

## Bacillus subtilis JS-17이 생산하는 Collagenase의 정제 및 특성

임경숙 · 손승희 · 강호영 · 전흥기\*

부산대학교 생명과학부

Received July 4, 2005 / Accepted August 19, 2005

**Purification and Characterization of *Bacillus subtilis* JS-17 Collagenase.** Kyoung-Suk Lim, Shung-Hui Son, Ho Young Kang and Hong-Ki Jun\*. *Division of Biological Sciences, Pusan National University, Pusan, 609-735, Korea* – Collagenases are generally defined as enzymes that are capable of degrading the polypeptide backbone of native collagen under conditions that do not denature the protein. An extracellular collagenase-producing bacterial strain was isolated from kimchi and identified to be *Bacillus subtilis* JS-17 through morphological, cultural, biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis. Optimum culture condition of *Bacillus subtilis* JS-17 for the production of collagenase was 1.5% fructose, 1% yeast extract, 0.5%  $K_2HPO_4$ , 0.4%  $KH_2PO_4$ , 0.01%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.01%  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ , 0.1% citrate and 0.1%  $CaCl_2$ . The production of collagenase was optimal at 30°C for 72 hr. A collagenase was isolated from the culture filtrate of *Bacillus subtilis* JS-17. The enzyme was purified using Amberlite IRA-900 column chromatography, Sephacryl S-300 HR column chromatography and DEAE-Sephadex A-50 column chromatography. The purified collagenase has a specific activity 192.1 units/mg. The molecular weight of the purified enzyme was estimated to be 28 kDa by SDS-PAGE. The purified collagenase has 100% activity up to 55°C.

**Key words** – Collagen, Collagenase, Purification, Enzyme activity, *Bacillus subtilis* JS-17

콜라겐(collagen)은 동물의 세포 외 기질의 주성분이며, 연결 조직의 주요 섬유 구성 인자로서 피부, 심줄, 연골 등에서 건조 중량의 70% 이상을 차지하는 단백질이다. 콜라겐은 섬유상으로 존재하는데, 모어서 교원 섬유를 나타내는 I형, II형, III형, V형, XI형 콜라겐은 섬유 형성 콜라겐 또는 간질형 콜라겐으로 불리며, 전자 현미경으로 볼 수 있는 복잡한 환형 구조를 가진다. 섬유를 구성하는 기본 단위는 분자량 약 30만, 길이 280 nm, 두께 1.5 nm의 tropocollagen으로서 동물의 성장과 함께 polypeptide 사슬 사이에 가교를 생성하여 불용성으로 되는데, tropocollagen의 각 polypeptide chain 구성의 차이에서 I ~ VIII형으로 다양하게 구분된다[15].

Collagenase는 진핵 생물이나 원핵 생물에서 모두 합성될 수 있다. 척추 동물의 collagenase는 상처의 치료, 성장 조절, 조직의 흡수와 재형성 등에서 중요한 역할을 한다[10]. Collagen, proteoglycans 및 당 단백질 등의 구조 단백질로 구성된 세포 외 기질의 시기적절한 분해는 배 발생, 형태형성, 생식 및 조직의 흡수와 재형성에 필수적인 현상이다. 그리고 원핵 생물의 collagenase의 기능들 중의 하나는 collagen 기질을 빠르게 분해함으로써 숙주의 조직에 감염하는 것을 돕는다. 세균은 hyaluronidase, phospholipase, elastase 등을 포함한 숙주 조직을 분해할 수 있는 다른 효소들을 생산하여 collagenase의 작용을 촉진시킨다.

정제 과정의 발전과 collagenase에 대한 향상된 활성 측정 방법은 세균성 병원체에서 collagenase의 특성과 역할을 더 잘 이해하는데 중요한 역할을 하게 된다. 현재 collagen과 collagenase에 대한 수요는 저질 육류의 품질 향상, 고화제 및 유화제, 사건의 코팅제, 그리고 피부 대용체와 수술용 실, 약리용 캡슐의 생산 등 식품과 화학, 의료 산업 및 기초 생명 과학의 영역까지 확대되고 있으며, 콜라겐 기반 기술에 응용하기 위해 양질의 콜라겐과 활성이 높고 안정한 collagenase를 얻기 위한 효율적인 방법이 지금도 모색되고 있다 [8]. 이에 본 연구는 김치로부터 collagenase를 생산하는 균주를 선별하고, collagenase의 정제 및 특성을 평가하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 분리용 시료 및 사용 배지

