

Streptomyces griseoplanus SL20209에 의한 Aminopeptidase M 저해제의 생산 조건

고학룡 · 전효곤 · 성낙계¹ · 고영희*

한국과학기술연구원 생명공학연구소 미생물화학연구그룹, ¹경상대학교 식품공학과

Conditions for the Production of Aminopeptidase M Inhibitors by *Streptomyces griseoplanus* SL20209. Hack-Ryong Ko, Hyo-Kon Chun, Nack-Kie Sung¹ and Yung-Hee Kho*. *Microbial Chemistry Research Group, Korea Research of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O. Box 115, Yusung, Taejeon 305-600, Korea, ¹Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea* - Maximum amount of the aminopeptidase M inhibitors produced by *Streptomyces griseoplanus* SL20209 in 500 ml-Erlenmeyer flask was accumulated after cultivation for 3 days at 28°C, thereafter the amount of inhibitors decreased slowly with a pH change to alkaline. Arabinose, xylose, mannose and soluble starch were good carbon sources for the production of the inhibitors. On the other hand, glucose was only good for the cell growth but potently inhibited the production of inhibitors. Natural organic nitrogen sources such as soybean meal, fish meal, gluten meal and peanut powder were good for the production of inhibitors, however, soytone, peptone and inorganic nitrogens such as NH₄Cl and NH₄NO₃ were poor. Inclusion of yeast extract (0.5%, w/v) or K₂HPO₄ (0.05%) into the production medium increased the production of inhibitors by accelerating cell growth. The production of inhibitors was slightly increased on the medium containing CaCO₃ (0.3%) and zeolite (0.5%), respectively. Optimal temperature and initial pH range for the production of inhibitors were determined to be 28°C and 6.0~7.0, respectively. Employing two improved production media consisting of 3% arabinose or soluble starch, 2.5% soybean meal, 0.5% yeast extract, 0.05% K₂HPO₄, 0.1% CaCO₃ and 0.3% zeolite (pH 6.8), 1.8-fold increase in the amount of inhibitors was achieved, comparing with the basal medium used.

Exopeptidase의 일종인 aminopeptidase M(AP-M 또는 AP-N; microsomal leucine aminopeptidase, EC 3.4.11.2)은 peptide의 N-말단으로 부터 유리 아미노산을 생성시키는 효소로서 주로 포유류의 신장 및 소장의 brush border에 존재하는 막-결합 효소이며(1), 사람의 경우 정상 및 악성 골수세포와 fibroblasts, hepatocytes, epithelial cells의 표면에 존재할 뿐만 아니라 cerebral membrane에도 존재하여 중추 신경계의 opioid peptide인 enkephalin을 불활성화하는 것으로도 알려져 있다(2, 3). AP-M의 생리적 기능으로는 먼저 체내에서 단백질 소화 중에 소장에 도달한 짧은 peptides로부터 아미노산을 유리시켜 소장 점막으로 흡수(peptide scavenging)되게 하며(1), 이 외에도 여러 aminopeptidases(APs)는 단백질의 성숙(protein maturation), 호르몬 수준의 조절(hormone level regulation) 및 세포주기의 조절 등에 관여한다(4). 이러한 다양한 생리적 기능을 가진 각종 APs가 여러 동물조직에서 발견됨으로서(5) 그 중요성이 인식되고 이들의 기능 및 역할 규명을 위해 저해제의 탐색이 이루어 지고 있다. 현재 까지 알려진 APs 저해제로는 bestatin을 대표로 하여 수종이 있으며, 이들의 각종 생리적 및 번역학적 기능도

많이 밝혀져 있다(6).

저자 등은 새로운 구조의 AP-M 저해제 개발을 목적으로 토양 미생물을 대상으로 저해제를 탐색하였으며 이 중 *Streptomyces griseoplanus* SL20209 분리균주(6)로부터 신규 구조의 valistatin(7)과 기존의 des-asp⁴-amastatin(8) 두 저해제를 분리하였다. 이들 두 저해제는 분자 내의 C-말단에 두 개의 valine을 포함하고 있으며 N-말단으로는 valistatin의 경우 phenylalanine의 유도체인 3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoic acid(AHPA)를, des-asp⁴-amastatin은 leucine의 유도체인 3-amino-2-hydroxy-5-methylhexanoic acid(AHMHA)로 각각 구성된 peptide성 화합물이다. 본 논문에서는 생산균주인 *S. griseoplanus* SL20209를 이용하여 flask 수준에서의 생산에 있어서 탄소원 및 질소원을 중심으로 각종 배지성분이 저해제 생산에 미치는 영향을 조사한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 효소

배지류는 주로 Difco 사, 당류, 질소원 등은 주로 Sigma 사 제품을 사용하였다. AP-M 저해활성 측정용 기질은 합성기질인 L-leucine-p-nitroanilide를, AP-M 효소는 hog kidney로 부터 분리된 것을 Sigma 사로

*Corresponding author.

Key words: *Streptomyces griseoplanus* SL20209, aminopeptidase M inhibitors, fermentation, soybean meal

부터 구입하였다.

균주 및 배양

본 실험에 사용된 AP-M 저해제 생산균주는 Taxon program에 의해 동정된 *Streptomyces griseoplanus* SL20209이며(6), 균주 보존 및 접종원 배지로는 Bennett agar(glucose 10 g, yeast extract 1 g, peptone 2 g, beef extract 1 g, agar 20 g을 물 1l에 녹임)를 사용하였다. 저해제 생산용 기본배지로는 GSS(glucose 10 g, soluble starch 20 g, soybean meal 25 g, yeast extract 4 g, NaCl 2 g, K₂HPO₄ 0.05 g을 물 1l에 녹임)를 사용하였다.

저해제 생산실험은 먼저 GSS 배지 50 ml을 함유하고 있는 baffle이 달린 250 ml 삼각 플라스크에 Bennett 한천 평판으로 부터 *S. griseoplanus* SL20209 균사체를 적당량 접종한 다음 28°C에서 2일간 진탕배양(rotary shaker, 170 rpm)한 배양액을 접종원으로 사용하였다. AP-M 저해제 생산 조건을 위한 실험은 주로 baffle이 달린 250 ml(배지 50 ml) 또는 500 ml 삼각 플라스크(배지 100 ml)를 사용하여 2% 접종원을 첨가한 후 동일조건으로 7일간 배양하였으며 배양 중 시간 별로 0.5 ml의 배양액을 취하여 저해활성을 측정하였다. 시간에 상관없이 배양 중 가장 높은 저해활성을 최대 저해활성으로 하였다.

AP-M 저해활성 측정

AP-M에 대한 저해활성 측정은 이전의 방법(7)에 따라 실시하였다. 저해활성(%)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 흡광도로 부터 다음과 같은 식으로 계산하였다.

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

건조 균체량 측정

배양액의 상등액을 원심분리하여 제거하고 생리 식염수로 2회 세척한 다음 105°C dry oven에서 항량이 될 때까지 건조시킨 후 건조중량을 측정하였다.

결과 및 고찰

GSS 배지에서 저해제 생산의 경시적 변화

생산용 배지인 GSS 배지 100 ml이 함유되어 있는 baffle이 달린 500 ml 삼각 플라스크에서 진탕배양하면서 AP-M 저해활성, pH 및 잔존 환원당을 조사하였다 (Fig. 1). AP-M 저해활성은 3일 배양 후 최대에 도달하였으며 이 때 대부분의 환원당이 소모되었고, 그 후 pH가 알칼리성으로 증가하면서 저해활성이 감소하는 경향을 보였다. 배양초기에 pH가 산성으로 떨어지다가 시간이 경과함에 따라 서서히 알칼리성으로 변화하는 것은 전형적인 방선균의 발효시 발견되는 현상이며 pH의 감소는 당으로 부터 유기산의 생성에 기인한 것

Table 1. Effect of the various carbon sources on the production of AP-M inhibitors by *S. griseoplanus* SL20209.

Carbon sources	Inhibition ^a (Relative, %)	Final ^b pH
GSS medium	500	9.1
No C-source	25	9.2
D-Glucose	100	9.0
L-Arabinose	700	8.5
D-Cellobiose	400	8.8
CM-Cellulose	35	9.2
D-Fructose	200	9.0
D-Galactose	135	9.1
Glycerol	300	8.8
D-Lactose	25	9.0
Maltose	50	9.1
D-Mannitol	250	8.9
D-Mannose	650	8.5
D-Raffinose	50	9.0
L-Rhamnose	25	9.2
D-Sorbitol	25	9.0
D-Sorbose	25	9.0
Soluble starch	650	8.8
D-Xylitol	200	8.8
D-Xylose	600	8.5

*Cells were cultured with shaking for 5 days in GSS medium containing 2% (w/v) of each carbon source.

^aRelative inhibition showing the maximum activity during the cultivation.

