

Bacillus licheniformis NS115가 생산하는 Glutamyl Aminopeptidase의 특성

박미자^{1,2} · 이정기¹ · 김종우² · 남희섭³ · 오태광^{1*}

¹생명공학연구소 미생물효소RU, ²충남대학교 낙농학과,
³(주)농심 상품개발연구소

Characterization of a Glutamyl Aminopeptidase from *Bacillus licheniformis* NS115. Park, Mi-Ja^{1,2}, Jung-Kee Lee¹, Jong-Woo Kim², Hee-Sop Nam³, and Tae Kwang Oh^{1*}. ¹Microbial Enzyme Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O.Box 115, Yusung, Taejeon 305-600, Korea, ²Department of Dairy Science, Graduate School, Chung-Nam National University, Taejeon 305-764, Korea and ³Nong Shim Co., Ltd., Kyung-Ki 430-030, Korea - An extracellular glutamyl aminopeptidase (EC 3.4.11.7) producing bacterium was isolated from soil and identified as *Bacillus licheniformis* based on its morphological and physiological characteristics. The aminopeptidase was purified to homogeneity by ammonium sulfate precipitation, Phenyl Sepharose, Resource Q, and Superose 12 column chromatographies. The specific activity of the purified aminopeptidase was 9.2 unit/mg for glutamyl *p*-nitroanilide with 17.6 purification folds. The purified aminopeptidase had an estimated molecular mass of 64 kDa consists of two different subunits (42 kDa and 22 kDa), and its isoelectric point was 5.2 measured by isoelectric focusing. The optimum pH and temperature of the aminopeptidase were 8.0 and 55°C, respectively. The aminopeptidase was inhibited by EDTA and 1,10-phenanthroline, suggesting it be a metalloenzyme. Comparing with other aminopeptidase, the enzyme showed relatively high activity against peptide having glutamic acid as N-terminal.

Key words: *Bacillus licheniformis*, glutamyl aminopeptidase, purification

Aminopeptidase는 생물체내에 다양하게 존재하며, 기질에 대한 특이성에 따라 분류하면, aminopeptidase M 혹은 N(AP-M, 혹은 AP-N, EC 3.4.11.2)은 peptide N 말단에 존재하는 중성 아미노산을 제거하는 효소로 그 활성 부위에 Zn을 갖는 metalloenzyme을 말하며[2, 5], aminopeptidase P는 oligoproline을 가수분해할 수 있는 능력의 효소이며[9, 15, 19], aminopeptidase Y는 yeast vacuoles로부터 분리하여 정제된 효소이고[20], aminopeptidase A(AP-A, EC 3.4.11.7)는 N말단에 산성 아미노산인 glutamic acid와 aspartic acid에 특이적으로 반응하는 효소로서, AP-M과 동일하게 활성부위에 Zn을 갖는 metalloenzyme이다[1, 8]. 이런, 다양한 aminopeptidase는 동물의 경우, 생체내에서 호르몬과 세포내 신경전달을 수행하는 enkephalin, kinin, tachykinin, substance P 등 저분자 peptide에 관여하여 bioactive peptides를 분해하는 역할을 하며[10], Menrad 등[14]은 human melanoma 암세포 전이과정에서 암세포 침윤에 이 효소가 관여한다고 보고하였다. 식품에서의 aminopeptidase는 allergenic 단백질 식품이나 유아용 조제 분유의 알레르기 억제에 관여하며, Nunez[7]등은 치즈

숙성시 숙성의 가속화와 치즈의 풍미형성에 크게 기여하고 있다고 보고 하였다. 치즈 숙성중에 기호도와 숙성도의 지표인 아미노산 증가는 주로 starter 유산균으로부터 유래된 aminopeptidase가 치즈 숙성시 protease의 일종인 chymosin과 함께 casein을 분해함으로써 아미노산이 생성되는 것으로 보고 되어 있다. 최근, 식품산업은 유럽을 중심으로 생리적으로 인체의 건강에 유효한 특성을 갖는 식품소재를 개발하고, 한편으로는 상업적으로 기호도를 높히는데 역점을 두고 있으며 이런 목적으로 aminopeptidase를 식품소재로 사용하는데 많은 관심을 가지고 활발히 연구가 진행되고 있다.

