

Actinomycetes sp. GF155-2 가 생산하는 Pepsin 저해물질의 성질

박석규* · 성낙계¹ · 노종수¹ · 김양우¹ · 조영숙

순천대학 식품영양학과, ¹경상대학교 식품공학과

Properties of Pepsin Inhibitor Produced by *Actinomycetes* sp. GF 155-2

**Park, Seok-Kyu*, Nack-Kie Sung¹, Jong-Soo Rho¹,
Yang-Woo Kim¹ and Young-Sook Cho**

Department of Food and Nutrition, Suncheon National University Suncheon, 540-070, Korea
¹Department of Food Science and Technology, Gyeong Sang National University Chinju, 660-701, Korea

When pepsin was used at a concentration of 8 mg/ml for hydrolysis of 0.02% casein, inhibitory activity of this inhibitor was proportional to a inhibitor concentration of 20 μ g/ml, and fifty percent inhibition (IC₅₀) was observed to be 15 μ g/ml. The inhibitor was pH-stable at pH range of 5-9 at 100°C for 10 minutes and thermo-stable at pH 7.0 at 100°C to give 100% activity for 20 minutes. The formation of pepsin-inhibitor complex was confirmed by sephadex G-25 gel filtration and type of inhibition was determined as non-competitive inhibition by Lineweaver-Burk plot. The inhibitor strongly inhibited acid proteases such as pepsin and renin, and it was soluble in methanol very well. On TLC analysis of silicagel 60 using various solvent systems, the inhibitor gave a single spot at Rf range 0.4-0.6. From the result of IR spectrum and color reaction (Rydon-Smith, Biuret), this inhibitor was considered as peptide substance. Melting point and elemental contents were 220-230°C, and C 50.61%-H 8.02%-N 9.34% (found), respectively.

Murao, Umezawa 등은 미생물이 생산하는 저분자량의 pepsin 저해물질의 약리적, 생화학적, 발효공업적 이용에 대하여 오래 전부터 많은 연구를 해오고 있다 (1-8).

그 저해물질로는 S-PI, pepstatin, pepstanone, *Penicillium cyclopium* 이 생산하는 저해물질 등이 보고 되어 있으며, 이미 상품화된 것도 있다(9-13). 현재까지 밝혀진 그들의 기본구조는 1몰의 L-alanine, 2몰의 4-amino-3-hydroxy-6-methyl heptanoic acid 로 이루어져 있는 pentapeptide 의 N-iso-valeryl 유도체로서 여러 가지가 있는데 각각의 물리·화학적 성질은 약간씩 차이가 있는 것으로 보고되어져 있다(11-14). 앞으로 이들 저해물질의 응용범위를 더욱더 넓혀 나가기 위해서는 또

다른 유도체나 새로운 물질을 지속적으로 탐색하여야 한다고 본다. 이에 저자들은 전보(15, 16)에서 pepsin 저해물질을 생산하는 *Actinomycetes* sp. GF155-2 의 분리 와 저해물질의 생산조건 및 정제에 대하여 보고한 바 있으며, 본 보에서는 저해물질의 효소반응적 특성 및 이화학적 성질 몇 가지를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

효소 및 주요 시약

본 실험에 사용된 효소로는 pepsin (1 : 10000, Junsei Chemical Co. Ltd.), renin (calf stomach, 20 units/mg protein, Sigma), trypsin (porcine pancreas, 100 units/mg solid, Sigma), chymotrypsin (3 \times , crystallized, bovine pancreas, 45~50 units/mg solid, Sigma), papain (2 \times , papaya latex, 16~40 units/mg protein, Sigma),

Key words: Pepsin inhibitor, properties

*Corresponding author

ficin(2×, fig tree latex, 1.5~2.5 units/mg protein, Sigma)을 사용했으며, 기질로는 casein(Hammarsten, Merk)을 사용하였다. 크로마토그래피용으로는 sephadex G-25(bead size 20~150 μ , Sigma)와 silica gel 60 TLC plate(Sigma)를 사용하였다.

