

Streptomyces S-217에 의한 Trypsin 저해물질의 생산 및 정제

류병호* · 이주화 · 신동분 · 김동석
경성대학교 식품공학과

Production and Purification of Trypsin Inhibitor from *Streptomyces* S-217

Ryu, Beung-Ho*, Ju-Hwa Lee, Dong-Bun Shin and Dong-Seuk Kim

Department of Food Science and Technology, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea

Abstract— Trypsin inhibitor produced by *Streptomyces* sp. S-217 was purified by solvent extraction and various column chromatographies, and physico-chemical properties of the inhibitor were investigated. Inhibitor complex was formed for incubation of 10 min. *Streptomyces* S-217 showed the highest production of trypsin inhibitor when it was cultivated at 37°C for 66 hr in the medium containing 2% mannitol & 0.9% peptone, pH 7.0. Trypsin inhibitor was purified by column chromatography and high performance liquid chromatography. Trypsin inhibitor indicated the maximum wavelength at 215 nm and solubilities in water, methanol and dimethyl sulfoxide were 95, 70 and 75%, respectively. The concentration of 50% inhibition (IC₅₀) was 15 µg/ml. The inhibitor was stable on heating at 100°C for 60 min in pH 5~9 and was more stable in alkaline region than acidic region.

Protease 저해물질은 그들 작용기의 생화학적 특성에 따라 thiol, serine, carboxy 및 metallo protease 저해물질 등 4가지로 크게 분류할 수 있으며, 이것은 동식물에 광범위하게 분포되어 있고 거의 단백질성이다(1-3). 이들 중 trypsin과 같은 serine protease를 저해하는 물질에 대하여 가장 면밀하게 연구되어져 있는데, 1936년 Kunitz와 Northrop는 소의 취장으로 부터 trypsin 저해물질을 결정상으로 단리했다. 이 저해물질은 Kunitz 저해물질(SATI) 혹은 염기성 취장 trypsin 저해물질이라며 많은 천연물질중에서 최초로 일차구조가 결정되어 있는 것이다. 따라서 이 저해물질은 급성취염에 치료 효과를 나타내기 때문에 임상적으로 임상적 의의를 가지고 있고 그와 함께 많은 연구가 수행되었다.

식물 기원의 단백분해효소 저해물질에 관해 Laskowski(4), Vogel(5) 및 Kassel(1) 등에 의하면 동식물로부터 발견된 다수의 저해물질은 모두 단백질성 고분자 물질이다. 이들의 저해물질은 산 및 열에 안정한

비교적 저분자물질(분자량 6,000~12,000)과 불안정한 고분자물질(분자량 20,000~60,000)로 대별된다.

한편 동식물로부터 얻어진 저해물질은 대부분 polypeptide, protein, glycoprotein 등의 고분자량의 저해물질인 것과는 달리 미생물 대사산물에 의해 발견된 단백분해효소 저해물질은 저분자인 것이 특징이다.

저분자 효소저해물질은 효소의 반응기구의 해석과 생리기능 및 의학적인 중요한 병리현상의 해석에 유효한 물질이다. 먼저 이들의 저해물질의 어떤 것은 소염작용, 변이유발저지 및 발암에 따른 암전위 저지 등으로 소개되어 있고, 많은 질병에 대한 효과가 보고되어 있다. 그리고 이들의 저해물질은 조직, 체액 중의 단백분해효소의 식별에, 친화성 chromatography의 활성기로서, 또는 복잡한 생체반응에 관한 단백분해효소의 역할을 이해하는 시약으로서 널리 사용되어지고 있다(6-8).

현재까지 밝혀진 protease 저해물질은 plasmin, trypsin, papain 및 cathepsin B를 저해하는 leupeptin과 papain, trypsin, cathepsin A 및 B를 저해하는 anti-pain 및 chymotrypsin을 저해하는 phosphoramidon과 metallo proteinase를 특이적으로 저해하는 MK-I,

FMPI, MAPI, SMPI, S-SI, thiolstatin 등이 있다(9-14).

이들 protease 저해물질을 생산하는 미생물은 곰팡이 및 세균도 가능하지만 대부분이 방선균이 주종을 이루고 있다.

본 연구는 protease 저해물질 중 trypsin 저해물질을 생산하는 *Streptomyces* sp. S-217 균주의 최적 배양조건 및 정제방법 등을 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

공시균주 : 본 실험에 사용한 균주는 토양에서 분리한 *Streptomyces* sp. S-217을 사용하였다(15).

배양방법 : 100 ml Erlenmeyer flask에 기본 액체 배지(glucose 10 g, polypeptone 2.0 g, NaCl 5 g을 증류수 1 l에 녹임, pH 7.0)를 40 ml를 넣고 멸균한 후 균주를 접종하여 30°C에서 3일간 진탕 배양한 후 그 배양액으로 trypsin의 저해활성을 측정하였다.

저해물질의 생산조건 : 기본배지를 토대로 탄소원, 질소원, 무기염류의 종류 및 농도, pH, 온도, 배양시간, 통기량에 따른 최적 배양조건을 조사하기 위하여 100 ml 진탕 플라스크에 30 ml씩 배지를 분주하여 살균하고 공시균주 한 백금을 접종한 후 각각에 대한 여러가지 조건으로 진탕 배양하여 여과(Toyo No. 2)한 다음 그 배양액에 대한 저해활성을 측정하였다.

저해물질의 분리 및 정제 : Flask 배양에서 구한 저해물질의 최적 생산조건을 토대로 500 ml Erlenmeyer flask에 저해물질 생산배지 100 ml를 분주하여 멸균하고 공시균주를 접종하여 30°C에서 48시간 전 배양시킨 후 전배양액을 저해물질 생성배지에 0.5% (v/v) 수준으로 첨가한 다음 jar fermentor(5 l)을 이용하여 30°C에서 60시간 동안 대량배양한 후 원심 분리(6,000×g)하였다. 그 상정액을 80% (NH₄)₂SO₄로 침전시킨 후 원심분리(10,000×g 10 min)하여 침전물을 모았다. 침전물을 butanol 500 ml로 추출하여 여과한 다음 진공 건조시켰다. 담황갈색의 분말을 탈이온수에 용해시키고 알루미나를 가하여 10분 동안 교반하면서 완전히 흡착시킨 후 여과하였다. 다시 2~3회 탈이온수로 씻은 후 butanol로 추출하여 진공건조시켰다. 이것을 methanol에 용해하고 이를 Sephadex G-10 column chromatography하여 분리하였다.

저해활성의 측정 : 시약은 Tris-CaCl₂ buffer(pH 8.2)를 조제하고 BAPA(N-Benzyl-DL-arginine-p-nit-

roanilide hydrochloride) 0.08 g을 2 ml의 dimethyl sulfoxide에 녹인 후 Tris-CaCl₂ buffer로 20 ml가 되게 하였다. Trypsin은 1 mg/ml로 buffer에 녹여서 측정하였다(6).

정제물질의 저해활성도 : 저해물질의 정제과정 및 각종 반응시에서 저해활성은 백분율(%)로 나타내었다.

결과 및 고찰

저해물질의 생산조건

각종 배지의 성분, 금속이온, pH 및 온도 등의 배양조건은 이차대사산물의 생산에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

그러나 각 조건 하나 하나에 대한 종류별, 또는 농도별로 모두 조사한다는 것이 어렵기 때문에, 방선균에 의한 효소저해물질 생산에 대하여 이미 보고된 것을 토대로 여러가지 조건 중 가장 공통된 조건을 먼저 선택하여 본 공시균주에 의한 저해물질 생산조건을 구하였다.

탄소원의 영향 : 기본배지에 20종의 탄소원을 각각 2%(w/v) 농도로 첨가하여 공시균주를 배양한 결과 최종 pH 및 저해활성(absorbance)값은 Table 1와 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 mannitol과 inositol 및 rhamnose, raffinose의 첨가가 저해활성에 큰 영향을 주었다. mannitol의 농도별 최적 조건은 2% 농도가 좋았다(Fig. 1). Murao 등(17)은 amylase 저해물질 생산에 있어서 1% 농도의 탄소원으로 조사한 결과 corn starch가 저해물질의 생산에 양호하였다고 보고한 바가 있고, S-PI(*Streptomyces* pepsin inhibitor) 생산(18)에 있어서도 nutrient broth에 각종 탄수화물을 1% 첨가한 결과 glucose, galactose, mannose, lactose가 효과적이었으며 2% glucose 농도일 때가 가장 양호한 것으로 보고하였다. 그러나 polypeptone의 농도가 5%일 때는 glucose 첨가가 없을 때가 오히려 저해활성이 높았다고 하였다. 또한 FMPT(fungal metallo protease inhibitor) 생산(19)에서는 glucose, soluble starch, glycerol이 효과적이었으며 alkaline protease 저해물질(S-SI) 생산(20)에서는 starch, dextrin, fructose 및 maltose 등이 효과적이었는데, 그 중 2% starch 농도일 때가 최적이라고 보고하였다. 그리고 pancreatic α-amylase 저해물질(pain)의 경우(21)는 3% glucose 농도가 가장 좋았

Table 1. Effect of carbon sources on the inhibitor production by strain S-217

| Carbon sources (2%) | Final pH | Inhibitory* activity (A_{410}) |
|---------------------|----------|------------------------------------|
| L-Arabinose | 7.15 | 0.215 |
| Cellobiose | 8.01 | 0.236 |
| Dextrin | 7.96 | 0.286 |
| D-Fructose | 5.68 | 0.324 |
| Galactose | 6.86 | 0.352 |
| Inositol | 8.20 | 0.376 |
| Inulin | 8.31 | 0.295 |
| Maltose | 6.96 | 0.313 |
| Mannitol | 8.46 | 0.392 |
| Mannose | 8.09 | 0.339 |
| D-Glucose | 5.73 | 0.352 |
| Raffinose | 7.68 | 0.387 |
| Rhamnose | 7.68 | 0.387 |
| Melibiose | 8.36 | 0.326 |
| Sorbitol | 8.17 | 0.342 |
| Salicin | 7.01 | 0.337 |
| Sorbose | 6.20 | 0.282 |
| Sucrose | 7.02 | 0.357 |
| Trehalose | 7.44 | 0.366 |
| D-Xylose | 5.96 | 0.284 |
| Starch | 8.91 | 0.298 |

*The low A_{410} value weaker inhibitory activity than the high A_{410} value.

