

α -Amylase 저해제 생산 방선균의 선별과 분류 및 α -Amylase 저해제의 분리와 Kinetics 연구

김제학 · 김정우 · 김하원 · 심미자* · 최응칠 · 김병각

서울대학교 약학대학 미생물약품화학교실

*서울시립대학 기초과정부

(1985년 7월 22일 수리)

Screening and Classification of Actinomycetes Producing α -Amylase Inhibitors and the Isolation, their Kinetic Studies of α -Amylase Inhibitors

Je Hak Kim, Jung Woo Kim, Ha Won Kim, Mi Ja Shim*
Eung Chil Choi and Byong Kak Kim

Department of Microbial Chemistry, College of Pharmacy
Seoul National University, Seoul 151

*Division of Liberal Arts, Seoul City University, Seoul 131, Korea

(Received July 22, 1985)

To find microorganisms of producing α -amylase inhibitors, actinomycetes were isolated from soil samples that were collected at different locations in Korea and screened for enzyme inhibitory activity. A strain of these microbes had a high inhibitory activity and was identified as one of the genus *Streptomyces* by morphological, biochemical and physiological studies according to the methods of the International Streptomyces Project (ISP). The medium used consisted of 3% corn starch, 0.2% yeast extract and 0.8% peptone (pH 7.0). When this strain was aerobically cultured in the medium on a rotary shaker, the highest inhibitory activity was obtained after four days. This inhibitor had inhibitory activities on various α -amylases and glucoamylase, but not on β -amylase.

화학 요법제 혹은 약물학적 활성 화합물로서의 이용 가능성 때문에 효소 저해제에 대한 연구는 많이 진행되어 왔다⁽¹⁾.

전분 소화 흡수를 저해하는 amylase 저해제를 이용하면 당뇨병, 비만증, 과혈당증, 과지방질증 등의 전분흡수와 관련된 질병을 치료하는데 커다란 효과가 있을 것으로 사료된다.

메밀, 밀, 호밀, 수수속 식물, 감자 뿌리 등의 식물에서 단백질 혹은 유기산으로 구성된 고분자의 저해물질을 발견한 보고가 있었다⁽²⁾.

1970년 Niwa 등은 *Streptomyces* 속이 생성하는

항생물질은 Nojirimycin이 amylase 저해효과가 있음을 보고하였고⁽³⁾, 1973년 Ueda 등도 *Streptomyces* 속의 배양액 중에서 glycopeptide로 구성된 amylase 저해물질이 있음을 보고하였다⁽⁴⁾. 그 후에도 현재 까지 미생물이 생성하는 amylase 저해제에 관하여 십여 편의 보고가 발표되었다. 즉, Goto 등은 peptide로 구성된 X-2라는 저해물질에 관해 보고하였고⁽⁵⁾, Murao 등은 다량의 당과 소량의 미지 물질로 구성된 S-AI을⁽²⁾, Murao 등은 oligosaccharide 로 구성된 amylostatin A⁽¹⁾, Schmidt 등은 oligosaccharide로 구성된 Bay e 4609⁽⁶⁾, Itoh 등은 oligosac-

charide로 구성된 oligostatins⁽⁷⁾, Murao 등은 protein으로 구성된 haim⁽⁸⁾, Namiki 등은 oligosaccharide로 구성된 adiposins⁽⁹⁾, Yokose 등은 oligosaccharide로 구성된 trestatins⁽¹⁰⁾, Kameda 등은 aminosugar로 구성된 valienamine⁽¹¹⁾에 관하여 amylase 저해효과가 있음을 보고하였다.

Streptomyces 속 균주의 동정에 관한 연구는 통일된 방법이 없었으므로, 균 동정에 커다란 문제점으로 부각되어 왔다. 이러한 문제를 해결하기 위한 노력으로 1966년부터 1977년에 걸쳐 Shirling의 주도하에 International Streptomyces Project (ISP)의 일환으로 지금까지 보고된 모든 종을 통일된 실험방법과 분류방법에 의해 재분류한 결과 1974년까지 458종으로 발표되었고, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974)에는 416종 47아종이 수록되었다⁽¹²⁾.

이에 저자들은 한국의 토양균 중에서 α -amylase 저해 활성이 있는 균주를 분리하여 ISP 방법으로 동정하고, 이 균주를 다량으로 배양하여 그 배양액으로부터 저해물질을 분리하였으며, 이 물질의 물리화학적 성질에 관하여 실험한 결과를 보고코자 한다.

실험재료 및 방법

α -Amylase 저해제 생성 균주의 검색

1) 토양 시료

한국 각지에서 따뜻하고 건조한 곳의 지하 10~30cm 사이의 토양을 채취하였다.

2) 배지

균분리용 배지로는 oat meal agar 배지 (oat meal 20g, yeast extract 1g, distilled water 1,000 ml, agar 20g)를 사용하였다.

