

Chryseobacterium sp. JK1이 분비하는 세포외 단백질분해효소 특성

이유경 · 오지성 · 노동현*

충북대학교 자연과학대학 미생물학과

Characterization of Extracellular Protease Secreted from *Chryseobacterium* sp. JK1

Yu-Kyong Lee, Ji-Sung Oh, and Dong-Hyun Roh*

Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea

(Received February 27, 2013 / Accepted March 21, 2013)

A novel *Chryseobacterium* sp. JK1 strain isolated from soil had been reported that this isolate produced large amount of extracellular protease at mesophilic temperature in previous study. The optimal temperature and pH of extracellular protease were 40°C and 7.0, respectively, showing narrow range of optimal temperature and relatively broad activity from pH 6.0 to 9.0. In addition, the protease showed greatest activity against skim milk and lowest against bovine serum albumin (BSA). The protease strongly inhibited by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) or phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and addition of cation Ag^+ or Cu^{2+} , and slightly inhibited by Al^{3+} . No significant inhibition was found with pepstatin, and addition of cation, K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} or Mg^{2+} . On the contrary, protease was enhanced by addition of divalent cation Mn^{2+} (5 mM). Zymography analysis of concentrated culture supernatant revealed two major bands at 67 and 145 kDa. These results suggest that *Chryseobacterium* sp. JK1 strain produced extracellular neutral serine proteases which could apply in food industry.

Keywords: *Chryseobacterium* sp. JK1, extracellular protease, optimal conditions

최근 재생자원의 적극적인 이용과 친환경적인 공정의 개발의 필요성으로 인해 단백질성 촉매인 효소의 이용공정 개발이 증가하고 있다(Kirk *et al.*, 2002). 현재 산업화 된 30여 종의 효소 중 생리화학적 역할의 중요성과 더불어 산업분야에 대한 응용에 있어 중요한 위치를 차지하고 있는 효소가 단백질 분해효소(protease)이다. 이 효소는 단백질 오염물에 대한 세척을 도와주는 계면활성제의 첨가제로 사용되거나, 제빵, 음료 등과 같은 식품산업, 죽은 조직의 제거나 응고된 혈액의 용해와 같은 제약산업, 가죽의 탈회와 제모와 같은 피혁산업, 진단산업, X-ray와 사진필름으로부터 은의 회수 등 폐기물 처리 등에 이용되며, 세계적인 판매효소의 60% 가량을 차지한다(Rao *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2008; Kasana *et al.*, 2011).

단백질 분해효소는 단백질을 분해하는 효소로서 단백질을 형성하는 폴리펩타이드 내에 존재하는 아미노산들의 펩타이드 결합에 대한 가수분해를 촉매한다(Hartley, 1960). 생명체에서 필수적인 역할을 수행하는 이 효소는 식물, 동물, 미생물에서 생산

되고, 이들 생명체 모두는 단백질 분해효소의 공급원이 될 수 있다. 이중 식물과 동물에서 생산되는 효소는 세계적인 수요량을 충족시킬 수 없으며, 생명공학적 응용에 대한 특성을 충족시키기 어렵기 때문에 미생물성 단백질분해효소를 이용하는 연구가 증가되고 있다(Rao *et al.*, 1998; Kasana *et al.*, 2011). 특히, 다양성이 풍부한 미생물 유래의 단백질 효소가 다양한 종으로부터 보고되어 있으며, 같은 종의 균에서도 배양학적 조건에 따른 생산성 향상 등이 많이 연구되었다(Lee *et al.*, 2012). 특히 생태계에서 분해자로 역할을 하는 미생물은 세포와 대사과정에서 중요한 세포내부의 단백질 분해효소 이외에도 세포외 환경에 존재하는 단백질의 가수분해와 분해산물을 흡수하기 위해 세포외 단백질 분해효소를 분비한다(Kalisz, 1988).

이러한 단백질 분해 효소는 활성부위에 존재하는 아미노산의 작용기작에 따라 serine protease, metalloprotease, aspartic protease, cysteine protease 등으로 구분되며, 활성이 존재하는 pH 범위에 따라 acid protease 또는 neutral protease, alkaline protease로 분류되기도 한다(Rao *et al.*, 1998).

