creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

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

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 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

dCollection

[UCI]I804:24011-200000239194

2010년 2월

석사학위논문

Streptomyces sp. CS624 균주가 생산하는 피브린 분해효소 연구

조선대학교 대학원

약 학 과

박 성 주

Streptomyces sp. CS624 균주가 생산하는 피브린 분해효소 연구

Fibrinolytic enzyme from
Streptomyces sp. CS624

2010년 2월 25일

조선대학교 대학원
약 학 과
박 성 주

Streptomyces sp. CS624 균주가 생산하는 피브린 분해효소 연구

지도교수 유 진 철

이 논문을 약학석사 학위신청논문으로 제출함.

2009년 10월

조선대학교 대학원

약 학 과

박 성 주

박성주의 석사학위논문을 인준함.

위원장 조선대학교 교수 홍 준 희 (인)

위 원 조선대학교 교수 손 홍 래 (인)

위 원 조선대학교 교수 유 진 철 (인)

2009년 11월

조선대학교 대학원

Contents

List of tables

List of figures

ABSTRACT

제1장 서론 ····· 1

제2장 재료 및 방법 ····· 5

제1절 시약 ····· 5

제2절 혈전분해효소를 생산하는 토양방선균의 분리 및 동정 ····· 5

1. 혈전분해효소를 생산하는 토양 방선균의 분리 ····· 5

2. 혈전분해효소를 생산하는 토양 방선균의 16S rDNA의 염기서열 ····· 6

제3절 혈전분해효소를 생산하는 *Streptomyces* sp. CS624 균주의 최적 배양 조건 ····· 6

제4절 *Streptomyces* sp. CS624가 생산하는 혈전분해효소의 분리정제 ····· 6

1. 혈전분해효소 생산 ····· 7

2. Ammonium sulfate 분획 ····· 7
3. Sepharose CL-6B column chromatography ····· 7
4. DEAE - Sepharose CL-6B column chromatography · 7
제5절 효소 활성 측정 ····· 8
1. 단백질 분해 효소 활성 측정 ····· 8
2. 혈전분해효소 활성 측정 ····· 8
3. 단백질 정량 ····· 9
4. 겔 전기영동 ····· 9
5. Fibrin zymography ····· 9
6. Fibrinogenolytic activity ····· 10
제6절 혈전분해효소의 특성 ····· 10
1. 혈전분해효소 활성과 안정성에 대한 온도의 영향 ····· 10
2. 혈전분해효소 활성과 안정성에 대한 pH의 영향 ····· 10
3. 혈전분해효소 활성에 대한 금속이온과 protease inhibitor 에 대한 영향 ····· 11
4. 다양한 기질에 의한 혈전분해 특성 분석 ····· 11
제3장 결과 및 고찰 ····· 13
제1절 선별된 혈전분해효소 생산 균주의 동정 ····· 13
1. 형태학적 특성 분석 ····· 13
2. 분자생물학적 특성 분석 ····· 13
제2절 혈전분해효소 생산성 향상을 위한 배지 성분의 최

적화 ····· 14
1. 탄소원이 혈전분해효소 생산에 미치는 영향 ····· 14
2. 질소원이 혈전분해효소 생산에 미치는 영향 ····· 14
3. 인산원이 혈전분해효소 생산에 미치는 영향 ····· 14
제3절 배양시간에 따른 방선균의 생장, pH, 혈전분해활성의 변화 ····· 15
제4절 *Streptomyces* sp. CS624가 생산하는 혈전분해효소의 분리정제 ····· 15
제5절 혈전분해효소 활성 측정 ····· 16
1. 겔 전기영동과 fibrin zymography ····· 16
2. Fibrinolytic 활성과 Fibrinogenolytic 활성 ····· 16
제6절 혈전분해효소의 특성 ····· 17
1. 혈전분해효소활성과 안정성에 대한 온도의 영향 ····· 17
2. 혈전분해효소활성과 안정성에 대한 pH의 영향 ····· 17
3. 혈전분해효소활성에 대한 금속이온과 protease inhibitor의 영향 ····· 17
4. 다양한 기질에 의한 혈전분해 특성 분석 ····· 18
제4장 결론 ····· 19
제5장 참고문헌 ····· 51

List of tables

Table 1. 16S rDNA sequence of *Streptomyces* sp. CS624 and other related species. ····· 24
Table 2. Composition of various media. ····· 26
Table 3. Effect of carbon sources on the production of enzyme activity. ····· 29
Table 4. Effect of nitrogen sources on the production of enzyme activity. ····· 31
Table 5. Effect of phosphorus sources on the enzyme activity. ····· 34
Table 6. Purification summary of FP624. ····· 37
Table 7. Effect of metal ions and protease inhibitors on the protease activity. ····· 47
Table 8. Chromogenic substrates. ····· 48
Table 9. Chracteristics of FP624 and other related Fibrinolytic enzymes. 50

List of figures

Fig. 1. Mechanism of blood coagulation and fibrinolysis. ····· 2
Fig. 2. Colony morphology of *Streptomyces* sp. CS624. ····· 22
Fig. 3. 16S rDNA sequence of *Streptomyces* sp. CS624. ····· 23
Fig. 4. Neighbor-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences showing relationships between of *Streptomyces* sp. CS624 and related *Streptomyces strains.* ····· 25
Fig. 5. Effect of various media on the production of protease activity. 27
Fig. 6. Effect of carbon sources on the production of protease activity. 28
Fig. 7. Effect of nitrogen sources on the production of protease activity. ····· 30
Fig. 8. Effect of phosphorus sources on the protease production. ····· 32
Fig. 9. Protease production with various $-PO_4$ concentrations. ····· 33
Fig. 10. Fermentation profiles of *Streptomyces* sp. CS624. ····· 35
Fig. 11. Fibrinolytic activity of FP624 in various days of culture. ····· 36
Fig. 12. Elution profile of FP624 from Sepharose CL-6B. ····· 38
Fig. 13. Elution profile of FP624 from DEAE Sepharose CL-6B. ····· 39
Fig. 14. SDS-PAGE and fibrin zymography of FP624. ····· 40
Fig. 15. Fibrinolytic activity of FP624. ····· 41
Fig. 16. Fibrinogenolytic activity of FP624. ····· 42
Fig. 17. Effect of temperature on the activity of FP624. ····· 43
Fig. 18. Thermalstability of FP624. ····· 44
Fig. 19. Effect of pH on the activity of FP624. ····· 45

Fig. 20. pH stability of FP624. ····· 46
Fig. 21. Amidolytic activity of FP624. ····· 49

ABSTRACT

Fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. CS624

Park Sung Ju
Advisor : Prof. Yoo Jin-Cheol, Ph.D.
Department of Pharmacy
Graduate School of Chosun University

A Fibrinolytic protease (FP624) was purified from *Streptomyces* sp. CS624, isolated from Korean soil. It produced protease when cultured in a medium containing 1.5% glucose, 1.5% oat meal, 0.45% K_2HPO_4, and 0.45% $NaHPO_4$ at 28℃. FP624 was purified from a filtrate of *Streptomyces* sp. CS624 by precipitation with $(NH_4)_2SO_4$ and gel filtration with Sepharose CL-6B and ion exchange with DEAE-Sepharose CL-6B . SDS-PAGE and fibrin zymography of the purified enzyme showed a single protein band of approximately 28 kDa. The optimal pH and temperature were pH 7.0 and 50℃, respectively. The enzyme was stable between pH 4 and below 40℃. It exhibited fibrinolytic activity, which is

stronger than that of plasmin. FP624 hydrolyzes Aα and Bβ-chains of fibrinogen. The activity was enhanced by Ca^{2+} and Mg^{2+}. Convensely, the activity of FP624 was significantly suppressed by Co^{2+}, Cu^{2+} and Zn^{2+} and completely inhibited by Fe^{2+} and Mn^{2+}. Furthermore, the activity was slightly inhibited by SBTI and PMSF, but significantly inhibited by EDTA, EGTA, TLCK and TPCK. These results suggest that FP624 is a serine metalloprotease with potential application in thrombolytic therapy.

제 1 장 서 론

최근 현대인들은 급속한 사회 변화에 따른 불규칙적이고 서구화된 식생활, 그리고 스트레스로 인해 혈액순환 장애에 따른 심·혈관계 질환의 성인병 발병률이 높아지고 이로 인한 사망률이 증가하고 있어 현대인들은 성인병의 예방과 치료에 대한 관심이 대단히 높다.

심·혈관계(혈액 순환계) 질환의 많은 원인 중 대표적인 것으로는 혈전(fibrin)을 들 수 있는데, 혈전(fibrin)은 생체에 상처가 발생 시 혈액을 응고시켜 과다 출혈을 방지하고 상처의 복구를 위한 복잡한 혈전 생성기작에 의해서 이루어지고 있다. 이러한 혈전은 혈액을 구성하는 성분 중의 하나인 fibrinogen이 혈액 내의 활성화된 thrombin에 의하여 fibrin으로 전환되어 불용성 중합체를 형성함으로써 생성된다.[22] 이렇게 형성된 혈전이 혈액 내에 존재 할 경우 혈액의 흐름을 방해하거나 혈관을 따라 이동하면서 뇌혈관과 같은 미세혈관을 막아 순환기계의 성인병을 유발한다. 즉, 혈전증(thrombosis)이란 뇌경색, 심근경색이라 하여 혈관에 혈전이 쌓여 혈액의 흐름을 방해함으로써, 세포의 성장 장애 및 기능장애를 유발시키는 등의 원인으로 여러 가지 형태로 성인병을 일으키는 증상을 말한다.[5]

혈전용해제란 혈관속의 fibrin을 용해하여 신속히 체내의 조직에 혈액을 공급하도록 하는 것으로서, 기존의 혈전용해제로는 혈전을 바로 용해시키는 혈전분해효소(Fibrinolytic enzyme)와 혈액 중의 plasminogen을 활성화하여 생성된 plasmin으로 하여금 혈전을 분해시키도록 하는 plasminogen activator로 나눌 수 있다.[4, 7] (Fig. 1.) 지금까지 사용되고 있는 혈전용해제로는 urokinase(UK) [38], streptokinase(SK) [20, 29], tissue type plasminogen activator(tPA) [25]등으로 plasminogen activator에 해당된다. 하지만 이 제품들은 urokinase(UK)를 제외하고는 경구 투여를 할 수 없고[32] 반감기가 짧고, 가격이 매우 높다는 단점을 지니고 있다.[2] 또 plasminogen을 plasmin으로 활성화시키는 작용에서 fibrin뿐만 아니라 다른 혈액응고인자를 용해시켜 용혈상태(lytic state)라는 side effect를 일으키는 단점 등을 지니고 있어, 이러한 문제점을 보완하고 대량생산을 통해 가격 경쟁력을 높이기 위해 현재 연구가 활발히 진행되고 있다.

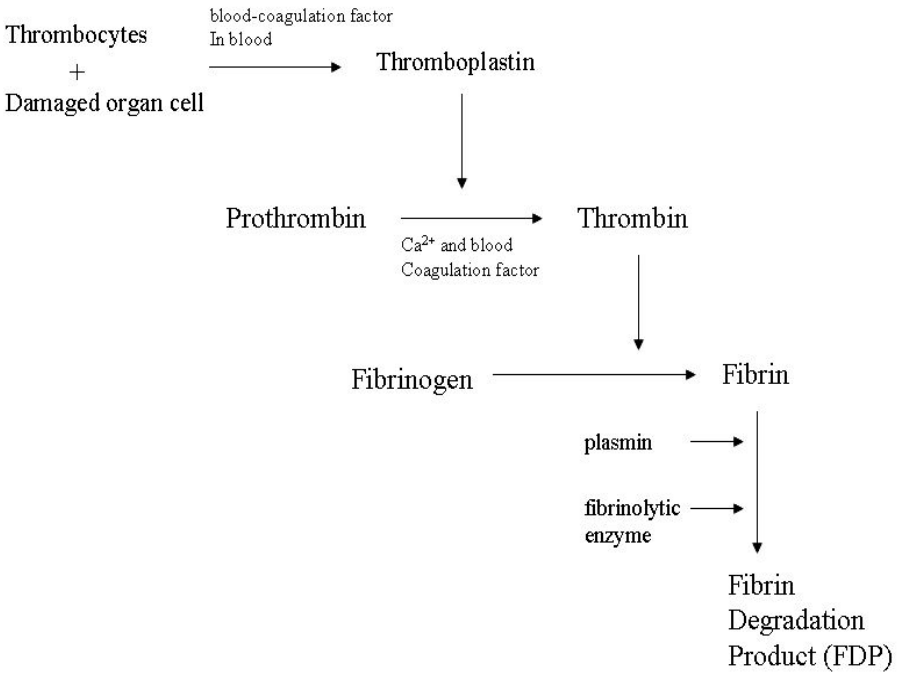

Fig. 1. Mechanism of blood coagulation and fibrinolysis.[7]

기존의 혈전분해효소가 가지는 혈전에 대해 비특이적이고 여러 가지 부작용을 가지며 가격이 비싸 경쟁력이 떨어진다는 단점이 있다. 이러한 단점을 해결하기 위해 고가 등의 단점을 해결할 수 있는 새로운 혈전분해효소를 얻기 위해 최근 약용식물 및 생약 등으로부터 특정성분이나 천연물이 가지는 생리활성물질에 대한 관심과 연구가 증대되고 있다.

