

Vibrio vulnificus CYK 279H에서 Collagenolytic Protease 생산을 위한 최적배양조건

강 성 일 · 김 영 문 · 장 영 부 · 임 동 중 · † 공 재 열
부경대학교 생물공학과

(접수 : 2004. 6. 29., 게재승인 : 2004. 8. 23.)

The Optimal Culture Condition for the Collagenolytic Protease Production from *Vibrio vulnificus* CYK279H

Sung-Il Kang, Young-Mun Kim, Young-Boo Jang, Dong-Jung Lim, and Jai-Yul Kong†
Department of Biotechnology & Bioengineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

(Received : 2004. 6. 29., Accepted : 2004. 8. 23.)

A marine bacterium for producing an collagenolytic protease was isolated from the southern sea of Korea and identified as *Vibrio vulnificus* and named as *Vibrio vulnificus* CYK279H. This strain producing an collagenolytic protease was showed high activity toward collagen and gelatin as substrate. The optimum initial pH, NaCl, and temperature for cell growth and protease production was 7.5, 2.0% and 25°C, respectively. Optimization for collagenolytic protease production was composed of 0.3% D-galactose, 0.6% yeast extract, 4.0% gelatin, 0.2% (NH₄)₂SO₄, and 0.2 mM ferric citrate in artificial sea water. The maximum protease production was required gelatin and yeast extract. The collagenolytic protease production by *Vibrio vulnificus* CYK279H reached a maximum of 73 unit/l after the cultivation for 18 h under the optimized medium.

Key Words : Collagenolytic protease, *vibrio vulnificus*, optimization, marine bacterium, gelatin

서 론

현대사회가 발달함에 따라 동·식·미생물에서 생산해 내는 최종산물인 단백질에 관심을 갖게 되었으며, 이 단백질들은 protease에 의해서 활성화 되거나 혹은 파괴되어 세포로 하여금 적절한 기능을 수행할 수 있도록 한다. Protease는 약 40년 전만해도 주로 식물의 papain, bromelain, 동물의 장기효소인 papsin, trypsin, renin 등의 응용의 대상이었으나, 다양한 산업적 수요를 충족하기에 공급이 제한되어 있으므로, 미생물로부터 산업적으로 유용한 protease를 생산하기 위해 많은 노력을 기울이고 있다. 실제, 미생물로부터 유래한 protease가 전 세계 효소 시장의 40%를 점하고 있다(1). Protease의 기능과 활성면에서는 plasmin, elastase와 같은 serine계, cathepsin B, L과 같은 cysteine계, cathepsin D와 같은 aspartyl계, collagenase, gelatinase, stromelysin과 같은

metallo계 등 4가지로 분류되어있다(2, 3). 그 중 천연콜라겐의 3중 나선 부위를 특이적으로 분해할 수 있는 collagenolytic protease는 생리적인 조건 하에서 천연 콜라겐의 구조를 붕괴시키지 않고 main body peptide chain을 분해하는 특이적인 효소로 알려져 있다(4). 그리고, 이 protease는 효소활성과 안정성에 Zn²⁺, Ca²⁺를 필요로 하는 것으로 보고되어져 있으며, 작용기작과 특성은 명확히 연구되어 있지 않다(4, 5). 현재 bacteria에서 collagen과 gelatin을 분해하는 것으로 보고된 미생물로는 *Bacillus*, *Serratic*, *Cytophage*, *Vibrio*, 그리고 *Clostridium* sp.(6-12) 등을 들 수 있다.

최근에는 bacterial protease에 의해 분해되어 생성된 가수분해물이 고혈압 예방과 항암효과 등이 있다는 연구결과가 발표되면서 이들에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(13, 14). 일반적으로 산 또는 알칼리에 의한 단백질 가수분해 방법은 이취발생과 맛의 변화 등을 수반하는 문제점이 있는 반면, 효소에 의한 가수분해 방법은 반응이 비교적 온화한 조건에서 진행되므로 영양성분의 파괴나 냄새, 맛 등의 변화가 거의 일어나지 않으므로 제품의 품질저하를 방지할 수 있는 이점이 있어(15), 산업적으로 식품이나 제약산업에서 매우 유리하다. 특히 collagen 가수분해물은 식용으로 젤리, 크림 source, 어묵제조 및 향미제 등에, 의

† Corresponding Author : Department. of Biotechnology & Bioengineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Tel & Fax : +82-51-620-6181

