

## 알파 - 아밀라제 저해제 생성 Streptomyces DMCJ-49 의 동정과 저해제의 분리

정동직 · 곽진환 · 최응철 · 김병각

서울대학교 약학대학

(Received May 17, 1989)

### Identification of *Streptomyces* DMCJ-49 Producing the alpha-Amylase Inhibitors and the Isolation of the Inhibitor

Dong-Jik Chung, Jin-Hwan Kwak, Eung-Chil Choi and Byong-Kak Kim  
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

**Abstract**—To find  $\alpha$ -amylase inhibitors produced by microorganisms from soil, a strain which had a strong inhibitory activity against bacterial  $\alpha$ -amylase was isolated from the soil sample collected in Korea. The morphological and physiological characteristics of this strain on several media and its utilization of carbon sources showed that it was one of *Streptomyces* species according to the International Streptomyces Project method. The amylase inhibitor of this strain was purified by active carbon adsorption, silica-gel column chromatography, SP-Sephadex C-25 column chromatography, adsorption on Amberlite XAD-2. The inhibitor was oligosaccharide which was composed of glucose. The inhibitor had inhibitory activity against other amylase such as salivary  $\alpha$ -amylase, pancreatic  $\alpha$ -amylase, fungal  $\alpha$ -amylase and gluco-amylase.

**Keywords** □  $\alpha$ -amylase inhibitor, *Streptomyces*, oligosaccharide

당뇨병이나 비만증은 그 원인의 하나로 음식물중의 탄수화물이  $\alpha$ -amylase 나 sucrase 와 같은  $\alpha$ -glucoside-hydrolyase 에 의해 분해되어 생긴 포도당의 과량 흡수됨으로 야기된다고 볼 수 있다.

$\alpha$ -amylase 나 sucrase 와 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  $\alpha$ -amylase 저해제를 투여함으로써 전분의 가수분해로 인해서 생기는 포도당이 adipose tissue 의 지질성분으로 전환되는 것을 차단할 뿐만 아니라 혈중당의 농도를 감소시키는 효과를 보여주고 있다.<sup>1,2)</sup>

이러한  $\alpha$ -amylase inhibitor 들은 처음에는 발아시킨 메밀이나 귀리 등의 고등식물에서 분리해내었으나, 1970년에 T. Niwa<sup>3)</sup> 등이 *Streptomyces* 속 세균에 배양액으로부터 얻어지는 nojirimycin 이 항균작용과 동시에  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase 등은 물론 그밖의 여러 amylase 에 대해 저해작용이 있는 것을 보고한 이래 10여종 이상의 새로운  $\alpha$ -amylase inhibitor 들이 미생물에서부터 발견되었다.<sup>4-9)</sup>

본 연구실에서는 1982년 및 1983년 2차에 걸쳐 우리나라 전국 토양에서 분리된 토양세균 1,000여 균주에 대해  $\alpha$ -amylase 활성 저해물질 생산여부를 검토하여 그중 6종의 균주가  $\alpha$ -amylase 활성억제 물질을 생산함을 확인하였다.<sup>10)</sup> 이 중 우선 억제 활성도가 우수한 균주 3가지를 선발하여, 이들 균주가 생산하는 억제 물질을 분리 정제하여 억제물질의 성

상 및 구조에 대하여 연구한 바 있다.<sup>11-13)</sup>

또한 1987-8년에 우리나라 토양재료에서 분리된 394종의 토양세균을 대상으로 하여,  $\alpha$ -amylase 저해성 물질 생성의 검색을 실시한 바 있다.<sup>14)</sup> 본 연구에서는 앞의 검색 실험에서  $\alpha$ -amylase 저해제 생산이 양호한 것으로 밝혀진 DMCJ-49 균주를 대상으로 하여, 그 균주를 분류 동정하였으며, 그 균주에서의  $\alpha$ -amylase 저해제 생산 배양을 검토하였다. 또한  $\alpha$ -amylase 저해제를 분리 정제하여, 구성당을 추정하였다.

