

## Alkaline protease를 생산하는 미생물의 분리, 동정 및 효소성질

고정연\* · 신공식<sup>1</sup> · 강상모<sup>2</sup>

한국과학기술원, <sup>1</sup>충북대학교 첨단원예기술개발센터, <sup>2</sup>건국대학교 미생물공학과

**초 록 :** 저온에서 높은 세척력을 갖는 효소세제의 개발을 위하여 토양으로부터 alkaline protease의 활성이 높은 균주를 분리, 동정하였으며, 효소의 성질을 조사하였다. 분리균주의 형태적 특징은 Gram 음성균 이고, 간균(0.6~0.7 × 1.3~2.6 μm in size)의 형태를 하고 있으며, 운동성을 보였다. 또한 catalase 양성, aesculin, gelatin 및 casein 분해능이 있었다. 분리균주의 세포벽 구성 성분은 meso-DAP를 함유하였으며, G+C mol 함량은 43.3%를 나타내었다. 이러한 형태적, 생리·생화학적 특성의 결과로부터 분리 균주는 *Acinetobacter* 속으로 동정되었다. 분리 균주를 이용한 alkaline protease의 생산은 초기 pH 10과 40°C에서 36시간 배양하였을 때 3,300 D.U./mL로 최대 효소 활성을 보였으며, 최적 pH와 온도는 9와 60°C이었다. 또한 본 균주에 의해 생산된 alkaline protease는 두개의 활성 band를 나타내었다. (2000년 5월 2일 접수, 2000년 8월 18일 수리)

### 서 론

최근 효소산업의 급격한 발전으로 다양한 효소들이 생산 가능되고 있으며 특히 미생물 기원성 효소는 안정성, 생산성 및 비용절감 등의 여러 잇점이 있기 때문에 그 중요성과 이용율이 증가하고, 활발한 연구가 진행 되고있다.<sup>1)</sup> 그 중에서도 protease는 단백질 혹은 peptide에 작용하여 peptide bond의 가수분해를 촉매하는 효소로서 생산원에 따라 동물성, 식물성, 미생물 기원성으로 구분되고, 또한 효소반응의 최적 pH에 따라 산성, 중성, 알칼리성 protease로 나눈다. 이외에도 활성구조에 따라 serine protease, thiol protease, metal protease, non-metal protease 등으로 구분하기도 한다.<sup>2)</sup>

alkaline protease는 세제, 피혁가공, 의약품, 제지공업, 연육가공 등에 널리 사용되고 있으며, 이 중 세제 및 피혁공업에서 가장 높은 비율을 차지하고 있다. alkaline protease에 관한 연구는 Horikoshi<sup>3)</sup>가 *Bacillus* sp.를 분리하여 효소학적 특성을 발표한 이후 Nakadai 등<sup>4)</sup>은 *Aspergillus oryzae*, Kobayashi 등<sup>5)</sup>은 *Pseudomonas maltophilia*, 그리고 Banerjee 등<sup>6)</sup>은 *Rhizopus oryzae*의 호알칼리성 protease에 관한 연구를 보고하였다. 특히 Willadsen 등<sup>7)</sup>은 세제용으로 적합한 효소를 *Bacillus pumilus*로부터 생산하여 효소학적 특성을 조사하였으며, 국내에서도 Choi 등<sup>8)</sup>은 호알칼리성 Coryneform bacterium을 분리, 동정하였고, Yeo 등<sup>9)</sup>은 *Alteromonas* sp.로, Kim 등<sup>10)</sup>은 *Thermoactinomyces* sp.로부터 열에 안정한 alkaline protease의 효소 특성을 조사하였다. 또한 Chang 등<sup>11)</sup>은 *Xanthomonas* sp.로부터 세제 첨가용 alkaline protease를 정제하여 그 효소학적 성질을 검토하였으며, Kim 등<sup>12)</sup>은 *Halomonas* sp.가 생산한 효소를 이용하여 세제성분과 세척조건에 따른 세척력을 검토한 바 있다.

