

## Alkaline protease inhibitor를 생산하는 해양유래 방선균의 탐색 및 동정

강성일 · 공재열 · 최영준<sup>1</sup> · 김민용<sup>2</sup> · 손흥주<sup>3\*</sup>

부경대학교 생물공학과, <sup>1</sup>경상대학교 해양식품생명공학과, <sup>2</sup>전남대학교 냉동공학과, <sup>3</sup>부산대학교 생명응용과학부

Received February 14, 2008 / Accepted March 12, 2008

**Screening and Identification of Alkaline Protease Inhibitor-Producing Marine-derived Actinomyces.** Sung-Il Kang, Jai-Yul Kong, Yeung Joon Choi<sup>1</sup>, Min-Yong Kim<sup>2</sup> and Hong-Joo Son<sup>3\*</sup>. Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea, <sup>1</sup>Division of Marine Bioscience/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Gyeongnam 650-160, Korea, <sup>2</sup>Department of Refrigeration Engineering, Chonnam National University, Yosu 550-749, Korea, <sup>3</sup>School of Applied Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea - In this study, we screened and identified the bacterial strain showing high alkaline protease inhibitor activity from marine environment. Nine bacterial strains with alkaline protease inhibitor activity were isolated from marine sediments. Among them, strain C12 had the highest alkaline protease inhibitor activity and was selected for further taxonomical study. On the basis of morphological and physiological characteristics, strain C12 was identified as the genus *Streptomyces*. A phylogenetic analysis of the 16S rDNA showed that the isolated strain was actually a member of the genus *Streptomyces*, because the determined sequence exhibited a higher homology with *Streptomyces thermocarboxydus*. Morphological characteristics showed cylindrical spore chain and smooth spore surface by scanning electron microscope. Strain C12 was grown on all media except for ISP 9 agar. This strain could be grown in the medium containing up to 9% NaCl.

**Key words :** Marine actinomycete, protease inhibitor, *Streptomyces* sp.

### 서 론

Protease는 동물, 식물 및 미생물계에 광범위하게 분포되어 있으며, 모든 생체기능에 직·간접적으로 관여한다. 그러나 이상 환경에 의하여 다양한 질병 유발과정에 관여하며, 생명현상과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다[2]. 이러한 protease에 대하여 억제 또는 방어역할을 하는 것이 protease inhibitor이다. Protease inhibitor는 serine, cystein, aspartic, metallo inhibitor 등으로 분류되어지며, 동, 식물 및 미생물에 의해 생산되는 것으로 알려져 있다[7,19].

Animal protease inhibitor는 간, 혈관 내피세포, 태반 등에서 합성되며 일부는 혈액응고, 면역 체계에 관여하며, 일부는 조직염증을 제어하는 생체 방어반응에 관여한다[2,18]. Plant protease inhibitor는 미생물 및 곤충 등의 외적으로부터의 종자방어, 내재성 protease의 조절과 보호작용, 소화기관 내에서 종자 보호 등 여러 가지 기능을 갖고 있다[11,13]. Microbial protease inhibitor는 방선균 중 *Streptomyces* 속에서 많이 발견되어지고 있으며 분자량이 작고, 열과 산에 비교적 안정하다[6,12].

이들 protease inhibitor는 의약, 식품, 농업에 활용 가능할 뿐만 아니라 단백질 구조 연구와 반응기작을 연구함에 있어서도 좋은 도구가 된다[3,17]. 특히, 특이적이고 선택적인

protease inhibitor는 소염작용, 항종양작용, 변이유발 저해, 복수저류 저해, 발암 및 암 전이 저해, 폐기종, 관절염, 췌장염, 고지혈증, 고혈압, AIDS와 같은 인체 질병의 발병과정에 관여하는 단백질 분해효소들을 불활성화 시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다[4]. 또한, 수산식품인 맛살류의 경우 제품의 원료인 어류의 근육조직 연화와 파괴, 제품의 겔(gel)화를 위한 가열과정 동안 단백질이 분해되어 독특한 조직감을 구성하는 gel 구조가 파괴되는 것을 방지하여 제품의 유통기간 연장 및 품질을 향상시켜 준다[1,14].

