

## 효모 *Pichia burtonii* Y257-7에 의한 $\alpha$ -Glucosidase 저해제의 생산 및 식후 혈당 상승 억제 효과

김영헌, 신자원, 이종수\*

배재대학교 바이오·의생명공학과

Received: May 29, 2014 / Revised: July 10, 2014 / Accepted: July 13, 2014

### Production and Anti-hyperglycemic Effects of $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor from Yeast, *Pichia burtonii* Y257-7

Young-Hun Kim, Ja-Won Shin, and Jong-Soo Lee\*

Department of Biomedical Science and Biotechnology, Paichai University, Daejeon 302-735, Republic of Korea

In order to develop a new anti-diabetic  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, we compared the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of the cell-free extracts of 48 strains of yeasts isolated from Korean fermented foods, and found that *Pichia burtonii* Y257-7 exhibited the highest  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of 55.6%. The  $\alpha$ -glucosidase inhibitor was maximally produced when *Pichia burtonii* Y257-7 was cultured in LB broth (initial pH of 6.0) at 28°C for 24 h. The  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, partially purified by Sephadex G-50 gel permeation chromatography and systematic solvents extraction, revealed potent hypoglycemic effects in normal rats and streptozotocin-induced diabetic rats after the oral administration of starch.

**Keywords:** Anti-hyperglycemic,  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, *Pichia burtonii* Y257-7

## 서 론

최근 우리나라 사람들의 식습관 서구화에 의한 과잉영양 섭취로 비만과 당뇨병이 증가하여 사회 문제가 되고 있다[24]. 당뇨병은 일반적으로 췌장에서 분비되는 인슐린의 분비 이상이나 유전적 이상으로 혈액이 고혈당 증세를 나타내는 대사성 만성질환의 일종이다. 당뇨병은 크게 1형 당뇨와 2형 당뇨로 구분하는데 1형 당뇨의 경우 인슐린 의존성으로 인슐린 주사를 이용한 혈당조절이 필수적이며, 2형 당뇨의 경우는 인슐린 비의존성 당뇨로 당뇨병 전체의 80-90%를 차지하고 있으며, 혈당 조절을 위해 경구용 혈당강하제를 사용하며 인슐린 주사를 병행하기도 한다[25].

현재 당뇨병 치료제 중 경구용 혈당강하제로도 사용되고 있는  $\alpha$ -glucosidase 저해제는 소장 점막의 용모에 있는 maltase와 sucrase 등 이당류 소화 효소류를 동시에 저해하며, 따라서 전분으로부터 포도당 분해가 저지되고 소장 용모

에서 포도당의 흡수를 지연시켜 혈당상승을 억제시켜주는 효과를 나타내게 된다[19, 22].

현재 시판 항당뇨성  $\alpha$ -glucosidase 저해제로 acarbose [20], voglibose [16], 1-deoxynojirimycin [2] 등이 사용되고 있지만 이들은 복부팽만, 구토, 설사 등의 위장 장애를 나타낼 뿐만 아니라 미분해된 이당류가 대장에서 박테리아에 의해 분해되어 가스, 설사, 변비 등과 같은 부작용을 야기시킬 수 있다[23]. 또한  $\alpha$ -glucosidase를 완전히 저해시킬 경우 당의 흡수율이 현저히 떨어져 저혈당 증상이 발생하므로 치료제로 사용하는데 문제점이 있다[4, 14]. 따라서 이러한 부작용을 줄이고 식후 혈당 상승 억제 효과를 낼 수 있는 새로운  $\alpha$ -glucosidase 저해제 개발은 매우 필요하다.

효모는 *Cryptococcus* sp. 등 몇몇 균주 이외에 대부분이 비병원성 GRAS 진균류로 오래전부터 주류등 발효 식품생산에 매우 유용하게 이용되어 오고 있고[11] biomass와 분자생물학적 연구의 재료(숙주)등으로 많이 이용되고 있다. 또한, 일부 효모는 비타민등 다양한 영양 성분들을 함유하여 식·사료의 영양보충제로 쓰이고 있고, 최근 항고혈압활성, 항암성, 항균성 등의 다양한 생리기능성이 보고되어 있다[9, 11]. 그러나 배양이 비교적 용이한 효모로부터 항당뇨 효과

### \*Corresponding author

Tel: +82-42-520-5388, Fax: +82-70-4362-6305

E-mail: biotech8@pcu.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

를 가진  $\alpha$ -glucosidase 저해제의 연구는 현재까지 많이 이루어지지 않고 있다[12].