### 실험방법

**균주**—본 연구실에서  $\alpha$ -amylase 저해제 생성균주로 선발된 방선균 DMCJ-49 균주를 사용하였다.<sup>14)</sup>

**배지 및 시약**—Bacterial  $\alpha$ -amylase 등 enzyme 은 Sigma 사 제품을 사용하였다.  $\alpha$ -Amylase 저해제 생성을 위한 배지는 oatmeal 배지 (oatmeal 20g, yeast extract 1g, distilled water 1,000 ml, pH 7.0)를 사용하였다. 배지의 중요성분은 Difco 사 제품을 사용하였다. SP-Sephadex C-25 등 물질분리용 시약도 Sigma 사 제품을 사용하였으며, 그밖의 중요시약은 시판특급시약을 사용하였다.

**액내 배양**—50 ml 삼각 flask 에 oatmeal 배지 10 ml 를 넣고, slant 상의 균을 접종하여  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  에서 4일간 진탕 배양하였다(1차 배양). 500 ml 삼각 flask 에 oatmeal 배지 100 ml 를 넣고 1차 배양균액 10 ml 를 접종하고  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  에서 4일간 배양하였다(2차 배양).  $\alpha$ -Amylase 저해제 생성이 최고로 되는 배양일을 검토하기 위하여 최장 6일까지 배양하였다. 2l 삼각 flask 에 oatmeal 배지 500 ml 를 넣고 4일간 배양한 2차 배양균액 50 ml 를 접종하고  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  에서 4일간 배양하였다(본 배양).

**$\alpha$ -Amylase 저해제 생성의 확인**—앞의 연구에서 사용한 검색계를 적용하여  $\alpha$ -amylase 저해제 생성을 확인하였으며, 물질분리단계에서도 같은 검색계를 적용하였다.<sup>10-14)</sup>

**균주의 동정**—Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 에 기재된 방법,<sup>15)</sup> Interna-

tional Streptomyces Project Method<sup>16)</sup> 및 carbon compound 의 이용<sup>17)</sup> 등을 이용하여 균주를 동정하였다. 이 방법들은 우리 연구실의 앞 연구의 보고에도 기재되어 있다.<sup>10-14)</sup>

### 1. 생화학적 실험

**Diaminopimelic acid(DAP) isomer 의 동정**<sup>18)</sup>—DMCJ-49 균주의 균체를 동결 건조한 후, 밀봉용기에 건조 균체 3mg 과 6 N-HCl 1ml 를 넣은 후  $100^\circ\text{C}$  에서 18시간 동안 가열하여 가수분해시켰다. 가수분해물을 냉각시킨 후 여과지로 여과하였다. 여액을  $40^\circ\text{C}$  에서 감압농축하고, 잔류염산을 완전히 제거하기 위하여 소량의 증류수를 넣어 용해시킨 후, 다시 농축하였다. 농축물을 소량의 증류수에 용해시켜 용액 5  $\mu$ l 정도를 cellulose(microcrystalline) TLC plate 에 spot 하였다. 표준으로는 Sigma 사 제품의 DAP mixture 를 사용하였다. 이것을 methanol : 10 N-HCl : pyridine (80 : 17.5 : 2.5 : 10) 의 용매계에서 전개시켰다. Spot 확인은 acetic ninhydrine (0.1% w/v) 용액을 분사한 후  $100^\circ\text{C}$  에서 2분간 가열하였다.

**당당류의 동정**<sup>19)</sup>—동결건조한 DMCJ-49 균체 50 mg 을 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 ml 와 함께 밀봉 용기에 넣은 다음 2시간 동안  $100^\circ\text{C}$  로 가열하였다. 이것을 냉각시킨 후, 가수분해물을 pH 5-5.5 될 때까지 포화 Ba(OH)<sub>2</sub> 를 가했다. 원심분리하여 침전물을 제거한 후, 상정액을 농축하여 0.4 ml 의 증류수를 가했다. 이 가수분해물 5  $\mu$ l 를 microcrystalline cellulose plate 에 spot 하고, 표준으로는 1%의 galactose, arabinose, xylose 를 사용하였다. 이것을 ethylacetate : pyridine : water (100 : 35 : 25) 의 용매계에서 전개시켰다. 확인시약은 aniline 2 ml, phthalic acid 3.3g 과 물로 포화된 n-butanol 100 ml 로 구성된 용액을 분사한 후  $100^\circ\text{C}$  에서 2분간 가열하여 발색을 확인하였다.