저해활성의 측정

저해활성의 일반적 측정은 전보(15)에 따라 실시하였으며, 여러 가지 효소에 대한 본 저해물질의 활성측정은 각 효소용액 0.5 ml와 저해물질용액(50 μ g/ml) 0.5 ml를 37°C에서 10분간 반응시켜 잔존하는 효소활성을 측정하였다. pepsin, renin 용액은 0.2 M KCl-HCl buffer (pH 2.0)로 각각 50 μ g/ml 되게 조제하였으며, papain, ficin, trypsin, chymotrypsin 용액은 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0)로 각각 100 μ g/ml 되게 만들어 사용하였다.

저해물질의 이화학적 분석

용점은 differential thermal analyzer (Shimadzu DT-30)를 사용하여 10분당 2°C씩 상승시켜 측정하였으며, 단일물질 확인은 silicagel 60 TLC plate (0.25 mm) 상에 저해물질 10 μ l를 spotting 한 다음 각종 전개용매로 전개시켜 건조하고 Rydon-Smith 반응을 시킨 후 나타난 spot의 단일밴드를 확인하고 R_f치를 구하였다.

저해물질의 원소분석은 micro carbon-hydrogen-nitrogen determinator (CHN-800, LECO Co. U.S.A.)를 사용하였으며, UV 및 IR spectrum은 Shimadzu UV-240과 Hitachi 270-30 IR spectrometer를 사용하여 조사하였다.

결과 및 고찰

저해물질의 농도와 저해활성

Fritz 등(17)의 방법에 따라 저해물질의 농도를 5~40 μ g/ml로 하고 효소(8 mg/ml) 반응을 10분간 시켜 본 결과, 그 잔존 효소활성은 Fig. 1과 같은데 20 μ g/ml까지는 반비례관계가 성립하였다.

한편 50% 저해물질의 농도 즉, IC₅₀은 15 μ g/ml였으며 이상적인 저해율로 환산하여 보면 100% 저해가 이루어지는 농도는 27 μ g/ml가 된다. Aoyagi 등(18)은 pepstatin의 경우 그 methylester, amide 및 유도체의 종류에 따라 IC₅₀에 상당한 차이가 있음을 보고하였다. 또한 Kunimoto 등(19)은 저해물질의 저해활성이 pepsin의 농도에 따라 IC₅₀이 매우 의존적이라고 보고한

