

Pepsin 저해물질을 생산하는 방선균의 분리 및 검색

박석규*·성낙계·노종수

경상대학교 식품공학과

Isolation and Screening of Pepsin Inhibitor-Producing *Actinomycetes*

Park, Seok-Kyu*, Nack-Kie Sung, and Jong-Soo Rho

Department of Food Science and Technology, Gyeong Sang National University,
Jinju 660-701, Korea

For the purpose of obtaining microorganisms which produced an extracellular pepsin inhibitor, screening test was carried out. One strain of *Actinomycetes* (GF 155-2) isolated from soil samples showed a high inhibitory activity against porcine pepsin. The morphological, physiological and cultural characteristics of the strain GF 155-2 on various culture media were studied according to ISP methods and Bergey's manual of determinative bacteriology (8th ed.). This actinomycetes GF 155-2 was found to be similar to the genus *Microtetraspora*.

미생물의 대사산물로부터 얻어지는 저분자량의 protease 저해물질은 친화성 크로마토그래피의 활성 기로나 효소·생리활성 물질의 정제시에 일어나는 효소적 분해방지용으로도 이용될 수 있으며, 또는 효소의 반응기구 및 입체구조 해석이나 약물학적 활성 화합물로서 각종 질병의 치료제로서 사용하기 위하여 많은 연구가 진행되어 오고 있다(1-7).

이들 protease 저해물질을 생산하는 미생물은 곰팡이 세균도 가능하지만 대부분이 방선균 중의 *Streptomyces* 속이 주종을 이루고 있다(3,6,9,11). 한편 산성 protease의 대표적 효소인 pepsin의 저해활성 물질은 Murao, Umezawa, Rich 등에 의하여 화학요법제 및 발효공업적용의 응용에 대한 연구가 행하여지고 있으며 그 생산균주로는 *Streptomyces naniwaensis*, *Streptomyces parvisporogenes*, *Streptomyces testaceus*, *Penicillium cyclopium* 등이 보고되어 있다(7-10,19).

이에 저자들은 토양으로부터 pepsin 저해물질을 세포외로 분비하는 방선균을 분리한 후, 그 균주의 미생물학적 특성에 대하여 조사한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용배지

1차 분리용배지는 세균 및 곰팡이의 생육을 저지하기 위하여 각각 asparagine, sodium propionate가 첨가된 고체배지 (glucose 10.0g ; asparagine 0.5g ; K_2HPO_4 0.5g ; sodium propionate 4.0g ; agar 15.0g ; pH 7.0 per liter)를 사용하였고, 2차 선정용배지는 액체배지 (glucose 10.0g ; peptone 2.0g ; meat extract 10.0g ; NaCl 5.0g ; pH 7.0 per liter)를 사용하였다. 분리·선정된 균의 미생물학적 특성조사는 ISP(International Streptomyces Project) 배지를 포함한 15가지 배지(Table 6)와 Pridham·Gottlieb의 기본배지(12)를 사용하였다.

균주의 분리

균주의 1차 분리는 살균한 면전시험관에 지표에서 깊이 5cm 이상의 부석이 많은 토양 약 1g을 채취하여 멸균수 10ml와 vortex로 강하게 진탕하고 잠시 방치한 후 백금이로 그 상정액을 분리용 평판배지에 도말하였다. 30°C에서 4~5일간 배양하여 기균사가 잘 발달하고 균생육이 빠른 콜로니를 확인하고 corker borer로 잘라서 별도의 살균된 petri dish에서 3일간 더 배양시켜 저해물질을 배지에 집적시킨 후 pepsin이 포함된 카제인-한천용액을 분주하였

Key words: Pepsin inhibitor-producing *Actinomycetes*, isolation

*Corresponding author

*Present address: Department of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-070, Korea

다. 그리고 생성된 저해물질을 확산시키기 위하여 저온 인큐베이트에서 약 30 분 이상 방치한 다음 30°C에서 15 시간 배양하여 0.44 M trichloroacetic acid(TCA)로 처리한 후 원통형 한천 주위에 형성된 white zone의 크기를 측정하고 우수한 균주를 2차 선정용 대상균주로 하였다. 2차 선정은 50 ml 삼각 플라스크의 25 ml 액체배지에 1차로 분리·선별된 균주를 접종하여 진탕 인큐베이트(rpm 60, stroke 5.4 cm)에서 30°C 3일간 배양하고 원심분리(균사 분열균) 및 여과(pellet 형성균)한 후 그 여액의 저해활성을 측정하여 최종적으로 선정하였다.

