한 여러 *Bacillus* 속 균주가 알려지고 있다(2, 3, 7).

본 연구에서는 산업적으로 유용한 protease를 탐색하던 중 알칼리 영역의 pH에서 protease 활성을 나타내는 *Bacillus* sp.를 청국장으로부터 분리 · 동정하였고, 분리 균주가 생산하는 protease의 조효소에 대한 일반적인 특성을 조사하였기에 보고하고자 한다.

청국장 시료(우호한의원 제공)를 희석하여 LB (0.5% yeast extract, 1% tryptone, 1% NaCl, 1.5% agar) 배지에서 균체생육이 우수하고 서로 다른 형태적 특징을 가진 것만을 선별하여 순수 분리하였다. 이들을 1% (w/v) skim milk (Difco™, USA)가 함유된 LB 배지에서 배양하여 skim milk 분해능이 가장 우수한 분리 균주 JK-1을 최종적으로 선발, 본 실험에 사용하였다.

최종 선정된 균주를 관찰한 결과 그람 양성의 간균(0.7~0.8× 2.0~2.3 μm)으로 포자와 협막를 형성하였고, 운동성을 지닌 호기성의 세균이었다. 또한 catalase 시험과 oxidase 시험 양성, Voges-Proskauer (V.P.) 시험과 indole 시험 음성, 질산 환원 및 citrate 이용 능력은 양성 이었으며, CMC와 soluble starch, tributyrin, xylan을 가수분해하는 특성도 보였다(Table 1). 그리고 자동화 균주 동정기계 VITEK system (VITEK 2 Compact 60, bioMerieux Inc., Hazelwood, MO, USA)을 이용하여 분리 균주의 생화학적 특성들을 조사한 결과 *B. subtilis*와 94%의 matching level을 나타내었다(자료 미제시). 위와 같은 형태적, 생리 · 생화학적 특성 등을 종합하고 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (5)에 기술된 분류 기준을 참조하여 동정한 결과 분

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-55-320-3737, Fax: 82-55-339-3734
E-mail: biokjy@inje.ac.kr

Table 1. Characteristics of the isolated strain JK-1

Morphology	
Shape	Rod
Cell size (μm)	(0.7~0.8) × (2.0~2.3)
Motility	Motile
Gram stain	+
Spore formation	+
Characterization of cultures on LB agar plates :	
Colony color	White
Form	Circular
Elevation	Flat
Margin	Wavy
Opacity	Opaque
Brilliancy	No glistening
Physiology	
Catalase activity	+
Oxidase activity	+
V. P.	-
Indole production	-
Nitrate reduction	+
Citrate utilization	+
CMC hydrolysis	+
Soluble starch hydrolysis	+
Tributyrin hydrolysis	+
Xylan hydrolysis	+