현재 알려져 있는 천연 protease inhibitor는 달걀흰자, 소혈장, 감자전분 등에서 분리된 것이 있으나, 소혈장 유래 protease inhibitor는 광우병 문제로 사용이 금지되었다[20,22]. 현재 해양으로부터 protease inhibitor를 생산하는 미생물을 분리한 사례는 극소수에 불과한 실정이며, 새로운 protease inhibitor의 개발이 점차 정체되는 경향을 나타내고 있다[24]. 따라서, 본 연구에서는 해양 생태계로부터 protease inhibitor 생산 활성을 가진 방선균을 탐색하여 분리·동정함으로써 protease inhibitor 개발을 위한 토착균주를 확보하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료 및 시약

사용된 효소는 subtilisin (Fluka, Switzerland)이었고, 저해제 반응에 사용된 발색시약은 ninhydrin (Lancaster,

\*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5544, Fax : +82-55-350-5544

E-mail : shjoo@pusan.ac.kr

England)이었으며, 그 외 사용된 모든 시약은 특급 혹은 분석용 시약이었다.

**균주 분리 및 배양**

우리나라의 남해안 전역에서 채집(2005년 1월)한 해수, 해조류, 침전물 및 갯벌을 alkaline protease inhibitor를 생산하는 방선균의 분리시료로 사용하였다. 채집한 각종 시료들은 멸균된 해수에 희석하여 방선균 및 해양미생물 선택 평판배지(Table 1)에 도말하여 27°C에서 4~6주 동안 배양하였다. 형성된 집락 중 방선균 단일 colony를 선별한 후, 반복 도말법으로 순수분리하였다. 순수분리된 각 균주를 기본배지에서 배양한 후, 회수된 배양 상층액 10 µl를 subtilisin 용액(0.1 mg/ml in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) 10 µl와 혼합하여 paper disk법으로 gelatin이 함유된 기본평판배지에서 clear zone 형성을 억제하는 균주를 선별하였다. 기본배지로는 인공해수(1 l 당 NaCl 23.0 g, KCl 0.7 g, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 10.6 g, CaCl<sub>2</sub> 1.1 g, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.9 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.2 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01 g, Trizma base 6.05 g)를 이용하여 조제된 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 사용하였다[8]. 전배양은

25°C, 180 rpm에서 3일 동안 진탕배양하였으며, 본배양은 전배양액 1.0% (v/v)를 접종하여 동일한 조건에서 4일 동안 진탕배양하였다.

**분리균주의 동정**

분리 선별한 균주의 1차 동정은 형태학적, 배양적 및 생화학적 특성을 조사하여 실시하였으며, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 분류 방법에 따라 분석하였다[8]. 분리균주의 형태는 scanning electron microscope (HITACHI S-2400, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

분리균주를 보다 정확하게 동정하기 위하여 16S rDNA의 염기서열을 분석하였다. Wizard Genomic DNA Prep. kit (Promega)를 사용하여 분리균주의 chromosomal DNA를 분리하였으며, 분리한 DNA를 주형으로 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. 이때 사용된 primer는 forward primer (27F, 5'-AGAGTTTG ATCCGCTCAG-3') 및 reverse primer (1492R, 5'-GGTACCTTGTTACG ACTT-3')이었다. 각 0.5 µM primer, 200 µM deoxynucleoside triphosphate, 10× PCR buffer 10 µl, 그리고 0.3 µl EF-Taq polymerase (2.5 unit)를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 30 cycles (95°C에서 20 sec, 50°C에서 40 sec, 72°C에서 90 sec)동안 증폭하였으며, 72°C에서 3 min 동안 신장시켰다. PCR 산물을 Wizard SV Gel과 PCR clean-up system (Promega)을 사용하여 추출하였다. Big Dye Terminator Cycle Sequence kit (Applied Biosystems, USA)와 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems)를 사용하여 PCR product의 염기 서열 분석을 수행하였다.

