

***Streptomyces* 속 균주가 생성하는 α -D-Glucosidase Inhibitor(II) -저해물질의 생산조건-**

도재호^{1*} · 주현규²

¹한국인삼연구연구소 ²건국대학교 농화학과

α -D-Glucosidase Inhibitor from *Streptomyces* sp. (II) - Cultural Conditions for the Inhibitor Production -

Do, Jae-Ho^{1*} and Hyun-Kyu Joo²

¹Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Daejeon 302-345, Korea

²Department of Agricultural Chemistry, Konkuk University, Seoul 133-140, Korea

Cultural conditions for α -D-glucosidase inhibitor production from *Streptomyces* sp. YS-221-B isolated from soil and identified as *Streptomyces flavovirens* or a subspecies of it were investigated. When the strain was cultured in a flask containing 2% glucose, 0.3% asparagine, 0.0002% riboflavin, 0.05% K_2HPO_4 , 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% NaCl, pH 8.0 at 30°C, maximum production of the inhibitor was obtained after 8-9 days of cultivation. Sugar alcohols such as mannitol, *i*-inositol, erythritol as carbon sources, asparagine and beef extract as nitrogen sources were favorable for inhibitor production. Among vitamins, riboflavin, *p*-aminobenzoic acid, pyridoxamine and folic acid promoted the production of inhibitor, but depressed by the addition of hesperidine, and also depressed by cobalt, lithium and ferrous salts.

미생물성 효소저해물질에 관한 연구는 Umezawa group에 의해서 시작되었으며 현재 약 50여개의 저해물질이 분리 동정되었다(1). 효소저해물질은 효소성질의 해명, 효소활성 부위의 연구에 중요한 도구가 되고, 생체내에서 효소의 움직임을 규명하는 역할을 하며 생리기능 및 병의 해석에 유용한 도구 또는 치료제로 알려져 있고, 이러한 저해물질 중에 S-SI, SMPI, MK-1 및 Haim은 불용화해서 protease, amylase의 정지에 이용되며, 대사산물에 영향을 주기 때문에 발효공업에 이용될 수 있다(2). 탄수화물 분해효소 저해물질 중에서 amylase inhibitor는 메밀로부터 얻은 단백질 저해물질이 최초이며(3), 그 후 여러가지 식물체로부터 amylase inhibitor가 발견되었으며(4-9) 미생물 유래의 amylase inhibitor는 주로 방선균으로부터 분리 정제된 것이 많다. 그 중에서 *Streptomyces*속에서 분리된 S-AI(10), S-GI(11), Haim(12), Amylostatin X'

와 Amylostatin XG(13), Paim I, II(14)과 항생물질인 nojirimycin(15) 등이 보고되었으며 *Actinoplanes*속으로부터 분리된 acarbose(BAYg 5421)(16, 17)가 있으며 acarbose에 관한 연구로는 당뇨병(18, 19), glucose, serum insulin, triglyceride level에 미치는 영향 등이 보고되었다(20-23). 저자 등은 α -D-glucosidase 저해물질을 분리하는 미생물을 방선균을 대상으로 분리해서 YS-221-B를 선별하여 *Streptomyces flavovirens* 또는 그 근연균으로 동정한 바 있으며(24), 본 실험에서는 이 균주가 생산하는 저해물질의 생산조건을 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양

본 실험에 사용된 균주는 전보(24)에 보고한

Key words: α -D-Glucosidase inhibitor, production, cultural conditions

*Corresponding author

Streptomyces flavovirens 또는 그 근연균으로 동정한 것을 사용하였으며, α -D-glucosidase 저해물질 생산 조건을 조사하기 위하여 균의 배양은 glucose 1.5%, asparagine 0.1%, K_2HPO_4 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, NaCl 0.05% 를 기본배지로 하고 여러가지 탄소원, 질소원 vitamin 등을 첨가하여 500 ml 삼각 flask 에 100 ml 씩 주입하고, 121°C에서 15분간 살균한 다음 균의 포자를 1~2 백금이씩 접종하여 30°C에서 7일간 배양하였다.

저해활성도 측정

α -D-glucosidase 에 대한 저해활성은 p-NPG 를 사용하여 전보와 같이 측정하였다(24).

균체량 측정

배양이 끝난 배양액을 Toyo No.2 여과지로 여과하고 증류수로 3회 세척하여 105°C에서 항량이 될 때까지 건조한 후 중량을 측정하였다.