이전의 연구에서 신종세균으로 단백질 분해활성이 강한 세균을 분리한 결과 30°C에서 최고의 효소활성을 보인 *Chryseobacterium*

*For correspondence. E-mail: dhroh@chungbuk.ac.kr; Tel.: +82-43-261-3368; Fax: +82-43-264-9600

sp. JK1을 분리하여 보고하였다(Lee et al., 2012). *Chryseobacterium* 속은 그람 음성의 비아포성 간균으로 유전적, 화학적인 분류법과 표현형적 특성을 근간으로 *Flavobacterim* 속에서 분리되어 독립적인 속(genus)으로 기술 되었다. 이 속에 속한 균들은 고체 배지상에서 노란색의 색소를 형성하는 균이 많으며 강한 단백질 분해활성을 보인다고 보고되어 있다(Vandamme et al., 1994). 분리된 *Chryseobacterium* sp. JK1은 완전배지인 Nutrient Broth (NB) 배지에 탄소원을 첨가했을 때 생육은 우수했지만, 낮은 효소활성을 보였다. 그리고 유기질소보다 무기질소를 첨가했을 때 생육은 저조했지만, 높은 효소활성을 보여주었다(Lee et al., 2012).

본 연구에서는 새로운 단백질 분해효소 공급원으로 분리되고 된 신종 *Chryseobacterium* sp. JK1 균주의 세포의 단백질 분해 효소 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

중온성 세균으로 토양으로부터 분리되었고, 세포의 단백질 분해효소의 활성이 높다고 보고 된 *Chryseobacterium* sp. JK1 균주를 사용하였다(Lee et al., 2012). 균주 배양을 위한 기본 배지는 NB 배지(Difco)를 사용하였으며 최소배지는 생존에 필요한 최소의 유기질소 yeast extract (Difco) 0.05%, 탄소원으로 mannitol 1%에 무기영양분 K_2HPO_4 1%, $NaHPO_4$ 0.5%, $(NH)_2SO_4$ 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.0001%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0001%를 첨가하여 사용하였다.

단백질 분해 조효소액 제조 및 효소 활성 측정

효소의 활성측정은 배양 상등액을 사용하여 Windle과 Kelleher의 방법(1997)에 준하여 시행하였다. 먼저 균주를 NB 배지에 접종하여 30°C에서 120 rpm으로 3일간 중배양한 다음 동일배지에 1% 접종하여 같은 조건에서 24시간 진탕배양하였다. 그 후 4°C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 배양 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 표준반응에서 효소의 기질은 0.5% (w/v) azocasein을 100 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.0)에 현탁시켜 사용하였으며, pH에 따른 활성은 각각의 상용 완충용액에 녹여 사용하였다. 효소반응과 효소의 활성단위는 Lee 등(2012)과 동일하게 시행하였으며, 효소의 활성은 3회 측정의 평균값과 표준편차로 표시하였다.

단백질 분해효소 활성에 대한 반응 온도와 pH의 영향

효소의 최적온도를 알아보기 위해서 효소의 반응 온도를 10°C부터 60°C까지 5°C 간격으로 효소 활성을 측정하였다. 반응 온도를 제외한 다른 조건은 상기와 같은 방법으로 측정하였다. 최적 pH를 알아보기 위해서는 azocasein을 현탁시키는 완충액의 pH를 5.0에서 11.0까지 1.0의 간격으로 조정하여 활성을 측정하였다. 각 pH별 사용된 완충액은 pH 5.0-6.0은 100 mM citrate buffer, pH 6.0-8.0은 100 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0-9.0은 100 mM Tris-HCl buffer 그리고 pH 9.0-11.0은

100 mM glycine-NaOH buffer를 사용하였다. pH를 제외한 다른 조건은 상기와 같은 방법으로 측정하였다.

단백질 분해효소 활성에 미치는 화학물질의 영향

세포의 단백질 분해효소의 활성에 영향을 미치는 금속이온들의 효과를 조사하기 위해 효소반응시 다양한 금속이온들의 최종 농도를 각각 1 mM 또는 5 mM이 되도록 첨가하였다. 금속이온과 결합하는 킬레이트 화합물들은 효소의 저해 유효농도인 최종 1 mM이 되도록 첨가하였으며, 효소저해제인 pepstain A는 최종 농도가 1 µg/ml, PMSF는 100 µg/ml이 되도록 첨가하였다(Sambook et al., 1989).

