

방선균이 생성하는 단백질 가수분해효소 저해물질의 생산

김 중 배

상지대학교병설전문대학 식품영양과

Production of Protease Inhibitor from *Streptomyces* sp. SK-862

Jung-Bae Kim

Dept. of Food and Nutrition, Sangji Junior College

660 Usan, Wonju, Kangwon, 220-702, Korea

Abstract

A inhibitor acting on substrate proteolytic enzyme was isolated from culture broth of *Streptomyces* sp. SK-862, which had been isolated from soil in Wonju City, by using the colloidal chitin agar medium. The optimum culture temperature and initial pH for the production of the protease inhibitor was 28°C and pH 8.5, respectively. The optimum culture medium was composed of 1.5% glucose, 0.5% peptone, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% CaCO₃ and initial pH 8.5. The inhibitor production was maximum when the strain was incubated in shaking incubator at 70 strokes for 60 hours.

Key words : protease inhibitor, *Streptomyces* sp., production.

서 론

1942년 Waksman이 방선균에서 결핵과 그람양성 및 음성균에 유효한 streptomycin을 발견한 이후¹⁾ 방선균을 중심으로 새로운 활성물질의 탐색이 시작되면서 1만 여종의 다양한 생리활성물질이 알려져 있으며^{2,3)}, 그 중에서 방선균이 50% 이상을 차지하고 있다^{4,5)}. 근래에 개발된 유용한 생리활성물질 중에는 항암제, 항바이러스제, 면역억제제 및 증강제, 에이즈 치료제, 고혈압, 당뇨병 치료제 등이 있다^{6~9)}. 단백질 가수분해효소 저해제는 효소의 촉매기능을 저해시키는 물질이다¹⁰⁾. 단백질 가수분해효소 저해제의 주목할만한 약리작용으로는 소염제, 물질의 염증 제거 작용, 혈액의 항응고작용, 항암작용(결장, 식도, 유선, 간장, 림프 종양) 등이 알려져 있다^{10,11)}. 미생물 중에서 *Clostridium* 속, *Aspergillus* 속, *Rhizopus* 속 등의 곰팡이와 *Proteus* 속, *Serratia* 속, *Pseudomonas* 속, *E. coli* 속의 세균 및 방선균이 2차 대사물질로 생산하고 있다^{12~15)}. 미생물이 생산하는 저해물질은 분자량이 적으며, 열과 산에 비교적 안정하다^{16,17)}.

따라서 많은 분리방법을 통하여 새로운 생리활성 물질을 찾고 있다¹⁴⁾. 본 연구는 colloidal chitin 배지를 사용하여 강원도 원주 주변의 토양에서 방선균을 분리하여, 단백질 가수분해효소 저해물질을 생산하는 균주를 선별하여 생산조건을 검토한 결과이다.

재료 및 방법

1. 방선균의 분리 및 선별

강원도 원주를 중심으로 깊이 10cm 이상의 밭과 산립 부식토에서 채취한 토양을 증류수에 현탁하여 20분간 방치한 후 상징액 0.1ml를 취해서 colloidal chitin 고체배지를 이용한(1% colloidal chitin, 0.5% peptone, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 2% agar) 3단 희석법으로 분리하였다. 균주의 분리는 형태적 특성을 관찰하고 방선균으로 추정되는 약 1000종의 균주를 분리하여 oatmeal 배지에 1개월마다 계대 배양하였다. 분리된 균주는 액체배지를 사용(1% glucose, 0.4% peptone, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O) 28°C에서 5일 동안

Corresponding author : Jung-Bae Kim

정치 배양하여 여과한 후 저해물질 활성을 측정하여 선별하였다.

2. 저해물질의 생산

저해물질 생산을 위한 액체배지(1% glucose, 0.4% peptone, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% CaCO₃)를 100ml 삼각플라스크에 20ml씩 가하여 살균한 후, 선별된 균주의 포자를 1 백금이씩 접종, 28℃ 배양기에서 3일간 정치 배양하여 종균으로 사용하였다. 저해물질 생산은 1,000ml 삼각플라스크에 200ml 생산용 배지를 넣고 초기 pH 8.5로 조절하여 가압 멸균한 후 종균 2ml씩 접종 60시간 진탕 배양(진폭 7cm, 70회/분)하였다.

