



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권으로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공 학 박 사 학 위 논 문

해양미생물로 부터 subtilisin-like
proteinase inhibitor를 생산하는
균주동정 및 정제특성



2007년 2월

부경대학교 대학원

생 물 공 학 과

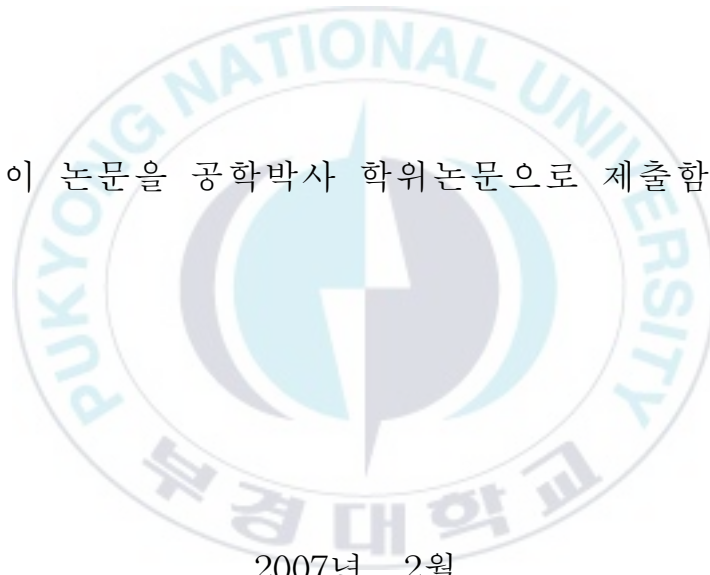
강 성 일

공 학 박 사 학 위 논 문

해양미생물로 부터 subtilisin-like proteinase inhibitor를
생산하는 균주동정 및 정제특성

지도교수 공 재 열

이 논문을 공학박사 학위논문으로 제출함



2007년 2월

부경대학교 대학원

생 물 공 학 과

강 성 일

강성일의 공학박사 학위논문을 인준함.

2007년 2월 일



주	심	이학박사	류 병 호	인
위	원	공학박사	최 영 준	인
위	원	약학박사	김 종 덕	인
위	원	이학박사	박 남 규	인
위	원	농학박사	공 재 열	인

목 차

<i>Figure and Table Index</i> -----	iv
<i>Abstract</i> -----	viii
제 1 장 서 론 -----	1
1. Protease inhibitor -----	1
1-1. Protease에 대한 inhibitor 연구 -----	1
1-2. Protease의 inhibitor 분류 -----	5
2. Protease inhibitor의 응용 -----	7
제 2 장 재료 및 방법 -----	10
1. 시약 -----	10
2. 균주의 분리동정 및 최적배양조건 측정 -----	10
2-1. 배지조성 및 배양방법 -----	10
2-2. 균주분리 및 보존 -----	11
2-3. 분리균주의 동정 -----	11
2-4. 16S rDNA 염기서열 분석 -----	13
2-5. 종속 계통적 분석 -----	14
2-6. 단백질 정량 -----	14
2-7. 효소 저해활성 측정 -----	14
2-8. 저해제 생산을 위한 최적배양조건 검토 -----	16

3. Subtilisin-like proteinase inhibitor의 분리 · 정제 및 특성	18
3-1. Subtilisin-like proteinase inhibitor의 분리 · 정제 -----	18
3-2. Subtilisin-like proteinase inhibitor의 이화학적 특성조사 ---	19
1) 분자량 측정 -----	19
2) 등전점 측정 -----	19
3) 아미노산 조성분석 -----	21
4) N-terminal sequence 분석 -----	21
5) 저해제의 온도 안정성 -----	23
6) 저해제의 pH 안정성 -----	24
7) 금속이온의 영향 -----	24
8) 여러 가지 단백질 분해효소에 대한 저해효과 -----	24
9) Subtilisin에 대한 inhibitor의 kinetics -----	24
10) 식품급 저해제와 저해율 비교 -----	25
제 3 장 결과 및 고찰 -----	26
1. 균주의 분리 및 동정 -----	26
2. 저해제 생산을 위한 최적배양조건 검토 -----	27
2-1. 배양온도의 영향 -----	27
2-2. 초기 pH의 영향 -----	41
2-3. 탄소원의 영향 -----	41
2-4. 질소원의 영향 -----	44
2-5. NaCl 농도의 영향 -----	47

2-6. Metal salts의 첨가 효과 -----	47
2-7. 최적배양조건에서 저해제의 생산 -----	51
3. Subtilisin-like proteinase inhibitor의 분리 · 정제 및 특성	54
3-1. Subtilisin-like proteinase inhibitor의 분리 · 정제 -----	54
3-2. 분자량 측정 -----	61
4. Subtilisin-like proteinase inhibitor의 이화학적 특성 -----	61
4-1. 저해제의 온도 및 pH 안정성 -----	61
4-2. 저해제의 등전점 -----	65
4-3. 금속이온의 영향 -----	65
4-4. 여러 가지 단백질 분해효소에 대한 저해효과 -----	68
4-5. Subtilisin에 대한 inhibitor의 kinetics -----	68
4-6. 아미노산 조성분석 -----	68
4-7. N-terminal sequence 분석 -----	71
4-8. 식품급 저해제와 저해율 비교 -----	75
제 4 장 결 론 -----	77
감사의 글 -----	80
참고문헌 -----	82

Figure and Table index

List of figures

- Fig. 1. Schematic representation for the purification of subtilisin-like proteinase inhibitor.
- Fig. 2. Plate assay system of enzyme inhibitor substance produced by the marine actinomycetes.
- Fig. 3. Plate assay for serine protease inhibitor produced by the *Streptomyces thermocarboxydus* C12.
- Fig. 4. Light micrograph(A) and scanning electron morphology(B) of *Streptomyces thermocarboxydus* C12.
- Fig. 5. A comparison of 16S rDNA full sequence of an isolated various strain with *Streptomyces thermocarboxydus* C12.
- Fig. 6. Neighbour-joining tree based on 16S rDNA sequences of 42 *Streptomyces* strains.
- Fig. 7. Effect of temperature on the production of subtilisin-like proteinase inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.
- Fig. 8. Effect of initial pH on the production of subtilisin-like proteinase inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.
- Fig. 9. Effect of galactose concentration on the production of subtilisin-like proteinase inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.
- Fig. 10. Effect of proteose peptone concentration on the production of subtilisin-like proteinase inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

- Fig. 11. Effect of NaCl concentration on the production of subtilisin-like proteinase inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.
- Fig. 12. Time course of subtilisin-like proteinase inhibitor production by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.
- Fig. 13. Diagram of plate assay for subtilisin-like proteinase inhibitor utilized in the dialysis membrane.
- Fig. 14. Elution profiles of subtilisin-like proteinase inhibitor from a DEAE Sepharose CL-6B column.
- Fig. 15. Elution profiles of subtilisin-like proteinase inhibitor from a Superdex 200 column.
- Fig. 16. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of purified subtilisin-like proteinase inhibitor.
- Fig. 17. Native polyacrylamide gel electrophoresis of purified subtilisin-like proteinase inhibitor from the *Streptomyces thermocarboxydus* C12.
- Fig. 18. Effect of temperature stability on the subtilisin-like proteinase inhibitor.
- Fig. 19. Effect of pH stability on the subtilisin-like proteinase inhibitor.
- Fig. 20. Analytical thin-layer isoelectric focusing of the subtilisin-like proteinase inhibitor.
- Fig. 21. Lineweaver-Burk plot of the subtilisin-like proteinase inhibitor.
- Fig. 22. Ettan MALDI-TOF of subtilisin-like proteinase inhibitor purified from *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

List of tables

- Table 1. Families of protein inhibitors of serine proteinases.
- Table 2. Composition of actinomyces selective medium.
- Table 3. Assay system for subtilisin-like proteinase inhibitor activity
- Table 4. Cultural characteristics of strain C12.
- Table 5. Morphological characteristics of strain C12.
- Table 6. Physiological characteristics of strain C12.
- Table 7. Utilization of carbon compounds by strain C12.
- Table 8. Effect of various carbon sources on the production of subtilisin-like proteinase inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.
- Table 9. Effect of organic nitrogen sources on the production of subtilisin-like proteinase inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.
- Table 10. Effect of inorganic nitrogen sources on the production of subtilisin-like proteinase inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.
- Table 11. Effect of metal salts on the production of subtilisin-like proteinase inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.
- Table 12. Ammonium sulfate precipitation of the subtilisin-like proteinase inhibitor from the culture supernatant of *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

- Table 13. Summary of the purification steps for the subtilisin-like proteinase inhibitor from the culture supernatant of *Streptomyces thermocarboxydus* C12.
- Table 14. Effect of metal ions on the subtilisin-like proteinase inhibitor.
- Table 15. Activity of the purified inhibitor against a various proteases.
- Table 16. Amino acid composition of the subtilisin-like proteinase inhibitor from *Streptomyces thermocarboxydus* C12.
- Table 17. N-terminal sequence of the subtilisin-like proteiase inhibitor and comparision with that of other subtilisin inhibitor.
- Table 18. Comparision of food inhibitor and subtilisin-like proteinase inhibitor produced at the *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

Identification and Purification Properties of Subtilisin-like Proteinase Inhibitor
Isolated from the Marine Bacterium

Sung-Il Kang

Department of Biotechnology and Bioengineering, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

A marine bacteria which produced the subtilisin-like proteinase inhibitor was screened from the sediment in the southern sea of Korea. The culturaleal, morphological and physiological characteristics of an isolated strain were investigated for identification. Cultural characteristics based on ISP(International *Streptomyces* Project) were as follows: white and gray aerial mycelium and good growth on various medium. Also, the strain did not produce the soluble pigment. Also, this strain could be grown up to 9% salt concentration. Morphological and physiological characteristics showed cylindrical spore chain and smooth spore surface by SEM(Scanning Electron Microscope). A phylogenetic analysis of the 16S rDNA provided a clue that the isolated strain was actually a member of the genus *Streptomyces*, because the determined sequence exhibited a higher homology with *Streptomyces thermocarboxydus*.

A subtilisin-like proteinase inhibitor has effectively inhibited the activity of subtilisin and proteinase K by complexing with the enzyme in the ratio of 1 : 1. The inhibitor has no effect on the trypsin and collagenase.

The optimum culture conditions for the production of subtilisin-like proteinase

inhibitor have been determined after cultivation for 3 days at 28°C. Glucose, galactose, starch and fructose were good carbon sources for the production of the inhibitors. On the other hand, maltose, lactose and mannose was only good for the cell growth potentially inhibited the production of inhibitor. Natural organic nitrogen sources such as poly peptone and proteose peptone were good for the production of inhibitor, however beef extract, urea, casamino acid and inorganic nitrogen sources such as $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and NH_4Cl were poor. Optimal culture conditions for inhibitor production were composed of 1.6% galactose, 0.5% proteose peptone, 1% NaCl and 1 mM Li^+ , respectively. The optimal temperature and initial pH for the subtilisin-like proteinase inhibitor activity were 40°C and pH8.0, respectively. The subtilisin-like protease inhibitor from *Streptomyces thermocarboxydus* C12 showed a maximum inhibitor activity after the cultivation for 60 h under the optimized medium.

A subtilisin-like proteinase inhibitor produced by *Streptomyces thermocarboxydus* C12 was purified by ultrafiltration, ammonium sulfate precipitation, DEAE Sepharose CL-6B and Superdex 200 column chromatography.

The final inhibitor was purified 119.9 fold, with a yield of 20.7%. The inhibitor has a monomer with a molecular weight of 33.1 kDa estimated by SDS-PAGE. Also, the inhibitor showed the one band in native-gel PAGE. The isoelectric point was 4.4. The inhibitor activity was stable in the range of pH 6.0~10.0 and temperature 30~60°C, respectively. The purified inhibitor was slowly activated by Mg^{2+} and K^+ . The N-terminal sequence of subtilisin-like proteinase inhibitor was determined as DAPSALYAPSALVLTVGKGV SAT. The sequence (residues from 1 to 23) was 100% identified with the *Streptomyces* subtilisin inhibitor (SSI) produced in the *Streptomyces albogriseolus*. The K_m and V_{max} of the inhibitor were calculated to be 2.67 mg and 15.3 unit, respectively. The inhibitor showed a noncompetitive inhibitor mode for subtilisin. As a result of a amino acid

compositon analysis, the purified inhibitor had a high content of serine and alanine. The degree of inhibition of subtilisin-like proteinase inhibitor was much greater than that of food inhibitor such as bovine plasma, pork plasma and egg white protein.



제 1 장 서 론

1. *Protease inhibitor*

1-1. *Protease*에 대한 *inhibitor* 연구

현대사회가 발달함에 따라 동·식물·미생물에서 생산해 내는 최종산물인 단백질에 관심을 갖게 되었으며, 이 단백질들은 단백질 분해효소에 의해서 활성화되거나 혹은 파괴되어 세포로 하여금 적절한 기능을 수행할 수 있도록 한다고 알려져 왔다(Mala et al., 1998). 단백질 분해효소는 동물, 식물 및 미생물계에 광범위하게 분포되어 있다. 약 40년 전만 해도 주로 식물의 papain, bromelain, 동물의 장기 효소인 pepsin, trypsin, renin 등이 응용의 대상이었다. 특히 세포질 외로 분비하는 미생물 단백질 분해효소는 다양한 미생물에 의해서 생성된다.

세포 내 및 세포 외 모두에서 일어나며 생체 내에서 소화효소의 작용 뿐만 아니라 혈전, 세포융합, 세포증식, 혈액응고, 혈압조절, 방어 등의 기능 뿐만 아니라 세포의 성장, 분화 및 사멸, 세포내외의 단백질 turnover, 세포이동, 침윤, 수정 등 모든 생체기능에 직·간접적으로 관여한다. 생리적으로 단백질 분해효소는 여러 신호에 의해 발현되고 또한 생체내의 저해 단백질에 의해 그 활성의 균형을 조절하고 있다. 그러나 이상 환경에 의해 비정상적으로 발현된 단백질 분해효소는 염증, virus 감염, 호르몬의 성숙, 부종, 발암, 암세포의 전이 등의 다양한 질병 병발과정에 관여하며, 발생으로부터 노화에 이르는 생명현상과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다. 이러한 단백질 분해효소에 대해 억제 또는 방어역할을 하는 것이 단백질 분해효소 저해제이다.

단백질 분해효소에 대한 저해제 연구에 대하여 의약품 개발과 사용의 역사는 천연물에서 비롯되었다. 지난 수 십년 간 유기화학의 발달에 따라 다수의

합성 의약품들이 출현하였으나, 현재 약 50% 정도의 의약품들이 식물, 미생물 등 천연 생물자원 유래의 천연물 또는 천연물 유도체이다. 천연물 유래의 생리활성 연구는 전통적으로 동·식물, 토양 미생물 등 육상생물을 주된 대상으로 하여 왔다. 그러나 근래에 이르러서는 지금까지 천연물의 보고였던 육상생물 및 토양 미생물로부터 새로운 의약활성 물질의 개발이 점차로 정체되는 경향을 나타냄에 따라 의약품의 새로운 탐색원으로서 육상 생태계가 아닌 해양이나 극한 생태계 같은 새로운 환경에 눈을 돌려 연구를 시작하고 있다. 해양은 특이한 생태계를 이루는 환경 때문에 해양생물이 만드는 대사산물은 육상생물에 비하여 특이한 골격의 화학구조를 가지게 되며, 항생물질 이외에 다양한 생리활성 작용을 갖는 효소 저해제를 생산하는 것으로 밝혀졌다. 생물체의 구성성분을 합성하고 생리적 기능을 나타내는 물질의 활성화 및 그 조절은 각각 효소와 효소 저해물질이 상당부분 담당하고 있다. 그러나 조절되지 않은 효소의 과잉작용은 각종 질병의 원인이 되거나 기존의 질환을 악화시키기도 한다.

단백질 분해효소에 의해 일어나는 질병의 치료 목적으로 자연계로부터 단백질 분해효소 저해제를 개발하고자 하는 노력이 진행되었다. 천연에 존재하고 있는 단백질 분해효소에 대한 저해물질의 연구는 미생물의 배양액 중으로부터 저분자의 저해물질을 발견할 때까지는 주로 동·식물 기원의 것에 대하여 행하여 왔다(Umezawa et al., 1972).

동물유래의 단백질 분해효소 저해물질은 소의 췌장으로부터 trypsin 저해물질을 결정상으로 단리하였다(Kunitz and Northrop, 1936). 이 저해물질은 Kunitz inhibitor 혹은 염기성 췌장 trypsin inhibitor로 불리며 많은 천연물질 중에서 최초로 일차구조가 결정된 것이다. 이 저해물질은 급성췌장염 치료 효과를 나타내고 임상적 의미를 가지는 것으로 잘 연구되어 있으며, 이와

유사한 물질은 염소와 돼지의 조직에서도 발견되었다. 췌액에는 또 다른 형태의 저해물질(pancreatic secretory trypsin inhibitor)이 함유되어 있는데 소, 돼지, 개, 쥐와 사람의 췌장추출액에서 얻어졌다(Pubols et al., 1974). 혈액내에 함유된 저해물질에 관해서도 많이 연구되어 있으며(Glaser and Karic, 1978), 그 외 사독(Takahashi et al., 1974), 달팽이(Tschesche et al., 1972), 선충류, 각종 난류(Laskowski, 1955)와 여러 가지 포유동물의 초유(Cechova, 1976)등에서 발견되었다.

식물유래의 단백질 분해효소 저해물질은 대두 유래의 것이 Read와 Haas(1938)에 의해서 발견된 이래로 Ham 및 Bowman 등(1944)은 각각 독립적으로 대두 중에 trypsin을 저해물질이 존재하는 것을 발견하였다. 이로 인해 두과식물을 대상으로 많은 연구자가 저해물질의 분리, 정제를 보고하고 있다. 특히 Vogel 등(1968)이 연구한 바에 의하면 대두식물은 거의 대부분 단백질 분해효소에 대한 저해물질을 함유하고 있다고 한다. 식물성의 저해물질은 그 외에도 감자, 옥수수, 그리고 대맥, 호맥 등의 맥류와 더불어 많은 식물에 존재하고 있음이 잘 알려져 있다. 그 후 많은 연구자에 의해 다수의 저해물질의 분리·정제가 보고되어 있지만, 상기 저해물질은 Bowman-Birk inhibitor로서 잘 연구되어 있다. 동·식물로부터 발견된 많은 저해물질들은 모두 단백질로 산 및 열에 안정한 비교적 저분자물질 (분자량 6,000~12,000)과 불안정한 고분자물질 (분자량 20,000~60,000)로 대별된다.

미생물유래의 단백질 분해효소 저해물질에 관한 연구는 Höyen와 Skulberg가(1962) *Clostridium botulinum* (type A, B and E)에서 trypsin에 대한 저해물질을 발견한 활발히 전개되었다.

곰팡이류의 단백질 분해효소 저해물질 생성 균주는 주로 *Penicillium*

*cyclopium*에 대해서 많이 연구되었는데 이 균주는 산성 proteinase에 대한 저해물질로서 malic acid가 중합한 고분자의 poly-L-malic acid를 생성한다는 것이 밝혀졌다(Shimada and Matsushima, 1969). *Neurospora sitophila*와 *Aspergillus japonicus*의 단백질 분해효소 저해물질은 저분자의 thiol proteinase inhibitor였다(Hanada et al., 1978). 미생물성 단백질 분해효소 저해물질 중에서 가장 활발히 연구되고 있는 actinomyces류가 생성하는 저해물질은 Aoyagi 등(1969)이 trypsin, plasmin 등을 저해하는 새로운 형태의 저해물질인 leupeptin을 발표하였고, Umezawa 등(1972)이 *Streptomyces mauvecolor*로 부터 trypsin, papain, cathepsin A, B 등의 단백질 분해효소 저해물질 antipain을 발표하였다. 그리고 chymotrypsin의 저해물질인 chymostatin이 Umezawa 등에 의해서 분리 연구되었다. Kunimoto 등(1972)은 pepsin과 renin을 저해하는 pepstatin을, Murao 등(1972)은 *Streptomyces* 속에서 단백질성 protease inhibitor인 *Streptomyces subtilisin inhibitor*(SSI)를 분리하였다. 또한 Faucher 등(1987)은 암의 침윤과 전이에 중요한 역할을 하는 matrix metalloprotease (MMP)의 저해제 중 actinonin은 초기에 actinomyces 으로부터 항생물질로 분리되었으나, 이후 collagenase 저해제로서 다시 탐색된 물질이다. 이와 같은 미생물 대표산물에서 발견된 단백질 분해효소 저해물질은 동·식물에서 얻은 저해물질과는 크게 다르며 이들 효소 저해물질은 효소의 반응 mechanism 해명에 유용할 뿐만 아니라 생리기능 및 의학적으로 중요한 여러 가지의 질병과 같은 현상의 해석에 유효한 물질이다.