분해 기질에 따른 단백질 분해 효소의 활성

Chryseobacterium sp. JK1이 생산하는 효소가 어떤 기질을 잘 사용하는지 알아보기 위해 Salwan 등(2010)이 사용한 방법을 변형하였다. 30°C에서 24시간 배양한 NB 배지 상등액을 조효소로 사용하여 반응기질로 azocasein 대신에 0.5% casein, BSA, skim milk, gelatin을 100 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)에 현탁시켜 기질로 사용하여 효소 활성을 측정하였다. 효소 반응은 150 µl의 조효소액과 기질 500 µl을 혼합한 후 30°C에서 30분 반응시켰으며, 반응중지는 650 µl 10% trichloroacetic acid (TCA) 용액을 첨가하였다. 그 후 13,000 rpm으로 4°C에서 15분간 원심분리하여 상등액 1.2 ml를 사용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정시 대조군은 기질을 조효소액과 반응시키기 전에 10% TCA 용액을 먼저 넣어 단백질을 침전시킨 것을 사용하였다. 효소활성의 표시는 각 기질에 대한 흡광도 증가의 상대적 비율을 3회 측정의 평균값과 표준편차로 표시하였다.

효소의 농축과 정량, 활성염색(Zymogram)

최소배지에 0.5%의 skim milk를 첨가한 배지 50 ml에 종배양액 1%를 접종하여 30°C에서 3일간 배양하였다. 배양액을 8,000 rpm (Supra 22K, rotor 7), 4°C에서 10분간 원심분리를 세 번 반복하여 균체를 제거한 상등액을 Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (10K NMWL, Millipore)를 사용하여 20배 농축하였다. 단백질 정량은 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 BSA를 표준단백질로 하여 측정하였다.

효소활성 염색을 위한 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 0.1% gelatin을 첨가한 8% 젤에서 Laemmli의 방법(1970)에 준하여 행하였으며, 효소활성 염색을 위한 시료는 상기에서 농축된 시료를 가열하지 않고 Pragash 등(2009)의 방법을 참조하여 다음과 같이 실행하였다. 전기영동 한 다음 젤 내부의 효소활성을 renaturation 시키기 위해 2.5% Triton X-100 용액으로 30분간 반응시킨 후 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 37°C에서 2시간 동안 효소를 반응시킨 후 50% methanol과 10% acetic acid를 함유하는 고정용액으로 2시간 처리하였다. 그 후 Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma)로 4시간 이상 염색한 다음 7% acetic acid와 10% methanol 탈색액으로 탈색하였다. 단백질 크기의 표준물질

은 Perfect protein marker, 10-225 kDa (Novagen)을 사용하였다.

결과 및 고찰

Protease 활성에 대한 반응 온도와 pH의 영향

수 많은 산업분야에 사용되는 효소는 그 특성이 다양하다. 따라서 새로운 효소를 어떤 분야에 사용하기 위해서 먼저 효소의 최적온도와 pH 특성을 알아야 한다. *Chryseobacterium taeanense* TKU001 생산되는 세포의 단백질 분해효소의 최적온도는 60°C로 보고되어 있으며(Wang et al., 2008), *Chryseobacterium* 속의 두 종에서 생산된 케라틴 분해성 단백질 분해효소는 45 또는 50°C로 보고되어 있다(Riffel et al., 2007; Bach et al., 2011). 같은 속의 *Chryseobacterium* sp. JK1가 생산하는 세포의 단백질 분해효소의 효소활성에 반응온도가 어떠한 영향을 주는가를 알아보기 위해 반응온도를 달리하여 효소활성을 측정하였다. 그 결과 *Chryseobacterium* sp. JK1의 체외 단백질 분해효소는 Fig. 1에서와 같이 10°C에서부터 활성이 점진적으로 증가하여 40°C에서 최대의 활성을 나타내었으며, 그 이상의 온도에서는 단백질의 변성으로 효소의 활성이 급격하게 감소하는 특성을 보여, 같은 속의 균주들 보다 다소 낮은 최적온도 특성을 보여주었다. 그리고 저온 적응성 *Pseudoalteromonas* sp. HJ47과 중온성인 *Micrococcus* sp. HJ19의 단백질 분해효소가 35°C에서 최고의 활성을 보인 후 완만하게 효소활성이 감소하는 것과는 다른 특성을 보여주었다(Cha et al., 2007, 2009). 본 균주가 생산하는 단백질 분해효소와 유사한 반응온도 특성을 보인 것으로는 *Bacillus cereus* SH-7가 생산한 단백질 분해효소로 40°C에서 좁은 최적온도 구간을 보여주었다(Yi et al., 1999).

