J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.
25(6), 915~921(1996)

한국식품영양과학회지

한국재래간장으로 부터 분리한 *Bacillus subtilis* CCKS-1110이 생성하는 Protease의 특성 및 작용양상

최 청† · 최광수 · 조영제* · 임성일 · 김 성 · 손준호 · 이희덕 · 김영활**

영남대학교 식품가공학과
*상주산업대학교 식품공학과
**대구보건전문대학 임상병리과

Characteristics and Action Pattern of Protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111 in Korean Traditional Soy Sauce

Cheong Choi†, Kwang-Soo Choi, Young-Je Cho*, Sung-Il Lim, Sung Kim, Jun-Ho Son, Hee-Duck Lee and Young-Hwal Kim**

Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University, Gyungsan 712-749, Korea
**Dept. of Food Engineering, Sangju National Polytechnic University, Sangju 742-170, Korea*
**Dept. of Clinical Pathology, Daegu Junior College, Daegu 702-240, Korea*

Abstract

An alkaline protease producing microorganism was isolated from Korean traditional soy sauce and identified as *Bacillus subtilis* CCKS-111. The optimum culture condition of *Bacillus subtilis* CCKS-111 for the production of alkaline protease was as follow: 2% soluble starch, 0.2% peptone, 0.1% $(NH_4)_2S_2O_8$, 0.2% $MgSO_4$, pH 7.0, 35°C and 24hrs. The optimum pH and temperature for the enzyme activity of alkaline protease producing *Bacillus subtilis* CCKS-111 were pH 9.0 and 50°C, respectively. The enzyme was relatively stable at pH 6.0~11.0 and at temperature below 40°C. The activity of the enzyme was inhibited by K^+ and Hg^{2+}, whereas Cu^{2+} exhibited rather activating effects on the enzyme activity. Ethylenediaminetetraacetic acid and phenylmethanesulfonyl fluoride inhibited the enzyme activity. This indicates that this is serine protease which requires metal ion group for the enzyme activity. Km value was 2.313×10^{-4}M/L, V_{max} value was 39.216μg/min. This enzyme hydrolyzed casein more rapidly than the hemoglobin.

Key words: *Bacillus subtilis*, protease, soy sauce

서 론

효소는 인류에 의해 오래전부터 이용되어 왔으나 양조, 치즈제조, 피혁공업, 발효 및 각종 기호 식품제조 등 그 용도가 제한되어 있었고 근래에 와서 식품, 의약품, 사료, 섬유, 세제, 화장품공업 등 그 사용범위가 넓어지고 있다(1,2). 대부분의 효소들은 산성이나 중성의 온화한 조건에서 활성을 나타내며 강산, 강알칼리, 고온 및 고농도의 염 등의 극한 환경조건에서 효소의 활용은 좁아질 수 밖에 없으며 특히 알칼리 범위에서 활용되는 효소들은 극히 제한되어 산업화에 이용되기가 어려운 실정이다(3). 그러나 호알칼리성 · 호열성, 호염성미생물 등 특수한 환경조건에서도 생육이 가능한 미생물이 발견되면서(4,5) 호알칼리성 미생물이 생성하는 alkaline protease에도 관심을 가지게 되었다(6-15). Alkaline protease는 환경오염, 특히 세제에 의한 하수오염이 날로 심각해져가고 있는 즈음에서 세제용 효소로서 인정받아 알칼리성이고 anion 계면활성제에 내성이 강한 protease가 미생물로 부터 개발되어 시판되면서 부터 단일효소로서는 세계 최대의 시장성을 가지고 있으며 앞으로도 그 수요량은 증가할 것으로 생각된다. 특히 단백질 가수분해효소가 산업적으로 널리 이용되기 위해서는 효소의 역가가 높아야 될 뿐 아니라 여러가지 극한 조건에서 안정해야 하며 효소자체의 품질이 일

†To whom all correspondence should be addressed

정하고, 대량수요에 신속히 대응할 수 있어야 한다. 이러한 조건에 부합할 수 있는 미생물 효소자원은 공급의 안정성과 유리한 경제성 때문에 산업적으로 매우 중요한 위치를 차지하게 되었고 특히 *Bacillus* sp. 유래의 alkaline protease는 여러 연구자들에 의해 연구되기에 이르렀으나, 같은 *Bacillus* sp.의 protease라도 효소단백질의 특성이 다양하다는 것이 보고되었다(5,6,10, 14-18)

