

방선균이 생성하는 단백질 가수분해효소 저해물질의 정제 및 특성

김 중 배

상지대학교병설전문대학 식품영양과

Purification and Properties 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 strain of *Streptomyces* sp. SK-862, isolated from soil in Wonju city, was able to produce a biologically active substance that has a strong inhibitory activity against proteolysis by trypsin. The inhibitory substance was extracted by n-butanol, and then purified by the adsorption chromatography followed by the reverse-phase high performance liquid chromatography. The purified substance was stable over the pH range from 2 to 10, but was unstable when treated at 80°C for 60 min. This substance was soluble in water, methanol, ethanol and butanol, but insoluble in chloroform and ethylacetate. The R_f value of the purified substance on the thin layer chromatography were 0.56 in n-butanol : methanol : water(5 : 3 : 1 v/v) solvent system compared to 0.23 in ethanol : ammonium hydroxide : water(8 : 1 : 1 v/v) solvent system. This substance has maximum absorption at 259 nm. The chemical reaction of the substance was negative for sugar but positive for ninhydrine and iodine reaction.

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

서 론

단백질 가수분해효소는 단백질의 펩티드 결합을 분해하는 가수분해효소(EC 3.4. peptide hydrolase)이며, 단백질 가수분해효소 저해제는 효소의 촉매 기능을 저해시킨다. 저해제는 serine, cysteine, aspartic, metallo inhibitor 등으로 분류하며, 식물, 동물, 미생물에서 생산되고 있다¹⁾. 식물에서는 미생물 및 곤충 등의 외적으로부터 종자 방어, 내재성 protease의 조절과 보호 작용, 소화기관 내에서 종자 보호 및 배설 후 종자 전파 등 여러 기능을 갖고 있다²⁾. 동물 저해제는 간, 혈관 내피세포, 백혈구, 태반 등에서 합성되어 일부는 혈소판에서 분비되어 혈액응고, 섬유소 용해제, kinnin kallikrein system(혈액응고에 관여하는 계), 면역 체계에 관여하며, 일부는 조직염증의 진정을 제어하는 생체 방어반응에 관여한

다³⁾. 미생물 저해제는 방선균 중 *Streptomyces* 속에서 많이 발견되었으며 분자량이 적고, 열과 산에 비교적 안정한 물질이다. 이후 leupeptin, chymostatin, pepstatin, elastatinal, bestatin 등의 물질이 발견되었다^{4,7)}.

단백질 분해효소저해제는 면역, 암, 감염증, 고지혈증, 당뇨병, 자기면역 질환증, 노인성 치매 등의 치료제 개발로 개발되고 있다⁸⁾. 체내에서 효소의 생리활성 제어기능에 이상이 생기면 병리에도 이상이 생기므로 여기에 관여하는 효소의 저해물질 탐색을 하면 새로운 영역으로 전개될 것이다. 따라서 본 연구는 새로운 저해물질을 탐색하기 위하여 강원도 원주 일원의 토양에서 선택적으로 분리한 방선균을 대상으로 단백질 분해효소 저해물질을 생산하는 균주를 선별하였다. 선별된 균주의 생산조건을 검토하여 배양액으로부터 생산되는 저해물질을 정제하여 그 결과를 보

고한다.

재료 및 방법

1. 활성 측정

단백질 가수분해효소 저해물질의 활성 측정은 Mikola 방법¹⁴⁾을 변화시켜 사용하였다. 0.1M Tris-HCl 완충액(pH 7.6) 0.4ml, 췌장(돼지) 트립신 0.1ml(100 μ g, Sigma), 시료액(배양액) 0.1ml를 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 전 처리한 후 1% milk casein용액 0.4ml를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켜 0.44M TCA(trichloroacetic acid) 1ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 실온에서 30분간 방냉하여 탈지면으로 여과한 후 기질인 카제인의 가수분해에 대한 저해를 280nm에서 흡광도의 변화로서 측정하였다.

