

Streptomyces luteogriseus KT-10 에 의한 Cathepsin B 저해물질의 발효생산

한길환 · 김상달*

영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과

Production of Cathepsin B Inhibitor by *Streptomyces luteogriseus* KT-10. Han, Kil-Hwan and Sang-Dal Kim*. Department of Applied Microbiology, College of Natural Resources, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea – *Streptomyces luteogriseus* KT-10 isolated from Korean farm soil produced a strong cathepsin B inhibitor. Optimal conditions for the cathepsin B inhibitor production by *S. luteogriseus* KT-10 were evaluated. The cathepsin B inhibitor was produced with maximal yield in the cultural condition of pH 7.0 and 25°C for 4 days. Optimal medium for the cathepsin B inhibitor production was determined to be a medium containing 20 g, peptone 3 g, yeast extract 1 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, NaNO₃ 0.5 g, NaCl 0.5 g per l. The cathepsin B inhibitor produced by *S. luteogriseus* KT-10 could also inhibit the other proteinases such as trypsin, papain, and cathepsin D.

Key words : *Streptomyces luteogriseus* KT-10, cathepsin B inhibitor

포유동물 조직세포내에 존재하는 lysosome은 세포외부로부터 병원성 세균의 침입, 세포의 단백질 분해, 세포내의 불필요한 조직을 소화분해하는 lysosomal 가수분해효소를 담고 있는 주머니로 pH 5.0 부근에서 최적의 활성을 나타낸다[4, 5, 12, 14]. 이러한 lysosomal 가수분해효소들 중 cathepsin B는 thiol 계 단백질 분해효소로 비교적 많은 양이 함유되어 있으며 최근 이 효소의 생리, 병리적 연구가 활발히 수행되고 있다. Cathepsin B는 세포내의 간, 비장, 포피선, 폐, 부갑상선, 뇌, 심장 등의 여러 조직세포에 존재하여 여러 가지 생리적 조절작용 및 면역작용에 관여하고 있다[10, 11, 15, 17].

Cathepsin B의 이상과다 발현은 포유동물 조직세포 내에서 암 발병 및 전이작용에 관여하며, 류머티스 관절염, 열증반응, 노인성 치매 등의 발병에도 관여한다는 보고가 있다[6, 13, 16]. 이와 같은 cathepsin B에 의한 발병의 원인 및 치유방법을 밝히기 위해 cathepsin B 저해물질 개발이 꾸준히 시도되고 있으며[7, 9], Umezawa 등은 미생물을 기원으로 하여 leupeptin과 antipain 등의 cathepsin B 저해물질을 개발하였다[1, 19]. 그 외에 E-64, β -MAP1, chymostatin 등의 cathepsin B 저해물질들이 미생물로부터 개발된 바 있다[18, 20, 21]. 그러나 보고된 이들 cathepsin B 저해물질들은 cathepsin B에 대한 저해력이 떨어질 뿐 아니라 인체에 투여시 다른 효소에도 영향을 미치므로

부작용이 있는 것으로 밝혀졌다[17].

본 연구는 전보[9]에서 cathepsin B에 대해 강한 저해력을 갖는 *Streptomyces luteogriseus*을 토양으로부터 분리한 데 이어, 본 균주의 cathepsin B 저해물질 생산 조건을 조사하였다. 또한 여러 가지 탄소원, 질소원 및 무기이온 등의 농도에 의한 저해물질 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 본 저해물질이 다른 종류의 단백질분해효소에 대해 저해력을 가지는지도 조사하였다.

재료 및 방법

균주, 효소 및 기질

전국 각지역의 토양으로부터 분리한 방선균 중에서 최종 선별된 *Streptomyces luteogriseus* KT-10 균주를 cathepsin B 저해물질 생산균주[9]로 사용하였다. Cathepsin B와 papain은 Sigma사의 제품을 사용하였으며, cathepsin B의 효소반응에 사용한 기질인 N α -CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester HCl (CLN)과 N α -benzoyl-DL-arginine β -naphthylamide (BANA)도 Sigma사의 제품을 구입하여 사용하였다.

Cathepsin B 저해물질의 활성도 측정

Cathepsin B 저해물질의 활성도 측정은 분광광도계의 1 ml cuvette 내에 25 mM sodium acetate buffer (pH 5.2)에 1 mM EDTA를 녹인 incubation buffer 0.8 ml를 넣고, 기질로 N α -CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester HCl (CLN) 5.22 mM을 dimethylsulfoxide에 녹여 사용하거나, N α -benzoyl-DL-arginine β -naphthylamide (BANA)의 171mM

*Corresponding author

Tel. 82-53-810-2395, Fax. 82-53-811-4319

E-mail: sdkim@yeungnam.ac.kr

농도를 N,N-dimethylformamide에 녹여 각 50 μ l를 반응시켰으며 저해물질용액은 100 μ l를 취하여 반응시켰다. CLN 기질의 경우는 326 nm에서, BANA 기질의 경우는 340 nm에서 25°C에서 각 반응시간에 따라 반응시킨 후 저해활성의 기울기 값(V_0)을 이용하여 저해활성도를 측정하였다[2]. Cathepsin B 저해물질의 생산성 조사 실험에서는 cathepsin B 대신에 같은 활성을 지닌 papain으로 대체하여 저해활성도를 측정하였다.

