

호알칼리성 *Bacillus pseudofirmus* HS-54가 생산하는 알칼리성 Protease의 특성

방성호* · 정인실*
한서대학교 생명과학과

Characterization of an Alkaline Protease from an Alkalophilic *Bacillus pseudofirmus* HS-54

Seong Ho Bang* and In-Sil Jeong*

Department of Biological Sciences, Hanseo University, Seosan 356-706, Republic of Korea

(Received August 19, 2011 / Accepted September 5, 2011)

An alkalophilic bacterium producing alkaline protease was isolated from waste water and solar saltern sample and identified as *Bacillus pseudofirmus* HS-54 based on morphological, biochemical characteristics as well as 16S-rRNA gene sequencing. The HS-54 protease was purified to homogeneity using ammonium sulfate precipitation, DEAE cellulose column chromatography, and sephadex G-100 gel filtration with a 4.0 purification fold. The molecular mass of the purified enzyme was estimated by SDS-PAGE to be 27 kDa. The optimal pH and temperature for the purified protease activity were 10.0 and 50°C, respectively. The purified enzyme was relatively stable at the pH range of 6.0-11.0 and at the temperature below 50°C. This enzyme was activated by Ca²⁺ and Mg²⁺ and inhibited by Hg²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Al³⁺, Ag²⁺. And this enzyme was strongly inhibited by PMSF, suggesting that it belongs to the serine protease superfamily.

Keywords: *Bacillus pseudofirmus* HS-54, alkaline protease, purification, serine protease

미생물의 protease는 가수분해 효소 중 가장 중요하며 활발한 연구가 이루어지고 있는 효소이다. 전 세계 효소판매량의 약 60%를 차지하고 있는 protease는 세제산업, 피혁가공, 식품산업 등 각종 산업분야에 널리 응용되고 있다(11, 17, 22). Protease는 활성부위에 존재하는 주요 기능기에 따라 serine protease, aspartic protease, cysteine protease, metallo protease의 4종류로 구분하거나 효소 활성의 최적 pH에 따라 산성 protease, 중성 protease, 알칼리성 protease로 분류하기도 한다. Protease는 동식물과 세균, 곰팡이 등의 다양한 미생물에서 생산되는데, 동물과 식물에서 유래한 protease는 다양한 산업적 수요를 충족하기에 공급이 제한되어 있다(26). 그러므로 안정성과 생산성, 비용절감 등 경제적인 면이나 공업적 규모의 활용 측면에서 많은 장점이 있는 미생물 유래의 protease를 생산하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있다(11, 12, 28).

Bacillus 속 균주는 생육이 양호하고 다양한 특성을 가지고 있어서 유전자 및 효소에 대한 기초 연구와 산업적 연구가 폭

넓게 이루어지고 있으며, *Bacillus* 속에서 알칼리성 protease가 발견된 이후로 산업적 요구에 알맞은 고열, 넓은 pH, 다양한 농도의 염 등에서 높은 효소 활성과 안정성을 유지하는 효소를 생산하는 균주의 탐색과 선별에 많은 연구가 시도되고 있다(6, 11, 30). 상업적 응용을 목적으로 생산되고 있는 세균 유래의 protease는 대부분 알칼리성 protease이다. 알칼리성 protease에 관한 연구로는 Horikoshi (15)가 *Bacillus* sp.를 분리하여 효소학적 특징을 발표한 이후, *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. cereus* 등을 포함한 여러 *Bacillus* 속 균주들이 알려지고 있다(3, 4, 7).

본 연구에서는 충남 서북부 일대의 폐수 및 염전에서 호알칼리성 세균을 분리하던 중, 알칼리 영역의 pH에서 높은 protease 활성을 나타내는 *Bacillus* 속 균주 HS-54를 분리·동정하였고, HS-54가 생산하는 protease를 분리·정제하고 그 특성을 확인하였다.