E-mail : kongjy@pknu.ac.kr

약용, 공업용, 산업용으로는 연-경질 캡슐, 필름, 화장품의 원료 및 지폐제조 등에 광범위하게 응용되고 있다(16, 17). 그리고 산업적으로 경제성이 높은 protease를 생산하기 위해 다량으로 효소를 분해하는 균주를 자연계로부터 새로 탐색하거나 혹은 protease 생산균주의 product 향상을 위해 최적화하는 등의 접근방법을 사용해왔다. 따라서 본 연구는 모양이 아닌 해양미생물이 생산하는 collagenolytic protease의 생산성에 미치는 환경 및 영양인자를 최적화하였기에 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주사용

균주는 Kim 등(18)에 의해 분리·동정된 *Vibrio vulnificus* CYK 279H를 사용하였다. 이 균주는 액체배양한 후 glycerol을 첨가하여 -70°C에 동결보존한 것을 본 실험에 사용하였다.

배지조성 및 배양방법

균주의 분리·배양 및 collagenolytic protease 생산을 위한 배지 조성은 인공해수 1 L당 bacto-peptone 5.0 g, yeast extract 1.0 g, ferric citrate 0.1 g, ammonium nitrate 0.0016 g, disodium phosphate 0.008 g이 각각 첨가된 배지를 기본배지로 사용하였다. 전배양은 100 mL 삼각플라스크의 액체 배지에 접종하여 25°C, 180 rpm 조건으로 7-8 h 동안 진탕 배양하였으며, 본 배양은 250 mL 삼각 플라스크의 액체 배지에 1% (w/v) 전배양액을 접종하여 25°C, 180 rpm 조건으로 27 h 진탕배양하였다.

효소활성의 측정

단백질 분해효소 활성은 Ninhydrin method로 측정하였다(19). 즉, 2 mg의 gelatin이 포함된 기질용액 1 mL (pH 7.5, 150 mM Tris-HCl buffer)를 중탕가열한 후, 0.2 mL 효소액을 가하여 37°C, 18 h 반응시켰다. 반응을 정지시키기 위해 10%(w/v) TCA 0.1 mL 첨가한 후, Ninhydrin 용액 (1 mL methyl cellosolve, 2% ninhydrin, 0.05% SnCl₂·H₂O) 0.5 mL을 혼합하여, 100°C, 10분간 끓이고, ice-water에서 냉각시킨 후 2.5 mL 희석액 (1-propanol : H₂O = 1 : 1)을 가한 것을 15분 동안 실온에서 방치한 후, 13,000 rpm에서 4분간 원심분리하여 A₅₇₀에서 측정하였다. 유리된 아미노산량 측정은 표준물질로서 D-isoleucine을 사용하여 검정곡선을 작성한 뒤 계산하였다. 효소활성 1 Unit는 37°C에서 1분당 유리되는 1 μmol의 아미노산 수로 나타내었다.

단백질의 정량

배양액 중의 단백질량은 UV spectrophotometer (Ultrospec 3000 Pharmacia Co., Sweden)를 이용한 Bradford method에 의해 측정하였다(20). 표준물질로는 Bovine serum albumin (Boehringer Mannheim Co., Germany)을 사용, 미리 구한 검량선으로부터 시료의 단백질 농도를 구하였다.

결과 및 고찰

배양온도의 영향

효소생산에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 20-37°C의 온도 범위에서 실험을 실시하였다. 일반적으로 해양 세균은 20°C 부근에서 잘 성장하는 것으로 알려져 있는데, 해양 유래 세균인 *Vibrio vulnificus* CYK 279H 또한 25°C에서 균체성장 및 효소활성이 높은 것으로 나타났다(Fig. 1).

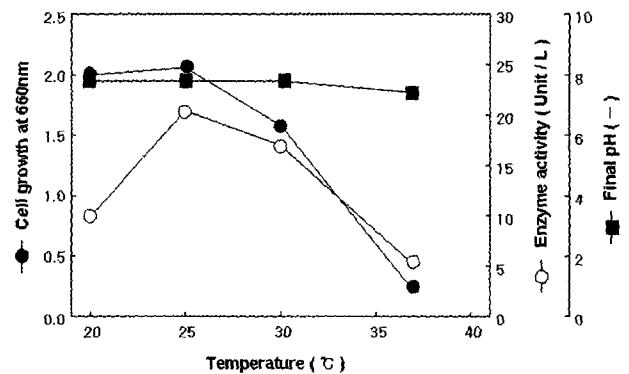


Figure 1. Effect of temperature on the cell growth and enzyme activity by *Vibrio vulnificus* CYK279H.

