

## *Bacillus* sp. KUN-17 균주가 생산하는 균체외 Serine Protease의 정제 및 특성

황 세 영\*

고려대학교 자연과학대학 생물공학과

### Purification and Characterization of An Extracellular Serine Protease from *Bacillus* sp. strain KUN-17

Se Young Hwang\*

Department of Biotechnology, College of Sciences and Technology,  
Korea University, Chochiwon, Chung Nam 339-800, Korea

**Abstract** — A protease isolated and purified 51 fold from the culture filtrate of a soil bacterium, *Bacillus* sp. KUN-17, which was appeared to be a monomeric protein with molecular weight of 38,000 daltons, was suggested to be involved in the serine (-alkaline) protease (E.C 3.4.21.14) since its activity was selectively inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and required 40°C and pH 10.5 for optimal condition. The half-life of the enzyme activity was 1 hr at 55°C, and the activity was maintained even under high concentrations of SDS or urea. The enzyme was indicated to perform random proteolysis from the fact that most of the chromogenic substrates employed were hydrolyzed by the enzyme. The affinity of the enzyme for natural proteins was approximately 10-times higher than ester compounds, and both substrates showed mutual inhibitory effect competitively for the enzyme activity.

1950년대 초반에 보고된 *Aspergillus oryzae*의 alkaline protease, *Bacillus subtilis amyloliquefaciens*의 neutral protease 및 *Bacillus subtilis*의 alkaline protease 들은 미생물로부터 분리되어 최초로 결정화에 성공한 protease로써 배양 및 생산성에 있어서 특히 효과적인 것으로 인정되어 이후 수 많은 관련 효소들이 미생물로부터 분리·정제되고 그 각각의 성질 유형이 규명되어 왔다(1).

한편, protease는 단백질화학, 식품, 의약 등의 각종 제조산업 분야에서 그 요구가 더해 가고 있어서 작금의 총 효소산업 중 60%의 시장성을 점하고 있으며, 특히 serine(-alkaline) proteinase(E.C. 3.4.21.14)는 피혁, 세제공업 등의 분야에서 매우 중요한 효소 단백질로 알려져 있다(2). 이 효소 단백질들의 최적 pH는 10 정도로서 diisopropyl fluorophosphate(DFP)나 phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)에 의하여 선택적으로 실활되며, 방향족 또는 소수성 아미노산 잔기의 carboxyl side를 우선적으로 인식, 가수분해

하는 기질특이성을 갖고 있는 것으로 보고되어 있다(3). 이 효소 단백질의 생산균은 *Aspergillus* sp., *Tritirachium album*, *Bacillus* sp. 등 다수가 보고되고 있지만, 이들 중에서 enzyme detergent로써의 산업적 응용이 가능하게 된 것은 *Bacillus subtilis* 유래의 Subtilisin Calsberg(6), Subtilisin BPN(7), Subtilisin Novo(8) 등 극히 일부에 지나지 않고 있다. 따라서, 환경오염 방지에 기여할 수 있는 생물 소재 산업의 측면에서 보다 강력하고 안정성이 우수한 효소 세제의 개발이 향후 계속적으로 요구될 것으로 추정된다.

이와같은 관점에서 저자들은 토양 세균인 *Bacillus* 속 KUN-17 균주가 생산하는 proteases의 분리 정제를 중심으로 보고한 바 있다(1, 9). 본 연구에서는 random proteolysis의 강력한 활성을 나타내는 protease를 분리·정제하여 이의 기질특이성 및 물리화학적 안정성에 관하여 검토, enzyme detergent로써의 가능성에 관하여 고찰한다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배양 조건

**Key words:** Serine (-alkaline) protease, *Bacillus* sp., enzyme detergent

\*Corresponding author

前報(1, 9)에서 보고한 바와 같이 amidase와 protease를 생산하는 토양세균인 *Bacillus* sp. KUN-17 균주를 실험에 사용하였다. 액체 영양배지(0.5% poly-peptone, 0.3% yeast extract, pH 7.0) 10 ml가 함유된 100 ml Erlenmyer flask에 균체를 접종하여 30°C에서 1일간 진탕배양(100 rpm) 후, 본 배양을 위하여 이 배양액을 동 배지 1 l가 함유된 5-l Erlenmyer flask에 접종, 전 배양법과 동일한 방법으로 배양하였다.

### 효소의 정제

배양액 1 l를 4°C에서 10분간 원심분리(10,000 rpm), 상등액 내의 단백질 활성부분을 ammonium sulfate 침전법(포화도 70%)으로 분획하여 농축 후, DEAE-Sephadex A-50 resins를 이용한 column chromatography(50 mM phosphate buffer, pH 7.0)를 행하였다. Resin에 흡착되지 않은 분획을 70% ammonium sulfate로 재농축, 5 mM citrate buffer(pH 5.0)로 투석하여 CM-Sephadex C-50 resins를 이용한 column chromatography로부터 10 mM NaCl에 의해 용출된 활성분획을 수거한 다음 water-ethanol(1 : 2, v/v)로 농축, Sephadex G-75 gel 여과(1.5×116 cm, 50 mM phosphate buffer, pH 7.0)를 행하여 정제하였다.

### 효소 활성 측정법

**Protease** 10 μM 기질 단백질과 0.01 U 효소단백질이 함유된 50 mM sodium borate buffer(pH 7.0) 0.1 ml를 30°C에서 반응 후, 1 μmole의 2,4,6-trinitrobenzene sulfonate(TNBS)가 함유된 5% sodium borate 포화용액 0.9 ml를 첨가하여 30°C에서 30분간 반응하였다. 반응 후 형성된 yellow picryl adduct의 양을 420 nm에서의 흡광도로부터 분석하였다( $\epsilon_{420} = 1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )(10).

**Esterase** Ice bath 상에서 0.3 ml의 N,N-dimethylformamide(DMF)에 0.1 μmole의 benzyloxycarbonyl-L-amino acid-p-nitrophenyl ester(Z-A.A-ONp)를 용해한 후 20 μl 효소 용액을 첨가하고 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)를 이용, 반응계를 1 ml로 하여 30°C에서 10분간 반응 후에 유리된 p-nitrophenol의 양을 405 nm에서의 흡광도로부터 분석하였다( $\epsilon_{405} = 9.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )(11).