+, positive; -, negative

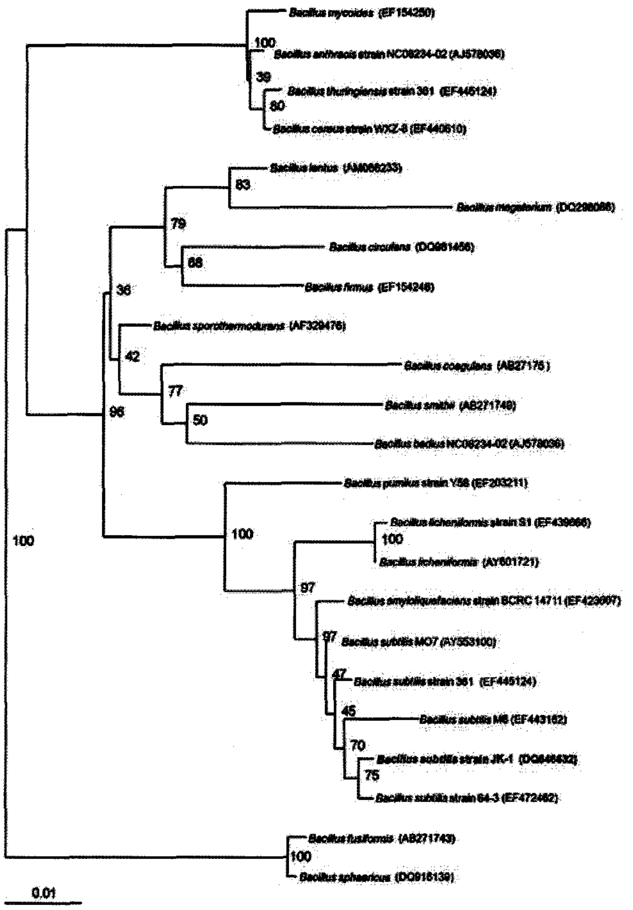

Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences, showing the relationship between the isolated strains and other species belong to the genus *Bacillus*. The accession numbers are in parentheses. The tree was constructed using the CLUSTAL X and neighbour-joining method. Scale bar corresponds to 0.01 subscriptions per nucleotide position. Numbers at nodes indicate levels of bootstrap support (%) determined from 100 resampled data.

리 균주는 *Bacillus* 속 균으로 추정되었다.

분리 균주 JK-1의 유전학적 특성에 따른 동정과 계통적 유연관계를 알아보기 위하여 PCR로 증폭 생산된 1.4 kb의 16S rRNA 유전자 염기서열을 결정하여 분석을 시도하였다(Fig. 1). 이 때 PCR에 사용된 primer는 16S rDNA 염기서열 결정에 사용하는 universal primer인 27f; 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'와 1492r; 5'-GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3'이었다(15). 얻어진 염기서열 분석 결과는 GenBank에 accession no. DQ846632로 등록하였다. 결정된 염기서열의 상동성 분석은 GenBank의 database에 등록된 16S rDNA 염기서열들의 정보를 대상으로 BLAST 프로그램(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, NCBI, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 수행하였다(1, 4). 계통 분석은 CLUSTAL X의 Multiple Sequence Alignment Program (Strasburg, France)을 이용하여 정렬하였고(22), GenBank에 등록된 다른 균주들의 16S rDNA 염기서열 정보와 TreeView program을 이용하여 neighbor-joining method에 의해 염기서열간의 유전적 거리와 phylogenetic tree를 얻었다(20). Branch의 신뢰도는 100회의 재구성된 자료로부터 새로운 tree를 작성하여 계산하였다.

분리 균주의 16S rRNA 염기서열을 기존에 등록된 다양한 세균들의 상응하는 염기서열과 상동성을 조사하여 본 결과 *B. subtilis* strain 64-3 (GenBank accession no. EF472462), *B. subtilis* MO7 (GenBank accession no. AY553100)과 99%의 유사성을 보였고, *B. subtilis* M6 (GenBank accession no. EF443162), *B. subtilis* strain 361 (GenBank accession no. EF445124)과는 98%의 유사성을 보였다(자료 미제시). 이들 분석 결과를 토대로 하여 분리 균주 JK-1은 *B. subtilis*로 최종 동정되었으며, *B. subtilis* JK-1으로 명명하였다.

분리・동정된 균주의 protease 활성을 조사하기 위하여 종배양액을 0.1% (v/v) 접종하여 37°C에서 16시간 동안 본배양하고, 13,400×g으로 10분간 원심분리한 후 상등액을 조효소액으로 사용하였다. Protease 활성 측정은 Hagihara 등(11)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. 기질용액은 0.1 M 탄산 완충용액(pH 9.0)에 기질인 Hammarsten casein (BDH, England)을 0.6% (w/v)가

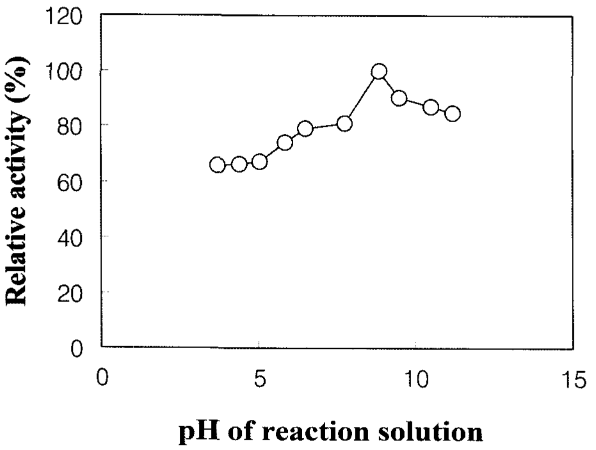

Fig. 2. Effect of pH on activity of the alkaline protease produced by *B. subtilis* JK-1. The enzyme reaction was carried out at 55°C for 30 min in 0.05 M citrate (pH 3.0~6.0), 0.1 M phosphate (pH 7.0~8.0) and 0.1 M sodium bicarbonate (pH 9.0~11.0) buffer.

