

Bacillus subtilis Y3-7 배양액의 α -glucosidase 활성 억제 효과

명길선* · 허 건 · 윤석영 · 심재중 · 이정희 · 임광세 · 허철성

(주)한국야쿠르트 중앙연구소

Inhibitory Effect of *Bacillus subtilis* Y3-7 Culture Broth on α -Glucosidase Activity

Kil-Sun Myoung*, Gun Heo, Suck-Yong Yoon, Jae-Jung Shim, Jung-Hee Lee, Kwang-Sei Lim, and Chul-Sung Huh

R&D Center, Korea Yakult Co., Ltd.

Abstract Culture broth of *Bacillus subtilis* Y3-7 in tryptic soy broth (TSB) isolated from Korean traditional fermented food was evaluated for the inhibition of α -glucosidase. The results of *in vitro* studies using the yeast α -glucosidase demonstrated that the culture broth exerted inhibitory effects on α -glucosidase with IC_{50} value of 1.62 mg/mL, and functioned as a competitive inhibitor. Furthermore, the culture broth of *B. subtilis* Y3-7 significantly improved glucose tolerance in normal and streptozotocin-induced diabetic mice. The blood glucose levels in the mice receiving sucrose supplementation in the culture broth (1 g/kg, 2 g/kg) were measured at 48.7%, which corresponded to 22.2% of the levels measured in the control mice. These results indicated that the culture broth of *B. subtilis* Y3-7 in TSB might be considered as a useful compound for the preparation of functional foods for diabetic patients.

Key words: α -glucosidase, glucose tolerance, diabetes

서 론

당뇨병은 체내의 탄수화물을 적절하게 사용하지 못하여 일어나는 질병이다. 당뇨가 진행되면 혈액 내 포도당의 농도와 인슐린의 분비가 조절이 되지 않으며 간, 근육, 지방조직 등 체내 조직에 인슐린 저항성이 일어나게 된다(1). 현재 세계적으로 1.7억 명의 사람들이 제 2형 당뇨병으로 진단되고 있으며 2030년에는 3.6억 명의 당뇨 환자가 발생할 것으로 추산된다(2).

α -Glucosidase는 탄수화물을 분해하는 가장 첫 단계의 효소로 탄수화물 분해 속도의 조절효소이며 glycoprotein과 glycolipids를 생합성하는 데 있어도 중요한 역할을 한다(3). 이에 따라 α -glucosidase 저해제는 소장점막에서 이당류와 과당류의 분해속도를 늦추어서 탄수화물의 흡수를 저해하고 식후 혈당상승을 억제하는 효과가 있으며(4,5), 당뇨, 비만과 과지방단백질혈증(hyperlipoproteinemia) 등과 같은 탄수화물의 이용과 관련된 질병에 영향을 미칠 수 있다(6). α -Glucosidase 저해제는 주로 식물 또는 식품에서 유래되어 개발되었는데 대표적인 예로 *Actinoplanes* spp.의 발효산물에서 분리한 acarbose를 들 수 있다(7). 이 외에도 뿌잎에 포함되어 있는 단당류 1-deoxy-nojirimycin(8)과 콩의 대표적인 isoflavone인 genistein(9)이 식물에서 유래된 α -glucosidase 저해물질이며, 중국의 전통식품으로 대두에 *Aspergillus oryzae*를 접종시켜 발효시킨 douchi(10)와 중국의 비지(okara) 발효물에서 분리한

B. subtilis B2(11) 등의 미생물에서 유래된 α -glucosidase 저해물질 탐색도 계속 이어지고 있다.

본 연구에서는, 한국의 전통식품에서 분리된 *B. subtilis* Y3-7의 α -glucosidase 활성 억제효과를 탐색하였다. 효소반응 실험과 동물실험을 거쳐 균주 배양액의 효능을 확인하였으며 이를 이용하여 당뇨치료제 혹은 건강기능식품으로의 활용 가능성을 알아보 고자 하였다.

