

# 분자진화 기술을 통한 *Vibrio metschnikovii* 유래 고활성 알칼리성 단백질 분해효소 생산균주 개발

신용욱<sup>†</sup> · 이과수<sup>‡</sup> · 조재형 · 이현환\*

한국외국어대학교 생명공학과

현주소: <sup>†</sup>(주) CJ 바이오연구소, <sup>‡</sup>(주) Cell Biotech

## Strain Development for the Over-production of Alkaline Protease from *Vibrio metschnikovii* by Molecular Evolution

Yong-Uk Shin<sup>†</sup>, Gwa-Soo Lee<sup>‡</sup>, Jae-Hyung Jo, and Hyune-Hwan Lee\*

Department of Bioscience and Biotechnology, Hankuk University of Foreign Studies, Yongin 449-791, Republic of Korea

Present address: <sup>†</sup> R&D Center for Bioproducts, CJ Cheiljedang Corp., Seoul 157-724, Republic of Korea

<sup>‡</sup> Cell Biotech, Gimpo 415-872, Republic of Korea

(Received December 17, 2010/Accepted December 22, 2010)

Alkaline protease-overproducing strains of *Vibrio metschnikovii* were developed by using the molecular evolution from the classical mutants *V. metschnikovii* L12-23, N4-8, and KS1. Each *vapK* (*Vibrio* alkaline protease K) was obtained from the genomic DNAs of mutants by PCR to carry out the DNA shuffling. The modified *vapK-1* obtained by DNA shuffling was used again as a template for the error-prone PCR to make the *vapK-2*. Both genes were cloned in the plasmid pKF3 to construct the recombinant plasmids which have one or two copies of the modified genes. The recombinant plasmids were back-transformed to *V. metschnikovii* KS1 to construct recombinant *V. metschnikovii* that expresses the alkaline protease. About 3.9-fold more protease activity was measured in the strain which has the plasmid containing two copies of *vapK-2* when compared to strain KS1. When compared to wild type *V. metschnikovii* RH530, 43-fold more activity was achieved. Comparison of amino acids among *vapK*, *vapK-1*, and *vapK-2* revealed that the active sites was highly conserved and not changed. However, many amino acids except the active sites were changed. These results suggested that the changes in amino acids might play an important role in the increase of protease activity by allowing the easy access of substrate to active sites of the protease. The fermentation of alkaline protease from the *V. metschnikovii* KS1 harboring the plasmid that contains two copies of *vapK-1* showed the possibility of this strain to be used as industrial producer.

**Keywords:** alkaline protease, DNA shuffling, error-prone PCR, molecular evolution, *Vibrio metschnikovii*

지난 수 년 동안 산업용 효소의 상업적 연구가 증가함에 따라 각 분야에 필요한 고활성 효소를 고생산하는 연구가 필수적으로 대두 되었다. 특히 전 세계적으로 산업적 측면에서 중요한 위치를 차지하고 있으며 산업용효소 판매량의 약 60%를 차지하고 있는 단백질 분해효소는 세탁세제, 피혁가공, 식품 산업 등 각종 산업분야에 널리 응용 되고 있다. 단백질 분해효소는 동·식물, 미생물, 곰팡이, 효모 등에서 만들어 지고 있지만 동물, 식물 유래의 단백질 분해효소는 산업적 수요를 충족하기에 양적인 면에 있어서 제한되어 있다. 따라서 생리적으로나

산업적으로 효용성이 높은 단백질 분해효소를 생산하기 위하여 생산성과 더불어 경제적인 면에서 역시 많은 장점을 지닌 미생물 유래의 단백질 분해 효소를 생산하기 위한 연구들이 많이 보고되어 있다(1, 7, 11). 그 중 세탁세제에 필수적으로 첨가되는 성분으로서 광범위하게 사용되는 알칼리성 단백질 분해효소는 그 수요가 폭발적으로 증가 함에 따라 고활성, 고역가의 생산 균주를 제조하는 연구가 많이 보고 되었다(8). 알칼리성 단백질 분해효소가 세탁세제에 사용되기 위해서는 알칼리 pH에서 고활성을 유지하고 안정해야 하며, 세제에 첨가되는 각종 계면활성제들에 대해 내성을 지녀 그 활성을 유지해야 하고, 고온이나 저온에서 활성을 유지하면서 장기간 보존 가능

