

알칼리성 단백질 분해 효소 생산 균주 *Gelidibacter* sp. HK-1의 분리 및 특성

오현근* · 이순열* · †이재학

한경대학교 생명공학과*, 서일대학 식품영양과

Isolation and Characterization of *Gelidibacter* sp. HK-1 Producing Alkaline Protease

Hyun-Geun Oh*, Soon-Youl Lee* and †Jae-hag Lee

Department of Genomic Engineering, Research Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University*

Department of Food and Nutrition, Seoil College

Abstract

This study was to isolate a bacterium producing a alkaline protease from mud flats of the west seaside of Korea and to investigate the biochemical analysis of the alkaline protease producing from the isolate. The isolate was named as *Gelidibacter* sp. HK-1 based on 16S rRNA sequence, Gram staining and the photograph of electron microscope. Optimum temperature for growth and protease production of the isolate was 25°C. Growth of the isolate was reached at stationary phase after 10hrs followed by inoculation. Maximum activity of protease produced from the isolate was shown after 14hrs. Optimum temperature and pH for the protease activity were 45°C and pH 9, respectively. Molecular weight of the protease was about 50KD and the partial amino acid sequence of the protease was Ala-Try-Ala-Leu-Asn-Thr-Ser-Val-Thr-Glu-Thr-Phe-Ala-Lys. The partial amino acid sequences of the protease showed significant homology with a protease produced from *Streptomyces avermitilis*.

Key words : alkaline protease, mud flat, *Gelidibacter*, partial amino acid sequence, rRNA sequence

서 론

Protease는 동물, 식물, 미생물 등 대부분의 생명체의 세포 안과 밖에서 발견되며, 다양한 생리적 기능들을 갖고 있다¹⁻⁴. 다양한 물리적, 화학적 조건에서 활용될 수 있는 단백질 분해 효소는 단백질 화학, 의학 등의 자연과학 분야와 식품 공업, 피혁 산업, 세제 공업 및 제지 공업 등의 일반 산업 분야에도 응용되고 있다^{5,6}.

미생물로부터 생산된 protease는 전 세계 효소 시장의 40% 이상을 점유하고 있으며, 이중 상업적으로는

중성, 알칼리성 효소가 대부분을 차지하고 있다⁷⁻⁹. 알칼리성 단백질 분해 효소는 Horikoshi¹⁰에 의해 처음으로 연구가 시작되어 *Bacillus* 속을 비롯하여 방선균, 곰팡이 등 여러 미생물에서 분리되어 연구되어 왔다. 이러한 알칼리성 단백질 분해 효소는 피혁, 세제 공업에 있어 종래의 유기 합성 세제보다 환경 오염에 대한 피해가 적고 이차 오염이 일어나지 않으므로 생태계의 피해를 예방할 수 있다¹¹. 알칼리성 단백질 분해 효소는 피혁의 탈모 공정과 세제 성분으로 많이 사용되는데 이에 대한 조건은 저온 및 알칼리성 하에서 효소 활성이 충분하게 발휘되어야 한다¹². 이러한 효

† Corresponding author : Jae-hag Lee, Dept. of Food and Nutrition, Seoil College, #49-3 Myeonmok-Dong, Jungnang-Gu, Seoul 131-702, Korea.

Tel : 82-2-490-7509, Fax : 82-2-490-7507, E-mail : wjjson@seoil.ac.kr

소 활성을 갖는 protease를 산업적으로 활용하기 위해 다양한 미생물들이 검색되고 있다^{13,14}.