특히, 대두 발효 식품인 전통식품(된장, 간장, 청국장, 등)이나 젓갈 등에 존재하는 *Bacillus subtilis* 로부터 생산되는 단백분해효소에 존재하는 혈전분해효소에 대한 연구가 많이 진행되는 상태이다. *Bacillus* 속의 균주들은 혈전분해효소를 포함하여 다양한 종류의 단백분해효소들을 분비하는 특성이 있다.[2, 10, 12] 최근 한국과 일본을 중심으로 전통발효 식품에서 높은 혈전분해능을 가진 많은 *Bacillus* 속의 균주들이 분리되고 있으며, 이들이 분지하는 혈전분해효소에 대한 연구가 진행되어오고 있다. 특히 일본의 전통대두 발효식품인 Natto(nattokinase)와 절임 식품인 Shiokara(katsuwokinase)에서 혈전분해효소 생산균주를 분리하고 효소를 정제하였으며, 이는 경구 투여 시 생체내의 혈전분해능을 높일 수 있다고 보고하였다.[33,34]

최근 들어 미생물에 대한 연구가 활발히 진행되면서 항생물질과 효소저해제 등의 다양한 생리활성 물질을 생산하고 고분자 물질을 분해하여 생태계의 물질순환에 크게 기여하는 방선균에 대한 관심도 증가되고 이들 균주에서 생산되는 혈전분해효소에 대한 연구도 꾸준히 진행되고 있다.

방선균은 자연계에 다양하게 분포하며 토양에 가장 많이 존재하고 있다. 토양 중에 존재하는 방선균의 약 95% 정도를 *Streptomyces*속이, 그 외에 *Nocardia, Micromonospora, Thermomonospora, Actinoplanes, Microbispora*속 등이 분포하고 있다.[27] 자연계에서 다양하고 폭 넓게 분포하는 방선균에서 생산되는 2차 대사산물에 포함된 단백 분해 효소 이용함으로써 위에서 언급된 혈전용해제(urokinase(UK), streptokinase(SK), tissue type plasminogen activator(tPA)) 등의 단점을 해결하는 궁극적인 해결책이 될 수 있다.

본 연구는 국내 토양에서 분리한 방선균을 대상으로 혈전분해효소 생산성을 탐색하여 효소생산성이 뛰어난 한 종류의 균주를 선별하였다. 선별된 균주의 16S rDNA 유전자 분석을 통하여 *Streptomyces* 속에 속함을 확인하고 *Streptomyces* sp. CS624 라 명명하였다. 또한 본 균주에서 2차 대사산물로 생산되는 protease에서 혈전분해능이 우수한 혈전분해효소(Fibrinolytic enzyme)의 각종 특성 조사와

효소정제를 수행하여 손쉽게 대량 생산이 가능하고 부작용이 없고 혈중에서 반감기가 길며 가격이 저렴한 혈전분해효소를 생산하는 미생물을 토양에서 탐색하여 향후 의약품으로 이용할 수 있을 것으로 사료되어 연구를 시도하였다.

제 2 장 재료 및 방법

제1절 시약

방선균의 배양을 위한 배지는 Yakuri pure chemical., Acumedia, Junsei사의 제품을 사용하였다. Protease 활성 실험에 쓰이는 Azocasein과 Protease inhibitor가 미치는 영향에 대한 실험 시 사용된 시료 EDTA, PMSF(phenylmethylsulphonyl fluoride), SBTI(Trypsin inhibitor from Glycine max (soybean)), TLCK(N_α-Tosyl-$_L$-lysine chloromethyl Ketone hydrochloride), TPCK(N-p-Tosyl-$_L$-Phenylanaline chloromethyl Ketone), Folin-Ciocalteu's phenol reagent 또한 혈전분해효소 활성을 확인할 때 사용한 Plasmin, Fibrinogen, Thrombin 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis. MO. USA)사의 제품을 사용하였다.

효소 정제를 위한 Sepharose CL-6B, DEAE-Sepharose CL-6B는 Pharmacia (Uppsala, Sweden)의 제품을 사용하였다.

제2절 혈전분해효소를 생산하는 토양 방선균의 분리 및 동정

1. 혈전분해효소를 생산하는 토양 방선균의 분리

전남 해안 지역에서 채취한 토양 샘플을 3일 정도 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 nalidixic acid (20μl/㎖) 을 첨가한 배지에 도말하여 28℃에서 1 ~ 3주일간 배양하였다. 선별된 방선균은 ISP2 (0.2% Yeast extract, 1% Malt extract, 0.4% Glucose, pH 7.2) 배지에 접종하여 28℃, 200rpm에서 배양하며 protease 활성을 관찰하였다. protease 활성이 높은 균주를 분리 선별하여, 이 균주들 중 우수한 혈전분해효소를 생산하는 토양 방선균을 선택하였다. 이 선택된 토양 방선균를 OSYM (2% Oatmeal, 1% Soybean meal, 1% Dried yeast, 1% Mannitol, pH 8.3) 고체배지에서 배양하여 20% glycerol로 보관용 vial에 취해 -80℃에 보관하고 6개

월마다 계대 배양하여 보존하였다.

2. 혈전분해효소를 생산하는 토양 방선균의 16S rDNA의 염기서열

우수한 혈전분해효소를 생산하는 토양 방선균을 PCR기기(Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler)를 이용하여 증폭하였으며 primer로는 27f(5′-AGAGTTT GATCMTGGCT-3) 1492r(5′-AAGGAGGTGWTCCARCC-3′)[18]을 사용하여 16S rDNA 염기서열을 확인하였다. 증폭조건의 변성은 94℃에서 1분, annealing은 55℃에서 1분, 신장은 72℃에서 1분간 총 30회 반복하였다. 증폭된 DNA는 Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)와 oilgo-nucleotide primers[3]를 이용하여 염기서열을 확인하였다.

제3절 혈전분해효소를 생산하는 *Streptomyces* sp. CS624의 최적 배양 조건

OSYM 평판 배지에서 배양한 균주의 균사체 및 포자를 취하여 50㎖의 OSYM 액체배지가 들어있는 250㎖ flask에 접종하여 28℃, 180rpm에서 3일간 진탕 배양하였다. 이 배양액을 protease의 최적 생산을 위해 자체 개발한 4가지 배지(Table 2.)에서 protease 활성과 fibrinolytic 활성을 조사하였다.

각각의 배지에 2% 수준으로 접종하여 28℃, 180rpm에서 5일간 배양하여 최고 활성을 보이는 배지를 *Streptomyces* sp. CS624 배양 배지로 선정하였다. 그리고 배양배지의 최적의 조건을 알아보기 위하여 탄소원, 질소원 그리고 인산원 등의 영양원에 따른 효소 생산성을 관찰하기 위하여 시험배지 중 가장 높은 효소 활성을 나타내는 GOKN의 조성 중 해당 영양원을 제거하고 1.5% 탄소원, 1.5% 질소원들을 각각 첨가하여 실험하였다. 또한 0.1%의 인산원등을 각각 첨가하여 실험하고 효과가 뛰어난 인산원을 선택하여 농도를 각각 0%, 0.1%, 0.15%, 0.3%, 0.45%, 0.6%로 첨가하여 최적 배양온도에서 최적 배양시간동안 배양하였다.

제4절 *Streptomyces* sp. CS624가 생산하는 혈전분해효소의 분리정제

1. 혈전분해효소 생산

OSYM 고체 평판 배지에서 배양한 균주의 균사체 및 포자를 취하여 50㎖의 OSYM 액체 배지가 들어있는 250㎖ baffled flask에 접종하여 28℃ 180rpm에서 3일간 진탕 배양하였다. 이 배양액을 혈전분해효소의 생산성 향상을 위해 자체 개발한 혈전분해효소용 배양배지 GOKN 배지 1L에 2%수준으로 접종하여 28℃ 180rpm에서 10일간 배양하였다. 2차 배양액은 6000rpm에서 30분간 원심분리 후 상등액을 조효소로 이용하였다.

2. Ammonium sulfate 분획

원심분리 후 상등액만 취한 조효소 용액에 30 ~ 90%가 포화되도록 ammonium sulfate를 가하여 1시간 정도 교반시킨 후, 원심분리 (×8,000rpm, 1h) 하고 침전된 단백질을 최소량의 10mM Tris-HCl (pH7.5) buffer에 녹여 회수하였다. 회수한 단백질에 10mM Tris-HCl (pH 7.5)를 가하여 용해시킨 후 YM10 (M.W 10,000) membrane을 사용하여 투석 후 동일완충액으로 평형화시켰다.

3. Sepharose CL-6B column chromatography

혈전분해효소 효소시료를 Sepharose CL-6B column chromatography (2.2 × 114cm)에 적하하고 10mM Tris-HCl buffer pH7.5로 10.3 ml/h 전개시켜 protease 활성 측정 방법인 Oda and Murao의 측정 방법[26]을 변형하여 수행하여 활성 분획을 회수하였다. 회수한 용액을 농축 (×3000rpm, 1h) (Vivaspin, 10.000MWCO, Sartorious Co.) 후 동일완충액으로 평형화시켰다.

4. DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography

Sepharose CL-6B column chromatography를 통해 정제된 혈전분해효소 분획을 회수하여 농축하고 이 혈전분해효소 농축액을 DEAE-Sepharose CL-6B column

chromatography (1.2 × 64cm)에 적하하였다. 8.0 ml/h 속도로 10mM Tris HCl pH 7.5 buffer 하에서 0 ~ 0.5M KCl의 염으로 농도구배를 주어 단백질을 분획하였으며 이 중 효소활성을 가지는 분획만을 모아 회수하였다. 회수한 분획을 농축 후 Laemmli의 방법[15]에 따라 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 수행하여 단일 효소임을 확인하였다. 그리고 정제된 혈전분해효소를 FP624로 명명하였다.

제5절 효소 활성 측정

1. 단백질 분해 효소 활성 측정

단백질 분해 효소 활성 측정은 *Oda and Murao*의 측정 방법[26]을 변형하여 수행하였다. Azocasein 용액[(2.0%(w/v), 0.2M Phosphate Buffer pH7.0를 조제]50㎕와 효소시료 100㎕를 섞어준 후, 40℃에서 20분간 반응시켰다. 여기에 10%(w/v) Trichloroacetic acid 60㎕를 가하고 즉시 vortexing 한 후 ice 위에서 10분간 방치하고 15,000rpm으로 20분간 원심 분리하였다. 원심분리 후, 상등액 150㎕을 취하여 6배 희석된 Folin-Ciocalteu phenol reagent, 2N 300㎕와 7.5%(w/v) Na_2CO_3 450㎕를 넣고 즉시 vortexing 한 후에 30℃에서 30분간 반응시켜 UV-1601 spectrophotometer (Shimadzu Corporation, Japan)를 이용하여 660nm에서 흡광도를 측정했다. 효소활성은 단위(unit)는 1분 동안 1㎍ tyrosine을 생성시키는 효소활성으로 정하였다.

2. 혈전분해효소 활성 측정

혈전분해효소 활성의 측정은 *Astrup and Mullertz*의 fibrin plate 법[1]을 변형하여 혈전분해효소인 plasmin을 표준시료로 하여 측정을 하였다. 즉, 20mM Tris-HCl (pH7.0) buffer로 fibrinogen의 최종농도가 0.12%가 되도록 완전히 용해한 다음, 그 용액 20ml에 500NIH U/ml의 thrombin 용액을 50μl 첨가하여 혼합한 다음, 동일한 완충용액으로 만든 1.2% agarose 용액을 80ml을 첨가하여 혼합하고 petri dish에 부어 상온에 30분간 방치하여 fibrin clot을 형성시켜 fibrin- agarose

plate를 제조하였다. 그리고 FP624의 fibrinolytic activity를 확인하기 위한 각각의 시료는 Negative control(1):buffer, Positive control(2,3):plasmin (3μg, 1.5μgl), 정제된 FP624(4~6):sample(3μg, 1.5μg, 0.5μg)로 하여 fibrin plate에 떨어뜨린 후 37℃에서 18시간 반응시키고 난 다음 형성된 환의 직경을 표준시료인 plasmin과 비교하여 측정하였다.(Fig. 15.)

3. 단백질 정량

단백질의 농도는 *Bradford*의 방법[7]을 이용하여 bovine serum albumin(BSA) (Life Technologies, Gaithersburg, MD, U.S.A.)을 표준시료로 하여 측정하였으며 효소정제 과정 중 분획 내의 상대적 단백질 농도는 595nm 흡광도로 측정하였다.

4. 겔 전기영동

SDS-PAGE는 5% staking gel과 10% polyacrylamide gel[15]을 사용하였다. Molecular weight maker (10 ~ 170 kDa)는 Fermentas (Glen Burnie, MD, U.S.A) 회사의 제품을 사용하여 단백질의 분자량을 결정하였다. gel은 0.1%(w/v) coomassie brilliant blue R-250로 1시간동안 염색한 뒤 Methanol: glacial acetic acid : H_2O(1:1:8) 비율로 섞은 용액에 overnight하여 탈색 시켰다.