3) 균주 분리 방법

토양 시료 1g을 10ml 멸균 증류수가 들어있는 멸균 시험관에 넣고, 강하게 1분간 진탕 후 방치하여 부유한 토양을 침전시켰다. 멸균 pipette으로 상정액을 1ml 취하여 9ml 멸균 증류수가 들어있는 멸균 시험관에 넣고 30초간 흔들어 희석 후, 다시 같은 방법으로 10,000배 희석액을 만들었다. 이중 0.1ml를 취하여, oat meal agar 배지 위에 도말하고, 27±1°C에서 4일간 배양하였다.

생성된 방선균 colony를 취하여 oat meal agar slant에 옮겨 3일간 배양하여 냉장(4°C)보관하였다.

4) 액내 배양

Agar slant에 보관중인 균주를 oat meal 배지 (oat meal 20g, yeast extract 1g, distilled water 1,000ml, pH 7.0)가 10ml 들어 있는 50 ml 삼각 flask에 접종하여, 27±1°C에서 4일간 배양하였다.

배양액을 여과지로 여과하여 상정액을 검색하는데 사용하였다.

5) 저해활성에 대한 반응계

저해활성 측정은 α -amylase와 시료를 반응시킨 후 잔류 효소 활성을 modified blue value method로 측정하였다⁽¹³⁾.

사용한 효소는 bacterial α -amylase (crystallized, lyophilized powder, Sigma)이며, 20mM NaCl을 함유하는 200mM phosphate buffer (pH 6.9)에 1.2U/ml 되게 희석한 것을 사용하였다.

사용한 기질은 20mM NaCl을 함유하는 100mM phosphate buffer (pH 6.9)에 녹인 1.5% soluble starch (Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo)용액이었다.

a) Test

효소 용액 0.5ml와 시료 0.5ml를 넣고 진탕 혼합 후, 37°C에서 5분간 반응시킨 다음, ice bath에서 냉각시킨 후 기질 용액 2ml를 가하였다. 진탕 혼합 후 37°C에서 15분간 반응시켜 즉시 100°C 수욕상에서 10분간 열을 가하여 반응을 정지시켰다.

b) Control

저해물질 용액 대신에 증류수 0.5ml를 넣고, test와 같은 방법으로 시행하였다.

Table 1. Assay systems for α -amylase inhibitory activity (Modified blue value method).

	Test	Control	Blank
α -Amylase solution	0.5 (ml)	0.5 (ml)	buffer
Culture broth	0.5	water	water
Preincubate at 37°C for 5mins.			
Soluble starch solution	2.0 (ml)	2.0	2.0
Incubate at 37°C for 15mins.			
The reaction was stopped by heating for 10 mins.			
Pipette into clean test tubes	0.1	0.1	0.1
Lügel solution	5.0	5.0	5.0
Optical density at 620 nm			

c) Blank

효소 용액 대신에 0.2M phosphate buffer (pH 6.9)를 0.5ml 넣고, 시료 용액 대신에 증류수 0.5ml를 넣어, test와 같은 방법으로 시행하였다.

열을 가하여 반응이 정지된 반응 혼합액 0.1ml에 0.5mM Lügol 용액 5ml를 가하여 620nm 에서 optical density를 측정하였다. 이상의 과정을 Table 1에 도시하였다.

저해활성 계산은 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Percent inhibition (P. I.) (\%)} = \frac{T-C}{B-C} \times 100$$

T, C 및 B는 test, control, blank 각각의 optical density이다. 1 inhibitory unit (I. U.)는 50% 저해하는 저해물질의 양으로 하였다.

DMC-47 균주의 동정**1) 생화학적 실험****① Diaminopimelic acid (DAP) isomer의 동정**

DMC-47 균주를 yeast extract-malt extract 배지에서 3일간 배양하여 얻은 배양액을 감압 여과하여 균체를 얻었다⁽¹⁴⁾. 균체를 동결 건조한 후, 밀봉 용기에 건조균체 3mg과 6N HCl 1ml를 넣은 후 100°C에서 18시간 동안 가열하여 가수분해 시켰다. 가수분해물을 냉각시킨 후 여과지로 여과하였다.

여액을 40°C에서 감압 농축하고, 잔류 염산을 완전히 제거하기 위하여 소량의 증류수를 넣어 용해시킨 후 다시 농축하였다. 농축물을 소량의 증류수에 용해시켜 용액 5μl 정도를 cellulose (microcrystalline) TLC plate에 spot 하였다.

표품으로는 Sigma사 제품의 DAP mixture를 사용하였다. 이것을 methanol : water : 10N-HCl : pyridine (80:17.5:2.5:10)의 용매계에서 전개시켰다.

Spot 확인은 acetic ninhydrine (0.1% w/v) 용액을 분사한 후 100°C에서 2분간 가열하였을 때 나타나는 olive green → 노란색으로 하였다.

② 단당류의 동정

단당류의 분석을 위하여 동결 건조된 DMC-47 균주의 cell 약 50mg을 2N H₂SO₄ 1ml와 함께 밀봉 용기에 넣은 다음 2시간 동안 100°C로 가열하였다. 이것을 냉각시킨 후, 가수분해물을 원심분리 시험관에 옮겨 5.0~5.5될 때까지 포화 Ba(OH)₂를 가했다.

원심분리하여 침전물을 제거한 후, 상정액을 농축하여 0.4ml의 증류수를 가했다.

