

## 효모를 이용한 selenium peptide 생산 및 특성 연구

김영옥\* · 이정옥 · 이백석\* · 김은기†

인하대학교 공과대학 생명화학공학과 생물공학과, \*인하대학교 의과대학 미생물학교실

\*\*캘리포니아대학 생물공학과

### Production and Characterization of Selenium Peptide from *Saccharomyces Cerevisiae*

Young-Ok Kim\*, Jung-Ok Lee, Baek-Seok Lee\*\*, and Eun-Ki Kim†

Department of Biological Engineering, Division of Chemical Science and Biological Engineering, Inha University, 253, Younghyun-dong, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea

\*Department of Microbiology, College of Medicine, Inha University, Incheon 402-751, Korea

\*\*Department of Bioengineering, University of California, San Diego, La Jolla, California 92093-0412, USA

**요약:** 셀레늄을 함유하는 펩타이드(셀레늄 펩타이드)는 셀레늄을 함유하는 배지에서 효모를 배양함으로써 생산하였다. 효모 단백질의 GPC 분석을 통해서 다양한 크기의 단백질 내 셀레늄 분포를 조사한 결과 셀레늄이 효모 내 단백질에 균일하게 분포하는 것을 확인하였다. 단백질당 셀레늄 양은 배지에 첨가한 셀레늄 양이 증가함에 따라 증가하였고 펩타이드 내의 셀레늄 함량이 높아질수록 항산화 효과 (glutathione peroxidase 유사 활성)가 증가하였다. 단백질 가수분해효소 XIV를 이용하여 여러 분자량의 펩타이드를 생산하였으며 평균 분자량을 GPC로 분석하였다. 셀레늄 펩타이드의 glutathione peroxidase (GPx) 활성은 펩타이드의 분자량이 감소할수록 증가하였다. Sodium selenate은 sodium selenite에 비해 효모의 성장 저해를 적게 받았고 단백질 내 셀레늄 함량이 sodium selenite보다 높았다. 이 결과는 효모 배양에 의한 셀레늄 펩타이드의 생산의 가능성과 이를 이용한 항산화제로서의 응용가능성을 보여주었다.

**Abstract:** Selenium containing peptide was produced by culturing yeast with selenium. Selenium was broadly incorporated in the various size of proteins based on the GPC analysis of the total yeast protein. The ratio of selenium to protein increased with the concentration of added selenium in the culture medium. Antioxidant activity (glutathione peroxidase-like activity) was proportional to the concentration of selenium concentration in the peptide. Different size of proteins were obtained by hydrolyzing the total yeast protein by protease XIV. Average molecular weight of selenium peptide was analyzed by GPC. Glutathione peroxidase (GPx) activity of the selenium peptide increased as the size of peptide decreased. Sodium selenite had strong inhibition on the yeast growth than sodium selenate. The ratio of selenium to protein was higher with sodium selenate than with sodium selenite. These results showed the potentials of selenium peptide production by yeast cultivation.

**Keywords:** selenium peptide, yeast, GPx, antioxidant

## 1. 서 론

자외선을 구성하는 UVA (320~380 nm)와 UVB (290~320 nm)는 활성산소종(reactive oxygen speices; ROS)을 발생시켜, 발암과 노화 등 광 손상 효과를 유발한다 [1]. 산소라디칼은 전사 인자인 NF- $\kappa$ B와 AP-1의 결합 활성을 증가시키며, 이들 전사 인자의 활성화는 피부의 형태를 유지시켜주는 기질 단백질(matrix protein)인 콜라겐, 엘라스틴 등을 분해시키는 효소(matrix metallopro-

teinases; MMPs)인 collagenase 등의 발현을 증가시켜 피부 기질 단백질을 손상시켜 광에 의한 피부 노화의 한 현상인 피부주름을 유발한다[2,3]. 따라서 이러한 자유라디칼에 의한 손상을 막기 위하여 비타민 C, E 등 항산화제를 사용하는 경향이 증가되고 있다[4].

