

Aspergillus sp. F184가 생산하는 Xanthine Oxidase 저해제에 관한 연구

박시형¹ · 윤상웅¹ · 박정민² · 옥승호¹ · 유주현² · 배동훈*

단국대학교 식품공학과, ¹연세대학교 생물산업소재연구센터, ²한국미생물보존센터

Studies on Xanthine Oxidase Inhibitor Produced from Aspergillus sp. F184. Park, See-Hyoung¹, Sang-Woong Yoon¹, Jung-Min Park², Seung-Ho Ohk¹, Ju-Hyun Yu², and Dong-Hoon Bai*. Department of Food Engineering, Dankook University, Cheonan city, Choongnam, Korea, ¹Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul, Korea, ²Korean Culture Center of Microorganisms 361-221 Hongje-1 dong, Seodaemun-ku, Seoul, Korea - Aspergillus sp. F184 was isolated from soil for the development of new xanthine oxidase inhibitor. This xanthine oxidase inhibitor was sequentially purified by filtration, HP-20 adsorption column chromatography, ethyl acetate extraction, silica gel column chromatography and crystallization, and was named as YUX 104. YUX 104 was identified to be 5,6-epoxy-2-hydroxy-3-methyl-2-cyclohexene-1,4-dione(terreic acid) by NMR and mass spectroscopic studies.

Key words: Aspergillus sp., Xanthine Oxidase Inhibitor, Terreic Acid.

Xanthine oxidase는 모든 purine의 terminal oxidation에서 rate-limiting enzyme으로 작용하며, superoxide radical이나 hydrogenperoxide와 같은 산화제의 source로서 작용하며 uric acid 생성에 관여하는 효소이다[7,10]. Xanthine oxidase와 관련하여 purine대사의 이상으로 생기는 통풍(gout)은 혈중 요산(uric acid)양의 증가와 관련이 있다. 통풍은 purine의 대사신물인 요산염이 관절낭에 축적되어 염증 반응을 일으키는 것으로 요산 축적과 더불어 이를 탐식한 과립백혈구의 침윤을 동반하며, 고요산혈증, 관절내 요산결정에 의해 유발되는 반복적인 급성관절염과, 만성 결절성 통풍으로 주로 관절주위에서 요산의 응집을 볼 수 있고, 결국은 만성적으로 악화와 호전을 거듭하는 통풍성 관절염으로 진행되는 질병이다[9,10]. Xanthine oxidase 분자는 네 개의 redox-active site를 포함하고 있으며, 여기에는 molybdenum, flavin adenine dinucleotide(FAD), 한 쌍의 ferridoxin type의 iron-sulfur center가 있다. NADH를 제외한 purine은 xanthine oxidase의 molybdenum site에서 작용하고, 반면에 oxygen은 flavin site에 작용한다[1,3,4,8,9,10,11,12]. 사용되는 약물에는 uricosuric agent와 xanthine oxidase 저해제의 두 가지가 있다. Xanthine oxidase 저해제를 이용한 통풍치료는 혈중과 뇨중의 요산량을 효과적으로 감소시킴으로서 이로 인한 hypoxanthine과 xanthine의 축적이 salvage pathway에 의해 다시 nucleotide의 생산에 이용되며, 또한 IMP, GMP와 AMP의 축적이

purine 생합성을 feedback inhibition하여 xanthine의 축적이 일어나지 않게 함으로서 결과적으로 purine대사에 별다른 영향을 주지 않으면서 혈중요산양을 줄일 수 있다[6]. 본 연구에서는 신규 xanthine oxidase 저해제 개발을 위해 국내 및 외국 토양으로부터 분리한 미생물을 탐색하여 xanthine oxidase 저해물질을 생산하는 균주를 선별하였고 선별균주의 동정과 선별균주가 생산하는 저해물질을 분리 및 정제함으로써 그 구조를 규명하였다.