### 단백질의 정량

Lowry 등에 의한 분석법(12)을 이용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량분석하였으며 표준단백질로는 bovine serum albumin(BSA)을 사용하였다.

### 전기영동

Sodium dodecyl sulfate(SDS) 전기영동은 1% SDS, 2% mercaptoethanol 및 20 μg의 효소 단백질이 함유된 시료 50 μl를 100°C에서 5분간 처리 후 Weber와 Osborn 법(13)에 준하여 10% acrylamide gel(7 mA per column : 5×70 mm ; 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 7.2) 상에서 행하였다. 전기영동 후, gel 내의 단백질 염색은 0.2% coomassie brilliant blue-R<sub>250</sub>으로, 탈색은 7% acetic acid로 하였다. Native-전기영동은 Davis 법(14)에 준하여, 20 μg의 효소단백질을 Tris-glycine buffer(pH 9.5)를 이용, 7% acrylamide gel(2 mA per column ; 5×70 mm) 상에서 행하였다. 효소 단백질의 활성 염색을 위하여 전기영동 후 gel을 5 mm 간격으로 slicing 하여 test tube에 각각 넣고 0.1 μmole의 Z-L-Ala-ONp와 300 μl DMF가 함유된 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 1 ml를 첨가하여 30°C에서 30분간 반응시켰다. 효소 활성은 반응 후 gel로부터 상등액으로 유리된 p-nitrophenol 양을 405 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

### 시약

PMSF, p-chloromercuribenzoate(PCMB), TNBS, SDS, casein, L-leucine-p-nitroanilide(L-Leu-pNA), Z-A.A-ONp, acrylamide, 및 분자량 측정용 표준단백질 marker는 Sigma Chem. Co.(U.S.A.), 효소 정제용 resin은 Pharmacia(Sweden), L-γ-Glu-pNA는 Tokyo Kasei Co.(Japan), lysozyme과 α-amylase는 Worthington, BSA는 Organon Teknika, B.V., Boxtel(Holland)로부터 각각 구입하였다.

## 결 과

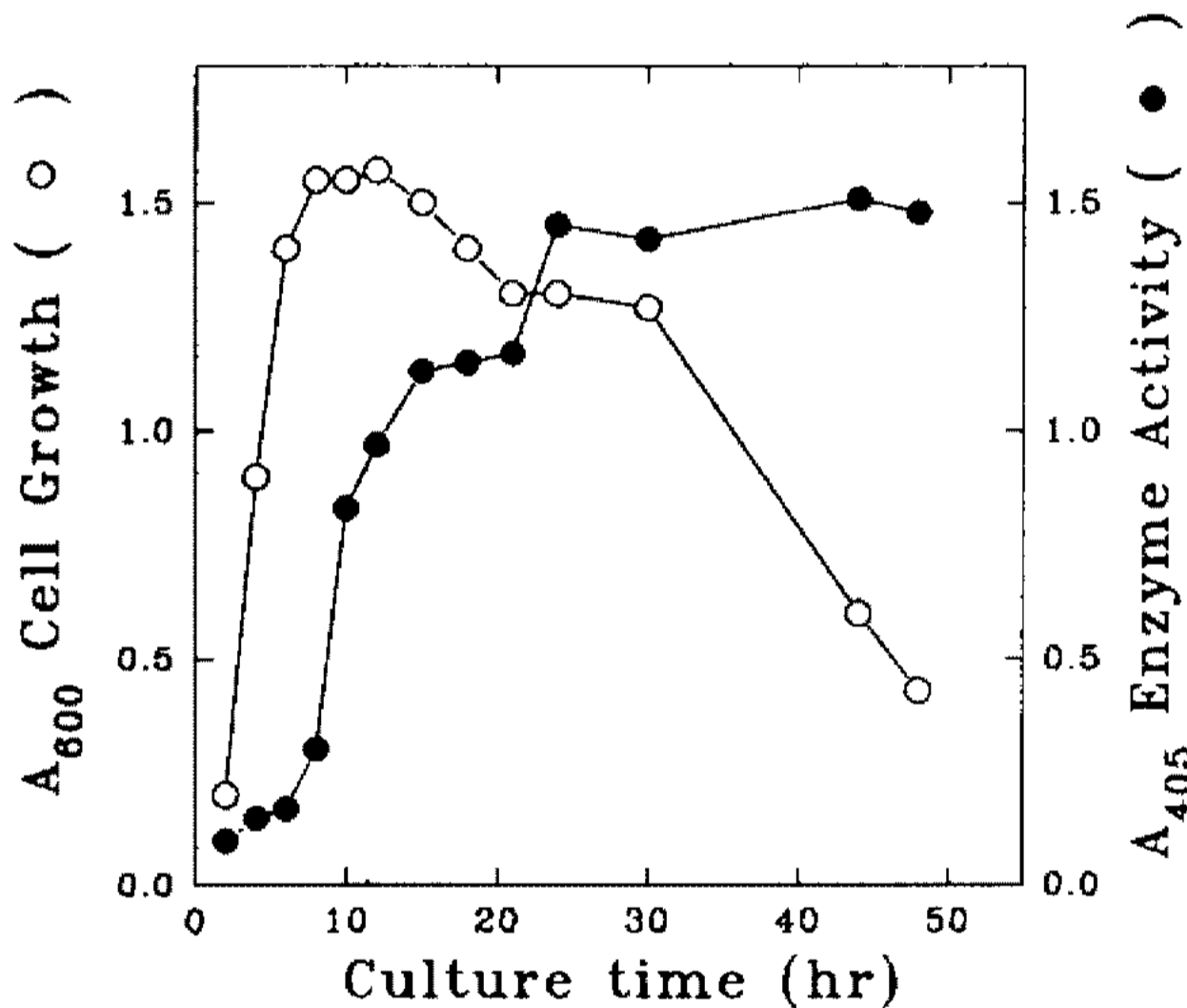
### 균체의 증식과 효소의 생산

균체 대수증식 기간 중에는 본 효소의 균체의 활성이 거의 검출되지 않았다(Fig. 1). 이 효소 생산균주는 포자 형성 세균으로서, 포자 형성기에 효소 단백질의 균체외 분비가 급격히 증가하는 양상을 나타내는, 즉, 균체 증식 곡선과 효소 생산량에 time lag 현상을 보여 균체의 lysis로 인하여 유리되어 나오는 단백질로 사료되었다(11). 또한, 균체가 거의 사멸되어도 배양액 내의 효소 활성은 감소되지 않았다.