재료 및 방법

세균의 분리 및 동정

충남 서북부 일대의 축사 폐수 및 염전에서 채취한 시료를

* For correspondence. (S.H. Bang) E-mail: bang342@hanseo.ac.kr; Tel.: +82-41-660-1342; Fax: +82-41-668-3403 / (I.S. Jeong) E-mail: ijoung@hanseo.ac.kr; Tel.: +82-41-660-1341; Fax: +82-41-668-3403

멸균된 증류수로 희석하여 분리용 고체배지에 접종하여 균주를 분리하였다. 호알칼리성이면서 protease를 생산하는 균주를 분리하기 위한 배지는 LB 고체배지를 기본으로 하여 pH를 10.0으로 조정하기 위해 멸균된 Na_2CO_3 (20%, w/v)를 첨가하였고 protease 생성을 확인하기 위해 1.5% skim milk (w/v)를 첨가한 것을 사용하였다. 알칼리성 protease 생산용 배지는 분리용 배지에서 한천을 제외한 액체배지를 사용하였다. 분리용 고체배지에 희석된 시료를 도말하여 28°C에서 2일간 배양한 후, 생육이 좋고 단일 집락 주변에 상대적으로 커다란 투명환(clear zone)을 형성하는 균주들을 일차 선별하였다. 이들 중 상대적 활성이 강하고 생육정도가 우수한 균주들을 이차 선별하였고, 이차 선별된 균주들의 효소활성을 측정하여 가장 높은 알칼리성 protease를 생산하는 HS-54을 선별하였다.

HS-54의 동정을 위해 그람염색, 포자염색 및 주사 전자현미경(JEOL, JSM-5600)을 이용하여 형태적 특성을 확인하였고, 생리생화학적 특성을 확인하기 위하여 인돌생성 유무, MR-VP 시험, catalase와 oxidase 활성시험, citrate 이용 여부 시험, 탄소원 이용 여부 시험 등을 수행하였다. (주)솔젠트에 의뢰하여 16S rRNA 유전자 염기서열을 확인하였는데, 분리 세균의 16S rRNA 유전자는 8F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3')을 primer로 이용하여 PCR을 수행해서 증폭하고 염기서열을 확인했으며, 여러 균주들과의 상동성을 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Logical Alignment Search Tool (BLAST)를 통하여 확인하고, 분리균주를 동정하였다.

효소 활성측정

알칼리성 protease의 활성은 Yanagida 등(32)의 방법을 변형하여 측정하였다. 기질용액(0.6% Hammerstein casein 용액)은 50 mM sodium bicarbonate buffer solution (pH 10.0) 100 ml에 casein 0.6 g을 녹이고, 5분간 중탕 가열하여 제조하였다. 효소반응은 적절히 희석한 효소용액(120 μl)을 기질용액(600 μl)과 혼합하여 28°C에서 30분간 반응시켰다. 이후에 TCA 혼합용액(0.11 M trichloroacetic acid, 0.22 M sodium acetate, 0.33 M glacial acetic acid) 600 μl 를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 효소 활성은 이 효소반응물을 30분 동안 실온에서 방치한 뒤 원심분리(4°C, 12,000×g, 15 min)하여 상등액을 취해 UV-spectrophotometer (SPECTRO UV-VIS RS)로 흡광도(A_{280})를 측정함으로써 결정하였다. 1 unit의 효소 활성도는 위의 조건에서 1분 동안에 1 μg 의 tyrosine에 해당하는 아미노산을 생성하는 효소의 양으로 하였다.

단백질의 농도는 Bradford의 방법(5)으로 bovine serum albumin (Bio-Rad)을 표준시료로 하여 측정하였다.

효소의 정제

효소의 정제를 위해 HS-54를 대량배양하여 얻은 조효소액을 ammonium sulfate (30-80%)로 분별침전시키고 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물은 탈염 후, 20 mM

phosphate buffer (pH 7.5)로 용해시키고 미리 평형화한 DEAE-cellulose column (1.5×20 cm)에 주입하여 NaCl 용액(0.05-0.5 M)을 이용한 농도구배법으로 용출한 후 활성성분을 회수하였다. 활성성분의 효소액은 동일 완충액으로 평형화한 sephadex G-100 column (2.5×50 cm)에 통과하여 정제하였다.

