

## Streptomyces 속 균주가 생성하는 $\alpha$ -D-Glucosidase 저해물질의 물리화학적 성질

도재호<sup>1\*</sup> · 주현규<sup>2</sup>

<sup>1</sup>한국인삼연구소, <sup>2</sup>건국대학교 농화학과

### Physico-Chemical Characteristics of $\alpha$ -D-Glucosidase Inhibitor from *Streptomyces* sp.

Do, Jae-Ho\* and Hyun-Kyu Joo<sup>1</sup>

\*Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Daejeon 302-345, Korea

<sup>1</sup>Department of Agricultural Chemistry, Konkuk University, Seoul 133-140, Korea

$\alpha$ -D-Glucosidase inhibitor purified in a pure form was amorphous powder which gave a single spot at  $R_f$  value 0.12-0.71 with various developing solvent systems on silica gel thin layer chromatography, and melting point was 154.3-155.3°C. It was dissolved in water, formic acid and ethylene glycol monoethyl ether, and was very high hygroscopic substance. Biochemical reaction of the substance was positive to phenol sulfuric acid, ninhydrin, silver nitrate-sodium hydroxide, but negative to DNS reagent. Acid hydrolysis gave fructose and aspartic acid as sole sugar and amino acid constituents respectively. Molecular weight of the inhibitor was estimated to be 1,050 by Shphadex G-25 column chromatography.

탄수화물분해효소 특히 amylase의 활성을 저해하는 물질에 대해서는 식물(1-3), 미생물(4-6) 등을 대상으로 한 연구가 이루어졌으며, 미생물 중에서는 *Streptomyces* 속 균주가 생산하는 저해물질에 대해서 많이 보고되었다. 그 중에서 S-AI는 분자량이 1,500 정도로 당을 함유하고 있는 질소화합물이며, 분자량이 163인 S-GI는 산과 열에 매우 안정한 물질로 알려졌고 Haim은 분자량이 12,000인 단백질 고분자물질이다(7-10). 그리고 분자량이 4,300, 4,800 정도인 Paim I, II는 모두 많은 양의 alanine을 함유하고 있으나 lysine, isoleucine 및 phenylalanine을 함유하고 있지 않았다(11-14). 또 항생물질인 동시에 amylase에 대해 저해활성을 갖는 oligostatin(15), trestatin(16)과 여러 가지 carbohydrase에 대해 저해활성을 나타내는 nojirimycin(17)이 보고되었다. 저자 등은 토양에서 분리한 방선균 YS-221-B가  $\alpha$ -D-glucosidase를

강하게 저해하는 물질을 생성하므로 이 균주의 동정, 저해물질의 생산조건 및 정제에 대해 보고한 바 있다(18-20).

본 보에서는 저해물질의 여러 가지 물리화학적 성질을 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

#### 재료 및 방법

##### 저해물질의 순도 및 $R_f$ 치 조사

저해물질의 순도와  $R_f$ 치를 조사하기 위하여 여러 가지 전개용매를 사용하여 thin layer chromatography (5×20 cm)를 하여 silver nitrate-sodium hydroxide로 발색시켰다(21).

##### 분자량 측정

저해물질의 분자량은 Andrews의 방법(22)에 따라 Sephadex G-25 column chromatography에 의하여 측정하였다. 즉 저해물질 1.0mg을 0.05M Tris-HCl buffer 용액(pH7.5) 0.5ml에 용해시켜 column에

Key words:  $\alpha$ -D-Glucosidase inhibitor, physico-chemical characteristics

\*Corresponding author

charge 하고 용출속도를 10 ml/hr로 하여 1 ml씩 분획하였다. 표준물질로서는 ACTH(Mw. 4,560), glucagon(Mw. 3,550), human gastrin I(Mw. 2,000)을 사용하였으며 void volume 을 blue dextrin 2,000 을 사용하여 측정하였다.

### 당의 분석

시료 20 mg 을 2.5% HCl 2 ml 에 용해시켜 80°C 에서 3 시간 산가수분해시킨 뒤 2.5% NaOH 로 중화시키고 감압농축하여 증류수 2 ml 에 녹여 milipore filter (pore size 0.45  $\mu$ m) 로 여과해서 HPLC 로 당의 종류를 확인하였다.