따라서 본 연구에서는 효모로부터 새로운 항당뇨 소재를 개발할 목적으로 전통 발효 식품에서 분리한 효모들 중  $\alpha$ -glucosidase 저해물질을 생산하는 우수 효모 균주를 선발하고  $\alpha$ -glucosidase 저해제 생산 최적조건을 검토하였다. 또한 선발균주가 생산하는  $\alpha$ -glucosidase 저해물질을 부분정제한 후 일반 쥐와 당뇨유발 쥐를 이용한 항당뇨 효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

48종의 효모는 한국식품연구원에서부터 전통 발효식품에서 분리, 동정한 효모들을 분양받아 사용하였다.

$\alpha$ -glucosidase와 p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (p-NPG)는 미국의 Sigma-Aldrich Chemical 제품을 사용하였고 Sepadex G-50은 Pharmacia Fine Chemicals (Sweden) 제품을 사용하였으며, 그 밖의 시약은 분석용 특급을 시중에서 구입하여 사용하였다.

### 효모 배양 상등액 및 무세포 추출물 제조

48종의 효모들을 LB 배지에 접종하여 28°C에서 12시간 배양한 후 원심분리 (20 min, 12,000 rpm, 4°C)하여 상등액을 얻고, 이를 동결건조시켜 배양 상등액 시료로 하였다. 또한 배양액을 원심분리(20 min, 12,000 rpm, 4°C) 하고 침전된 cell pellets를 회수하여 Tris-HCl buffer로 세척한 후 bead를 이용하여 세포를 파쇄하고 원심분리한 후 동결건조시켜 무세포 추출물 시료를 제조하였으며  $\alpha$ -glucosidase 저해활성 측정에 사용하였다.

### $\alpha$ -Glucosidase 저해활성 측정

$\alpha$ -glucosidase 저해활성은 0.1 M 인산완충용액(pH 6.8)에 0.2 U/ml로 희석한 표준  $\alpha$ -glucosidase 효소액 50  $\mu$ l와 시료 50  $\mu$ l를 96-well plate에 넣고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 0.1 M 인산완충용액(pH 6.8)을 이용하여 5 mM로 희석한 기질 p-NPG 용액 50  $\mu$ l를 첨가한 후 37°C에서 25분간 반응시켰다. 반응 후 0.1 M sodium carbonate를 100  $\mu$ l 넣어 반응을 정지시킨 다음 ELISA 측정기로 405 nm에서 p-nitrophenol 함량을 측정하였고 이를 대조구와 비교하여 다음과 같이 저해활성을 계산하였다[10].

$$\alpha\text{-Glucosidase 저해 활성 (\%)} = (C - T)/C \times 100$$

C: 대조구의 p-nitrophenol 함량, T: 시료첨가후 생성된 p-nitrophenol 함량.

### $\alpha$ -Glucosidase 저해물질 생산 조건

최종 선발 균주를 이용한  $\alpha$ -glucosidase 저해물질 최적 생산 조건으로 먼저 선발균주를 LB 배지에 접종하여 25°C에서 72시간까지 일정시간 간격으로 배양한 후 위와 같이 각각의 무세포 추출물을 얻어서 이들의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 측정하여 최적 배양시간을 검토하였다.

또한 LB 배지와 YPD 배지, PDB, TSB, YM, MRS 배지 등에 선발 균주를 접종하고 25°C에서 24시간 배양하여 위와 같이 최적배지를 검토하였고, 초기 pH를 4.0-10.0까지 각각 조정된 최적배지에 위와 같이 선발 균주를 배양하여 배지의 초기 pH의 영향을 검토하였다.

### Rat Sugar Loading Test

**실험동물 준비:** 실험동물은 생후 6주령(180-200 g)된 수컷 SD-rat과 조단백질 20.5%, 조지방 3.5%, 조섬유 8.0%, 회분 8.0%, 칼슘 0.5%와 인산 0.5%의 조성을 가진 마우스 렛 전용사료를 (주)대한바이오링크에서 구입하여, 온도 22  $\pm$  1°C, 습도 55  $\pm$  7%, 낮밤주기 12시간으로 유지되는 동물 사육실에서 일주일간 매일 18-20 g씩 물과 함께 섭취시키며 적응시켰다[6].