결 과

배양온도 및 pH 의 영향

미생물은 물질생산에 있어서 배양온도에 따라 매우 민감하므로 저해물질 생산에 온도가 미치는 영향을 조사하기 위하여 21°C에서 40°C까지 여러 온도에서 배양하여 저해활성과 균체량을 조사한 결과는 Fig.1 과 같이 30°C에서 배양했을 때 저해물질 생산과 균체량이 가장 높게 나타났으며 35°C 이상에서는

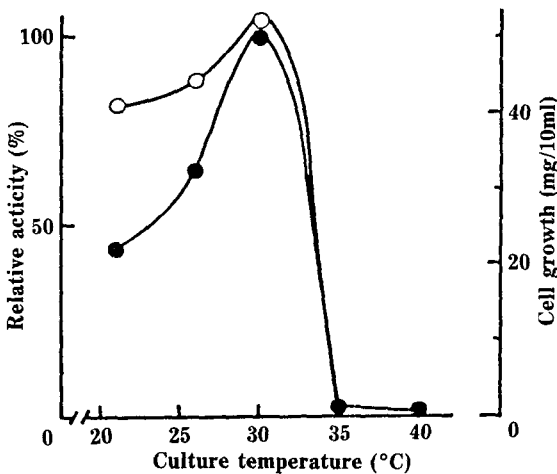


Fig. 1. Effect of temperature on the inhibitor production.

● - ● ; inhibitory activity, ○ - ○ ; cell growth.

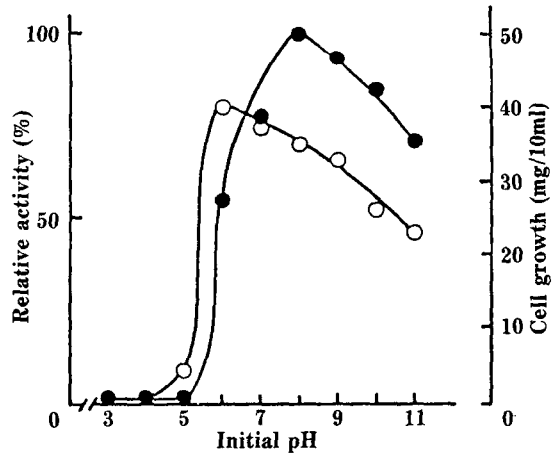


Fig. 2. Effect of initial pH on the inhibitor production. pH of culture medium was adjusted with 1N-HCl and NaOH. The cultivation was carried out at 30°C for 6 days. ● - ● ; inhibitory activity, ○ - ○ ; cell growth.

균이 생육하지 않았다. 그리고 저해물질 생산에 미치는 초발 pH의 영향을 조사한 결과는 Fig.2와 같이 균의 생산은 pH 6.0 부근에서 가장 왕성하였으나 저해물질 생산은 pH 8.0에서 가장 높았으며 pH 5.0 이하에서는 저해물질이 거의 생산되지 않았다.

탄소원의 영향

저해물질 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 각종 탄소원을 1%가 되게 첨가하고 pH를 8.0으로 조절하여 30°C에서 7일간 배양한 뒤 저해활성을 조사한 결과는 Table 1과 같이 mannitol,

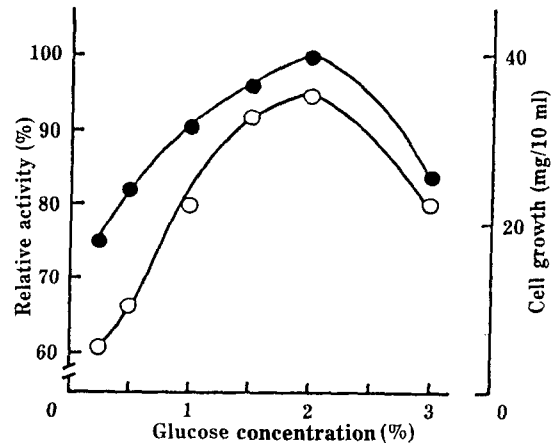


Fig. 3. Effect of glucose concentration on α -D-glucosidase inhibitor production by *Streptomyces* sp. YS-221-B.

● - ● ; inhibitory activity, ○ - ○ ; cell growth.

Table 1. Effect of carbon source on α -D-glucosidase inhibitor production.