Table 1. Composition of actinomyces selective medium

Medium	Composition (per liter of artificial sea water )
Starch-casein nitrate	Starch 10.0 g, casein 0.3 g, NaCl 2.0 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2.0 g, KNO <sub>3</sub> 2.0 g, MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.05 g, CaCO <sub>3</sub> 0.02 g, FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.01 g, cycloheximide 50 mg, rifampicin 5.0 mg, 1 M Tris-HCl buffer 20 ml, agar 18.0 g, pH 7.5
Humic acid-vitamin	Humic acid 1.0 g, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.5 g, KCl 1.7 g, MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.05 g, FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.01 g, CaCO <sub>3</sub> 0.02 g, thiamine-HCl 0.25 mg, riboflavin 0.25 mg, niacin 0.25 mg, pyridoxine-HCl 0.25 mg, inositol 0.25 mg, Ca-pantothenate 0.25 mg, PABA 0.5 mg, biotin 0.25 mg, FeSO <sub>4</sub> 10.0 mg, CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O 1.0 mg, ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 1.0 mg, MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 1.0 mg, actidin 50 mg, nystatin 50 mg, polymixin B 4.0 mg, penicillin 0.8 mg, cycloheximide 50.0 mg, rifampicin 5.0 mg, 1.0 M Tris-HCl buffer 20.0 ml, agar 18.0 g, pH 7.5
M1	Starch 10.0 g, yeast extract 4.0 g, peptone 2.0 g, rifampicin 5.0 mg, cycloheximide 50.0 mg, 1.0 M Tris-HCl buffer 20.0 ml, agar 18.0 g, pH 7.5
Arginine-glyceol	Arginine 1.0 g, glycerol 12.5 ml, ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.0005 g, MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O 0.0005 g, CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O 0.0005 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.5 g, MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.25 g, FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.005 g, cycloheximide 50.0 mg, rifampicin 5.0 mg, 1.0 M Tris-HCl buffer 20.0 ml, agar 18.0 g, pH 7.5

**종족 계통적 분석**

16S rDNA의 염기서열 분석을 통하여 얻어진 분리균주의 부분 염기서열은 Blast network service를 이용하여 GenBank에 등록된 다른 균주의 염기서열과 비교함으로써 계통분류학적 유연관계를 분석하였다. 각 염기서열의 alignment는 Clustal X software와 Mega 3 program을 사용하여 정렬하였으며, 계통도는 neighbor-joining 방법을 사용하여 작성하였다[15].

**효소 저해활성 측정**

Alkaline protease inhibitor 측정은 ninhydrin법[10]을 변형시켜 사용하였다. 즉 50 mM Tris-HCl buffer 50 µl에 10 µl subtilisin (0.1 mg/ml)과 증류수에 3배 희석된 배양 상층액 10 µl를 혼합하여 37°C에서 20 min간 전처리한 후, 0.2% (w/v) gelatin (in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5)이 포함된 기질용액 0.5 ml를 첨가하여 37°C에서 30 min간 반응시켰다. 효소 반응을 중지시키기 위해 50% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) 0.1 ml를 첨가한 후, ninhydrin 용액 0.5 ml를 혼

합하여 100°C에서 10 min간 끓인 후, ice-water에서 냉각시켰다. 가수분해 되지 않은 단백질을 침전시키기 위해 50% 1-propanol을 가하여 15 min간 방치한 후, 10,000× g에서 10 min간 원심분리를 행하여 570 nm에서 상층액의 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.

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

### 결과 및 고찰

#### 저해제 생산 균주의 분리

우리나라의 남해 연안에서 채집한 각 시료로부터 약 1,000 균주를 분리하였다. 이 중, Bennet's 배지에서 paper disk 법으로 alkaline protease를 저해하는 9 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 각각의 균주들을 250 ml Erlenmeyer flask내의 Bennet's 액체배지에 접종한 후, 호기적인 조건에서 27°C, 180 rpm으로 4일간 진탕배양하였다. 배양액을 Whatman No. 1 paper로 여과하고, 원심분리(10,000× g, 10 min)하여 얻은 상층액과 subtilisin 효소액을 혼합하여 37°C에서 20 min간 처리하였다. Gelatin이 함유된 test plate에 10 µl씩을 loading한 paper disk를 올려놓은 후 37°C에서 48 hr 반응시켰다. 반응 후 clear zone 형성을 저해한 균주를 2차 선별하였다. 2차 선별된 균주 중 ninhydrin 방법을 통해 subtilisin에 대한 저해율이 가장 높게 나타난 균주 C12를 최종적으로 선별하였다(Fig. 1). 최종 분리된 균주는 20% (v/v) glycerol을 첨가하여 -70°C 냉동고에 보관하며 본 실험에 사용하였다.