실험동물을 무작위로 정상군과 당뇨 유발군으로 나누고 다시 이를 각각 대조군과 실험군으로 나누었다. 당뇨 유발은 공복상태인 SD-rat에 0.1 M citrate buffer (pH 4.5)에 용해시킨 당뇨 유발 물질 streptozotocin (STZ, 60 mg/kg, Sigma)를 1회 복강주사 하여 3일 후 혈당측정기(동방 휴먼텍, Accu-Chek Active)로 측정된 후 혈당치가 300 mg/dl 이상인 SD-rat만을 선발하여 당뇨 SD-rat로 실험에 사용하였다[1, 7, 15].

본 연구는 실험동물의 사육에 대한 배재대학교 동물실험윤리위원회의 가이드라인(등록번호: 2013-001)을 토대로 진행하였다.

**$\alpha$ -Glucosidase 저해물질의 부분정제:** 선발 균주를  $\alpha$ -glucosidase 저해물질 최적 생산조건으로 배양한 후 위와 같이 무세포 추출물을 제조한 다음 동결건조하고 멸균수로 다시 용해시키고 0.45  $\mu$ m와 0.25  $\mu$ m filter로 여과하였다. 이 여과액을 Sephadex G-50 chromatography로 활성 분획을 얻은 다음 hexane과 활성분획을 1:1로 혼합하여 1시간 진탕시킨 후, 물층과 hexane 층을 각각 분리하여 이들을 동결건조시켜 위와 같이  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 측정하였다. 활성 층을 다시 chloroform과 ethyl acetate 용매들을 이용하여 순차적으로 같은 방법으로 각각 1시간씩 연속 용매 추출하여 활성분획을 얻고 이를 butanol로 마지막으로 추출하여 활성 분획을 얻어 동결 건조시켜 최종 부분정제물로 하였고 이를 동물실험용 시료로 사용하였다.

**혈당 상승 억제 효과 측정:** 탄수화물 식이 후 혈당 조절에 미치는 효모추출물의 영향을 조사하기 위해 일반 SD-rat

와 당뇨 유발쥐에 대하여 전분과 효모 추출물을 각각 1회 투여 후 단기 혈당 변화를 조사하였다. 정상군은 일반 SD-rat을 가지고 대조군에는 멸균수를 투여하고 실험군은 부분정제물을 동결 건조한 시료를 500 mg/kg, 1000 mg/kg의 농도로 경구 투여하였으며 시판 혈당강하제인 acarbose(글루코바이 정 50 mg, 바이엘코리아)는 15 mg/kg를 경구 투여하고 starch를 3 g/kg로 투여한 후 시간별로 혈당을 측정하였고, 당뇨유발군도 같은 방법으로 실험하였다. 혈중 포도당의 변화는 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하고 혈당측정기(동방 휴먼텍, Accu-Chek Active)로 측정하였다.

**통계처리**

동물실험에서 statistical analysis system에 의한 Duncan의 다범위 검정 시험법(multiple range test)을 이용하여  $p < 0.05$ 에서 각각의 시료간의 유의적 차이를 검증하였다.

**결과 및 고찰**

**α-Glucosidase 저해물질 생산 균주의 선발**

한국 전통 발효식품에서 분리한 48종의 효모들을 28°C에서 12시간 배양하여 위와 같이 제조한 배양 상등액과 무세포 추출물들을 동결 건조한 후 다시 1 ml의 0.1 M 인산 완충용액(pH 6.8)에 용해시켜 α-glucosidase 저해활성을 측정

**Table 1. α-Glucosidase inhibitory activities of cell-free extracts from the 1st screened yeasts.**

Yeasts <sup>a</sup>	α-glucosidase inhibitory activity (%) <sup>b</sup>
<i>Pichia caribbica</i> Y101-4	41.1 ± 0.8
<i>Pichia anomala</i> Y103-4	45.5 ± 0.7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y111-5	21.0 ± 0.4
<i>Pichia caribbica isolate</i> Y162-8	17.6 ± 0.6
<i>Pichia anomala</i> Y169-6	34.3 ± 0.7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y172-8	45.2 ± 0.5
<i>Pichia burtonii</i> Y197-9	43.2 ± 0.4
<i>Pichia burtonii</i> Y257-7	55.6 ± 0.6 (IC <sub>50</sub> 1.82 mg/ml)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y64-3	43.1 ± 0.6
<i>Pichia burtonii</i> Y86-5	44.7 ± 0.8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y89-1-3	13.6 ± 0.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y91-5	27.7 ± 0.7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y98-5	43.5 ± 0.5

<sup>a</sup>Yeast were cultured at 28°C for 12 h and then centrifuged to obtain supernatant and cell-free extracts.

