

Penicillium sp.-L4의 균성장 및 효소작용을 억제하는 β -glucosidase inhibitor의 분리 및 특성

김무성* · 하성운 · 전기봉 · 임달택 · 박병화 · 이보섭 · 이상린 · 최영길^{1,2}

(주)태평양 기술연구원 기반기술연구소, ¹한양대학교 생물학과,

²서울대학교 분자미생물학 연구센터

Isolation and Characterization of β -Glucosidase Inhibitor Suppressing Cell Growth and Enzyme Action of *Penicillium* sp.-L4. Moo-Sung Kim*, Sung-Yoon Ha, Gi-Boong Jeon, Dal-Taek Lim, Byung-Hwa Park, Bo-Seop Lee, Sang-Rin Lee and Yong-Keel Choi^{1,2}. Specialty Chemical Institute, Pacific R&D Center, Yongin 449-900, Korea, ¹Department of Biology, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea, ²Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea. - A producer of inhibitor against β -glucosidase of *Penicillium* sp.-L4 was screened from *Actinomycetes*, and the isolated strain was identified as *Streptomyces* sp. The inhibitor produced was very stable against heat, acidic and alkaline conditions, proteolytic and amylolytic enzymes. The inhibitor was purified from culture broth through activated carbon treatment, ultrafiltration, anion and cation exchange, activated carbon column, acetone precipitation and preparative HPLC. It showed inhibitory activities against a variety of disaccharide hydrolyzing enzymes produced by *P.* sp.-L4, and the mode of inhibition was competitive. Its structure and molecular formula was elucidated by IR, ¹H and ¹³C NMR and FAB/Mass spectrometry, which was identified as 1-deoxynojirimycin (dNM). dNM showed inhibitory effects on the cell growth and hydrolytic enzyme action of *P.* sp.-L4 on agar plate and infected lemon peel.

미생물 및 곤충 등의 병해에 의한 농작물 재배, 저장 중의 피해는 방제약제를 사용하지 않을 경우 약 20-40%에 이를 것으로 추정되며, 전체 병해의 절반정도는 미생물에 의한 병해이고 그 중 70-80%는 진균에 의해 발생하는 것으로 보고되었다(1, 2). 특히 곡물, 과일, 채소류의 수확 후 저장시에 진균 감염에 의한 변패는 생산성의 감소 뿐만 아니라 aflatoxin, penicillic acid, fumonisin 등 인체에 해로운 독소를 생성할 수 있다는 면에서 큰 문제로 여겨지고 있어(3, 4), 저장방법의 개선과 함께 장기간 저장에 따른 살균제의 남용 및 식물체의 약제흡수에 의한 인체독성을 줄일 수 있는 저독성의 물질 개발이 시급하다.

일반적으로 진균에 대한 항생물질은 진핵세포(eukaryotic cell)에 작용하기 때문에 인체 또는 동물에 독성을 유발할 가능성이 높을 것으로 추정되고 있으며(5), 이러한 가능성을 줄이고 원하는 진균류에 대한 특이적 방제 및 항진균제에 대한 내성균의 출현을 억제하기 위하여 최근에는 진균의 식물세포벽 분해효소에 대한 저해물질의 개발에 관한 연구가 많은 부분에서 진행되고 있다(6, 7). *Geotrichum candidum*의 polygalacturonase

를 저해하는 polyphosphate 계통의 물질이 *Streptomyces satsumaensis*로부터 보고되었고(8), 역시 polygalacturonase의 활성억제기능을 가진 glycoprotein 종류인 chro-galin이 *Pezizales* sp.로부터 보고되었으며(9), 이와 함께 식물 자체의 방어기작으로 생성되는 polygalacturonase inhibiting protein(PGIP)에 대한 생화학적, 분자생물학적 연구도 진행되고 있다(10, 11). 또 cellulase 활성억제 물질의 존재가 *Aspergillus terreus*의 배양액에서 확인되었고(12), Kawaguchi 등(13)은 cellulase의 transglycosidation 작용에 의해 cellulase 활성을 억제하는 물질을 합성하였으며, 식물 표면의 cutin질 분해효소인 cutinase의 활성억제에 의한 병원균 감염방지도 보고(14)되는 등, 병원균의 감염기작에 따라 식물세포벽 침투를 억제하는 다양한 물질이 연구되고 있다.

본인 등은 lemon, orange, 감귤 등 저장 중 진균에 의한 감염이 비교적 심한 감귤류 변패의 생물학적 제제에 의한 방제를 목적으로, 전보에서 변패 원인균인 *Penicillium* sp.-L4의 감염시 β -glucosidase의 작용이 초기에 중요함을 규명하였으며, 본 실험에서는 변패 원인균의 감염시 key enzyme으로 작용하는 β -glucosidase를 저해하는 물질을 토양 미생물로부터 분리하여 구조 및 특성을 확인하고, 분리된 저해물질에 의한 변패 억제효과를 조사하였다.

*Corresponding author

Tel. 82-331-281-8340, Fax. 82-331-284-8478

E-mail: prdcspch@interpia.net

Key words: *Streptomyces* sp., β -glucosidase inhibitor, *Penicillium* sp., Inhibition of fungal growth

재료 및 방법

사용균주

분해효소 제조 및 감염 실험에는 lemon에서 분리된 *Penicillium* sp.-L4를 사용하였으며, β -glucosidase inhibitor의 생산에는 토양에서 분리된 *Streptomyces* sp. BGI-1을 사용하였다.

β -Glucosidase inhibitor 생산균주의 분리

방선균 분리는 수집한 토양 시료를 90°C에서 2 시간 건열처리한 후, 적절히 희석하여 분리용 배지(15)인 Bennet's agar 배지 및 Humic acid-vitamin agar 배지에 접종한 뒤, 28°C에서 1-3 주간 배양하여 방선균 집락을 분리하였다. 이 때 경우에 따라 일반 세균 및 진균을 억제하기 위해 nalidixic acid, tetracyclin 및 cycloheximide를 각각 적절히 첨가하여 사용하였다. β -Glucosidase inhibitor의 생산균주 분리는 Monosodium glutamate(MSG) 배지(MSG 2.5, glycerol 10, K_2HPO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, 1% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 ml, 0.1% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 2 ml, 0.1% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 ml, 0.1% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 2 ml)를 사용하여, 28°C에서 5-10 일간 왕복진탕배양(120 rpm)하고 원심분리(Microfuge, 12,000 rpm)한 상등액을 crude inhibitor 용액으로하여 저해활성을 측정하였다. 분리된 균주는 oatmeal(OM) agar 배지에서 28°C, 7-10 일간 배양하여 사용하였으며, β -glucosidase inhibitor 생산균주의 동정은 International Streptomyces Project(16) 및 Gottlieb의 방법(17)에 기술된 순서에 따라 수행하였다.

β -Glucosidase 활성 및 β -glucosidase 저해활성 측정

β -Glucosidase activity는 *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside(PNPG)를 기질로 하여 측정하였다. 0.5 ml의 PNPG 용액(2 mM, 0.1 M acetate buffer, pH 4.5)에 효소용액 0.1 ml를 넣어 30°C 항온수조에서 10분간 반응시킨 후 0.9 ml의 1 M Na_2CO_3 를 첨가하여 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit는 상기 조건하에서 1 μ M의 nitrophenol을 형성하는 효소의 양으로 정의하였다. β -Glucosidase 저해활성은 상기 조건에서 inhibitor 용액 0.1 ml을 효소용액과 동시에 넣어 반응시켰으며, 1 inhibitory activity는 inhibitor 대신에 증류수를 넣은 control과 비교하여 50%의 효소활성을 저해하는 inhibitor의 양으로 정의하였다.

Inhibitor의 생산

OM agar 배지에서 배양된 *S. sp.* BGI-1의 포자 1 loop을 종균용 배지인 MSG 배지(200 ml/1 L Sakaguchi flask)에 접종하여 30°C, 120 rpm에서 3 일간 배양한 후,

변형된 MSG 배지(MSG 3.75, glycerol 15, K_2HPO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, 1% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 ml, 0.1% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 2 ml, 0.1% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 ml, 0.1% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 2 ml)를 사용하여 30 L 발효조(jar fermenter)에서 본배양하였다. 발효조에서의 배양조건은 배지량 20 L, 온도 30°C, 교반속도 350 rpm, 통기량 0.5 vvm이었으며 초기 pH는 7.0이었다.