5. Fibrin zymography

Fibrin zymography는 Kim의 측정 방법[11]을 변형하여 수행하였다. 즉, 0.12% fibrinogen과 100ul의 Thrombin 용액 (1NIH U/ml)을 함유한 10% polyacrylamide gel에 순수하게 정제된 단백질 2.2μg을 sample buffer(×5)와 혼합하여 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 2.5% Triton X-100 Solution (50mM Tris-HCl, pH7.5)에 상온에서 30분간 침적하여 단백질을 활성화 시킨 후 증류수로 세척을 한다. 다시 효소반응 완충용액(200mM NaCl, 10mM $CaCl_2$, 0.02% NaN_3가 포함된 30mM Tris-HCl pH 7.0)에 넣어 37℃에서 24시간을 반응시킨다. Fibrin 분해능을 지닌 단백질 분획은 활성염색법에 의해 gel상의 fibrin을 분해하여 Coomassie

Brilliant Blue R-250 염색결과 형성된 투명한 활성 band를 확인하였다.(Fig. 14.)

6. Fibrinogenolytic activity

Fibrinogenolytic activity는 Koh의 측정 방법[14]을 변형하여 수행하였다. 순수하게 정제된 enzyme solution (20μg/ml, 0.2M Tris-HCl pH7.5 buffer) 60ul와 1.0%(w/v) fibrinogen solution (50mM Tris-HCl pH7.5 buffer)를 섞어 37℃에서 각각 0min, 5min, 10min, 20min, 40min, 80min동안 incubation을 한다. 일정한 시간 간격으로 동량의 Sample을 취하여 10% SDS-PAGE[15]를 사용하여 fibrinogen chain 분해능의 패턴변화를 확인했다.(Fig. 16.)

제6절 혈전분해효소의 특성

1. 혈전분해효소 활성과 안정성에 대한 온도의 영향

효소활성에 대한 최적 온도를 결정하기 위하여 4 ~ 70℃의 범위에서 10℃ 간격으로 *Oda and Murao*의 측정 방법[26]을 이용하여 효소활성을 측정하여 최적 온도를 결정하였다. 효소의 온도 안정성을 알아보기 위해 각각의 온도(40℃, 45℃, 50℃, 55℃)에서 효소를 2시간 동안 incubating 시킨 후, 30분마다 sampling 하였다. Sampling 용액에 10mM Tris-HCl buffer pH 7.5를 넣고 20분 동안 실온에 방치한 후, *Oda and Murao*의 측정 방법[26]을 이용하여 효소 활성을 측정함으로써 효소의 온도에 대한 안정성을 확인하였다.

2. 혈전분해효소 활성과 안정성에 대한 pH의 영향

정제된 효소활성에 대한 최적 pH를 결정하기 위해 pH 3 ~ 11 범위에서 pH 1.0 간격으로 1M pH buffer (pH 3 ~ 7.5은 Citrate-Na_2HPO_4 buffer, pH 7.5 ~ 9는 Tris-HCl buffer, pH 10 ~ 11은 Sodium-Bicarbonate buffe)를 넣고 최적온도에서 20분간 반응시켜 효소활성을 측정하였다. 그리고 효소의 pH 안정성을 측정하기 위해 pH 3 ~ 11 범위 안에서 pH 간격을 1.0으로 각각의 1M pH buffer(pH 3 ~ 7.5

은 Citrate-Na_2HPO_4 buffer, pH 7.5 ~ 9는 Tris-HCl buffer, pH 10 ~ 11은 Sodium-Bicarbonate buffe)를 효소용액과 넣어 4℃에서 48시간동안 방치한 뒤, 최적 pH buffer를 넣고 최적온도에서 20분간 반응시켜 효소 활성을 측정함으로써 pH 안정성을 확인하였다. 효소 활성 측정법은 *Oda and Murao*의 측정 방법[26]을 변형하여 수행하였다.

3. 혈전분해효소 활성에 대한 금속이온과 protease inhibitor에 대한 영향

효소 활성에 미치는 금속이온들의 영향을 조사하기 위해 효소 반응용액에 금속이온 (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Cu^{2+})을 최종농도가 5mM 되도록 첨가하여 최적온도에서 20분 동안 반응시킨 후 *Oda and Murao*의 측정 방법[26]을 변형하여 효소활성을 측정하였다.

Protease inhibiter가 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 Serine protease inhibitor인 SBTI(Trypsin inhibitor from Glycine max (soybean)), TLCK(N_α-Tosyl-L-lysine chloromethyl Ketone hydrochloride), TPCK (N-p-Tosyl-L-phenylanaline chloromethyl Ketone), PMSF(phenylmethylsulphonyl fluoride) 를 반응시 SBTI의 최종 농도가 0.01mg/ml이 되고, 나머지 TLCK, TPCK, PMSF의 최종 농도가 1mM이 되도록 첨가 후 최적온도에서 20분간 반응시켜 효소 활성 변화를 측정하였고, EDTA, EGTA는 Metalloprotease inhibitor이며 EDTA, EGTA 역시 반응 시 최종농도가 1mM이 되게 첨가한 후 최적온도에서 20분간 반응시켜 효소의 활성 변화를 측정하였다. PMSF는 소량의 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹인 후 증류수로 희석하여 사용하였으며, 그 외의 시료는 증류수에 녹여 사용하였다.[6]

4. 다양한 기질에 의한 혈전분해효소 특성 분석

단백질분해효소의 특성을 분석하기 위하여 다양한 Chromogenic substrate (Chromogenix co.)을 이용하여 Amidolytic activity를 측정하였다. 시용되어진 chromogenic substrate로는 Table 8.와 같다.

활성화측정은 0.5mM chromogenic substrate에 정제된 혈전분해효소 1ug을 첨가

하여 37℃에서 10분간 반응시킨 후 ELISA Reader를 사용하여 405nm에서 방출되어진 p-nitroaniline의 양을 측정하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제1절 선별된 혈전분해효소 생산 균주의 동정

1. 형태학적 특성 분석

전남 해안 지역에서 채취한 토양에서 protease의 활성이 높은 균주 중 fibrinolytic enzyme을 생산하는 *Streptomyces* sp. CS624 균주를 선별하였다. *Streptomyces* sp. CS624 균주를 OSYM 평판 배지 상에 접종한 후 28℃에서 배양하였을 때 4 ~ 5일이 배양한 후 한천 배지 상의 균사는 하얀색 colony가 관찰되었다. Colony들은 단단하였고 포자들은 substrate mycelium에 달라붙어 쉽게 떨어지지 않았다.(Fig. 2.)

2. 분자생물학적 특성 분석

혈전분해능이 우수한 균주에서 추출한 total DNA를 template를 이용하여 16S rDNA 부분을 PCR 반응으로 증폭하였으며, 증폭된 16S rDNA 부분의 1,497개의 염기서열(Fig. 3.)을 Blast & programd을 이용하여 가장 유사도가 높은 균주들을 검색한 결과, 분석 균주는 *Streptomyces* 속에 속하는 세균으로 나타났다. *Streptomyces*속은 495종(2004년 기준)이 존재하며, 16S rDNA 염기서열 분석 결과, *Streptomyces* sp. CS624는 *Streptomyces murinus* NBRC 12799(T), *Streptomyces costaricanus* NBRC 100773(T), *Streptomyces griseofuscus* NBRC 12870(T), *Streptomyces graminearus* NBRC 15420(T)와 100% 일치하였다.(Table 1.) *Streptomyces* sp. CS624의 16S rDNA의 염기서열의 의한 계통발생학적 위치는 Neighbour-joining tree[30]로 나타내었다.(Fig. 4.) 본 균주에서 생산한 효소나 생리활성물질에 대한 연구는 이전에는 없었으며 본 연구가 처음이라고 볼 수 있다. 이러한 결과들을 토대로 선별된 혈전분해효소 생산 균주를 *Streptomyces* sp. CS624로 명명하고 이후의 연구를 진행하였다.

제2절 혈전분해효소 생산성 향상을 위한 배지 성분의 최적화

Fibrinolytic protease 생산의 최적화를 위한 4가지 배지(Table 2.)를 통한 실험결과는 다른 배지에 비해 GOKN 배지에서 월등한 효과를 나타내었다.(Fig. 5.)

1. 탄소원이 혈전분해효소 생산에 미치는 영향

혈전분해효소의 생산성 향상을 위한 탄소원의 효과를 조사하기 위하여 GOKN에 1.5%의 각 종류별 탄소원을 참가하여 배양한 결과, protease 활성은 Fructose를 1.5%를 첨가되었을 때 가장 우수 하였으나(Fig. 6.), Fibrinolytic 활성은 기본배지(GOKN)의 탄소원인 Dextrose (D(+)-Glucose)를 첨가되었을 때 활성이 가장 우수하였다. (Table 3.)

2. 질소원이 혈전분해효소 생산에 미치는 영향

혈전분해효소의 생산성 향상을 위한 질소원의 효과를 조사하기 위하여 GOKN에 1.5%의 각 종류별 질소원을 첨가하여 배양한 결과, protease 활성과 fibrinolytic 활성이 기본배지인 GOKN 배지와 Oat meal를 대신하여 첨가한 1.5% Soy bean meal 배지, 두 종류에서 타 액체배지와 비교하여 월등히 뛰어남을 확인하였다.(Fig. 7.) (Table 4.)

3. 인산원이 혈전분해효소 생산에 미치는 영향

혈전분해효소의 생산성 향상을 위한 인산원의 효과를 조사하기 위하여 GOKN에 0.1%의 각 종류별 인산원을 첨가혀여 배양한 결과, 각각 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$와 K_2HPO_4에서 protease 활성과 fibrinolytic 활성이 뛰어남을 확인하였고, 같은 양의 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$와 K_2HPO_4를 혼합하여 첨가하였을 때 활성이 25%정도 상승함을 확인할 수 있다.(Fig. 8.) (Table 5.)

또한 인산원의 농도에 따른 활성변화를 확인한 결과, 첨가한 인산원의 농도가 증가함에 따라 fibrinolytic 활성이 향상됨을 보였고, 두 종류의 인산원을 각각 0.45%

첨가하였을 때 가장 효율적으로 생각된다.(Fig. 9.) (Table 5.)

제3절 배양시간에 따른 방선균의 생장, pH, 혈전분해활성의 변화

Streptomyces sp. CS624를 pH 6.2 인 액체 영양배지에 접종하여 배양시간에 따른 생장, 혈전분해활성, 그리고 배양기간 중의 pH 변화를 관찰하였다. Protease 활성을 확인하였을 때, *Streptomyces* sp. CS624는 3일째부터 빠르게 생장하였고, 5일째 최대 활성을 보였으며, 5일 이후 생장속도가 서서히 감소하였다. 배양초기의 pH는 6.2이었으며, 배양 후 시간이 지남에 따라 서서히 증가하나 큰 변화는 없어 배양액 내의 pH는 6 ~ 7 범위 내에서 비교적 일정하게 유지되었다. (Fig. 10.) 배양시간에 따른 혈전분해활성의 생산에 대한 결과를 fibrin plate로 확인한 결과도 protease 활성의 결과와 마찬가지로 5일에서 최대 활성을 보였고 시간이 지남에 따라 조금씩 감소함을 확인할 수 있었다.(Fig. 11.)

제4절 *Streptomyces* sp. CS624가 생산하는 혈전분해효소의 분리 및 정제

Streptomyces sp. CS624에 의해 생산된 혈전분해효소의 전반적인 정제과정은 Table 4.에 요약하여 나타내었다. 조효소액을 Ammonium sulfate, Sepharose CL-6B column chromatography (Fig. 12.), DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography (Fig. 13.)에 의해 혈전분해효소를 정제하였다. *Streptomyces* sp. CS624의 배양 여액을 Ammonium sulfate (30% ~ 90%) 로 분획하고 농축하여 탈염시킨 효소용액을 얻었다. 원심분리 후 얻은 상층액은 10mM Tris-HCl buffer pH 7.5으로 평형화시키고 최소로 농축하여 동일 완충액으로 평형화 시킨 다음 Sepharose CL-6B column chromatography (2.2 × 114cm)에 적하하여 동일 완충액으로 10.3 ml/h의 속도로 용출시켰다. (Fig. 13.) protease 활성 부분은 1개의 큰 피크로 나누어졌다. 최고 활성 부분은 2.1의 정제도를 보였으며 수율은 19%를 나타내었다.(Table 6.) Sepharose Cl-6B column chromatography 에서 얻은 활성 분획을 농축한 후 DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography (1.2 × 71cm)에 적하

하여 0 ~ 0.5M KCl의 농도구배로 용출 시켰을 때 protease의 활성분획은 0 ~ 0.3M KCl 농도에서 나타났다.(Fig. 13.) 총 4개의 protease 활성 분획 중 혈전분해 효소 활성을 보이는 분획은 0.3M KCl 농도 분획에서 용출되었으며 SDS-PAGE와 Fibrin zymography를 통해 단일효소임을 확인하였다. 이 효소의 분자량은 약 28kDa 인 것으로 확인하였고 FP624로 명명하였다.(Fig. 14)

제5절 혈전분해효소 활성 측정

1. 겔 전기영동과 fibrin zymography

Sepharose CL-6B column chromatography를 이용한 정제 과정에서 얻어진 fibrinolytic enzyme을 DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography 를 통해 제차 정제를 하여 얻어진 순수한 fibrinolytic enzyme Sample 를 SDS-PAGE와 Fibrin zymography를 통해 확인한 결과 분자량이 약 28 kDa인 부분에서 활성을 보이는 것으로 확인되었다.(Fig. 14.)