이 가수분해물 5μl를 microcrystalline cellulose plate에 spot 하고, 표품으로는 1%의 galactose와

arabinose, xylose를 포함한 것과 *Mycobacterium smegmatis*의 가수분해물을 사용하였다.

이것을 ethylacetate : pyridine : water (100 : 35 : 25)의 용매계에서 전개시켰다. 완전한 분리를 위하여 동일 plate를 동일한 용매계에서 연속적으로 3번 전개하였다.

Aniline 2ml, phthalic acid 3.3g과 물로 포화된 n-butanol 100ml로 구성된 확인시약을 분사한 후, 상온에서 완전히 건조시킨 다음 100°C에서 2~5분간 가열하여 생성된 색으로 spot를 확인하였다.

2) 형태학적 특징

다음과 같은 각각의 배지에 DMC-47 균주를 동시에 접종하여, 27±1°C에서 14일간 배양한 다음, 성장의 정도와 공중균사의 색깔, Petri dish 뒷면의 색깔, 용성 색소의 생성여부 등을 관찰하였다.

① Yeast extract-malt extract agar (ISP No. 2 medium) : yeast extract 4.0g, malt extract 10.0g, glucose 4.0g, agar 20.0g, distilled water 1,000ml, pH 7.3.

② Oat meal agar (ISP No. 3 medium) : oat meal 20.0g, agar 18.0g, distilled water 1,000ml, pH 7.2.

③ Inorganic salts-starch agar (ISP No. 4 medium) : soluble starch 10.0g, (NH₄)₂SO₄ 2.0g, K₂HPO₄(anhydrous basis) 1.0g, MgSO₄·7H₂O 1.0g, NaCl 1.0g, CaCO₃ 2.0g, agar 12.0g, trace salts sol'n 1.0ml, distilled water 1,000ml.

* Trace salts solution : FeSO₄·7H₂O 0.1g, MnCl₂·4H₂O 0.1g, ZnSO₄·7H₂O 0.1g, distilled water 1,000ml.

④ Glycerol-asparagine agar (ISP No. 5 medium) : glycerol 1.0g, L-asparagine (anhydrous basis) 1.0g, K₂HPO₄ 1.0g, agar 12.0g, trace salts sol'n 1.0ml, distilled water 1,000ml, pH 7.0-7.4.

⑤ Tyrosine agar (ISP No. 7 medium) : glycerol 15.0g, L-tyrosine 0.5g, L-asparagine 1.0g, K₂HPO₄(anhydrous basis) 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, NaCl 0.5g, FeSO₄·7H₂O 0.01g, trace salts sol'n 1.0ml, distilled water 1,000ml, agar 20g, pH 7.2-7.4.

⑥ Glucose-asparagine agar (Krainsky's medium) : glucose 10.0g, L-asparagine 0.5g, K₂HPO₄ 0.5g, agar 15g, distilled water 1,000ml, pH 7.4.

⑦ Glucose-nitrate agar : glucose 5.4g, NaNO₃ 1.5g, KH₂PO₄ 1.0g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, thia-

mine · HCl 2ml of a 1,000 ppm stock solution, distilled water 1,000ml, agar 20.0g.

⑧ Glucose-peptone agar : glucose 10.0g, peptone 2.0g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, KH₂PO₄ 0.5g, agar 15.0g, distilled water 1,000ml, pH 6.5.

⑨ Nutrient agar : peptone 5.0g, beef extract 3.0g, agar 15.0g, distilled water 1,000ml, pH 6.8.

3) 현미경 관찰

Tyrosine-agar 배지위에 균을 접종하고, 멸균한 cover glass를 45° 경사지게 끼워 27±1°C에서 14일간 배양한 후, 공중균사의 형태 및 배열상태를 관찰하였다.

4) 생리적 특징

① 탄소원 이용에 관한 실험^(5,6)

i) 배지 및 탄소원 : 여기에 사용된 배지는 다음과 같다.

Tryptone yeast extract broth : tryptone 5.0g, yeast extract 3.0g, distilled water 1,000ml.

Basal medium : (NH₄)₂SO₄ 2.64g, KH₂PO₄ 2.38g, K₂HPO₄·3H₂O 5.56g, MgSO₄·7H₂O 1.00g, CuSO₄·5H₂O 6.40mg, FeSO₄·7H₂O 1.10mg, MnCl₂·4H₂O 7.90mg, ZnSO₄·7H₂O 1.50mg, agar 15.00g.

탄소원 : Millipore filter로 여과하여 10% 용액을 만들고 멸균하여 60°C로 냉각시켜 basal medium의 최종농도가 1%로 되게 첨가하였다. 사용한 당은 D-glucose, D-xylose, L-arabinose, L-rhamnose, D-fructose, D-galactose, raffinose, D-mannitol, inositol, salicin, sucrose 등이었다.

ii) 실험방법

상기의 방법으로 각각의 당이 들어있는 배지를 만들고 DMC-47 균주를 tryptone yeast extract 액체 배지에서 2일 배양 후 만든 washed inoculum을 접종한 후 27±1°C에서 10~16일 배양하고 탄소원의 이용 여부를 관찰하였다. glucose가 들어있는 배지를 positive control로 하고 탄소원이 들어있지 않은 배지를 negative control로 하였다.

