

***Streptomyces* 속 균주가 생성하는 α -D-Glucosidase Inhibitor (I) - 균주의 동정 -**

도재호^{1*} · 주현규²

¹한국인삼연구소 ²건국대학교 농화학과

α -D-Glucosidase Inhibitor from *Streptomyces* sp. (I) - Identification of the Strain -

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

A microorganism, YS-221-B strain which powerfully produced α -D-glucosidase inhibitor was isolated from soil. The morphological, cultural characteristics and physiological properties of the strain were investigated. As the results of various examinations, the strain YS-221-B was identified to be similar to *Streptomyces flavovirens* except the utilization of raffinose, *i*-inositol among the various carbon sources.

α -D-Glucosidase (α -D-Glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.20)는 비환원성 말단의 α -1,4로 결합된 glucosidic bond를 가수분해하여 glucose를 유리시키는 효소이며, 소장점막미용모막에는 α -D-glucosidase를 포함하여 β -galactosidase, glucoamylase, sucrase- α -dextrinase 및 trehalase 등이 존재하며 모두 당을 함유하고 있는 당단백효소이다(1,2). Amylase를 포함한 이들 효소에 의한 분해산물은 glucose, fructose 및 galactose이며 동물이나 인간에 있어서 glucose의 이상대사는 당뇨병, 비만, 고지혈증과 같은 질병을 유발시키며(3,4), 이러한 질병이 증가되어감에 따라 탄수화물 분해효소 저해물질은 탄수화물 의존성 질환의 치료제로서 이용가능성이 주목되고 있다(5,6). 현재까지 탄수화물 분해효소 저해물질 중에서 가장 많이 연구된 것이 amylase inhibitor이며, 이것은 1933년 Chrzaszcz와 Janicki가 보고한 메밀로부터 얻은 저해물질이 최초의 것이다(7). 그 후 밀, 흑두, 호밀, mangos 등의 식물에서 amylase inhibitor가 발견되었으며(8-13), 미생물 유래의 저해물질은 *Streptomyces* 속(14-18), *Cladosporium* 속(19), *Actinoplanes* 속(5,20) 등에

서 분리하여 보고된 바 있다. 본 실험에서는 미생물을 이용하여 glucose의 흡수를 방해하는 α -D-glucosidase inhibitor를 검색코자 서울 근교의 토양으로부터 방선균을 분리하여 α -D-glucosidase를 강하게 저해하는 균주 YS-221-B를 선별하고 본 균의 균학적 성질을 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균의 분리 및 선별

본 실험에 사용한 균주는 서울 근교에서 채취한 토양에서 분리한 것으로, glucose 1.0%, peptone 0.2%, K_2HPO_4 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, agar 1.8% 조성의 분리용 배지를 pH 7.0으로 조절하여 3단회석 및 획석법으로 분리한 방선균 328주를 대상으로 α -D-glucosidase에 대한 저해물질 생산균주를 검색하였다. 저해물질 생산능은 Table 1의 저해물질 생산용 배지에서 7일간 배양한 다음 배양 여액을 사용해서 Halvorson의 방법(21)에 따라 측정하였다. 즉, 1/15 M-phosphate buffer 용액(pH 6.8) 0.4 ml,

Key words; α -D-Glucosidase inhibitor, *Streptomyces* sp., identification

*Corresponding author

Table 1. Composition of media for stock culture and inhibitor production.

Medium for stock culture	
Glucose	2.0%
Beef extract	0.5
Peptone	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
NaCl	0.1
Agar	1.8
pH	7.0
Medium for inhibitor production	
Glucose	1.5
Asparagine	0.1
K ₂ HPO ₄	0.05
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
NaCl	0.05
pH	7.0