1-2. *Protease*의 *inhibitor* 분류

1) Acid protease inhibitor

*Streptomyces testaceus*와 *Streptomyces argenteolusvar*, *Streptomyces toyonakensis*가 생산하는 pepstatin은 pepsin, cathepsin D 및 renin을 특이적으로 저해한다(Kunimoto et al., 1972). Pepstatin 생산균이 생산하는 활성물질을 상세히 검토한 결과 pepstatin의 구조 중의 alanine이 serine으로 치환된 hydroxy-pepstatin, C말단 (3S, 4S)-4-amino-3-hydroxy-6-methyl heptanic acid(AHMHHA 혹은 statin)이 생합성 최종단계에서 환원받기 전에 탈산된 pepstanone 및 다른 acyl기를 가진 상기 저해물질을 발견할 수 있었다. Pepstatin, hydroxy-pepstatin, pepstanone은 여러 가지 acyl기를 가진 각각의 물질을 총칭한다. Pepstatin은 포유동물 뿐만 아니라 미생물 기원에서 분리한 산성 단백질 분해효소를 저해한다. Pepstatin의 aspartic protease에 대한 선택적 저해작용을 이용하여 pepstatin Sepharose affinity gel을 만들어 대량으로 산성 단백질 분해효소를 분리하는데 사용하였다(Takahashi and Tang, 1981). Pepstatin은 위에서 sialic acid양을 감소시켜 stomach ulcer를 방지하는 효과가 있었다. *Streptomyces*에 의해 생산된 다른 pepsin inhibitor로서는 procidins, SP-1과 pepsinostreptin이 알려져 있다(Murao and Sato, 1970).

2) Metallo protease inhibitor

*Streptomyces tanashiensis*에 의해 생산되는 phosphopeptide인 phosphor-amidon은 thermolysin을 강력하게 저해한다(Suda et al., 1973). Phosphor-amidon의 인산부위가 thermolysin의 활성부위에 존재하는 Zn와 결합하여 저해한다. *Streptomyces nigrescens*의 S-MPI, *Streptomyces mozensis*의 talopeptin과 *Streptomyces rishiriensis*의 FMPI는 다른 thermolysin 저해제

이다. *Actinomadura altrammentaria*에서 생산되는 matlystatin은 collagenase type IV를 저해하며, actinomyces sp.에서 생산하는 matlystain A는 MMP-2, 9에 저해활성이 강하다. 그리고 matrigel을 이용한 *in vitro* 침윤실험에서 HT 1080 섬유육종 세포주의 침윤을 저해하는 것으로 보고하였다(Tanzawa et al., 1992).

3) Serine 과 thiol protease inhibitors

Leupeptin, antipain과 chymostatin은 serine과 thiol protease의 강력한 peptide성 저해물질이다. Leupeptin(acetyl 혹은 propionyl-L-leucyl-L-leucyl-L-argininal)은 *Streptomyces*의 17종(즉, *roseus*, *rosechromogenes*, *chartreusis*, *albireticuli*, *thioluteus*, *labendulae*, *roboritoenis* 등)이 생산하였고 trypsin, plasmin, papain과 cathepsin B를 저해한다. 아르기닌구조와 알데하이드기는 중요한 구조적인 인자로서 알데하이드의 carbinol로의 환원이나 carboxyl로의 산화에 의해 저해활성이 상실되었다(Umezawa, 1972). Leupeptin은 뛰어난 약리효과를 가지고 있어 소염, 화상, 진통 및 수포 방지 효과가 있는데 이는 kinin 형성을 저해하기 때문이고, 이 외에도 trypsin 저해에 의한 궤창염 치료에 leupeptin의 이용성이 기대된다. 혈액응고는 leupeptin에 의해 저해되는데 이는 thrombokinase와의 반응 때문이다. 또한 leupeptin은 암발생 억제와 암전이 억제효과가 있는 것으로 보고되어 있다(Aoyagi et al., 1977). Antipain(phenyl alaninal-arginine-valine-argininal)은 구조적으로 leupeptin과 관련이 있고 *Streptomyces michiganesis*, *Streptomyces mauvecolor*와 *vokosukanesis*에 의해 생산된다. Antipain은 trypsin, cathepsin A와 cathepsin B를 저해하며 leupeptin에 비해 papain과 trypsin에 보다 특이적이다.

Antipain은 leupeptin과 유사한 약리학적 활성을 가지나 그 활성은 leupeptin

보다 낮다.

Chymotrypsin 저해제인 chymostatin은 *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces laremdule*와 다른 일곱 균주에 의해 생산된다. L-Phenylalanine은 chymostatin 구조와 한 특성으로 알데하이드기를 환원시키면 실활의 원인이 된다(Umezawa and Aoyagi, 1973). *S. nigrescens*의 배양여액으로부터 분리된 알칼리성 단백질 분해효소 저해제 MAPI은 여러 가지 미생물 기원의 α -chymotrypsin과 papain을 저해하나 trypsin, thermolysin, kallikrein, pepsin은 저해하지 않는다(Murao and Watanabe, 1978). 이 처럼, Laskowski와 Kato(1980)에 의해 처음 serine proteinase inhibitor의 family가 발표된 이후 많은 수의 inhibitor들이 새로이 발견되었다. Table 1는 현재까지 알려진 serine proteinase inhibitor family를 요약한 것이다.

2. *Protease inhibitor*의 응용

더욱이 이들 단백질 분해효소 저해물질은 약리학, 식품, 농업에 활용 가능할 뿐만 아니라 단백질 구조의 연구와 반응기작에 대해서 연구할 수 있다(Bode and Huber, 1992; Terashita et al., 1980). 특히, 특이적이고 선택적 단백질 분해효소 저해제는 소염작용, 항종양작용, 변이유발저지, 복수저류저지, 발암 및 암 전이 저지, 폐기종, 관절염, 췌장염, 혈전증, 고혈압, AIDS와 같은 인체 질병발병과정에 관여하는 단백질 분해효소들을 불활성화 시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다(Demuth, 1990). 이들 단백질 분해효소 저해물질은 세포, 조직, 체액 중에서 단백질 분해효소의 식별, affinity chromatography의 활성기, 물질 정제시에 일어나는 효소적 분해방지용으로도 이용될 수 있으며, 혹은 복잡한 생체반응에 있어서 단백질 분해효소의 역할을 이해하기 위한 시약으로써 널리 이용될 수 있다. 또한, 식품공정상에서 불필요한 protease의 활성을 억제시키며, 식품원료에 자유 amino acid의 작용을 감소시킬 수 있다

(García-Carreño, 1996).

따라서, 본 연구에서는 이러한 중요성을 갖는 단백질 분해효소 저해제를 탐색하기 위해 해양자원 중 미생물에서 subtilisin-like proteinase inhibitor에 대한 저해활성물질을 생산하는 균주를 탐색하고 탐색한 균주로부터 저해활성물질을 분리·동정하여 기존에 해양미생물과 비교 검토하였다. 또한, 저해제의 생산성을 높이고자 최적생산조건을 조사하였으며 이것을 분리·정제하여 그 특성을 조사하였다. 특성을 통해 특이적인 저해제인지 확인하여 산업적으로 사용 가능한지를 검토하였다.



Table 1. Families of protein inhibitors of serine proteases.

Animals	Approximate domain size & number of domains
Bovine pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz) family	60 residues
Pancreatic secretory trypsin inhibitor (Kazal) family	55 residues; up to 7 domains
Ascaris trypsin inhibitor family	60 residues
Serpin family (mechanistically distinct)	400 residues
Hirudin family	65 residues
Plants	
Soybean trypsin inhibitor (Kunitz) family	180 residues
Soybean proteinase inhibitor (Bowman-Birk) family	35 residues; 2 domains
Potato 1 family	70 residues
Potato 2 family	50 residues; 1 or 2 domains
Barley trypsin inhibitor family	120 residues
Squash inhibitor family	30 residues
Microbial	
<i>Streptomyces</i> subtilisin inhibitor (SSI) family	110 residues

제 2 장. 재료 및 방법

1. 시약

효소들은 subtilisin (Fluka, Switzerland), trypsin, α -chymotrypsin, amino peptidase, collagenase (Sigma, USA)와 proteinase K (Promega, USA)를 사용하였고, 기질은 gelatine (Yakuri, JAPAN)을 사용하였다. 효소반응에 사용된 발색시약은 ninhydrin (Lancaster, England)을 사용하였다. 분리된 해양세균 동정에는 API kit를 사용하였고, 투석막은(Spectra/por, MWCO: 12,000~14,000, Texas, USA)를 사용하였으며, 그 외 사용된 모든 시약은 특급 혹은 분석용 시약을 사용하였다.

Subtilisin-like proteinase inhibitor의 분리·정제에서 분자량 표준품은 (Sigma, USA)의 low-range protein molecular weight markers(MW 6,500~66,000 Da)을 사용하였다. 농축은 한외여과막 장치인 Millipore Co.의 제품 (Massachusetts, USA)을 사용하였고, 이때의 분리막은 분자량 한계범위 (molecular weight cut-off: MWCO)가 10,000인 것을 사용하였다.

2. 균주의 분리동정 및 최적배양조건 측정

2-1. 배지조성 및 배양방법

균주의 분리 및 배양을 위한 배지조성으로는 Bennet's 배지(Glucose 10.0 g, Peptone 1.0 g, Yeast extract 1.0 g, Beef extract 1.0 g, pH 7.5)에 증류수 1 l당 NaCl 23.0 g, KCl 0.7 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 10.6 g, $CaCl_2$ 1.1 g, $NaSO_4$ 3.9 g, $NaHCO_3$ 0.2 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g, K_2HPO_4 0.01 g, Tris-HCl 6.05 g, pH 7.8의 인공해수를 첨가하여 기본배지로 사용하였다. 평판배지에서 얻어진 각종 분리균주를 액체배지 20 ml를 함유한 전배양에 접종하여 25℃, 3일 동안

진탕배양하였다. 그 후 본배양 액체배지 50 ml에 전배양액 1.0% (v/v)를 접종하여 25℃, shaking incubator 에서 180 rpm으로 4일 동안 진탕배양 하였다.

2-2. 균주분리 및 보존

우리나라의 남해안에서 채집한 해수, 해조류 및 갯벌을 subtilisin-like protease inhibitor를 생산하는 방선균의 분리시료로 사용하였다. 채집한 각종 시료는 멸균된 해수에 희석하여 항생물질 Cyclohexamide와 Rifampicin이 첨가된 방선균 및 해양 미생물 선택배지 (Table 2)에 100 µl를 도달한 다음, 27℃에서 4~6주 동안 정치배양 하였다. 배지표면의 집락으로부터 약 1,000균주를 분리하였다. 분리된 균주는 Bennet's 배지에서 약 2일 동안 27℃에서 배양하였으며, 배양된 균주 중 subtilisin-like proteinase inhibitor물질을 생산하는 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별된

각각의 균주들을 250 ml Erlenmeyer flask를 이용하여 Bennet's 액체배지에 접종한 다음 호기적인 조건으로 27℃, 180 rpm으로 4 일간 교반배양하였다. 배양액은 Whatman No. 1 paper로 거른 다음, 원심분리하여 얻은 상층액과 효소액을 혼합하여 37℃에서 20 min간 전처리한 후 test plate에 10 µl씩을 loading한 paper disk를 올려놓은 후 37℃에서 48 hr 반응시켰다. 반응 후 clear zone을 확인하여 2차 선별하였다. 2차 선별된 균주 중 ninhydrin 발색시약을 이용하여 subtilisin-like proteinase inhibitor 활성이 가장 강한 균주 하나를 선택하여 최종균주로 선택하였다. 최종 분리된 균주는 20% (v/v) glycerol을 첨가하여 -70℃ 냉동고에 보관하며 본 실험에 사용하였다.

2-3. 분리균주의 동정

분리 선별한 균의 1차 동정은 형태학적, 배양학적 및 생화학적 특성을

Manual of methods for general bacteriology(Gerhardt et al., 1981) 및 Biochemical tests for identification of medical bacteria(Macfaddin, 1980)에 준하여 검토하고, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(Kreig and Holt, 1989)에 의하여 제안된 International Streptomyces Project(ISP)에 의한 방법으로 분석하였다. 수행한 분석결과를 BLASTN의 data와 비교하여 동정하였다. 분리균의 형태는 SEM (HITACHI S-2400, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

1) 전자 현미경에 의한 균의 형태 관찰

(1) SEM(Scanning Electron Microphotography)

액체배양액을 주사위로 소량 취해 0.2 μm polycarbonate filter로 통과시킨다. 통과된 배양액은 차가운 2.4% glutaraldehyde에 filter를 담구어 고정시킨 후, 0.1 M phosphate buffer로 여러번 세척한다. 분리균의 형태적 특성조사는 영양 한천 배지에 하루 전 배양해 놓은 배양액을 그리고 ethylalcohol 30, 50, 80, 90%로 각각 15 min, 95%로 1 hr 동안 두 번 탈수시킨다. 이 후 filter를 iso-amyl acetate에 30 min동안 담근 후, 액체 CO_2 로 iso-amyl acetate를 날리고, 금박을 입혀 전자현미경으로 관찰한다.

(2) 운동성 관찰

MMM(Modified Marine Medium)에서 30 hr 배양한 대수 증식기의 균 배양액을 사면배지에 접종한 후 균의 운동성 유무를 확인하였다.

2) 생리·생화학적 특성조사

(1) 그람염색

그람 염색법으로 분리균의 세포벽 특성을 조사하였다. MMM(Modified

Marine Medium) 고체배지에서 균 집락을 선별하여 새로운 Bennet's 배지에 접종하였다. 하루정도 배양한 후 배지표면에 형성된 단일 colony를 멸균증류수에 한 방울로 현탁 후 그람 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 동균에 대한 표준균주로는 그람 음성의 *E. coli*를 이용하였고, safranin에 역염색되어 적색을 띠는 균은 그람 음성으로 그렇지 않으면 그람 양성으로 판단하였다.

(2) Catalase test

호기균의 대사 독성물질인 H_2O_2 는 산화 환원제인 catalase에 의해 H_2O 와 O_2 로 분해된다. 이에 분리균의 catalase test를 행하였다. 대수기의 단일 colony를 slide glass에 묻힌 후 여기에 1 ml의 3.0% 과산화수소(H_2O_2)용액에 소량 가해 기포발생 유무를 확인하였으며, 기포 발생균을 catalase 양성으로, 기포 발생이 없는 균을 catalase 음성으로 확인하였다.

2-4. 16S rDNA 염기서열 분석

16S rDNA 분석은 Wizard Genomic DNA Prep. kit (Promega)을 사용하여 chromosomal DNA를 분리하였으며 2개의 보편적인 primer를 사용하는 PCR를 이용하여 16S rDNA를 증폭시켰다. 합성된 oligonucleotides의 각각의 prime는 forward prime (27F): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', reverse primer (1492R): 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'의 염기서열로 구성되었다. 각각의 0.5 μ M primer, 200 μ M deoxynucleoside triphosphate, 10X PCR buffer 10 μ l, 그리고 EF-*Taq* polymerase (2.5 unit)를 0.3 μ l를 사용하여 PCR를 수행하였다.

PCR 반응조건으로 30 cycles (95°C에서 20 sec, 50°C에서 40 sec, 72°C에서 90 sec)동안 계속적으로 증폭하였으며, 72°C에서 3 min 동안 신장시켰다. PCR 산물을 Wizard SV Gel과 PCR Clean-Up System (Promega)을 사용하

여 추출하였다. Big Dye Terminator Cycle Sequence kit (Applied Biosystems)와 automatic DNA sequence (Applied Biosystems)를 사용하여 PCR product의 염기 서열 분석을 수행하였다.

2-5. 종족 계통적 분석

분리균주의 16S rDNA 염기서열과 함께 *Streptomyces* 속과 몇몇 다른 관련된 분류군의 16S rDNA 유전자 염기서열과 함께 Clustal X software를 사용하여 배열하였다. 계통도는 neighbor-joininging 방법을 사용하여 설계하였다 (Saitou and Nei, 1987).

2-6. 단백질 정량

단백질 농도는 Lowry 법 (Lowry et al., 1951)을 이용하였다. Bovine serum albumin (Sigma chem Co.)를 표준시료로 하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였으며, column chromatography를 사용하였을 때는 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2-7. 효소 저해활성 측정

Subtilisin-like proteinase inhibitor 측정은 ninhydrin 방법 (Moore and Stein, 1948)을 변형시켜 사용하였다. 즉 50 mM Tris-HCl buffer 50 μ l에 10 μ l subtilisin (0.1 mg/ml)과 희석된 배양 상층액 10 μ l용액을 37°C에서 20 min간 전처리한 후 중탕가열한 0.2% (w/v)의 gelatin이 포함된 기질용액 0.5 ml (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5)과 37°C에서 30 min간 반응시켰다. 효소 반응을 정지시키기 위해 10.0% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) 0.1 ml를 첨가한 후, ninhydrin 용액 0.5 ml을 혼합하여 100°C, 10 min간 끓이고, ice-water에서 냉각시킨다.

Table 2. Composition of actinomyces selective medium.

Medium	Composition (artificial sea water per liter)
Starch-casein nitrate medium	Starch 10.0 g, casein 0.3 g, NaCl 2.0 g, K ₂ HPO ₄ 2.0 g, KNO ₃ 2.0 g, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.05 g, CaCO ₃ 0.02 g, FeSO ₄ · 7H ₂ O 0.01 g, Cyclohexamide 50 mg, Refampicin 5.0 mg, 1 M Tris-HCl buffer 20 ml, agar 18.0 g, pH 7.5
Humic acid-vitamin medium	Humic acid 1.0 g, Na ₂ HPO ₄ 0.5 g, KCl 1.7 g, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.05 g, FeSO ₄ · 7H ₂ O 0.01 g, CaCO ₃ 0.02 g, B-vitamins: thiamine HCl, riboflavin, niacin, pyridoxine HCl, inositol, Ca-panthothenate, PABA; 0.5 mg, biotin 0.25 mg, Trace salts: FeSO ₄ 10.0 mg, CuSO ₄ · 5H ₂ O 1.0 mg, ZnSO ₄ · 7H ₂ O 1.0 mg, Mn SO ₄ · 7H ₂ O 1.0 mg, antibiotics: actidin 50 mg, nystatin 50 mg, polymixin B 4.0 mg, penicillin 0.8 mg, Cyclohexamide 50.0 mg, Refampicin 5.0 mg, 1.0 M Tris-HCl buffer 20.0 ml, agar 18.0 g, pH 7.5
M1 medium	Starch 10.0 g, Yeast extract 4.0 g, Peptone 2.0 g, Refampicin 5.0 mg, Cyclohexamide 50.0 mg, 1.0 M Tris-HCl buffer 20.0 ml, Agar 18.0 g, pH 7.5
Arginin-glyceol medium	Arginine 1.0 g, Glycerol 12.5 ml, ZnSO ₄ · 7H ₂ O 0.0005 g, MnSO ₄ · 4H ₂ O 0.0005 g, CuSO ₄ · 5H ₂ O 0.0005 g, K ₂ HPO ₄ 0.5 g, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.25 g, FeSO ₄ · 7H ₂ O 0.005 g, Cyclohexamide 50.0 mg, Refampicin 5.0 mg, 1.0 M Tris-HCl buffer 20.0 ml, agar 18.0 g, pH 7.5

가수분해 되지 않은 단백질을 침전시키기 위해 50.0% 1-propanol을 가하여 15 min간 방치한 후, 10,000 rpm에서 10 min간 원심분리하여 570 nm에서 측정하였다. 저해율(%)은 저해제를 첨가한 것의 반응전(A)과 반응후(B)의 흡광도, 저해제를 첨가하지 않은 것의 반응전(C)과 반응후(D)의 흡광도로부터 다음과 같은 식으로 계산하였다. 모식도는 Table 3에 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{(D - C) - (B - A)}{(D - C)} \times 100$$

2-8. 저해제 생산을 위한 최적배양조건 검토

해양에서 분리한 *Streptomyces thermocarboxydus* C12의 subtilisin-like proteinase inhibitor 물질 생산을 위한 최적배양조건은 온도, pH, 탄소원, 질소원, NaCl, metal salts 순으로 실행하였다. 균 생육도는 배양액의 상층액을 원심분리하여 제거한 후 증류수로 2회 세척한 다음 100℃에서 dry oven에서 건조시켜 dry cell weight(D.C.W)로 측정하였다. 배양온도는 기본배지에서 10~60℃까지 10℃ 간격으로 배양하여 저해활성을 조사하였다. 배양초기 pH는 활성이 높은 온도를 기준으로 pH 3~10까지 달리하여 저해활성을 조사하였다. 탄소원은 저해활성이 높게 나타난 온도, 초기 pH에서 기본배지에 첨가된 glucose를 제외하고, 각종 탄소원 1.0% (w/v)를 첨가하여 배양한 후 저해활성이 높은 탄소원을 선택하였다. 선택된 탄소원은 농도별로 첨가하여 활성을 검토하였다. 질소원은 선택된 탄소원을 첨가한 다음 기본배지의 질소원을 제거하고 각종 유·무기질소원을 0.5% (w/v)씩 첨가하여 배양한 후 활성을 검토하였다. 금속염의 영향은 여러 금속염을 1.0 mM씩 첨가하여 저해활성을 검토하였다. 그리고 저해물질의 최대생산 시기는 정해진 최적배양조건하에서 배양하여 시간별로 활성을 측정함으로써 배양 최적시간을 결정하였다.