### 아미노산의 분석

시료 10 mg 을 맴플에 넣고 6.0N-HCl 용액 2 ml 에 용해한 뒤 3 분 동안 감압시키고 밀봉하여 120°C 에서 24 시간 가수분해시킨 뒤 감압농축하여 HCl 를 제거한 후 2 ml 의 buffer 용액 (sodium citrate 19.78g, phenol 1g, 35% HCl 16.5 ml 를 증류수 1,000 ml 에 용해한 뒤 pH 를 2.2 로 조절한 액) 을 가하여 완전히 용해시켜서 여과하고 amino acid autoanalyzer (LKB 4150) 로 분석하였다.

## 결 과

### 순도 및 $R_f$ 치

저해물질을 acetic acid/water (3:1), acetic acid/acetone (1:1), pyridine/n-butanol/water (3:4:7), acetone/water (3:2) 등의 전개용매 system 을 사용하여 thin layer chromatography 한 후 발색시킨 결과 단일 spot 로 나타났으며 그외 여러 가지 전개용매에서 전개시킨 뒤  $R_f$ 치를 조사한 결과는 Table 1 과 같다.

### 용해성

저해물질의 여러 가지 용매에 대한 용해성을 조사한 결과 water, formic acid, ethylene glycol monomethyl ether 에서 용해되었으나 그외 각종 용매에서는 불용이었으며 매우 흡습성이 큰 물질이었다. 그리고 thermal analyzer (Du pont Instrument 1090) 로 융점을 측정한 결과 154.3~155.3°C 였다.

### 생화학반응

본 저해물질은 phenol-sulfuric acid test (23) 에 의해

**Table 1.  $R_f$  value of  $\alpha$ -D-glucosidase inhibitor in various solvent systems .**

Solvent	$R_f$
n-Butanol : acetic acid : water (4 : 1 : 5)	0.12
Phenol : water (3 : 1)	0.18
Pyridine : n-butanol : water (3 : 4 : 7)	0.62
Chloroform : methanol : water (15 : 5 : 1)	0.10
Acetic acid : water (3 : 1)	0.57
Acetone : water (3 : 2)	0.56
Propanol : formic acid : water (2 : 1 : 5)	0.71
Acetic acid : acetonitrile (1 : 1)	0.47

Estimation of  $R_f$  value was carried out with silica gel thin layer chromatography (5×20 cm) and coloration of the spot was performed with silver nitrate-sodium hydroxide.

