

## *Streptomyces* sp. DMCJ-49 균주가 생산하는 $\alpha$ -Amylase 저해제 MB4-03의 분리와 구조분석

염대현 · 최응철\* · 김진웅 · 김병각

서울대학교 약학대학

### Isolation and Structural Analysis of MB4-03, an $\alpha$ -Amylase Inhibitor Produced by *Streptomyces* sp. DMCJ-49

Yum, Dae-Hyun, Eung-Chil Choi\*, Jin-Woong Kim and Byong-Kak Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**MB4-03, an  $\alpha$ -amylase inhibitor was isolated from the culture broth of *Streptomyces* sp. DMCJ-49 and purified through ion-exchange chromatography, adsorption, and gel filtration. The results of various instrumental analyses showed that the inhibitor was one of oligosaccharides that had glucoses as its major component and that its molecular weight was about 2000. And one methyl group which seemed to be related with the inhibitory activity of this compound was identified. From the CMR spectrum, it was elucidated that this compound was composed of  $\alpha$ -D-glucopyranoses which were linked together by  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  bond configuration. As the inhibitory effect of this compound was reduced after incubation with  $\beta$ -amylase, the maltose units was seemed to exist at non-reducing terminal side of it.**

인간의 섭취음식에 있어서 탄수화물의 주종인 전분은 위장관에서  $\alpha$ -amylase에 의해 maltose로 분해된다. Maltose는 소장의 maltase에 의해 glucose로 가수분해되어 혈류로 흡수된다. 전분의 소화는 신속한 과정으로서 이를 통해 혈당량과 insulin level의 상승이 이루어진다. 이와 같은 postprandial hyperglycemia나 이에 수반되는 insulin량의 급격한 증가는 비만환자 또는 당뇨병을 가진 환자들에게는 바람직하지 못한 것이다.

따라서 postprandial hyperglycemia 또는 hyperinsulinemia는 diet 중의 전분함량을 조절하거나 meal size를 일반적인 권장량으로 조절하는 식이요법으로 경감시킬 수 있다. 그러나 실제적으로 이러한 치료법은 환자가 잘 순종하느냐 하는 문제로 인해 그 실효를 거두기가 어려울 가능성이 높다. 따라서  $\alpha$ -amylase나  $\alpha$ -glucosidase에 의한 탄수화물소화의 제한은 이러한 질병들의 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것이다. 이러한 목

적으로 여러 종류의  $\alpha$ -amylase inhibitor들이 연구되어 오고 있다. 이들  $\alpha$ -amylase에 대한 억제물질들은 탄수화물 특히 전분의 소화속도를 지연시킴으로서 그 흡수 kinetics에 영향을 나타내어 혈당량의 고른 분포를 가능케 하며, 또한 포도당의 지질로는 전환을 차단하는 것으로도 알려져 있다(1, 2).

이들 저해물질들은 주로 oligosaccharide 계통의 물질과 polypeptide 계통의 물질들이며 *Streptomyces*속에서 nojirimycin, amylostatin, oligostatin, trestatin, adiposin 등이 분리되었다(3-9).

Peptide 계통의 물질로서는 X-2와 haim 등이 보고되어 있다(2, 10). Oligosaccharide 계통의 저해제들은 대부분이 그 구조상에 4,6-dideoxy-4-aminosugar의 amino group이 unsaturated[or saturated]cyclitol(hexitol)로 치환되어 core structure로 구성되어 있고 이 구조의 좌우측에 glucose 분자들이 연결된 양상을 하고 있다(2, 11).

본 실험에서는 한국토양에서 분리되어 보관 중인  $\alpha$ -amylase 저해제 생산 균주인 *Streptomyces* DMCJ-49

**Key words:**  $\alpha$ -amylase inhibitor, oligosaccharide,  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  linkage,  $\alpha$ -amylase, maltose unit.

\*Corresponding author

에 대하여 그 대량배양을 통한 저해물질의 분리와 구조 분석에 관하여 연구하였다(12).

## 재료 및 방법

### 균주

본 연구실에서  $\alpha$ -amylase 저해제 생성균주로 선발된 *Streptomyces* sp. DMCJ-49 균주를 이용하였다(12).

