

Actinomycetes GF 155-2 에 의한 pepsin 저해물질의 생산 및 정제

박석규* · 성낙계 · 이상원

경상대학교 식품공학과

Production and Purification of Pepsin Inhibitor from *Actinomycetes* GF 155-2

Park, Seok-Kyu*, Nack-Kie Sung, and Sang-Won Lee

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

***Actinomycetes* GF 155-2, which produced an extracellular pepsin inhibitor, was isolated from soil samples. Optimal conditions of inhibitor production by flask-shacking culture were 2% glucose, 0.7% polypeptone, initial pH 7.0, culture time 60 hours and temperature 30°C. Effect of inorganic salts was not observed.**

About 5 mg of colorless crystalline inhibitor was obtained from 5L culture broth in jar fermentor by means of ammonium sulfate precipitation, methanol extraction, and column chromatographies on Amberlite IR-120, XAD-2 and silicagel 60.

천연에 존재하는 pepsin 저해물질은 생체내 세포에 흡수되었을 때 세포내의 산성 protease 활성을 저해하여 생리 이상현상을 유발시키는 생리 활성물질로서, 약리적으로는 위궤양·관절염·대퇴손상 등의 치료제로서 이용 가능하며, 발효 공업적으로는 버섯의 자실체 형성일수 단축 및 증산효과와 일부 미생물에서의 효소변성 및 자가분해방지나 대사변동에 의한 효소 수득량의 증가, 그리고 *Rhodotorular glutinis* 의 생육온도변화 및 carotenoid 색소 생성억제 등의 효과가 있다는 것이 알려져 있다(1-7).

이런 점을 고려하여 저자들은 식용버섯의 증산 및 자실체 형성일수 단축 등 담자균류에 있어서 pepsin 저해물질에 의한 생리적 효과를 획득할 목적으로 우선 전보(8)에서 토양으로부터 pepsin 저해물질을 균체의외로 분리하는 방선균 1주를 분리하고 그 미생물학적 특성을 밝혀 *Actinomycetes* GF 155-2로 보고한 바 있다. 본 보에서는 그 분리균주의 저해물질 생산을 위한 배양조건 및 정제한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 균주는 토양으로부터 분리·검색하여 bennet medium 에 보존중인 *Actinomycetes* GF 155-2 를 사용하였다.

배양방법

100 ml 진탕플라스크에 기본액체배지 (glucose 10.0g ; polypeptone 2.0g ; NaCl 5g ; pH 7.0 per liter) 40 ml 를 분주하여 살균하고 포자현탁액 0.2 ml 를 접종한 후 30°C, 3 일간 진탕배양 (rpm 60, stroke 5.4 cm) 하여 여과 (Toyo No.2) 한 다음 그 배양액 중의 pepsin 에 대한 저해활성을 측정하였다.

저해활성의 측정

저해물질 생산조건에서의 저해활성은 전보(8)에서 (A)-(C) 한 OD 값 (저해물질 첨가시의 순수한 효소

Key words: Pepsin inhibitor, *Actinomycetes* GF 155-2, production and purification

*Corresponding author

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

반응)으로 나타내었으며, 정제과정에서의 저해활성은 percent inhibition으로 나타내었다. 즉 (B)-(D)한 OD 값(순수한 효소반응)에서 (A)-(C)한 OD 값을 뺀 것에 대한 (B)-(D)한 OD 값의 백분율로 표시하였다.

균생육도

배양물의 균체를 여과하여 증류수로 3번 세척하여 100~105°C로 상압건조하고 항량을 구하여 균생육도로 나타내었다.

저해물질의 분리

저해물질의 최적 생산조건을 토대로 500 ml 진탕플라스크의 저해물질 생산배지 100 ml에 균주를 접종하여 30°C, 3일간 전배양시킨 후, 10l jar fermentor 내의 배지 5l에 2%(v/v)수준으로 첨가한 다음 30°C, 60시간 동안 대량배양(300 rpm, 통기량 10l/min)하여 원심분리(6,000 rpm, 10 min)시킨다. 그 상징액에 (NH₄)₂SO₄를 90% 포화로 천천히 용해시키고 냉장고에서 하루밤 방치한 후 공침하는 침전물을 완전히 침전시키고 원심분리(10,000 rpm, 10 min)하여 침전물을 한군데 모으고, methanol 500 ml로 추출하여 여과한 다음 진공건조기(GCA19, 2.5 psig 이하, 40°C)에서 건조시킨다. 얼은 황갈색 물질을 탈이온수 100 ml에 용해하여 25g의 활성탄을 가하여 10분 동안 교반하면서 완전히 흡착시킨 후 여과한다. 2~3번 탈이온수로 세척하고 methanol로 추출하여 진공건조시킨다. 이것을 methanol 20 ml로 용해하여 Amberlite IR-120, XAD-2, silica gel 60 column chromatography 하여 분리하였다.