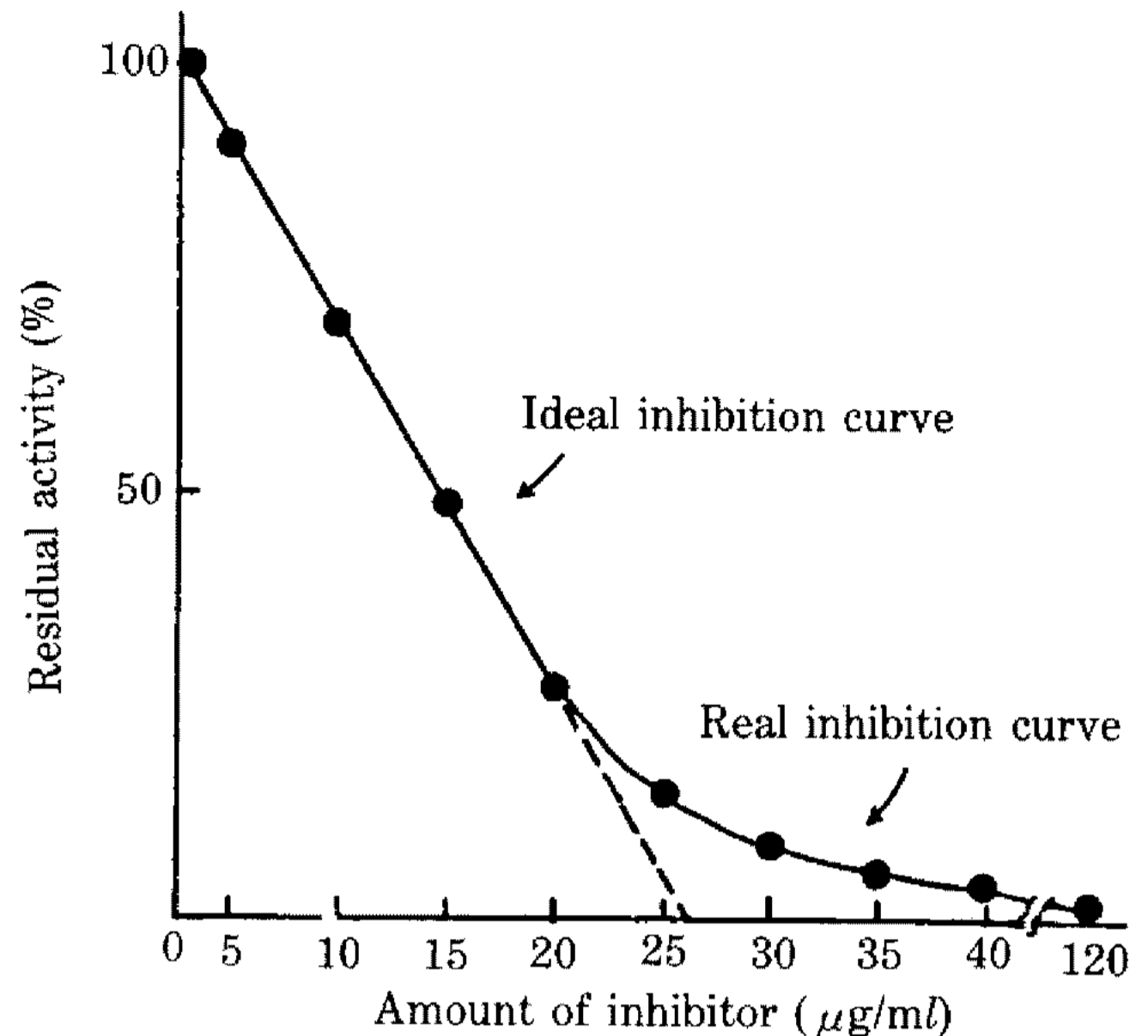


Fig. 1. Effect of concentration of the inhibitor on the inhibitory activity of the inhibitor to the pepsin.

바 있다.

pH 및 열안정성

저해물질의 pH 안정성 조사를 위하여 pH를 1~11까지 각각 조절하여 100°C에서 10분간 열처리한 후 효소에 대한 저해활성을 조사한 결과(Fig. 2b), pH 5에서 9까지는 안정하였고 5 이하의 산성측이나 9 이상의 알칼리성측은 상당히 불안정하였는데, 그 중 산성측이 더 불안정하였다. Andreeva 등(20)은 중성이나 알칼리성측보다 산성측이 더 안정하였다고 보고하였다. 한편 저해물질을 100°C, pH 7.0에서 20~120분 가열처리한 후 pH 2.0으로 조절하여 저해활성을 조사한 결과(Fig. 2a), 저해물질의 열안정성은 20분까지는 유지되었으나 40분 이후는 크게 감소하였다. Murao 등(21)의 S-PI 경우는 pH 7~10에서 10~60분간 열처리시 잔존활성이 100% 유지되었고, 0.1 M HCl로 100°C에서 60분간 처리할시도 원래의 75~80%가 유지되어 상당히 안정성이 높다고 한 바 있다.

저해양식

Pepsin 용액 1 ml (8 mg/ml)와 저해물질용액 1 ml (40 μ g/ml)에 완충액 1 ml를 가하여 37°C 10분간 전처리하고 여러 가지 농도의 casein 용액 0.5 ml를 첨가한 후 동일한 온도에서 30분간 반응시켰을 때 저해물질의 저해양식은 Lineweaver-Burk plot 상에서 비경쟁적 저해였다. Aoyagi, Murao, Rich 등(18, 21, 22)은 pepstatin, S-PI, deoxyepstatin의 경우, 그들 구조에서 2