### 효소의 정제

효소단백질의 비활성은 균체의 배양여과액(0.055 U/mg)을 70% ammonium sulfate를 이용한 활성분

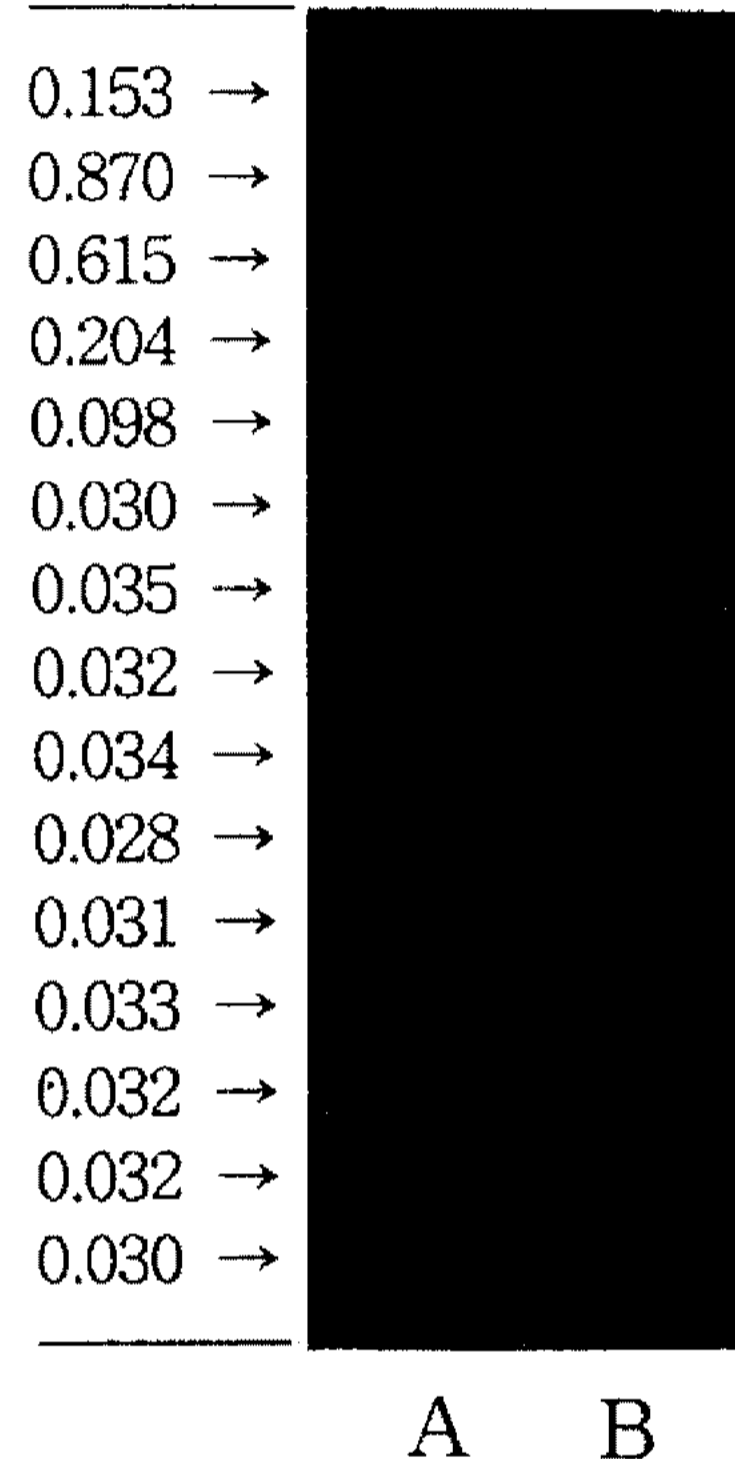
획으로 0.157 U/mg, DEAE-Sephadex A-50(pH 7.0) 및 CM-Sephadex C-50 resins(pH 5.0)을 이용한 column chromatography로써 0.539 U/mg, water-ethanol(1 : 2, v/v)에 의한 농축 및 Sephadex G-75 gel 여과를 하므로써 2.8 U/mg의 비활성 증가를 보였으며, 12%의 회수율을 나타내었다(Table 1). 이 방법으로 정제된 효소 단백질의 intact form(native 단백질)과 SDS 처리 후의 변성된 form을 전기 영동적으로 분석한 profile에서 각각 단일 band를 나타내었다(Fig. 2)(1). 한편, native 효소 분자는 Fig. 3(A)의 Sephadex G-75 column chromatography로부터 계산된 분자량이, SDS-polyacrylamide gel 전기영동법으로부터 산출된 분자량(Fig. 3(B))과 일치하는 38,000 daltons의 값을 보였으며, 이 효소 단백질은 단량체로 존재하는 것으로 판단되었다.



**Fig. 1. Time course of cell growth and the enzyme production from *Bacillus* sp. KUN-17.** 100 μl each of the culture filtrates were used to measure the esterase activity under the standard condition (30°C, 10 min) as described in the "Materials and Methods". Cell growth was determined by measuring the absorbance of culture broth at 600nm.

