

## 효소활성에 미치는 니코틴의 영향

이 미 자 · 이 상 하

한국인삼연구소 연구부 담배제조부

### **Effect of Nicotine on the Various Enzymes' Activity**

Mi Ja Lee and Sang Ha Lee

Division of Tobacco Manufacturing, Korea Ginseng & Tobacco Research  
Institute, Daejon, Korea.

(Received Sep. 5, 1987)

#### **Abstract**

Nicotine, the main alkaloid of tobacco, showed different effect according to the enzyme. Among investigated enzymes, protease was inactivated remarkably by nicotine and the mode of inhibition was examined.

$\alpha$ -amylase and  $\beta$ -amylase were not affected, and cellulase and glucoamylase were inactivated partially when the concentration of it was over 1.0%, but protease was inhibited powerfully by nicotine. The inhibition of protease by nicotine was performed almost in the initial stage of reaction, and was not so much affected by temperature, and was reversible. The inhibition type of protease by nicotine appeared as a Mixed-type inhibition.

## 서 론

담배잎 등에 존재하는 중요한 가수분해 효소는  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, invertase, lipase 및 2-3종의 protease 등이 밝혀졌다.<sup>1-6)</sup> 이들은 curing과 redrying에 의하여 대부분 전환되지만  $\alpha$ -amylase와 invertase는 curing 후 점차 활성이 증가되며<sup>1-3)</sup> 저장 2년 까지도 미약하지만 활성이 유지됨을 조사한 바 있다.<sup>7)</sup> Kawashima 등<sup>5)</sup>에 의하면 protease는 curing에 의하여 활성이 증대된다. 그 후에는 거의 전환된다고 보고하였고, kuo 등<sup>8)</sup>은 잎담배를 어두운 곳에 두면 chymotrypsin의 활성을 강력하게 저해하는 물질인 proteinase inhibitor [I]이 축적된다고 하였다. protease의 저해제로서 각종 식물과 균류의 물질이 다수 알려져 있으며 이들의 특성을 이용한 효소의 생화학적 해결은 매우 유용하다.<sup>9-15)</sup> 전지는 잎담배에 처리하기 위한 효소를 선별하고 그 특성을 밝히는 과정에서 니코틴이 효소의 종류에 따라 활성에 다르게 영향을 주며 특히 protease를 강력히 저해하는 사실을 제시하였다. 지금까지 니코틴이 효소활성에 미치는 영향에 관한 보고는 없기에 protease에 대한 니코틴의 저해양식을 중심으로 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 효소원

protease와 cellulase는 토양, 담배잎 등에서 분리한 균주와 보관하고 있는 저장균으로 분리하였으며  $\alpha$ -chymotrypsin은 Fluka 제, *Bacillus subtilis*의  $\alpha$ -amylase와 soybean의  $\beta$ -amylase는 농장화장제이며 크립의 amylase는 Sigma 제를 사용하였다.

### 2. 효소액의 조제

각 배양액으로 부터 추출한 효소액은 protease

의 경우 0.2M phosphate buffer soln. (pH6.0)에 cellulase는 0.1M acetate buffer soln. (pH5.0)으로 각각 하루밤 투석시킨 후 효소를 사용하였고 크립에 효소활성은 각각 최적 pH의 완충액에 놓았다.

### 3. 효소활성의 측정

protease의 활성은 Amson - 萩原<sup>16-17)</sup>에 따라 측정하였고  $\alpha$ -,  $\beta$ -amylase, gluco-amylase, cellulase는 DNS method<sup>18)</sup>에 의하여, 1.0% soluble starch와 0.5% CMC를 각각 기질로 하여 측정하였다.

### 4. 니코틴용액의 조제

각 효소액의 조제에 사용한 완충액의 농도를 니코틴에 의하여 pH가 변화되지 않도록 농도를 확인 후 Fluka제 (nicotine)을 조제용으로 놓았다.