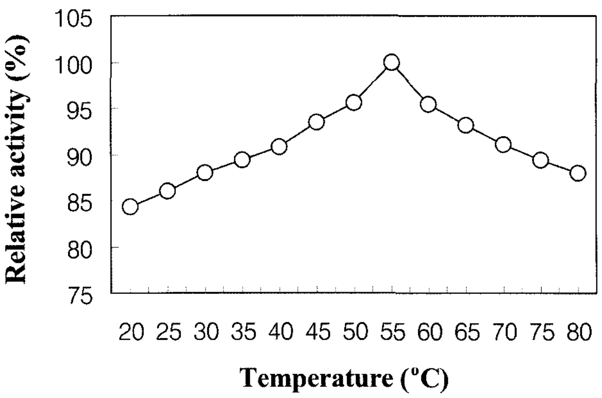

Fig. 3. Effect of temperature on activity of the alkaline protease produced by *B. subtilis* JK-1. The enzyme reaction was carried out at various temperatures for 30 min in 0.1 M sodium bicarbonate buffer (pH 9.0).

되도록 용해하여 사용하였다. 효소액 1 ml을 기질용액 1 ml과 혼합하여 55°C에서 30분간 반응시킨 후 TCA 혼합액 1 ml을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이 반응 정지액을 원심분리하여 상등액을 취하고 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성도(Unit)는 위의 조건에서 1분 동안에 Hammarsten casein으로부터 1 μg의 tyrosine에 해당하는 아미노산을 생성하는 효소의 양으로 하였다.

B. subtilis JK-1이 생산하는 protease의 최적 pH는 0.05 M 시트르산 완충용액(pH 3.0~6.0)과 0.1 M 인산 완충용액(KH_2PO_4, pH 7.0~8.0), 0.1 M 탄산 완충용액($NaHCO_3$, pH 9.0~11.0)을 사용, 각 pH 별로 0.6% Hammarsten casein (w/v) 기질용액을 제조하여 효소 활성을 측정하고, 그 효소의 상대 활성으로 표시하였다(Fig. 2). 본 효소는 pH 8.0에서부터 11.0까지의 범위에서 protease 활성이 80% 이상의 활성도를 나타내었으며, 특히 반응 최적 pH는 9.0로 나타나 알칼리성 protease임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Shin 등(21)이 고등어에서 분리한 *B. megaterium* 유래의 protease (pH 8.0)와 Kim 등(14)이 토양으로부터 분리한 *B. subtilis* PANH765 유래 proterase (pH 7.0)와는 다르게 나타났다.

B. subtilis JK-1이 생산하는 알칼리성 protease의 최적 활성 온도를 검토하기 위해 0.1 M 탄산 완충용액(pH 9.0)에 Hammarsten casein을 0.6%되게 용해시키고 조효소액을 가한 다음, 온도를 20°C부터 80°C로 변화시키면서 효소 활성을 측정 비교하여 상대 활성으로 표시한 결과는 Fig. 3과 같다. 본 균주가 생산하는 protease의 최적 반응 온도는 55°C이었고, 20~80°C에서도 80% 이상의 효소 활성을 나타내었으며, 특히 40~70°C에서는 90% 이상의 높은 활성을 나타내었다. 이 결과는 Kim 등(14)이 분리한 *B. subtilis* PANH765가 생산하는 protease의 활성이 30°C에서 가장 우수하였다는 보고와 Shin 등(21)이 분리한 *B. megaterium*의 protease가 35°C에서 최적 활성을 나타내었다는 결과와 비교하면 본 균주가 다소 높은 최적 온도를 나타냈다. 이상의 결과에 따라 본 실험의 효소 활성 측정 조건은 최적 조건인 pH 9.0, 55°C에서 행하여졌으며 기질은 동일 pH의 0.1 M 탄산 완충용액에 용해하여 사용하였다.