Table 3. Assay systems for subtilisin inhibitor activity.

Pipette	Inhibitor assay (B)	Reference assay (D)	Control assay (A)	Blank assay (C)
Enzyme sol. (μ l)	10	10	10	10
Buffer sol. (μ l)	50	50	50	50
Inhibitor sol. (μ l)	10	buffer	10	buffer
50% TCA (ml)	—	—	0.1	0.1
Mix and preincubate at 37°C for 20 min				
Substrate sol. (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubate at 37°C for 30 min				
50% TCA (ml)	0.1	0.1	—	—
Centrifuge 10,000 rpm $\times$ 10 min				
Pipette into test tubes (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2
Ninhydrin sol. (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5
Heating at 100°C for 10 min				
Stand for 5 min at ice water				
50% 1-propanol (ml)	2.0	2.0	2.0	2.0
Stand for 15 min at room temperature				
570 nm				

3. *Subtilisin-like proteinase inhibitor*의 분리 · 정제 및 특성

3-1. *Subtilisin-like proteinase inhibitor*의 분리 · 정제

Streptomyces thermocarboxydus C12 균주에서 생산되는 저해물질의 정제 단계는 Fig. 1에 나타내었다. 배양액을 25℃에서 4일 동안 배양하여 균체 및 포자를 제거하기 위해 Whatman No 1. 여과지로 여과하였다. 여과액은 원심 분리(16,000 g × 20 min) 하여 상층액 중 잔존 찌꺼기를 제거하였다. 분리한 상층액은 ammonium sulfate 포화농도 0~40%에서 침전시켜 16,000 g × 20 min 동안 원심분리하고 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물은 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)(buffer A)에 대하여 24 hr 동안 3회 완충액을 교환하여 투석하였다. 투석액은 0.20 μm로 여과한 후 DEAE Sepharose CL-6B anion column (26/30, Pharmacia, Sweden)에서 NaCl (0~1.0 M)이 첨가된 buffer A로 step gradient를 하여 저해물질을 용출시켰다. 용출액은 280 nm에서 단백질 함량을 측정하였고 fraction의 저해활성을 측정하였다. 활성이 높은 분획을 모아 YM-10 membrane (MW cut off limit, 10 kDa)으로 한외 여과 하여 농축하였다. 농축액은 0.1 M NaCl이 포함된 buffer A로 평형화된 Superdex 200 column (16/60, Pharmacia, Sweden)에서 같은 완충액으로 용출시켰다. 용출액을 탈 이온수에 투석한 후 한외여과 (YM-10 membrane)하여 농축하였다. 정제한 저해물질은 -20℃에서 보관하면서 특성 실험에 사용하였다. 효소활성 1 unit는 37℃에서 1 min당 유리되는 1 μmol의 아미노산수로 나타내었으며, 표준검량곡선으로 leucine을 사용하였다. 효소 저해활성 1 unit는 효소활성 1 unit를 감소시키는 것으로 정의하였다.

3-2. *Subtilisin-like proteinase inhibitor*의 이화학적 특성조사

1) 분자량 측정

Subtilisin-like proteinase inhibitor의 정제도 및 분자량을 측정하기 위하여 Laemmli 법(1970)에 따라 12.5% gel에서 SDS-polyacrylamide 전기영동을 수행하였다. 전기영동은 90 V로 행하였다. 전기영동 후 gel은 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하고 탈색용액 (MeOH : glacial acetic acid : D.W = 40 : 10 : 50)으로 염색이 완전히 탈색 될 때 까지 탈색하였다. 분자량 측정을 위한 표준 단백질은 bovine serum albumin (66.0 kDa), ovalbumin (45.0 kDa), glycer-aldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36.0 kDa), carbonic anhydrase (29.0 kDa), trypsinogen (24.0 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), α -lactalbumin (14.2 kDa), aprotinin (6.5 kDa)을 사용하였다.

2) 등전점 측정

Subtilisin-like proteinase inhibitor의 등전점을 측정하기 위하여 Righetti 등(1989)의 방법에 따라 등전점 전기영동하였다. Ampholyte pH 3.5~10이 함유된 7.5% acrylamide gel을 사용하여 1500 V (constant voltage), 50 mA, 30 W에서 1 hr 30 min 동안 전개하였다. 전개가 끝난 gel은 10% (w/v) TCA에서 10 min 동안 차례로 침지시킨 후, Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색 및 탈색하였다. 등전점 측정을 위한 표준 단백질로 amyloglucosidase (pI 3.6), trypsin inhibitor (pI 4.55), β -lactoglobulin A (pI 5.1), bovine carbonic anhydrase isozyme (pI 5.9), human carbonic anhydrase (pI 6.6), myoglobin (pI 6.8, 7.2), lentil (pI 8.2, 8.6, 8.8), trypsinogen (pI 9.3)을 사용하였다.

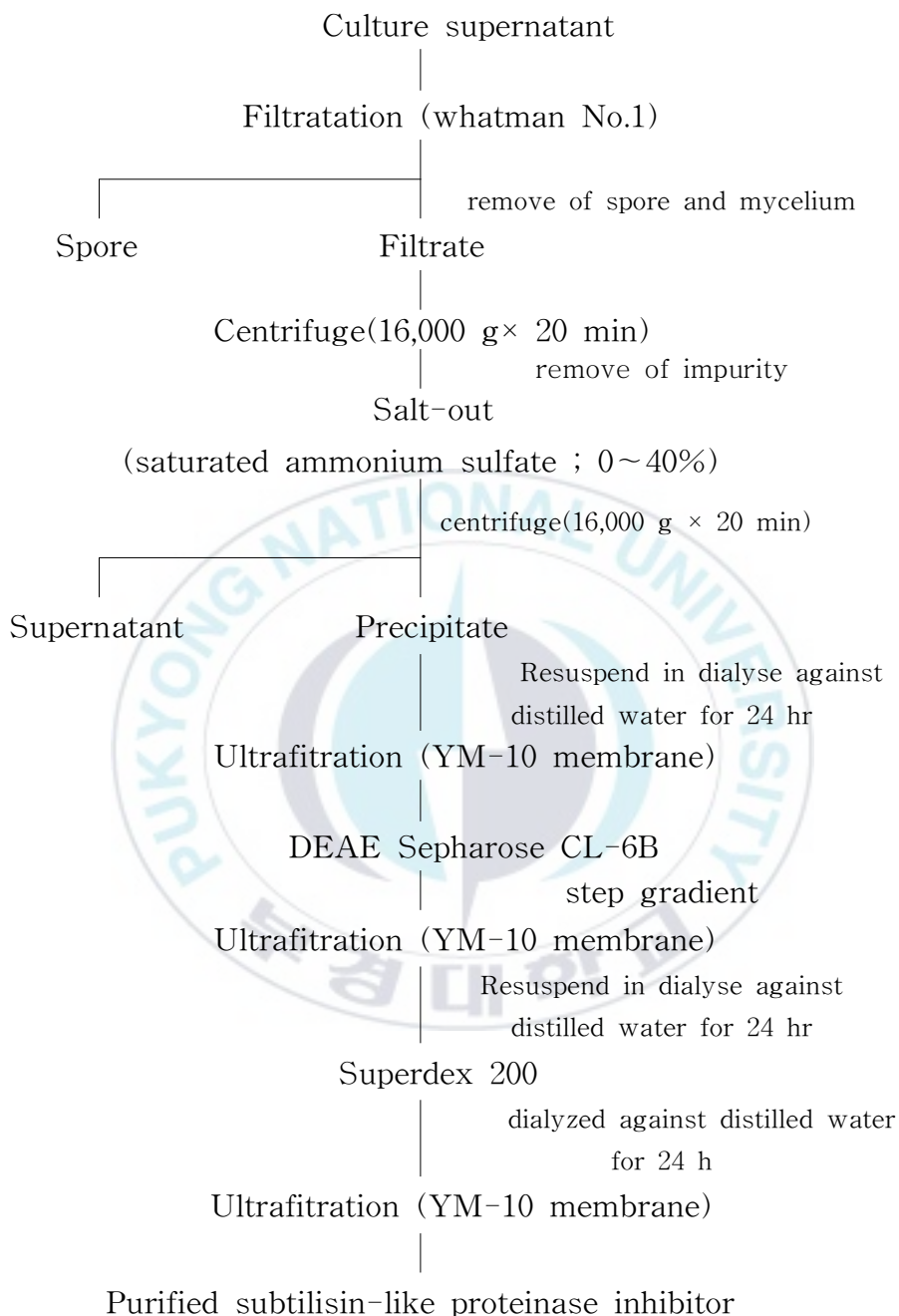


Fig. 1. Schematic representation for the purification of subtilisin-like proteinase inhibitor.

3) 아미노산 조성분석

아미노산 조성분석은 13 × 100 mm 시험관에 시료를 넣고 분석시료 0.5 ml에 대하여 0.1% phenol을 포함하는 0.5 ml의 constant boiling HCL (sigma H0636)을 가하여 질소를 flushing 한 후 화염으로 봉하고 110℃의 heating block에서 24 hr 가수분해하였다. 가수분해한 시료는 60℃의 Micro-cenVac (N-Biotec, Inc, Korea)에서 염산을 완전히 휘발 시킨 후, 시료에 0.01 N HCl로 1 ml되게 정용하였다. 아미노산 분석은 아미노산 자동 분석기 (Biochrom, Inc, Korea)에 40 µl를 주입하여 분석하였다.

4) *N-terminal sequence* 분석

(1) 단백질 추출

단백질 추출은 다음과 같이 실시하였다. 겔은 10배 부피의 7.0 M urea, 2.0 M Thiourea, 4.0% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate(CHAPS), 1.0%(w/v) dithiothreitol (DTT), 2.0% (v/v) pharmalyte, 1.0 mM benzamidine로 구성된 시료용액과 혼합되어 homogenizer (PowerGen125, Fisher Scientific)에 의해 분해되었다. 그리고, 단백질 추출을 위해서 1 hr 동안 혼합하였으며, 15℃에서 15,000 rpm으로 1 hr 동안 원심분리하여 상층액을 이차원전기영동의 시료로 사용하였다.

(2) 이차원전기영동

일차 Isoelectric focusing(IEF)를 위하여 IPG strips은 7.0 M urea, 2.0 M thiourea, 2.0% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), 1.0% dithiothreitol(DTT), 1.0% pharmalyte로 구성된 reswelling 용액으로 상온에서 12-16 hr 정도 reswelling 하였다. Strip 당 각각 200 µg 이 시료를 loading하여, Amersham Biosciences 사의 Multiphore II system을

이용하여 제조회사의 사용 메뉴얼을 준수하여 20℃에서 IEF를 수행하였다. IEF 조건은 150 V에서 3,500 V까지의 도달시간을 3 hr 되게 하였으며, 3,500 V에서 26 hr 지속되도록 하여 최종적으로 96 kVh 가 되도록 설정하였다. 이차적으로 SDS-PAGE를 수행하기 전에 IPG Strips을 1.0% DTT를 함유한 equilibration buffer(50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 6.0 M urea, 2.0% (w/v) SDS, 30.0% glycerol)로 10 min동안 incubation 하였으며, 곧바로 2.5% iodoacetamide를 함유한 equilibration buffer로 10 min 동안 더 incubation하였다. 평형이 완료된 strips을 SDS-PAGE gels (20 × 24 cm, 10.0-16.0%) 위에 배열시키고, Hoefer DALT 2D system (Amersham Biosciences)을 이용하여 20℃에서 최종적으로 1.7 kVh가 되게 전개하였다. 이차원전기영동이 완료된 이차원 젤은 Coomassie Brilliant G250으로 염색하였다. 염색된 이차원 젤은 AGFA 사의 Duoscan T1200 스캐너로 스캐닝하여 확장자가 TIFF 인 파일의 형태로 컴퓨터에 저장하였다.

(3) 이미지분석(image analysis)

스캐닝한 이미지로부터 단백질 spots의 발현변화 확인을 위한 정량적인 분석은 PDQuest software (version 7.0, BioRad)를 이용하여 수행하였다. 각 spot의 정량은 total valid spots의 intensity로 평균화 되었으며, 대조군에 비해 두 배 이상의 유의한 발현변화를 보여주는 단백질 spots을 선정하였다.

(4) 질량분석을 위한 단백질 절편화

단백질 spots은 modified porcine trypsin을 이용하여 작은 단편으로 분해하였다. 젤 조각에서 SDS, 유기용매, 염색시약 등의 불순물을 제거하기 위하여 50.0% acetonitrile로 세척하였다. 세척 후 spot을 100.0% acetonitrile로 탈수, 건조시켜 trypsin(8-10 ng/μl)으로 reswelling 하고 8-10 hr 동안 37℃에

서 항온시켰다.

(5) 단백질 절편들의 sulfonation과정을 위한 SPITC처리

Typsin처리된 용액에 SPITC(4-sulfophenyl isothiocyanate)를 20 mM NaHCO₃ (pH 9.5)가 되도록 처리한 후, sulfonation과정을 위하여 55℃에서 5-30 min 동안 항온시켰다. SPITC로 sulfonation한 수용액은 C₁₈ ZipTips (Millipore)을 이용하여 1-5 µl로 탈염 및 농축되었다. 이 농축액은 동량의 50.0% aqueous acetonitrile에 포화한 α-cyano-4-hydroxycinnamic acid와 혼합하였고, 질량분석을 위하여 target plate 위에 적하하였다.

(6) 단백질 서열 분석

질량분석기는 Ettan MALDI-TOF (Amersham Biosciences)를 사용하였다. Target plate 상에 적하한 단백질 단편들을 337 nm의 N₂ laser 조사로 기화시킨 다음, 20 kV injection pulse에 의해 가속되었다. 300 laser shots의 누적 peaks에 의해 각각의 단백질 spot에 대한 mass spectrum을 구하였다. 분석이 완료된 mass spectrum으로부터 단백질 서열 분석 후 동정을 위하여 Rockefeller 대학에서 개발한 PepFrag 검색엔진 (<http://prowl.rockefeller.edu/prowl/pepfrag.html>)을 이용하여 N-terminal sequence 서열 결정에 사용하였다.

5) 저해제 온도 안정성

최종 정제된 subtilisin-like proteinase inhibitor를 여러 온도(30~80℃)에서 30 min 동안 전처리 한 후, 4℃에서 30 min 동안 냉각시켜 저해제의 잔존 활성을 측정하였다.

6) 저해제 pH 안정성

정제된 subtilisin-like proteinase inhibitor를 50 mM sodium citrate- citric acid (pH 4.0~6.0), 50 mM Tris-HCl (pH 7.0~8.5), 50 mM Na₂CO₃-NaHCO₃ (pH 9.0~10.0)의 완충액에 12 hr 동안 실온에서 방치한 후 subtilisin을 첨가하여 37°C, 20 min간 전처리 한 후, 저해제의 잔존 활성을 측정하였다.

7) 금속이온의 영향

Subtilisin-like proteinase inhibitor를 metal ions(Cu²⁺, Li⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Cd²⁺, K⁺)이 첨가된 buffer에 1 hr 동안 실온에서 방치한 후, subtilisin을 첨가하여 37°C, 20 min간 전처리하여 저해제의 잔존활성을 측정하였다.

8) 여러 가지 단백질 분해효소에 대한 저해효과

Subtilisin-like proteinase inhibitor가 여러 단백질 분해효소에 대해서 저해작용이 일어나는지 확인하였다. 사용된 단백질 분해효소는 *Vibrio vulnificus* CYK279에서 생산되는 metalloprotease, collagenase type I, II, III, IV, trypsin과 α-chymotrypsin(0.01 mg/ml)농도에서 활성을 조사하였으며, subtilisin과 proteinase K는 (0.1 mg/ml)에서 저해활성을 조사하였다.

9) Subtilisin에 대한 inhibitor의 kinetics

Subtilisin을 기질인 gelatin 농도 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg 범위에서 활성을 측정하였다. 또한, subtilisin에 대한 subtilisin-like proteinase inhibitor의 저해활성을 기질의 농도에 따라 측정하였다. 반응속도 역수와 기질농도의 역수에 대하여 Lineweaver-Birk plot를 사용하여 K_m 와 V_{max} 의 값을 구한 후, 저해형태를 확인하였다.

10) 식품급 저해제와 저해율 비교

Streptomyces thermocarboxydus C12에서 생산하는 subtilisin-like proteinase inhibitor를 식품 저해제로 사용가능한지 조사하였다. 대조군은 상업적으로 많이 사용하고 있는 식품급 저해제 pork plasma protein과 egg white type p-39를 농도별 (0.1~1.0%)로 첨가하여 비교하였다.



제 3 장 연구결과 및 고찰

1. 균주의 분리 및 동정

우리나라의 남해 연안해역에서 해수, 해조류 및 갯벌을 채집하여 subtilisin-like proteinase inhibitor 분리시료로 사용하였다. 채집한 각종 시료는 Table 2에서 서술한 바와 같이 방선균 및 해양미생물 선택배지를 이용하여 27℃, 4~6주 동안 정치배양 시켜 방선균을 분리한 후 Bennet's 배지에서 subtilisin-like proteinase inhibitor의 우수한 9균주 B5, C11, 12, 17, S1, 2, 6, 7, 8를 plate assay 방법으로 1차 선별하였다. 선별 방법은 Fig. 2에 나타난 plate assay법으로 실시하였다. 1차 선별된 균주들을 액체배양한 후 paper disk를 이용하여 clear zone 크기로 2차 선별하였다. 2차 선별된 균주 중 ninhydrin 방법으로 proteinase K 와 subtilisin에 대한 저해율이 가장 높게 나타난 균주 C12를 최종적으로 선별하였다(Fig. 3). Fig. 4(B)와 같이 전자현미경으로 관찰한 결과 긴 원주모양의 형태를 보였다. 생화학적 특성은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 준하여 실험을 행하였다. 배양과정 중 ISP 9 배지를 제외한 모든 배지에서 성장하였으며, 비확산성의 색소를 생산하지 않음을 확인하였다. 포자의 색깔은 배지조건에 따라 하얀색에서 회색의 빛깔을 띠었으며 갈색빛을 띠는 포자가 드물게 관찰되었다(Table 4). 최종 선별된 균주 C12는 운동성이 없으며, 그람양성에 포자를 형성하고 있었으며, 표면은 smooth type이다. 기질 균사체의 분열 경우 전자현미경으로 조사한 결과 negative로 나타났다. 그리고 catalase 양성반응, starch, gelatin 및 casein에 대해서 분해한 것을 확인하였다. 또한, 균주 C12의 경우에는 9.0%의 NaCl 및 50℃까지 성장하였다(Table 6). 이러한 특성은 *Streptomyces* 균주의 특성과 일치하였다(Table 5). 또한, 보다 정확한 균주명을 알고자 16S rDNA sequence를 분석하여 BLAST program에 의한

GenBank에 따라 비교하여 염기서열을 조사하였다. 16S rDNA의 19~1423번까지 부분적 염기서열을 비교한 결과 전체 염기서열에는 다소 차이가 있었지만, *Streptomyces* sp. EF-2(AF112165), *Streptomyces thermocarboxydus* (U94490), (AB098079)와 유사하였다(Fig. 5). Neighbor-joining 방법을 사용하여 계통도를 작성한 결과 Fig. 6의 phylogenetic tree에서와 같이 분리균주 C12는 *Streptomyces thermocarboxydus*(AB098079)와 100.0% 일치하는 것으로 보였다(Miyairi et al., 2004). 따라서 본 균주를 *Streptomyces thermocarboxydus*로 동정하였으며, C12로 명명하였다.