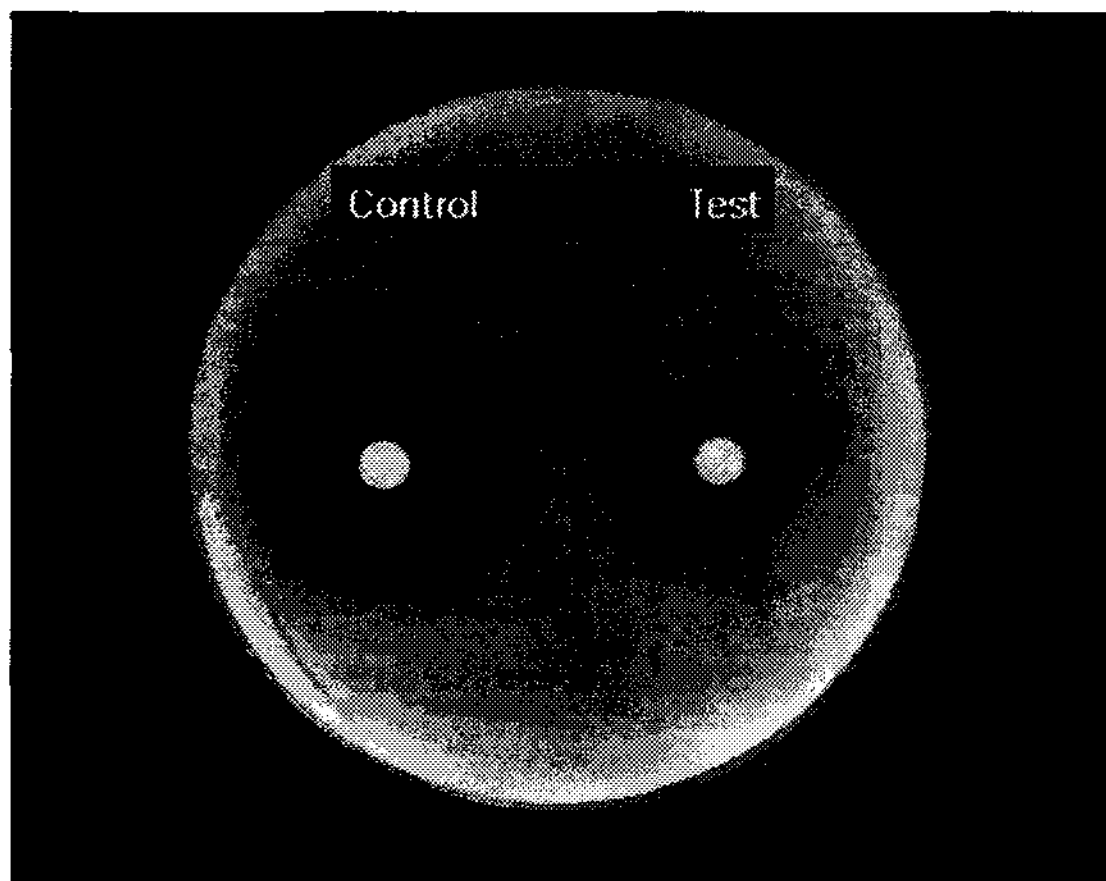


Fig. 1. Plate assay for alkaline protease inhibitor produced by the *Streptomyces* sp. C12. Control, Subtilisin and buffer; Test, Subtilisin and culture supernatant of C12.

#### 형태학적·배양적 특성

분리 선별한 균주의 1차 동정은 형태학적, 배양적 및 생리학적 특성을 검토하고, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 제안되어 있는 International Streptomyces Project (ISP)에 의한 방법[8]으로 분석하였다.