3. 활성 측정

저해물질의 활성 측정은 Anson 방법¹⁸⁾을 변화시켜 사용하였다. 즉 0.1M Tris-HCl 완충액(pH 7.6) 0.4ml, 췌장(돼지) 트립신 0.1ml(100μg, Sigma), 시료용액(배양여액) 0.1ml를 37℃에서 5분간 전처리하고 1% milk casein용액 0.4ml를 가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 0.44M TCA(trichloroacetic acid) 1ml를 가하여 반응을 정지, 실온에서 30분간 방냉하여 탈지면으로 여과하였다. 여액 1ml와 0.55M Na₂CO₃ 2.5ml, Folin-Ciocalteu 발색시약 0.5ml를 가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 제1 대조구는(C₁) 기질(casein)과 효소(trypsin)와 반응한 것, 제2 대조구는(C₂) 기질과 시료액(배양액)만 반응시킨 것을 보정하여 저해율을 계산하였다.

$$\text{저해율}(\%) = 100 \left(1 - \frac{S - C_2}{C_1 - C_2} \right)$$

S : 시료의 흡광도

C₁ : 제 1 대조구의 흡광도

C₂ : 제 2 대조구의 흡광도

4. 균체량 측정

액체 배양액을 거름종이에 여과하고 충분한 양의 증류수로 세척한 후 105℃ 건조기에서 항량이 될 때까지 수분을 제거하고, 그 무게를 측정하여 건조 전후의 차이를 건조 중량(Dry Cell Weight, DCW)으로 표시하였다.

결 과

1. 탄소원의 영향

에너지원 및 물질의 탄소 골격 기본구조로 사용될 수 있는 탄소원을 액체 배지내의 농도가 1% 되도록 20ml 씩 첨가하여 28℃에서 배양후 활성을 조사하였다. 저해물질 생산에 가장 좋은 탄소원은 글루코오스이며, α-cellulose, chitin 순으로 감소되었다(Table 1). 가장 적합한 탄소원인 글루코오스를 농도별로 첨가하여 생산성을 조사한 결과 1.5%에서 가장 많은 생산성을 보였으며 균체량도 가장 많았다(Fig. 1).

2. 질소원의 영향

세포의 대사 및 성장에 필요한 질소원을 0.5%씩 첨가하여 물질생산과 균체 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 가장 많은 저해물질을 생산하는 질소원은 peptone이었으며, casein 87%, yeast extract 69%의 상대활성을 나타내었고, 무기질소는 물질생산에 별다른 영향을 미치지 못하였다(Table 2). 최적 질소원인 peptone을 농도별로 첨가하여 생산성을 조사한 결과 0.5% 농도에서 최고의 생산량을 보였으

Table 1. Effect of carbon source on inhibitor production

Carbon source	Cell growth	Final pH	Relative activity(%)
Glycerine	19	6.4	11
D-Xylose	16	6.5	17
L-Arabinose	13	5.8	45
D-Galacturonic acid	18	5.8	25
D-Glucose	26	5.6	100
D-Galactose	16	6.5	11
D-Mannose	13	7.6	14
Lactose	16	7.9	76
Maltose	21	6.5	6
Saccharose	19	6.2	3
Salicin	12	8.0	77
Xylan	15	7.8	40
Inulin	14	8.1	43
Dextrin	13	5.7	6
Soluble starch	22	6.5	9
CMC · 2Na	23	7.9	71
α-Cellulose	24	7.9	88
Chitin	25	8.0	80

Each carbon source(1%) was added to basal medium. Cell growth was expressed by DCW(mg/10ml). Activity added glucose was set at 100.