전기영동

SDS-PAGE는 Laemmli의 방법(23)으로 acrylamide 함량은 10%로 하여 수행하였다. 전기영동 후, coomassie brilliant blue R 250으로 염색하였고, 탈색액(acetic acid 70 ml, methanol 930 ml, DW 1,000 ml)으로 탈색하여 관찰하였다. 분자량 측정을 위한 표준단백질 시료는 Bio-Rad 사의 phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa), lysozyme (14.4 kDa)를 사용하였다.

효소의 특성

효소의 최적 pH 및 안정성: 정제한 효소의 최적 pH를 조사하기 위하여 pH 5.0-6.0은 0.1 M citric acid-NaOH buffer, pH 7.0-9.0은 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 10.0은 0.1 M NaHCO_3 -NaOH buffer, pH 11.0-12.0은 0.1 M Na_2HPO_4 -NaOH buffer로 각각 pH별로 기질용액을 만들어 최적온도인 50°C에서 30분간 반응시켜 그 활성을 측정하였다. 또한 정제한 효소의 pH 안정성을 조사하기 위하여 위 buffer들을 이용하여 pH 5.0에서 12.0까지 각각의 pH를 조절하여 50°C에서 30분간 처리한 후 최적 pH인 10.0으로 조정된 후에 잔존활성을 조사하였다.

효소의 최적온도 및 열안정성: 정제한 효소의 최적온도를 조사하기 위하여 반응액의 pH를 최적 pH인 10.0으로 하여 0°C-80°C까지 각 온도별로 30분간 효소 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다. 또한 정제한 효소의 열안정성을 조사하기 위하여 0°C에서 80°C까지 각 온도 별로 30분간 열처리한 후 최적온도인 50°C에서 기질과 반응시켜 그 잔존활성을 조사하였다.

금속염의 영향: 정제한 효소의 활성에 미치는 금속염의 영향을 조사하기 위하여 다음의 금속염[NaCl, KCl, CaCl_2 , FeCl_3 , MgSO_4 , CuSO_4 , HgCl_2 , MnSO_4 , ZnCl_2 , $\text{AlK}(\text{SO}_4)$, AgNO_3 , BaCl_2]들을 최종농도가 1 mM과 5 mM이 되도록 각각 첨가하여 50°C에서 30분간 효소를 처리한 후 효소의 활성을 조사하였다.

단백질 분해효소 저해제의 영향: 정제한 효소의 활성에 영향을 주는 여러 가지 저해제의 효과를 조사하기 위하여 다음의 저해제[PMSF; phenylmethanesulfonyl fluoride, SDS; sodiumdodecyl sulfate, EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid, EGTA; ethylene glycol-bis-(β -aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetra-acetic acid, L-cysteine]들을 최종농도가 1 mM과 5 mM

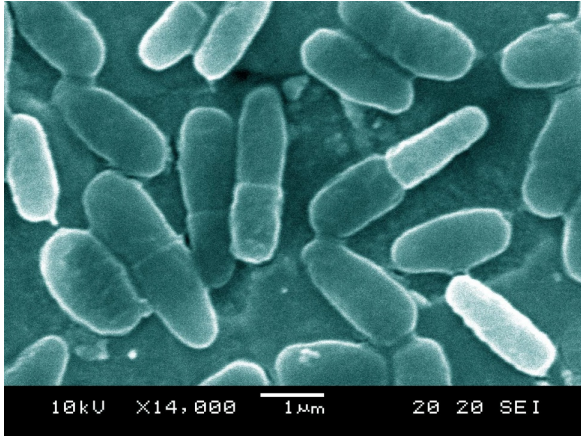


Fig. 1. Scanning electron micrograph of the *B. pseudofirmus* HS-54 cultured on the isolation medium for 24 h.

또는 0.5%가 되도록 각 저해제를 첨가하여 50°C에서 30분간 반응시킨 후 효소의 잔존활성을 조사하였다.