가정으로부터 수집된 각종 김치 시료로부터 collagenase 생산 균주를 선별하였다. Collagenase 생산 균주의 분리용 평판 배지는 0.3% collagen (Insoluble Type I, Sigma), 0.1% yeast extract, 0.7%  $K_2HPO_4$ , 0.2%  $KH_2PO_4$ , 0.01%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.05% citrate  $\cdot 2H_2O$ , 그리고 1.5% agar로 구성된 것을 사용하였다[8]. 평판 배지에 균질화시킨 시료를 도말하여 colony를 선별하였다.

#### 사용 균주 및 배양 조건

분리용 배지에서 collagenase 생산을 확인한 균주들은

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2270, Fax : +82-51-513-4532

E-mail : hkjun@pusan.ac.kr

collagen 대신에 gelatin으로 대체된 액체배지에서 배양하였다[1,16,20]. 고체배지 상에서 3~4일 배양한 후 형성된 colony를 액체 배지에 접종하고, 30°C, 200 rpm에서 2~3일 배양한 다음 원심분리하여(17,000×g, 30 min, BECKMAN COULTER, Avanti J-E centrifuge, USA) 상층액을 조효소액으로 사용하였다.

### Collagenase 활성 측정

Collagenase 활성 측정은 collagen를 기질로 사용하여 60°C에서 10분간 반응시킨 다음 반응 전후의 free α-amino group을 Ninhydrin법에 의해 570 nm에서 흡광도를 측정하고 leucine에 대한 표준 검량선으로부터 구하였다[6,14,18,19]. 효소 1 unit는 1분 동안 1 μmol의 leucine을 생산하는 효소의 양으로 정의하였다[22]. 총 단백질의 농도는 Bradford assay법[4]을 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

### 조효소액의 조제

효소 생산 최적 배지 조건에서 72시간 동안 배양한 배양액을 원심분리(17,000×g, 30 min)한 후 상층액을 취하여 ultrafiltration (Millipore YM10 membrane, Amicon Co., USA)으로 농축한 후 조효소액으로 사용하였다.

### Collagenase의 정제

조제한 조효소액을 4 mM CaCl<sub>2</sub>를 포함하는 50 mM Tris-HCl 완충액 (buffer A, pH 7.4)으로 평형화시킨 Amberlite IRA-900 column (1.8 cm×15 cm, Sigma Co., USA)에 0.5 ml/min 유속으로 NaCl을 이용하여 0~1.5 M까지 농도 구배를 주면서 단백질을 용출시켰다. 활성 분획을 회수하여 ultrafiltration을 이용하여 농축시킨 후, buffer A로 평형화시킨 Sephacryl S-300 HR column (1.8 cm×53 cm, Pharmacia Co., Sweden)에 0.15 ml/min 유속으로 단백질을 용출시켰다. 활성 분획을 회수하여 ultrafiltration을 이용하여 농축시킨 다음 DEAE-Sephadex A-50 column (1.8 cm×15 cm, Pharmacia Co., Sweden)에 0~1.5 M까지 NaCl (buffer A, pH 7.4) 농도 구배를 주면서 0.5 ml/min의 유속으로 정제를 실시하였다.

### SDS-PAGE 법

정제된 효소의 분자량을 측정하기 위해서 Laemmli[12]의 방법에 따라 SDS-PAGE로 확인하였으며, 12% polyacrylamide gel과 Tris-glycine buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3)를 사용하였다. 단백질 시료는 100°C에서 5~10분간 가열 변성시킨 후, 시료량의 10%에 해당하는 TCA (trichloroacetic acid)를 첨가하여 ice에서 30분간 침전시켰다. 이를 원심분리(10,000 rpm, 10 min)하여 상등액을 제거하고 0.1 N NaOH 20 μl을 첨가하여 단백질을 농축시켰다. TCA 처리 후 sample buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5%

β-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.02% bromophenol blue)와 2:1의 비율로 섞어 전기 영동을 실시하였다. 단백질 염색은 Coomassie blue R-250으로 행한 후, 탈색액 (methanol: acetic acid:DW=1:1:8, v/v/v)으로 탈색하였다. 효소의 분자량 측정은 SDS-PAGE의 R<sub>f</sub> 값을 비교하여 분자량을 측정하였다.

$$R_f = \frac{\text{distance of protein migration}}{\text{distance of tracking dye migration}}$$

### 효소의 활성 측정법

정제된 효소액을 온도별로 30분 동안 방치한 후에 잔존 활성을 측정하여 상대 활성으로 안정성을 검토하였고, 온도에 따라 효소 활성을 측정하고 후 효소 활성 최적 온도를 결정하였다.