\* For correspondence. E-mail: hyunlee@hufs.ac.kr; Tel: +82-31-330-4280; Fax: +82-31-333-1696

해야 한다. 특히 다양한 기질에 대한 광범위한 특이성을 가질 수록 그 활용도는 높아진다(2). 이러한 알칼리성 분해효소를 생산하는 고활성 균주를 개발하기 위하여 폐수로부터 균주를 분리하여 보고하였다(12, 13). 이 균주는 그람 음성균으로서 통기성(facultative) 호알칼리성 균주인 *Vibrio metschnikovii* RH530으로 명명되었다. 이 균주는 광범위한 pH (7.0-11.0)와 저온(20-30°C)에서 고온(65°C)까지 활성을 보이며 특히 pH 10.5, 60°C에서 최적활성을 보이는 6개의 서로 다른 단백질 분해효소와 1개의 알칼리성 metalloprotease를 분비하는 것으로 보고되었다(13). 이 중 주효소인 VapT와 VapK 효소가 정제되고 동정되었으며 특히 VapK는 분자량 약 29 kDa으로서 강력한 알칼리성 효소활성을 보이는 것으로 밝혀졌다. 이 단백질을 암호화하는 유전자 *vapK*가 클로닝 되어 그 특징이 밝혀졌고, 세탁세제로의 적합성을 나타내는 계면활성제 POE (polyoxyethylene oxide)와 AOS ( $\alpha$ -olefin sulfonate) 등에 강한 내성을 보이며, 강력한 단백질 불활성 제제인 SDS와 urea에도 내성을 보이는 것으로 보고되었다(4, 5). 한편 *V. metschnikovii* RH530으로부터 classical mutation에 의해 각종 고생산 돌연변이주를 제작하고 이의 세탁세제 적합성을 연구하였고(3), 재조합 *V. metschnikovii*를 제조하기 위한 형질전환법도 보고하였다(5). 이와 같은 기존 연구를 바탕으로 본 연구에서는 고활성, 고생산 재조합 균주를 제조하기 위해 DNA shuffling과 error-prone PCR 등을 이용한 분자진화법(molecular evolution)을 사용하였다. 분자진화법은 다수의 유전자원으로부터 원하는 특성만을 조합하여 combinatorial chimera를 제조할 수 있는 기술로서 치료용 단백질의 개량, 산업용효소의 개량 및 역가 향상 등에 광범위하게 사용된다(17).

본 연구에서는 이미 제조된 고활성 알칼리성 단백질 분해효소 고생산 돌연변이주들로부터 *vapK* 유전자를 증폭한 후 DNA shuffling에 의해 고역가 단백질 분해효소를 암호화하는 유전자 *vapK-1*을 만들고 이로부터 다시 error-prone PCR을 통한 재조합 유전자 *vapK-2*를 제조하였다. 이들 유전자를 고생

산 균주인 *V. metschnikovii* KS1에 역도입하여 알칼리성 단백질 분해효소 고생산 재조합 균주를 제조한 후 그 특성을 연구하고 30 L 발효에 의해 그 생산성을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 균주, 플라스미드 및 배양조건

본 실험에서 사용된 균주 및 플라스미드는 Table 1에 나타내었으며 재조합 *V. metschnikovii* KS1은 단백질 분해효소 생산을 위한 재조합 숙주로 사용되었다(3). *V. metschnikovii*는 영양배지인 LSC 배지(1% trypton, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 100 mM sodium citrate buffer, pH 10.5)와 생산배지인 PM (4% wheat gluten meal, 1.5% cotton seed flour, 5% soybean meal, 1% NaCl, pH 10.5) 배지를 사용하여 30°C, 200 rpm으로 배양하였다. 30 L fermentor를 이용한 배양은 PM 배지에서 수행하였다. Seed 배양은 100 ml의 LSC 배지를 500 ml 삼각 플라스크에서 배양한 후 다시 PM 배지가 들어있는 2.5 L fermentor에서 배양하였다. 이를 2차 seed로 하여 16-18시간 동안 0.5 vvm, 500-600 rpm으로 배양한 후 다시 동일한 조건의 30 L PM 배지에서 대량배양을 수행하였다. 이때 pH는 10.0으로 조절하였다. 단백질 분해효소 고활성 선별 배지는 LB 배지에 2.5% agar와 1-2% skim milk를 첨가하여 사용하였다. *Escherichia coli*는 재조합 플라스미드의 형질전환 숙주로 사용되었으며 경우에 따라서 chloramphenicol과 ampicillin을 각각 12.5  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml 농도로 첨가하여 사용하였다.

