

***Streptomyces*속 균주가 생성하는 α -D-Glucosidase Inhibitor(III) -저해물질의 정제 및 안정성-**

도재호^{1*} · 주현규²

¹한국인삼연구연구소 ²건국대학교 농화학과

α -D-Glucosidase Inhibitor from *Streptomyces* sp. (III) - Purification and Stability of the Inhibitor -

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 strain of *Streptomyces* sp. (YS-221-B) extracellularly produced an inhibitory substance for α -D-glucosidase. The substance was purified 96-fold from culture filtrate by dialysis, heat treatment, adsorption on active carbon, Bio-Gel P-10 and Sephadex G-75 column chromatography with yield of 9.2%. The substance was stable in pH range from 7.0 to 11.0 at 37°C, and a treatment at 100°C for 20 min diminished only 15% of the original activity. The inhibitor was not inactivated by the treatment of α -, β -amylases, glucoamylases, trypsin and chymotrypsin but inactivated by proteases from *Streptomyces griseus* and *Tritirachium album*.

Umezawa group에 의해 미생물 유래의 효소 저해 물질에 관한 연구가 시작되어 현재 약 50여개의 저해물질이 분리 동정되었으며 이 미생물성 효소 저해물질은 이미 알려진 저해물질 즉, 합성물질이나 고등 동·식물로부터 얻은 저해물질보다 더 활성이 강한 것이 있다(1). 저자 등은 토양에서 분리한 방선균 중에서 α -D-glucosidase를 강하게 저해하는 물질을 분리하는 균주를 선별하여 동정하고 이 저해물질의 생산조건을 검토하여 보고한 바 있다(2, 3). 본 실험에서는 이 균주가 생산하는 저해물질의 정제 및 안정성에 대해 조사한 결과를 보고하고자 한다.

균의 배양

α -D-Glucosidase inhibitor를 생성하는 균주인 *Streptomyces* sp. YS-221-B를 전보와 같이 최적 생산 조건인 glucose 2%, asparagine 0.3%, riboflavine 0.0002%, K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄ 0.1%, NaCl 0.05% 조성의 배지를 pH 8.0으로 조절하여 30°C에서 9일간 배양하였다(3).

저해활성도 측정

α -D-Glucosidase의 저해활성도는 전보와 같이 측정하였다(2).

저해물질의 정제

배양액을 탈지면으로 여과하고 그 여액을 45°C에서 약 1/15의 양으로 감압농축한 뒤 Fig.1과 같은 방법으로 정제하였다.

배양여액을 1/15의 양으로 농축한 뒤 cellophane tube에 주입하여 4°C에서 24시간 증류수를 갈아주면서 투석하고 내액을 4°C, 9,200×g에서 20분간 원심 분리하였다. 상등액 내에 존재하는 protease의 활성을 불활성화하기 위해서 80°C에서 15분간 열처리한 뒤(4) 9,200×g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 활성탄층(2.0×12 cm)에 흡착시킨 뒤 0.005 M-HCl이 함유된 methyl alcohol로 용출시켜 감압농축하였는데 이 때 대부분의 색소가 제거되었다. 다시 1/15 M-phosphate buffer용액(pH 6.8)을 가하여 불용성 물질을 제거하고 감압농축한 다음 Bio-Gel P-10

Key words: α -D-Glucosidase inhibitor, purification, stability

*Corresponding author

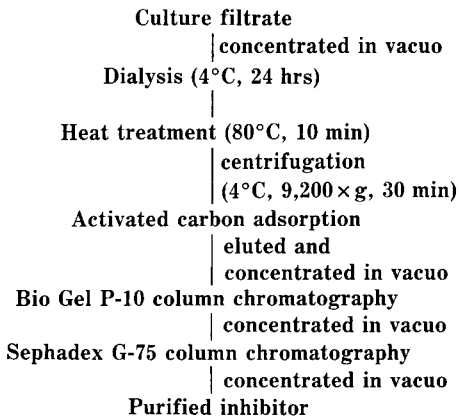


Fig. 1. Purification procedure of α -D-glucosidase inhibitor.

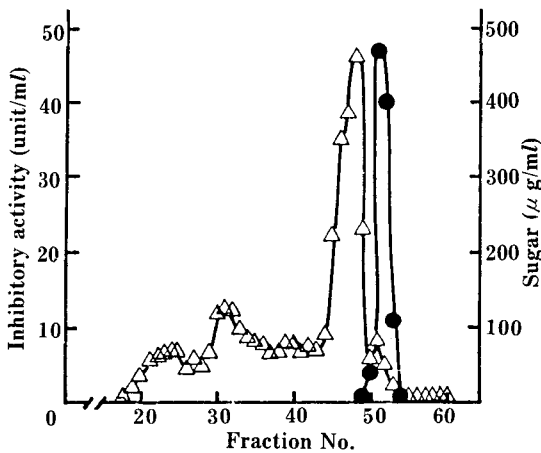


Fig. 2. Bio-Gel P-10 column chromatography of α -D-glucosidase inhibitor.