본 연구는 저온에서 내염성이 있고 알칼리성 pH에서 활성을 갖는 protease를 생산하는 미생물을 분리하기 위해 해양에서 서식하는 미생물을 대상으로 균주를 분리, 동정하였고, 이 균주가 생산하는 효소학적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 균주의 선별

서해안 제부도 인근 갯벌에서 갯벌 흙을 채취하였다. 채취한 시료는 식염수를 넣고 혼합하여 정제한 후 1 ml 상등액을 취하여 2% 탈지 분유(10% 탈지 분유를 105°C에서 15분간 고압 증기 멸균하여 사용함)가 함유된 평판 Zobell 배지(50% 해수, 1% peptone, 0.5% Yeast extract)에 도말하여 25°C에서 배양하였다. 이 평판배지를 다시 4°C에서 24시간 방냉한 후 투명대 형성의 정도를 통해 protease 분비 균주를 선별하였다. 선별된 균주 배양액에 멸균된 glycerol stock solution (100% glycerol)을 15% 되도록 첨가한 후 동결 보존하였다. 배지는 Difco사 제품, 일반 시약은 Sigma사 제품을 이용하였다. 탈지 분유는 서울우유에서 판매되는 제품을 사용하였다.

2. 미생물의 동정: 16S rRNA 유전자 염기 서열 분석, 그람 염색과 전자 현미경 관찰

선별된 미생물로부터 16S ribosomal RNA(rRNA) 유전자 단편을 PCR 반응으로 증폭하기 위해 세균의 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기 서열을 primer로 합성하였다(9F, 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG; 926R, 5'-CCG TCA ATT CCT TTR AGR TT). PCR 반응을 위해 분리 균주로부터 Genomic DNA extraction kit (Intron, Korea)를 이용하여 Genomic DNA를 추출하였다. TaKaRa PCR Thermal Cycler를 사용하여 TaKaRa Ex Taq polymerase(5 units/ μ l) 0.5 μ l, 10Ex Taq buffer 5 μ l, dNTPs Mixture(2.5 mM) 5 μ l, 926R primer(2 pmol/ μ l) 5 μ l, 9F primer(2 pmol/ μ l) 5 μ l, 분리된 Genomic DNA 1 μ g을 혼합하고 멸균된 증류수로 총량 50 μ l 되게 하였다. 이 후 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초로 이루어진 과정을 35회 반복함으로써 16S rRNA의 유전자 단편을 증폭하였다. 전기영

동 후 증폭된 DNA 단편을 agarose gel extraction kit (Intron, Korea)로 회수하였다. 회수된 DNA 단편을 pGEM[®]-T Easy Vector (Promega)에 재조합시켰다. 재조합 plasmid를 갖는 재조합 균주를 소량 배양한 후 배양된 세포로부터 재조합 plasmid DNA를 Mini prep kit (Atman Bio, Korea)를 이용하여 분리하고, DNA sequencer(Megabase1000, GE Healthcare Bioscience, USA)를 이용하여 DNA 염기 서열을 결정하였다. 결정된 염기 서열을 NCBI BLAST를 이용하여 GenBank에 보고된 균주와의 상동성을 조사하였다.

분리 균주의 그람 염색성을 확인하기 위해 영동계약에서 생산하는 그람 염색 시약을 사용하였으며, 제조사의 실험 방법에 준하였다. 대조균으로 그람 양성 균인 *Bacillus licheniformis*와 그람 음성균인 *E. coli* DH5a를 사용하였다.

분리 균주의 전자 현미경 촬영을 위해 분리 균주를 Zobell 배지에서 하루 동안 배양한 후, Scanning Electron Microscopy (JSM 5410LV, JEOL, Japan)를 이용하여 형태적 특성을 조사하였다. 시료의 고정을 위해 Karnovsky's method를 이용하였다¹⁵.

3. Protease 효소 활성 측정

분리 균주가 생산하는 protease의 활성 측정은 Leighton¹⁶ 등의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. 액체 배양액은 6000 \times g에서 원심 분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 효소 반응은 0.5% azocasein 용액 250 μ l에 조효소액 250 μ l를 넣고 37°C에서 1시간 동안 수욕상에서 반응시켰다. 반응 후 20%(w/v) Trichloroacetic acid(TCA) 용액을 500 μ l 첨가하여 반응을 정지시킨 후 상온에서 5분간 방치하였다. 이 반응액은 6000 \times g에서 5분간 상온에서 원심 분리한 후 상층액 1 ml을 취하여 2M NaOH 용액 100 μ l를 가한 후 440nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 역가 1U는 1 ml의 기질 용액을 사용하였을 때, 최종 반응액의 흡광도를 0.01 상승시키는 값으로 환산하였다.