저해물질이 첨가되지 않은 기질과 효소의 반응을 A, 기질과 효소 그리고 저해물질을 첨가한 반응을 B, 효소가 첨가 되지 않은 기질과 저해물질의 반응을 C 라고 할 때 저해활성도를 다음 식으로 계산하였다.

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

Cathepsin B 저해물질의 생산조건 조사

S. luteogriseus KT-10에 의해 생산되는 cathepsin B 저해물질 생산의 최적조건을 구하기 위해 다음 조성의 배지를 사용하였다. *S. luteogriseus* KT-10의 배양배지로는 glucose 10 g, peptone 2 g, yeast extract 1 g, beef extract 1 g, agar 20 g을 물 1 l에 녹인 후 pH 7.0으로 조정된 Bennett's 배지를 기초배지로 사용하였고, cathepsin B 저해물질의 생산 배지로는 glucose 20 g, peptone 3 g, yeast extract 1 g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $NaNO_3$ 0.5 g, NaCl 0.5 g을 물 1 l에 녹여 pH 7.0으로 조정된 배지를 사용하였다.

Cathepsin B 저해물질 생산을 위한 액체배양은 상기의 저해물질 생산배지 100 ml를 500 ml Erlenmeyer flask에 넣고 121°C에서 15분 간 살균한 다음 전배양한 배양액을 1%(v/v) 접종하여 25°C에서 4일 간 진탕 배양하였다. 배양액을 Whatman No. 2로 여과하고 배양여액을 80°C, 10분 정도 가열한 후 저해활성을 측정하였다.

균체의 건조중량은 배양액 10 ml를 Whatman No. 2로 여과하여 증류수로 2회 세척 후 이를 105°C에서 항량이 될 때까지 건조한 균체 무게를 3회 반복 측정하여 평균값으로 하였다.

결과 및 고찰

Cathepsin B 저해물질의 활성

S. luteogriseus KT-10에 의해 생산되는 cathepsin B 저해물질의 2종의 합성기질을 사용할 경우 활성도 측정가능 여부를 조사하기 위해 cathepsin B 기질로 알려진 N- α -CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester HCl (CLN)과 N- α -benzoyl-DL-arginine β -naphthylamide (BANA)을 이용하여 활성을 확인한 결과 Fig. 1과 같이 나타났다. 기질에 대한 cathepsin B의 활성을 시간에 따른 활성값의 기울기로 조사

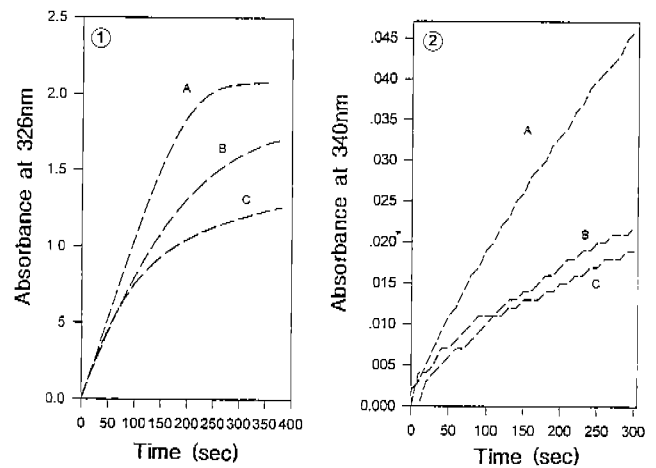


Fig. 1. Effect of CLN or BANA as a substrates on the activity and inhibition of cathepsin B.

⊘; N- α -CBZ-L-lysine *p*-nitrophenyl ester (CLN),

⊚; N- α -benzoyl-DL-arginine β -naphthylamide (BANA).

A; in the absence of inhibitor, B; in the presence of inhibitor, C; in the absence of enzyme (control)

Table 1. Effect of carbohydrates on the cathepsin B inhibitor production

Carbohydrate	Growth	Final pH	Relative activity(%)
Glucose	++	5.8	100
Mannose	+	6.5	85.7
Galactose	±	6.4	89.5
Maltose	+	6.5	82.7
Melibiose	±	6.3	72.7
Adonitol	±	6.5	59.5
Fructose	±	6.3	53.2
Xylose	±	6.4	73.6
Cellobiose	+	6.2	85.0
Rhamnose	±	6.4	75.9
Salicin	±	6.4	42.0
Melezitose	±	6.5	56.0
Arabinose	±	6.2	76.6
Sorbose	±	6.3	68.0
Saccharose	±	6.5	52.5
Dextran	±	6.5	66.7
Starch	++	5.6	90.0
Laminaran	++	5.5	93.0
Pectin	+	5.5	82.3
Amylose	±	6.2	78.2
Pectic acid	±	3.1	41.8

++, good; +, Normal; ±, Poor

Carbon source (1.0%) was added to the basal medium composed of 0.1% asparagine with K_2HPO_4 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, NaCl 0.05% at pH 7.0. One percent of seed culture solution was inoculated into a 250 ml shaking flask containing 100 ml of medium and cultivated at 25°C for 4 days on a reciprocal shaker.

