

Streptomyces thermocarboxydus C12에서 Subtilisin-like Protease Inhibitor 생산을 위한 최적배양조건

강성일¹ · 장영부¹ · 최경임² · 최병대² · 공재열¹ · 최영준^{2*}

¹부경대학교 생물공학과

²경상대학교 해양식품생명공학과

Optimal Culture Conditions for Production of Subtilisin-like Protease Inhibitor from *Streptomyces thermocarboxydus* C12

Sung-Il Kang¹, Young-Boo Jang¹, Gyeonglim Choi², Byeong-Dae Choi²,
Jai-Yul Kong¹, and Yeung-Joon Choi^{2*}

¹Dept. of Biotechnology & Bioengineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

²Division of Marine Bioscience/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University,
Gyeongnam 650-160, Korea

Abstract

The objective of this paper was to investigate optimal culture conditions for the production of an inhibitor against subtilisin-like protease from *Streptomyces thermocarboxydus* (*S. thermocarboxydus*) C12 isolated from sediments of Gwangyang coast. The optimal temperature and initial pH for the production of subtilisin-like protease inhibitor were 40°C and pH 8.0, respectively. Inhibition activities were high for galactose, glucose and fructose. The best carbon source and its concentration were galactose and 1.6% (w/v), respectively. Inhibition activities were also high in medium containing polypeptone, proteose and peptone. Optimal nitrogen source and concentration were protease peptone and 0.5% (w/v), respectively. Optimal concentrations for inhibitor production were 1% (w/v) for NaCl and 1 mM LiCl for metal salts. The subtilisin-like protease inhibitor from *S. thermocarboxydus* C12 showed a maximum inhibitor activity after cultivation for 84 h under the optimized medium.

Key words: *Streptomyces thermocarboxydus*, marine actinomycete, protease inhibitor, subtilisin, optimum conditions

서 론

Protease는 동물, 식물 및 미생물계에 광범위하게 분포되어 있으며, 모든 생체기능에 직접 혹은 간접적으로 관여한다. 그러나 이상 환경에 의해 비정상적으로 발현된 protease는 염증, virus 감염, 암세포의 전이 등의 다양한 질병 발병과정에 관여하며 생명현상과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다(1). Protease 저해제는 이와 같은 protease의 활성을 억제하거나 조절하는 역할을 수행한다. Protease 저해제에 관한 연구는 육상의 동·식물 및 미생물에 대하여 수행되어왔다(2). 미생물 유래 protease 저해제는 동물과 식물에서 얻은 저해제와 크게 다르며, 효소의 반응 기작 해명에 유용할 뿐만 아니라 물질 정제 시에 일어나는 효소에 의한 가수분해 반응의 방지, 식품공정상에서 불필요한 protease 활성의 억제에 효율적인 것으로 알려져 있다(3-5). 특이적인 protease 저해제는 변이유발저지, 암 전이 저지, 폐기종 및 체장염과

같은 인체 질병발병과정에 관여하는 protease들을 불활성화시킬 수 있다(6). 산업적으로 경제성이 높은 새로운 protease 저해제를 생산하기 위해 균주를 자연계에서 탐색하거나, protease 저해제 생산 균주의 생산성을 향상시킬 목적으로 생산 조건의 최적화에 많은 노력을 기울이고 있다. 미생물이 생성하는 저해제와 관련하여 *Actinomyces*류로부터 trypsin, plasmin 등을 저해하는 leupeptin(7), *Streptomyces mauvecolor*로부터 trypsin, papain, cathepsin A와 B, chymotrypsin을 저해하는 antipain 및 chymostatin(8,9), pepsin과 renin을 저해하는 pepstatin(10), *Streptomyces*속에서 protease 저해제인 *Streptomyces* subtilisin-like protease 저해제 등이 분리되었다(11). Kourteva와 Boteva(12)는 *Streptomyces*에서 단리한 단백질의 아미노산 조성과 저해특성을 조사하여 미생물 기원의 alkaline protease에 대하여 강력한 저해활성을 가진다고 보고하였다. *Streptomyces*가 생성하는 새로운 subtilisin-trypsin 저해제의 일차 구조

