

## $\alpha$ -아밀라제 저해물질을 생성하는 방선균 BY-445의 동정

방 병 호

서울보건대학 식품영양과

### Identification of the $\alpha$ -Amylase Inhibitor Producing *Actinomycetes* BY-445

Byung-Ho Bang

Dept. of Food and Nutrition, Seoul Health College, Yanggidong, Sung-nam, 461-250, Korea

#### Abstract

The strain BY-445 which produces new inhibitors of  $\alpha$ -amylase was isolated from a soil sample and identified. The aerial hyphae of this strain develop in the form of open spirals. The spore chain of BY-445 strain appears in a spiral shape with spiny surface. Melanoid and soluble pigments were not observed. Gelatin was liquefied, and skim milk and starch was also hydrolyzed. The isolate contained LL-diaminopimelic acid in its cell wall hydrolysate. The content of fatty acid 16:iso, 15:0 anteiso and 16:0 was 25.30, 16.19 and 13.16%, respectively. BY-445 strain was closely related to *Streptomyces violaceusniger* but it was different from this strain in some cultural and physiological characteristics. This strain was, therefore, designated as *Streptomyces* sp. BY 445.

Key words : *Streptomyces* sp. BY-445, identification,  $\alpha$ -amylase inhibitor.

#### 서 론

효소저해물질은 미생물 대사산물로 많이 얻어지며 효소의 반응기구 및 입체구조의 해석에 중요한 역할을 한다. 그래서 세포, 조직, 체액 중의 효소의 식별, 친화크로마토그래피(affinity chromatography)에 의한 활성물질의 분리, 정제시에 일어나는 분해의 방지 등, 의학, 생화학, 식품공업, 제약공업 등의 영역에 널리 이용되고 있다<sup>1-3)</sup>.

효소저해물질이 친화크로마토그래피 및  $\beta$ -1,3-glucosidase,  $\beta$ -galactosidase, cholesterol esterase, lipase, glutamic-oxaloacetate transferase (GOT), B<sub>6</sub> enzyme 등을 protease의 분해로부터 보호하는 것을 이용하여 효소의 정제, 새로운 효소의 검색과 산성 protease, 효소, 식용버섯의 증산 등에 이용된다<sup>2)</sup>.

Murao group<sup>4-7)</sup>, Ueda group<sup>8-10)</sup>, Namiki 등<sup>11)</sup>, Itoh 등<sup>12)</sup> 각종 방선균으로부터, Saito는 *Clad-*

*osporium*으로부터<sup>13)</sup>, Yokose 등<sup>14,15)</sup>은 *Aspergillus*로부터 각종 아밀라제 저해물질을 정제하여 연구하였으며, 국내에서는 김<sup>16)</sup> 등이  $\alpha$ -아밀라제 저해물질을 생산하는 미생물 아밀라제 저해물질의 선별과 물질의 정제에 관해서 보고하였을 따름이다.

급증하는 당뇨병이나 비만증 등의 탄수화물 의존성 질환의 치료 수단으로 강력한 저해물질이 요구되고 있다. 그래서 전보에서는 1차적으로 자연계에서 토양 시료로부터 아밀라제 저해물질을 생산 분비하는 미생물 균주를 분리·선별하여 생성조건을 검토하였으며, 또한 조정제하여 저해제의 여러 생리적 특성을 이미 조사 보고한 바 있다<sup>17,18)</sup>.

본 연구는  $\alpha$ -아밀라제 저해물질 생성력이 높은 방선균 BY-445의 형태학적, 배양학적 제특성을 규명하고 균계의 구성 성분에 대한 화학적 분석을 통하여 분리주에 대한 동정 결과이다.

Corresponding author : Byung-Ho Bang

## 재료 및 방법

### 1. 사용배지 및 배양방법

균 분리는 방선균 분리용 배지를 사용하였으며, 배양은 방선균 분리용 배지를 사용하여 배양하였다. 보존배지로는 Bennett's agar 배지를 사용하였으며 선별분리주의 동정은 ISP, No 2, 3, 4, 5, 6, 7 배지, Bennett's agar 배지, Czapeck solution agar 배지를 사용하였다.