다고 하였다. Trypsin 저해물질의 생산에 대하여 Ti와 Seu 등(22)은 대부분의 탄소원이 거의 비슷한 결과를 나타내었으나 2% glucose 농도일 때가 가장 적당하였다고 했으며 Maruo와 Watanabe 등(23)은 MAPT (microbial alkaline proteinase inhibitor) 생산에 있어서는 glucose가 1.0% 농도일 때가 양호하였다고 보고하였다.

질소원의 영향: 기본배지에 2%의 농도가 되도록 glucose를 첨가한 후 13종류 질소원을 0.5% 농도로 첨가하고 공시균주를 접종하여 배양한 결과, 저해물질 생성 및 최종 pH는 Table 2와 같다. Table 2에서 보는 바와 같이 저해물질 생성은 무기 질소보다는 유기 질소가 훨씬 양호하였다.

유기 질소는 그 중 peptone이 가장 우수하였으며 0.9% 농도일 때 저해활성이 가장 높았다(Fig. 2). Ti와 Seu 등(22)은 trypsin 저해물질의 경우에 peptone, yeast extract, sodium nitrate가 우수하였다고 보고하였으며, 그 중 0.3% peptone 농도일 때가 저해물

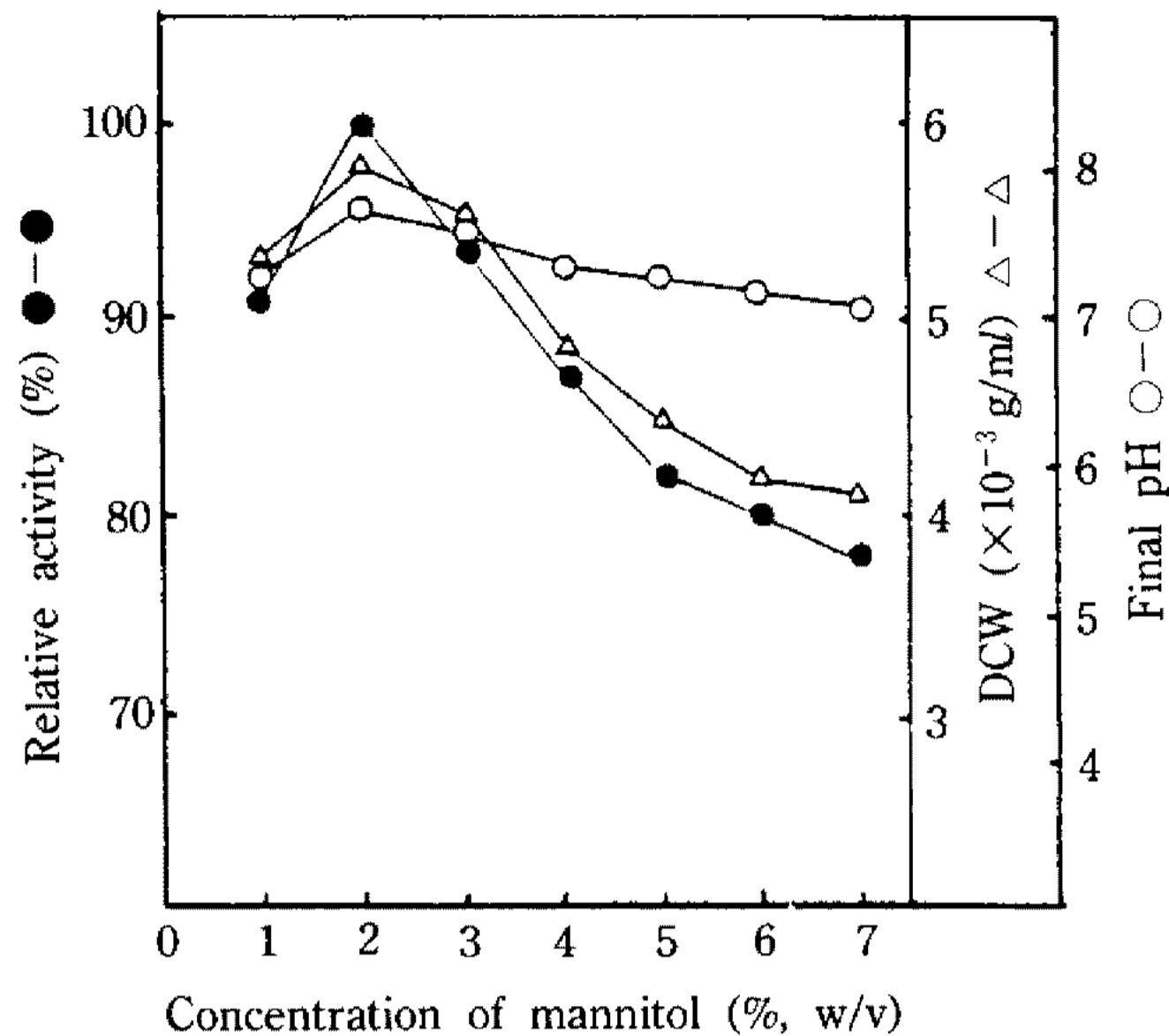


Fig. 1. Effect of concentration of mannitol on trypsin inhibitor production by strain S-217.
DCW: dry cell weight

Table 2. Effect of nitrogen sources on the trypsin inhibitor production by strain S-217

| Nitrogen sources (0.5%) | Final pH | Inhibitory* activity (A_{410}) |
|---------------------------------------|----------|------------------------------------|
| NH_4Cl | 4.16 | 0.429 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 4.77 | 0.417 |
| NaNO_3 | 6.14 | 0.345 |
| $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ | 8.71 | 0.266 |
| NH_4NO_3 | 4.66 | 0.375 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ | 6.62 | 0.388 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ | 5.47 | 0.150 |
| Malt ext. | 5.07 | 0.360 |
| Asparagine | 7.62 | 0.517 |
| Casein | 5.93 | 0.126 |
| Peptone | 7.99 | 0.579 |
| Yeast ext. | 6.94 | 0.538 |
| Beef ext. | 7.00 | 0.549 |

*The low A_{410} value has weaker inhibitory activity than the high A_{410} value.

질의 최적 생성농도였다고 하였다.

Murao 등(19)은 FMPI (fungi metallo proteinase inhibitor)의 경우에 1% meat extract와 1% polypeptone을 혼합첨가한 경우 효과적이었으며, amylase 저해물질의 경우는 2%라고 보고하였다. Maruo와 Satoi 등(18)은 S-PI 생산에서 무기태 질소는 거의 저해활성이 없었으며, 유기태 질소의 경우는 polypeptone을 5%의 상당한 높은 농도로 첨가할 때가 저해

