

알파-아밀라제 저해제 생성 방선균의 검색

최응철 · 김병자 · 정경수*

서울대학교 약학대학, *충남대학교 약학대학

(Received September 12, 1988)

Screening of Actinomycetes Producing α -Amylase Inhibitors

Eung-Chil Choi, Byong-Kak Kim and Kyeong-Soo Chung*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742 and *College of Pharmacy,

Chungnam National University, Taejon 302-764, Korea

Abstract—394 strains of soil microorganism were isolated from the Korean soil samples. The isolated strains were shake-cultured in oat-meal medium. The filtrates of the cultures were screened for the production of α -amylase inhibitors. Five strains were identified to produce α -amylase inhibitors. And these strains were identified as Actinomycetes.

오늘날 식생활 문명의 발달로 인해, 유복한 생활을 하게 되었음은 매우 바람직한 일이라 할 수 있으나, 이에 반하여 상당수의 사람들이 비만증이나 당뇨병, 고혈당증과 같은 식생활 패턴의 변화로 부터 오는 초래되는 질환에 시달리고 있음은 주지의 사실이다. 이러한 현상은 구미의 경우는 말할 것도 없고, 우리나라의 경우도 구미의 현상을 답습하는 상황에 놓여있다. 따라서 이러한 질환을 치료하고, 예방하는 방법의 개발은 매우 시급한 과제라 아니할 수 없다.

이러한 질환을 치료하거나 예방하는 방법을 약물요법과 식이요법으로 크게 나눌 수 있을 것이다. 현재 당뇨병이나 비만증에 사용되고 있는 약물들은 경우에 따라서는 좋은 효과를 기대할 수 있으나, 모든 것을 해결할 수는 없으며, 각 약물이 갖는 부작용 역시 무시할 수 없다. 이런 관점에서 볼 때, 부작용이 적으면서도 보다 좋은 치료효과를 기대할 수 있는 새로운 접근법의 치료약물이 필요하게 되며, 그중의 하나가 α -amylase 저해제이다.

당뇨병이나 비만증은 현상적으로 음식물 중의 탄수화물이 α -amylase나 sucrase와 같은 α -glucoside-hydrolase에 의해 분해되어 생긴 포도당이 과량 흡수됨으로 야기된다고 볼 수 있다. α -

amylase나 sucrase와 같은 효소들을 저해하는 물질은 체내에서 탄수화물의 가수분해를 억제하며 따라서 소장에서의 포도당의 흡수를 제한하게 됨으로, 당뇨병이나 고혈당증, type IV hyperlipoproteinaemia, 비만증 등의 탄수화물 의존성 질환(carbohydrate-dependent disease)의 치료에 적용이 기대된다. 실제로 동물실험에서 α -amylase 저해제를 투여함으로써 전분의 가수분해로 인해 생기는 포도당이 adipose tissue의 지질성분으로 전환되는 것을 차단할 뿐만 아니라 혈중 당의 농도를 감소시키는 효과를 보여주고 있다.¹⁻²⁾

이러한 α -amylase inhibitor들은 처음에는 발아시킨 메밀이나 귀리 등의 고등식물에서 분리해 내었으나, 1970년에 T. Niwa³⁾ 등이 Streptomyces속 세균의 배양액으로 부터 얻어지는 nojirimycin이 항균작용과 동시에 α -amylase, β -amylase 등은 물론 그 밖의 여러 amylase에 대해 저해작용이 있는 것을 보고한 이래 10여종 이상의 새로운 α -amylase inhibitor들이 미생물에서부터 발견되었다.

또한 1973년에 α -amylase에 대해 저해효과를 가지는 분자량 약 2000 정도인 peptide-like substance⁴⁾가 보고되었으며, 1975년에는 약 3500

여 균주를 검색한 결과 이중 한 균주에서 S-AI⁵⁾이라는 새로운 α -amylase 저해성 물질이 생성되는 것이 보고되었다. 이어서 1981년에 oligostatin⁶⁾, 1982년에 adiposin⁷⁾, 1983년에는 tresatin⁸⁾ 등이 보고되었으며, 현재 이들 물질에 대한 동물 시험과 독성실험, 임상실험 등이 진행되고 있다. 1977년에 독일의 Müller⁹⁾가 acarbose (BAY g5421)를 발견해 이물질에 대해 동물실험 및 임상실험이 끝나, 곧 제품으로 허가될 단계에 이르렀다.

이들은 기존의 합성에 의해서 얻어진 효소 저해 물질이나 고등 동, 식물로부터 분리되는 효소 저해물질보다 훨씬 강력한 효과를 가지고 있으며, 또한 고등식물이나 동물에서 얻어지는 물질은 고분자 물질인데 비해, 미생물의 이차대사의 결과로 생기는 이 물질들은 비교적 저분자 물질이므로 인체독성면이나 대량생산면에 있어서 큰 잇점을 가지고 있다.

본 저자들은 우리나라에서도 이 분야의 연구가 매우 시급하다고 판단되어 본 연구에 착수하여 연구를 진행중에 있다. 저자들은 1982년 이래 관심을 갖고 검색계의 여러 방법들을 검토하여 확실하고 신속한 검색계를 확립하였다.