결과 및 고찰

세균의 분리 및 동정

HS-54는 간균이며 크기는 직경이 0.6 µm-0.9 µm, 길이 1.8 µm-2.0 µm이다(Fig. 1). 또한 HS-54는 그람 양성이고, 운동성이 있고 포자가 존재하였고, catalase 시험은 양성, oxidase 시험은 음성, MR-VP 시험은 음성이었고, glucose, xylose, lactose, maltose, sucrose를 이용하여 산과 기체를 생성하지 않았다. 이와 같이 HS-54의 형태적, 생화학적 특징들은 *Bacillus* 속의 특징을 나타냈으며, 16S rRNA 유전자 서열을 확인한 결과 HS-54는 *Bacillus pseudofirmus* (GenBank accession no. CP001878)와 99%의 유사성을 나타냈다(자료 미제시). 이상의 결과로 HS-54를 최종적으로 *Bacillus pseudofirmus* HS-54로 동정하였다.

효소의 정제

B. pseudofirmus HS-54 배양액에서 균체를 제거한 조효소액을 ammonium sulfate (30-80%)로 침전시킨 단백질을 20 mM phosphate buffer (pH 7.5)에 녹여 DEAE cellulose column과 sephadex G-100 column에 주입하여 용출시켜 효소를 정제하였다(자료 미제시). 이상의 정제과정을 요약하면 Table 1과 같으며 최종 수율은 2.3%였고 효소의 비활성은 약

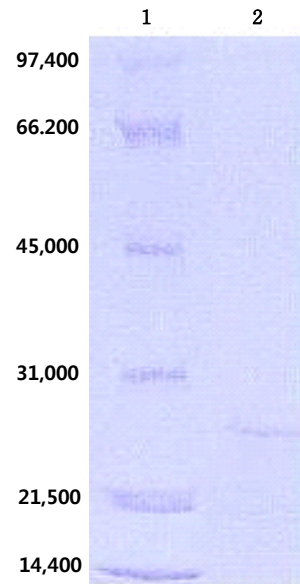


Fig. 2. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of purified alkaline protease from *B. pseudofirmus* HS-54. Lanes: 1, molecular weight marker; 2, purified enzyme after sephadex G-100.

4배 증가하였다.

정제한 단백질 분해효소의 단일성을 확인하기 위하여 SDS PAGE한 결과 단일 band를 얻었으며, 그 분자량은 표준 단백질과 상대이동거리를 비교한 결과 약 27 kDa으로 측정되었다(Fig. 2). 일반적으로 *Bacillus* 속에서 생성되는 알칼리성 protease들의 분자량은 15-38 kDa인데(1, 10, 13, 16, 20, 27, 29, 31), HS-54의 알칼리성 protease도 이 범위내의 분자량을 지니고 있었다.

효소의 특성

효소의 최적 pH 및 pH 안정성: *B. pseudofirmus* HS-54의 protease의 최적 활성 pH를 알아보기 위하여 pH (5.0-12.0) 별로 50°C에서 30분간 반응시켜 그 활성을 측정·비교하였다(Fig. 3). 효소의 최적 활성 pH는 10.0 (100%)이었고, pH 11.0에서도 98%의 활성을 나타냈고 pH 9.0에서는 92%, pH 8.0에서는 86%의 활성을 나타냈지만, pH 8.0 이하에서는 활성이 급격히 감소하는 것으로 판단할 때, HS-54가 생산하는 protease는 알칼리성 protease로 확인되었다. 또한 효소의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 효소 반응액을 각 pH로

Table 1. Purification procedures of the alkaline protease from *B. pseudofirmus* HS-54

Procedures	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Culture broth	10,279,000	1,700	6,064	1	100
30-80%(NH ₄) ₂ SO ₄	3,211,704	396	8,110	1.34	31.2
DEAE cellulose	1,102,572	108	10,209	1.68	10.7
Sephadex G-100	235,952	9	25,647	4.13	2.3

