[UCI]I804:24011-200000232741

2006年 8月

碩士學位論文

Streptomyces Cs 684 균주로부터 Phospholipase D의 생산, 분리정제 및 특성분석

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

藥 學 科

金 枝 賢

Streptomyces Cs 684 균주로부터 Phospholipase D의 생산, 분리정제 및 특성분석

Production, Purification and Characterization of Phospholipase D from *Streptomyces* Cs 684

2006年 8月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

藥 學 科

金 枝 賢

Streptomyces Cs 684 균주로부터 Phospholipase D의 생산, 분리정제 및 특성분석

指導敎授 柳 鎭 鐵

이 論文을 藥學碩士 學位申請論文으로 提出함

2006年 4月 17日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

藥 學 科

金 枝 賢

金枝賢의 碩士學位論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 教授 金 成 俊 印

委 員 光州科學技術院 教授 金 載 一 印

委 員 朝鮮大學校 教授 柳 鎭 鐵 印

2006年 6月 1 日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

Contents

List of tables

List of figures

Abbreviations

Abstract

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 8

Ⅱ-1. 시약 ····· 8

Ⅱ-2. 분석기기 ····· 8

Ⅱ-3. Phospholipase D를 생산하는 토양방선균의 분리 동정 ····· 8

Ⅱ-3-1. Phospholipase D활성을 가지는 토양 방선균의 분리 ····· 8

Ⅱ-3-2. Phospholipase D활성 측정 ····· 9

Ⅱ-3-3. 16S rDNA의 염기서열 ····· 9

Ⅱ-3-4. *Streptomyces* Cs 684 균주의 배양 ····· 10

Ⅱ-3-5. 단백질 정량 ····· 10

Ⅱ-4. Phospholipase D의 정제 ····· 10

Ⅱ-4-1. 조효소 조제 ····· 11

Ⅱ-4-2. Ammonium sulfate 분획 ····· 11

Ⅱ-4-3. Heat treatment ····· 11

Ⅱ-4-4. Sepharose CL-6B column chromatography ····· 12

Ⅱ-4-5. DEAE - Sepharose CL-6B column chromatography ·····12
Ⅱ-4-6. 최적 효소활성도와 안정성에 대한 온도의 영향 ·····12
Ⅱ-4-7. 효소활성도와 안정성에 대한 pH의 영향 ·····13
Ⅱ-4-8. 효소활성도에 대한 계면활성제에 대한 영향 ·····13
Ⅱ-4-9. 효소활성도에 대한 금속이온에 대한 영향 ·····13
Ⅲ. 결과 및 고찰 ·····14
Ⅲ-1. *Streptomyces* Cs 684 균주의 동정 ·····14
Ⅲ-1-1. 형태학적 특성분석 ·····14
Ⅲ-1-2. 분자생물학적 특성분석 ·····14
Ⅲ-2. Phospholipase D의 생산 ·····15
Ⅲ-3. *Streptomyces* Cs 684 이 생산하는 phospholipase D의 분리정제 ·····16
Ⅲ-4. 효소활성도와 안정성에 대한 온도의 영향 ·····17
Ⅲ-5. 효소활성도와 안정성에 대한 pH의 영향 ·····17
Ⅲ-6. 효소활성도에 대한 계면활성제의 영향 ·····17
Ⅲ-7. 효소활성도에 대한 금속 이온의 영향 ·····18

Ⅳ. 결론 ·····19

Ⅴ. 참고문헌 ·····33

List of tables

Table 1. Similarity of nucleotide sequence of 16S rDNA of *Streptomyces* Cs 684 with related species ·····22

Table 2. Purification of phospholipase D from *Streptomyces* Cs 684 ·····25

Table 3. Detergents effect on the hydrolytic activity of phospholipase D from *Streptomyces* Cs 684 ·····31

Table 4. Metal ions effect on the hydrolytic activity of phospholipase D from *Streptomyces* Cs 684 ·····32

List of figures

Fig 1. Hydrolysis from phosphatidylcholine by phospholipases ····· 7

Fig 2. Fermentation profiles for production from phospholipase D from *Streptomyces* Cs 684 ····· 21

Fig 3. Elution profiles of phospholipase D on Sepharose CL-6B column chromatography ····· ·····23

Fig 4. Elution profiles of phospholipase D on DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography ····· 24

Fig 5. Molecular weight determination from phospholipase D by SDS-PAGE ····· 26

Fig 6. Temperature effect on hydrolytic activity from phospholipase D of *Streptomyces* Cs 684 ····· ····· ····· 27

Fig 7. Thermal stability of phospholipase D from *Streptomyces* Cs 684 ····· 28

Fig 8. pH effect on activity from phospholipase D from *Streptomyces* Cs 684 ····· 29

Fig 9. pH stability from phospholipase D from *Streptomyces* Cs 684 ····· 30

List of abbreviations

DAG	Diacylglycerol
PC	Phosphatidylcholine
PA	Phosphatidic acid
sn	Stereochemical numbering
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
IP_2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
IP_3	Inositol 1,4,5-triphosphate
PKC	Protein kinase C
PLD	Phospholipase D
$CaCO_3$	Calcuim carbonate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
EDTA	Ethylene deamine tetra acetic acid

ABSTRACT

Production, Purification and Characterization of Phospholipase D from *Streptomyces* Cs 684

Kim Ji-Hyun
Adviser: Prof. Yoo Jin-Cheol Ph.D.
Department of Pharmacy,
Graduate School of Chosun University

Soil samples were screened for several actinomyces strains, that capable of producing phospholipase D, and it was revealed that a finally selected *Streptomyces* Cs 684 has a high phosholipase D activity. The production of phospholipase D from *Streptomyces* Cs 684 was carried out in GYT medium that contains glucose 2.0%, yeast extract 1.5%, tryotone 0.5%, calcium carbonate 0.1% at 28℃. 16S rDNA analysis showed that *Streptomyces* Cs 684 was highly homologous to *Streptomyces jumonjinensis* JCM 4947 and *Streptomyces nanningensis* YIM 33098. A extracellular phospholipase D was purified through several purification procedures such as ammonium sulfate fractionation, heat treatment, ultramembrane

(YM10) filtration, sepharose CL-6B column chromatography and DEAE-sepharose CL-6B column chromatography. The purified phospholipase D was identified with a major band of 48KDa on a 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The optimal temperature for hydrolytic activity was 55℃. Most of enzyme activity was retained for 30min incubation at 55℃ without a significant loss in enzyme activity. The enzyme showed an optimal pH of 7.0 in hydrolytic reaction and was stable between pH 6.0-9.0. Tween 20 increased enzyme activity, but was inhibited by polyoxyethylene-4-laurylether, N-laurylsarcosine and SDS. The enzyme activity was a little affected by Ca^{+2} metal ion. .

Ⅰ. 서 론

인지질은 생체막의 구성원이기도 하고 동시에 phospholipase의 활성화로 인해 다양한 종류의 이차전달물질이나 지질성 화학매개물질이 되어 세포내 혹은 세포간의 신호전달에 있어서 중요한 역할을 담당한다. 이들 신호를 전달하는 1차 물질인 신경 전달물질. 호르몬 및 각종 성장 인자들이 세포막에 있는 특이 수용채와 결합하게 되면 세포 내에서 2차 전달 물질을 만들어내게 된다.