^bInitial pH was adjusted to 7.0.

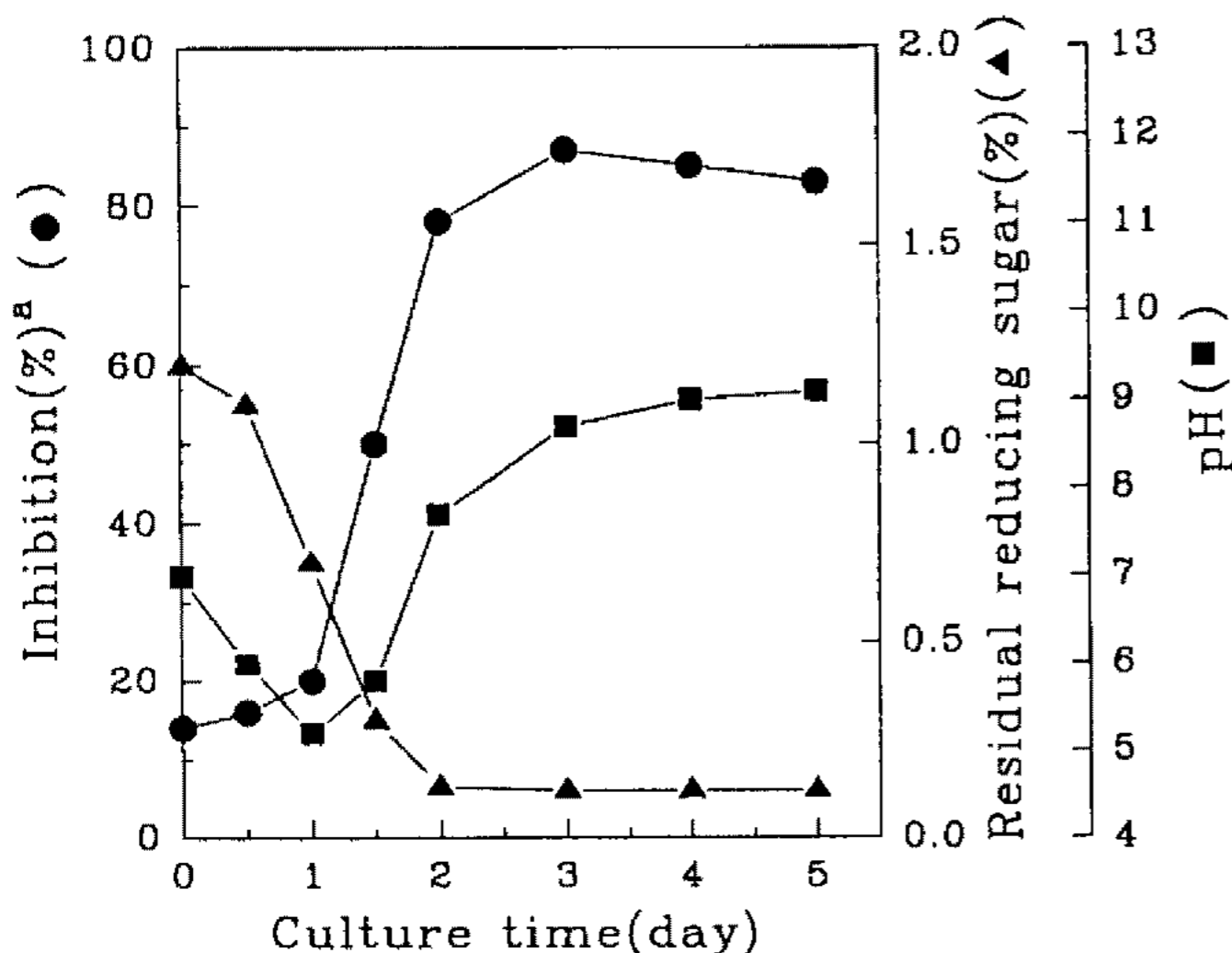


Fig. 1. Time course of the production of AP-M inhibitors by *S. griseoplanus* SL20209.

^aInhibitory activity of 5 μl of culture filtrate.

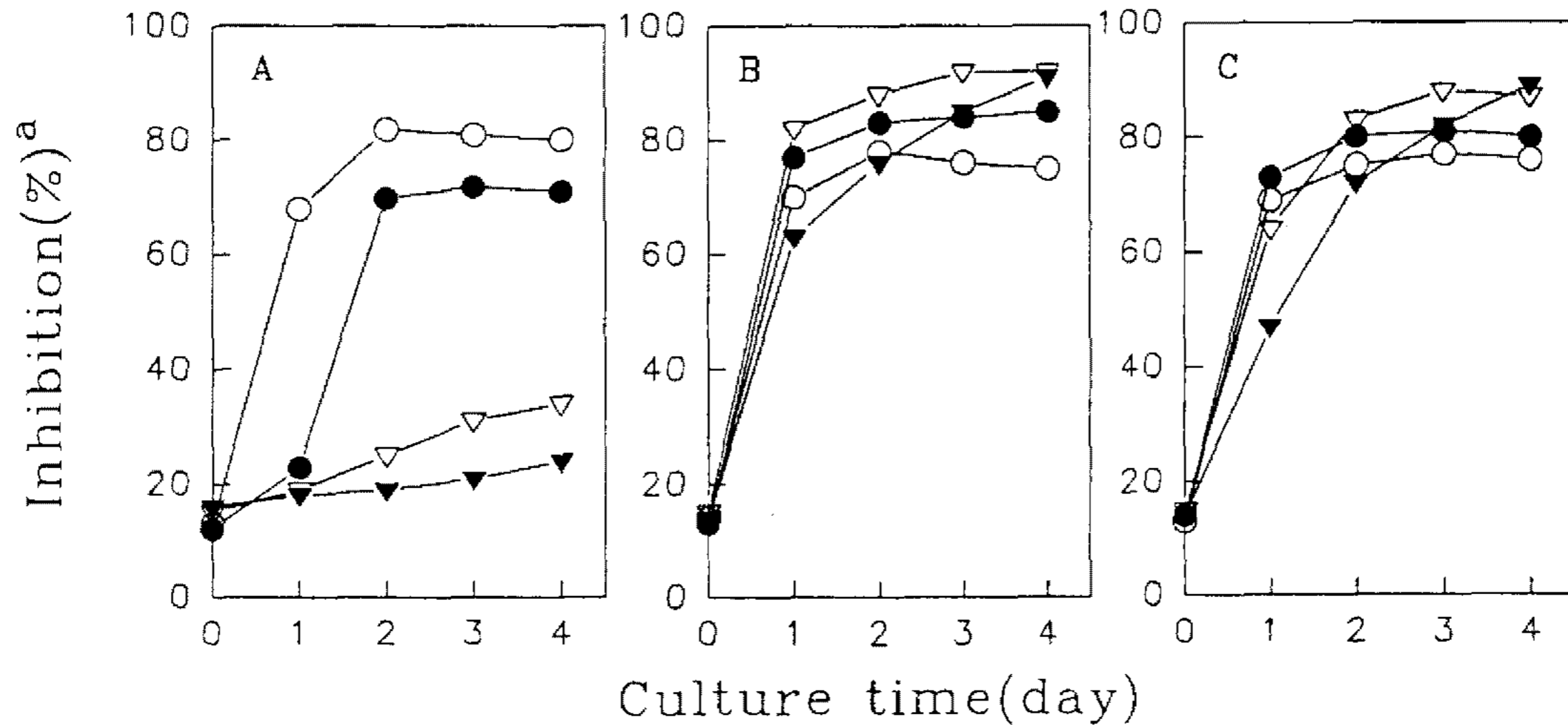


Fig. 2. Effect of the concentration of carbon sources, glucose (A), arabinose (B), and mannose (C), on the production of AP-M inhibitors by *S. griseoplanus* SL20209.

○; 0.5%, ●; 1.0%, ▽; 2.0%, ▼; 3.0%.

^aInhibitory activity of 10 μ l (A) and 5 μ l (B, C) of culture filtrate, respectively.

으로 추정되었다.

탄소원의 영향

탄소원인 glucose와 가용성 전분 대신 각종 탄소원(2%, w/v)을 달리한 GSS 배지에 *S. griseoplanus* SL20209를 접종한 다음 시간 별로 저해활성을 조사한 후 각각 활성이 최대에 도달했을 때의 저해활성을 상대적으로 비교하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 오탄당인 arabinose와 xylose, 육탄당인 mannose, 그리고 다당류인 가용성 전분을 포함하는 배지에서 glucose가 포함된 배지보다 6~7배 높게 나타났으며 D-cellobiose, D-fructose, glycerol 및 D-mannitol 등에서도 높은 저해활성을 보였다. 배양이 끝난 각 배지의 최종 pH는 저해활성이 높은 arabinose나 mannose 등의 배지에서 GSS 배지 보다 다소 낮았다. AP-B 저해제로 알려진 bestatin (9)과 *Penicillium rugulosum* 곰팡이로 부터 생산된 OF 4949(10)의 경우 glucose, galactose, lactose 및 maltose가 저해제 생산에 좋은 탄소원으로 보고되었고, 본 논문에서와 같이 arabinose나 xylose와 같은 오탄당이 저해제 생산에 매우 좋은 탄소원이라는 보고는 특이한 것이다.