효소별 저해활성 측정용 효소용액 제조

다양한 효소의 생산을 위해 *P. sp.*-L4는 밀기울 배지(wheat bran 5, yeast extract 0.5, tap water 5 g/L)에서 26°C, 5 일간 정체배양한 후, $CaCl_2$ - Na_2HPO_4 gelation(pH 6.0, final concentration 1% each)을 이용하여 과한 액을 crude enzyme solution으로 사용하였다.

분석조건

Inhibitor의 확인을 위한 TLC는 Silica gel 60F₂₅₄ plate(Merck)를 사용하여 전개용매로서 isopropanol: NH_4OH (2:1, v/v), 또는 n-propanol:pyridine:acetic acid:water(10:4:6:10, v/v)의 조성으로 전개하였으며 silver nitrate-sodium hydroxide 용액으로 발색시켰다. 분취용(preparative) HPLC을 이용한 정제 및 분석은 YMC pack NH_2 column(10×250 mm)을 사용하여 UV 203 nm에서 detection하였으며 이 때 eluent로는 acetonitril:water (83:27, v/v)를 flow rate 7.0 ml/min로 사용하였다. 분석용(analytical) HPLC을 이용한 분석은 YMC pack NH_2 column(4.6×250 mm)을 사용하여 UV 203 nm에서 detection하였으며 이 때 eluent로는 acetonitril:water(83:27, v/v)를 flow rate 1.0 ml/min로 사용하였다.

균성장 억제효과

a) Agar plate 상에서의 억제효과

탄소원으로 glucose, cellobiose, carboxymethylcellulose(CMC) 및 polygalacturonase(PG)를 각각 0.5%(w/v)되게 첨가한 Czapek agar 배지에 *P. sp.*-L4의 포자 10^6 /ml 씩을 pour plating 방식으로 접종한 후, filter paper disc를 놓고 농도별 dNM용액(1-100 μ g/ml) 10 μ l씩을 dropping한 뒤 26°C에서 배양하면서 균체성장을 관찰하였다.

b) 실제 과피에서의 억제효과

Lemon 과피에 cork borer와 knife로 직경 5 mm, 깊이 2-3 mm의 표피 제거부위를 만든 후 중심부위에 *P. sp.*-L4의 포자(1×10^6)를 접종하고 증류수로 적신 filter paper disc(ϕ 5 mm)를 덮은 뒤, 12 시간 간격으로 4 회 증류수를 첨가하면서 26°C에서 7-10 일간 배양하였으며, 이 때 감염억제 효과를 위해서는 filter paper disc에

증류수대신 농도별 dNM용액 10 μ l씩을 동일하게 첨가하였다.

사용기기

Spectrophotometer는 Hitachi, U-3210를 사용하였고, 연속식 Centrifuge는 Hitachi, CR 20B2를, Microcentrifuge는 Kubota, KM-15200를 사용하였으며, 동결 건조기는 Martin Christ, GAMMA IA를 사용하였다. 방선균 형태는 주사전자현미경(Scanning electronmicroscope, Cambridge, Streoscan 250 MK2)에 의해 관찰하였다. Inhibitor의 생산은 30 L Jar fermenter(Marubish, MSJ₃)를 이용해 배양하였으며, Ultratiltration은 Amicon Stirred Cell 8400을 사용하였고, Fraction collector는 Pharmacia Fine Chemical의 FRAC 300을 사용하였다. 분취용 및 분석용 HPLC는 영인과학의 Model 910를 사용하였다. Inhibitor의 구조분석은 FT-IR (Biorad, FTS-40), NMR(Joel, JNM-LA400 FT NMR system 400MHz)에 의해 수행하였으며, 분자량 측정은 Mass spectrometer(Joel, JMS-AX 505WA)를 FAB mode로 사용하였다.

결과 및 고찰

β -Glucosidase inhibitor 생성균주의 분리

*P. sp.-L4*가 생성하는 식물세포벽 분해효소 중 감염시의 key enzyme으로 판단된 β -glucosidase에 저해작용을 하는 물질을 방선균으로부터 검색하여 저해물질 생산균인 strain BGI-1을 획득하였으며(Fig. 1), 동정한 결과 분리균은 *Streptomyces* 속의 균주로 확인되어, 이후 *Streptomyces sp. BGI-1*으로 명명하고 사용하였다.

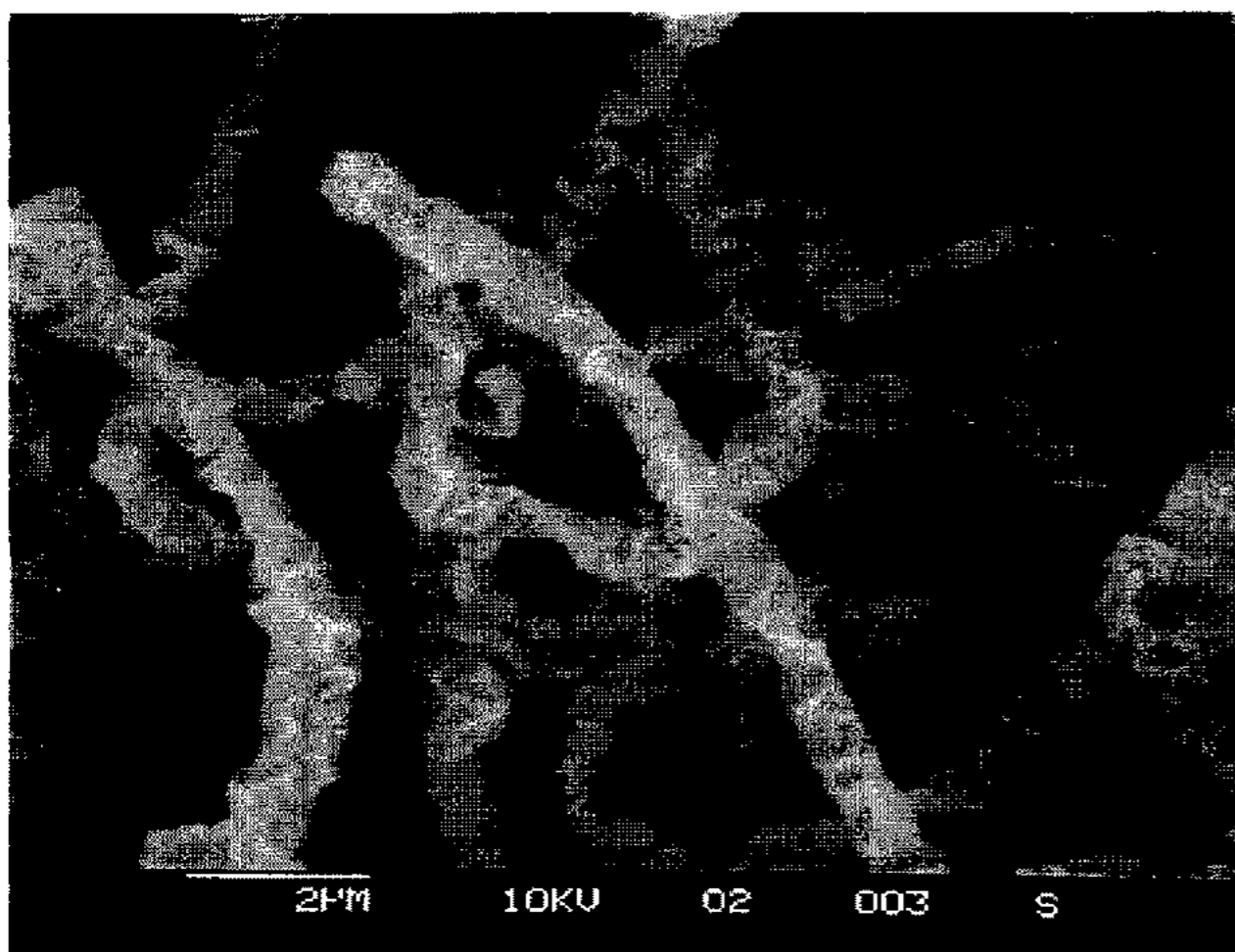


Fig. 1. Scanning electron microscopy of strain BGI-1. Bar represents 2 μ m.