Phopholipas는 인 지방질의 가수분해 반응과 염기 전이반응을 촉매하는 효소이다. 전이활성에 의해 변형 레시틴을 포함하는 항산화성 및 항종양성을 가지는 새로운 인지질 유도체를 생성함으로써 산업적으로 유용하게 이용될 수 있는 가능성을 보이고 있다. 이러한 유도체 생산이 효과적으로 수행되기 위해서는 높은 전이활성을 보이는 PLD의 확보가 중요하다. 세포구조의 이화학적 분해 및 기능저하 과정 중에서 세포막 지질의 분해는 환경적인 스트레스와 노화(scnescence)에 대한 호르몬(ethylene)의 반응과정중에 일어나는 신호변환경로(signal transduction pathway)에서 볼 수 있는 일반적인 양상이다. 인지질 분해 경로는 PLD(Phospholipase D), phosphatidate phosphatase, lipolytic acylhydrolase 및 lipoxygenase등의 효소들을 포함하는 인지질과 효소들의 작용 중에 생성된 각각의 재반응 산물에 대한 일련의 작용을 포함하는 경로이다. 이러한 효소들 중 Phospholipase D는 지질분해 경로대사에서 phosphatidylcholine,phosphatidylamine,phosphatidylinositol, phosphatidylglycerol과 같은 세포막 인지질의 가수분해를 촉진하는 효소이며 세포막 인지질을 phosphatidic acid로 전환시킨다. 최근에는 Phospholipase D isozymes(PLD α,PLD β,PLDγ,PLDδ)와 신호변환과정에서의 잠재적인 역할 등이 보고되고 있다. 최근 많은 종류의 호르몬, 생장인자 등의 신경전이 물질에 의해 세포막에 존재하는 인지질인

phosphatidylcholine (PC)의 가수분해에 의한 DAG의 증가가 밝혀지면서 PC 가수분해에 의한 신호전이 기작에 많은 관심이 모아지고 있다. PC는 phosphatidic acid (PA)에 choline이 결합된 것으로 3가지 다른 효소에 의해 가수 분해될 수 있다.[1-5] (Fig. 1)

Phospholipase A_1(PLA_1)은 각종 생물에 널리 분포하는 막결합형(membrans-bound)효소이나, Phospholipase A_2 (PLA_2)는 막결합형 또는 분비형으로 뱀독, 벌의 독,또는 포유동물의 췌장액에 존재하고 있음이 알려져있다.Phospholipase A_2 (PLA_2)는 고콜레스테롤증 치료제로서 또 Phospholipase A_1 (PLA_1)과 A_2는 계면활성제의 일종인 리조형 인지질 제조에 이용되어 왔다. Phospholipase A_2 (PLA_2)는 세포질에 존재하다가 세포가 자극을 받은 경우 세포막으로 이동하여 인지질의 sn-2 위치에 에스테르 결합을 가수분해하여 arachidonic acid와 같은 지방산과 lysophospholipid를 생성한다.[6,7] Fatty acid의 일종인 arachidonic acid는 arachidonic cascade에 관련한 여러 효소에 의해 생성되는 eicosanoid라 통칭하는 prostaglandin, thromboxane, leukotriene등의 지질성 화학전달물질의 전구체이다. Arachidonic acid에는 각각 cyclooxygenase경로,lipoxygenase 경로,epoxygenase 경로 3가지 주요 경로가 있다. 이들 화학전달물질들은 염증,천식 및 각종 혈관순환기계질병의 병리에 중심적인 역할을 담당하고 있다. Prostaglandin은 외부로부터 자극(agonist stimuli)에 의해 생체내 각종 조직 세포로부터 생합성되어 각 반응세포의 생리적 기능을 조절하는 강력한 지질성 화학전달물질이다.[8]

호르몬,pepide 성장인자,neuroransmier,면역 globulin 등이 세포 포면에 존재하는 특정한 receptor에 결합하게 되면 inositol phospholipid에 특이성을 갖는 phospholipase C(PLC)를 활성화 시킴으로써 세포내의 반응들을 일으킨다. 활성화된 phospholipase C는 세포막에 소량으로 존재하는 phospholipid 인 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2)를 Inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3)와 diacylglycerol(DAG)로 분해한다.[6] IP_3는 세포내의 저장소로부터 Ca^{+2}를 유리시키고 DAG는 DAG는 protein kinase C (PKC)를 활성화시켜 일련의 세포반응을 유도하여

궁극적으로 세포의 성장과 분화를 일으킨다.[6,9-12]

Phospholipase C는 cDNA에서 유추한 아미노산 서열을 비교하여 크게 PLC-α, PLC-β, PLC-γ로 분류할 수 있고 이 세 가지에서 적어도 16종류의 isoform이 발견되었다.[16] 이 중 eoidermal growth factor(EGF),plateletderived growth factor(PDGF)등의 세포성장인자에 의해 활성화되는 PLCγ1은 암과 특히 관련이 깊은 것으로 보고되었다. PLC-γ는 -β,δ와는 달리 receptor에 있는 phosphortyrosine 잔기와의 결합부위로 알려진 *src*homology(SH) domain을 가지며, 이 효소를 NIH3T3 세포에 주입하면 암세포화된다는 보고는 PLC-γ가 암세포의 증식에 중요한 역할을 할 것으로 추정케 한다. 현재까지 알려진 PLC의 세포내 신호전달 반응에서의 다양한 조절 역할을 볼 때 선택적인 PLC 저해제가 항암제를 비롯하여 신경계,순환계 질환 및 면역계 질환 치료제로서의 개발 가능성을 보여주고 있어 이들의 탐색이 이루어지고 있다. 저해 물질에는 유기합성 ether lipid analogue인 ET-18-OCH_3[17], phosphoinositol analogue[18], 식물유래 PLC저해물질로써 *Selaginella tamariscina*에서 분리된 amentoflavone[19], *Sophora flavenscens*에서 분리한 prenylated flavones[20] 등이 있으며 미생물에서 유래 PLC저해물질로는 *penicillium vinaceum*으로부터 분리된 vinaxanthone[21], *Actinomadura sp.*의 Q12713[22], *Chatetosphaeronema hispidulum*의 hispidospermidin[23], *Caloporusdichrous*의 caloporoside[24]등이 최근에 보고되었다. 미생물로부터 얻어지는 C형 인지질 분해효소는 유기인산의 제조,광학 이성질적으로 순수한 diacylglycerol의 생산 등과 같은 생촉매 합성 반응에 사용될 뿐만 아니라 최근에는 유지산업의 탈검(degumming)공정에 도입하여 유지중의 인지질을 리조형-인지질로 변화시켜 물에 쉽게 녹게하므로서, 종래의 화학적 정제법으로 인지질을 제거하는것에 비교하여 물의 소비량과 수증기의 소비를 줄일 수 있어 유지의 정제비용을 절반 정도로 낮출수 있다고 한다.[25-26]

Phospholipase D(E.C.3.1.4.4)는 세포막에 존재하는 인지질인 phosphatidylcholine(PC)을 가수분해하여 phosphatidic acid를 증가시켜 세포를 활성화시키는 기능을 한다. 포유동물 조직 세포막에 다량으로 존재하는 또 하나의 인지질인

phosphatidylcholine(PC)은 세포막의 골간 구조를 형성하는 기능 이외에 세포외부의 자극에 의하여 가수분해 되어 세포내 생리 현상을 조절할 수 있는 2차 신호 전달 물질을 생성하게 된다. Phospholipase D (PLD) 는 두 가지의 효소 활성을 나타낸다 (Fig2). 첫 번째의 활성은 phosphatidyl choline을 phosphatidic acid 와 choline으로 가수분해하는 효소활성이고 (hydrolytic activity), 다른 하나의 활성은 phosphatidyl choline의 polar head group을 상호 변환시켜 다른 phospholipid를 만드는 transphosphatidylation 효소활성이다.[27-28] PA는 최근 근육 세포에서 세포질내의 Ca^{2+} 농도를 증가시키며[29], neutrophil에서 NADPH oxidase를 활성화시켜 O_2의 생성을 촉진 시키고30[30], 섬유아세포등에서 유사 분열 촉진 기능을 수행하는 것을 보고했다.[31] 이 두 반응 중 transphosphatidylation은 생물 세포막을 구성하는 인지방질의 결합비율과 깊은 관계가 있는 것으로 연구되어 왔으며 이런 성질을 이용하여 lecithin으로부터 phosphatidylglycerol이나 phosphatidylethanol, phosphatidyl-serine등을 대량생산할 수 있는 기술개발이 활발히 이루어지고 있다. 레시틴의 $-R_3$기를 ascorbic acid(비타민 C)로 치환하므로서 phosphatidylascorbate라는 항산화성의 신기능성 레시틴 유도체를 만들 수 있고, antitumor nucleoside를 부착시킨 인지질 유도체를 만들수도 있다. 그 중 PG는 제과, 제빵, whip cream의 제조등 식품산업에 널리 활용할 수 있으며 화장품 산업에도 유용하게 될 수 있다.