정제된 효소액을 각각의 pH 완충액에서 55°C, 30분간 방치한 후 잔존 활성을 측정하여 pH 안정성을 검토하였고, 각각의 pH 완충액에 기질을 녹여 효소 활성을 측정하여 효소 활성 최적 pH를 결정하였다. pH 3.0~6.0은 50 mM citrate buffer, pH 6.0~8.0은 50 mM phosphate buffer, pH 8.0~9.8은 50 mM borate buffer, pH 10.0~12.0은 50 mM NaHCO<sub>3</sub>·NaOH buffer를 사용하였다.

효소 활성에 미치는 금속 이온의 영향을 검토하기 위하여 효소액을 20 mM EDTA가 포함된 phosphate buffer (pH 7.0)에 24시간 투석한 후 다시 EDTA가 없는 동일 buffer에 24시간 투석하였다. 처리된 효소에 각각의 금속 이온을 1 mM과 5 mM이 되게 가한 후 효소 활성을 측정하였다.

저해제에 따른 효소 활성을 검토하기 위하여 각각의 저해제를 가하고 실온에서 30분간 방치한 후 효소 활성을 조사하였다[5].

효소 반응의 기질 특이성을 알아보기 위하여 collagen 및 gelatin, casein, elastin[11] 그리고 합성 기질인 FALGPA [N-[3-(2-Furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala][7,23]를 기질로 하여 효소반응을 한 뒤 기질별로 collagenase 활성을 측정하였다[1,8,16,17,20].

## 결과 및 고찰

### Collagenase 생산 균주 분리 및 동정

Collagenase 생산능을 가지는 균주를 분리하기 위하여 가정으로부터 채취한 김치를 미생물 분리원으로 사용하였다. Collagenase 생산 균주의 분리용 평판 배지에 3~4일간 배양한 결과 collagen을 분해한 결과로 고체배지 상에 halo가 형성되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

분리된 균주는 간균 형태의 그람 양성균으로 내생 포자를 형성하였고, 분리용 배지에서 아이보리색의 불투명한 colony를 형성하고 불특정하게 퍼져 자랐다. 생화학적 특성으로

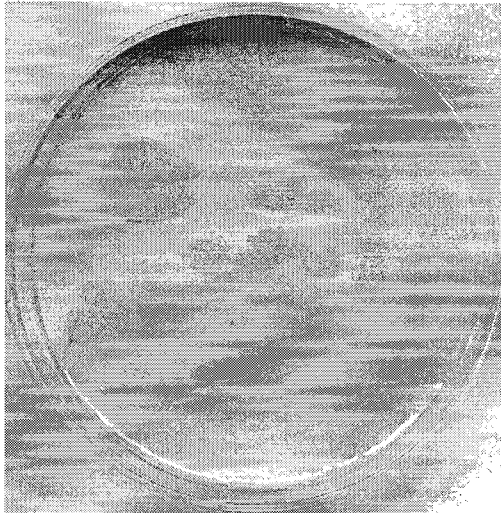


Fig. 1. Photograph of clear zone of the isolated strain JS-17.

Table 1에서 보는 바와 같이 대부분의 특성이 *Bacillus subtilis* 와 거의 흡사한 결과를 보였다.

분리 균주 세포로부터 genomic DNA를 분리하여 Accu-Power PCR PreMix kit (Bioneer)를 이용해 16S rDNA 부위를 PCR로 증폭시킨 후 auto-sequence를 이용해 염기서열을 확인하여 결정된 573개의 염기 서열을 Gene bank database와 비교한 결과 *Bacillus subtilis* strain ATCC 9799와 100%의 상동성을 보였다. 이상의 결과로부터 본 균주를 *Bacillus subtilis* JS-17로 명명하였다.