4. Protease의 정제 및 동정

효소의 정제는 배양여액에 황산 암모늄을 가하여 분획 침전시킨 후 이온 크로마토그래피를 실시하였다. 컬럼은 Bio-Rad HR system (750-0047, Bio-Rad, U.S.A, 2.5 cm \times 30 cm column), 이온 수지는 Q Excellose (Bioprogen, Korea)를 사용하였으며, 유속은 분당 4ml

속도로 용출시켰다. 각각의 분획 별로 효소 활성을 측정하였으며, 이중 활성이 높은 4개의 분획을 모은 후 Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units(Millipore, U.S.A.)를 이용하여 농축하여 native-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)를 수행하였다. Zymogram을 위해 두 개의 Lane에 농축액을 전기영동하고 한 Lane은 Coomassie Blue staining을 수행하고 다른 Lane은 염색하지 않았다. 염색되지 않은 Lane을 잘라내어 2% skim milk 상에서(37°C, overnight) 투명띠를 형성하는 부위로부터 효소의 분자량을 확인하였다. protease 활성을 보이는 band를 분리하여 Q-TOF2분석방법^{17,18)}으로 mass spectroscopy를 수행하여 peptide 단편들의 아미노산 서열을 결정하였다. 결정한 아미노산 서열을 NCBI Blast를 이용하여 database를 탐색하여 상동성을 갖는 단백질들을 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 균주의 선별과 동정

갯벌에서 채집한 시료를 희석하여, 2% skim milk (w/v)이 첨가된 Zobell 평판 배지에서 형성된 투명환의 크기를 기준으로 우수한 균주를 선별하였다. 분리 균주를 동정하기 위해 분리 균주의 16S rRNA의 염기 서열을 결정하였다. 결정된 염기 서열을 이용하여 상동성 분석을 수행하였다. Fig. 1의 결과에서 분리 균주는

```

HK-1   CTAACACATGCA-GTC GAACGGGATTTCGCCAGCTTGTGGCA-TGAGAGTGGCCACGGG
Gelidi CTAACACATGCAAGTGC GAACGGGATTTCGCCAGCTTGTGGCAATGACAGTGGCCACGGG
HK-1   TGAGTAAACGGGTATGCAACCTTACCTTTTCCAGTGGATAGCCAGAGAAATTTGGATTAA
Gelidi TGAGTAAACGGGTATGCAACCTTACCTTTTCCAGTGGATAGCCAGAGAAATTTGGATTAA
HK-1   TACCGCATAGTATGCAATACCAGCATTGGAACTGTATTAAACATTTATGGGTGAGAGATG
Gelidi TACCGCATAGTATGCAATACCAGCATTGGAACTGTATTAAACATTTATGGGTGAGAGATG
HK-1   GGCATGCGTTC TATTA GTTACTTGGAGTGGTAACGGCACCCCAAGACCGGTCGATAGAT
Gelidi GGCATGCGTTC TATTA GTTACTTGGAGTGGTAACGGCACCCCAAGACCGGTCGATAGAT
HK-1   AGGGGCCCTGAGAGCNAAGNGGGATCCCCCAACCTGCTACTGAGACACGGGACAGAG
Gelidi AGGGGCCCTGAGAGC---GGGATCCCCAC---ACTGGTACTGAGACACGG-ACCAGA-
HK-1   CTCCTACGGGAGGCAGCAGCTTGGGGAATATTGGACAATGGGGCAAAGCCTGATCCAGC
Gelidi CTCCTACGGGAGGCAGCAG---TGAGGAATATTGGACAATGGGGCAAAGCCTGATCCAGC
HK-1   CATGCCGCGTGCAGGAAGTACGGCCCTATGGGTTGTAACTGCTTTTATACAGGAAAGAA
Gelidi CATGCCGCGTGCAGGAAG-ACGGCC-TATGGGTTGTAACTGCTTTTATACAGGAAAGAAA
HK-1   CAACCTCTACGTGTAGAGTCTTGACGGTACTGTAAAGATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCC
Gelidi CAACCTCTACGTGTAGAGTCTTGACGGTACTGTAAAGATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCC
HK-1   AGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCAAAGCGTTATCCGGAAATCATTGGGTTTAAAGGGTC
Gelidi AGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCAAAGCGTTATCCGGAAATCATTGGGTTTAAAGGGTC
HK-1   CGTAGGTGGACGATTAAGTCAAGGGTAAATCCTGACGCTCAACTGTAGAAATGCTTTTG
Gelidi CGTAGGTGGACGATTAAGTCAAGGGTAAATCCTGACGCTCAACTGTAGAAATGCTTTTG
HK-1   ATACTGTTGTCTTGAATCATTTGGAAGTGGTTAGAATATC-GTGGTGTGTA-GCGGTG-AAA
Gelidi ATACTGTTGTCTTGAATCATTTGGAAGTGGTTAGAATAT- GTGGTGTGTA-GCGGTG-AAA
    
```