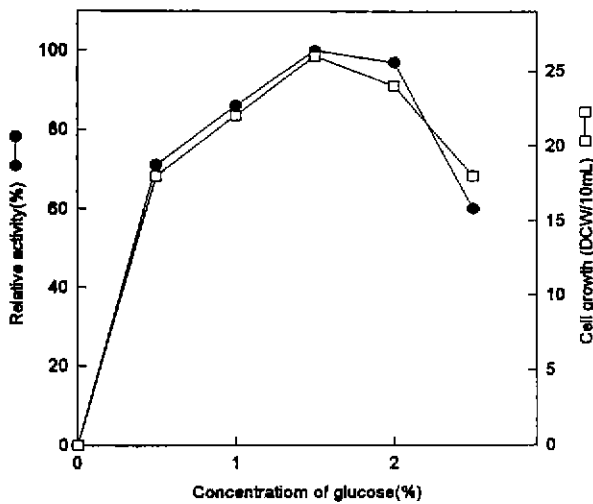


Fig. 1. Effect of concentration of glucose on the inhibitor production. Each concentration of glucose was added to basal medium. Cell growth was expressed by DCW(mg /10ml) and maximum activity was set as a value of 100.

며, 농도가 증가할수록 생산량은 서서히 감소되었다 (Fig. 2).

3. 금속염의 영향

세포의 효소와 대사 활성화에 영향을 주는 여러 금속 이온을 배지 내 최종농도가 1mM이 되도록 첨가하여 물질 생산성을 조사하였다. 조사 결과 Ca²⁺ 이온이 다른 금속이온에 비하여 약간 높았으며 Mg²⁺,

Table 2. Effect of nitrogen source on inhibitor production

Nitrogen source	Cell growth	Final pH	Relative activity(%)
NaNO ₂	12	7.5	56
NaNO ₃	10	7.3	52
NH ₄ Cl	18	4.5	52
(NH ₄) ₂ SO ₄	16	6.3	59
NH ₄ · H ₂ PO ₄	22	4.8	45
(NH ₄) ₂ HPO ₄	21	3.7	55
Urea	18	5.0	51
Malt ext.	20	5.8	53
Yeast ext.	24	5.3	69
Peptone	27	5.6	100
Casein	26	5.1	87

Each nitrogen source(0.5%) was added to basal medium containing 1.5% glucose. Cell growth was expressed by DCW(mg /10ml). Activity added 0.5% peptone was set at 100.

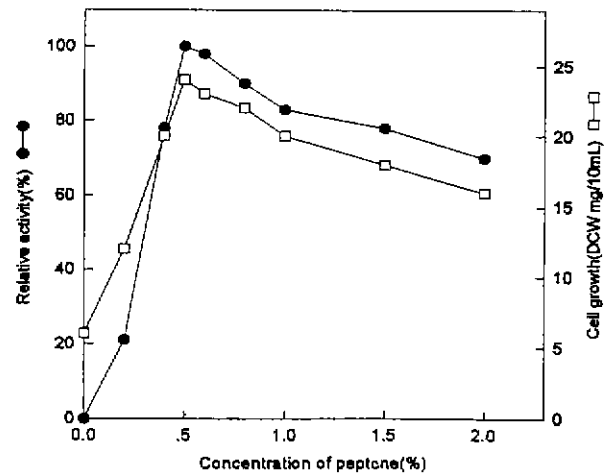


Fig. 2. Effect of peptone concentration on production of the inhibitor. Cultivation was carried out with addition of various concentration of peptone to the medium containing 1.5% glucose with basal medium and maximum activity was set as a value of 100.

Mn²⁺, Fe²⁺ 순으로 감소하였지만 별다른 차이가 없었고, Hg²⁺ 이온은 물질생산과 균체 증식을 강하게 저해시켰다(Table 3).