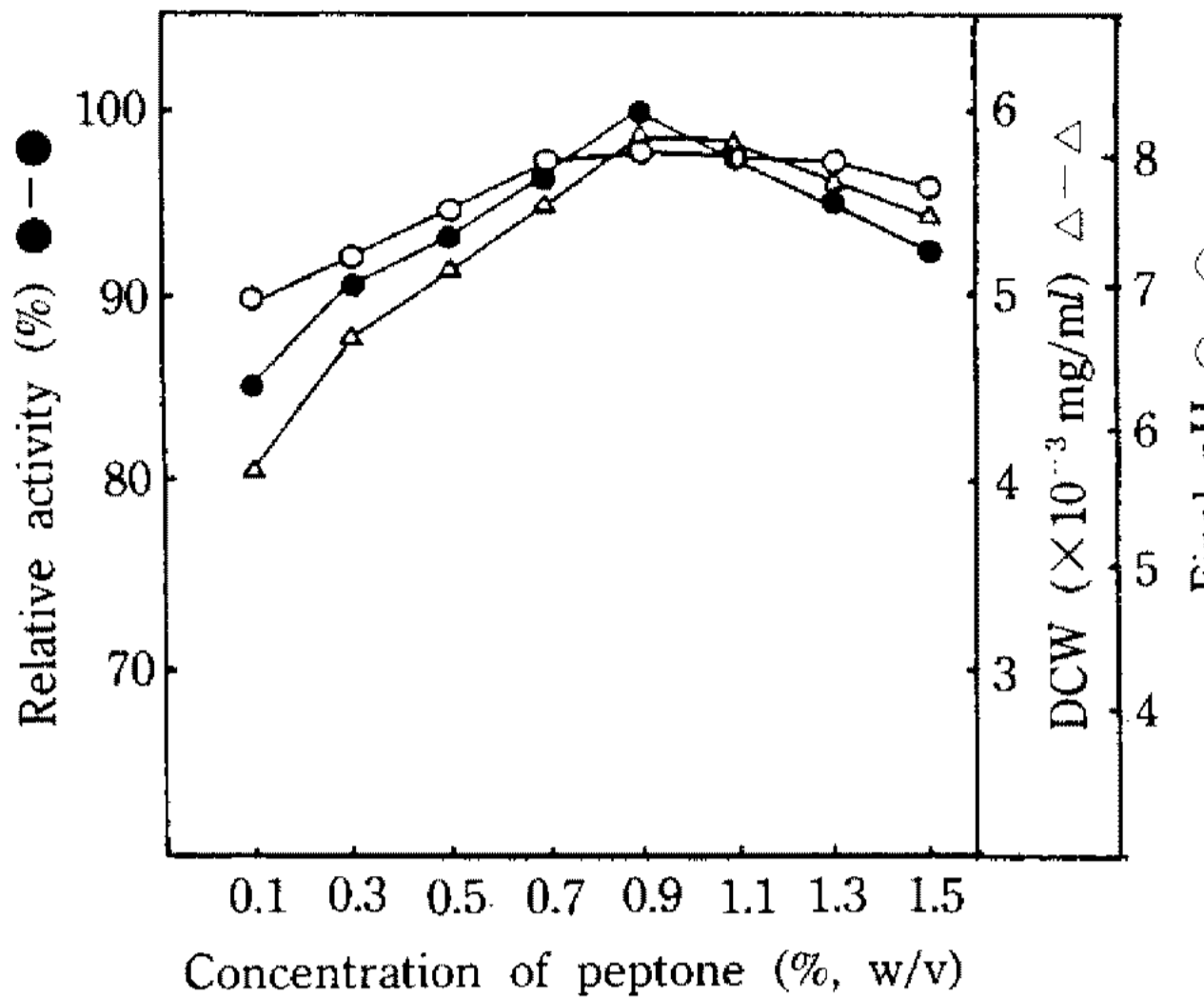


Fig. 2. Effect of peptone concentration on trypsin inhibitor production by strain S-217.
DCW: dry cell weight

활성이 높게 나타나는 것으로 보고하였다. Maruo와 Watanabe 등(23)은 MAPI 생산에 있어서 polypeptide와 meat extract를 각각 3%, 1%의 농도로 첨가할 경우가 좋았다고 보고하였다. 또한 Murao 등(20)은 S-SI 생산의 경우, 질소원 중 4% polypeptide 농도일 때가 가장 양호하였으며 무기 질소는 거의 영향이 없는 것으로 보고하였다.

무기염의 영향 : glucose와 polypeptide를 각각 2%, 0.7%의 농도로 첨가한 후 각종 무기염 13가지를 0.005% 농도로 첨가하여 30°C에서 3일간 배양시킨 결과, 저해활성과 최종 pH는 Table 3와 같다. 전반적으로 무기염의 첨가 중 저해물질 생산에 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, MgCl_2 가 효과가 있었다. 그런데 여러가지 효소 저해물질 생산에서 무기염은 중요한 역할을 한다는 보고(23)도 있지만, Murao 등(21)은 amylase 저해물질 생산에서 무기염의 효과가 없다고 보고하였으며, 또한 Ti와 Seu 등(22)도 trypsin 저해물질의 경우 AgNO_3 , CuSO_4 , HgCl_2 , PbAc_2 , ZnCl_2 가 저해물질 생산 및 균 증식을 강하게 억제시켰으며 CaCl_2 만이 약간 증가시켰다고 보고하였다.

온도의 영향 : 배양온도는 저해물질 생산에 질소원과 마찬가지로 중요한 요인 중의 하나라고 한다. 저해물질 생성 및 균체생육에 있어서 최적 온도는 30°C였으며(Fig. 3), 40~50°C 이상이 되면 극히 감소하여 마침내 생육이 정지되어 저해물질이 생산되지 못하였다. Murao(23) 및 Ti와 Seu 등(22)에 의하면 저해물질 생산의 범위는 대체로 25~35°C였으나, Murao(18)의 S-SI 생산의 경우는 상당히 고온인 45

Table 3. Effect of inorganic salts on the trypsin inhibitor production by strain S-217

| Inorganic salts (0.005%) | Final pH | Inhibitory* activity (A_{410}) |
|---|----------|------------------------------------|
| HgCl_2 | 6.16 | 0.342 |
| ZnCl_2 | 6.50 | 0.304 |
| NaCl | 7.36 | 0.189 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 5.71 | 0.517 |
| K_2HPO_4 | 6.77 | 0.205 |
| CoCl_2 | 6.09 | 0.366 |
| MgCl_2 | 6.77 | 0.536 |
| AgNO_3 | 6.18 | 0.263 |
| MgSO_4 | 7.71 | 0.056 |
| ZnSO_4 | 6.32 | 0.388 |
| MnCl_2 | 7.13 | 0.132 |
| CaCl_2 | 7.86 | 0.031 |
| FeSO_4 | 6.73 | 0.023 |

*The low A_{410} value has weaker inhibitory activity than the high A_{410} value.

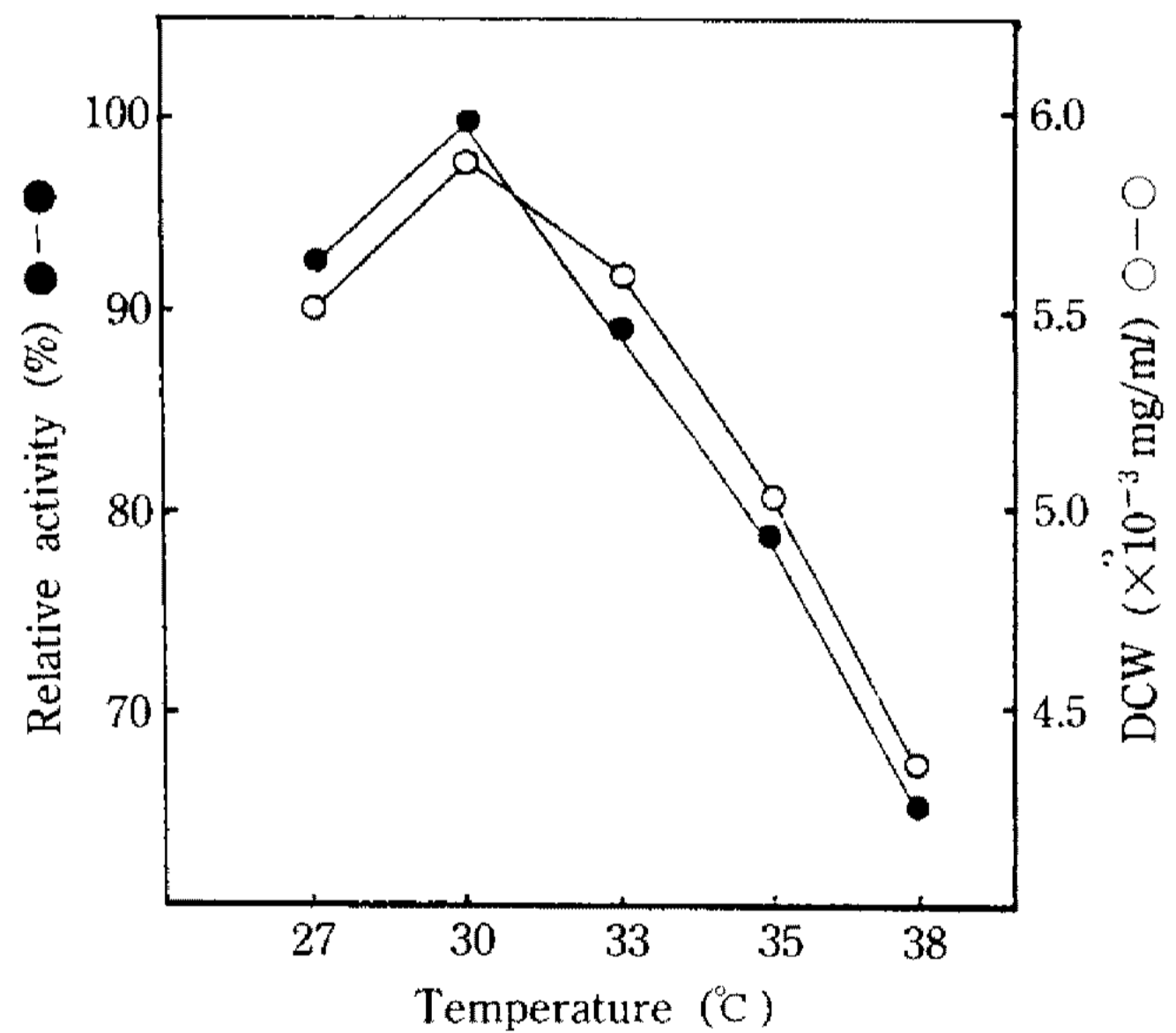


Fig. 3. Effect of temperature on the production of the trypsin inhibitor by strain S-217.
100% represent inhibition activity at 30°C.
DCW: dry cell weight

°C에서 저해활성이 가장 높게 나타났으며 균체생육은 30°C가 최적이었다.