균주의 미생물학적 특성

형태학적 특성 : 일반적인 기균사 및 균락표면의 형태는 yeast ext. -malt ext. agar, glucose-peptone agar, Emerson agar 배지를 사용하여 관찰하였고 spore chain, sporophore의 형태 및 배열상태는 glucose-peptone agar 배지에서 30°C로 14일간 배양한 공시균주를 광학현미경(Phase Contrast, Nikon, Labophot형)으로 검경하였으며 spore wall ornamentation, spore shape, size 등은 포자를 채취하여 주사전자현미경(SEM, AKASI SX-40)으로 관찰하였다(13).

생리 및 생화학적 특성 : NaCl tolerance는 Czapek's 배지에 NaCl 1~10% 첨가하여 균주를 배양시킴으로서 그 생육도를 관찰하여 생육 최고 한계의 NaCl 농도를 검토하였다. Catalase는 3% H₂O₂ 1 ml를 배양액 1 ml에 가하여 거품의 생성유무로서 판정하고 cellulase는 여지분괴력으로 하였으며 protease는 casein을 기질로하여 조사하였다. 당의 이용성검정은 Pridham·Gottlieb 기초배지를 10 Lb에서 10분간 살균한 후 각각의 당류를 1%씩 첨가하여 100°C에서 10분간 재살균하고 균주를 평판배양하여 그 균생육도로서 판정하였다. 그의 gelatin 액화력, milk coagulation, 질산염 환원, H₂S 생성, 전분 가수분해도는 일반적인 상법에 준하였다.

배양학적 특성 : Yeast ext. -malt ext. agar 배지의 14종의 배지에서 균의 생육도를 조사하였고, aerial mass color, substrate mycelium color 및 diffusible soluble pigment는 color harmony manual 혹은 Tresner-Backus color series와 비교하여 관찰하였다(20).

세포벽 구성성분 분석

2, 6-Diaminopimelic acid(DAP) 및 단당류의 분석은 미생물의 화학분류 실험법(14)에 따라 실시하였

는데, 동결건조한 균체를 각각 5 mg, 50 mg을 산 가수분해시켜 전처리한 가수분해액 10 μl을 cellulose TLC plate(polyester sigma cell type 100 cellulose, 10 μm layer thickness)에서 spotting하여 전개시켜 나타난 spot를 각각 표준용액(Sigma)의 것과 비교하여 확인하였다.

저해활성의 측정

분리균주의 배양물에서 저해물질 활성측정은 Anson 방법(15)을 변경시킨 것으로 Table 1과 같으며, (A)-(C)한 흡광도(OD)의 평균값을 구하여 저해활성의 대소를 비교하였다. (A)는 저해물질을 첨가하고 효소반응을 시킨 것으로 소형시험관에 0.

Table 1. Assay systems for pepsin inhibitory activity (modified Anson method)

Pipette	Inhibitor assay (A)	Reference assay (B)	Control assay (C)	Blank assay (D)
Pepsin solution	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Buffer solution	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Inhibitor solution	0.5 ml	buffer (methanol)	0.5 ml	buffer (methanol)
Trichloroacetic acid			1.5 ml	1.5 ml
Mix and preincubate at 37°C for 10 min				
Substrate solution	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Incubate at 37°C for 30 min				
Trichloroacetic acid	1.5 ml	1.5 ml		
Stand for 40 min at room temperature				
Centrifuge off the precipitate				
Pipette into test tubes	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Sodium carbonate	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
Folin's reagent (3x dilution)	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Incubate at 37°C for 30 min				
Read optical density at 660 nm				

02% 효소액 0.5 ml, 0.2 M KCl-HCl buffer(pH 2.0) 0.5 ml 와 저해물질용액 0.5 ml 를 vortex 로 혼합하여 37°C에서 10 분간 전처리한 후 1% casein 용액 0.5 ml 를 첨가하여 정확히 30 분 동안 유리상태로 잔존하는 효소를 반응시킨다. 반응을 정지시키기 위하여 0.4 M TCA 1.5 ml 를 즉시 가하고 혼합하여 실온에서 40 분간 방치한 다음 분해되지 않은 기질을 원심분리(4000 rpm, 10 min)하여 제거한다. 그 상정액 1 ml 를 소형 시험관에서 0.4 M sodium carbonate 2.5 ml 와 혼합하여 알칼리성으로 조절한 후 Folin-phenol(3 배 희석) 1 ml 와 37°C에서 30 분 동안 항온수조에서 정색반응을 시켜 660 nm 에서 OD 값을 측정하였다. (B)는 저해물질을 첨가하지 않고 buffer 로 대체한 효소만의 반응을 조사한 것이며 (C)·(D)는 효소반응 전에 이미 TCA 를 첨가한 것으로 각각 효소·저해물질과 효소 자체만의 OD 값을 알아보기 위한 것이다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 선정

균주분리시 토양시료의 경우 탄산칼슘을 처리하면 방선균의 비율이 높아진다고 알려져 있으나(17), 큰 효과가 없었으며 또한 세균 및 사상균의 선택적 생육 저지제인 asparagine 과 sodium propionate 는 *p*-oxybenzoic acid butyl ester, furacin 등과 마찬가지로 완전한 저지효과를 나타내지 못하였다.