2. 저해제 생산을 위한 최적배양조건 검토

2-1. 배양온도의 영향

배양온도는 저해물질 생산에 질소원과 마찬가지로 중요한 요인 중의 하나이다. 따라서, 효소 저해제 생산에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 10~60℃의 온도 범위에서 4일 동안 배양하여 각 온도에서의 균체성장 및 저해활성을 측정하였다. 본 실험에 사용한 해양 방선균의 경우 40℃에서 저해활성이 높았으며, 균체성장도 가장 잘 성장하므로 중온성 미생물인 것으로 사료된다(Fig. 7). 그러나, 50℃의 경우 균체성장과 저해활성이 급격히 감소되었다. 일반적으로 해양 세균은 저온미생물로서 20~30℃ 부근에서 잘 성장하는 것으로 보고하며(Kang et al., 2004; Choi et al., 2002), *Streptomyces albogriseolus* S-3253의 경우 30℃에서 균체성장이 최적이고, 저해활성은 45℃에서 가장 높은 것으로 조사되었다(Murao et al., 1972). 그 외 연구자들에 의하면 27~35℃ 범위에서 저해활성이 높게 나타났다(Tsuchiya and Kimura, 1978; Fukuhara et al., 1982; Park et al., 1989).

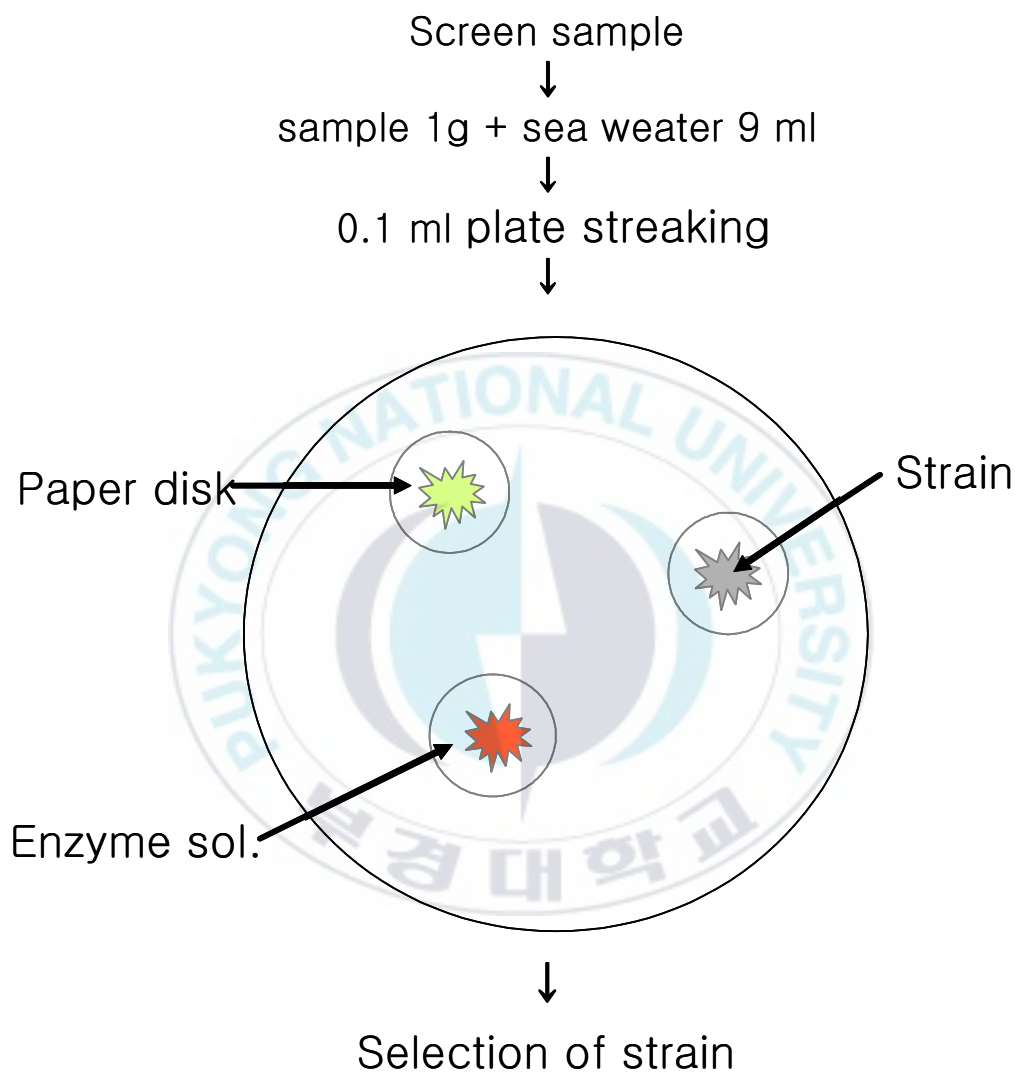


Fig. 2. Plate assay system of enzyme inhibitor substance produced by the marine actinomycetes.

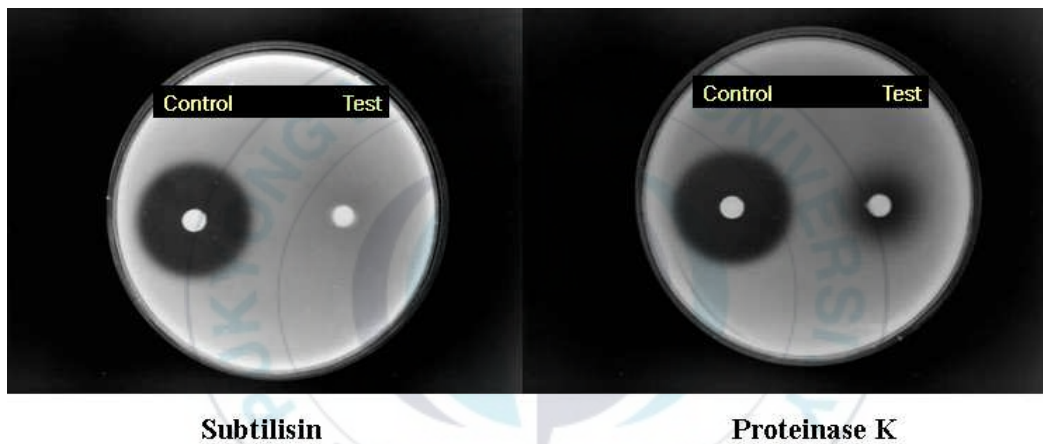
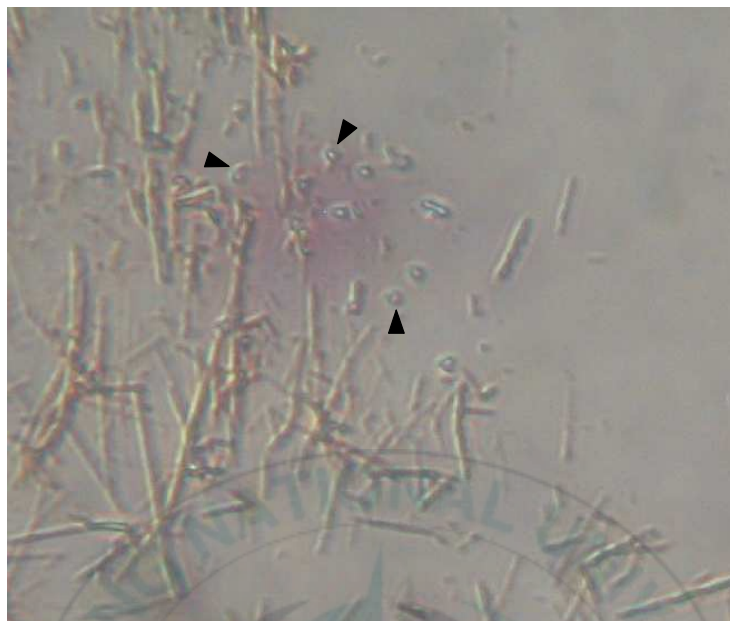


Fig. 3. Plate assay for serine protease inhibitor produced by the *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

A



B



Fig. 4. Light micrograph(A) and scanning electron morphology(B) of *Streptomyces thermocarboxdus* C12.

Table 4. Cultural characteristics of strain C12.

Medium	Growth	Spore mass color	R.S.C *	S.P **
ISP 1 agar	good	gray	green	none
ISP 2 agar	good	white	yellow	none
ISP 4 agar	moderate	gray	gray	none
ISP 9 agar	ND ^a	none	none	none
Starch-glyceol agar	good	gray	brown	none
Starch-casein nitrate agar	moderate	white	yellow	none
Nutrient agar	good	pale yellow	pale yellow	none
Bennet's	good	gray	dark brown	none

* Reverse side color, ** soluble pigment

ND^a : no detect

Table 5. Morphological characteristics of strain C12.

Characteristic	Isolated strain	<i>S. thermocarboxydus</i> (AB098079)
Spore morphology	Cylindrical spore	arthrospore
Spore surface	Smooth	Smooth
Fragmentation of substrate mycelium	—	—
Wall chemotype	LL-DAP	LL-DAP [*]
Spore mobility	Immotile	Immotile
Arthrospores in verticals	—	—
Growth temperature	15~50℃	10~42℃

^{*} LL-DAP : LL-diaminopimelic acid, + : positive, — : negative

Table 6. Physiological characteristics of strain C12.

Content	Characteristic
Starch hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	+
Casein hydrolysis	+
Melanin pigment	—
Gram staining	+
Growth in 9% NaCl	+
Catalase	+
Utilization of citrate	—

Table 7. Utilization of carbon compounds by strain C12.

Carbon compounds	Growth
Glucose	++
Galactose	+
Maltose	++
Arabinose	
Mannitol	
Lactose	++
Sorbitol	-
Fructose	++
Starch	+
Mannose	++
Sucrose	-

++ ; Good, + ; Fair, - ; Not utilized

The growth was checked after 10 days culture at 27°C.

Strain C12	-----CAAGTGGCGGCATGCTTA-CACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGT	75
<i>S. thermocarboxydus</i> (AB098079)	-----GACGAACGCTGGCGGCGTCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGT	81
<i>S. sp.EF-2</i> (AF112165)	CATTACGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGT	110
<i>S. thermocarboxydus</i> (U94490)	-----GACGAACGCTGGCGGCGTCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGT	81
<i>S. purpurascens</i> (AJ781382)	-----GACGAACGCTGGCGGCGTCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGT	
Strain C12	AACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACCTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGATCGCCTTGGGCATCCTTGGTGATCGAAAGCTCCGGCGGTGCA	185
<i>S. thermocarboxydus</i> (AB098079)	AACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACCTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGATCGCCTTGGGCATCCTTGGTGATCGAAAGCTCCGGCGGTGCA	191
<i>S. sp.EF-2</i> (AF112165)	AACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACCTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGATCGCCTTGGGCATCCTTGGTGATCGAAAGCTCCGGCGGTGCA	220
<i>S. thermocarboxydus</i> (U94490)	AACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACCTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGATCGCCTTGGGCATCCTTGGTGATCGAAAGCTCCGGCGGTGCA	191
<i>S. purpurascens</i> (AJ781382)	AACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACCTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACTGATCGCCTTGGGCATCCTTGGTGATCGAAAGCTCCGGCGGTGCA	191
Strain C12	GGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC	295
<i>S. thermocarboxydus</i> (AB098079)	GGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC	301
<i>S. sp.EF-2</i> (AF112165)	GGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC	330
<i>S. thermocarboxydus</i> (U94490)	GGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC	301
<i>S. purpurascens</i> (AJ781382)	GGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTAGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC	301
Strain C12	AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG-AATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGCA	404
<i>S. thermocarboxydus</i> (AB098079)	AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG-AATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGCA	410
<i>S. sp.EF-2</i> (AF112165)	AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG-AATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGCA	439
<i>S. thermocarboxydus</i> (U94490)	AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG-AATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGCA	410
<i>S. purpurascens</i> (AJ781382)	AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG-AATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGCA	411

(to be continued)

<i>Strain C12</i>	GGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAA	514
<i>S. thermocarboxydus</i> (AB098079)	GGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAA	520
<i>S. sp.EF-2</i> (AF112165)	GGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAA	549
<i>S. thermocarboxydus</i> (U94490)	GGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAA	520
<i>S. purpurascens</i> (AJ781382)	GGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAA	521
<i>Strain C12</i>	GAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCCGTTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGT	624
<i>S. thermocarboxydus</i> (AB098079)	GAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCCGTTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGT	630
<i>S. sp.EF-2</i> (AF112165)	GAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCCGTTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGT	659
<i>S. thermocarboxydus</i> (U94490)	GAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGCGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCCGTTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGT	630
<i>S. purpurascens</i> (AJ781382)	GAGCTCGTAGGCGGCTTGTCGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCCGTTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGT	631
<i>Strain C12</i>	GTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATA	734
<i>S. thermocarboxydus</i> (AB098079)	GTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATA	740
<i>S. sp.EF-2</i> (AF112165)	GTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATA	769
<i>S. thermocarboxydus</i> (U94490)	GTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATA	740
<i>S. purpurascens</i> (AJ781382)	GTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATA	741
<i>Strain C12</i>	CCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCGACATTCACGTCGTCGTCGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG	844
<i>S. thermocarboxydus</i> (AB098079)	CCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCGACATTCACGTCGTCGTCGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG	850
<i>S. sp.EF-2</i> (AF112165)	CCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCGACATTCACGTCGTCGTCGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG	879
<i>S. thermocarboxydus</i> (U94490)	CCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCGACATTCACGTCGTCGTCGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG	850
<i>S. purpurascens</i> (AJ781382)	CCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACGTTGTCGTCGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG	851
<i>Strain C12</i>	GCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAACGCTCC	954

(to be continued)

<i>S. thermocarboxydus</i> (AB098079)	GCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGTCC	960
<i>S. sp.EF-2</i> (AF112165)	GCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGTCC	989
<i>S. thermocarboxydus</i> (U94490)	GCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGTCC	960
<i>S. purpurascens</i> (AJ781382)	GCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGTCC	961
Strain C12	AGAGATGGGCGCCCCCTTGTTGGTCGGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTCGTG	1064
<i>S. thermocarboxydus</i> (AB098079)	AGAGATGGGCGCCCCCTTGTTGGTCGGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTCGTG	1070
<i>S. sp.EF-2</i> (AF112165)	AGAGATGGGCGCCCCCTTGTTGGTCGGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTCGTG	1099
<i>S. thermocarboxydus</i> (U94490)	AGAGATGGGCGCCCCCTTGTTGGTCGGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTCGTG	1070
<i>S. purpurascens</i> (AJ781382)	AGAGATGGGCGCCCCCTTGTTGGTCGGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTCGTG	1071
Strain C12	TTGCCAGCAGGCCCTTGTTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGCTTGGGCTGCA	1174
<i>S. thermocarboxydus</i> (AB098079)	TTGCCAGCAGGCCCTTGTTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGCTTGGGCTGCA	1180
<i>S. sp.EF-2</i> (AF112165)	TTGCCAGCAGGCCCTTGTTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGCTTGGGCTGCA	1209
<i>S. thermocarboxydus</i> (U94490)	TTGCCAGCAGGCCCTTGTTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGCTTGGGCTGCA	1180
<i>S. purpurascens</i> (AJ781382)	TTGCCAGCAGGCCCTTGTTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGCTTGGGCTGCA	1181
Strain C12	CACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCG	1284
<i>S. thermocarboxydus</i> (AB098079)	CACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCG	1290
<i>S. sp.EF-2</i> (AF112165)	CACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCG	1319
<i>S. thermocarboxydus</i> (U94490)	CACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCG	1290

(to be continued)

<i>S. purpurascens</i> (AJ781382)	CACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCG	1291
Strain C12	GAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCA	1394
<i>S. thermocarboxydus</i> (AB098079)	GAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCA	1400
<i>S. sp.EF-2</i> (AF112165)	GAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCA	1429
<i>S. thermocarboxydus</i> (U94490)	GAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCA	1400
<i>S. purpurascens</i> (AJ781382)	GAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCA	1401
Strain C12	ACCCCTTGTGGGAGGGAGCT-TCGAA--GTGACTAGCT-----	1431
<i>S. thermocarboxydus</i> (AB098079)	ACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACG-----	1450
<i>S. sp.EF-2</i> (AF112165)	ACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAG-----	1508
<i>S. thermocarboxydus</i> (U94490)	ACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT	1500
<i>S. purpurascens</i> (AJ781382)	ACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGGAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAG-----	1479

Fig. 5. A comparison of 16S rDNA full sequence of an isolated various strain with *Streptomyces thermocarboxydus*.

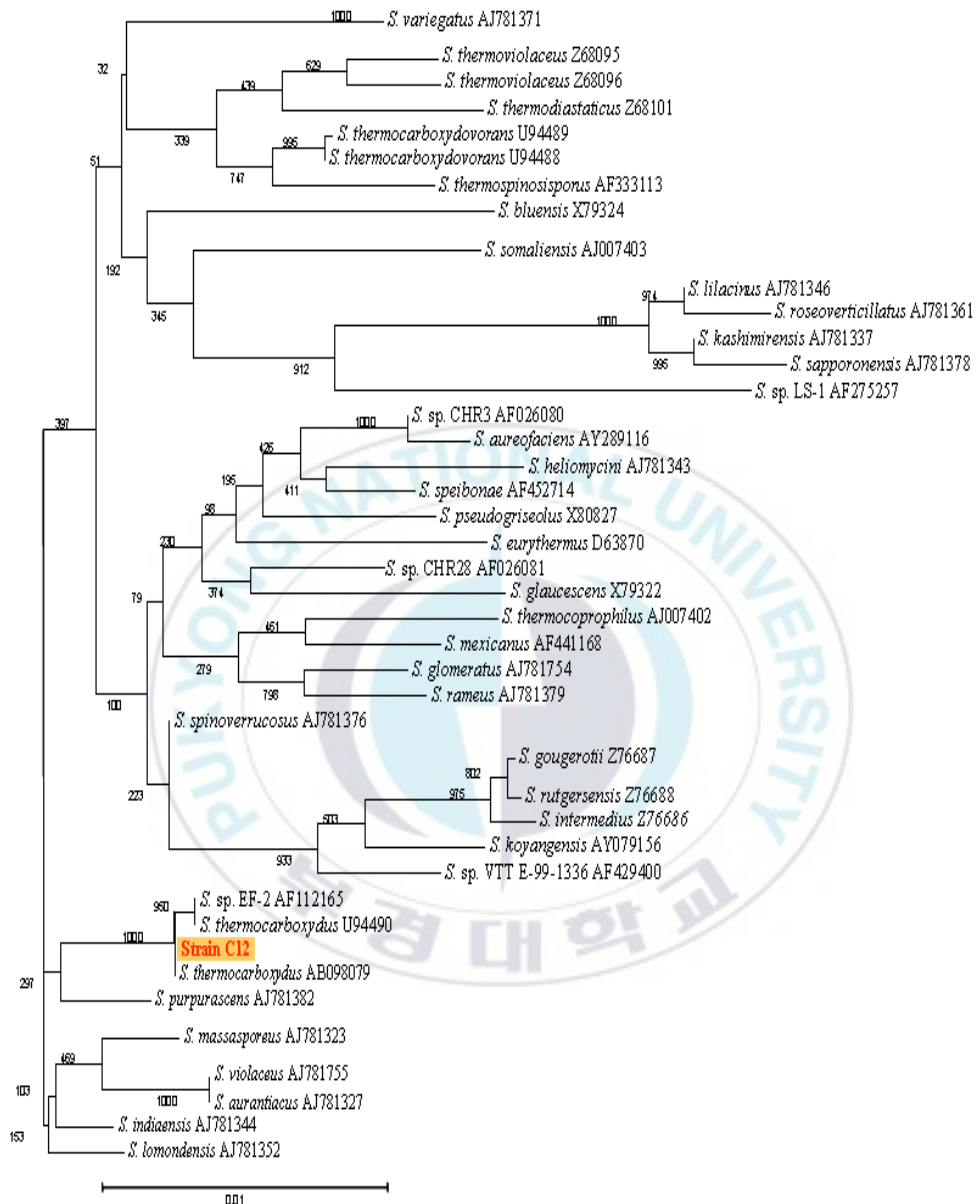


Fig. 6. Neighbour-joining tree based on 16S rDNA sequences of 42 *Streptomyces* strains.