### 배지 및 시약

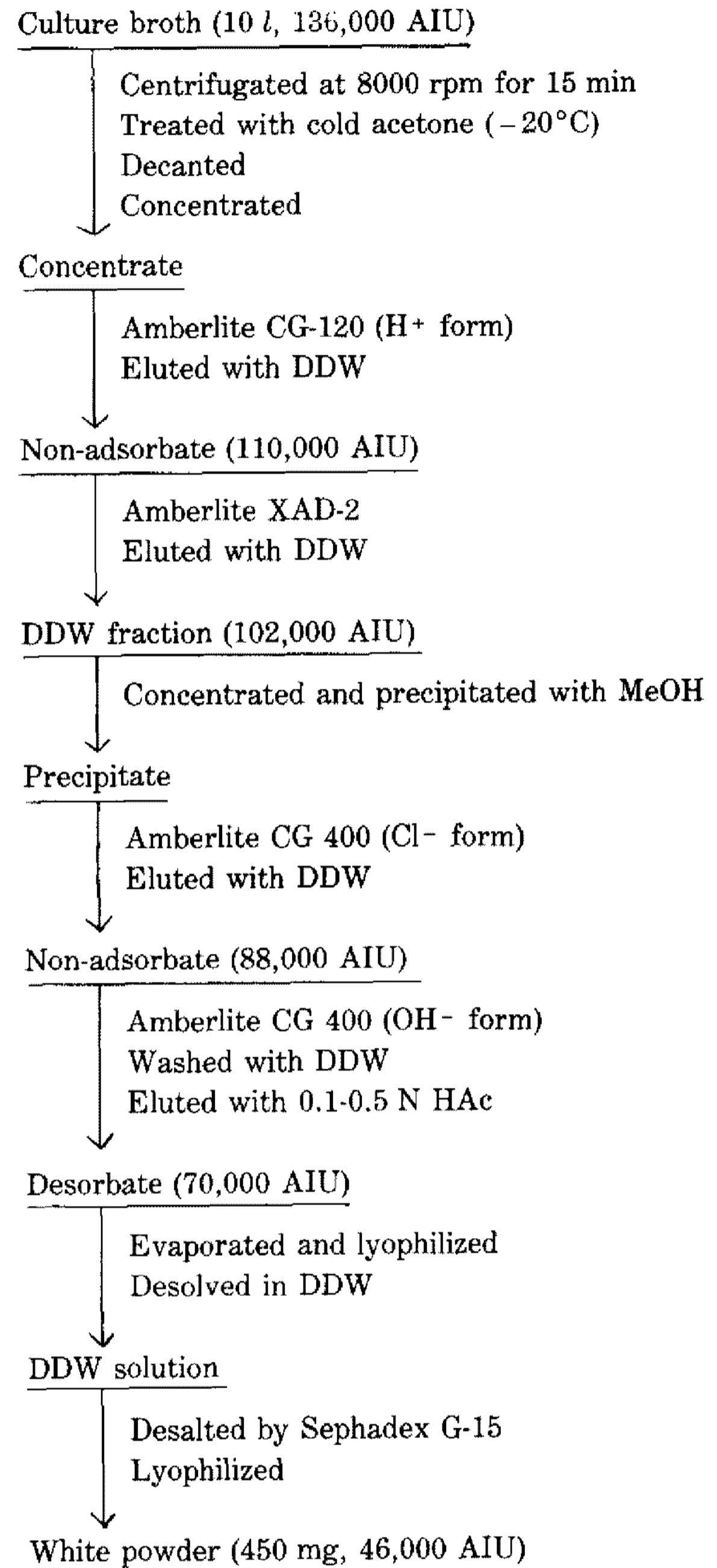
Bacterial  $\alpha$ -amylase 등의 enzyme 은 Sigma 사 제품을 사용하였다.  $\alpha$ -amylase 저해제 생성을 위한 배지는 oatmeal 배지 (oat meal 20g, yeast extract 1g, distilled water 1,000 ml, pH 7.0)를 사용하였다. 배지의 중요 성분은 Junsei 사 및 Difco 사 제품을 사용하였다. 물질분리용 시약으로 Amberlite CG-120 등은 Sigma 사 제품을 사용하였으며, 기타 중요시약들은 시판특급시약을 사용하였다.

