

Streptomyces griseus HC-1141이 생성하는 Alkaline Protease의 특성 및 작용양상

최 청* · 정영건 · 성삼경 · 최광수 · 이재성 · 조영제 · 천성숙
영남대학교 식품가공학과

Characteristics and Action Pattern of Alkaline Protease from *Streptomyces griseus* HC-1141

Choi, Cheong*, Yung-Gun Chung, Sam-Kyung Sung, Kwang-Soo Choi,
Jae-Sung Lee, Young-Je Cho and Sung-Sook Chun

Department of Food Science & Technology, Yeungnam Univ., Gyongsan 712-749, Korea

Abstract— An alkaline protease producing microorganism was isolated from soil and identified as *Streptomyces griseus* HC-1141. The optimum pH and temperature for the purified enzyme activity were 8.0 and 60°C, respectively. The enzyme was relatively stable in the pH range of 7.0~9.0 and at the temperature below 60°C. The activity of purified enzyme was inhibited by Hg²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Ba²⁺ and Fe²⁺, whereas activated by Mn²⁺ and Ca²⁺. ε-Amino caproic acid, 2,4-dinitrophenol and iodine did not show inhibitory effect on the activity of alkaline protease, but p-chloromercuribenzoic acid, ethylenediaminetetraacetic acid showed inhibitory effect on the enzyme activity. These result suggested that the protease was metalloenzyme, and require a reactive SH group for the activity. The reaction of this enzyme follows typical Michaelis-Menten kinetics with the K_m value of 2.299×10⁻⁴ M and the V_{max} of 46.08 μg/min for casein. The activation energy for the alkaline protease calculated by Arrhenius equation was 3.643 kcal/mol. This enzyme hydrolyzed casein more rapidly than the hemoglobin and egg albumin.

Alkaline protease의 생산에 대하여 Horikoshi(1)가 보고한 이래 알칼리내성 및 호알카리성 미생물로부터 alkaline protease의 생산, 균주개발, 활성증대 및 protease의 이용에 관한 많은 연구가 진행되고 있으며(2-15), 그 중요성 때문에 연구가 날로 증대되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서도 활성이 강한 alkaline protease를 생산하여 피혁 및 세제공업에 이용할 목적으로 토양으로부터 분리동정한 *Streptomyces griseus* HC-1141가 생성하는 alkaline protease의 효소학적 특성과 작용양상을 검토하였다.

재료 및 방법

Key words: *Streptomyces griseus* HC-1141, alkaline protease

*Corresponding author

공시균주

공시균은 대구 근교의 토양에서 분리한 방선균 중 *Streptomyces griseus* HC-1141 균주를 동정하여 사용하였다.

배지 및 배양방법

균의 분리를 위한 배지는 분리용 배지(2% soluble starch, 0.5% yeast extract, 1% soybean meal, 0.3% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 1% Na₂CO₃, 1.5% agar), protease 생산균주분리를 위해서 skim milk 배지(5% skim milk, 1% Na₂CO₃, 1.5% agar), 효소 생성을 위하여 기본배지(2% soluble starch, 1% polypeptone, 0.3% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 1% Na₂CO₃)를 사용하여 40°C에서 3일간 배양하였다.

정제효소액의 조제

0.5% casein, 0.05% ammonium chloride, 0.1% ferrous sulfate, 2.0% lactose를 첨가한 최적생산조건에서 배양된 배지로부터 얻은 조효소액을 gel filtration과 ion exchange chromatography를 이용하여 specific activity가 1572.86 unit/mg, 정제배수가 약 53 배로 전기영동상 단일밴드가 확인될 때까지 정제한 뒤 정제효소액으로 사용하였다.

효소활성도 측정

Protease 역가는 Anson-Hagihara 변법(16)을 이용하여 측정하였으며, 효소단위는 1분 동안에 효소용액 1 ml가 tyrosine 1 µg을 생성시키는 것으로 정하였다.

단백질 정량

Bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry법(17)에 따라 측정하였다.

결과 및 고찰

효소학적 성질

효소작용 최적 pH : pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.2 M acetate buffer(pH 5.0~6.0), 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0), 0.2 M boric acid-borax buffer(pH 8.0~11.0)을 사용하여 pH를 5.0~11.0으로 조절한 완충용액 1 ml에 효소액 0.5 ml를 혼합한 다음 30°C에서 1시간 동안 전처리 한 뒤 효소활성을 측정하였다. 결과는 Fig. 1과 같이 효소의 최적 pH가 8.0이었다. 이 결과는 Tetsuo 등(19)이 보고한 *Streptomyces griseus*, 윤 등(10)의 *Streptomy-*