<sup>b</sup>All of supernatants were not showed α-glucosidase inhibitory activity.

하였다(Table 1).

48종의 효모중 13종만이 10% 이상의 α-glucosidase 저해활성을 보였고 특히 청주누룩에서 분리한 *Pichia burtonii* Y257-7의 무세포 추출물의 α-glucosidase 저해활성이 55.6%로 가장 높아 우수균주로 최종 선발하였다. 또한, 모든 효모들의 배양 상등액은 α-glucosidase 저해활성이 없었다.

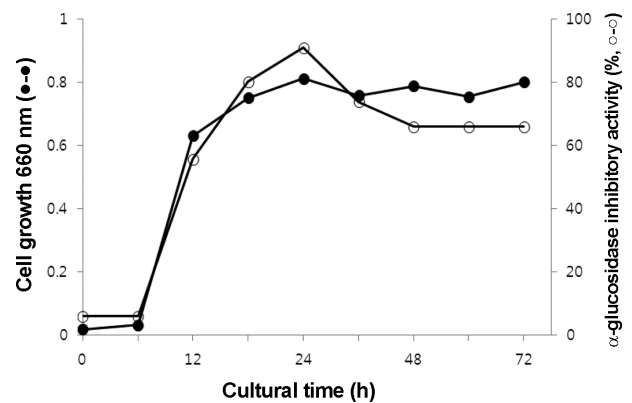
이 결과는 Kang 등[10]의 *Aspergillus oryzae* N157-1 배양 상등액의 48.3%와 Lee 등[13]의 한약재인 토우슬의 물 추출물(9.2%)과 에탄올 추출물(10.9%) 및 이들의 에틸 아세테이트와 hexan 추출물(12.8%)들의 저해활성보다 높은 저해활성이었다. 한편, Chin 등[5]은 뽕나무에서 분리한 steppogenin과 oxyresveratrol이 효모 α-glucosidase를 각각 농도 의존적으로 경쟁적, 비경쟁적으로 저해하였다고 보고한 바 있다.

최종 선발 균주인 *Pichia burtonii*에 관한 주요 연구로는 *Pichia burtonii*로부터 α-amylase와 lipase[21]생산에 관한 연구들이 있고 Guo 등[8]은 *Pichia burtonii*가 소아 설사 치료로 사용되는 전통의약인 *Qiweibaizhusan*과 장내에서 상호작용함을 보고한 바 있다. 그러나 *Pichia burtonii*의 항당뇨 효과에 관한 연구보고는 본 연구가 처음으로 선발균주와 이 균이 생산하는 α-glucosidase 저해물질을 앞으로 대체의 약이나 건강 소재로 산업적으로 유용하게 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

**α-Glucosidase 저해물질 최적생산 조건**

선발 균주를 LB 배지(pH 6.0)에 접종하여 배양시간에 따른 생육과 α-glucosidase 저해활성을 측정한 결과 Fig. 1과 같이 균 생육이 정지기에 도달한 배양 24시간에 90.9%의 가장 높은 α-glucosidase 저해활성을 보였다.

또한, LB, YPD, PDB, TSB, YM, MRS 등의 배지를 이용하여 α-glucosidase 저해물질 생산에 미치는 배지의 영향을 검토한 결과는 Table 2와 같다. 선발 균주인 *Pichia burtonii*



**Fig. 1. Effect of cultural time on the cell growth and α-glucosidase inhibitory activity of *Pichia burtonii* Y257-7.**

**Table 2. Effect of media on the  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of cell-free extracts from *Pichia burtonii* Y257-7.**

Media	$\alpha$ -glucosidase inhibitory activity (%) <sup>b</sup>
MRS <sup>a</sup>	38.5
PDB	32.3
LB	90.9 (IC <sub>50</sub> 1.92 mg/ml)
TSB	49.2
YM	47.4
YPD	79.5 (IC <sub>50</sub> 3.9 mg/ml)

<sup>a</sup>MRS: De Man, Rogosa and Sharpe, PDB: potato dextrose broth, LB: Luria-bertani, TSB: trptic soy broth, YM: yeast extract-malt extract, YPD: yeast extract-peptone-dextrose.