### 액내배양

본 실험실에서 수행된 연구(13)에서 확립한 검색계를 이용하여 bacterial  $\alpha$ -amylase 에 대한 저해제 생성을 확인하고 역시 확립된 최적 배양조건에 따라 확인 후에, 1, 2 차 및 본 배양을 실시하였다. 물질분리 단계에서도 같은 검색계를 적용하였다(12, 13).

### 저해물질의 분리

5 일 배양한 culture broth 를 8,000 rpm 에서 15 분간 원심분리하여 상등액을 수확하고, 이것을 동량의 cold acetone 으로 처리하여 하루 방치시켜서 생성되는 침전을 제거하였다. 그 상등액을 50°C 이하에서 감압 농축하여 농축액 (120 ml)을 얻고 cation exchange Amberlite CG-120(H<sup>+</sup>-form, V<sub>t</sub>=230 ml)에 적용시켜 탈이온수로 용리시켜 색소물질을 제거하고 양이온성의 불활성 물질들을 흡착시켜 제거하였다. 저해활성을 나타내는 탈이온수 분획을 50°C 이하에서 다시 감압농축한 후에 흡착 chromatography로서 Amberlite XAD-2(14.5×13 cm) column 에 적용시켜 활성을 갖는 비흡착 부분만을 다시 탈이온수로 용리시키고 비활성 흡착분획은 분리 제거하였다. 다시 감압농축하여 얻은 농축액(20 ml)를 20 배의 MeOH 에 서서히 가하여 백색의 침전물을 얻었고, 이 침전을 원심분리한 후 탈이온수 100 ml 에 녹인 후 감압농축하여 잔류 MeOH 을 제거하였다. 얻어진 농축액(10 ml)을 음이온 교환 column 인 Amberlite



**Fig. 1. Purification scheme of  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Streptomyces* sp. DMCJ-49.**

CG-400(Cl<sup>-</sup>-form, V<sub>t</sub>=120 ml)에 먼저 적용시켜서 흡착되는 불순물을 제거하고 활성인 탈이온수 분획을 얻고 이를 감압농축 후에 Amberlite CG-400(OH<sup>-</sup>-form) column 에 결합 적용시킨 후 탈이온수 300 ml 로 washing 한 후 0.1~0.5 M HAc 로 용리시켰다. HAc 의 활성분획을 pH 5.0 으로 조절한 후 감압농축하고 동결건조시켜 얻은 분말을 탈이온수에 용해시킨 후 Sephadex G-15(2.0×45 cm)를 통과시킨 후 다시 동결건조하여 백색의 분말을 얻었다. 이상의 과정을 Fig.1 에 나타내었다.

### 확인반응

분리된 저해물질의 0.1% (w/v) 수용액을 시료용액으로 하여 anthrone 반응, Molish 반응, iodine 반응, phenol-황산반응, tryptophan 반응, biuret 반응 및 ninhydrin 반응을 실시하였다(14, 15).

### 저해제의 기기분석

JEOL GSX-500 과 Bruker-WP 80 SY 를 사용하여 저해제 및 저해제를 acetyl 화한 물질의 PMR 및 CMR spectrum 을 얻었다. Acetyl 화한 저해제의 80 MHz PMR 은 TMS 을 표준물질로 하여 CDCl<sub>3</sub> 을 용매로 하여 실시하였으며, 저해제의 500 MHz PMR 은 DSS 를 표준물질로, D<sub>2</sub>O 을 용매로 하여 실시하였고, 저해제의 125 MHz CMR 은 dioxane 을 표준물질로, D<sub>2</sub>O 을 용매로 하여 실시하였다. 저해제 시료 (20 mg) 을 NaBH<sub>4</sub> (2 mg) 을 사용하여 환원시킨 후에 methanolysis 시키고 trimethylsilyl 유도체로 만든 후 OV-1 column 을 이용하여 GLC chromatogram 을 얻었다. 환원시키지 않은 저해제와 표준당류들에 대하여는 methanolysis 시킨 후 TMS 유도체로 하여 역시 Shimadzu GC(OV-1 column) 으로 단당류 분석에 이용하였다. 원소분석은 Perkin-Elmer 240C 기기를, UV scanning 은 Hitachi Model ESP-35 를, IR 은 Beckman IR-20A (KBr disk 법) 을 사용하였으며, Fab mass spectrum 은 mNBA (meta-nitrobenzylalcohol) 에 용해시킨 후 glycerin 을 matrix 로 하여 JEOL HS-110 형기기를 이용하여 얻었다.