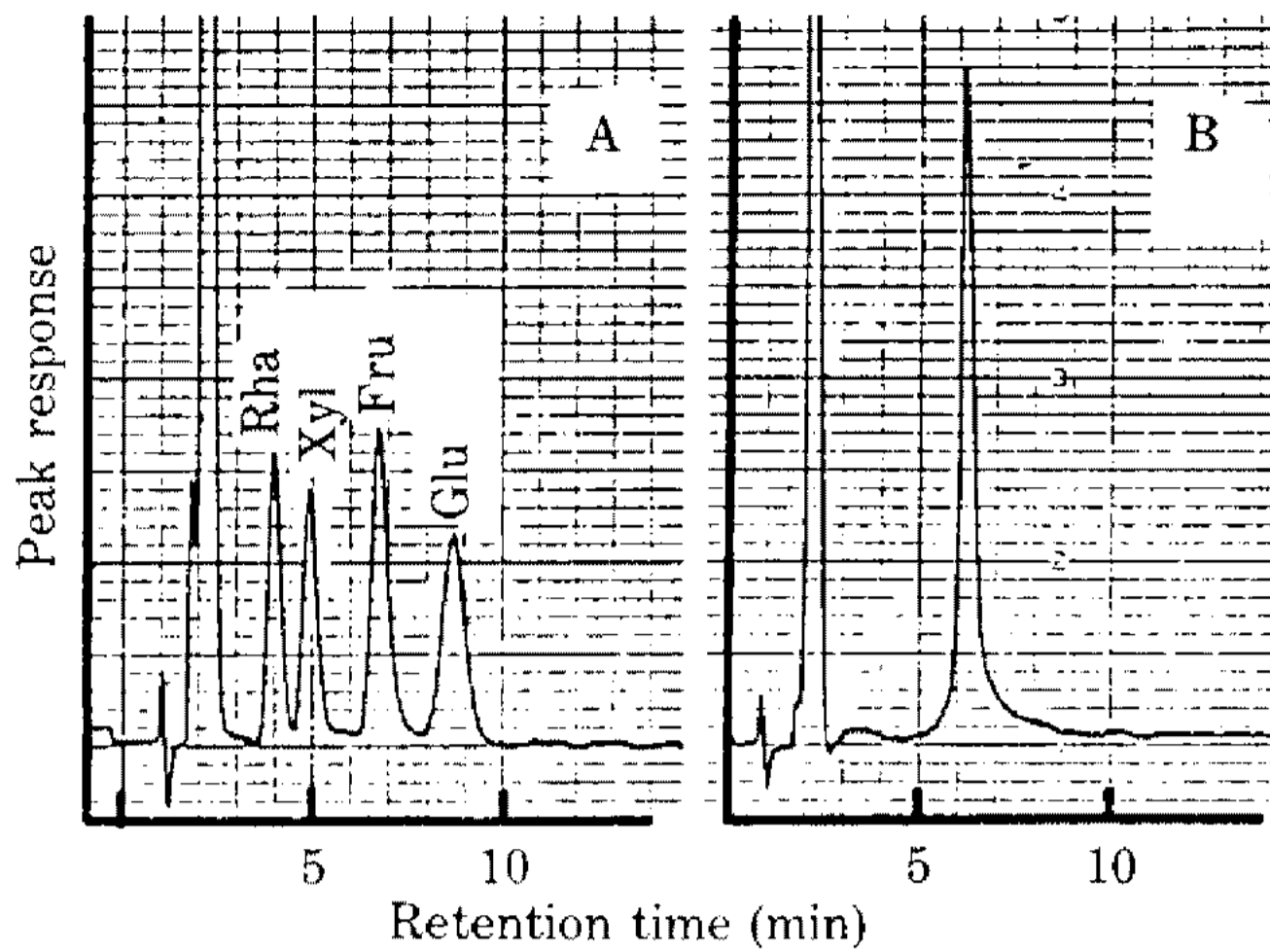
**Table 2. Biochemical reaction of  $\alpha$ -D-glucosidase inhibitor**

Reaction	Result
Phenol-sulfuric acid	+
Ninhydrin	+
DNS	-
Silver nitrate-sodium hydroxide	+
Fluorescence	+

서 양성반응을 나타내므로 당류인 것이 확인되었으나 그외 주요 radical 의 존재여부를 조사한 결과 Table 2 와 같이 ninhydrin 반응 (21) 에 양성을 나타내므로  $\text{NH}_2$  group 을 가지고 있으며 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 반응 (24) 에 음성이므로 환원력이 없는 당류인 것으로 추정되며 당류에 특이적으로 흑색반응을 나타내는 silver nitrate-sodium hydroxide (21) 에 양성이므로 본 저해물질은 합질소 saccharide 로 추정되며 자외선 조사하에서 청색형광을 나타내었다.