인체내 항산화 물질 중 매우 큰 역할을 담당하고 있는 효소 중 하나가 glutathione peroxidase (GPx)이다[4]. 그러나 GPx는 강력한 항산화 능력에도 불구하고 거대 생체 분자이며 매우 불안정하여 상업성이 떨어져 GPx 모방분자에 관한 관심이 매우 크다[5,6].

GPx의 활성자리에 존재하는 셀레노시스테인은 시스테

† 주 저자 (e-mail): ekkim@inha.ac.kr

인의 황 자리에 셀레늄이 들어간 형태이다[7,8]. 셀레노메티오닌 또한 GPx와 같은 활성을 보이는 것으로 보고 되어있다[4]. 그러나 셀레노메티오닌은 세포 독성이 있기 때문에 그 자체로서는 기능성 식품이나 화장품 원료로서 사용할 수 없지만 셀레노메티오닌을 다량 포함하는 셀레늄 효모는 독성이 없어 현재 영양 보조제로서 사용되고 있다[9]. 또한 유기 셀레늄의 주 공급원이 되고 있는 셀레늄 효모에는 셀레늄 펩타이드, 셀레늄 리피드, 셀레나이드 등 항암제로서 연구되고 있는 셀레늄 화합물이 존재한다[10]. 효모는  $\text{SeO}_3^{2-}$ 와  $\text{SeO}_4^{2-}$ 를 흡수하여 단백질 내에 셀레노아미노산의 형태로 포함시키는 특성이 있는데 효모의 유기 셀레늄은 70% 이상 셀레노메티오닌의 형태로 단백질 상에 존재한다[11].

따라서 셀레늄이 다량 포함된 효모 단백질은 항산화 효과로 인해 화장품에 적용할 경우 광노화를 억제할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 화장품 원료로 적용할 때 고분자인 셀레늄 단백질의 경우 피부 침투율이 떨어지는 문제가 있다. 또한 셀레노아미노산을 단독으로 사용할 경우 독성이 있기 때문에 분자량이 작고 안전한 셀레늄 펩타이드의 개발이 필요하다. 항산화제의 생산은 현재로서는 천연물로부터의 추출물에 의존하고 있으나 미생물로부터 값싼 원료를 이용하여 대량 생산한다면, 가격이 저렴하여 많은 용도로 개발이 가능할 것으로 기대된다.

따라서 본 연구에서는 셀레늄 효모로부터 셀레늄 단백질을 분리하고, 단백질의 셀레늄 함량에 따른 항산화 활성을 측정하였다. 또한 단백질 가수분해효소를 이용하여 셀레늄 펩타이드를 제조하고 펩타이드의 길이에 따른 항산화 활성을 관찰하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약 및 재료

Sodium selenite, sodium selenate, seleno-DL-methionine, reduced-glutathion, glutathione peroxidase, glutathione reductase, NADPH, sodiumazide, Foline reagent, bovine serum albumin, selenium standard solution for AAS, Protease XIV, hydrogen peroxide 등 시약들은 Sigma (St. Louis, MO)사에서 구입하여 사용하였다.

### 2.2. 균주 및 배양

효모 균주로는 Baker's yeast를 사용하였고 YM 배지에 sodium selenite 또는 sodium selenate를 첨가한 후 250 rpm, 30°C에서 24시간 진탕배양하였다.