우선, alkaline protease inhibitor 생산 균주 C12의 형태학적 특성을 조사하기 위해 포자 형성 및 형태 확인용 배지를 이용하여 27°C에서 4일 동안 배양한 후, 전자현미경으로 관찰하였다. 그 결과 Fig. 2(B)와 같이, C12 포자의 크기는 2.0 µm로 *Streptomyces*속의 일반적인 포자크기인 0.3~0.8 µm 보다는 상당히 신장된 크기였으며, 외형은 원통형으로 편모가 없고 운동성은 없었다. 포자형태는 smooth하였으며, 분절형이었다(Table 2).

분리균주는 ISP 9 배지를 제외한 대부분의 배지에서 잘 성장하였으며, 비확산성의 색소를 생산하지 않음을 확인하였다. 포자의 색깔은 ISP 2, starch-casein nitrate 배지에서 하얀색을, nutrient배지는 옅은 노란색을 띄었다. 그 외의 배지에서는 회색을 띄는 것으로 관찰되었다(Table 3).

#### 생리생화학적 특성

분리균주의 생리생화학적 특성을 조사한 결과, 15~50°C 사이에서 성장하였으며, 55°C 이상에서는 전혀 성장하지 못했다(Table 4). 또한 Gram 양성으로 나타났으며, citrate 음성,

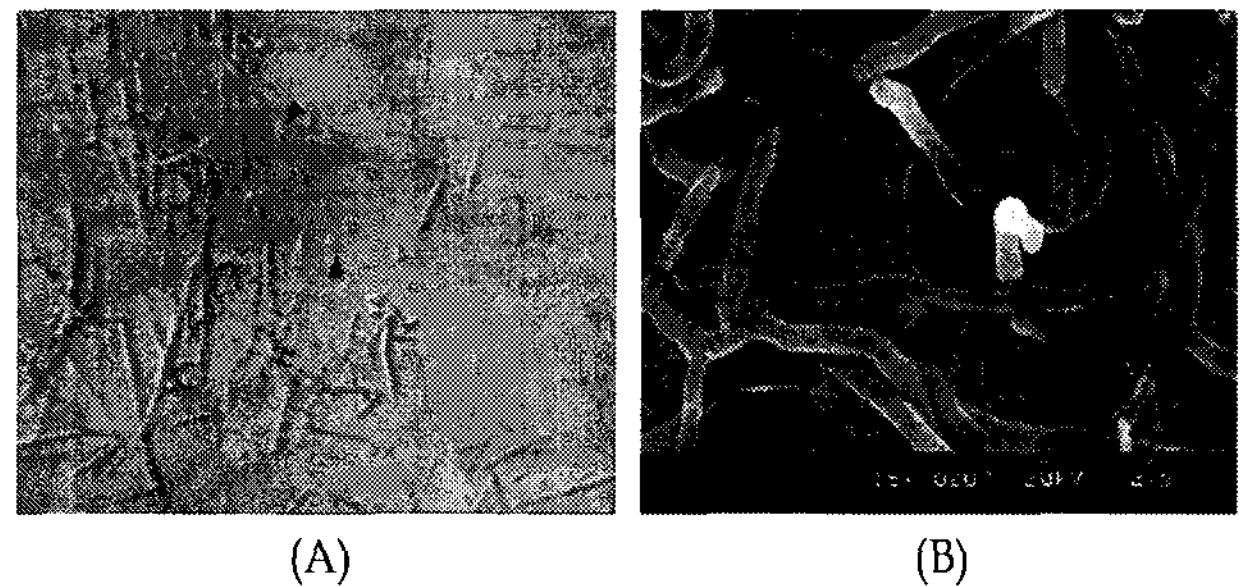


Fig. 2. Light micrograph (A, ×1,000) and scanning electron microscopy (B, ×1,500) of *Streptomyces* sp. C12.