또한 0.1 M 탄산 완충용액(pH 9.0)에 조효소액을 첨가하여 일정 온도에서 10~60분까지 10분 간격으로 효소액을 미리 반응시킨 후 최적 온도에서 30분 동안 잔여 효소 활성을 측정하는 방법을 이용하여 효소의 열안정성을 측정하여 그 효소의 상대 활성으로 표시하였다. 그 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 40°C에서는 60분 동안 가열하여도 100% 안정성을 유지하였으며, 50°C에서 60분간 열처리로 93% 이상 잔존활성을 보였고, 60°C에서 60분간 열처리 시 88% 이상의 효소 활성을 나타내었다. 70°C의 온도에서 60분간 열처리 시 83%의 효소 활성이 존재하였으며 80°C에서는 60분 가열하여도 78%의 잔여 활성을 유지하였다.

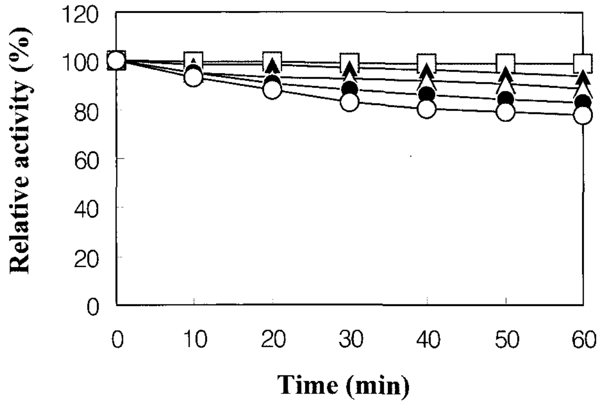

Fig. 4. Thermal stability of the alkaline protease produced by *B. subtilis* JK-1. The enzyme reaction was carried out at optimal condition after preheating of the enzyme solution at the indicated temperatures for the different time periods. Symbols: ○, 80°C; ●, 70 °C; △, 60°C; ▲, 50°C; □, 40°C.

한편, Shin 등(21)이 분리한 *B. megaterium*의 알칼리성 protease는 80°C에서 10분간 방치 시 약 15%로 급격한 활성 감소를 보였다. 따라서 본 효소는 열에 안정하다고 사료된다.

Protease는 배지 내 탄소원과 질소원, 무기염의 성분에 따라 그 생산량의 차이가 많으며 미생물의 종류에 따라 그 영향이 다르다(8). 분리 균주의 protease 생산성에 미치는 배지성분의 영향을 조사하기 위해 탄소원과 질소원, 무기염류가 다른 배지에서 배양된 균체의 생육 정도를 비교하였고, 원심분리한 배양 상등액을 조효소액으로 사용하여 protease 활성을 측정함으로써 protease 생산성을 조사하였다.

탄소원의 종류 따른 *B. subtilis* JK-1의 균체생육 및 protease의 활성을 조사하기 위하여 LB 액체배지에 arabinose와 CMC (carboxymethyl cellulose), fructose, galactose, glucose, glycerol, lactose, maltose, mannitol, mannose, raffinose, rhamnose, soluble starch, sucrose, xylose를 각각 1% (w/v)되게 첨가하여 배양한 후 조사하였다. 그 결과 Table 2에서와 같이 사용되어진 탄소원에 대한 균체생육은 대조구와 비교하여 mannitol 사용시 가장 높은 반면, glycerol과 mannose를 첨가한 배지에서는 균체 생육이 매우 낮게 나타났다. 또한 효소 활성에서는 대조구인 LB 배지에서의 활성을 100%로 하였을 경우, xylose 첨가시 213.9%, arabinose 첨가시 189.9%로 효소 활성이 높게 나타났으며, glycerol (82.5%)과 raffinose (99.4%) 첨가 시는 오히려 활성이 저하되었다. 이와 같은 결과로 볼 때 protease의 생산을 위한 탄소원은 xylose가 비교적 적합하다고 판단되며, 본 연구에서는 protease의 활성이 가장 우수한 탄소원으로 밝혀진 xylose를 배지에 첨가하여 사용하였다. Kim 등(14)이 보고한 *B. subtilis* PANH765의 protease는 glucose를 첨가한 경우 활성이 가장 높았고, xylose를 첨가한 경우 glucose를 첨가할 때와 비교할 때 30% 이하로 활성이 매우 낮았다. 또한 Shin 등(21)의 연구에 따르면 알칼리성 protease 활성을 가진 *B. megaterium*은 탄소원으로 galactose를 이용하며 xylose에서는 전혀 활성이 나타나지 않는다고 보고함으로써 본 연구의 결과와 상이함을 알 수 있었다.