② Melanin 색소 생성에 관한 실험

i) 배지

상기한 tyrosine-agar 배지를 사용하였다.

ii) 실험방법

Petri dish에 상기 배지를 만들어 부어 굳힌 다음 DMC-47 균주를 접종하여 27±1°C에서 1~2일간 배양하였을 때 colony 주위에 짙은 회색~청흑색의 색소가 생성되는가를 관찰하였다.

③ 전분 가수분해

i) 배지

0.2% (w/v) 가용성 전분을 첨가한 nutrient broth 배지를 사용하였다.

ii) 실험방법

상기 배지에 DMC-47 균주를 접종하고, 27±1°C에서 3~4일간 배양한 후, 요오드 용액을 가하여 colony 주위의 변색 여부를 관찰하여, 무색이면 양성으로 하고 청색이면 음성으로 하였다.

균주의 배양

1) DMC-47 균주의 배양

① 배지

옥수수 전분 배지를 사용하였다.:

Corn starch 30g, yeast extract 2g, peptone 8g, distilled water 1,000ml, pH 7.0.

② 종균 배양

100ml 배지가 들어있는 500-ml 삼각 flask에 옥수수전분 slant의 균주를 무균적으로 접종하여 rotary shaking incubator에서 27±1°C, 180 rpm으로 3일간 진탕 배양하였다.

③ 본 배양

상기 배지 500ml를 함유한 2-l flask에 종균배양액 50ml를 접종하여 4일간 진탕 배양하였다.

2) Time Course 측정

상기 배지 100ml를 함유한 500-ml 삼각 flask에 무균적으로 균을 접종하여 3일간 배양하여, 그 중 10ml를 배지 100ml를 함유한 500ml 삼각 flask에 접종하여 1일부터 6일 경과 후의 pH변화, 저해능 변화를 측정하였다.

저해물질의 안정성

DMC-47 균주의 4일 배양한 그 여액 1ml를 각각의 시험관에 취해, 0.5N HCl과 0.5N NaOH로 각각의 시험관의 pH를 1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12로 맞춘 다음 100°C에서 30분간 가열하였다. 냉각시킨후, HCl과 NaOH로 시험관 모두를 pH 7로 되게 조정한 다음 잔류하는 저해 활성을 측정하였다.

저해물질의 분리

4일 배양한 culture broth를 수확하여, 8000rpm으로 10분간 원심분리한 다음 원량의 반이되게 60°C이하에서 rotary evaporator를 써서 감압 농축하였다. 농축액에 동량의 -20°C acetone를 가하여 하룻밤 방치시켜 고분자 물질을 침전시켰다.

침전물을 여과지를 통해 여과하여 제거하고, 그 여액을 감압 농축하여 Amberlite IRA-400 (OH⁻, Rohm and Hass Co.)로 충전한 유리 column(4 ×

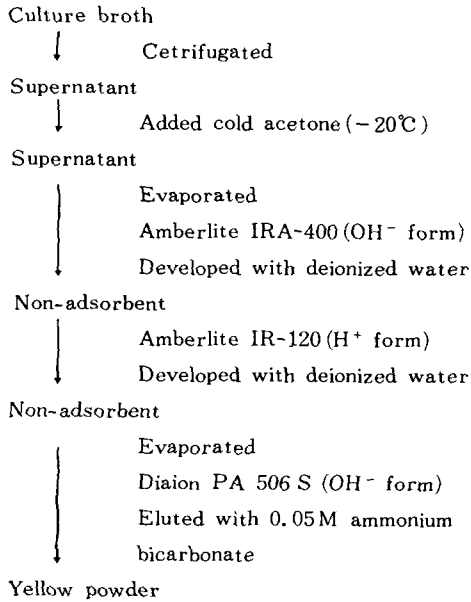


Fig. 1. Purification procedure of the amylase inhibitor.

50cm)에 느린 속도로 통과시켰다. bed volume 의 12배에 해당하는 탈 ion수를 통과시켜 비흡착 부분을 모아, Amberlite IR-120(H⁺, Rohm and Hass Co.) column(3×50cm)를 통과시켜 비흡착 부분을 모아 감압 농축하였다.

농축액을 Diaion PA 506S(OH⁻, Mistubishi Co.) column(2.5×80cm)에 흡착시켜 0.05M ammonium bicarbonate로 elution시켰다. 이상의 분리과정을 Fig. 1에 도시하였다.

각종 Amylase에 대한 저해효과

α -amylase, glucoamylase와 β -amylase는 앞서 기록한 modified blue value method에 따라 저해활성을 측정하였고, α -, β -glucosidase, dextranase, invertase에 대해서는 환원당 정량법인 Somogyi - method를 이용하였다.

1) Fungal α -amylase에 대한 효과

Fungal α -amylase (*Aspergillus oryzae*, Sigma) 용액은 20mM CaCl₂를 함유한 0.2M acetate buffer (pH 5.5)에 4 μ g/ml 되게 희석된 것을 사용했고, 기질은 0.1M acetate buffer (pH 5.5)에 녹인 1.5% (w/v) 가용성 전분 용액을 사용하였다.