**Collagenase의 정제 및 효소의 특성**

*Bacillus subtilis* JS-17로부터 생산된 collagenase 특성을 평가하기 위해 효소를 정제하였다. 조효소액은 배양액을 원심 분리하여 상층액을 취해 ultrafiltration으로 농축하여 얻어졌다. 조효소액을 Amberlite IRA-900 column에 NaCl을 이용하여 0~1.5 M까지 농도 구배를 주면서 단백질을 용출시켰

Table 1. Biochemical characteristics of the isolated strain JS-17

Contents	Isolated strain JS-17	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC9799
Indole test	—	—
Aerobic condition	Aerobes	Aerobes
Methyl red test	—	—
Voges-Proskauer test	+	+
Citrate utilization	+	+
Catalase	+	+
Casein hydrolysis	+	+
Starch hydrolysis	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+
Fat hydrolysis	+	+
Decomposition of tyrosine	—	—
Phenylalanine deaminase	—	—

다. 용출액은 10 ml/tube로 분획하였으며(Fig. 2), 활성이 있는 분획을 회수하여 ultrafiltration을 이용하여 농축시켰다. 이때의 효소의 비활성은 164.4 units/mg으로 증가하였고, 회수율은 6.9%였다. 두 번째 단계로 Sephacryl S-300 HR column을 이용하여 단백질을 용출시킨 결과, 효소의 비활성은 189.5 units/mg로 증가하였고, 회수율은 3.1%였다(Fig. 3). Gel filtration chromatography의 활성분획을 회수하여 ultrafiltration을 이용하여 농축시킨 다음 DEAE-Sephadex A-50 column으로 단백질을 정제하였다(Fig. 4). 이 때 효소의 비활성은 192.1 units/mg이며, 1.1%로 회수되었다(Table 2). 이러한 회분액을 투석 및 농축한 후 SDS-PAGE를 실시하였다. 염색, 탈색을 한 후 분자량을 측정한 결과 분자량은 약 28 kDa 이었다(Fig. 5, 6). *Clostridium histolyticum* 유래의 collagenase [2,3,9,13,21,22,24]는 68~130 kDa 범위로 보고되었고 *Cytophaga* sp.[20] 유래의 collagenase는 120 kDa으로 보고되어 이들 효소와는 다른 collagenase 효소임을 추정할 수 있었다.

정제된 효소의 온도에 따른 안정성을 측정한 결과, 65°C까지 60% 정도의 활성이 남아 고온에서도 비교적 안정하였다(Fig. 7). 일반적으로 collagenase는 대개 30~37°C에서 최적 활성을 나타내는 것으로 보고되어 있으며, 해양 미생물인 *Vibrio* sp. B-30의 경우 23°C에서 최적 활성을 가지는 것으로 보고

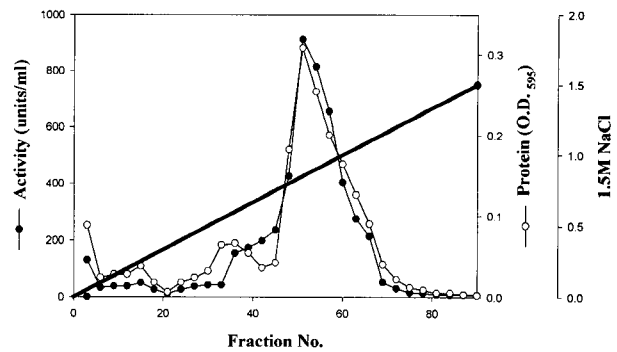


Fig. 2. Isolation of collagenase using Amberlite IRA-900 column chromatography from concentrated growth medium.

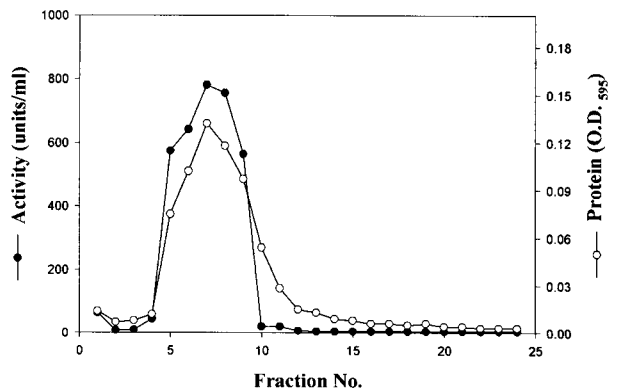


Fig. 3. Sephacryl S-300 HR column chromatography of the *Bacillus subtilis* JS-17 collagenase.