2. 활성물질의 분리 및 정제

전당 배양한 배양액은 분액깔때기를 사용하여 배양액의 20%가 되도록 부탄올을 넣고 2회 추출하여 60 $^{\circ}$ C에서 감압농축하였다. 추출 농축한 갈색물질을 소량의 증류수로 녹인 후 Amberite XAD 수지로 채운 컬럼(8 \times 70cm)에 주입하여 증류수로 씻어 불순물을 제거한 후 70% 메탄올로 용출시키면서 분획하였다. 분획된 활성물질은 감압농축한 후 실리카겔 컬럼(70~230 mesh, 2.0 \times 50cm, Merck)에 주입하여 butanol : methanol : water(5 : 3 : 1 v/v)의 용매로 용출시켜 활성부분을 8ml씩 분획하였다. 활성부분은 다시 감압농축하여 Prep-ODS 컬럼(2.5 \times 25cm, YMC, Japan)을 사용하여 HPLC(Gilson 505B, France)로 분리하였다. 용매는 70% 메탄올을 사용하였고, 분당 3ml/min씩 용출시켜 254nm에서 검출하였다. 분리된 활성물질은 GPC 컬럼(Diol-120, YMC, Japan)을 사용하여 30% acetonitrile 용매를 사용하여 254nm에서 HPLC로 최종 정제하였다.

3. 물질의 안정성

pH와 온도에 대한 안정성은 pH 2에서 12까지의 Britton-Robinson 광역 완충액을 사용하여¹⁵⁾ 실온에서 60분 동안 처리한 후 잔존활성을 조사하였으며, 열 안정성은 40, 60, 80 $^{\circ}$ C의 항온수조에서 120분 동안 열처리하여 활성을 조사하였다.

4. 이화학적 특성

자외선 분석은 분광광도계(Shimadzu UV-120A)

를 사용하여 흡수 spectrum을 조사하였으며, 전용성 시험은 각종 유기용매를 사용하였다. DNS, 안트론, 닐히드린, 요오드 등의 화학반응도 하였다. R_f 값은 TLC plate(3 \times 15cm, Si F₂₅₄, Merck)에 상승법으로 전개하여 구하였다. 전개용매는 n-butanol : methanol : water(5 : 3 : 1 v/v), n-butanol : acetic acid : water(3 : 1 : 1 v/v), ethanol : ammonium hydroxide(8 : 1 : 1 v/v) 시스템을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 정 제

대사산물과 배지성분이 혼재되어 있는 액체배양액(10 ℓ)에서 저해물질을 정제하기 위하여 유기용매에 대한 전용성을 조사한 후 n-butanol로 2회 반복 추출하였다. 추출한 유기용매는 감압농축하여 Amberite XAD-7에 흡착시킨 후 70% 메탄올로 용출시켜 활성부분을 분획하여 농축하였다. 갈색의 농축물질은 실리카겔 컬럼을 사용하여 활성부분을 분획하였다. 분획된 노란색의 활성물질은 ODS 컬럼을 사용하여 HPLC로 분리한 결과 용출시간 19.2분대에서 활성물질이 검출되었다(Fig. 2). 활성 부분의 피크는 다시 감압농축하여 GPC 컬럼을 사용하여 HPLC로 분리하여 한 개의 단일 피크의 물질을 얻었다(3mg).

2. 기질에 따른 저해율

여러 기질에 따른 저해율은 Table 1과 같이 기질에 따라 상이한 결과를 보였다. 즉 기질인 egg albumin, milk casein, hemoglobin 이 각각 58, 74, 88%의 저해율을 보였다. 본 실험에 사용한 기질인 milk casein은 hemoglobin보다 저해율이 낮았다

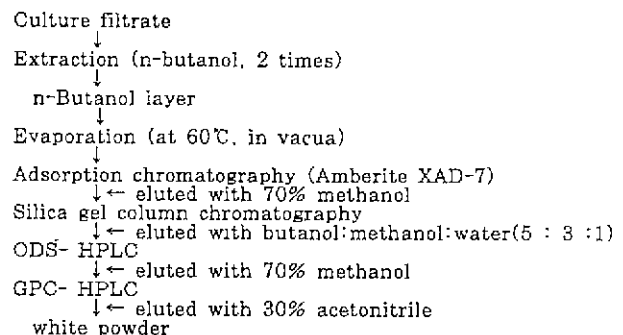


Fig. 1. Purification procedure of inhibitor from the culture broth of *Streptomyces* sp. SK-862.