한 바 CLN이 높게 나타났으나, 저해물질에 의한 저해력은 BANA기질이 높게 나타났다. 그러나 BANA는 cathepsin B에 대해 낮은 활성을 나타내었으므로 cathepsin B의 기질로 적합하지 않았다[3].

탄소원의 영향

S. luteogriseus KT-10이 생산하는 cathepsin B 저해물질이 배지에 첨가된 탄소원에 의한 저해물질 생산성의 영향을 조사하였다. 여러 탄소원 (1%, w/v)을 저해물질 생산 배지에 첨가한 후 *S. luteogriseus* KT-10을 접종하여 25°C에서 4일간 배양한 후 배양여액 내에 생산된 저해물질의 활성을 조사한 후 상대 저해값을 비교하였다. 그 결과 Table 1과 같이 단당류인 glucose에서의 생육이 양호하였으며, 다당류인 starch와 laminaran에서도 생육이 왕성하였다. 그 외 mannose, melibiose, cellobiose 등의 당 이용율도 양호하게 나타났다. 그러나 fructose, xylose, arabinose, sorbose 등의 당에서 그 생육이 낮게 나타났다. 배양 후 배지의 최종 pH는 5.4에서 6.7에 이르는 약산성으로 변화되었으나 pectic acid를 첨가했을 경우 3.17의 낮은 pH를 나타냈다. 저해물질 생산은 glucose를 탄소원으로 첨가하여 생산된 저해물질 양을 100%로 두고 상대적인 저해율을 확인한 결과 starch와 laminaran 등의 다당류는 균체의 생육에서 동일하게 glucose에 비해 좋았으나 저해물질 생산율은 90%, 93%로써 glucose에 비해 낮았다.

저해물질 생산시 배양시간에 의한 균체의 성장과 저해물질 생산율을 조사하기 위해 균체생육과 저해물질 생산율이

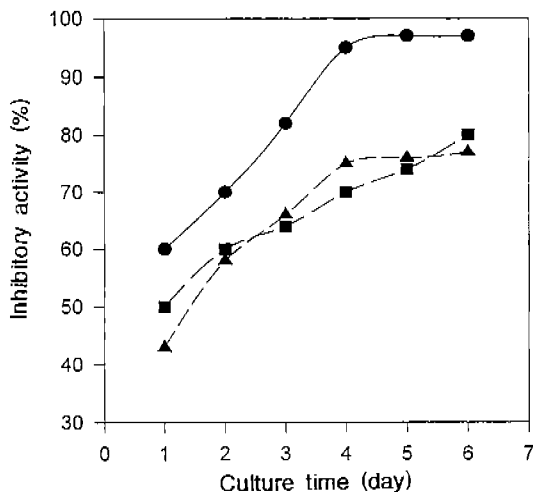


Fig. 2. Changes of cathepsin B inhibitor production in the various media containing glucose, starch or laminaran as a carbon source by *Streptomyces luteogriseus* KT-10.

l, glucose; ■, starch; ▲, laminaran. Carbohydrate or carbon source was added with a final concentration of 1%. The strain was cultured for 4 days at 25°C. The filtered culture broth was heated at 80°C for 10 min, and then the inhibitory activity was measured.

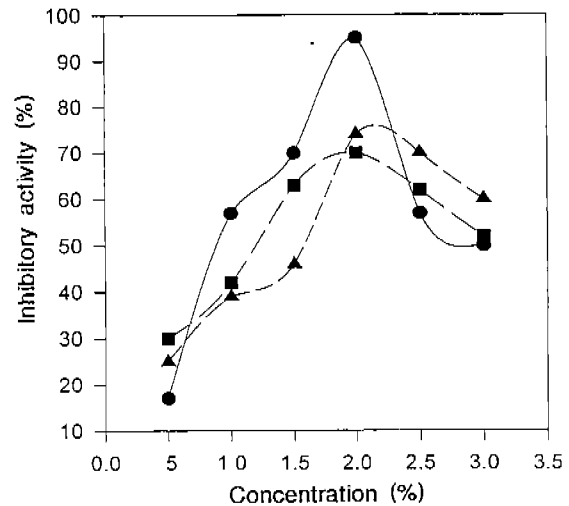


Fig. 3. Effect of the concentration of carbon sources on the cathepsin B inhibitor production by *Streptomyces luteogriseus* KT-10.

l, glucose; ■, starch; ▲, laminaran. The strain was cultured for 4 days at 25°C. The filtered culture broth was heated at 80°C for 10 min, and then the inhibitory activity was measured.