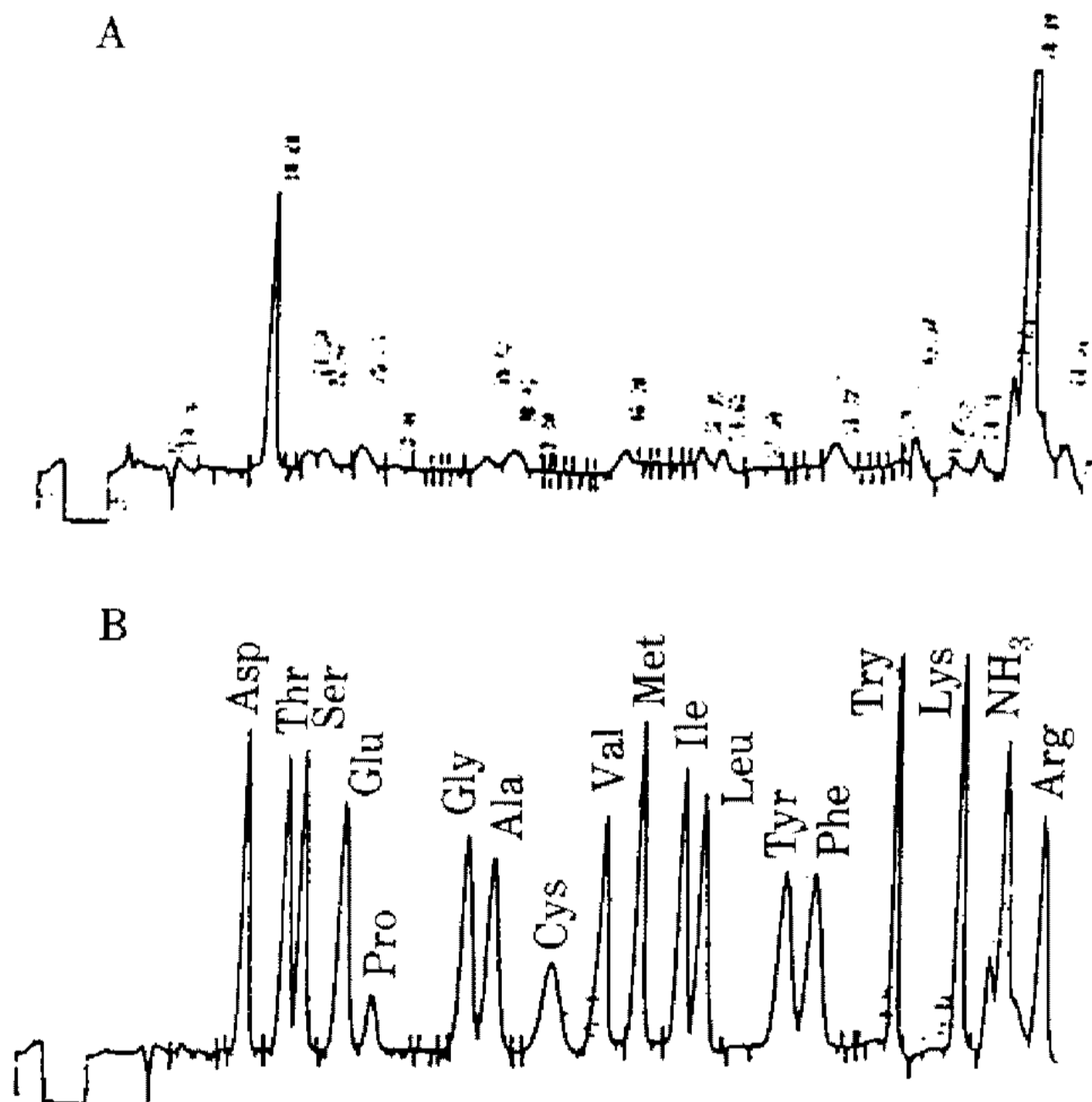
### 당 및 아미노산 조성

본 저해물질을 구성하고 있는 당의 종류 및 조성을 HPLC 를 이용하여 조사한 결과는 Fig.1 과 같이 fructose 인 것이 확인되었으며 fructose 이외의 당은 검출되지 않았다. 그리고 본 저해물질은 ninhydrin 반응 (21) 에 양성을 나타내므로 amino acid 의 종류를 조사한 결과는 Fig.2 와 같이 aspartic acid 로 확인되었다.



**Fig. 1. HPLC chromatogram for acid hydrolysate of the inhibitor**

A: Standard sugar, B: Inhibitor  
 Rha: Rhamnose, Xyl: Xylose, Fru: Fructose, Glu: Glucose.  
 Model: Waters Associate Model 244, Column: Lichrosorb NH<sub>2</sub> (4×250 mm), Solvent: Acetonitrile : H<sub>2</sub>O : BuOH (80:20:5), Detector: Differential Refractometer (RI), Sensitivity: 8×, Flow rate: 2.0 ml/min, Chart speed: 1 cm/min.