### $\beta$ -amylase 에 의한 저해능 억제효과

분리한 저해제의 0.1% 수용액에 대하여 각 시험관 당 시료용액 1 ml 와 2.0 U/ml 의  $\beta$ -amylase 1 ml 를 가하고 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 분간씩 25°C 에서 반응시킨 후 비수욕 중에서 5 분간 끓여서 반응을 정지시키고 그 잔류되어 있는 억제능을 물질분리 단계와 동일한 검색계로 assay 하였다.

### 결과 및 고찰

#### 저해물질의 분리 및 확인반응

Fig. 1 의 분리과정을 통하여 배양액 10 l 로부터 450 mg 의 백색분말의 저해물질을 분리하였다. 각종 확인반응에서는 anthrone 반응, Molisch 반응 및 phenol 황산 반응 등에서 강한 양성을 나타내었다.

Iodine 반응, ninhydrin 반응 및 biuret 반응에서는

**Table 1. Various color reactions for the  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Streptomyces* sp. DMCJ-49.**

Reaction	Result	Component identified
Anthrone test	Greenish blue	Saccharide
Molish test	Purple ring	Saccharide
Phenol-sulfuric acid test	Brown ring	Saccharide
Tryptophane test	Positive	Saccharide
Iodine test	No change	No starch
Biuret test	No change	No peptide
Ninhydrin test	No change	No peptide

**Table 2. Retention times of standard monosaccharides and the  $\alpha$ -amylase inhibitor in G.L.C.**

Standard material	Retention time (min)			
Glucose	4.82	16.02	17.09	
Xylose	5.72	5.79	7.09	9.18
Galactose	4.72	12.62		
Mannose	4.67	10.16		
Arabinose	3.32	4.67	5.32	6.00
Rhamnose	3.86	4.75		
Fucose	4.47	4.93	6.22	7.44
$\alpha$ -amylase inhibitor	4.85	16.14	18.05	

음성을 나타내었다. 이상의 결과는 Table 1 에 표시하였다.

#### 저해물질의 기기분석

각종의 기기분석 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

- UV (end absorption)
- IR (KBr, disk) : 3,300 (O-H), 2,900 (C-H), 1,030 (C-O) cm
- PMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  : 5.2~5.4 (-O-CH-O), 3.2~3.8 (-CH OH), 1.3~1.4 (-CH<sub>3</sub>)
- CMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  : 101.0, 78.6, 75.0, 73.0, 72.7 및 61.6
- MS (m/z) : 1013, 1174, 1336, 1498, 1661, 1822, 1985 (M<sup>+</sup>+Na)