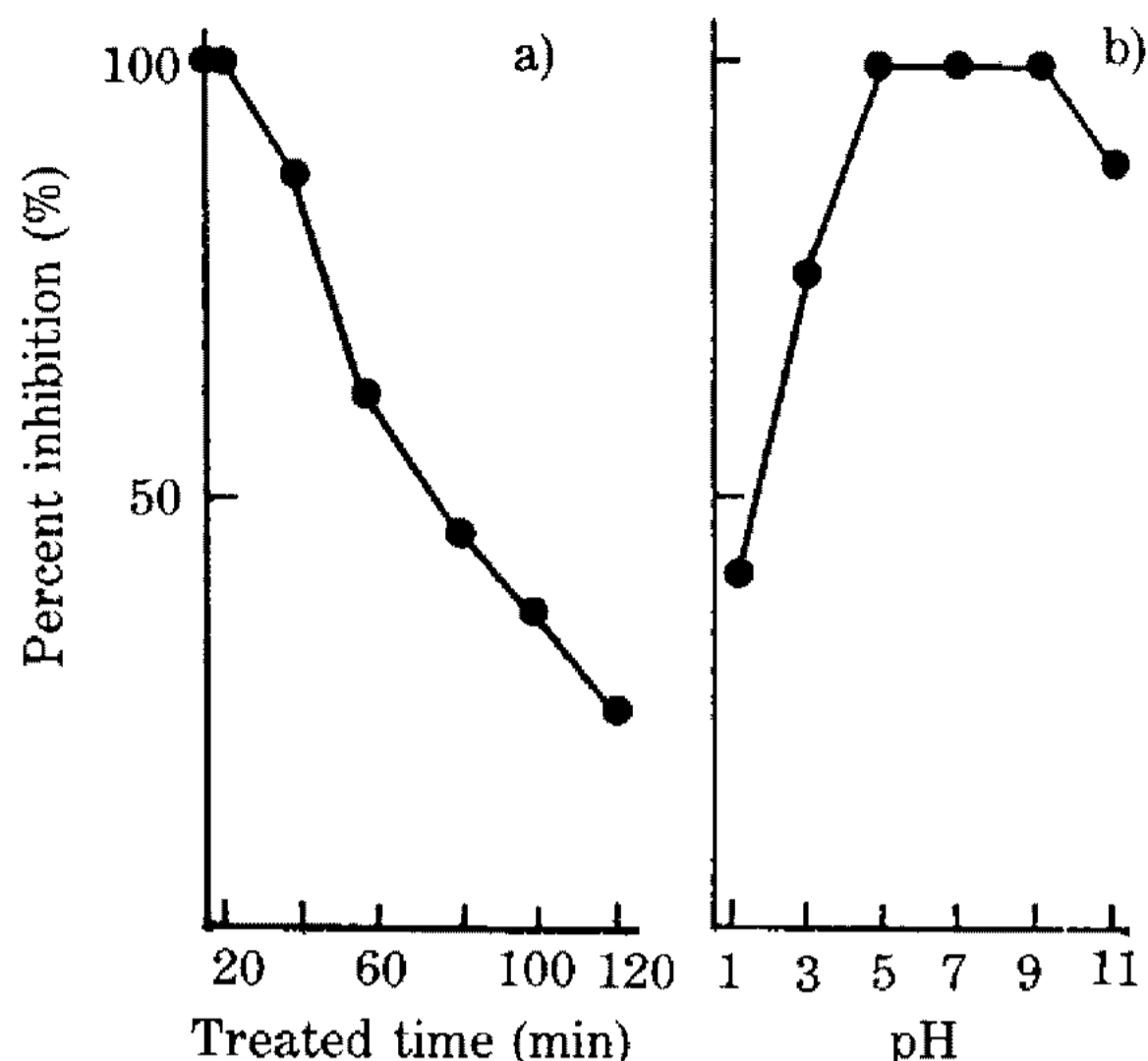


Fig. 2. Thermal and pH stability of the pepsin inhibitor.