Inhibitor 생산

*S. sp. BGI-1*은 검색용 배지인 MSG 배지에서 MSG와 glycerol의 농도를 각각 50% 증가시킨 배지의 조성에서 저해물질의 생산성이 좋았으며, 배양의 전체적인 Profile은 Fig. 2에 나타난 바와 같다.

Inhibitor의 내성

*S. sp. BGI-1*이 생산하는 inhibitor는 산, 알칼리 및 열에 대한 내성과 proteases, amylases에 대한 내성에 있어서 대단히 안정한 성질을 나타내었으며(Table 1), 이러한 환경요인에 대한 안정성은 배양 및 정제시의 productivity 향상과 함께 실제 사용시의 효과를 지속시킬 수 있는 일차적인 요인이라 할 수 있다. 또 이러한 성질로 미루어 보아 inhibitor BGI-1은 비단백질성의 비교적

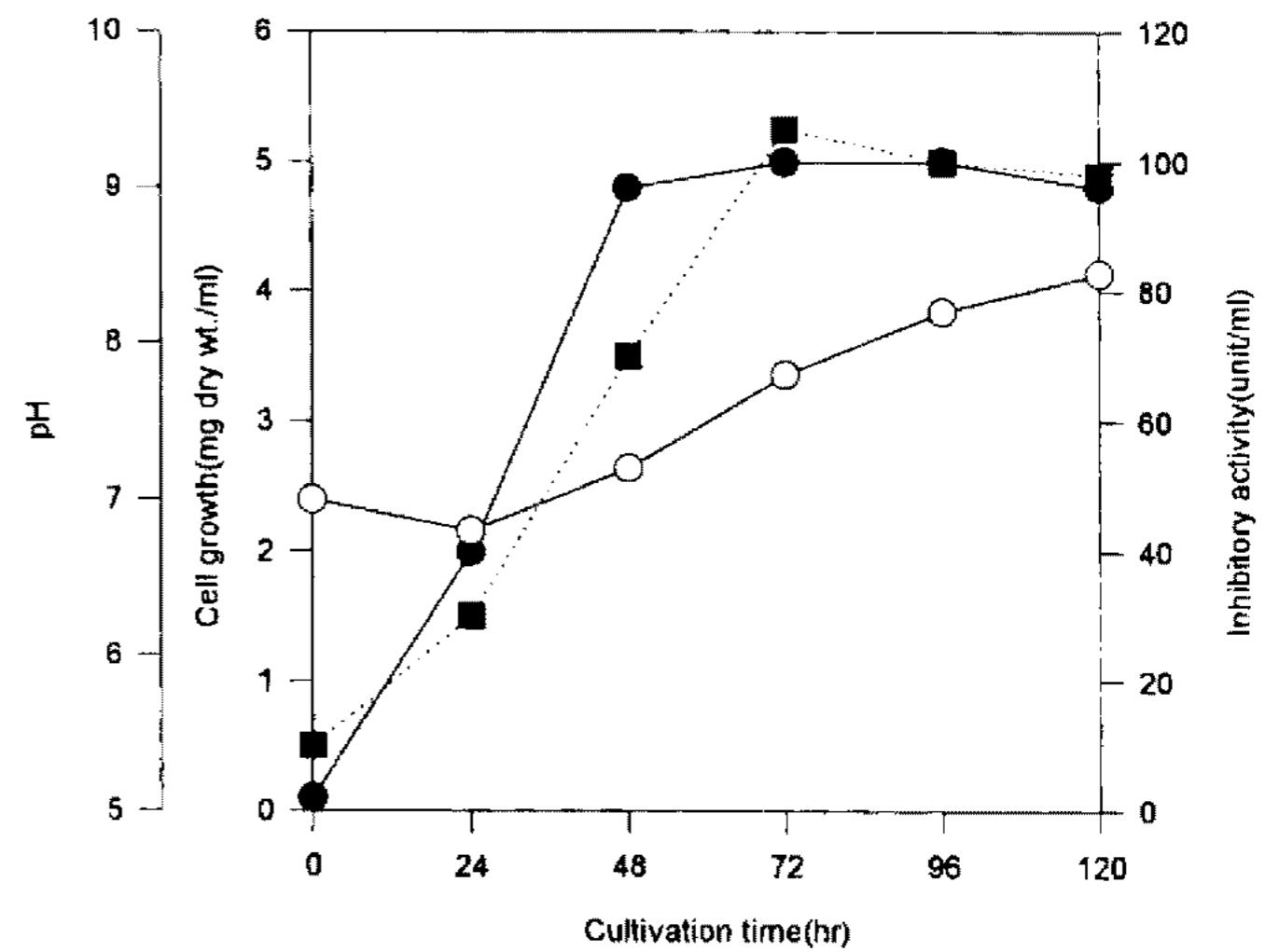


Fig. 2. Profile of the production of β -glucosidase inhibitor BGI-1 in 30 L jar fermentor.

Streptomyces sp. BGI-1 was cultivated in modified MSG medium. Conditions for BGI-1 production in fermentor were, working volume 20 L, temperature 30°C, agitation 350 rpm, aeration 0.5 vvm, initial pH 7.0. Symbols: ●-● Cell growth, ○-○ pH, ■-■ β -Glucosidase inhibitor production.

Table 1. Residual activities β -glucosidase inhibitor BGI-1 after various treatments

Treatments ^a	Residual activity (%)
1 N HCl, 30°C, 12 hr	96.6
1 N NaOH, 30°C, 12 hr	96.0
100°C, 1 hr	94.2
Protease	
<i>Bacillus subtilis</i> , pH 7, 37°C, 1 hr	97.7
Pepsin, pH 2, 37°C, 1 hr	98.3
Trypsin, pH 8, 37°C, 1 hr	100.5
α -Amylase(<i>Aspergillus niger</i>), pH 5, 30°C, 1 hr	96.0
Glucoamylase(<i>A. niger</i>), pH 5, 30°C, 1 hr	96.2

^aCrude solutions of β -glucosidase inhibitor BGI-1 (10 ml, 10,000 units/ml) were treated with described conditions.