본 연구에서는 전보[17]에서 발표한 Heterodimeric aminopeptidase를 생산하는 미생물을 토양으로부터 분리하여 동정하고, 효소단백질을 정제하는 과정과 이효소의 구체적인 특성을 조사하여 보고한다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

전국 각지에서 수집한 토양시료 각 1g을 시험관에 넣고 멸균수 10 ml을 가하여 충분히 교반시킨 후 교반 상등액을 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 으로 생리식염수를 사용하여 희석한 희석액 0.1 ml을 Luria-Bertani Medium(tryptophan 1%,

*Corresponding author
Tel. 82-42-860-4370, Fax. 82-42-860-4959
E-mail: otk@kribb4680.kribb.re.kr

yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, agar 1.5%)에 도달하여 37°C에서 24시간 배양한 뒤 생성된 집락을 분리하였다. 이들 집락을 같은 배지에서 2회 이상 반복하여 배양하면서 분리하여 단일 균종만을 획득하였고, 단일 균종을 agar가 포함되지 않은 동일 배지에서 액체배양한 뒤 배양상등액을 기질인 glutamyl p-nitroanilide를 사용하여 aminopeptidase 역가가 높은 우수 균주를 선발하였다. 분리균주의 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성을 조사하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [11]에 준하여 동정하였고, 균주의 세포벽 지방산 조성을 GC-MS로 분석한 후 MIDI system[19]의 데이터와 비교하여 동정하였다.

효소의 생산

선발된 균주를 조제된 효소 생산용배지(starch 1%, yeast extract 0.1%, K_2HPO_4 0.25%, KH_2PO_4 0.25%, $MgCl_2$ 0.02%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%)에 접종하여 37°C에서 12시간 증배양하였다. 효소생산을 위한 본 배양은 발효기를 사용하여 조제된 배지 3 l에 증배양을 2% 수준으로 접종한 후, 37°C에서 통기속도 0.5 v.v.m, 교반속도를 300 rpm의 발효조건으로 24시간 동안 배양하였다.

효소의 정제

배양상등액에 ammonium sulfate를 30% 포화되게 가해, 생성된 침전물을 원심분리하여 제거하고, 다시 ammonium sulfate를 70%까지 포화되게 가하여 생성된 침전물을 취하였다. 이 침전물을 소량의 완충액 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)으로 용해시킨 후 같은 완충액으로 3차례 투석하였다. 투석된 조효소액을 ammonium sulfate가 포함된 10 mM potassium phosphate buffer로 평형화시킨 Phenyl Sepharose CL-4B column(2.7 cm×22cm)에 넣고 동일 완충액으로 비흡착된 단백질을 용출시킨 후, 1.5 M에서 0.0 M ammonium sulfate의 농도 역구배를 만들어 1분당 1 ml의 유속으로 용출시켰다. Phenyl Sepharose CL-4B column을 통해 얻은 활성분획을 모아 농축한 후 투석을 수행하였다. 완충액을 10 mM potassium phosphate(pH 7.0)로 평형화시킨 Resource Q column에 Phenyl Sepharose CL-4B column에서 얻어진 비흡착 단백질을 용출시킨 후 KCl을 0.0 M에서 0.5 M까지 농도를 증가시키면서 흡착 단백질을 순차적으로 용출시켰다. Resource Q column을 통해 얻은 활성분획을 모아 농축한 후 투석을 수행하여 완충액 150 mM NaCl이 포함된 10 mM potassium phosphate로 평형화시킨 Superose 12 column에 가하여 흡착단백질을 용출시키는 방법으로 효소를 최종정제하였다.

단백질 정량

Bradford 방법[4]을 이용한 protein assay kit(Bio-Rad Lab., Richmond, Calif, U.S.A)를 사용하여 단백질을 정량하였으며, 이때 표준단백질로 bovine serum albumin을 사용하였다.

효소의 역가측정

Aminopeptidase 역가는 기질인 glutamyl p-nitroanilide(5 mM)를 함유한 0.2 M Tris/HCl buffer(pH 7.5)에 일정량의 효소를 첨가하고 50°C에서 25분간 반응시킨 후, 생성된 p-nitroaniline의 양을 측정함으로써 효소역가를 결정하였다. 반응액중에 존재하는 p-nitroaniline의 양은 El Soda 등이 보고한 방법[7]에 따라 발색시켜서 410 nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량하였다. Aminopeptidase의 1 unit는 주어진 조건하에서 1분간에 1 μ mol의 p-nitroanilide를 유리시키는데 필요한 효소량으로 정하였다.