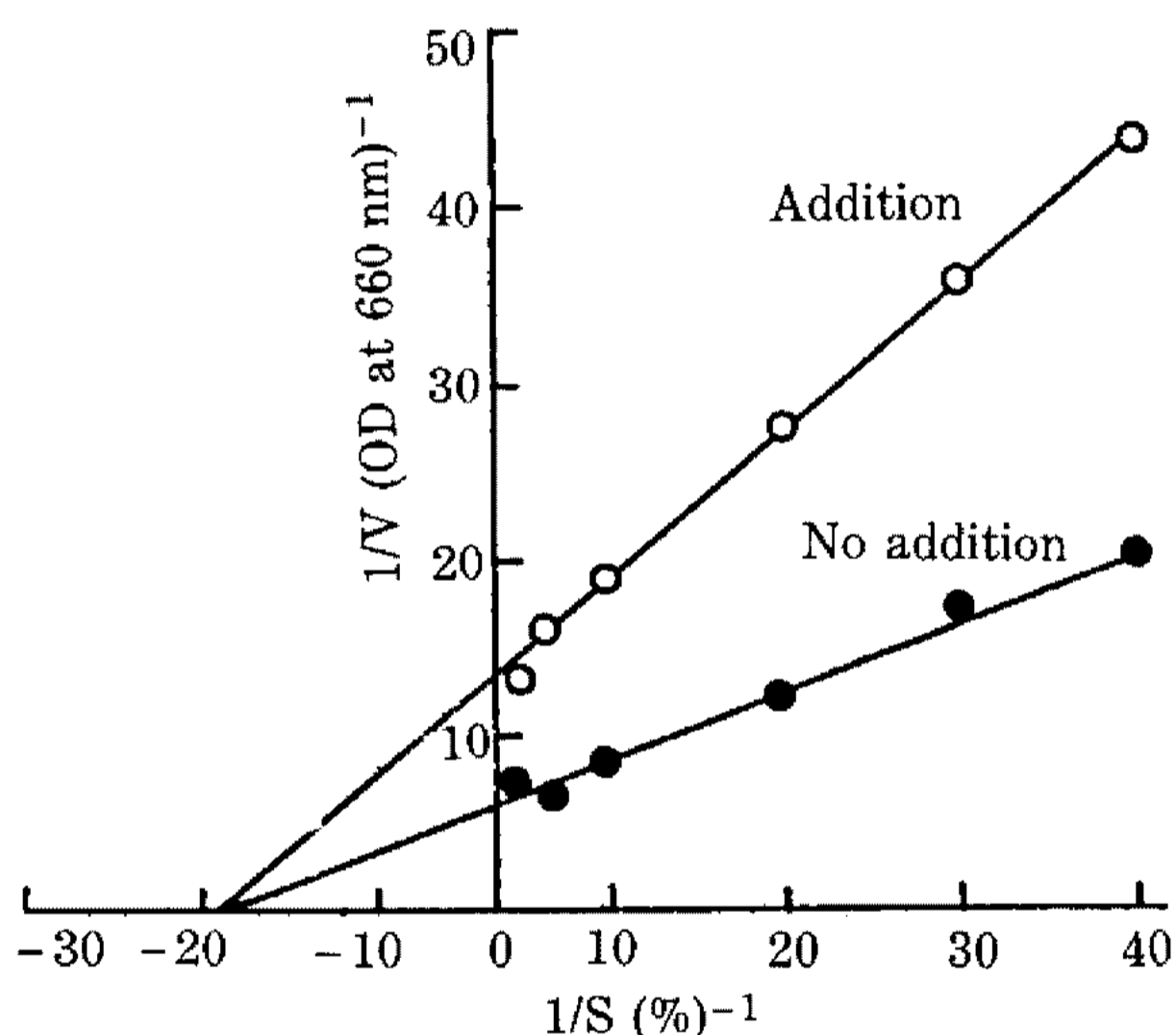


Fig. 3. Mode of inhibition against pepsin from Lineweaver-Burk plot in the presence and absence of the inhibitor.

개의 hydroxyl group 중 하나가 pepsin의 active center에 있는 2개의 aspartic acid의 carboxyl group과 hydrogen binding이나 hydrophobic binding을 하므로서 경쟁적 저해양식을 나타낸다고 하였다. 그러나 Gregermann 등(23)은 pepstatin이 효소의 catalytic site가 아닌 장소에서 결합하는 것으로 renin 및 pepsin에 대해서 비경쟁적 저해를 나타낸다고 하였다. 또한 Morishima 등(9)은 기질의 종류에 따라서 저해양식이 달라진다고 보고하였으며, 더욱이 저해물질의 농도에 따라 효소에 대한 multiple binding이 존재한다는 사실도 보고한 바 있다.