2) Pancreatic α -amylase에 대한 효과

효소는 pancreatic α -amylase(hog, 한독약품)를 20mM NaCl을 함유한 0.2M phosphate buffer (pH

6.9)에 1.6 μ g/ml 되게 희석한 것을 사용했고, 기질은 0.1M phosphate buffer (pH 6.9)에 녹인 1.5% (w/v) 가용성 전분 용액을 사용하였다.

3) Salivary α -amylase에 대한 효과

효소는 salivary α -amylase (human saliva, Sigma)를 20mM NaCl을 함유한 0.2M phosphate buffer (pH 6.9)에 1 U/ml 되게 희석한 것을 사용했고, 기질은 0.1M phosphate buffer (pH 6.9)에 녹인 1.5% (w/v) 가용성 전분 용액을 사용하였다.

4) Glucoamylase에 대한 효과

효소는 glucoamylase (*Rhizopus* genus, Sigma)를 20mM CaCl₂를 함유한 0.2M acetate buffer (pH 5.5)에 1U/ml 되게 희석한 것을 사용했고, 기질은 0.1M acetate buffer (pH 5.5)에 녹인 1.5% (w/v) 가용성 전분 용액을 사용하였다.

5) β -Amylase에 대한 효과

효소는 β -amylase (barley, Nakarai Chemicals, Ltd.)를 20mM CaCl₂를 함유한 0.2M acetate buffer (pH 5.5)에 1 U/ml 되게 희석한 것을 사용했고, 기질은 0.1M acetate buffer (pH 5.5)에 녹인 1.5% (w/v) 가용성 전분 용액을 사용하였다.

6) α -Glucosidase에 대한 효과

효소는 α -glucosidase (brewers, Sigma)를 20mM NaCl을 함유한 0.2M phosphate buffer (pH 6.9)에 1.52U/ml 되게 희석한 것을 사용했고, 기질은 0.1M phosphate buffer (pH 6.9)에 녹인 3% maltose 용액을 사용하였다.

7) Dextranase에 대한 효과

효소는 dextranase (*Penicillium* species, Sigma)를 20mM CaCl₂를 함유한 0.2M acetate buffer (pH 5.5)에 2.2 U/ml 되게 희석한 것을 사용했고, 기질은 0.1M acetate buffer (pH 5.5)에 녹인 3% dextran용액을 사용하였다.

8) Invertase에 대한 효과

효소는 invertase (*Candida utilis*, Sigma)를 20mM CaCl₂를 함유한 0.2M acetate buffer (pH 5.5)에 1 U/ml 되게 희석한 것을 사용했고, 기질은 0.1M acetate buffer (pH 5.5)에 녹인 3% sucrose용액을 사용하였다.

9) β -Glucosidase에 대한 효과

효소는 β -glucosidase (almonds, Sigma)를 20mM CaCl₂를 함유한 0.2M acetate buffer (pH 5.5)에 1 U/ml 되게 희석한 것을 사용하였고, 기질은 0.1M acetate buffer (pH 5.5)에 녹인 3% salicin 용

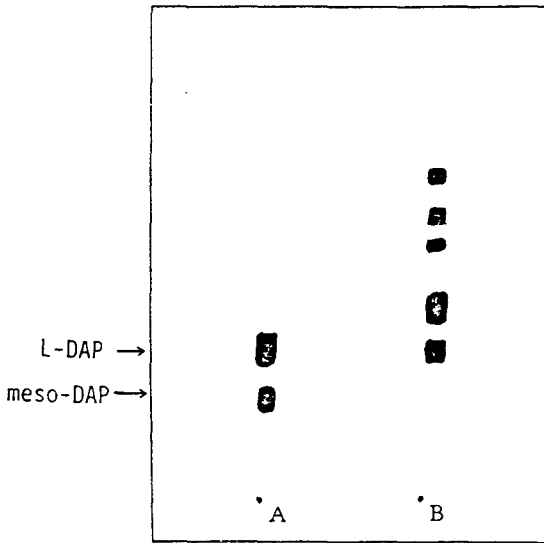


Fig. 2. Separation of DAP isomers by TLC.
 (A): standard DAP mixtures
 (B): hydrolyzates of strain DMC-47

액을 사용하였다.

결 과

균주 선발

토양에서 분리한 500종의 토양균 균주 중에서 bacterial α -amylase에 대한 강력한 저해효과가 있는 균주를 선택하여 DMC-47 균주라 명명하였다.

DMC-47 균주의 동정

1) 생화학적 실험

세포벽 성분중 DAP-isomer와 단당류 존재여부에 대한 실험결과, LL-DAP가 존재하였으며 xylose, arabinose와 galactose등의 단당류는 존재하지 않는 것이 확인되었다. 이들 결과로부터 DMC-47균주는 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 의거하여 cell wall type I에 속하는 것을 알 수 있다.

Fig. 2와 Fig. 3에 결과를 도시하였다.