최근 전 세계적으로 겪고 있는 문제 중 하나가 고령화 사회이다. UN인구국은 국가의 전체인구 중 65세 이상 노령인구의 비율이 7% 이상일 때를 고령화사회, 14% 이상일 때를 고령사회(aged society), 20% 이상일 때를 초고령사회로 분류하고 있다. 우리나라의 경우도 2000년 7월 1일을 기점으로 65세 이상 노령인구가 처음으로 총인구의 7.1%를 넘어서는 고령화 사회에 진입하였다. 한국 사회의 고령화 단계는 선진국에 비해 낮은 편이나,그 진행속도가 가히 "혁명적 “이라고 할 만큼 빠르다는데 그 심각성이 있다. 통계청에 따르면 2004년 한국의 고령화 지수(총인구대비 65세이상인구 비중)

8.7%로 일본,이탈리아,독일 등의 17~19%에 비해 크게 낮은 편이다.그러나 불과 20년 후인 2025년 한국사회의 고령자 지수는 19.9%로 현재 선진국의 수준을 상회할 것으로 본다. 이러한 고령자가 많은 사회가 안고 있는 중심적 문제로서 뇌 기능의 문제나 정신적 장해의 문제가 있다. 현재, 미국에 있어서 85세 이상의 노령자의 약 반수가 무엇인가의 정신적 장해를 갖고 있다고 말하고 있다. 한편, 일본에서도 고령자의 알츠하이머증을 시작으로 하는 치매증이 사회적으로 큰 문제가 되고 있다. 건강한 사람이라도 기억력 등의 뇌 기능 저하는 50세대에서 시작된다고 알려져 있고, 뇌의 기능은 쇠약해져 간다. 이처럼, 사람이 장수를 누리고 있는 지금, 단지 생명을 유지하는 것이 아니라, 어떻게 질이 높은 생활 (Quality of Life)을 유지하는 가가 중요한 과제가 되고 있다. 질이 높은 생활에의 사회적 요구가 높아지는 중, 다양한 뇌 기능성 소재가 발견되고 있다. 그 중에서 phospholipid류는 알츠하이머증을 시작으로 하는 치매증의 개선, 기억력 저하의 완화, 간질, 스트레스내성, 호르몬 리듬분비의 수복에 있어서 놀라운 효과를 보이고 있다.

고령화 사회를 넘어선 우리나라에서도 노인의료복지의 필요성이 증대함에 따라 노인성 질환 예방 및 치료를 위한 의약품이나 예방목적의 기능성식품의 수요가 그게 증가할 것으로 예상이 되며 위의 뇌 기능성 소재로써 phospholipid는 노인의료에 큰 비중을 차지할 것으로 본다. 현재 우리나라는 phospholipids 뇌 기능성 소재는 수입에 의존하고 있기 때문에 국내 자체적으로 phospholipid를 생산하여 외국산 제제를 대체할 수 있는 경쟁력의 확보가 필수적이라고 할 수 있다. Phospholipase D 는 포유류, 식물, 미생물에서 발견되고 있으며, phospholipid를 공업적으로 생산하기 위해 phospholipase D 에 대한 연구가 미생물에서 주로에서 이루어지고 있는데 방선균에서는 *S. hachijoensis*, *S. lydicus*, *S. antibioticus*, *S. choromofuscus*, *Streptoverticillium cinnamoneum* 등에서 phospholipase D 의 생산이 보고되었으며 활발한 연구가 진행되고 있다.

Phospholipase D는 아직까지 상업적인 생산단계에 와 있지는 않으나, 최근에는 유

전자 조작으로 안정된 균주를 확립하려는 연구도 시도되고 있다. 특히 일본은 PG의 대량생산기술 확립을 목표로 효소반응의 시스템 및 반응기의 개발등의 기술개발을 서두르고 있다.

본 연구에서는 우수한 균주의 확보에서부터 새로운 용도의 개발에 이르기까지 독자적인 연구를 서두를 필요가 있어, 전남지역의 토양에서 분리한 방선균을 대상으로 phospholipase D의 분해활성을 가지는 방선균을 수 종 분리하여 이들 중 활성이 뛰어난 *Streptomyces* Cs 684 균주를 선별하였으며 균주의 동정 및 균주가 생산하는 phospholipase D를 분리 정제하고 특성을 조사하였다

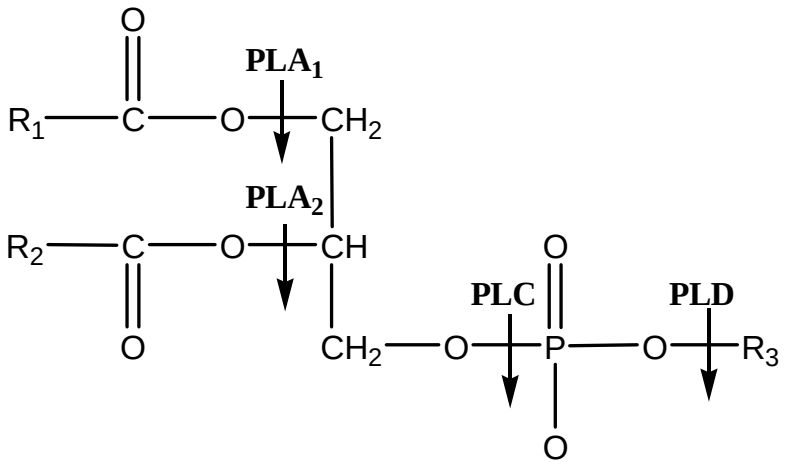

Fig.1 Hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipases.

R1,R2,R3 : 지방산 잔기의 알킬기

PLA_1, PLA_2 : phosphoipase A_1, phospholipase A_2

PLC : phospholipase C

PLD : phospholipase D

Ⅱ. 재료 및 방법

Ⅱ-1. 시약

방선균의 배양을 위한 배지는 주로 Junsei사의 제품을 사용하였다. 효소활성에 쓰이는 phosphatidylcholine, EDTA, 4-aminoantipyrine, phenol은 Sigma사의 제품을 사용하였다.

Ⅱ-2. 분석기기

효소정제를 위한 Sepharose CL-6B, DEAE-Sepharose CL-6B은 Pharmacia의 제품을 사용하였다.