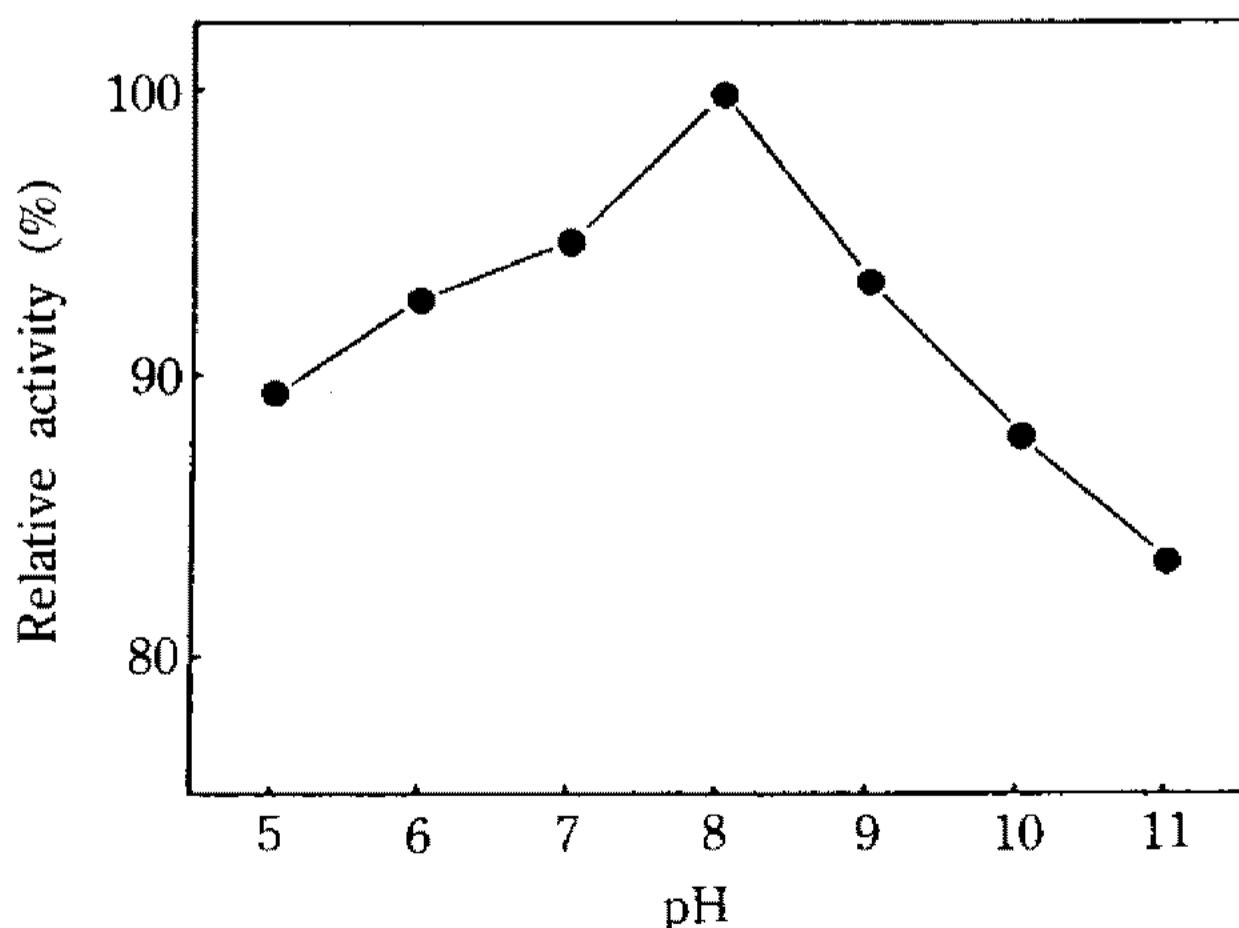


Fig. 1. Effect of pH on the activity of alkaline protease from *Streptomyces griseus* HC-1141.

ces sp. YSA-130의 alkaline protease의 최적 pH 범위가 pH 10.5~11.5까지의 비교적 강알칼리라고 보고한 것보다는 다소 낮지만, 정 등(18)의 *Streptomyces* sp. SMF-301이 생성하는 효소의 최적 pH가 9.0의 약알칼리라고 보고한 것과는 유사하였다.

pH 안정성

본 alkaline protease의 pH 안정성을 조사하기 위하여 McIlvane buffer(pH 5.0~6.0), Clark and Lub's buffer(pH 7.0~11.0) 1 ml에 효소액 0.5 ml를 가하여 30°C에서 24시간 동안 정치한 후 최적 pH 8.0으로 조절하고 잔존 활성을 측정하였다. 결과는 Fig. 2와 같다. 즉 본 alkaline protease는 pH 7.0~9.0 범위의 약알칼리성에서 안정성을 나타냈으며 pH 6.0 이하와 pH 10.0 이상에서는 불안정하여 활성저하를 보였다. 이는 Tetsuo 등(19)의 *Streptomyces griseus*속, 윤 등(10)의 *Streptomyces* sp. YSA-130의 alkaline protease pH 안정범위가 pH 5.0~12.0까지라고 한 보고와 비교할 때 본 효소의 pH 안정범위가 다소 좁은 편이었으며 정 등(18)의 *Streptomyces* sp. SMF-301의 alkaline protease의 안정범위가 9.0~10.0이었다는 보고와도 다소 차이가 있었다.

효소작용 최적온도

효소활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 10~70°C로 효소반응온도를 변화시키면서 활성을 측정하였다. 결과는 Fig. 3에서와 같이 60°C에서 최대의 활성을 보였으며 40°C에서는 70%, 50°C에서는 90% 정도의 활성을 나타내었으나 70°C에서는 활성이 현저하게 저하하였다. 이는 김 등(20)의 *Streptomyces*속

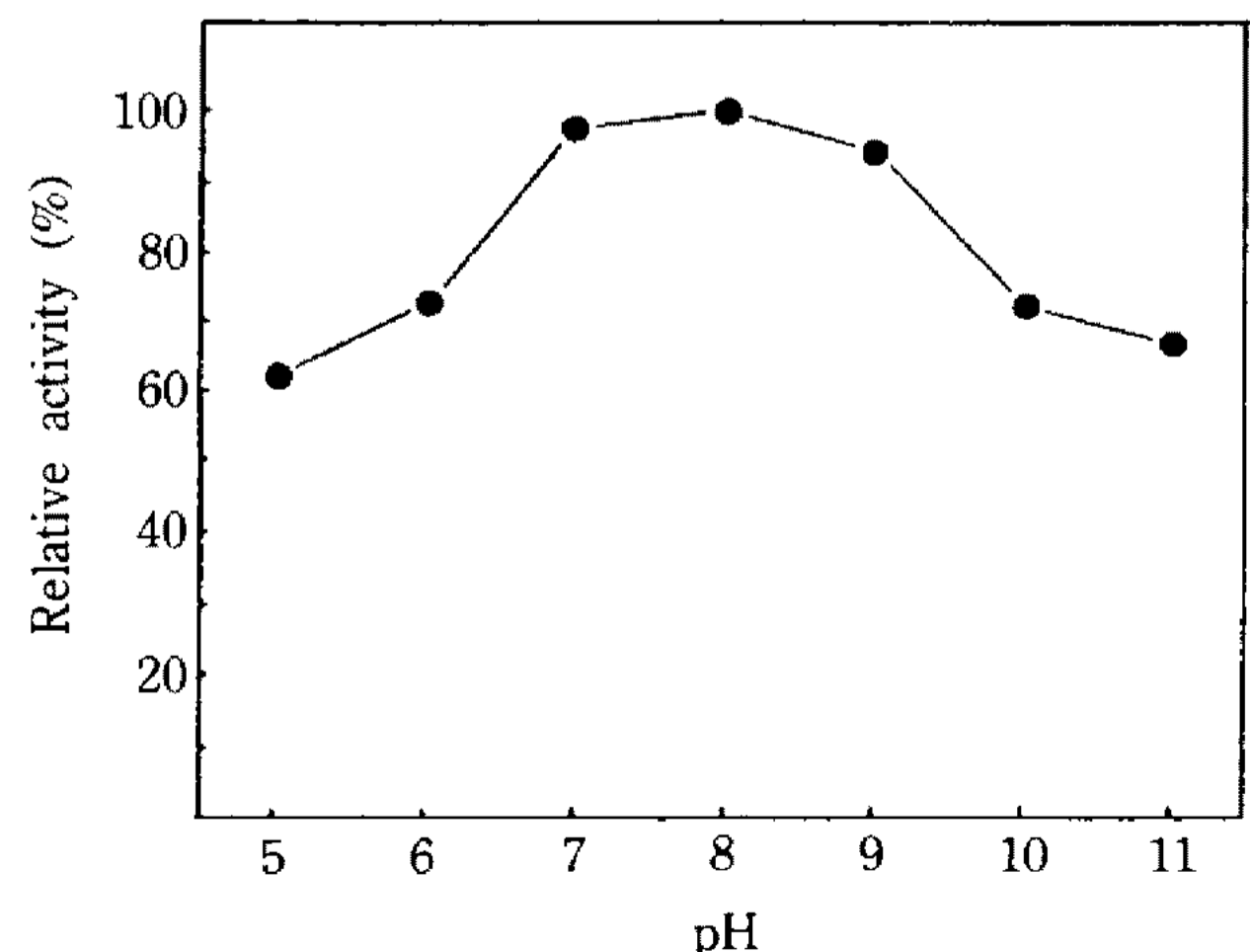


Fig. 2. pH Stability of purified alkaline protease from *Streptomyces griseus* HC-1141.