*Corresponding author. E-mail: yjchoi@gnu.ac.kr
Phone: 82-55-640-3115, Fax: 82-55-640-3111

를 해명하고 다른 저해제들과 상관성을 조사하여 차이를 보고하였고(13), *Streptomyces subtilisin* 저해제(SSI)와 동일한 단백질성 protease 저해제는 여러 *Streptomyces* 종들이 생성하며, 이들을 SSI-유사 단백질이라 명명하였다(14). 저자들은 남해 연안 해역에서 해수, 해조류 및 갯벌을 채집하여 배양한 배양 표면의 집락에서 약 1,000 균주를 분리하고, 이 중에서 강력한 subtilisin-like protease 저해제를 생성하는 새로운 *Streptomyces thermocarboxyus*(*S. thermocarboxyus*) C12를 동정하였다(15).

본 연구는 전라도 광양만의 갯벌에서 분리한 *S. thermocarboxyus* C12가 생산하는 protease 저해제를 대량으로 생산하기 위해 배양 온도, pH, 탄소원과 질소원 및 이들의 최적 농도와 금속염의 영향을 측정하여 최적배양조건을 조사하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

효소는 subtilisin(Fluka, Switzerland), trypsin, α-chymotrypsin, amino peptidase, collagenase(Sigma, USA)와 protease K(Promega, USA)를 사용하였고, 기질은 gelatine(Yakuri, Japan)을 사용하였다. 저해제 반응의 발색시약은 ninhydrin(Lancaster, England)을 사용하였으며, 그 외에 사용한 모든 시약은 특급 혹은 분석용 시약을 사용하였다.

사용 균주

본 실험에 사용된 균주는 광양만 갯벌에서 분리·동정한 *S. thermocarboxyus* C12를 사용하였다(15). 균주는 액체배지에서 27°C, 4~6주 동안 배양하여 포자를 형성시킨 후 glycerol은 최종농도 10%로 조정하여 첨가하고, -70°C에 동결보존한 것을 본 실험에 사용하였다.

분리 및 저해물질 생산배지

균주의 분리 및 배양을 위한 배지조성은 인공해수(증류수 1 L 당 NaCl 23.0 g, KCl 0.7 g, MgCl₂ · 6H₂O 10.6 g, CaCl₂ 1.1 g, Na₂SO₄ 3.9 g, NaHCO₃ 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, K₂HPO₄ 0.01 g, Tris-HCl 6.05 g, pH 7.8)에 Bennet's 배지(glucose 10.0 g, peptone 1.0 g, yeast extract 1.0 g, beef extract 1.0 g, pH 7.5)를 기본배지로 사용하였다. 평판배지에서 얻은 분리균주를 액체배지 20 mL에 접종하여 25°C에서 180 rpm으로 3일 동안 진탕 배양하였다. 이 때 진탕배양한 전배양은 50 mL 본배양에 1% 접종하여 25°C에서 4일 동안 진탕배양(180 rpm)하였다.

균체량과 단백질 함량의 측정

균체량은 액체 배양액을 Whatman No. 1 여지에 여과한 후 충분한 양의 증류수로 세척한 다음 100°C의 항온건조기(model-175, Johnsam, Korea)에서 12시간 건조시켜 dry

cell weight(DCW)로 측정하였다. 단백질 농도는 UV spectrophotometer(Ultrospec 3000, Pharmacia Co., Sweden)를 이용한 Lowry법(16)에 의해 측정하였으며, 표준물질은 bovine serum albumin을 사용하여 작성한 검량선으로 단백질 농도를 구하였다.