The column (1.2 × 104 cm) was eluted with distilled water. Fractions of 4.5 ml were collected at a flow rate of 20 ml/hr and aliquots were taken for determination of α -D-glucosidase inhibitor (●) and phenol-sulfate (△) assay.

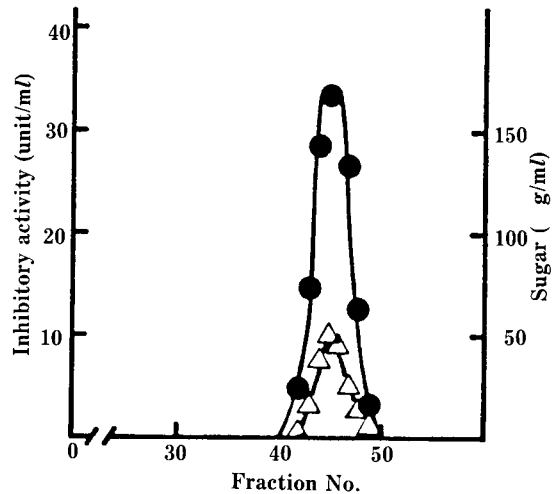


Fig. 3. Sephadex G-75 column chromatography of α -D-glucosidase inhibitor.

The column (1.2 × 87 cm) was eluted with distilled water. Fractions of 2.5 ml were collected at a flow rate of 12.5 ml/hr and aliquots were taken for determination of α -D-glucosidase inhibitor (●) and phenol-sulfate (△) assay.

column (1.2 × 104 cm)에 주입하여 20 ml/hr의 유속으로 튜브당 4.5 ml씩 증류수로 용출시켰으며 용출양상은 Fig.2와 같이 4개의 정점이 나타났으나 분획번호 49~54에서 저해물질이 용출되었다. Bio-Gel P-10 column chromatography에 의해서 얻은 활성분획 (tube No.49~54)을 감압농축하여 Sephadex G-75 column (1.2 × 87 cm)에 주입한 후 12.5 ml/hr의 유속으로 튜브당 2.5 ml씩 증류수로 용출시켰을 때 Fig.3과 같이 당의 용출분획과 저해활성을 나타내는 분획 (tube No.42~49)이 일치하였다. 이상과 같은 정제 과정에서 저해물질의 회수율은 약 9.2%였으며 비활

Table 1. Summary of purification steps of α -D-glucosidase inhibitor from culture filtrate.

Purification step	Volume (ml)	Total sugar (mg) ^a	Total activity (unit)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture filtrate	2,000	3,640	31,920	8.8	1.0	100
Dialysis	150	272	20,100	73.9	8.4	63
Heat treatment	150	258	18,000	70.0	8.0	56
Charcoal	16	54	8,576	156.7	17.9	27
Bio-Gel P-10	72	4.2	3,378	804.3	91.4	10.6
Sephadex G-75	64	3.5	2,950	842.9	95.8	9.2

^aDetermined by phenol-sulfuric acid method

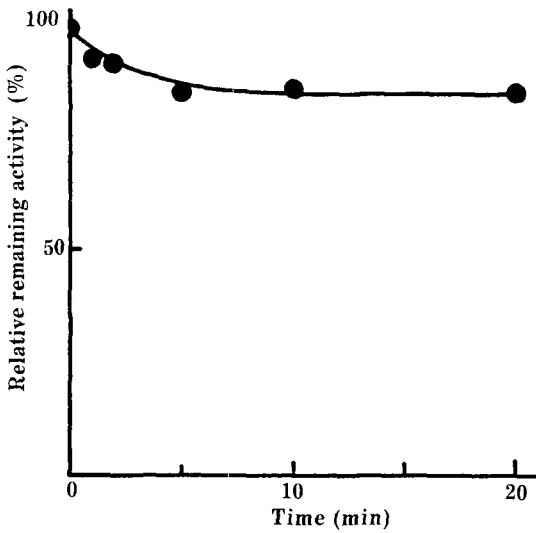


Fig. 4. Thermal stability of the inhibitor.
Inhibitor solution (100 μ g) was treated at 100°C for each time, and the residual inhibitory activities toward glucosidase were measured.