### 2. 분리주 BY-445의 형태학적 특성

분리균주의 형태는 그람염색하여 광학현미경(Jana, Leipzig, Germany)으로 관찰하였으며 정밀한 외형을 관찰은 2% phosphotungstic acid로 염색하여 금으로 코팅(gold coating)한 후 주사 전자현미경 SEM 515(Philips, Netherlands)로 포자의 사슬형태, 표면상태, 포자의 형성력을 관찰하였다. 포자형성력은 Bennett's agar 배지를 이용하여 30°C에서 14일간 배양한 후 원심분리하여 생리 식염수로 두 차례 세척한 뒤 fuchsin-methylene blue 법에 따라 조사하였다.

### 3. 분리주 BY-445의 배양학적 특성

선별된 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology와 Actinomycetes Taxonomy<sup>19,20)</sup> 방법에 따라 조사하였다. 분리주 BY-445를 ISP, No 2, 3, 4, 5, 7 배지, Bennett's agar 배지, Czapeck solution agar 배지<sup>19)</sup>에 접종한 후 30°C에서 배양하면서 7일, 14일, 21일 간격으로 기균사의 색깔, 배면 색깔, 배지 색깔, 생육 정도, 가용성 색소 생성 유무 및 멜라닌 색소 생성 유무를 관찰하였다.

### 4. 분리주 BY-445의 생리학적 특성

분리주 BY-445에 대한 멜라닌 생성과 당 이용성은 Shirling과 Gottlieb방법<sup>21~25)</sup>에 따라 carbon utilization 배지에 arabinose, rhamnose, fructose, sucrose, inositol, mannitol, cellulose 등을 첨가하여 이용성을 조사하였고, 젤라틴 액화력과 전분 분해력은 Gordon과 Mihm 방법<sup>26)</sup>으로 조사하였다.

### 5. 세포벽의 diaminopimelic acid(DAP) isomer의 분석

동결건조 균체 약 10mg과 6 N HCl 1ml을 시험관

에 넣고 밀봉한 후 100°C에서 18시간 가수분해하여 탈염산 농축하고 이 농축시료를 셀룰로오스 TLC 판을 이용하여 methanol : water : 6N HCl : pyridine(80 : 20 : 4 : 10) 용매로 전개시킨 다음 0.2% ninhydrin으로 발색시켰다.

### 6. 세포내 지방산 분석

균체 지방산 분석은 방선균 분리용 배지에 접종한 후 30°C에서 24시간 배양하여 대수증식기의 균체 40~50mg에서 지방산을 추출하여 microbial identification system (MIS, Hewlett-Packard 5890 A, USA)으로 gas liquid chromatograph(GLC)를 사용하여 분석하였다<sup>27, 28)</sup>.

## 결과 및 고찰

### 1. 형태 및 배양학적 특성

분리된 BY-445 균주를 2주일간 배양한 뒤 ISP, No 2, 3, 4, 5, 6, 7배지에 접종하여 배양하면서 콜로니의 성장, 생육 정도, 기균사의 색깔, 배면 색깔 등을 관찰한 결과 콜로니의 성상은 배지에 따라 차이를 보였다. 배양학적 특성을 조사한 결과 Isp. No. 2, 3, 4, 5, 7 한천 배지에서는 잘 생육하였으나 ISP, No 6에서는 생육이 왕성하지 못하였다(Table 1). 또한 기균사의 색깔은 대체적으로 갈색 또는 짙은 갈색을 나타냈으며 포자의 표면은 바늘모양(spiny)을 한 형태로 연갈색, 짙은 갈색 또는 황색을 띤 갈색계열로 나타났다. 포자의 크기는 0.7~0.8×1.1~1.2µm로 원통형이었다(Fig. 1).



Fig. 1. Scanning electron micrograph of the isolated Actinomycetes BY-445.

**Table 1. Cultural characteristics of BY-445**

Media	Growth	Aerial mass color	Spore mass color	Reverse color	Soluble pigment
ISP2	Good	Gray abundant	Yellowish brown	Dark brown	
ISP3	Good	Gray abundant	Yellowish white	Greenish gray	
ISP4	Good	Gray abundant	White	Brown	
ISP5	Good	Whitish gray moderate	Brown	Pinkish brown	
ISP6	Good	None	Yellowish brown	Yellowish brown	Negative
ISP7	Good	Gray moderate	Dark brown	Dark brown	Negative

Melanoid Pigment : Negative. The strain was cultured in various kinds of media at 30°C for 14days.