재료 및 방법

균주의 배양 및 배양액 수거

B. subtilis Y3-7은 TSB 배지(Difco, Detroit, MI, USA)를 이용하여 30°C에서 200 rpm의 속도로 진탕배양 하였다. 배양 완료 후, 원심분리(480×g, 15분)하여 균체와 배양액을 분리하였다.

α -Glucosidase 억제 활성 측정

α -Glucosidase 억제활성은 Watanabe 등(12)의 방법에 따라 측정 하였다. *B. subtilis* Y3-7의 균체는 20 mM sodium phosphate 완충 용액(pH 7.0)을 사용하여 2회 세척을 한 후, lysozyme(Sigma, St. Louis, MO, USA)이 최종 농도가 1 mg/mL이 되도록 첨가하여 상온에서 16시간 반응시켜 용해하였다. 이를 90°C에서 5분간 열처리하여 균체 내 효소의 활성을 억제시킨 후, α -glucosidase 활성 억제효과를 측정하였다. 균주 배양액은 pH를 7.0으로 조정 한 후 억제활성 측정에 사용하였다. 효소용액은 phosphate buffered saline (PBS)에 yeast α -glucosidase(Sigma)를 150 mU/mL로 용해시켜 만 들었다. 기질용액은 *p*-nitrophenyl- α -glucopyranoside(Sigma)를 PBS에 5 mM 농도로 용해하여 만들었다. 효소반응은 sodium phosphate 완충용액 40 μ L와 샘플용액 20 μ L, 효소용액 20 μ L, 기질용액 50 μ L를 넣어 준비하였다. 37°C에서 30분간 반응시키고 1 M

*Corresponding author: Kil-Sun Myoung, R&D Center, Korea Yakult Co., Ltd., Yongin, Gyeonggi-do 446-901, Korea
Tel: 82-31-8997845
Fax: 82-31-8997710
E-mail: duqr180@re.yakult.co.kr
Received July 9, 2008; revised August 27, 2008;
accepted September 4, 2008

Table 1. Inhibitory effects of *B. subtilis* Y3-7 on α-glucosidase

	Culture broth		Cell lysates	
	OD	Inhibitory activity (%) ¹⁾	OD	Inhibitory activity (%)
<i>B. subtilis</i> Y3-7	0.624±0.010 ²⁾	80.01±0.30	2.866±0.115	8.26±3.69
Control	3.124±0.025	-	-	-

¹⁾Percentage of inhibition was calculated as: inhibitory activity (%)=(OD_{control}-OD_{sample})/OD_{control}×100.

²⁾Values are mean±SD of three independent experiments in triplicates.

glycine(Sigma)용액을 100 μL 넣어 반응을 정지시켰다. 405 nm에서 흡광도를 측정하고 샘플용액과 동량의 완충용액을 넣은 대조군을 기준으로 효소 저해 활성을 계산하였다. 효소저해 활성은 대조군의 흡광도에서 샘플의 흡광도를 제하고 이것은 대조군의 흡광도로 나눈 값의 백분율로 계산하였다.

IC₅₀ 측정 및 효소학적 분석

IC₅₀은 TSB 배지에 30시간 동안 배양한 균주 배양액을 이용하여 측정하였다. 원심분리하여 균체를 제거한 *B. subtilis* Y3-7 배양액을 동결건조하여 건조중량을 측정하였으며 TSB 배지를 대조군으로 효소반응 정도를 비교하였다. 효소학적 분석을 위하여 3, 4, 5, 6 mM 농도의 기질과 *B. subtilis* Y3-7 배양액 동결건조물을 5, 10, 20 mg/mL의 농도로 준비하였다. 각각의 기질과 샘플용액의 조합에 따라 총 12개의 조건으로 3반복하여 α-glucosidase 억제활성을 측정하였다.