재료 및 방법

활성물질 생산을 위한 균주의 배양

선별균주의 xanthine oxidase 저해물질 생산을 위해 3% saccharose, 1% yeast extract, 0.2% NaCl, pH 7.0의 조성을 가진 배지를 최적배지로 하여 배지 10 ml에 균주를 접종하여 30°C에서 72시간 중배양 후 이를 배지 200 ml를 포함하는 1 L Erlenmeyer flask에 최종농도 5%로 접종하여 30°C, 200 rpm으로 72시간 중간배양을 실시하였다. 다시 이를 30 L fermenter (KOREA Fermenter Co.)내의 20 L 배지에 5%가 되게 접종하여 96시간 동안 본배양을 하였다. 본배양 조건은 30°C, 200 rpm, aeration 5 LM/min 으로 하였다. 생육곡선을 Fig. 1에 나타내었다.

조효소액의 조제 및 활성 측정

Xanthine oxidase 활성을 측정하기 위한 조효소액은 돼지의 간을 이용하여 Giovanna, Roussos, Suleiman[2,11,13] 등의 방법으로 조제하였다.

효소의 활성 측정은 Cho[2]등의 방법인 spectrophoto-

*Corresponding author
Tel. 82-417-550-3562, Fax. 82-417-550-3566
E-mail: baidh@anseo.dankook.ac.kr

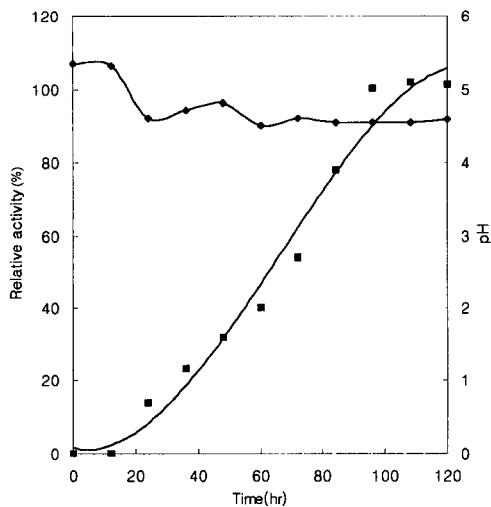


Fig. 1. Time course of the xanthine oxidase inhibitor production from *Aspergillus* sp. F184.

○; pH, ●; Relative activity

meter(UV1201, SHIMADZU, JAPAN)를 이용하여 37°C에서 30분간 반응하여 생성된 uric acid에 의한 292 nm의 흡광도 증가를 측정하였다. 저해제 활성측정은 기질이 포함되지 않은 반응용액에 저해제를 첨가하여 37°C에서 5분간 효소와 반응시킨 후 기질을 첨가하여 30분간 반응시켜 남아있는 효소의 활성으로 측정하였다. 저해제활성 1 unit는 위 반응 조건에서 효소활성을 50% 저해하는 양을 1 A.U.으로 정하였다.

결과 및 고찰

Aspergillus sp. F184의 분리 및 동정

Xanthine oxidase 저해물질을 생산하는 F184 균주의 형태적 특징을 Table 1에 나타내었다. Potato dextrose agar 배지에서 생육시켰을 경우 노란색의 균사가 성장한 후 황갈색의 포자가 나타났으며, 한천배지 뒷면은 암갈색이었다. 균사는 격벽을 가지고 있었으며 포자는 원형이었다. 기균사의 끝에는 정낭을 가지고 있었고, 그 위에 단일층의 경자가 둘러쌓여 있었다. 경자의 끝에는 분생자가 연쇄적으

Table 1. Characteristics of the isolated F184

Cultural characteristics(PDA)	
Colony color	Yellowish brown (Reverse; yellowish black)
Colony size (7 days culture)	20~5 mm
Colony surface	Velvety
Growth temperature	20°C(++) , 30°C(+++), 37°C(+)
Colony margin	Distinct
Mycellium color	Yellow

로 착생되어 있었다. 이러한 형태적인 결과는 *Aspergillus* sp. 와 유사하여 F184균주를 *Aspergillus* sp. F184로 동정하였다.