시료용액 0.1 ml, α-D-glucosidase (from yeast) 용액 0.1 ml (10 μg)를 함유한 반응액을 37°C에서 15 분간 전처리한 후 0.003 M-*p*NPG (*p*-nitrophenylglucopyranoside) 0.4 ml를 가하여 37°C에서 20 분간 반응시킨 다음 0.1 M-Na₂CO₃ 용액 3.0 ml를 가하여 반응을 정지시키고 필요에 따라 0.1 M-Na₂CO₃ 용액으로 희석하여 400 nm에서 흡광도를 조사하였다. 이때 저해율은 α-D-glucosidase와 저해물질을 전처리시키고 난 후 기질과 작용시킨 것을 시험구(S), α-D-glucosidase와 기질과 작용시킨 것을 제 1대조구(C₁), 시료만을 반응시킨 것을 제 2대조구(C₂)로 하여 다음과 같이 계산하였고, 저해활성은 10%의 저해율을 나타낼 때를 1 unit로 하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = 100 \left(1 - \frac{S - C_2}{C_1 - C_2} \right)$$

생리적 특성조사 및 동정

Aerial mass color, reverse side color, melanoid 색소 및 가용성 색소의 판정은 Shiring & Gottlieb 등 (22)의 방법에 따랐으며 spore chain은 glycerol-asparagine agar 배지에 28°C에서 14일간 배양한 균을 광학 현미경(Nikon Labophot 형)으로 검경하였고, spore surface의 검사는 yeast-malt extract agar 배지에서 28°C, 14일간 배양한 균의 포자를 채취하여 전자 현미경(Hitachi model HV-11E)으로 관찰하였다. 생리화학적 특성으로서 전분가수분해력, indol 생성력, H₂S 생성력, nitrate 환원력, catalase

Table 2. Cultural characteristics of *Streptomyces* sp. strain YS-221-B.

Medium	Growth	Aerial mycelium	Soluble pigment
Trypton yeast extract broth (I.S.P. No. 1)*	G	whitish grey	pale yellow
Yeast malt extract agar (I.S.P. No. 2)	M	grey	pale yellow
Oatmeal agar (I.S.P. No. 3)	G	whitish grey	none
Inorganic salts starch agar (I.S.P. No. 4)	G	whitish grey	none
Glycerol asparagine agar (I.S.P. No. 5)	M	whitish grey	none
Peptone-yeast extract iron agar (I.S.P. No. 6)	M	none	none
Tyrosine agar (I.S.P. No. 7)	G	pinkish grey	none
Starch agar	G	grey	pale brown
Nutrient agar	P	whitish grey	none
Potato dextrose agar	G	grey	brown
Glucose peptone agar	M	white	none
Czapeck agar	M	whitish	none

Growth; G: good, M: moderate, P: poor
 *Media were employed by International *Streptomyces* Project. The strain was cultured in various kinds of media at 28°C for 14 days.

생성력을 조사하였으며 (23) urease는 Christensen urea agar(24)를 사용하여 조사하였다. Casein 가수분해력은 탈지유를 가한(10% v/v) nutrient agar 평판에, gelatin 가수분해력은 gelatin을 0.4% 가한 nutrient agar 평판에 균을 희석 접종하여 28°C, 11일간 배양한 후 15% HgCl₂가 함유된 1.8 N-HCl 용액을 가하여 생성된 투명대의 유무로서 판정하였다. Milk coagulation은 litmus milk 배지를 사용하여 5일간 배양하면서 색소변화, coagulation, peptonization을 조사하였다. 그리고 streptomycin에 의한 생육 저해성은 glucose-peptone 액체배지에 streptomycin을 0~30 μg/ml가 되게 가하여 균을 접종한 후 5일간 배양하면서, 내염성은 Czapeck 배지에 NaCl의 농도가 1~12%가 되게 첨가해서 15일간 배양하면서 생육도를 조사하였다. 당이용성 검정은

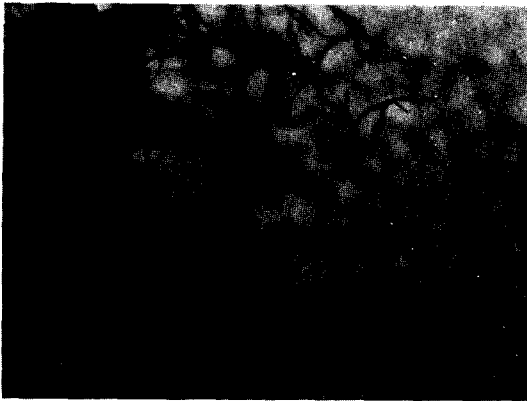


Fig. 1. Spore chain of *Streptomyces* sp. strain YS-221-B.