한편 세제에 첨가하기 위한 protease의 조건은 pH 9~11의

강알칼리 조건에서 작용하고, 계면활성제, 형광염료, 표백제 및 향료 등의 성분에 의한 실활이 적으며, 비교적 저온의 세탁온도에서 활성이 유지되어야 한다. 그러나 현재 시판 중인 세제 첨가용 protease는 고온활성(40°C이상)으로 우리 나라를 비롯한 동북아시아의 세척조건인 15~20°C에서는 부적합하며 효과적인 세정효과를 나타내지 못하고 있다.

따라서, 본 연구는 저온의 세척조건에서 고활성을 유지하는 alkaline protease를 개발하기 위하여 토양으로부터 세제내성의 alkaline protease 생산균주를 분리, 동정하고, 그 효소학적 성질을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주의 분리 및 배양

토양으로부터 세제 내성을 지니면서 alkaline protease를 생산하는 균주를 선별하기 위해 분리용 배지(yeast extract 0.1%, NaCl 0.5%, detergent 0.2%, skim milk powder 3%, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2%, agar 1.5%, DW 1l, pH 10.0)에 토양 현탁액을 도말하고 20°C 배양기에서 4일간 배양한 후 균의 생육이 좋고 큰 halo size를 갖는 것을 1차 선별하였다. 선별된 균주를 toothpick을 이용하여 동일 배지에 접종하고 성장과 효소활성이 높은 균주를 다시 액체배지에서 20°C, 2일간 진탕배양한 후 원심 분리하여 얻은 상등액을 agar plate에 구멍을 내어 50 μl씩 분주하여 단백질 분해에 의해 생성된 clear zone의 크기가 큰 것을 선별하였다. 최종 선별은 액체배양한 배양액을 원심분리하여 상등액을 20°C와 40°C 각각의 조건에서 효소활성을 측정하여 높은 활성과 각 온도에서 고른 활성을 갖는 alkaline protease 생산균주를 분리하였다. 균주는 보관용인 종균배지(sucrose 6%, tryptone 2%, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.2%, NaCl 0.2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.02%, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.3%, agar 1.5%, DW 1l, pH 7.0)에서 백균이로 1회 취하여 동일 액체 배지에 접종하여 20°C에서 24시간 진탕배양한 것을 종균으로 사용하였다.

찾는말 : 효소세제, alkaline protease, *Acinetobacter* sp.  
\*연락처 : Tel : 82-42-869-2662; Fax : 82-42-869-2610  
E-mail : 9460114ko@hanmail.net

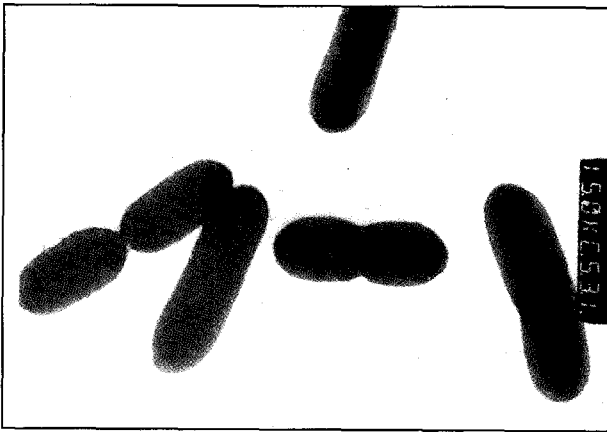


Fig. 1. Electron micrographic of the isolated strain KN-27(x19,500). Bacteria were cultured on the isolate medium at 20°C for 24 hrs.