2) 형태학적 특징

Table 2에 표시되어 있는 바와 같이 glucose-nitrate agar배지와 glucose-peptone agar배지를 제외한 각종 배지에서 성장이 양호하였다. 공중 균사의 색깔은 회색 혹은 흰색이었으며, 용성 색소는 전혀 관찰되지 않았다.

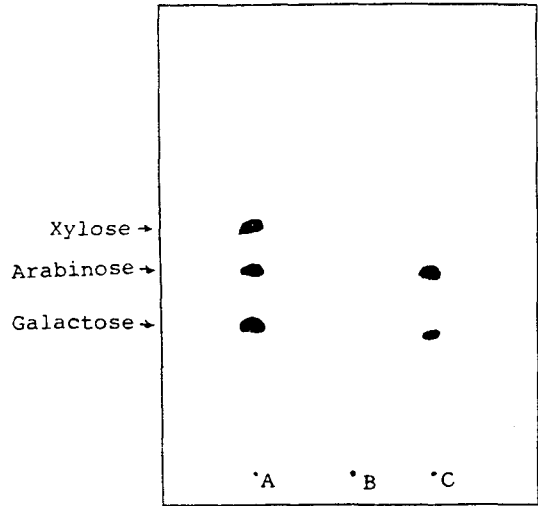


Fig. 3. Separation of monosaccharides in whole cell hydrolyzates.
 (A) : standard mixture (B) : strain DMC-47 (C) : *Mycobacterium smegmatis*

Table 2. Cultural characteristics of strain DMC-47.

Medium	Growth	Reverse phase	Aerial mycelium	Soluble pigment
Yeast extract-malt extract agar (ISP No.2)	good	dark yellow	gray	none
Oat meal agar (ISP No.3)	good	gray	white	none
Inorganic salts-starch agar (ISP No.4)	good	whitish yellow	gray	none
Glycerol-asparagine agar (ISP No.5)	good	dark brown	gray	none
Tyrosine agar (ISP No.7)	good	dark brown	whitish brown	none
Glucose-asparagine agar	good	whitish brown	white	none
Glucose-nitrate agar	moderate	yellowish gray	gray	none
Glucose-peptone agar	poor	white	white	none
Nutrient agar	good	yellow	white	none

3) 현미경 관찰

Fig. 4와 Fig. 5에 도시되어 있는 바와 같이 포



Fig. 4. Spore chains of strain DMC-47 after 14 days on tyrosine-agar at 27°C. The surfaces of the spores are smooth.

(scanning electron microscope, ×10,000)

사사슬의 형태는 같이 갈고리처럼 구부러졌거나, 1~2번 감긴 나선형태를 취하는 Spira 형태이었고, spore 표면은 smooth이었다.

4) 생리적 특징

탄소원 이용에 관한 결과는 Table 3에 표시되어 있는 바와 같이, L-rhamnose를 매우 양호하게 이용하였고, D-xylose, D-fructose, D-mannitol, raffinose, sucrose등을 이용하였다.

Melanin색소는 생성하지 않았고, 전분을 가수분



Fig. 5. Aerial mycelium of strain DMC-47.

해시켰다.

5) DMC-47균주와 기존의 유사균주와의 비교

DMC-47균주의 종을 구명하기 위하여 탄소원 이용, 멜라닌 색소 생성, vegetative mycelium 색조에 대한 실험 결과를 종합하여 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8판)에 수록되어 있는 Streptomyces속 균주들과 비교하였다.

탄소원 이용도에 관한 비교 결과는 Table 3과 같다.

이상의 결과에서 처럼 spore색조가 회색~흰색이고, spore chain의 형태가 spira이고, 멜라닌 색소를 생성하지 아니하고, 포자 표면이 smooth인 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8판)

Table 3. Comparison of DMC-47 with Streptomyces spp. of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

	D-Glucose	D-Xylose	L-Arabinose	L-Rhamnose	D-Fructose	D-Galactose	Raffinose	D-Mannitol	i-Inositol	Salicin	Sucrose	Spore color	Spore chain type	Melanoid pigment	Spore surface
DMC-47	+	+	-	+	+		+	+	-	-	+	W ^{or} _{GY}	S	C ⁻	SM
<i>S. herbescens</i>	+	+	+	+		+	+	+	+		+	W	S	C ⁻	SM
<i>S. ochraceiscleroticus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
<i>S. atratus</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+					
<i>S. chibaensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+				
<i>S. griseoaurantiacus</i>	+		+	+	+	+	+	+	+		-	GY	S	C ⁻	SM
<i>S. olivaceoviridis</i>	+	+	+	+	+		+	+	+		+				
<i>S. violaceolatus</i>	+	+	+	+	+		+	+	+		+				

Melanoid pigments produced C⁺, not produced C⁻. Spore wall ornamentation; SM=Smooth. Spore color en masse indicated as White(W), Gray(GY) etc. S=Spira; Spore chains in form of hooks, open loops and coils.