2. Fibrinolytic 활성과 Fibrinogenolytic 활성

FP624효소의 fibrinolytic activity를 확인하기 위한 각각의 시료는 Negative control(1):buffer, Positive control(2,3):plasmin(3μg, 1.5μg), 정제된 FP624(4~6):sample(3μg, 1.5μg, 0.5μg)로 하여 fibrin plate에 떨어뜨린 후 37℃에서 12시간 반응시키고 난 다음 형성된 활성 환의 직경을 표준시료인 plasmin과 비교하여 측정한 결과, 정제된 FP624효소는 단백분해 효소의 비활성도를 단백질량에 대한 활성환의 크기를 정의하였을 때 FP624는 9.5였으며 plasmin는 7.5로써 FP624의 비활성이 대조제제에 비교하여 1.27배 월등함을 알 수 있었다.(Fig. 15.)

정제된 단백질(FP624)은 fibrin 분해능이 우수하여 Aα-chain를 가수분해반응 후 5분 이내에 완전히 분해됨을 확인할 수 있었다. Bβ-chains에 대한 분해능 또한 10분 이내에 분해됨을 확인함으로써 순수하게 정제된 FP624 물질의 fibfin 분해능이 비선택적이나 강력한 분해능을 보유하고 있음을 확인할 수 있었다.(Fig. 16.) Markland, Jr.[21]의 분류에 의하면 Aα-chain fibrinogen에 특이한 fibrinogen 용해

효소는 주로 23,000 ~ 33,500의 분자량을 가지는 metalloprotease이며, Bβ-chain을 특이적으로 분해하는 효소는 약 31,000의 분자량을 가지는 serine protease 종류이라고 나누었으며, FP624는 Aα와 Bβ-chain에 특이적으로 분해하는 효소임으로 serine metalloprotease 종류임을 확인할 수 있다.

제6절 혈전분해효소의 특성

1. 혈전분해효소 활성과 안정성에 대한 온도의 영향

온도에 대한 혈전분해효소활성과 안정성에 미치는 영향을 조사한 결과, 효소반응의 최적 온도는 50℃로 나타났으며 그 이상의 온도에서는 활성이 저하되었다. (Fig. 17.) 이는 Lee[17]의 *Streptomyces* 속이 생성하는 효소의 최적온도 50℃와 D-1이 일치함을 보여주었다. 효소의 안정성은 40℃ ~ 55℃ 온도구간에서 5℃ 간격으로 효소를 2시간 동안 incubating 시킨 결과 40℃에선 안정하여 100% 활성을 유지하였다. 45℃ 이후부터는 시간에 흐름에 따라 점차적으로 활성이 감소함을 보였다. (Fig. 18.)

2. 혈전분해효소 활성과 안정성에 대한 pH의 영향

pH에 대한 protease의 활성과 안정성에 미치는 영향을 조사한 결과, pH 3 ~ 12 범위 내에서 새로운 fibrinolytic enzyme의 최적 pH는 pH 7.0 으로 나타났다.(Fig. 19.) 효소의 pH 안정성을 보기 위해 pH 3 ~ 11 범위에서 4℃, 48시간동안 pH buffer를 처리한 후 효소활성을 조사한 결과 새로운 fibrinolytic enzyme은 pH4.0 ~ pH6.0 부근의 약산성 범위 내에서 안정한 것으로 확인할 수 있었다. (Fig. 20.)

3. 혈전분해효소 활성에 대한 금속이온과 protease inhibitor의 영향

효소 반응용액에 금속이온(Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Cu^{2+})을 반응 시 최종 농도가 5mM 되도록 첨가한 후 효소 활성의 변화를 측정하였다. 효소의 활성

은 Mn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+} 등의 금속이온에 의해 활성이 저해된 사실을 확인할 수 있으며, 이 중 Mn^{2+}, Fe^{2+}에 의해 효소 활성이 완전히 저해되었으나, Ca^{2+}, Mg^{2+}에서는 효소 활성이 증가되었음을 확인할 수 있다. Protease inhibiter가 효소 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 Serine inhibitor인 SBTI(Trypsin inhibitor from Glycine max (soybean)), TLCK(N_{α}-Tosyl-L-lysine chloromethyl Ketone hydrochloride), TPCK(N-p-Tosyl-L-Phenylanaline chloromethyl Ketone), PMSF(phenylmethylsulphonyl fluoride)를 사용하고 Metalloprotease inhibitor로는 EDTA, EGTA를 사용하여 protease inhibitor에 대한 영향을 실험한 결과, SBTI, PMSF는 fibrinolytic enzyme의 활성을 약하게 억제하는 것으로 확인되었으나, EDTA, EGTA, TLCK, TPCK와 같은 protease inhibitor는 혈전분해효소 활성을 강하게 억제하는 것으로 확인되었다. 이 결과 FP624는 metalloprotease 억제제인 EDTA, EGTA와 Serine 억제제인 PMSF, SBTI, TLCK, TPCK에 영향을 받는 Serine metalloprotease라고 생각된다.(Table 7.)

4. 다양한 기질에 의한 혈전분해 특성 분석

단백질 분해 특성을 확인하기 위하여 Factor Xa-like, Thrombin-like, Urokinase-like 그리고 t-PA-like 등의 Chromogenic substrate를 이용하여 *Streptomyces* sp. CS624로부터 분리정제 된 혈전분해효소와 반응시켜 특성을 분석하였다. Chromogenic substrate 중 S-2288인 t-PA-like의 기질 말단의 -Arg-pNA를 -Arg-OH + pNA로 가수분해하여 발색반응을 나타내었다.(Fig. 19.) 따라서 분리 정제된 혈전분해효소는 t-PA 계열의 효소임을 알 수 있었다.

제 4 장 결 론

전남 해안 지역에서 채취한 토양 시료로부터 700여종의 방선 균주를 분리하였다. 이들 균주 중 배양 후에 생산되는 대사산물에서 protease의 활성이 높은 방선 균주를 우선 선별하였고 이들 중 강력한 fibrinolytic protease를 생산하는 *Streptomyces* sp. CS624를 선택하였다. *Streptomyces* sp. CS624를 최적 배지에서 배양하여 배양액에서 혈전분해효소를 분리·정제하고 그 특성을 조사하였다.

방선균주의 분자 생물학적 특성(16S rDNA sequence)을 분석 결과, *Streptomyces* sp. CS624는 *Streptomyces murinus* NBRC 12799(T), *Streptomyces costaricanus* NBRC 100773(T), *Streptomyces griseofuscus* NBRC 12870(T), *Streptomyces graminearus* NBRC 15420(T)와 100% 일치하였다. 본 균주에서 생산한 효소나 생리활성물질에 대한 연구는 이전에는 없었으며 본 연구가 처음이라고 볼 수 있다.

Streptomyces sp. CS624 균주는 자제 개발한 GOKN (1.5% Glucose, 1.5% oat meal, 0.45% K_2HPO_4, 0.45% NaH_2PO_4, pH 6.2) 배양배지는 다른 배지(Table 2.)에 비교하여 높은 protease를 생산성을 보였고, 탄소원, 질소원 그리고 인산원에 각 종류에 따라 fibrinolytic protease의 생산성 변화를 비교하였을 때, 다른 탄소원에 비교해 Glucose에서 보다 많은 양의 fibrinolytic protease를 생산함을 확인할 수 있었다. 또, 각각 1.5% oat meal과 soy bean meal의 질소원, 0.45%를 함유한 인산원(각각 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, K_2HPO_4)에서 finbrinolytic protease의 생산성이 향상됨을 확인할 수 있었다.

최적배지 실험을 통해 선정된 GOKN (1.5% Glucose, 1.5% oat meal, 0.45% K_2HPO_4, 0.45% NaH_2PO_4, pH 6.2) 배양배지에서 28℃, 180rpm에서 배양하였을 때 5일째 최대 활성을 나타내었으며 점차 효소 활성이 감소하였다. 최대 활성을 보이는 시점에서 배양액을 취하여 Ammonium sulfate, Sepharose CL-6B column chromatography, DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography를 수행하여 순수한 혈전분해효소를 분리 정제하였으며 FP624라 명명하였다.

위의 단계를 통해 최종 정제된 fibrinolytic protease(FP624)은 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)와 Fibrin zymography를 통해 단일 단백질임을 확인한 결과, FP624는 분자량이 28kDa인 효소임을 확인하였

다.

FP624효소의 fibrinolytic activity를 확인하기 위해 Negative control, Positive control (plasmin), 정제된 FP624를 각각 fibrin plate에 떨어뜨린 후 37℃에서 12시간 반응시키고 난 다음 형성된 활성 환의 직경을 표준시료인 plasmin과 비교하여 측정한 결과, 정제된 FP624효소는 단백분해 효소의 비활성도를 단백질량에 대한 활성환의 크기를 정의하였을 때 FP624는 9.5였으며 plasmin은 7.5로써 FP624의 비활성이 대조제제에 비교하여 1.27배 월등함을 알 수 있었다.

본 실험에서 분리한 혈전분해효소(FP624)는 fibrin 분해능이 우수하여 Aα 와 Bβ-chain를 가수분해반응 후 10분 이내에 완전히 분해됨을 확인할 수 있었다. 특히, Aα chains에 대한 분해능 또한 5분 이내에 분해됨을 확인함으로써 순수하게 정제된 FP624 물질의 fibrin 분해능이 비선택적이나 우수한 분해능을 보유하고 있음을 확인할 수 있었다. Markland, Jr.의 분류에 의하면 Aα-chain fibrinogen에 특이한 fibrinogen 용해 효소는 주로 23,000 ~ 33,500의 분자량을 가지는 metalloprotease 이며, Bβ-chain을 특이적으로 분해하는 효소는 약 31,000의 분자량을 가지는 serine protease 종류이라고 나누었으며, FP624는 Aα와 Bβ-chain에 특이적으로 분해하는 효소임으로 serine metalloprotease 종류임을 확인할 수 있다.

FP624의 최적온도는 50℃이고, 여러 구간의 온도 범위에서 2시간 동안 효소 활성의 온도 안정성을 확인한 결과, 40℃에서 100% 안정함을 보이고 40℃이상의 온도를 유지하였을 때 시간의 변화에 따라 활성이 점차 감소함을 확인할 수 있었다. 정제된 FP624의 최적 pH는 pH 7.0 이였으며, 각 효소들은 pH 4.0 ~ pH 6.0에서 안정한 것으로 나타났다.

FP624의 활성의 금속 이온에 대한 fibrinolytic protease에 미치는 영향을 알아본 결과, Mn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+} 에 의해 효소 활성이 저해되었으며, 이 중 Mn^{2+}, Fe^{2+}에 의해 효소 활성이 완전히 저해되었으나, Ca^{2+}, Mg^{2+}의 금속이온에서 효소 활성이 증가되었음을 확인할 수 있다. protease inhibitor 중에서 SBTI, PMSF는 fibrinolytic protease의 활성에 미세한 억제하는 것으로 확인되었고 EDTA, EGTA, TLCK, TPCK의 protease inhibitor에서 fibrinolytic protease의 활성에서 강하게 억제하는 것으로 확인되었다.

혈전분해 기질의 특성을 확인하기 위하여 Factor Xa-like, Thrombin-like, Urokinase-like 그리고 t-PA-like 등의 Chromogenic substrate를 이용하여 *Streptomyces* sp. CS624로부터 분리 정제된 혈전분해효소와 반응시켜 특성을 분석

하였다. Chromogenic substrate 중 S-2288인 t-PA-like의 기질 말단의 -Arg-pNA를 -Arg-OH + pNA로 가수분해하여 발색반응을 나타내었다. 따라서 분리 정제된 혈전분해효소는 t-PA 계열의 효소임을 알 수 있었다.

위 연구를 통하여 토양방선균 *Streptomyces* sp. CS624가 생산하는 혈전분해효소는 온도, pH에 안정하고 저분자이며 fibrin의 Aα, Bβ chain을 비선택적으로 분해할 수 있으며 대표제제인 plasmin에 비해 1.27배의 높은 비활성을 보이는데 이는 FP624의 의약소재로써의 개발 가능성을 보여주고 있다. 향후 효소제제 개발을 위해 동물모델을 이용한 연구가 필요하다고 생각된다.

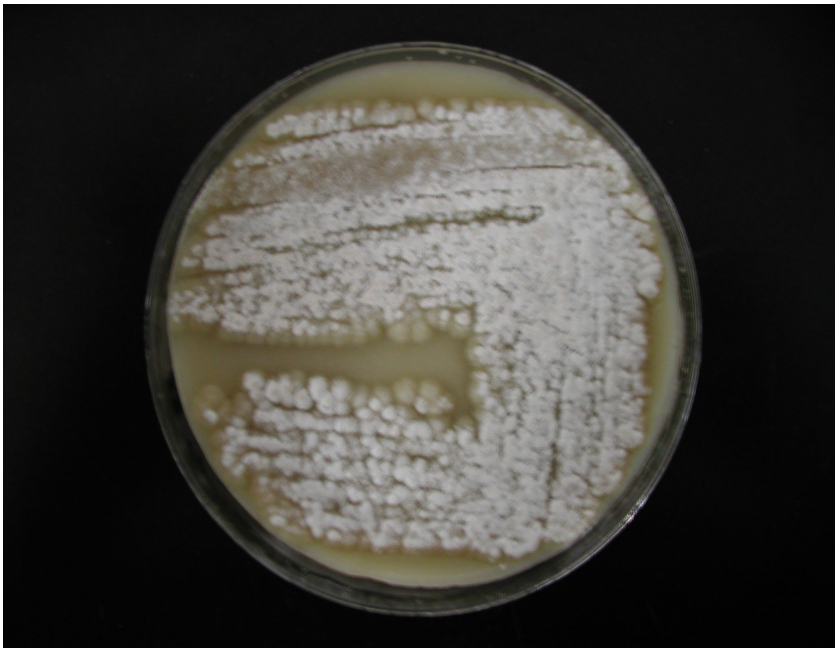

Fig. 2. Colony morphology of *Streptomyces* sp. CS624.