## 결과 및 고찰

### 1. 각 효소에 대한 니코틴의 영향

미생물이 생산하는 neutral protease의 활성을 측정하고 일가가 우수한 14주를 먼저 선별한 후 잎담배에 적용하기 위한 효소였으므로 니코틴에 대한 영향을 검토하였다. 0.2%의 니코틴과 효소액을 37°C에서 30분동안 preincubation 시간 후 전환현상을 측정한 결과 Table 1과 같이 *Asp. cellulosa*, *Pen. notatum*을 제외 한 나머지의 protease는 저해를 받았고 특히 *Asp. saitoi*, *Muc. javanicus*와 담배잎으로부터 분리한 저장균(Tobacco leaf I)의 protease는 현저히 전환되었다.

이들중 전환율이 85% 이상인 protease에 대하여 니코틴 농도에 따른 영향을 조사한 결과 Table 2와 같이 니코틴의 농도가 증가함에 따라 모두 저해를 받았으므로 다른 효소에 대한 효과를 검토하였다. 특수화된 가수분해 효소인

Table 1. Effect of nicotine on various protease

Source of enzyme	Residual activity (%)	Source of enzyme	Residual activity (%)
<i>Asp. awamori</i>	80.12	<i>Pen. notatum</i>	100.13
<i>Asp. cellulosa</i>	102.22	Tobacco seed *	77.88
<i>Asp.saitoi</i>	0	Tobacco leaf 1 *	7.14
<i>Asp. sydowi</i>	88.03	Tobacco leaf 2 *	68.72
<i>Asp. oryzae</i>	86.19	Tobacco leaf 3 *	69.06
<i>Muc. javanicus</i>	23.46		65.72
<i>Pen. frequentans</i>	77.47		83.04

\* Isolated source of fungi, not identified.

cellulase,  $\alpha$ -,  $\beta$ -amylase, glucoamylase의 활성에 대해서 0.2%의 니코틴은 전혀 영향을 미치지 않았으므로 농도를 증가시켰다. Table 2의 결과의  $\alpha$ -,  $\beta$ -amylase를 대조군에 비하여 10% 이하

로 완상화 되었고 cellulase와 glucoamylase는 니코틴 농도의 증가에 따라 약간씩 심화되는 protease와 같이 다른 영향을 나타내었다.

Table 2. Effect of nicotine concentration on various enzymes.

Enzymes	Source of enzyme	Relative activity (%)				
		Concentration of nicotine (%)				
		0	0.5	1.0	1.5	2.0
Protease	<i>Asp. cellulosa</i>	100	70.3	45.7	37.8	29.1
	<i>Pen. notatum</i>	100	63.4	45.5	42.8	37.1
	<i>Asp. sydowi</i>	100	63.0	41.8	-	28.6
	<i>Asp. oryzae</i>	100	75.3	53.1	27.0	17.3
Cellulase	<i>Asp. saitoi</i>	100	103.4	89.6	88.7	73.1
	<i>Asp. usami</i>	100	99.9	94.4	89.0	77.5
	Soil fungi	100	101.4	98.4	94.9	83.4
$\alpha$ -amylase	<i>Asp. oryzae</i>	100	100.5	101.2	98.8	97.5
	<i>Bac. licheniformis</i>	100	104.1	101.4	102.4	100.8
	<i>Bac. subtilis</i>	100	104.5	106.5	108.1	100.7
	Porcine pancreas	100	105.3	103.0	101.5	96.7
$\beta$ -amylase	Barley	100	101.2	102.2	99.3	96.9
	Soybean	100	104.5	105.6	104.1	89.9
Gluco-amylase	<i>Asp. oryzae</i>	100	94.0	92.0	81.9	80.1
	<i>Rhizopus spp.</i>	100	97.7	96.1	92.0	83.5