효소-저해물질 복합체 형성

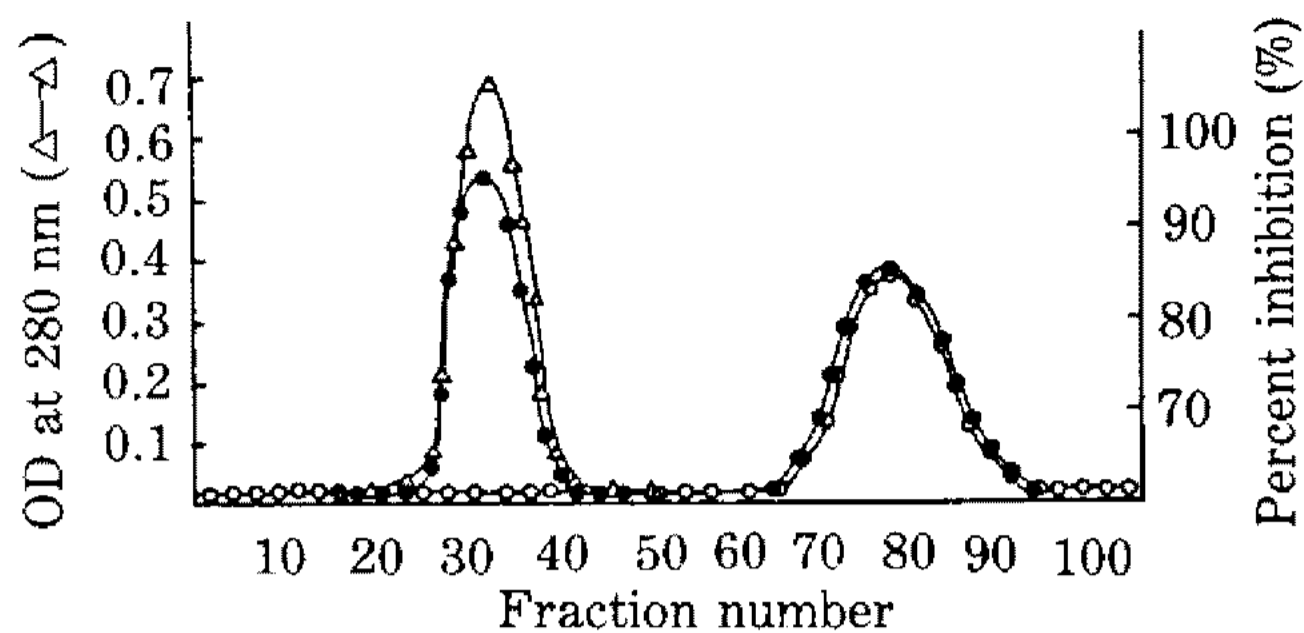


Fig. 4. Sephadex G-25 column chromatography of pepsin-inhibitor mixture.

(column size = 2.5 × 45 cm, flow rate = 7 ml/10 min, 3 ml/tube)

●-●, inhibitory activity of inhibitor after heat treatment
○-○, inhibitory activity of inhibitor before heat treatment

Saitoi 등(24)의 방법에 따라 유리상태의 저해물질이 충분한 양으로 잔존하도록 효소-저해물질(EI) 복합체를 형성시킨 후 sephadex G-25 gel filtration을 시킨 결과(Fig. 4), 280 nm의 pepsin 관련 분획과 유리상태의 저해물질 관련 분획으로 구별될 수 있었다. 다음으로 각 분획을 95°C에서 5분간 열처리하여 저해활성을 조사하여 본 결과, 열처리 전 저해활성이 없는 분획에서 저해활성이 나타나는 것으로 보아 이 구간이 복합체가 용출된 것으로 생각되며 이것은 pepsin의 열변성으로 인한 EI 복합체가 해리되어 저해물질이 유리상태로 되었기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 본 저해물질은 확실히 복합체를 형성하며 해리된 후에도 저해활성이 유지됨을 알 수 있었다.