효소 저해활성 측정

Subtilisin-like protease 저해제 측정은 ninhydrin법을 변형시켜 사용하였다(17). 즉 50 mM Tris-HCl buffer 50 µL에 10 µL subtilisin(0.1 mg/mL)과 증류수로 3배 희석한 배양상층액 10 µL 용액을 섞고 37°C에서 20분간 전 처리한 후 0.2% gelatin(w/v)이 포함된 기질용액 0.5 mL(50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5)를 가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응을 중지시키기 위해 10.0% trichloroacetic acid (TCA, w/v) 0.1 mL를 첨가한 후 ninhydrin 용액 0.5 mL을 혼합하여 100°C에서 10분간 끓인 후, 얼음물에서 냉각시켰다. 가수분해되지 않은 단백질을 침전시키기 위해 2.5 mL 희석액(1-propanol : H₂O=1:1)을 가하여 15분간 방치한 후, 원심분리기(5415C, CE, Germany)로 1,570×g에서 10분간 원심분리하여 570 nm에서 분광광도계(UV-1700, Shimadzu, Japan)로 흡광도를 측정하였다. 저해율(%)은 저해제를 첨가한 것의 반응 전(A)과 반응 후(B)의 흡광도, 저해제를 첨가하지 않은 것의 반응 전(C)과 반응 후(D)의 흡광도로부터 다음과 같은 식으로 계산하였다.

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

저해제 생산을 위한 최적배양조건의 측정

해양에서 분리한 *S. thermocarboxyus* C12의 subtilisin-like protease 저해제 생산을 위한 최적배양조건은 온도, 초기 pH, 탄소원, 질소원, NaCl, 금속염의 영향을 측정하는 순서로 진행하였다. 저해물질의 최대생산 시기는 최적배양조건하에서 배양하여 시간별로 활성을 측정함으로써 배양 최적시간을 결정하였다.

결과 및 고찰

배양온도의 영향

배양온도는 미생물의 대사물질 생산에 영향을 미치는 질소원과 함께 중요한 요인 중의 하나이다. 효소저해제 생산에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 10~60°C의 온도 범위에서 4일 동안 배양하여 각 온도에서의 균체성장 및 저해활성을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 일반적으로 해양세균은 저온미생물로서 20~30°C 부근에서 잘 성장하는 것으로 알려져 있는데, 본 균주 *S. thermocarboxyus* C12는 40°C에서 배양하였을 때 저해활성과 균체성장이 가장 높았으나, 50°C 이상의 온도에서는 균체성장과 저해활성이 급격히 감소하므로 중온성 균으로 사료된다. *Streptomyces*

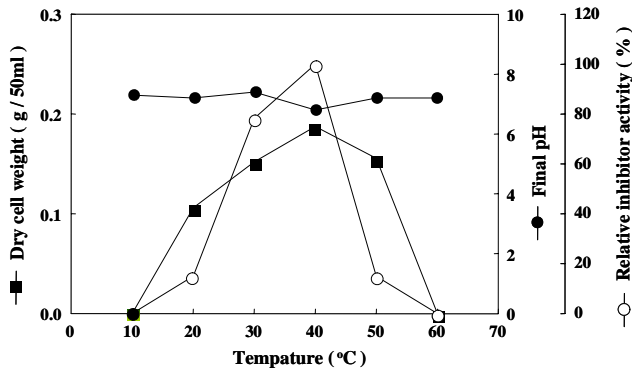


Fig. 1. Effect of temperature on the production of subtilisin-like protease inhibitor by *S. thermocarboxydis* C12.

albogriseolus(*S. albogriseolus*) S-3253의 경우 30°C에서 균체성장이 최적이며, 저해활성은 45°C에서 가장 높은 것으로 조사되었다(18-20). 그러나 *Cephalosporium* sp.가 생성하는 trypsin 저해제(21), *Streptomyces mozunensis* MK-23가 생성하는 protease 저해제인 talopeptin(MK-1)(22) 및 *Actinomyces* GF 155-2가 생성하는 pepsin 저해제(23)는 27~35°C의 온도 범위에서 저해활성을 보여 본 연구의 결과와 다소 차이를 보였다.