높은 glucose, starch 그리고 laminaran의 3종의 당을 배지에 첨가하여 시간 별로 배양한 결과 Fig. 2에서 나타난 것 같이 4일간 배양시 97% 이상의 저해물질 생산을 나타내었다. Glucose, starch 및 laminaran의 농도별 저해물질 생산을 조사한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 glucose의 경우 2% 농도에서 95% 정도의 저해율을 나타내었으며, 2.5% 이상에서는 저해물질 생산율이 급격히 떨어졌다. Starch와 laminaran을 2% 첨가한 경우 67%와 73%의 저해율을 나타내었으며, 균체 생육율은 좋았으나, 저해물질 생산에 있어서는 glucose에 비해 떨어지는 것으로 확인되었다. 그러므로 저해물질 생산용 배지에 탄소원으로 glucose 2%를 이용하기로 하였다.

질소원의 영향

S. luteogriseus KT-10이 cathepsin B 저해물질을 생산할 때 첨가된 각종 질소원의 영향을 조사하였다. 질소 첨가가 미치는 저해물질 생산의 최적조건을 조사하기 위해 질소원을 제거한 저해물질 생산용 배지에 최종농도 0.3% 되게 각 질소원을 첨가하여 저해물질 생산에 미치는 영향을 조사한 결과 Table 2와 같이 전반적으로 유기질소원이 무기질소원에 비해 균체의 생장율 및 저해물질 생산율이 높게 나타났다. 질소원 asparagine의 저해물질 생산율을 100%로 하여 각 질소원을 비교한 결과 peptone, yeast extract, beef extract, malt extract 그리고 casein 등의 유기질소원은 123%에서 180%로 우수하였고, 무기질소원인 (NH₄)₂ SO₄, NH₄Cl, NH₄H₂PO₄, NaNO₃ 등은 72%

Table 2. Effect of nitrogen sources on the cathepsin B inhibitor production

Nitrogen source	Growth	Final pH	Relative activity(%)
Asparagine	++	6.4	100
Casein	+	6.3	123
Malt extract	++	6.0	133
Peptone	++	5.9	180
Beef extract	++	6.1	155
Yeast extract	+	6.2	165
Urca	±	6.6	72
(NH ₄) ₂ HPO ₄	±	6.5	82
(NH ₄) ₂ SO ₄	±	6.4	80
NH ₄ H ₂ PO ₄	±	6.3	85
NH ₄ Cl	±	5.7	82
NH ₄ NO ₃	±	6.1	79
NaNO ₃	±	6.6	100
KNO ₃	±	6.7	78

++, good; +, normal; ±, poor

Nitrogen source (0.1%) was added to the inhibitor production medium composed of 2% glucose, 0.05% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ 7H₂O at pH 7.0. Seed culture of 1% was inoculated into a 250 ml shaking flask containing 100 ml of medium and cultivated at 25°C for 4 days on a reciprocal shaker.

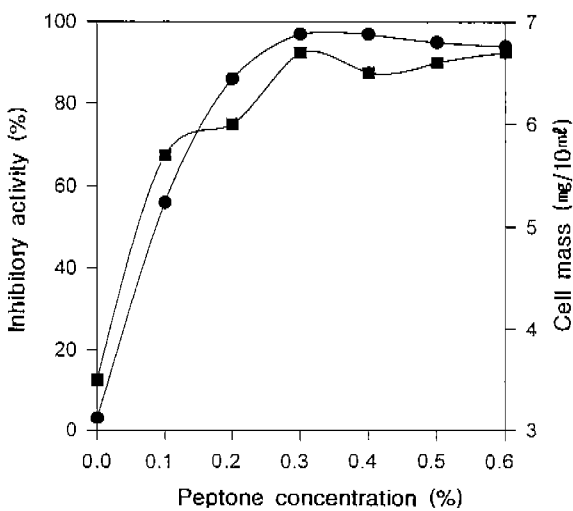


Fig. 4. Effect of the concentration of peptone on the cathepsin B inhibitor production by *Streptomyces luteogriseus* KT-10.

○, Inhibition activity (%); ■, Cell mass (mg/10ml)
The strain was cultured for 4 days at 25°C. The filtered culture broth was heated at 80°C for 10 min, and then the inhibitory activity was measured.

에서 100%로서 유기질소원보다 저조하였다.

질소원 중에서 저해물질 생산성이 가장 높은 peptone을 대상으로 농도에 따른 저해물질 생산율과 균체생장율을

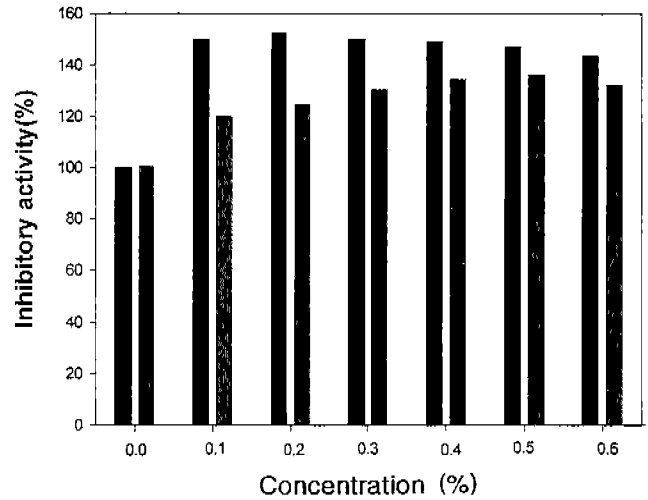


Fig. 5. Effect of the concentration of yeast extract or beef extract on the cathepsin B inhibitor production by *S. luteogriseus* KT-10.