**효소의 물리 화학적 성질**

정제 효소단백질의 가수분해 활성은 10 mM PCMB에 의해서는 전혀 저해되지 않았으나 활성 부위의 serine 잔기에 선택적으로 반응하는 PMSF 10 mM 존재 하에서 거의 실활된 결과로부터 serine protease (E.C. 3.4.21)로 추정되었다(Table 2). 한편, 이 효소단백질의 반응 최적 pH 및 pH 안정성은 pH 10.5(Fig. 4)로 나타나, serine protease의 4개 subgroup 중에서



**Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme.** 150 μl of the active fraction from Sephadex G-75 column chromatography was exchanged into water by dialysis, lyophilized, and used one-half each for native (A) and SDS (B) polyacrylamide gel electrophoresis, respectively. The O.D. values in the left were observed from the enzyme activity in 5 mm each of the gel slices shown in (A).

**Table 1. Purification summary of a protease from *Bacillus* sp. KUN-17**

	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (u)*	Specific activity (u/mg)	Recovery (%)
Culture filtrate	726	2096	115	0.055	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitation	50	585	92	0.157	80
DEAE-Sephadex A-50	20	176	46	0.261	40
CM-Sephadex C-50	4	39	21	0.539	18
Ethanol precipitation	1	21	18	0.857	16
Sephadex G-75	18	5	14	2.8	12

\*One unit of activity was defined as the amount of enzyme that releases 1 μmole of p-nitrophenol per minute as described previously(1).

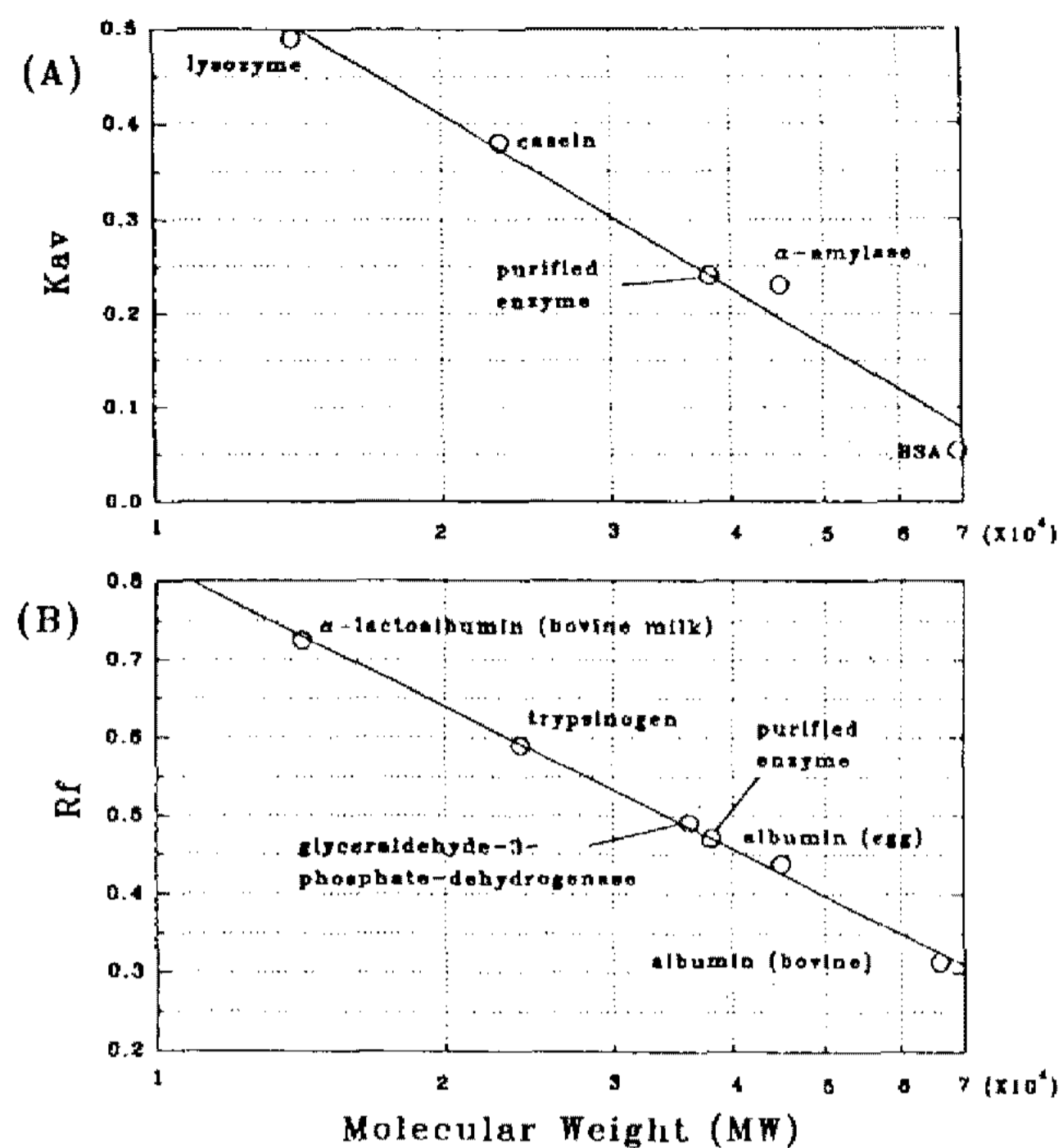


Fig. 3. Molecular weight determination of the purified enzyme.

Molecular weight was calculated by using Sephadex G-75 gel filtration (A) and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (B).

Table 2. Effect of various compounds on the enzyme activity

Compound conc.	Relative activity of hydrolysis (%)	
	Z-L-Ala-ONp	BSA
none	100	100
PMSF 1 mM	64	61
10 mM	10	6
PCMB 1 mM	104	102
10 mM	100	112
SDS 0.1%	93	76
1%	91	76
Urea 0.5 M	64	48
5 M	57	44
NaCl 0.1 M	100	100
1 M	100	100

\*Enzyme solution was incubated in the presence of each compounds at 30°C for 1 hr prior to the addition of substrates.

alkaline protease(E.C. 3.4.21.14)(2)에 속하는 효소 단백질로 판단되었으며, SDS나 urea 등, 변성제의 존재 하에서도 비교적 높은 잔존 활성도를 나타내는 특성을 보였다(Table 2). 특히, 이 효소 단백질의 chromogenic ester 화합물에 대한 가수분해 활성은 반응