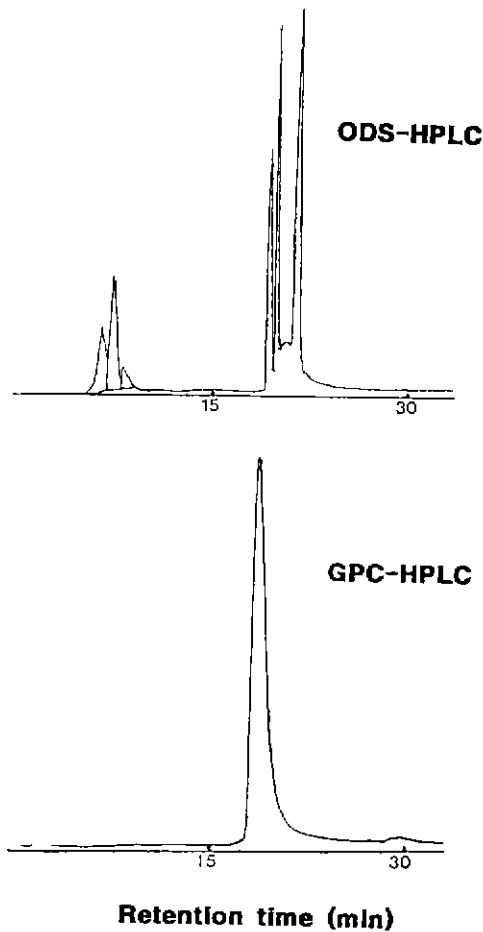


Fig. 2. HPLC of the inhibitor.

ODS-HPLC : Column ODS AQ YMC-pack(2×25cm, 5μm, 120Å), Elution solvent : 70% methanol, Flow rate : 3ml/min, Detection : 254nm, GPC-HPLC : Column YMC-pack Diol-60(0.8×50cm, 5μm, 60Å), Elution solvent : 30% acetonitrile, flow rate : 1ml/min Detection : 254nm.

Table 1. Effect of the various substrate on inhibitor

Substrate	Inhibition(%)
Egg albumin	58
Milk casein	74
Hemoglobin	88

Substrate concentration in the reaction mixture was 0.3% respectively.

(Table 1).

3. 저해제의 안정성

정제된 저해물질은 온도와 pH에 대한 안정성을 조

사한 결과 60℃에서 2시간 처리하여도 안정되었으며, 70℃에서 30분간 처리하였을 때 안정되었으나, 2시간 반응시켰을 때 약 58%의 잔존활성을 보였다. 즉 70℃에서는 2시간 반응시키면 42% 실활되었다. 80℃에서 60분간 처리하였을 때는 65%의 급격한 실활을 보였으며, 2시간 처리하였을 때는 80% 실활되었다(Fig. 3, 4).

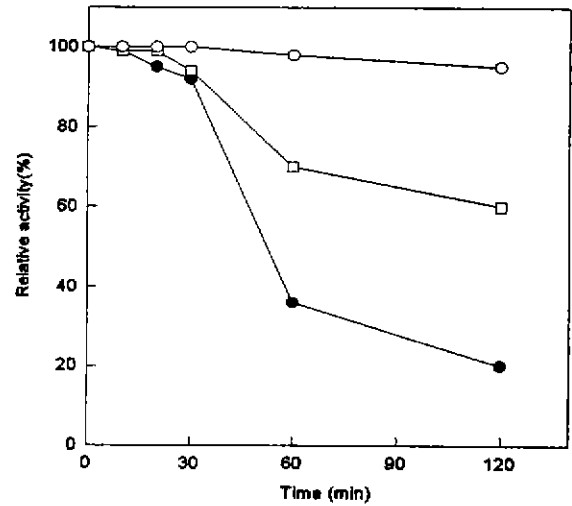


Fig. 3. Heat stability of the inhibitor. Inhibitor solution(200μg/ml) was treated at 60℃(○-○), 70℃(□-□) and 80℃(●-●) for each time. Activity of the inhibitor not treated was set at 100.