각종 효소에 대한 저해활성

분리된 저해물질의 여러 가지 protease에 대한 저해활성을 조사한 결과(Table 1), trypsin, chymotrypsin의 serine protease나 papain, ficin의 thiol protease에 대해서는 저해활성이 없었으며 pepsin, renin의 산성 protease에 대해선 우수한 저해활성을 나타내었다. 특히 renin에 대한 저해활성으로 renin 정제를 위한 친화성 크로마토그래피의 ligand에 활성기로도 이용가능하리라 본다.

이화학적 성질

저해물질은 220~230°C 부근에서 흡열반응을 일으키며 용해되어 최종적으로 옅은 황적색으로 되었는데, 다른 저해물질의 용점보다 약간 낮았다. Murao 등(25)은 저해물질의 금속염이나 유도체에 따라 용점은 달라진다고 하였다. 또한 온도상승에 의한 중량감소의 휘발현상은

Table 1. Effect of inhibitor on various protease

Enzymes	Substrate	Buffer	pH	Inhibition
Acid protease				
Pepsin	Casein	0.2 M KCl-HCl	2.0	+
Rennin	Casein	0.2 M KCl-HCl	3.0	+
Thiol protease				
Papain	Casein	1/15 M phosphate	7.0	-
Ficin	Casein	1/15 M phosphate	7.0	-
Serine protease				
Trypsin	Casein	1/15 M phosphate	7.0	-
Chymo- trypsin	Casein	1/15 M phosphate	7.0	-

A half ml of the enzyme solution was incubated with 0.5 ml of the inhibitor solution at 37°C for 10 min and the residual enzyme activity was assayed.

Table 2. R_f value of TLC chromatogram of inhibitor in various solvent systems.

Solvent	R _f
Butanol-Acetic acid-Water (4:1:1)	0.48
Butanol-Pyridine-Water (6:4:3)	0.51
Butanol-Methanol-Water (5:1:5)	0.59
Butanol-Butyl acetate-Acetic acid-Water (4:4:1:1)	0.49
Butanol-Pyridine-Acetic acid-Water (15:10:3:12)	0.42
Butanol-Water (4:1)	0.46

나타나지 않았다. methanol에 가장 잘 용해되었고 그 외 acetic acid, dimethyl sulfide 등에도 용해되었으며, benzene, ether, chloroform 등에는 어려웠다. 단일물질의 확인은 소량의 저해물질을 methanol에 녹인 다음, 그 10 μ l를 silicagel 60 TLC plate 상에서 spotting 하여 각종 전개용매계에서 상온 상압의 상승법으로 전개시켜 용매를 완전히 날려 보내고 저해물질의 이동을 Rydon-Smith 반응으로 확인한 결과 (Table 2), R_f치는 0.4~0.6 사이의 값을 나타내었으며 또한 단일 spot를 형성하였다. 정색반응은 Rydon-Smith 반응과 Biuret 반응이 나타났으며, 그외의 탄수화물 정색반응에는 전혀 나타나지 않았다. 또한 저해물질의 원소함량은 탄소 50.61%, 수소 8.02%, 질소 9.34%로 얻어졌으며, 190~340nm의 UV range에서 뚜렷한 흡광 peak이 나타나지 않았다. 저해물질의 IR spectrum은 3440 cm⁻¹,

3280 cm⁻¹, 3060 cm⁻¹, 2950 cm⁻¹, 2925 cm⁻¹, 2870 cm⁻¹, 1710 cm⁻¹, 1630 cm⁻¹, 1550 cm⁻¹에서 진동흡수 peak이 나타났는데, 그 중 1630 cm⁻¹, 1550 cm⁻¹에서의 진동흡수로부터 저해물질이 정색반응의 결과와 마찬가지로 peptide 성 물질인 것으로 판단된다. 본 저해물질의 화학구조식과 발효학적 응용면에 대해서는 차후에 보고하고자 한다.