효소반응의 pH가 단백질 분해효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH를 달리하여 활성을 측정한 결과 Fig. 2와 같았다. 분리된 *Chryseobacterium* sp. JK1으로부터 생산된 체외

단백질 분해효소는 비교적 넓은 범위의 pH 6.0-9.0에서 높은 활성을 보였으며, 최적 pH는 7.0이었다. 같은 속의 균주에서 생산된 단백질 분해효소들간의 최적 pH를 비교한 결과 *C. taeanense* TKU001의 단백질 분해효소와 *C. indologenes* A22에서 생산된 케라틴 분해성 단백질 분해효소의 최적 pH는 7.0으로, JK1 균주의 효소와 유사한 특성을 보였다(Wang et al., 2008; Bach et al., 2011). 그리고 *Chryseobacterium* sp. kr6의 케라틴 분해성 단백질 분해효소는 최적 pH가 8.5를 나타내었고 최적 반응온도 유사한 특성을 보인 *Bacillus cereus* SH-7는 최적 pH가 8.0을 나타내어 약간의 차이를 보여주었다(Yi et al., 1999). *Chryseobacterium* 속의 단백질 분해효소는 약간의 차이에도 불구하고 모두 neutral protease에 속하는 특성을 보여주었다.

Protease 활성에 대한 화학물질들의 영향

효소의 활성은 다양한 화학물질에 의해 영향을 받는다고 알려져 있다. JK1 균주의 세포의 단백질 분해효소를 이용하여 여러 금속이온들과 화학물질들의 효과를 알아 본 결과 Table 1과 같았다. 효소 반응시 아무것도 첨가하지 않은 대조군과 비교하였을 때, 금속을 흡착하는 킬레이트 화합물을 처리한 결과 활성이 60% 수준으로 감소하여 효소의 활성부위에 금속이 필요함을 알 수 있었다. 효소활성에 대한 다양한 금속효과를 조사한 결과 Ag^+ 와 Cu^{2+} 을 5 mM 첨가하였을 때 각각 10%와 20% 수준으로 감소하였고, Al^{3+} 첨가하였을 때는 78%로 감소하였다. 반면에 Mn^{2+} 를 5mM로 첨가하였을 때는 3.5배 정도 활성이 증가하였다. 그 외의 K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} , Mg^{2+} 첨가는 10% 미만의 미미한 활성변화를 보였다. 효소 저해제 중 활성부위에 aspartic acid를 가진 단백질 분해효소를 저해하는 pepstatin을 첨가한 결과 아무런 변화를 보이지 않은 반면, serine을 가진 단백질 분해효소를 저해하는 PMSF를 첨가한 결과 46% 수준으로 효소활성이 감소하였다.

이러한 결과를 종합해 보면, *Chryseobacterium* sp. JK1이 생

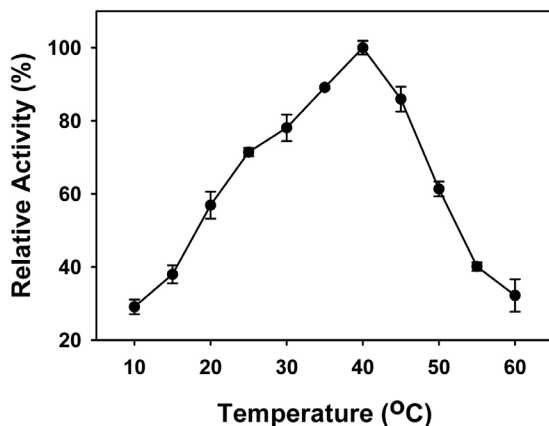


Fig. 1. Reaction temperature effects on protease activity of extracellular protease secreted from *Chryseobacterium* sp. JK1. Cells were grown in NB medium at 30°C for 24 h. The activities were determined for 30 min at each temperature with culture supernatants. Standard deviations from the mean of three independent assays are indicated by error bars.