결과 및 고찰

저해물질의 생산조건

탄소원의 영향 : 기본배지에 탄소원 20종을 각각 2%(w/v) 농도로 첨가하여 균주를 배양한 결과 (Table 1), D-fructose와 D-glucose 첨가가 저해물질 생성에 큰 영향을 끼쳤으나 fructose의 가격이 비싸 이후의 실험에선 glucose를 사용하였으며 그 농도별 최적조건으로 균생육은 3% 농도였으며 저해물질 생산에는 2%가 좋았다(Fig.1).

질소원의 영향 : 앞에서 구한 탄소원중 기본배지에 2%의 농도가 되도록 glucose를 첨가한 후 질소원 13종류를 0.5% 농도로 첨가하고 균주를 배양한 결과 저해물질 생성 및 최적 pH는 Table 2와 같다. 저해물질 생성은 무기태질소보다는 유기태질소가 훨씬

Table 1. Effect of carbon sources on the inhibitor production by strain GF 155-2.

Carbon sources (%)	Final pH	Inhibition* activity (OD)
Arabinose	5.2	0.907
Cellobiose	4.9	0.773
Dextrin	4.8	0.678
Fructose	4.4	0.514
Galactose	5.6	0.818
Inositol	6.9	1.066
Inulin	7.0	0.948
Maltose	6.9	0.734
Mannitol	6.7	0.695
Mannose	4.3	0.595
Glucose	4.1	0.548
Raffinose	6.9	0.695
Rhamnose	6.8	0.798
Melibiose	6.7	0.775
Sorbitol	7.0	0.910
Salicin	6.9	1.051
Sorbose	5.6	0.875
Sucrose	7.0	0.705
Trehalose	6.9	0.708

*The high OD value has weaker inhibitory activity than the low OD value.

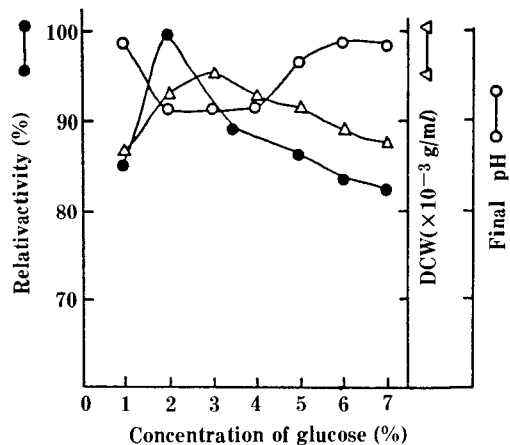


Fig. 1. Effect of concentration of glucose on pepsin inhibitor production by strain GF 155-2.

선 양호하였는데 그 중 polypeptone이 가장 우수하였으며 0.7% 농도일 때가 저해활성이 가장 높았다 (Fig.2). 이는 다른 연구자들(10-13)의 보고와 일치

Table 2. Effect of nitrogen sources on the pepsin inhibitor production by strain GF 155-2.

Nitrogen sources (0.5%)	Final pH	Inhibitory activity (OD)
NH ₄ Cl	5.3	0.764
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.8	0.836
NaNO ₃	5.8	0.937
(NH ₂) ₂ CO	6.8	0.758
NH ₄ NO ₃	3.1	0.697
(NH ₄) ₂ HPO ₄	6.5	0.774
(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄	5.2	0.817
Malt ext.	6.1	0.659
Asparagine	5.3	0.643
Casein	5.0	0.637
Polypeptone	4.3	0.436
Yeast ext.	5.1	0.502
Beef ext.	6.1	0.561

Table 3. Effect of inorganic salts on the pepsin inhibitor production by strain GF 155-2.