<sup>b</sup>After cultured in various media at 28°C for 24 h prepared cell-free extract.

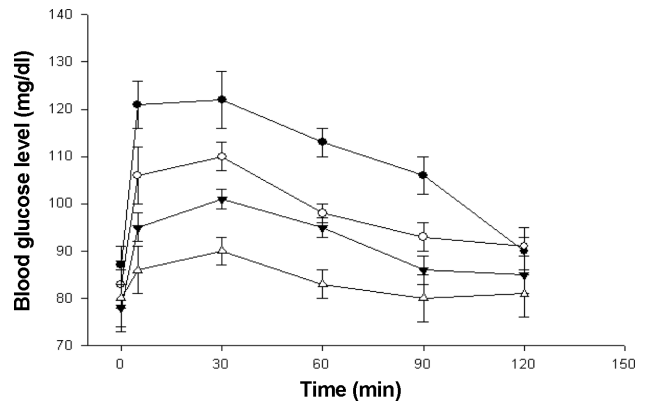
Y257-7를 LB 배지에서 배양하였을 때  $\alpha$ -glucosidase 저해활성이 90.9% (IC<sub>50</sub>; 1.92 mg/ml)로 가장 높았고, YPD 배지에서도 79.5% (IC<sub>50</sub>; 3.9 mg/ml)로 비교적 높은 저해활성을 보였다.

최적 생산배지로 선정된 LB 배지를 이용하여 배지 초기 pH의 영향을 검토한 결과, 생육은 pH 6.0에서 가장 양호하였고  $\alpha$ -glucosidase 저해활성도 pH 5.0-7.0에서 큰 차이 없이 90% 이상을 보였다(data not shown).

이상의 결과들을 종합했을 때,  $\alpha$ -glucosidase 저해물질은 선발균주인 *Pichia burtonii* Y257-7를 LB 배지(pH 6.0)에 접종하여 28°C에서 24시간 배양하였을 때 가장 많이 생산되었다.

**$\alpha$ -Glucosidase 저해물질의 부분정제 및 식후 혈당 상승 억제 효과**

*Pichia burtonii* Y257-7 무세포 추출물을 동결건조한 후 멸균수로 희석하고 0.45  $\mu$ m와 0.2  $\mu$ m disposable syringe filter unit로 여과한 후 Sephadex G-50 column chromatography를 실시하여 활성분획 F-1 (IC<sub>50</sub> 0.86 mg/ml)을 얻었다. 이 활성 분획물을 동결건조 후 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol과 물까지 순차적으로 용매 추출하여 각각의 추출물들에 대한 저해활성을 측정한 결과 마지막 단계인 물 추출물에서 가장 높은 저해활성(79.3%, 수율: 57.7%)을 보여 *Pichia burtonii* Y257-7이 생산하는  $\alpha$ -glucosidase 저해물질은 친수성 물질로 판단하였다. 이 친수성  $\alpha$ -glucosidase 저해물질을 동정하기 위해서 먼저 단백질과 펩타이드, 당단백질 실험법[18]으로 효모 추출물을 확인한 결과 단백질이나 펩타이드, 당단백질과는 다른 물질이었다. 따라서 본 실험의 효모 추출물에 함유되어 있는  $\alpha$ -glucosidase 저해물질은 아마도 최근 보고된 polyphenol 계통의 tannic



**Fig. 2. Effects of the partial purified  $\alpha$ -glucosidase inhibitor on blood glucose levels after 3 g/kg starch administration in normal SD-rat.** Different symbols on the bars indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. ●-●: Starch + D.W, △-△: Starch + commercial anti-diabetic acarbose (15 mg/kg), ○-○: Starch + partial purified  $\alpha$ -glucosidase inhibitor (500 mg/kg), ▼-▼: Starch + partial purified  $\alpha$ -glucosidase inhibitor (1000 mg/kg).