5'-TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGA
TGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGC
AATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGG
ATATGACCATCTTGGGCATCCTTGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGG
ATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGC
GACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG
GCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTT
GTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAG
AAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACG
TCGATTGTGAAAGCTCGGGGCTTAACCCCGAGTCTGCAGTCGATACGGGC
TAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAAT
GCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCAT
TACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCAC
GTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGG
CCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGG
AGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGAC
ATACACCGGAAAGCATTAGAGATAGTGCCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAG
GTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGC
TGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACG
ACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAAT
GGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAG
CCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAG
TCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC
TTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGG
TGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAGGTGGGACCAGCGATTG
GGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATC-3'

Fig. 3 16S rDNA sequence of *Streptomyces* sp. CS624.

Table 1. 16S rDNA sequence of *Streptomyces* sp. CS624 and other related species.

Name/Title	Strain	Accession	Similarity	Diff/Totalnt
Streptomyces murinus	NBRC 12799(T)	AB184155	100.0	0/1476
Streptomyces costaricanus	NBRC 100773(T)	AB249939	100.0	0/1480
Streptomyces griseofuscus	NBRC 12870(T)	AB184206	100.0	0/1476
Streptomyces graminearus	NBRC 15420(T)	AB184667	100.0	0/1476
Streptomyces murinus	NRRL B-2286(T)	DQ026667	100.0	0/1359
Streptomyces griseofuscus	KACC 20083(T)	AY207605	99.8	3/1478
Streptomyces griseofuscus	KCTC 9879(T)	AY999809	99.6	6/1418
Streptomyces misionensis	NBRC 13063(T)	AB184285	98.8	17/1474
Streptomyces phaeoluteichromatogenes	NRRL 5799(T)	AJ391814	98.6	20/1470
Streptomyces almquistii	NRRL B-1685(T)	AY999782	98.2	26/1482
Streptomyces lanatus	NBRC 12787(T)	AB184845	98.2	26/1473
Streptomyces malachitofuscus	LMG 20067(T)	AJ781347	98.2	26/1463
Streptomyces lanatus	ISP 5090(T)	AJ399469	98.2	26/1447
Streptomyces durhamensis	NRRL B-3309(T)	AY999785	98.2	27/1492
Streptomyces althioticus	NRRL B-3981(T)	AY999791	98.2	27/1485
Streptomyces thioluteus	NBRC 13341(T)	AB184344	98.2	27/1476
Streptomyces filipinensis	NBRC 12860(T)	AB184198	98.2	27/1469
Streptomyces althioticus	NBRC 12740(T)	AB184112	98.1	27/1458
Streptomyces malachitofuscus	NBRC 13059(T)	AB184282	98.1	28/1466
Streptomyces cellostaticus	ISP 5189(T)	AY999742	98.1	28/1447

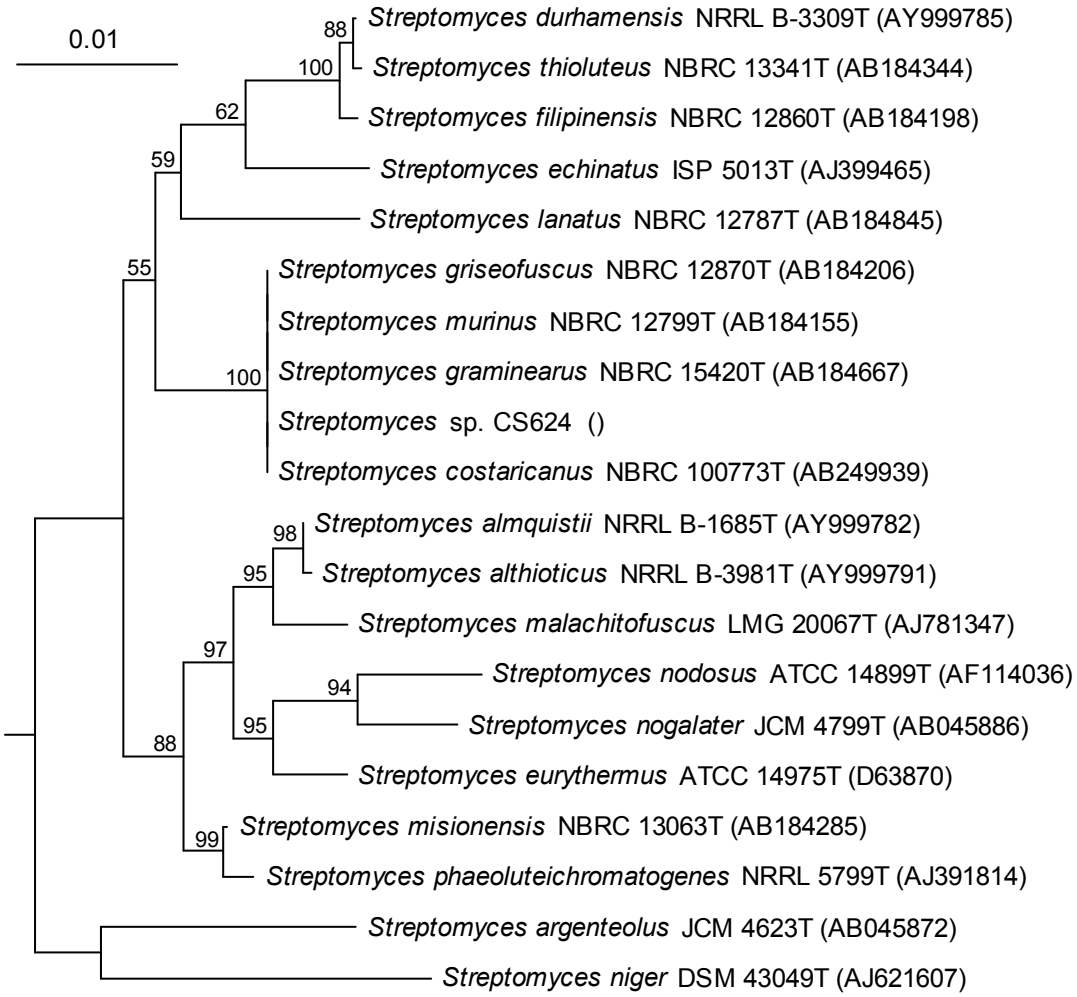

Fig. 4. Neighbor-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences showing relationships between of *Streptomyces* sp. CS624 and related *Streptomyces strains*.

Table 2. Composition of various media.

Component	Media (g/100ml)			
	GYT	GYTS	OSYM	GOKN
Dextrose(D(+)-glucose)	2.0	2.0		1.5
Yeast Extract	1.5	1.5		
Dried yeast			1.0	
Oat meal			2.0	1.5
Soy bean meal		1.5	1.0	
Mannitol			1.0	
$CaCO_3$	0.1	0.1		
Trypton	0.5	0.5		
K_2HPO_4				0.3
NaH_2PO_4				0.3

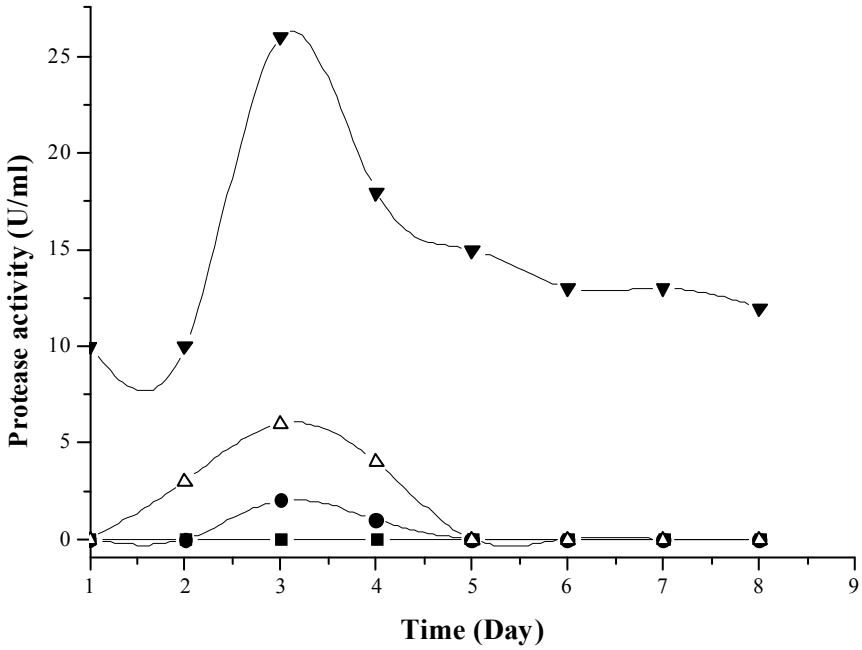

Fig. 5. Effect of various media on the production of protease activity. (■:GYT, ●: GYTS, △: OSYM, ▼: GOKN)

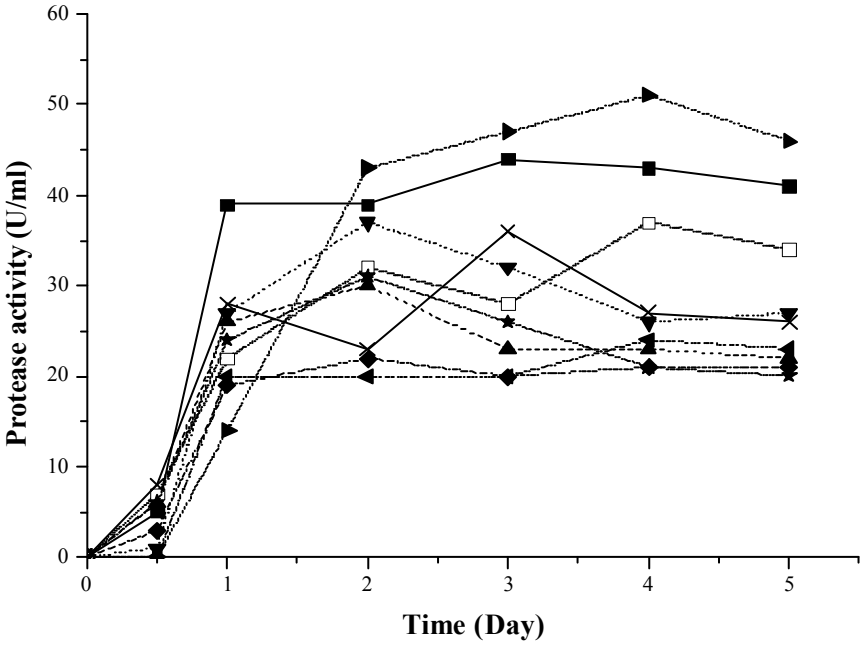

Fig. 6. Effect of carbon sources on the production of protease activity. [GOKN(■), Control(without carbon source, ▲), Maltose(▼), Starch(◆), Lactose(◀), Fructose(▶), Sucrose(□), Sorbitol(★), Mannitol(×)]

Table 3. Effect of carbon sources on the production of enzyme activity.

Carbon source(1.5%)	Protease activity (U/ml)	Fibrinolytic activity (mm)
Distilled water	-	0
GOKN[a]	44	16.0
Control[b]	23	13.3
Maltose	32	13.3
Starch	20	12.5
Lactose	20	13.5
Fructose	47	15.0
Sucrose	28	14.5
Sorbitol	26	14.5
Mannitol	36	15.3

Diameter of Clear zone(mm) was measured after 3days of incubation at 37℃.
[a] Glucose 1.5%, Oat meal 1.5%, K_2HPO_4 0.3%, NaH_2PO_4 0.3%
[b] The GOKN without carbon source.

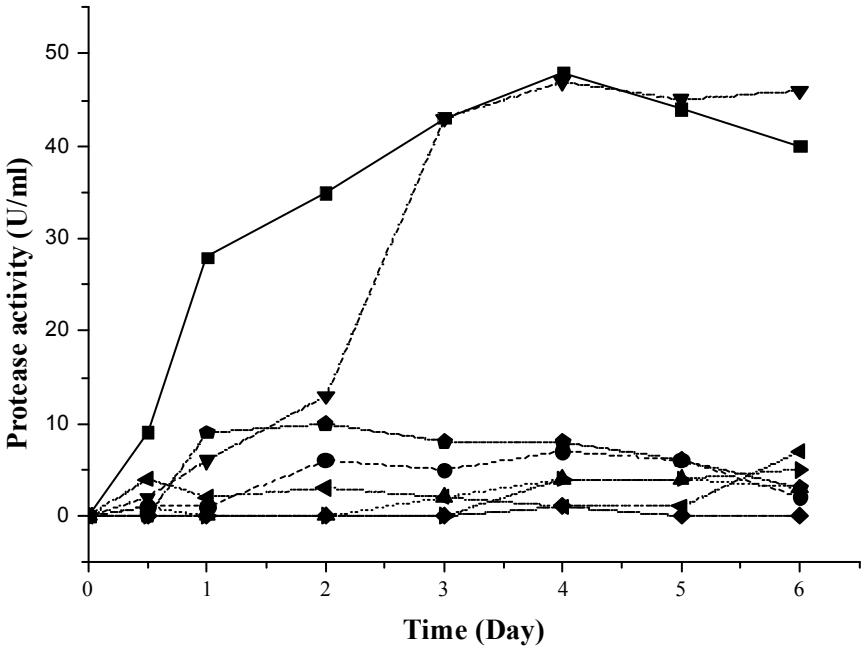

Fig. 7. Effect of nitrogen sources on the production of protease activity. [GOKN(■), Control(without nitrogen source, ●), Yeast extract(▲), Soy bean meal(▼), Peptone(◀), Beef extract(▶), Trypton(◆), Malt extract(★)]

Table 4. Effect of nitrogen sources on the production of enzyme activity.