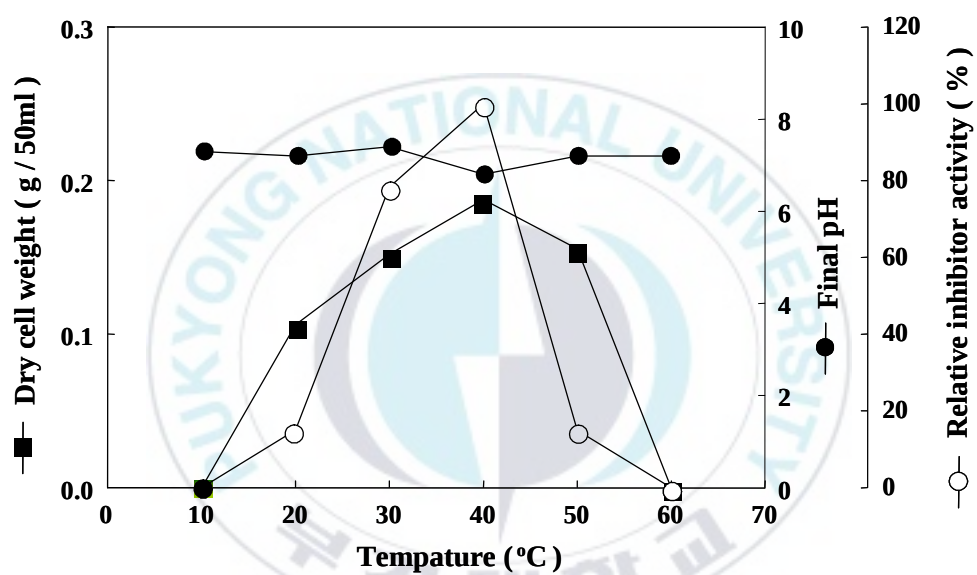


Fig. 7. Effect of temperature on the production of subtilisin-like proteinase inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

2-2. 초기 pH의 영향

배양액의 pH는 다양한 영양분, 성장인자 등의 세포막 이동속도에 영향을 미치며, 외부의 pH가 변하면 영양물질분자의 이온화 경향이 달라져 물질흡수능력이 감소하므로 미생물의 생육성장과 저해물질 생산에 중요한 역할을 한다. 따라서, 효소저해물질 생산에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 배양액의 초기 pH를 3~10까지 조절하여 배양 후 저해활성을 측정하였다. 균체성장은 초기 pH 6~7 범위에서 가장 잘 성장하여 호중성 미생물인 것으로 사료된다. 그러나, 저해활성의 경우 pH 6.5~8.0 중성 범위에서 가장 높은 것으로 확인되었다(Fig. 8). 이와같은 결과는 Murao 등(1972, 1978)이 pH 7 에서 저해활성이 높다고 보고한 결과와 유사하였지만, Kim 등(1991)은 알칼리성에서 저해활성이 높다고 보고한 것과는 차이가 있었다. 이 처럼 중성 범위의 pH에서 효소 저해활성이 가장 높게 유지되는 것은 이 부근에서 효소 저해활성이 가장 안정화되기 때문인 것으로 사료된다. 아직까지 강산·강알칼리성에서 저해물질 생성에 대한 보고는 거의 없다.

2-3. 탄소원의 영향

효소저해물질의 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 인공해수에 0.2% (w/v) peptone, 0.1% (w/v) yeast extract, 0.1% (w/v) malt extract가 첨가된 배지에 glucose, maltose, fructose, galactose, saccharose, starch, lactose, sorbitol, mannose를 각각 1.0% 씩 첨가하여 균체성장 및 저해물질의 활성을 측정하였다. Table 8에서 나타내는 바와 같이 대부분 단당류인 galactose, glucose, fructose와 다당류인 starch에서 높은 저해활성을 보였다. Three actinomycetes에서 생산된 저해제 API- I, II와 III(Pandhare et al., 2002)의 경우 starch, glucose, mannose 및 fructose가 저해제 생산에 좋은 탄소원으로 보고되었고, 그 외 protease inhibitor 생산에서 최적 탄소원으로

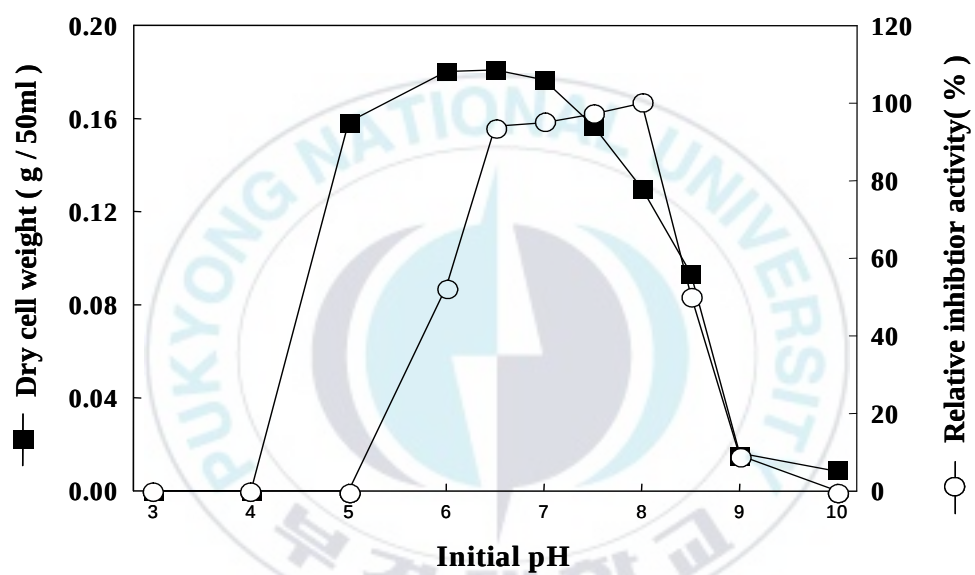


Fig. 8. Effect of initial pH on the production of subtilisin-like proteinase inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

Table 8. Effect of various carbon sources on the production of subtilisin-like proteinase inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

Carbon source (1.0 %)	Dry cell weight (g / 50 ml)	Relative inhibitor activity (%)	Final pH (-)
Control	0.049	0.0	8.25
Glucose.	0.155	88.2	7.45
Galactose	0.132	100.0	7.76
Fructose	0.156	84.0	7.83
Maltose	0.146	1.9	7.77
Lactose	0.159	15.8	7.98
Sorbitol	0.053	8.3	8.32
Saccharide	0.042	5.6	8.34
Starch	0.138	84.0	7.76
Mannose	0.159	10.8	7.62

glucose와 starch를 사용하는 것으로 보고되고 있어 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다(Murao et al., 1972; Murao and Watanabe, 1978; Fukuhara et al., 1982; Kim et al., 1991). 일반적으로 glucose와 같이 쉽게 이용 가능한 기질은 그 자체가 이차 대사산물의 생합성 관련 효소들을 저해할 뿐만 아니라 방선균 발효에서도 과량의 glucose가 존재할 때 pyruvic acid 및 α -ketoglutaric acid 등의 축적으로 이들에 의한 간접적인 저해효과도 초래할 수 있는 것으로 알려져 있다(Aoyagi, 1990; Tanaka, 1992). 특히, 본 연구에서 탄소원을 첨가하지 않을 경우 균체성장 및 저해활성이 나타나지 않으므로 저해물질 생산에 있어 중요한 인자로 사료된다.

최적의 탄소원으로 선정된 galactose를 0.0~2.8% (w/v) 농도별로 첨가하여 균체성장 및 저해활성을 측정하였다(Fig. 9). 그 결과 저해활성은 1.6% (w/v)에서 가장 높았으며, 이 이상의 농도에서는 저해활성이 점차 감소한 반면에 균체성장은 계속 증가하는 것으로 조사되었다. 이것은 이차대사산물인 저해제의 생합성을 저해하는 catabolite repressor로 작용한 것으로 사료된다.

2-4. 질소원의 영향

질소원은 미생물의 대사증식에 결정적인 영향을 미치는 성분으로 알려져 있어 각종 유·무기 질소원으로 나누어 실험을 행하였다. 먼저 기본배지에 peptone, yeast extract, malt extract를 제외하고 각종 유기 질소원을 각각 0.5%씩 첨가하여 균체성장 및 효소 저해활성을 측정하였다.

Polypeptone, yeast extract, casamino acid 경우 균체성장에 많은 도움이 되지만 peptone을 제외한 두 질소원에 대해서는 저해활성이 현저히 낮거나 활성이 나타나지 않았다. Table 9에 나타내는 바와 같이 저해활성은 복합배지인 polypeptone과 proteose peptone에서 가장 높게 조사되어 *Cephalosporium* sp.에서 생산된 trypsin inhibitor와 *Streptomyces*

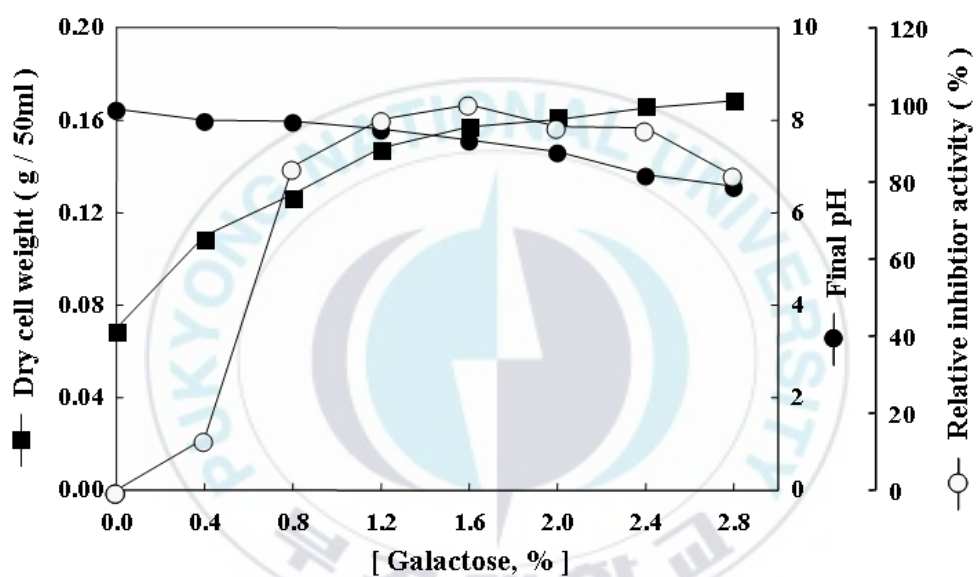


Fig. 9. Effect of galactose concentration on the production of subtilisin-like proteinase inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

Table 9. Effect of organic nitrogen sources on the production of subtilisin-like proteinase inhibitor by *Streptomyces thermocarboxy-dus* C12.

Organic nitrogen source (0.5%)	Dry cell weight (g / 50 ml)	Relative inhibitor activity (%)	Final pH (-)
Control	0.046	0.0	7.38
Poly peptone	0.173	98.9	7.67
Bacto peptone	0.087	66.3	7.99
Beef extract	0.102	7.5	5.19
Yeast extract	0.173	44.1	7.36
Bacto soytone	0.092	90.1	7.93
Meat extract	0.102	72.8	8.00
Proteose peptone	0.098	100.0	8.01
Urea	0.030	0.0	8.17
Casamino acid	0.180	0.0	5.64
Gelatin	0.056	0.0	7.24

albogriseolus S-3253에서 생산된 alkaline protease inhibitor(Tsuchiya and Kimura, 1978; Murao and Sato, 1972)에서 polypeptone을 사용한 것과 유사한 결과를 보였다. 이것은 저해제가 두 질소원을 소비한 후 세포 대사물질에 대한 기질로써 활용한 것으로 사료된다. 그러나 *actinomyces*에서 생산된 API- I, II와 III의 경우 각각 casein, yeast extract, malt extract에서 저해활성이 높다는 보고와 상이하였다(Pandhare et al., 2002). 그리고 천연 질소원과 무기 질소원의 경우 저해활성이 나타나지 않았다(Table 10). 본 연구에서 최적 질소원으로는 균체제거를 고려하여 proteose peptone을 선정하였다. 선정된 proteose peptone은 0.0~3.0% (w/v)까지 농도별로 첨가하여 저해활성을 조사하였다. 그 결과 0.5% (w/v)에서 가장 높았으며, 이상의 농도에서는 점차 감소하였다(Fig. 10).

2-5. NaCl 농도의 영향

일반적으로 해수에는 약 3.0% (w/v)의 NaCl이 함유되어 있으므로 NaCl에 따른 균체성장 및 효소 저해활성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 11). NaCl 농도를 0.0~9.0% (w/v)까지 조절한 배지에서 배양한 후 효소 저해활성을 측정한 결과, 1.0% (w/v)에서 저해활성이 높았으며 균체성장은 2.0% (w/v)에서 가장 많이 성장하였다. 또한, 5.0% (w/v)의 염 농도에서도 저해활성의 경우 70.0% 이상의 저해율을 나타냈다. 또한, 저해활성은 나타나지 않지만 9.0% (w/v)의 높은 염에서 성장하는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 볼 때 *Streptomyces thermocarboxydus* C12는 미호염성균임을 알 수 있었다.

2-6. Metal salts의 첨가 효과

Galactose 1.6% (w/v), proteose peptone 0.5% (w/v), NaCl 1.0% (w/v)로 고정된 조건에서 각종 금속염을 1 mM의 농도로 첨가하여 균체 성장 및 저

Table 10. Effect of inorganic nitrogen sources on the production of subtilisin-like proteinase inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

inorganic nitrogen source (0.5%)	Dry cell weight (g / 50 ml)	Relative inhibitor activity (%)	Final pH (-)
Control	0.046	0.0	7.38
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.081	2.2	5.52
NH ₄ NO ₃	0.011	0.0	6.09
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.062	0.0	7.29
NH ₄ Cl	0.029	2.4	5.71
NaNO ₃	0.054	1.2	8.01

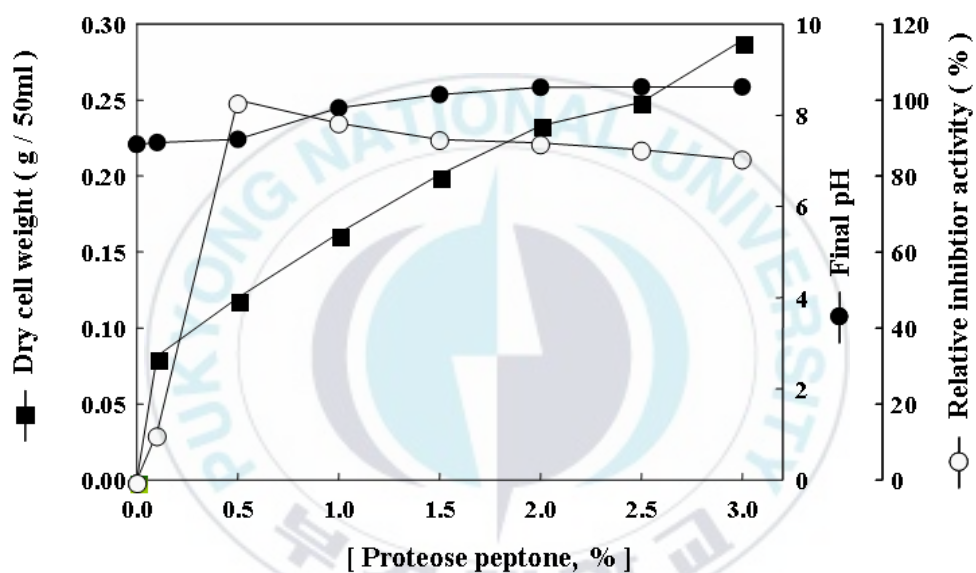


Fig. 10. Effect of proteose peptone concentration on the production of subtilisin-like proteinase inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

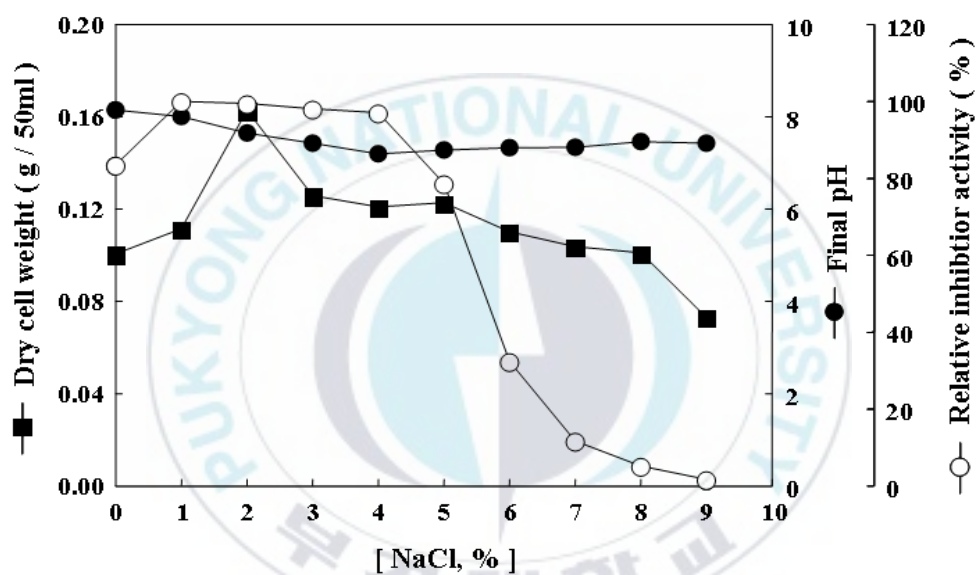


Fig. 11. Effect of NaCl concentration on the production subtilisin-like proteinase inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

해활성을 살펴보았다(Table 11). LiCl, MgCl₂와 KCl은 대조군보다 높았으며, 이 중 LiCl에서 가장 좋은 활성을 나타내었다. Murao 등(1972, 1978)에 의하면 여러 가지 효소 저해물질의 생산에서 금속염은 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 중금속염의 첨가는 균체성장 및 저해활성을 억제하는 것으로 조사되었다. 이것은 중금속의 경우 -SH 작용기를 지닌 단백질과 결합하면 단백질을 비활성화 시키므로 저해활성이 전혀 나타나지 않은 것으로 판단된다.

2-7. 최적배양조건에서 저해제의 생산

앞의 결과를 토대로 배지 및 배양 조건을 조절하여 저해제의 생산을 증가시키고자 다음과 같이 실행하였다. 40℃, pH 8.0, 1.6% (w/v) galactose, 0.5% (w/v) proteose peptone, 1% (w/v) NaCl, 1 mM LiCl이 첨가된 500 ml flask에서 *Streptomyces thermocarboxydus* C12균주를 배양하여 시간별로 균체 성장과 저해활성을 조사하였다(Fig. 12). 균체는 12 hr부터 성장하여 48 hr에는 정지기에 도달하였다. 저해활성 경우 48 hr부터 나타났으며, 균체 정지기 84 hr에 최고조에 이르렀다. 이것은 저해물질이 2차 대사산물인 것으로 사료된다. pH의 경우 시간이 경과 할 수록 점차 감소한 후 약 염기성으로 증가하는 것은 전형적인 방선균 발효시의 발견되는 현상이며 pH의 감소는 당으로부터 유기산의 생성에 기인한 것으로 추정된다. 이상의 결과 최적 배양 조건에서 84 hr 배양시 저해활성은 균주 최적배양 전의 저해율 33%에 비해, subtilisin을 완전 저해하는 것으로 나타났다.