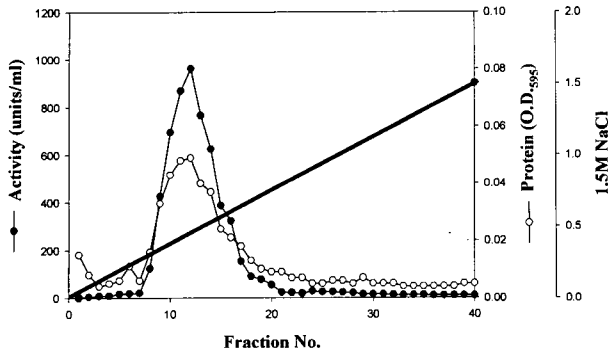


Fig. 4. DEAE-Sephadex A-50 column chromatography of the *Bacillus subtilis* JS-17 collagenase.

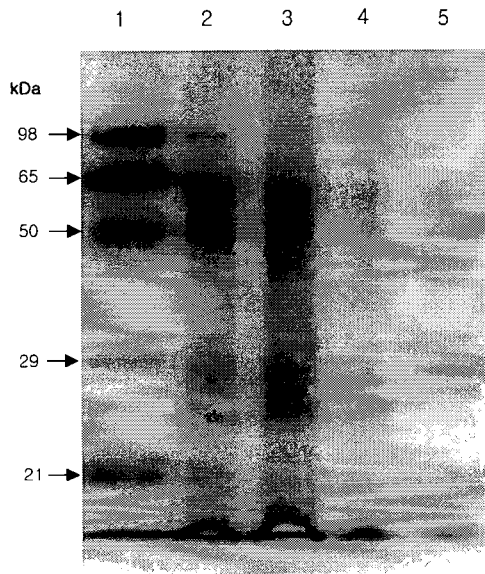


Fig. 5. SDS-PAGE of the purified collagenase from *Bacillus subtilis* JS-17.

Lane 1, Standard (Phosphorylase B; 98 kDa, Bovine serum albumin; 65 kDa, Ovalbumin; 50 kDa, Carbonic anhydrase; 29 kDa, Trypsin inhibitor; 21 kDa); Lane 2, Amberlite IRA-900; Lane 3, Sephacryl S-300 HR (after ultrafiltration); Lane 4, Sephacryl S-300 HR (before ultrafiltration); Lane 5, DEAE-Sephadex A-30.

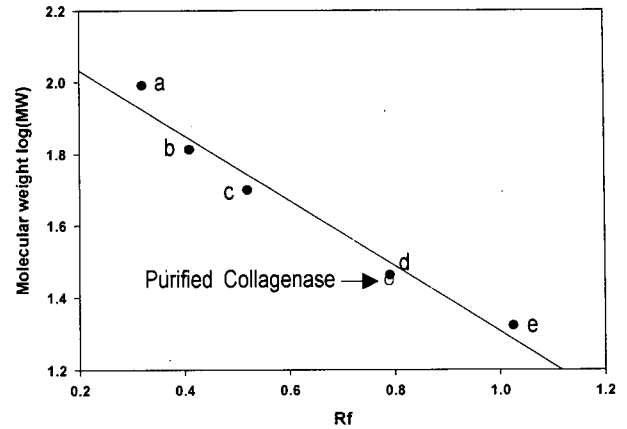


Fig. 6. Determination of the molecular weight of the purified collagenase by SDS-PAGE.

a, Phosphorylase B (M.W. 98 kDa); b, Bovine serum albumin (M.W. 65 kDa); c, Ovalbumin (M.W. 50 kDa); d, Carbonic anhydrase (M.W. 29 kDa); e, Trypsin inhibitor (M.W. 21 kDa).