저해활성이 매우 낮았던 glucose와 저해활성이 가장 높게 나타난 arabinose 및 mannose의 보다 자세한 효과를 알아보기 위해 이들 세 당을 각각 농도별로 첨가하여 저해활성 변화를 조사한 결과(Fig. 2), glucose의 경우 0.5% 첨가시 저해활성이 가장 높았고 그 이상 농도가 증가할 수록 활성이 낮아진 반면, arabinose나 mannose를 첨가한 배지에서는 2% 농도에서 활성이 가장 높았으며 3%의 농도에서도 생성시간은 약간 지연되었으나 최대 저해활성은 거의 비슷하였다. 따라서, 배지내의 과량의 glucose는 AP-M 저해제 생산을 강

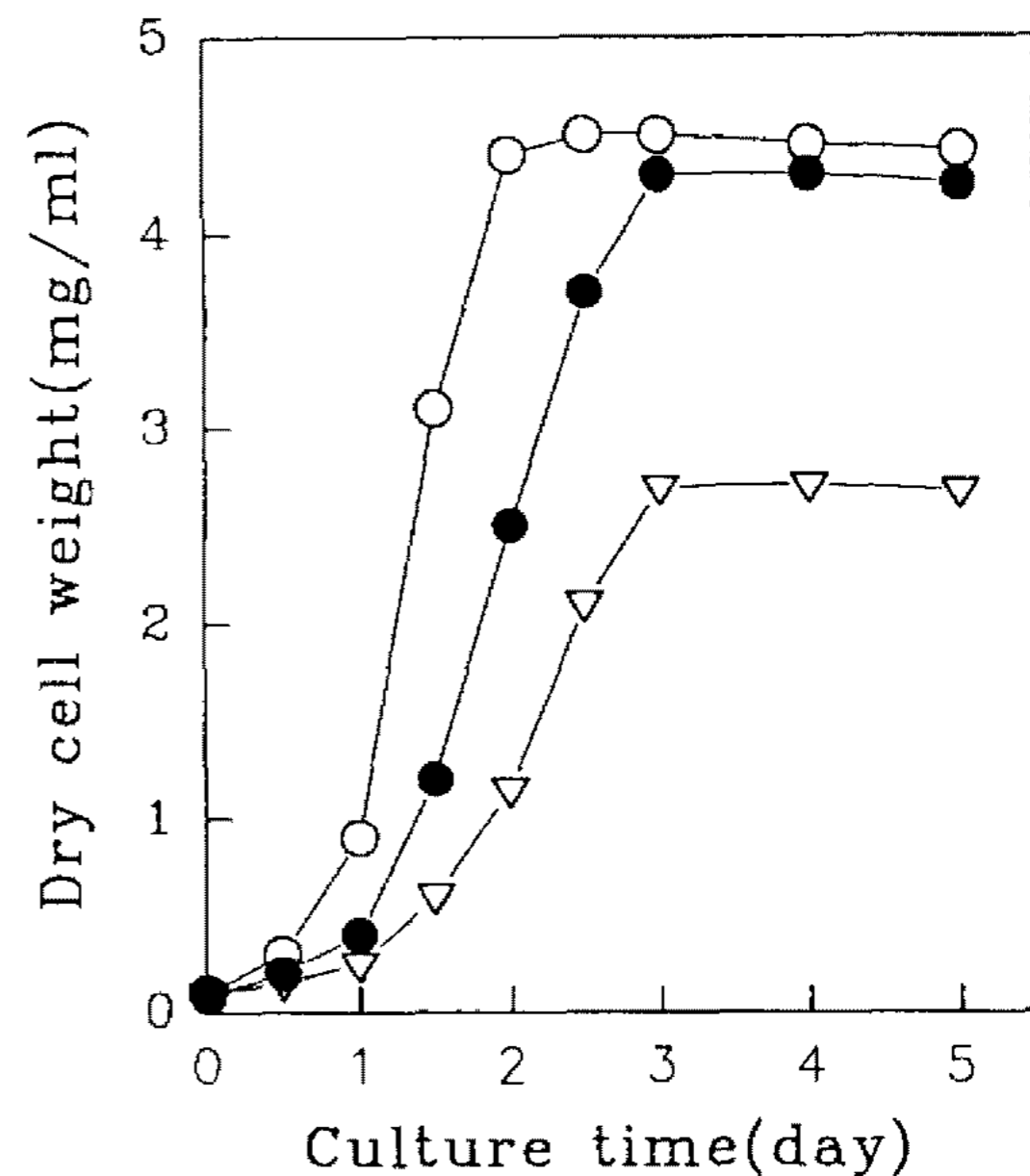


Fig. 3. Growth of *S. griseoplanus* SL20209 on the modified Bennett medium containing 2% of glucose (○), arabinose (●), and mannose (▽), respectively.

하게 저해하며 arabinose나 mannose는 저해하지 않음을 알 수 있었다. 한편, 이들 세 가지 당들이 *S. griseoplanus* SL20209의 생육에 미치는 영향을 알아보기 위해 soybean meal(SBM)과 같은 불용성 잔유물이 포함되지 않은 Bennett 배지에 각 탄소원(2%)을 첨가하고 배양 중 균체량의 변화로 생육도를 조사한 결과(Fig. 3), 이들 세 당은 각각 다른 생육양상을 나타내었다. 즉, 2% glucose가 포함된 GSS 배지에서 저해제의 생산은 강하게 저해되었으나(Table 1), 동일 농도에서 *S. griseoplanus* SL20209의 균체량은 빠르게 증가하여 약 48시간에 거의 정지기에 도달하였다. Arabinose의 경우 정지기에

도달하는 시간이 glucose에 비해 약 24시간 정도 지연되었으나 이 때의 균체량은 비슷한 수준이고 mannose의 경우 arabinose와 거의 비슷한 시기에 균체량이 최대에 도달하였으나 균체량이 glucose 배지의 약 2/3에 불과하였다. 따라서, glucose는 *S. griseoplanus* SL20209의 균체생육에는 좋으나 저해제의 생산을 저해하였으며 이들 세 가지 당은 당 이용성에 있어서 뚜렷한 차이가 있는 것으로 생각되었다. 이러한 결과로부터 glucose는 *S. griseoplanus* SL20209의 AP-M 저해제 생산에 있어서 균생육에는 좋으나 이차대사산물인 저해제의 생합성을 강하게 저해하는 catabolite repressor로 작용할 것으로 판단되었다. 또한, arabinose나 mannose의 효과는 이들 당이 미생물의 당 대사 특성상 glucose에 비해 그 이용속도가 느리므로 균 생육을 지연시킨 결과이거나 또는, 이들 당 자체가 이 균에서 AP-M 저해제의 생합성을 저해하지 않은 결과에 기인한 것으로 추측된다. 일반적으로 glucose와 같이 쉽게 이용 가능한 기질은 그 자체가 이차 대사산물의 생합성 관련 효소들을 저해할 뿐만 아니라 방선균 발효에서도 과량의 glucose가 존재할 때 pyruvic acid 및 α -ketoglutaric acid 등의 축적으로 이들에 의한 간접적인 저해효과도 초래할 수 있는 것으로 알려져 있으며(4, 11), 항생제 발효의 경우 glucose가 주로 생합성 관련효소를 저해하므로써 최종

산물의 생산을 저해한다는 보고(11, 12)도 있다.