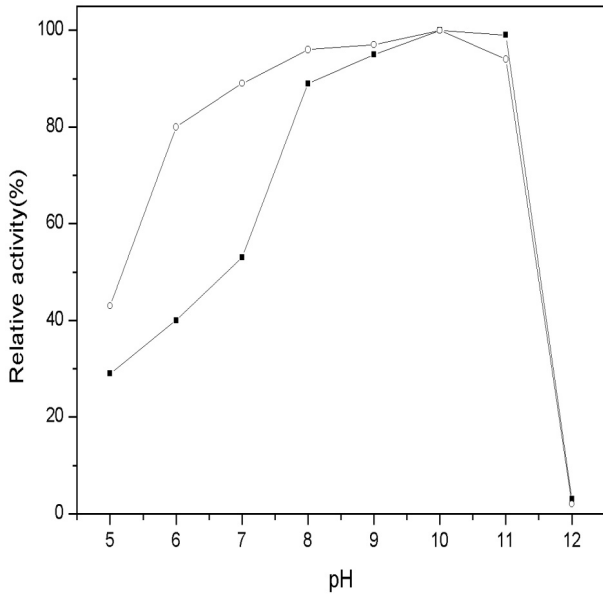


Fig. 3. Effects of pH on the protease activity and stability of *B. pseudofirmus* HS-54. Symbols: (■) protease activity; (○) protease stability.

조절하여 50°C에서 30분간 처리한 후, 최적 pH인 10.0으로 조정하여 잔존활성을 측정된 결과, pH 7.0-11.0까지 비교적 안정하였고 pH 11.0 이상과 pH 7.0 미만에서는 효소활성이 급격히 감소하였다.

B. licheniformis NCIBM 6816에서 생산하는 subtilisin Carlsberg를 비롯한 *Bacillus* 속의 세균들이 생산하는 많은 알칼리성 protease들의 최적 활성 pH는 8.0-10.0이다(10, 16, 27, 29). *B. licheniformis* NH1가 생산하는 알칼리성 protease는 pH 11.0에서도 높은 활성을 나타내는데(14), HS-54의 protease도 pH 11.0에서 상대적으로 높은 활성을 나타냈다.

HS-54 protease의 pH에 대한 안정성은 pH 7.0-12.0에서 안정한 *B. licheniformis* NH1(13), pH 8.0-10.0에서 안정한 *B. subtilis* PE-11(1), pH 8.0-11.0에서 안정한 *B. subtilis* VSG-4(10) 등과 다르게 pH 7.0-11.0에서 안정하였다. 하지만 HS-54의 protease는 pH 12.0에서 급격히 감소하였는데, 호염성호알칼리성 세균에서 분리한 protease가 pH 12 이상에서 비교적 높은 안정성을 갖는 특징을 나타내는 것(8)으로 보아 환경에 고농도로 존재하는 염과 protease의 안정성이 서로 연관된 것 같다.

세제의 일반적인 pH가 9.0-12.0이므로 pH 10.0-11.0에서 최적 활성을 나타내고 pH 7.0-11.0에서 안정하게 활성을 유지하는 HS-54의 알칼리성 protease는 세제용 효소로서의 이용 가능성이 높다고 판단된다.

효소의 최적 온도 및 열안정성: *B. pseudofirmus* HS-54가 생산하는 알칼리성 protease의 최적 반응온도를 조사하기 위하여 반응액의 pH는 10.0으로 온도는 0°C에서 80°C까지 각