활성물질의 정제

여과를 통해 균체와 배양액을 분리한 후 균체를 acetone으로 추출한 다음 김압농축하고 남은 수용액층을 배양액과 합쳐 pH 4.0으로 조정한 후에 HP-20 흡착 수지에 흡착시켰다. HP-20 column에 흡착된 활성물질은 iso-propyl alcohol을 단계적으로 변화를 주어 용리하였다. 활성분획을 pH 3.0으로 조절하여 동량의 ethyl acetate로 3회 추출하고 ethyl acetate층을 김압농축한 후 n-hexane과 ethyl acetate의 비율이 4:1로 포화된 silica gel column에 loading한 후 동일용매로 용리하였다. 활성분획을 김압농축하여 얻은 노란색의 분말을 50°C로 온도를 올리면서 최소량의 methanol에 녹인 후 glass filter를 사용하여 여과한 여액을 모아 상온에 방치하면서 결정을 얻었고, YUX 104로 명명하였다. 이와 같은 재결정 과정을 수 차례 반복하여 순수한 판상의 결정을 얻었다. 결정 YUX 104의 순도검정을 위해 Aminex HPX-87H column을 사용하여 HPLC를 수행하였다. 이때 용출용매로는 0.004 N H₂SO₄를 사용하였으며, 용매의 유속은 1.0 ml/min이었고, 흡수파장 256 nm에서 단일 peak를 확인할 수 있었다. 위의 정제과정을 Fig. 2에 나타내었다.

YUX 104의 구조분석

결정 YUX 104의 ¹H 및 ¹³C NMR 스펙트럼분석 결과

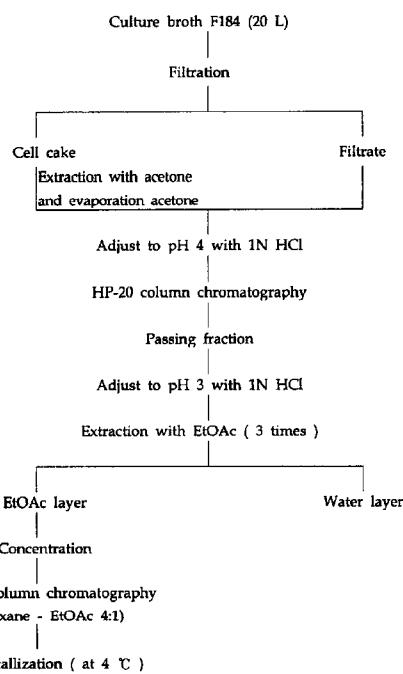


Fig. 2. Purification procedure of the xanthine oxidase inhibitor from *Aspergillus* sp. F184.

및 구조를 Table 2와 Fig. 3에 각각 나타내었다. ^1H NMR 스펙트럼에서는 3.3 ppm에서 singlet methyl(3-Me)과 3.7 (H-5) 및 3.8 ppm(H-6)에서 ortho coupling을 하는 doublet methine proton들이 관찰되었다. ^{13}C NMR 스펙트럼에서는 8.5 ppm의 methyl 탄소, 53.2 (C-5)와 55.0 ppm (C-6)의 2개의 methine 탄소, 189.0 (C-4)와 193.4 ppm (C-1)의 2개의 carbonyl 탄소, 155.8 ppm (C-2) phenolic 탄소 및 120.2 ppm (C-3) 의 aromatic 탄소 등 총 7개의

Table 2. Assignment for key protons and carbons of compounds (400MHz in CD_3OD)

Position No.*	^{13}C -NMR (ppm)	^1H -NMR (ppm)
1	193.4	
2	155.0	
3	120.1	
4	189.0	
5	53.2	3.7
6	55.0	3.8
7	8.5	3.3

* Compare with the structure in Fig. 4.

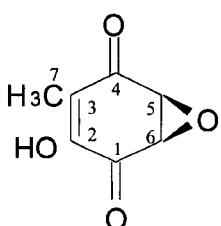


Fig. 3. Structure of the terreic acid produced from *Aspergillus* sp. F184.