### 2. 형태학적 특징

다음과 같은 각각의 배지에 DMCJ-49 균주를 동시에 접종하여,  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  에서 14일간 배양한 다음, 성장의 정도와 공중균사의 색깔, petri dish 뒷면의 색깔, 용성색소의 생성여부 등을 관찰하였다.<sup>16)</sup>

a) Yeast extract-malt extract agar (ISP No.2 medium)

- b) Oatmeal agar (ISP No.3 medium)
- c) Inorganic salts-starch agar (ISP No.4 medium)
- d) Glycerol-asparagine agar (ISP No.5 medium)
- e) Tyrosine agar (ISP No.7 medium)
- f) Glucose-asparagine agar (Krainsky's medium)
- g) Glucose-nitrate agar

### 3. 생리적 특징

탄소원 이용에 관한 실험<sup>17)</sup>—탄소원 : Millipore filter 로 여과결균하여 10% 용액을 만들고 60°C로 냉각하여 basal medium 의 최종농도가 1%가 되게 첨가하였다. 사용한 당은 D-glucose, D-xylose, L-arabinose, L-rhamnose, D-fructose, raffinose, D-mannitol, salicin, sucrose, inositol 등이었다. 각각의 당이 들어있는 배지를 만들고 DMCJ-49 균주를 tryptone yeast extract 액체배지에서 2일 배양후 만든 washed inoculum 을 접종한 후 27±1°C 에서 15일 배양하고 탄소원 이용여부를 관찰하였다. Glucose가 들어있는 배지를 positive control 로 하고 탄소원이 들어있지 않은 배지를 negative control 로 하였다.

Melanin 색소 생성 실험<sup>18)</sup>—Petri dish 에 tyrosine-agar 배지를 만들어 부어 굳힌 다음 DMCJ-49 균주를 접종하여 27±1°C에서 1일간 배양하였을 때 colony 주위에 짙은 회색의 색소가 생성되는가를 관찰하였다.

### 4. 현미경 관찰<sup>16)</sup>

Oat meal agar 배지위에 균을 접종하고 멸균한 cover glass 를 45° 경사지게 끼워 27±1°C에서 14일간 배양후 공중균사의 형태 및 배열상태를 관찰하였다. 또한 spore 표면을 전자현미경으로 관찰하였다.

저해물질의 분리—4일 배양한 culture broth 를 수확하여 active carbon (0.2g/ml)으로 흡착시키고 active carbon 의 2배 정도 (2ml/g)의 acetone 으로 용출하였다. 이 용출액을 감압농축하여 silica-gel column chromatography 와 SP-Sephadex C-25 column chromatography 를 통해 분리 정제 하였다.

Silica-gel column chromatography—Active carbon 으로부터의 용출액을 농축 (3ml)하여 silica-gel 60 (70-230 mesh) column (4.5×40 cm)에 top-loading 하고 BuOH : EtOH : Water (5 : 3 : 2)로 elution 하였다.

SP-Sephadex C-25 column chromatography—Silica-gel 을 통과한 active fraction 을 농축 (1ml)하여 SP-Sephadex C-25 column (2.5×60 cm) 에 top-loading 하고 0.01 M citrate buffer (pH 3.0-pH 6.0 gradient)를 0.7 ml/min 의 flow rate 로 elution 하였다.

Amberlite XAD-2 에 의한 Desalting—SP-Sephadex C-25 를 빠져나온 active fraction 을 XAD-2 column 에 흡착시키고 탈이온수로 씻어 염을 제거하고 흡착된 저해물질을 80% MeOH 로 용출하고 감압농축하여 흰색의 분말을 얻었다. 이상의 분리과정을 Fig.1 에 도시하였다.