본 연구실에서는 1982년 및 1983년 2차에 걸쳐 우리나라 전국 토양에서 분리된 토양세균 1,000여 균주에 대해 α -amylase 활성 저해물질 생산 여부를 검토하여 그중 6종의 균주가 α -amylase 활성억제 물질을 생산함을 확인하였다.¹⁰⁾ 이중 우선 억제 활성도가 우수한 균주 3가지를 선발하여, 이들 균주가 생산하는 억제 물질을 분리 정제하여 억제물질의 성상 및 구조에 대하여 연구한 바 있다.¹¹⁻¹³⁾

1988년 7월부터 실시된 물질 특허제도에 더욱 신물질에 관한 연구의 필요성을 느끼게 되었으며, 그러한 연구의 한 분야로서 α -amylase 저해제에 관한 폭 넓은 연구가 인정되었다. 우리나라의 각지에서 채취된 토양재료로부터 각종의 토양 세균을 분리하고, 그중 α -amylase 저해성 물질을 생산하는 균주를 검색하며 선발된 균주를 다량 배양하여 저해성 물질을 분리, 물질의 화학구조를 밝히며, 저해제가 갖는 각종 생리적

생화학 특성을 구명할 필요가 있다. 본 연구에서는 그 첫단계로, 토양재료에서 분리된 394종의 토양세균을 대상으로 실시된 α -amylase 저해성 물질 생산의 검색 결과를 보고한다.

실 험 방 법

토양재료—우리나라 각 지역에서 따뜻하고 건조한 곳의 지하 10~30cm 사이의 토양을 채취하였다.

배지 및 시약—Bacterial α -amylase와 pancreatic α -amylase는 Sigma사의 제품을 사용하였다.

균 분리용 배지로는 oatmeal 한천배지(oatmeal 20g, yeast extract 1g, distilled water 1,000ml, agar 20g)를 사용하고, α -amylase 저해제생성을 위한 배지는 oatmeal 배지(oatmeal 20g, yeast extract 1g, distilled water 1,000ml, pH7.0)를 사용하였다. 배지의 중요성분은 Difco사 제품을 사용하였다.

균주의 분리—앞의 연구에서 사용한 분리법을 적용하였다.¹¹⁻¹³⁾ 즉 적당하게 희석한 토양재료 현탁액 0.1ml을 oatmeal 한천배지 평판에 도달하고 27±1°C에서 4일간 배양하여, 생성된 단일 집락을 취하였다.

액내배양—50ml 삼각 flask에 oatmeal 배지 10ml을 넣고 균을 접종하여 27±1°C에서 4일간 배양하였다. 배양액을 여과지로 여과하여 여액을 취하거나, 고속 원심분리기(10,000×g, 30분)로 원심분리하여 상정액을 취하였다.

α -Amylase 저해제 생성균의 검색—앞의 연구에서 사용한 검색계를 적용하여 α -amylase 저해제 생성균을 검색하였다.¹¹⁻¹³⁾ 여과액(또는 상정액) 0.5ml를 취하여 α -amylase 용액 (1.2U/ml) 과 37°C 수조에서 5분간 가운시켜, 남아있는 α -amylase 활성정도를, 2ml의 1.5% 가용성 전분액과 37°C 수조에서 15분간 가운시켜, 반응정도를 구하였다(modified flue value method). 1차 검색에서는 여과액에 의해 나타나는 청색도의 상승치로 선별하였으며, 2차 및 3차 검색에서는 유의성이 있는 percent inhibition(P.I)으로 α -

amylase 저해제 생성 균주를 선발하였다.

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

T.C. 및 B는 검색제에서 test(배양여액), control(증류수), 및 blank(증류수, α -amylase 제외)의 흡광치이다.

실험결과 및 고찰

균주의 분리—우리나라 각지에서 채취한 토양 재료에서 각기 상이한 것으로 보이는 균주 394종을 분리하였다. 분리한 균주는 집락의 모양, 크기 집락뒤틀면의 모양 및 색소 생산등을 지표로 하여 방선균을 대상으로 한 것이다.

일차검색—분리된 394종을 액내배양하고, 여과하여 얻은 여과액을 대상으로 하여 α -amylase 활성 저해 여부를 검토하였다. 394종의 토양균주중 DMCJ-49 균주 등 18개 균주에서 저해제 생성 가능성이 제시되었으며(결과 생략), 이 18개 균주를 다시 액내 배양하여 2차 검색을 실시하였다.

이차검색—18개 균주의 액내 배양 여과액을 대상으로 bacterial α -amylase와 pancreatic α -amylase 활성 저해 여부를 검토한 결과 7개 균주에서 α -amylase 활성 저해제의 생성 가능성이 매우 높았다. 그 결과를 Table I에 표시하였다

삼차검색—7개 균주를 새로 액내 배양하여 여과액을 얻고, 냉 아세톤 처리하여 고분자 물질을 제거한 후 검색하여 그 결과를 Table II에 표시하였다.