Table 2. Pepsin inhibitory activity of *Actinomycetes* isolated from soil samples

Strain No.	Inhibitory activity	Growth type
GF1-41-3	+	Pellet, yellowish brown
GF22	+	Pellet, brown
GF27-2	+	Pellet, yellow
GF95-1	++	Pellet, brown
GF84-1	++	Paste, whitish brown
GF155-2	+++	Pellet, yellowish brown
GF230-1	+	Pellet, yellowish brown
GF281-3	++	Pellet, light brown
GF321	+++	Paste, whitish brown
GF326	+	Pellet, brown
GF336	+	Pellet, brown
GF342	+	Pellet, brown
GF363	+	Pellet, dark brown

Casein-pepsin agar plate 의 최적조건을 0.1% casein, 40 µg/ml pepsin 및 1.5% agar 농도에서 pH2.0으로 사용하면 paper disk 를 이용한 방법(16)보다 white zone 확인 및 저해물질의 확산에 효과적인 것을 알 수 있었다. 1차 분리용 배지에서 저해력이 있는 것으로 확인된 37 균주중, 2차적으로 액체 진탕배양한 결과 배양액중의 pepsin 저해력이 양호한 13 균주는 Table 2 와 같으며, 저해활성의 OD 값(Table 1 의 A 분석)은 1.0 이상(+), 0.95~1.0(++), 0.90~0.95(+++), 0.90이하(++++)로 구분하여 표시하였다. 대체로 pellet 형성균이 많았고, 색소분비는 배지 자체의 색소 때문에 정확히 판단하기는 어려웠으며 배양기간에 따라 pellet 형성균도 paste 한 성장을 하기도 하였는데 포자형성이 우수하고 성장이 빠른 155-2 균주를 최종 분리균주(이하 GF 155-2)로 택하였다.

균주의 미생물학적 특성

형태학적 특성 : Spore chain 은 2~6 개의 spore 로 구성되었으며, 직선상의 형태였다(Fig. 1-D). 포자를 주사전자현미경으로 관찰한 결과(Fig. 1-E), spore surface 는 편모 등이 없는 구형이었고 크기는 대개 1.5 µ 내외였는데 *Streptomyces* 속의 0.3~0.8 µ 보다는 상당히 크고 *Microtetraspora*, *Microbispora* 속의 1.2~2.0 µ 와는 비슷하거나 약간 작았다. 또한 포자형성 방식은 Hessen 및 Schnepf 의 방선균 포자형성법 5 가지중 *Thermopolyspora* 형과 비슷한 형식이었다. Sporangium 은 관찰되지 않았으며 sporophore 는 기균사에서 형성되어졌다. Spore wall ornamentation 은 평활하면서 굴곡이 있었다.

전반적으로 *Streptomyces* 속, *Micropolyspora* 속, *Microtetraspora* 속과 유사하였는데 균의 외관적 관찰

Table 3. Morphological characteristics of strain GF 155-2

Spore chain	Straight to flexuous
Substrate mycelium	Not fragmentated
Spore shape	Spherical
Flagellated spore	Not detected
Colony surface	Short cottony, variable
Spore size	1.0-1.5 µ
Spore wall ornamentation	Smooth type
Sporophore	Formed from aerial mycelium
Globular sporangium	Not detected