Fig. 1. Homology analysis for the nucleotide sequences of rRNA of *Gelidibacter* sp. HK-1.

Gelidibacter sp. 4-3과 98%의 유사성을 갖고 있었다. *Gelidibacter* sp. 13-4와도 98%의 유사성을 보였고, *Calefactosor saeffrenus* strain HFD와는 96%, *Biziolla paragoriae* strain KMM 6029과는 94%의 유사성을 보였다 (data not shown). 분리 균주는 Gram음성이었고 (data not shown), 길이 약 0.8~1.5 μ m, 폭 0.23~0.34 μ m의 간균이었다 (Fig. 2). 일반적으로 간균의 크기는 길이 약 1~수 μ m, 폭 1~3 μ m 내외임을 고려할 때, 분리 균주는 단간균임을 알 수 있다. 이러한 결과는 남극해에서 분리한 *Gelidibacter*의 특징인 호염성, 편성호기성, 노란색 색소를 함유한 그람 음성균의 단간균과 일치하였다¹⁹⁾. 이러한 결과들을 근거로 분리 균주를 *Gelidibacter* sp. HK-1로 명명하였다.

2. 선별 균주의 증식 최적 온도와 최적 온도에서 증식곡선과 Protease 활성

Fig. 3에서 최대값을 보인 미생물의 수와 protease의 활성을 1로 했을 때 상대값으로 표시하였다. 25°C에서 균체량과 효소의 생산이 최고치에 이르렀다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 효소의 최적 온도가 45°C임을 감안하면 Fig. 3에서 25°C 이상에서 낮은 활성을 보인 것은 균체의 양에 기인한다고 할 수 있다. 그러므로 Protease의 생산은 균체의 양과 비례함을 볼 수 있었다.

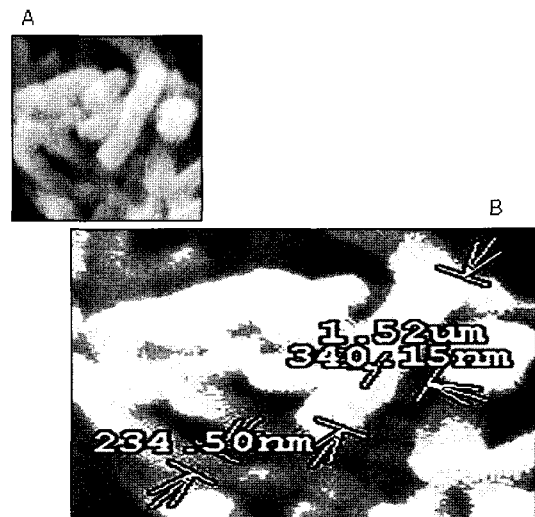


Fig. 2. Photograph of *Gelidibacter* sp. HK-1 using Electron microscope.

A : Photograph of *Gelidibacter* sp. HK-1.