2. protease에 대한 니코틴의 저해양식

니코틴에 의하여 protease의 저해 정도가 시간과 온도에 따라 어떻게 다른가를 알기 위하여 시간과 온도를 달리하여 전처리한 후 그 잔존활성을 비교하였다. 양식한 4종의 protease의 inhibition type이 동일하였으므로  $\alpha$ -chymotrypsin에 대한 경과만을 Fig.1에 나타내었다. 그림에서와 같이 최초 5분동안에 50% 이상이 실패되었고 그 이상에서는 실패율이 위만해지는 것을 볼때 니코틴과  $\alpha$ -chymotrypsin은 화학량론적으로만 응하여 빠른 시간내에 평형에 도달되는 것으로 생각된다. Matsushima<sup>9,10</sup>는 우육의 protease가 감자, 보리, 콩, 난백등 집원의 저해제 뿐만아니라 킬레이트 화합물인 EDTA에 의하여 저해를 받을 때 저온보다는 고온에서 매우 빨리 진행된다고 하였으나 본 실험결과를 20℃보다 40℃에서 약간 촉진되는 정도를 보였다. 이로써 EI 혹은 EIS 복합체의 해리도 역시 억제됨을 알 수 있다.

니코틴에 의한 효소저해의 가역성을 조사하기 위하여 실패된  $\alpha$ -chymotrypsin을 하룻밤 투석시킴으로써 저해물질인 니코틴을 제거시킬 수 있었다. Table 3에서 볼 수 있는 바와 같이 니코틴대신 이를 녹인 1M phosphate buffer soln. (pH 7.7)으로 처리한 실험구의 비교할 때 효소

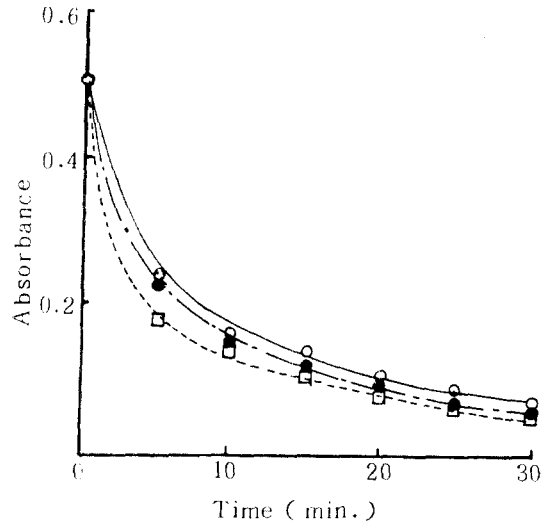


Fig.1. Effect of temperature and time on  $\alpha$ -chymotrypsin inhibition by nicotine

○—○ : 20℃  
●—● : 30℃  
□—□ : 40℃

의 활성은 완전히 회복되었다.

protease에 대한 니코틴의 저해양식과 inhibition constant( $k_i$ )를 Lineweaver-Burk plot와 Dixon plot법<sup>19)</sup>을 이용해서 구하였다.

Table 3. Reversion of  $\alpha$ -chymotrypsin on nicotine

Preincubation	None	with 1M phosphate buffer (pH 7.7)	with 90mM nicotine in 1M phosphate B.
Activity (absorbance)	0.488	0.485	0.131
After dialysis* (absorbance)		0.476	0.475
Residual activity (%)	100.0	97.5	97.3

\* After preincubation for 20 min. at 37℃, the mixture were dialyzed overnight against D.W.