초기 pH의 영향

배양액의 pH는 영양분, 성장인자 등의 세포막 이동속도에 영향을 미치며, 외부의 pH가 변하면 영양물질 분자의 이온화 경향이 달라져 물질 흡수 능력에 차이를 보이기 때문에 미생물의 성장과 저해물질 생산에 중요한 역할을 한다. Protease 저해제 생산에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 배양액의 초기 pH를 3~10까지 조절하여 배양 후 저해활성을 측정하였다(Fig. 2). 균체성장은 초기 pH 6~7 범위에서 가장 잘 성장하여 호중성 미생물인 것으로 판단되었으나, 저해활성은 pH 6.5~8.0의 중성과 약알칼리 범위에서 가장 높은 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과는 알칼리 protease 저해제를 생산하는 균주는 pH 7에서 저해활성이 높다고 보고한 결과와 유사하였고(19,24), Kim 등(25)이 *Streptomyces* 속이 생산하는 protease 저해제는 pH 8~9의

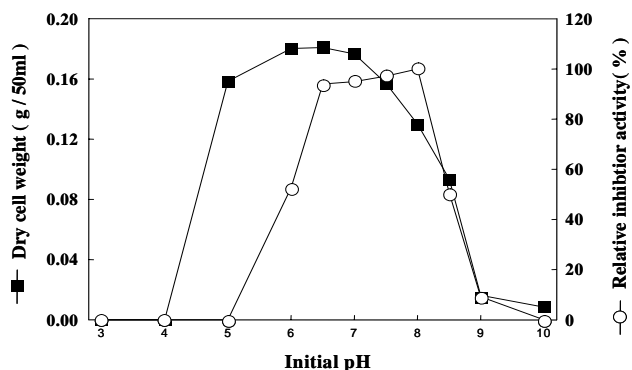


Fig. 2. Effect of initial pH on the production of subtilisin-like protease inhibitor by *S. thermocarboxydis* C12.

범위에서 저해활성이 높다고 보고한 것과도 유사하였다. 이처럼 중성 범위의 pH에서 효소 저해활성이 가장 높게 유지되는 것은 이 부근에서 저해활성이 가장 안정화되기 때문인 것으로 보인다.

탄소원의 영향

Protease 저해제의 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 인공해수에 0.2% peptone(w/v), 0.1% yeast extract(w/v), 0.1% malt extract(w/v)를 첨가한 배지에 glucose, maltose, fructose, galactose, saccharose, starch, lactose, sorbitol, mannose를 각각 1%(w/v)씩 첨가하여 균체성장 및 저해물질의 활성을 측정하여 Table 1에 나타내었다. 단당류인 galactose, glucose, fructose와 다당류인 starch에서 높은 저해활성을 보였다. Pandhare 등은 starch, glucose, mannose 및 fructose 등이 저해제 생산에 좋은 탄소원으로 보고하였고(26), protease 저해제 생산에 최적 탄소원으로서 glucose와 starch가 효과적인 것으로 보고하여(20,22,24,25) 본 연구와 일치하였다. 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 저해 효과도 초래할 수 있는 것으로 알려져 있다(26,27). 본 연구에서 탄소원을 첨가하지 않을 경우 균체성장 및 저해활성이 나타나지 않았기 때문에 protease 저해제 생산에 탄소원이 중요한 인자인 것으로 판단하였다.

최적의 탄소원으로 선정된 galactose를 농도별로 2.8% (w/v)까지 첨가하여 균체성장 및 저해활성을 측정한 결과(Fig. 3), 저해활성은 1.6%(w/v)에서 가장 높았으며, 이 이상의 농도에서는 저해활성이 점차 감소한 반면에 균체성장은 계속 증가하는 것으로 나타났다.