Gas chromatography 에 의한 구성당 분석—분리 정제된 저해제 시료를 부분산 가수분해 조건으로 0.025 N HCl 로 100°C 15분, 30분 동안 반응시켰다. 총 산 가수분해 조건으로 0.25 N, 0.5 N HCl 로 100°C 30분 동안 반응시켰다. 저해제 2mg 을 각 조건에 따라 산 가수분해하여 무수분말로 만들고

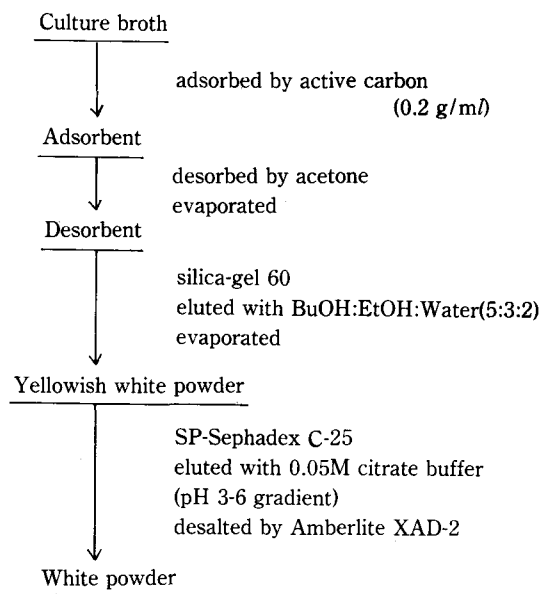


Fig. 1—Purification procedure of  $\alpha$ -Amylase inhibitor from the culture broth of DMCJ-49.

100  $\mu$ l pyridine 넣은 후 300  $\mu$ l hexamethyldisilane과 50  $\mu$ l의 trimethylchlorosilane를 넣어 silylation 하고 이 시료 1  $\mu$ l를 취하여 Shimadzu GC로 분석하였다.

여러가지 효소에 대한  $\alpha$ -amylase 저해제의 효과—여러가지 효소 용액 0.5 ml의 amylase 저해제를 37°C에서 10분간 incubation 하여 남아있는 효소 활성을 조사하였다. 기질로 soluble starch를 사용하고 저해 결과는 60-100%일 때를 양성(+), 그외는 음성(-)으로 하였다.

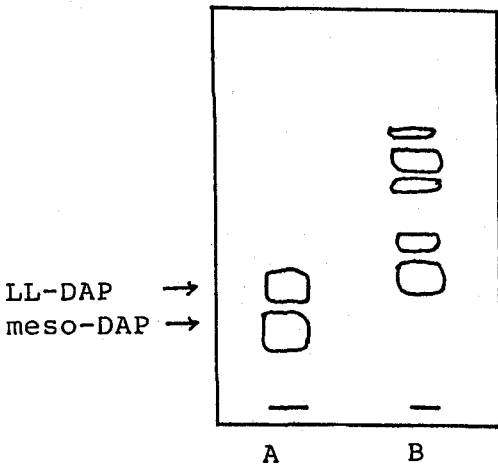
**실험결과**

**1. DMCJ-49 균주의 동정**

**생화학적 실험**—DMCJ-49 균주의 세포벽 성분중 DAP-isomer와 당당류 존재여부에 대한 실험결과, LL-DAP가 존재하였으며 arabinose, galactose, xylose 등의 당당류는 존재하지 않는 것이 확인되었다. 이들 결과로부터 DMCJ-49 균주는 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 의거하여 cell wall type I에 속하는 것을 알 수 있다.

Fig.2와 Fig.3에 결과를 도시하였다.