초기 pH의 영향 : 배양기의 초기 pH를 4~10 구간으로 조정하여 30°C에서 최적 배지조건으로 배양한 결과는 pH 7에서 저해활성 및 균체생육량이 가장 높았다(Fig. 4). Ti와 Seu 등(22)에 의하면 방선균에 의한 저해물질 생성의 초기 pH는 대부분이 pH 7이

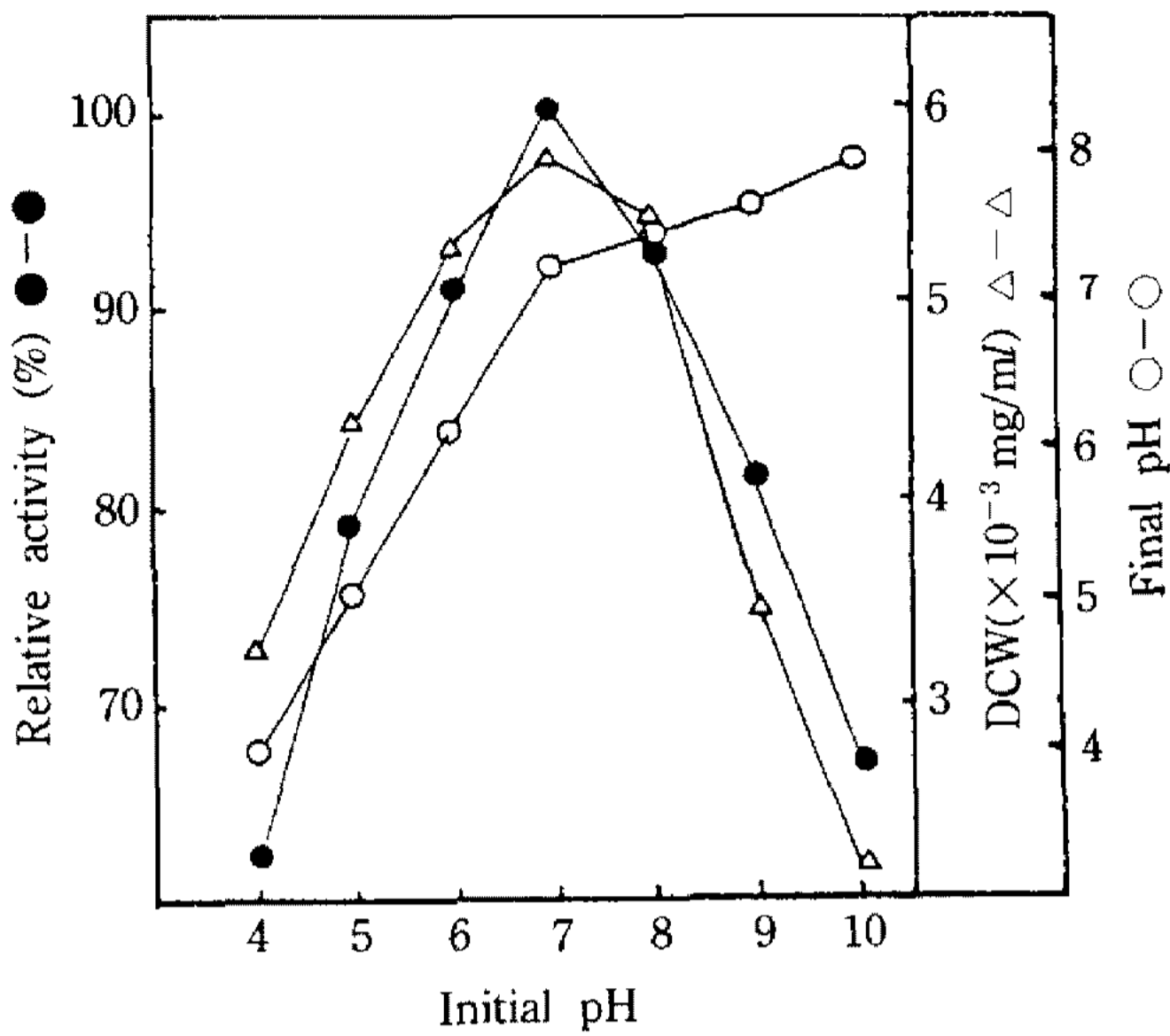


Fig. 4. Effect of the initial pH on the trypsin inhibitor production by strain S-217.
100% represents inhibition activity at initial pH 7.0
DCW: dry cell weight

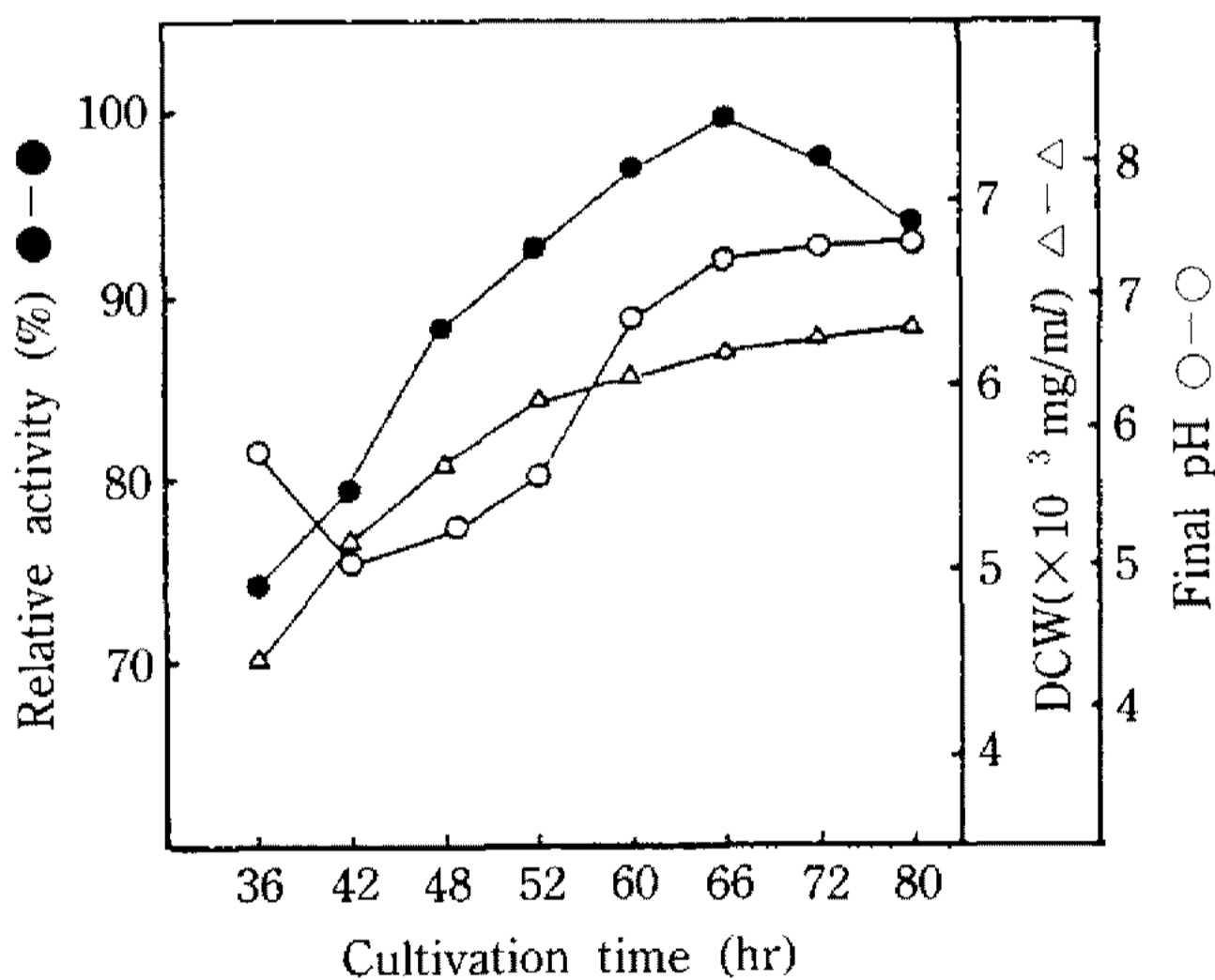


Fig. 5. Time course of the trypsin inhibitor production by strain S-217.
100% represent inhibition activity after 66 hours.
DCW: dry cell weight

양호하였으며, 아직까지 극한 산, 알칼리성 측에서의 저해물질 생성에 대하여는 보고된 바가 없다.

배양시간의 영향: 최적 배지의 조건에서 배양한 결과 66시간이 저해물질 생성에 최적이었다(Fig. 5). Murao 등(22)에 의하면 FMPI의 경우는 24시간에서 균생육이 정상에 도달하는 것과 더불어 저해활성도 높았으며, trypsin 저해물질의 경우(27)는 3일째 저해활성이 높았다.