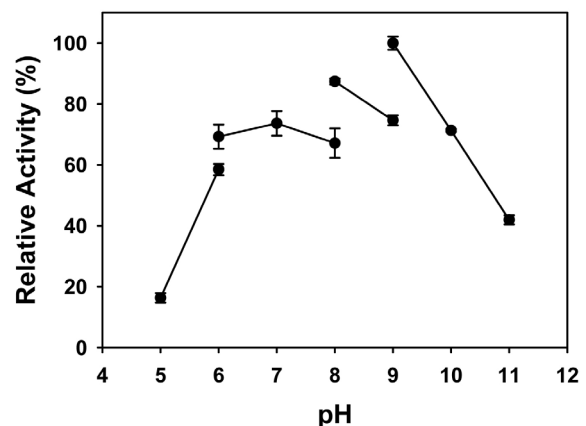


Fig. 2. Effect of pH on enzyme activity of extracellular protease secreted from *Chryseobacterium* sp. JK1. All conditions are the same as Fig. 1 except the pH range. The buffers were used 0.1 M citrate (pH 5.0-6.0), 0.1 M sodium phosphate (pH 6.0-8.0), 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0-9.0), and 0.1 M glycine-NaOH (pH 9.0-11.0).

Table 1. Influence of chemicals on the proteolytic activity of extracellular protease secreted from *Chryseobacterium* sp. JK1

Chemicals	Concentration	Relative activity (%)
None		100.0±2.4
KCl	1 mM	95.0±1.6
	5 mM	97.5±1.1
CaCl ₂	1 mM	100.0±0.7
	5 mM	97.5±1.9
AlCl ₃	1 mM	87.5±1.5
	5 mM	77.5±1.0
NaCl	1 mM	90.0±4.4
	5 mM	90.0±3.3
FeCl ₂	1 mM	92.5±1.4
	5 mM	100.0±3.7
CuSO ₄	1 mM	40.0±1.4
	5 mM	20.0±0.9
MgCl ₂	1 mM	97.5±1.2
	5 mM	105.0±2.1
AgNO ₃	1 mM	50.0±3.4
	5 mM	10.0±1.0
MnSO ₄	1 mM	172.5±1.9
	5 mM	345.0±2.9
Pepstatin	1 µg/ml	99.6±0.4
PMSF	100 µg/ml	46.1±1.9
EDTA	1 mM	60.1±0.8
EGTA	1 mM	61.4±2.1

산하는 체의 단백질 분해효소는 효소의 활성부위에 serine을 가지고 있으며, 효소활성부위에 Mn²⁺ 금속이온을 필요로 하는 효소라 추정할 수 있었다. *C. taeanense* TKU001에서 생산된 단백질 분해효소와 비교해 볼 때 EDTA와 Cu²⁺ 첨가에 의해 활성이 감소하는 특성은 같았으나, Mn²⁺ 첨가시 효소활성이 오히려 감소하고, PMSF 첨가에 의해 효소활성이 감소하지 않는 다른 특성을 보여주었다(Wang *et al.*, 2008). 그리고 *Bacillus cereus* SH-7의 효소도 PMSF에 의해 영향을 받지 않았다(Yi *et al.*, 1999).

분해 기질에 따른 단백질 분해효소의 활성

어떤 기질을 잘 분해하는지 *Chryseobacterium* sp. JK1으로 생산된 단백질 분해효소를 사용하여 조사한 결과 Table 2와 같았다. BSA 또는 casein, skim milk, gelatin 중 BSA를 이용한 반응이 가장 낮은 활성을 보였으며, skim milk를 이용하였을 때 BSA 보다 10% 높은 활성을 보여 가장 높은 효소의 특이성을 보여 주었다. 이러한 결과는 균주의 분리시 기질로서 skim milk를 배지에 첨가하여 분리하였기 때문인 것으로 추정된다. Salwan 등(2010)이 보고한 저온성 *Arthrobacter* sp. MNPB6 균주의 단백질 분해효소는 반대로 BSA에 가장 높은 활성을 보이고 skim milk에 가장 낮은 특이성을 보여 주었다.