그러나, 37°C에서는 균체성장 및 효소활성이 현저히 저하되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Ryu 등(21)이 *Xenorhabdus Nematophilus*의 효소활성이 25°C에서 높은 것과는 일치하는 것으로 나타났으며, 이외 많은 연구자들에 의해 효소활성이 25-30°C 범위에서 높게 나타났다(9-12, 21). 반면에 Boer 등(22)과 같이 45°C 부근에서 효소활성이 높았다는 연구결과도 있었다.

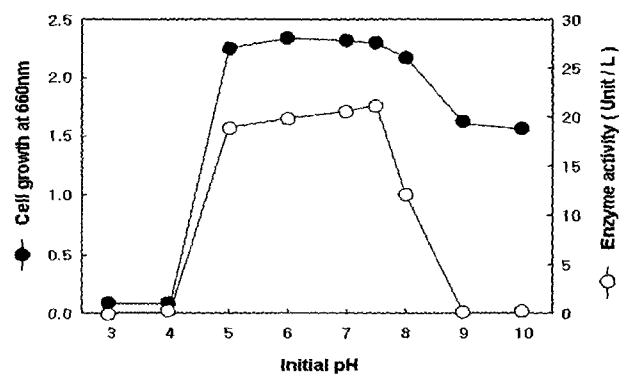


Figure 2. Effect of initial pH on the cell growth and enzyme activity by *Vibrio vulnificus* CYK279H.

초기 pH의 영향

배양액의 pH는 다양한 영양분, 유도체, 성장인자 등의 세포막 이동속도, 효소반응과 산, 염기 평형에 영향을 미치므로 미생물의 생육성장과 효소생산에 영향을 미친다. 따라서, 배양액의 초기 pH에 따른 균체성장과 효소활성의 변화를 검토하기 위해 pH 3-10까지 조절한 후 27 h, 25°C, 180 rpm으로 배양한 결과, pH 5-8까지는 균체성장이 양호

하였지만, 강산 및 강염기의 조건에서는 현저히 저하되는 것으로 나타났다(Fig. 2).

중성 pH 범위인 7.5에서 효소활성이 최대로 나타났다. 이것은 Susan 등(23)이 pH 7.6 부근에서 효소활성이 높게 나타난 것과 유사하지만, Nakado 등(6)은 pH 9.0, Nakayama 등(24)은 pH 4.0 부근에서 효소활성이 높게 나타나 본 연구와는 상이하였다. 다른 연구 결과들도 대부분 pH 7-8 사이에서 효소활성이 높다고 하였다(6, 9, 22, 25). 이처럼 중성 범위의 pH에서 효소활성이 가장 높게 유지되는 것은 이 부근에서 효소활성이 가장 안정화되기 때문인 것으로 사료되어진다.

탄소원의 영향

효소생산에 미치는 탄소원의 영향을 알아보기 위해 인공해수에 0.5% (w/v) peptone, 0.1% (w/v) yeast extract, 1.0% (w/v) gelatin이 첨가된 배지에 단당 및 이당, 다당류를 각각 0.1% (w/v)씩 첨가하여 27 h, 25°C, 180 rpm 배양한 후 균체성장과 효소활성을 측정하였다. 그 결과 galactose에서 효소활성이 가장 높게 나타났다(Table 1). 이것은 Baek 등(26)은 salicine, Boer 등(22)은 glucose에서, Ferrero 등(25)은 casein을 효소활성을 유도하는 가장 효과적인 탄소원으로 이용하여 본 연구와는 상반된 결과를 보였다.