실험동물 및 식이

5주령의 ICR 수컷 생쥐(mice)를 환경에 적응시키기 위해 1주간 고형사료로 예비 사육하였다. 실험동물을 무작위로 정상군과 당뇨유발군으로 나누고 이를 각각 대조군과 실험군으로 나누었다. 당뇨 유발은 공복상태인 실험동물에 0.1M citrate 완충용액(pH 4.5)에 용해시킨 streptozotocin(STZ, 60 mg/kg of body weight, Sigma)을 1회 복강주사 하였으며 STZ 주사 1주일 후 당부하 실험을 진행하였다.

혈당강하효과측정

B. subtilis Y3-7 균주를 TSB 배지에 30시간 배양하고 배양액을 분리해 동결건조하여 준비하였다. 실험동물은 6시간 절식시킨 후 공복혈당을 측정하였다. 실험군은 배양액 동결건조물을 PBS에 희석하여 1g/kg, 2g/kg의 수준으로 경구투여 하였으며 대조군은 PBS를 동량 경구투여하였다. 시료 투여 직후 2g/kg sucrose를 경구투여하고 30분 간격으로 2시간 동안 꼬리 정맥에서 채혈하여 혈당측정기기(Accutrend active, Roche, Basel, Switzerland)로 혈당을 측정하였다.

결과 분석

모든 결과는 평균값±표준편차로 표현하였다. 실험군 간의 결과 차이는 Turkey's test를 이용하여 분석하였으며 p<0.05 이하만 유의차가 있는 것으로 표현하였다.

결과 및 고찰

***B. subtilis* Y3-7의 α-glucosidase 억제 활성**

B. subtilis Y3-7을 TBS배지에 24시간 배양하여 균체와 배양액을 분리하고 yeast α-glucosidase 억제 활성을 측정하였다(Table 1). 그 결과 *B. subtilis* Y3-7균주의 배양액은 α-glucosidase의 활성을

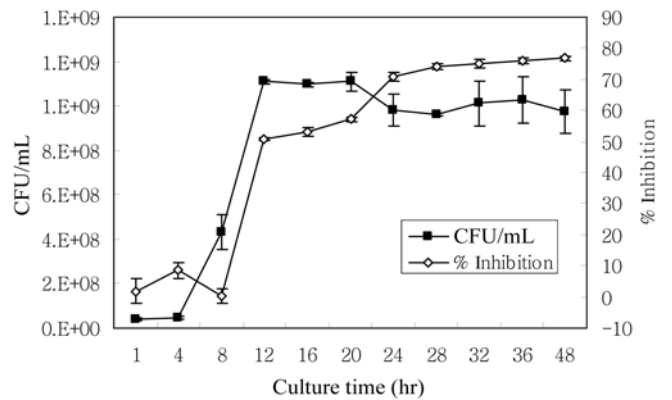


Fig. 1. Inhibitory activity of *B. subtilis* Y3-7 culture broth on α-glucosidase and the growth curve of *B. subtilis* Y3-7. Each value is expressed as mean±SD in triplicate experiments.

Table 2. Composition of experimental groups

Group	N	STZ	Sucrose	Sample
NC	8	-	2 g/kg	-
N-CB1	8	-	2 g/kg	Culture broth 1 g/kg
N-CB2	8	-	2 g/kg	Culture broth 2 g/kg
STZ	8	60 mg/kg	2 g/kg	-
STZ-CB1	8	60 mg/kg	2 g/kg	Culture broth 1 g/kg
STZ-CB2	8	60 mg/kg	2 g/kg	Culture broth 2 g/kg

80.01%까지 억제하였으나 균체 용해액에서는 효소활성 저해가 나타나지 않았다.