**균체량 측정**

균의 성장 정도를 측정하기 위해 배양액을 증류수로 2배로 희석한 후 분광광도계(Shimadzu, UV-120-02)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**분리 균주의 동정**

선발된 균주의 형태학적 특성은 Gram 염색, 집락의 크기, 모양, 색깔 등을 관찰하였고, 생리학적 특성으로는 gelatin 액화력, indole 생성능, nitrate 환원력 및 catalase, oxidase, urease의 생성 유무 등을 조사하였다. 세포벽 구성 성분의 분석은 Komagata<sup>13)</sup>의 방법에 따라 cellulose TLC plate에 시료를 점적하고 methanol : water : 6 N-HCl : pyridine(80 : 20 : 4 : 10, v/v)을 이동상으로 하여 전개하고 acetonic ninhydrine으로 발색시켜 diaminopimelic acid(DAP) isomer를 분석하였다. 또한 DNA염기 성분 중의 G+C mol 함량은 Tamaoka<sup>14)</sup>의 방법에 따라 HPLC를 사용하여 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 acetonitrile(20 : 1, v/v)을 이동상으로 하여 측정하였다. 이 균주의 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology<sup>15)</sup>와 Manual for the identification of medical bacteria<sup>16)</sup>에 준하였다.

**단백질분해효소의 활성측정**

조효소액은 효소생산 배지( $\beta$ -D fructose 1%, soybean meal 2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.02%, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.3%, DW 1 l, pH 10.0)에서 20°C 및 40°C, 36시간 배양한 후 배양액을 원심분리(12,000 rpm)하여 상등액을 사용하였으며, alkaline protease의 활성은 Yamada 등<sup>17)</sup>의 변형방법으로 Hammarsten casein을 기질로하여 Delft Unit-assay 법으로 측정하였다. 즉, 0.2M Tris-HCl(pH 8.5) 완충액에 casein을 1.2%로 용해하여 5 ml을 취하고, 적당한 배수로 희석한 효소액 1 ml를 첨가하여 40°C water bath에서 shaking 하면서 40분 반응시킨 후, 반응 중지액으로 TCA 혼합액(0.11 M trichloroacetic acid(TCA), 0.22 M sodium acetate, 0.33 M acetic acid, glacial) 5 ml를 넣어 반응을 중지시키고, 상온에서 30분 정도 방치 후 원심분리하였다. 여기서 얻어진 상등액을 275 nm에서 흡광도를 측정하여 효소활성으로 나타내었다.

Table 1. Protease activity of the selected strains

Isolated strain	Halo size	OD (660 nm)	Final pH	Protease activity (D.U*/mL)	
				20°C	40°C
KN-1	++	1.52	8.88	610	2,280
KN-9	++	1.43	9.11	860	2,830
KN-27	+++	1.62	8.90	1,040	3,340
KN-33	++	1.24	8.98	710	2,640
KN-38	++	1.27	8.94	770	1,710

\*Delft unit.

Table 2. Morphological and cultural characteristics of the isolated strain KN-27

Characteristics	KN-27
Shape	Rod
Diameter( $\mu$ m)	0.6-0.7
Length( $\mu$ m)	1.3-2.6
Gram stain	-
Growth in air	+
Growth anaerobically	-
Growth at 42°C	d
Motility	+

+: positive, -: negative, d: 11 ~ 89% of colony are positive.

**전기영동**

Native polyacrylamide gel 전기영동은 Arvidson 등<sup>18)</sup>의 방법에 따라 행하였으며 gel의 acrylamide 함량은 7.0%를 사용하였다. Native PAGE를 통하여 얻은 gel을 protein 분해능을 확인하기 위하여 2.5%의 skim milk가 포함된 molten agarose plate에 겹쳐 37°C에서 30분 간 반응시킨 후 형성된 active band를 확인하였다.

**결과 및 고찰**

**Alkaline protease 생산 균주의 분리 및 선발**

토양으로부터 얻은 각종 균원 시료를 분리용 고체배지와 액체배지를 이용하여 casein 분해에 따른 clear zone이 크고, 상등액의 효소활성이 높은 5개의 균주를 선발하여 Table 1에 나타내었다. 최종 선발은 20°C와 40°C에서 clear zone 및 배양상 등액의 두 조건에서 효소활성이 높게 나타나고, 세포증식이 양호한 KN-27균주를 최종 선발하였다.