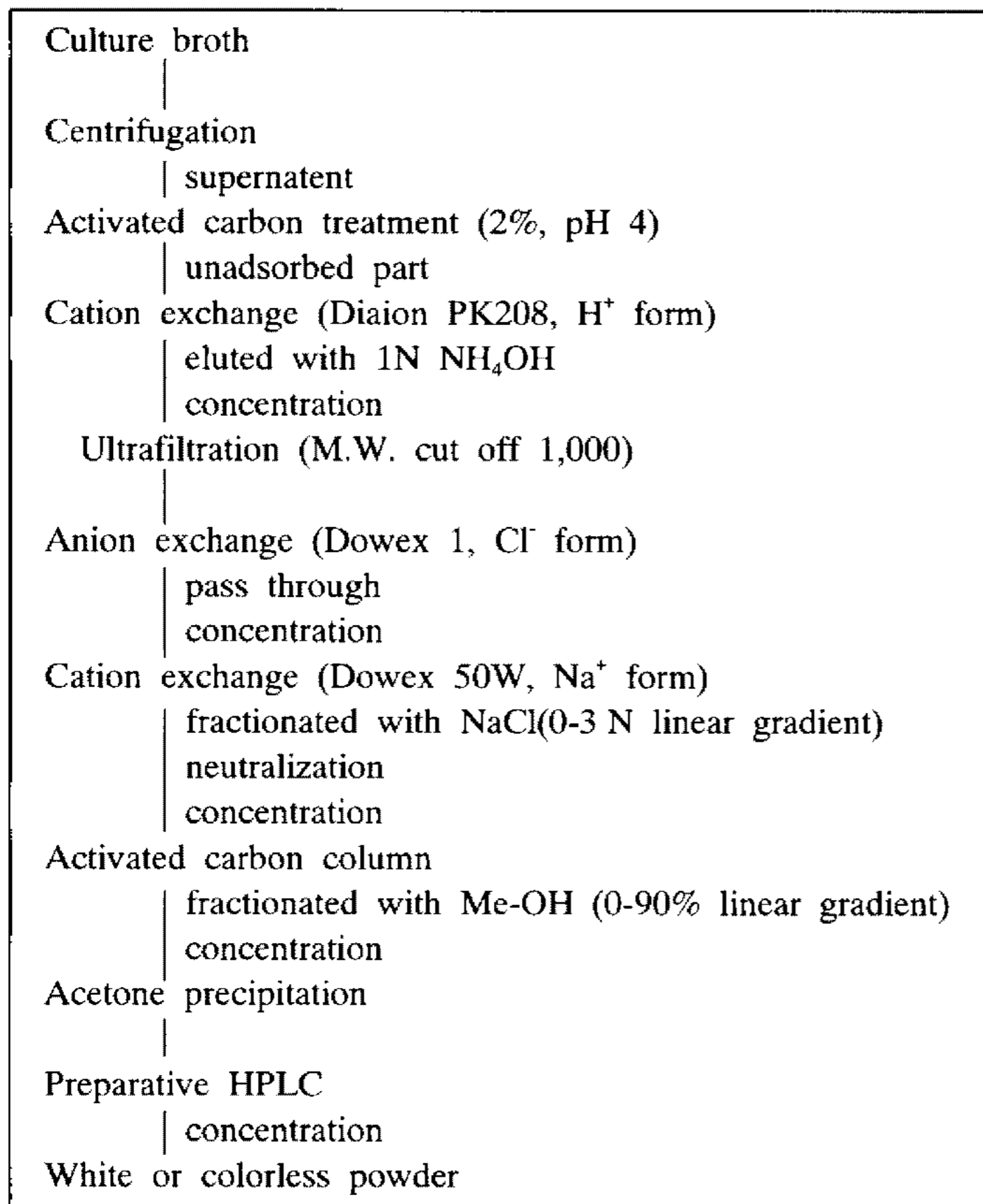


Fig. 3. Purification procedure of BGI-1.

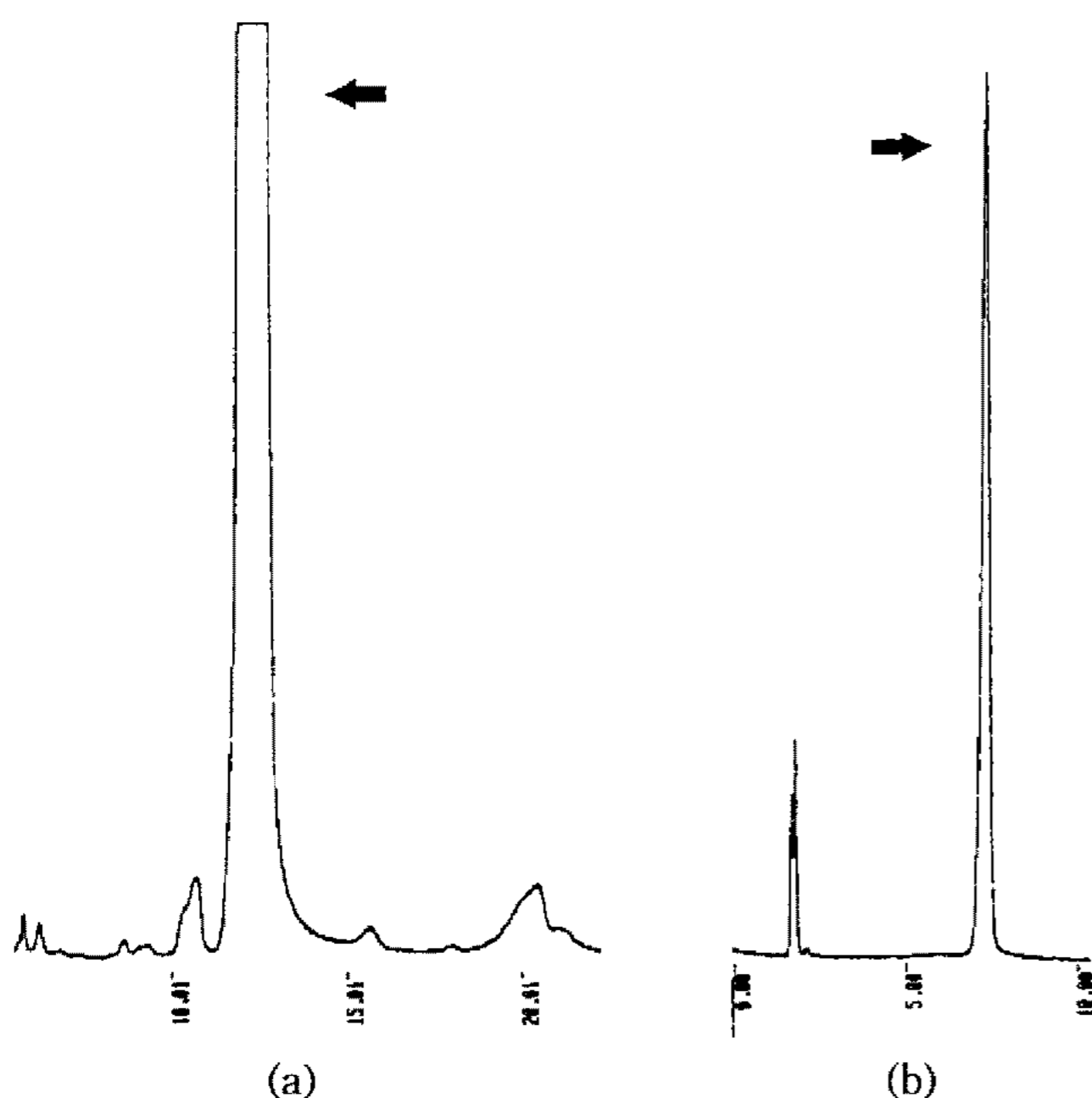


Fig. 4. Chromatograms of BGI-1 by HPLC. (a) Preparative HPLC. (b) Analytical HPLC.

저분자 물질일 것으로 추측되었다.

분리정제

Inhibitor의 전체적인 분리정제 공정은 Fig. 3과 같으

Table 2. Yields of purification step of β -glucosidase inhibitor BGI-1

Purification steps	Volume (ml)	Total activity ($\times 10^5$ units)	Yield (%)
Culture broth	20,000	20.0	100.0
Activated carbon	20,000	18.4	92.0
Cation exchange (PK208)	500	15.0	75.0
Ultrafiltration (M.W. 1000)	750	15.0	75.0
Anion exchange (Dowex-1)	1,500	13.5	67.5
Cation exchange (Dowex 50W)	150	9.7	48.5
Activated carbon column	200	6.5	32.5
Acetone precipitation	5 g	5.0	25.0
Preparative HPLC	10	5.0	25.0

Table 3. Inhibitory activities of BGI-1 against various hydrolytic enzymes produced by *Penicillium* sp.-L4

Enzymes ^a	Substrates	Inhibition ^b
β -Glucosidase	PNPG(β) ^c	+++++
α -Glucosidase	PNPG(α) ^c	+++++
Sucrase	sucrose	+
β -Galactosidase	ONPG(β) ^d	+++
α -Galactosidase	ONPG(α) ^d	+++
Laminarinase	laminarin	++++
Laminariobiase	laminariobiose	+++++
CMCase	CMC	-
Cellobiase	cellobiose	+++++
Glucosylase	starch	+++
α -Amylase	starch	-
Polygalacturonase	pectin	-
Xylanase	xylan	-
Dextranase	dextran	-

^aEnzymes were prepared as crude filtrate from solid culture of *Penicillium* sp.-L4 in wheat bran medium. ^bNumber of mark+ means inhibition strength(+++++ strong inhibition, + weak inhibition), and mark - means no inhibition. ^cPNPG; *p*-nitrophenyl-(α or β)-D-glucopyranoside. ^dONPG; *o*-nitrophenyl-(α or β)-D-galactopyranoside.