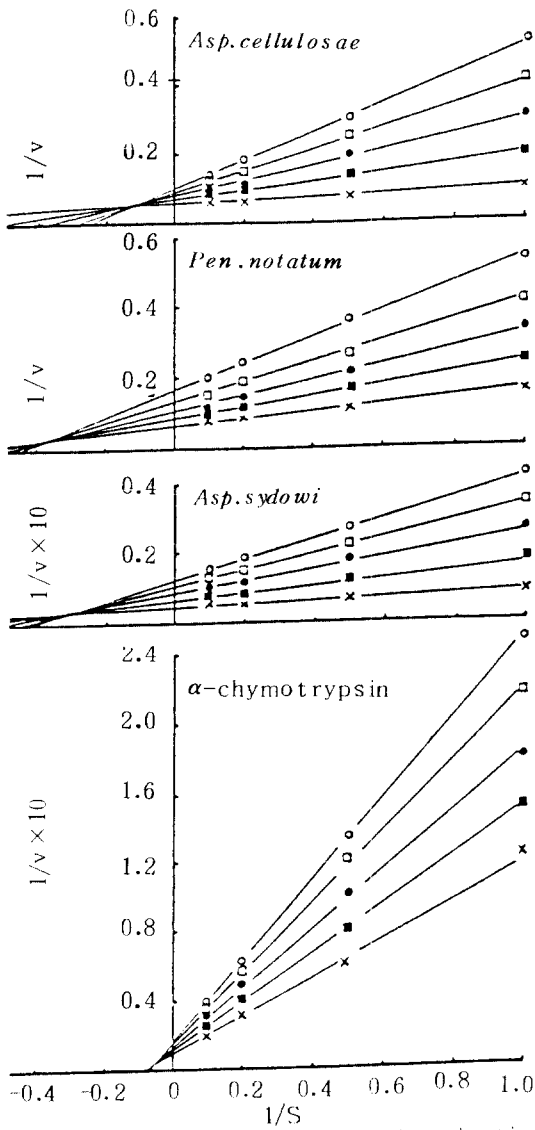


Fig.2. Inhibition of protease by nicotine (Lineweaver-Burk plots)  
 $v$ :  $\mu$ g of tyrosine/min. mg of protein  
 $S$ : % of casein

- x—x : 0 mM of nicotine
- : 30 mM "
- : 60 mM "
- : 90 mM "
- : 120 mM "

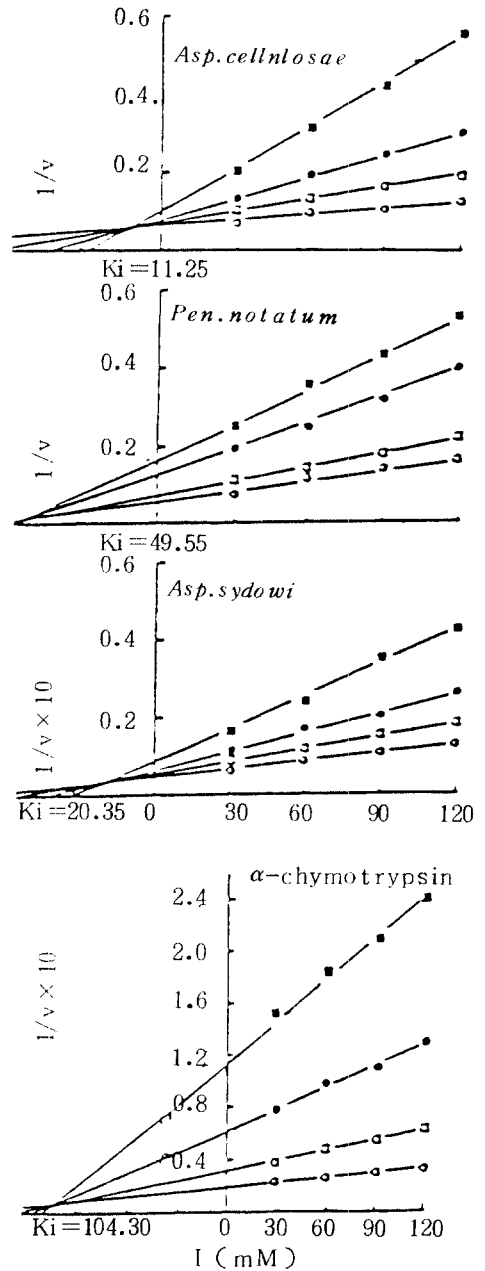


Fig.3. Inhibition of protease by nicotine (Dixon plots)