Table 2. Morphological characteristics of strain C12

Characteristics	Isolated strain	<i>S. thermocarboxydus</i> (AB098079)
Spore morphology	Cylindrical spore	Arthrospore
Spore surface	Smooth	Smooth
Fragmentation of substrate mycelium	—	—
Spore motility	Immotile	Immotile
Arthrospores in verticals	—	—
Growth temperature	15~50°C	10~42°C

Table 3. Cultural characteristics of strain C12

Medium	Growth	Spore mass color	Reverse side color	Soluble pigment
ISP 1 agar	good	gray	green	none
ISP 2 agar	good	white	yellow	none
ISP 4 agar	moderate	gray	gray	none
ISP 9 agar	-	none	none	none
Starch-glyceol agar	good	gray	brown	none
Starch-casein nitrate agar	moderate	white	yellow	none
Nutrient agar	good	pale yellow	pale yellow	none
Bennet's agar	good	gray	dark brown	none

Table 4. Physiological characteristics of strain C12

Contents	Characteristic
Gram staining	+
Catalase production	+
Melanin pigment	-
Casein hydrolysis	+
Starch hydrolysis	+
Growth in 9% NaCl	+
Gelatin hydrolysis	+
Utilization of citrate	-

Table 5. Utilization of carbon compounds by strain C12

Characteristics	C12
Glucose	+
Galactose	+
Maltose	+
Arabinose	+
Mannitol	+
Lactose	+
Sorbitol	-
Fructose	+
Starch	+
Mannose	+
Sucrose	-

catalase 양성 및 melanin 색소를 생성하지 않았다. Starch, gelatin 및 casein을 가수분해하며, 9% (w/v) NaCl이 포함된 배지에서도 잘 성장하였다. 분리 균주의 생장에 있어 당 이용성을 조사한 결과 glucose, galactose, maltose, lactose, fructose 및 mannose 등은 잘 이용하였지만, sorbitol과 sucrose는 이용하지 못했다(Table 5). 이상의 결과를 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [8]에 준하여 검토한 결과, 실험균주는 *Streptomyces* 속에 포함됨을 알 수 있었다.

### 16S rDNA 염기서열 분석 및 계통 분류

분리균주의 보다 정확한 동정을 위하여 16S rDNA 염기서열 분석을 실시하였다. 분리균주의 genomic DNA를 추출하여 16S rDNA 유전자 primers를 이용하여 PCR을 수행하였다. 16S rDNA 부분 염기서열을 NCBI GenBank에 등록된 유사 균주와 비교분석하여 유전자간 상관성을 비교한 결과, 본 분리균주는 *Streptomyces* sp. EF-2 (AF112165), *Streptomyces thermocarboxydus* (AB098079)와 99% 유사하였다[5]. Neighbor-joining 방법을 사용하여 계통수(phylogenetic tree)를 작성한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 분리균주 C12는 *Streptomyces* 속을 포함하는 계통학적 그룹에 속하며, 특히 *Streptomyces thermocarboxydus* (AB098079)와 높은 유연관계를 나타내었다. 따라서 본 균주를 *Streptomyces* sp. C12로 명명하였다. 현재, alkaline protease inhibitor를 생산하는 *Streptomyces* 속으로 *S. coelicolor* A3 (2) [6], *Streptomyces* sp. NCIM 5127 [21], *S. albogriseolus* S-3253 [9], *S. virginiae* [16] 등이 알려져 있으며, alkaline protease inhibitor를 생산할 수

있는 해양 방선균에 대한 국내 보고는 본 논문이 처음이다. 본 논문에 사용된 균주는 한국농업미생물자원센터에 기탁하여 기탁번호 KACC 91318P를 부여받았다.

### 요 약

Alkaline protease는 식품 가공 공정에 있어 가공 원료의 선도 저하를 초래하거나 맛살류 제품 원료인 어류의 근육조직을 파괴하여 gel 구조를 파괴시키는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 해양으로부터 alkaline protease에 대한 저해력을 가지는 방선균들을 분리하여 그 중 저해력이 가장 높은 C12 균주를 최종 선정하였다. 본 균주의 형태학적, 배양적 및 생리학적 특성을 조사한 결과, 포자의 크기는 2.0 μm로 외형은 원통형이고, 편모가 없으며, 포자형태는 smooth하였다. ISP 9 배지를 제외한 대부분의 배지에서 잘 성장하였다. 또한 15~50°C에서 잘 성장하였으며, 9% (w/v) NaCl이 포함된 배지에서도 성장하는 것으로 확인되었다. Gram 양성, citrate 음성, catalase 양성이었으며, melanin 색소를 생성하지 않았다. Starch, casein 및 gelatin 분해능이 있었으며, glucose, galactose, maltose, lactose, fructose 및 mannose 등은 잘 이용하였지만, sorbitol과 sucrose는 이용하지 않았다. 이러한 특성을 토대로 본 균주는 *Streptomyces* sp.로 확인되었다. 보다 정확한 균주 동정을 위하여 16S rDNA 염기서열 분석을