Table 4. Distribution of trypsin inhibitor in water and solvent phases

| pH | Butanol (%) | water (%) | Ethylacetate (%) | water (%) |
|----|-------------|-----------|------------------|-----------|
| 2 | 52 | 48 | 0 | 100 |
| 8 | 68 | 32 | 0 | 100 |

저해물질의 분리 및 정제

용매에 대한 용출성: pH 2와 8로 조정된 배양액에 동량의 butanol 및 ethylacetate를 첨가하여 잘 섞은 후 물층과 용매층으로 분획하여 각층의 용매를 건조시킨 후 용매를 완전히 제거하기 위해 원래 부피의 물을 첨가하여 다시 완전히 건조시켰다. 이것에 원래 부피의 물을 첨가하여 효소저해활성을 측정된 결과 trypsin 저해활성은 약 70%가 butanol에 의해 추출되었고, 나머지 물층에 남아있는 trypsin 저해활성은 butanol에 추출되지 않았다. Ethylacetate에 의해서는 저해물질이 전혀 추출되지 않았다(Table 4).

활성탄에 대한 흡착 및 용출: 배양액 50 ml에 활성탄(Sigma Co.) 1g을 가하고 10분간 잘 섞은 후, 원심분리에 의해 여액을 분리하여 저해활성을 측정된 결과, 약 70%의 저해활성이 활성탄에 흡착되었고, 나머지 20%가 흡착되지 않았다. 산성 methanol 및 중성 methanol에 의해서는 용출되지 않았다.

Alumina에 대한 흡착 및 용출: Alumina(Wako Co.)로 소형 column을 만들어 배양액을 통과시킨 결과 대부분의 활성물질은 흡착되지 않았다.

열안정성: 배양액을 100°C dry oven에 정치하면서 저해활성을 10분 간격으로 측정된 결과 한 시간 열처리하였을 때 약 90%의 활성이 유지되었다.

저분자성: 저분자성 반투막(molecular cut off: 12,000)에 배양액을 넣고 물로 24시간 투석시킨 후 반투막내에 남아있는 액으로 활성을 조사한 결과 활성이 약 5% 정도 남아 있었다.

효소저해물질 복합체에서 저해물질의 분리: 배양액에 많은 양의 trypsin(1 mg/ml)을 첨가하였을 때 배양액의 저해활성은 인정되지 않았으나, 이 액을 100°C에서 1시간 처리한 후 butanol로 추출한 결과 저해활성이 인정되었다.

저해물질의 조정제: 배양액을 alumina column (2×10 cm)에 통과시켜 상당량의 색소물질을 제거한 후 alumina column을 butanol층만 따로 모아 rotary evaporator에서 건조하였다. 건조된 물질을 metha-

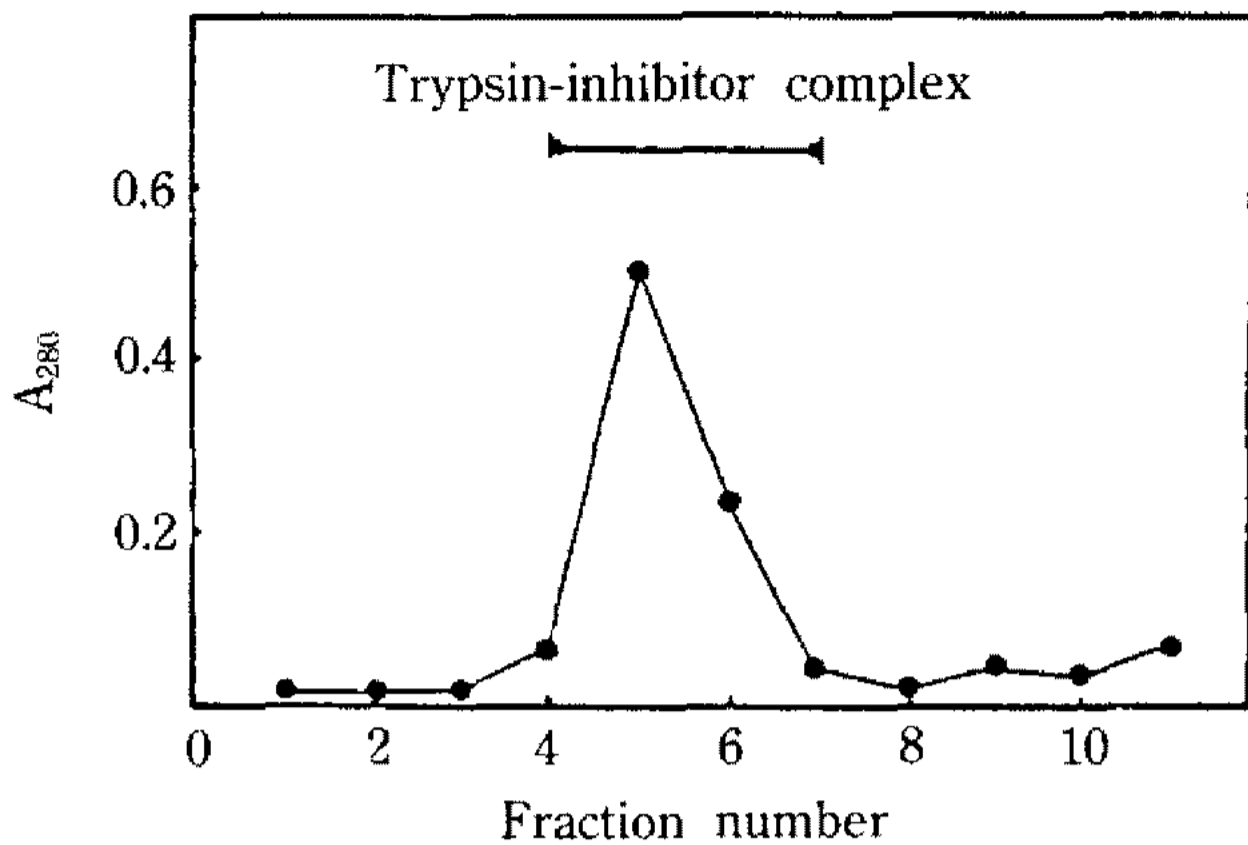


Fig. 6. Sephadex G-10 column chromatography of enzyme-inhibitor complex.

anol에 녹여 다시 rotary evaporator로 건조한 다음 건조된 물질은 소량의 물에 녹여 불용성물질을 원심분리에 의해 제거한 후 여기에 trypsin 용액을 가하여 30분 후에 활성이 나타날 때까지 trypsin을 첨가하였다. Trypsin이 과다하게 첨가된 저해물질의 수용액을 충전된 Sephadex G-10 column(1×30 cm)에 loading하여 물로 elution시켰을 때 trypsin 활성은 void volume에서 용출되었다(Fig. 6). 용출된 trypsin 활성을 나타내는 단백질 peak에서 효소저해물질 복합체로 존재하므로 trypsin 활성이 있는 부위를 모아 100°C에서 한시간 동안 열처리하여 trypsin을 변성시키고 저해물질을 butanol로 추출하여 흰색의 분말을 얻었다. 이를 silicagel TLC plate상에서 확인한 결과 3개의 반점이 나타났다.

이미 정제한 trypsin을 activated Sepharose-4B column matrix에 coupling시켜 Amberlite IR-50 column에서 얻은 시료액을 통과시킨 후 0.01 M HCl buffer(pH 2.0)로 용출하여 저해활성 부위를 회수한 다음 preparative HPLC의 chromatogram에서는 2개의 peak가 나타났다. 두개의 peak 중 활성을 가지는 retention time 7.0분대의 물질을 분리하였다.

저해물질의 이화학적 성질

전처리시간과 저해활성 : 일반적으로 저해물질의 반응상의 성질조사는 가능하다면 그 상대효소의 최적 활성조건에서 구하는 것으로 되어 있다. Trypsin 최적 활성조건하에서 EI 복합체(enzyme-inhibitor complex) 형성에 미치는 전처리 시간의 영향을 알아보기 위하여 저해물질(40 µg/ml)과 trypsin(1 mg/ml)을 37°C에서 반응시켜 효소의 잔존활성을 조사한 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 저해율이 아주 빠르게