질소원의 영향

GSS 배지의 soybean meal(SBM) 대신 각종 질소원을 달리하여 배양 중 저해활성을 조사한 후 최대 저해활성을 비교한 결과(Table 2), SBM, fish meal, gluten meal 및 peanut powder와 같은 천연 유기질소원이 함유된 배지에서 높은 저해활성을 보였으며, 부분적인 가수분해물인 soytone, peptone 및 casamino acid 등이 함유된 배지에서는 저해활성이 낮게 나타났다. 또한, NH₄Cl 등의 무기 질소원에서는 균 생육도 빈약하였으며 저해물질도 거의 생산되지 않는 것으로 판단되었다. 저해활성이 높게 나타난 천연 유기질소원 중에서 방선균의 이차 대사산물의 생산용 배지의 질소원으로 가장 널리 사용되는 SBM을 농도별로 첨가하여 저해활성을 조사한 결과(Fig. 4), 3%의 농도에서 4일 배양 후 가장 높은 저해활성을 보였으며 그 이상 농도가 증가할 수록 활성은 조금씩 증가하나 최대 저해활성에 도달하는 시간이 지연되었다. Bestatin(9)은 yeast extract와 SBM이, amastatin(13)은 cotton seed meal과 corn steep liquor (CSL)를, actinonin(14)은 CSL과 corn gluten meal을, 그리고 probestin(15)은 soya meal을 각각 생산용 배지의 질소원으로 사용하였으므로 본 실험 결과와 같이 유기 질소원이 대체적으로 좋은 것으로 나타났다. 그러나, OF4949(10)의 경우에는 질소원으로 SBM 대신 soytone이 포함된 배지에서도 저해제 생산이 우수한 것으로 보고되어 차이를 보였다. 위의 결과로부터, *S. griseoplanus* SL20209는 valistatin과 des-asp⁴-amastatin의 두 AP-M 저해제의 생합성 기질로서 배지내에

Table 2. Effect of the various nitrogen sources on the production of AP-M inhibitors by *S. griseoplanus* SL20209

Nitrogen sources	Inhibition ^a (Relative, %)	Final ^b pH
No N-source	20	8.0
Soybean meal	100	9.1
Fish meal	120	9.1
Corn meal	35	5.3
Corn steep solid	35	8.8
Corn steep liquor	20	8.8
Corn seed flour	80	8.8
Gluten meal	130	9.0
Peanut powder	100	8.9
Casein	25	9.1
Soytone	50	9.0
Peptone	25	9.0
Neopeptone	25	9.1
Casamino acids	30	8.9
NH ₄ Cl	20	4.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	20	4.0
NaNO ₃	20	8.0
NH ₄ NO ₃	20	4.0

*Cells were cultured with shaking for 5 days in GSS medium containing 2.5% (w/v) of each nitrogen source.

^aRelative inhibition showing the maximum activity during the cultivation.

^bInitial pH was adjusted to 7.0.

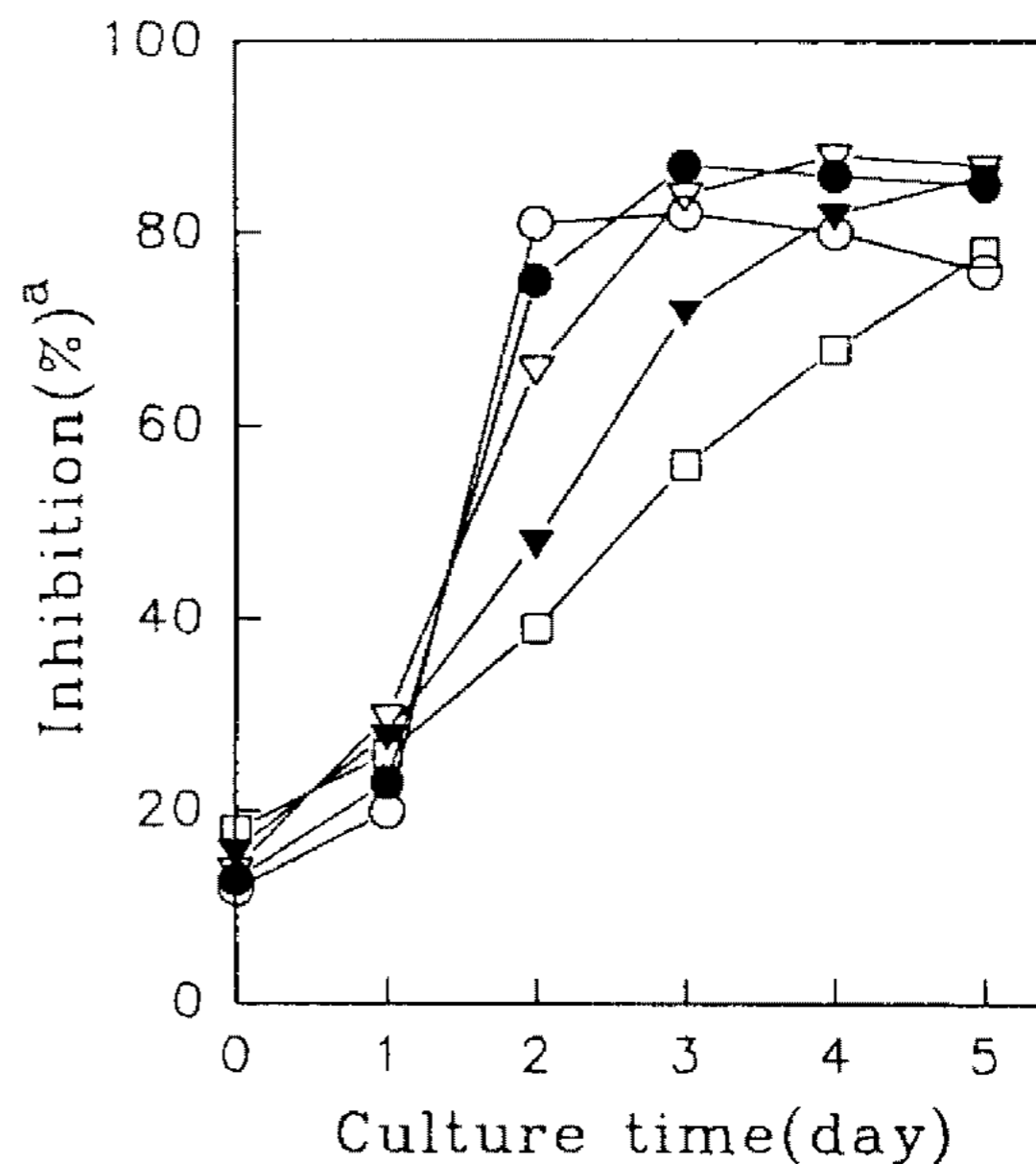


Fig. 4. Effect of the concentration of soybean meal on the production of AP-M inhibitors by *S. griseoplanus* SL20209.
 ○; 1.0%, ●; 2.0%, ▽; 3.0%, ▼; 4.0%, □; 6.0%.
^aInhibitory activity of 5 μl of culture filtrate.

존재하는 유리 아미노산 또는 oligopeptides를 직접 이용하는 것이 아니라, SBM과 같은 천연 유기질소원을 자신의 특이적인 단백질 분해효소로 분해한 다음 이로부터 생성된 아미노산, oligopeptides 또는 그 유도체를 사용할 것으로 추정되었다. 물론 soytone 및 peptone이 함유된 배지에서 균 생육은 우수하며 이들의 농도를 증가시키면 저해활성이 다소 증가하나 이는 *S. griseoplanus* SL20209에 의해 생성된 저해제에 의한 것이 아니라 APs가 일반적인 oligopeptides에 의해서도 약간의 저해를 받기 때문에(16) 이들 내에 존재하는 각종 peptides에 의한 저해효과일 것으로 판단되며 그 활성도 SBM을 비롯한 다른 천연 유기질소원 배지에 비해 훨씬 낮은 정도이다(data not shown).

Yeast extract의 영향

GSS 배지에 yeast extract를 농도별로 첨가하여 저해활성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 5). Yeast extract를 첨가하지 않았을 때 저해활성은 낮았고 활성의 증가속도도 감소하였으나 yeast extract를 첨가함으로써 활성이 빠르게 증가하였다. 0.5% 첨가시 저해활성이 가장 높았으며 그 이상의 농도로 첨가할 경우 저해제의 생산속도는 빨라졌으나 최대 저해활성은 감소하였다. 이러한 현상은 질소원으로서 뿐만 아니라 생육인자로서 균생육을 촉진시킨 결과로 추정되었다.