전기영동

Aminopeptidase의 분리정도와 분자량을 구하기 위하여 Laemmli 등[13]의 방법에 따라 Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE, 12%)을 수행하였고, Coomassie Brilliant Blue R-250 용액(40% methanol, 10% acetic acid, 0.125% Coomassie Brilliant Blue R-250)을 사용하여 단백질을 염색하였다.

결과 및 고찰

Aminopeptidase의 생산균주 분리 및 동정

전국각지의 토양으로부터 분리한 1,000여 주의 세균을 대상으로 탐색한 결과 균주 NS115가 glutamic acid에 분해능이 뛰어나며, 생산하는 aminopeptidase의 열안정성이 우수하여 NS115를 실험을 위한 최종 선발균주로 선정하였다. 균주 NS115는 그람양성균으로 세포내에 포자를 갖고 있으며 Catalase 활성이 있는 *Bacillus* 속의 세균임을 알 수 있었다. 당이용성과 몇가지 효소의 생산성을 조사한 결과, Table 1에 나타난 바와 같이 *Bacillus licheniformis*[11]의 특성과 동일하고, 특히 세포벽의 지방산 조성의 경우 Table 2에 나타난 바와 같이 15:0 iso, 15:0 anteiso, 17:0 anteiso가 주 지방산으로 나타나서 MIDI[19]의 결과와 데이터분석을 비교한 결과 *Bacillus licheniformis*로 동정할 수 있어서, 분리된 균주를 *Bacillus licheniformis* NS115로 명명하였다.

효소의 분리

Bacillus licheniformis NS115 균주를 37°C에서 24시간 배양한 후, 배양상정액에 ammonium sulfate를 30% 포

Table 1. Microbiological characteristics of the isolate strain NS115

Characteristics	Results
Gram stain	positive
Spores	positive
Anaerobic growth	positive
β -galactosidase	positive
Lysine decarboxylase	negative
Arginine dihydrolase	positive
Catalase	positive
Urease	negative
Indole test	negative
Nitrate reduction to nitrite	positive
Hydrolysis of casein	positive
gelatin	positive
starch	positive
Utilization of glucose	positive
arabinose	positive
xylose	positive
mannitol	positive

Table 2. Cellular fatty acid compositions and other cellular chemical parameters of isolate NS115

G+C mol %	44.6
Murein type	meso-DAP
Main Menaquinone	MK-7
Fatty acid profile	%
14:0 ISO	0.56
15:0 ISO	27.84
15:0 ANTEISO	36.15
16:0 w7c alcohol	0.45
16:0 ISO	2.82
16:1 wHc	0.41
16:0	1.81
15:0 ISO 3OH	0.97
15:0 2OH	1.17
17:0 ISO	8.81
17:0 ANTEISO	16.12

화되게 가하여 생성된 침전물을 원심분리하여 제거하고 다시 ammonium sulfate를 70% 포화되게 가하여 생성된 침전물을 취하였다. 이 침전물을 소량의 완충용액으로 용해시킨 후, 같은 용액으로 여러번 투석한 후 효소액을 1.5 M ammonium sulfate가 함유된 10 mM phosphate 완충액(pH 7.0)으로 평형화시킨 Phenyl Sepharose CL-4B column에 흡착시켜 분획한 결과 Fig. 1과 같은 ammonium sulfate가 0.7 M 농도에서부터 단백질이 용출되어 총 5개의 단백질 peak를 얻었다. 비흡착 부위인 부근에서 aminopeptidase 역가를 가지는 반면 나머지 4개의 단백질 peak에서는 aminopeptidase 역가를 전혀 보이지 않았다. Aminopeptidase 역가가 있는 분획만을 모아 두번째 column으로 Resource Q를 사용하