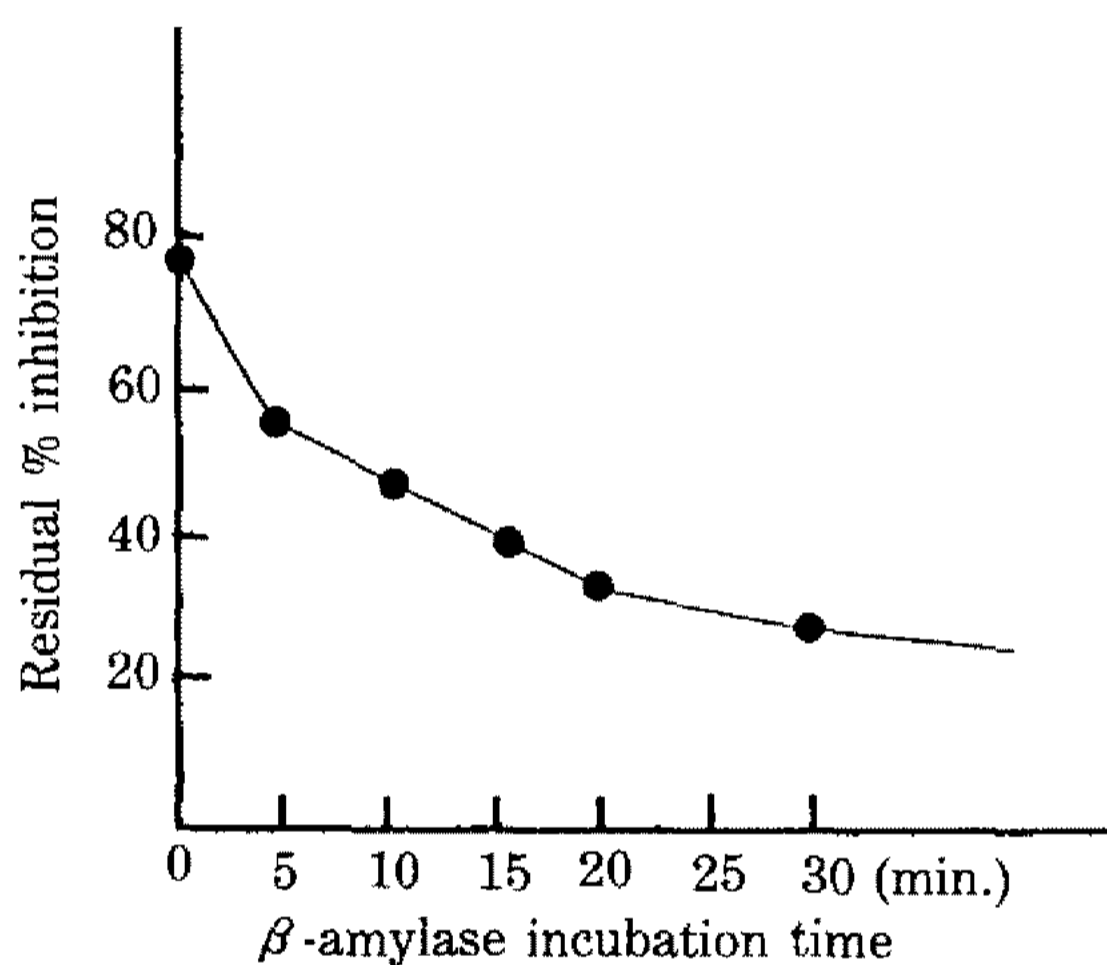
• 원소분석 : C, 39.43 ; H, 6.08 ; O, 54.1 ; N, 0.44 (%)  
환원시키지 않은 저해물질의 G.C 결과는 Table 2 에 표시하였다. NaBH<sub>4</sub> 로 환원시킨 결과 G.C spectrum 상에 glucitol peak 가 확인되었다.

저해물질은 확인반응에서 anthrone 반응, Molisch 반

**Table 3.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectral data for the  $\alpha$ -amylase inhibitor comparison with standard values.