질소원의 영향

질소원은 미생물의 대사증식에 가장 중요한 영향을 미치는 성분으로 알려져 있어 각종 유·무기 질소원으로 나누어

Table 1. Effect of various carbon sources on the production of subtilisin-like protease inhibitor by *S. thermocarboxydis* C12

Carbon source (1.0%)	Dry cell weight (g/50 mL)	RIA ¹⁾ (%)	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

¹⁾Relative inhibitor activity.

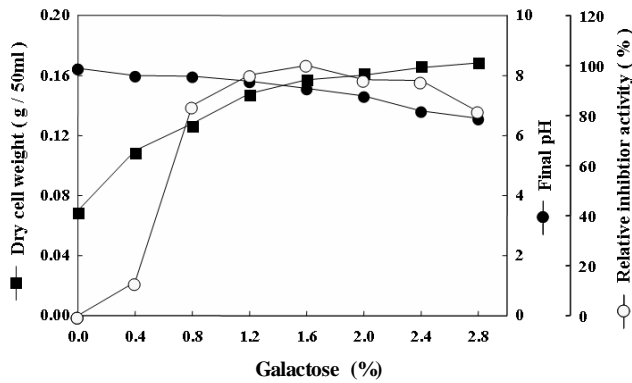


Fig. 3. Effect of galactose concentration on the production of subtilisin-like protease inhibitor by *S. thermocarboxyodus* C12.

Table 2. Effect of organic nitrogen sources on the production of subtilisin-like protease inhibitor by *S. thermocarboxyodus* C12

Nitrogen source (0.5%)	Dry cell weight (g/50 mL)	RIA ¹⁾ (%)	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
(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

¹⁾Relative inhibitor activity.

실험을 행하였다. 먼저 기본배지에 peptone, yeast extract, malt extract를 제외하고 각종 유기 질소원을 각각 0.5% (w/v)씩 첨가하여 균체성장 및 protease 저해를 측정하였다 (Table 2). 저해 효과는 복합배지인 polypeptone과 proteose peptone에서 가장 높게 나타났으며, 이 같은 결과는 *Cephalosporium* sp.가 생산하는 trypsin 저해제와 *S. albogriseolus* S-3253이 생산하는 alkaline protease 저해제 생산에 polypeptone을 사용하였을 때와 유사한 결과를 보였다 (11,21). 본 실험의 결과는 Pandhare 등이 *Actinomyces*가 생성하는 alkaline protease 저해제는 casein, yeast extract, malt extract에서 저해활성이 높다는 보고와 차이를 보이고 있었다(26). 한편 천연 질소원과 무기 질소원의 경우 저해활성이 거의 나타나지 않았다. 이것은 무기 질소원보다는 유기 질소원이 저해물질의 생합성과정에서 효과적으로 이용하기 때문인 것으로 사료된다. 이 결과를 토대로 최적 질소원으로 는 균체 제거를 고려하여 proteose peptone을 선정하였다. 선

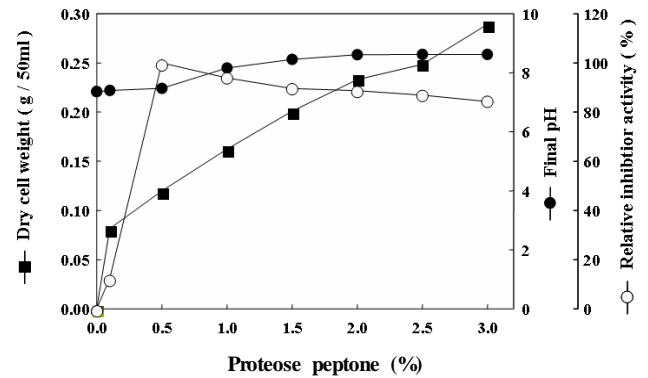


Fig. 4. Effect of proteose peptone concentration on the production of subtilisin-like protease inhibitor by *S. thermocarboxyodus* C12.