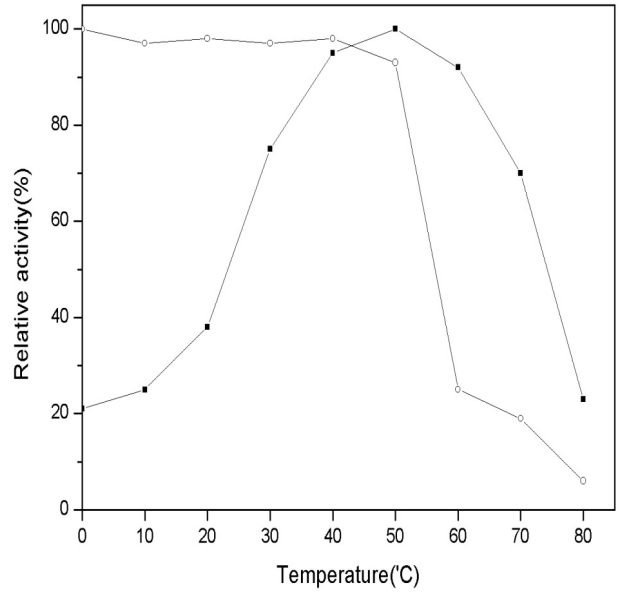


Fig. 4. Effects of temperature on the protease activity and stability of *B. pseudofirmus* HS-54. Symbols: (■) protease activity; (○) protease stability.

온도별로 30분간 효소 반응시킨 후, 그 활성을 조사한 결과 50°C에서 최적의 활성을 나타내었다. 또한 효소의 열에 대한 안정성을 알아보기 위하여 0°C에서 80°C까지 온도를 변화하여 각각의 온도에서 30분간 열처리한 후 50°C에서 기질과 반응시켜 그 잔존활성을 측정된 결과 10°C에서 50°C까지 안정하였으나 60°C 이상에서는 불안정하였다(Fig. 4). 즉, HS-54의 알칼리성 protease의 열안정성은 *B. subtilis* DM-04(37°C-45°C) 보다는 높았고, *B. subtilis* VSG-4(30°C-70°C), *B. licheniformis* NH1(65°C-70°C) 보다는 낮았다(10, 14). 또한 HS-54가 생산하는 알칼리성 protease는 60°C 이상에서 효소활성이 급격히 감소되었지만, 20°C인 저온에서 최적온도의 약 38% 정도의 활성을 보였으므로 우리나라를 비롯한 동북아시아의 저온 세탁조건에 맞는 세제첨가용 효소로서의 이용가능성이 높다고 판단된다.

금속 이온의 영향: *B. pseudofirmus* HS-54에서 정제한 알칼리성 protease의 활성에 미치는 다양한 금속이온(Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} 등)의 영향을 조사하기 위하여 최종 농도가 1 mM과 5 mM이 되도록 해당 금속이온의 금속염을 첨가하여 50°C에서 30분간 효소를 전처리시킨 후 효소의 잔존 활성을 조사하였다(Table 2). Ca^{2+} 에 의해서는 활성이 증진(34%)되었고, Mg^{2+} 와 Ba^{2+} 등의 2가 양이온에 의해서는 약간의 활성이 증진되었다. 또한 Mn^{2+} 와 1가 양이온인 Na^+ , K^+ 는 효소 활성에 영향을 주지 않았지만, Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , Ag^+ 등은 효소 활성을 억제하였다. Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 의 protease 활성 증진 효과와 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} 등의 억제 효과에 대해서는 많은 연구 결과가 있었다(2, 18, 21, 24,

Table 2. Effects of metal ions on protease activity

Metal ion	Relative activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100	100
NaCl	102	97
KCl	104	99
CaCl ₂	105	134
FeCl ₃	98	78
MgSO ₄	103	102
CuSO ₄	60	10
HgCl ₂	52	9
MnSO ₄	104	100
ZnCl ₂	98	72
AlK(SO ₄) ₂	98	75
AgNO ₃	91	55
BaCl ₂	105	103

Metal ions were preincubated with the enzyme solution at 50°C for 30 min. Buffer system: 0.1 M NaHCO₃-NaOH buffer (pH 10.0)

25, 27, 29). Ca²⁺와 Mg²⁺는 열에 대한 효소의 변성에 보호 작용을 하여 고온에서 효소 구조에 안정성을 제공한다고 제안되고 있다(9). 그러나 Cu²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺ 등은 ligand와 결합하여 효소와 안정된 복합체를 형성하여 효소의 활성을 낮춘다고 알려져 있다(29).