단백질분해효소의 활성밴드

분비 생산된 체의 단백질 분해효소의 분자량을 알아보기 위해 *Chryseobacterium* sp. JK1의 배양액을 농축하여 SDS-PAGE를 수행하고 효소의 활성밴드를 관찰한 결과 Fig. 3과 같았다. 배

Table 2. Proteolytic activities of extracellular protease secreted from *Chryseobacterium* sp. JK1 on different substrates

Substrate	Relative activity (%)
Bovine serum albumin	100.0±0.7
Casein	103.7±4.2
Skim milk	110.2±2.0
Gelatin	103.7±3.0

양 상등액을 농축했지만 농축과정 중 침전에 의한 손실로 단백질의 양은 많지 않았으며, 가열한 시료와 가열 하지 않은 시료의 밴드는 많은 차이를 보였다(Fig. 3 A and B). 그리고 시료를 가열하거나, 농축과정에서 발생된 여과물에서는 활성밴드를 볼 수 없는 반면, 농축 중 침전물에서는 활성밴드를 관찰 할 수 있었다(자료 미제시). 유일하게 가열하지 않은 시료에서만 67과 145 kDa 크기에서 활성밴드가 관찰되었다(Fig. 3 C and D). 같은 속의 *C. taeanense* TKU001의 세포의 단백질을 정제한 결과 41과 75 kDa 크기의 두 효소가 존재했으며(Wang *et al.*, 2008), *Bacillus cereus* SH-7는 40 kDa 크기의 효소를 생산하였다. JK1 균주 유래의 세포의 단백질 시료를 가열하지 않아 정확한 단백질 분해효소의 종류를 알 수 없었으며 정확한 결과는 단백질 정제를 해야 알 수 있을 것으로 생각된다.

종합적으로, *Chryseobacterium* sp. JK1의 세포의 단백질 분해효소는 여러 가지 측면에서 기존의 효소들과는 정확하게 일치하지 않아 새로운 특성을 가진 효소로 판단된다. 일반적으로 식품산업의 효소반응 과정은 최적의 효율을 위해 반응 전후에 pH를 조정한다. 하지만, 산이나 알칼리의 첨가로 인해 원하지 않은 염이 생성되어 맛의 변화를 초래할 수 있다(Ou and Zhu, 2012).

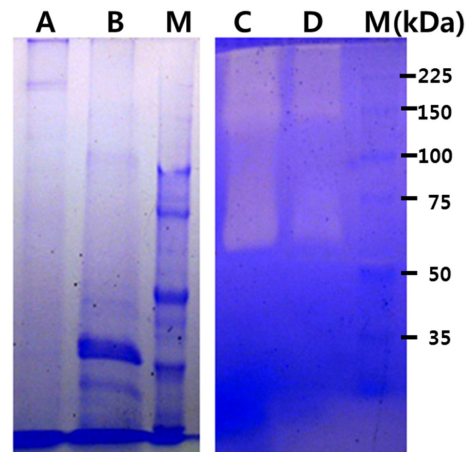


Fig. 3. SDS-PAGE and zymography analysis of extracellular protease from *Chryseobacterium* sp. JK1. Cells were grown in minimal medium supplemented with 0.5% skim milk at 30°C. Samples of standard protein molecular marker (M) and 4.5 µg of concentrated culture supernatant, unboiled (A) and boiled (B) were subjected to SDS-PAGE on 8% polyacrylamide gels and stained with Coomassie brilliant blue R250. Concentrated culture supernatants of 0.23 µg (C) and 0.023 µg (D) were analyzed for proteolytic activity by 0.1% gelatin zymography on 8% SDS-PAGE gels and stained with Coomassie brilliant blue R250.

따라서 *Chryseobacterium* sp. JK1의 단백질 분해효소는 중성 pH와 낮은 온도에서 최적 효소활성을 보여 중성의 반응조건이나 약한 열로 효소 실활을 필요로 하는 산업분야 등에 응용가능할 것으로 생각된다.