**형태학적 특징**—실험방법에 기술한 각각의 배지에 DMCJ-49 균주를 동시에 접종하고 27±1°C에서 14일간 배양한 다음, 성장의 정도와 공중 균사의 색깔, petri dish 뒷면의 색깔, 용성색소의 생성여부



**Fig. 2**—Separation of DAP isomers by TLC.  
(A) standard DAP mixture  
(B) hydrolyzates of strain DMCJ-49

등을 관찰하였다. Table I에 표시된 바와 같이 glucose-asparagine agar와 glucose nitrate agar, tyrosine agar 배지를 제외한 각종 배지에서 성장이 양호하였다. 공중 균사의 색깔은 회색 또는 흰색이었으며, 용성색소는 전혀 생성하지 않았다.

**생리적 특징**—DMCJ-49 균주를 배양할 때의 탄소원 이용에 관한 결과는 Table II에 표시되어 있는 바와 같이, salicin을 제외하고는 대부분 양호하게 이용하였다.

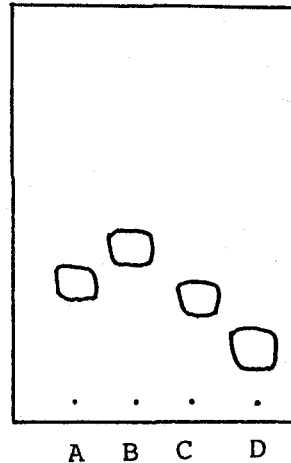
Melanin 색소는 생성하지 않았다.

**현미경 관찰**—Oatmeal agar 배지에 DMCJ-49 균주를 배양하여 공중균사의 형태 및 배열상태를 관찰하였다. 또한 spore 표면을 전자현미경으로 관찰했다. Fig.4에 도시되어 있는 바와 같이 spore chain 형태는 straight or flexuous(RF=Rectus flexibis)이었고, spore 표면은 smooth이었다.

이상의 실험결과를 종합하여 DMCJ-49 균주는 Streptomyces속으로 확인되었다.

**2. DMCJ-49 균주의  $\alpha$ -amylase 저해제 생성배양곡선**

Oatmeal 배지에 DMCJ-49 균주를 배양하면서 24시간 간격으로  $\alpha$ -amylase 저해제 생성과 배양배지의 pH 변화를 관찰하였다. 저해제 물질의 활성은 배양 3일째에 급격히 증가하여 배양 4일째에 최대에



**Fig. 3**—Separation of monosaccharides in whole cell hydrolyzates.  
(A) arabinose  
(B) xylose  
(C) galactose  
(D) sample hydrolyzates

**Table I**—Cultural characteristics of strain DMCJ-49

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

**Table II**—Utilization of carbon sources by strain DMCJ-49

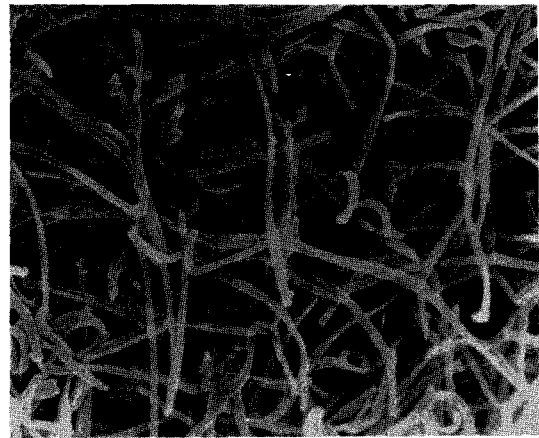
Carbon Sources	Growth
D-Glucose	+
D-Xylose	+
L-Arabinose	+
L-Rhamnose	+
D-Fructose	+
D-Mannitol	+
Raffinose	+
Inositol	+
Salicin	-
Galactose	+

(+ : utilized, - : Not utilized)

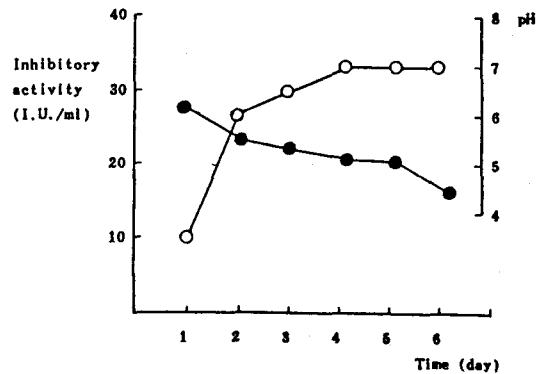
도달하여 그 후는 완만하게 약간 증가하였다. 또한 배양배지의 pH는 배양시간이 지남에 따라 지속적으로 감소하였다. 그 결과를 Fig.5에 표시하였다.