B : Photograph for the measurement of *Gelidibacter* sp. HK-1.

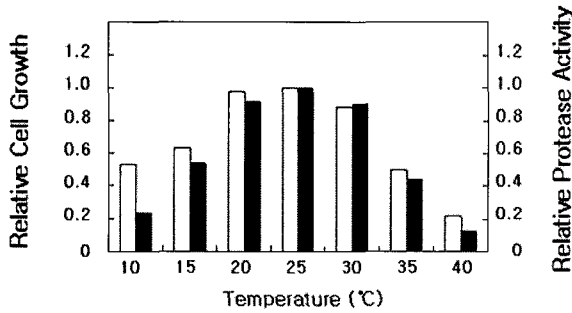


Fig. 3. The effect of culture temperature on growth and protease activity of *Gelidibacter* sp. HK-1.
 Grey box : Relative cell growth based upon growth of the isolate at 25°C.
 Black box : Relative protease activity based upon protease activity assayed for the protease in the culture supernatant of the isolate at 25°C.

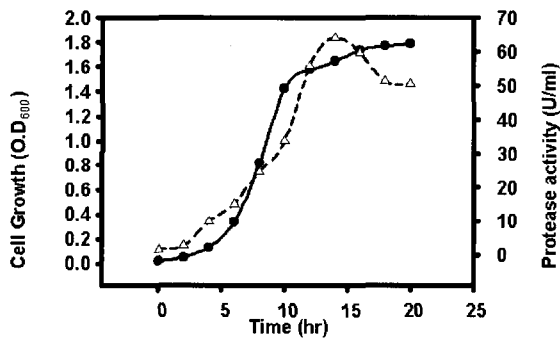


Fig. 4. Growth curve and protease activity of *Gelidibacter* sp. HK-1 at 25°C.
 The isolates were cultured in Zobell media at 25°C with vigorous shaking at 200rpm. The cell growth (closed circle, ●) was determined by measuring the optical density at 600 nm. The protease activity (open triangle, △) was determined as described in Materials and methods.

선별 균주의 최적 온도인 25°C에서 배양 시간에 따른 균체의 증식과 protease 활성을 조사하였다. Fig. 4에서 보듯이 균체의 증식은 접종 후 10시간 만에 최대 균체량을 보였다. Protease의 활성은 접종 후 14시간 만에 최대값을 보였다. 이러한 결과로부터 이후의 protease 활성에 관한 실험은 접종 14 시간 후에 측정하였다.

3. 조 효소액에 존재하는 protease 활성의 최적 온도와 최적 pH

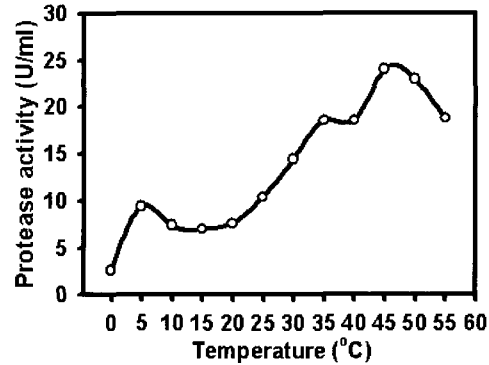


Fig. 5. The effect of reaction temperature on the assay of the protease produced in the culture supernatant of the isolate at 25°C.

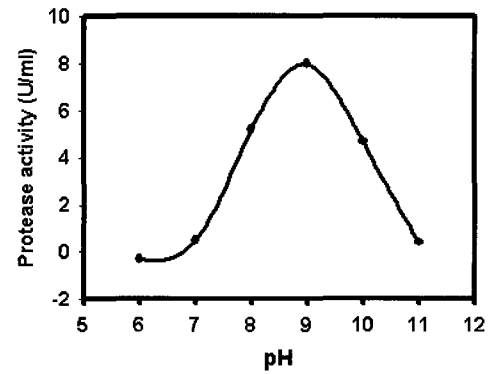


Fig. 6. The effect of pH on the assay of protease produced in the culture supernatant of the isolate at 25°C.