Bacterial α -amylase와 pancreatic α -amylase에 대해 동시에 저해작용을 갖는 균주로 DMCJ-49 균주, DMCJ-144 균주가 확인되었으며 bacterial α -amylase 활성만을 저해하는 균주로 1205 균주와 DMCJ-76 균주가 추정되었고, pancreatic α -amylase만을 저해하는 균주로 1060 균주가 추정되었다.

이들 α -amylase 활성을 저해하는 균주를 대상으로 하여 현재 저해성 물질의 분리, 정제가 진행중에 있다. 이들 7개 균주는 생화학적 실험, 형태학적 특징, 생리적 특징을 검토한 결과 Stre-

Table I—Secondary Screening of α -amylase in inhibitor producing soil microorganisms.

Strain No	Bacterial α -amylase Inhibition (P.I)	Pancreatic α -amylase Inhibition (P.I)
1036	4%	2%
1060	17	79
1078	11	-14
1205	40	6
1372	4	-9
1411	-6	-19
1421	4	-23
1425	4	-17
1440	-11	-19
1492	0	-11
G84	-2	-12
J 49	62	70
J 71	9	2
J 76	43	40
J 81	0	-6
J 84	-9	-9
J 93	6	4
J 144	72	66

Table II—Confirmatory screening of α -amylase inhibitor producing soil microorganisms.

Strain No	Bacterial α -amylase Inhibition (P.I)	Pancreatic α -amylase Inhibition(P.I)
1060	-7%	47%
1205	16	19
J 49	78	103
J 76	27	17
J 93	-14	2.7
J 144	86	95

ptomycetes 속에 속하는 방선균으로 확인되었다(결과 생략). 검색된 균주 중에서 α -amylase 저해제를 생성하는 토양 미생물의 빈도는 1.2%로 이 결과는 이미 보고된 검색 결과에서의 빈도와 큰 차이가 없었다.¹⁰⁻¹³⁾

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단의 목적기초연구비로 수행된 것이며, 동 재단에 깊이 감사한다.

문헌

- 1) W. Puls and U. Keup: *Recent Advances in Obesity Research*, I, p.391 (A. Howard, ed) London, Newman (1975).
- 2) W. Puls and U. Keup: *ibid.*, p.412.
- 3) T. Niwa, S. Inouye, T. Tsuruoka, Y. Koaze and T. Nidda: Nojirimycin as a potent inhibitor of glucosidase. *Agr. Biol. Chem.* 34, 966 (1970).
- 4) S. Ueda and Y. Koba: Properties of amylase inhibitor produced by *Streptomyces* species. *Agr. Biol. Chem.* 37, 2025(1973).
- 5) S. Murao and K. Ohyama: New amylase inhibitor(S-AI) from *Streptomyces diastaticus* var. *amylostaticus*. *Agr. Biol. Chem.* 39, 2271(1975).
- 6) J. Itoh, S. Omoto and T. Shomura, H. Ogino, K. Iwamatu and S. Inouye: Oligostatins, new antibiotics with amylase inhibitory activity I. production, isolation and characterization. *J. Antibiotics* 34, 1424 (1981).
- 7) S. Namiki, K. Kangouri and T. Nagate: Studies on the α -glucoside hydrolase inhibitor, adiposin. I. Isolation and physico-chemical properties. *J. Antibiotics* 35, 1234 (1982).
- 8) K. Yokose, K. Ogawa, T. Sano, K. Watanabe, H.B. Maru ama and Y. Suhara: New α -amylase inhibitor, trestatins. I. Isolation, characterization and biological activities of trestatins A, B and C. *J. Antibiotics* 36, 1157(1983).
- 9) D.D. Schmidt, W. Frommer, B. Junge, L. Muller and W. Wingender: Glucosidase inhibitor: New complex oligosaccharides of microbial origin. *Naturwissenschaften* 64, 535 (1977).
- 10) 김광옥, 최응철, 심미자, 김병각: 한국토양균중 항생물질 생산균에 관한 연구(제 1 보) 스트렙토마이세스속 균주 DMC-72호의 분리 및 항균작용, *한국생약학회지* 15, 1(1984).
- 11) J.H. Kwak, E.C. Choi and B.K. Kim; Studies on screening and isolation of α -amylase inhibitors of soil microorganisms(I). Isolation and activities of the inhibitor of *Streptomyces* Strain DMC-225, *Arch. Pharm. Res.* 8, 67 (1985).
- 12) K.H. Kim, S.H. Lee, J.W. Kim, H.W. Kim, M.J. Shim, E.C. Choi and B.K. Kim: Studies on screening and isolation of α -amylase inhibitors of soil microorganisms (II) Isolation and activities of the inhibitors of *Streptomyces* Strain DMC-72. *Kor. J. Mycol.* 13, 203 (1985).
- 13) 김제학, 김정우, 김하원, 심미자, 최응철, 김병각: α -Amylase 저해제 생산방선킨의 선별과 분류 및 α -Amylase 저해제의 분리와 Kinetics 연구, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng* 13, 223 (1985).
- 14) S. Murao, K. Ohyama, S. Ogura: Isolation of amylase inhibitor-producing microorganism. *Agric. Biol. Chem.* 41, 919 (1977).