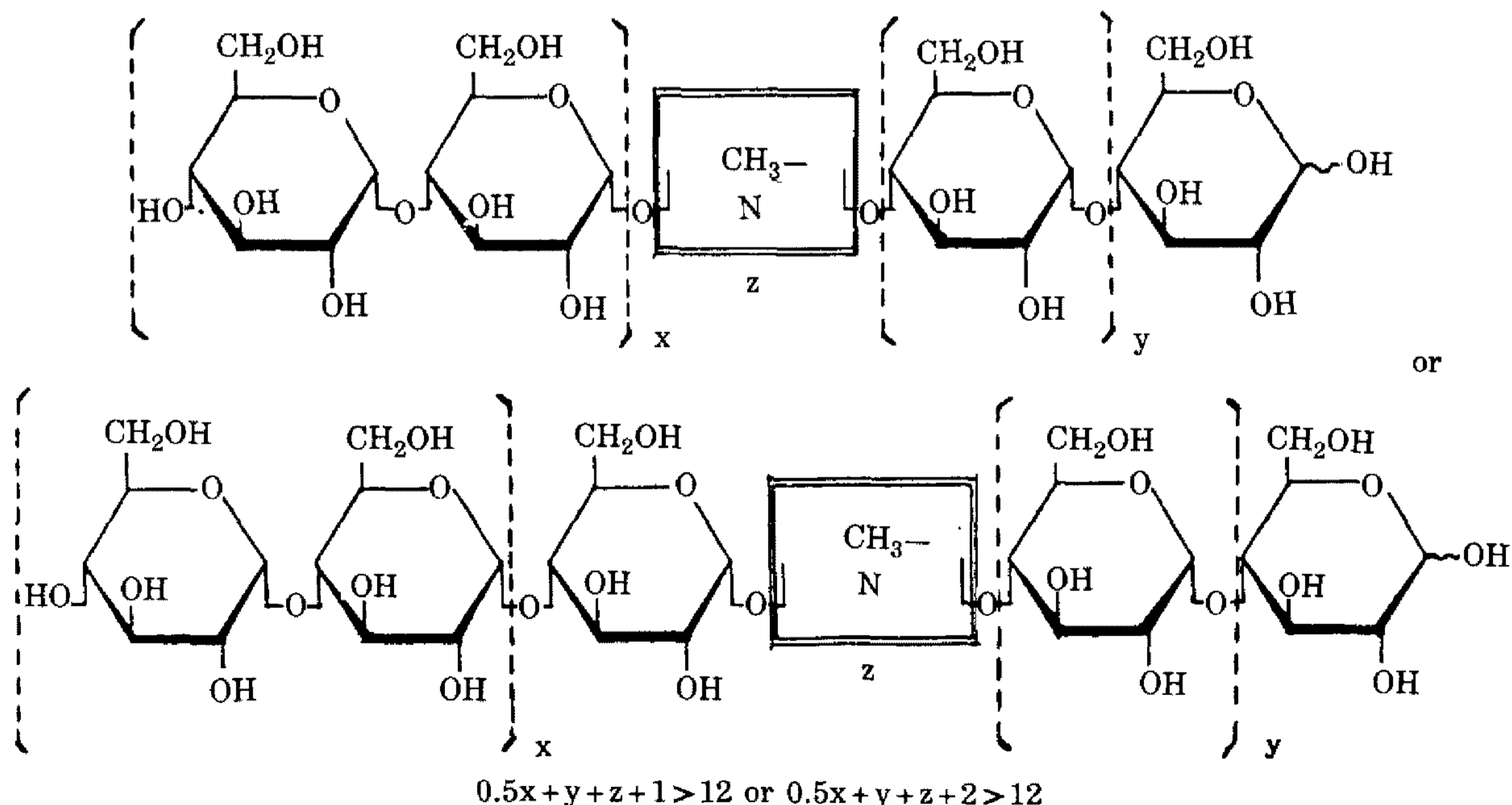
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Inhibitor	101.0 <sup>a</sup>	73.0	75.0	78.6	72.7	61.6
$\alpha$ -Glucose	92.9	72.5	73.8	70.6	72.3	61.6
$\beta$ -Glucose	96.7	75.1	76.7	70.6	76.8	61.7
Amylose	100.9	72.7	74.5	78.4	72.4	61.8
$\alpha$ -Glc (1 $\rightarrow$ 4)	100.7	72.8	73.9	70.4	73.6	61.6
$\alpha$ - $\alpha$ -Glc	92.8	72.3	74.1	78.5	71.0	61.6
$\alpha$ -Glc (1 $\rightarrow$ 6)	98.5	72.4	74.1	70.4	72.9	61.6
- $\alpha$ -Glc	92.9	72.4	74.1	70.4	70.4	66.4

<sup>a</sup> Chemical shift in ppm.