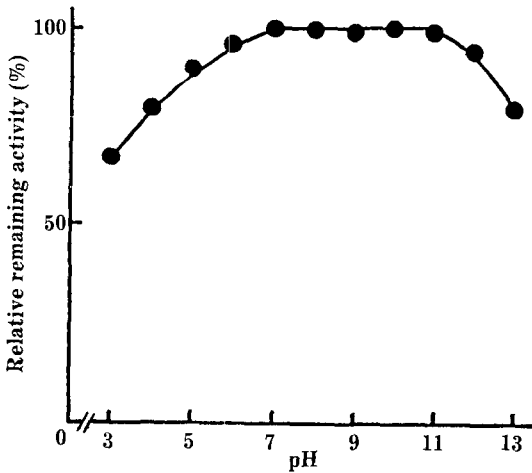


Fig. 5. Effect of pH on stability of the inhibitor.
0.1 ml (100 μ g) of inhibitor solution was adjusted to an appropriate pH value. After incubation for 1 hr at 37°C, the remaining inhibitory activity toward glucosidase was assayed.

성도는 약 96배 증가되었다(Table 1).

저해물질의 안정성

열 안정성 : 저해물질의 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 100°C에서 20분까지 열처리시킨 후 잔존 저해활성을 조사한 결과는 Fig.4와 같다. 100°C에서 5분간 열처리했을 때 약 15%가 실활되었으나

Table 2. Effect of proteases and amylases treatment on inhibitory action of α -D-glucosidase inhibitor

Enzymes (origin)	Enzyme amount (μ g)	Remaining activity (%)
Trypsin (Bovine pancreas)	400	103
Chymotrypsin (Bovine pancreas)	100	96
Protease (<i>Streptomyces griseus</i>)	100	0
Protease (<i>Tritirachium album</i>)	50	18
α -Amylase (Human salivary)	50	98
α -Amylase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	100	95
β -Amylase (Barley)	100	92
β -Amylase (Soybean)	150	94
β -Amylase (Sweet potato)	100	95
Amyloglucosidase (<i>Rhizopus</i> sp.)	100	91
Amyloglucosidase (<i>Aspergillus oryzae</i>)	50	99
No treatment	-	100

Reaction mixture of 0.1 ml (100 μ g) of inhibitor solution, 0.3 ml of buffer solution (pH 6.8) and 0.1 ml of protease or amylase solution was incubated at 37°C for 30 min (proteases) or 20 min (amylases), then boiled at 100°C for 5 min and then 0.1 ml of glucosidase solution was added to reaction mixture, and preincubated at 37°C for 15 min. Remaining activity was assayed by adding 0.4 ml of PNPG solution.

그 후 20분까지 처리하여도 그 이상 실활되지 않았으므로 본 저해물질은 열에 대해 비교적 안정성이 큰 물질이라고 사료된다.

pH 안정성 : pH에 대한 저해물질의 안정성을 조사하기 위하여 pH 3.0에서 13.0까지 각 단계별로 37°C에서 60분간 처리시킨 후 α -D-glucosidase에 대한 잔존 저해활성을 조사한 결과는 Fig.5와 같이 pH 7.0에서 11.0 사이인 alkali 영역에서는 안정하였으나 pH 6.0 이하와 pH 12.0 이상에서는 불안정하였다.

Proteases 및 amylases에 대한 안정성 : 저해물질의 protease와 amylase에 대한 안정성을 조사하기 위하여 trypsin, chymotrypsin 및 기타 미생물성 protease는 본 저해물질과 30분간 α -amylases, β -amylases 및 amyloglucosidases는 20분간 전처리시킨 다음 100°C에서 5분간 열처리하고 나서 잔존

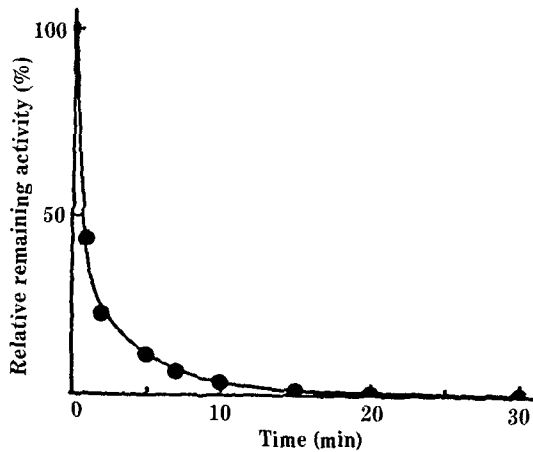


Fig. 6. Effect of treatment time of protease (from *Streptomyces griseus*) on inhibitory activity of α -D-glucosidase inhibitor.