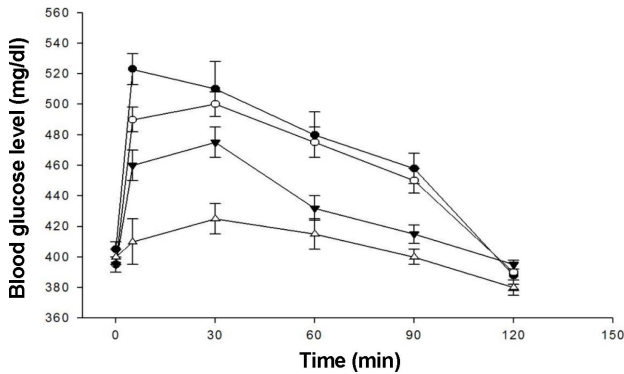
acid [3]로 추정되었고 보다 확실한 물질 동정을 위해서는 추가의 정제실험이 요구된다.

**일반 SD-rat에서의 혈당 상승 억제:** 위와 같이 얻은 *Pichia burtonii* Y257-7의  $\alpha$ -glucosidase 저해물질의 부분 정제물을 동결건조한 후 500 mg/kg, 1000 mg/kg의 농도로 전분 3 g/kg과 함께 경구 투여하였고 시간별로 혈중 포도당 함량의 변화를 측정하였다(Fig. 2).

일반 SD-rat의 평균 혈중 포도당 함량은 80  $\pm$  10 mg/dl로 보였고 대조구인 멸균수를 경구 투여한 SD-rat에서는 혈중 포도당이 5분 후엔 122  $\pm$  4.2 mg/dl로 급격히 증가하여 30분까지 변화없이 122  $\pm$  6.1 mg/dl의 혈중 포도당 함량을 보였으며, 투여 120분 후엔 정상의 혈중 포도당 함량으로 다시 낮아졌다.

그러나  $\alpha$ -glucosidase 저해제의 부분정제물을 500 mg/kg, 1000 mg/kg의 농도별로 투여한 실험군에서는 5분 후 각각 105  $\pm$  7.0 mg/dl, 94  $\pm$  5.1 mg/dl의 혈중 포도당 함량을 보여 이는 일반 rat의 혈당함량보다 농도 의존적으로 17 mg/dl, 26 mg/dl 낮아  $\alpha$ -glucosidase 저해제의 부분정제물이 혈당 상승 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

시판 혈당강하제인 acarbose를 15 mg/kg의 농도로 경구 투여 5분 후 일반 rat(대조구)와  $\alpha$ -glucosidase 저해제의 부분 정제물의 경구투여 rat보다 훨씬 낮은 85  $\pm$  4.3 mg/dl, 30분 후엔 88  $\pm$  3.1 mg/dl의 혈중 포도당 함량을 보여 혈당 상승 억제 효과가 매우 우수하였다. 이와 같이 비록 *Pichia burtonii* Y257-7이 생성하는  $\alpha$ -glucosidase 저해제의 부분정제물이 시판 혈당강하제인 acarbose보다는 SD-rat에서 혈당 상승 억



**Fig. 3. Effects of the partial purified  $\alpha$ -glucosidase inhibitor on blood glucose levels after 3 g/kg starch administration in streptozotocin-induced diabetic SD-rat.** Different symbols on the bars indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test. ●-● : Starch + D.W,  $\triangle$ - $\triangle$ : Starch + commercial anti-diabetic acarbose (15 mg/kg), ○-○ : Starch + partial purified  $\alpha$ -glucosidase inhibitor (500 mg/kg), ▼-▼: Starch + partial purified  $\alpha$ -glucosidase inhibitor (1000 mg/kg).

제 효과가 낮았지만 같은 경향으로 식후 농도 의존적으로 혈당 상승을 낮추는 효과가 있었다.

**당뇨 유발 SD-rat에서의 혈당 상승 억제:** 부분 정제된  $\alpha$ -glucosidase 저해물질을 이용하여 streptozotocin로 당뇨를 유발시킨 SD-rat에서 항당뇨 효과를 조사하였다. 당뇨가 유발된 SD-rat에서의 대조구인 멸균수를 경구 투여하였을 때 혈중 포도당 함량은 5분후에  $523 \pm 5$  mg/dl를 보였으나 시료인 효모  $\alpha$ -glucosidase 저해제의 부분정제물을 500 mg/kg, 1000 mg/kg의 농도별로 투여한 실험군에선 5분 후 각각  $490 \pm 5.2$  mg/dl,  $460 \pm 3.4$  mg/dl의 혈중 포도당 함량을 보여 일반 rat의 결과와 같이 각각 35 mg/dl, 65 mg/dl 혈당 상승 억제 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 3).