Ⅱ-3. Phospholipase D활성을 가지는 토양 방선균의 분리 동정

Ⅱ-3-1. Phospholipase D활성을 가지는 토양 방선균의 분리

전남 해안 지역에서 채취한 토양 샘플을 3일정도 건조시킨 후 단계적으로 희석하여 Bennet's agar medium (1% Glucose, 0.1% Yeast extract, 0.2% Peptone, 0.1% Beef extract, pH:7.0) 에 nalidicxic acid (20ul/ml) 을 첨가한 배지에 도말하여 28℃에서 1-3주일간 배양하였다. 나타난 균체집락을 선정하여 다시 egg yolk medium에 도말하여 lipolytic활성을 가지는 방선균을 선별하였다. 이렇게 선별된 방선균은 ISP2 medium (0.2% Yeast extract, 1% Malt extract, 0.4% Glucose, pH:7.2)에 접종하여 28℃,

200rpm에서 배양하며 lipase활성을 관찰하였다. 분리 및 선별된 균주들은 OSYM (2% Oatmeal, 1% Soybean meal, 1% Dried yeast, 1% Mannitol) agar plate에서 배양 후 4℃의 냉장고에 보관하면서 사용하였다. 균주의 장기 보관은 포자를 20% glycerol로 보관용 vial에 취해 -85℃에 보관하고 6개월마다 계대 보존하였다.

II-3-2 Phospholipase D활성 측정

효소활성 측정은 phosphatidylcholine을 기질로 하는 방법을 사용하였다. 효소용액 20ul에 substrate emulsion (phosphatidylcholine 200mg을 증류수 4ml과 0.4ml diethylether과 섞어 1시간동안 sonication시킴) 80ul을 섞어 50℃에서 20분간 반응을 시키고 50mM EDTA (50mM EDTA in 1M Tris/Cl buffer pH 7.0) 으로 효소반응을 정지시키고 5분간 100℃에서 끓였다. 2분간 얼음에 방치 후 12,000rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액 100ul을 choline assay solution (choline oxidase 1.7mg, peroxidase 65ug, 4-aminoantipyrine 30mg, phenol 15mg을 10mM Tris/Cl pH 7.5 30ml에 녹임) 150ul과 혼합 후 37℃에서 60분간 반응을 시켰다. 반응 후 용액은 Triton X-100 300ul을 가하여 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

II-3-3. 16S rDNA의 염기서열

16S rDNA는 capillary rapid cycler (Idaho Technology)로 증폭하였으며 primer로는 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCT-3) 1492r (5'- AAGGAGGTGWTCCARCC - 3') (Lee *et al.*, 2000)을 사용하였다. 증폭조건은 변성은 94℃에서 1분, annealing은 55℃에서 1분, 신장은 72℃에서 1분간 총 30회 반복하였다. 증폭된 DNA는 Taq DiDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)와 oligonucleotide primers (Chun and

Goodfellow, 1995)를 이용해 직접 서열을 확인하였다. 얻어진 16S rDNA 염기서열은 AL16S program (Chun, 1995)을 이용해 Ribosomal Database project (Maidak *et al*., 1996)와 EMBL/GenBank database로부터 얻어진 *actinomycetes*의 16S rDNA sequence와 비교 분석하였다.

II-3-4. *Streptomyces* Cs 684 균주의 배양

OSYM agar 배지에서 배양한 균주의 균사체 및 포자를 취하여 50ml의 OSYM 액체배지가 들어있는 250ml baffled flask에 접종하여 28℃ 180rpm에서 2일간 전 배양하였다. 이 배양액을 phospholipase D의 생산을 위해 자체 개발한 GYT (2% Glucose,1.5% Yeast extract,0.5% Tryptone, 0.1%$CaCO_3$) medium에 2% 수준으로 접종하여 28℃, 180rpm에서 2일간 배양하였다.

II-3-5. 단백질 정량

단백질의 농도는 Bradford의 방법[33]을 이용하여 bovine serum albumin (Sigma co.)을 표준시료로 하여 측정하였으며 효소 정제 과정 중 분획내의 상대적 단백질 농도는 280nm 흡광도로 측정하였다.

II-4. Phospholipase D의 정제

Ⅱ-4-1. 조효소 조제

OSYM agar 배지에서 배양한 균주의 균사체 및 포자를 취하여 50ml의 OSYM 액체 배지가 들어있는 250ml baffled flask에 접종하여 28℃ 180rpm에서 2일간 전 배양하였다. 이 배양액을 phospholipase D의 생산을 위해 자체 개발한 phospholipase D용 배양배지 GYT (2% Glucose,1.5% Yeast extract,0.5% Tryptone,0.1% $CaCO_3$)medium 1L에 2% 수준으로 접종하여 28℃ 180rpm에서 2일간 배양하였다. 배양액은 6000rpm에서 30분간 원심분리 후 상층액을 조효소로 이용하였다.

Ⅱ-4-2. Ammonium sulfate 분획

조효소 용액에 25-80%가 포화되도록 ammonium sulfate를 가하고 원심분리(12,000rpm, 60분)하여 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물에 10mM Tris-HCl (pH 7.0)를 가하여 용해시킨 후 YM10 (M.W 10,000) membrane을 사용하여 농축 및 탈염하고 동일완충액으로 평형화시켰다.

Ⅱ-4-3. Heat treatment

25-80% ammonium sulfate처리 후 탈염 농축한 효소시료는 phospholipase D의 열안정성을 고려하여 효소가 denaturation되지 않는 온도인 50℃에서 30분간 처리하여 열에 약한 protein을 일부 제거하였다.

Ⅱ-4-4. Sepharose CL-6B column chromatography

25-80% ammonium sulfate농축 탈염, 열처리후의 효소시료는 Sepharose CL-6B (1.8*106cm) column에 적하하고 10mM Tris - HCl(pH7.0) buffer를 이용하여 전개시켜 활성을 보이는 분획들을 회수하였다.
회수된 효소용액을 amicon UF 막인 YM10 membrane을 이용하여 농축 후 동일완충액으로 평형화시켰다.

Ⅱ-4-5. DEAE - Sepharose CL-6B column chromatography

Sepharose CL-6B column chromatography(1.0*68cm) 후 얻은 활성분획은 2ml로 탈염 및 농축하여 10mM Tris-HCl(pH 7.0) buffer로 평형화 시켰다. 농축 시료는 동일 완충액으로 평형화된 DEAE- Sepharose CL-6B column chromatography(1.0*68cm)에 적하한 후 KCl(0, 0.1, 0.15M)을 차례대로 용출 시켜 최종적으로 순수한 활성분획을 회수하였다. 정제된 효소의 확인은 Laemmli[34]의 방법에 따라 SDS-PAGE로 수행하였다.

Ⅱ-4-6. 최적 효소활성도와 안정성에 대한 온도의 영향

최적 활성 온도는 10-70℃의 범위에서 pH(7.0)조건으로 효소 반응을 수행하여 활성을 측정하였다. 효소의 열에 대한 안정성은 효소 용액을 50℃의 온도에서 30분간 방치한 후 잔존효소 활성을 측정함으로써 효소의 열에 대한 안정성을 측정하였다.

Ⅱ-4-7. 효소활성도와 안정성에 대한 pH의 영향

정제된 효소활성에 대한 최적 pH는 pH 2-7.5는 sodium-citrate buffer, pH 7.5-10는 Tris-HCl buffer를 사용하여 효소활성을 측정하였으며 pH에 대한 안정성은 pH 2-10의 범위에서 4℃, 24시간 방치 후 잔존효소 활성을 측정함으로써 pH 안정성을 측정하였다.

Ⅱ-4-8. 효소활성도에 대한 계면활성제에 대한 영향

효소활성에 미치는 계면활성제의 영향을 조사하기 위해 효소의 활성에 영향을 미치는 계면활성제들(Tween20, Tween80, Deoxycholic acid, N-laurylsarcosine, CHAPS, Polyoxyethylene-4-laurylether, SDS)을 2%(v/v)가 되도록 효소액에 첨가하고 45℃에서 20분간 반응시킨 후 효소의 활성의 변화를 측정하였다.