따라서 본연구자들은 산업화에 유리한 강력한 alkaline protease를 생산하는 균주 개발의 일환으로 한국 재래간장에서 protease 활성이 강한 균주를 분리하고 그 균주가 생성하는 효소의 특성과 작용양상을 규명하여 산업화를 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

공시균주

가정에서 염(NaCl)의 농도가 19.1%되게 제조한 재래간장(pH 6.2)에서 분리하여 영남대학교 식품가공학과에서 보관 중인 *Bacillus subtilis* CCKS-111을 사용하였다.

효소 생산 조건

효소 생산에 미치는 배지의 조성을 조사하기 위하여 탄소원, 유기질소원, 무기질소원, 무기염류, 초기 pH, 온도를 조사하였다. 먼저 탄소원은 기본배지(0.2% NH_4NO_3, 0.1% K_2HPO_4, 0.1% KH_2PO_4, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01% yeast extract)에 각 탄소원을 2%되게 조정하여 35°C에서 14시간 배양한 후 배양액을 원심분리하여 균체를 제거하고 상징액을 조효소액으로 하여 protease활성을 측정하였으며, 유기질소원은 0.2%, 무기질소원은 0.1%, 무기염류는 0.2% 되도록 조정하여 위와 같은 방법으로 측정하였다. 초기 pH는 5~9, 배양온도는 25~45°C 범위에서 효소생산용 배지(0.2% soytone, 2% starch, 0.2% $(NH_4)_2S_2O_8$, 0.1% K_2HPO_4, 0.1% KH_2PO_4, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% yeast extract)에서 실시하였다.

효소생산을 위한 배지 및 배양방법

Nutrient broth에서 예비배양한 후 효소생산용 배지에 1%되게 접종하고 24시간 배양하여 조효소액으로 사용하였다.

효소의 부분정제

배양된 배지를 원심분리한 상징액을 조효소액으로 하고, 조효소액에 황산암모늄을 70% 포화되게 가하고 4°C에서 12시간 방치하여 효소단백질을 응집, 침전시켰다. 침전된 효소단백질은 원심분리하여 회수하였고, 반투막에 넣어 0.2M boric acid borax buffer(pH 9.0) 안에서 24시간 동안 투석하였다. 투석 후 동결건조하여 농축하고, Sephadex G-25에 통과시켜 저분자의 불순물질을 제거한 뒤 부분정제효소로 사용하였다.

효소활성 측정법

효소활성은 Anson-Hakihara의 방법(19)을 이용하여 측정하였다. 효소액 0.5ml에 0.2M boric acid-borax buffer(pH 9.0) 1ml를 가한 다음 기질용액(0.6% Harmmarstein milk casein, pH 9.0) 2.5ml를 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.44M trichloroacetic acid 2.5ml를 넣어 반응을 중지시키고 실온에서 10분간 방치한 다음 여과하여 얻은 여액 1ml에 0.55M Na_2CO_3 용액 10ml와 1ml의 Folin-ciocalteu용액을 넣어 37°C에서 30분간 발색시켜 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소단위는 효소액 1ml가 1분간 1μg의 tyrosine을 생성하는 것으로 정하였다.

단백질의 정량

Lowry 등의 방법(20)에 따라 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 단백질량을 측정하였다.

기질특이성

본 효소의 기질에 대한 특이성을 알아보기 위하여 각 0.6%의 casein과 hemoglobin을 제조하여 시간별 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소생성을 위한 최적 조건

배양온도 및 pH의 영향

Bacillus subtilis CCKS-111의 alkaline protease생산을 위한 최적 배양온도와 최적 배양pH를 조사한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 pH 7.0과 35°C에서 최대의 생산을 보였는데 이는 *Bacillus*속의 alkaline protease가 pH 7.5와 35°C에서 최대활성을 보였다는 이 등(27)의 보고와 유사하였다.