시판 혈당강하제인 acarbose를 당뇨유발 쥐에 15 mg/kg의 농도로 경구투여 하였을 때 투여 5분 후  $410 \pm 5.3$  mg/dl, 30분 후  $425 \pm 3.6$  mg/dl의 혈중 포도당 함량을 보여 혈당 상승 억제 효과가 아주 우수하였다. 위 결과 같이, 부분 정제된 *Pichia burtonii* Y257-7의  $\alpha$ -glucosidase 저해물질의 당뇨유발 SD-rat에서의 혈당 상승 억제 효과는 비록 시판 혈당강하제인 acarbose보다 낮았지만 유사하게 식후 농도 의존적으로 혈당을 낮추는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 실험의  $\alpha$ -glucosidase 저해물질을 함유한 효모 추출물은 시판 acarbose와 유사한 항당뇨 효능기작을 갖고 있는 것으로 사료된다.

한편, 이 결과들은 검은콩 씨 껍질에 함유되어 있는 안토시아닌이 본 실험과 같이 streptozotocin으로 유도된 당뇨쥐에서 혈당과 triglyceride 함량을 급격히 감소시켰다는 Nizamutdinova 등[17]의 보고와 오디중의 안토시아닌이 당

뇨성 고지혈 쥐의 혈당 함량을 농도 의존적으로 감소시켰다는 Sarikaphuti 등[22]의 보고와 같은 결과이었다.

### 요 약

본 연구에서는 우리나라 전통발효식품에서 분리한 효모들을 이용하여 새로운 항당뇨성  $\alpha$ -glucosidase 저해물질을 개발하기 위하여, 먼저 48종의 효모들의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 측정된 결과, *Pichia burtonii* Y257-7의 무세포 추출물이 가장 높은 저해활성을 보여 시험군주로 최종 선발하였다.  $\alpha$ -glucosidase 저해제 최적 생산 조건을 검토한 결과, *Pichia burtonii* Y257-7를 28°C에서 24시간 LB 배지(pH 6.0)에 배양하여 얻은 무세포 추출물에서 가장 높은  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 보였다. 최적 생산조건에서 얻은  $\alpha$ -glucosidase 저해물질을 0.45  $\mu$ m와 0.2  $\mu$ m syringe filter unit로 여과한 후 Sephadex G-50 column chromatography와 연속 용매 추출을 실시하여 부분정제한 후 일반 쥐와 당뇨유발 쥐를 이용하여 항당뇨 효과를 조사하였다. 정상 쥐와 streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨 당뇨유발 쥐에 *Pichia burtonii* Y257-7이 생산하는  $\alpha$ -glucosidase 저해제의 부분정제물을 전분과 함께 500 mg/kg, 1000 mg/kg 농도로 경구 투여한 결과, 시판 혈당강하제인 acarbose보다는 효과가 낮았지만 농도 의존적으로 정상 쥐와 당뇨유발 쥐 모두에서 혈당 상승 억제 효과를 확인할 수 있었다.

### References

1. Akgun-Dar K, Bolkent S, Yanardag R, Tunali S. 2007. Vanadyl sulfate protects against streptozotocin-induced morphological and biochemical changes in rat aorta. *Cell Biochem. Funct.* **25**: 603-609.
2. Asano N, Tomioka E, Kizu H, Matsui K. 1994. Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis*. *Carbohydr. Res.* **253**: 235-245.
3. Babby A, Elanchezhyan C, Suhasini S, Chandrasegaran G. 2014. Antihyperglycemic effect of tannic acid in streptozotocin induced diabetic rats. *J. Current Res.* **6**: 5396-5398.
4. Bischoff H. 1995. The mechanism of  $\alpha$ -glucosidase inhibition in the management of diabetes. *Clin. Invest. Med.* **18**: 303-311.
5. Chin HS, Nam KW. 2010. Inhibitory effects of steppogenin and oxyresveratrol from *Morus alba* L. against yeast  $\alpha$ -glucosidase. *J. Pharm. Soc. Korea* **54**: 398-402.
6. Choi HY, Ha KS, Jo SH, Ka EH, Chang HB, Kwon YI. 2012. Antioxidant and anti-hyperglycemic effects of a Sanghwang mushroom (*Phellinus linteus*) water extract. *J. Food Nutr.* **25**: 239-245.
7. Fiordaliso F, Cuccovillo I, Bianchi R, Bai A, Doni M, Salio M, et