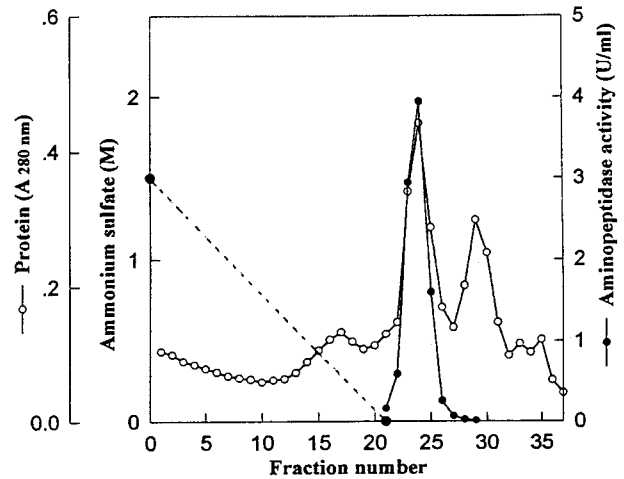


Fig. 1. Chromatography of crude aminopeptidase on Phenyl Sepharose CL-4B column.

Enzyme was eluted with decreasing gradient of ammonium sulfate from 1.5 M to 0.0 M in phosphate buffer at a flow rate of 60 ml/h and the volume of each fraction was 5 ml.

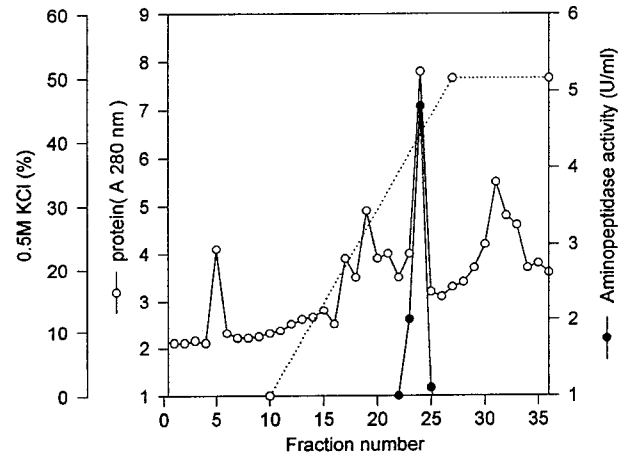


Fig. 2. Resource Q chromatography of the aminopeptidase fractions pooled from the Phenyl Sepharose CL-4B column by using FPLC.

Enzyme was eluted with linear gradient of KCl from 0.0 M to 0.5 M in phosphate buffer, at a flow rate 360 ml/h and the volume of each fraction was 3 ml.

여 분획한 결과 Fig. 2에서 나타난 바와 같이 0.35~0.44 M까지 증가시켜서 aminopeptidase의 역가를 갖는 단백질 peak를 얻었고 이 단백질을 모아서 투석 및 농축한 후, 마지막으로 Superose 12HR column을 사용하여 Fig. 3에서 보는 바와 같이 효소를 순수 분리하였다. 정제된 효소는 Table 3에서와 같이 효소 발효상징액에 비해서 20.6%의 수율로 최종 17.6배 정제할 수 있었고, specific activity가 9.2 unit/mg의 정제효소를 얻을 수 있었다. 순수 분리된 효소의 순도와 분자량을 알기위해 분자량을 알고 있는 표준단백질과 분리한 aminopeptidase를 전기영동법으로 확인하였다. 효소의 분리단계에서

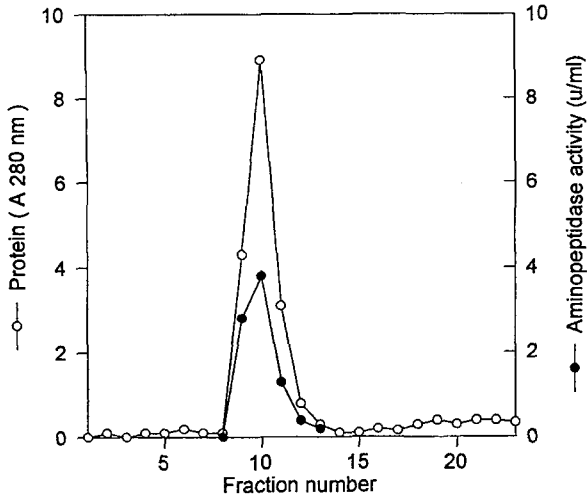


Fig. 3. Superose 12HR 10/30 chromatography of the aminopeptidase fractions collected from the Resource Q column by using FPLC.