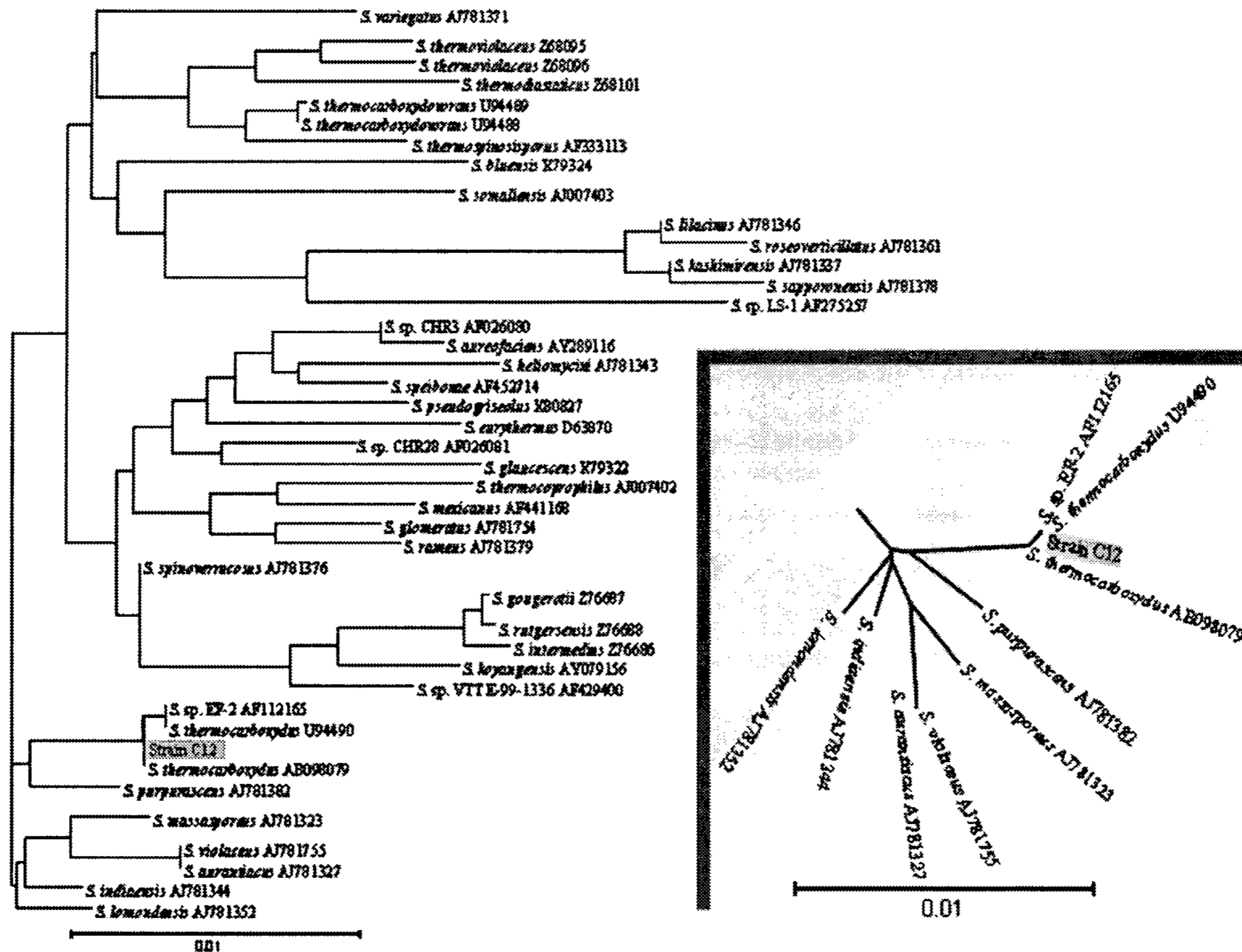


Fig. 3. Neighbour-joining tree based on 16S rDNA sequences of 42 *Streptomyces* strains.