또한 *B. subtilis* Y3-7균주의 성장과 α-glucosidase 활성억제효과와의 상관관계를 알아보기 위해 배양시간에 따른 억제효능 변화를 살펴보았다. *B. subtilis* Y3-7균주를 TSB 배지에 접종한 후, 30°C에서 진탕배양하면서 시간에 따라 배양액을 얻어 yeast α-glucosidase 억제 활성을 관찰하였다(Fig. 1). 그 결과 배양 시작 10시간 이후부터 효소활성억제 효과가 나타나며 배양 30시간 이후에 최대억제 활성을 보인 후, 이후에는 활성이 더 이상 증가하지 않았다. 이것은 균주의 성장곡선과 비슷한 양상을 보여 균주의 성장과 배양액의 α-glucosidase 억제 활성이 연관되어있음을 시사하였다.

***B. subtilis* Y3-7 균주 배양액의 효소학적 특징 평가**

B. subtilis Y3-7 균주 배양액의 yeast α-glucosidase활성 저해 효과에 대한 IC₅₀을 측정하기 위해 최대 억제활성을 보인 30시간 배양액의 동결건조물을 이용하였다. 그 결과 *B. subtilis* Y3-7 균주 배양액 1.62 mg/mL이 yeast α-glucosidase의 활성을 50% 저해함을 보였다(Fig. 2A). 배양액의 IC₅₀이 다른 물질에 비해 다소 높은 편이나(acarbose: 1 mg/mL, 15) 실험 시 배양액 전체를 이용한

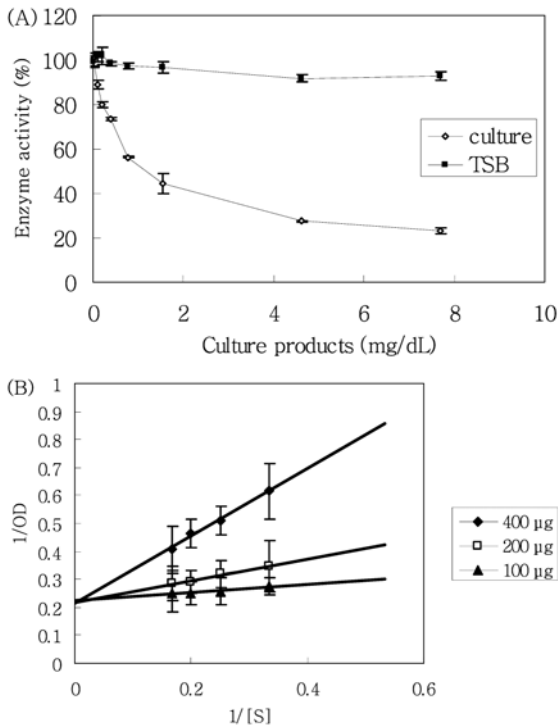


Fig. 2. Inhibition of α -glucosidase by *B. subtilis* Y3-7 culture broth. (A) IC_{50} value of inhibitory activity of *B. subtilis* Y3-7 culture broth on α -glucosidase. IC_{50} value is the concentration of sample required for 50% inhibition. Each value is expressed as mean \pm SD in triplicate experiments. (B) Inhibition kinetics of α -glucosidase inhibitory effects of *B. subtilis* Y3-7 culture broth.

것이므로 향후 *B. subtilis* Y3-7 배양액으로부터 활성물질을 분리하면 더 낮은 IC_{50} 값을 기대할 수 있을 것으로 보인다.

B. subtilis Y3-7 배양액이 α -glucosidase 활성을 저해하는 기작을 파악하기 위하여 기질과 배양액의 동결건조물을 다양한 농도로 만들고 이를 이용하여 효소반응을 수행하였다. 각각의 조합에 의한 α -glucosidase 활성 억제 정도를 측정하고 그 값을 Lineweaver-Burke plot 방식으로 표현하였다. X축은 기질 농도의 역수를 대입하였고 y축은 반응결과인 OD값의 역수를 대입한 결과 배양액의 농도가 전해질에 따라 y절편의 변화 없이 기울기가 커지는 것으로 보아 배양액의 억제활성은 기질과 경쟁적으로 일어남을 알 수 있었다(Fig. 2B). 일반적으로 경쟁적 억제효과를 가지는 물질들은 기질과 유사한 구조를 가지고 있으며 효소의 활성자리에 결합을 하여 기질과 효소의 반응을 억제한다. 이 또한 향후 *B. subtilis* Y3-7의 배양액에서 억제효능을 가지는 물질을 분리하면 α -glucosidase와의 구조적 반응을 밝힐 수 있을 것이다.