며, 분취용 HPLC에 의해 모아진 활성분획(Fig. 4a)은 TLC 및 분석용 HPLC에 의해 단일 peak로 확인하였다(Fig. 4b). 전체적인 정제 수율은 25% (Table 2)로서 일반적인 단백질, 효소 등의 정제 수율에 비해 상당히 높은 것으로 보이며 이는 BGI-1의 산, 알칼리 및 열에 대한 높은 안정성에 의한 것으로 판단된다.

효소종류에 대한 저해효과

P. sp.-L4 균주가 생산하는 각종 분해효소에 대한 BGI-1의 저해효과를 살펴본 결과 Table 3에 나타난 바와 같이 탄수화물 분해효소중 이당류 분해효소에 비교적 강한 저해활성을 나타내었다. 이러한 저해특성은 균에 대한 작용억제시에 β -glucosidase 뿐 아니라 다른 분해효소 저해에 의한 상승효과를 가져올 수도 있을 것으로 사려된다. 한편 β -glucosidase에 있어서 기질 및 효소, 저

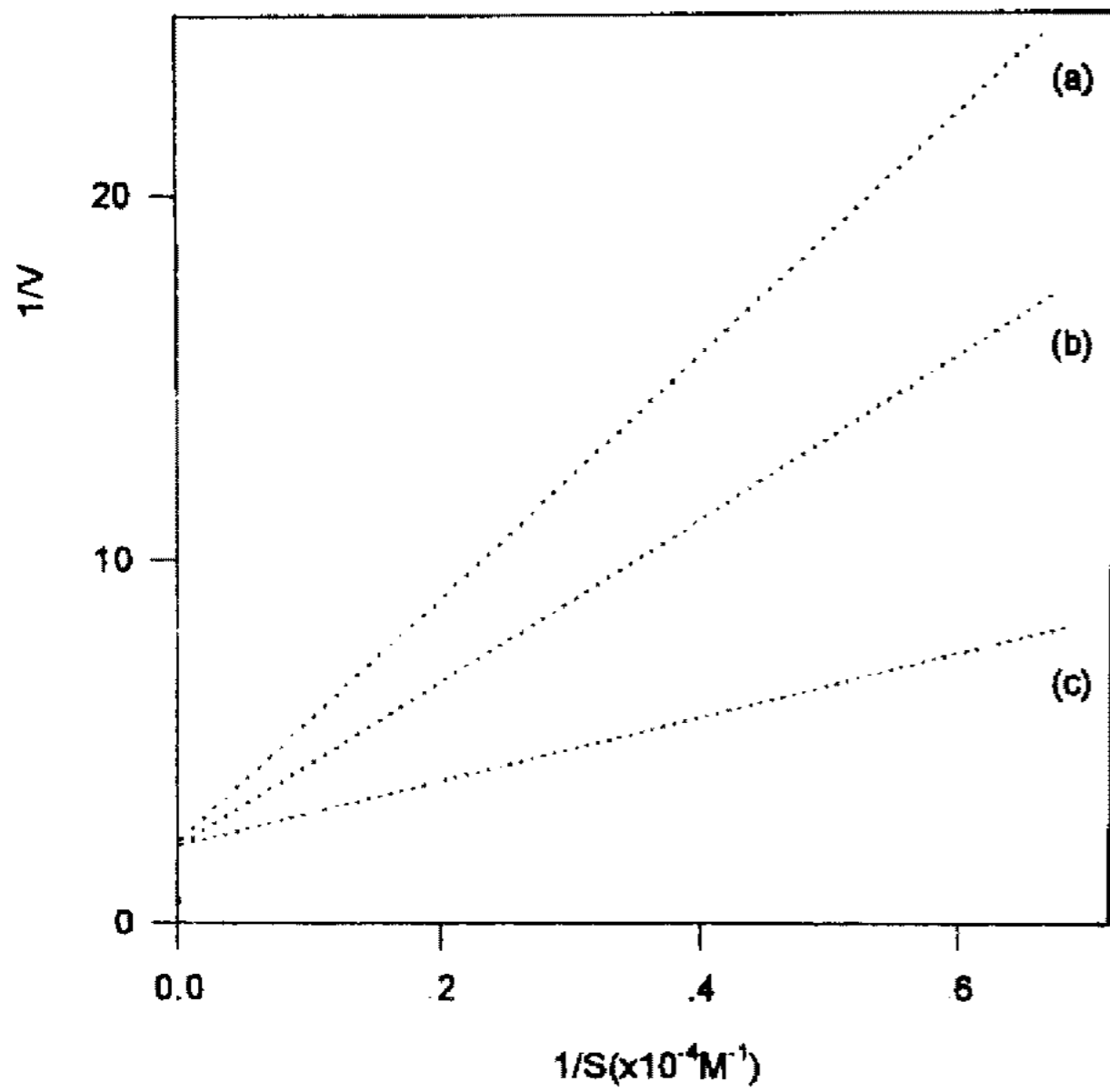


Fig. 5. Effects of β -glucosidase inhibitor BGI-1 on hydrolysis of PNPG (Lineweaver-burk plot).
 (a) Effect of BGI-1 (1×10^{-4} M) on β -glucosidase of *Penicillium* sp.-L4. (b) Effect of BGI-1 on β -glucosidase of Almond. (c) No inhibitor (BGI-1) added.

Table 4. Physico-chemical characteristics of BGI-1

Appearance	Colorless powder, very hygroscopic
UV adsorption	End adsorption
FAB-MS m/z	164 ($M^+ + 1$)
Solubility	$C_6H_{13}NO_4$ Soluble in H_2O , Me-OH, DMSO Slightly soluble in Et-OH Insoluble in acetone, ethyl acetate
Color reaction	Silver nitrate-sodium hydroxide Positive Ninhydrin, phenol-sulfuric acid, DNS, Negative fluorescence
Rf values in TLC	0.34 in n-propanol:10% ammonia (2:1, v/v) 0.57 in isopropanol:pyridine:acetic acid: H_2O (10:4:6:10, v/v)

해제의 농도에 따른 효과를 측정된 결과(Fig. 5), BGI-1은 기질과의 경쟁적 저해양식에 의해 저해하였으며 식물(Almond)유래의 β -glucosidase 보다는 *P. sp.-L4*의 β -glucosidase에 효과적으로 작용하는 것으로 나타났다.

저해물질의 물리화학적 성질

BGI-1은 TLC 상에서 amino acid 또는 glucosamine 과 같은 amino sugar의 전개용매에서 비교적 잘 전개되었으나, 일반적인 carbohydrate, protein, lipid 등의 발색방법에 의해서는 발색되지 않았고 자외선 형광도 나타내지 않았으며 시험한 발색 방법중 silver nitrate-sodium hydroxide에서만 발색되었다. BGI-1의 물리화학적 성질은 Table 4에 요약되었다. 정제된 BGI-1의 구조규명을 위해 IR, 1H NMR, ^{13}C NMR spectrum 을 조사하