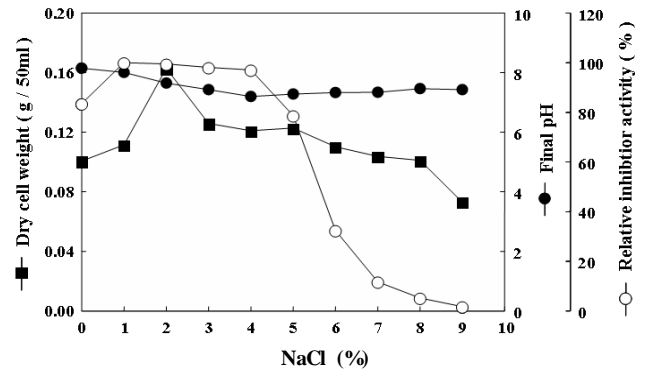


Fig. 5. Effect of NaCl concentration on the production of subtilisin-like protease inhibitor by *S. thermocarboxyodus* C12.

정한 proteose peptone을 3%(w/v)까지 농도별로 첨가하여 저해활성을 조사한 결과, 0.5% (w/v)에서 가장 높은 저해활성을 보였으며, 0.5%(w/v) 이상의 농도에서는 농도 증가와 더불어 저해활성은 감소하였다(Fig. 4).

NaCl 농도의 영향

일반적으로 해수에는 약 3% NaCl(w/v)이 함유되어 있기 때문에 NaCl 농도에 따른 균체성장 및 protease 저해활성에 미치는 영향을 조사하였다. NaCl 농도를 1~9%(w/v)까지 조절한 배지에서 균체를 배양한 후 protease 저해활성을 측정된 결과(Fig. 5), 균체는 2% NaCl(w/v)에서 가장 많이 성장한 반면, 저해활성은 1~4% NaCl(w/v)에서 높은 수준을 유지하였다. 나아가 5%와 같은 높은 NaCl(w/v) 농도에서도 저해활성은 80% 이상을 나타내었다. 이 같은 결과는 해양에서 생육하는 미생물의 경우 NaCl 농도는 삼투압 조절과 밀접한 관련이 있기 때문이다. 2%의 NaCl 농도에서 해양미생물의 성장과 대사물질의 생산은 증가한다고 보고하였다(28).

금속염의 첨가 효과

1.6% galactose(w/v), 0.5% proteose peptone(w/v), 1% NaCl(w/v)로 고정한 조건에서 최종 농도가 1 mM이 되도록 각종 금속염을 첨가하여 균체성장 및 저해활성에 미치는 영

Table 3. Effect of metal salts on the production of subtilisin-like protease inhibitor by *S. thermocarboxydis* C12

Metal salt (1 mM)	Dry cell weight (g/50 mL)	RIA ¹⁾ (%)	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

¹⁾Relative inhibitor activity.

항을 측정하였다(Table 3). LiCl, MgCl₂와 KCl은 대조군보다 저해활성이 유의적으로 높았으며(p<0.05), LiCl 첨가시에 가장 높은 저해활성을 보였다. 금속염은 여러 가지 효소 저해물질의 생산에 영향을 미치고 특히 중금속염의 첨가는 균체성장 및 저해활성을 억제하는 것으로 보고하였다(20,24). 중금속은 -SH 작용기를 지닌 단백질과 결합하면 단백질을 비활성화 시키기 때문에 저해활성이 전혀 나타나지 않는 것으로 추정된다(29).