실험동물에서의 혈당강화효과

먼저 정상상태인 ICR mice를 이용하여 당부하 실험을 진행하였다. 실험군(N-CB1, N-CB2)에 각각 1g/kg, 2g/kg 수준의 *B. subtilis* Y3-7 배양액 건조물을 PBS에 희석하여 경구투여하고 대조군(NC)은 동량의 PBS를 경구투여하였다. 시료 투여 후 즉시 2g/kg의 sucrose를 투여하고 혈당의 변화를 측정하였다. 그 결과 대조군은 sucrose 투여 30분 후에 혈당이 91.1 mg/dL에서 197.9 mg/dL로 증가한 데 반하여 실험군은 혈당변화가 58.1%(92.1 mg/dL에서 154.2 mg/dL), 46.8%(96.7 mg/dL에서 146.7 mg/dL)수준으로 낮아졌다(Fig. 3A). STZ로 당뇨를 유발시킨 실험동물에서도

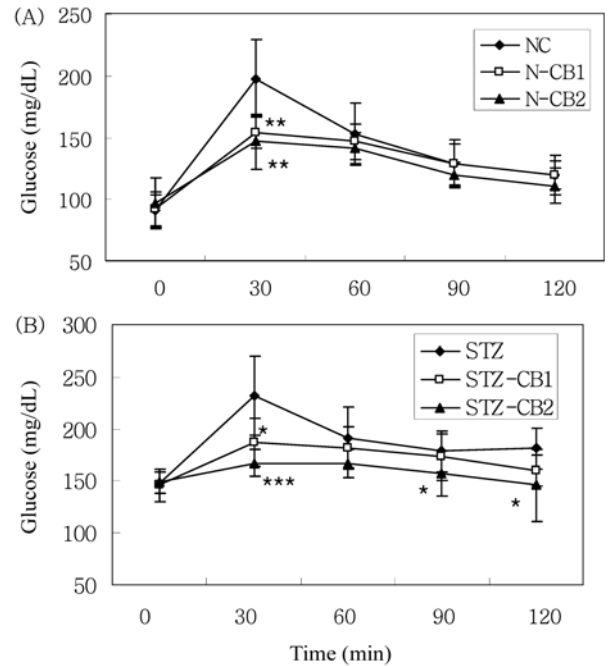


Fig. 3. The blood glucose levels following the sucrose challenge in ICR mice. (A) The blood glucose levels in normal mice. (B) The blood glucose levels in STZ-induced diabetic mice. Values are mean \pm SD (N=8 per group). *Compared with control group (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, t -test unpaired comparison).

이와 같은 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 3B). 당뇨 유발로 인해 공복혈당이 높아진 상태에서 실험군은 배양액의 투여로 인해 혈당의 변화가 대조군(147.9 mg/dL에서 232.0 mg/dL)의 48.7%(146.2 mg/dL에서 187.2 mg/dL), 22.2%(148.7 mg/dL에서 167.4 mg/dL) 수준으로 낮아졌다.

이러한 결과는 *B. subtilis* Y3-7의 배양액이 실험동물의 장내 당 흡수를 저해하여 혈당 변화가 줄어든 것을 의미한다. 식후 혈당의 급격한 증가는 인슐린의 민감도와 분비량을 감소시키며 이러한 증세가 반복되면 당뇨병의 상태를 악화시킨다. 따라서 당뇨의 예방과 치료에 있어서 내당능 장애개선은 매우 중요한 의의를 가진다. *B. subtilis* Y3-7 균주는 한국의 전통식품에서 분리한 것으로 대량배양이 가능하며 효능이 안정적이다. 이러한 *B. subtilis* Y3-7의 배양액 자체나 혹은 배양액 내의 α -glucosidase 활성억제 물질을 분리하고 대량생산한다면 건강기능식품 등 산업적 이용이 가능할 것이다.