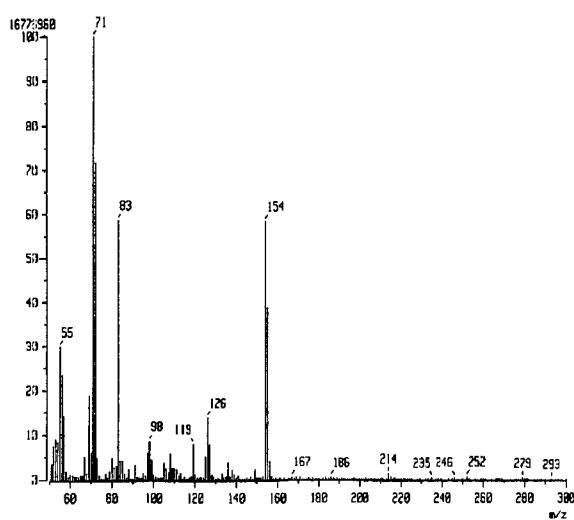


Fig. 4. El-mass spectrum of the YUX 104 produced from *Aspergillus* sp. F184.

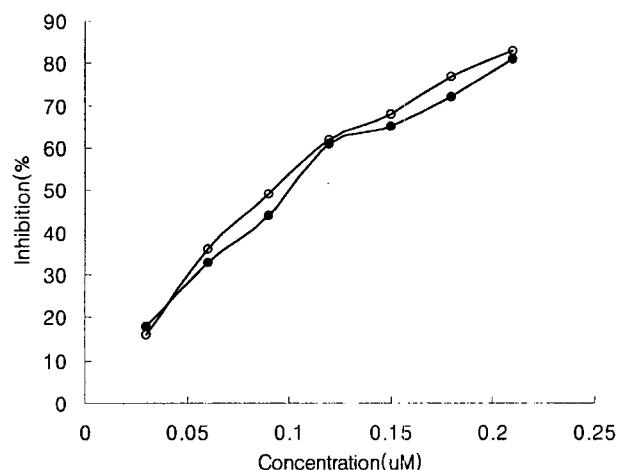


Fig. 5. Inhibition of the pig liver xanthine oxidase by terreic acid and allopurinol.

○; Terreic acid, ●; Allopurinol

signal들이 관찰되었다. 한편 EIMS 스펙트럼 (Fig. 4)에서는 m/z 154에서 분자이온 피크가 관찰되었다. 이상의 기기분석 결과를 기존물질의 database와 비교분석한 결과 *Aspergillus* sp.[14]로부터 분리된 5,6-epoxy-2-hydroxy-3-methyl-2-cyclohexene-1,4-dione (terreic acid)[14]과 동일한 물질로 동정되었다.

Terreic acid의 농도에 따른 xanthine oxidase 활성저해 효과

Terreic acid의 xanthine oxidase 저해활성을 측정한 결과 IC_{50} 은 $1.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 로서 xanthine oxidase 저해제로 알려져 있는 allopurinol과 유사하였다(Fig. 5).

HPLC를 이용한 terreic acid의 xanthine oxidase 저해 활성 측정

Terreic acid의 xanthine oxidase 저해효과를 HPLC로 확인하기 위해 xanthine oxidase와 hypoxanthine을 37°C에서 30분동안 반응시킨 후 uric acid의 생성량을 관찰하였다. 저해활성을 확인하기위하여 사용한 column은 Spherasorb®S10 ODS2(4.6 × 250mm) column을 사용하였고 용출용매로는 5% acetonitrile을 사용하였다. 용매의 유속은 0.7 ml/min, 흡수파장은 254 nm였다. 0.33 mM hypoxanthine, 6×10^{-3} unit xanthine oxidase(Sigma X-4875, lot. no. 103H3876)을 사용하여 기질인 hypoxanthine과 생산물인 uric acid의 retention time을 조사했을 때 hypoxanthine은 6분대에서 관찰되었고, 생산물인 uric acid는 3분대에 관찰되었다(Fig. 6A). 저해제가 첨가되지 않은 반응에서 uric acid의 생성량은 분석된 적분값의 비교시 90% 생산됨을 확인하였다. 생산물이 xanthine oxidase에 의하여 생산된 것임을 확인하기 위하여 xanthine oxidase를 denature시킨 후 동일한 조건으로 반응시켰을 때 3분대의 uric