Carbon source	Growth	Final pH	Relative activity (%)	Carbon source	Growth	Final pH	Relative activity (%)
Glycerol	++++	7.9	126	Cellobiose	+++	8.0	69
Erythritol	++	8.2	148	Sucrose	++	8.7	0
Arabinose	+++	7.7	103	Trehalose	++++	7.7	106
Xylose	++++	7.6	114	Melezitose	++	8.5	103
Ribose	++++	7.4	105	Raffinose	++	8.6	81
Rhamnose	++++	8.0	119	Inulin	++	8.6	90
Glucose	++++	7.9	100	Dextrin	++++	8.2	92
Mannose	+++	8.0	112	Amylose	+++	8.0	115
Fructose	+++	7.7	110	Amylopectin	++++	8.3	103
Galactose	++++	8.0	140	Starch	++++	8.2	85
Mannitol	++++	8.0	138	CMC-2Na	++	8.6	93
<i>D</i> -Inositol	++	8.4	142	Dextran	++	8.6	93
Sorbitol	++	8.4	118	(Mw.2,000,000)			
Salicin	++	8.6	87	Chitosan	+++	8.7	103
Maltose	+++	7.8	90	(carb shell)			
Lactose	++	8.4	86	Xylan	++	8.7	84

Table 2. Effect of nitrogen source on α -D-glucosidase inhibitor production.

Nitrogen source	Growth	Final pH	Relative activity (%)
Yeast extract	++++	7.1	90
Casein	++	6.1	71
Malt extract	+	6.4	74
Peptone	++++	6.6	80
Beef extract	++++	6.5	104
Asparagine	++++	7.8	100
Urea	++++	7.6	96
(NH ₄) ₂ HPO ₄	+++	6.5	61
(NH ₄) ₂ SO ₄	+	5.9	78
NH ₄ H ₂ PO ₄	+	6.1	47
NH ₄ Cl	+	6.7	83
NH ₄ NO ₃	+	6.7	60
NaNO ₃	+	7.4	92
KNO ₃	+	7.4	57

0.3% of nitrogen source was added to inhibitor production medium composed of 2.0% glucose.

D-inositol, erythritol 과 같은 당알코올이 양호하였으며 sucrose 를 첨가하였을 때에는 균의 생육도 저조하였지만 저해물질도 거의 생성되지 않았다. 당알코올류가 저해물질 생산에 양호한 편이었으나, 대량 배양시 경제성을 고려하여 glucose 를 0.25% 에서 3.0% 까지 각 농도별로 첨가하여 저해물질 생성능을 조사한 결과 Fig.3 과 같이 glucose 농도가 증가할수록 저해물질 생산량도 급격하게 증가하여 2.0% 를 첨가하였을 때 최고에 달했다.

질소원의 영향

Glucose 를 2% 첨가하고 각종 질소원을 0.3% 가 되게 첨가하여 저해물질 생산에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 2 와 같이 유기질소원은 무기질소원을 사용했을 때보다 저해물질 생산과 균체 증식이 양호하였으며 무기질소원 중에서도 NaNO₃, NH₄Cl 은 저해물질 생산이 비교적 좋았다. 그리고 asparagine 은 첨가농도에 따른 저해물질 생산능을 조사하기 위하여 0~0.5% 까지 첨가하여 그 생산능을 조사한 결과는 Fig.4 와 같이 첨가농도가 증가할수록 저해물질량도 증가하다가 0.3% 이상의 농도에서는 완만하게 증가하였다.

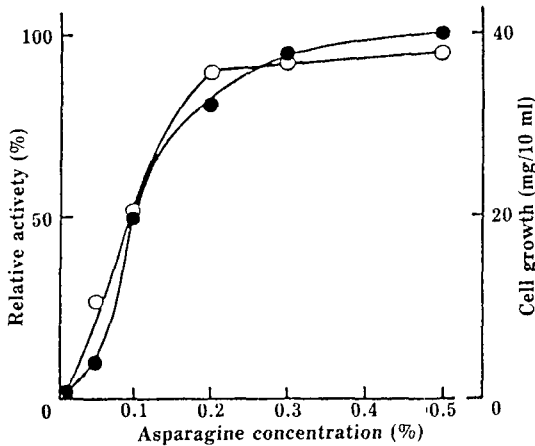


Fig. 4. Effect of asparagine concentration on α -D-glucosidase inhibitor production by *Streptomyces* sp. YS-221-B.

● - ● ; inhibitory activity, ○ - ○ ; cell growth.