적 요

이전의 연구에서 토양으로부터 많은 양의 세포의 단백질분해 효소를 생산하는 신종 중온세균 *Chryseobacterium* sp. JK1를 분리하였다. 이 균주가 생산하는 단백질 분해효소의 특성조사 결과 최적반응온도와 pH는 각각 40°C와 7.0이었으며, 좁은 최적온도 구간과 비교적 넓은 pH 구간인 pH 6.0-9.0에서 높은 활성을 보여주었다. 그리고 단백질 분해효소는 EDTA 또는 EGTA, PMSF와 금속이온 Ag^+ 또는 Cu^{2+} 의 첨가에 의해 강하게 저해되었으며, Al^{3+} 의 첨가에 의해 약하게 저해되었다. Pepstatin과 금속이온 K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} 또는 Mg^{2+} 의 첨가는 저해에 큰 영향을 주지 않았다. 이와 반대로 단백질분해효소는 이가 금속이온인 Mn^{2+} (5 mM)의 첨가에 의해 효소활성이 향상되었다. 농축된 배양 상등액의 활성염색 분석으로 67과 145 kDa 크기의 주요 밴드 두 개가 관찰되었다. 이러한 결과들로 *Chryseobacterium* sp. JK1 균주가 식품산업에 응용 가능한 세포의 중성의 serine 단백질 분해효소를 생산한다는 것을 알 수 있었다.

감사의 말

이 논문은 2011년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다(This work was supported by the research grant of the Chungbuk National University in 2011).

참고문헌

- Bach, E., Daroit, D.J., Corrêa, A.P.F., and Brandelli, A. 2011. Production and properties of keratinolytic protease from three novel Gram-negative feather-degrading bacteria isolated from Brazilian soils. *Biodegrad.* **22**, 1191-1201.
- Cha, I.-T., Lim, H.-J., and Roh, D.-H. 2007. Isolation of *Pseudoalteromonas* sp. HJ47 from deep sea water of East Sea and characterization of its extracellular protease. *Kor. J. Life Sci.* **17**, 272-278.
- Cha, I.-T., Oh, Y.-S., Cho, W.-D., Lim, C.-S., Lee, J.-K., Lee, O.-S., and Roh, D.-H. 2009. Production condition and characterization of extracellular protease from *Micrococcus* sp. HJ-19. *Kor. J. Microbiol.* **45**, 69-73.
- Hartley, B.S. 1960. Proteolytic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **29**, 45-72.
- Kalisz, H.M. 1988. Microbial proteinases. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **36**, 1-65.
- Kasana, R.C., Salwan, R., Yadave, S.K. 2011. Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. *Crit. Rev. Microbiol.* **37**, 262-276.
- Kirk, O., Borchert, T.V., and Fuglsang, C.C. 2002. Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 345-351.
- Kumar, D., Savitri, Thakur, N., Verma R., and Bhalla, T.C. 2008. Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res. J. Microbiol.* **3**, 661-672.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee, Y.-K., Oh, Y.-S., and Roh, D.-H. 2012. Production properties on extracellular protease from *Chryseobacterium* novel strain JK1. *Kor. J. Microbiol.* **48**, 48-51.
- Lowery, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Ou, J.F. and Zhu, M.-J. 2012. An overview of current and novel approaches for microbial neutral protease improvement. *Int. J. Mod. Biol. Med.* **2**, 1-31.
- Pragash, G., Narayanan, M.K.B., Naik, P.R., and Saktivel, N. 2009. Characterization of *Chryseobacterium aquaticum* strain PUPC1 producing a novel antifungal protease from rice rhizosphere soil. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 99-107.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., and Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 597-635.
- Riffel, A., Brandelli, A., Bellato, C.M., Souza, G. H.M.F., Eberilin, M.N., and Tavares, F.C.A. 2007. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. *J. Biotech.* **128**, 693-703.
- Salwan, R., Gulati, A., and Kasana, R.C. 2010. Phylogenetic diversity of alkaline protease-producing psychrotrophic bacteria from glacier and cold environments of Lahaul and Spiti, India. *J. Basic Microbiol.* **50**, 1-10.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., p. 18.31. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, N.Y., USA.
- Vandamme, P., Bernardet, J.F., Segers, P., Kersters, K., and Hølems, B. 1994. New perspectives in the classification of the *Flavobacteria*: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 827-831.
- Wang, S.-L., Yang, C.H., Liang, T.-W., and Yen, Y.-H. 2008. Optimization of conditions for protease production by *Chryseobacterium taeanense* TKU001. *Bioresour. Technol.* **99**, 3700-3707.
- Windle, H.J. and Kelleher, D. 1997. Identification and characterization of a metalloprotease activity from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **65**, 3132-3137.
- Yi, H.K., Chun, Y.J., and Kim, H.B. 1999. Characterization of *Bacillus cereus* SH-7 extracellular protease. *J. Microbiol.* **37**, 213-217.