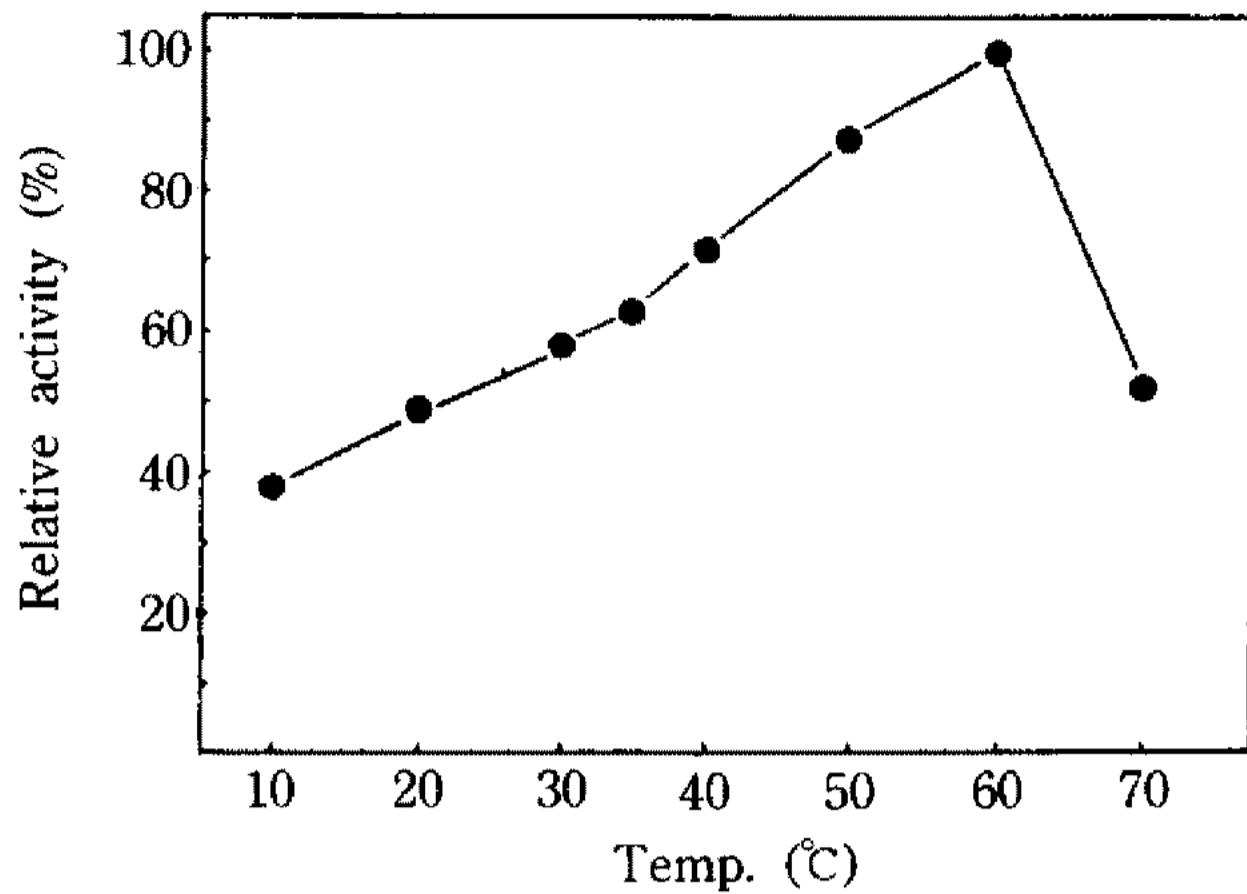


Fig. 3. Effect of temperature on the activity of alkaline protease from *Streptomyces griseus* HC-1141.

생산효소 최적반응온도가 37°C, 정 등(18)이 *Streptomyces* sp. SMF-301의 alkaline protease의 최적반응온도가 50°C라고 한 보고보다는 높으나 윤 등(10)이 *Streptomyces* sp. YSA-130의 효소 최적반응온도가 60°C라고 한 것과는 비슷한 결과를 나타낸 것으로 생각된다.

열에 대한 안정성

본 효소의 열안정성을 조사하기 위하여 20, 30, 40, 50, 60, 70°C에서 10~60분간 반응시킨 결과 Fig. 4와 같이 60°C까지 급격한 활성감소가 없었으나 70°C에서는 10분 후부터 40% 이상의 활성이 저하되어 본 효소는 열에 대하여 상당히 안정한 효소임을 알 수 있었다. 정 등(18)의 *Streptomyces* sp. SMF-301, 김 등(20)의 *Streptomyces* sp., 윤 등(20)의 *Streptomyces* sp. YSA-130 등의 균주가 생산하는 효소의 열안정성이 각각 50°C, 40°C, 60°C라고 한 것보다는 다소 높으며 Kiyoshi 등(21)이 보고한 고온성 *Streptomyces*속 균의 생성 protease가 70°C 이하에서 안정하다고 한 것과는 비슷한 결과를 나타내었다.

금속이온의 영향

효소활성에 미치는 각종 금속이온의 영향을 검토하기 위하여 pH 8.0인 증류수에 각종 금속염을 2×10^{-3} M되게 용해시키고 금속이온용액 0.5 ml에 같은 양의 효소액을 혼합하여 30°C에서 5시간 동안 방치한 다음 효소활성을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 본 효소는 Mn^{2+} 에 의하여 활성이 가장 많이 촉진되었으며 Ca^{2+} , K^+ 등에 의해서는 활성이 다소 증대되었으나 Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} 등에 의하여