Nitrogen source(1.5%)	Protease activity (U/ml)	Fibrinolytic activity (mm)
Distilled water	-	0
GOKN[a]	48	16.5
Control[b]	7	9.0
Yeast extract	4	10.0
Soy bean meal	47	16.5
Peptone	1	0
Beef extract	4	7.5
Trypton	1	0
Mal extract	8	9.0

Diameter of Clear zone(mm) was measured after 3days of incubation at 37℃.
[a] Glucose 1.5%, Oat meal 1.5%, K_2HPO_4 0.3%, NaH_2PO_4 0.3%
[b] The GOKN without nitrogen source.

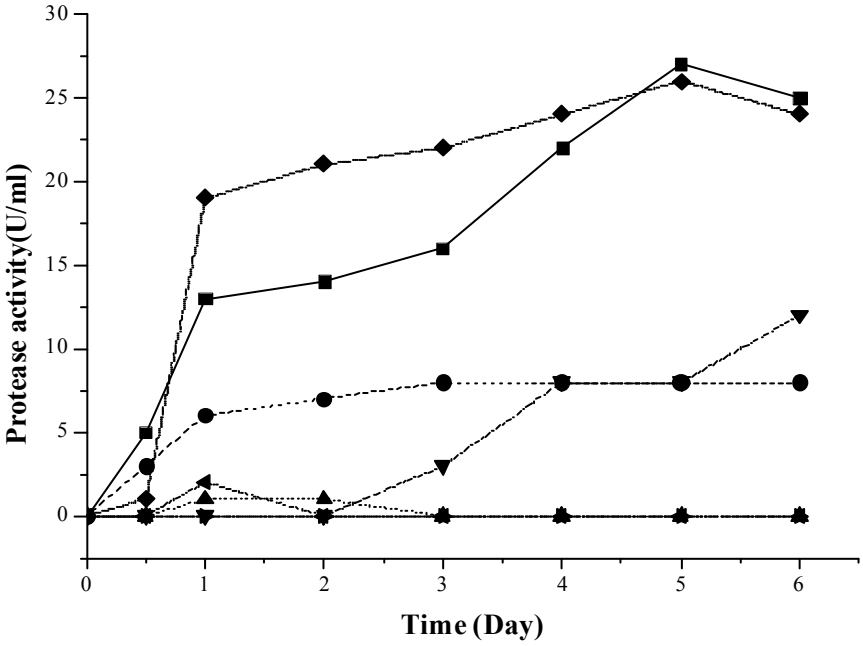

Fig. 8. Effect of phosphorus sources on the protease production. [GOKN(◆), Control (without phosphorus source, ▶), $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$(■), Na_2HPO_4(●), KH_2PO_4(▲), K_2HPO_4(▼), $NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$(◀)]

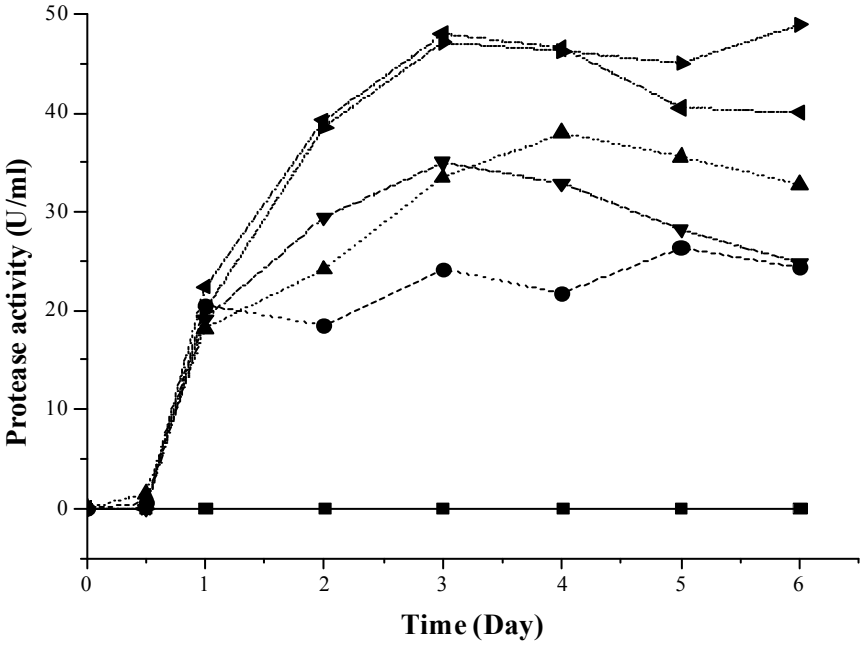

Fig. 9. Protease production with various $-PO_4$ concentrations. (■: 0% $-PO_4$, ●: 0.1% $-PO_4$, ▲: 0.15% $-PO_4$, ▼: 0.3% $-PO_4$, ◀: 0.45% $-PO_4$, ▶: 0.6% $-PO_4$)

Table 5. Effect of phosphorus sources on the enzyme production.

Phosphorus source(0.1%)	Protease activity (U/ml)	Fibrinolytic activity (mm)
Distilled water	-	0
GOKN[a]	24	15.5
Control[b]	0	0
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	16	8
Na_2HPO_4	8	4
KH_2PO_4	0	7
K_2HPO_4	3	11.5
$NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$	0	4
GOKN(0.15%)	33	16
GOKN(0.3%)	35	16
GOKN(0.45%)	48	17.5
GOKN(0.6%)	47	17.5

Diameter of Clear zone(mm) was measured after 3days of incubation at 37℃.
[a] Glucose 1.5%, Oat meal 1.5%, K_2HPO_4 0.1%, NaH_2PO_4 0.1%
[b] The GOKN without phosphorus source.

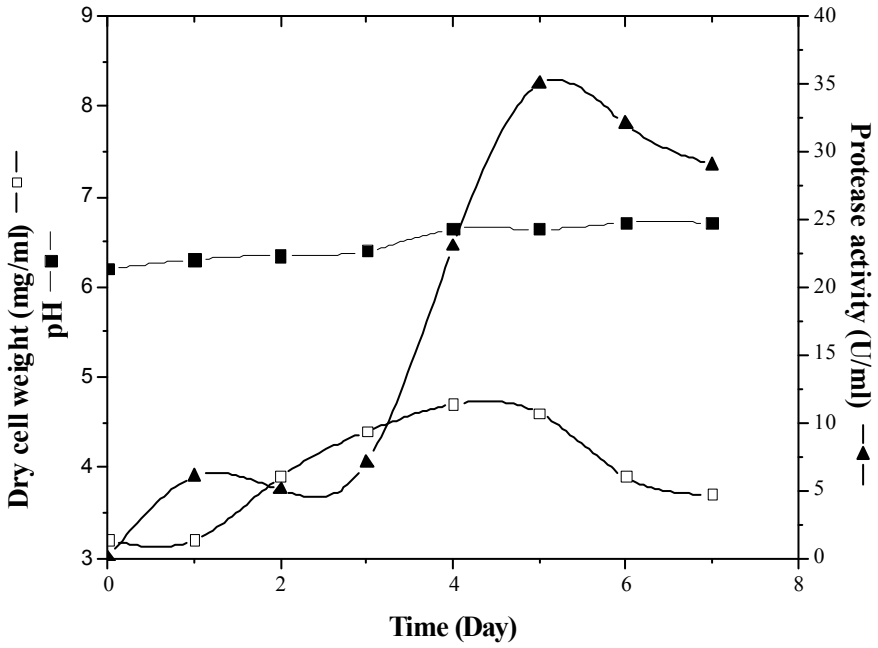

Fig. 10. Fermentation profiles of *Streptomyces* sp. CS624.

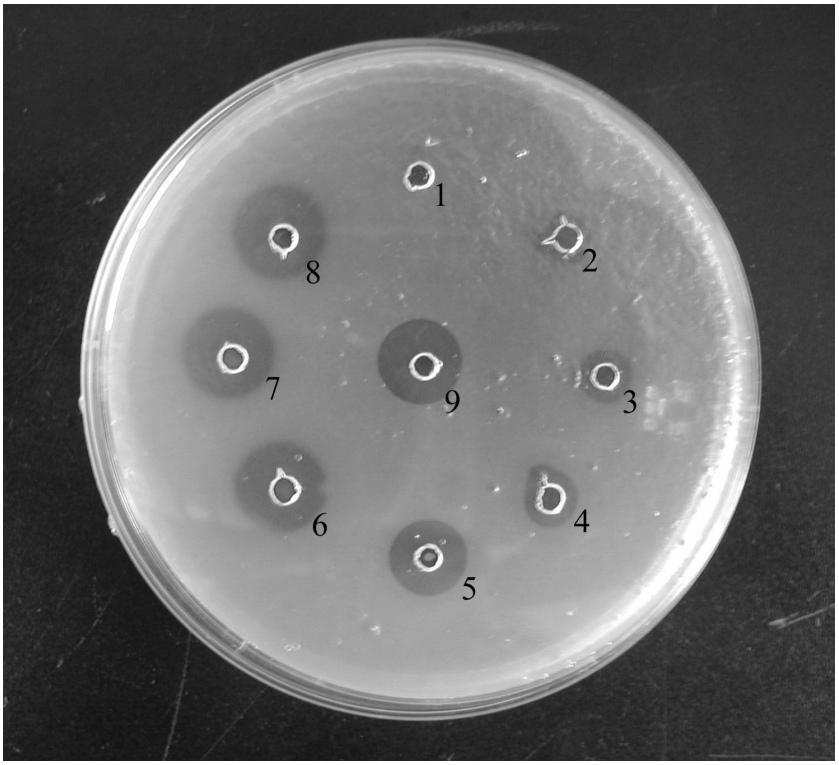

Fig. 11. Fibrinolytic activity of FP624 in various days of culture. 1-9 in figure were distilled water(1), 1Day - 7Day (2-8) and positive control[plasmin(1.5μg)], respectively.

Table 6. Purification summary of FP624.

Step	Total protein(mg)	Total activity(U)	Specific activity(U/mg)	Fold	Yield(%)
Crude supernatant	2161	325185	376	1	100
Ammonium sulfate	232	132101	569	1.5	41
Sepharose CL-6B	81.24	63240	778	2.1	19
DEAE Sepharose CL-6B	5.6	4216	753	2.0	1.3

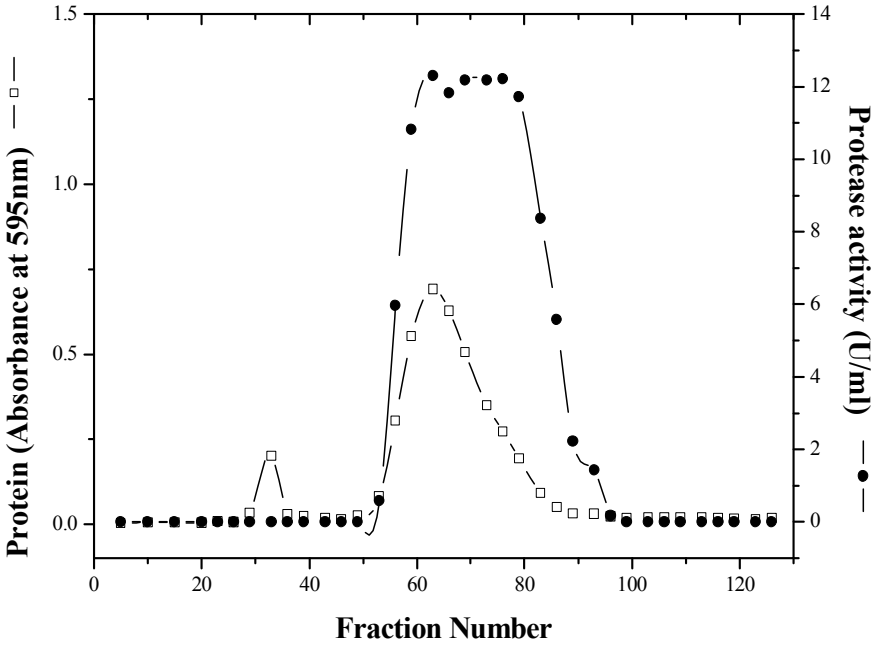

Fig. 12. Elution profile of FP624 from Sepharose CL-6B.