### 재조합 유전자 방법

Chromosomal DNA는 Mamur법(14)을 응용하여 분리하였다(14). 사용한 제한 효소와 변형효소는 New England Biolab (USA)에서 구입하였으며 플라스미드 분리를 위한 kit는 QIAGEN (USA)에서 구입하여 사용하였다. Oligonucleotide는

**Table 1.** Strains and plasmids used in this study

Strains / Plasmids	Genotype /Characteristics	Reference
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i>		
TOP10 <sup>r</sup>	F[tet <sup>r</sup> mcrAΔ(mrr-shdRMS-mcrBC)φ80 ΔlacX74 deoR recA1 araD139(ara,leu)-7697 galU galKλ rpsL endA1 nupG	
<i>V. metschnikovii</i>		
RH530	Protease producing strain, wild type	
KS1	Protease overproducing mutant	
pKF31	KS1 containing pKF31	This study
pDKF310	KS1 containing pDKF310	This study
pKFep5	KS1 containing pKFep5	This study
pDKep5	KS1 containing pDKep5	This study
<b>Plasmids</b>		
pGEMT-Easy	<i>Amp<sup>r</sup></i> T/A cloning vector	Promega
pKF3	<i>Cm<sup>r</sup></i> cloning vector	Takara
pKF31	pKF3 containing <i>vapK-1</i>	This study
pKDF31	pKF3 containing 2 copies of <i>vapK-1</i>	This study
pKFep5	pKF3 containing <i>vapK-2</i>	This study
pDKFep5	pKF3 containing 2 copies of <i>vapK-2</i>	This study

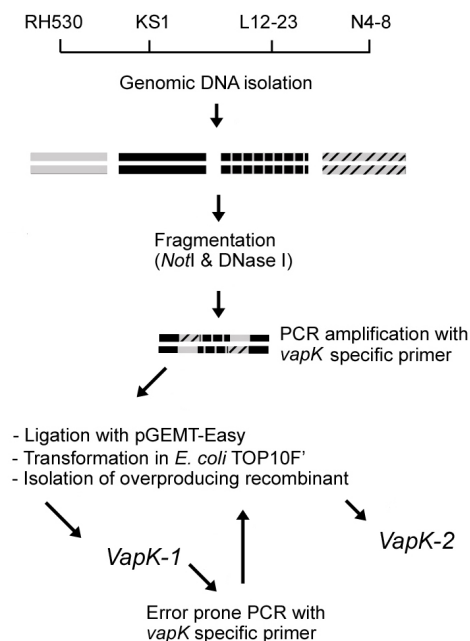
Bioneer (Korea)에서 합성하였으며, DNA sequencing은 Macrogen (Korea)에 의뢰하였다. PCR은 1 min denaturation at 94°C, 1 min annealing at 54°C, and 1 min elongation at 72°C for 40 cycles 조건에서 Perkin-Elmer thermal cycler (model 480)을 사용하였으며, *Taq* polymerase는 Promega (USA)에서 구입하였다. 기타 일반적인 분자생물학적인 방법은 Sambrook 등(15)의 것을 참고하여 사용하였다. *V. metschnikovii*의 형질전환은 Chung 등(5)의 방법에 따라 electroporation법을 사용하였다.

### DNA shuffling

야생형의 *V. metschnikovii* RH530과 classical mutagenesis를 통해 얻은 VapK 고활성 돌연변이주 L12-23, N4-8, KS1 균주(3)의 genomic DNA를 분리한 다음 이를 주형으로 하여 *vapK* specific primer VFuLF (5'-TTTCGGTTTTTCTGCCG)와 VFuLR (5'-CAGACCGTGTACAAGAAG)를 이용하여 *vapK* 유전자를 PCR로 증폭하였다. 증폭된 *vapK* 유전자들은 제한효소 *NotI*으로 절단한 후 DNAse I으로 처리하였다. 이를 Wizard™ Clean-Up system (Promega)을 이용하여 세척 후 회수하였다. 회수된 유전자를 이용하여 *vapK* specific primer와 함께 다시 PCR 반응을 거쳐 *vapK* 유전자를 증폭하여 변형된 유전자를 얻었다(Fig. 1).