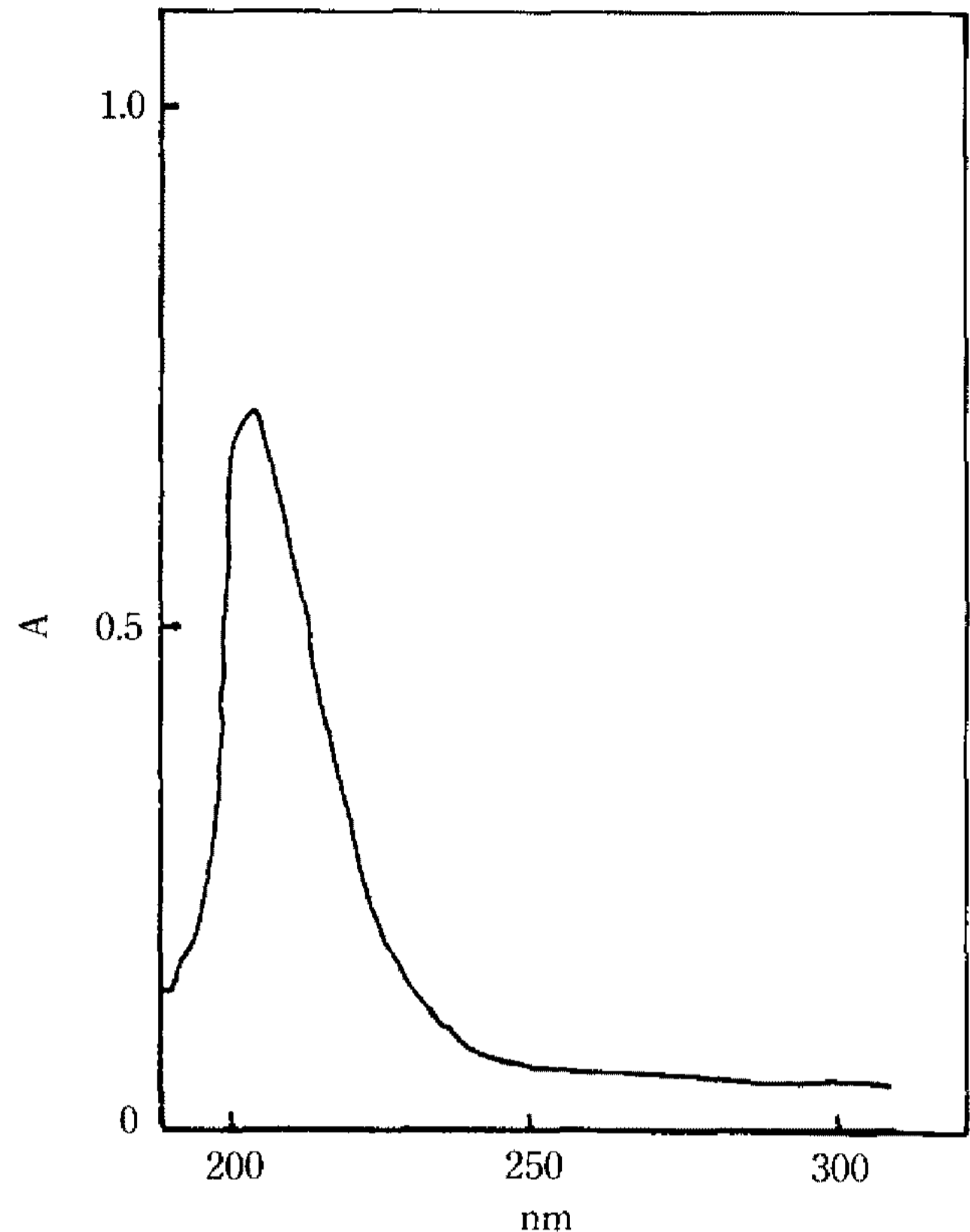


Fig. 7. UV scanning spectrum of the purified trypsin inhibitor produced by *Streptomyces* sp. 217.

나타났다. 그런데 반응물질의 농도가 매우 낮을 때($1 \times 10^{-7} \sim 10^{-8}$ M)에도 복합체의 저해물질 equilibrium이 비교적 빠르게 형성되어진다고 하였는데(24, 25), 취장 혈청의 trypsin 저해물질은 몇초내에 복합체가 형성되어지며 trypsin-kallikrein 저해물질은 4분 정도가 걸린다고 하였다(24, 25). Arai 등(26)은 amylase 저해물질의 경우 7분이 걸린다고 보고하였으며, Marshall과 Lauda(27)는 phaseolamin의 α -amylase에 대한 저해에서 전처리 시간은 온도에 따라 그 저해율이 상당히 다르며 60분 정도의 긴 시간에도 최고 40% 밖에 저해를 나타내지 못하였다고 하였다. 그러나, 일반적으로 전처리시간에서 온도(20°C 내외)는 저해율과 무관한 것으로 알려져 있으며(24), Ti와 Seu 등(22)은 trypsin 저해물질의 경우, 30분 경과 후에 93%의 저해를 보인다고 하였다.

저해물질의 농도와 저해활성

Fritz 등(24)의 방법에 따라서 저해물질의 농도를 ml당 5, 10, 15, 20, 30, 40 µg으로 하고 trypsin(1 mg/ml) 반응을 시킨 결과 trypsin 잔존활성은 Fig. 9과 같다. 효소의 잔존활성과 저해물질의 농도와의 관계에서 20 µg까지는 저해율이 비례관계에 있으나

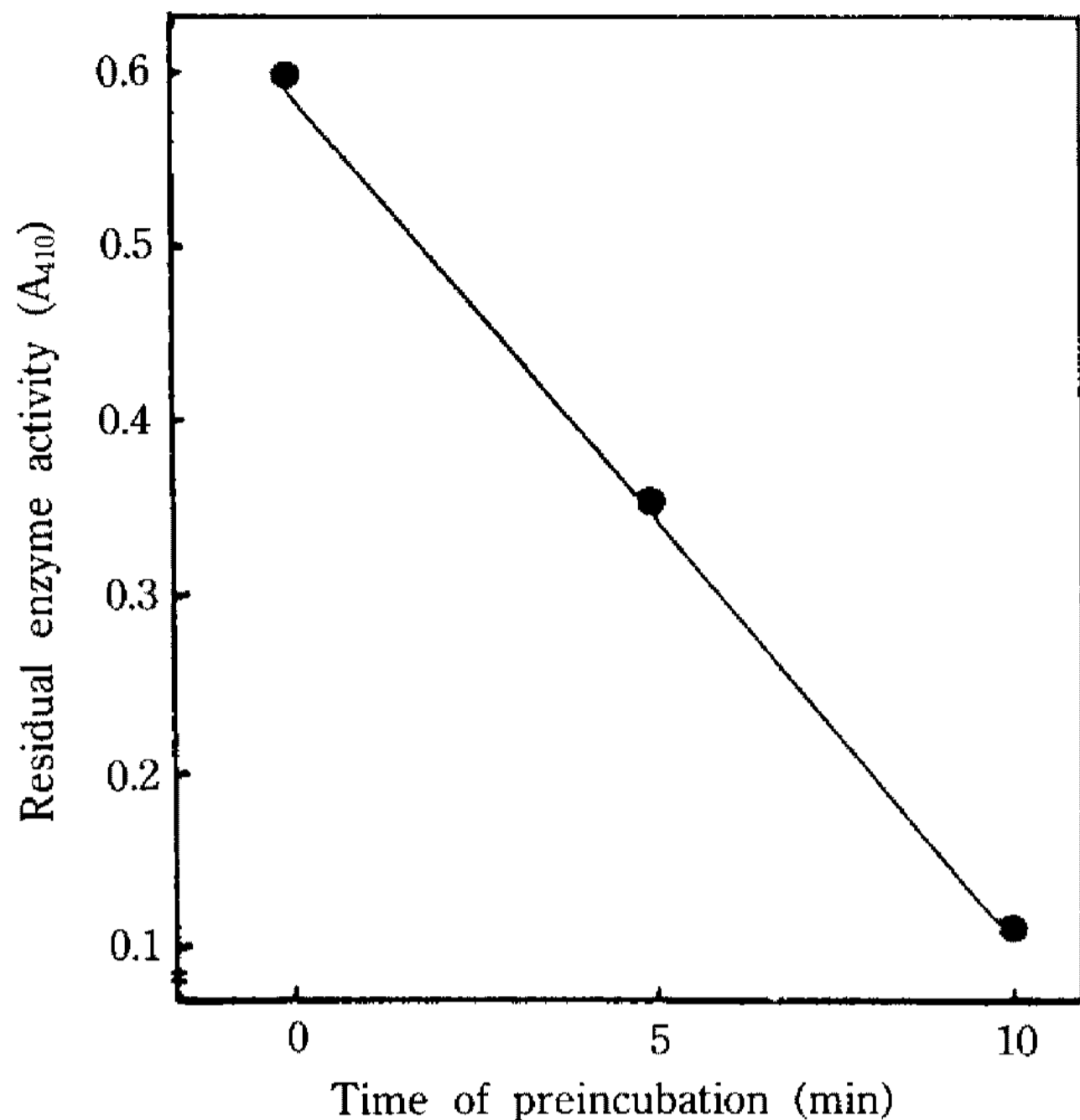


Fig. 8. Effect of preincubation time on the inhibitory activity of the inhibitor to the trypsin.
Purified inhibitor concentration is 40 µg/ml.
Trypsin concentration is 1 mg/ml.