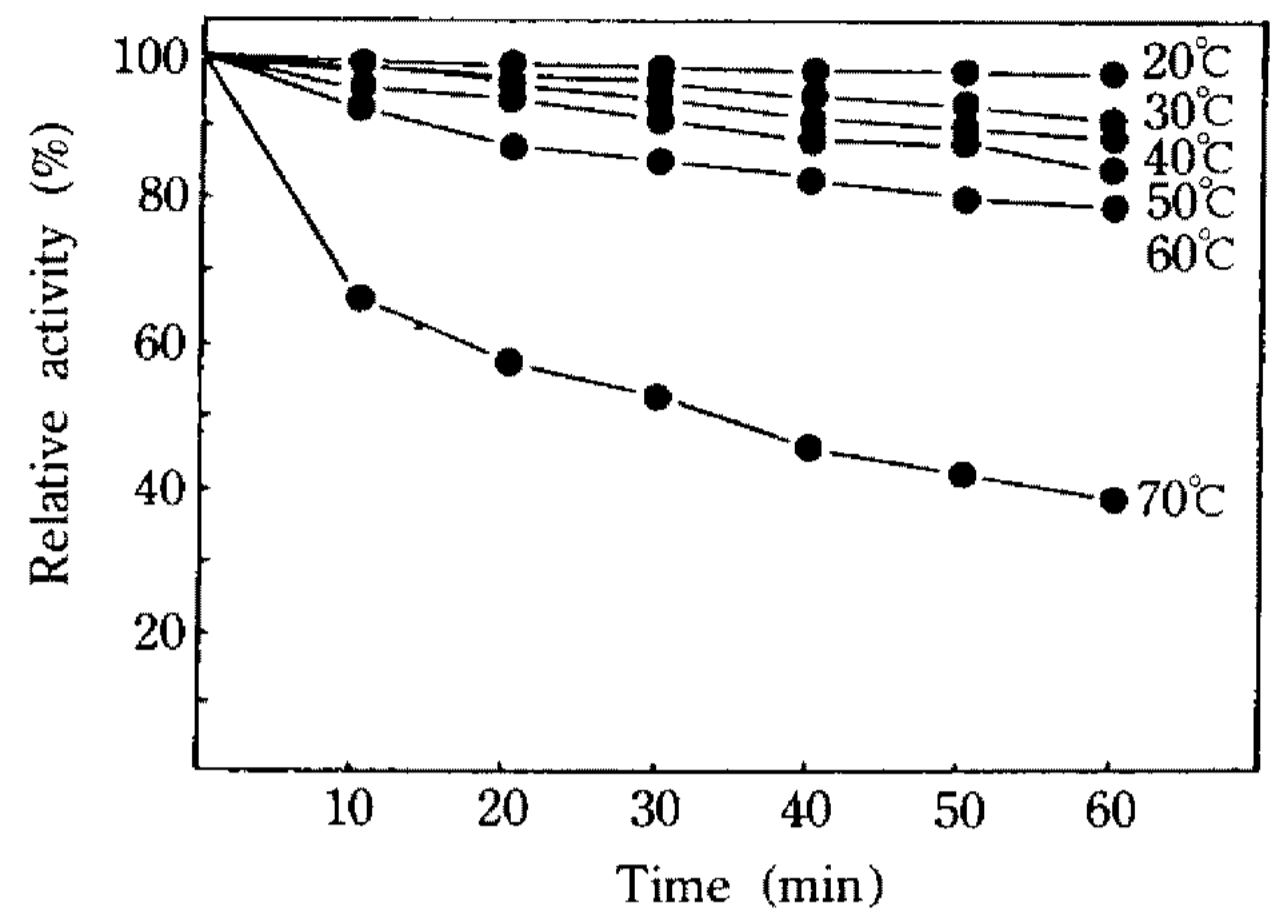


Fig. 4. Temperature stability of alkaline protease from *Streptomyces griseus* HC-1141.

Table 1. Effect of metal ions on the activity of alkaline protease from *Streptomyces griseus* HC-1141

Ion	Metal	Relative activity (%)
Control	—	100.00
Hg^{2+}	$HgCl_2$	25.12
Mn^{2+}	$MnSO_4 \cdot H_2O$	472.30
Mg^{2+}	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	96.62
K^+	K_2SO_4	105.41
Pb^{2+}	$Pb(CH_3COO)_2$	88.51
Cu^{2+}	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	22.97
Zn^{2+}	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	10.14
Ba^{2+}	$BaCl_2 \cdot 2H_2O$	—
Na^+	Na_2SO_4	100.68
Fe^{2+}	$FeSO_4$	17.57
Ca^{2+}	$CaCO_3$	122.97

The reaction mixture, consisted of 0.5 ml enzyme solution and 0.5 ml metal ion solution (2×10^{-3} M), was incubated at 30°C for 5 hrs and the residual activities were assayed.

급격한 활성저해가 관찰되었다. 이는 김 등(20), 윤 등(10)이 보고한 *Streptomyces* sp.의 alkaline protease가 Mn^{2+} , Ca^{2+} 등에 의해서 활성촉진이 되며 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} 등에 의해 강한 저해작용을 받는다고 한 것과 유사하였다. 일반적으로 *Streptomyces* sp.의 alkaline protease는 SH와 결합력이 강한 Hg^{2+} , Ag^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} 등에 의하여 강하게 저해된다고 알려져 있으며 본 실험에서도 비슷한 결과를 얻었다.