### Error-prone PCR

DNA shuffling에 의해 얻어진 변형 *vapK* 유전자를 주형으로 하여 error-prone PCR을 수행하였다. Error-prone PCR은



**Fig. 1.** Schematic diagram of DNA shuffling and error-prone PCR. Genomic DNAs from the classical mutants of alkaline protease-overproducing *V. metschnikovii* L12-23, N4-8, and KS1 and wild type RH530 were used as templates for the shuffling.

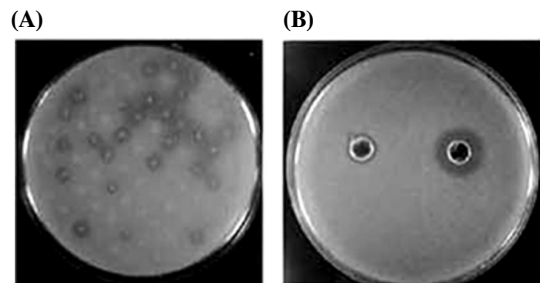
GeneMorph™ PCR Mutagenesis kit (Stratagene Co.)를 사용하였다. 간단히 보면 100 ng의 *vapK-1*을 포함하는 50  $\mu$ l의 반응액에 200  $\mu$ l의 4 dNTP와 250 ng/ $\mu$ l의 primer를 첨가한 다음 Mutazyme II 완충용액을 넣은 후 Mutazyme II DNA polymerase를 넣어 반응시켰다. 이로부터 변형된 *vapK* 유전자 후보들을 얻었다(Fig. 1).

### 고활성 *vapK* 유전자를 가진 재조합 플라스미드의 제작

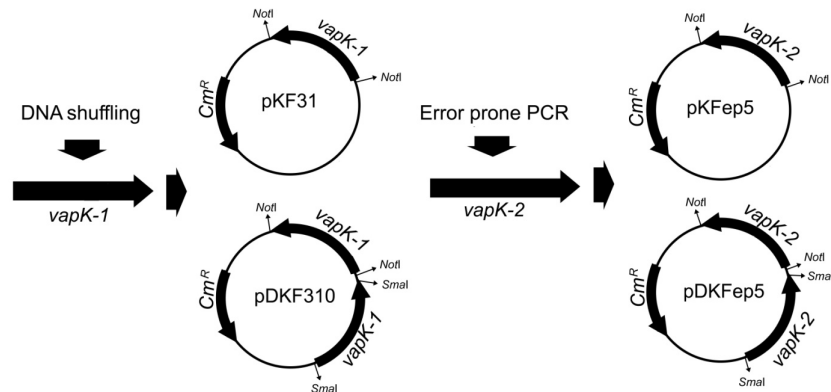
DNA shuffling에 의해 얻은 변형 *vapK* 유전자들을 pGEMT-easy vector에 cloning 한 후 이를 대장균에 형질전환 시켰다. 나타난 형질전환체로부터 단백질 분해효소 선별배지에서 큰 투명환(clear halo)을 보이는 대장균으로부터 재조합 플라스미드를 분리한 후 이를 제한효소 *NotI*으로 절단하여 변형 *vapK* 단편을 분리(*vapK-1*라 명명)한 다음, 이를 같은 제한효소로 절단된 플라스미드 pKF3로 삽입하여 pKF31을 제작하였다. 제작된 pKF31을 제한효소 *SmaI*으로 절단하고, 이에 Klenow 효소를 처리(15)하여 blunt end로 만든 *vapK-1* 단편을 결합시켜, 2 copy의 *vapK-1*이 삽입된 pDKF310 제작하였다. *vapK-1*을 주형으로 하여 error-prone PCR 방법에 의해 얻어진 단편(*vapK-2*라 명명)을 얻어 동일한 방법으로 *vapK-2* 단편이 1 copy 삽입된 pKFep5와 2 copy 삽입된 pDKFep5를 제작하였다(Fig. 3).