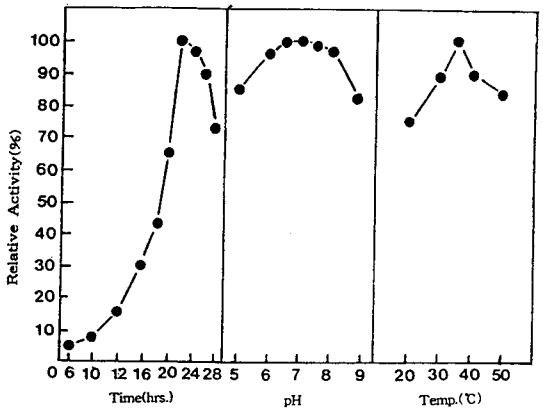

Fig. 1. Effect of incubation time(A), initial pH(B) and incubation temperature(C) on the protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111.

배양시간의 영향

배양시간의 영향을 볼 때 Fig. 1과 같이 24시간 배양시 효소생성이 최대에 달하였으며 황(17)은 *Bacillus* 속 유래의 alkaline protease가 24시간 배양시 최대활성을 나타내었다는 보고와 거의 일치하였다.

탄소원의 영향

효소의 생성에 미치는 탄소원의 영향을 알아보기 위하여 각 탄소원을 2%되게 첨가하고 배양시킨 결과 Table 1에서와 같이 soluble starch 첨가시에 약 104% 정도의 활성 증가가 있었으며 다른 탄소원에서는 활성 증가작용이 나타나지 않았다.

유기질소원의 영향

배지에 유기질소원을 첨가하였을 때 효소생산에 미치는 영향을 살펴 보기 위하여 각종 유기질소원을 각 0.2%씩 배지에 첨가하여 35℃에서 1일간 배양한 결과 Table 1과 같이 peptone이 가장 효과적이었다.

무기질소원의 영향

무기질소원을 배지에 첨가하였을 때 효소생산에 미치는 영향을 살펴 보기 위하여 각종의 무기질소원을 0.1% 농도로 첨가하여 35℃에서 1일간 배양한 결과 Table 1과 같이 $(NH_4)_2S_2O_8$이 가장 효과적이었다.

무기염류의 영향

각종 무기염류를 배지에 각 0.2% 농도로 첨가하고 35℃에서 1일간 배양시킨 결과 Table 1에서와 같이 $MgSO_4$가 가장 효과적이었다. 이는 이 등(27)이 *Bacillus*속의 alkaline protease가 $MgSO_4$에 의해 최대활성을 나타낸다고 보고하였으며 본 실험결과와 유사하였다.

Table 1. Effect of various sources on protease production

Source	Component	Relative activity (%)
Carbon (2%, w/v)	Glucose	50.4
	Soluble starch	103.5
	Fructose	68.8
	Maltose	67.4
	Sucrose	65.2
	Lactose	68.8
	Xylose	62.4
	Galactose	69.5
Organic nitrogen (0.2%, w/v)	Yeast extract	258.5
	Casein	171.9
	Tryptophan	171.9
	Peptone	267.1
	Skim milk	125.6
	Soytone	206.1
Inorganic nitrogen (0.1%, w/v)	$(NH_4)_2SO_4$	106.3
	$(NH_4)_2S_2O_8$	118.8
	NH_4NO_3	73.7
	$NaNO_2$	50.0
	$NaNO_3$	112.5
	$CaNO_3$	66.2
	KNO_3	88.8
Inorganic salt (0.2%, w.v)	$CaCl_2$	42.6
	$CuSO_4$	61.7
	$FeSO_4$	43.6
	$MgSO_4$	126.6
	$NaHPO_4$	55.3
Control	None	100

효소의 부분정제

공시균을 최적 배양조건에서 배양한 후 균체를 제거하고 70% 포화 황산암모늄 처리를 한 후 침전된 효소 단백질은 회수하여 농축하고, Sephadex G-25에 통과시켜 저분자의 불순물질을 제거한 효소의 단백질량과 효소활성을 측정한 결과, Table 2에서와 같이 단백질량은 550mg이었고 효소활성은 5,583unit로서 비활성역가가 10.2unit/mg이었으며 회수율은 59%였다. 황(17)과

Table 2. Summary of purification of protease from *Baciullus subtilis* CCKS-111

Step	Total protein(mg)	Total activity(unit)	Specific activity(unit/mg)	Yield(%)	Fold
Crude enzyme solution	19608	9460	0.48	100	1
Ammonium sulfate	941	6905	7.34	73	15.29
Sephadex G-25	550	5583	10.2	59	21.25

이 등(23)은 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus* sp.의 protease 비활성역가가 각각 1.38과 0.157unit/mg이라고 보고하였으며 본 균주의 활성이 약 10배 이상 높았다.