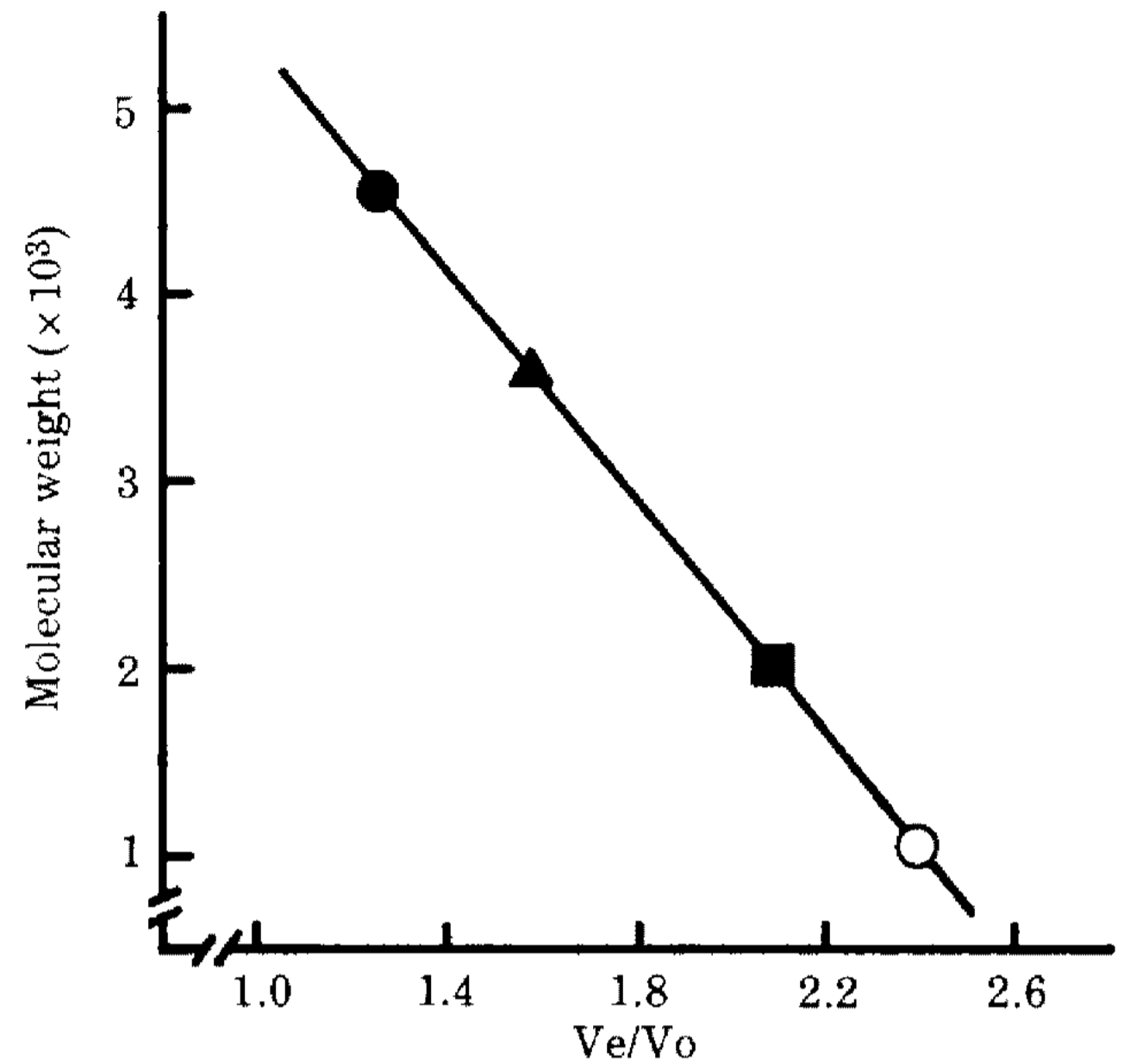


**Fig. 2. Analysis profile for acid hydrolysate of the inhibitor by amino acid autoanalyzer**

A: acid hydrolysate of inhibitor  
 B: standard amino acid

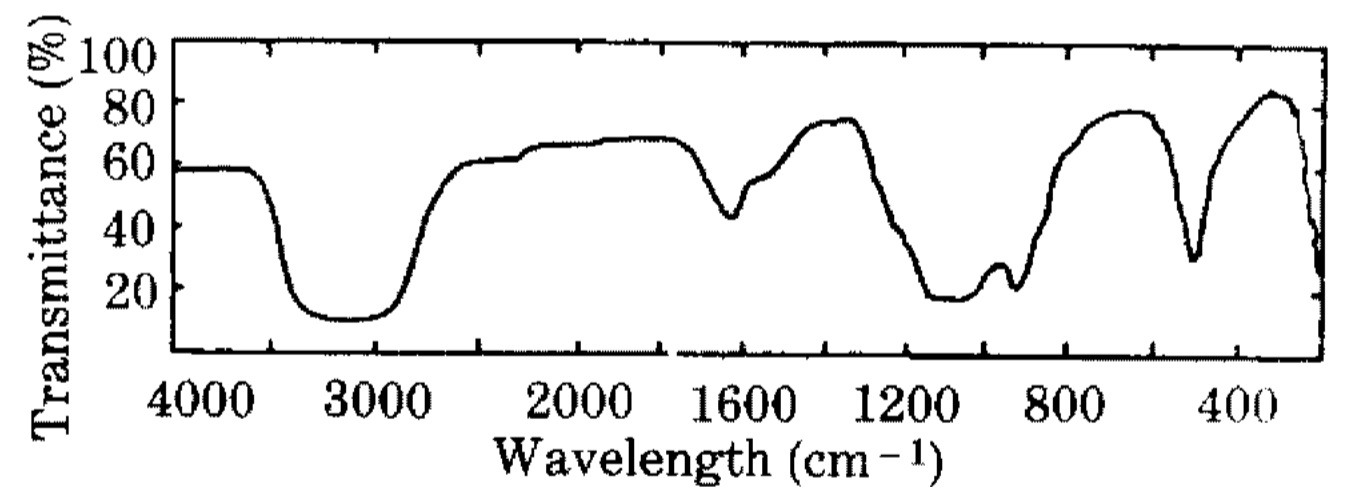
**분자량 추정**

저해물질의 분자량을 Sephadex G-25 column chromatography (1.2×87 cm)에 의해서 측정한 결과 약 1,050 이었다 (Fig.3).



**Fig. 3. Molecular weight determination of the inhibitor by Sephadex G-25 gel chromatography.**

Purified inhibitor and standard peptides were put on a column of Sephadex G-25 (1.2×87 cm) equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 0.1 M KCl. The buffer solution was allowed to flow at a rate of 10 ml per hr. Fraction of 1 ml was collected. ●: ACTH (Mw. 4566), ▲: glucagon (Mw. 3550), ■: gastrin I (Mw. 2000), ○: purified inhibitor. The void volume (Vo) was determined using blue dextran 2000. Vo vs. Ve represented void volume vs. elution volume, respectively.



**Fig. 4. Infrared spectrum of α-D-glucosidase inhibitor (in KBr).