SDS 전기영동을 했을 경우 분자량이 42,000 Da과 22,000 Da의 두 밴드가 계속 같은 강도로 나타났다. 정제과정의 마지막 단계인 Superose 12HR column을 거친 활성있는 분획을 4°C에서 native 전기영동을 했을 때, 전보[17]에서와 같이 단일 밴드로 나타났고, 이 native 전기영동상의 단백질 밴드를 다시, SDS 전기영동했을 때 Fig. 4에서와 같이 2개의 단백질 밴드가 나타나는 것으로 전보 [17]에서 보고된 바와 같이 분리된 aminopeptidase의 분자량은 64,000 Da으로 각각 42,000 Da과 22,000 Da으로 구성된 헤테로다이머임을 확인 할 수 있었다. 보고된 aminopeptidase의 subunit 구조는 모노머에서 헥사머까지 여러구조와 크기를 갖고 있는 것으로 보고되었고 본 효소는 *Lactobacillus casei*[3] 유래의 분자량과 유사했다.

효소의 등전점

Aminopeptidase의 등전점을 조사하기 위해 ampholyte 3~10 liner pH 구배로된 polyacrylamide gel을 사용하여 대략적인 등전점을 확인한 후, 등전점이 5부근에 나타나 다시 ampholyte 4~6.5 liner pH 구배로 된 것을 사용하여 좀더 정확한 등전점을 확인한 결과 5.2로, Arora[3] 등에서 유래한 aminopeptidase의 등전점과 유

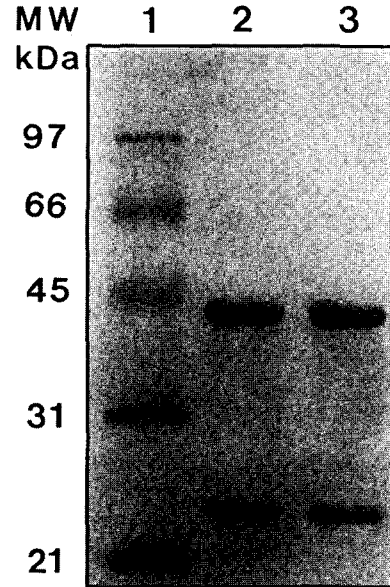


Fig. 4. SDS-PAGE of molecular weight marker (lane 1), eluted aminopeptidase from Native-PAGE (lane 2) and purified aminopeptidase (lane 3).

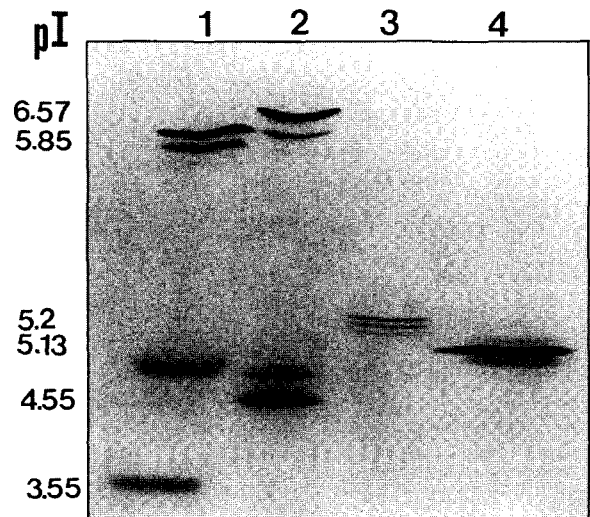


Fig. 5. Determination of isoelectric point of purified aminopeptidase by isoelectric focusing with standard protein. Lane 1, amyloglucosidase (pI 3.55), carbonic anhydrase B (pI 5.85); lane 2, trypsin inhibitor (pI 4.55), carbonic anhydrase (pI 6.57); lane 3, purified aminopeptidase (pI 5.2); lane 4, β -lactoglobulin A (pI 5.13)

Table 3. Summary of the purification procedure of aminopeptidase from *Bacillus licheniformis* NS 115