효소의 특성

효소작용의 최적 pH

pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 0.2M Britton-Robinson buffer(pH 3~12)를 사용하여 완충용액 1ml에 기질 2.5ml를 혼합한 다음 부분정제효소 0.5ml를 가하여 30°C에서 1시간 방치한 후 효소활성을 측정한 결과 Fig. 2와 같이 효소의 최적 pH는 9.0이었다. Tsura 등(6), Moon 등(23), 김 등(15), 황(17)은 *Bacillus* sp. 유래의 alkaline protease의 최적 pH가 10.0 부근이라고 보고 하였으며, 본 균주의 효소는 이들 효소 보다는 약알칼리성에서 최적 pH를 나타내었다.

pH 안정성

본 효소의 pH 안정성을 조사하기 위하여 0.2M Britton-Robinson buffer(pH 3~12)를 사용하여 각 pH의 buffer 1ml에 효소 0.5ml를 가한 다음 30°C에서 1시간 방치한 다음 최적 pH인 9.0으로 조절하고 잔존활성을 측정한 결과 Fig. 2와 같이 pH 6~11까지 그 안정범위가 대단히 넓은 것을 관찰할 수 있었다. 안 등(18), Tsura 등(6), 장 등(14), 문 등(21), Oh 등(22), 김 등(15), 황(17)은 *Bacillus* sp. 유래의 alkaline protease가 pH 6.0~11.0까지의 그 안정범위가 매우 넓다고 보고한 것과 비교하여 본 균주의 protease도 전형적인 *Bacillus* sp. 유래의 효소와 양상이 비슷하였다.

효소작용의 최적온도

효소활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여

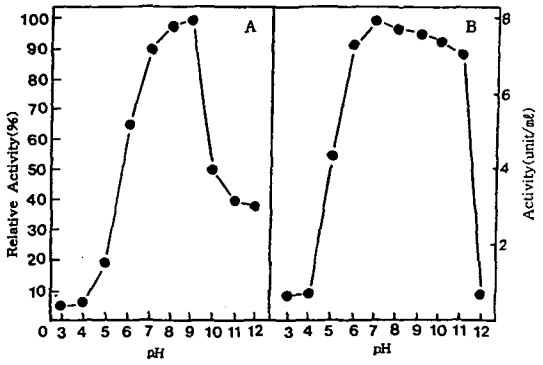

Fig. 2. Effect of pH on the activity of protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111.
A: Optimum pH
B: pH stability

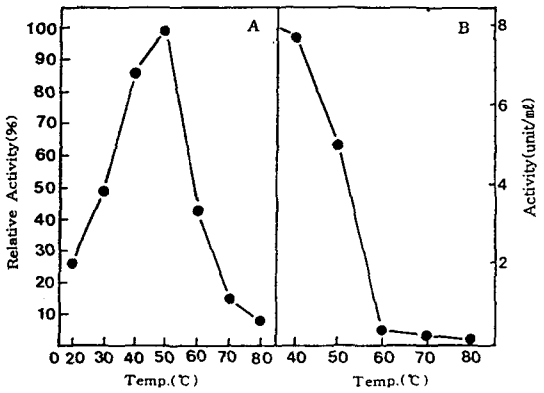

Fig. 3. Effect of temperature on the activity of protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111.
A: Optimum temperature
B: Heat stability

효소액 0.5ml에 기질용액 2.5ml와 1ml의 boric acid borax buffer(pH 9.0)를 혼합하여 20~80°C로 반응온도를 변화시키면서 활성을 측정한 결과는 Fig. 3과 같이 50°C에서 최대활성을 보였으나 60°C 이상에서는 급격한 효소활성의 감소가 발생하였다. 안 등(18), 이 등(23), Tsura 등(6), 오 등(22)은 *Bacillus* sp.의 최적 온도가 55°C라고 보고한 것 보다 다소 낮았으나 황(17)이 보고한 40°C 보다는 높은 온도에서 최대 활성을 나타내었다. 최적 반응온도가 비교적 낮다는 것은 효소반응시 많은 열에너지 공급없이도 반응이 잘 일어난다는 점에서 유리하리라 생각된다.