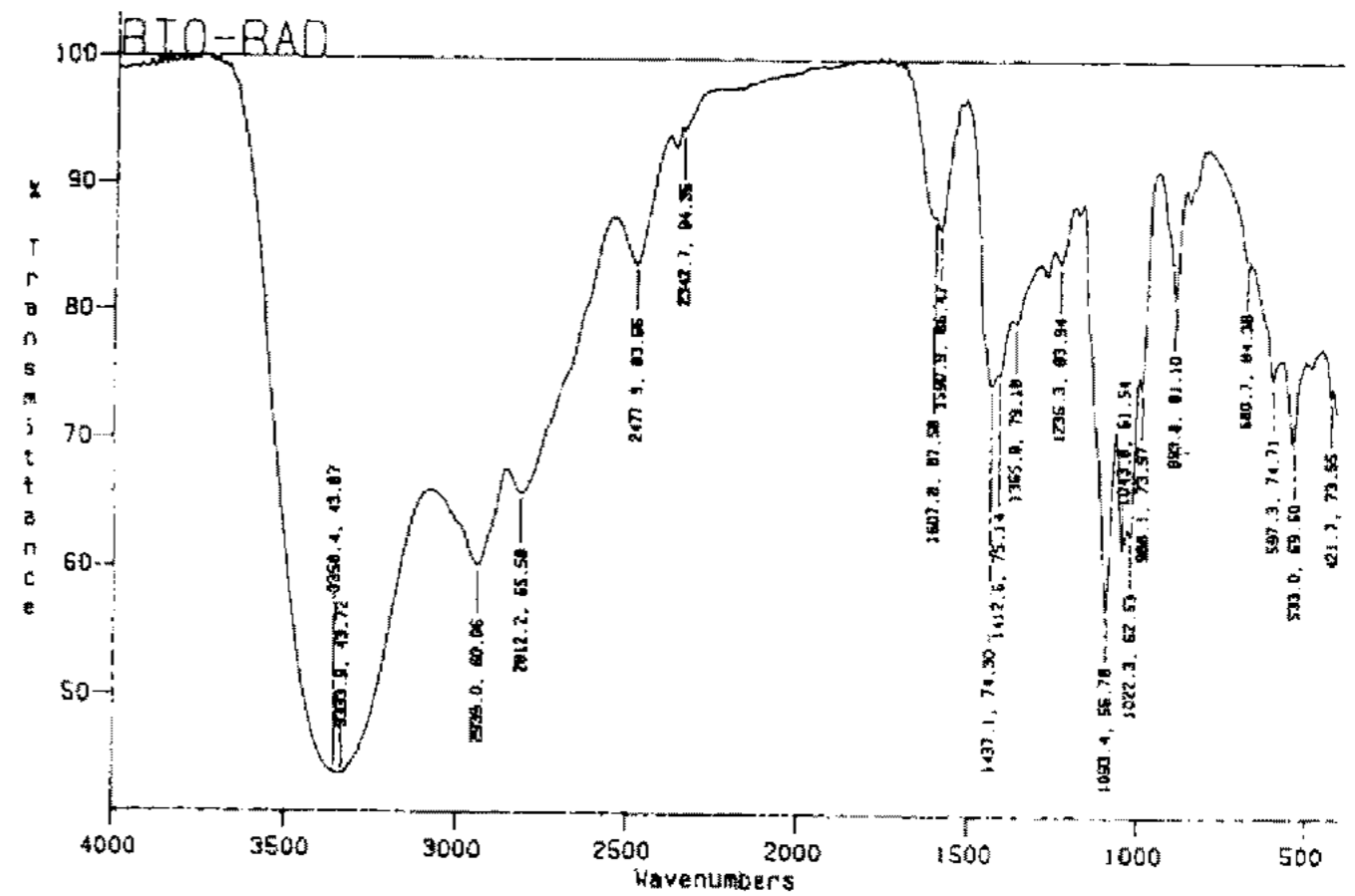


Fig. 6. IR spectrum of BGI-1.

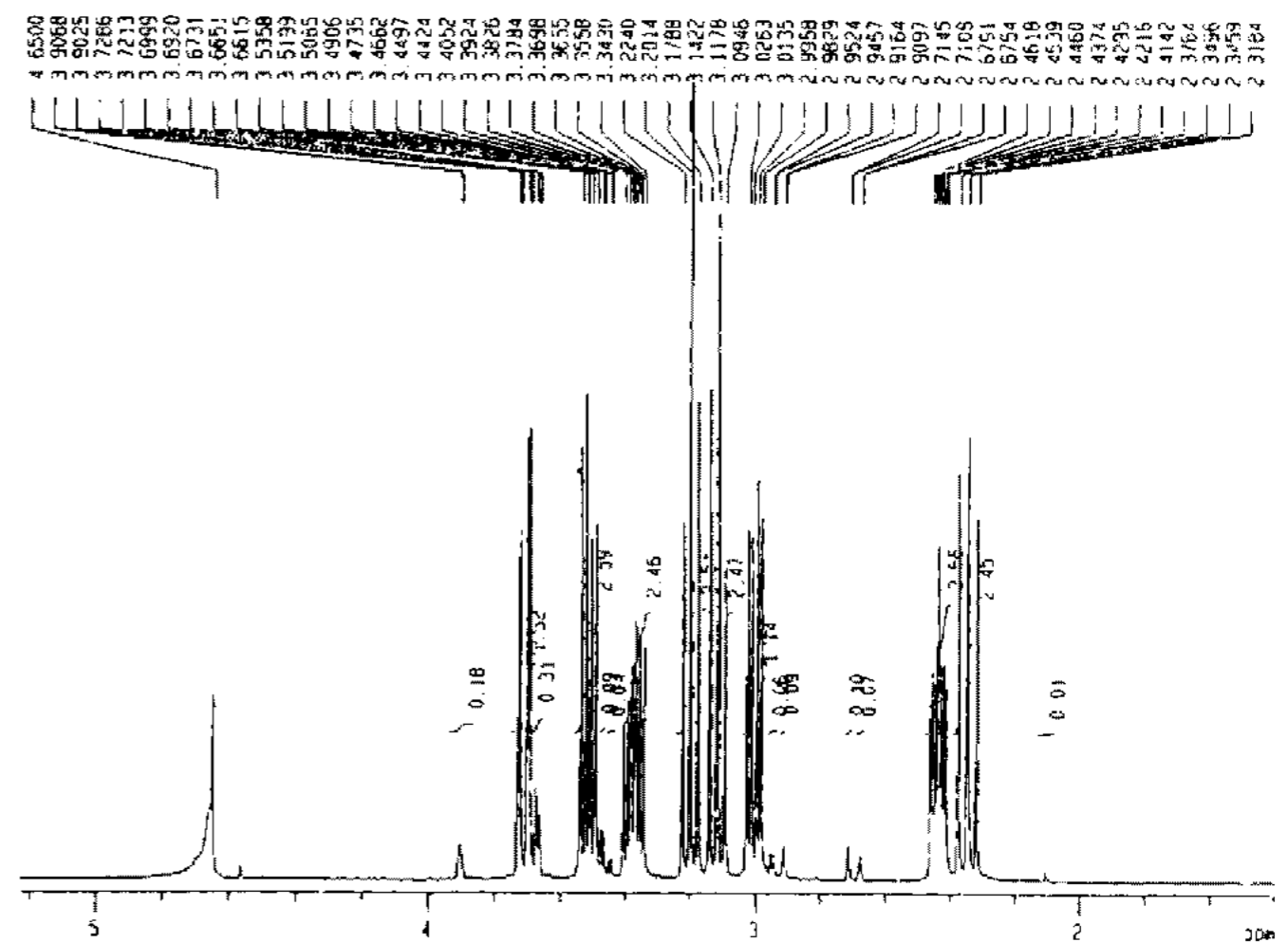


Fig. 7. 1H -NMR spectrum of BGI-1.