저해제 영향

효소활성에 영향을 미치는 화학적 저해제 중 ethy-

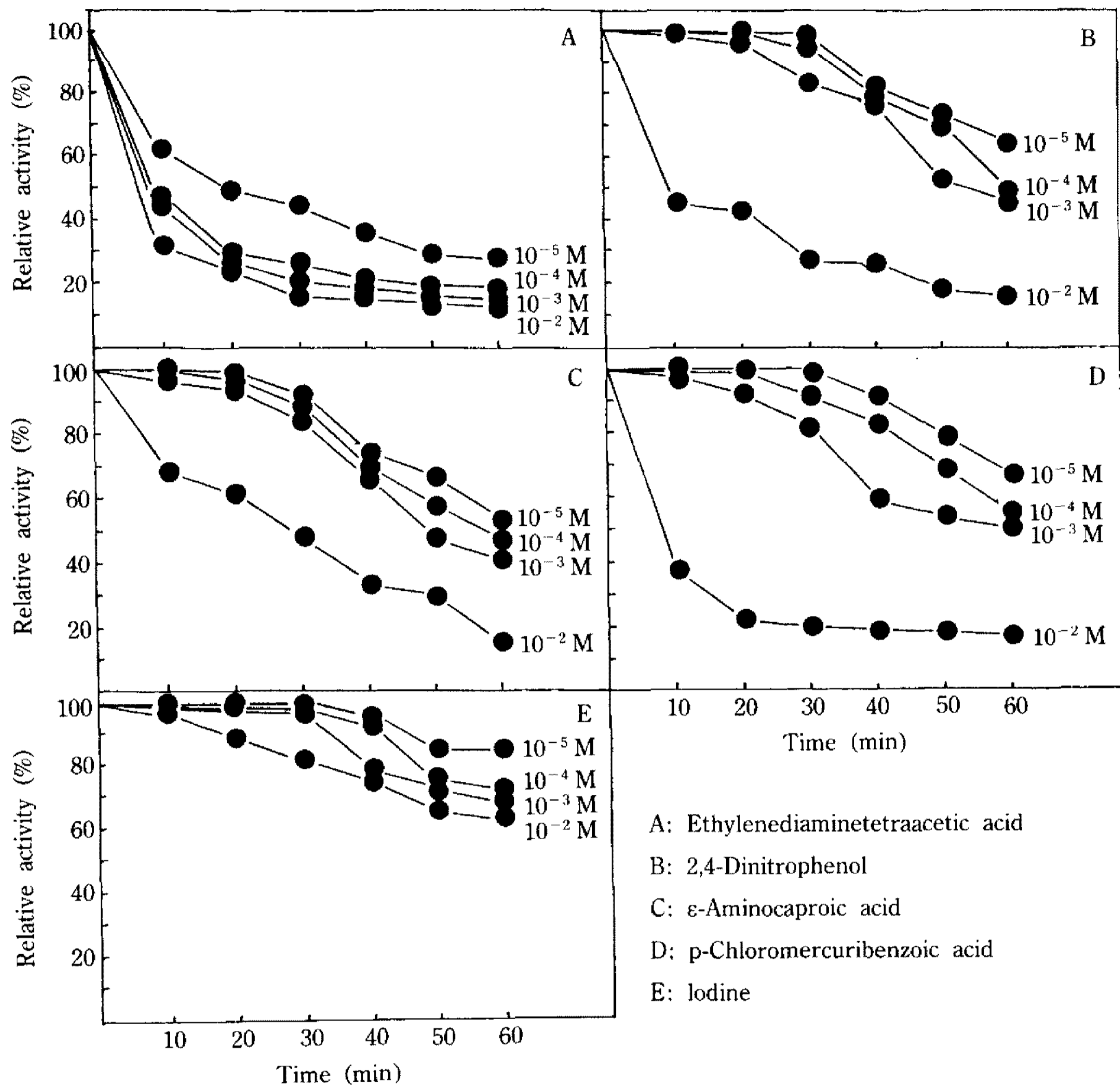


Fig. 5. Effect of various inhibitors on the activity of purified alkaline protease from *Streptomyces griseus* HC-1141.

lendaminetetraacetic acid(EDTA), p-chloromercuribenzoic acid(PCMB), 2,4-dinitrophenol(2,4-DNP), ε-aminocaproic acid(ACA)를 선정하여 *Streptomyces griseus* HC-1141의 alkaline protease 활성에 미치는 영향을 검토하였다. 금속과 결합하여 chelate를 형성하는 EDTA의 영향을 알아보기 위하여 pH 8.0 증류수에 EDTA를 $2 \times 10^{-2} M \sim 2 \times 10^{-5} M$ 의 농도로 용해시키고 0.5 ml의 효소액과 같은 양의 이들 EDTA 용액을 혼합하여 30°C에서 10~60분간 전처리시킨 후 효소활성을 측정된 결과는 Fig. 5와 같이 각 농도별로 전처리 초기부터 활성저해가 관찰되는 것으로 보아 본 효소는 metallo enzyme으로 추측이 가능하였다. 이는 윤 등(10)의 *Streptomyces* sp. YSA-130, Tetsuo 등(19)의 *Streptomyces griseus*의 alkaline protease가

EDTA에 의하여 활성저해가 관찰되지 않았다고 보고한 것과는 다소 차이가 있으나 김 등(20)의 *Streptomyces* sp.의 protease가 EDTA에 의해 60% 이상의 활성저해가 관찰되었다는 보고와는 유사하였다.

효소분자의 말단 아미노기와 친화력이 강하여 이 말단 아미노산이 효소활성 부위인 경우 효소활성을 저해하는 2,4-DNP를 0.2 M boric acid-borax buffer (pH 8.0)에 $2 \times 10^{-2} \sim 2 \times 10^{-5} M$ 되게 용해시키고 2,4-DNP 용액 0.5 ml에 효소액 0.5 ml을 혼합하여 30°C에서 10~60분 동안 전처리한 후 활성을 측정된 결과 Fig. 5에서와 같이 $10^{-2} M$ 농도에서는 다소 저해는 있었으나 반응초기부터의 현저한 저해는 받지 않음을 알 수 있었다. 김 등(20)은 *Streptomyces* sp.의 alkaline protease가 2,4-DNP에 의해 활성저해가 일어나지

않는다고 보고하였으나 본 실험결과 약간의 저해는 발생하였다.

일반적으로 protease의 경쟁적 저해제로써 특히 plasmin과 carboxypeptidase B에 강하게 작용하는 ϵ -aminocaproic acid의 본 효소에 대한 영향을 검토하고자 증류수에 $2 \times 10^{-2} \sim 2 \times 10^{-5}$ M되게 용해시키고 같은 양의 효소액과 혼합하여 30°C에서 10~60분간 전처리한 후 활성을 조사한 결과 Fig. 5와 같이 10^{-2} M에서 상당한 저해가 관찰되었으며, 나머지 농도에서는 반응초기에서의 급격한 활성저해가 관찰되지 않았으며, 1시간 동안 전처리시켰을 때 최고 60%의 활성저해가 관찰되었다. 김 등(20)은 *Streptomyces* sp.의 alkaline protease가 ACA에 의해 활성저해가 일어나지 않는다고 보고하였으며 본 실험과는 다소 차이가 있었다.

효소분자 중 SH기의 저해제로 알려진 PCMB의 영향을 검토하여 보고자 에탄올 98 ml에 10% NaOH 2 ml을 가한 에탄올성 NaOH 용액에 PCMB를 $2 \times 10^{-2} \sim 2 \times 10^{-5}$ M되게 용해시키고 같은 양의 효소액과 혼합한 다음 10~60분간 전처리하여 효소활성을 측정된 결과 Fig. 5에서와 같이 10^{-2} M 농도에서 큰 활성저해가 관찰되었고 나머지 농도에서는 반응초기의 큰 활성저해는 관찰되지 않았다.

이같은 결과로 볼 때 본 효소의 활성부위에 cysteine이 어느정도 관여하는 것으로 확인되었으며, 이는 금속이온의 영향에서 SH기에 영향을 미치는 Hg^{2+} , Cu^{2+} 등에 의해 활성저해가 관찰된 것과도 일치하였다. Tetsu 등(19)은 *Streptomyces griseus*의 alkaline protease가 PCMB에 의해 전혀 영향을 받지 않는다고 보고하였으며 이는 본 실험의 결과와는 일치하지 않

았다. 효소 분자 중 tyrosine의 phenolic hydroxyl group, histidine의 imidazol group을 저해하는 것으로 알려진 iodine을 chemical modification agent로 사용하여 pH 8.0의 buffer에 $2 \times 10^{-2} \sim 2 \times 10^{-5}$ M되게 용해시키고 같은 양의 효소액과 혼합한 다음 10~60분간 전처리하여 효소활성을 측정된 결과 Fig. 5에서와 같이 각 농도 공히 큰 활성저해는 관찰되지 않았다.