### 2.3. 효모 내 셀레늄 분포 조사

효모를 sodium selenite (50 ppm)가 첨가된 배지에서

배양한 후 원심분리하여 회수하였다. 두 차례 세척하여 효모 표면의 셀레늄을 제거한 후 ultrasonicator (Branson sonifier 450, Danbury, CT)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 원심분리하여(3000 g, 30 min) 상등액을 회수하여 0.22  $\mu\text{m}$  filter로 여과한 후 FPLC (fast performance liquid chromatography) (AKTA explore 10, Amersham Pharmacia, Sweden)를 위해 HiLoad 16/60 superdex 200 prep grade column을 이용하여 효모추출물을 분리하였다. Tris-HCl 30 mM, pH 7을 1.5 mL/min의 속도로 흘려주었으며 UV detector를 이용하여 280 nm에서 단백질을 검출하였고 fraction을 받은 후 selenium 농도를 측정하였다.

효모 세포의 셀레늄 함량을 측정하기 위하여 원심분리하여 얻어진 pellet을 건조시킨 후 건조 중량을 측정하고, 60%  $\text{HNO}_3$ 를 이용하여 12시간 동안 45°C에서 가수분해하였다. 측정 가능 범위까지 희석한 후 graphite furnace atomic absorption spectrophotometer (AAS 5EA, Analytical Jena, Germany)를 이용하여 셀레늄의 양을 측정하였다.

또한 각 셀레늄 원료를 사용했을 경우 유기 셀레늄으로 전환된 비율을 알아보기 위하여 세포 건조중량 당 셀레늄 농도를 측정하였고, 세포로부터 단백질을 분리하여 셀레늄 농도를 분석하였다. 단백질 정량은 Lowry method를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 표준물질은 bovine serum albumin를 사용하였다.

### 2.4. 단백질 분리

효모를 sodium selenite (50 ppm)가 첨가된 배지에서 24시간 배양한 후 원심분리하여(3000 g, 15 min) 회수하였다. 효모 표면의 셀레늄을 제거하기 위하여 두 차례 세척하였으며, ultrasonicator로 세포를 파쇄한 후 원심분리하여(3000 g, 30 min) 상등액을 취하였다. Ammonium sulfate (final conc. 80%)를 이용하여 단백질을 침전시킨 후 투석하여 염을 제거하고 회수한 단백질은 동결건조한 후 사용하였다.

### 2.5. 셀레늄 펩타이드 제조

셀레늄 펩타이드를 제조하기 위하여 protease XIV를 처리하여 셀레늄 단백질을 가수분해하였다. 단백질 분해 효소로는 Protease XIV를 사용하였고 protease/substrate 비율은 1/50로 25°C에서 반응시킨 후 Gel permeation chromatography (Ultrasorb 250, Waters)를 이용하여 아래 수식으로 펩타이드의 평균 분자량을 계산했으며 분자량 표준곡선은 PEG (polyethyleneglycol)를 사용하여 측정하였다.

$$\text{Average molecular weight} = \frac{\sum (\text{MW} \times \text{conc.})}{\sum \text{conc.}}$$

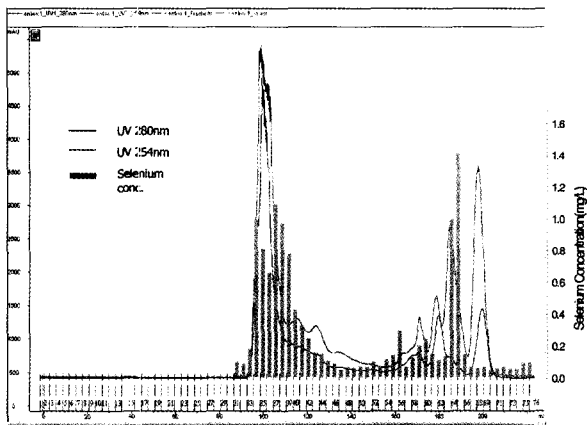


Figure 1. Selenium distribution in protein isolated from yeast cells using FPLC.