Vitamin 의 영향

각종 vitamin 을 2.0 μ g/ml 의 농도로 첨가하여 균의 생육과 저해물질 생산능을 조사한 결과 Table 3 과 같이 riboflavin, thiamine, *p*-aminobenzoic acid, pyridoxamine, folic acid 등은 대조구보다 저해물질 생산을 10~20% 정도 촉진시켰으나 hesperidine 을 첨가하였을 때에는 균의 생육은 양호하였지만 저해물질 생산은 오히려 37% 가 감소되었다.

금속염의 영향

저해물질 생산에 미치는 금속염의 영향을 조사하

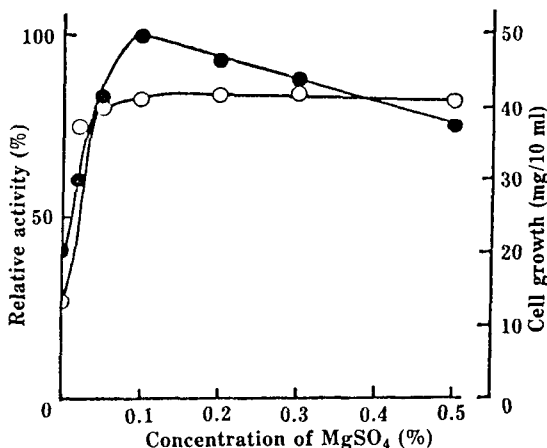


Fig. 5. Effect of concentration of MgSO₄ on α -D-glucosidase inhibitor production by *Streptomyces* sp. YS-221-B.

● - ● ; inhibitory activity, ○ - ○ ; cell growth

Table 3. Effect of vitamin on α -D-glucosidase inhibitor production.

Vitamin	Growth	Final pH	Relative activity (%)
None	++++	8.3	100
Riboflavin	++++	8.4	123
d-Biotine	++++	8.4	96
Thiamine HCl	++++	8.5	115
DL- α -Lipoic acid (oxidized form)	++++	8.4	98
Pyridoxal HCl	++++	8.4	91
Pyridoxamine 2HCl	++++	8.4	110
Pyridoxine HCl	++++	8.4	96
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	++++	8.4	110
Folic acid	++++	8.4	121
<i>i</i> -Inositol	++++	8.4	94
Ca-pantothenate	++++	8.2	82
Niacin	++++	8.3	85
Nicotinamide	++++	8.3	93
Ascorbic acid	++++	8.2	85
Hesperidine	++++	8.4	63

Each vitamin was added with concentration of 2.0 μ g/ml to inhibitor production medium.

기 위하여 각종 금속염을 1mM 농도로 첨가해서 배양한 결과 Table 4 와 같이 ZnCl₂, MgCl₂, MgSO₄ 등이 20% 정도 촉진시켰으나, CoCl₂, Li₂SO₄, CaCl₂, FeSO₄ 등은 저해물질 생산을 감소시켰다. MgSO₄ 의 첨가농도에 따른 균체량과 저해물질 생산능은 Fig.5 와 같이 첨가농도가 증가할수록 저해물질 생산이 급격하게 증가하다가 0.2% 이상의 농도에서는 감소하는 경향이였다.

배양시간의 영향

배양시간과 저해물질 생산량과의 관계를 조사하기 위하여 glucose 2%, asparagine 0.3%, riboflavin 0.0002%, K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄ 0.1%, NaCl 0.05% 조성의 배지를 pH 8.0 으로 조절하여 30°C 에서 배양하면서 경시적으로 pH 변화, 균체량 및 저해물질 생산량을 조사한 결과는 Fig.6 과 같다. 배양시간이 경과함에 따라 pH 는 서서히 낮아지다가 배양 4 일째에는 pH 5.5 까지 떨어졌으나 배양 5 일째부터는 다시 증가하여 10 일째에는 pH 8.5 까지 증가하였다. 한편 저해물질 생산은 pH 가 가장 낮은 4 일째까지는 서서

Table 4. Effect of metal salt on α -D-glucosidase inhibitor production.

Metal salt	Growth	Final pH	Relative activity (%)
None	+++	8.2	100
Li ₂ SO ₄	++++	6.8	34
MnCl ₂	+++	8.0	92
CoCl ₂	+	7.8	5
PbSO ₄	+++	8.0	100
CaCl ₂	+++	8.0	39
CuSO ₄	++	6.4	103
ZnSO ₄	++	6.2	109
ZnCl ₂	++	8.0	118
BaCl ₂	+++	8.0	104
MgCl ₂	+++	8.0	118
MgSO ₄	++++	8.0	119
FeSO ₄	++++	6.4	58
FeCl ₃	+++	8.0	103
AlCl ₃	+++	7.8	106

Each metal salt was added with concentration of 1mM to the medium containing 2% glucose, 0.3% asparagine, 2 μ g/ml of riboflavine, 0.05% K₂HPO₄, and 0.05% NaCl.