Steps	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Culture supernatant	225	118	0.52	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	141.4	115	0.8	1.5	97.5
Precipitation(30-70)					
Phenyl Sepharose	88.2	91	1.03	1.9	77.1
Resource Q(FPLC)	6.2	40.8	6.6	12.7	34.6
Superose 12(FPLC)	2.64	24.3	9.2	17.6	20.6

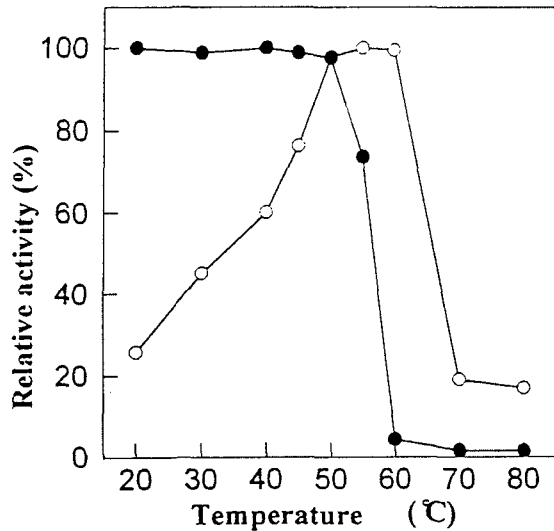


Fig. 6. Effects of temperature on enzyme activity and stability. ●, stability of aminopeptidase; ○, aminopeptidase activity.

사했다(Fig. 5).

효소에 대한 온도의 영향

본 균주가 생산하는 aminopeptidase의 최적 활성온도를 조사하기 위하여 20°C에서 80°C까지 각 온도별로 활성을 조사한 결과 Fig. 6과 같이 55°C에서 최적활성을 나타냈다. 또한 이 효소의 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 20°C에서 80°C까지 정해진 온도에서 30분간 열처리한후, 그 잔존 활성을 50°C에서 측정된 결과, Fig. 6과 같은 60°C이상의 온도에서 활성이 급격히 감소하였다.

효소에 대한 pH의 영향

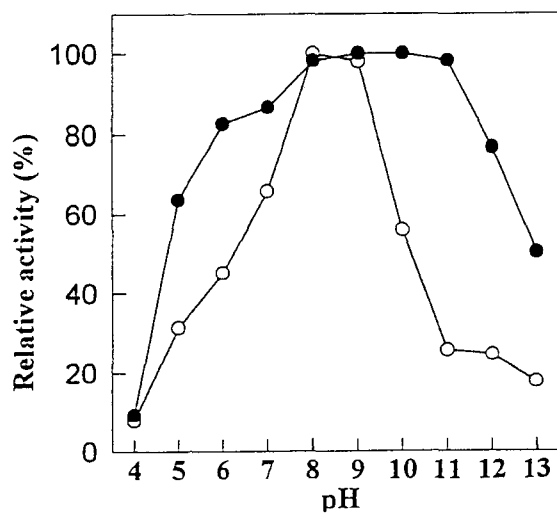


Fig. 7. Effects of pH on enzyme activity and stability. ●, stability of aminopeptidase; ○, aminopeptidase activity.

Table 4. Effect of inhibitors and metal ions on aminopeptidase activity

Reagents	Relative activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100	100
EDTA	78	69.7
1,10-Phenanthroline	97.4	88.2
L-cysteine	100	94.2
DTT	106.5	101.2
2-Mercaptoethanol	110.4	98.8
SDS	62.3	16.7
PMSF	118.8	92.9
LiCl	128.1	133.3
NaCl	114.0	136.8

pH가 이 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH 4에서 pH 13까지 각 pH별로 그 활성을 조사한 결과, Fig. 7과 같이 효소 반응의 최적 pH가 8.0이었다. Shibata 등[18]과 Edward 등[6]이 보고한 aminopeptidase는 최적 pH가 각각 8.5로 본 효소와 유사한 최적 pH를 가졌다. 이 효소의 pH 안정성을 조사하기 위하여 pH 4에서 13까지 각각의 pH에서 60분간 방치한 후 잔존 활성을 측정된 결과, 이 효소는 pH 6에서 pH 12까지 안정한 알칼리내성 효소임이 밝혀졌다.