Table 1. Effect of various carbon source on the cell growth and enzyme activity by *Vibrio vulnificus* CYK 279H

Carbon source (0.1%)	Cell growth (A_{660})	Final pH (-)	Relative activity (%)
Control	1.96	8.32	79.61
Maltose	2.17	8.13	63.81
Sucrose	2.16	8.21	74.35
Lactose	1.79	8.21	47.21
Glucose	2.15	8.07	44.16
Galactose	2.26	8.03	100.00
Fructose	2.15	8.20	45.66
Soluble starch	2.32	8.31	48.66
D-sorbitol	1.77	8.05	51.33

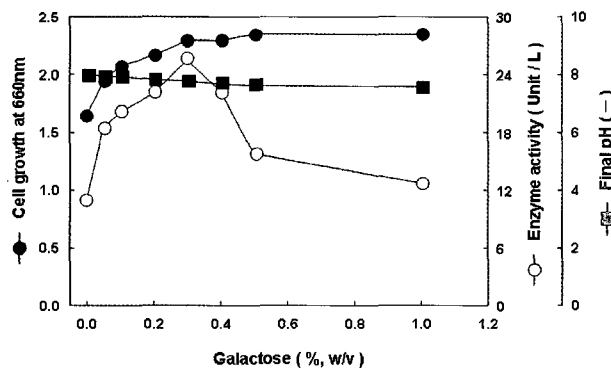


Figure 3. Effect of Galactose concentration on the cell growth and enzyme activity by *Vibrio vulnificus* CYK279H.

그리고 glucose, fructose에서 효소활성이 매우 낮았다. 이

것은 탄소원 중에 glucose, fructose가 쉽게 대사되므로 효소활성이 감소하는 것으로 생각된다. 따라서 galactose를 0.0-1.0% (w/v) 농도별로 첨가하여 효소활성을 살펴본 결과, 0.3% (w/v)에서 효소활성이 최대로 나타났으며 그 이상의 농도에서는 저하되는 것으로 나타나 최적 탄소원으로 0.3% (w/v) galactose를 선정하였다(Fig. 3).

NaCl 농도의 영향

일반적으로 해수에는 약 2.3% (w/v)의 NaCl이 함유되어 있으므로 NaCl 농도에 따른 균체 성장과 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 4).

NaCl 농도를 0.0-10.0% (w/v)까지 조절된 배지에서 배양한 후 효소활성을 측정된 결과, 2% (w/v)에서 균체 성장과 효소활성이 높았다. 4% 이상의 농도에서는 균체 성장이 현저히 감소하였다. 이 실험의 결과로 미루어 볼 때, *Vibrio vulnificus* CYK 279H는 미호염성균임을 알 수 있었다.

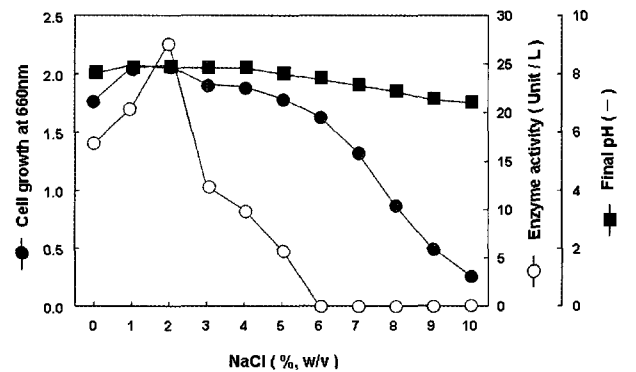


Figure 4. Effect of NaCl concentration on the cell growth and enzyme activity by *Vibrio vulnificus* CYK279H.

질소원의 영향

일반적으로 효소생산에 결정적인 영향을 미치는 성분은 질소원으로 알려져 있어 각종 질소원의 종류에 따른 균체 성장과 효소활성을 조사하기 위해 유·무기질소원으로 나누어 실험을 행하였다. 먼저, 기본배지에 peptone, yeast extract, gelatin을 제외하고 각종 유기 질소원 0.6% (w/v)씩 첨가하여 실시하였다. 균체 성장은 단일 질소원으로 yeast extract를 첨가한 경우 가장 높게 나타났으며, 효소활성은 yeast extract와 gelatin 혼합시 가장 높게 나타났다(Table 2). 이것은 gelatin이 내포하고 있는 아미노산이 효소생산을 위한 유도물질로 사용되어지는 것으로 사료되는 결과이다.

하지만 urea 첨가시 균체성장 및 효소활성이 전혀 나타나지 않았다. 이 결과를 토대로 다음 실험에서는 배지 상에 gelatin 1% (w/v)의 농도를 고정시켜, 최적 유기질소원으로 선정된 yeast extract를 0.0-1.2% (w/v) 농도별 첨가하여 효소활성을 조사하였다(Fig. 5). 그 결과, 0.6% (w/v)에서 효소활성이 높게 나타났다. 또한, 선정된 0.6% (w/v) yeast extract에, gelatin의 농도를 0.0-8.0% (w/v)까지 조절하여 효소활성을 조사한 결과, 4% (w/v)에서 효소활성이 가장 높았다(Fig. 6).