### 2.6. Glutathione peroxidase (GPx) 활성 측정

Glutathione peroxidase 활성은 Paglia와 Lawrence[12]의 방법에 따라 측정하였다. 50 mM potassium phosphate 완충용액(pH 7)에 1 mM EDTA, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 0.2 mM NADPH, 1 mM GSH, 1 U/mL GSSG-reductase를 혼합한 용액 0.8 mL에 측정하고자 하는 시료 0.1 mL를 넣어 37°C 항온 수조에서 5분간 반응시킨 후 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액 0.1 mL를 첨가하여 NADPH의 흡광도 감소를 340 nm에서 측정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 효모 내 셀레늄 분포

본 연구에서 사용한 효모의 경우 배지에 첨가된 셀레늄을 흡수하여 대부분을 단백질에 결합된 형태로 전환시키는 것으로 보여진다(Figure 1). Bird 등은 셀레늄 축적 효모는 셀레늄을 단백질 상에 함유하고 있는 것으로 보고하였다[11].

### 3.2. 단백질 내 셀레늄 비율

배양 초기에 sodium selenite의 농도를 변화시켜 배지에 첨가한 경우 배양 24시간째 단백질 당 셀레늄의 양은 셀레늄의 초기 농도가 높을수록 증가하였다. 각각 1, 10, 30, 50 ppm의 sodium selenite가 첨가된 배지에서 배양한 효모를 회수하여 세포내 단백질을 분석한 결과 각각 0.067, 0.359, 0.936, 1.302 g selenium/mg protein의 셀레늄 단백질을 얻었다(Figure 2). 배지의 셀레늄 농도가 높을수록 세포 내로의 흡수가 증가하고 단백질 합성 시 참여 빈도가 높아지는 것으로 사료된다.

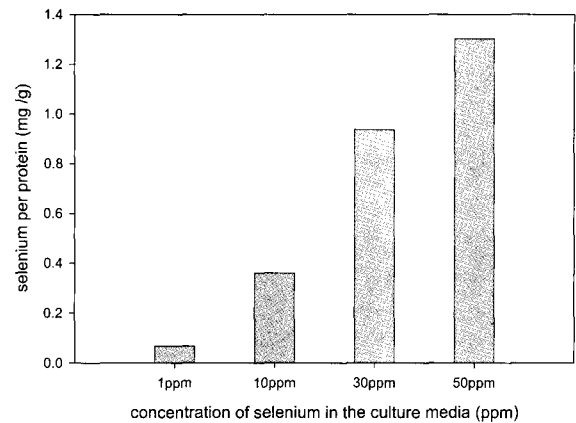


Figure 2. Effect of selenium concentration in medium on the selenium content per protein.

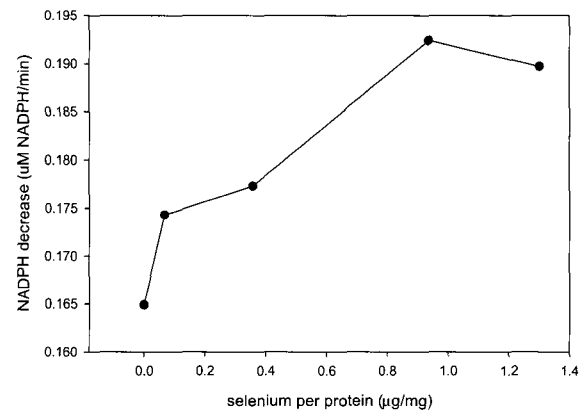


Figure 3. GPx-like activity of selenium peptide at various selenium content per protein.

### 3.3. 단백질의 셀레늄 함량에 따른 항산화 활성 변화

각각의 셀레늄 단백질의 GPx 활성을 측정한 결과 GPx 활성은 셀레늄 함량이 높은 단백질일수록 증가하였다(Figure 3). 이는 GPx의 활성자리에 있는 selenium이 ROOH를 환원시키기 때문이다[6].