Ⅱ-4-9. 효소활성도에 대한 금속에 대한 영향

효소 활성에 미치는 금속이온들의 영향을 조사하기 위해 효소반응용액에 금속이온(Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, EDTA)을 2mM 되도록 첨가하고 45℃에서 20분간 반응시킨 후 효소의 활성의 변화를 측정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

Ⅲ-1. *Streptomyces* Cs 684 균주의 동정

Ⅲ-1-1. 형태학적 특성 분석

전남 해안 지역에서 분리한 600여종의 방선균 중 phospholipase D의 분해활성이 높은 균주인 *Streptomyces* Cs 684 균주를 선별하였다. *Streptomyces* Cs 684 균주를 OSYM agar 배지에 접종한 후 28℃에서 배양하였을 때 3~4일이 경과하면서부터 colony가 관찰되었으며 이 colony들은 단단하였으면 포자들은 substrate mycelium에 달라붙어 쉽게 떨어지지 않았다.

Ⅲ-1-2. 분자생물학적 특성 분석

Streptomyces Cs 684 균주에서 추출한 total DNA를 template를 이용하여 16S rDNA 부분을 PCR 반응으로 증폭하였으며 증폭된 16S rDNA 부분의 9182개의 염기서열은 다음과 같다.

5 ‘-GCTGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCGCTTCGGTGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTA
ACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTGTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAATACCTGCCGAGGCATC
TTGGCGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGC
GACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG
GGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTC

AGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTTGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTT
AACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCG
CAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTTAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCG
AACGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGC
AGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCT-3'

결정된 16S rDNA의 염기서열을 Blast search program(NCBI)를 이용하여 가장 유사도가 높은 균주들을 검색한 결과, 유전자내 G+C 함량이 76.1 mol%로서 스트렙토마이세스속의 대표적인 균주들은 상동성을 보이는 것으로 확인되었다. *Streptomyces*속은 495종(2004년 기준)이 존재하며, 16S rDNA sequence 분석 결과, *Streptomyces jumonjinensis* JCM 4947 - unpublish name AB045863 97.84의 유사성을 보였다. (Table 1.)[35-38]

Ⅲ-2. Phospholipase D의 생산

Streptomyces Cs 684균주를 GYT 배지 200ml이 들어있는 1L baffled flask에 2%의 종배양액을 접종하고 28℃, 180rpm에서 배양하면서 배양시간에 따른 phospholipase D의 생산성, 건조 균체량, pH 변화를 조사하였다. 균의 증식은 배양 24시간째부터 증가하기 시작하여 48시간째까지 증가하였으나 그 이후부터 균의 생육이 차츰 감소하였다. Phospholipase D의 생성은 배양 24시간째부터 증가하여 48시간째까지 증가하였다가 140시간째까지 서서히 감소하였다. 배양액 내의 pH는 24시간부터 서서히 증가하여 이후에는 서서히 감소되다 유지되었다.(Fig. 2)

Ⅲ-3. *Streptomyces* Cs 684이 생산하는 Phospholipase D의 분리, 정제

Streptomyces Cs 684에 의해 생산된 phospholipase D의 전반적인 정제과정들은 Table 2.에 요약하여 나타내었다. 조효소액을 ammonium sulfate, heat treatment, Sepharose CL-6B column chromatography (Fig.3), DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography에 의해 PLD를 정제하였다. *Streptomyces* Cs 684의 배양 여액을 ammonium sulfate (25-80%) 로 분획하고 농축하여 탈염시킨 효소용액을 얻었다. 이 용액을 50℃에서 1시간 처리하고 12,000rpm에서 30분간 원심분리를 하여 열에 약한 단백질들을 제거하였다. 원심분리 후 얻은 상등액은 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)으로 평형화시키고 최소로 농축하여 동일 완충액으로 평형화된 Sepharose CL-6B column (1.8*106cm)에 적하하여 동일 완충액으로 12ml/hr의 속도로 용출시켰다. Fig. 3에서와 같이 phospholipase D는 단일 피크로 용출되었다. Sepharose CL-6B column chromatography 활성분획의 정제도는 1.55배였으며 수율은 34%였고 비활성도는 8.14unit/mg이었다. Sepharose Cl-6B column에서 얻은 활성 분획을 amicon UF막인 YM10 (MW 10,000)을 사용하여 1ml이내로 농축한 후 DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography(1.0*68cm)에 적하하고 0M, 0.1M, 0.15M KCl의 농도로 용출하였을때, phospholipase D의 활성분획은 0.15M KCl 농도에서 나타났다.(Fig 4). 0.15M KCl elution에서 나온 활성분획의 정제도는 4.29배였으며 수율은 0.9% 였으며 비활성도는 12Unit/mg이었다. 정제된 phospholipase D의 분자량은 SDS-PAGE를 통해 약 48KDa인 것으로 밝혀졌다. (Fig.5) 이는 Carrea 등[39]이 *Streptomyces* 속에서 분리 정제한 PLD 효소(50KDa)와 비슷한 크기인 것으로 나타났다. 그러나 Shimbo등[40]이 *Streptomyces antibioticus*에서 분리 정제한 PLD의 분자량은 약 60KDa으로 나타나 이것보다는 약간 적은 분자량을 나타내고 있다.

Ⅲ-4. 효소활성도와 안정성에 대한 온도의 영향

온도가 정제된 효소활성과 안정성에 미치는 영향을 조사하였다. 효소반응의 최적 온도는 55℃로 나타났으며 55-65℃사이에서는 상대적으로 높은 활성을 유지하였다. 55℃에서 30분 동안 처리 시 효소의 열안정성은 70% 유지하였다.(Fig.6,7)

Ⅲ-5. 효소활성도와 안정성에 대한 pH의 영향

pH가 phospholipase D의 활성과 안정성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 효소반응의 최적 pH는 7.0으로 나타났다. 각각의 pH 범위에서 4℃, 24시간동안 처리 후 잔존 활성을 조사한 결과 pH 안정성은 6.0-9.0부근으로 약알칼리조건에서 안정한 것으로 나타났다.(Fig.8,9)

Ⅲ-6. 효소활성도에 대한 계면활성제의 영향

효소에 영향을 미치는 계면활성제인 Triton X-100, Tween 20, Tween 80, Deoxycholate, CHAPS, N-laurylsarcosine, Polyoxyethylene-4-laurylether, SDS를 2%(v/v)로 하여 효소활성에 대한 영향을 검토하였다.

실험결과 Table4 에 나타낸 바와 같이 효소는 Tween 20 에서 최대 활성을 나타내었다. SDS 첨가 시 91.4%의 저해를 나타내었으며 N-laurylsarcosine은 87.98%, Polyoxyethylene -4- laurylether는 76.4%의 효소활성이 저해되었다.

Ⅲ-7. 효소활성도에 대한 금속이온의 영향

효소 반응용액에 금속이온(Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, EDTA)을 2mM 되도록 첨가한 후 효소 활성의 변화를 측정하였다. Table 5. 에 나타낸 바와 같이 효소는 효소활성에 금속이온의 영향을 받지않았다. 이는 Shimbo등[40]이 *Streptomyces antibioticus*에서 분리 정제한 PLD의 여러 가지 금속이온에 대해 영향을 본 결과에서 큰 차이(99-100%)를 보이지 않았던 것과 유사한 경향을 보였다.

Ⅳ. 결　　론

전남 지역에서 채취한 토양 시료로부터 600여종의 방선균주를 분리하였다. 이들 균주의 배양 상등액 중 phospholipase D의 가수분해 활성이 양호한 균주를 탐색한 결과, 3종의 균주를 선발하였으며 이 중 활성이 높은 *Streptomyces* Cs 684 배양액으로 phospholipase D 효소를 분리정제하여 그 특성을 조사하였다. 16S rDNA 염기서열을 유사도가 높은 균주를 검색한 결과 *Streptomyces* Cs 684 균주는 *Streptomyces jumonjinensis* JCM 4947 - unpublish name AB045863 97.84%의 가장 높은 유사도를 나타내었다.