이것은 효소에 구조적으로 기질과 유사한 화합물을 사

용하였을 때 효소생산량이 증가한다는 Ahn의(27) 경우 0.4 % (w/v) yeast extract, 1.5% (w/v) gelatin을 사용한 보고와 Sasagawa 등(9)의 0.2% (w/v) gelatin을 사용한 보고와 유사 하였지만, Ryu 등(21)은 peptone에서 효소활성이 높은 것과는 상이하였다. 그리고, 4% (w/v) 이상의 농도에서는 균체 성장과 효소활성이 떨어지는 것으로 나타났다. 이것은 질소원의 농도가 높아질수록 질소원에 포함된 아미노산이나 저분자 형태의 peptide들의 농도가 상대적으로 높아져서 효소활성이 저해받는 것으로 생각되어진다.

Table 2. Effect of organic nitrogen source on the cell growth and enzyme activity by *Vibrio vulnificus* CYK 279H

Nitrogen source (0.6%)	Cell growth (A660)	Final pH (-)	Relative activity (%)
Control	0.42	8.10	23.33
Peptone	1.56	7.83	48.93
Yeast extract	2.29	8.02	81.60
Gelatin	0.75	7.64	34.52
Tryptone	2.48	8.02	69.70
Bacto peptone	2.08	7.88	58.23
Meat extract	1.96	8.05	63.37
Protease peptone	2.09	7.96	66.96
Urea	0.24	7.63	00.00
Thiourea	0.29	7.65	00.00
Casamino acid	2.00	8.00	72.30
Beef extract	1.54	8.04	34.49
Gelatin + Yeast extract	2.42	8.10	100.00

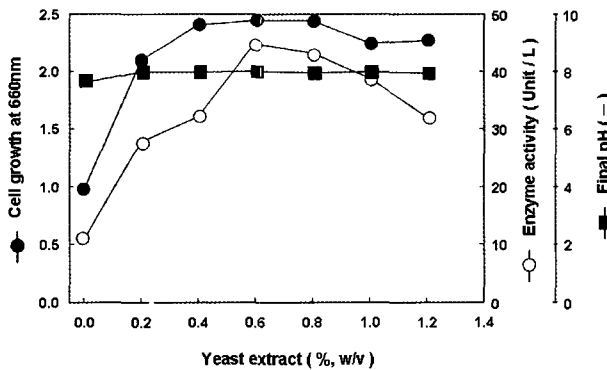


Figure 5. Effect of Yeast extract concentration on the cell growth and enzyme activity by *Vibrio vulnificus* CYK279H.

무기 질소원에 관한 영향은 (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃을 제외한 인공해수에 각종 무기질소원을 0.1% (w/v)씩 첨가하여 균체 성장과 효소활성을 조사하였다. 그 결과 (NH₄)₂SO₄에서 높은 효소활성이 나타났으며(Table 3), (NH₄)₂SO₄ 0.0-0.5% (w/v) 농도별로 배양한 결과, 0.2% (w/v)에서 효소활성이 높았다 (Fig. 7). 일반적으로 아미노산이나 ammonium 같은 대사되기 쉬운 질소원은 protease 생산을 저해한다고 알려져 있지만 본 실험과는 관련이 없었다.

이후의 실험에서는 0.6% (w/v) yeast extract, 4.0% (w/v) gelatin, 0.2% (w/v)의 (NH₄)₂SO₄를 사용하였다

Table 3. Effect of inorganic nitrogen source on the cell growth and enzyme activity by *Vibrio vulnificus* CYK279H

Nitrogen source (0.1%)	Cell growth (A660)	Final pH (-)	Relative activity (%)
Control	2.33	7.81	78.49
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.32	7.79	100.00
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.61	7.96	52.82
NH ₄ NO ₃	2.21	7.99	75.26
NH ₄ Cl	2.24	7.83	84.94
KNO ₃	2.28	8.08	41.31
NaNO ₃	1.85	8.06	44.77