■, Yeast extract; ▨, Beef extract

조사한 결과 Fig. 4에서 나타난 것과 같다. Peptone의 농도를 0에서 0.6%로 조정하여 배양한 결과 0.3% 이상에서 저해물질 생산율이 96% 이상의 높은 생산율을 나타내었으며, 균체성장율 또한 0.3% peptone 농도에서 가장 높게 나타났다.

Peptone 외에 부가적으로 첨가한 질소원이 저해물질 생산에 어떠한 영향을 미치는가를 확인하기 위하여 peptone이 들어 있는 배지에 저해물질 생산율이 좋은 yeast extract, beef extract를 부가적으로 첨가해서 농도별 균체성장률 및 저해물질 생산율을 확인하였다. 그 결과 Fig. 5에서 나타난 것과 같이 0.1% 농도까지 저해물질 생산율이 증가하였다. Yeast extract를 사용했을 경우 beef extract를 사용했을 때보다 저해물질 생산율이 더욱 증가되었다. 이는 yeast extract 내에 존재하는 thiamine, riboflavin, pyridoxine, niacinamide 및 pantothenic acid 등의 vitamin이 생육인자 혹은 저해물질 생산의 cofactor로 작용했을 가능성을 시사한다. Yeast extract의 경우 0.4%와 beef extract의 경우 0.5% 이상 농도에서는 저해물질 생산율이 낮아짐을 알 수 있었다. 여기서 상기 소정 농도의 질소원의 첨가와 비례하여 저해물질 생산율이 증가함을 확인함으로써, 저해물질 생산에 peptone외 yeast extract와 beef extract의 유기질소 영양분의 영향을 크게 받음을 알 수 있었다.

Vitamin 에 의한 영향

미생물의 생육 및 저해물질 생산에 있어서 vitamin은 cofactor로 작용할 것으로 추측하여 *S. luteogriseus* KT-10가 cathepsin B 저해물질을 생산할 때 각종 vitamin이 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 이를 확인하기 위해

Table 3. Effect of vitamins on the cathepsin B inhibitor production

Vitamin	Growth	Final pH	Relative activity(%)
Riboflavine	+	6.5	106
d-Biotine	+	6.3	96
Thiamine · HCl	+	6.2	111
DL- α -Lipoic acid	+	5.6	93
Pyridoxal · HCl	+	6.7	103
Pyridoxamine · 2HCl	+	5.3	90
Folic acid	+	5.2	112
i-Inositol	+	6.3	110
Ca-pantothenate	+	6.4	120
Niacin	+	6.5	93
Nicotinamide	+	6.7	87
Ascorbic acid	+	6.1	110
None	+	6.2	100

+, good. Each vitamin was added with a concentration of 1 μ g/ml to the medium containing 2% glucose, 0.3% asparagine, 0.05% K_2HPO_4 , 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% NaCl at pH 7.0. Seed culture of 1% was inoculated into a 250 ml shaking flask containing 100 ml of medium and cultivated at 25°C for 4 days on a reciprocal shaker.

Table 4. Effect of inorganic salts on the cathepsin B inhibitor production

Metal salt	Growth	Final pH	Relative activity(%)
$AlCl_3$	+	5.5	63
Li_2SO_4	+	6.2	64
$MnCl_2$	+	6.3	73
$CoCl_2$	+	6.3	83
$CaCl_2$	+	6.3	72
$CuSO_4$	+	6.3	89
$ZnSO_4$	+	6.7	67
$BaCl_2$	+	5.4	56
$MgCl_2$	+	5.2	87
$MgSO_4$	+	5.4	110
$FeSO_4$	+	5.6	83
$FeCl_3$	+	5.2	81
None	+	6.4	100

+, good. Each metal salt was added with a concentration of 1 mM to the medium containing 2% glucose, 0.3% asparagine, 0.05% K_2HPO_4 , and 0.05% NaCl at pH 7.0.

상기의 배지에 각종 vitamin을 1 μ g/ml 농도로 첨가하여 균의 생육과 저해물질 생산능을 조사해 본 결과 Table 3 과 같이 대부분의 vitamin에 의해 성장율이 좋았으며 저해 물질 생산율에 있어서도 87%에서 120% 정도로 나타났다. 그 중에서도 Ca-pantothenate, DL- α -lipoic acid, thiamine HCl, folic acid 등은 무첨가 대조구에 비해 높은 저해물질

생산율을 나타냈으며 nicotinamide, niacin 등은 낮게 나타났다. 그러나 이 결과로 부가적으로 첨가된 vitamin이 미생물의 생육 및 저해물질 생산에 cofactor로서의 뚜렷한 증가 효과는 확인 할 수 없었다.