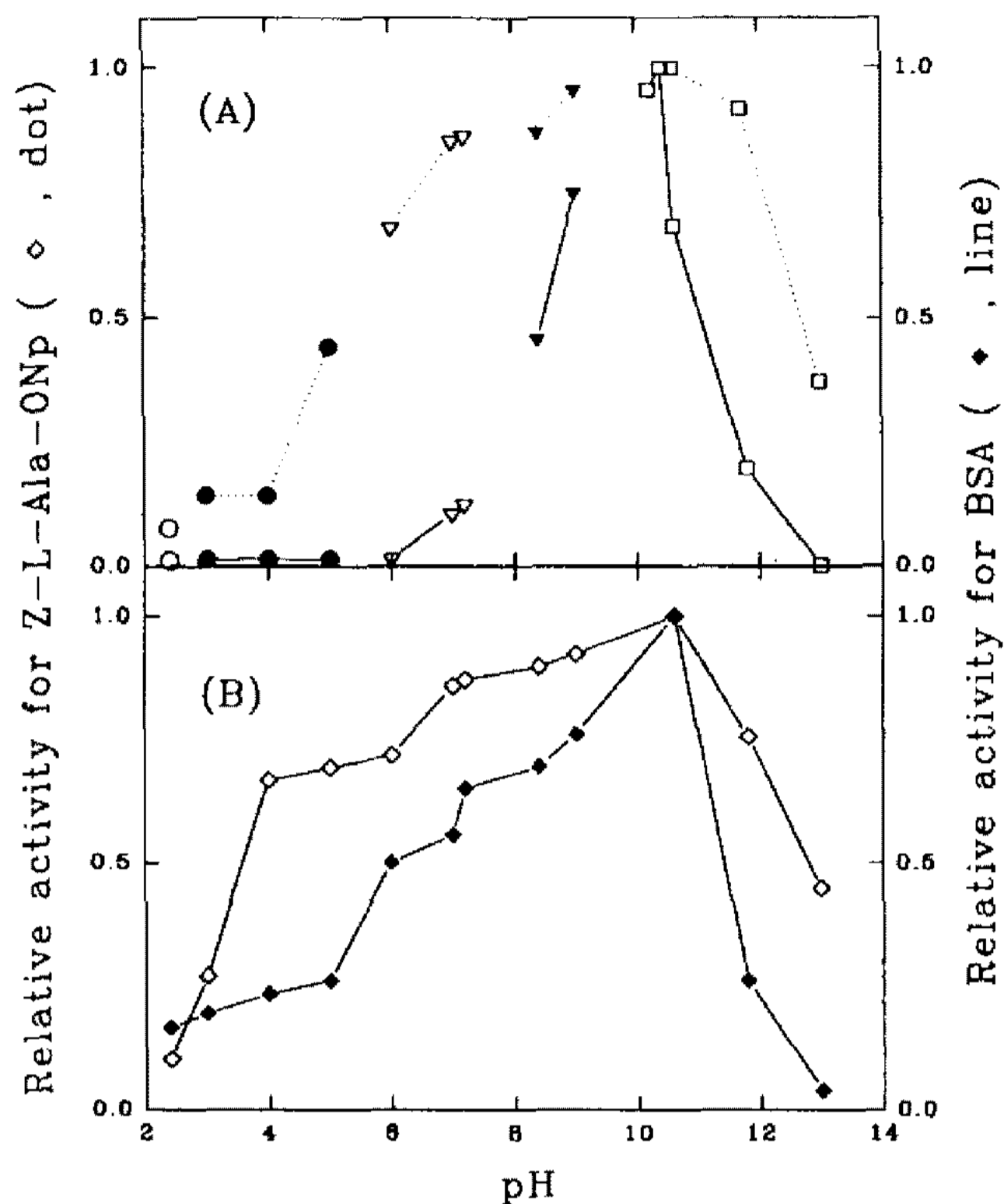


Fig. 4. The effect of pH on the enzyme activity.

A: Optimal pH. Buffers used were glycine-HCl (○), Na-citrate (●), K-phosphate (▽), Tris-HCl (▼), and glycine-NaOH (□). Solid line and dotted line indicate relative enzyme activity for BSA and Z-L-Ala-ONp, respectively. B: Relative pH stability of the enzyme activity for BSA (◆) and Z-L-Ala-ONp (◇). Enzyme solutions under the above buffers (all 50 mM) were stored at 4°C overnight prior to assay the remained each activities.

pH의 변화에 크게 영향을 받지 않은 반면에, protease 활성은 반응 pH의 변화에 민감한 것으로 나타나므로써, 효소 기질로 사용한 천연 단백질과 ester 화합물의 pH 변화에 따른 구조적 안정도의 차이가 시사되었다.

한편, 이 효소 단백질에 대한 EDTA 처리 및 금속이온 효과는  $Hg^{2+}$ 에 의한 것 이외에는 뚜렷한 활성의 증감 현상이 관찰되지 않았다(Table 3). 효소 활성에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 효소 반응을 위한 최적온도는 단백질 가수분해 활성이 ester 화합물 가수분해 활성보다 10°C 높은 40°C로 나타났으며, 이 효소 단백질의 half-life는 55°C에서 1시간으로, 90°C에서 1시간 이내에 모두 실패되었다.