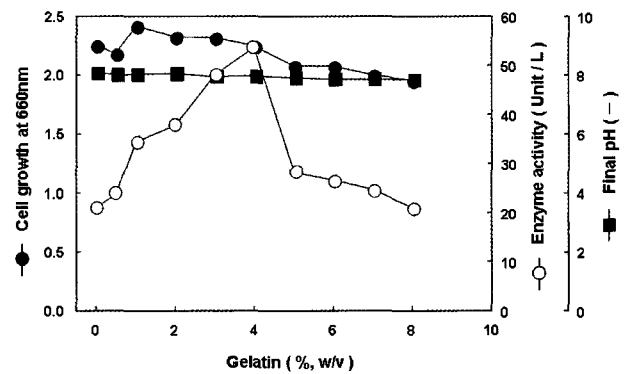


Figure 6. Effect of Gelatin concentration on the cell growth and enzyme activity by *Vibrio vulnificus* CYK279H.

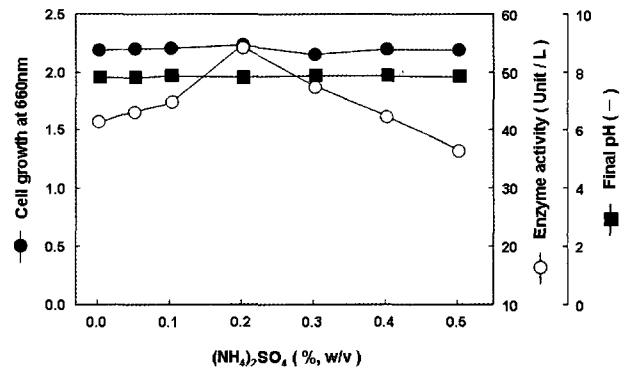


Figure 7. Effect of (NH₄)₂SO₄ concentration on the cell growth and enzyme activity by *Vibrio vulnificus* CYK279H.

금속이온 첨가 효과

세포에서 생산되는 효소와 대사활성에 중요한 역할을 하는 금속이온이 효소생산에 있어서 cofactor로서 작용하는 가를 조사하기 위해 여러 가지 금속이온 0.1 mM의 농도로 첨가하였다. 균체성장은 금속이온을 첨가하지 않은 대조군에 비해 비슷하게 나타났으나, 효소활성에서는 Fe²⁺이 대조군에 비해 높게 나타났다. 이는 Fe²⁺이 대사조절의 가장 중요한 인자로 작용하며 대사산물의 분비에 주로 관여함으로써 효소활성이 높게 나타난 것 같다.

그리고 Okamoto 등(7)이 Fe²⁺에 의해서 활성이 완전 저해되었다는 보고와는 상이하였다. 또한 Zn²⁺는 일반적으로 bacteria spore에 존재하며, gelatin과 collagen분해능이 있는

protease의 stability 및 cofactor로서 이용된다는 보고(4, 21, 28)는 있으나, 본 연구에서는 효소활성을 약 45% 정도 저해하였다. 따라서 본 실험에서 효소활성이 가장 높게 나타난 금속이온을 0.1-0.5 mM까지 농도별로 조사한 결과, 0.2 mM에서 효소활성이 가장 높게 나타났다(Table 4).

Table 4. Effect of metal ion on the cell growth and enzyme activity by *Vibrio vulnificus* CYK279H

Metal ion (0.1 mM)	Cell growth (A ₆₆₀)	Final pH (-)	Relative activity (%)
Control	2.44	8.03	79.75
Ni ²⁺	2.40	7.94	45.68
Zn ²⁺	2.45	8.00	53.84
Cr ²⁺	2.41	7.85	74.08
Cu ²⁺	2.38	7.98	73.09
Co ²⁺	2.50	7.97	94.39
Fe ²⁺	2.47	7.96	100.00
Mn ²⁺	2.49	8.02	82.06
Cd ²⁺	2.38	7.95	52.33

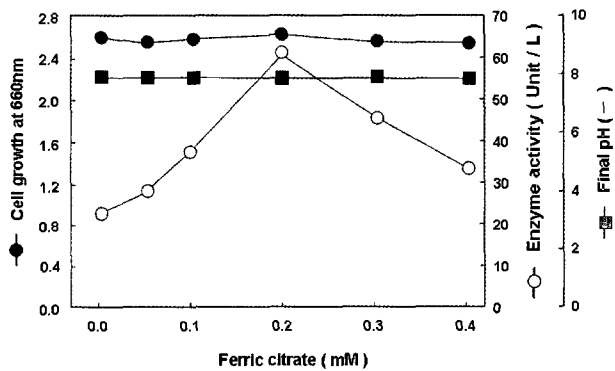


Figure 8. Effect of ferric citrate on the cell growth and enzyme activity by *Vibrio vulnificus* CYK279H.