**3. 저해물질의 분리**

$\alpha$ -Amylase 저해제의 분리과정은 Fig.1에 표시



**Fig. 4**—Aerial mycelium of strain DMCJ-49 (scanning electron microscope  $\times 8,000$ ).



**Fig. 5**—Production curve of the  $\alpha$ -amylase inhibitors of strain DMCJ-49.

○-○ :  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of culture  
●-● : pH of culture medium

되었다. 그 마지막 과정에서 흰색 분말을 얻었다. 이 흰색 분말은 anthrone test에서 양성반응을 나타내었고 ninhydrine test에는 반응하지 않았다. 이 결과 및 gas-chromatography 분석으로, 분리된 저해제는 oligosaccharide로 추정되었다.

**4. 저해제의 구성당 분석**

Gaschromatography에 의해 저해제의 구성당을 분석하였다. 표준물질로 glucose, rhamnose, xylose, mannose, galactose, arabinose를 사용하였다. 저해제의 산 가수분해 gas-chromatogram을 Fig.6에 표시하였다. 저해제의 주 구성당은 glucose로 95% 이상이었다. 그밖에 mannose, xylose 및 rhamnose로 추정되는 당이 5% 차지하

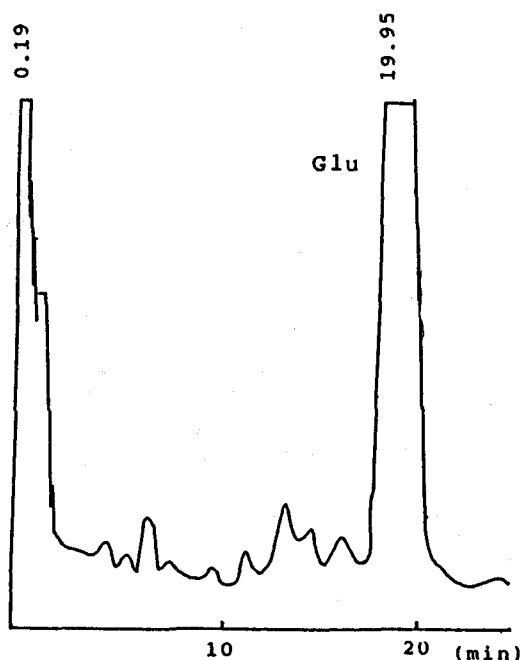


Fig. 6—Gas chromatograph of the hydrolysate of the inhibitor from DMCJ-49.

Table III—Effects of the  $\alpha$ -amylase inhibitor on various enzymes

Enzyme	Origin	Substrate	pH	Inhibition
$\alpha$ -Amylase	<i>Bacillus subtilis</i>	Starch	6.9	+
Salivary $\alpha$ -amylase	Human saliva	Starch	6.9	+
Pancreatic $\alpha$ -amylase	Porciné pancreas	Starch	6.9	+
Fungal $\alpha$ -amylase	<i>Aspergillus oryzae</i>	Starch	6.9	+
Glucoamylase	<i>Rhizopus genus</i> mold	Starch	5.5	+
$\beta$ -Glucosidase	Almond	Maltose	6.0	-
$\beta$ -Amylase	Barley	Starch	5.5	-

+ : 60-100% inhibition, - : 0-60% inhibition

고 있었다.

##### 5. 여러가지 효소에 대한 저해제의 효과

DMCJ-49 균주에서 분리된  $\alpha$ -amylase 저해제가 각종의  $\alpha$ -amylase 등, 여러 효소에 미치는 효과를 검토하여 Table IV에 표시하였다. DMCJ-49 균주에서 분리된  $\alpha$ -amylase 저해제는 bacterial  $\alpha$ -amylase, pancreatic  $\alpha$ -amylase, salivary

$\alpha$ -amylase, fungal  $\alpha$ -amylase, glucoamylase 등 효소의 활성을 저해하였고  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -amylase, dextranase 등의 효소는 저해하지 못했다.