Table 2. Effect of various carbon sources on the cell growth and alkaline protease production by *B. subtilis* JK-1

Sources (1.0%, w/v)	Cell growth (OD_{600})	Relative enzyme activity (%)
Control	4.714	100.0
Arabinose	4.219	189.9
CMC	4.124	104.1
Fructose	4.789	133.1
Galactose	4.669	136.6
Glucose	5.388	119.8
Glycerol	2.673	82.5
Lactose	4.717	108.2
Maltose	4.609	108.1
Mannitol	5.677	103.8
Mannose	3.222	127.5
Raffinose	4.839	99.4
Rhamnose	4.041	120.7
Soluble starch	4.839	104.8
Sucrose	5.087	101.4
Xylose	4.335	213.9

질소원에 대한 실험은 LB 배지의 tryptone을 제거한 것을 대조구로 하고 실험구는 이 tryptone 대신 유기질소원(beef extract, casein, malt extract, peptone, skim milk, soytone, tryptone, urea, yeast extract)과 무기질소원[$(NH_4)H_2PO_4$, NH_4Cl, NH_4NO_3, $(NH_4)SO_4$, KNO_3, $NaNO_3$]의 농도를 1% (w/v)로 제조한 배지를 사용하였다(Table 3). 균체 생육은 실험에 사용한 여러 질소원 중 soytone과 tryptone, yeast extract, malt extract, beef extract, skim milk, peptone을 첨가한 배지에서 높게 나타났으며, 그 중 tryptone을 첨가한 경우 최대의 생육을 보였다. 이와는 대조적으로, urea와 $(NH_4)H_2PO_4$를 첨가한 배지에서는 균체의 성장이 일어나지 않았다. 그리고 실험에 사용한 유기질소원 중에서 yeast extract를 첨가한 경우 protease의 활성이 248.7%로 가장 높게 나타내었고, soytone (221.7%), beef extract (184.2%), tryptone (159.7%)을 첨가한 경우에도 protease의 활성이 비교적 높게 나타났으며, urea를 첨가할 경우에는 90.4%로 대조구보다 낮게 나타났다. 반면에 무기질소원을 사용하였을 때에는 유기질소원보다 효소 활성이 상대적으로 낮아 효소 생산용으로는 부적합한 것으로 판단된다. 이는 *B. megaterium*에 의한 알칼리성 protease의

Table 3. Effect of various nitrogen sources on the cell growth and alkaline protease production from *B. subtilis* JK-1

Sources (1.0%, w/v)	Cell growth (OD_{600})	Relative enzyme activity (%)
Control	1.367	100.0
Complex nitrogen sources:		
Beef extract	4.051	184.2
Casein	2.693	110.1
Malt extract	4.282	107.9
Peptone	4.196	119.4
Skim milk	4.222	124.6
Soytone	4.612	221.7
Tryptone	4.702	159.7
Urea	0.000	90.4
Yeast extract	4.499	248.7
Inorganic nitrogen sources:		
$(NH_4)H_2PO_4$	0.010	93.7
NH_4Cl	3.000	96.1
NH_4NO_3	2.831	90.1
$(NH_4)_2SO_4$	2.959	97.7
KNO_3	1.658	103.5
$NaNO_3$	1.780	102.8

Table 4. Effect of mineral sources on the cell growth and alkaline protease activity produced by *B. subtilis* JK-1