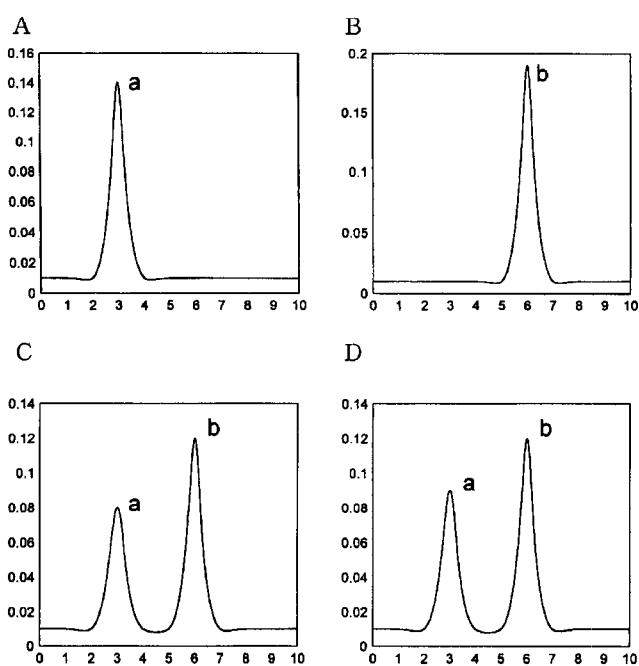


Fig. 6. HPLC analysis of the xanthine oxidase inhibition.

A : Hypoxanthine + xanthine oxidase
 B : Hypoxanthine + denatured xanthine oxidase
 C : Hypoxanthine + xanthine oxidase + allopurinol
 D : Hypoxanthine + xanthine oxidase + YUX 104
 a: Uric acid, b: Hypoxanthine

acid가 생성되지 않음을 확인하였다(Fig. 6B). 기존 저해제인 allopurinol (1.1×10^{-7} M)을 저해제로 첨가하여 반응시켰을 때의 uric acid생성량을 확인했을 때 uric acid의 생성이 저해된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6C). 같은 조건으로 1.1×10^{-7} M의 terreic acid의 xanthine oxidase 저해효과를 확인했을 때 uric acid의 생성량은 36%로 terreic acid의

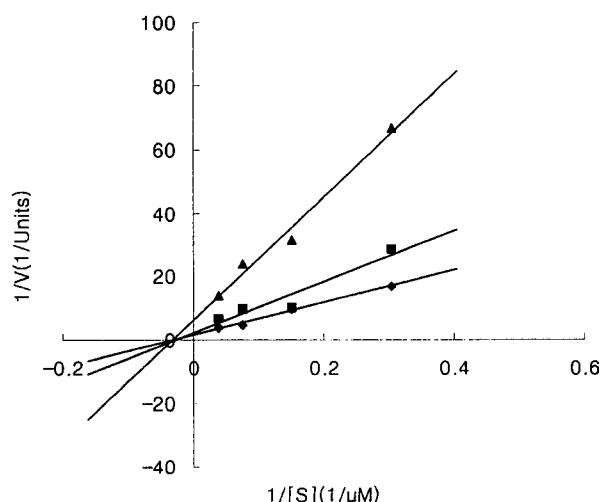


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of the pig liver xanthine oxidase in the presence of various amount of terreic acid.

◆ ; no inhibitor, ■ ; 0.3 μM , ▲ ; 0.6 μM

xanthine oxidase의 저해효과를 확인할 수 있었다(Fig. 6D).

Terreic acid에 의한 xanthine oxidase 저해기작

Xanthine oxidase의 기질에 대한 terreic acid의 저해기작 여부를 확인하기 위해 terreic acid의 농도를 $0.3, 0.6 \times 10^{-6}$ M로 가하고 기질의 농도를 달리하여 ($3.12, 6.25, 12.5, 25 \times 10^{-6}$ M)효소의 활성을 측정한 후 double-reciprocal plot을 작성하여 저해양식을 조사한 결과 Fig. 7와 같이 terreic acid는 xanthine oxidase에 대해 non-competitive inhibitor로 작용하는 것을 알 수 있었다.