무기이온에 의한 영향

무기이온은 2차 대사산물의 생합성을 억제하는 경우도 있지만 균체 생육에 필수적인 보조인자로써 필요한 미량영양원일 수도 있다. Cathepsin B 저해물질 생산에 미치는 금속염의 영향을 조사하기 위하여 각종 금속염을 1.0 mM 농도로 첨가해서 배양한 결과 Table 4와 같이 성장율에 있어서는 대조구에 비해서 많은 차이를 보이지 않았으며, 저해물질 생산율에 있어서는 $MgSO_4$, $MgCl_2$, $CaCl_2$ 를 제외한 대부분의 금속염 첨가구에서 저해물질 생산력이 떨어졌음을 확인할 수 있었다. Table 4에서 보는 바와 같이 Mg^{2+} 이온이 저해물질 생산에 가장 좋은 영향을 미쳤다. 이러한 결과로 cathepsin B 저해물질 생산에 Mg^{2+} 이온이 관여하는 것으로 생각된다. 그 외 금속염은 저해물질 생산에 나쁜 영향을 주는 것으로 생각되며 배지내의 pH 변화는 약산성으로 변화되었음을 확인할 수 있었다.

배양시간에 따른 저해물질 생산영향

Cathepsin B 저해물질 생산용 배지로 방선균 배양용으로 많이 이용하는 생산 배지를 활용해서 조사하였다. 먼저 Bennett 배지에 전 배양시킨 종균 배양액을 1% 접종한 다음, 배양시간별로 25°C에서 배양시켜 그 생산성을 측정한다. 결과 Fig. 6 에서 나타난 것처럼 배양시간이 증가함에 따라

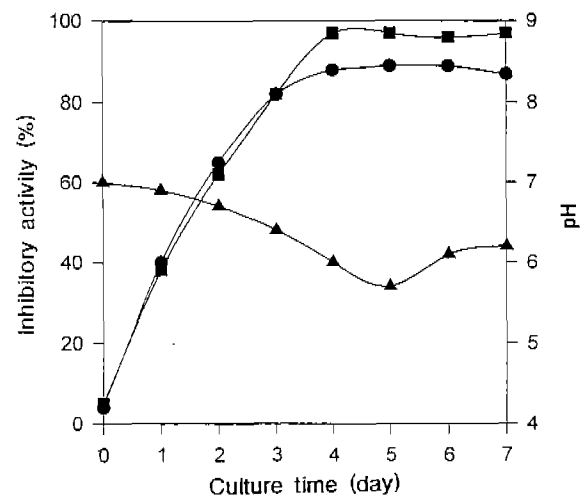


Fig. 6. Effect of the culture time on the cathepsin B inhibitor production by *S. luteogriseus* KT-10.

■, Inhibitor product medium; ●, Bennett's medium; ▲, pH. The strain was cultured at 25°C. The filtered culture broth was heated at 80°C for 10 min, and then the inhibitory activity was measured.

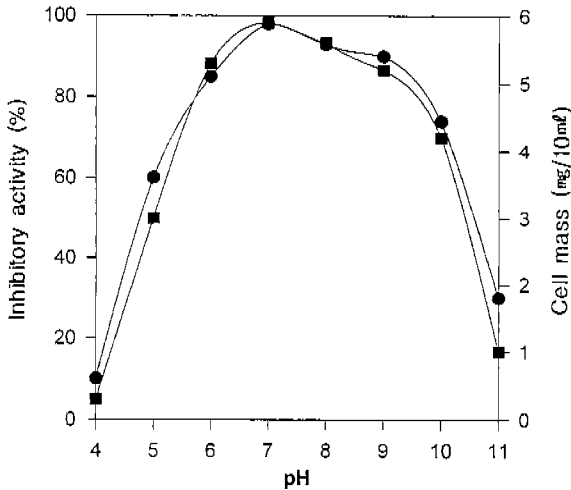


Fig. 7. Effect of pH on the cathepsin B inhibitor production by *S. luteogriseus* KT-10.

1, Inhibitory activity (%); ■, Cell growth (mg/10ml)
 The strain was cultured for 4 days at 25°C. The filtered culture broth was heated at 80°C for 10 min, and then the inhibitory activity was measured.

저해물질 생산성이 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 최적 배양시간을 조사한 결과는 4일 배양시 저해율이 95% 이상의 높은 생산율로 나타났다. 배양중 배지내 pH 변화를 알 이본 결과 배지내의 pH가 차츰 떨어져 pH 5.7까지 떨어졌 으나, 5일 후 pH는 차츰 증가함을 알 수 있었다.

또한, 본 실험의 2가지 배지상에서 균체량을 측정하면 Bennett's 배지에서 자란 균체가 성장율이 약간 높게 나타 났다. 이와 같은 결과는 Bennett's 배지가 저해물질 생산용 배지에 비하여 풍부한 영양분을 함유하여 균체성장에는 다소 양호하였으나 저해물질 생산율에 있어서는 본 연구에 서 선정한 저해물질 생산배지가 높은 것으로 확인되었다.