배지로 분비 생산된 protease의 반응 최적 온도를 확인하기 위해 반응 온도를 0°C에서 55°C로 각각 반응시켜 protease의 활성을 조사하였다. Protease 활성은 균주의 증식을 위한 최적 온도인 25°C보다 45°C에서 약 2.5배의 protease 활성을 보였다 (Fig. 5). 효소의 최적 pH를 조사하기 위해 반응액의 pH를 6에서 11까지 완충액을 사용하여 각각 반응시켜 활성을 조사한 결과 (Fig. 6) pH 9에서 최대 활성을 보였다. 이 같은 결과로 본 효소는 알칼리성 단백질 분해 효소임을 알 수 있었다.

4. 선별 균주로부터 생산되는 Protease 분자량 결정과 일부 아미노산 서열 확인

배양 여액으로부터 효소를 분리하기 위하여 ammonium sulfate 분획을 수행하였다. Protease는 80% ammonium sulfate에서 침전시킨 후 투석하였다(data not sho-

wn). 투석 후 이온 크로마토그래피를 실시하여 얻은 분획 중 15~30번째의 분획에서 활성을 나타냈으며, 그 중 17~20번째 분획의 활성이 가장 높았다 (data not shown). 이 시료 중 일부를 native-PAGE를 수행한 후 Coomassie Blue 염색과 Zymogram 분석을 수행한 후 Fig. 7의 결과를 얻었다. Lane A는 Coomassie Blue Staining 한 결과이고, Lane B는 Coomassie Blue Staining을 수행하지 않고 2% skim milk를 함유한 Agarose gel에서 Zymogram을 수행한 후의 결과이다. Zymogram 결과 활성을 보이는 band가 한 개 관찰되었으며 Lane A와 비교한 결과 활성을 보이는 band의 크기는 약 50KD로 추정되었다. 이 band를 분리해 내어 MS/MS Q-TOF를 이용한 de-novo sequencing한 결과 단백질의 일부분 아미노산 서열은 Ala-Try-Ala-Leu-Asn-Thr-Ser-Val-Thr-Glu-Thr-Phe-Ala-Lys으로 확인되었다. NCBI Blast를 이용하여 분석한 결과 *Streptomyces avermitilis*의 proteolysis에 관여하는 효소와 87%의 상동성을 보였다.

본 연구를 통해 protease를 생산하는 균주를 선별하였으며 이 균주는 *Gelidibacter* 속에 속하는 그람 음성균의 단간균임을 확인하였다. 효소학적 특성은 알칼리성에서, 염분이 존재하는 곳에서, 고온에서보다는 활성도는 약하지만 저온에서도 활성을 지니고 있어 산업적으로 응용 가능하다고 사료된다.

요 약

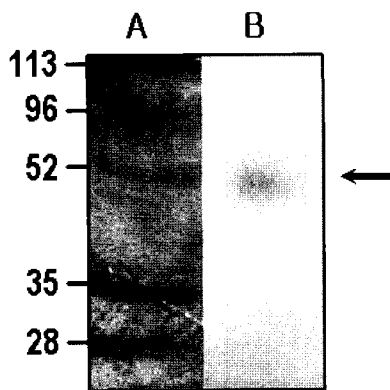


Fig. 7. Zymogram of protease produced from *Gelidibacter* sp. HK-1 after native-PAGE.

Lane A : After Coomassie blue staining.

Lane B: Zymogram on skim milk-containing agarose plate.