Mineral sources (0.3%, w/v)	Cell growth (OD_{600})	Relative enzyme activity (%)
Control	4.904	100.0
$CaCl_2$	5.543	97.8
$CaCO_3$	7.255	100.6
$CoCl_2$	0.033	93.6
$CuSO_4$	2.094	129.0
$FeSO_4$	5.689	95.2
K_2HPO_4	5.079	104.1
KCl	4.954	100.1
KH_2PO_4	4.898	102.1
$MgSO_4$	4.252	99.6
$MnSO_4$	0.160	94.8
NaCl	4.547	100.6
$ZnCl_2$	1.455	100.3

경우 무기질소원인 1.5%의 NH_4NO_3 첨가시 가장 우수하였다는 보고(21)와는 다른 결과였으며, yeast extract를 첨가한 경우 protease 활성이 가장 높게 나타났다는 Kim 등(14)의 결과와 일치하였다. 따라서 본 실험에서는 최적의 질소원으로 yeast extract를 선택하였다.

균체의 생육과 효소 생산에 미치는 무기염류의 영향은 LB 배지에서 NaCl을 제거한 것을 대조구로 하고 각종 무기염($CaCl_2$와 $CaCO_3$, $CoCl_2$, $CuSO_4$, $FeSO_4$, K_2HPO_4, KCl, KH_2PO_4, $MgSO_4$, $MnSO_4$, NaCl, $ZnCl_2$)을 0.3% 첨가한 것을 실험구로 하였다 (Table 4). *B. subtilis* JK-1은 $CaCO_3$ 첨가시 생육이 가장 높았으며, $CoCl_2$에서는 생육이 일어나지 않음을 알 수 있었다. 또한 $CuSO_4$에 의해서는 효소 활성이 129.0%로 가장 높게 나타났으며, $CaCl_2$와 $CoCl_2$, $FeSO_4$, $MgSO_4$, $MnSO_4$를 첨가한 경우 대조구에 비해 효소의 활성을 감소되는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 고등어에서 분리한 *B. megaterium*의 경우 $MgSO_4$ 첨가시 효소 활성이 가장 높았다는 Shin 등(21)의 결과와는 상이하였다. 따라서 대부분의 배지조성에 의해 균체의 생육과 protease의 생산은 큰 영향을 받지 않는 것으로 사료된다.

최적배지를 사용한 최적 배양조건에서 배양시간에 따른 *B. subtilis* JK-1 생육과 알칼리성 protease 활성의 변화를 균 접종 후 4시간 간격으로 조사하였다. Figure 5에 나타난 바와 같이 *B. subtilis* JK-1의 생육은 접종 8시간 이후 급격히 증가하기 시작하여 12시간 만에 최대성장을 나타내었고, 그 이후로 약간씩 감소하는 경향을 나타내었다. 효소 활성은 8시간부터 급격히 증가하여 16~20시간에 최대 활성을 나타내었고 그 이후의 시간에는 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 본 균주의 배양시간에 따른 효소 생산에 대한 특성은 균체 생육에 비례하여 알칼리성 protease가 생산됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Kim 등(14)의

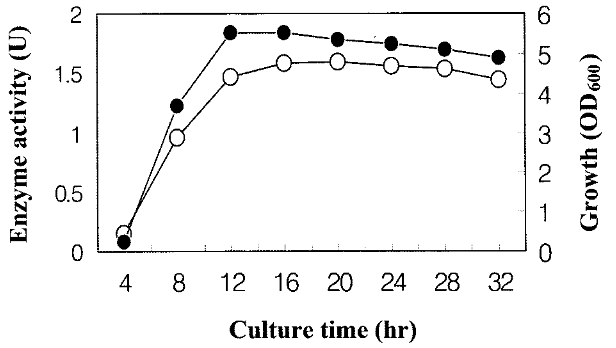

Fig. 5. Growth and alkaline protease production of *B. subtilis* JK-1. *B. subtilis* JK-1 was grown aerobically in optimum media at 37°C. Culture supernatants was prepared periodically and alkaline protease activity was determined at 55°C for 30 min. Symbols: ○, Enzyme activity (U); ●, Cell growth (OD_{600})