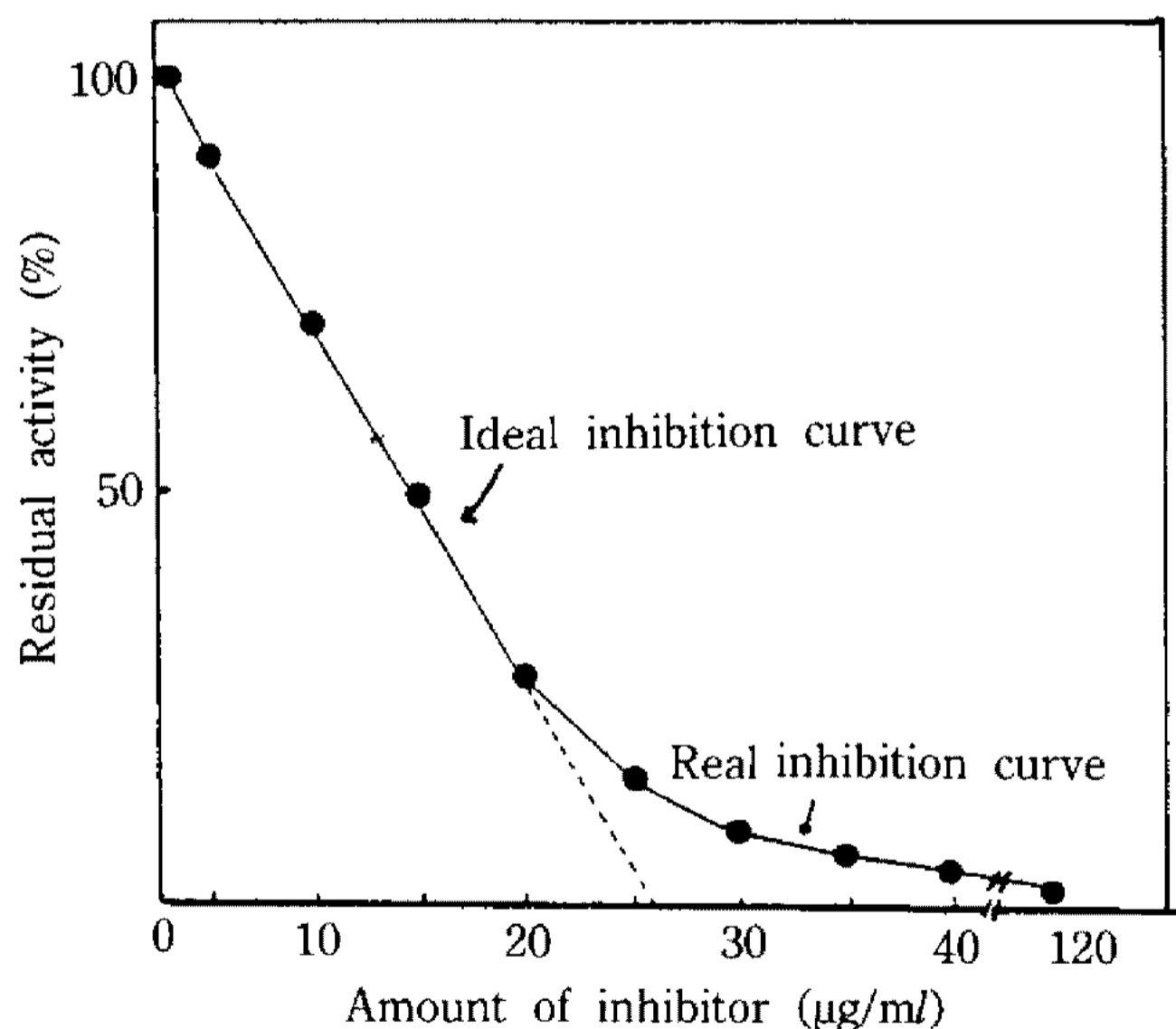


Fig. 9. Effect of concentration of the inhibitor on the inhibitory activity of the inhibitor to the trypsin.
Trypsin concentration is 1 mg/ml.

그 이후부터는 비례관계가 성립하지 않았다.

pH 및 열안정성

저해물질의 pH 안정성을 조사하기 위하여 pH를 1~11까지 각각 조절하여 100°C 에서 20분간 열처리한 후, 효소에 대한 저해물질의 저해활성을 살펴본 결과는 Fig. 10과 같다. pH 5에서 9까지는 안정하였고, 5

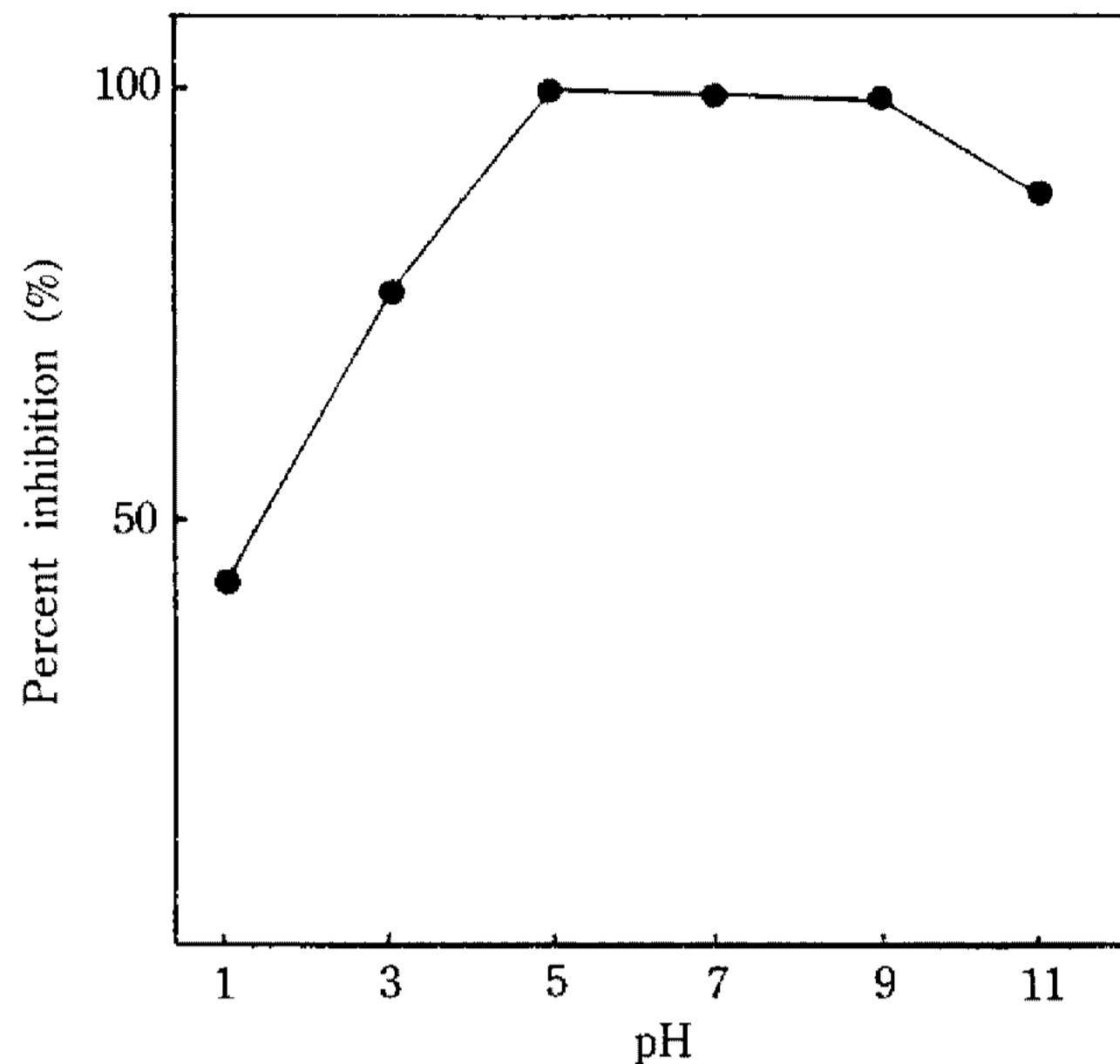


Fig. 10. pH stability of the trypsin inhibitor.
100% represent inhibition activity at pH 7.0.