## 고 찰

$\alpha$ -Amylase의 활성을 강하게 저해하는 물질을 생성하는 것으로 검색된 토양세균 DMCJ-49를 동정하고, 이 균주가 생산하는  $\alpha$ -amylase 저해제의 분리 정제를 시도하였다. DMCJ-49 strain에 대한 동정은 ISP(International Streptomyces Project) 방법과 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology의 방법에 따라 동정하였다. 그 결과 whole cell 가수분해물에는 LL-DAP가 포함되어 있고, 단당류 성분 분석결과 galactose, xylose, arabinose는 들어있지 않았다. 현미경 관찰결과 aerial spore를 가지며, spore chain은 rectus flexiblis이며, spore 표면은 smooth이고, colony의 색은 회색을 나타내었다. 이 균주는 glucose-asparagine agar 배지와 glucose nitrate agar, tyrosine agar 배지 등을 제외한 각종 배지에서 성장이 양호하였으며, 탄소원 이용에 있어서는 salicin을 제외한 나머지 탄소원을 이용하여 양호하게 성장하였다. 이와 같은 실험결과로 DMCJ-49 균주는 Streptomyces속 세균으로 분류되었다. 토양세균중에서  $\alpha$ -amylase 저해제를 많이 생산하는 속은 Actinoplanes속, Streptosporangium속 및 Streptomyces속 순인데<sup>20)</sup> DMCJ-49 균주가 Streptomyces속으로 판명된 것은 토양세균을 분리할 때 Actinoplanes속이나 Streptosporangium속 세균을 특별히 목표로 하지 않았기 때문으로 생각된다.

DMCJ-49 균주를 액내 배양하였을 때 저해제 생성이 현저히 증가하는 것은 배양 3일째이었으며 4일 이후 6일까지는 일정하였다. 이러한 물질생성 곡선은 항생물질의 생산의 경우와 일치하였다. 따라서 물질분리를 위한 수확은 4일째가 타당한 것으로 생각된다.

저해제를 분리하기 위해 active carbon adsorption, silica-gel column chromatography, SP-Se-

phadex C-25 column chromatography, XAD-2 column adsorption 등이 이용되었다. 이 방법을 통해 흰색의 분말을 얻었다. 결과에 나타나지 않았지만 CM-Sephadex C-25 column도 좋은 분리효과를 가짐을 알 수 있었다.

Anthrone test와 gas chromatography를 통해 이 물질은 oligosaccharide 유도체로서 대부분이 glucose로 되어 있음을 알 수 있었다. 이 저해제가 oligosaccharide 유도체로 추정되는 것은 이미 발견된  $\alpha$ -amylase 저해제의 대부분이 oligosaccharide 계통인 것으로<sup>20)</sup> 생각할 때 타당한 것으로 생각된다. 앞으로 배양방법, 분리방법 등을 개량하여, 물질의 구조를 밝힐 계획이다.

DMCJ-49 균주가 생성하는 저해제는 bacterial  $\alpha$ -amylase 뿐만 아니라 pancreatic  $\alpha$ -amylase의 활성을 저해함으로 의약품으로 개발할 때의 필수조건 즉 인체에서 생산하는 pancreatic  $\alpha$ -amylase의 활성을 저해해야 한다는 요건을 갖추었다고 생각된다.

## 결 론

$\alpha$ -amylase 저해제를 생산하는 DMCJ-49 균주는 Streptomyces속 세균으로 동정되었다. 이 균주에서 저해제 생성이 양호한 것은 배양 4-6일이었다. 이 균주에서 생산된  $\alpha$ -amylase 저해제는 oligosaccharide 계통의 물질로 추정되었으며, 이 물질은 bacterial  $\alpha$ -amylase 뿐만 아니라 pancreatic  $\alpha$ -amylase도 억제하였다.