Reaction mixture of 0.1 ml (100 μ g) of inhibitor solution, 0.3 ml of buffer solution (pH 6.8) and 0.1 ml (100 μ g) of protease solution (from *Streptomyces griseus*) was incubated at 37°C for each time, and then boiled at 100°C for 5 min. 0.1 ml of glucosidase solution was added to reaction mixture, and preincubated at 37°C for 15 min. Remaining activity was assayed by adding 0.4 ml of PNP solution.

저해활성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. α -, β -Amylase 및 amyloglucosidase와 같은 carbohydrases와 trypsin, chymotrypsin과 같은 proteases는 본 저해물질의 활성을 감소시키거나 불활성화할 수 없었으나 *Streptomyces griseus*, *Tritirachium album* 등의 protease 처리에 의해서 저해활성은 거의 상실되었다.

그리고 본 저해물질이 protease (*Streptomyces griseus*)의 처리에 의해서 저해 능력이 거의 상실되었기 때문에 protease와 저해물질을 혼합하여 0~30분까지 전처리시킨 후 잔존 저해활성을 조사한 결과는 Fig. 6과 같이 처리시간이 길어질수록 저해활성은 급격히 감소되어 5분간 처리했을 때에는 약 90%가 실행되었으며 10분간 처리로 97%가 실행되었다.

α -D-Glucosidase inhibitor를 순수하게 분리하기 위해서 배양여액을 투석, 열처리, 활성탄 흡착, Bio-Gel P-10 및 Sephadex G-75 column chromatography의 과정을 거쳐서 정제하였다. 이 때의 수율은 9.2%로서 S-AI(5), Haim(6), Paim(7)이나 Ueda group(8, 9)이 *Streptomyces* 속에서 분리한 amylase inhibitor 및 *Cladosporium herbarum* F-828(10)에서 정제한 저해물질의 수율에 비해서 높은 편이었다.

본 저해물질은 열에 대한 안정성은 커서 100°C에서 20분간 처리하여도 15% 정도밖에 실행되지 않았

다. 이것은 Ohyama 등(5)이 *Streptomyces* 속으로부터 분리한 S-AI, Goto 등(6)이 *Streptomyces griseosporus* YM-25로부터 얻은 Haim, Oouchi 등(7)이 *Streptomyces corchorushii*로부터 분리한 Paim I, II 그리고 Ueda 등(11)이 *Streptomyces* 속으로부터 분리한 amylase inhibitor와 비슷한 경향이 있으나, Saito(10)가 *Cladosporium herbarum*에서 분리한 amylase inhibitor 보다는 안정하였다. 그리고 pH에 대한 안정성은 산성용액보다 알칼리성 용액에서 더 안정해서 37°C에서 pH 7~11 사이에서는 매우 안정하였다. 이것은 S-AI(5), Haim(6) 및 Ueda 등(11)이 분리한 amylase inhibitor에 비해서는 pH에 대한 안정범위가 좁았으나 알칼리성 용액에서 매우 불안정한 Paim I, II 보다는 안정성이 컸다(7). 여러가지 amylase와 trypsin 및 chymotrypsin의 작용에 의해 저해활성을 잃지 않지만 *Streptomyces griseus*, *Tritirachium album*이 생산하는 protease에 의해 활성을 잃어버리기 때문에 저해물질의 분자 내에는 peptide bond가 존재하고 있다는 것을 암시해주며 insulin의 oxide B chain의 절단부위가 trypsin이나 chymotrypsin과 같이 아주 적은 protease(12)에 대해서는 안정성이 크지만 절단부위가 많은 일반적인 protease의 작용으로 α -D-glucosidase에 대한 저해활성을 잃을 가능성이 많다고 사료된다.

참고문헌

1. Demain, A.L.: *Science*, **219**, 709 (1983).
2. 도재호, 주현규: 한국산업미생물학회지, **17**, 202 (1989)
3. 도재호, 주현규: 한국산업미생물학회지, **17**, 207 (1989)
4. Saito, N.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 3120 (1982).
5. Ohyama, K. and S. Murao: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2221 (1977).
6. Goto, A., Y. Matsui, K. Ohyama, M. Arai and S. Murao: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 83 (1983).
7. Oouchi, N., M. Arai and S. Murao: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 793 (1985).
8. Ueda, S., Y. Koba and H. Chaen: *Carbohydrate Res.*, **61**, 253 (1978).
9. Tajiri, T., Y. Koba and S. Ueda: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 671 (1983).
10. Saito, N.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 3120 (1982).
11. Ueda, S. and Y. Koba: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2025 (1973).
12. Reed, G.: *Enzymes in food processing*, Academic Press Inc., New York, 2nd edition, p.142 (1975).

(Received July 21, 1989)