**분리 균주의 동정**

**형태 및 생리학적 특성 :** 선발균주의 세포형태는 Table 2에 나타낸 바와 같이 간균이며 크기는 직경이 0.6-0.7  $\mu$ m이고 길이는 1.3-2.6  $\mu$ m로서 고체배지에서는 circular form의 colony를 형성하며 colony의 색깔은 연한 yellow 색을 띠었다. 또한 spore를 형성하지 않았고, 약한 운동성을 가진 호기성의 세균이었다.

**배양 및 생화학적 특성 :** 선발균주는 Table 3에 나타낸 바와 같이 oxidase, urease, glucose(acid), phenylalanine deaminase test에서 음성반응을 보였으며, catalase test, MacConkey 배지

**Table 3. Biochemical and physiological characteristics of the isolated strain KN-27**

Characteristics	KN-27
Carbohydrate degradation	-
glucose	-
dulcitol	-
rhamnose	-
xylose	-
lactose	-
maltose	-
adonitol	-
arabinose	-
raffinose	-
sorbitol	-
sucrose	-
trehalose	-
inositol	-
Catalase	+
Oxidase	-
Glucose(acid)	-
Carbohydrate(F/O/-)	O
Growth in KCN	-
Citrate as C source	+
Gas from glucose	-
MR test	-
VP test	-
Aesculin hydrolysis	+
Indole	-
Gelatin liquefaction	+
Urease	-
Lysine decarboxylase	+
Ornithine decarboxylase	+
Arginine decarboxylase	+
Phenylalanine	-
Growth on MacConkey	+
Growth on nutrient broth	+
Nitrate reduced	-
Starch hydrolysis	-
Tween 80 hydrolysis	+
ONPG ( $\beta$ -galactosidase)	-
Casein hydrolysis	+

+: positive, -: negative, O: oxidative.

및 NB 배지 등에서는 양성반응을 보였다.

또한 분리균주 KN-27의 세포벽 Diaminopimelic acid(DAP)를 분석한 결과 meso-DAP 성분을 갖는 것으로 나타났으며, DNA의 G+C mol 함량은 43.3%를 보였다. 대부분의 *Acinetobacter* sp.는 38~47%를 함유하므로 본 균주가 *Acinetobacter* sp.에 속하는 것으로 추정하였다.

이들 결과를 Bergey's manual of systematic bacteriology<sup>15)</sup>와 Manual for the identification of medical bacteria<sup>16)</sup>에 준하여 동정한 결과 본 균주는 *Acinetobacter* sp. KN-27로 최종 동정하였다.

#### 배양시간에 따른 효소생산

배양시간에 따른 균의 성장과 효소의 생산을 조사하기 위해

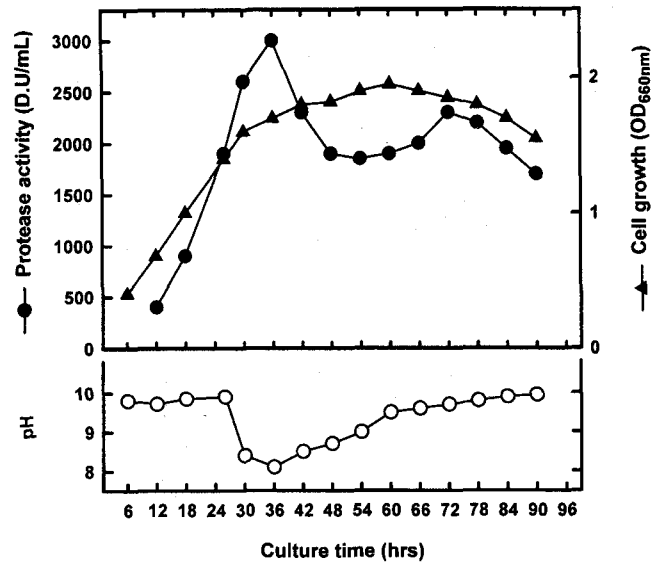


Fig. 2. Time course of cell growth and the protease production by *Acinetobacter* sp. KN-27.