열에 대한 안정성

본 효소의 열안정성을 조사하기 위하여 40~80°C 범위에서 0.5ml의 효소와 1ml의 boric acid-borax buffer (pH 9.0)를 혼합하여 각 온도에서 1시간 동안 전처리시킨 후 최적 온도인 50°C에서 30분간 안정화시킨 다음 잔존활성을 조사한 결과 Fig. 3과 같이 50°C에서부터 급격한 실활을 보여 열에는 상당히 불안정한 것으로 판단되었다. 이는 Tsuru 등(6), 오 등(22), 김 등(24), 황(17)이 *Bacillus* sp.의 alkaline protease의 열안정성이 40~45°C 정도라고 보고한 것과 유사하였다.

금속이온의 영향

본 효소에 미치는 금속이온의 영향을 조사하기 위하여 각종 금속염을 각각 2×10^{-3}M 되게 pH 9.0의 증류수에 녹이고 금속이온용액 0.5ml와 효소액 0.5ml를 섞어 30°C에서 60분간 방치한 다음 효소활성을 측정한 결과 Table 3과 같이 Cu^{2+}에 의해서만 활성이 증대되었으며 K^{+}과 Hg^{2+} 등에 의해 각각 54%, 35%의 활성저해가 관찰되었다. Tsuru 등(6), 장 등(14), 김 등(24), 황(17)

은 alkaline protease가 Hg^{2+}에 의해 효소활성이 저해된다고 하였으며 김 등(15)은 Cu^{2+}에 의해서 활성이 증대된다고 보고한 것과 유사하였다.

효소의 작용양상

저해제의 영향

효소활성에 영향을 미치는 화학적 저해제 중 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), ε-aminocaproic acid, H_2O_2, sodium citrate, phenyl hydrazine, 2,4-dinitrophenol(2,4-DNP), iodine, ρ-chloromercuribenzoic acid(PCMB), phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF)를 선정하여 *Bacillus subtilis* CCKS-111의 protease 활성에 미치는 영향을 검토하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 serine protease에 특이적 저해를 일으키는 PMSF에 의해 현저한 저해를 보였으며 EDTA에 의해서도 상당한 활성저해가 관찰되어 이 효소는 효소활성 부위에 serine잔기를 가지는 serine protease로 추정되며 금속이온도 활성부위에서 효소활성에 관여하는 것으로 판단되었다(24).

Table 3. Effect of metal ions on the activity of protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111

Ion	Metal	Relative activity(%)
Control	–	100
Ca^{2+}	$CaCl_2$	103
Pb^{2+}	$Pb(CH_3COO)_2$	97
K^+	K_2CO_3	46
Ag^+	$AgNO_3$	87
Zn^{2+}	$ZnSO_4$	109
Hg^{2+}	$HgCl_2$	65
Cu^{2+}	$CuSO_4$	145
Ba^{2+}	$BaCl_2$	105
Mn^{2+}	$MnSO_4$	105
Mg^{2+}	$MgSO_4$	92
Fe^{2+}	$FeSO_4$	100

The reaction mixture, consisted of 0.25ml enzyme solution and 0.25ml metal ion solution(2×10^{-3}M), was incubated at 30°C for 30min and the residual activities were assayed

Table 4. Effect of various inhibitors on the protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111

Reagent	Relative activity(%)
Control	100.0
Ethylenediaminetetraacetic acid	42.9
ε-Aminocaproic acid	91.5
H_2O_2	91.0
Sodium citrate	94.2
Phenyl hydrazine	96.9
2,4-Dinitrophenol	114.4
Iodine	76.9
ρ-Chrolomercuribenzoic acid	95.5
Phenylmethanesulfonyl fluoride	2.7

The reaction mixture, consisted of 0.5ml enzyme solution and 0.5ml inhibitor solution(2mM), was incubated at 30°C for 30min and the residual activities were assayed

효소반응속도론

기질 농도와 효소활성과의 관계를 검토하기 위하여 Hammarstein milk casein을 1.0×10^{-4}~5.0×10^{-4}M로 기질 농도를 달리하였을 때 효소활성의 변화를 측정한 후 Lineweaver-Burk plotting한 결과 Fig. 4에서와 같이 Km값이 2.313×10^{-4}M, V_{max}값은 39.216μg/min이었다. 이와같은 결과는 최 등(25)의 *Streptomyces griseus*가 생산하는 protease의 Km값 2.299×10^{-4}M과 비슷한 결과를 나타내었다.