Fig. 2. Spore surface of *Streptomyces* sp. strain YS-221-B.

Pridham 과 Gottlieb 의 방법 (25)에 의해서 당류를 1% 첨가하여 균을 접종한 뒤 28°C에서 14일간 배양하면서 생육도를 관찰하였으며, 동정은 주로 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (26), ISP strain key (27), Shirling and Gottlieb (28)의 방법에 따랐다.

결과 및 고찰

선발균주의 형태학적 관찰 및 배양상의 특성

서울 근교의 토양에서 외부 형태가 다른 방선균 328주를 분리하여 α -D-glucosidase inhibitor 활성도 측정방법에 의해 그 저해능이 가장 강한 균주 YS-221-B를 선정하였다. 본 균주의 spore chain을 광학 현미경으로 관찰한 결과 rectus-flexibilis 형이었으며 (Fig.1), 전자 현미경으로 spore surface를 관찰한 결과 smooth type이었다 (Fig.2). Aerial mass color는 grey였고, reverse side color 및 melanoid 색소 이외의 가용성 색소는 yellow-brown이었으며

Table 3. Morphological characteristics of *Streptomyces* sp. strain YS-221-B.

factor	Characteristics
Colony surface	powdery
Spore chain	rectus-flexibilis
Spore surface	smooth
Aerial mass color	grey
Melanoid pigment	none
Reverse side color	yellow-brown
Other soluble pigment	yellow-brown

melanoid 색소는 생성하지 않았고, 그외의 배양상의 특성은 Table 2와 같으며 형태적 특성을 요약하면 Table 3과 같다.

생리 및 생화학적 특성

본 균의 생리 및 생화학적 특성은 Table 4와 같이 전분과 gelatin을 가수분해하였으며 catalase와 urease를 생성하였고 litmus milk를 서서히 coagulation, peptonization시켰으며 nitrate를 환원시킬 수 있었으나 H₂S와 indole를 생성하지 않았다. 또 균

Table 4. Physiological and cultural characteristics of *Streptomyces* sp. strain YS-221-B.

Factor	Characteristics
Starch hydrolysis	positive
Gelatin liquefaction	positive
Catalase	positive
H ₂ S production	negative
Nitrate reduction	positive
Indole production	negative
Urease*	positive
Litmus milk	color; changed to red coagulation slowly peptonization slowly
Optimum pH for growth	6.0
Optimum temp. for growth	30°C
NaCl tolerance	≥5%, but <7%
Streptomycin inhibition	inhibition

*Christensen urea agar was used for this test²⁴.

Table 5. Utilization of carbon compound.

Carbon compound	Growth
No carbon	-
D-Glucose	+
D-Xylose	+
L-Arabinose	+
L-Rhamnose	+
D-Fructose	+
D-Galactose	+
Raffinose	-
D-Mannitol	+
<i>i</i> -Inositol	+
Salicin	-
Sucrose	-
Starch	+
Cellulose	-
Inulin	+

+: utilized, -: not utilized. The growth was checked after cultivation for 14 days at 28°C.

의 생육 최적 온도는 30°C 부근이었고, 최적 pH는 6.0이었으며 NaCl tolerance를 조사한 결과 5%의 농도까지는 생육하였으며 배양시간이 경과함에 따라 6%에서도 약하지만 생육이 가능하였으나 7% 이상에서는 생육하지 못했고, streptomycin을 5 µg/ml의 농도로 첨가하였을 때에도 전혀 생육하지 않았다. 당이용성을 조사한 결과 Table 5와 같이 raffinose, salicin, sucrose, cellulose는 탄소원으로 이용할 수 없었다.

본 균주의 배양성, 형태학적 특성, 생리 및 생화학 특성, 당이용성 등을 Bergey's manual of determinative bacteriology (26), ISP strain key (27), Shirling and Gottlieb의 방법 (22, 28)에 의하여 분리균의 형태, 생리 및 생화학 특성상과 raffinose, *i*-inositol을 제외한 당이용성 등을 고려해 볼 때 YS-221-B 균주는 *Streptomyces flavovirens* 또는 그 근연균으로 추정되었다 (Table 6).