Streptomyces Cs 684 균주는 Glucose 2.0%, Yeast extract 1.5%, Tryotone 0.5%, 0.1% Calcium carbonate의 배양배지에서 28℃, 180rpm에서 배양하였을 때 48시간째 최대 활성을 나타내었으며 그 이후로부터는 점차 효소 활성이 감소하였다. *Streptomyces* Cs 684을 GYT (Glucose 2.0%, Yeast extract 1.5%, Tryotone 0.5%, Calcium carbonate 0.1%) 배지에서 최대 활성을 가지는 48시간째에 얻은 배양액을 ammonium sulfate 분획, Sepharose CL-6B column chromatography, DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography 방법을 차례대로 적용하여 약 48 KDa의 phospholipase D 효소를 얻었다. Phospholipase D의 최적온도는 55℃였으며 55-65℃에서 상대적으로 높은 활성을 유지하였다. 55℃에서 30분 동안 처리 시 효소의 열안정성은 70% 유지함을 보였다. 정제된 phospholipase D의 최적 pH는 7.0이였으며 pH 6.0~9.0으로 약알칼리조건에서 안정한 것으로 나타났다. 2%(v/v)수준에서 계면활성제가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하였다. SDS, N-laurylsarcosine은 효소활성에 영향을 미치지 않았으며 Tween 20,Triton X-100,의 첨가는 효소활성의 증가를 보였다. 그리고 2mM 수준에서의 대부분의 금속 이온은 영향을 받지 않고 Ca^{+2}의 약간의 영향을 받았다.

전이활성에 의한 생성물의 정량에 관한 실험이 추가 수행되어야 하며 효소활성의 수치의 정량화 및 전이활성의 개량이 이루어진다면 *Streptomyces* Cs 684균주가 생산한 phospholipase D는 산업화에 충분히 활용 가능하다고 생각된다.

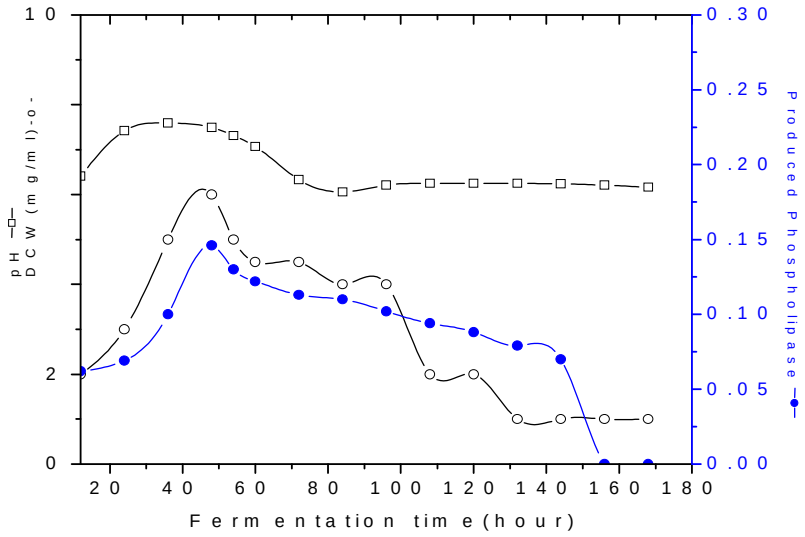

Fig 2. Fermentation profiles for production of phospholipase D from *Streptomyces* Cs 684

Table 1. Similarity of nucleotide sequence of 16S rDNA of *Streptomyces* Cs684 with related species

균주	등재번호	상동성	nt차이 /비교수
Streptomyces jumonjinensis JCM 4947 - unpublish name	AB045863	97.84	31/1436
Streptomyces nanningensis YIM 33098 - 2003 in press	AY222320	97.48	36/1431
Streptomyces lipmanii JCM 4711	AB045861	97.28	39/1432
Streptomyces avermitilis NCIBM 12804T	AF145223	96.86	45/1434
Streptomyces mirabilis ATCC 27447T	AF112180	96.50	50/1429
Streptomyces acidiscabies ATCC 49003T	D63865	96.44	51/1433
Streptomyces cinnabarinus ISP 5467T	AJ399487	96.24	53/1408
Streptomyces lincolnensis NRRL 2936T	X79854	96.09	56/1432
Streptomyces diastatochromogenes ATCC 12309T	D63867	96.02	57/1433
Streptomyces curacoi ISP 5107T	AJ399471	95.96	57/1410
Streptomyces viridochromogenes JCM 5013T	AB045858	95.95	58/1431
Streptomyces cyaneus ISP 5108T	AJ399460	95.95	57/1406
Streptomyces capoamus JCM 4734T	AB045877	95.83	59/1433
Streptomyces griseorubiginosus ISP 5469T	AJ399488	95.82	59/1410
Streptomyces neyagawaensis ATCC 27449T	D63869	95.81	60/1433
Streptomyces galbus DSM 40089T	X79852	95.81	60/1432
Streptomyces pseudovenezuelae ISP 5212T	AJ399481	95.74	60/1410
Streptomyces resistomycificus DSM 40133T	AJ31092	95.74	60/1410
Streptomyces galilaeus JCM 4757T	AB045878	95.67	62/1433
Streptomyces scabies ATCC 49173T	D63862	95.60	63/1432

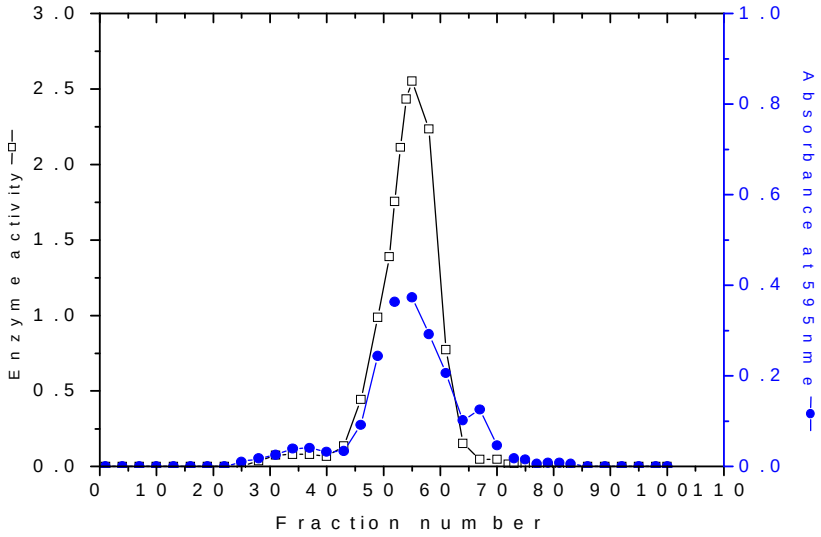

Fig 3. Elution profile of phospholipase D on Sepharose CL-6B column chromatography

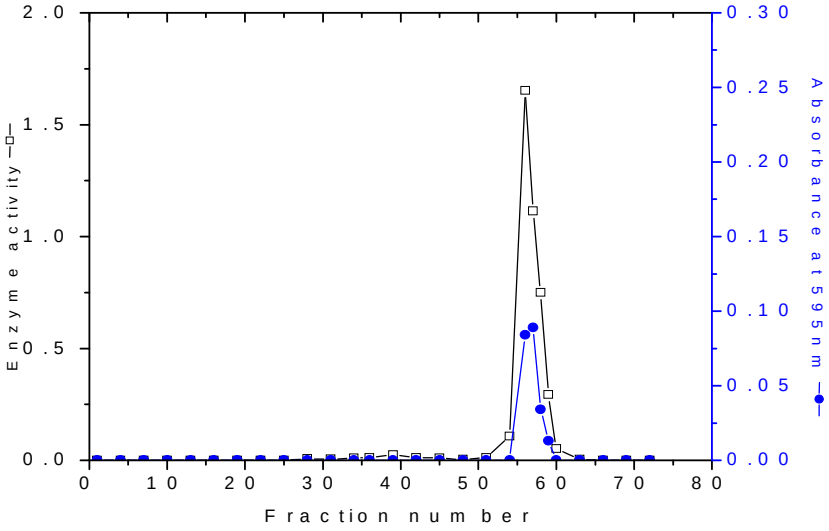

Fig 4. Elution profile of phospholipase D on DEAE - Sepharose CL- 6B column chromatography