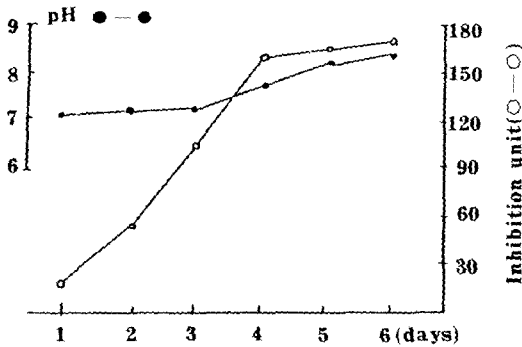


Fig. 6. Time course of strain DMC-47.

수재 *Streptomyces* 속 균주 중에서 DMC-47과 동일하게 탄소원을 이용하는 균주는 없었다.

DMC-47균주의 배양

저해활성은 4 일째에 최대로 되어 5, 6 일때는 4 일째와 비슷한 활성을 나타내었다. 또한 pH 변화는 시간이 지남에 따라 지속적으로 증가하였다. Fig. 6에 결과를 도시하였다.

저해물질의 안정성

100°C에서 30분간 각각의 pH에서 저해물질의 안정성을 시험하여본 결과, 중성의 pH에서는 매우 안정하였으며, pH 3 이하와 pH 10 이상에서는 불안정하였고, 특히 산성에서 보다 alkali성에서 불안정 하였다. 결과를 Fig. 7에 도시하였다.

저해물질의 분리

Fig. 1에 도시되어 있는 바와 같이 마지막 단계에서 음 ion교환 수지인 Diaion PA 506 S를 이용하여 ion-exchange column chromatography를 시행하여 연한 노랑색의 분말을 얻었으며, 더욱 정제해야 할 필요가 있다.

각종 amylase에 대한 저해 효과

Table 4에 표시되어 있는 바와 같이 각종 α-

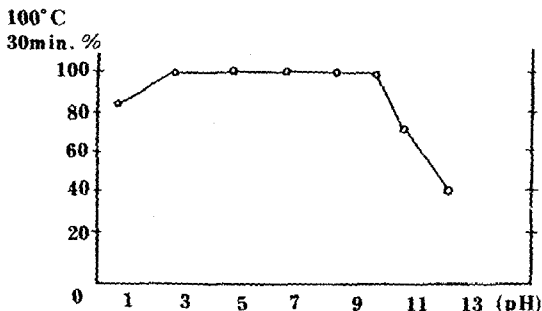


Fig. 7. Thermal and pH stability of the inhibitor.

Table 4. Effects of the amylase inhibitor on various glucoside hydrolases.

Enzyme (origin)	pH	Inhibition
α-Amylase		
<i>Bacillus subtilis</i>	6.9	+
<i>Aspergillus oryzae</i>	5.5	+
Porcine pancreas	6.9	+
Human saliva	6.9	+
Glucoamylase		
<i>Rhizopus</i> genus mold	5.5	+
α-Amylase		
Barley	5.5	-
α-Glucosidase		
Brewers yeast	6.9	+
Dextranase		
<i>Penicillium</i> species	5.5	-
Invertase		
<i>Candida utilis</i>	5.5	-
β-Glucosidase		
Almond	5.5	-

Inhibitory ratings used were as follows: +, 80~100%; -, 0% inhibition of enzymatic activity.

amylase와 glucoamylase, α-glucosidase에 대해서는 강력한 저해효과가 있었고, β-amylase, dextranase, invertase, β-glucosidase에 대해서는 저해효과가 없었다.

고찰

토양에서 분리한 DMC-47균주에 대하여 세포벽 성분분석 결과 LL-DAP가 존재하였고, 단당류 성분 분석 결과 arabinose, galactose, xylose등은 존재하지 않았다. 이러한 결과로부터 DMC-47 균주는 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 의거하여 cell wall type I으로 판명되었다.

현미경 관찰 결과 포자 사슬의 형태가 *Streptoverticillium*의 특징인 verticillate배열이 아니고, 끝이 갈고리처럼 구부러지거나, 1~2번 감긴 나선 형태를 취하는 것으로 보아 *Streptomyces*속 임이 확인되었다. 따라서 이를 ISP의 통일된 개념에 준하여 균동정을 시도하였다.

DMC-47균주의 종을 구명하기 위해서 탄소원 이

용, 색소 생성 여부 및 spore의 형태등을 결과를 종합하여 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 수재되어 있는 *Streptomyces*속 균들과 비교해 본 결과 탄소원의 이용도가 같은 균주가 없었다. 그중 다소 유사하다고 생각되는 균주들과 DMC-47균주를 비교하여 보았다.

*S. herbescens*는 배지상에서 녹색의 vegetative mycelium을 생성한다는 점에서 DMC-47과 상이했다.

*S. atratus*는 spore chain의 형태가 Spira인 점에서 DMC-47과 동일하지만, *S. atratus*는 배지에서 회색~검은색의 vegetative mycelium을 생성하는데 비하여, DMC-47은 회색, 노란색 또는 갈색 계통이었다.

*S. chibaensis*는 갈색~노란색의 vegetative mycelium을 생성한다는 점에서 DMC-47과 유사하지만, 배지상에서 용성 색소를 생성한다는 점에서 DMC-47과 상이했다.