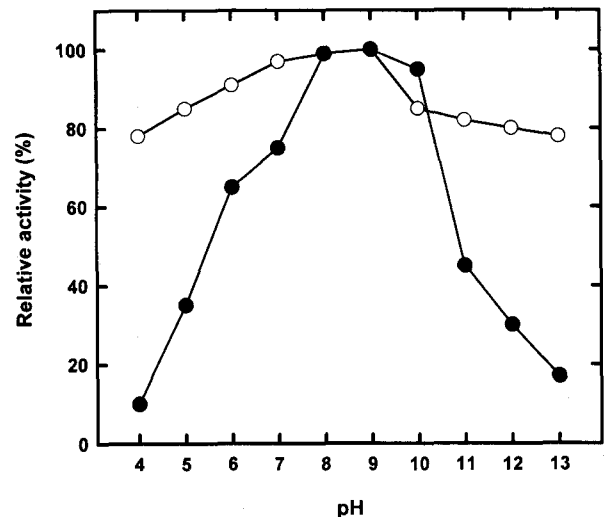


Fig. 3. Effect of pH on the activity and stability on the protease from *Acinetobacter* sp. KN-27. pH 4-5: 100 mM citrate buffer, pH 6: 100 mM phosphate buffer, pH 7-9: 100 mM Tris-Cl buffer, pH 10-11: 100 mM sodium borate buffer, pH 12-13: NaOH-KCl buffer. ●: optimal pH, ○: pH stability.

protease 생산배지에 분리한 균주를 접종하여 초기 pH를 10.0, 온도는 40°C에서 90시간 진탕배양하면서 균의 증식, pH 변화 및 효소생성량을 측정하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 균의 성장은 초기 30시간 까지 대수적으로 증가하였으며, 이와 더불어 배양액내의 효소활성이 급격히 증가하여 접종 36시간 경과했을 때 효소 생산량이 3,300 D.U./mL로 최대를 나타내었다. 그 이후 활성이 감소하다가 배양 72시간이었을 때 효소활성이 다시 상승하는 것을 볼 수 있었다. 이때 pH의 변화는 배양초기 24시간까지는 큰 변화가 없었으며, 24시간 이후 pH가 감소하다가 36시간이 지나면서 다시 pH가 상승하였고, 세포성장이 정지기에 도달하게 되었다. 따라서 본 균주의 alkaline protease의 생산에 대한 배양 특성은 균의 성장에 따라 효소를 생산한다는

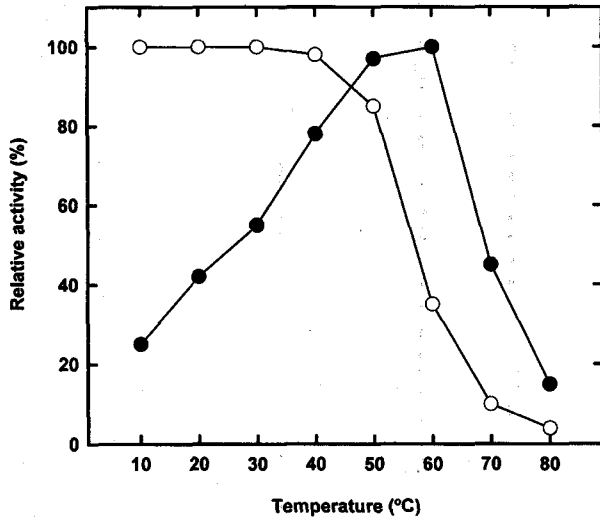


Fig. 4. Effect of temperature on the activity and stability of the protease from *Acinetobacter* sp. KN-27. ●: optimal temperature, ○: temperature stability.