Table 2. Purification of phospholipase D from *Streptomyces* Cs 684

Step	Total Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Fold	Yield (%)
Crude supernatnat	49.34	138	2.8	1	100
Ammonium sulfate	19.05	100	2.25	1.88	73
Sepharose CL-6B	5.9	48	8.14	1.55	34
DEAE-Sepharose CL-6B	0.1	1.2	12	4.29	0.9

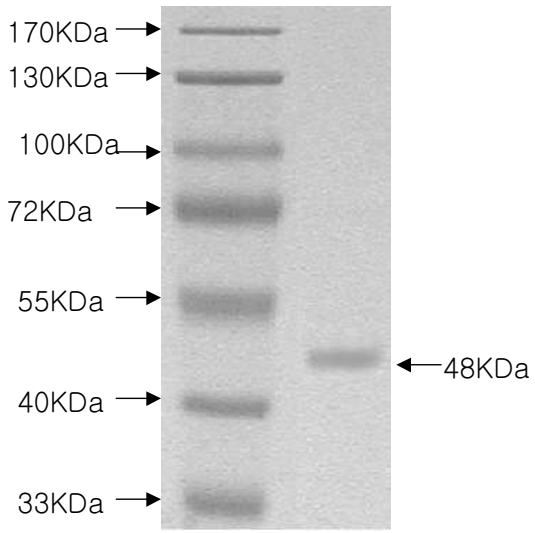

Fig 5. Molecular weight determination from phospholipase D by SDS-PAGE

Lane 1 : Size marker (MBI Fermantase Co.)

Lane 2: PLD

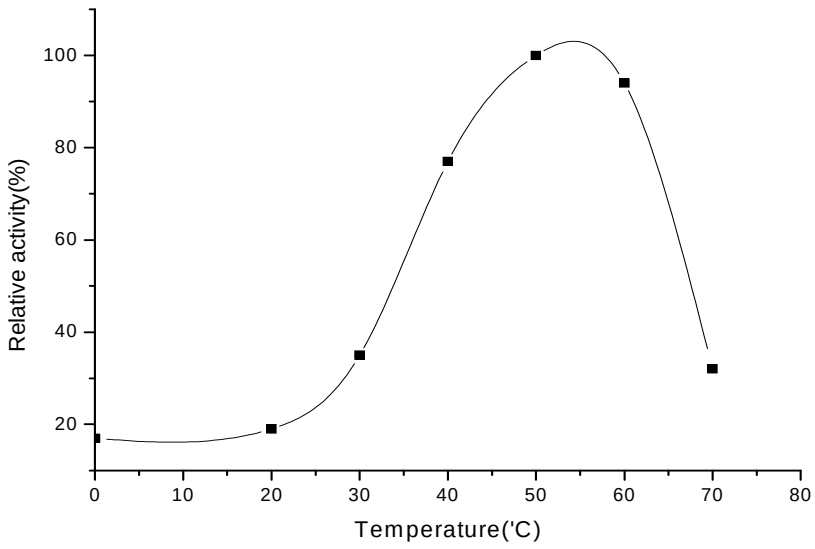

Fig 6. Temperature effect on hydrolytic activity of phospholipase D from *Streptomyces* Cs 684

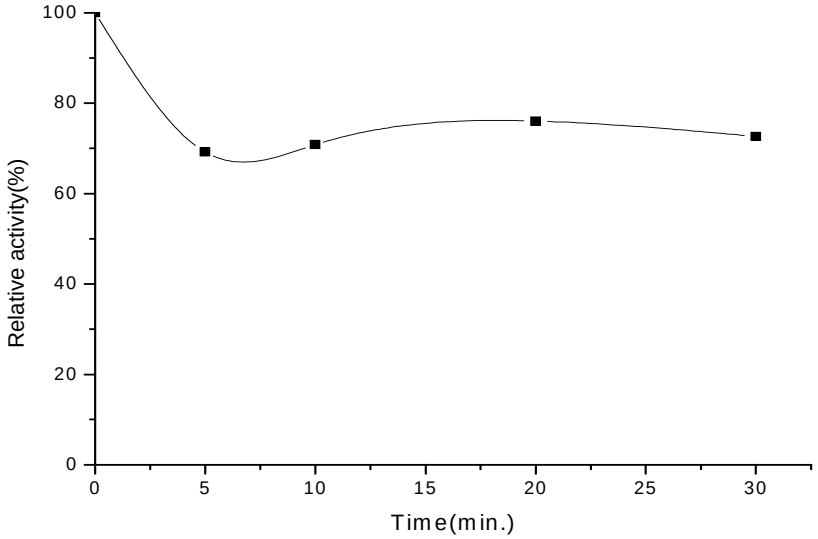

Fig 7. Thermal stability of phospholipase D from *Streptomyces* Cs 684

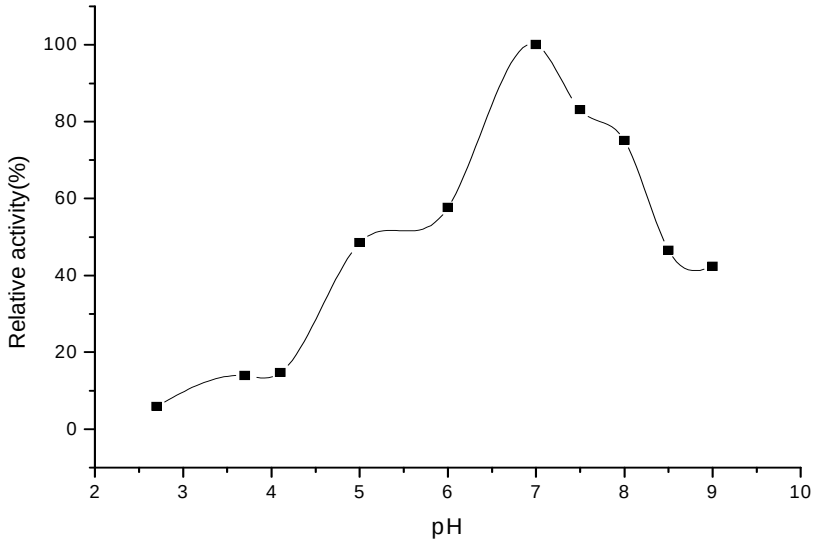

Fig 8. pH effect on activity of phospholipase D from *Streptomyces* Cs 684

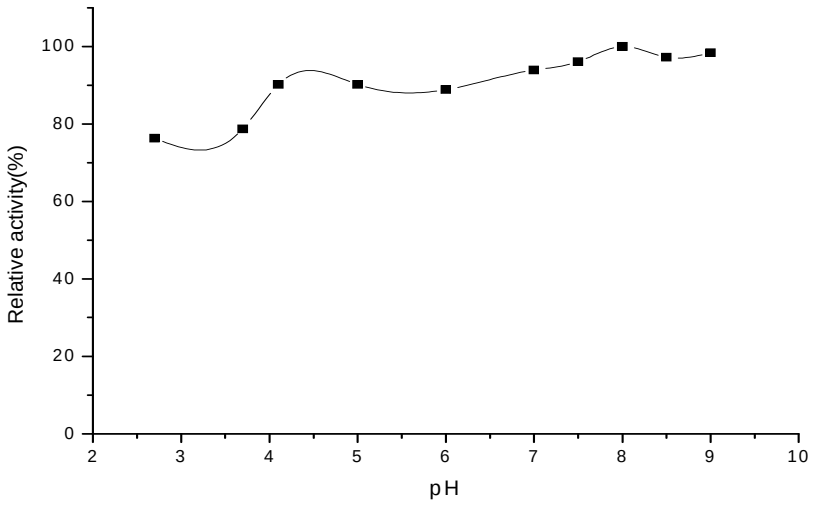

Fig 9. pH stability of phospholipase D from *Streptomyces* Cs 684

Table 3 .Detergents effect on the hydrolytic activity of phospholipase D from *Streptomyces* Cs684