요 약

토양으로부터 α-D-glucosidase inhibitor를 강력히 분비하는 방선균속 균주를 분리한 후 균의 형태학적 특성, 배양성 및 생리화학적 특성을 조사하여 동정한 결과 *Streptomyces flavovirens* 또는 그 근연균으로 동정되었다.

Table 6. Comparison of strain YS-221-B with *St. flavovirens*

Factor	YS-221-B	<i>St. flavovirens</i>
Spore chain	RF	RF
Spore surface	smooth	smooth
Aerial mass color	whitish grey	grey
Melanoid pigment	negative	negative
Growth inhibition by streptomycin	no inhibition	inhibition
NaCl tolerance	≥5%, but 7%	≥7%, but <10%
Carbon utilization		
D-Glucose	+	+
D-Xylose	+	+
L-Arabinose	+	+
L-Rhamnose	+	+
D-Fructose	+	+
D-Galactose	+	+
Raffinose	-	+
D-Mannitol	+	+
<i>i</i> -Inositol	+	-
Salicin	-	-
Sucrose	-	-

+: utilized, -: not utilized.

참고문헌

- Dixon, M. and E.E. Webb: Enzymes, Longman Group Ltd., London, 3rd ed., p. 862-863 (1979).
- Gray, D.M.: *New Engl. J. Med.*, **292**, 1225 (1975).
- Caspary, W.F.: *Lancet*, **1**, 1231 (1978).
- Plus, W., U. Keup, H.P. Krause, G. Thomas and F. Hoffmeister: Proceedings of first international symposium on Acarbose, ed. by W. Creutzfeldt, Excerpta Medica, Amsterdam, P. 16-26 (1982).
- Schmidt, D.D., W. Frommer, B. Junge, L. Müller, W. Wingender, W. Truscheit and D. Schäfer: *Naturwissenschaften*, **64**, 535 (1977).
- Puls, W., U. Keup, H.P. Krause, G. Thomas and F. Hoffmeister: *Naturwissenschaften*, **64**, 536 (1977).
- Chrzaszcz, T. and J. Janicki: *Biochem. Z.*, **260**, 354 (1933).
- Kneen, E. and R.M. Sandstedt: *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1247 (1943).
- Maeda, K., Y. Takamori and O. Oka: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2873 (1982).
- Lajolo, F.M. and F.F. Filho: *J. Agric. Food Chem.*,

- 33, 132 (1985).
11. Frels, J.M. and J.H. Rupnow: *J. Food Sci.*, **50**, 72 (1985).
 12. Granum, P.E.: *J. Food Biochem.*, **2**, 103 (1978).
 13. Mattoo, A.K. and V.V. Modi: *Enzymologia*, **39**, 237 (1970).
 14. Murao, S. and K. Ohyama: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2271 (1975).
 15. Murao, S. and K. Ohyama: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 919 (1977).
 16. Murao, S., A. Goto, Y. Matsui and K. Ohyama: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1679 (1980).
 17. Ueda, S. and Y. Koba: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2025 (1973).
 18. Ueda, S., Y. Koba and H. Chaen: *Carbohydrate Res.*, **61**, 253 (1978).
 19. Saito, N.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 3120 (1982).
 20. Hidaka, H., T. Takaya and J.J. Marshall: *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **27**, 114 (1980).
 21. Halvorson, H.: *Methods in enzymology*, Academic Press, New York, vol. 8, p. 559-562 (1966).
 22. Shirling, E.B. and D. Gottlieb: *Int. J. System Bacteriol.*, **16**, 313 (1966).
 23. 長谷川武治: 微生物の分類と同定, 學會出版センタ, p221-234 (1975).
 24. Gerhardt, P.: *Manual of methods for general bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, DC., p. 434 (1981).
 25. Pridham, T.G. and D. Gottlieb: *J. Bacteriol.*, **56**, 107 (1948).
 26. Buchaman, R.E. and N.E. Gibbons: *Bergey's manual of determinative bacteriology*, The Williams Wilkins Co., Baltimore, 8th ed., p.748-829 (1974).
 27. Nonomura, H.: *J. Ferment. Technol.*, **52**, 78 (1974).
 28. Shirling, E.B. and D. Gottlieb: *Int. J. System Bacteriol.*, **18**, 69 (1968).

(Received March 27, 1989)