히 증가하다가 그 이후부터는 급격하게 증가하여 배양 9일만에 최고에 달했으며 균의 증식은 배양 6일만에 최대에 도달했다. 따라서 본 저해물질을 생산하기 위해서는 본 균을 8~9일간 배양하는 것이 바람직하다고 사료된다.

고 찰

미생물 대사산물 중에서 탄수화물 분해효소 저해제가 한 영역을 담당하고 있으며(25), 최근에는 이러한 미생물 유래의 탄수화물 분해효소 저해물질이 생화학, 생리학 및 임상학적인 분야에서 많이 연구되고 있고, 궁극적으로 탄수화물 대사의 불균형에 의해 초래되는 질병의 치료에 대한 연구가 많이 보고되고 있다(18, 20-23, 26). 지금까지 carbohydrase inhibitor의 생산에 사용된 탄소원으로는 corn starch(10, 11), soluble starch(27, 28), glycerol(12), glucose(14) 등이 양호하였으며 고농도(3~7%)로 첨가했을

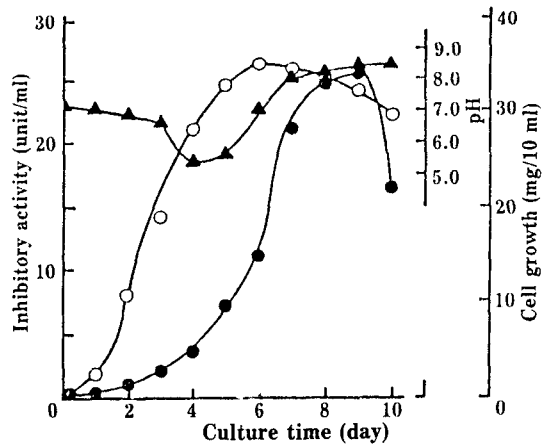


Fig. 6. Time course of α -D-glucosidase inhibitor production by *Streptomyces* sp. YS-221-B.

The composition and initial pH of the culture medium were glucose 2.0%, asparagine 0.3%, riboflavin 0.2mg K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄ 0.1%, NaCl 0.05% and pH 8.0. The cultivation was carried out at 30°C.

●-●; inhibitory activity, ○-○; cell growth, ▲-▲; pH

때 물질생산이 우수하였다. 질소원의 경우에는 대부분이 soy bean flake extract(10, 11), polypeptone, meat extract, yeast extract의 복합첨가(12, 27, 29), soy bean meal, ammonium phosphate의 복합첨가시(28) 저해물질 생산이 양호하였다. 본 실험에서도 무기질소원보다는 유기질소원인 asparagine, beef extract가 양호하였으며 asparagine을 농도별로 첨가하여 배양한 결과 0.2%까지는 균의 생육과 물질생산이 급격히 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 서서히 증가하였다. Vitamin 중에서 riboflavin, folic acid, thiamine 등이 저해물질 생산을 10~20% 정도 촉진하였으며, 금속이온 중에 Zn⁺⁺, Mg⁺⁺이 약 20% 정도 저해물질 생산을 촉진시켰으나 Li⁺, Co⁺⁺, Ca⁺⁺, Fe⁺⁺ 등은 감소시켰으며 MgSO₄·7H₂O를 0.1% 첨가하였을 때 최고에 달했다. pH와 온도의 영향을 조사한 결과 pH 6.0 부근에서 생육이 가장 왕성하였으나 물질생산은 pH 8.0에서 양호하였다. 이는 *Streptomyces*속 균주(27, 29-31) 및 *Cladosporium herbarum*(28)의 경우보다 약간 높았다. 최적 배양온도는 30°C이며 35°C 이상에서는 균의 생육과 저해물질 생산이 거의 되지 않았는데 이것은 S-AI(30), Haim(31)을 생산하는 방선균 및 *Cladosporium herbarum*(28)과 비슷하였으나 최적 배양온도가 고온성인 방선균(27, 29)보다는 낮았다.