**Fig. 2.** Deactivation of the inhibitory effect of the  $\alpha$ -amylase inhibitor by  $\beta$ -amylase.

응 및 phenol 황산반응 등의 saccharide 확인반응에서 강한 양성을 보였으며, 전분형 고분자 구조를 확인하는  $\text{I}_2$  반응과 peptide 구조를 보는 ninhydrin 반응 및 biuret 반응에는 음성을 나타내어, oligosaccharide 계열의  $\alpha$ -amylase 저해제의 일종임을 보였다. UV scanning 시에는 다른 oligosaccharide 계열 저해물질과 같은 말단흡수를 보였으며 IR spectrum 상에서도 saccharide 특성 peak의 일반적인 양상을 보였다. 원소분석을 통하여  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ 의 당구조를 추정할 수 있었으며 소량의 질소원자의 포함을 추정할 수 있었다. Proton NMR에서는 일반적인 saccharide 성 peak 외에  $-\text{CHCH}_3$ 의 methyl기가 인정되었으며 ( $\delta$ : 1.3~1.4), 이것은 glucose 등의 단당류에서는 발견되지 않는 구조로서 질소원자와 함께, 이 물질의 저해 활성발현에 중심적인 부분이 될 것으로 보이며, 이미 발견된  $\alpha$ -amylase 저해물질들의 N-linked pseudosaccharide 구조와 일맥상통한다(8, 9). 하지만  $-\text{CH}-\text{CH}_3$ 의 methyl기를 인정케 한 chemical shift는 4,6-dideoxy 4-amino sugar unit에서 유래했을 가능성이 있기 때문에 이 부분의 구조결정을 확실히 하는 것이 필수적이다. G.C chromatography 결과로 D-(+)-glucose 분자가 91% 이상이라는 점과 glucose에 해당되는 peak와 거의 중첩된 다른 작은 peak(retention time의 차이유발)로부터 glucose와 경미한 구조적 차이를 가진 부분이 존재하리라는 것을 추정할 수 있었다. G.C에 의해 cyclitol unit의 존재가 확인되지 않았지만, 존재여부를 확실히 하기 위해 방법



**Fig. 3.** Possible structures of the  $\alpha$ -amylase inhibitor, MB4-03 from streptomyces DMCJ-49.

을 강구할 필요가 있다. 분리된 저해물질로 CMR 스펙트럼 자료를 보면, 표준 단당류들의 carbon peak (ppm)들과의 비교를 통해 C<sub>2</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>의 공명 위치가  $\alpha$ -D-glucose와 일치하며 C<sub>1</sub> 및 C<sub>4</sub> 위치에서 치환에 의한  $\alpha$ -effect (down field shift)를 보인 것을 통해 분자구조는  $\alpha$ -D-glucopyranose의  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4) link conformation임을 알 수 있었다. 또한 결합에 참여하지 않은 free C<sub>4</sub> peak의 부재를 통해서 oligostatin에서와 같은 C<sub>1</sub> $\rightarrow$ C<sub>1</sub>의 trehalose 구조가 존재하지 않는 것을 알 수 있었다 (6).

Fab mass 상에서도 평균 glucose 분자량에 해당되는 m/e 162의 연속적인 감소사실을 확인할 수 있었으며, molecular ion peak는 1985(M+Na<sup>+</sup>)로 추정되었다. 이를 통해 분자전체를 glucose로 환산해 보면 monomer의 갯수는 12개 가량이 될 것으로 추정된다. 이 경우 이 물질이 Schmidt 등의 BAYe 4609와 같은 비교적 작은 분자(monomer 갯수 5개)와는 차이를 보임을 알 수 있었다(9). 또한 proton NMR 상에서 불포화 이중결합에 의한 공명은 일어나지 않고 있음을 알 수 있는데 이것은 trestatin과의 차이점이다(8). 더욱  $\beta$ -amylase에 의해 이 물질의 저해능이 감소되는 것을 통해 활성발현에 있어 중심이 되는 구조는 직선형 구조의 내측에 위치할 것임을 추정할 수 있다. 이것은  $\beta$ -amylase의 작용 특성이 비환원성 말단으로부터 연속적으로 기질로부터 maltose( $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)형) unit를 제거하기 때문이다.

따라서 이 분자는 Schmidt 등의 BAYe 4609 등의 구조와는 비당 부분의 위치에서 차이를 보이는 것으로 사료된다.

이상의 결과를 토대로 하여, 저해활성의 중심적인 부분의 구조는 아직 명확치 않으나 추정가능한 저해물질의 구조를 Fig. 3에 도시하였으며, 이  $\alpha$ -amylase 저해물질을 잠정적으로 MB4-03이라 부르기로 하였다.

## 요 약

*Streptomyces* sp. DMCJ-49 균주의 배양액으로부터 분리된  $\alpha$ -amylase 저해물질 MB4-03은 그 구조상 질소원자와 methyl기를 포함하는 일종의 직선형  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4) 결합으로 연결된 glucose의 변형된 oligomer 형태로서 구성 단당류는 12 정도로 추정된다.