**Table 2. Physiological and biochemical characteristics of the selected strain BY-445**

Characteristics	BY-445
⊙ Growth on sole carbon source(1%, w/v)	
Glucose	+
Fructose	+
Cellulose	-
Inositol	+
Mannitol	+
Raffinose	-
Arabinose	±
Cellobiose	-
Galactose	+
Melibiose	+
Rhamnose	+
Sucrose	-
⊙ Enzyme activity	
Gelatin liquefaction	Positive
Skim milk hydrolysis	Positive
Starch hydrolysis	Positive
⊙ Isomer of diaminopimelic acid	
DAP	LL-DAP

+ : utilized, ± : doubtful, - : not utilized

## 2. 생리학적 특징

분리한 균주 BY-445의 생육온도는 Bennett 매지 (goucose 1%, yeast extract 0.1%, bacto-peptone 0.2%, beef extract 0.1%, agar 1.5%)를 사용하였을 때 20~40°C에서 생육하였으며 최적 생육온도는 24~30°C 범위였다. 젤라틴 액화는 양성을 나타냈고(Table 2), 탈지우유의 가수분해력, 전분의 가수분해력 등의 시험도 양성이었으며 탄소원으로는 glucose, fructose, inositol, mannitol, galactose, melibiose, rhamnose 등을 이용하였으나 cellulose, raffinose, cellobiose, sucrose는 이용하지 못하였다(Table 2).

## 3. 화학적 특성

분리된 균주 BY-445를 더 정확하게 동정하기 위해 화학적 분석법으로 특성을 조사하였다. 즉 균주의 전세포 가수분해 산물로부터 세포벽 성분을 분석한 결과 LL-diaminopimelic acid(LL-DAP)를 함유한 것으로 나타났다(Table 2).

## 4. 세포내의 지방산 조성의 특성

MIS를 이용한 지방산 분석에서는 Table 3과 같이 16:0 ISO(25.30%), 15:0 ANTEISO(16.19%), 16:0(13.16%)과 같은 지방산이 주축을 이루고 있다. 이 결과는 KIST 생명공학 연구소 유전자은행실에서 보관중인 library의 표준균주와 비교할 때 본 실험균주 50% 정도의 지방산 상동성(homology)을 보이는 *Streptomyces* 속으로 분류되었다.

분리된 균주 BY-445가 함유하는 fatty acid type는 Table 3과 같이 branched type(2C)이었다.

**Table 3. Contents of cellular fatty acid of isolated BY-445 strain**

Retention time(min)	Name	Percentage (%)
1.463	solvent peak	
4.336	11:0 Iso 3OH	2.42
6.078	14:0 Iso	5.09
7.470	15:0 Iso	7.31
7.601	15:0 Anteiso	16.19
8.741	16:1 Iso H	7.23
9.015	16:0 Iso	25.30
9.317	16:1 Cis 9	1.63
9.610	16:0	13.16
10.305	16:0 9 Methyl	1.49
10.480	17:1 Anteiso	3.91
10.661	17:0 Iso	3.44
10.817	17:0 Anteiso	9.42
11.091	17:0 Cyclo	3.41
12.574		
15.170		

## 요 약

$\alpha$ -아밀라제의 강력한 저해물질을 생성하는 분리주 BY-445를 토양으로부터 분리하여 이를 동정하였다. 이 균주의 기균사는 나선형이며, 포자의 표면은 침상형(spiny)이었다. 펠라닌 색소 및 용해성 색소는 음성이었으며, 단백질 및 전분 분해력은 강한 편이었다. 세포벽 성분중 diaminopimelic acid는 LL형이었고 세포의 지방산은 16:0 iso가 25.30%, 15:0 anteiso는 16.19% 그리고 16:0이 13.16%였으며 이 균주는 *Streptomyces violaceusniger*와 유사하였으나 몇몇 배양학적, 생리학적 특성이 달라 *Streptomyces* sp. BY-445로 명명하였다.