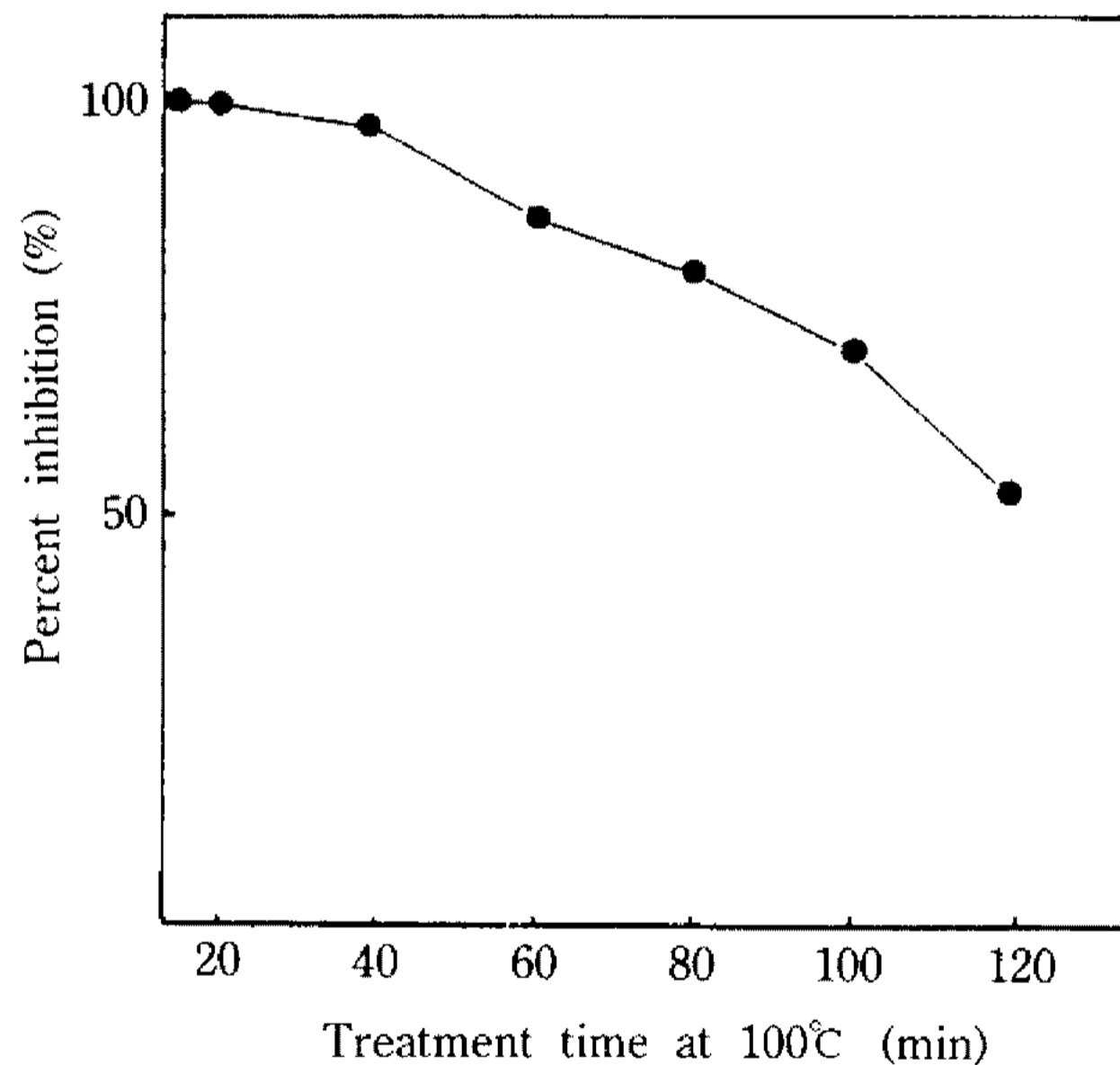


Fig. 11. Thermal stability of the trypsin inhibitor.
100% represent inhibition activity at 0 min.

이하의 산성측이나 9 이상의 알칼리성측은 불안정했다. 저해물질의 열안정성을 알아보기 위하여 100°C, pH 7.0에서 20~120분간 가열처리한 후 pH 8.0으로 조절하여 저해물질의 저해활성을 조사한 결과는 Fig. 10과 같은데 20분까지는 저해활성이 완전 유지되었으며, 60분까지도 80% 정도가 보존되었으나 60분 이후는 저해활성이 크게 감소되었다.

UV spectrum

정제된 trypsin 저해물질의 UV spectrum을 조사한

Table 5. Rf value of trypsin inhibitor on TLC plate by the various solvents

| Solvent | Rf value |
|---|----------|
| Butanol : water (8 : 2) | 0.42 |
| Butanol : methanol : water (4 : 2 : 1) | 0.40 |
| Butanol : acetic acid : water (4 : 1 : 1) | 0.20 |
| Butanol : pyridine : water (6 : 4 : 2) | 0.45 |

결과 Fig. 7와 같이 λ_{max} 215 nm에서 최대흡수파장을 나타냈다.

각종 용매에 대한 용해도 조사

용매로 물, methanol, butanol, acetonitrile, dimethylsulfoxide 등을 사용하여 trypsin inhibitor의 용해도를 조사한 결과, 물에는 95%, methanol과 dimethylsulfoxide에 대해서는 70, 75%이었고 butanol 및 acetonitrile에서는 각각 60% 및 70%를 나타내었다.

TLC의 전제

Silica gel TLC plate상에 정제된 trypsin 저해물질을 spot하여 각종 전개용매에 대한 Rf치를 조사한 결과를 Table 5에 나타냈다.

각 protease에 대한 특이적 저해반응

본 실험에서 정제된 trypsin inhibitor는 trypsin에 대하여 강한 저해효과를 나타내었으나, pepsin, papain, chymotrypsin 및 metalloprotease에 대하여는 저해효과를 나타내지 않았다.

요 약

Streptomyces S-217 균주가 생산하는 trypsin 저해물질의 생산 및 정제조건을 검토하였다. 저해물질의 생산은 500 ml 후라스크의 배양에서 2% mannitol, 0.9% peptone의 배지와 초기 pH는 7.0 배양시간은 66 시간 및 배양온도 30°C의 조건에서 제일 높았으며, 무기염의 효과는 크게 영향이 없었다. 정제는 column chromatography와 HPLC에 의하여 정제하였다. 정제된 trypsin 저해물질의 최대 파장은 λ_{max} 215 nm이었고, 용해도는 물에는 95%, methanol과 dimethylsulfoxide에서는 70% 및 75%이었다. Trypsin 저해물질 복합체 형성시간은 10분 정도였으며, trypsin 효소의 50% 저해농도(IC₅₀)는 15 µg/ml이었다. 저해물질의

pH 안정성은 100°C, 10분간 열처리시 pH 5~9에서 100% 활성이 유지되었으며, 산성측보다 알칼리측이 안정하였고, 열안정성은 100°C, pH 7.0에서 1시간 동안 50% 활성을 유지하였다.

참고문헌

- Kassell, B. 1971. Naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes. *Methods in Enzymology*. Vol. 19, Pp. 389-471.
- Yoda, K. 1982. Instability of potato proteinase inhibitor I against pepsin. *Agric. Biol. Chem.* **46**(2): 541-542.
- Yoshikawa, M., K. Yokota and K. Hiraki. 1985. Purification and some properties of a subtilisin inhibitor from Adzuki beans. *Agric. Biol. Chem.* **49**(2): 367-371.
- Laskowski, M., JR and R.W. Sealock. 1971. Proteinase inhibitors in the enzymes. Vol. 3, pp. 375-473. Academic Press. N.Y.
- Vogel, R., I. Trautschold, and E. Werle. 1966. *Naturliche Proteinase-Inhibitoren* Thieme, Stuttgart.
- Aoyagi, T. 1987. *Bioactive Peptides by Microorganisms*(ed.) by Umezawa, H., T. Shiba and T. Takita. Kodansha Scientific Press.
- Umezawa, H. 1972. *Enzyme Inhibitors of Microbial Origin*. pp. 1-114. Univ. of Tokyo Press.
- Umezawa, H. and T. Aoyagi. 1977. *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*. p. 637. A. J. Barrett. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Aoyagi, J. 1972. Biological activity of Pepstatin, peopstanone a and partial peptides on pepsin, cathepsin D and reanin. *J. Antibiot.* **25**(12): 689-694.
- Ichishima, E. 1967. The structure and activity of acid proteinase. *J. Antibiot.* **25**: 269-279.
- Kunimoto, S.M. 1974. Mechanism of inhibition of pepsin by pepstatin. II. *J. Antibiot.* **27**(6): 413-418.
- Morishima, H. The structure of pepstatin. 1970. *J. Antibiot.* **23**(5): 23-265.
- Rich, D.H. and E.T.O. Sun. 1980. Mechanism of inhibition of pepsin by pepstatin. II. Effect of inhibitor structure on dissociation constant and time-dependent inhibition. *Biochem. Pharmacol.* **29**: 2205-2212.
- Umezawa, H.T. and J. Aoyagi. 1970. Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by *Actinomycetes*. *J. Antibiot.* **23**(5): 259-262.
- Lee, J.H. 1990. Isolation of *Streptomyces* sp. pro-

- ducing trypsin inhibitor and purification and properties of the inhibitor. pp. 1-49. P.H.M. Kyungsung Univ.
16. Hamerstrand, G.E., L.T. Black and J.D. Glover. 1980. *Cereal Chemistry*, **58**(1): 42-45.
 17. Murao, S., K. Ohyama and S., Ogura, 1977. Isolation of inhibitor producing microgonisim. *Agric. Biol. Chem.* **41**(6): 919-929.
 18. Murao, S. and S. Satoi, 1971. Studies on pepsin inhibitor (S-PI) from *Streptomyces* sp. Part 1. Isolation of pepsin inhibitor producing microorganism. *Agric. Biol. Chem.* **35**(10): 1477-1481.
 19. Murao, S. 1982. Isolation of metallo proteinase inhibitor (EMPI) producing microorganism. *Agric. Biol. Chem.* **46**(11): 2697-2703.
 20. Murao, S., S. Sato, and N. Muto. 1972. Isolation of alkaline protease inhibitor producing microorganism. *Agric. Biol. Chem.* **36**(10): 1737-1744.
 21. Murao, S. 1985. Isolation and identification of pig pancreatic α -amylase inhibitor(Pain) producing *Streptomyces*. *Agric. Biol. Chem.* **49**(1): 107-110.
 22. Ti, D.H. and J.H. Seu, 1983. Trypsin inhibitor from *Streptomyces* sp. (III)-Cultural conditions for the inhibitor production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **11**(4): 297-301.
 23. Murao, S., and T. Watanabe. 1978. Isolation and identification of microorganism inhibitor (MAPL). *Agric. Biol. Chem.* **42**(12): 2209-2215.
 24. Frtiz, H., I. Trautschold and E. Werle. 1974. Protease inhibitor Pp. 1964-1980.
 25. Goto, A. 1985. Inhibitor effects of the proteina-
ceous α -amylase inhibitor Haim on animal β -
amylase. *Agric. Biol. Chem.* **49**(2): 435-439.
 26. Arai, M., N.J. Oouchi and S. Murao. 1985. Inhi-
bitor Properties of an α -amylase inhibitor, Paim,
from *Streptomyces corchorushii*. *Agric. Biol. Chem.*
49(4): 987-991.
 27. Marshall, J.J. and C.M. Lauda. 1975. Purification
and properties of phaseolamin, an inhibitor α -
amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*.
J. Biol. Chem. **250**(20): 8030-8037.

(Received July 10, 1992)