*S. olivaceoviridis*는 공중 균사가 노란색인 점에서 DMC-47과 상이하였다.

*S. violaceolatus*는 파란색, 보라색 또는 빨간색의 vegetative mycelium을 생성하고, 용성 색소를 생성한다는 점에서 DMC-47과 상이하였다.

이상의 결과로부터 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8판)에 수재된 균주 중에서 DMC-47과 동일한 균주가 없는 것으로 밝혀졌으며, 이로써 DMC-47균주를 *Streptomyces*속의 새로운 균주로 추정하였다.

배양 실험에 대한 결과를 보면, 4일 째에 최대 로 증가하여 5, 6일째는 거의 증가가 없었으므로, 배양시간은 4일이 최적 조건으로 사료되었다.

안정성에 대한 실험 결과 DMC-47균주가 생성하는 저해물질은 pH가 중성일때는 안정하였으나, 강산성에서 보다 강알칼리성에서 더 불안정하였다.

Ion-exchange extraction 결과, 저해물질은 음이온 교환 수지인 Amberlite IRA-400(OH⁻ form)에는 거의 흡착되지 않았고, 양이온 교환 수지인 Amberlite IR-120(H⁺ form)에는 전혀 흡착되지 않는 것으로 보아 극성은 매우 크지만, 전하를 거의 가지지 않는 물질로 사료되며, 이 물질의 분리는 cellulose chromatography를 이용하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

각종 amylase에 대한 저해효과를 본 결과, α -amylase의 경우에는 기원이 세균이나 진균인 미생물의 것 뿐 아니라, 기원이 돼지 췌장, 사람의 침선인 것에도 강력한 저해효과가 있었다.

Glucosylase와 α -glucosidase에 대해서도 저해 효과가 있었다. 그러나 β -amylase, dextranase, invertase와 β -glucosidase에 대해서는 저해효과가 거의 없었다.

1965년 Umezawa 등이 미생물이 생성하는 효소저해제에 관한 연구를 시작한 이래 각종 효소 저해제가 알려졌으며, 미생물이 생성하는 α -amylase저해제도 약 15종이 알려져 있다. DMC-47균주가 생성하는 저해물질의 효과가 매우 강력하며, 또한 이 균주가 새로운 *Streptomyces* 균주로 추정되는 바, 앞으로 더 자세한 연구를 계속할 계획이다.

요 약

한국의 토양에서 분리한 균 중 bacterial α -amylase에 저해효과가 있는 균주를 분리하여 DMC-47 균주라 명명하였고, 이 균주는 *Streptomyces* 속의 균임을 확인하였다.

이 균주를 옥수수 전분 배지에서 진탕 배양한 결과 4일후에 최대 저해 효과를 나타내었다.

이 균주가 생성한 저해물질은 bacterial α -amylase, pancreatic α -amylase, salivary α -amylase, glucosylase에 저해효과를 보였고, β -amylase 에는 저해효과가 없었다.

사 사

이 연구에 소요된 경비의 일부는 한국과학재단의 연구비로 충당되었으며 이에 깊은 감사를 표시하는 바입니다.

참고문헌

- Schinder, P.: Phil. Trans. Roy. Soc. London, B290, 291 (1980).
- Murao, S. and K. Ohyama: *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 2271 (1975).
- Niwa, T., S. Inouye, T. Tsuruoka, Y. Koaze and T. Niida: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 966 (1970).
- Ueda, S. and Y. Koba: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 2025 (1973).
- Goto, H., T. Inukai and M. Amano: *Jpn. Kokai*, **55-77**, 594 (1975).
- Schmidt, D.D., W. Frommer, B. Junge, L. Müller, W. Wingender, E. Truscheit and D. Schäfer: *Naturwissenschaften*, **64**, 535 (1977).

7. Itoh, J., S. Omoto, T. Shomura, H. Ogino, K. Iwamatsu and S. Inouye: *J. Antibiotics*, **34**, 1424 (1981).
8. Murao, S., A. Goto, Y. Matsui and K. Ohyama: *Agr. Biol. Chem.*, **44**, 1679 (1980).
9. Namiki, S., K. Kangouri, T. Nagate, H. Hara, K. Sugita and S. Omura: *J. Antibiotics*, **35**, 1234 (1982).
10. Yokose, K., K. Okawa, T. Sano, K. Watanabe, H.B. Maruyama and Y. Suhara: *J. Antibiotics*, **36**, 1157 (1983).
11. Kameda, Y., N. Asano, M. Yoshigawa and K. Matsui: *J. Antibiotics*, **33**, 1575 (1980).
12. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 8th ed., 1246 pp. (1974).
13. Murao, S., K. Ohyama and S. Ogura: *Agr. Biol. Chem.*, **41**, 919 (1977).
14. Staneck, J.H. and G.D. Roberts: *Appl. Microbiol.*, **19**, 226 (1974).
15. Shirling, E.B. and D. Gottlieb: *Intern. J. Syst. Bac.*, **16**, 313 (1966).
16. Pridham, T.C. and D. Gottlieb: *J. Bacteriol.*, **56**, 107 (1948).