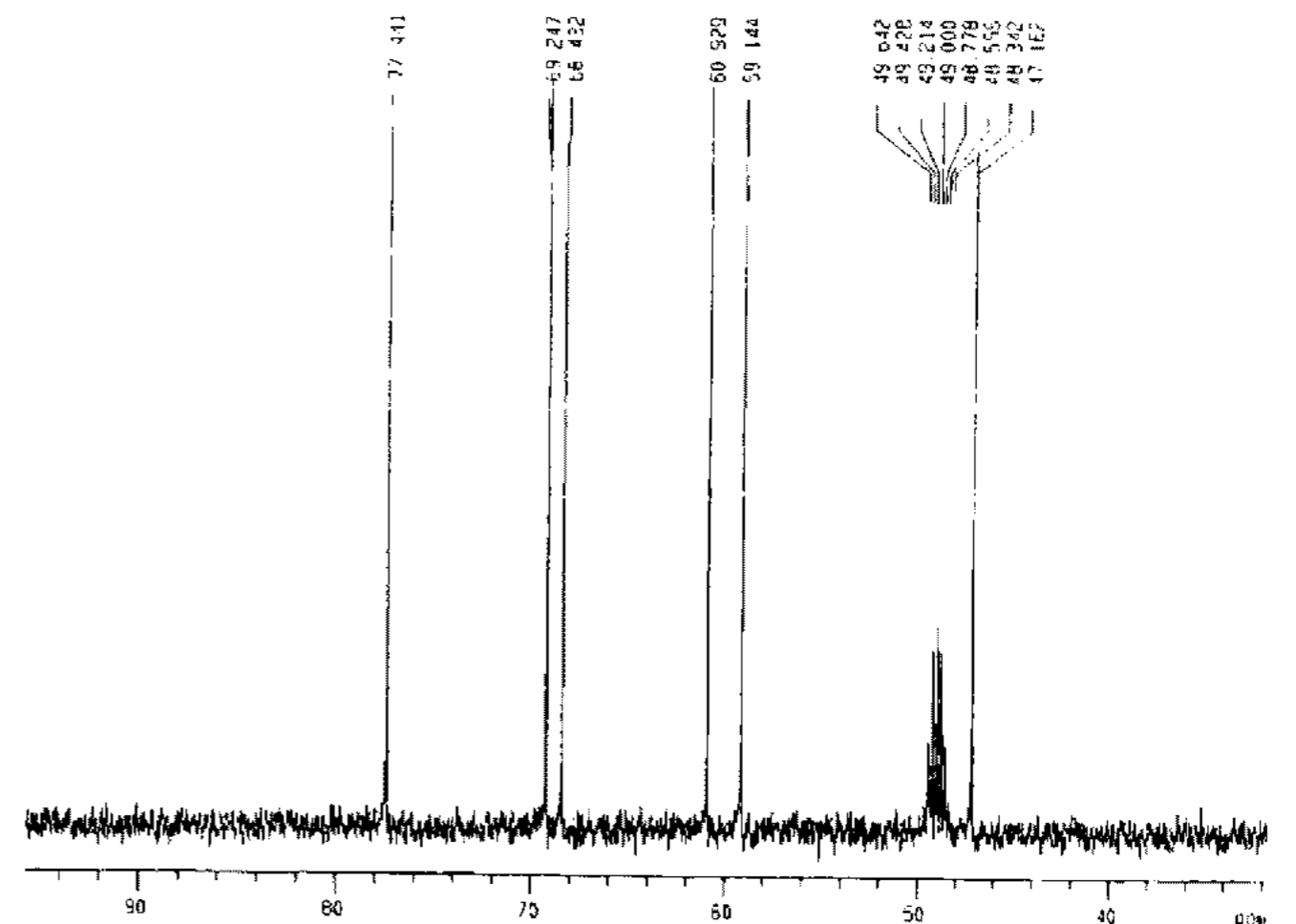


Fig. 8. ^{13}C -NMR spectrum of BGI-1.

고(Fig. 6, 7, 8), 분자량 측정을 위해 FAB/Mass spectrum을 확인하여(Fig. 9). 아래와 같은 data를 얻었다.

IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3333.9 (OH), 1093.4, 1043.8 (C-O)
 1H NMR ppm(in D_2O):2.3184-2.3764 (H_{1a}), 2.4142-2.4618 (H_5), 2.9829-3.0263 (H_{1b}), 3.0946-3.1422 (H_4),

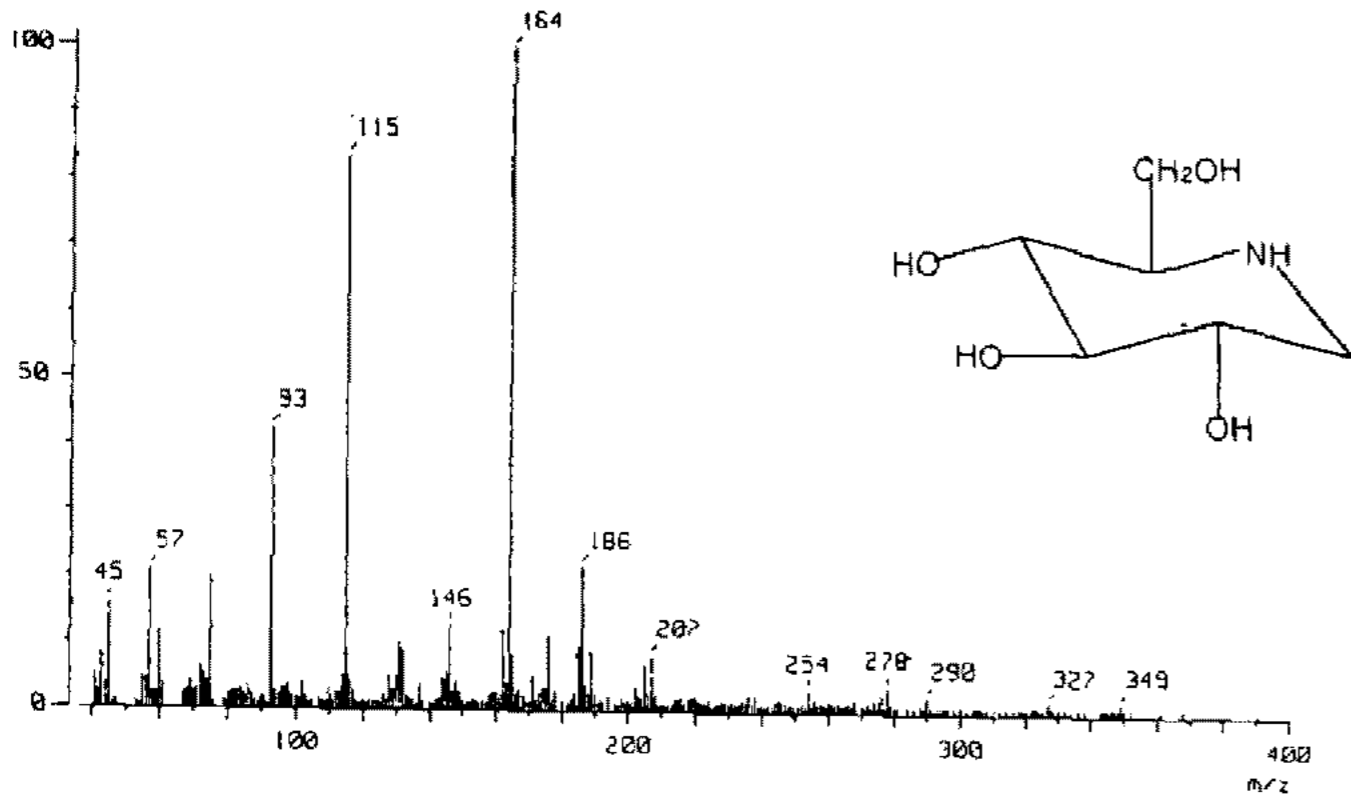


Fig. 9. FAB/Mass spectrum and structure of BGI-1.