#### 효소의 기질특이성(1)

본 효소 단백질의 ester 화합물 가수분해 활성을 측정하기 위한 표준기질로는 benzyloxycarbonyl-L-

**Table 3. Effect of metal ions on the enzyme activity**

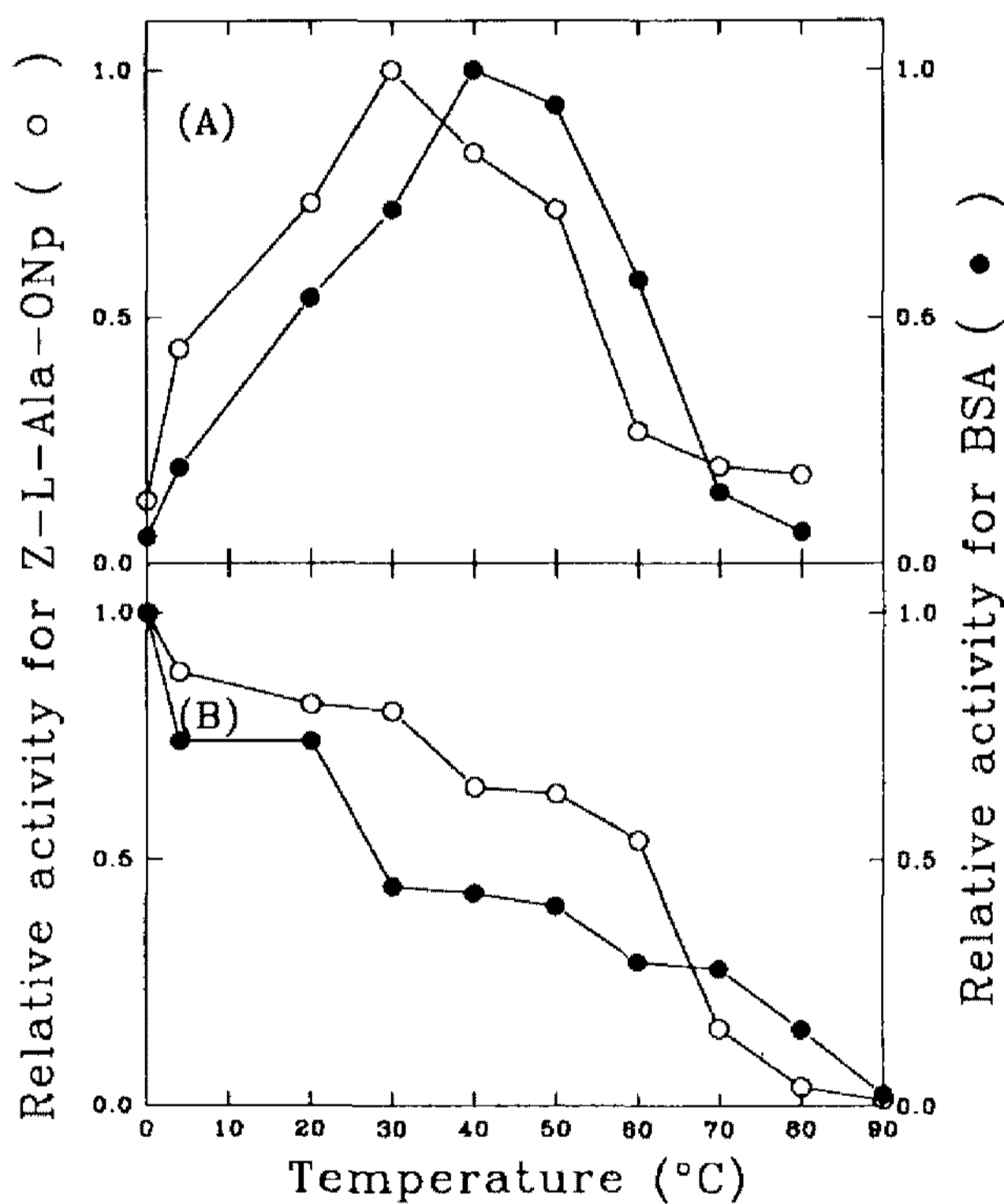
Metal ions (1 mM)	Relative activity of hydrolysis (%)	
	Z-Ala-ONp	BSA
none*	100	100
EDTA	89	65
MgCl <sub>2</sub>	84	70
CaCl <sub>2</sub>	80	70
CoCl <sub>2</sub>	99	60
CdCl <sub>2</sub>	86	73
HgCl <sub>2</sub>	29	17
ZnCl <sub>2</sub>	90	69
PbCl <sub>2</sub>	100	76
FeSO <sub>4</sub>	71	75
CuSO <sub>4</sub>	75	81
MnSO <sub>4</sub>	80	87
SnCl <sub>2</sub>	77	85
BaCl <sub>2</sub>	79	95

\*Enzyme preparation dialyzed against 10 mM EDTA at 4°C for overnight.