수행하였으며, 그 결과 C12 균주는 *S. thermocarboxydus*와 계통진화학적으로 가장 유연관계가 높았다.

### 감사의 글

본 연구는 2005년도 해양수산부 수산특정연구개발과제 (Project No. 20040078)에 의해 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

### References

- An, H., M. Y. Peters and T. A. Seymour. 1996. Roles of endogenous enzymes in surimi gelation. *J. Food Sci.* **7**, 321-326.
- Barrett, A. J. and G. Salvesen. 1986. *Proteinase inhibitors*. pp. 3-18, Elsevier Science Publishers B. V.
- Bode, W. and R. Huber. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* **204**, 433-451.
- Demuth, H. U. 1990. Recent developments in inhibiting cysteine and serine proteases. *J. Enzym. Inhib.* **3**, 249-278.
- Miyairi, K., A. Ogasawara, A. Tonouchi, K. Hosaka, M. Kudou and T. Okuno. 2004. Low-molecular-weight pectate lyase from *Streptomyces thermocarboxydus*. *J. Appl. Glycosci.* **51**, 1-7.
- Kato, J., S. Hirano, Y. Ohnishi and S. Horinouchi. 2005. The *Streptomyces* subtilisin inhibitor (SSI) gene in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1624-1629.
- Kenney, A. J. 1999. Nomenclature and classes of peptidase, pp. 1-8. In Sterchi, E. E. and W. Stocker (eds.), *Proteolytic Enzyme*, Springer Lab Manual, New York.
- Kreig, N. R and J. G. Holt. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. pp. 2451-2492, Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland.
- Kuramoto, A., A. Lezhava, S. Taguchi, H. Momose and H. Kinashi. 1996. The location and deletion of the genes which code for SSI-like protease inhibitors in *Streptomyces* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **139**, 37-42.
- Moore, S. and W. H. Stein. 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* **176**, 367-388.
- Orr, G. L., J. A. Strickland and T. A. Walsh. 1994. Inhibition of diabrotica larval growth by a multicystatin from potato tubers. *J. Insect Physiol.* **40**, 893-900.
- Pandhare, J., K. Zog and V. V. Deshpande. 2002. Differential stability of alkaline protease inhibitors from actinomyces: effect of various additives on thermostability. *Biores. Technol.* **84**, 165-169.
- Ryan, C. A. 1990. Protease inhibitors in plants : Genes for improving defense against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**, 25-49.
- Saeki, H., Z. Iseya, S. Sugiura and N. Seki. 1995. Gel forming characteristics of frozen surimi from Chum salmon in

- the presence inhibitors. *J. Food Sci.* **60**, 917-922.
15. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
  16. Terabe, M., S. Kojima, S. Taguchi, H. Momose and K. Miura. 1994. Primary structure and inhibitory properties of a subtilisin-chymotrypsin inhibitor from *Streptomyces virginiae*. *Eur. J. Biochem.* **226**, 627-632.
  17. Terashita, T., M. Kono and S. Murao. 1980. Promoting effect of S-PI on fruiting of *Lentinus edodes*. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* **21**, 137-140.
  18. Travis, J. and G. S. Salvesen. 1983. Human plasma proteinase inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 655-709.
  19. Umezawa, H. 1972. Enzyme inhibitors of microbial origin, pp. 1-114, University of Tokyo Press, Tokyo.
  20. Ustadi, K., K. Y. Kim and S. M. Kim. 2005. Characteristics of protease inhibitor purified from the eggs of Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*). *J. Kor. Fish. Soc.* **38**, 83-88.
  21. Vernekar, J. V., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge and V. V. Deshpande. 2001. Novel bifunctional alkaline protease inhibitor: protease inhibitory activity as the biochemical basis of antifungal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 1018-1024.
  22. Weerasinghe, V. C., M. T. Morrissey and H. An. 1996. Characterization of active components in food grade proteinase inhibitor for surimi manufacture. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2584-2590.
  23. Yamashita, M. and S. Konagaya. 1991. Cysteine protease inhibitor in egg of Chum salmon. *J. Biochem.* **110**, 762-766.