## 참고문헌

1. 青柳高明 : 生體制御における 酵素阻害物質の役割, 化学と生物, 18, 480~482(1980).
2. Murao, S. : Studies on enzymes and biologically active substances produced by microorganisms, *Nippon Negeikagaku Kaishi*, 55 503~513(1981).
3. Muller, L. : "Microbial glycosidase inhibitors" in Biotechnology vol. 4, p.531~567, Verlag Chemie, Weinheim, (1986).
4. Murao, S., K. Ohyama and S. Ogura : Isolation of amylase inhibitor producing microorganism, *Agric. Biol. Chem.*, 41, 919~924(1997).
5. Ohyama, K, and Murao, S. : Purification and some properties of amylase inhibitor, *Agric. Biol. Chem.*, 41, 2221~2228(1997).
6. Murao, S., Goto, A, Matsui, Y, Ohyama, K and Arai, M. : Isolation and identification of a hog pancreatic  $\alpha$ -amylase inhibitor(Haim) producing *Streptomyces*, *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2599~2604(1981).
7. Goto, A., Matsui, Y, Ohyama, K. and Arai, M. : Purification and characterization of an  $\alpha$ -amylase inhibitor(Haim), *Agric. Biol. Chem.* 47, 83~88(1983).
8. Koba, Y., Najima, M, and Ueda, S. : Further purification of amylase inhibitor produced by *Streptomyces* sp., *Agric. Biol. Chem.*, 40, 1167~1173(1976).
9. Nakano, H, Tajiri, T., Koba, Y. and Ueda, S. : Some properties of amylase inhibitor A produced by *Streptomyces* sp. No. 280, *Agric. Biol. Chem.*, 45, 4053~4060(1981).
10. Tahiri, T., Koba, Y. and Ueda, S. : Amylase inhibitor produced by *Streptomyces* sp. No. 280., *Agric. Biol. Chem.*, 47, 671~677(1983).
11. Namiki, S. : Studies on the amylase inhibitors from *Streptomyces calvus* TM- 521 and their physiological activities, *J. Jap. Soc. Strach Sci.*, 26, 134~144(1979).
12. Itoh, J. : New antibiotics with amylase inhibitory activity I. Production, isolation and characteristics, *J. Antibiot.*, 34, 1424~1428(1981).
13. Saito, N. :  $\alpha$ -amylase inhibitor from fungus *Cladosporium herbarum* F-828, *J. Biol. Chem.*, 257, 3120~3125(1982).
14. 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 trestatin A, B and C, *J. Antibiot.*, 36, 1157~1165(1983).
15. Yokose, K., Ogawa, K., Suzuka, Y., Umeda, I. and Suhara, Y. : New  $\alpha$ -amylase inhibitor, trestatins II. Structural determination of trestatins A, B and C, *J. Antibiot.*, 36, 1166~1175(1983).
16. Kim, J.M., Kim, J.W. Kim, H.W. Shim, M.J. Choi, E.C. and Kim, B.K. : Screening and classification of Actinomycetes producing  $\alpha$ -amylase inhibitors and the isolation, their kinetic studies of  $\alpha$ -amylase inhibitors, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 13, 223~232, (1985).
17. 방병호 : Amylase 저해물질 생산균의 분리 및 배양조건, *서울보건전문대학논문집*, 16, 1~8(1996).
18. 방병호, 이진영 : 방선균 BY-445가 생성하는  $\alpha$ -amylase 저해물질의 특성, *서울보건전문대학한국보건과학 연구논문집*, 4, 11~18(1997).
19. Waksman, S.A. : The Actinomycetes, p328, The Williams and Willkins Co., Baltimore, vol. 2 (1961).
20. Peter, H.A.S., Nicholas, S.M., Sharp, M.E. and Holt, J.G : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol II. Pp. 1104~1139. Williams and Willkins Co., Baltimore(1986).
21. Dietz, A. and Thayer, D.W. : "Actinomycetes taxonomy" SIM special publication NO. 6. Society for Industrial Microbiology(1980).
22. Shirling, E.B. and Gottlieb, D. : Cooperative descriptions of type cultures of *Streptomyces* II species descriptions from first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 18, 172~174(1968).
23. Shirling, E.B. and Gottlieb, D. : Cooperative descriptions of type cultures of *Streptomyces* III. species descriptions from first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 18, 150~152(1968).
24. Shirling, E.B. and Gottlieb, D. : Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* IV. species descriptions from the second, third and fourth studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 19, 391~512(1969).
25. Shirling, E.B. and Gottlieb, D. : Cooperative description of the type strains of *Streptomyces* V. additional descriptions. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 22,

- 265~394(1972).
26. Gerhardt, P., Murray, R.C.G., Costilow, R.N. . Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R. and Phillips, G.B.: Manual of Methods for General Bacteriology. ASM. Washington, p. 415~416(1981).
27. Goodfellow, M. and Minikin, D.E. : Chemical Method in Bacteria Systematics, 145-171. Academic Press, New York, p. 145~171(1985).
28. Millwe, L.T. and Berger, T. : Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acid, In Hewlett-Packard Application Note p. 228~248(1985).
- 

(1998년 10월 24일 접수)