- al.* 2006. Cardiovascular oxidative stress is reduced by an ACE inhibitor in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Life Sci.* **79**: 121-129.
8. Guo KX, Li WG, Peng ZF, Shu XH, Xiao NQ, Li DD, *et al.* 2013. Intestinal *Pichia burtonii* associated with Qiweibaizhusan. *Intl. J. Pharmaceut. Sci. Inven.* **2**: 26-33.
  9. Jeong SC, Lee DH, Lee JS. 2006. Production and characterization of an anti-angiogenic agent from *Saccharomyces cerevisiae* K-7. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 1904-1911.
  10. Kang MG, Yi SH, Lee JS. 2013. Production and characterization of a new  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptide from *Aspergillus oryzae* N159-1. *Mycobiol.* **41**: 149-154.
  11. Kim JH, Lee DH, Jeong SC, Chung KS, Lee JS. 2004. Characterization of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 1318-1323.
  12. Kim YM, Wang MH, Rhee HI. 2004. A novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydr. Res.* **339**: 715-717.
  13. Lee YS, Kim MS, Kim DJ, Sohn HY. 2013. A comparison of the components and biological activities of the ethanol of *Achyranthes japonica* Nakai and *Achyranthes bidentata* Blume. *J. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 416-424.
  14. Lembcke B, Folsch UR, Creutzfeldt W. 1985. Effect of 1-desoxynojirimycin derivatives on small intestinal disaccharidase activities and on active transport *in vitro*. *Digestion.* **31**: 120-127.
  15. Ligeti L, Szenczi O, Prestia CM, Szabo C, Horvath K, Marcsek ZL, *et al.* 2006. Altered calcium handling is an early sign of streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *Intl. J. Mol. Med.* **17**: 1035-1043.
  16. Murai A, Iwamura K, Takada M, Ogawa K, Usui T, Okumura J. 2002. Control of postprandial hyperglycaemia by galactosyl maltobionolactone and its novel anti-amylase effect in mice. *Life Sci.* **71**: 1405-1415.
  17. Nizamutdinova IT, Jin YC, Chung JI, Shin SC, Lee SJ, Seo HG, *et al.* 2009. The anti-diabetic effect of anthocyanins in streptozotocin-induced diabetic rats through glucose transporter 4 regulation and prevention of insulin resistance and pancreatic apoptosis. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**: 1419-1429.
  18. Oh PS, Lee HJ, Lim KT. 2009. Inhibitory effect of glycoprotein isolated from *Cudrania tricuspidata* bureau on histamine release and COX-2 activity in RBL-2H3 cells. 2009. *J. Food Sci. Technol.* **41**: 405-412.
  19. Olden K, Breton P, Grzegorzewski K, Yasuda Y, Gause BL, Cha JK, *et al.* 1991. The potential importance of swainsonine in therapy for cancers and immunology. *Pharmacol. Ther.* **50**: 285-290.
  20. Schmidt DD, Frommer W, Junge B, Muller L, Wingender W, Truscheit E, *et al.* 1977. Alpha-glucosidase inhibitors. New complex oligosaccharides of microbial origin. *Naturwissenschaften.* **64**: 535-536.
  21. Sugihara A, Senoo T, Enoki A, Shimada Y, Nagao T, Tomimaga Y. 1995. Purification and characterization of a lipase from *Pichia burtonii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 277-281.
  22. Taylor DL, Sunkara P, Liu PS, Kang MS, Bowlin TL, Tyms AS. 1991. 6-O-Butanoylcastanospermine (MDL 28,574) inhibits glycoprotein processing and the growth of HIVs. *AIDS.* **5**: 693-698.
  23. Van de Laar FA, Lucassen PL, Akkermans RP, Van de Lisdonk EH, Rutten GE, Van Weel C. 1995. Alpha-glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes: results from a Cochrane systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care.* **28**: 154-163.
  24. Xu ML, Wang L, Xu GF, Wang MH. 2011. Antidiabetes and angiotensin converting enzyme inhibitory activity of *Sonchus asper* (L) Hill extract. *Korean J. Pharmacogn.* **42**: 61-67.
  25. Yagi M, Kouno T, Aoyagi Y, Murai H. 1976. The structure of moranolone a piperidine alkaloid from *Morus* species. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* **50**: 571-572.