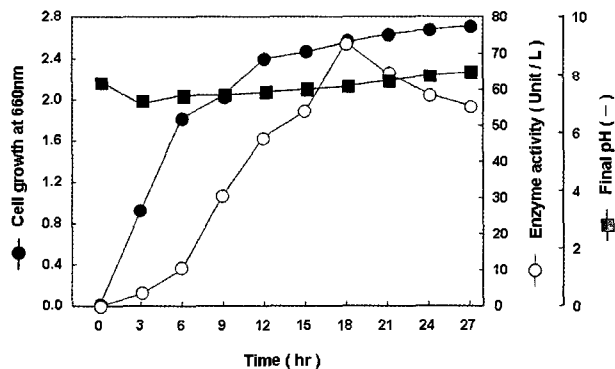


Figure 9. Time course of cell growth and enzyme activity by *Vibrio vulnificus* CYK279H.

최적배양조건에서의 효소생산

이상의 실험에서 25°C, pH 7.5, 0.3% (w/v) galactose, 2.0% (w/v) NaCl, 0.6% (w/v) yeast extract, 4.0% (w/v) gelatin, 0.2% (w/v) (NH₄)₂SO₄, 0.2 mM ferric citrate의 최적 배양조건에서 *Vibrio vulnificus* CYK 279H 균주를 배양하여

시간별로 균체성장과 효소활성을 조사하였다(Fig. 8).

초기 3 h 경과 후부터 균체성장이 급격히 증가하기 시작하였으며, 효소활성 또한 상대적으로 증가하였다. 이어서 균체성장은 12 h 배양시 정지기에 도달하였으며, 배양 18 h에는 효소활성 최대값인 73 Unit/L을 나타내었다. 이후의 시간에서는 균체성장은 일정한 수준으로 유지되었으나, 효소활성은 점점 감소하는 현상을 보였다. 그리고 배양과정에 pH의 변화는 중성에서 약 알칼리 범위이며, 거의 변화가 없는 것으로 효소생산에는 전혀 영향이 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과, 최적 배양조건에서 18 h 배양시, 효소활성은 균주선별 초기의 효소활성인 20 Unit/L에 비해 약 3.7배 증가한 73 Unit/L였다.

요약

해양유래미생물에서 gelatin 분해능이 우수한 균주 *Vibrio vulnificus* CYK 279H를 이용하여 최적 효소활성조건을 검토하였다. 온도와 초기 pH는 25°C, 7.5에서 높은 것으로 나타났다. 또한, 이당, 다당류를 첨가하여 탄소원의 영향에 미치는, 0.3% (w/v) galactose 에서, 유·무기 질소원으로는 0.6% (w/v) yeast extract와 4.0% (w/v) gelatin, 0.2% (w/v) (NH₄)₂SO₄에서 효소활성이 가장 높게 나타났다. 염 농도로는 2.0% (w/v) NaCl, 금속이온은 Fe²⁺를 첨가하였을 때 효소활성이 증가되었다. 선정된 최적배양조건에서 *Vibrio vulnificus* CYK 279H를 배양한 결과, 18 h 배양시 73 Unit/l로 기본배지 20 Unit/l보다 활성이 3.7배 증가한 것으로 확인되었다.

감사

본 연구는 2003년도 부경대학교 발전기금재단 지원비 (Project No. 200302800)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Godfrey, T. and S. West (1996), Industrial enzymology, pp3. 2nd ed. Macmillian Publishers Inc., New York, N.Y., USA.
- Hartley, B. S. (1960), Proteolytic enzyme, *Annu. Rev. Biochem.* **29**, 45-72.
- Miller, E. J. and S. Gay. (1982), Collagen, *Method in Enzymology* **82**, 3.
- Borkakoti, N. (2000), Structural studies of matrix metalloproteinases, *J. Mol. Med.* **78**, 261-268.
- Sivakumar, P., P. Sampath, and G. Chandrakasan (1999), Collagenolytic metalloprotease (gelatinase) from the hepatopancreas of the marine crab, *Scylla serrata*, *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **123**, 273-279.
- Nakado, H. and A. T. Kim (1999), Purification of Collagenase and Specificity of Its Related Enzyme from *Bacillus subtilis* Fs-2, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 181-183.
- Okamoto, M., Y. Yonejima, Y. Tsujimoto, Y. Suzuki, and K. Watanabe (2001), A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus* sp. strain MO-1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 103-108.