**Table 4. Substrate specificity of the purified enzyme**

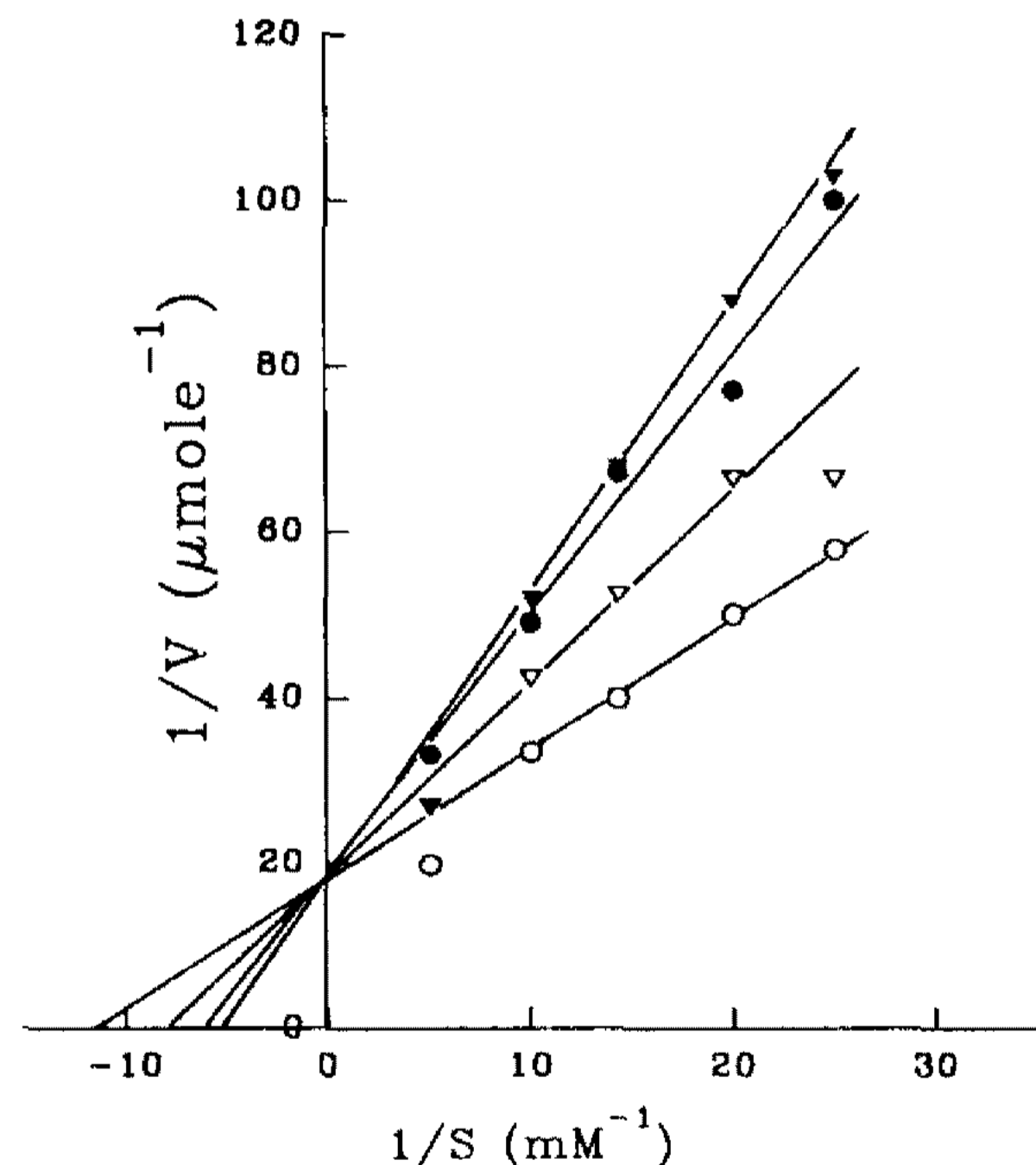
Substrate	Relative activity of hydrolysis (%)*
(A)	
Z-Gly-ONp	114
Z-L-Ala-ONp	100
Z-L-Leu-ONp	49
Z-L-Phe-ONp	82
Z-L-Trp-ONp	68
Z-L-Pro-ONp	6
Z-L-Val-ONp	60
Z-L-Lys-ONp	33
L-Leu-ONp	22
L-γ-Glu-ONp	11
(B)	
BSA	100
α-amylase	23
casein	33
lysozyme	74

\*Activity is expressed by percent ratio relative to that found in Z-L-Ala-ONp or BSA, respectively.



**Fig. 5. The effect of temperature on the enzyme activity.** A: Relative optimal temperature of the enzyme activity for BSA (●) and Z-L-Ala-ONp (○). B: Relative temperature stability of the enzyme activity for BSA (●) and Z-Ala-ONp (○).

alanine-*p*-nitrophenyl ester(Z-L-Ala-ONp)를 사용하였다. 기질특이성을 검토한 결과, glycine이나 alanine 잔기 이외에 방향족 아미노산 잔기에의 가수분해 활



**Fig. 6. Lineweaver-burk plot of the enzyme-catalyzed reaction.**

Enzyme (10 μg) was reacted with chromogenic substrate, Z-Ala-ONp, in the absence (○) or presence of 0.01 mM each of the following competitive substrates; BSA (●), lysozyme (▽), and α-amylase (▼).

성도 높은 것으로 나타난 반면, proline, 염기성 아미노산, 유리 아미노산 잔기 및 glutamyl-γ-carboxamide 등에는 비교적 낮은 가수분해 활성을 보였다

(Table 4A). 한편, 이 효소의 단백질 가수분해 활성 측정을 위하여 bovine serum albumin(BSA)을 표준 기질로 사용하였으며, 수종의 단백질을 이용하여 기질특이성을 검토한 결과, BSA와 lysozyme에 대한 높은 가수분해 활성과  $\alpha$ -amylase와 casein에 대한 낮은 가수분해 활성이 큰 대조를 보였다(Table 4B). Z-L-Ala-ONp와 각 단백질 기질 간의 효소 단백질에 대한 kinetics는 길항저해 양식을 보였다(Fig. 6). 이 효소 단백질의 Z-L-Ala-ONp 가수분해 활성에 있어서의  $K_m$ 은 0.09 mM,  $V_{max}$ 는  $5.8 \mu\text{moles mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ 의 값을 나타냈으며 단백질기질들의 저해 상수( $K_i$ )는 각각 BSA : 0.01 mM, lysozyme : 0.02 mM,  $\alpha$ -amylase : 0.007 mM로써 실험에 사용한 단백질기질들의 효소 단백질에 대한 친화력이 detector 기질인 Z-L-Ala-ONp 보다 모두 높은 것으로 나타났다.

## 고찰

토양으로부터 분리한  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase(E.C. 2.3.2.2)(15)의 고 생산균주인 *Bacillus* sp. KUN-17은 영양증식의 사멸기 즉, 포자형성기에 적어도 2종 이상의 protease를 위 효소와 함께 균체외로 분비하는데, 이들은 모두 균체의 lysis와 함께 유리되어 나오는 단백질로 추정되고 있다(Fig. 1)(1, 9). 이 논문에서는 이들 효소 중에서 특히 단백질의 random 가수분해 활성이 높은 protease를 정제, 물리화학적 특성을 조사하여 응용가능성에 관하여 검토하고자 하였다. 이 효소는 PMSF에 의하여 선택적으로 저해되며, 또한 반응 최적 pH가 10.5로써 serine(-alkaline) protease(E.C. 3.4.21.14)에 속하는 것으로 추정되며, 이 group은 특히 피혁 및 세제 공업에의 응용 대상으로써 미생물 유래의 관련 효소 단백질에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(2). Fig. 4, 5의 결과로부터 이 효소 단백질의 pH, 온도 등의 물리적 요인에 의한 안정성(pH 10.5,  $90^\circ\text{C}$  / 1 h)이 위에 열거한 방면에서 그 응용가능성을 강력히 시사해 주고 있다. 특히 비교적 고농도의 변성제(예; SDS, urea) 하에서도 대부분의 활성을 유지하는 특이한 성질은 enzyme detergent로서의 실용적 측면에서 가치가 인정된다고 생각된다. 확인한 바에 의하면, alkaline protease(16), extracellular 및 membrane-bound proteases(17), serine protease(18), Marburg proteinases(19), B.A. protease(20) 등 *Bacillus* sp. 유래의 관련 endoprotease의 많은 종류가 *Bacillus subtilis*에서 발견되어 왔으며, 현재 subtilisin 등 극히 제한된 효소단백질이 산업적으로 응용되고 있다(2). 이와 같은 관점에서 볼 때 KUN-