Inorganic salts (0.005%)	Final pH	Inhibitory activity (OD)
HgCl ₂	4.9	0.559
ZnCl ₂	6.1	0.498
NaCl	5.9	0.506
CuSO ₄ ·5H ₂ O	4.4	0.538
K ₂ HPO ₄	5.1	0.471
CoCl ₂	6.1	0.519
MgCl ₂	4.1	0.482
AgNO ₃	6.0	0.497
MgSO ₄	4.5	0.420
ZnSO ₄	6.2	0.418
MnCl ₂	4.7	0.689
CaCl ₂	4.7	0.493
FeSO ₄	5.0	0.413

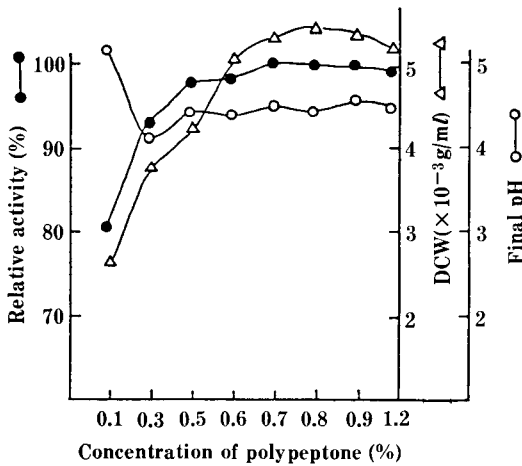


Fig. 2. Effect of concentration of polypeptone on pepsin inhibitor production by strain GF 155-2.

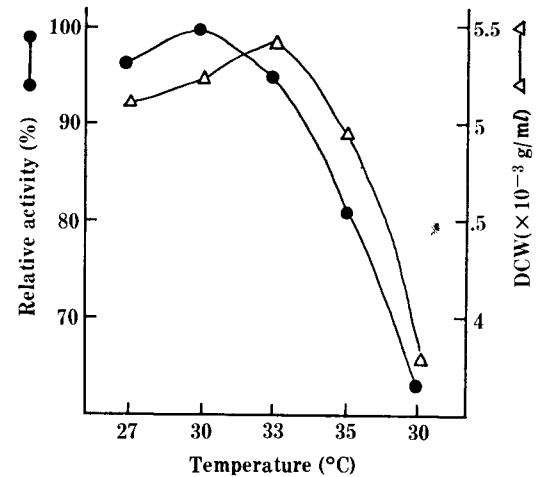


Fig. 3. Effect of temperature on the production of the pepsin inhibitor by strain GF 155-2.

하는 경향으로 무기태질소보다는 유기태질소가 저해물질의 생합성과정에서 효과적으로 이용되기 때문일 것이다. 이상의 결과에서 C/N 비율은 타균주에 비하여 상당히 높은 것을 알 수 있었다.

무기염의 영향 : glucose 와 polypeptone 을 각각 2%, 0.7%의 농도로 첨가한 후 각종 무기염 13 가지를 0.005% 농도로 첨가하여 30°C, 3일간 배양시킨 결과, 저해활성과 최종 pH는 Table 3 과 같다. 전반적으로 무기염의 첨가는 저해물질 생산에 뚜렷한 효과가 없거나 오히려 억제시키는 결과로 나타났으며, 그 중 K₂HPO₄, ZnSO₄, FeSO₄ 등이 약간의 효

과가 있을 정도였다. 그런데 여러가지 효소 저해물질 생산에서 무기염은 중요한 역할을 한다는 보고 (13)도 있지만, 여러 보고자들(9, 14)의 경우 대체로 저해물질 생산 및 균증식을 억제시키는 경향이였다.

온도의 영향 : 배양온도는 저해물질 생산에 질소원과 마찬가지로 중요한 요인 중의 하나이다. 저해물질 생성에는 30°C가 양호한 반면에 균체생육에 있어서의 최적온도는 33°C였으며 (Fig.3), 45~50°C 이상이 되면 극히 감소하여 마침내 생육이 정지되어 저해물질이 생산되지 못하였다. 다른 연구보고에 의하면

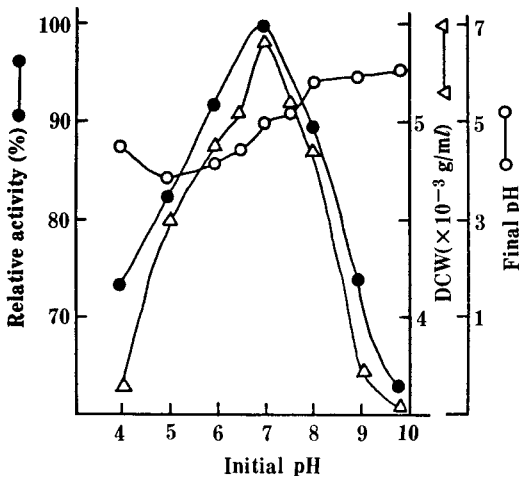


Fig. 4. Effect of the initial pH on the pepsin inhibitor production by strain GF 155-2.