Table 11. Effect of metal salts on the production of subtilisin-like proteinase inhibitor by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

Metal salt (1mM)	Dry cell weight (g / 50 ml)	Relative inhibitor activity (%)	Final pH (-)
Control	0.086	94.3	8.02
MgCl ₂	0.075	97.8	7.95
CaCl ₂	0.057	95.4	8.04
FeCl ₂	0.064	85.2	7.92
Fe ³⁺ -citrate	0.052	90.1	7.91
LiCl	0.081	100.0	8.03
KCl	0.079	97.6	8.01
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.000	0.0	6.53
CuSO ₄ · 6H ₂ O	0.000	0.0	5.94
ZnCl ₂	0.000	0.0	6.69

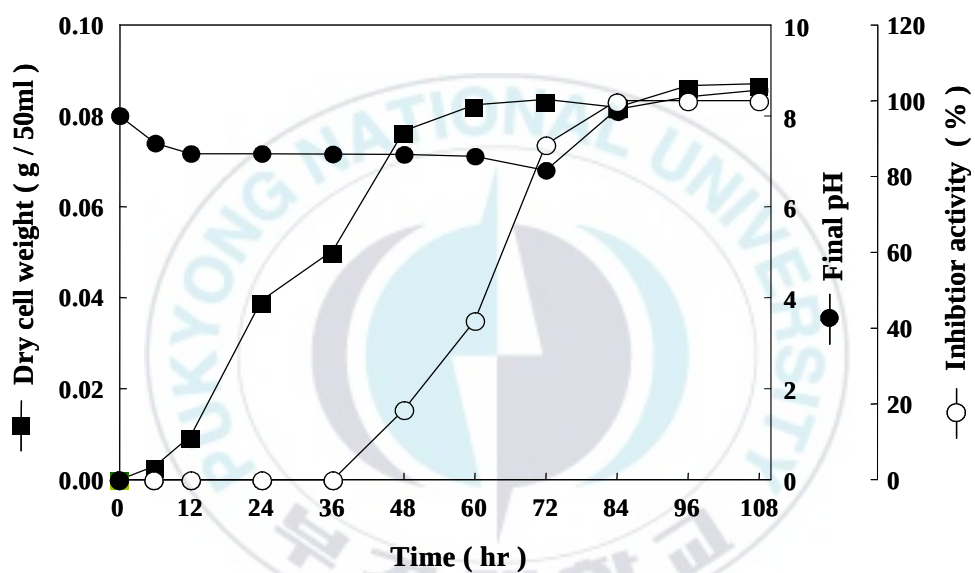


Fig. 12. Time course of subtilisin-like proteinase inhibitor production by *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

3. *Subtilisin-like proteinase inhibitor*의 분리 · 정제

3-1. *Subtilisin-like proteinase inhibitor* 분리 · 정제

Streptomyces thermocarboxydus C12가 생산하는 subtilisin-like proteinase inhibitor가 protein 또는 peptide인지를 확인하기 위해 투석막을 사용하여 확인한 결과 투석내액에서 저해활성이 조사되었다(Fig. 13). 이 저해물질은 고분자 물질인 것으로 추정하였으며, 이러한 결과를 바탕으로 초기에는 ammonium sulfate 침전법을 사용하지 않고 정제를 하였다. 그 결과 yield는 5.3%, 순도는 18.5 fold 정제되었다(data not shown). 정제 순도를 높이기 위해 상층액을 ammonium sulfate를 사용하여 최적 포화농도를 조사한 결과, (0~20, 20~40%)농도 범위에서 각각 yield는 3.8, 17.9%이며, 정제도는 11.4, 7.4 배로 확인되었다(Table 12). 이후의 실험은 상층액을 ammonium sulfate(0~40%) 범위까지 침전시켜 투석하였으며, 투석액은 DEAE Sepharose CL-6B column (26/30, Pharmacia, Sweden)에서 step gradient를 주어 저해물질을 용출시킨 결과 0.6~0.8 M 범위에서 나타난 peak에서 저해활성을 조사하였다(Fig. 14). 그 중, 활성이 높은 획분을 농축하여, 0.1 M NaCl이 포함된 buffer A로 평형화된 Superdex 200 column (16/60, Pharmacia, Sweden)으로 용출시킨 결과 52~53 fraction에서 저해활성이 90% 이상인 단일 peak를 나타내어 최종적으로 정제된 것으로 확인되었다(Fig. 15). 이 두 획분을 탈 이온수에 투석, 농축하여 특성조사에 사용하였다. 최종 정제된 저해물질의 specific activity는 $35,620.6 \text{ U mg}^{-1}$, yield는 20.7%, 정제도는 119.9 fold로 나타났다(Table 13). 또한, 순도를 검정하기 위하여 native gel 전기영동을 한 결과 Fig. 16과 같이 단일밴드로 나타났다.

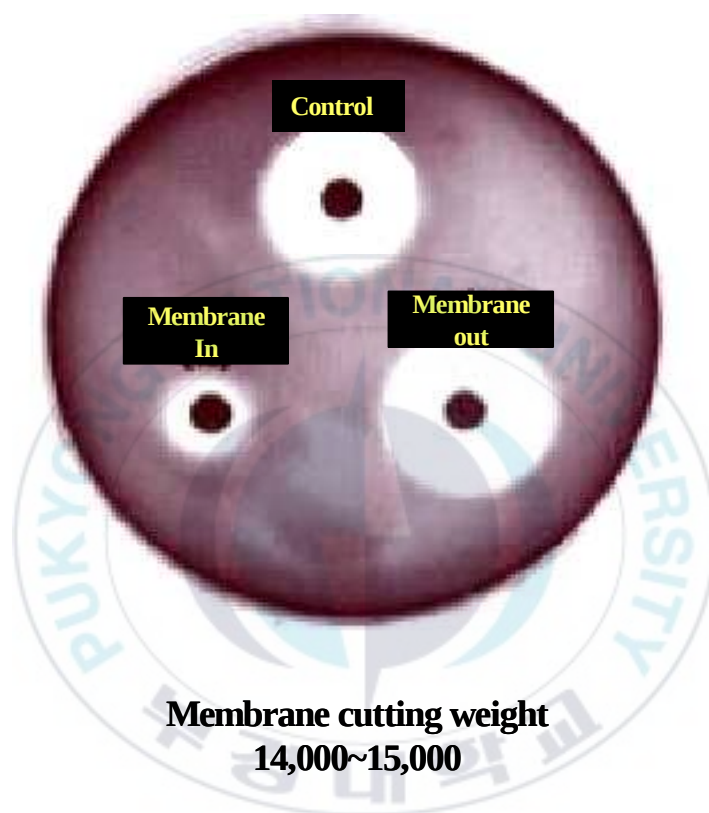


Fig. 13. Diagram of plate assay for subtilisin-like proteinase inhibitor utilized in the dialysis membrane.

Table 12. Ammonium sulfate precipitation of subtilisin-like proteinase inhibitor from the culture supernatant of *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

Conc.	Total vol. (ml)	Total activity (Unit)	Total protein (mg)	Specific activity (U mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification (fold)
Supernatant	100.0	251,700	300.5	837.6	100.0	1.0
0 ~ 20%	0.65	9,594	1.0	9,594.0	3.8	11.4
20 ~ 40%	1.50	45,000	7.3	6,164.4	17.9	7.4
40 ~ 60%	1.20	13,284	4.6	2,887.8	5.3	3.5
60 ~ 80%	2.20	6,336	4.5	1,408.0	2.5	1.7

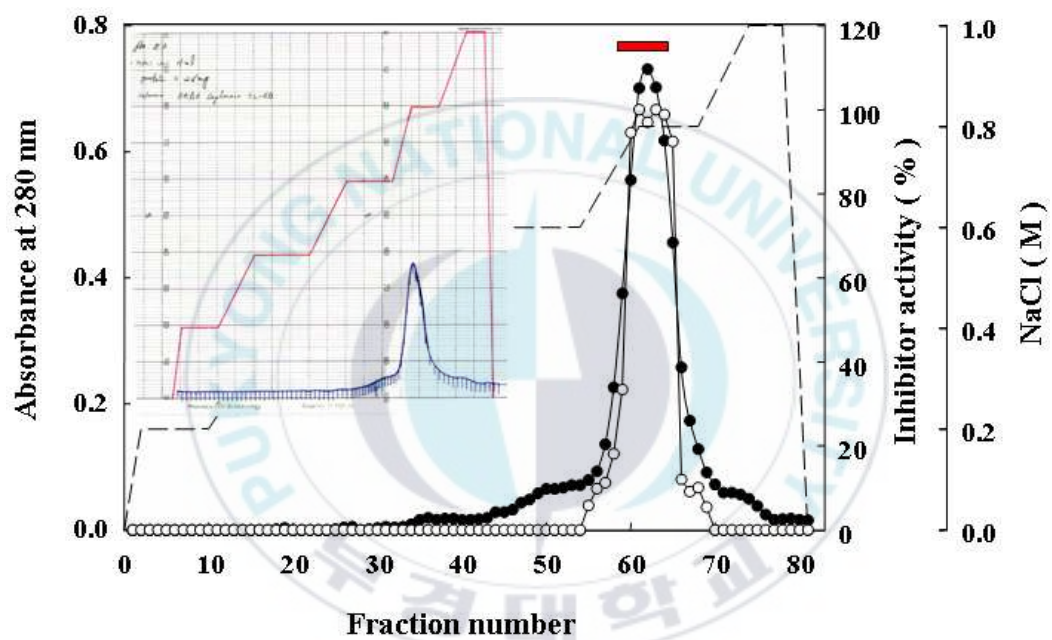


Fig. 14. Elution profiles of subtilisin-like proteinase inhibitor from a DEAE Sepharose CL-6B anion column.

—●— protein —○— inhibitor activity --- NaCl

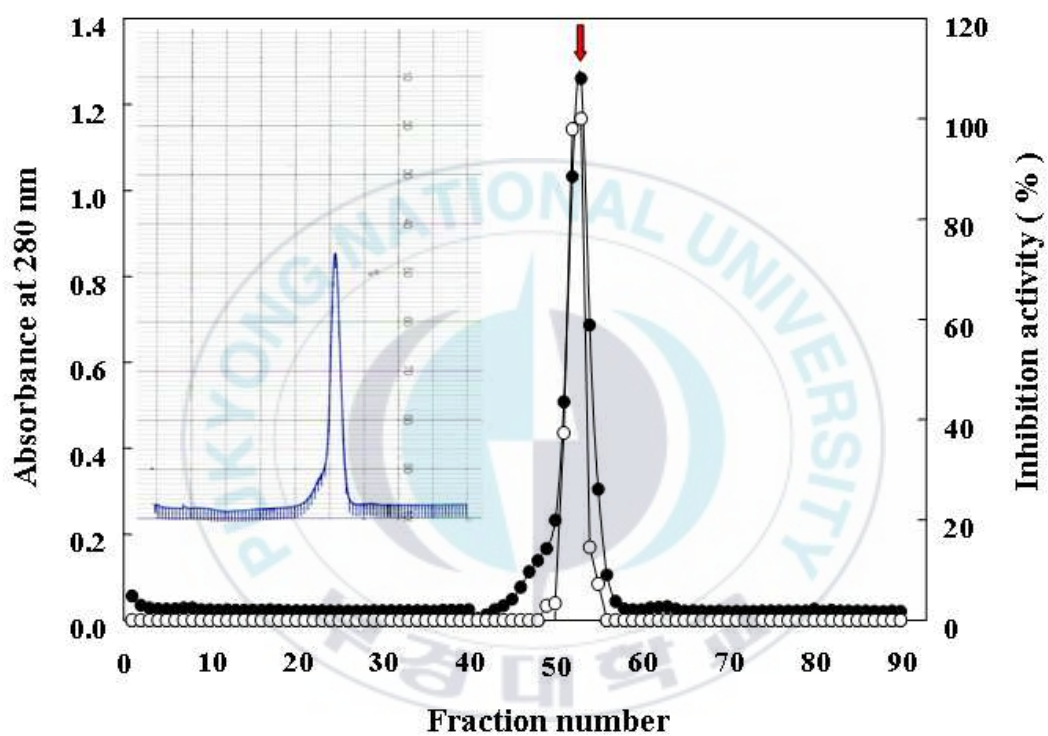


Fig. 15. Elution profiles of subtilisin-like proteinase inhibitor from a Superdex 200 gel column.

—●— protein —○— inhibitor activity

Table 13. Summary of the purification steps for the subtilisin-like proteinase inhibitor from the culture supernatant of *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

Purification Step	Total activity (Unit $\times 10^3$)	Total protein (mg)	Specific activity (U mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification (fold)
Supernatant	499.0	1,680.2	296.9	100.0	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (0~40%)	359.3	53.7	6,690.8	72.0	22.5
DEAE Sepharose CL-6B	335.2	9.5	35,284.2	67.2	118.8
Superdex 200	103.3	2.9	35,620.6	20.7	119.9

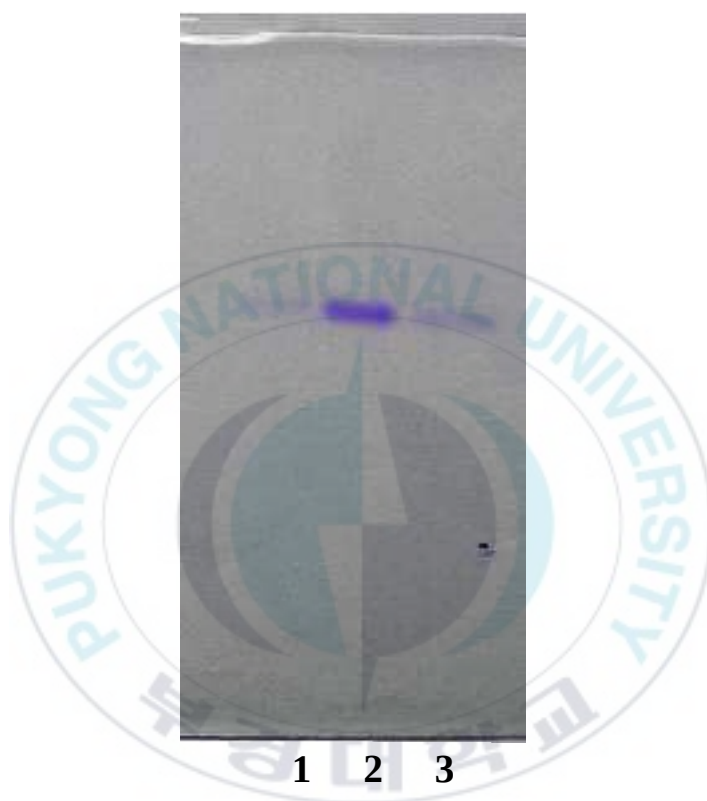


Fig. 16. Native polyacrylamide gel electrophoresis of purified subtilisin-like proteinase inhibitor from the *Streptomyces thermocarboxydus* C12. Lane 1, Ammonium sulfate; lane 2, DEAE Sepharose CL-6B; lane 3, Superdex 200.

3-2. 분자량 측정

단백질성 저해제의 분자량을 조사하기 위해 Fig. 17에서 보는 바와 SDS-PAGE에서 분자량은 약 33,100 daltons에 해당하였으며 단일 band로 나타났다. 대부분 subtilisin inhibitor의 경우 두 개의 동일 subunit로 이루어진 dimer protein으로 알려져 있다(Kojima et al., 1994; Ueda et al., 1992). 그러나 *Streptomyces hiroshimensis*과 Potato tubers(*Solanum tuberosum*)의 subtilisin inhibitor의 분자량의 경우 14,200, 21,000 Da인 monomer로 보고하였으며, 토양에서 분리한 *Streptomyces* sp. 경우 dimer로 이루어진 분자량이 28 kDa 인 것으로 보고하였다(Nitta et al., 2002; Revina, et al., 2004; Vernekar et al., 1999)

4. Subtilisin-like proteinase inhibitor의 이화학적 특성

4-1. 저해제의 온도 및 pH 안정성

Streptomyces thermocarboxydus C12가 생산하는 subtilisin-like proteinase inhibitor에 대한 온도 안정성을 조사하기 위해 30~70℃까지 30 min 동안 water bath에서 전처리한 후 잔존 저해활성을 측정한 결과 Fig. 18에서와 같이 50℃까지 활성을 유지하였으나 70℃에서는 60%의 저해활성을 가지고 있는 것으로 조사되었다. 이것은 *Streptomyces* sp. (NCIM 5127)은 40~95℃까지 열에 안정하다는 보고와 유사하였지만, *Streptomyces hiroshimensis*에서 생산하는 저해제의 경우 40~50℃에서 안정한 것과는 상이하였다(Vernekar et al., 1999; Nitta et al., 2002).

저해제의 pH 안정성을 검토하기 위하여 각 pH별로 제조한 buffer 용액에 37℃에서 12 hr 동안 전처리한 후 저해제의 잔존활성을 측정하였다. 그 결과, 중성 pH 6에서 강 염기성인 pH 10까지 저해활성이 80% 이상 유지

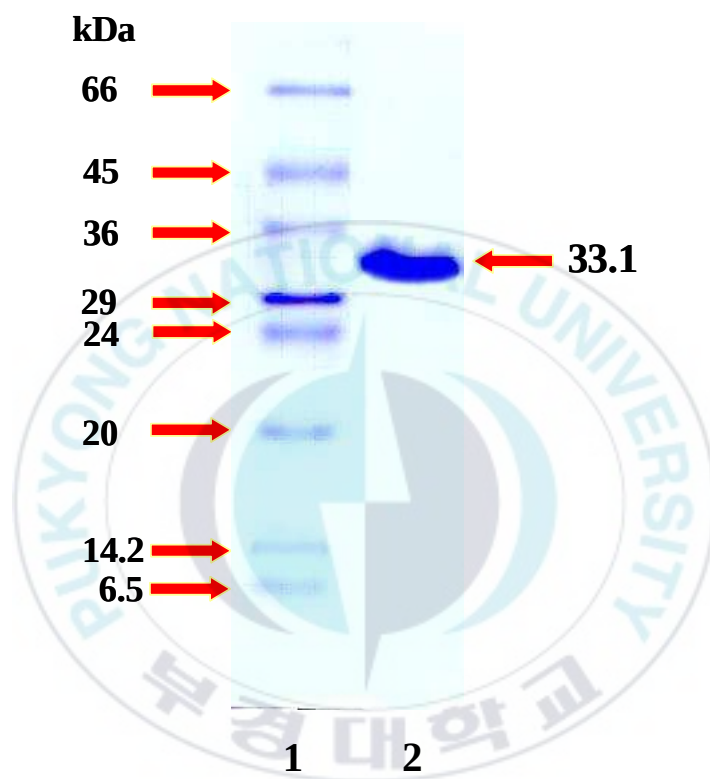


Fig. 17. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of purified subtilisin-like proteinase inhibitor. Lane 1, mark proteins: lane 2, purified inhibitor.

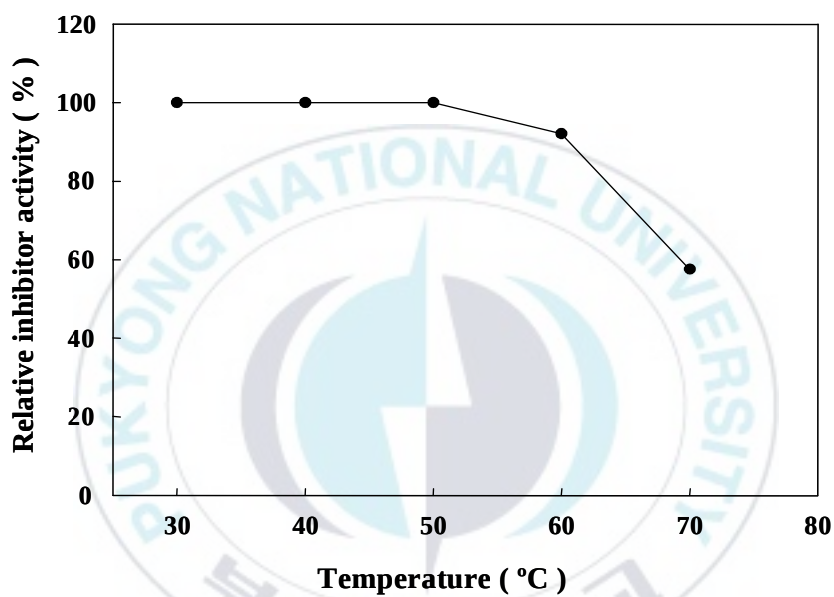


Fig. 18. Effect of temperature stability on the subtilisin-like proteinase inhibitor.

The inhibitor was preincubated at the various temperatures for 30 min.