최적배양조건에서 저해제의 생산

Protease 저해제 생산을 위한 최적 배지 및 배양 조건인 40°C, pH 8.0, 1.6% galactose(w/v), 0.5% proteose peptone (w/v), 1% NaCl(w/v), 1 mM LiCl이 첨가된 배지에서 *S. thermocarboxydis* C12 균주를 배양하여 시간별로 균체 성장과 저해활성을 조사하였다. 균체는 12시간 이후부터 성장하기 시작하여 48시간 이후에는 정지기에 도달하였다(Fig. 6). 저해활성은 48시간 이후부터 나타났으며, 84시간에 최고 수준에 도달하였으며, 점차 시간이 경과하여도 저해활성은 변화가 없는 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 단백질 분해효소 저해제가 2차 대사산물을 지적한다. 시간이 경과할수록 pH는 점차 감소한 후 72시간 이후에 약알칼리로 증가하는 것은 전형적인 방선균의 대사 시에 발견되는 현상

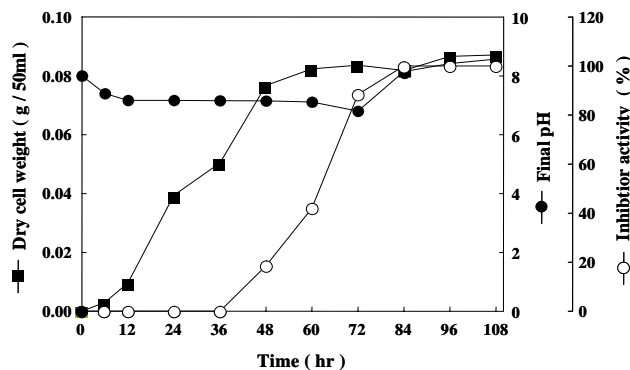


Fig. 6. Time course for the production of subtilisin-like protease inhibitor by *S. thermocarboxydis* C12.

이며 pH의 감소는 당에서 생성되는 유기산에 기인한 것으로 추정된다.

요 약

광양만의 해안 땔에서 protease 저해력이 우수한 균주 *S. thermocarboxydis* C12를 분리하여 최적의 저해제 생산 조건을 조사하였다. 최대 저해활성을 보이는 온도와 초기 pH는 각각 40°C와 8.0이었다. 저해제 생산에 미치는 탄소원의 영향을 검토한 결과, 단당류인 galactose, glucose, fructose와 다당류인 starch에서 높은 저해활성을 보였으며, 최적의 탄소원과 농도는 각각 galactose와 1.6%(w/v)였다. 질소원의 경우 복합배지인 polypeptone과 proteose peptone에서 가장 높은 저해활성이 나타났으며, 최적의 농도와 질소원은 0.5%(w/v)와 proteose peptone이었다. 최적의 NaCl 농도와 금속이온은 각각 1%(w/v)와 1 mM LiCl이었다. 선정된 최적배양조건에서 균주를 배양한 결과, 84시간 동안 배양시 저해활성이 최대인 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2004년도 해양수산부 수산특정연구개발과제(과제번호 20040078)에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Perlmann GE, Lorand L. 1970. Proteolytic enzymes. In *Methods in Enzymology*. Academic press, New York, USA. Vol XIX, p 807-889.
2. Umezawa H. 1972. *Enzyme inhibitors of microbial origin*. University of Tokyo Press, Tokyo, Japan. p 1-114.
3. Bode W, Huber R. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur J Biochem* 204: 433-451.
4. Terashita T, Kono M, Murao S. 1980. Promoting effect of S-PI on fruiting of *Lentinus edodes*. *Trans Mycol Soc Jpn* 21: 137-140.
5. García-Carreño FL. 1996. Proteinase inhibitors. *Trends Food Sci Technol* 7: 197-204.
6. Demuth HU. 1990. Recent developments in inhibiting cysteine and serine proteases. *J Enzym Inhibition* 3: 249-278.
7. Aoyagi T, Takeuchi T, Matsuzaki A, Kawamura K, Kondo S, Hamada M, Maeda K, Umezawa H. 1969. Leupeptins, new protease inhibitors from *Actinomyces*. *J Antibiot* 22: 283-286.
8. Umezawa S, Tatsuta K, Fujimoto K, Tsuchiya T, Umezawa H. 1972. Structure of antipain, a new Sakaguchi-positive product of *Streptomyces*. *J Antibiot* 25: 267-270.
9. Tatsuta K, Mikami N, Fujimoto K, Umezawa S, Umezawa H. 1973. The structure of chymostatin, a chymotrypsin inhibitor. *J Antibiot* 26: 625-646.
10. Kunitomo S, Aoyagi T, Morishima H, Takeuchi T, Umezawa H. 1972. Mechanism of inhibition of pepsin by pepstatin. *J Antibiot* 25: 251-255.
11. Murao S, Sato S. 1972. S-SI, a new alkaline protease in-