Protease 저해제의 영향: *B. pseudofirmus* HS-54의 알칼리성 protease의 활성에 미치는 다양한 저해제의 영향을 조사하였다(Table 3). HS-54의 알칼리성 protease는 PMSF에 의해 강한 저해작용을 받았다. 이 결과로 HS-54의 알칼리성 protease는 지금까지 연구된 거의 모든 알칼리성 protease와 마찬가지로 serine protease로 판단된다(1, 2, 18, 19, 20). 또한 EDTA에 의해 효소활성이 50% 이상(5 mM에서) 감소되었는데, 이는 이 효소가 금속이온을 보조인자로 요구한다는 것을 나타낸다. 이는 EDTA에 대해 낮은 저해 효과(5 mM에서 20% 이하의 저해 효과)를 나타내는 다른 알칼리성 protease 보다는 세제 첨가물로의 이용에 약간의 단점으로 작용한다(1, 13, 18, 20).

적요

알칼리성 protease를 생산하는 호알칼리성 균주를 분리하여 *Bacillus pseudofirmus* HS-54로 동정하였고, HS-54가 생산하는 알칼리성 protease를 ammonium sulfate 침전, DEAE cellulose chromatography, sephadex G-100 gel filtration을 통과시켜 정제하였는데, 정제된 protease의 분자량은 27 kDa 이었다. 정제된 효소의 반응최적 pH는 10.0이었고 pH 7.0-11.0에서 비교적 안정하였다. 또한 정제된 효소의 반응최적 온도는 50°C이었고 10-55°C에서 안정하였다. 금속이온에 대한 영향은 Ca²⁺와 Mg²⁺ 등에 의해 효소활성이 촉진되었으

Table 3. Effects of inhibitors on protease activity

Inhibitors	Concentration	Relative activity (%)
None		100.0
PMSF	1 mM	2.4
	5 mM	1.9
SDS	0.5%	90.5
	1 mM	62.3
EDTA	5 mM	32.0
	1 mM	78.1
EGTA	5 mM	76.1
	1 mM	98.4
L-cysteine	5 mM	97.1

All reagents were preincubated with the enzyme solution at 50°C for 30 min. Buffer system: 0.1 M NaHCO₃-NaOH buffer (pH 10.0)

나, Hg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Al³⁺ 등에 의해서 효소활성이 저해되었다. 본 효소는 PMSF에 의해 강하게 저해를 받는 것으로 보아 serine protease에 속하는 것으로 판단된다.

감사의 말

본 연구는 2010년도 한서대학교 교내연구비(101 이학 103)에 의해 지원되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Adinarayana, K., P. Ellaiah, and S.D. Prasad. 2003. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 4, 1-9.
- Arulmani, M., K. Aparanjini, K. Vasanthi, P. Arumugam, M. Arivuchelvi, and P.T. Kalaichelvan. 2007. Purification and partial characterization of serine protease from thermostable alkaliphilic *Bacillus laterosporus* AK-1. *World J. Microb. Technol.* 23, 475-481.
- 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.
- Banika, R.M. and M. Prakash. 2004. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiol. Res.* 159, 135-140.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Chung, S.S., Y.U. Shin, H.J. Kim, G.H. Jin, and H.H. Lee. 2001. Transformation of an alkaline protease over-producer, *Vibrio metschnikovii* strain RH530, and improvement of plasmid stability by the par locus. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 222-228.
- Dhandapani, R. and R. Vijayaragvan. 1994. Production of the thermophilic, extracellular alkaline protease by *Bacillus stearothermophilus* AP-4. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 33-35.
- Dodia, M.S., C.M. Rawal, H.G. Bhimani, R.H. Joshi, S.K. Khare, and S.P. Singh. 2008. Purification and stability characteristics of an alkaline serine protease from a newly isolated *Haloalkaliphilic bacterium* sp. AH-6. *J. Ind. Microbiol.*