- : 0.1% of casein
- : 0.2% of casein
- : 0.5% of casein
- : 1.0% of casein

그림과 같이 니코틴은 *Asp.cellulosae*, *Pen. notatum*, *Asp.sydowi*의 protease와  $\alpha$ -chymotrypsin에 대하여 동일하게 mixed-type으로 저해하였다. mixed-type inhibition은 매우 다양한 방법으로 일어나며 acetylcholine-sterase의 경우 저해제가 초기의 E-S 복합체와 결합하지 않고 반응 후기의 중간체와 결합하여 저해한다고 Krupka와 Kaidler<sup>20</sup>는 보고한바 있다. 그러나 앞에서 기술한 것처럼 니코틴에 의하여 반응초기에 50% 이상이 저해되는 결과를 볼 때 니코틴은 기질과 비경쟁적 혹은 반경쟁적으로 EI, EIS의 결합을 이루어 효소의 작용을 억제시키며 Fig.3의 Dixon plot를 통하여 그래프가  $K_i < K_i'$ 인 형태를 나타내므로써 반경쟁적 형태보다는 비경쟁적 형태의 저해가 더 빨리 일어날 것으로 생각한다.  $K_i$ 의 값을 비교할 때 bovine pancreas의  $\alpha$ -chymotrypsin의 세 종류의 미생물원 protease보다 니코틴에 의하여 덜 저해됨을 알 수 있다. 니코틴의 protease를 저해한다는 사실은 매우 흥미가 있으나 alkaloid성 물질에 의한 protease의 저해형태를 상세히 규명하려면 작용특성이 이미 밝혀진 효소에 대한 검토가 이루어져야 할 것으로 생각한다.

## 요 약

잎담배의 주요 알칼로이드 성분인 니코틴은 효소에 따라 다르게 영향을 미쳤으며 특히 protease를 강력히 저해하였으므로 이에 대한 저해양식을 검토하였다.

$\alpha$ -amylase와  $\beta$ -amylase는 니코틴에 의하여 영향을 받지 않으며 cellulase와 glucoamylase는 니코틴 농도 1.0% 이상에서 약간 실패되는 반면 protease는 현저히 저해되었다.

니코틴에 의한 protease의 저해는 기질 반응초기에 일어나며 온도에 의한 영향을 받지 않았고 가역적이었다. 니코틴은 protease를 mixed-type으로 저해하였다.

## References

1. R.Spencer and T.J.Weston: Tobacco Science VIII :94(1966)
2. Müller, R.: Ibid.(Inst. Tab. Dresden Ber., 2(1):75(1955)
3. Nakai, T. and Inaba, Y.: Ibid.(Agr. Chem. Soc., 24:105(1951)
4. D.Liu and S. J. Sheen: Beiträge zur Tabakforschung International, 12(4) : 219(1984)
5. N.Kawashima, A. Imai and E. Tamaki : Agr. Biol. Chem., 32(9):1141(1968)
6. Kakie, T., Sugizaki, Y.: Plant Nutrition 18:7(1972)
7. 李相夏, 李美子: 烟葉研究報告書, 韓國人參煙草研究所: 409(1985)
8. Tsung-Min Kuo, Gregory Pearce and Clarence A. Ryan: Arch. Biochem. and Biophys., 230(2):504(1984)
9. 松島欽-嶋田協: 日農化, 39(4):164(1965)
10. Kinichi Matsushima : J. Agr. Chem. Soc., 43(11):810(1969)
11. Rolf Bergqvist: Acta Chemica Scandinavia 17:2239(1963)
12. Y. Shimizu, T. Nishiro and S. Murao: Agr. Biol. Chem., 47(8):1775(1983)
13. James Dwight McConn, Daisuke Tsuru and Kerry T. Yasunobu: J. Ferment Technol., 47(1):20(1969)
14. Yoshio Otani and Yukihiro Ishigawa: J. Ferment Technol., 47(1):20(1969)
15. Takemura Masaki, Hideya Suzuki and Masami Soejima: Agr. Biol. Chem., 50(12):3089(1986)
16. Anson, M.L.: J. Gen. Physiol., 22:79(1938)
17. 萩原文三: 標準生化學實驗書: 207(1953)

18. 福井作藏 : 還元糖의 定量法, 東京大 : 17  
(1981)
19. M. Dixon and E. C. Webb: In "Enzymes", 3rd Ed., Chap. VIII, Longman, U.K. (1979)
20. Krupka, R.M. and Kaidler, K.J.: J. Amer. Chem. Soc., 83:1445(1961)