K₂HPO₄의 영향

미생물 발효에서 무기인산은 균 생육을 촉진시키지만 이차 대사산물의 생성을 억제하는 효과를 나타내는 경우도 많다. 따라서 배지내의 무기인산이 저해제 생산에

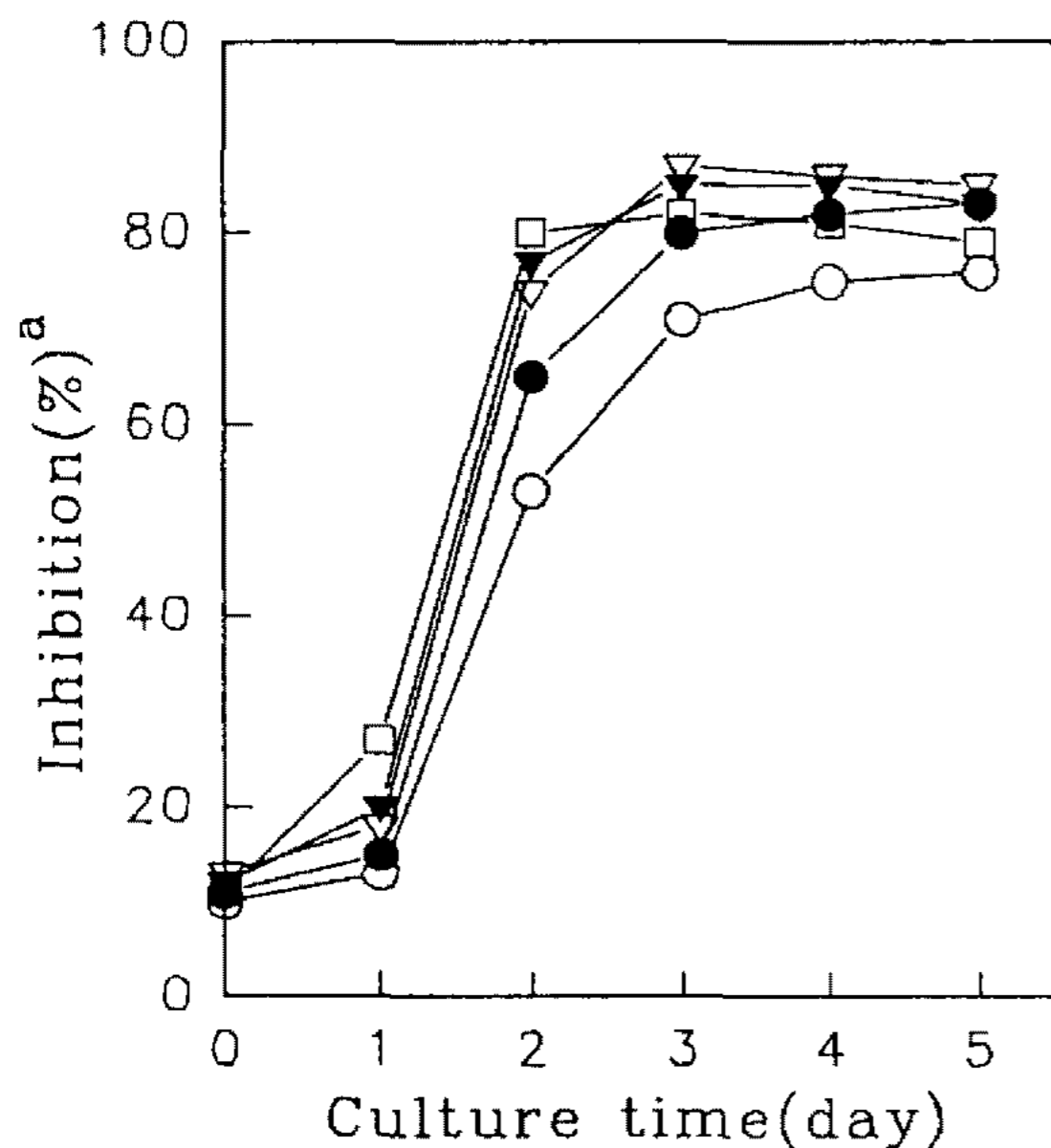


Fig. 5. Effect of yeast extract on the production of AP-M inhibitors by *S. griseoplanus* SL20209.
○; No addition, ●; 0.2%, ▽; 0.5%, ▼; 1.0%, □; 1.5%.
^aInhibitory activity of 5 μl of culture filtrate.

미치는 영향을 알아보기 위해 K₂HPO₄를 농도 별로 첨가하여 저해활성을 측정해 본 결과(Fig. 6), 첨가하지 않은 배지에 비해 첨가한 배지에서 저해활성의 생성속도가 촉진되었으며 최대 저해활성도 증가되었다. 0.05% 첨가시 가장 활성이 높았으며 0.5% 첨가시 2일 배양 때까지는 빠르게 증가하다가 그 후 더 이상의 활성 증가가 관찰되지 않았으나 뚜렷한 활성감소도 발견되지 않았다. 따라서, *S. griseoplanus* SL20209의 경우 무기인산은 균생육을 촉진시켜 저해제의 생산을 다소 증가시켰으며, 무기인산에 의해 저해제 생합성이 저해되지는 않는 것으로 판단되었다.

CaCO₃의 첨가효과

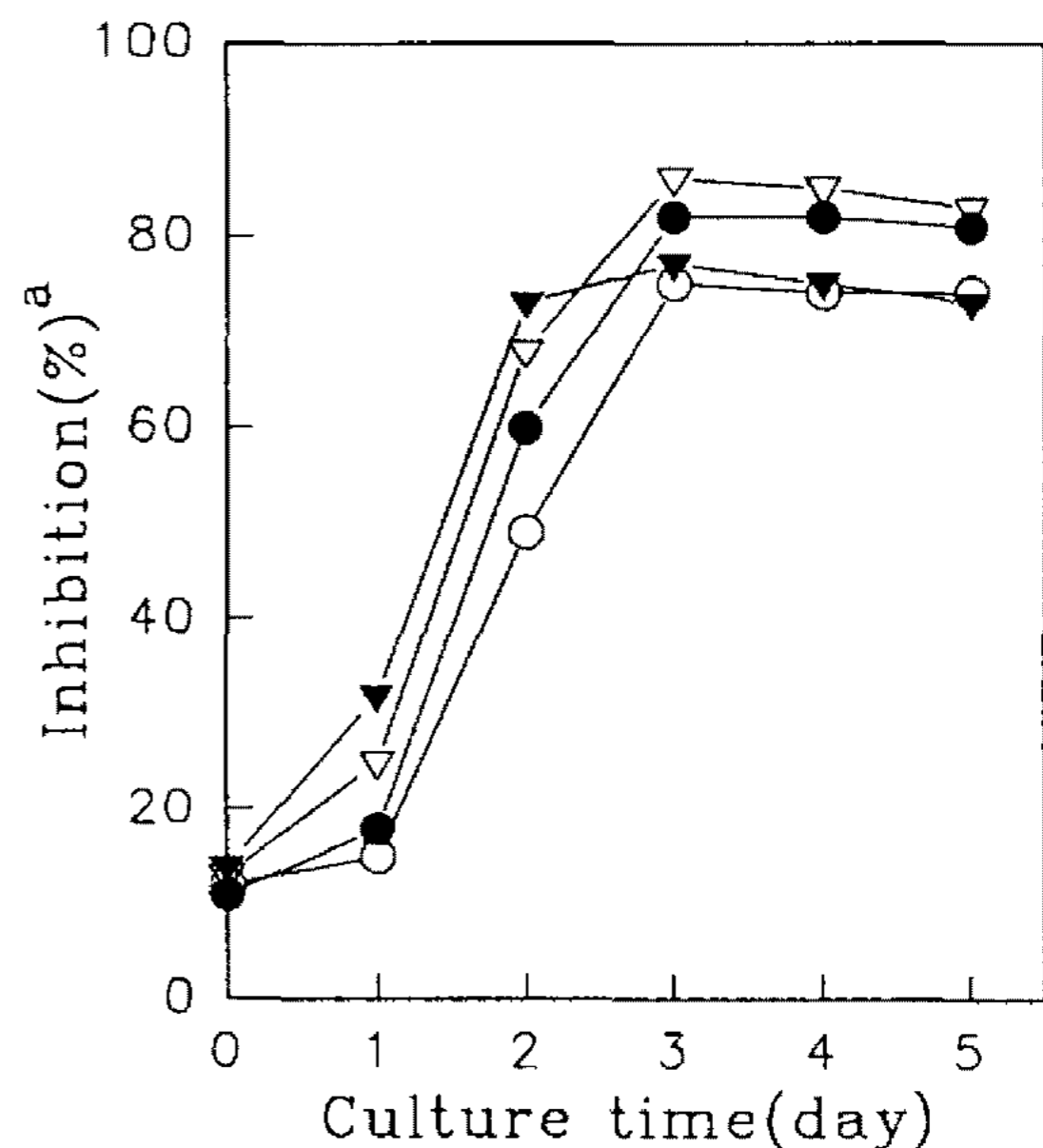


Fig. 6. Effect of K₂HPO₄ on the production of AP-M inhibitors by *S. griseoplanus* SL20209.
○; No addition, ●; 0.01%, ▽; 0.05%, ▼; 0.5%.
^aInhibitory activity of 5 μl of culture filtrate.