8. 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.
9. Sasagawa, Y., Y. Kamio, Y. Matsubara, Y. Matsubara, K. Suzuki, H. Kojima, and K. zaki (1993), Purification and Properties of Collagenase from *Cytophage* sp. L43-1 Strain, *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 1894-1898.
10. Liu, P. C., K. K. Lee, C. C. Tu, and S. N. Chen (1997), Purification and Characterization of a Cysteine Protease Produced by Pathogenic Luminous *Vibrio harveyi*, *Current. Microbiology* **35**, 32-39.
11. Dreisbach, J. H. and J. R. Merkel (1978), Induction of collagenases production in *Vibrio* B-30, *J. Bacteriology* **135**, 521-527.
12. Emöd, I., N. T. Tong, and B. Keil (1981), Chemical characterization of the homogeneous collagenase from *Clostridium histolyticum*, *Biochim. Biophys. Acta* **659**, 283-291.
13. Lee, Y. S., T. Noguchi, and H. Naito (1983), Intestinal absorption of calcium in rats given diet containing casein or amino acid mixture; the role of casein phosphopeptide, *Br. J. Nutr.* **49**, 67-70.
14. Yashiro, A., S. Oda, and M. Sugano (1985), Hypocholesterolemic effect of soybean in rats and mice after peptide digestion, *J. Nutr.* **115**, 1325-1329.
15. Sohn, K. H. and H. J. Lee (1988), Bitter peptide derived from α - and β -casein digested with alkaline protease from *Bacillus subtilis*, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **20**, 659-664.
16. Watanabe, K. (2004), Collagenolytic protease from bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 520-526.
17. Chandrasekaran, M. (1997), Industrial enzymes from marine microorganisms: The Indian Scenario, *J. Mar. Biotechnol.* **5**, 86-89.
18. Kim, B. J., H. J. Kim, S. H. Hwang, S. K. Bae, S. D. Ha, J. D. Kim, and J. Y. Kong (1998), Cloning and Expression of a Collagenase Gene from the Marine Bacterium *Vibrio vulnificus* CYK279H. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 245-250.
19. Moore, S. (1968), Amino Acid Analysis: Aqueous Dimethyl Sulfoxide as Solvent for the Ninhydrin Reaction, *J. Biol. Chem.* **243**, 6281-6283.
20. Bradford, M. M. (1976), A Rapid and Sensitive Method for the Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
21. Ryu, K. G., J. S. Bae, and S. H. Park (1999), Extracellular protease production from *Xenorhabdus nematophilus*, a Symbiotic Bacterium of Entomopathogenic Nematodes, *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* **4**, 147-150.
22. Boer, C. G. and R. M. Peralta (2000), production of extracellular protease by *Aspergillus tamarii*, *J. Basic. Microbiol.* **40**, 75-81.
23. Susan, Long, M. A. Mothibeli, F. T. Robb, and D. R. Woods (1981), Regulation of Extracellular Alkaline Protease Activity by Histidine in a Collagenolytic *Vibrio alginolyticus* Strain, *J. Gen. Microbiol.* **127**, 193-199.
24. Nakayama, T., N. Tsuruoka, M. Akai, and T. Nishino (2000), Thermostable Collagenolytic Activity of a Novel Thermophilic Isolate, *Bacillus* sp. Strain NTAP-1, *J. Biosci. Bioeng.* **89**, 612-614.
25. Ferrero, M. A., G. R. Castro, C. M. Abate, M. D. Baigori, and F. Sineriz (1996), Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR29: isolation, production and characterization, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 327-332.
26. Baek, D. H., H. W. Lee, and S. H. Bok (1995), A Study on the Optimum Condition of Gelatin-Degrading Proteolytic enzyme Production from *Bacillus subtilis* B0021, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **10**, 374-385.
27. Ahn, Y. S. (1999), Properties of protease production by the extreme halophile, *Halobacterium* sp., M. S. Thesis, Dept. of Food Science and Technology, Chungnam National University, Taejon.
28. Murray, P. (1990), *Methods in Enzymology* **182**, 373-376.