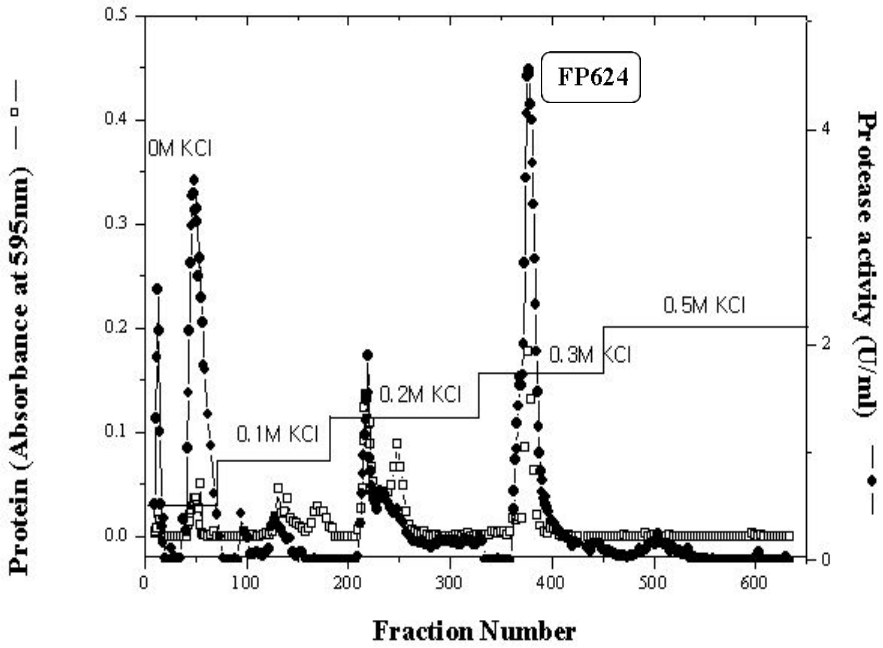

Fig. 13. Elution profile of FP624 from DEAE Sepharose CL-6B.

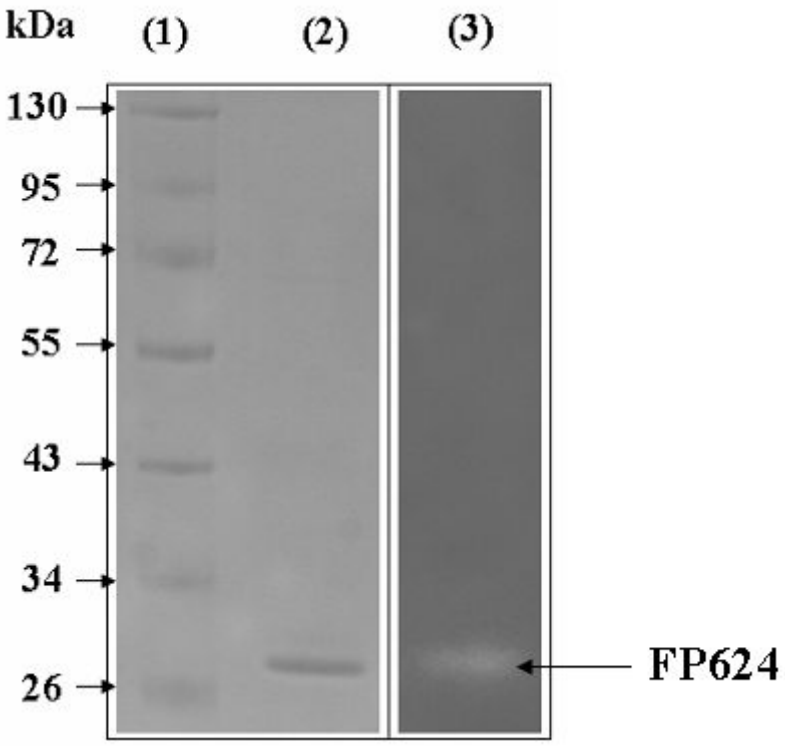

Fig. 14. SDS-PAGE and fibrin zymography of FP624. Lane (1), molecular mas markers; Lane (2), protease enzyme (4μg); Lane (3) fibrin zymography of the purified Fibrinolytic enzyme.

Fig. 15. Fibrinolytic activity of FP624. Negative Control (buffer), Positive Control (plasmin) and purified enzyme were carefully placed into the well (3.5mm diameter) made in the fibrin plate and then incubated at 37℃ for 18h. 1-6 in figure were buffer(1), plasmin 3μg(2), plasmin 1.5μg(3), purified enzyme 3μg(4), 1.5μg(5) and 0.5μg(6), respectively.

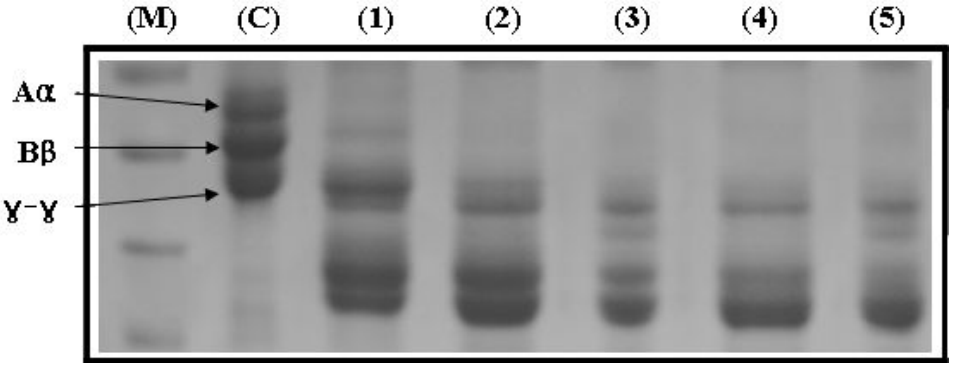

Fig. 16. Fibrinogenolytic activity of FP624. Lane M, protein size marker(from the top 72kDa, 55kDa, 43kDa) (Fermentase); Lane C represents the undigested fibrinogen; Lanes (1) - (5), FP624 hydrolyzed aliquots after 5min, 10min, 20min, 40min and 80min incubation at 37℃, respectively.

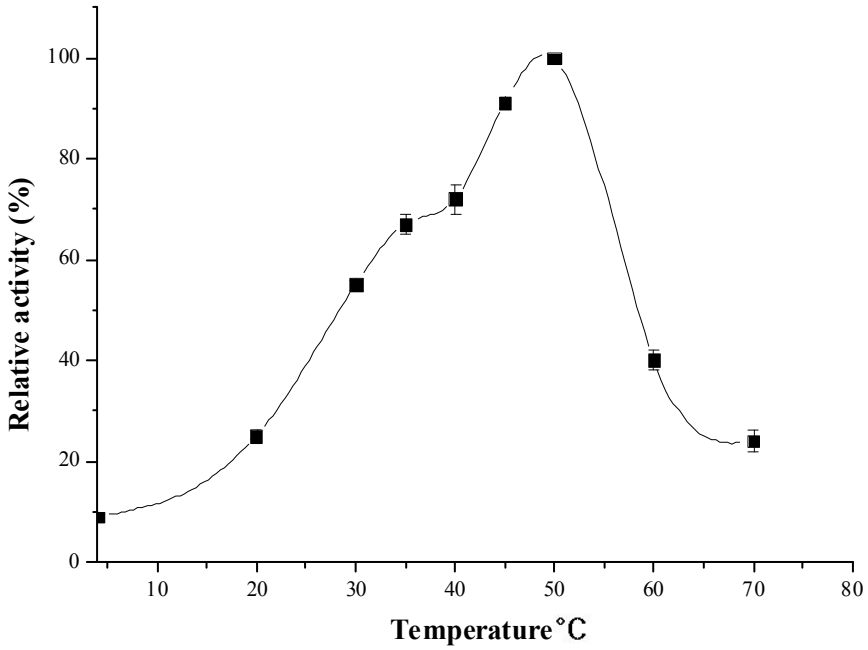

Fig. 17. Effect of temperature on the activity of FP624. The optimum temperature was studied by incubating the enzyme at pH7.0 from 4℃ to 70℃ for 30 min.

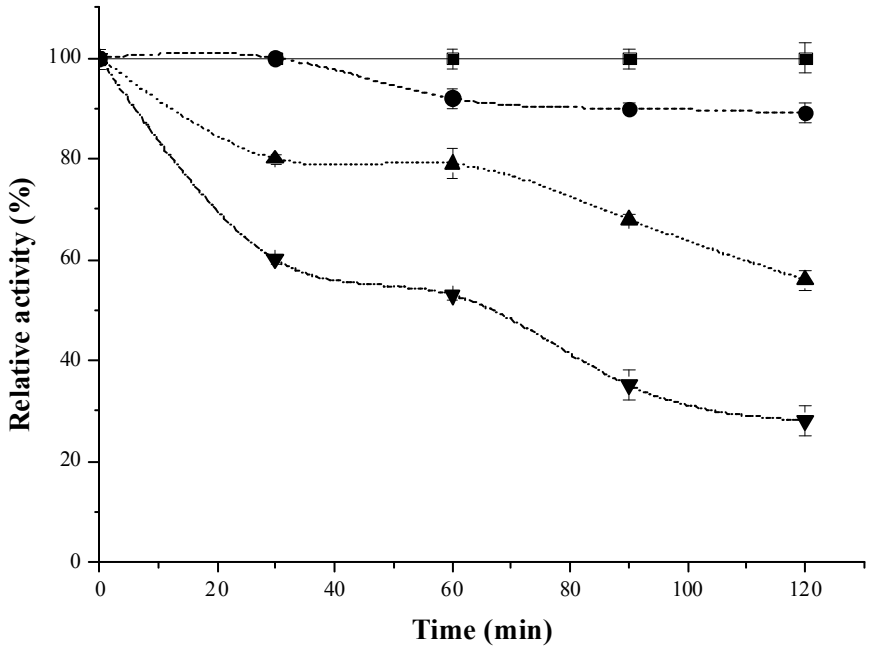

Fig. 18. Thermalstability of FP624. After incubating the enzyme samples at varius temperatures (40℃ ~ 55℃) for different time (0 ~ 120min), the residual activities were measured. (■: 40℃, ●: 45℃, ▲: 50℃, ▼: 55℃)

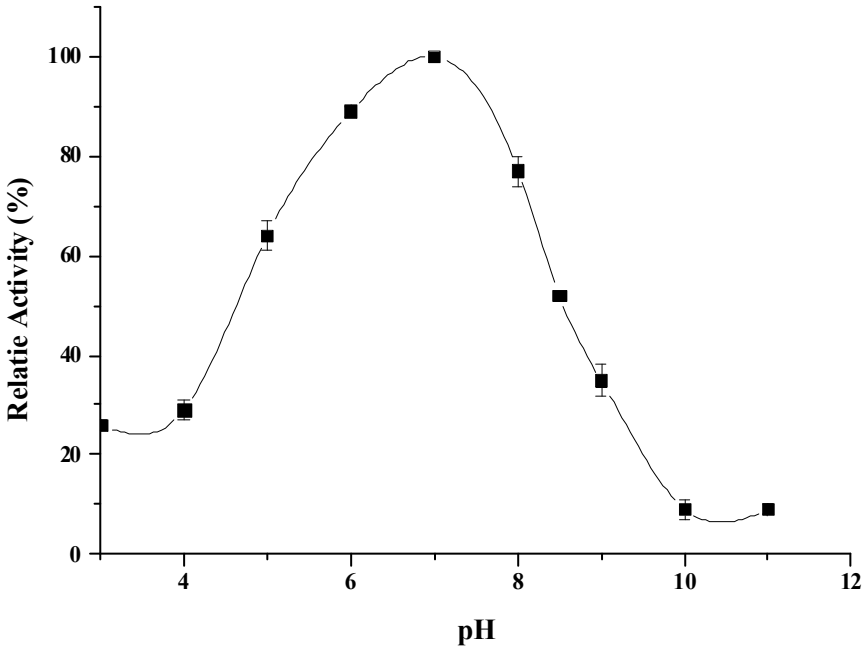

Fig. 19. Effect of pH on the activity of FP624. pH optimum was determined by assessing the enzyme activity with various 100mM pH buffers: Citric acid/sodium phosphate (pH 3 - pH 7.5), Tris HCl (pH 7.5 - pH 9) and $NaHCO_3$ (pH 9.6 - pH 11).

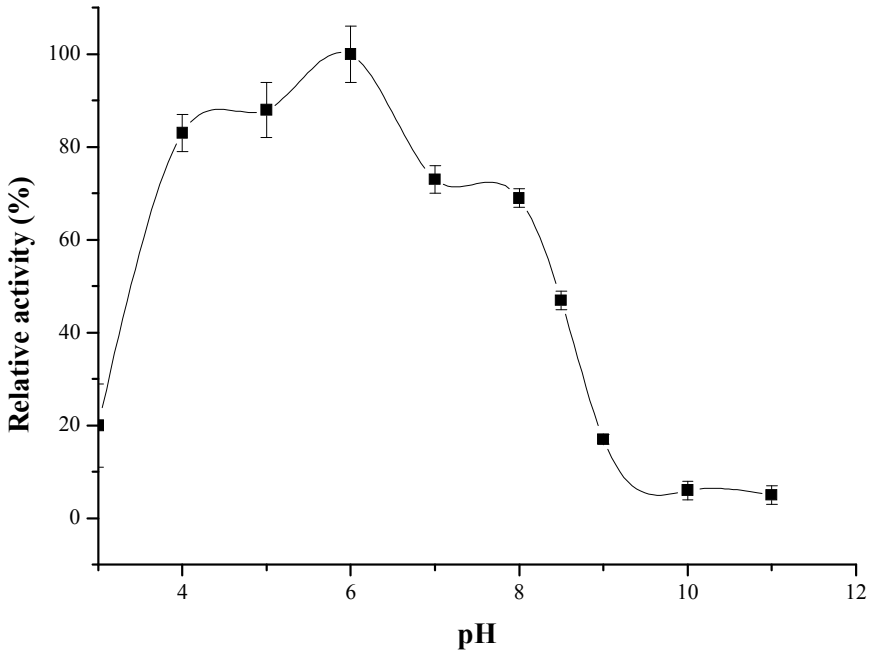

Fig. 20. pH stability of FP624. pH stability was determined by measuring the residual activity after aliquots of the enzyme sample were incubated with their respective buffers(100mM) at 4℃ for 2h.