17 균주가 생산하는 protease의 산업적 응용을 위한 향후의 면밀한 검토가 필요한 것으로 생각한다. Fig. 6의 결과로부터 이 효소단백질은 단백질과 ester 기질들을 단일 활성중심에서 가수분해하는 것으로 사료되었다. 또한 ester 기질보다 단백질 기질에의 친화력이 높았으나 공시 단백질 들에의 친화력과 가수분해 속도와는 연관성이 낮은 것으로 나타났다(Table 4B). 이와 같은 현상은 Table 4A에서 시사하는 바와 같이 단백질의 특정 아미노산 잔기의 조성비로부터 기인하든지, 혹은 기질 단백질의 다양한 3차원 구조에서 비롯되는 것으로 추정되고 있다. 따라서, 향후 각종 천연 단백질에 대한 kinetic power( $V_{max}/K_m$ )를 비교 분석하여 이 효소 단백질의 식품, 세제산업 등에의 유용성 여부를 검토할 예정으로 있다.

## 요약

토양 세균인 *Bacillus* sp. KUN-17의 배양액으로부터 51배 정제된 protease는 분자량 38000의 단량체이며, phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF)에 의하여 선택적으로 활성이 억제되고, 반응 최적 온도 및 pH는  $40^\circ\text{C}$ , pH 10.5를 보이므로써 serine(-alkaline) protease(E.C. 3.4.21.14)에 속하는 것으로 판단되었다. 효소 활성의 half-life는  $55^\circ\text{C}$ 에서 1시간으로 나타났으며 SDS나 urea 등의 고농도 하에서도 활성이 유지되었다. 본 효소의 기질특이성은 사용한 chromogen 기질의 대부분이 본 효소에 의하여 가수분해 되므로써, random proteolysis가 시사되었다. 이 효소의 천연 단백질에 대한 친화력은 ester 기질보다 약 10배 이상인 것으로 나타났으며 이들 기질은 효소 단백질에 대하여 서로 길항저해 효과를 보였다.

## 감사의 글

본 연구수행과 논문 준비에 도움을 준 양준환과 김남형에게 감사한다.

## 참고문헌

1. 양준환, 황세영. 1992. *Bacillus* sp. KUN-17 균주가 생산하는 Protease II의 정제 및 특성. 과학기술논문집(고려대학교) 10: 43-48.
2. Ward, O.P. 1985. Proteolytic Enzymes, in Comprehensive Biotechnology 1st ed. by M.Y. Murray, Pergamon press: 789-792.
3. Johansen, J.T., M. Otteson, I. Svendsen and G. Wybrant. 1968. Degradation of the B-chain of

- oxidized insulin by two subtilisins and their succinylated and N-carbamylated derivatives. *Calsberg Res. Commun.* **36**: 365-384.
4. NaKagawa, Y. 1970. Alkaline proteinases from *Aspergillus*. *Methods Enzymol.* **19**: 581-591.
  5. Ebeling, W., H. Metz, H.D. Orth, and M. Klochow. 1970. Neues proteolytisches Enzyme und Verfahren zu seiner Herstellung. *Ger. Offen.* **1**: 965-981.
  6. Guntelberg, A.V. and M. Ottesen. 1952. Preparation of crystals containing the plakalbumin-forming enzyme from *Bacillus subtilis*. *Nature(London)* **170**: 802.
  7. Smith, E.L., R.J. DeLange, W.H. Evans, M. Landon, and F.S. Markland. 1968. Subtilisin Calsberg. V. The complete sequence: comparison with subtilisin BPN: evolutionary relationship. *J. Biol. Chem.* **243**: 2184-2191.
  8. Ottesen, M. and A. Spector. 1960. A comparison of two proteinases from *Bacillus subtilis*. *C.R. Trav. Lab. Calsberg.* **32**: 63-74.
  9. 윤지수, 강진구, 양준환, 황세영. 1991. *Bacillus* sp. KUN-17 균주가 생산하는 Protease에 관한 연구. 과학기술논문집(고려대학교) **9**: 59-65.
  10. Binkley F, F. Leibach, and N. King. 1968. A new method of Peptidase assay and the separation of three leucyl-glycinases of renal tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* **128**: 397-405.
  11. 양준환, 황세영. 1992. *Bacillus* sp. KUN-17 균주에서의 Amidase와 Esterase 생산양식. 생물공학논문집(고려대학교) **4**: 43-47.
  12. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
  13. Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406-4412.
  14. 宇井信生. 1976. 生化學實驗 講座 **1**: 222-261.
  15. Barman, T.E. 1985. Enzyme Handbook. Suppl. 1, by Springer-Verlag, 199.
  16. Takami, H., T. Akira, and K. Horikoshi. 1992. Substrate specificity of thermostable Alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**(2): 333-334.
  17. Mantsala, P. and H. Zalkin. 1980. Extracellular and membrane-bound Proteases from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **141**: 493-501.
  18. Roitsch, C. and J.H. Hageman. 1983. Bacillopeptidase F: two forms of a glycoprotein Serine protease from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **155**: 145-152.
  19. Millet, J. 1970. Characterization of proteinases excreted by *Bacillus subtilis* Marburg strain during sporulation. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 207-219.
  20. Tsuru, D., H. Kira, T. Yamamoto, and J. Fukumoto. 1966. Studies on bacterial protease XVI. Purification, crystallization and some enzymatic properties of alkaline protease of *Bacillus subtilis* var. amylosacchariticus. *J. Agric. Biol. Chem.* **30**: 1261-1268.

(Received 22 August 1994)