요 약

토양으로부터 분리한 균주 YS-221-B로부터 α -D-glucosidase inhibitor 생산조건을 검토한 결과는 다음과 같다. 최적 pH와 온도는 8.0, 30°C였으며, 탄소원으로는 mannitol, *i*-inositol, erythritol 과 같은 당알코올이 양호하였으며, 질소원으로는 asparagine, beef extract 가 양호하였다. Riboflavin, folic acid, thiamine 과 같은 vitamin 의 첨가에 의해서 저해물질 생산이 10~20% 증가되었으며, 금속이온 중에 Zn⁺⁺, Mg⁺⁺은 약 20% 정도 물질생산을 촉진시켰으나 Li⁺, Co⁺⁺, Ca⁺⁺, Fe⁺⁺ 등은 감소시켰다. 그리고 pH 8.0, 30°C에서 8~9 일간 배양함으로써 저해물질 생산이 최고에 달하였다.

참고문헌

- Demain, A.L.: *Science*, **219**, 709 (1983).
- Murao, S.: *Nippon Nōgeikagaku kaishi*, **55**, 503(1981).
- Chrzaszcz, T. and J. Janicki: *Biochem. Z.*, **260**, 354 (1933).
- Kneen, E. and R.M. Sandstedt: *Arch. Biochem. Biophys.*, **9**, 235 (1946).
- Marshall, J.J. and C.M. Lauda: *J. Biol. Chem.*, **250**, 8030 (1975).
- Granum, P.E.: *J. Food Biochem.*, **2**, 103 (1978).
- Narayana Rao, M., K.S. Shurpalekar and O.E. Sundaravalli: *Indian J. Biochem.*, **4**, 185 (1967).
- Mattoo, A.K. and V.V. Modi: *Enzymologia*, **39**, 237 (1970).
- Strumeyer, D.H. and M.J. Malin: *Biochem. Biophys. Acta*, **184**, 643 (1969).
- Murao, S. and K. Ohyama: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2271 (1975).
- Murao, S., K. Ohyama, H. Murai, A. Goto, Y. Matsui, K. Fukuhara, S. Miyata, M. Sumida and M. Arai: *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **26**, 157 (1979).
- Murao, S., A. Goto, Y. Matsui and K. Ohyama: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1679 (1980).
- Fukuhara, K., H. Murai and S. Murao: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2021 (1982).
- Murao, S., N. Oouchi, A. Goto and M. Arai: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 453 (1983).
- Niwa, T., S. Inouye, T. Tsuruoka, Y. Koaze and T. Niida: *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 966 (1970).
- Schmidit, D.D., W. Frommer, B. Junge, L. Müller, W. Wingender, E. Truscheit and D. Schäfer: *Naturwissenschaften*, **64**, 535 (1977).
- Hidaka, H., T. Takaya and J.J. Marshall: *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **27**, 114 (1980).
- Gries, F.A., D. Grünekle and H. Drost: *Front. Hormone Res.*, **7**, 265, (1980).
- Vierhapper, H., A. Bratusch-Marrain and W. Waldhäusl: *Lancet*, **i**, 1386, (1978).
- Hillebrand, I., K. Boehme, G. Frank, H. Fink and P. Berchtold: *Res. Exp. Med. (Berl.)*, **175**, 81 (1979).
- Hillebrand, I., K. Boehme, G. Frank, H. Fink and P. Berchtold: *Res. Exp. Med. (Berl.)*, **175**, 87 (1979).
- Sjöström, L. and T. William Olsson: *Curr. Ther. Res.*, **30**, 351 (1981).
- Jenkins, D.J.A., R.H. Taylor, R. Nineham, D.V. Goff, S.R. Bloom, D. Sarsons and K.G.M.M. Alberti: *Lancet*, **ii**, 924 (1979).
- Do, J.H. and H.K. Joo: *Kor. J. Appl. Microbiol. Biocng.*, **17**, (1989).
- Demain, A.L.: *Science*, **214**, 987 (1981).
- McLoughlin, J.C., K.D. Buchanan and M.J. Alam: *Lancet*, **ii**, 603 (1979).
- Ueda, S. and Y. Koba: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2025 (1973).
- Saito, N.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 3120 (1982).
- Murao, S.N. Oouchi, A. Goto and M. Arai: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 107 (1985).
- Murao, S., K. Ohyama and S. Ogura: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 919 (1977).
- Murao, S., A. Goto and Y. Matsui: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2599 (1981).

(Received March 27, 1989)