**

**Infrared spectrum**

정제된 저해물질의 infrared spectrum 을 측정하기 위해 infrared spectrophotometer (Perkin-Elmer 599B)를 사용하여 흡광 spectrum 을 조사한 결과 Fig.4 와 같이 2900~3400 cm<sup>-1</sup>, 1640 cm<sup>-1</sup>, 1010~1150 cm<sup>-1</sup>, 930 cm<sup>-1</sup>, 500 cm<sup>-1</sup> 부근에서 흡광대역이 나타났다.

**고 찰**

본 저해물질은 R<sub>f</sub>치가 acetic acid/water (3:1)에서

0.57, acetic acid/acetonitrile(1 : 1)에서 0.47, pyridine/n-butanol/water(3 : 4 : 7)에서 0.62, acetone/water에서 0.56, propanol/formic acid/water(2 : 1 : 5) system에서 0.71이었다. 그리고 저해물질의 melting point는 154.3~155.3°C였으며 물, formic acid, ethylene glycol monomethyl ether에는 용해되지만 그외 대부분의 용매에서는 불용이었고 매우 흡습성이 큰 물질이었다. Phenol-sulfuric acid(23), ninhydrin(21), silver nitrate-sodium hydroxide 반응(21)은 양성이었으나 DNS 반응(24)에서는 음성이며 자외선 조사하에서 청색형광을 나타내었다. 저해물질을 구성하고 있는 성분은 당류로서는 fructose였고, 아미노산으로서는 aspartic acid가 검출되었으며, Chromatography 법에 의해서 측정된 분자량은 약 1,050이었다. 지금까지 발견된 저해물질은 그 구성성분이 다양하여 Haim I, II(25), Paim(11), *Cladosporium herbarum*이 생산하는 저해물질(5)과 같은 단백질성 저해제, glycoprotein(26), oligosaccharide(7), 질소함유 oligosaccharide(15, 16, 27), piperidinose sugar antibiotic(nojirimycin)(17), homologous pseudo-oligosaccharide(6) 등으로서 본 저해물질의 구성성분 중의 하나인 fructose가 함유된 저해물질은 거의 발견되지 않았다.