B. subtilis PANH765의 protease가 36시간 배양 시 최대 활성을 나타내었다는 보고와는 차이가 있는 것으로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 2005년도 인제대학교 학술연구조성비 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
2. Banerjee, U.C., R.K. Sani, W. Azmi, and R. Soni. 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochem.* 35, 213-219.
3. Banika, R.M. and M. Prakash. 2004. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiol. Res.* 159, 135-140.
4. Benson, D.A., M.S. Boguski, D.J. Lipman, J. Ostell, B.F. Ouellette, B.A. Rapp, and D.L. Wheeler. 1999. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 27, 12-17.
5. Claus, D. and R.C.W. Berkeley. 1986. Genus *Bacillus*, p. 1105-1139. *In* P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland, USA.
6. Cowan, D. 1983. Industrial applications: Proteins, pp. 353-374. *In* T. Godfrey and S. West (ed.), Industrial enzymology: the application of enzyme in industry. The Nature Press, New York, USA.
7. Dhandapani, R. and R. Vijayaragvan. 1994. Production of thermophilic, extracellular alkaline protease by *Bacillus stearothermophilus* AP-4. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 33-35.
8. Giesecke, U.E., G. Bierbaum, H. Rudde, U. Spohn, and C. Wandrey. 1991. Production of alkaline protease with *Bacillus licheniformis* in a controlled fed-batch process. *Appl. Microbiol.*

Biotechnol. 35, 720-724.
9. Godfrey, T. and S. West. 2001. Industrial enzymology, 2nd ed. Macmillan Publisher Inc., New York, USA.
10. Gupta, R., Q.K. Beg, and P. Lorenz. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 13-32.
11. Hagihara, B., H. Matsubara, M. Nakai, and K. Okunuki. 1958. Crystalline bacterial proteinase I. Preparation of crystalline proteinase of *B. subtilis*. *J. Biochem.* 45, 185-194.
12. Hartley, B.S. 1960. Proteolytic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 29, 45-72.
13. Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms, Part I, alkaline protease produced by *Bacillus* No. 221. *Agric. Biol. Chem.* 36, 1407-1414.
14. Kim, K.P., N.H. Kim, C.H. Rhee, C.J. Woo, and D.H. Bae. 2002. Isolation and characterization of protease producing bacteria from soil. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31, 754-759.
15. Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-175. *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. The John Wiley & Sons, New York, USA.
16. Manachini, P.L., M.G. Fortima, and C. Parini. 1988. Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermoruber* a new species of *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 409-413.
17. Massaki, Y., S. Kazuo, and M. Mitsuo. 1984. Purification and properties of acid protease from *Monascus* sp. No. 3403. *Agric. Biol. Chem.* 48, 1637-1639.
18. Panouillé, M., J.F. Thibault, and E. Bonnin. 2006. Cellulase and protease preparations can extract pectins from various plant byproducts. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8926-8935.
19. Rao, M.B., A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, and V.V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 597-635.
20. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
21. Shin, S.U., M.A. Kwon, M.S. Jang, K.J. Jung, and H.J. Seo. 2004. Production conditions of alkaline protease by *Bacillus megaterium*. *Korean J. Food Preservation* 11, 227-232.
22. Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882.

(Received December 10, 2007/Accepted December 12, 2007)

ABSTRACT : Isolation and Characterization of an Alkaline Protease Produced by *Bacillus subtilis* JK-1

Ji-Yeon Kim (Graduate School of Molecular & Biomedical Technology, College of General Education, Inje University, Gimhae 621-749, Korea)

A bacterium producing the alkaline protease was isolated from *Chungkookjang*, and was identified as *Bacillus subtilis* JK-1 based on morphological, physiological and biochemical characteristics, as well as phylogenetic analysis using 16S rRNA gene sequence. The optimum pH and temperature of the protease activity were pH 9.0 and 55°C, respectively. This enzyme was stable at the temperatures 40~80°C. The maximum alkaline protease production was obtained when 1.0% (w/v) xylose, 1.0% (w/v) yeast extract and 0.3% (w/v) $CuSO_4$ were used as carbon source, nitrogen source and mineral source. Under the optimal condition, growth of the isolate was reached at stationary phase after 12 hr followed by incubation, the alkaline protease production reached a maximum level with 16~20 hr cultivation.