4. 배양온도의 영향

저해물질 생산의 최적온도를 검토하기 위하여 균체의 배양온도를 20℃에서 40℃까지 다르게 하여 생산

Table 3. Metal salt on inhibitor production

Metal salt	Cell growth	Final pH	Relative activity(%)
Control (none)	18	5.8	58
AgNO ₃	9	6.0	67
CaCO ₃	28	6.9	100
CoCl ₂ · 6H ₂ O	12	7.5	38
CuSO ₄ · 5H ₂ O	19	6.8	90
FeSO ₄ · 7H ₂ O	24	6.5	96
Hg(NO ₃) ₂ · 2H ₂ O	2	7.5	0
MnCl ₂ · 4H ₂ O	24	6.0	98
Pb · Acetate · 3H ₂ O	17	6.7	62
ZnCl ₂	16	5.8	84
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	17	5.1	81
AlCl ₃ · 6H ₂ O	20	4.8	88
FeCl ₃ · 6H ₂ O	23	5.7	95
MgSO ₄ · 7H ₂ O	27	6.5	99

Each metal salt was added with concentration of 1mM to basal medium containing 1.5% glucose, 0.5% peptone and maximum activity was set as a value of 100.

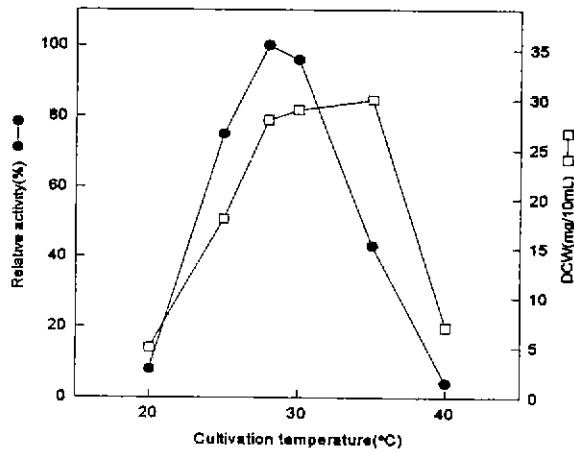


Fig. 3. Effect of temperature on production of the inhibitor and cell growth. The cultivation was carried out for 60 hr. The composition of the medium was 1.5% glucose, 0.5% peptone, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% CaCO₃. Cell growth was expressed by DCW(mg/10ml).

성을 조사한 결과 Fig. 3과 같이 28℃에서 가장 좋았으며, 30℃ 이상의 온도에서는 저해물질의 생산이 급격히 감소하였다. 균체 증식량은 28℃보다 35℃에서 가장 많았다.

5. 초기 pH의 영향

저해물질 생산에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하

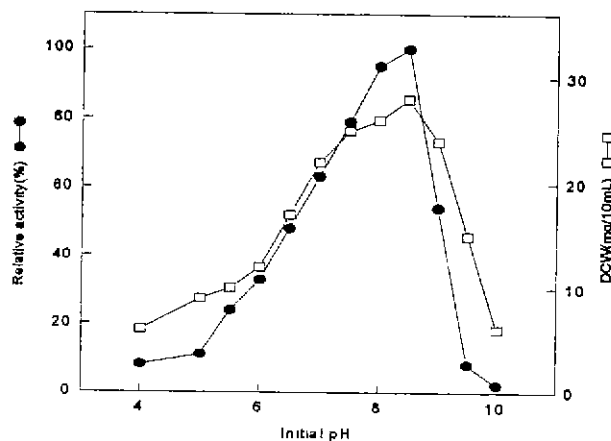


Fig. 4. Effect of initial pH on the production of the inhibitor. pH of culture medium was adjusted with 0.1N HCl and NaOH. The cultivation was carried out 28℃ for 60 hr. The composition of the medium was 1.5% glucose, 0.5% peptone, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% CaCO₃. Cell growth was expressed by DCW(mg/10ml).