- hibitor from *Streptomyces albogriseolus* S-3253. *Agric Biol Chem* 36: 160-163.
12. Kourteva Y, Boteva R. 1989. A novel extracellular subtilisin inhibitor produced by a *Streptomyces* sp. *FEBS Lett* 247: 468-470.
 13. Terabe M, Kojima S, Taguchi S, Momose H, Miura K-I. 1996. New subtilisin-trypsin inhibitors produced by *Streptomyces*: primary structure and their relationship to other proteinase inhibitors from *Streptomyces*. *Biochim Biophys Acta* 1292: 233-240.
 14. Taguchi S, Kojima S, Terabe M, Kumazawa Y, Kohriyama H, Suzuki M, Miura K-I, Momose H. 1997. Molecular phylogenetic characterization of *Streptomyces* protease inhibitor family. *J Mol Evol* 44: 542-551.
 15. Kang S-I. 2007. Identification and purification properties of subtilisin-like proteinase inhibitor isolated from the marine bacterium. *PhD Dissertation*. Pukyong National University, Busan.
 16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
 17. Moore S, Stein WH. 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J Biol Chem* 176: 367-388.
 18. Kang SI, Kim YM, Jang YB, Lim DJ, Kong JY. 2004. The optimal culture condition for the collagenolytic protease production from *Vibrio vulnificus* CYK279H. *Korean J Biotechnol Bioeng* 19: 295-300.
 19. Choi HJ, Jung MJ, Jeong YK. 2002. Optimization of the production of an immunostimulant from a marine bacterium. *Korean J Life Sci* 12: 759-764.
 20. Murao S, Sato S, Muto N. 1972. Isolation of alkaline protease inhibitor producing microorganisms. *Agric Biol Chem* 36: 1737-1744.
 21. Tsuchiya K, Kimura T. 1978. Production of trypsin inhibitor by a *Cephalosporium* sp. *Appl Environ Microbiol* 35: 631-635.
 22. Fukuhara KI, Katsura M, Murao S. 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.
 23. Park SK, Sung NK, Lee SW. 1989. Production and purification of pepsin inhibitor from *Actinomyces* GF 155-2. *Korean J Appl Microbiol Bioeng* 17: 121-125.
 24. Murao S, Watanabe T. 1978. Isolation and identification of microorganism, producing microbial alkaline proteinase inhibitor (MAPI). *Agric Biol Chem* 42: 2209-2215.
 25. Kim IS, Kim HT, Lee HS, Lee KJ. 1991. Protease inhibitor production using *Streptomyces* sp. SMF13. *J Microbiol Biotechnol* 1: 288-292.
 26. Pandhare J, Zog K, Deshpande VV. 2002. Differential stability of alkaline protease inhibitors from actinomyces: effect of various additives on thermostability. *Bioresour Technol* 84: 165-169.
 27. Aoyagi T. 1990. Small molecular protease inhibitors and their biological effects. In *Biochemistry of Peptide Antibiotics*. Kleinkauf H, Dohren H, eds. Walter de Gruyter, Berlin. p 312-363.
 28. Uo ME, Joo DS, Cho SY. 2006. Screening and cultivation characteristics of alginate degrading bacteria. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 109-114.
 29. 안영길. 1993. 단백질의 변성과 재생, 효소화학. 청문각, 서울. p 118-125.

(2007년 11월 14일 접수; 2008년 3월 7일 채택)