요 약

통풍과 oxygen free radical의 독성에 관여하는 xanthine oxidase에 대한 새로운 저해물질의 탐색 및 개발을 목적으로 본 연구에서 선택분리한 *Aspergillus* sp. F184가 생산하는 저해물질을 분리·정제하고 구조를 결정하였으며 효소저해활성을 조사하였다. 본 균주를 배양 후 배양액을 여과하여 균체와 배양액을 분리하고 균체를 acetone으로 추출하고 감압농축하고 남은 수용액층을 배양액과 합쳐 HP-20 adsorption column chromatography, ethyl acetate추출, silica gel column chromatography, 결정화 등을 실시하여 xanthine oxidase에 대한 저해물질을 분리, 정제하였다. 본 저해물질의 구조를 NMR 및 MS 스펙트럼을 측정하여 분석한 결과 5,6-epoxy-2-hydroxy-3-methyl-2-cyclohexene-1,4-dione으로서 terreic acid로 동정되었다. Terreic acid의 xanthine oxidase에 대한 저해활성을 조사한 결과 IC_{50} 가 1.1×10^{-7} M로서 기존의 저해제인 allopurinol과 유사하였다. 이에 terreic acid에 의한 xanthine oxidase 저해활성은 보고된 바가 없기에 새로운 통풍치료제로서의 가능성이 있음을 보고한다.

감사의 글

본 연구는 (주)풀무원의 연구비 지원에 의한 연세대학교 생물산업소재연구센터의 연구과제로 수행된 결과의 일부이며 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Brumby, P. E. and V. Massey. 1963. Some properties of xanthine-oxygen oxidoreductase isolated from pig liver. *Biochem. J.* **89**: 46–53.
- Cho, D. Y. 1995. Studies on the purification of the xanthine oxidase inhibitor from *Streptomyces* sp. YU-101. Department of food and biotechnology, The graduate school of Yonsei University.
- Corte, E. D. and F. Stirpe. 1972. The regulation of rat liver

- xanthine oxidase, *Biochem. J.* **126**: 739–745.
4. Elion, G. B., K. Aylene, and H. H. George. 1966. Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochem. Pharm.* **15**: 863–880.
 5. Gilman, A. G., W. R. Theodore, S. N. Alan, and P. Taylor. 1991. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th ed, McGraw-Hill Inc **2**: 674–681.
 6. Granger, D. N., G. Rutili, and J. M. McCord. 1981. Role of superoxide radicals in intestine; Ischemia. *Gastroenterology*. **81**: 22–29.
 7. Kennedy, T. P., N.V. Rao, C. Hopkins, L. Pennington, E. Tolley, and J. R. Hoidal. 1989. Role of Reactive Oxygen Species in Reperfusion injury of the rabbit lung. *J. Clin. Invest.* **83**: 1326–1335.
 8. Komai, H., M. Vincent, and P. Graham. 1969. The preparation and properties of deflavo xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **244**: 1692–1700.
 9. Massey, V., E. B. Philip, and K. Hirochika. 1969. Studies on milk xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.* **244**: 1682–1691.
 10. Nelson, C. A. and H. Philip. 1968. Preparation of bovine xanthine oxidase and the subunit structures of some iron flavoproteins. *J. Biol. Chem.* **243**: 5368–5373.
 11. Roussos, G. G. 1963. Studies on a hypoxanthine oxidase from bovine small intestine. *Biochim. Biophys. Acta*. **73**: 338–340.
 12. Stripe, F. and C. E. Della. 1969. The regulation of rat xanthine oxidase conversion *in vitro* of enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Biol. Chem.* **244**: 3855–3863.
 13. Suleiman, S. A. and J. B. Stevens. 1987. Purification of xanthine dehydrogenase from rat liver : A rapid procedure with high enzyme yields. *Arch. Biochem. Biophys.* **258**: 219–225.
 14. Yamamoto, H., K. Moriyama, H. Jinnouchi, and K. Yagishita. 1980. Studies on terreic acid. *Jpn. J. Antibiot.* **33**: 320–328.
 15. Wang, C. J. K. and R. A. Zabel. Identification manual for fungi from utility poles in the eastern united states.

(Received January 12, 2000)