저해물질 생산에 미치는 pH의 영향

저해물질 생산용 배지의 초기 pH를 pH 4.0부터 pH 11.0 까지 각각 조절한 후 미리 종균 배양시킨 1%의 접종 원을 배지에 접종한 후 28°C에서 4일간 배양시킨 후 pH 에 의한 저해물질 생산성을 조사해 본 결과 Fig. 7 에서와 같이 pH 7.0 에서 cathepsin B 저해물질 생산이 가장 좋 았으며, 균체성장을 또한 pH 7.0 에서 가장 높게 조사되었 다. 균체성장에 있어서나 저해물질 생산에 있어서 pH 가 중성에서 가장 양호하다는 실험 결과는 기존의 방선균의 생육조건[11] 과 비슷함을 확인 할 수 있었으며, 균체 생육 과 저해물질 생산이 비례하면서 생산함을 알 수 있었다.

저해물질 생산에 미치는 배양온도의 영향

배양 온도에 따른 cathepsin B 저해물질 생산성을 조사 하기 위하여 종 배양액 1%를 pH 7.0으로 조정된 저해물

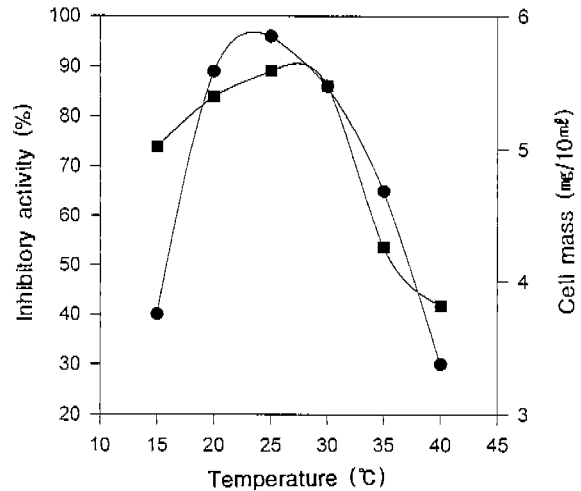


Fig. 8. Effect of temperature for the cathepsin B inhibitor pro- duction by *S. luteogriseus* KT-10.

1, Inhibitory activity (%); ■, Cell growth (mg/10ml)
 The strain was cultured for 4 days. The filtered culture broth was heated at 80°C for 10 min, and then the inhibitory activity was measured.

질 생산 배지에 접종한 후 15°C에서 45°C 사이의 온도에서 5일간 배양하였다. 그 결과 25°C에서 저해물질 생산율 이 가장 높았으며, 균체 성장율 또한 25°C에서 가장 높게 나타났다 (Fig. 8). 이와 같은 결과는 다른 방선균에 있어 서 28°C에서 30°C 사이에서 성장률이 가장 좋은 것으로 보고된 결과[1] 와 비교할때 본 균주의 경우 25°C 부근에 서 성장률이 가장 좋았으므로 일반 방선균의 특성과는 약 간의 상이함을 나타내었다.

다양한 enzyme들에 대한 저해 활성 조사

S. luteogriseus KT-10이 생산하는 조정제된 cathepsin

Table 5. Inhibition for various proteases and urease by the inhibitor produced from *S. luteogriseus* KT-10

Proteolytic enzyme	Substrate	Inhibition
pepsin	haemoglobin	-
cathepsin B	CLN ^a	+
papain	casein	+
cathepsin D	hemoglobin	+
trypsin	casein	+
α-chymotrypsin	casin	-
aminopeptidase M	L-leucine- <i>p</i> -nitroanilide	-
collagenase	collagen	-
snake venom protease (<i>Rhabdophis tigrinus</i>)	human plasma	-
urease	urea	+

^a N_α-CBZ-L-Lysine *p*-Nitrophenyl ester HCl.

B 저해물질이 다른 단백질 분해효소에 대한저해 할 수 있는지 그 저해 spectrum을 조사하였다. 그 결과 Table 5에 나타난 것과 같이 trypsin, papain, cathepsin D에도 저해력을 나타내었다. 또한 최초 위암 발병의 원인으로 주목받고 있는 *Helicobacter pylori*의 urease에서도 저해력을 확인 할 수 있었다.

요 약

포유동물 조직의 세포내에 존재하는 lysosomal cathepsin B 효소는 암 발병과 전이작용, 류머티스 관절염, 염증 및 노인성 치매 등 여러가지 질병에 관여하고 있다. 이러한 cathepsin B의 작용을 저해하는 효소 저해물질을 개발하기 위해 토양으로부터 cathepsin B 저해물질 생산성 방선균을 분리, 선발, 동정한 결과 *Streptomyces luteo-griseus* KT-10을 분리하였다. Cathepsin B 저해물질 생산을 위한 최적의 생산조건을 조사한 결과, 배지에 첨가한 탄소원으로 glucose 2%의 첨가와 질소원으로는 0.3% peptone, 0.1% yeast extract, 0.05% NaNO₃을 처리하였을 경우 균주의 성장 및 저해물질 생산이 가장 높게 나타났고, 배지에 첨가하는 염류로는 MgSO₄를 처리하였을 경우 저해물질의 생산량이 가장 높았다. 이와 같은 조건을 바탕으로 저해물질의 배지 조성은 배지 1당 glucose 20 g, peptone 3 g, yeast extract 1 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, NaNO₃ 0.5g, NaCl 0.5 g으로 최적 배지조건을 구명하였다. Cathepsin B 저해물질 생산을 위한 *S. luteo-griseus* KT-10의 최적 배양 조건은 pH 7.0, 25°C, 4일간 배양시켰을 경우 가장 많은 양의 cathepsin B 저해물질을 생산하였다. 또한 *S. luteo-griseus* KT-10가 생산한 cathepsin B 저해물질은 trypsin, papain, cathepsin D 등의 다른 protease와 urease에도 저해력을 확인할 수 있었다.