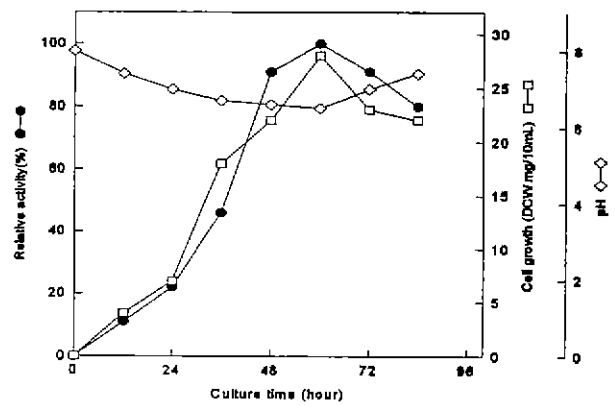


Fig. 5. Effect of culture time on the inhibitor production. The composition of the culture medium was 1.5% glucose, 0.5% peptone, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% CaCO₃ at initial pH 8.5. The cell were cultivated at 28℃ and maximum activity was set as a value of 100. Cell growth was expressed by DCW(mg/10ml).

기 위하여 0.1N HCl과 NaOH용액을 사용하여 배지의 초기 pH를 조절하였다. 고압 멸균한 후 60시간 진탕 배양하여 생산성을 검토한 결과 pH 8.5에서 가장 높은 생산성을 나타내었으며, pH 7.0 이하와 8.5 이상에서는 물질생산이 감소하였다. 균체 증식량은 pH와 비슷한 경향을 보였다(Fig. 4).

6. 배양일수

저해물질의 생산은 2차 대사산물로 알려져 있다⁵⁻⁷⁾. 따라서 물질생산의 최적 생산조건인 1.5% glucose, 0.5% peptone, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% CaCO₃, 초기 pH 8.5로 조절하여 고압 멸균한 후 28℃에서 진탕 배양하면서 생산성을 조사한 결과 배양 60시간만에 최대의 생산량을 보였으며, 균체 증식량도 가장 많았다. pH의 변화는 시간이 경과할수록 점차 감소되었으나 60시간 이후부터 점차 증가하는 경향을 보였다(Fig. 5).

고 찰

방선균은 원핵생물 중에서 가장 진화된 균주이며⁶⁾ 항생물질과 생리활성 물질을 생산하여 발효와 의약 산업에 중요한 비중을 차지하고 있다⁷⁾. 최근에는 항생물질 이외의 면역억제 물질과 항암제 등의 생리활성을 가진 저분자 물질을 생산하여 주목받고 있다^{4,5)}. 그러나 방선균은 유전적 불안정성 때문에 변이주의 발생빈도가 높아 일정한 생산성을 지속시키기 어려운

경우가 자주 발생되고 있다. 이후 이에 대한 연구가 시작되면서 2차 대사의 유도과 제어에 관여하는 인자인 A, B, L-factor 등의 존재도 보고되었다^{19,20}. 본 생산성 실험에서 글루코오스와 peptone이 가장 적합한 탄소원과 질소원인 결과는 일반적으로 방선균에서 사용되는 배지와 별다른 차이를 보이지 않았으나, 농도에 대한 차이는 많았다. 저해물질은 합성배지보다 천연배지를 많이 사용되고 있고 생산성도 증가되는 것으로 알려져 있다^{13,16,21}. 금속염의 경우 물질생산에 별다른 영향을 미치지 못하였으나, 다른 보고와는 약간의 차이를 보였다^{15,17,21,22}. 배양온도와 initial pH의 영향은 다른 결과와 비슷하였으며¹⁰, 저해물질의 생산은 배양 60시간 만에 최대가 되었다. 이 같은 결과는 미생물에서 생산되는 생리활성 물질이 대부분 2차 대사산물로서 생산되는 점과 유사한 경향을 보였다^{19,20}.

요 약

본 연구는 단백질 분해효소 저해물질을 탐색하고자 방선균을 선택적으로 분리할 수 있는 colloidal chitin 고체배지를 사용하여 강원도 원주 일원의 토양에서 *Streptomyces* sp. SK-862를 선별하여 배양여액으로부터 단백질 분해효소 저해물질을 분리하였다. 최적의 배양온도와 초기 pH는 각각 28℃와 8.5이였다. 가장 적합한 배지조성은 1.5% glucose, 0.5% peptone, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% CaCO₃이었으며, 60시간 동안 진탕 배양하였을 때 저해물질 생산이 최대가 되었다.