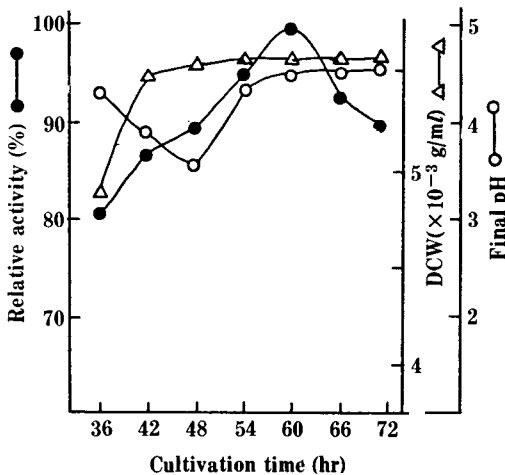


Fig. 5. Time course of the pepsin inhibitor production by strain GF 155-2.

(9, 13) 그 범위는 25~35°C였으나, Murao 등의 경우는 균체생육은 30°C가 최적이고 저해활성은 45°C에서 가장 양호하였다(12).

초기 pH의 영향 : 배양기의 초기 pH를 4~10 구간으로 조절하여 30°C에서 3일간 최적배지조건으로 배양한 결과는 Fig.4와 같은데, pH7에서 저해활성 및 균체생육량이 가장 높았다. 방선균에 의한 저해물질 생성의 초기 pH는 대부분 pH7이 양호하였으며(9-12), 아직까지 극한 산·알칼리성축에서의 저해물질 생성에 대하여는 언급된 바가 없다.

배양시간의 영향 : 최적배지의 조건에서 배양한 결과, 48시간이면 균체생육은 정상기에 도달했으나 저

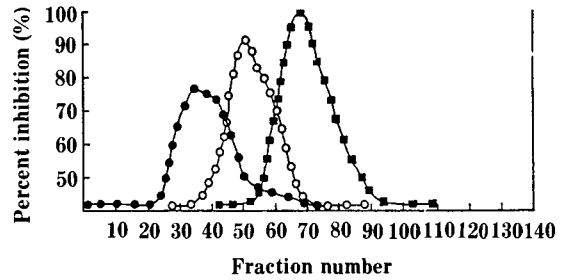


Fig. 6. Column chromatography of inhibitor on Amberlite IR-120(A), XAD-2(B), and silicagel 60(C).

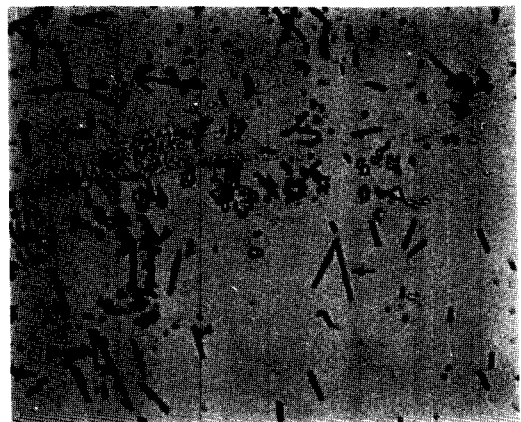


Fig. 7. Microscopic photograph of inhibitor crystals (x100).

해물질 생성은 60시간이 최적이었다(Fig.5). 최종 pH를 통해서 보면 본 균주는 산을 분비하는 것으로 생각되며, 전반적으로 생육이 양호할 때에 현저하게 나타났다. 다른 보고자들에 의하면 24시간에서 균생육 및 저해활성이 가장 높게 나타나는 경우도 있으나(11), 대체로 50~80시간 전후가 저해물질 생성에 적합한 시간범위로 보고되어 있다(9, 12, 13).