### 단백질 분해효소 활성도 측정

단백질 분해효소 활성 측정방법은 Yanagida 등(18)의 방법을 변형하여 사용하였다. 2% casein이 포함된 100 mM sodium carbonate 용액(pH 10.5) 2.5 ml과 동일 완충용액에 희석시킨 세포 배양액을 0.5 ml을 섞어 37°C에서 10분간 반응 시킨 후 정지용액(0.22 M trichloroacetate, 0.22 M acetic acid, 0.22 M sodium acetate)을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 이 반응액을 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 회수 한 후, 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit의 단백질 분해효소 활성도(PU)는 10분간 반응 시킨 반응액의 흡광도가 0.1 증가하는 양으로 정하여 사용하였다.



**Fig. 2.** Screening of recombinant *E. coli* which shows the alkaline protease production. (A) *E. coli* transformants harboring the recombinant plasmid containing the shuffled *vapK*. (B) Isolated *E. coli* which overproduces alkaline protease. The isolated strain harboring plasmid pDK310 containing the two copies of *vapK-1* shows large clear halo.



**Fig. 3.** Strategies for the cloning of modified *vapK* genes. The *vapK-1*, obtained by DNA shuffling and *vapK-2*, obtained by error-prone PCR were cloned and back-transformed to *V. metschnikovii* KS1. Recombinant plasmids that contain single or double copy of each gene were constructed.

## 결과 및 고찰

### 분자진화 기법을 통한 *vapK* 유전자 변형 및 고활성 변이 유전자 선별

야생형인 *V. metschnikovii* RH530과 classical mutagenesis를 통해 얻은 VapK 고생산 균주인 L12-23, N4-8 그리고 KS1의 *vapK* 유전자를 PCR로 얻은 다음, 이를 이용하여 DNA shuffling을 수행하여 변형된 *vapK* 유전자들을 얻었다. 이 유전자들을 클로닝하고 대장균에 형질전환한 후 skim milk를 포함하는 LB 배지에 배양하였을 때(Fig. 2A) 가장 큰 투명환을 보인 균주를 선별하였다(Fig. 2B). 이 균주로부터 재조합 플라스미드를 분리하여 변형 *vapK* 유전자를 분리한 결과 *V. metschnikovii*의 *vapK* 고유의 프로모터 부위를 포함한 1.6 kb의 *vapK* 유전자 후보들을 얻을 수 있었다. 이는 *vapK*가 가지고 있는 *V. metschnikovii* 고유의 프로모터가 대장균에서도 안정적으로 작동한다는 것을 나타내며, 또한 단백질 분해효소 고생산 재조합 플라스미드 선별이 대장균에서 가능하다는 것을 나타낸다. 재조합 대장균에서 선별된 고활성 변이 *vapK* 유전자를 *vapK-1*이라 명명하였다. 이후 *vapK-1*이 1 copy 삽입된 플라스미드 pKF31과 2 copy 삽입된 플라스미드 pDKF310을 제조하여 단백질 분해효소 고생산 균주인 *V. metschnikovii* KS1으로 역도입 하였다. 한편 얻어진 *vapK-1*을 주형으로 하여 error-prone PCR을 수행하였다. 재변이가 예상되는 증폭된

**Table 2.** Comparison of alkaline proteases activities

Host <sup>a</sup>	Plasmid	Protease activity <sup>b</sup> (PU/ml)	Activity increase (fold)
<i>V. metschnikovii</i> RH530	-	160	0.1
<i>V. metschnikovii</i> KS1	-	1808	1
	pKF31	2953	1.6
	pDKF310	6057	3.6
	pKFep5	4550	2.5
	pDKFep5	6980	3.9

<sup>a</sup> Cells were grown in 500 ml flask containing 100 ml of PM medium for 45 h at 30°C.

<sup>b</sup> Mean value of three independent experiments.

*vapK* 유전자 후보들은 앞선 방법과 동일하게 대장균에 형질전환하여 고활성 변이 유전자를 선별하였으며, 이를 *vapK-2*라 명명하고, *vapK-2* 유전자가 1 copy 삽입된 pKFep5와 2 copy 삽입된 pDKFep5는 앞선 방법과 동일하게 숙주인 *V. metschnikovii* KS1으로 역도입하였다(Fig. 3).