### 3.4. 셀레늄 펩타이드의 항산화 활성

기능성 화장품 원료로 이용하려면 분자량이 작을수록 피부 투과성이 높아져 효율적이다. 따라서 셀레늄 단백질을 가수분해하여 작은 크기의 펩타이드로 전환하는 것이 필요하다. Protease/substrate 비율을 1/50으로 수행하였고 GPx 활성 측정 결과 평균 분자량이 작을수록 GPx 활성이 높아졌다(Figure 4). 단백질이 가수분해 되어 selenium을 포함하는 아미노산이 외부로 노출되어 반응 참여 확률이 높아지는 것으로 사료된다.

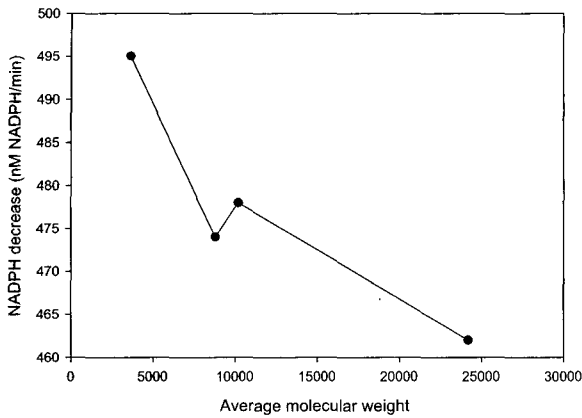
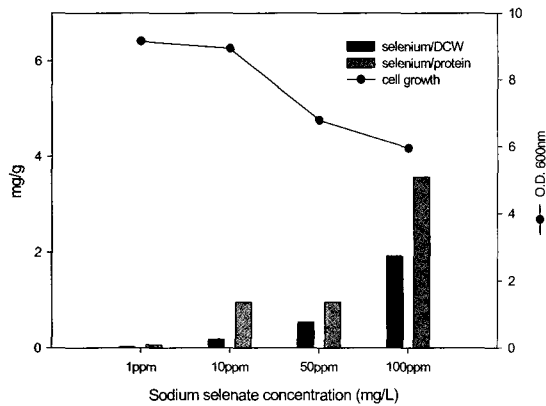
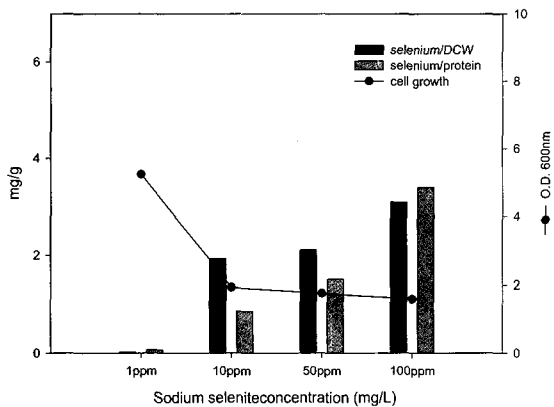


Figure 4. Effect of peptide length on the GPx-like activity of selenium peptide.



(a)



(b)

Figure 5. Selenium peptide production using (a) sodium selenate and (b) sodium selenite.

3.5. 무기 셀레늄 원료의 선택

효모 세포가 흡수하여 사용할 수 있는 무기 셀레늄은 sodium selenite (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>)와 sodium selenate (Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>)

가 있다. Sodium selenate의 경우 약 50 mg/L의 농도에서 50%의 성장 저해를 보였으나 sodium selenite의 경우 약 1 mg/L의 농도에서 50%의 성장 저해를 보였다(Figure 5).

한편 세포 건조 중량 당 셀레늄의 농도는 sodium selenite가 첨가된 배지에서 자란 효모가 높았으나 단백질의 셀레늄 함량은 sodium selenite와 sodium selenate 두 경우 비슷한 결과를 나타냈다(Figure 5). Sodium selenite가 첨가된 배지에서 자란 효모의 경우, 세포 내로 셀레늄을 흡수하는 능력은 크지만 단백질로 전환은 적은 것은 이 경우 대부분의 셀레늄이 유기 형태로 전환되지 못하고 세포벽에 흡착되어 있는 형태로 존재한다는[13] 보고와 일치한다. 따라서 세포 독성이 적고 유기 셀레늄으로의 전환율이 큰 sodium selenate가 셀레늄 펩타이드 생산에 적합한 것으로 판단된다.