요 약

Pepsin (8 mg/ml)에 의한 0.02% casein의 효소적 가수분해반응에서 저해물질의 저해활성은 저해물질농도 20 μ g/ml까지는 비례관계였으며, IC₅₀은 15 μ g/ml였다. 저해물질의 pH안정성은 pH5~9 범위내에서 100°C, 10분 가열하였을 때 안정하였고, 열안정성은 pH7.0, 100°C에 20분까지는 100% 저해활성이 나타나 비교적 안정하였다. 효소-저해물질 복합체는 형성되었으며 Lineweaver-Burk plot 상에서 비경쟁적 저해양식이었다. 저해물질은 pepsin, renin의 산성 protease를 강력히 저해하였으며 methanol에 가장 잘 용해되었다. 각종 용매계의 silicagel 60 TLC 상에서 R_f치는 0.4~0.6 범위였고 단일 spot를 나타내었다. IR spectrum 및 정색반응 (Rydon-Smith, Biuret)의 결과로부터 peptide 성 물질로 간주되며, 융점 및 원소함량은 각각 220~230°C, C 50.61%, H 8.02%, N 9.34%였다.

참고문헌

1. 村尾澤夫: 醱酵と工業, 43(1), 43(1985).
2. 寺下隆夫, 小田耕平, 河野又四, 村尾澤夫: 醱酵工學, 59(1), 55(1981).
3. 青柳高明: 醱酵と工業, 37(7), 615(1979).
4. Barrett, A.J. and G. Salveson: Proteinase inhibitors, Elsevier (1986).
5. Fukushima, Y., K. Hayashi and H. Motai: Agric. Biol. Chem. 49(6), 1643 (1985).
6. Arai, M., E. Tsuchiya and S. Murao: Agric. Biol. Chem. 42(7), 1429 (1978).
7. Terashita, T., K. Oda, M. Kono and S. Murao: Agric. Biol. Chem. 45(9), 1937 (1981).
8. Kakimura, A. and T. Kanamaru: J. Takeda Res. Lab. 35(3/4), 123 (1976).
9. Morishima, H., T. Takita, T. Takeuchi and H. Umezawa: J. Antibiotics 23, 259 (1970).
10. Fukumura, M., S. Saito, N. Kuwana and S. Murao: Agric. Biol. Chem. 35(8), 1310 (1971).
11. Aoyagi, T., Y. Yagisawa, M. Kumagai, M. Hamada, H.

- Morishima, T. Takeuchi and H. Umezawa: *J. Antibiotics* **26**(9), 539 (1973).
12. Miyano, T., M. Tomiyasu, H. Tizuka and S. Tomisaka: *J. Antibiotics* **25**(8), 489 (1972).
13. Shimada, K. and K. Matsushima: *Agric. Biol. Chem.* **41**(9), 454 (1967).
14. Moroshima, H., T. Takita, T. Aoyagi, T. Takeuchi and H. Umezawa: *J. Antibiotics* **23**(5), 263 (1970).
15. Park, S.K., N.K. Sung and J.S. Rho: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**(2), 115 (1989).
16. Park, S.K., N.K. Sung and S.W. Lee: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**(2), 121 (1989).
17. Fritz, H., I. Trautschold and E. Werle: Protease inhibitors, p.1964, (1974).
18. Aoyagi, T., H. Morishima, R. Nishizawa, S. Kunimoto, T. Takeuchi and H. Umezawa: *J. Antibiotics* **25**(12), 689 (1972).
19. Kunimoto, S., T. Aoyagi, H. Morishima, T. Takeuchi and H. Umezawa: *J. Antibiotics* **25**(4), 251 (1972).
20. Andreeva, N.A. and D.N. Chermenskii: *Biokhimiya* **44**(5), 838 (1979).
21. Murao, S. and S. Sato: *Agric. Biol. Chem.* **34**(8), 1265 (1970).
22. Rich, D.H., E. Sur and J. Singh: *Bioche. and Biophys. Res. Comm.* **74**(2), 2 (1977).
23. Gregerman, R.I., M. Mckown and R.J. Workman: *J. Biol. Chem.* **249**, 7770 (1974).
24. Sato, S. and S. Murao: *Agric. Biol. Chem.* **36**(3), 515 (1972).
25. Murao, S.: *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **55**(6), 503 (1981).

(Received July 31, 1990)