- Biotechnol.* 35, 121-131.
9. Donaghy, J.A. and A.M. McKay. 1993. Production and properties of alkaline protease by *Aurebasidium pullulans*. *J. Appl. Bacteriol.* 60, 662-666.
 10. Giri, S.S., V. Sukumaran, S.S. Sen, M. Oviya, B.N. Banu, and P.K. Jena. 2011. Purification and partial characterization of a detergent and oxidizing agent stable alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* VSG-4 of tropical soil. *J. Microbiol.* 49, 455-461.
 11. Gupta, R., Q.K. Beg, and P. Rorenze. 2002. Bacterial alkaline proteases : molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 15-32.
 12. Gupta, R., K. Gupta, R. Saxena, and S. Khan. 1999. Bleach-stable alkaline protease from *Bacillus* sp. *Biotechnol. Lett.* 21, 135-138.
 13. Haddar, A., R. Agreibi, A. Bougatef, N. Hmide, A. Sellami-Kamoun, and M. Nasri. 2009. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: purification, characterization and potential application as a laundry detergent. *Bioresour. Technol.* 100, 3366-3373.
 14. Hadi-Ali, N.E., R. Agrebi, B. Ghobel-Frikha, A. Sellami-Kamoun, S. Kanoun, and M. Nasri. 2007. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline protease from a newly isolated *B. licheniformis* NH1. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 515-523.
 15. 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.
 16. Horikoshi, K. 1990. Enzymes of alkalophiles, pp. 275-294. *Microbial Enzyme and Biotechnology*, 2nd ed. MO : Elsevier Applied Science, Amsterdam, Netherlands.
 17. Horikoshi, K. 1996. Alkalophiles : from an industrial point of view. *FEMS Microbiol.* 18, 259-270.
 18. Jaouadi, B., S. Ellouz-Chaabouni, M. Rhimi, and S. Bejar. 2008. Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. *Biochimie.* 90, 1291-1305.
 19. Joo, H.S., C.G. Kumar, C.G. Park, K.T. Kim, S.R. Paik, and C.S. Chang. 2002. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horokoshi*. *Process Biochem.* 38, 155-159.
 20. Kazan, D., A.A. Denizci, M.N.K. Oner, and A. Erarslan. 2005. Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, 335-344.
 21. Kembhavi, A.A., A. Kulkarni, and A. Pant. 1993. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No. 64. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38, 83-92.
 22. Kumar, C.G. and H. Takagi. 1999. Microbial alkaline protease: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.* 17, 561-594.
 23. Laemmli, U.K. 1971. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
 24. Lee, S. and D.J. Jang. 2001. Progressive rearrangement of subtilisin Carlsberg into orderly and inflexible conformation with Ca²⁺ binding. *Biophys. J.* 81, 2972-2978.
 25. Oberoi, R., Q.K. Beg, S. Puri, R.K. Saxena, and R. Gupta. 2001. Characterization and wash performance analysis of an SDS-stable alkaline protease from a *Bacillus* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 493-497.
 26. Panouille, M., J.F. Thibault, and E. Bonnin. 2006. Cellulase and protease preparations can extract pectins from various plant by product. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8926-8935.
 27. Patel, R.K., M.S. Dodia, R.H. Joshi, and S.P. Singh. 2006. Purification and characterization of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *Process Biochem.* 41, 2002-2009.
 28. 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.
 29. Shah, K., K. Mody, J. Keshri, and B. Jha. 2010. Purification and characterization of a solvent, detergent and oxidizing agent tolerant protease from *Bacillus cereus* isolated from the Gulf of Khambhat. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* DOI: 10.1016/j.molcatb.2010.07.010.
 30. Shin, Y.U., G.S. Lee, J.H. Jo, and H.Y. Lee. 2010. Strain development for the overproduction of alkaline protease from *Vibrio metschnikovii* by molecular evolution. *Kor. J. Microbiol.* 46, 383-388.
 31. Uchida, H., D. Kondo, S. Yamashita, T. Tanaka, L.H. Tran, H. Nagano, and T. Uwajima. 2004. Purification and properties of a protease produced by *Bacillus subtilis* CN2 isolated from a Vietnamese fish sauce. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 579-582.
 32. Yanagida, N., T. Uozumi, and T. Beppu. 1986. Specific excretion of *Serratia marcescens* protease through the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 166, 937-944.