본 연구는 대한민국 서해안 갯벌로부터 알칼리성 단백질 분해 효소를 생산하는 세균을 분리하고 분리된 세균으로부터 생산되는 단백질 분해 효소의 생화학적 특징을 조사하는 것이다. 분리 균주는 16S rRNA의 염기 서열, 그람 염색과 전자 현미경사진을 통해 *Gelidibacter* sp. HK-1으로 명명하였다. 분리 균주의 증식과 protease 생산을 위한 최적 온도는 25°C이었다. 분리 균주의 증식은 접종 10시간 후에 stationary phase에 도달하였다. 효소 생산은 14시간 후 최대값을 보였다. 효소 활성의 최적 온도와 pH는 각각 45°C와 pH 9이었다. Protease의 분자량은 약 50KD이었고 protease의 부분적인 아미노산 서열은 Ala-Try-Ala-Leu-Asn-Thr-Ser-Val-Thr-Glu-Thr-Phe-Ala-Lys이었다. Protease의 부분적인 아미노산 서열은 *Streptomyces avermitilis*의 protease와 높은 상동성을 보였다.

감사의 글

본 논문은 2005년도 서일대학 학술연구비에 의해 연구되었음.

참고문헌

- Condra, JH. Virological and clinical implications of resistance to HIV-1 protease inhibitors. *Drug Resist. Updat.* 1(5):292-9. 1998
- Panouille, M, Thibault, JF and Bonnin, E. Cellulase and protease preparations can extract pectins from various plant byproducts. *J. Agric. Food Chem. Nov.* 15:54(23):8926-35. 2006
- Thomson, JA and Perni, RB. Hepatitis C virus NS3-4A protease inhibitors: countering viral subversion in vitro and showing promise in the clinic. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* Sep;9(5):606-17. 2006
- Kageyama, K. Studies on *Aspergillus oryzae* stain for sake brewing. *J. Ferment. Technol.* 33: 53-57. 1955.
- Rao, MB, Tanksale, A, MGHatge, MS and Deshpande, VV. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial protease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 597-635. 1998
- Ward, OP. Proteolytic Enzymes, in *Comprehensive*

- Biotechnology. 1st ed. By M.Y. Murray, Pergamon press, pp. 789-792. 1985
7. Chun, DS, Kang, DK and Kim, HK. Isolation and enzyme production of a neutral protease-strain, *Bacillus sp.* DS-1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 30: 346-351. 2002.
 8. Fujii, M, Takagi, M, Imanaka, T and Aiba, S. Molecular cloning of a thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus* in vector plasmid and its expression in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bact.* 154: 831-837. 1983
 9. Masaaki, Y, Kazuo, S and Mitsuo, M. Purification and properties of acid protease from *Monascus sp.* No. 3405. *Agric. Biol. Chem.* 48:1637-1645. 1984
 10. Horikoshi, K. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganism. *Agric. Biol. Chem.* 35: 1407-1414. 1971
 11. Payne, WJ. Pure culture studies of the degradation of detergent compounds. *Biotechnol. Bioeng.* 5: 355. 1963
 12. Godfrey, T and West, S. Industrial enzymology, p.3. 2nd ed. Macmillian Publishers Inc., New York, N.Y., U.S.A. 1996
 13. Hartley, BS. Proteolytic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 29: 45-72. 1960.
 14. Choi, SS, Chi, WJ, Lee, JH, Kang, SS, Jeong, BC and Hong, SK. Overexpression of the sprD gene encoding *Streptomyces griseus* protease D stimulates actinorhodin production in *Streptomyces lividans* *The Journal of Microbiology.* 39(4):305-313. 2001
 15. Karnovsky, MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 27: 137-138. 1965
 16. Leighton, TJ, Doi, RH, Warren, RAJ and Kellin, RA. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 76: 103-122. 1973
 17. Shevchenko, A, Sunyaev, S, Loboda, A, Shevchenko, A, Bork, P, Ens, W and Standing, KG. Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching. *Anal. Chem.* 73(9):1917-26. 2001
 18. Son, WK, Lee, DY, Lee, SH, Joo, WA and Kim, CW. Analysis of proteins expressed in rat plasma exposed to dioxin using 2-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 3: 2393-2401. 2003.
 19. Bowman, JP and Nicholas, DS. Nobel members of the Family Flavobacteriaceae, *Gelidibacter* and *Gillisia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* Jul; 55:1471-86. 2005
-
- (2006년 11월 16일 접수; 2006년 12월 17일 채택)