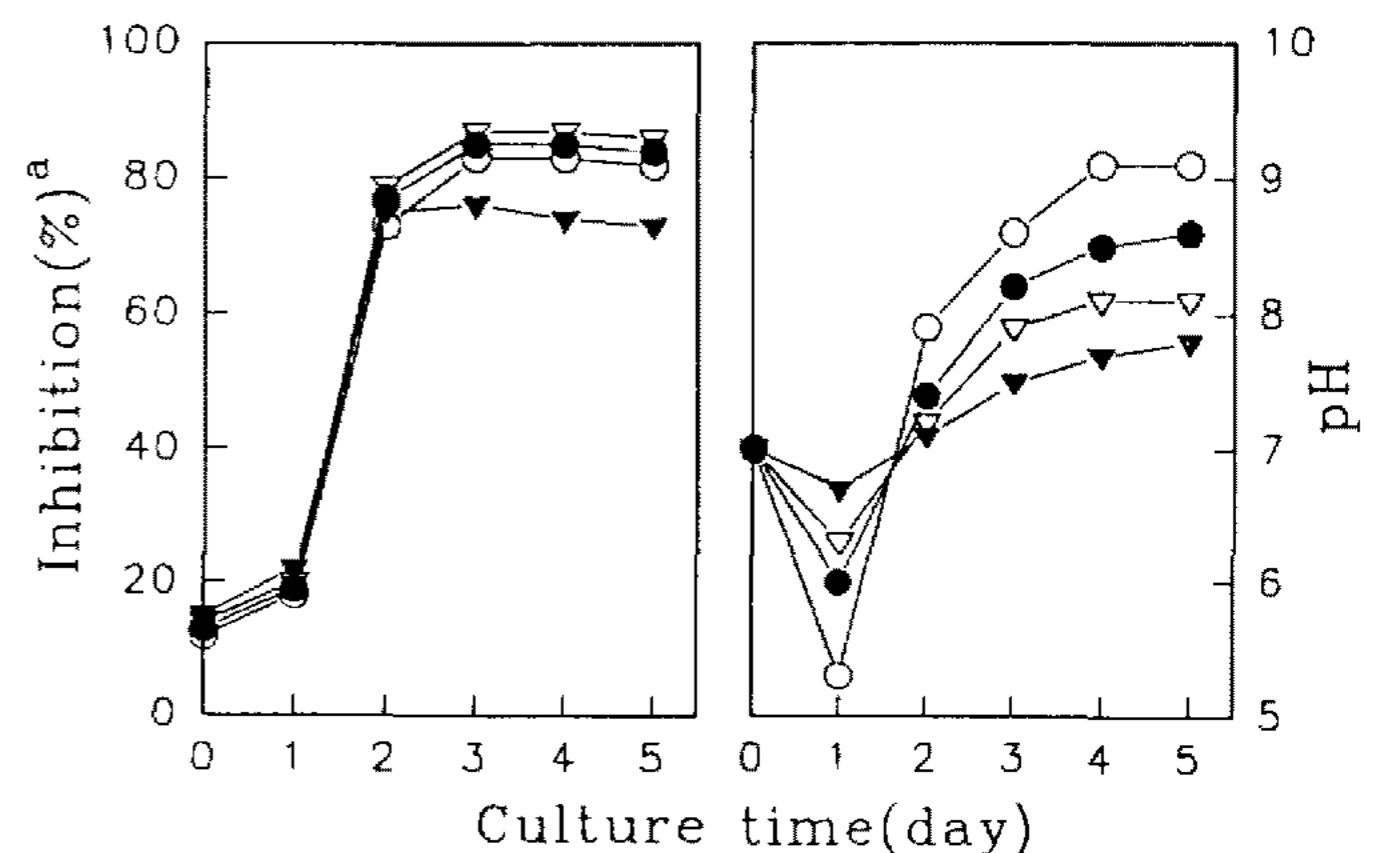


Fig. 7. Effect of CaCO₃ on the production of AP-M inhibitors by *S. griseoplanus* SL20209.
○; No addition, ●; 0.1%, ▽; 0.3%, ▼; 0.6%.
^aInhibitory activity of 5 μl of culture filtrate.

S. griseoplanus SL20209는 Fig. 1에서 본 바와 같이 배양 초기에 pH가 낮아졌다가 그 후 서서히 증가하면서 저해활성이 최대에 도달한 3일 이후 pH가 점차적으로 증가하여 9 이상으로 되면서 활성이 다소 감소하므로 완충능을 지닌 CaCO₃를 첨가하여 저해활성 및 pH의 변화를 조사하였다(Fig. 7). CaCO₃ 첨가시 무첨가시보다 최대 저해활성이 다소 높았고 0.3% 첨가시 활성이 가장 좋았으며 0.6% 이상 첨가시 배양 2일 이후 활성이 감소하는 경향을 보였다. CaCO₃ 첨가시 pH는 첨가하지 않은 경우에 비해 그 변화폭이 적은 것으로 나타나 배양 중 배지의 pH 변화폭을 적절히 조절하면 저해제 생산성을 증가시킬 것으로 추정되었다. Probestin(15)의 경우 생산배지에 0.32%의 CaCO₃를 첨가하여 배양중 pH가 6.8~7.8로 변화하는 생산곡선이 보고되었고 amastatin(13)의 생산시에는 1%의 CaCO₃를 첨가하여 배양하였다.

Natural zeolite의 영향

방선균에 의한 이차 대사산물의 생산시 균사체가 서로 얽히는 응집현상으로 산소 및 영양분의 전달이 방해 받을 수 있다. 따라서, 배양 중 균사체의 응집을 방지하는 것으로 알려진 natural zeolite(공업용)를 첨가하여 저해활성을 조사해 본 결과(Fig. 8), zeolite의 첨가는 배양 초기에 저해제 생산속도를 약간 지연시켰으나 최대 저해활성은 첨가하지 않은 배지에서 보다 높았으며 0.5% 첨가시 가장 좋은 것으로 나타났다.

배양온도의 영향

GSS 배지 50 ml를 함유하고 있는 baffle이 달린 250

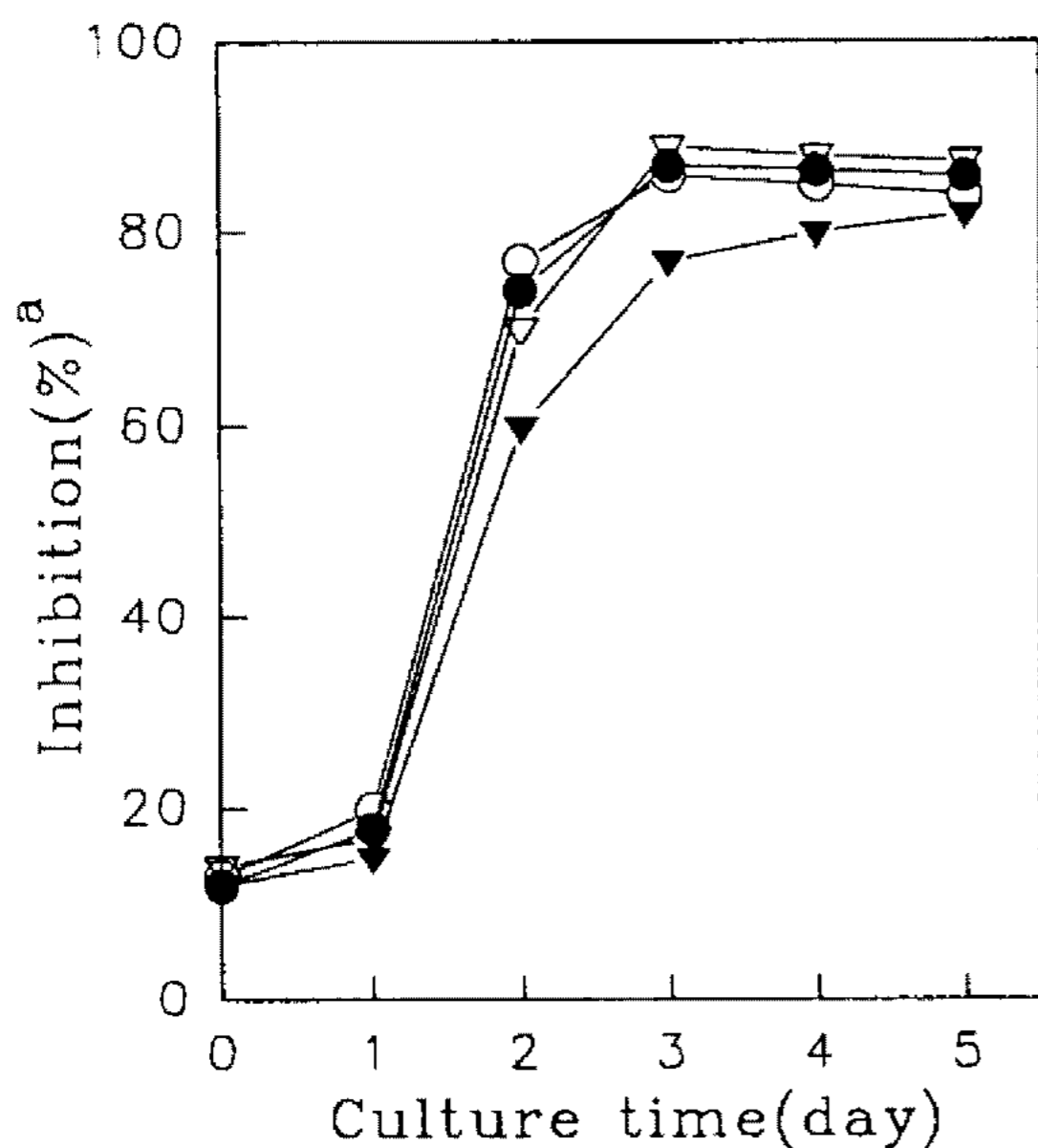


Fig. 8. Effect of natural zeolite on the production of AP-M inhibitors by *S. griseoplanus* SL20209.
○; No addition, ●; 0.2%, ▽; 0.5%, ▼; 1.0%.
^aInhibitory activity of 5 μl of culture filtrate.

ml 삼각 플라스크에 *S. griseoplanus* SL20209를 접종 원으로 2% 첨가한 후 각각의 온도에서 진탕배양하면서 24시간 간격으로 저해활성을 조사해 본 결과(Fig. 9), 28°C에서 가장 높은 활성을 보였으며, 32°C 이상의 온도에서는 저해활성이 현저히 낮아졌다.