저해물질의 분리

활성탄에 흡착된 저해물질을 methanol(pH 7.0)로 추출하여 진공건조시킨 황갈색의 물질을 Amberlite IR-120 column chromatography (column size 3.5x60 cm ; flow rate 7 ml/10 min ; 10 ml/tube)에서 95% methanol로 유출하여 저해활성을 측정후 활성이 있는 fraction tube No.25~51 까지를 진공건조시켜 (Fig.6, A), 다시 XAD-2 column chromatography (column size 2.5x45 cm ; flow rate 5 ml/10 min ; 5 ml/tube)에서 60% methanol로 유출시켜 본 결과 80% 이상 저해되는 곳은 45~57 번이었다(Fig.6,

B). 이들을 20 ml 까지 진공 농축하여 최종적으로 silicagel 60 column chromatography (column size, 2.5×45 cm ; flow rate, 5 ml/10 min ; 3 ml/tube)에서 chloroform-methanol-acetic acid (96 : 6 : 2) 용액으로 유출시켜 각 fraction tube 의 유출액에 대한 저해활성을 percent inhibition 으로 환산하여 나타낸 결과는 Fig.6, C 와 같다. No.61~80 사이를 합쳐서 진공건조한 결과 약 10~15 mg 의 무색침상의 결정성 분말을 얻었으며, 그 결정을 광학현미경으로 관찰한 것은 Fig.7 과 같다. 이는 다른 연구자들(18-21)의 경우와 비슷하거나 약간 낮은 수득량인데, 분리·정제과정의 재검토와 공시균주의 대사제어발효에 의한 생합성 과정의 조절을 잘 고려한다면 좀 더 나은 수득량을 얻을 수 있을 것으로 믿어진다.

한편 본 저해물질의 효소학적 및 이화학적 성질에 대하여는 다음 보에서 발표하고자 한다.

요 약

토양으로부터 분리되고 세포외로 pepsin 저해물질을 생산하는 *Actinomyces* GF 155-2 의 플라스크 배양에 의한 pepsin 저해물질 최적배양조건은 2% glucose, 0.7% polypeptone, 초기 pH 7.0, 배양 60 시간, 배양온도 30°C 였으며 무기염의 효과는 크게 영향이 없었다. 발효조 배양물 5l 를 유안염석하여 methanol로 추출한 후 활성탄에 흡착하고 Amberlite IR-120, XAD-2 및 silicagel 60 column chromatography 한 결과 약 15 mg 의 무색 침상물질을 수득하였다.

참고문헌

1. Terashita, T., K. Oda, M. Kono and S. Murao: *Agric. Biol. Chem.*, **45**(9), 1937; *Hakkokogaku*, **59**(1), 55 (1981).
2. Satoi, S., K. Nakahara and S. Murao: *Agric. Biol.*

- Chem.*, **39**(4), 773 (1975).
3. 村尾澤夫: *醱酵と工業*, **43**(1), 43 (1985).
4. Lee, T.H.: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**(2), 111 (1983).
5. 川合源四郎: *化學と生物*, **23**(5), 281 (1975).
6. Arai, M., E. Tsuchiya and S. Murao: *Agric. Biol. Chem.*, **42**(7), 1429 (1978).
7. Tsuchiya, E., M. Arai and S. Murao: *Agric. Biol. Chem.*, **43**(3), 415 (1979).
8. Park, S.K., N.K. Sung and J.S. Rho: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*,
9. Yi, D.H. and J.H. Seu: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**(4), 297 (1983).
10. Murao, S. and S. Satoi: *Agric. Biol. Chem.*, **35**(10), 1477 (1971).
11. Murao, S., N. Kasai, Y. Kimura and K. Oda: *Agric. Biol. Chem.*, **46**(11), 2697 (1982).
12. Murao, S., S. Sato and N. Muto: *Agric. Biol. Chem.*, **36**(10), 1737 (1972).
13. Murao, S., T. Watanabe: *Agric. Biol. Chem.*, **42**(12), 2209 (1978).
14. Murao, S., N. Oouchi, A. Goto and M. Arai: *Agric. Biol. Chem.*, **49**(1), 107 (1985).
15. Murao, S.: *Nippon Nogekigaku Kaishi*, **55**(6), 503 (1981).
16. 青柳高明: *醱酵と工業*, **37**(7), 615 (1979).
17. Umezawa, H.: *Methods in enzymology* part B, **45**, 678 (1976).
18. Satoi, S. and S. Murao: *Agr. Biol. Chem.*, **35**(10), 1482 (1971).
19. Aoyagi, T., Y. Yagisawa, M. Kumagai, M. Hamada, H. Morishima, T. Takeuch and H. Umezawa: *J. Antibiot.*, **26**(9), 539 (1973).
20. Murao, S., T. Nishino, N. Katayama and H. Nagano: *Agric. Biol. Chem.*, **45**(4), 1039 (1981).
21. Oka, S., M. Kodama, H. Takeda, N. Tomizuka and H. Suzuki: *Agric. Biol. Chem.*, **50**(11), 2723 (1986).

(Received February 2, 1989)