## 감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 목적기초연구비로 수행된

것으로 동 재단에 깊이 감사한다. NMR 및 Mass spectroscopy 측정에 편의를 제공해 주신 日本, 東京大學의 Ushio Sankawa 선생님께 깊은 감사의 뜻을 포함한다.

## 참고문헌

1. Brodbeck, U.: *Enzyme inhibitors*, Verlage Chemie, Heidelberg, New York, p109 (1980).
2. Deshpande, B.S., S.S. Ambedkam and J.G. Shewale: Biologically active secondary metabolites from *Streptomyces*. *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 455 (1988).
3. Niwa, T., S. Inouye, T. Tsuruoko, Y. Koaze and T. Nidada: Nojirimycin as a potent inhibitor of glucosidase. *Agr. Biol. Chem.* **34**, 966 (1970).
4. Ueda, S. and Y. Koba: Properties of amylase inhibitor produced by *Streptomyces* species. *Agr. Biol. Chem.* **37**, 2025 (1973).
5. Murao, S. and K. Ohyama: New amylase inhibitor (S-AI) from *Streptomyces distaticus* var. *amylostaticus*. *Agr. Biol. Chem.* **39**, 2271 (1975).
6. Itoh, J., S. Omoto, T. Shomura, H. Ogino, K. Iwamatu and S. Inouye: Oligostatins, new antibiotics with amylase inhibitory activity I. Production, isolation and characterization. *J. Antibiotics* **34**, 1424 (1981).
7. Namiki, S., K. Kangouri and T. Nagate: Studies on the  $\alpha$ -glucoside hydrolase inhibitor, adiposin, I. Isolation and physico-chemical properties. *J. Antibiotics* **35**, 1234 (1982).
8. Yokose, K., K. Ogawa, T. Sano, K. Watanabe, H.B. Maruyama and Y. Suhara: New  $\alpha$ -amylase inhibitor, trestatin, I. Isolation, characterization and biological activities of trestatins A, B and C. *J. Antibiotics* **36**, 1157 (1983).
9. Schmidt, D.D. W. Frommer, B. Junge, L. Muller and W. Wingender: Glucosidase inhibitor. New complex oligosaccharides of microbial origin. *Naturwissenschaften* **64**, 535 (1977).
10. Murao, S., A. Goto, Y. Matsui and K. Ohyama: New proteinous inhibitor (Haim) of animal  $\alpha$ -amylase from *Streptomyces griseosporus* YM-25, *Agr. Biol. Chem.* **44**, 1679 (1981).
11. Truscheit, E., B. Frommer, L.M. Junge, D.D. Schmidt and W. Wrigender: Chemistry and biochemistry of microbial  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Angew. Chem. Int. ed. (Engl)* **20**, 744 (1981).
12. 정동직, 광진환, 최응철, 김병각:  $\alpha$ -아밀라제 저해제 생성 *Streptomyces* DMCJ-49의 동정과 저해제의 분리, 약학회지 **33**, 175(1989).
13. Kwak, J.H., E.C. Choi and B.K. Kim: Studies on screening and isolation of  $\alpha$ -amylase inhibitors of soil microorganisms (I). Isolation and activities of the inhibitor of

- Streptomyces* strain DMC-225. *Arch. Pharm. Res.* **8**, 67 (1985).
14. Chaplin, M.F. and J.F. Kennedy: *Carbohydrate analysis*, IRL press, Oxford (1986).
  15. Hiroshi, S.: carbon-13 NMR study of saccharides. *Heterocycles* **11**, 616 (1978).
  16. Dell, A. and C.E. Ballou: Fast atom bombardment mass spectrometry of a 6-O-methylglucose polysaccharide. *Biomedical Mass Spectrometry* **10**, 50 (1983).
  17. Gorin, P.A.J.: Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem.* **38**, 13 (1980).
  18. Linscheid, M., J. Oangona, A.L. Burlingane, A. Dell and C.E. Ballou: Field desorption mass spectrometry of oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1471 (1981).

(Received July 23, 1990)