것을 알 수 있다. 효소의 분비양상이 균의 성장과 같이 증가하는 것은 효소의 기능이 세포의 성장에 필요한 영양분으로 질소원을 체내로 공급하기 위한 주요 수단이라고 Choi 등<sup>8)</sup>은 설명하고 있고, 다른 한편 *Bacillus* sp.의 경우 대수증식기 말경에 효소를 분비하는데 이는 포자형성과 상당한 관련이 있다고 추정하였다.<sup>3)</sup>

#### 효소의 성질

**효소의 최적 pH 및 안정성 :** 본 균주가 생산하는 protease의 최적작용 pH를 조사하기 위하여 pH 4.0~5.0 범위는 100 mM citrate, 6.0은 100 mM phosphate, 7.0~9.0은 100 mM Tris-Cl, 10.0~11.0은 sodium borate 및 12.0~13.0은 NaOH-KCl buffer를 사용하여 60°C에서 30분간 반응시켜 그 활성을 측정된 결과 Fig. 3와 같이 pH 9.0에서 최적작용을 나타냈으며 pH 10.0 이후 효소활성이 점점 감소하였다. 또한 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 pH 4.0에서 pH 13.0까지 위와 같은 buffer로 각각 조절하여 60°C에서 30분간 처리하고, 최적 활성 pH인 9.0에서 잔존활성을 측정된 결과 전체적으로 고온 잔존활성을 보여 pH에 의한 활성의 감소를 받지 않는 것으로 나타났다. 이는 최적 활성이 pH 12.0로 보고한 Horikoshi 등<sup>3)</sup>과, Bac 등<sup>19)</sup>의 결과와 Matsuzawa 등<sup>20)</sup>의 pH 10.5~11.0보다 다소 낮았으나, Kim 등<sup>10)</sup>의 *Thermoactinomyces* sp.의 pH 9.0~10.0와 같은 수준이었다. 또한 pH 안정성에서 Chang 등<sup>11)</sup>은 *Xanthomonas* sp.의 pH 5.0~12.0 범위와 비슷하였으며, Kim 등<sup>21)</sup>의 *Halomonas* sp.의 pH 7.0~11.0보다 훨씬 넓은 영역에서 안정하였다. 따라서 *Acinetobacter* sp. KN-27균주에 의해 생산되는 alkaline protease는 pH 9.0의 알칼리 범위에서 효소활성이 안정하므로 세제용 효소로 이용가능성이 높다고 사료된다.

**효소의 최적온도 및 열안정성 :** 본 균주가 생산하는 protease의 최적반응 온도를 조사하기 위하여 pH 9.0으로 하여 10°C부터 80°C까지 각각으로 30분간 반응시킨 후 활성을 조사한 결과 Fig. 4와 같이 60°C에서 최적 활성을 보였다. 열에 대한 안

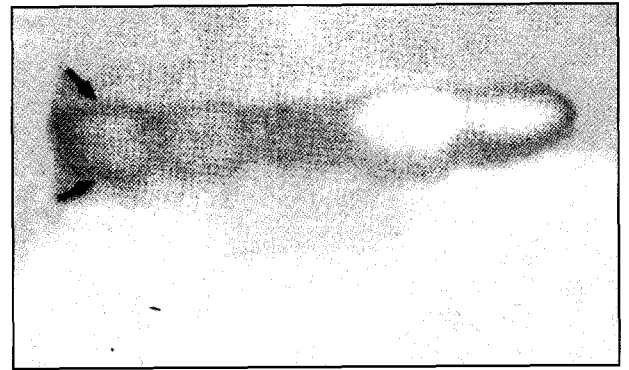


Fig. 5. Active bands of alkaline protease from *Acinetobacter* sp. KN-27. Arrows are the active bands of alkaline protease on the electrophoresis of native gel. Enzymes were separated on native PAGE with 7.0% acrylamide, and then the active reaction of alkaline protease was carried out with molten agarose plate containing 2.5% skim milk at 37°C.