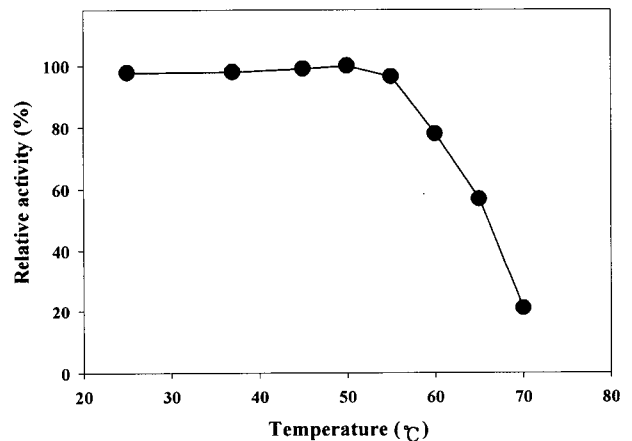


Fig. 7. Effect of temperature on the collagenase stability.

되고 있다. pH에 대한 측정 결과는 pH 6.0~9.8까지 안정함을 보였고(Fig. 8), pH 7에서 최대 활성을 나타내었다(Fig. 9). 금속 이온에 대한 효소의 특성을 검토한 결과, 금속 이온 농

Table 2. Purification of collagenase from *Bacillus subtilis* JS-17

Step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Fold
Supernatant	324,000	33,750	9.6	100.0	1.0
Ultrafiltration	53,550	4,335	12.4	16.5	1.3
Amberlite IRA-900 column chromatography	22,200	135	164.4	6.9	17.1
Sephacryl S-300 HR column chromatography	9,950	52.5	189.5	3.1	19.7
DEAE- Sephadex A-50 column chromatography	3,688	19.2	192.1	1.1	20.0

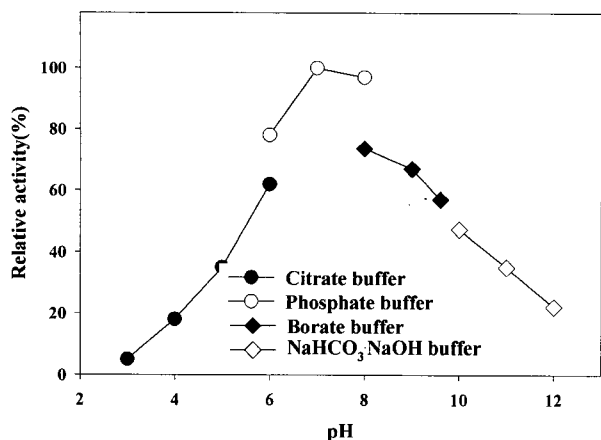


Fig. 8. Effect of pH on the collagenase stability.

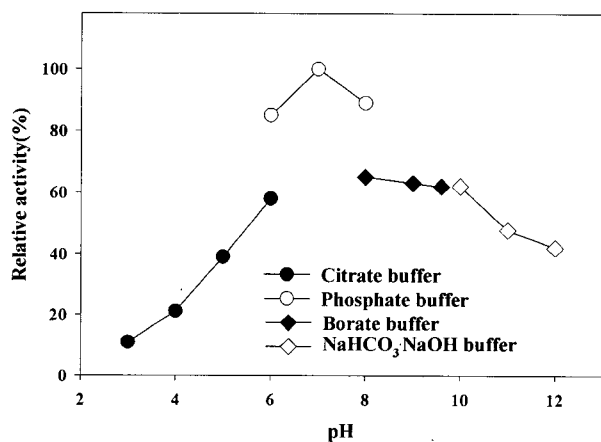


Fig. 9. Effect of pH on the collagenase activity.

도 1 mM을 가한 경우에는 대부분의 금속 이온이 존재할 때 활성이 증가하여 전형적인 metalloproteinase의 성질을 지녔

다. Na<sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> 존재 하에서는 약 40% 정도의 활성 증가를 보였고, 특히 Sn<sup>2+</sup> 존재 하에서는 60%까지의 활성 증가를 보였다. 하지만, 5 mM의 높은 농도에서는 효소의 활성이 감소되었고, Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>에 대해서는 농도를 높였을 때 30% 정도 저해 효과를 보였다(Table 3). 효소의 저해제에 대한 특성 검토는 metalloprotease inhibitor인 EDTA와 O-phenanthroline에 의해 활성이 저해되는 metalloproteinase의 특성을 나타냈으며, ammonium persulfate, N-ethylmaleimide, L-cysteine, NaF, PMSF에서도 저해되었다(Table 4). 또한, 정제된 효소의 기질 특이성을 실험한 결과 정제된 collagenase는 insoluble collagen (Type I)에 대해 기질 특이성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다(Table 5).