초기 pH의 영향

HCl 또는 NaOH로 pH가 조절된 각각의 GSS 배지에서 배양 중 저해활성을 조사해 본 결과(Fig. 10), pH

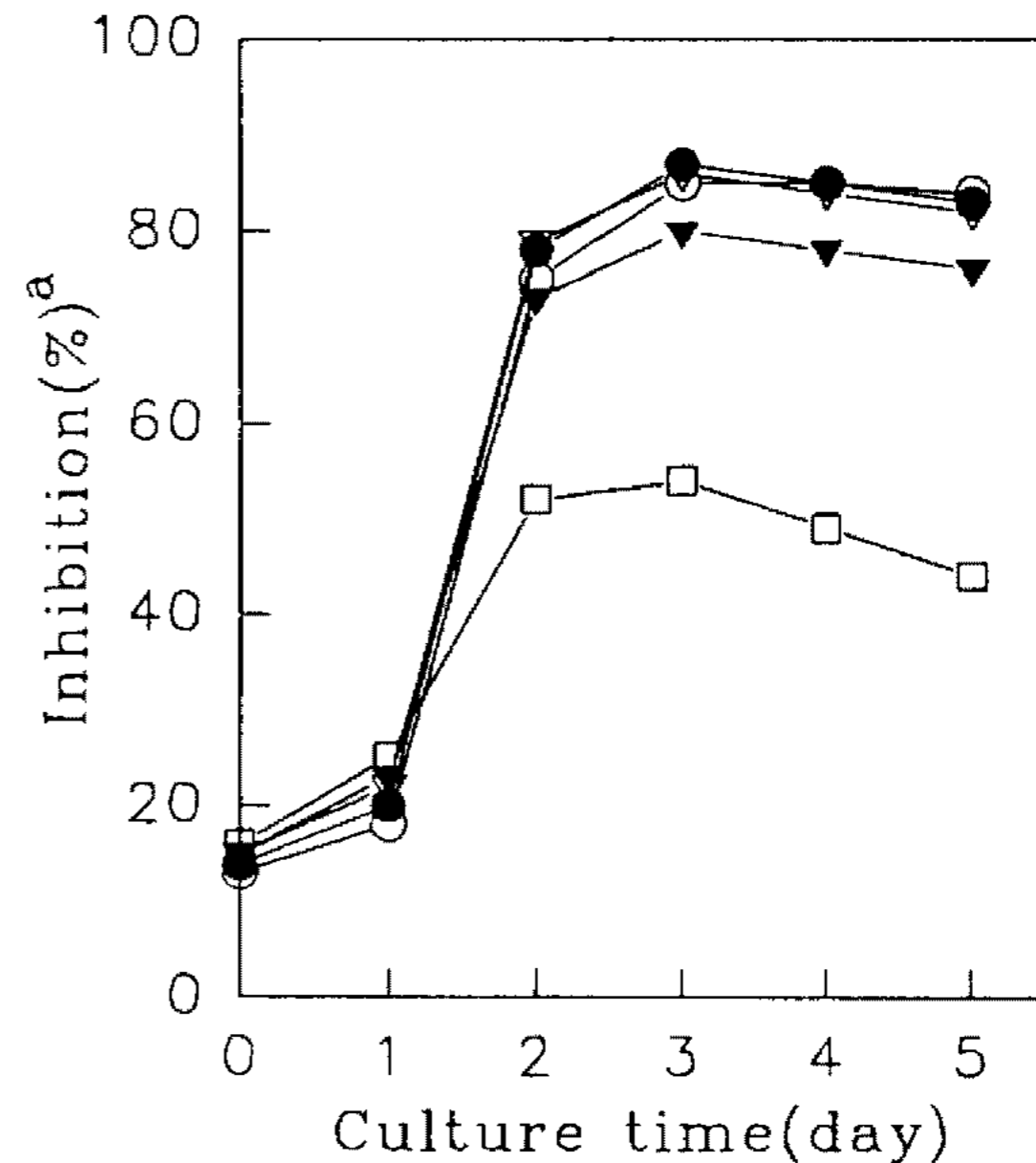


Fig. 9. Effect of temperature on the production of AP-M inhibitors by *S. griseoplanus* SL20209.
○; 25°C, ●; 28°C, ▽; 30°C, ▼; 32°C, □; 35°C.
^aInhibitory activity of 5 μl of culture filtrate.

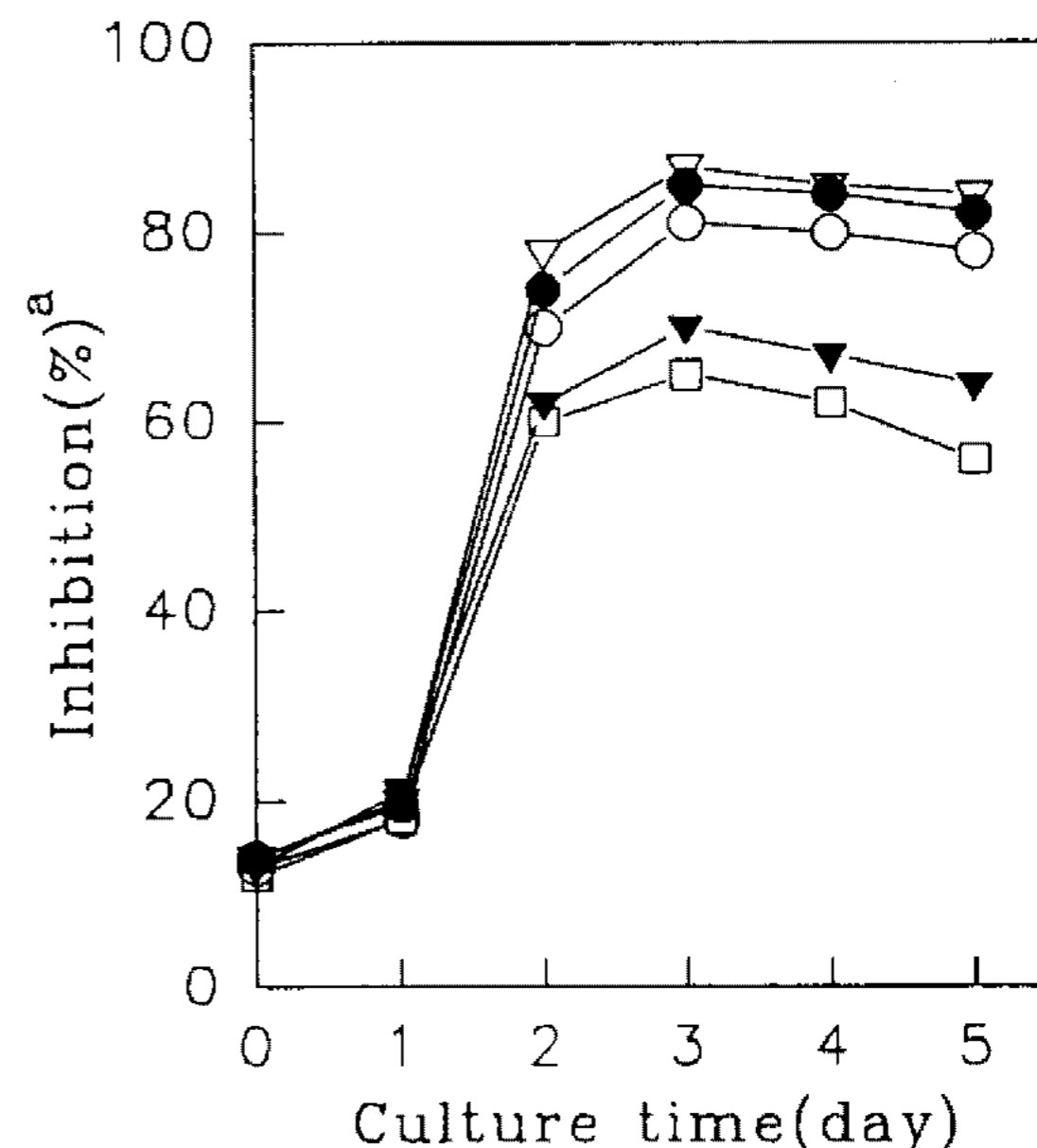


Fig. 10. Effect of initial pH on the production of AP-M inhibitors by *S. griseoplanus* SL20209.
^aInhibitory activity of 5 μl of culture filtrate.