기질에 대한 특이성

본 효소의 기질에 대한 특이성은 Fig. 5에서와 같이

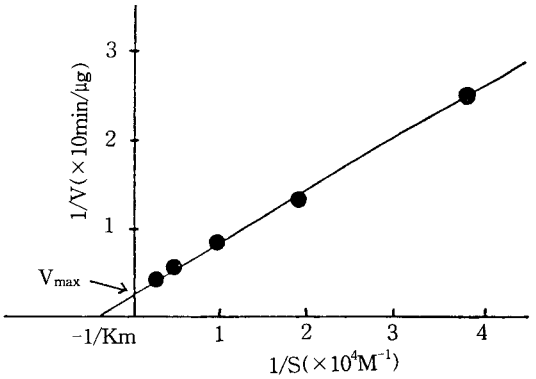

Fig. 4. Lineweaver-Burk plot for hydrolysis of casein by protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111.

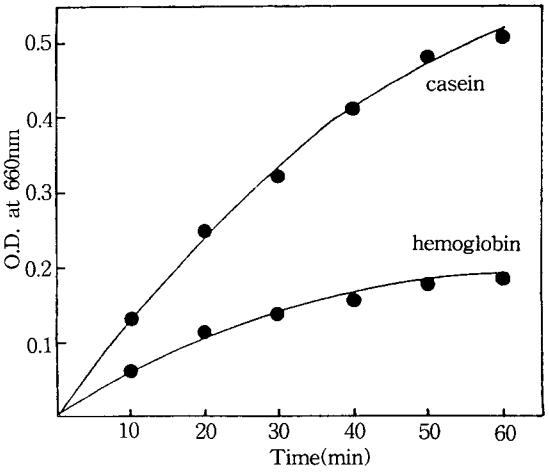

Fig. 5. Hydrolysis of casein and hemoglobin by protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111.

기질로써 hemoglobin 보다 casein을 더 잘 가수분해하였다. 이는 최 등(25)이 *Streptomyces griseus*의 protease와 차와 최(26)가 *Aspergillus fumigatus*의 alkaline protease가 hemoglobin 보다 casein에 기질특이성을 가진다고 보고한 것과 유사하였다.

요 약

한국재래간장으로 부터 분리한 *Bacillus subtilis* CCKS-111이 생성하는 protease 생산의 최적 배양조건은 2% soluble starch, 0.2% peptone, 0.1%$(NH_4)_2S_2O_8$, 0.2% $MgSO_4$, pH 7.0, 35°C에서 24시간 배양했을 때이다. 효소의 최적 작용 pH와 온도는 pH 9.0, 50°C였으며, pH 6.0~11.0의 범위와 50°C 이상에서 불안정하였다. 금속이온 중 Cu^{2+}에 의하여 활성이 증대되었으나 K^{2+}, Hg^{2+} 등에 의하여 효소활성이 저해되었다. Ethylenediaminetetraacetic acid와 phenylmethane sulfonyl fluoride 처리에 의해 활성이 저해되어 금속이온의 영향을 받는 serine protease로 확인되었다. Km값은 2.313×10^{-4}M, V_{max}값은 39.216μg/min이었으며, hemoglobin보다 casein을 더 잘 가수분해하였다.

감사의 글

본 연구는 1995년도 과학기술처 선도기술과제 연구비에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 이에 깊이 감사드립니다.