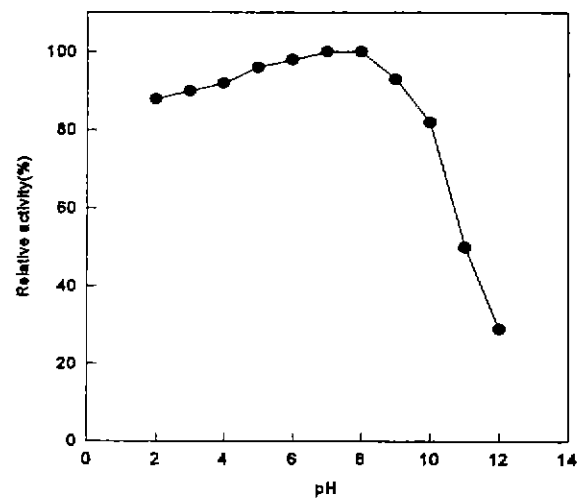


Fig. 4. pH stability of the inhibitor. Inhibitor solution(200μg/ml) was treated in various pH ranged from 2 to 12 at room temperature for 60min, remaining activity was tested.

Table 2. Solubility if the inhibitor in various solvents

Solubility	Organic solvent
Good	water, methanol, ethanol, butanol
Poor	chloroform, ethylacetate

4. 특 성

정제된 물질의 유기용매에 대한 전용성을 조사한 결과 물, 메탄올, 에탄올에는 잘 용해되었으나 비극성 용매인 클로로포름, 에틸아세테이트에 잘 녹지 않았다(Table 2). 자외선 흡수대는 259nm에서 최대 흡광도를 나타내었다. 물질의 이화학적 특성은 당 검출 반응인 DNS, 안트론 반응에서 음성, 난히드린과 요오드 반응에서는 양성반응을 보였다. 이 같은 결과로 본 저해물질이 아미노산을 함유된 물질로 추정할 수 있었다. 상층법으로 전개한 TLC plate (F₂₅₄, Merck)에서 R_f값은 n-butanol : methanol : water(5 : 3 : 1 v/v)에서 0.56, n-butanol : acetic acid : water(3 : 1 : 1 v/v) 0.8, ethanol : ammonium hydroxide : water(8 : 1 : 1 v/v) 0.23 이었다. 또한 본 물질은 자외선 램프(UV lamp, 254nm)에서 형광성을 나타내었다.

고 찰

본 물질의 정제는 추출과 합성수지를 이용한 흡착법, 역상, 겔 크로마토그래피 순으로 정제하였으나 다른 보고와 비교하여 낮은 수율을 보였다^{16,17)}. 열과 pH에 대한 안정성은 비교적 높은 경향을 보였으며, 극성용매에서는 잘 용해되지만 비극성 용매에 녹지 않는 특징을 보였다. 이러한 특성은 leupeptin, antipain과는 비슷한 경향을 보였으나, chymostatin, pepstatin, bestatin과는 차이가 있었다^{2,6,11,18,19)}.