효소반응 속도론

기질농도와 효소활성과의 관계를 검토하기 위하여 Hammarsten milk casein을 $1.0 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-4}$ M로 기질농도를 달리하였을 때 효소활성의 변화를 측정된 후 Lineweaver-Burk plotting한 결과 Fig. 6에서와 같이 K_m 값이 2.299×10^{-4} M, V_{max} 값은 46.08 $\mu\text{g}/\text{min}$ 이었다. 이같은 결과는 김 등(9)의 *S. rimosus*가 생산하는 alkaline protease의 K_m 값, 2.7×10^{-4} M과 비슷한 수치를 나타내었다.

활성화에너지

Alkaline protease의 활성화에너지를 측정하기 위하여 10°C에서 70°C의 범위에서 온도변화에 따른 효소활성을 Arrhenius 방정식에 의하여 plotting한 결과 Fig. 7과 같으며 활성화에너지는 3.643 kcal/mol로 차 등(22)의 *A. fumigatus*의 alkaline protease의 활성화에너지 0.821 kcal/mol보다 상당히 높았다.

기질에 대한 특이성

본 효소의 기질에 대한 특이성은 Fig. 8에서와 같이 본 효소는 기질로써 hemoglobin이나 albumin보다 casein을 더 잘 가수분해하였다. 이와같은 결과는 김 등(20)의 *Streptomyces*의 alkaline protease가 casein

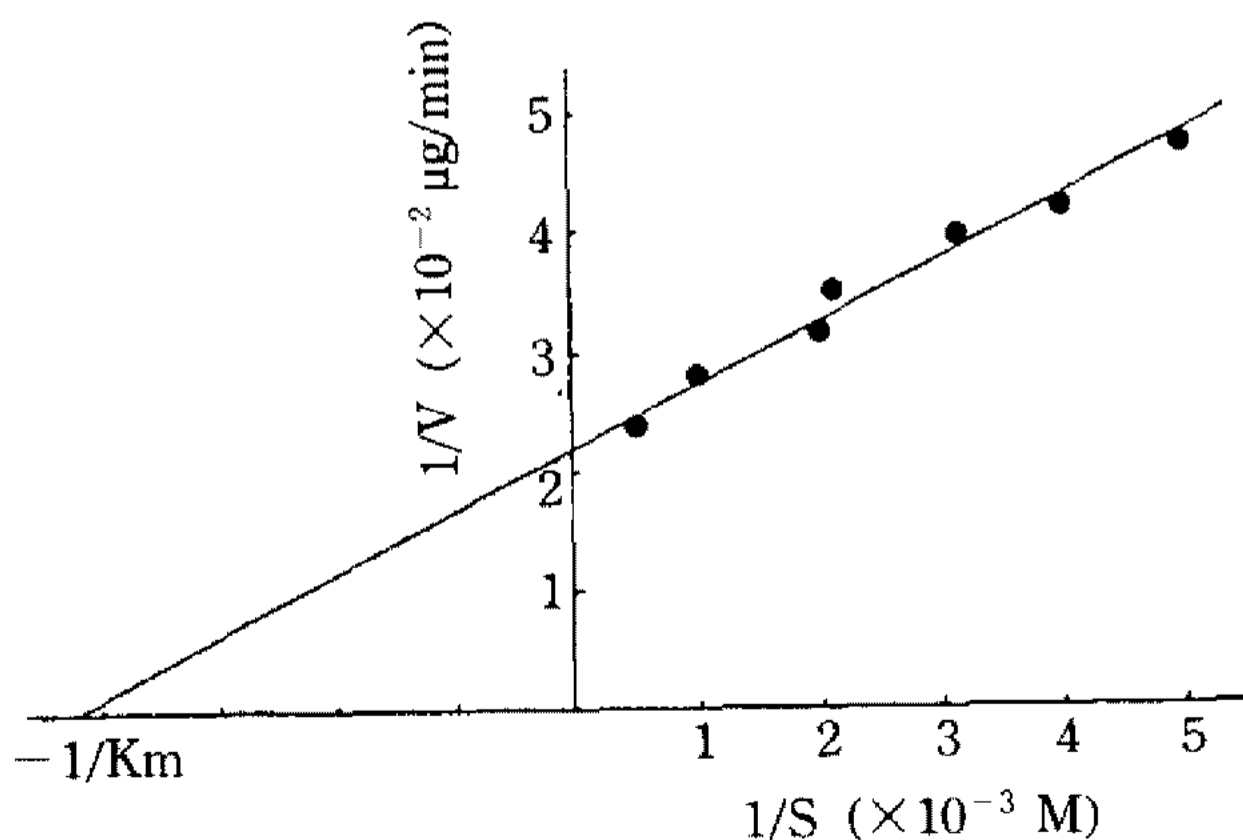


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot for the hydrolysis of casein by the purified alkaline protease from *Streptomyces griseus* HC-1141.