REFERENCES

1. Aoyagi, T., T. Takeuchi, A. Matsuzaki, K. Kawamura, S. Kondo, M. Hamada, K. Maeda, and H. Umezawa. 1969. Leupeptins, new protease inhibitor isolated from *Actinomycetes*. *J. Antibiot.* **22**: 283-286.
2. Bajkowski, A. S. and A. Frankfater. 1975. Specific spectrophotometric assays for cathepsin B. *Anal. Biochem.* **68**: 119-127.
3. Barrett, A. J. 1972. A new assay for cathepsin B and other thiol proteinases. *Anal. Biochem.* **47**: 280-293.
4. Barrett, A. J. 1977. Introduction to the history and classification of tissue proteinase, pp.1-18, In A.J. Barrett (ed.), *Proteinase in Mammalian Cells and Tissue*. North-Holland Biomedical Press.
5. Chapman H. A., R. J. Riese, and G. P. Shi. 1997. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* **59**: 63-88.
6. de Duve, C. 1969. pp. 3-42 In J. T. Dingle and H.B. Fell, (eds.), *Lysosomes in Biology and Pathology*, Vol 1. North-Holland Publ., Amsterdam.
7. Duffy, M. J. 1996. Protease as prognostic markers in cancer. *Clin. Cancer Res.* **2**: 613-618.
8. Ebert, W., H. Knoch, B. Werle, G. Trefz, T. Muley, and E. Spiess. 1994. Prognostic value of increased lung tumor tissue cathepsin B. *Anticancer Res.* **14**: 895-900.
9. Han, K. H. and S. D. Kim, 1997. Selection and identification of a strain KT-10 producing the cathepsin B inhibitor. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 333-340.
10. Hara, K., E. Kominami, and N. Katunuma. 1988. Effect of proteinase inhibitors on intracellular processing of cathepsin B, H, and L in rat macrophages. *FEBS Lett.* **231**: 229-231.
11. Katunuma, N. and E. Kominami. 1983. Structures and functions of lysosomal thiol proteinases and their endogenous inhibitor. *Curr. Top. Cell. Regul.* **22**: 71-101.
12. Ledakis, P., T. T. William, N. Rosenberg, D. Romero-Fischmann, I. Daskal, and T. T. Lah. 1996. Cathepsin D, B, and L in malignant human lung tissue. *Clin. Cancer Res.* **2**: 561-568.
13. Lenney, J.F. 1980. Inhibitors associated with the proteinases of mammalian cells and tissues. *Curr. Top. Cell. Regul.* **17**: 25-57.
14. Neurath, H. and K. A. Walsh. 1976. Role of proteolytic enzymes in biological regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 3825-3832.
15. Reddy, U. Y., Q-Y. Zhang, and S. J. Weiss. 1995. Percellular mobilization of the tissue destructive cysteine proteases, cathepsin B, L, and S, by human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3849-3853.
16. Sloane, B. F., K. Moin, E. Krepela, and J. Rozhin. 1990. Cathepsin B and its endogenous inhibitors: Role in tumor malignancy. *Cancer Metastasis Rev.* **9**: 333-352.
17. Sloane, B. F., K. Moin, and T. T. Lah. 1994. Regulation of lysosomal endopeptidases in malignant neoplasia, pp. 411-466. In G. Pretlow and H. Pretlow (eds.), *Biochemical and Molecular Aspects of Selected Cancers*. Academic Press, New York.
18. Sreedharan, S. K., C. Verma, L. S. D. Cavcs, S.M. Brocklehurst, S. E. Gharbia, H. N. Shah, and K. Brocklehurst. 1996. Demonstration that 1-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido - (4-guanidino) butane (E-64) is one of the most effective low Mr inhibitors of trypsin-catalysed hydrolysis. Characterization by kinetic analysis and by energy minimization and molecular dynamics simulation of the E-64- β -trypsin complex. *Biochem. J.* **316**: 777-786.
19. Suda, H., T. Aoyagi, M. Hamada, T. Takeuchi, and H. Umezawa. 1972. Antipain, a new protease inhibitor isolated from *Actinomycetes*. *J. Antibiot.* **25**: 263-266.
20. Umezawa, H., T. Aoyagi, H. Morishima, S. Kunimoto, S. Matsuzaki, M. Hamada, and T. Takeuchi. 1970a. Chymostatin, a new chymotrypsin inhibitor produced by *Actinomycetes*.

J. Antibiot. **23**: 425–427.

21. Watanabe, T. and S. Murao. 1979. Purification and characterization of crystalline microbial alkaline proteinase inhibitors

(MAPI) produced by *Streptomyces nigrescens* WT-27. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 243–250.

(Received October 14, 1999)