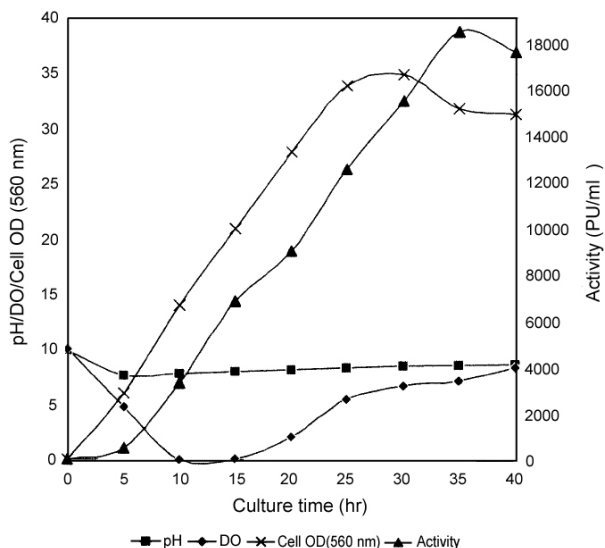
### 재조합 *V. metschnikovii*의 단백질분해 활성 비교

제작된 재조합 플라스미드 pKF31, pDKF310, pKFep5 그리고 pDKFep5를 가진 재조합 *V. metschnikovii* KS1과 야생균주인 *V. metschnikovii* RH530, 숙주 균주인 *V. metschnikovii* KS1의 단백질분해 활성 정도를 비교·분석하였다. 그 결과 classical mutagenesis에 의해 제작된 VapK 고생산 숙주인 KS1 (1,808 PU/ml)에 비해 적게는 1.6배(2,953 PU/ml)에서 많게는 3.9배(6,980 PU/ml)의 높은 단백질 분해 활성도를 보였다(Table 2). 또한 이는 야생균주인 *V. metschnikovii* RH530 (160 PU/ml)과 비교하였을 경우 *vapK-2*가 2 copy인 pDKFep5는 약 43.6배의 높은 단백질 분해 활성도를 보였다. 이 결과는 전통적인 무작위 돌연변이법에 의해 KS1 균주가 야생형보다 약 11.3배 높은 역가를 보이는 것과 비교할 때, DNA shuffling, error-prone PCR 및 재조합 DNA을 통한 방법은, 무작위 돌연변이법을 통한 누적된 변이로 인해 더 이상 단백질 분해 활성도를 향상시키지 못했던 점을 극복하는 효율적 방법임을 나타낸다.

### 변이 VapK의 특성

얻어진 두 유전자 *vapK-1*과 *vapK-2* 유전자와 아미노산 서열을 *vapK*와 비교하였다. Figure 4에서 나타난 바와 같이 VapK의 active site인 D<sup>169</sup>, H<sup>202</sup> 그리고 S<sup>358</sup>는 *Pseudomonas* sp.의 단백질 분해효소(10), *Vibrio* alkaline protease T (13), elastase YaB (9), subtilisin Carsberg (16), *V. alginolyticus*의 exoprotease A (6), 그리고 *T. album*의 proteinase K (7) 등과 비교하였을 경우 동일 부위에 보존되어 있으며(자료 미제시), Ca<sup>++</sup>-binding site의 경우 *vapK-2*의 V<sup>219</sup>이 N<sup>219</sup>으로 변형된 반면, *vapK-1*은 아무런 변화 없이 잘 보존되어 있는 것으로 나





**Fig. 5.** Fermentation (30 L) of *V. metschnikovii* KS1 harboring plasmid pDK310 that contains two copies of *vapK-1*. Cells were cultured in PM medium as described in text. Maximum activity was obtained after 35 h culture with growth-dependent manner.

### 적요

알칼리성 단백질 분해효소 고생산 돌연변이 균주 *Vibrio metschnikovii* L12-23, N4-8, KS1으로부터 알칼리성 단백질 분해효소를 암호화하는 *vapK* (*Vibrio* alkaline protease K) 유전자들을 PCR에 의하여 분리한 다음 DNA shuffling, error-prone PCR 방법과 같은 분자진화 기술을 통해 고효율 단백질 분해효소를 생산하는 재조합 *V. metschnikovii* 균주를 제작하였다. DNA shuffling 방법을 통해 변형시킨 *vapK-1* 유전자와 이 유전자를 주형으로 error-prone PCR 기법을 통해 재 변형된 *vapK-2* 유전자를 cloning한 후 *V. metschnikovii* KS1 균주에 역도입하여 재조합 균주를 제조하였다. 재조합 균주들의 단백질 분해 능력을 조사한 결과 *vapK-2* 유전자가 2 copy 도입된 재조합 균주의 경우 야생형 균주인 *V. metschnikovii* RH530에 비해 43.6배 높은 단백질 분해활성을 보였으며 숙주인 *V. metschnikovii* KS1에 비해 약 3.9배 향상된 단백질 분해 활성을 확인할 수 있었다. 변형된 *vapK-1*과 *vapK-2* 유전자를 야생형 *vapK* 유전자의 염기서열을 비교·분석한 결과 단백질 분해 능력의 활성에 영향을 미치는 active site를 제외한 부분에서 변화가 일어났음을 확인할 수 있었다. 변형된 유전자 *vapK-1*을 two copy를 포함한 재조합 플라스미드를 가진 *V. metschnikovii* KS1을 30 L fermentor로 배양 하였을 때 배양 후 35 시간에 18,000 PU/ml의 활성을 보였으며, 이는 향후 산업용 균주로서 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