감사의 말

본 연구는 상지대병설전문대학의 학술연구비 지원으로 수행된 연구결과이다.

참고문헌

1. Florey, H. W., Chain, E., Heatley, N. G., Jennings, M. A., Saunders, A. G., Abranram, E. P. and Florey, M. E. : *Antibiotics*, Vol. 2, Oxford University Press, 1144~1151(1949).
2. Gottlieb, D. : The production and role of antibiotics in soil, *J. Antibiotics*, 35, 987~1000(1976).
3. Wagman, G. H. and Weinstein, I. J. : Antibiotics from micromonospora, *Ann. Rev. Microbiol.*, 34, 537~558(1980).
4. 屈指内末治 : 放線菌의 抗生物質生産, *蛋白質核酸酵素*, 40, 986~998(1995).
5. 上芳夫, 大村智 : 微生物薬品化学, 南江堂, 東京, 106~115(1995).
6. Umezawa, H., Demain, A. L. and Hata, H. : Trends antibiotic research, Japan Antibiotics Research Association, Tokyo(1982).
7. 大野雅二, 大村智 : 抗生物質研究の最尖端, 東京化学同人, 東京, 155~172(1987).
8. Giancarlo, L. and Parenti, F. : *Antibiotics*, Springer-Verlag, New York(1977).
9. 大岳望 : 生理活性 微生物化学, 公立出版社, 東京, 208~212(1985).
10. Aoyagi, T. and Umezawa : Structure and activities of protease inhibitor of microbial origin, Cold Spring Harbor Laboratory, 429~454(1975).
11. Umezawa, H. : Enzyme inhibitors of microbial origin, University of Tokyo Press, 1~3(1972).
12. Hidetoshi, T., Hiroyuki, O., Masakazu, U. and Kiyoshi, I. : A new inhibitor of protein kinase C, *J. Antibiotics*, 43, 168~173(1990).
13. Kendo, S., Kawamura, K., Iwanaga, J., Hamada, M., Aoyagi, T., Maeda, K., Takechi, M. and Umezawa, H. : Isolation and characterization of leupeptin produces by *Actinomycetes*, *J. Antibiotics*, 17, 1896~1901(1969).
14. Tanaka, H., Kawakita, K., Imamura, N., Suzuki, K. and Shiomi, K. : *General screening of enzyme inhibitors*, Springer-Verlag, New York, 117~125(1992).
15. Lorando, L. : *Naturally occurring protease inhibitor*, Methods in Enzymol., 45, Academic Press, New York, 639~881(1976).
16. Aoyagi, T., Takeuchi, T., Matsuzaki, A., Kawamura, K., Kondo, S., Hamada, M., Maeda, K. and Umezawa, H. : Leupeptins, new protease inhibitors from *Actinomycetes*, *J. Antibiotics*, 22, 283~186(1969).
17. Umezawa, H., Okami, Y. and Hotta, K. : Transfer of leupeptin producing ability of the strain, *Streptomyces roseus* MA839-A1, by conjugation, *J. antibiotics*, 31, 99~102(1977).
18. Greenberg, D.M. : Plant proteolytic enzymes, Methods in Enzymol., 2, Academic Press, New York, 54~64(1955).
19. 柳沼勝己 : 微生物二次代謝研究の新局面, *日本生化学会誌*, 58, 167~197(1986).
20. 堀之内末治 : 放線菌の抗生物質生産・形態分化におけるシグナル傳達, *蛋白質核酸酵素*, 40, 986~999(1995).
21. 松嶋欽日, 嶋田協 : 麴菌の細胞抽出液中に存在するアルカリプロテアーゼ, 三重大学 農学部學術報告, 49, 139~147(1975).
22. Murao, S., Sato, S. and Muto, N. : Isolation of alkaline protease inhibitor producing microorganisms, *Agri. Biol. Chem.*, 36, 1739~1744(1972).