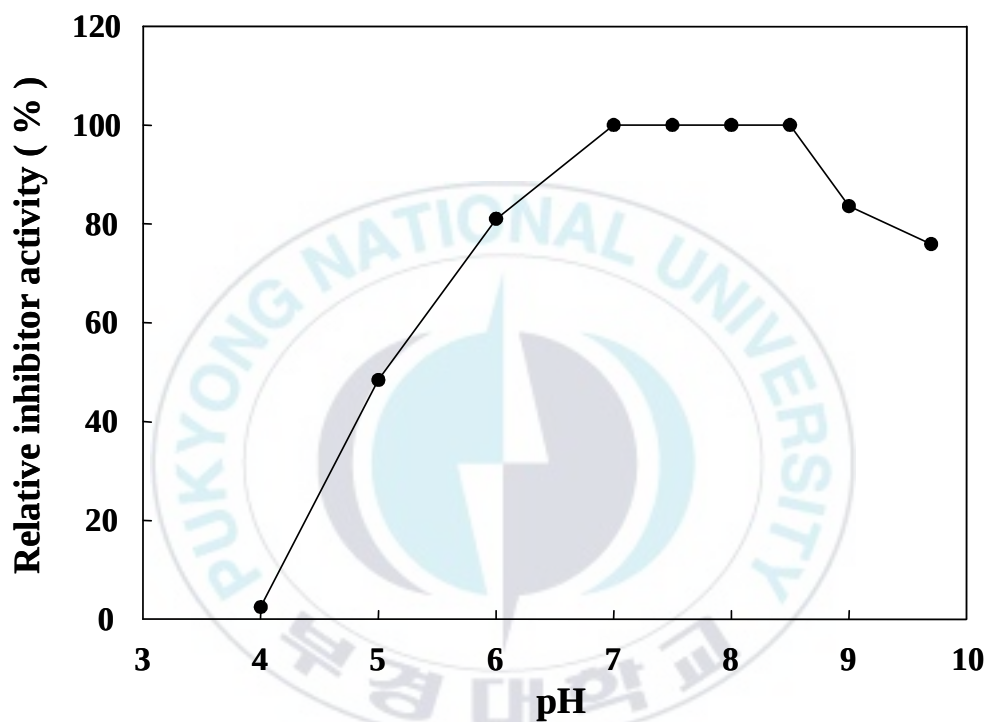


Fig. 19. Effect of pH stability on the subtilisin-like proteinase inhibitor.

To determine the pH stability of the inhibitor, the reactions were preincubated at the 37°C for 12 hr.

하였다(Fig. 19). 이것은 방선균 *Streptomyces* sp.에서 생산되는 저해제의 경우 pH 5~12 범위에서 안정하다는 보고와 유사하였다(Vernekar et al., 1999; Nitta et al., 2002; Pandhare et al., 2002). 이처럼 넓은 범위의 온도와 pH에서 저해제가 안정할 경우 해충과 병원균에 대해서 저항성에 대한 이식 유전자 조사나 환경 생물제재로 사용할 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 단백질성 저해제가 넓은 범위의 pH와 온도에서 안정한 것은 disulfide 결합이 존재하는 것으로 생각되어진다.

4-2. 저해제의 등전점

저해제의 등전점은 isoelectric focusing 전기영동으로 확인하였으며, subtilisin-like proteinase inhibitor의 pI 값은 4.4였다(Fig. 20). *Streptomyces* sp.에서 생산하는 alkaline protease inhibitor와 *Streptomyces albogriseolus* S-3253에서 생산하는 subtilisin inhibitor의 pI값은 각각 3.8, 4.7이다(Vernekar, et al., 1999; Murao and Sato, 1972,).

4-3. 금속이온의 영향

저해제에 대한 금속이온의 영향을 알아보기 위해 각종 금속이온 1 mM이 첨가된 buffer 용액에 37°C에서 30 min간 방치한 후 잔존 저해활성을 조사한 결과는 Table 14와 같다. K^+ 과 Mg^{2+} 의 존재하에서 다소 증가하였다. Ca^{2+} 의 경우 단백질 구조의 안정화에 관여하며, 열 불활성에 대해 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있지만(Donaghy and McKay, 1993; Häse and Finkelstein, 1993) 본 연구결과는 상이하였다.

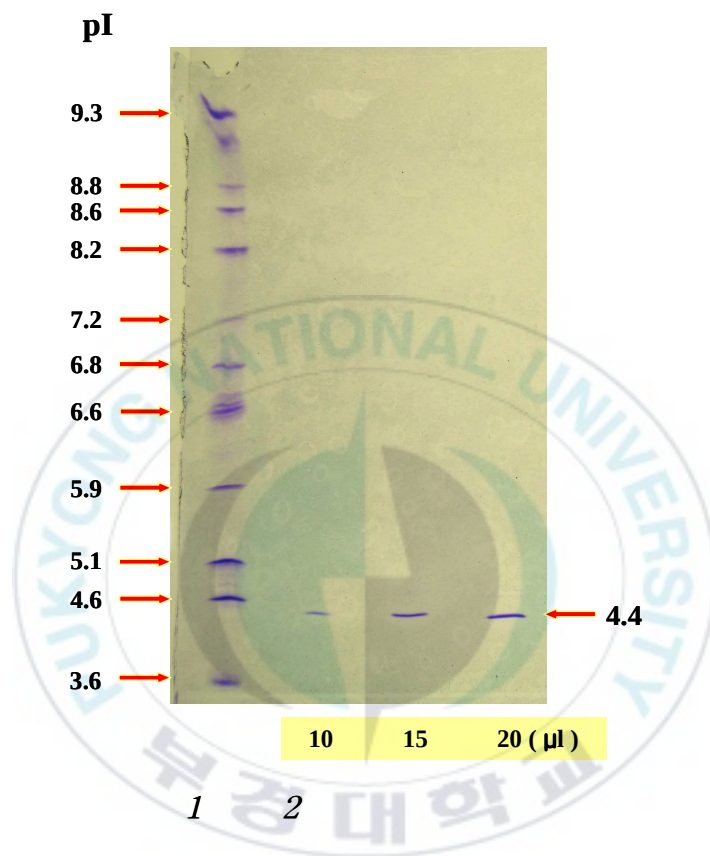


Fig. 20. Analytical thin-layer isoelectric focusing of the subtilisin-like proteinase inhibitor. Lane 1, Isoelectric focusing standards; lane 2, various concentration of purified inhibitor

Table 14. Effect of metal ions on the subtilisin-like proteinase inhibitor.

Metal ions (1mM)	Relative inhibitor activity (%)
Control	100.0
Cu ²⁺	78.1
Li ⁺	100.4
Ca ²⁺	99.7
Mg ²⁺	104.1
Mn ²⁺	96.7
Cd ²⁺	101.0
K ⁺	105.1

4-4. 여러 가지 단백질 분해효소에 대한 저해효과

Streptomyces thermocarboxydus C12에 생산된 저해물질을 여러 단백질 분해효소에 적용하여 저해율을 조사하였다. 실험에 이용한 단백질 분해효소는 *Vibrio vulnificus* CYK27H에서 생산되는 protease, collagenase I, II, III, IV, thermoase PC10, leucine amino peptidase, α -chymotrypsin(10 μ g/ml), proteinase K, subtilisin(100 μ g/ml)의 농도에서 조사하였다. 그 결과 serine protease 계열 중 proteinase K와 subtilisin에 대해서만 저해효과가 강하게 나타났다(Table 15). 특히, C12에서 생산된 저해물질을 70배 희석하여 subtilisin과 proteinase K에 대해서 저해활성을 측정하였다. 그 결과 subtilisin에 대해서 저해효과가 동일하게 유지되었지만, proteinase K에 대해서는 20.4%의 저해효과가 나타났다(data not shown). 이러한 결과로 미루어 볼 때 strain C12에서 생산되는 저해물질은 subtilisin만을 특이적으로 저해작용을 가진 *Streptomyces* subtilisin inhibitor(SSI)인 것으로 판단된다.

4-5. Subtilisin에 대한 inhibitor의 kinetics

정제된 inhibitor의 subtilisin에 대한 저해형태를 알아보기 위하여 기질 농도(0.25~2.0 mg)를 달리하면서 저해효과를 측정하였다. 그 결과, 기질을 증가시켜 저해제를 첨가한 것과 첨가하지 않았을 때 K_m 은 변하지 않고 V 만 감소하므로 비경쟁적 저해인 것으로 나타났다. K_m 값은 2.67 mg, V_{max} 15.33 unit이다(Fig. 21).

4-6. 아미노산 조성분석

단백질성 저해제를 110℃에서 24 hr 동안 12 N HCl 용액에서 산 가수분해한 후, Micro-cenVac (N-Biotec, Inc, Korea)에서 염산을 완전히 휘발시켰다.

Table 15. Activity of the purified inhibitor against a various proteases.

Proteases ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition (%)
Collagenase type I,II,III,IV (>10)	0.0
Thermoase PC10 (>10)	0.0
α - chymotrypsin (>10)	0.0
Leucine amino peptidase (>10)	0.0
Subtilisin (>100)	100.0
Proteinase K (>100)	100.0
Metalloprotease ¹⁾ (>10)	0.0

¹⁾ Protease produced by *Vibrio vulnificus* CYK 279H

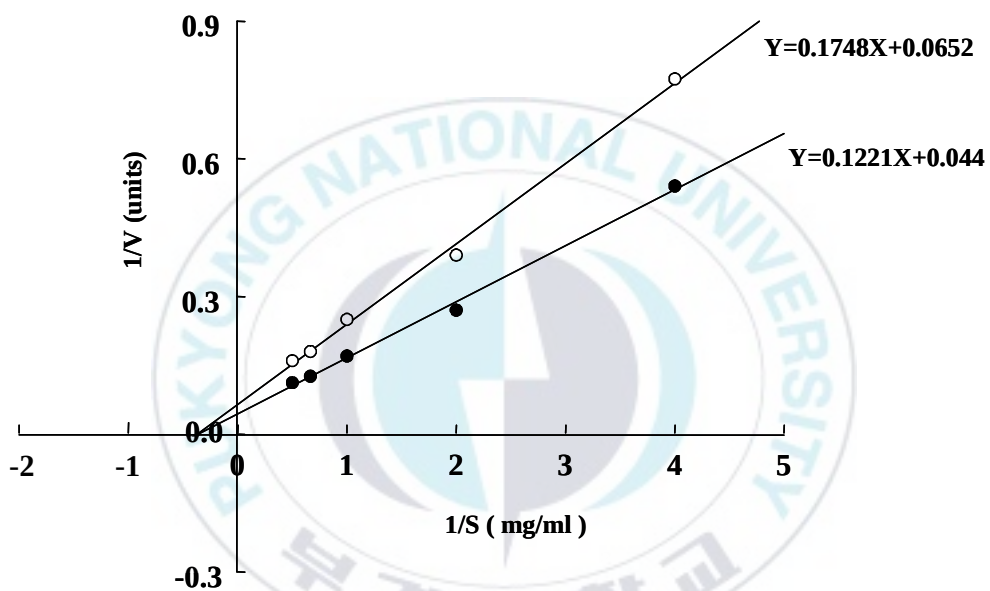


Fig. 21. Lineweaver-Burk plot of the subtilisin-like proteinase inhibitor.

●: In the absence inhibitor ○: In the presence inhibitor

아미노산 분석은 아미노산 자동 분석기 (Biochrom, Inc, Korea)로 분석하였다. 저해제를 구성하는 아미노산의 수는 저해제의 분자량을 기초로 하여 각 아미노산 peak 면적비로부터 계산하였다(Table 16). 본 저해제의 전체 아미노산 조성 중 Ser, Ala의 잔기 수가 비교적 많았으며, Met, Ile, His, Lys의 잔기 수가 적은 것으로 조사되었다. *Streptomyces* sp.에서 생산된 SI-1-72 저해제의 경우 Glu, His, Arg의 함량이 많은 것과 Val, Ala의 함량이 낮은 것과는 상이하였다(Kourteva and Boteva, 1989). 이것은 자유 thiol 기가 존재하지 않거나, -S-S결합을 소유하지 않기 때문인 것으로 사료된다.

4-7. N-terminal sequence 분석

정제된 단백질성 저해제의 아미노산 서열분석은 질량분석기 Ettan MALDI-TOF (Amersham bioscience)를 사용하였다. Target plate 상에 적혀져 있는 단백질 단편들을 337 nm의 N₂ laser 조사에 의해 기화하였다. 300 laser shots의 누적 peaks에 의해 각각의 단백질 spot에 대한 mass spectrum을 구하였다. 단백질 서열 분석 후 동정을 위하여 PepFrag 검색엔진 (<http://prowlrockefeller.edu/prowl/pepfrag.html>), SWISS-PROT 및 BLAST의 data bank에 자료들과 비교시에 이용하였다. 확인된 N-terminal sequence는 DAPSALYAPSALVLTVGKGVSAT이었다(Fig. 22). 기존에 보고된 식물 및 미생물에서 발견된 subtilisin inhibitor의 N-terminal의 partial sequence (1~23 residue)는 Table 17의 경우 *Streptomyces albogriseolus*에서 생산하는 subtilisin inhibitor의 homology가 100% 일치하였다. 하지만, *Streptomyces albogriseolus*의 경우 분자량이 11,487 Da이며 strain C12에서 생산되는 저해제의 경우는 분자량이 33,100 Da이므로 전체 아미노산을 조사할 경우 다른 물질일 것으로 사료된다. 그리고 strain C12에서 생산되는 저해제는 *Streptomyces* subtilisin inhibitor(SSi)인 것으로 조사되었다.

Table. 16. Amino acid composition of the subtilisin-like proteinase inhibitor from *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

Amino acid	Amount, (nM)	Residues
Aspartic acid	333.8	20
Threonine	279.1	17
Serine	512.0	31
Glutamic acid	164.8	10
Proline	360.6	22
Glycine	365.7	22
Alanine	582.0	36
Cystein	279.6	17
Valine	319.7	20
Methionine	86.4	5
Isoleucine	88.8	5
Leucine	302.8	19
Tyrosine	124.8	8
Phenylalanine	130.2	8
Histidine	89.7	6
Lysine	88.7	5
Arginine	148.7	9

Table 17. N-terminal sequence of subtilisin-like protease inhibitor and comparison with that of other subtilisin inhibitor.

Strain	N-terminal sequence	Reference
<i>S. thermocarboxydus</i> C12	DAPSALYAPSALVLTVGKGVSAT	This study
<i>S. albogriseolus</i>	DAPSALYAPSALVLTVGKGVSATTAAPERA	Ikenaka, et al., 1974
<i>S. virginiae</i>	SLYAPSAMVFSVAQGDDVAAPT VVRATTVS	Terabe, et al., 1994
<i>S. lividans</i>	SLYAPSALVLTVGHGESAATAAPLRVTLTCAP	Ueda, et al., 1992
<i>S. longisporus</i>	ASLYAPSALVLTVGHGTSAAAATPLRAVTLN	Strickler, et al., 1992
<i>S. cacaoi</i>	SLYAPSAVVISK TQGASA-DAPAQRAVTLRCL	Kojima, et al., 1994
<i>S. parvulus</i>	TAPASLYAPSALVLTIGQGESAATSPLRAVTL	Taguchi, et al., 1993

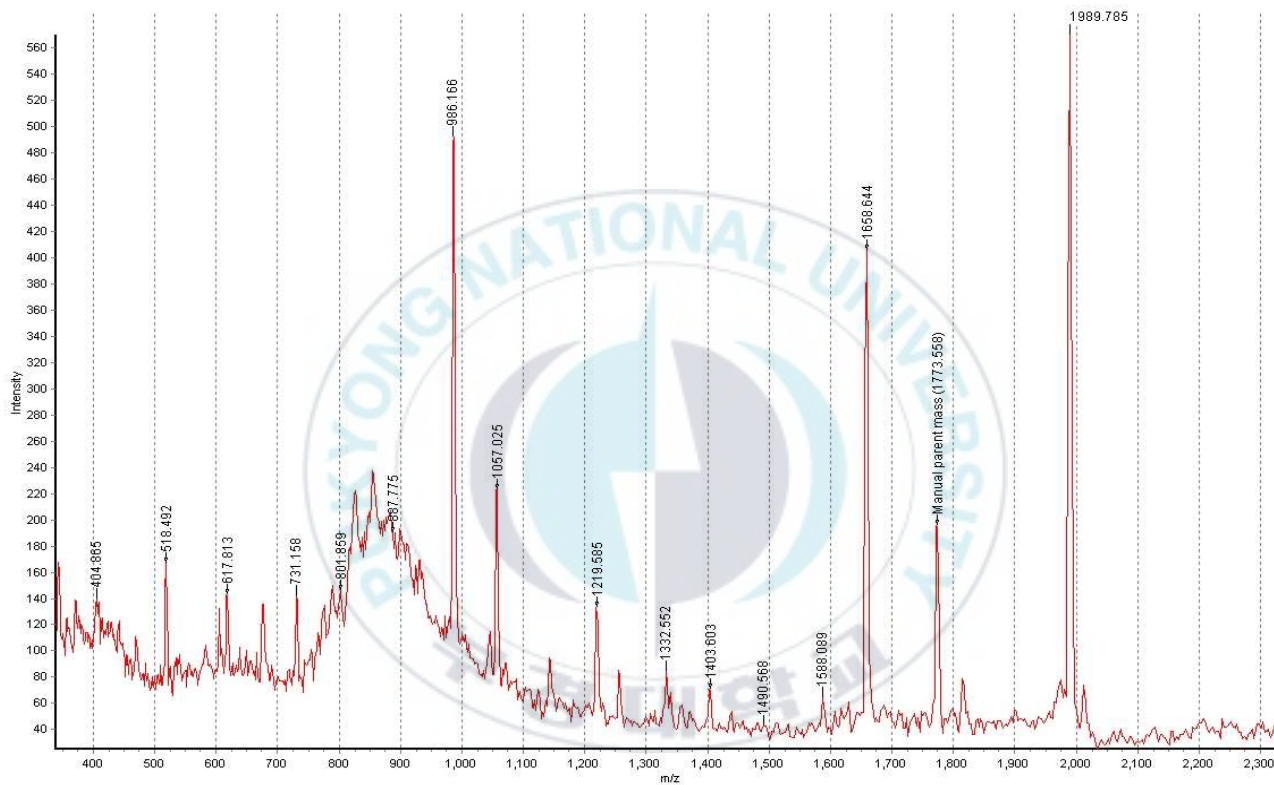


Fig. 22. Ettan MALDI-TOF of subtilisin-like proteinase inhibitor purified from *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

4-8. 식품급 저해제와 저해율 비교

식품 저해제로써 응용 가능한지를 조사하기 위해 식품에서 가장 많이 사용되는 pork plasma protein과 egg white type p-39를 농도별로 (0.1~1.0%) subtilisin(0.1 mg/ml)과 proteinase K(0.1 mg/ml)에 적용하여 저해율을 조사하였다(Table 18). 그 결과 proteinase K 보다 subtilisin에 대해서 저해율이 높았으며, pork plasma protein 보다 egg white type p-39의 저해효과가 좋았다. 그러나, *Streptomyces thermocarboxydus* C12에서 생산된 subtilisin-like proteinase inhibitor보다 두 단백질의 저해효과는 상당히 낮은 것으로 조사되었다. 따라서, 방선균에서 생산된 저해물질이 *in vivo*, *in vitro* 실험에서 무해할 경우 식품 저해제로써 사용 가능할 것으로 판단된다.



Table 18. Comparision of food inhibitor and subtilisin-like proteinase inhibitor produced at the *Streptomyces thermocarboxydus* C12.

Substrate	Protein conc. (mg/ml)	Subtilisin inhibition (%)	Proteinase K inhibition (%)
Pork protein	1.63	1.94	0
	4.73	16.3	10.5
	9.89	61.7	14.7
Egg white	0.78	16.7	14.5
	3.43	100	47.2
	8.39	100	95.8
Subtilisin-like proteinase inhibitor	0.54	100	100
	0.006	100	35

제 4 장 결 론

남해 해안의 갯벌 또는 해수에서 탐색한 해양미생물을 starch-casein nitrate, humic acid-vitamin, M1, arginin-glyceol 배지에 적용하여 미생물 및 방선균을 약 1,000여 균주를 분리하였다. 분리한 균주는 멸균된 인공해수에 희석하여 도말하였다. 도말 배지는 4~6주 동안 27℃에서 배양하였다. 배양 분리한 균주를 단백질 분해효소 저해제로써 plate assay에 적용한 결과, serine protease 계열인 subtilisin과 proteinase K에 대하여 9균주에서 저해효과가 나타났으며, 이 균주들을 1차 선별하였다. 선별된 균주는 액체배양을 통하여 paper disk방법으로 2차 선별하였으며, 최종적으로 ninhydrin 방법으로 활성이 가장 높은 strain C12를 선별하였다.

선별된 균주의 경우 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 제안된 International Streptomyces Project(ISP)에 의한 방법으로 조사한 결과, . 균주 C12는 전자현미경에 의해 간균형태이며, 운동성이 없고, 표면이 smooth한 type의 그람양성 인 방선균으로 확인되었다. 배양학적 특성에서 ISP 9 배지를 제외한 모든 배지에서 성장하였으며, 색소를 생산하지 않았다. 그리고 catalase 양성반응, starch, gelatin 및 casein에 대해서 분해한 것을 확인하였다. 또한, 균주 C12의 경우 50℃까지 성장하였으며, homology가 유사한 균주의 경우 42℃까지 성장하는 것으로 보고되었다. 일반적으로 해양세균은 2~3%의 염에서 성장하는 것으로 알려져 있지만, C12 균주는 NaCl 9%의 고농도에서도 성장 가능한 것으로 확인되었다. 보다 정확한 균주명을 알고자 16S rDNA sequence 분석을 통해 19번부터 1423번 까지 부분서열을 BLAST program에 의해 비교한 결과, *Streptomyces thermocarboxydus*의 homology와 100% 일치하므로, *Streptomyces thermocarboxydus*로 동정되었다. 따라

서, 이 균주를 *Streptomyces thermocarboxydus* C12로 명명하였다.