## 감사의 말씀

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

## 문 헌

- 1) Puls, W. and Keup, U.: Recent Advances in Obesity Research, I, p. 391 (A. Howard, ed) London, Newman (1975).
- 2) Puls, W. and Keup, U.: *ibid.*, p. 412.
- 3) Niwa, T., Inouye, S., Tsuruoka, T., Koaze, Y. and

Nidda, T.: Nojirimycin as a potent inhibitor of glucosidase. *Agr. Biol. Chem.* **34**, 966 (1970).

- 4) Ueda, S. and Koba, Y.: Properties of amylase inhibitor produced by Streptomyces species. *Agr. Biol. Chem.* **37**, 2025 (1973).
- 5) Muraio, S. and Ohyama, K.: New amylase inhibitor (S-AI) from *Streptomyces diastaticus* var. *amylostaticus*. *Agr. Biol. Chem.* **39**, 2271 (1975).
- 6) Itoh, J., Omoto, S., Shomura, T., Ogino, H., Iwamatu, K. and Inouye, S.: Oligostatins, new antibiotics with amylase inhibitory activity I. Production, isolation and characterization. *J. Antibiotics* **34**, 1424 (1981).
- 7) Namiki, S., Kangouri, K. and Nagate, T.: Studies on the  $\alpha$ -glucoside hydrolase inhibitor, adiposin, I. Isolation and physico-chemical properties. *J. Antibiotics* **35**, 1234 (1982).
- 8) Yokose, K., Ogawa, K., Sano, T., Watanabe, K., Maruyama, H.B. and Suhara, Y.: New  $\alpha$ -amylase inhibitor, trestatins, I. Isolation, characterization and biological activities of trestatins A, B and C. *J. Antibiotics* **36**, 1157 (1983).
- 9) Schmidt, D.D., Frommer, W., Junge, B., Muller, L. and Wingender, W.: Glucosidase inhibitor. New complex oligosaccharides of microbial origin. *Naturwissenschaften* **64**, 535 (1977).
- 10) 김광욱, 최응철, 심미자, 김병각: 한국토양균중 항생물질 생산균에 관한 연구(제1보) 스트렙토마이세스속 균주 DMC-72호의 분리 및 항균작용, 한국생약회지 **15**, 1(1984).
- 11) Kwak, J.H., Choi, E.C. and Kim, B.K.: Studies on screening and isolation of  $\alpha$ -amylase inhibitors of soil microorganisms (I). Isolation and activities of the inhibitor of Streptomyces Strain DMC-225, *Arch. Pharm. Res.* **8**, 67 (1985).
- 12) Kim, K.H., Lee, S.H., Kim, J.W., Kim, H.W., Shim, M.J., Choi, E.C. and Kim, B.K.: Studies on screening and isolation  $\alpha$ -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:  $\alpha$ -Amylase 저해제 생성방선균의 선별과 분류 및  $\alpha$ -Amylase 저해제의 분리와 Kinetics 연구, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**, 223(1985).

- 14) 최응철, 김병각, 정경수 : 알파 - 아밀라제 생성 방선균의 검색, 약학회지 **32**, 304 (1988).
- 15) Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., 1246 pp., Williams and Wilkins Company, Baltimore (1974).
- 16) Shirling, E.B. and Gottlieb, D.: Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Intern. J. Syst. Bac.* **16**, 313 (1966).
- 17) Pridham, T.G. and Gottlieb, D.: The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination. *J. Bacteriol.* **56**, 107 (1948).
- 18) Staneck, J.H. and Roberts, G.D.: Simplified approach to identification of aerobic Actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* **19**, 226 (1974).
- 19) Starr, M.P., Stolp, H., Truper, H.G., Balows A. and Schlegel, H.G.: *The Prokaryotes*, Vol. II, 2059 pp., Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1981).
- 20) Truscheit, E., Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Schmidt, D.D. and Wingender, W.: Chemistry and biochemistry of microbial  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, *Angew. Chem. Int. Engl.* **20**, 744 (1981).