Table 3. Effect of the metal ions on the activity of collagenase from *Bacillus subtilis* JS-17

Metal ions	Relative activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100.0	100.00
MgCl <sub>2</sub>	122.0	82.50
MnCl <sub>2</sub>	126.0	63.75
ZnCl <sub>2</sub>	136.6	90.00
NaCl	144.0	80.00
FeSO <sub>4</sub>	148.0	100.00
SrCl <sub>2</sub>	140.6	75.00
LiCl	137.3	117.10
CaCl <sub>2</sub>	130.6	70.80
KCl	117.3	89.20
CoCl <sub>2</sub>	131.3	65.80
SnCl <sub>2</sub>	168.6	96.25
NiCl <sub>2</sub>	144.0	70.40
CuSO <sub>4</sub>	124.6	93.75
HgCl <sub>2</sub>	145.3	65.42
BaCl <sub>2</sub>	121.3	91.70

Table 4. Effect of some reagents on the activity of collagenase from *Bacillus subtilis* JS-17

Reagents	Class	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None			100.00
Ammonium persulfate		10	23.54
L-cysteine		10	16.14
N-ethylmaleimide		10	16.37
β-mercaptoethanol		10	135.87
SDS		10	39.68
NaN <sub>3</sub>		10	13.68
Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub>		10	177.58
NaF		10	10.76
Sodium thioglycolate		10	81.23
KMnO <sub>4</sub>		10	44.40
O-phenanthroline	metalloprotease inhibitor	10	58.30
PMSF	serine protease inhibitor	1	42.60
EDTA	metalloprotease inhibitor	10	21.75
Pepstain A	aspartate protease inhibitor	1	91.03
Leupeptin	serine/cysteine protease inhibitor	1	92.00

Table 5. Substrate specificity of collagenase from *Bacillus subtilis* JS-17

Substrate	Relative activity (%)
Collagen (type I)	100
Elastine	0
Gelatin	15.2
Casein	0
FALPGA (합성 기질)	0

## 요 약

Collagenase는 천연 collagen의 triple-stranded helix를 분해할 수 있는 protease로서 조직의 수복(修復)과 재생 과정에서 collagen의 재형성과 세포의 이동에 아주 중요한 역할을 하고, 숙주 감염시에는 collagen 기질을 빠르게 분해함으로써 감염을 돕는다. 본 연구에서는 일반가정에서 식용하는 김치로부터 collagenase를 생산하는 균주를 분리하여 *Bacillus subtilis*로 동정하였으며 이를 *Bacillus subtilis* JS-17이라 명명하였다. *Bacillus subtilis* JS-17이 생산하는 collagenase의 최적 생산 조건은 1.5% fructose, 1% yeast extract, 0.5% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.01% MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.1% citrate, 0.1% CaCl<sub>2</sub> (pH 7.0)의 배지에서 30°C, 200 rpm으로 72시간 동안 배양하는 것이다. 최적 조건에서 *Bacillus subtilis* JS-17이 생산하는 collagenase를 Amberlite IRA-900 column chromatography, Sephacryl S-300 HR column chromatography, DEAE-Sephadex A-30 column chromatography를 거쳐 분리·정제하고, 얻어진 정제 효소의 특성에 대하여 검토하였다. 정제된 collagenase의 비활성은 growth medium에서 192.1 units/mg였고, 1.1%의 수율로 얻어졌으며 분자량은 28 kDa이었다. 정제된 collagenase는 55°C까지는 100%의 활성을 유지하였고 65°C에서도 60% 정도의 활성을 유지하였다. 또한 pH 6.0~9.8에서 60% 이상의 활성을 유지하였다. 정제된 collagenase는 metalloprotease inhibitor인 EDTA와 O-phenanthroline에 의해 효소 활성이 감소하였을뿐만 아니라 Ammonium persulfate, L-cysteine, N-ethylmaleimide, SDS, NaN<sub>3</sub>, NaF, KMnO<sub>4</sub>, PMSF에 대해서도 활성이 감소하였다. 정제된 collagenase를 여러가지 기질에 대해 효소 활성을 비교한 결과 collagen (type I)에 대해 기질 특이성을 가지고 있었다.