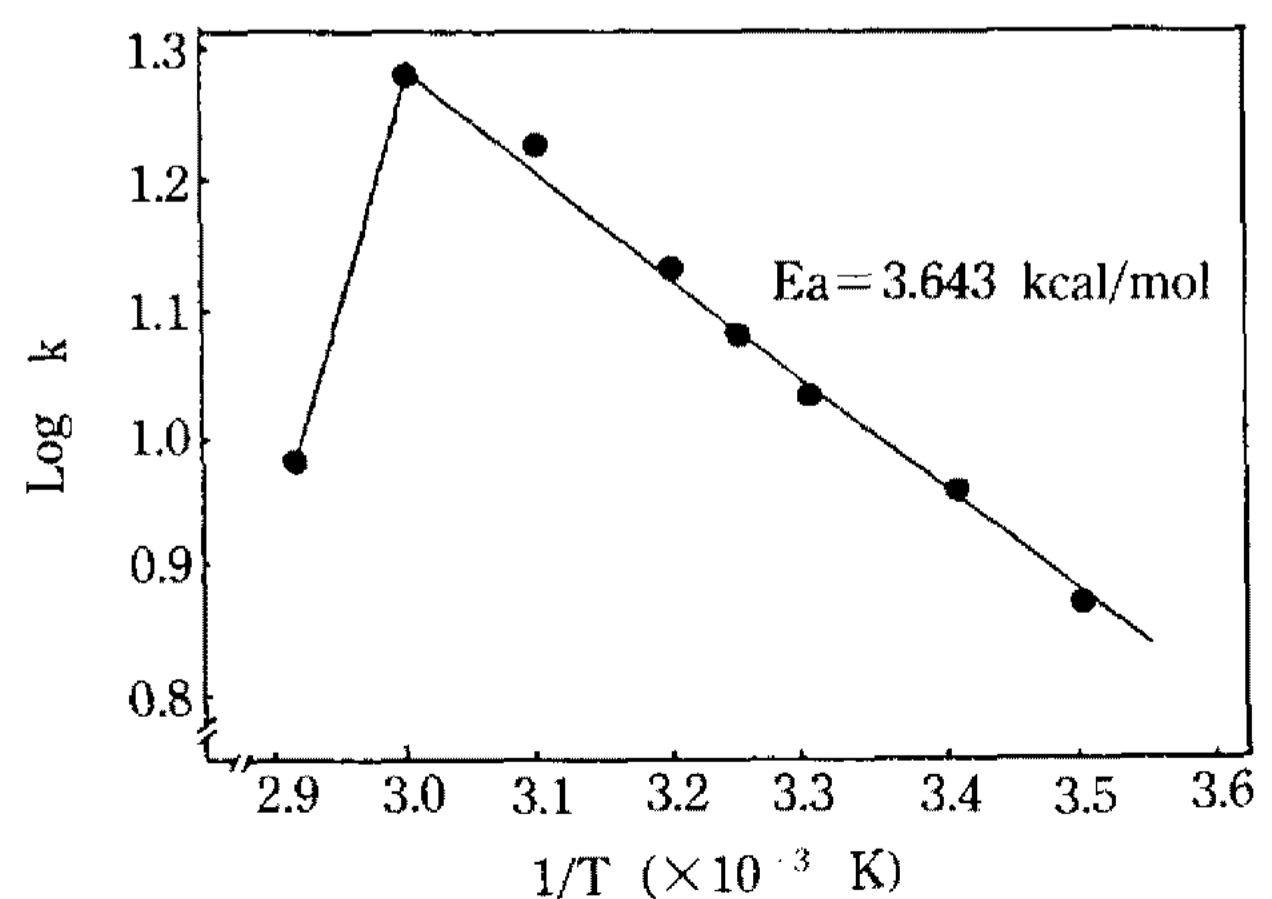


Fig. 7. Arrhenius plot of alkaline protease reaction.

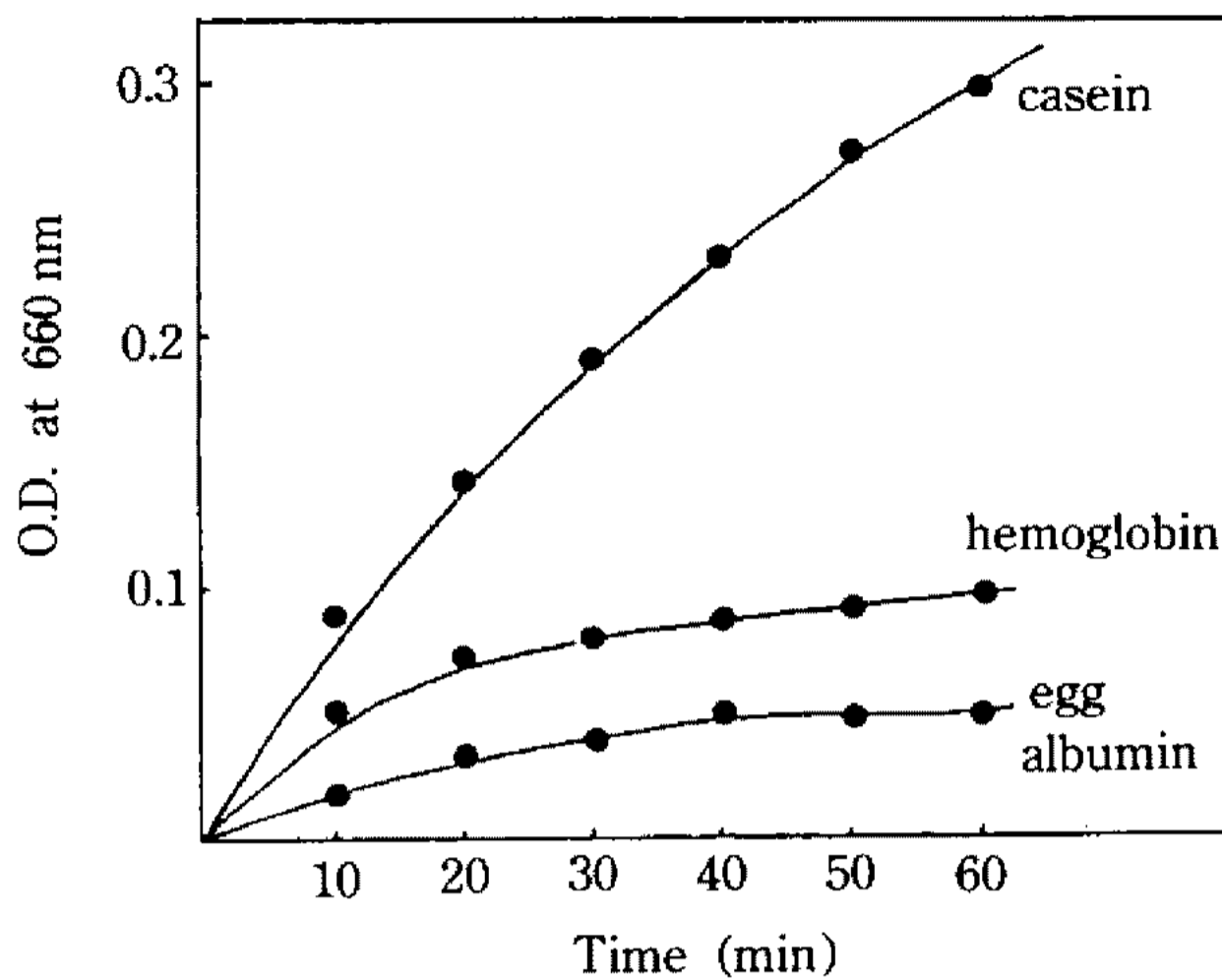


Fig. 8. Hydrolysis of casein, hemoglobin and egg albumin by the alkaline protease from *Streptomyces griseus* HC-1141.

Table 2. Effect of various detergents on alkaline protease activity from *Streptomyces griseus* HC-1141

Detergent	Relative activity (%)
Control	100.00
SDS	48.13
Tween 20	98.75
Tween 60	115.12
Tween 80	101.25
Triton X-100	97.50

The reaction mixture, consisted of 0.5 ml enzyme solution and 0.5 ml detergent solution (2%), was incubated at 30°C for 1 hr and the residual activities were assayed.