## 요 약

정제된 저해물질의  $R_f$ 치는 0.12~0.71 사이였으며 melting point는 154.3~155.3°C로 나타났다. 물, formic acid, ethylene glycol monomethyl ether에는 용해되지만 그외 대부분의 용매에서는 불용성이었고 흡습성이 매우 큰 물질이었다. Phenol-sulfuric acid, ninhydrin, silver nitrate-sodium hydroxide 반응은 양성이었으나 DNS 반응에서는 음성이며 자외선 조사하에서 형광을 나타내었다. 저해물질의 구성성분은 fructose와 aspartic acid로 확인되었으며 분자량이 약 1,050 정도였다.

## 참고문헌

1. Maeda, K., Y. Takamori and O. Oka: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2873 (1982).
2. Lajolo, F.M. and F.F. Filho: *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 132 (1985).
3. Strumeyer, D.H. and M.J. Malin: *Biochem. Biophys. Acta*, **184**, 643 (1969).

4. Murao, S. and K. Ohyama: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2271 (1975).
5. Saito, N.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 3120 (1982).
6. Schmidt, D.D., W. Frommer, B. Junge, L. Müller, W. Wingender, E. Truscheit and D. Schäfer: *Naturwissenschaften*, **64**, 535 (1977).
7. Ohyama, K. and S. Murao: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2221 (1977).
8. Murao, S. and K. Ohyama: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 679 (1979).
9. Murao, S., K. Ohyama, H. Murai, A. Goto, Y. Matsui, K. Fukuhara, S. Miyata, M. Sumida and M. Arai: *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **26**, 157 (1979).
10. Goto, A., Y. Matsui, K. Ohyama, M. Arai and S. Murao: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 83 (1983).
11. Murao, S., N. Oouchi, A. Goto and M. Arai: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 453 (1983).
12. Murao, S., N. Oouchi, A. Goto and M. Arai: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 107 (1985).
13. Oouchi, N., M. Arai and S. Murao: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 793 (1985).
14. Arai, M., N. Oouchi and S. Murao: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 987 (1985).
15. Itoh, J., S. Omoto, T. Shomura, H. Ogino, K. Iwamatsu and S. Inouye: *J. Antibiot.*, **34**, 1424 (1981).
16. Yokose, K., K. Ogawa, T. Sano, K. Watanabe, H.B. Maruyama and Y. Suhara: *J. Antibiot.*, **36**, 1157 (1983).
17. Niwa, T., S. Inouye, T. Tsuruoka, Y. Koaze and T. Niida: *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 966 (1970).
18. Do, J.H. and H.K. Joo: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 202 (1989).
19. Do, J.H. and H.K. Joo: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 207 (1989).
20. Do, J.H. and H.K. Joo: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 529 (1989).
21. Dawson, R.M.C., D.C. Elliott, W.H. Elliott and K.M. Jones: *Data for biochemical research*, Oxford University Press, Oxford, 2nd ed. pp.509-550 (1969).
22. Andrews, P.: *Biochem. J.*, **96**, 595 (1965).
23. Meloan, D.E. and Y. Pomeranz: *Food analysis laboratory experiments*, The AVI Publishing Company, Inc., Pennsylvania, p.85 (1973).
24. Colowick, S.P. and N.O. Kaplan: *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc., New York, Vol. 1, p.149 (1955).
25. Murao, S., A. Goto, Y. Matsui and K. Ohyama: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1679 (1980).
26. Koba, Y., M. Najima and S. Ueda: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1167 (1976).
27. Namiki, S., K. Kangouri, T. Nagate, K. Sugita, H. Hara, E. Mori, S. Ohmura and M. Ohzeki: *J. Jap. Soc. Starch. Sci.*, **26**, 134 (1979).

(Received January 24, 1990)