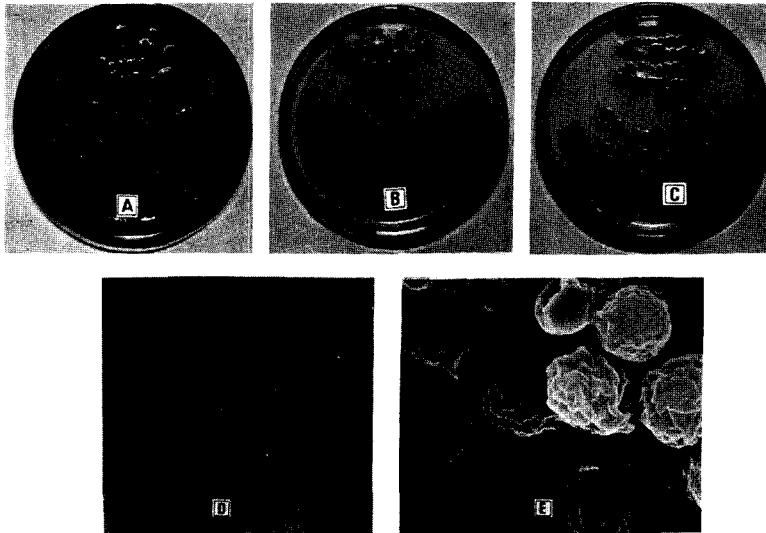


Fig. 1. Photographs of strain GF 155-2.

A—C: Difference of growth on inorganic salts-starch agar (A), tyrosine agar (B), and glucose-asparagine agar medium (C). D: Phase-contrast photomicrograph (bar equals 1.5 μ m). E: Scanning electron micrograph of spore surface (bar equals 0.5 μ m).

만으로는 정확한 속을 결정할 수는 없었으며, 특히 포자의 갯수가 4 개가 많았지만 여러가지 형태가 많아 *Microtetraspora* 속으로 단정하기는 어려웠다(12, 18, 21, 22).

생리 및 생화학적 특성: 전분과 gelatin 은 가수분해할 수 있었고, 질산염 환원 및 H₂S 생성은 인정되지 않았으며 NaCl tolerance 를 조사한 결과 6~7% 까지는 생육하였으나 8% 이상이 되면 생육하지 않았는데 최적 pH는 7.0 이었고 최적 온도는 33°C 였다. D-glucose, D-fructose, mannose, dextrin 을 잘 이용하였으며 inositol, salicin, inulin 은 이용하지 못

Table 4. Physiological characteristics of strain GF 155-2

Optimum pH	7.0
Growth temperature	15-38 °C
Gelatin liquefaction	Positive
Starch hydrolysis	Positive, very weak
Milk coagulation	Positive
Melanin formation	Positive, variable
Nitrate reduction	Negative
H ₂ S production	Negative
Catalase production	Positive
NaCl tolerance	8% below
Cellulase production	Negative
Protease production	Positive

Table 5. Utilization of carbon compounds by strain GF 155-2

Carbon compounds	Growth
Control (no carbon)	-
D-Glucose	++
D-Xylose	+
L-Arabinose	±
L-Rhamnose	±
D-Fructose	++
D-Galactose	+
Raffinose	±
D-Mannitol	±
Inositol	-
Salicin	-
Sucrose	±
Mannose	++
Dextrin	++
Melibiose	+
Starch	+
Maltose	+
Sorbose	+
Inulin	-
Trehalose	±
Sorbitol	±

++ ; Good, + ; Fair, ± ; Doubtful, - ; Not utilized
The growth was checked after 14 days culture at 30 °C.

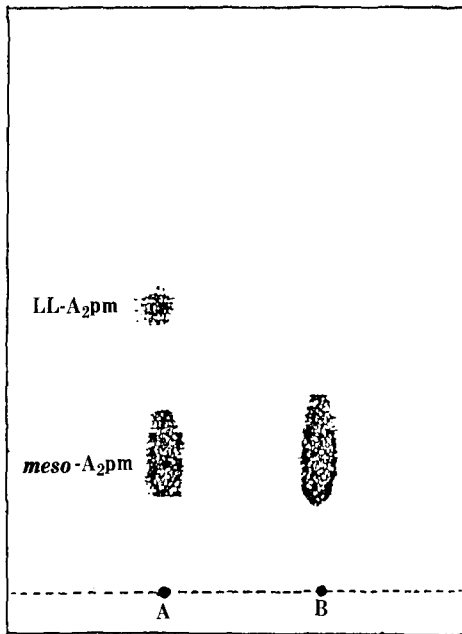


Fig. 2. Separation of DAP isomers by cellulose-TLC.
 A: Standard DAP mixture
 B: Hydrolyzate of strain GF 155-2

하였다.

배양학적 특성 : 균생육은 yeast ext.-malt ext. agar, glucose-peptone agar, Emerson agar, Dulaney 배지에서 양호하였고, reverse side pigment는 대체로 갈색 계통이었으며 특히 tyrosine agar slant, inorganic salts-starch agar, glucose-nitrate agar 배지에는 흑갈색을 나타내었다. aerial mass color는 대부분 갈색이었으나 inorganic salts-starch agar 배지에는 약간의 회색빛이었다(Fig. 1-A). Soluble pigment는 아주 약하게 용출되는 경우가 대부분이었으며 Czapek's agar, peptone beef ext. agar. 배지에는 전혀 용출되지 않았다. 특히 glucose-peptone 배지에서는 흙냄새를 강하게 형성하였고, tyrosine 함유 배지상에서 melanin계 색소를 많이 분비하는 chromogenic type 이었다(Fig. 1-B).