Biological detergents	Ionic	Relative activity(%)
None		37.98
Triton X-100	Non-Ionic	91.85
Tween 20	Non-Ionic	100
Tween 80	Non-Ionic	57.08
Polyoxyethylene-4-laurylether	Non-Ionic	23.6
Deoxycholic acid	Anionic	34.55
N-laurylsarcosine	Anionic	12.02
CHAPS	Zwitter-Ionic	30.04
SDS	Anionic	8.58

Table 4 . Metal ions effect on the hydrolytic activity of phospholipase D from *Streptomyces* Cs 684

Metal ions	Relative activity(%)
None	100
Ca^{++}	77
Mg^{++}	97
Mn^{++}	95
Co^{++}	98
Zn^{++}	104
EDTA	98

V. 참 고 문 헌

1. Exton, J.H. (1990) J. Biol. chem. 265, 1-4.
2. Guillemain, I., and Rossignol, B. (1992) FEBS Lett. 314, 489-492.
3. Ha, K.-S., amd Thompson, G. A., Jr. (1992) Biochem. 31, 576-603.
4. Cook, S. J., and Wakelam, M. J. O. (1992) Biochem. J. 285, 247-253.
5. Mangoura, D., and Dawson, G. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci.U.S,A.90,2915-2919.
6. Nishizuka, Y. (1992) Science 258, 607-614.
7. Dennis.E.A.,and Boyer,P.D (1983)The enzyme Academicpress,NewYork,16pp,307-353
8. Bonventre,J.V.(1992)J.Am.Soc.Nephrol.3,128-150
9. Berridge, M. J. (1987) Ann. Rev. Biochem. 56, 159-193.
10. Berridge, M. J., and Irvine, R. F. (1989) Nature 341, 197-205.
11. Bell, R. M., and Burns, D. J. (1991) J, Biol. chem. 266, 4661-4664.
12. Zidovetzki, R., and Lester, D. S. (1992) Biochem. Biophys. Acta. 1134,261-272.
13. Farese, R. V., Standaert, M. L., Arnold, T., Yu, B., Ishizuka, T., Hoffman, J.,Vila, M., and Cooper, D. R. (1992) Cell. Signalling 4, 133-143.
14. Hocevar, B. A., Burns, D. J., and Fields, A. P. (1993) J. Biol. chem. 268, 7545-7552.
15. Herget, T., Brooks, S. F., Broad, S., and Rozengurt, E. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 2945-2949.
16. Rhee SG, Choi KD. (1992) Regulation of inositol phospholipidspecific phospholipase C isozymes. J. Biol. chem. Jun 25;267(18): 12393-6.

17. Powis G, Seewald MJ, Gratas C, Melder D, Riebow J, Modest EJ. (1992) Selective inhibition of phosphatidylinositol phospholipase C by cytotoxic ether lipid analogues. Cancer Res. May 15;52(10):2835-40.
18. Potter, B. V. L. (1990) Recent advancesin the chemistry and biochemistry of inositol phosphates of biological interest. Nature, Prod. Rep. 1:1-24.
19. Lee HS, Oh WK, Kim BY, Ahn SC, Kang DO, Shin DI, Kim J, Mheen TI, Ahn JS. (1996) Inhibition of phospholipase C gamma 1 activity by amentoflavone isolated from Selaginella tamariscina Plant Med. Aug;62(4):293-6.
20. Lee HS, Ko HR, Ryu SY, Oh WK, Kim BY, Ahn SC, Mheen TI, Ahn JS. (1997) Inhibition of phospholipaase C gamma 1 by the prenylated flavonoids from Sophora flavescens. Plant Med. Jun;63(3):266-8.
21. Aoki, M., Itezono, Y., Shirai, H., Nakayama, N., SaKai, A. and Tanaka, Y. (1991) Structure of a novel phospholipase Cinhibitor,vanaxanthone(R009-1450), produced by penicillium vanaceum, Tetrahed. Lett. 32: 4737-4740.
22. Ogawara H, Higashi K, Manita S, Hidaka M, Kato H, Takenawa T. 1993. An inhibitor of inositol-phospholipid-specific phospholipase C. Biochim Biophys Acta. 1993 Feb 17;1175(3):289-92
23. Yanagisawa M, Sakai A, Adachi K, Sano T, Watanabe K, Tanaka Y, Okuda T. (1994) Hispidospermidin, a novel phospholipase C inhibitor produced by Chaetosphaeroneama hispidulum(Cda) Moesz NR 7127. I. Screening, taxonomy, and fermentation. J Antibiot (Tokyo). Jan;47(1):1-5.
24. Larone, D. H. (1995) Medically important fungi: a guide to identification. Pp. 132-133. ASM press. Washington, D. C.
25. Clausen,K.(2001),Enzymatic oil-degumming by a novel microbial phospholipase, Eur,Lipid Sci,Technol.103,333-340

26. Schnider,M (2001),Phospholipids for functional food, Eur,J.Lipid Sci,Technol.103,98-101
27. Eibl, H and Kovachev, S. (1981) Methods Enzymol. 72, 632-639.
28. Juneja, L. R., Hibi, N., Yamane, T. and Shimizu, S. (1987) Enzyme Microb. Technol. 9, 350-354.
29. Nishzuka, Y. (1992) Science 258, 607-614.
30. Salmon, D.M., and Honeyman, T.W.(1980) *Nature* 284,344-345
31. Bauidry, S.A., Elsey,K.L.,and Bass,D.A.(1992)*J.Biol.Chem.* 267,25141-25152
32. Tsai,m.h.,Yu,C.L.,Wei,F.S.,and Stacey,D.W.(1989) *Science* 243, 522-526
33. Bradford, M. M.(1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-251
34. Laemmli,U.K.(1970).Cleavage of structural proteins during the assembly of the hesd of Bacteriophage T4.Nature 227,680-685
35. Jukes,T.H.,Cantor,C.R.(1969).Evolution of protein molecules. In Mammalian protein metabolism,pp.21-132.Edited by H.N.Munro.New York.Academic press
36. Saitou,N,Nei,M.(1987).The neighbor-joining method.Mol biol evol 4,406-425
37. Kim,S.B.,Goodfellow,M.(2002) *Streptomyces avermitillis* sp.nov.,rev.,a taxonomic home for the avermectin-producing*streptomyces.* Int.J.Syst.Evol. Microbiol.52,2011-2014
38. Peter H. A. Sneath, Nicholas S. Mair, M. Elisabeth Sharpe, John G. Holt. (1986). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. vol. 4. Willians and Wilkins.
39. Carrea, G., P. D'Arrigo, F.Secundo, and S. Servi.(1997). Purification and applications of a phospholipase D from a new strain of *Streptomyces.*

Biotechnol. Lett. 19:1083-1085

40. Shimbo, K., Y. Iwasaki, T. Yamane, and K. Ina.(1993). Purification and properties of phospholipase D from *Streptomyces* antibioticus. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57: 1946-1948