Table 7. Effect of metal ions and protease inhibitors on the protease activity.

Reagents	Concentration(mM)	Relative activity(%)
None	-	100
$CaCl_2$	5	121
$MgSO_4$	5	154
$MnSO_4$	5	0
$CoSO_4$	5	39
$CuSO_4$	5	5
$FeSO_4$	5	0
$ZnSO_4$	5	24
EDTA	1	8
EGTA	1	6
TLCK	1	23
TPCK	1	11
PMSF	1	98
SBTI	0.01mg/ml	97

Table 8. Chromogenic substrates.

Chromogenic substrate	Amino acid sequence	Characteristics
S-2765	Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA·2HCl	For factor Xa
S-2222	Bz-Ile-Glu-(OR)-Gly-Arg-pNA	For factor Xa
S-2238	H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	For thrombin
S-2288	H-D-Ile-Pro-Arg-pNA	For t-PA
S-2444	pyroGlu-Gly-Arg-pNA	For urokinase

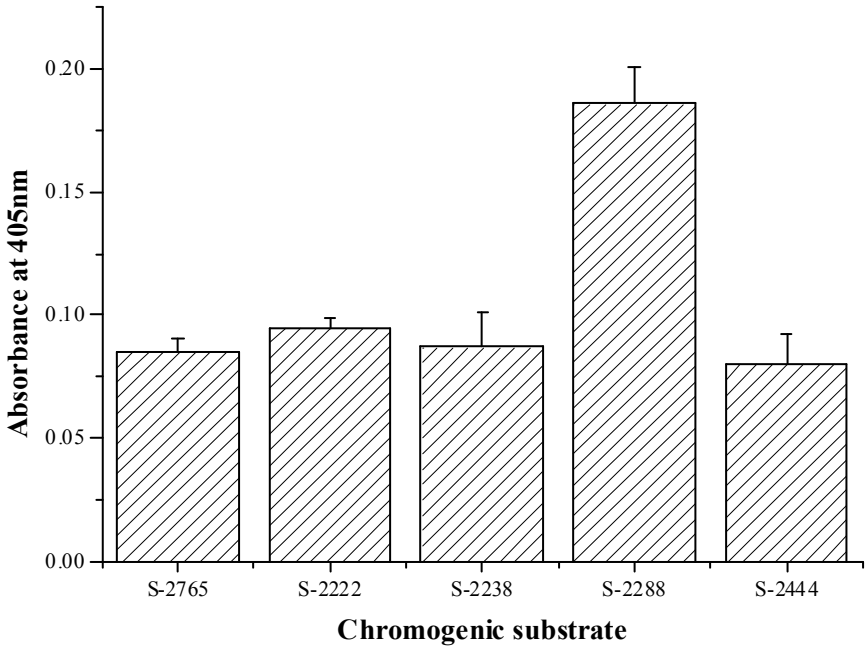

Fig. 21. Amidolytic activity of FP624.

Table 9. Chracteristics of FP624 and other related Fibrinolytic enzymes.

Enzyme	M.W. (kDa)	Optimal		Stability		Comment	Reference
		pH	Temperature (℃)	pH	Temperature (℃)		
AMMP	21	6.0	33	ND	ND	Chymotrycin-like metalloprotease	[16]
CK	28.2	10	70	7-10.5	<50	Thermophilic alkaline serine protease	[12]
Enzyme from *Oidiodendron flavum*	22	8.0	ND	6-11	<65	ND	[24]
From *chinensis* 12	16	10.5	45	6.8-8.8	37 for 24h	Metalloprotease	[19]
From *Fusarium* sp.BLB	27	9.5	50	2.5-11.5	<50	Serine protease belong to neither chymotrypsin, trypsin, or subtilisin	[23]
Fu-P	28	8.5	45	6-9	<37	Chymotrypsin-like serine metalloprotease	[37]
KA38	41	7.0	40	ND	ND	Metalloprotease	[9]
Subtilisin DFE	28	9.0	48	6-10	<50	Subtilisin-family serine protease	[27]
Subtilisin DJ-4	29	ND	40	4-11	R.T for 48h	Plasmin-like serine protease	[10]
Subtilisin FS33	30	8.0	55	ND	ND	Subtilisin-like serine protease	[35]
Subtilisin QK-2	28	8.5	55	3-12	40 for 30min	Subtilisin-family serine protease	[13]
SW-1	30	ND	ND	4-9	4-37	Serine metalloprotease	[36]
FP84	35	7.5	45	6-9	<40	Serine metalloprotease	[31]
FP624	28	7	50	4-6	<40	Serine metalloprotease	This work

ND : data not available.

제 5 장 참고문헌

[1] Astrup, T., Mullertz, S., 1952. The fibrin plate method for the estimation of fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 40, 346-351.

[2] Choi. NS, Kim. SH., 2001. The Effect of sodium chloride on the serine type fibrinolytic enzymes and the thermostability of extracellular protease from *Bacillus amyloliquefaciens* DJ-4. *J. Biochem. Mol. Biol.* 34. 134-138.

[3] Chun, J., M. Goodfellow., 1995 A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences, *Int. J. Syst. Bact.* 45:240-245.

[4] Fujita, M., K. Hong, Y. Ito, R. Fujii, K. Kariya, S. Nishimuro., 1995, Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat. *Biol. Pharm. Bull.* 18, 1387-1391.

[5] Gomez, C.C., R. Simoncarballo, A. C. Coma, T. Samchez de Leon, D. E. Montero, P.R. Rodriguez., 1991. The relationship between lipid peroxidation and platelets aggregation in atherosclerotic patients. *Angiologia* 43: 241-246.

[6] Hahn. BS., Cho. SY., Ahn. MY., 2001. Purification and characterization of a plasmin-like protease from *Tenodera sinensis* (Chinese mantis). *Insect biochemistry and molecular biology* 31:573-581.

[7] Heo. S., Lee SK., Joo. HK., 1998. Isolation and Identification of Fibrinolytic Bacteria from Korean Traditional Chungkookjang. *Agricultural Chemistry and Biotechnology.* 41(2): 119-124.

[8] Jukes, T. H. and C. R. Cantor., 1969. Evolution of protein molecules, *In* H. N. Munro(ed.) Mammalian Protein Metabolism, *Academic Press*, **3**:21-132.

[9] Kim HK, Kim GT, Kim DK, Choi WA, Park SH, Jeong YK, Kong IS., 1997. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermented Wsh. *J Ferment Bioeng* 84:307-312. doi:10.1016/S0922-338X(97)89249-5.

[10] Kim SH, Choi NS., 2000. Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp. strain DJ-4 screened from Doen-Jang. *Biosci*

Biotechnol Biochem 64:1722-1725. doi:10. 1271/bbb.64.1722.

[11] Kim SH, Choi NS, Lee WY., 1998, Fibrin Zymography: A Direct Analysis of Fibrinolytic Enzyme on Gels. *Analytical Biochemistry*, 263:115-116.

[12] Kim W, Choi K, Kim Y, Park H, Choi J, Lee Y, Oh H, Kwon I, Lee S., 1996. Purification and characterization of a Fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl Environ Microbiol* 62:2482-2488.

[13] Ko JH, Yan JP, Zhu L, Qi YP., 2004. Identification of two novel fibrinolytic enzymes from *Bacillus subtilis* QK02. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 137:65-74. doi:10.1016/j.cca.2003.11.008.

[14] Koh YS, Chung KH, Kim DS., 2001. Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme from snake. *Toxcion* 39: 555-560. doi:10. 1016.S0041-0101(00)00169-0.

[15] Laemmli UK., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-686.

[16] Lee SK, Kim JS, Kim JE, Sapkota K, Shen MH, Kim S, Chun HS, Yoo JC, Choi HS, Kim MK, Kim SJ., 2005. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of Armillaria mellea. *Protein Expr Purif* 43:10-17. doi:10.1016/j.pep.2005.05.004.

[17] Lee, JB., 1984. Production and properties of alkaline protease from *Streptomyces sp. Kon-Kuk University(Master thesis).*

[18] Lee, S. D., S. O. Kang, Y. C. Hah., 2000. *Catellatospora koreensis* sp. nov., a novel actinomycetes isolated from a gold-mine cave, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1103-1111.

[19] Liu XL, Du LX, Lu FP, Zheng XQ, Xiao J., 2005. Purification and charcterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Rhizopus chinensis*12. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:209-214. doi:10. 1007/s00253-004-1846-5.

[20] Madved, L. V., D. A. Solovjov, K.C. Ingham., 1996. Domain structure, stability and interactions in streptokinase. *Eur. J. Biochem.* 239: 333-339.

[21] Markland, Jr., F.S., 1991. Inventory of α- and β- fibrinogenases from snake venoms. *Thrombosis and Haemostasis* 65, 438-443.

[22] Marks, D., A. Marks, C. Smith., 1996. Basic Medical Biothemistry, P.107. *Williams & Wilkins, Baltimore.*

[23] Mitsuhiro U, Toshihiro K, Kazutaka M, Takumi N., 2007 Purification and characterization of fibrinolytic alkaline protease from *Fusarium* sp. BLB. Appl *Microbiol Biotechnol.* 74:331-338. doi:10.1007/s00253-006-0621-1.

[24] Nagwa A, Tharwat H., 2006 Purification and biochemical characterization of Fibrinolytic enzyme produced by thermophilic fungus *Oidiodendron Xavum. Biotechnology.* 5:160-165.

[25] Nakajima, N., H. Mihara, H. Sum., 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm. Lumbricus rebellus. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 1730-1737.

[26] Oda K, Murao S., 1974. Purification and some properties of acid proteinase A and B of Scytalidium lignicolum ATCC 24568. *Agric Biol Chem.* 38:2435-2444.

[27] Okazaki, T., 1987. Rare actinomycetes new breed of actinomycetes, *J. Microorganisms.* 3: 453-461.

[28] Peng Y, Huang Q, Zhang RH, Zhang Y., 2003. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol.* 134:45-52. doi:10.1016/S1096-4959(02)00183-5.

[29] Reed, G. L., L. F. Parhami-Seren, P. Kussie., 1995. Identification of plasminogen binding region in streptokinase that is necessary for the creation of functional streptokinase-plasminogen activator complex. *Biochemistry.* 34: 10266-10371.

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

[31] Simkhada. JR, Mander. P, Cho. SS, Yoo. JC., 2009 A novel fibrinolytic protease from *Streptomyces* sp. CS684. *Process. Biochem.* doi:10.1016/j.procbio.2009.08.010.

[32] Sumi H, Seiki M, Morimoto N, Tsushima H, Maruyama M, Mihara H.,

1985. Plasma fibrinolysis after intraduodenal administration of urokinase in rats. *Enzyme*, 33: 121-127.

[33] Sumi, H., H. Hamada, K. Nakanishi and H. Hiratani., 1990. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of NK. *Aata. Haematol.* 84, 139-143.

[34] Sumi, H., N. Nakajima and C. Yatagai., 1995. A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack Shiokara, a Japanese traditional fermented food. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 112, 711-714.

[35] Wang CT, Ji BP, Li B, Rob N, Li PL, Ji H, Chen LF., 2006. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional *Douchi. J Ind Microbiol Biotechnol.* 33:750-758. doi:10.1007/s10295-006-0111-6.

[36] Wang J, Wang M, Wang Y., 1999. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. *Chin J Biotechnol* 15:83-89.

[37] WuB, WuL, Chen D, Yang Z, Luo M., 2009. Purification and characterization of a novel fibrinolytic protease from Fusarium sp. CPCC 480097. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36:451-459.

[38] Zweorski P.G., K. R. Marotti, V. MacKay, C. Yip, G. S. Gill., 1989. Production and secretion of porcine urokinase in Saccharomyces cerevisiae: characterization of the secreted gene product. *Gene* 28: 545-551.

저작물 이용 허락서

학 과	약학과	학 번	20087230	과 정	석 사
성 명	한 글 박성주 한 문 朴成柱 영 문 Park, Sung-Ju				
주 소	전라남도 해남군 마산면 연구 277-1				
연락처	E-mail : psju0920@naver.com				
논 문 제 목	한글 : 국내 토양방선균에서 피브린 분해효소 개발.				
	영문 : Development of Fibrinolytic enzyme from soil *Actinomycetes.*				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포・전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송・출력을 허락함.

동의여부 : 동의(o) 반대( )

2010년 2월

저작자: 박성주 (인)

조선대학교 총장 귀하