## 참 고 문 헌

- Asdornnithee, S., K. Akiyama, T. Sasaki, and R. Takata. 1994. Isolation and characterization of a collagenolytic enzyme from *Bacillus licheniformis* N22. *J. Ferment. Bioeng.* **78**, 283-287.
- Bond, M. D. and H. E. Van Wart. 1984. Characterization of the individual collagenase from *Clostridium histolyticum*.

- Biochemistry.* **23**, 3085-3091.
- Bond, M. D. and H. E. Van Wart. 1984. Purification and separation of individual collagenase of *Clostridium histolyticum* using red dye ligand chromatography. *Biochemistry* **23**, 3077-3085.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Denis, L. J. and J. Verweij. 1997. Matrix metalloproteinase inhibitors : Present achievements and future prospects. *Investigational New Drugs* **15**, 175-185.
- Doi, E., D. Shibata and T. Matoba. 1981. Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Anal. Biochem.* **118**, 173-184.
- Gendron, R., D. Grenier, T. Sorsa and D. Mayrand. 1999. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**, 437-439.
- Hisano, T., S. Abe, M. Wakashiro, A. Kimura, and K. Murata. 1989. Isolation and Properties of a Collagenase with Caseinolytic Activity from a *Pseudomonas* sp. *J. Ferment. Bioeng.* **68**, 399-403.
- Hu, Y., E. Webb, J. Singh, B. A. Morgan, J. A. Gainor, T. D. Gordon, and T. J. Sahaan. Rapid determination of substrate specificity of *Clostridium histolyticum*  $\beta$ -collagenase using an immobilized peptide library.
- Kim, K. W. and J. T. Kim. 2001. Structure and function of the matrix metalloproteinase. *Bric Webzine.* Feb, 1-4.
- Kothary, M. H. and Creeger, A. S. 1987. Purification and characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 1783-1791.
- Laemmli, J. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lecroisey, A. and B. Keil. 1979. Differences in the degradation of native collagen by two microbial collagenase. *Biochem. J.* **179**, 53-58.
- Manicourt, D. H. and V. Lefebvre. 1993. An assay for matrix metalloproteinases and proteases acting on proteoglycans, casein or gelatin. *Anal. Biochem.* **215**, 171-179.
- Nagai, Y., S. Sakakibara, H. Noda, and S. Akabori. 1960. Hydrolysis of synthetic peptides by collagenase. *Biochim. Biophys. Acta.* **37**, 567-569.
- Nagano, 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.
- 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.
- Netzel-Arnett, S., S. K. Mallya, H. Nagase, H. B. Hansen and H. E. Van Wart. 1991. Continuously recording fluorescent assays optimized for five human matrix metalloproteinases. *Anal. Biochem.* **195**, 86-92.
- Rosen, H. 1957. A modified ninhydrin colorimetric analysis

- for amino acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **67**, 10-15.
20. Sasagawa, Y., Y. Kamio, Y. Matsubara, Y. matsubara, K. Suzuki, H. Kojima, and K. Izaki. 1993. Purification and properties of collagenase from *Cytophaga* sp. L43-1 strain. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 1894-1898.
  21. Sugawara, R., and E. Harper. 1984. Purification and characterization of three forms of collagenase from *Clostridium histolyticum*. *Biochemistry* **23**, 5175-5181.
  22. Van Wart, H. E. and D. R. Steinbrink. 1981. A continuous spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase. *Anal. Biochem.* **113**, 356-365.
  23. V-Lopez, C., C. A. Serra, C. G. Pardo and F. R. Caabeiro. 1999. Proteolytic activity of the *Gymnorhynchus gigas* plerocercoid: purification and properties of a collagenase from the crude extract. *Parasitol. Res.* **85**, 64-70.
  24. Yoshida, E., and H. Noda. 1965. Isolation and characterization of collagenase I and II from *Clostridium histolyticum*. *Biochem. Biophys. Acta.* **105**, 562-574.