문 헌

1. Im, M. : Fish protein hydrolysates. *Process Biochemistry*, **1**, 26(1982)
2. Ishide, K. I. and Nagasaki, M. : Effect of protease on textural properties of wheat flour dough. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **36**, 1003(1989)
3. Horikoshi, K. : Production of alkaline enzyme by alkalophilic microorganism. *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1407 (1971)
4. Horikoshi, K. and Aakiba, T. : Alkalophilic microorganisms. Japan Scientific Societies Press., Tokyo (1982)
5. Ichishima, E., Takada, V., Taira, K. and Takeuchi, M. : Specificites of extracellular and ribosomal serine proteinases from *Bacillus natto* a food microorganism. *Biochemica et Biophysica. Acta*, **896**, 178(1986)
6. Tsuru, D., Heizokira, K. and Yamamoto, T. : Studies on bacterial proteinase part 16. Purification. Crystalization and some enzymatic properties of alkaline protease of *Bacillus subtilis* var. amylosacchariticus. *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 1261(1966)
7. Ito, M. and Sugiura, M. : Studies on *Aspergillus* proteinase. *Yakugaku Zasshi*, **88**, 1576(1968)
8. Tadahiko, O. and Seiichi, N. : Enzymatic properties of alkaline proteinase from *A. candidus*. *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 1797(1972)
9. Takashi, W. and Sawao, M. : Purification and characterization of crystalline microbial alkaline proteinase inhibitors produced by *Streptomyces* WT-27. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 243(1979)
10. Makio, K. and Koki, H. : Alkaline proteinase production from methyl acetate by alkalophilic *Bacillus* sp. *J. Ferment. Technol.*, **54**, 383(1976)
11. Kazuo, S., Kyo, S. and Kinichi, M. : Purification and some properties of serine proteinase from a mutant of *A. niger*. *J. Ferment. Technol.*, **63**, 479(1985)
12. 차원섭, 조영제, 최 청 : *Aspergillus fumigatus*에 의한 alkaline protease의 생산과 정제. 한국영양식량학회지, **18**, 279(1989)
13. 윤성우, 익강표, 윤주현, 신철수, 오두한 : *Streptomyces* sp. YSA-130이 생성하는 alkaline protease의 정제와 특성. 한국산업미생물학회지, **17**, 358(1989)
14. 장신재, 김윤숙, 성하진, 최용준, 양한철 : *Bacillus subtilis*가 생산하는 alkaline protease에 관한 연구. 한국농화학회지, **31**, 356(1988)
15. 김태호, 박성희, 이동선, 권택규, 김종국, 홍순덕 : 호알칼리성 *Bacillus*속 균주가 생산하는 alkaline protease의 특성. 한국산업미생물학회지, **18**, 159(1990)
16. 이병우, 유영선, 임근형, 최춘언 : *Bacillus* LY-353이 생산하는 protease의 정제 및 특성. 한국영양식량학회지, **20**, 21(1991)
17. 황세영 : *Bacillus* sp. KUN-17 균주가 생산하는 균체외 serine protease의 정제 및 특성. 한국산업미생물학회지, **23**, 53(1995)
18. 안장우, 오태광, 박용하, 박관화 : *Bacillus* sp.가 생산하는 호알칼리성 protease의 부분정제 및 특성. 한국산업미생물학회지, **18**, 344(1990)
19. Haginhara, B. : 酵素研究法. Vol. Ⅱ, 朝昌書店, 東京, p.237(1956)
20. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L. A. and Randal, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
21. Moon, S. Y., Oh, T. K. and Rho, H. M. : Purification and characterization of an extraxellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* RM615. *Korean Biochem. J.*, **27**, 323(1994)
22. Oh, S. H. and Oh, P. S. : Screening of *Bacillus* sp. M-71 with high alkaline protease productivity and some properties of the enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 1(1991)
23. 이병우, 유영선, 임근형, 최춘언 : *Bacillus subtilis* LY-353이 생산하는 protease의 정제 및 특성. 한국영양식량학회지, **20**, 21(1991)
24. 김형권, 김기현, 이정기, 김영옥, 남희섭, 오태광 : 고온성 *Bacillus amylolique faciens* NS 15-4가 생산하는 내열성 protease의 특성. 한국산업미생물학회지, **23**, 322 (1995)

25. 최청, 정영건, 성삼경, 최광수, 이재성, 조영제, 천성숙 : *Streptomyces griseus* HC-1141이 생성하는 alkaline protease의 특성 및 작용양상. 한국산업미생물학회지, **20**, 295(1992)
26. 차원섭, 최청 : *Aspergillus fumigatus*가 생산하는 alkaline protease의 특성과 작용양상. 한국영양식량학회지, **18**, 348(1989)
27. 이우제, 조영제, 손규목, 최청 : *Bacillus* sp. CW-1121이 생성하는 alkaline protease의 특성 및 작용양상. 한국생화학회지, **24**, 537(1991)

(1996년 9월 23일 접수)