정성은 10°C에서 80°C까지 각각의 온도에서 30분간 열처리 후 최적활성온도인 60°C에서 기질과 반응시켜 그 잔존활성을 측정된 결과 40°C까지는 변화가 없었으며 60°C 이상에서는 불안정하였다. 이 결과는 Rahman 등<sup>22)</sup>의 *Bacillus stearothermophilus*와 Matsuzawa 등<sup>20)</sup>의 *Thermus* sp.의 최적 활성온도 75°C, Kim 등<sup>12)</sup>의 70°C보다 낮았으며, Horikoshi 등<sup>3)</sup> 및 Kobayashi 등<sup>5)</sup>의 50°C, Toshinoro 등<sup>23)</sup>의 *Streptomyces* sp.의 60°C와 같았다. 또한 Yeo 등<sup>9)</sup>의 *Alteromonas* sp.의 경우 35~40°C, Kim 등<sup>21)</sup>의 *Halomonas* sp.의 35~45°C보다는 높았다. 열에 안정성은 Kunitate 등<sup>24)</sup>의 65°C와 Chang 등<sup>11)</sup>의 60°C보다 낮았고, Kim 등<sup>21)</sup>과 Yeo 등<sup>9)</sup>의 50°C와 같은 수준이었다. 또한 본 균주는 최적온도 20°C의 저온에서도 42% 활성을 보였는데, Chang 등<sup>11)</sup>은 *Xanthomonas* sp. YL-37의 최적온도 중 20°C에서 약 40%의 활성을 나타내어 저온세제용 효소로 이용가능성이 높다고 판단한 바 있다. 이로 보아 본 균주의 경우도 우리나라 및 동, 북아시아의 세탁조건에 맞는 세제용 효소로서 이용가능 할 것으로 생각된다.

#### 전기영동

선정된 균주 KN-27이 생산하는 protease의 활성 band를 확인하기 위하여 조효소 용액을 이용하여 native PAGE를 한 다음 skim milk 2.5%가 포함된 molten agarose plate에서 반응시켜 본 결과 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 *Acinetobacter* sp. KN-27이 생산하는 alkaline protease는 두개의 활성 band를 가지고 있는 것으로 나타났다.

#### 참고문헌

1. Miller, B. M. and Litsky, W. (1976) In 'Industrial Microbiology,' 5th Ed., pp. 128, McGraw-Hill Book Co., New York.
2. Meyrath, J. and Volavsek, G. (1975) In 'Enzymes in Food Processing,' 2nd Ed., pp. 255-300, Academic press, New York.
3. Horikoshi, K. (1971) Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganism. Part I. Alkaline protease produced