세포벽의 구성성분

세포벽의 DAP isomer를 확인하기 위하여 건조균체를 가수분해시켜 TLC를 행한 결과(Fig. 2)에서 황색의 meso-DAP를 확인하였으며 단당류의 spot는 나타나지 않았다. 따라서 본 공시균주의 세포벽은 Type III에 속하는 것을 알 수 있었다(14, 18, 21).

Table 6. Cultural characteristics of strain GF 155-2

Media	Growth	Reverse side pigment	Aerial mass color	Soluble pigment
Yeast ext.-malt ext. agar	Abundant, intruding	Brownish black	Yellowish brown	Brown
Inorganic salts-starch agar	Good	Dark brown	Whitish gray	Dark brown
Glycerol-asparagine agar	Moderate	Light brown	Brown	Light brown
Tyrosine agar	Poor	Dark brown	Yellowish brown	Brown
Glucose-asparagine agar	Moderate	Brown	Light brown	Brown
Glucose-nitrate agar	Moderate	Reddish brown	Light brown	rown
Glucose-peptone agar	Abundant	Yellowish black	Light brown	Yellow
Arginine-glycerin agar	Poor	Brown	Brown	Brown
Starch agar	Poor	Yellowish brown	Brown	Brown
Czapek's agar	Poor	None	White	None
Emerson agar	Abundant	Brownish black	Light brown	Dark brown
Peptone beef ext. agar	Moderate	Light brown	Whitish brown	None
Dulaney's medium	Abundant	Brownish black	Whitish brown	Brown
Tyrosine agar slant	Poor	Reddish brown	Brown	Brown

요 약

세포외로 pepsin 저해물질을 생산하는 미생물을 획득할 목적으로 screening test 를 실시하여, porcine pepsin 에 대하여 우수한 저해력을 나타내는 방선균 1 균주 (GF 155-2) 를 분리하였다. 각종 배지상에서 그 형태학적·배양학적·생리학적 성질을 조사하여본 결과 그 미생물학적 특성이 *Microtetraspora* 속과 유사하였다.

참고문헌

1. Fukushima, Y., K. Hayashi and H. Motai: *Agric. Biol. Chem.*, **49**(6), 1643 (1985).
2. Hartsuck, J.A. and J. Tang: *J. Biol. Chem.*, **247**(8), 2575 (1972).
3. 青柳高明: *化學と生物*, **18**(7), 480 (1979).
4. Brodbeck, U.: *Enzyme inhibitors*, Verlag Chemie (1980).
5. Kunimoto, S., T. Aoyagi and R. Nishizawa: *J. Antibiot.*, **27**(6), 413 (1974).
6. Marumo, S.: *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **61**(12), 1616 (1987).
7. Rich, D.H. and E.T.O. Sun: *Biochemical Pharmacology*, **29**, 2205 (1980).
8. 村尾澤夫: *化學と生物*, **13**(2), 110 (1974).
9. 村尾澤夫: *發酵と工業*, **43**(1), 43 (1985).
10. Umezawa, H.: *Methods in enzymology* Part B, **45**, 678 (1976).
11. Barrett, A.J. and G. Salvesen: *Proteinase inhibitors*, Elsevier (1986).
12. Shirling, E.B. and D. Gottlieb: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **16**(3), 313 (1966).
13. 天兒和暢, 小池聖淳: *微生物における電子顕微鏡技術(上)*, (1980).
14. 駒形和男: *微生物の化學分類實驗法*, 學會出版センター (1982).
15. Anson, M.L.: *J. Gen. Physiol.*, **22**, 79 (1938).
16. Kakinuma, A. and T. Kanamaru: *J. Takeda Res. Lab.*, **35**, 123 (1976).
17. Maki, Z.: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 953 (1980).
18. 長谷川武治: *微生物の分類と同定*, 學會出版センター (1981).
19. Murao, S.: *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **55**(6), 503 (1981).
20. Tresner, H.D. and E.J. Backus: *Appl. Microbiol.*, **11**, 335 (1963).
21. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1974).
22. Lechevalier, M.P. and H.A. Lechevalier: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **20**, 435 (1970).

(Received February 2, 1989)