을 hemoglobin, egg albumin보다 더 잘 분해한다는 보고와 Froda 등(22)이 *S. carlsbergensis*가 생성하는 protease가 casein을 hemoglobin이나 soybean protein, serum albumin, egg albumin보다 더 잘 가수분해 한다는 보고와 김 등(12)이 *S. alboniger* 생성 효소가 casein 100에 hemoglobin 50의 비율로 가수분해한다고 보고한 것과 비슷하였다.

Detergent의 영향

Detergent가 본 효소의 활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 SDS, Tween 20, Tween 60, Tween 80 및 Triton X-100을 각각 1%되게 효소용액에 첨가시키고 30°C에서 1시간 전처리한 후 잔존활성을 측정하였으며 그 결과 SDS만이 약 50% 이상의 활성저해가 관찰되었으며 나머지 detergent에는 강한

저항성을 보여주었다(Table 2). 이는 윤 등(10)이 *Streptomyces* sp. YSA-130이 생성하는 alkaline protease가 Tween 20, 60, 80 및 Triton X-100에 의해 강한 저항력을 가진다고 한 보고와 유사하였다.

요 약

토양으로부터 alkaline protease 생성능이 강한 *Streptomyces griseus* HC-1141을 분리하였으며, 정제 효소의 최적작용 pH와 온도는 8.0, 60°C였으며, pH 7.0~9.0의 범위와 60°C 이하에서 안정하였다. 금속 이온중 Mn^{2+} , Ca^{2+} 등에 의해 활성이 증대되었으나 Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} 등에 의해 효소활성이 저해되었고, 효소활성 저해제 중 ϵ -aminocaproic acid, 2,4-dinitrophenol, iodine 등에 의해서는 현저한 효소활성저해가 관찰되지 않았으나 ethylenediaminetetraacetic acid와 p-chloromercuribenzoic acid에 의해 활성저해가 관찰되어 효소분자 중 SH기가 활성에 어느 정도 관여하는 metallo enzyme으로 추정되었다. 정제효소의 K_m , V_{max} 및 활성화에너지는 2.299×10^{-4} M, 46.08 μ g/min, 3.643 kcal/mol이었으며 hemoglobin과 egg albumin보다 casein을 더 잘 가수분해하였다. 또한 여러가지 detergent에 대하여 강한 저항성을 가지고 있었다.

감사의 말

이 논문은 1990년도 문교부 지원 한국 학술진흥재단의 대학부설연구소 지원 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzyme by alkalophilic microorganism. *Arg. Biol. Chem.* 35: 1407-1411.
- 장신재, 김윤숙, 성하진, 최용준, 양한철. 1988. *Bacillus subtilis*가 생산하는 alkaline protease에 관한 연구. *한국농화학회지* 31: 356-360.
- 김태호, 박성희, 이동선, 권택규, 김종국, 홍순덕. 1990. 호알칼리성 *Bacillus*속 균주가 생산하는 alkaline protease의 특성. *산업미생물학회지* 18: 159-164.
- Ichishima, E., Y. Takada, K. Taira and M. Takeuchi. 1986. Specificities of extracellular and ribosomal serine proteinases from *Bacillus natto*, a food microorganism. *Biochimica et Biophysica*

- Acta* **860**: 178-184.
5. 차원섭, 조영제, 최칭. 1989. *Aspergillus fumigatus*에 의한 alkaline protease의 생산과 정제. 한국영양식량학회지 **18**: 279-286.
 6. McConn, J.D., D. Tsuru and K.T. Yasunobu. 1964. *Bacillus subtilis* neutral proteinase. *J. Biol. Chem.* **239**: 3706-3709.
 7. Tsuru, D., K. Heizokira and T. Yamamoto. 1966. Studies on bacterial proteinase part 16. Purification, crystalization and some enzymatic properties of alkaline protease of *Bacillus subtilis* var. amylosacchariticus. *Agr. Biol. Chem.* **30**: 1261-1268.
 8. Ito, M. and M. Sugiura. 1968. Studies on *Aspergillus* proteinase. *Yakugaku proteinase. Yakugaku Zasshi* **88**: 1576-1582.
 9. 김경미, 이태경, 양한철. 1989. *Streptomyces rimous*가 생성하는 protease의 정제와 특성. 산업미생물학회지 **17**: 407-411.
 10. 윤성우, 이강표, 유주현, 신철수, 오두환. 1989. *Streptomyces* sp. YSA-130이 생성하는 alkaline protease의 정제와 특성. 산업미생물학회지 **17**: 358-364.
 11. Siegel, S., A.H. Brady and W.M. Awad. 1972. The proteolytic enzymes of the K-1 strain of *Streptomyces griseus* obtained from commercial preparation. *J. Biol. Chem.* **247**: 4155-4159.
 12. 김경신, 한강완, 김형로. 1984. *Streptomyces alboniger*가 생산하는 protease의 특성에 관한 연구. 한국농화학회지 **27**: 174-179.
 13. 배인휴, 강국희. 1987. *Saccharomycopsis lipolytica* (*Candida lipolytica*)의 균체의 protease에 관한 연구. 산업미생물학회지 **15**: 286-293.
 14. 강국희, 배인휴, 이춘화. 1987. *Saccharomycopsis lipolytica*의 균체의 protease에 관한 연구(효소의 생산조건). 산업미생물학회지 **15**: 279-285.
 15. Horikoshi, K. and T. Akiba. 1982. *Alkalophilic Microorganisms, A New Microbial World*, Japan Sci. Soc. Press.
 16. Haginhara, B.. 1956. 酵素研究法. Vol. II(調昌書店: 東京) **1**: 237.
 17. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, L.A. Farr and R.J. Randal. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Biol. Chem.* **193**: 265-275.
 18. 정병철, 신현승, 이계준. *Streptomyces* sp. SMF-301에서 분리한 단백질분해효소의 성질. 산업미생물학회지 **16**: 526-531.
 19. Tetsuo, M., M. Takumi, T. Yoshio, M. Tai and O. Shigetaka. 1991. Purification and some properties of protease I having transfer action from *Streptomyces griseus* var. *alkalophilus*. *Agr. Biol. Chem.* **55**: 2: 307-314.
 20. 김광원, 서정훈. 1974. *Streptomyces*속 균이 생산하는 protease에 관한 연구. 산업미생물학회지 **2**: 13-17.
 21. Kiyoshi, M., I. Eiji and Y. Fumihiko. 1964. Studies on the proteolytic enzymes of thermophilic *Streptomyces*. *Agri. Biol. Chem.* **28**: 884-895.
 22. 차원섭, 최 칭. 1989. *Aspergillus fumigatus*가 생산하는 alkaline protease의 특성과 작용양상. 한국영양식량학회지 **18**: 348-354.
 23. Fronda, C.W. and J.E. Kensella. 1980. Protease from *Saccharomyces carlsbergensis*; Activity on food proteins. *J. Food Sci.* **45**: 1200-1203.

(Received February 13, 1992)