요 약

강원도 원주일원의 토양에서 분리한 *Streptomyces* sp. SK-862 균주는 단백질 분해효소인 트립신에 대하여 강한 저해작용을 하는 물질을 생산하였다. 저해물질의 정제는 n-butanol 용매로 추출한 후 합성수지인 Amberite XAD로 흡착하였으며 ODS-HP-LC, GPC HPLC 순으로 정제하였다. 정제된 물질은 pH 2-10에서 안정하였으며 80℃에서 60분간 온도 처리하였을 때에는 65%가 실활되었다. 물, 메탄

올, 에탄올, 부탄올에는 잘 용해되었으나 비극성용매인 클로로포름, 에틸아세테이트에는 녹지 않았다. TLC에서의 R_f값은 n-butanol : methanol : water(5 : 3 : 1 v/v)의 용매에서 0.56, ethanol : ammonium hydroxide : water(8 : 1 : 1 v/v) 0.23이었다. 자외선 흡수스펙트럼 조사에서는 259nm에서 최대흡광도를 보였으며, 당 반응은 검출되지 않았으나 난히드린과 반응하였다.

감사의 말

본 연구는 상지대병설전문대학의 학술연구비 지원으로 수행된 연구결과이다.

참고문헌

- Lorand, L. : Proteolytic enzymes Part B, *Methods Enzymol.*, vol 45, Academic Press, New York, 639-888(1976).
- Barrett, A. J. and Salvesen, G. : *Proteinase inhibitors*, Elsevier Science Publishers B. V., 3~18 (1986).
- 大坪研一 : 植物にみる 프로テ아제와 인히비터의局在性, *日本農藝化學會誌*, 64, 1382~1385(1990).
- Barrett, A. J. and Salvesen, G. : *Proteinase inhibitors*, Serpins, Elsevier Science Publishers B. V., 403~418(1986).
- Travis, J. and Salvesen, G. S. : Human plasma proteinase inhibitors, *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 655~709(1983).
- Aoyagi, T. and Umezawa, H. : Structure and activities of protease inhibitor of microbial origin, Cold Spring Harbor Laboratory, 429~454(1975).
- Umezawa, H. : *Enzyme inhibitors of microbial origin*, University of Tokyo Press, 1-3(1972).
- 上芳夫, 大村智 : 微生物藥品化學, 南江堂, 東京, 290~319(1995).
- 勝沼信彦, 木南英紀 : 内在性 cysteine proteinase inhibitor family 最近の進歩, *日本生化学會誌*, 58, 470~477(1986).
- Suzuki, K., Ohno, S., Emori, S., Imazo, S., Kawasaki, H. and Kisaragi, M. : The biological role of proteinases and their inhibitors in skin., University of Tokyo Press(1985).
- Murao, S., Sato, S. and Muto, N. : Isolation of alkaline protease inhibitor producing microorganisms, *Agric. Biol. Chem.*, 36, 1737~1744(1972).
- Barrett, A. J. and Salvesen, G. : *Proteinase inhibitors*, Biological Aspects, Elsevier Science Publishers B. V., 613~622(1986).
- Jochum, M., Danswald, K. M., Newmann, S.,

- Witte, J., Fritze, H. and Seemuller, U. : Proteinase inhibitors : Medical and Biological Aspects, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, 85~95(1984).
14. Birk, Y. : Proteinase Inhibitors from Cereal Grains. *Methods in Enzymol.*, 45, Academic Press, New York, 723~724(1976).
 15. Perrin, D. D. and Dempsey, B. : Buffers for pH and metal ion control, Chapman and Hill Ltd, London, 130~155(1974)
 16. 柿沼 勝己 : 微生物 二次代謝研究の新局面, *日本生化学會誌*, 58, 167~197(1986).
 17. Murao, S and Watanabe, T. : Novel microbial protease inhibitor, MAPI, produced by *Streptomyces* sp. No. WT-27, *Agric. Biol. Chem.*, 41, 1313-1314(1977).
 18. Umezawa, S., Kuniaki, T., Koichi, F., Tsutomu, T., Umezawa, H. and Hiroshi, N. : Structure of antipain, A new sakaguchi positive product of *Streptomyces.*, *J. Antibiotics*, 25, 267-270(1972).
 19. Murao, S. and Shuzo, Sato : Studies on pepsin inhibitor(S-PI) from *Streptomyces naniwaensis.*, *Agric. Biol. Chem.*, 35, 1477-1481(1971).

(1998년 12월 4일 접수)