- by *Bacillus* sp. No. 221. *Agric. Biol. Chem.* **35**, 1407-1414.
4. Nakadai, T., Nasuno, S. and Iguchi, N. (1973) Purification and some properties of alkaline proteinase from *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* **37**, 2685-2694.
  5. Kobayashi, T., Ogasawara, A., Ito, S. and Saito, N. (1985) Purification and some properties of alkaline proteinase produced by *Pseudomonas maltophilia*. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 693-698.
  6. Banerjee, R. and Bhattacharya, B. C. (1993) Kinetic properties of extracellular alkaline protease of *Rhizopus oryzae*. *J. Ferment. Bioeng.* **75**, 380-382.
  7. Willadsen, K. J. S. and Vestberg, K. P. (1976) U.S. Patent No. 3960665.
  8. Choi, M. C. Yang, J. S. and Kang, S. C. (1996) Isolation and identification of an alkaliphilic coryneform bacterium TU-19 producing extracellular protease. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 160-165.
  9. Yeo, I. O., Choi, J. S. and Kim, C. J. (1995) Characteristics of an alkaline protease from *Alteromonas* sp. *Agric. Chem. Biotechnol.* **38**, 106-110.
  10. Kim, Y. O., Lee, J. K., Sunitha, K., Kim, H. K. and Oh, T. K. (1999) Minor thermostable alkaline protease produced by *Thermoactinomyces* sp. E79. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 469-474.
  11. Chang, H. S. and Kwon, T. J. (1998) Purification and properties of alkaline protease from *Xanthomonas* sp. YL-37. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 427-434.
  12. Kim, C. J., Lee, J. S., Choi, S. H. and Oh, M. J. (1997) Enzyme detergent using alkaline protease produced by *Halomonas* sp. ES-10. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 51-55.
  13. Komagata, K. and Suzuki, K. (1987) Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. In 'Methods in Microbiology,' Vol 19, pp. 161-207, Academic Press, N.Y.
  14. Tamaoka, J. and Komagata, K. (1984) *FEMS Microb. Lett.* **25**, 125-128.
  15. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (1986) In 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,' Vol. 2, Williams & Wilkins, Baltimore.
  16. Cowan and Steel (1974) In 'Manual for the Identification of Medical Bacteria,' 2nd Ed., Cambridge University Press.
  17. Yamada, K. and Komagata, K. (1972b) Taxonomic studies on coryneform bacteria. V. classification of coryneform bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **18**, 417-431.
  18. Arvidson, S. and Wadstrom, T. (1973) Detection of proteolytic activity after isoelectric focusing in polyacrylamide gel. *Biochim. Biophys. Acta.* **310**, 418-420.
  19. Bae, M. and Park, P. R. (1989) Purification and characterization of thermotolerable alkaline protease by alkaliphilic *Bacillus* sp. No. 8-16. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 545-551.
  20. Matsuzawa, H., Hamaoki, M. and Ohta, T. (1983) Production of thermophilic extracellular protease (aqualysin I and II) by *Thermus aquaticus* YT-1, an extreme thermophile. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 25-28.
  21. Kim, C. J., Oh, M. J. and Choi, S. H. (1992) Characteristics of the alkaline protease from the moderate halophile, *Halomonas* sp. ES 10. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **35**, 237-241.
  22. Rahman, R. N. Z. A., Kamaruzaman, C. N. R., Basri, A. M. Yunus, M. Z. W. and Salleh, A. B. (1994) Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus strearothermophilus* F1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 822-827.
  23. Toshihiro, N. and Yamamoto, T. (1974) *Agric. Biol. Chem.* **38**, 2391-2397.
  24. Kunitate, A., Okamoto, M. and Ohmori, I. (1989) Purification and characterization of a thermostable serine protease from *Bacillus thuringiensis*. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 3251-3256.

#### Isolation, Identification and Enzyme Properties of a Bacterium producing Alkaline Protease

Jung-Youn Ko\*, Kong-Sik Shin<sup>1</sup>, Sang-Mo Kang<sup>2</sup>(\*Departure of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon, 305-701; <sup>1</sup>Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Department of Horticulture, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763; <sup>2</sup>Department of Microbiological Engineering, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea)

**Abstract :** For the development of enzyme detergent capable of effectively washing at low temperature, a bacterium producing alkaline protease was isolated from soil samples, and properties of the enzyme were investigated. The selected strain was Gram negative, rod shape(0.6~0.7×1.3~2.6 μm in size) and motile. It had the degradation activity of aesculin, gelatin and casein, and was catalase-positive. The cell wall components was meso-DAP, and G+C mole contents was 43.3%. From these results, the strain was identified as *Acinetobacter* sp. KN-27. The activity of alkaline protease by this strain peaked with 3,300 D.U./mL after 36 hours in the liquid culture at 40°C. The optimal pH and temperature of the enzyme were pH 9 and 60°C, respectively. Alkaline protease produced by *Acinetobacter* sp. KN-27 has shown two active bands on the electrophoresis of native gel.

Key words : enzyme detergent, alkaline protease, *Acinetobacter* sp.

\*Corresponding author