요 약

본 연구에서는 전통 발효 식품에서 분리한 *B. subtilis* Y3-7 균주의 배양액이 α -glucosidase의 활성에 미치는 영향을 살펴보았다. *B. subtilis* Y3-7 균주를 TSB 배지에 30시간 이상 배양한 배양액은 1.62 mg/mL의 농도로 yeast α -glucosidase의 활성을 50%까지 저해할 수 있었다. 또한 효소학적 분석을 통해 이것이 배양액 내 물질이 효소의 기질과 경쟁적으로 작용하여 억제효과가 나타남을 확인하였다. *B. subtilis* Y3-7 균주의 배양액은 yeast 뿐만 아니라 실험동물의 장내 α -glucosidase의 활성에도 영향을 미쳐 당부하에 따른 급격한 혈당상승을 억제할 수 있었다. 이와 같은 결과로 보아 대량배양이 가능한 *B. subtilis* Y3-7을 통해 탄수화

물 흡수에 중요한 역할을 하는 α -glucosidase 활성억제 물질을 얻음으로써 항당뇨 물질의 안정적인 생산이 기대되는 바이다.

문 헌

- DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev.* 5: 177-269 (1997)
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27: 1047-1053 (2004)
- Bertozzi CR, Kiessling LL. Chemical glycobiology. *Science* 23: 2357-2364 (2001)
- Bell DS. Type 2 diabetes mellitus: What is the optimal treatment regimen? *Am. J. Med.* 116: 23S-29S (2004)
- Lebovitz HE. Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrin. Metab. Clin.* 26: 539-551 (1997)
- de Melo EB, da Silveira Gomes A, Carvalho I. α - and β -glucosidase inhibitors: Chemical structure and biological activity. *Tetrahedron* 62: 10277-10302 (2006)
- Schmidt DD, Frommer W, Junge B, Muller L, Wingender W, Truscheit E, Schafer D. Alpha-glucosidase inhibitors. New complex oligosaccharides of microbial origin. *Naturwissenschaften* 64: 535-536 (1977)
- Asano N, Tomioka E, Kizu H, Matsui K. Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis*. *Carbohydr. Res.* 253: 235-245 (1994)
- Lee DS, Lee SH. Genistein, a soy isoflavone, is a potent alpha-glucosidase inhibitor. *FEBS Lett.* 501: 84-86 (2001)
- Chen J, Cheng YQ, Yamaki K, Li LT. Anti- α -glucosidase activity of Chinese traditionally fermented soybean (*douchi*). *Food Chem.* 103: 1091-1096 (2007)
- Zhu YP, Yin LJ, Cheng YQ, Yamaki K, Yutaka M, Su YC, Li LT. Effect of sources of carbon and nitrogen on production of α -glucosidase inhibitor by a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* B2. *Food Chem.* 109: 737-742 (2008)
- Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H, Niki R. Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from tochi-cha (*Eucommia ulmoides*). *Biosci. Biotech. Biochem.* 61: 177-178 (1997)
- Kasai N, Murata A, Inui H, Sakamoto T, Kahn RI. Enzymatic high digestion of soybean milk residue (okara). *J. Agr. Food Chem.* 52: 5709-5716 (2004)
- Ma CY, Liu WS, Kwok KC, Kwok F. Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara). *Food Res. Int.* 29: 799-805 (1997)
- Schafer A, Hogger P. Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol) effectively inhibit alpha-glucosidase. *Diabetes Res. Clin. Pr.* 77: 41-46 (2007)