Aminopeptidase 저해제의 영향

본 효소에 대한 aminopeptidase 저해제와 금속이온의 영향을 알아보기 위하여 각각을 최종농도가 1 mM, 5 mM되게 첨가하여 잔존활성을 측정된 결과, serine기에 작용하는 phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF)에 의해 크게 저해받지 않았으나 metalloenzyme의 저해제인 1, 10-phenanthroline과 EDTA에 의해 저해를 가져와 본 효소는 metalloenzyme으로 추정된다(Table 4). 이외 금속이온중에서도 Zn⁺⁺이온에 의해서 활성이 50%이상 저해되었고, 보고된 *Bacillus licheniformis* aminopeptidase[12]에서는 Co⁺⁺이온에 의해서 활성이 증가 되었으나 본 효소는 증가되지 않는 특성을 보였다.

효소에 대한 기질특이성

각종기질에 대한 aminopeptidase의 반응성을 검토하여 기질에 대한 특이성을 Table 5에 표시한 것처럼 아미노산말단에 glutamic acid가 존재할 때 효소의 역가가 가장 컸고, Glu-pNA가 타 peptide에 비해 특히 분해를 잘 받아 기질로 적합하다고 사료된다. 이와 같은 본 효소의 기질특이성은 *Lactobacillus casei*[15]의 경우 lysine과 argine에 대해서는 역가가 높고, glutamic acid에 대해서는 역가가 낮은 것과는 다른 특성을 보였다. 또한 carboxypeptidase 역가를 확인하기 위해서 CBZ-amino

Table 5. Substrate specificities of aminopeptidase from *Bacillus licheniformis* NS 115

Substrate	Relative activity (%)	Substrate	Relative activity (%)
Glutamic acid-pNA	100	Glu-His	86.4
Leucine-pNA	0	Glu-Glu	54.0
Glycine-pNA	0	Glu-Lys	14.4
Methionine-pNA	0	Glu-Gly	79.2
Alanine-pNA	0	Glu-Cys	77.0
Cystine-pNA	0	Glu-Gln	84.4
Proline-pNA	0	Leu-Leu	0
Valine-pNA	0	DL-Leu-DL-Leu	0
Argine-pNA	0	Leu-Met	3.4
Glu-Pro-pNA	0	Ala-Pro	0
Benzoyl-Tyrosin-pNA	0	Leu-Leu-Leu	0
		Leu-Leu-Tyr	0
Tryptophan-βNA	10	Glu-Gly-Phe	5.0
Isoleucine-βNA	15.4		
Lysine-βNA	0	CBZ-Glutamine	0
Serine-βNA	9.8	CBZ-Lysine	0
Cystine-βNA	0	CBZ-Serine	0
Aspartic acid-βNA	11.3	CBZ-Threonine	0
Histidine-βNA	0	CBZ-Glutamic acid	0

acid의 기질을 사용하여 실험한 결과, 전혀 효소 역가를 가지지 않아 본 효소는 전형적인 aminopeptidase임을 확신할 수 있었다. 이 효소가 단백질의 아마노말단으로부터 아미노산을 하나씩 유리시켜 나간다고 하는 기질 특이성의 관점에서부터 판단할 때, 단백질을 분해하여 아미노산을 생성시키는 관점에서 본효소의 주된 역할은 단백질로부터 endotype의 protease에 의해 생성되는 peptide에 2차적으로 작용하여 아미노산의 단위로까지 분해하는데 적합한 효소임을 알 수 있었다. 따라서, 본 효소를 이용하여 단백질로부터 풍미성분을 제조할 때는 glutamic acid의 생성을 증가시킬 수 있어서 단백질 유래 풍미소재를 개발하는데 적합한 효소로 이용가능성이 높을 것으로 생각된다.