4. 결 론

효모의 셀레늄 단백질은 GPx와 같은 항산화 활성을 갖고 있었고 단백질의 셀레늄 함량이 높을수록 GPx 활성이 높아졌고, 셀레늄 펩타이드의 길이가 짧을수록 GPx 활성이 높아졌다. Sodium selenate는 sodium selenite에 비하여 효모에 독성이 적고 유기 셀레늄으로의 전환율이 커서 셀레늄 펩타이드의 생산을 위한 무기 셀레늄 원료로 적합하였다.

참 고 문 헌

1. C. Meewes, P. Brenneisen, J. Wenk, L. Kuhr, W. Ma, J. Alikoski, A. Poswig, T. Krieg, and K. S. Kochanek, Adaptive antioxidant response protects dermal fibroblasts from UVA-induced phototoxicity, *Free radic. biol. Med.*, **30**, 238 (2001).
2. N. Emonet, M. T. Leccia, A. Favier, J. C. Beani, and M. J. Richard, Thiols and selenium: protective effect on human skin fibroblasts exposed to UVA radiation, *J. photochem. photobiol. B, Biol.*, **40**, 84 (1997).
3. T. S. Rafferty, R. C. McKenzie, J. A. A. Hunter, A. F. Howie, J. R. Arthur, F. Nicol, and G. J. Beckett, Differential expression of selenoproteins by human skin cells and protection by selenium from UVB-radiation-induced cell death, *Biochem. J.*, **332**, 231 (1998).
4. G. E. Arteel and H. Sies, The biochemistry of selenium and the glutathione system, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **10**, 153 (2001).

5. G. Luo, Z. Zhu, L. Ding, G. Gao, Q. Sun, Z. Liu, T. Yang, and J. Shen, Generation of selenium-containing abzyme by using chemical mutation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **198**, 1240 (1994).
6. X. J. Ren, L. Q. Yang, J. Q. Liu, D. Su, D. L. You, C. P. Liu, K. Zhang, G. M. Luo, Y. Mu, G. L. Yan, and J. C. Shen, A novel glutathione peroxidase mimic with antioxidant activity, *Arch. Biochem. Biophys.*, **387**, 250 (2001).
7. F. Ursini, M. Maiorino, and C. Gregolin, The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *Biochim. Biophys. Acta.*, **839**, 62 (1985).
8. H. Sies, L. O. Klotz, V. S. Sharov, R. Tamler, A. Assmann, and K. Briviba, Glutathione peroxidases as peroxynitrite reductases, *Pathophysiology*, **5**, 61 (1998).
9. G. H. Heinz and D. J. Hoffman, Comparison of the effects of seleno-L-methionine, seleno-DL-methionine, and selenized yeast on reproduction of mallards, *Environmental Pollution*, **91**, 169 (1996).
10. C. Jiang, W. Jiang, C. Ip, H. Ganther, and J. Lu, Monomethyl selenium-specific inhibition of MMP-2 and VEGF expression: Implications for angiogenic switch regulation, *Mol. Carcinog.*, **26**, 213 (1999).
11. S. M. Bird, P. C. Uden, J. F. Tyson, E. Block, and E. Denoyer, Speciation of Selenoamino Acids and Organoselenium Compounds in Selenium-enriched Yeast using High-performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *J. anal. at. spectrom.*, **12**, 785 (1997).
12. D. E. Paglia and W. N. Valentine, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *J. Lab. Clin. Med.*, **70**, 158 (1967).
13. A. Demirci and A. L. Pometto III, Production of organically bound selenium yeast by continuous fermentation. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2491 (1999).