균주 C12에서 생산되는 subtilisin-like proteinase inhibitor의 생산량 및 저해활성을 증가시키기 위해 최적배양조건을 검토하기 위해 온도, 초기 pH, 탄소원, 질소원, 무기염, NaCl로 실행하였다. 그 결과, 40℃, 배양초기 pH 8.0, 1.6% galactose, 0.5% proteose peptone, 1% NaCl, 1 mM LiCl였으며 60 hr 배양 후 최대활성이 나타내는 것으로 확인되었다. 최적배양전 subtilisin(0.1 mg/ml)을 저해하였을 때 활성은 33%였으나, 최적배양 후 동일농도의 subtilisin은 완전 저해되는 것으로 나타났다.

이러한 결과를 바탕으로 저해물질을 분리·정제하였다. 정제는 ammonium sulfate, DEAE Sepharose CL-6B, Superdex 200 column으로 specific activity 35,620.6 U mg⁻¹, yield 20.7 %, 119.9 fold로 정제하였다. Native 전기영동에서는 단일 band로 나타났다. SDS-PAGE로 측정된 저해제의 분자량은 33.1 kDa monomer이었고, 등전점은 4.4에 해당하였다.

저해제의 물리·화학적 특성에서는 70℃에서 30 min 전처리한 후에 60%의 저해활성을, pH 6~10범위에서는 80% 이상의 저해활성이 유지되었다. Subtilisin에 대한 저해형태는 비경쟁적 저해로 나타났으며, K_m 값과 V_{max} 는 각각 2.67mg. 15.33 unit였다. Subtilisin-like proteinase inhibitor의 N-terminal sequence는 DPSALYAPSALVLTVGKGVSAT였다. 이 Sequence는 *Streptomyces albogriseolus*에서 생산되는 *Streptomyces* subtilisin inhibitor (SSI)와 일치하는 것으로 조사되었다. *Streptomyces thermocarboxydus* C12에서 생산된 subtilisin-like proteianse inhibitor의 아미노산 조성분석의 경우 Ser, Ala의 함량이 높았으며, Met, Ile, His, Lys의 함량이 낮은 것으로 조사되었다. Subtilisin-like proteinase inhibitor를 식품급 저해제로 적용 가능한지

조사하였다. 비교 대조군은 상업적 저해제로 사용되는 pork plasma protein과 egg white type p-39이며, 단백질 농도로 subtilisin에 대해 저해율을 비교하였다. 그 결과 subtilisin에 대하여 pork plasma protein과 egg white type p-39보다 1,648.3, 571.6배의 저해효과가 있었다.



감사의 글

지난 6년 동안 학문수양에 도움을 주시며 지금의 박사논문이 완성되기까지 세심한 배려를 해주신 공재열 교수님께 머리 숙여 진심으로 감사드립니다.

부족한 논문이 완성되기까지 조언과 충고로 도움을 주신 경성대 류병호 교수님, 부경대 박남규 교수님, 전남대 김종덕 교수님께 감사드리며, 항상 옆에서 실험 완성도를 높이기 위해 지난 4개월 동안 지도해 주신 경상대 최영준 교수님께 진심으로 감사드립니다.

학위과정 중 여러모로 도움을 주신 공인수 교수님, 김중균 교수님, 이형호 교수님, 김성구 교수님, 홍용기 교수님께 감사드립니다.

항상 후배들의 앞날을 걱정하시며, 추운 겨울날인데도 불구하고 술선수범하여 도움을 주신 김민용 교수님, 강양순 박사님께 감사드립니다.

매일 전화주시며 후배를 챙겨주신 김학주 박사님, 임동중 박사님께 감사드립니다.

먼 타국에서 애정어린 관심과 격려해주신 김봉조 박사님, 하순득 박사님, 장재혁 박사님, 황선희 박사님, 이경미 박사님께 감사드립니다.

박사과정 중 실험이 무난하게 마치게끔 근심과 격려 해주신 부산대학교 이태호 교수님, 손홍주 교수님께 감사드립니다.

경상대에서 실험하는 동안 물신양면으로 많이 도와준 허성익, 최경임, 추양재, 신창호, 김현섭, 임형수, 윤보영, 윤소미, 한병욱 후배님께 감사드리며, 마지막 실험에서 나에게 미소를 띄게끔 도와준 홍유미 후배님께 감사드립니다.

2005년 추운겨울 군주탐색 차 여수 방문시 우리를 따뜻하게 맞이해 준 세영, 종권, 명진 후배님께 감사의 마음을 전합니다.

석·박사과정 중 서로에게 격려와 용기를 내어 여기까지 오게끔 버팀목이 되어준 장영부 동기님, 전병진, 김영문, 조은희 후배님께 감사드립니다.

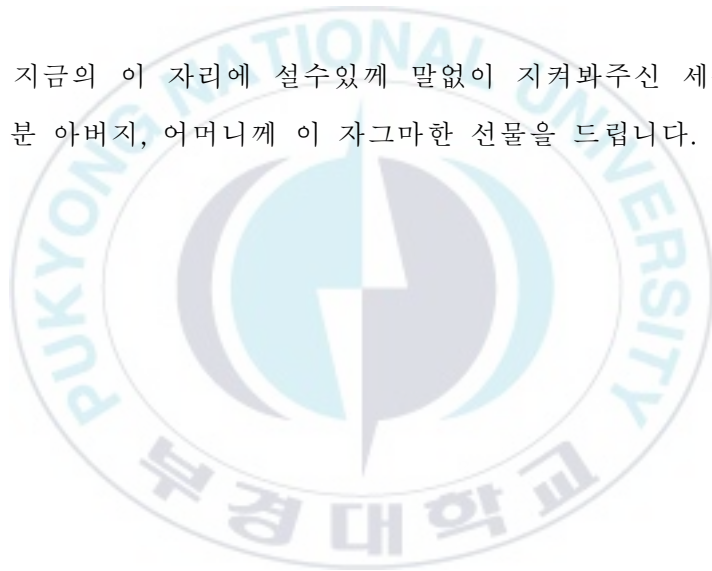
언제나 우정이란 단어로 널 변하지 않고 날 격려해준 친구들 김종수, 박년진, 신원혁, 박종춘, 김성준, 김성곤에게 감사드립니다.

어릴 때부터 친 자식처럼 돌보며 항상 큰 힘이 되어주신 부모님과 같은 이모, 이모부님께 감사드립니다.

같은 전공을 걸어오며 격려해준 외사촌 동생 김대현 박사님께 고마움을 표합니다.

동생이 고집부려 하고픈 일이라면 뭐든지 도와준 누나 숙정, 항상 편안하게 되해준 자형, 형이 가는 길이 잘 되기만을 말없이 봐라보던 동생 성호에게 감사합니다.

마지막으로 지금의 이 자리에 설수있게 말없이 지켜봐주신 세상에서 가장 사랑하는 두 분 아버지, 어머니께 이 자그마한 선물을 드립니다.



참 고 문 헌

Aoyagi, T. 1990. Small molecular protease inhibitors and their biological effects. p. 312-363. *In* H. Kleinkauf & H. Dohren (eds.), *Biochemistry of Peptide Antibiotics*, Walter de Gruyter, Berlin.

Aoyagi, T., M. Ishizuka, T. Takeuchi and H. Umezawa. 1977. Enzyme inhibitors in relation to cancer therapy. *J. Antibiot.* **30**: 121-132.

Aoyagi, T., T. Takeuchi, A. Matsuzaki, K. Kawamura, S. Kondo, M. Hamada, K. Maeda and H. Umezawa. 1969. Leupeptins, new protease inhibitors from *Actinomyces*. *J. Antibiot.* **22**: 283-286.

Ardelt, W. and M. Laskowski, Jr. 1985. Tukey ovomucoid third domain inhibits eight different serine proteinases of varied specificity on the same...Leu¹⁸-Glu¹⁹...reactive site. *Biochemistry* **24**: 5313-5320.

Bode, W. and R. Huber. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* **204**: 433-451.

Bowman, D. E. 1946. Differentiation of soy bean antitryptic factor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **63**: 547-550.

Cechova, D. 1976. Trypsin inhibitor from cow colostrum. *Methods in Enzymology.* **45**: 806-813.

Choi, H. J., M. J. Jung and Y. K. Jeong. 2002. Optimization of the production of an immunostimulant from a marine bacterium. *Kor. J. Life Sci.* **12**: 759-764.

Demuth, H. U. 1990. Recent developments in inhibiting cysteine and serine proteases. *J. Enzym. Inhib.* **3**: 249-278.

Donaghy, J. A. and A. M. McKay. 1993. Production and properties of an alkaline protease by *Aureobasidium pululans*. *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 662-666.

Estell, D. A. and M. Laskowski, Jr. 1980. Dermasterias imbricata trypsin 1: An enzyme which rapidly hydrolyzes the reactive-site peptide bonds of protein trypsin inhibitors. *Biochemistry* **19**: 124-131.

Faucher, D. C., Y. Lelievre and T. Cartwright. 1987. An inhibitor of mammalian collagenase active at micromolar concentrations from an actinomycete culture broth. *J. Antibiot.* **40**: 357-359.

Fukuhara, K. I., M. Katsura and S. Murao. 1982. Purification and some properties of Talopeptin (MK-1), a novel proteinase inhibitor produced by *Streptomyces mozunensis* MK-23. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1707-1710.

Gerhardt, P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg and G. B. Phillips. 1981. Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Glaser, C. B. and L. Karic. 1978. Spectral studies on two genetic forms of

the human serum proteinase inhibitor, alpha-1-antitrypsin. *Int. J. Pept. Protein Res.* **12**: 284-292.

García-Carreño, F. L. 1996. Proteinase inhibitors. *Trends Food Sci. Technol.* **7**: 197-204.

Ham, W. E. and R. M. Sandstedt. 1944. A proteolytic inhibiting substance in the extract from unheated soy bean meal. *J. Biol. Chem.* **154**: 505-506.

Hanada, K., M. Tamai, M. Yamagishi, S. Ohmura, J. Sawada, I. Tanaka. 1978. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 523-528.

Hartley, B. S. 1960. Proteolytic enzyme. *Annu. Rev. Biochem.* **29**: 45-72.

Häse, C. C. and R. A. Finkelstein. 1993. Bacterial extracellular zinc-containing metalloprotease. *Microbiol. Rev.* **57**: 823-837.

Höyen, T. and A. Skulberg. 1962. Trypsin inhibitors produced by *Clostridium botulinum* cultures. *Nature* **195**: 922-923.

Ikenaka, T., S. Odani, M. Sakai, Y. Nabeshima, S. Sato and S. Murao. 1985. Amino acid sequence of an alkaline proteinase inhibitor (*Streptomyces* subtilisin inhibitor) from *Streptomyces albogriseolus* S-3253. *J. Biochem.* **76**: 1191-1209.

Kang, S. I., Y. M. Kim, Y. B. Jang, D. J. Lim and J. Y. Kong. 2004. The optimal culture condition for the collagenolytic protease production from

- Vibrio vulnificus* CYK279H. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **19**: 295-300.
- Kim, I. S., H. T. Kim, H. S. Lee and K. J. Lee. 1991. Protease inhibitor production using *Streptomyces* sp. SMF13. *J. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 288-292.
- Kojima. S., M. Terabe, S. Taguchi, H. Momose, and K. Miura. 1994b. Primary structure and inhibitory properties of a proteinase inhibitor produced by *Streptomyces cacaoi*. *Biochem. Biophys. Acta.* **1207**: 120-125.
- Kourteva, Y and R. Boteva. 1989. A novel extracellular subtilisin inhibitor produced by a *Streptomyces* sp. *FEBS Lett.* **247**: 468-470.
- Kreig, N. R. and J. G. Holt. 1989. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. IV, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Kunimoto, S., T. Aoyagi, H. Morishima, T. Takeuchi and H. Umezawa. 1972. Mechanism of inhibition of pepsin by pepstatin. *J. Antibiot.* **25**: 251-255.
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties. *J. Gen. Physiol.* **30**: 291-310.
- Kunitz, M. 1947. Isolation of a crystalline protein compound of trypsin and of soybean trypsin-inhibitor. *J. Gen. Physiol.* **30**: 311-320.
- Kunitz, M. and J. H. Northrop. 1936. Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. *J. Gen. Physiol.* **19**: 991-1007.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Laskowski, M. 1955. Naturally occurring trypsin inhibitors. *Methods in Enzymology*. **2**: 36-54.

Laskowski, M., Jr. and I. Kato. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* **49**: 593-626.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

Macfaddin, J. F. 1980. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland.

Mala, B. R., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge and V. V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Bio. Rev.* **62**: 597-635.

Miyairi, K., A. Ogasawara, A. Tonouchi, K. Hosaka, M. Kudou and T. Okuno. 2004. Low-molecular-weight pectate lyase from *Streptomyces thermocarboxydus*. *J. Appl. Glycosci.* **51**: 1-7.

Moore, S. and W. H. Stein. 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* **176**: 367-388.

Murao, S and S. Sato. 1972. S-SI, a new alkaline protease inhibitor from *Streptomyces albogriseolus* S-3253. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 160-163.

Murao, S., S. Sato and N. Muto. 1972. Isolation of alkaline protease inhibitor producing microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 1737-1744.

Murao, S. and Satoi, S. 1970. New Pepsin Inhibitors (S-PI) from *Streptomyces* EF-44-201. *Agric. Biol. Chem.* **34**: 1265-1267.

Murao, S. and S. Sato. 1972. S-SI, a new alkaline protease inhibitor from *Streptomyces albogriseolus* S-3253. *Agri. Biol. Chem.* **36**: 160-163.

Murao, S. and T. Watanabe. 1978. Isolation and identification of microorganism, producing microbial alkaline proteinase inhibitor (MAPI). *Agric. Biol. Chem.* **42**: 2209-2215.

Nitta, M., M. Goto, N. Shibuya, and Y. Okawa. 2002. A novel protein with alkaline phosphatase and protease inhibitor activities in *Streptomyces hirosimensis*. *Bio. Pharm. Bull.* **25**: 833-836.

Nunokawa, Y., Y. Namba and S. Watanabe. 1961. A study of the rice koji protease. *J. Soc. Brew.* **53**: 930-933.

Pandhare, J., K. Zog, V. V. Deshpande. 2002. Differential stability of alkaline protease inhibitors from actinomycetes: effect of various additives on thermostability. *Bioresour. Technol.* **84**: 165-169.

Park, S. K., N. K. Sung and S. W. Lee. 1989. Production and purification

of pepsin inhibitor from *Actinomyces* GF 155-2. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 121-125.

Peckman, E. V. 1951. *Aspergillus* proteinase. *Biochemistry* **5**: 321-325.

Pubols, M. H., D. C. Bartelt and L. J. Greene. 1974. Trypsin inhibitor from human pancreas and pancreatic juice. *J. Biol. Chem.* **249**: 2235-2242.

Quast, U., J. Engel, E. Steffen, H. Tschesche and S. Kupfer. 1978. Stopped-flow kinetics of the resynthesis of the reactive site peptide bond in Kallikrein inhibitor (Kunitz) by β -trypsin. *Biochemistry* **17**: 1675-1682.

Read, J. W. and L. W. Haas. 1938. Studies on the baking quality of flour as affected by certain enzyme action. Part V. Further studies concerning potassium bromate and enzyme activity. *Cereal Chem.* **15**: 59-68.

Read, R. J. and M. N. G. Jaes. 1986. "Introduction to the Protein Inhibitors: X-ray crystallography" in "Proteinase Inhibitors", A. J. Barrett. and G. S. Salvesen, eds., Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, p. 301.

Read, R. J., M. Fujinaga, A. R. Sielecki and James, M. N. G. 1983. Structure of the complex of *Streptomyces griseus* protease B and the third domain of the Turkey Ovomucoid inhibitor at 1.8-Å resolution. *Biochemistry.* **22**: 4420-4433.

Revina, T. A., A. S. Speranskaya, G. V. Kladnitskaya, A. B. Shevelev and T. A. Valueva. 2004. Subtilisin protein inhibitor from potato tubers. *Biochemistry (Moscow).* **69**: 1345-1352.

Righetti, P. G. 1989. Protein structure; A practical approach, T.E. Creighton, ed. IRL press. p 23~63. Oxford.

Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.

Shimada, K. and K. Matsushima. 1969. A protease inhibitor from *Penicillium cyclopium* part I. Purification and partial characterization. *Agric. Biol. Chem.* **33**: 544-548.

Shimada, K. and K. Matsushima. 1969. A protease inhibitor from *Penicillium cyclopium* part III. The mode of action of the inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* **34**: 47-52.

Strickler, J. E., T. R. Berka, J. Gorniak, J. Fornwald, R. Keys, J. J. Rowland, M. Rosenberg and D. P. Taylor. 1992. Two novel *Streptomyces* protein protease inhibitors. purification, activity, cloning, and expression. *J. Biol. Chem.* **267**: 3236-3241.

Suda, H., T. Aoyagi, T. Takeuchi and H. Umezawa. 1973. A thermolysin inhibitor produced by *Actinomycetes*: Phosphoramidon. *J. Antibiot.* **26**: 621-623.

Taguchi, S., H. Kikuchi, S. Kojima, I. Kumagai, T. Nakase, K. I. Miura and H. Momose. 1993. High frequency of SSI-like protease inhibitors among *Streptomyces*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 522-524.

Takahashi, H., S. Iwanaga and T. Suzuki. 1974. Distribution of proteinase inhibitors in snake venoms. *Toxicon*. **12**: 193-197.

Takahashi, T. and Tang, J. 1981. Methods in Enzymology, **80**: 565-581.

Tanaka, S. 1992. Fermentation processes in screening for new bioactive substances. p. 303-326. In S. Omura (ed.). The search for bioactive compound from microorganism. Springer-Verlag, New York.

Tanzawa, K., M. Ishii, T. Ogita and K. Shimada. 1992. Matlystatins, new inhibitors of type IV collagenases from *Actinomadura altrammentaria*. II. Biological activities. *J. Antibiot.* **45**: 1733-1737.

Terabe, M., S. Kojima, S. Taguchi, H. Momose and K. I. Miura. 1994. Primary structure and inhibitory properties of a subtilisin- chymotrypsin inhibitor from *Streptomyces virginiae*. *Eur. J. Biochem.* **226**: 627-632.

Terashita, T., M. Kono, and S. Murao. 1980. Promoting effect of S-PI on fruiting of *Lentinus edodes*. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* **21**: 137-140.

Tschesche, H., T. Diet, R. Marx and H. Fritz. 1972. Nex polyvalent protease inhibitors for trypsin, chymotrypsin, plasmin and kallikreins from snails (*Helix pomatia*). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**: 483-486.

Tsuchiya, K. and T. Kimura. 1978. Production of trypsin inhibitor by a *Cephalosporium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 631-635.

Ueda, Y., S. Kojima, K. Tsumoto, S. Takeda, K. Miura and I. Kumagai.

1992. A protease inhibitor produced by *Streptomyces lividans* 66 exhibits inhibitory activities toward both subtilisin BPN' and trypsin. *J. Biochem.* **112**: 204-211.

Umezawa, H. 1972. Enzyme inhibitors of microbial origin, p. 1-114. University of Tokyo Press, Tokyo.

Umezawa, H. and Aoyagi, T. 1973. The Structure of Chymostatin, A Chymotrypsin Inhibitor. *J. Antibiot.* **26**: 625-646.

Umezawa, S., K. Tatsuta, K. Fujimoto, T. Tsuchiya and H. Umezawa. 1972. Structure of antipain, a new Sakaguchi-positive product of *Streptomyces*. *J. Antibiot.* **25**: 267-270.

Vernekar, J. V., M. S. Ghatge and V. V. Deshpande. 1999. Alkaline protease inhibitor: A novel class of antifungal proteins against Phytopathogenic fungi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**: 702-707.

Vincent, J-P. and M. Lazdunski. 1972. Trypsin-pancreatic trypsin inhibitor association. Dynamics of the interaction and role of disulfide bridges. *Biochemistry* **11**: 2967-2977.

Vogel, R., I. Trautschold and E. Werle. 1968. Natural proteinase inhibitors, Academic Press, New York; translation of Natrliche Proteinasen-Inhibitoren. 1966. G. Thieme, Stuttgart.