요 약

Glutamic acid의 분해능이 뛰어난 aminopeptidase를 생산하는 세균을 토양으로부터 분리하였다. 이 균은 형태적 생리적 특성으로부터 *Bacillus licheniformis*로 동정되었다. 이 균을 최적 배지에 접종하고 37°C에서 진탕배양한 후 균이 생산한 aminopeptidase를 ammonium sulfate 침전, Phenyl Sepharose CL-4B, Resource Q, Superose 12HR column을 통해 분리하여서 20.6%의 수율로 17.6배 정제된 glutamyl p-nitroanilide을 기질로 했을 때 9.2 unit/mg의 순수효소를 얻었다. SDS-PAGE와

Native-PAGE로 부터 이 효소의 분자량이 42,000 Da와 22,000 Da으로 구성된 헤테로다이커로 약 64,000 Da임이 밝혀졌고 효소의 등전점은 5.2로 나타났다. 이 효소의 반응 최적 온도는 55°C, 반응최적 pH는 8.0이었고, EDTA와 1,10-phenanthroline에 의해서 효소활성이 저해되는 metalloenzyme으로 판명되었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 선도기술개발사업으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Anson, K. J. A., S. Movahe, H. G. Griffin, M. J. Gusson, and F. Mulgolland 1995. A non-essential glutamyl aminopeptidase is required for optimal growth of *Lactococcus lactis* MG 1363 in milk. *Microbiology* **141**: 2873–2881.
- Armelle, H., B. Ann, and P. R. Bernard. 1991. Functional residues at the active site of aminopeptidase N. *Eur J. Biochem.* **196**: 385–393.
- Arora, G. and B. H. Lee. 1992. Purification and characterization of aminopeptidase from *Lactobacillus casei* ssp. *casei* LLG. *J. Dairy Sci.* **75**: 700–710.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
- Chung, M. C., H. K. Chun, C. H. Lee, and Y. H. Kho. 1995. Fermentation of MR-387A and novel aminopeptidase M inhibitors by *Streptomyces*. SL-387: Carbon and nitrogen catabolite repression of inhibitor formation. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 158–162.
- Edward, P. D., W. L. Starnes, and F. J. Behal. 1975. Aminopeptidase of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **124**: 353–363.
- El Soda, M., A. Macedo, and N. P. Olson. 1991. Aminopeptidase and dipeptidylaminopeptidase activities of several cheese related microorganisms. *Milchwissenschaft* **46**: 223–228.
- Eric, N. C., C. Pascale, L. C. Catherine, P. R. Bernard, and C. Marie. 1994. Investigation of the active site of aminopeptidase A using a series of new thiol-containing inhibitors. *J. Med. Chem.* **37**: 1339–1346.
- Hareda, R. and A. Yaron. 1992. Aminopeptidase P from human leukocytes. *Biochem.* **210**: 93–100.
- Hros, C., B. Giros, and J. C. Schwartz 1985. Identification of aminopeptidase M as an enkephaline-activation enzyme in rat cerebral membranes. *Biochemistry* **24**: 2179–23185.
- John, G. H., N. R. Krieg, and P.H.A. Sneath. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Jose, R. A. and J. M. Prescott. 1978. Isolation and pro-

- perties of an aminopeptidase from *Bacillus licheniformis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **186**: 383–391.
13. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
 14. Menrad, A., D. Speicher, J. Wacker, and M. Herlyn. 1993. Biochemical and functional characterization of aminopeptidase N expressed by human melanoma cell. *Cancer Research* **53**: 1450–1455.
 15. Mohammad, B. H. and H. L. Byong. 1995. Purification and characterization of proline aminopeptidase from *Lactobacillus casei* ssp. *casei* LLG. *J. Dairy Sci.* **78**: 251–259.
 16. Nunez, M., A. M. Guillen, M. A. Rodriguez-Marin, and M. Medina. 1991. Accelerated ripening of ewes, milk manchego cheese. *J. Dairy Sci.* **25**: 123–127.
 17. Oh, T. K., M. J. Park, J. K. Lee, H. K. Kim, and H. S. Nam. 1997. Heterodimeric aminopeptidase A from *Bacillus licheniformis* NS115. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**(11): 1934–1936.
 18. Shibata, K. I. and T. Watanabe. 1987. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Mycoplasma salivarium*. *J. Bacteriol.* **169**: 3409–3413.
 19. Stages, C. E. and J. R. Davis. 1992. Automated systems for identification of microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**: 302–327.
 20. Susumu, M., K. Isutomu, O. Takashi, and M. Hidekutu. 1994. Aminopeptidase P, capable of hydrolyzing oligo-proline, from bovine brain. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**(11): 2107–2108.
 21. Toshimasa, Y., N. Toshiki, and O. Akira. 1994. Aminopeptidase Y, a new aminopeptidase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**(18): 13644–13650.

(Received May 29, 1998)