### 감사의 말

본 연구는 한국외국어 대학교 2010년도 교내학술연구비 지원에 의한 결과임.

### 참고문헌

- Anwar, A. and S. Mohammed. 1998. Alkaline proteases: a review. *Bioresour. Technol.* 64, 139-144.
- 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. *Proc. Biochem.* 35, 213-219.
- Chung, S.S., Y.U. Shin, H.J. Kim, G.H. Jin, H.M. Rho, and H.H. Lee. 2000. Isolation of high yielding alkaline protease mutants of *Vibrio metschnikovii* strain RH530 and detergency properties of enzyme. *J. Microbial. Biotechnol.* 10, 349-354.
- Chung, S.S., H.J. Kim, Y.U. Shin, G.H. Jin, and H.H. Lee. 2001. Molecular characterization of gene encoding an extracellular alkaline protease in *Vibrio metschnikovii*. *Biotechnol. Lett.* 23, 1175-1182.
- Chung, S.S., Y.U. Shin, H.J. Kim, G.H. Jin, and H.H. Lee. 2001. Transformation of an alkaline protease overproducer, *Vibrio metschnikovii* strain RH530, and improvement of plasmid stability by the *par* locus. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 222-228.
- Deane, S.M., F.T. Robb, and D.R. Woods. 1987. Production and activation of a SDS-resistant alkaline serine exoprotease of *Vibrio alginolyticus*. *J. Gen. Microbiol.* 133, 391-398.
- Gunkel, F.A. and H.G. Gassen. 1989. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *Eur. J. Biochem.* 179, 185-194.
- Gupta, R., Q.K. Beg, and P. Lorenz. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 15-32.
- Kaneto, R., N. Koyama, Y.C. Tsai, R.Y. Juang, K. Yoda, and M. Yamasaki. 1989. Molecular cloning of the structural gene for alkaline elastase YaB, a new subtilisin produced by an alkalophilic *Bacillus* strain. *J. Bacteriol.* 171, 5232-5236.
- Ko, H., W.H. Jang, E.K. Kim, H.H. Lee, K.D. Park, J.H. Chung, and O.J. Yoo. 1996. Enhancement of thermostability and catalytic efficiency of AprP, an alkaline protease from *Pseudomonas* sp. by the introduction of a disulfide bond. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221, 631-635.
- Kumar, C.G. and H. Takagi. 1999. Microbial alkaline proteases from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.* 17, 561-594.
- Kwon, Y.T., S.Y. Moon, J.O. Kim, Y.H. Kho, and H.M. Rho. 1992. Characterization of extracellular proteases from alkalophilic *Vibrio* sp. strain RH530. *Kor. J. Microbiol.* 30, 501-506.
- Kwon, Y.T., J.O. Kim, S.Y. Moon, H.H. Lee, and M.M. Rho. 1994. Extracellular alkaline proteases from alkalophilic *Vibrio metschnikovii* strain RH530. *Biotechnol. Lett.* 16, 413-418.
- Mamur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208-218.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd (ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y., USA.
- Smith, E.L., R.J. DeLange, W.H. Evans, M. Landon, and F.S. Markland. 1968. Subtilisin Carlsberg. V. The complete sequence; comparison with subtilisin BPN'; evolutionary relationships. *J. Biol. Chem.* 243, 2184-2191.
- Stemmer, W.P. 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10747-10751.
- Yanagida, N., T. Uozumi, and T. Beppu. 1984. Specific excretion of *Serratia marcescens* protease through the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 166, 937-944.