Table 3. Production of the AP-M inhibitors by *S. griseoplanus* SL20209 on the improved media, ASY and SSY

Components (%, w/v)	ASY	SSY	GSS
Glucose			1
Arabinose	3		
Soluble starch		3	
Soybean meal	2.5	2.5	2.5
Yeast extract	0.5	0.5	0.4
Beef extract			0.1
K ₂ HPO ₄	0.05	0.05	0.025
NaCl			0.2
CaCO ₃	0.1	0.1	
Zeolite	0.3	0.3	
Initial pH	6.8	6.8	7.0
Inhibition (%) ^a	180	180	100

*Cells were cultured with shaking for 5 days.

^aRelative inhibition showing the maximum activity during the cultivation.

6.0에서는 4일 후, pH 7.0에서는 3일 후 각각 가장 높은 저해활성을 보였으며, 산성 조건 하에서는 저해활성이 약간 감소하였으나 알카리 조건에서는 저해활성이 크게 감소하였다.

개선된 조건에서 저해제의 생산

앞의 결과를 토대로 배지 및 배양 조건을 조절하여 저해제의 생산성을 증진하고자 하였다. 탄소원으로는 GSS 배지의 glucose(1%)와 soluble starch(2%) 대신에 3%의 arabinose 또는 soluble starch의 단일 탄소원을 첨가하였으며, 질소원으로는 앞의 결과(Table 2)에서 gluten meal이 가장 좋은 질소원이었으나 SBM과 저해활성에 큰 차이가 인정되지 않아 SBM을 질소원으로 사용하였다. Yeast extract는 0.5%, K₂HPO₄는 0.05%를 첨가하였으며 CaCO₃와 zeolite는 앞의 결과(각각 Fig. 7, 8)에서 나타난 최적 농도로 동시에 첨가할 경우 저해활성이 다소 감소되는 경향이 예비실험에서 나타나 CaCO₃는 0.1%, zeolite는 0.3%로 각각 농도를 낮추어 첨가하였다. 또한, 예비실험에서 GSS 배지에서 beef extract와 NaCl을 제거한 배지가 저해활성에 아무런 변화를 보여주지 않아 이 두 성분은 제외시켰다. 이상의 결과로 부터 탄소원만 각각 arabinose와 soluble starch로 바뀐 ASY 및 SSY 두 가지의 새로 조제된 배지에 *S. griseoplanus* SL20209를 접종하여 배양 중 저해활성을 측정된 결과(Table 3), ASY 및 SSY 배지 모두 GSS 배지에 비해 최대 저해활성이 약 1.8배 증가되었다.

요 약

생산용 배지(GSS) 100 ml을 포함하는 500 ml 삼각 플라스크에서 *Streptomyces griseoplanus* SL20209를 28°C, 3일간 배양했을 때 aminopeptidase M(AP-M) 저해제 생산이 최대에 도달하였으며, 그 이후 pH가 알카리성으로 변하면서 다소 감소하였다. Arabinose, xylose, mannose 및 soluble starch가 저해제 생산에 좋은 탄소원인 반면, glucose는 균생육에는 좋으나 저해제 생산은 강하게 저해하였다. Soybean meal, fish meal, gluten meal 및 peanut powder와 같은 천연 유기질소원이 저해제 생산에 좋은 질소원이었으며, soytone이나 peptone 및 NH₄Cl과 NH₄NO₃와 같은 무기질소원이 함유된 배지에서는 저해제 생산이 빈약하였다. 배지내에 각각 0.5%(w/v)의 yeast extract나 0.05%의 K₂HPO₄의 첨가는 균생육을 촉진시켜 저해제 생산을 증가시켰으며, CaCO₃(0.3%)와 zeolite(0.5%)도 저해제 생산 증가의 효과를 나타내었다. 저해제 생산을 위한 최적 배양온도 및 초기 pH 범위는 각각 28°C와 6.0~7.0이었다. Arabinose(ASY 배지) 또는 soluble starch(SSY 배지) 3%, SBM 2.5%, yeast extract 0.5%, K₂HPO₄ 0.05%, CaCO₃ 0.1% 및 zeolite 0.3%(pH 6.8)의 조성의 두 개선된 배지에서 초기의 GSS 배지에서 보다 저해제 생산이 1.8배 증가되었다.

참고문헌

1. 鶴 大典·船津 勝. 1993. 蛋白質 分解酵素 II. 生物化學實驗法 31. Pp. 18-29. 學會出版센터(日本).
2. Giros, B., C. Gros, B. Solhome, and J.-C. Schwartz. 1986. Characterization of aminopeptidase responsible for inactivating endogenous Met⁵ enkephalin in brain slice using peptidase inhibitors and anti-aminopeptidase N antibodies. *Mol. Pharmacol.* **29**: 281-187.
3. Gros, C., B. Giros, and J.-C. Schwartz. 1985. Identification of aminopeptidase M as an enkephalin-inactivating enzyme in rat cerebral membrane. *Biochem.* **24**: 2179-2185.
4. Aoyagi, T. 1990. Small molecular protease inhibitors and their biological effects. Pp. 312-363. In H. Klein-kauf & H. Dohren (eds.), *Biochemistry of Peptide Antibiotics*, Walter de Gruyter, Berlin.
5. Aoyagi, T., H. Suda, M. Nagai, K. Ogawa, J. Sizuki, T. Takeuchi, and H. Umezawa. 1976. Aminopeptidase activities on the surface of mammalian cells. *Biochem. Biophys. Acta.* **452**: 131-143.
6. 고학룡, 전효곤, 정명철, 서현효, 고영희. 1996. Aminopeptidase M 저해제인 Valistatin과 des-Asp⁴-Amastatin을 생산하는 지방선균 SL20209의 특성 및 동정. *한국산업미생물학회* **24**: 1-8.
7. Ko, H.R., H.K. Chun, M.C. Jung, and Y.H. Kho. 1995. Valistatin(3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl-valyl-valine), a new aminopeptidase M inhibitor, produced by *Streptomyces* sp. SL20209. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 36-40.
8. Ko, H.R., H.K. Chun, S.H. Kim, N.K. Sung, and Y.H. Kho. 1995. des-Asp⁴-amastatin, MRK22 as an inhibi-

- tor of aminopeptidase M produced by *Streptomyces* sp. SL20209. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 154-157.
9. Umezawa, H., T. Aoyagi, H. Suda, M. Hamada, and T. Takeuchi. 1976. Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. *J. Antibiotics* **29**: 97-99.
 10. Sano, S., K. Ikai, H. Kuroda, T. Nakamura, A. Obayashi, Y. Ezure, and H. Enomoto. 1986. OF4949, new inhibitors of aminopeptidase B. I. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiotics* **39**: 1674-1684.
 11. Tanaka, S. 1992. Fermentation processes in screening for new bioactive substances. Pp. 303-326. In S. Omura (ed.), *The search for bioactive compound from microorganisms*, Springer-Verlag, New York.
 12. Zanca, D.M. and J.F. Martin. 1983. Carbon catabolite regulation of conversion of penicillin N into cephalosporin C. *J. Antibiotics* **36**: 700-708.
 13. Aoyagi, T., H. Tobe, F. Kojima, M. Hamada, T. Takeuchi, and H. Umezawa. 1978. Amastatin, an inhibitor of aminopeptidase A, produced by actinomycetes. *J. Antibiotics* **31**: 636-638.
 14. Umezawa, H., T. Aoyagi, T. Tanaka, H. Suda, A. Okuyama, H. Naganawa, M. Hamada, and T. Takeuchi. 1985. Production of actinonin, an inhibitor of aminopeptidase M, by actinomycetes. *J. Antibiotics* **38**: 1629-1630.
 15. Aoyagi, T., S. Yoshida, Y. Nakamura, Y. Shigihara, M. Hamada, and T. Takeuchi. 1990. Probestin, a new inhibitor of aminopeptidase M, produced by *Streptomyces azureus* MH663-2F6. I. Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. Antibiotics* **43**: 143-148.
 16. Aoyagi, T. 1990. Small molecular protease inhibitors and their biological effects. In *Biochemistry of peptide antibiotics*, H. Kleinkauf & H. Dohren, Walter de Gruyter, Berlin, Pp. 312-363.

(Received 28 December 1995)