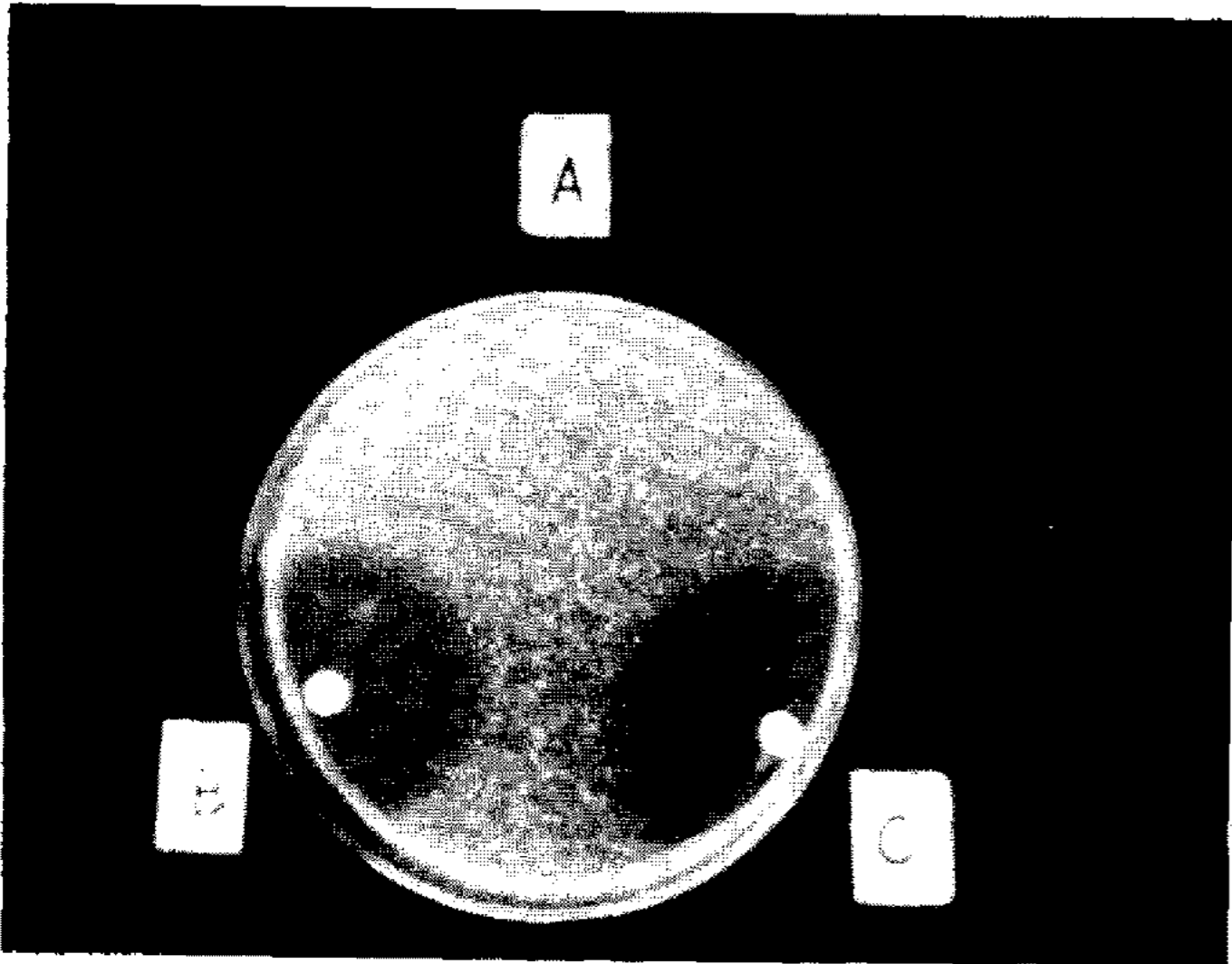


Fig. 10. Formation of inhibitory zones for the growth of *Penicillium sp.-L4* with different concentrationa of dNM.

Penicillium sp.-L4 was cultivated on Czapek agar medium containing 0.5%(w/v) CMC. Concentrations of dNM were, A; 1 µg/ml, B; 10 µg/ml, C; 100 µg/ml.

3.1788-3.2240 (H_a), 3.3430-3.4052 (H_b), 3.4424 -3.5358 (H_{6b}), 3.6615-3.7286 (H_{6a})

¹³C NMR ppm(in D₂O): 47.184 (triplet, HNCH₂), 59.144 (doublet, CH), 60.929 (triplet, CH₂OH), 68.432 (doublet, CH), 69.247 (doublet, CH), 77.441 (doublet, CH)

MS *m/z*: 163(M⁺) or 164(M⁺+1)

기기분석 data에 의해 규명된 물질은 분자량이 163(M⁺), 또는 164(M⁺+1)이었으며, C₆H₁₃NO₄의 화학식을 가진 것으로서 나타났고, 검색 결과 1-deoxynojirimycin (dNM)으로 판명되었다(Fig. 9).

Agar plate 상에서의 억제효과

β-Glucosidase inhibitor인 dNM의 *P. sp.-L4*에 대한 억제효과를 알아보기 위하여 실험한 결과, glucose를 첨가한 배지에서는 1-100 µg/ml의 농도에서 전혀 균체성장을 억제시키지 못하였으나, cellobiose, CMC 및 PG를

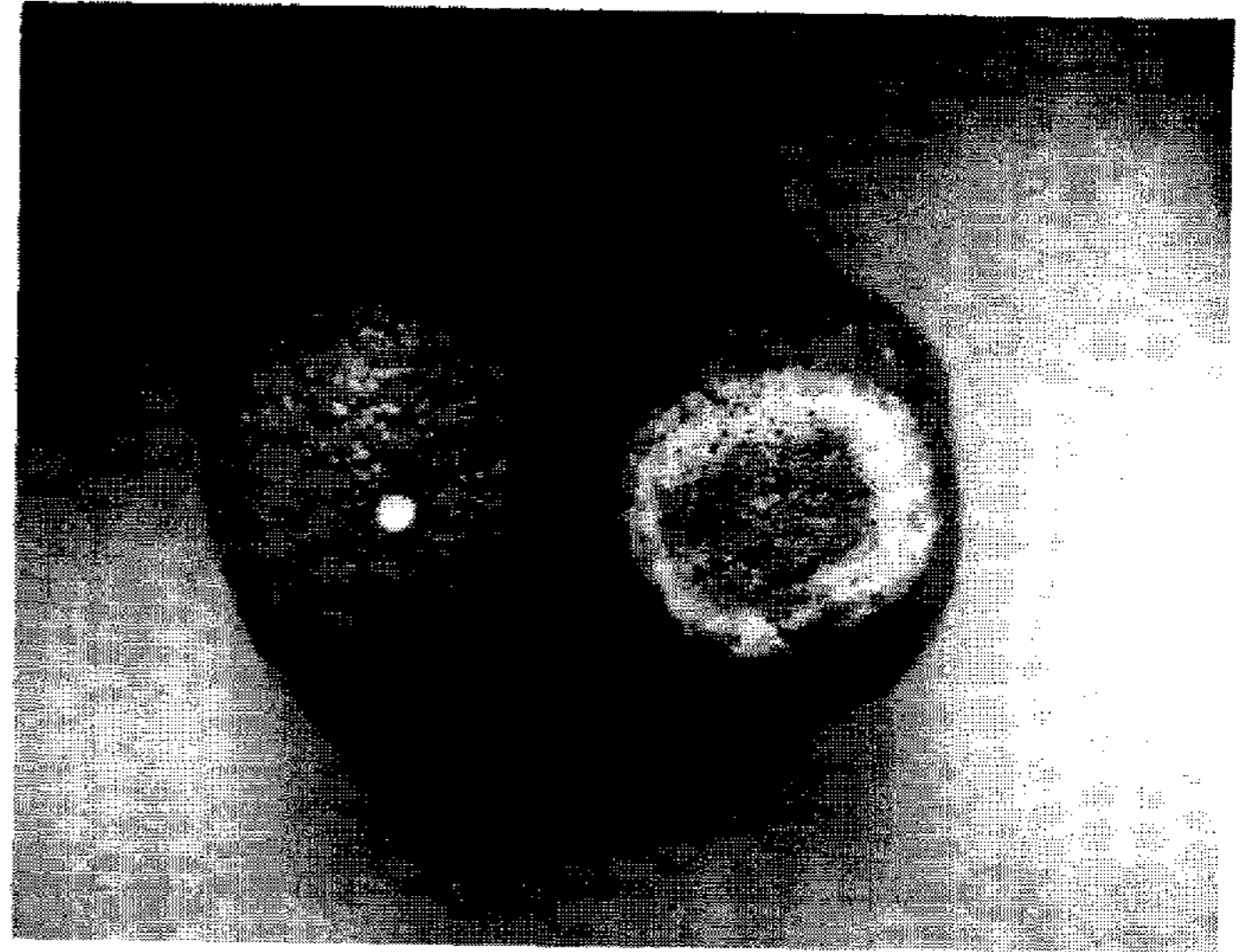


Fig. 11. Inhibitory effect of dNM against infection of *Penicillium sp.-L4* on intact lemon peel.

Spores (1×10⁶) of *Penicillium sp.-L4* were infected on lemon peels, and the infected lemons were incubated at 26°C for 7 days. 10 µl(10 µg/ml) of dNM was added 4 times with interval of 12 hr. Left; with dNM, Right; without dNM.

첨가한 배지에서는 10-100 µg/ml의 농도에서 모두 균체 증식을 억제시켰다(Fig. 10). Glucose 첨가배지에서 균 성장을 억제시키지 못하는 결과는 dNM이 세포내의 단백질 또는 효소 생합성시의 glycosidation을 억제시킨다기 보다는 생성된 β-glucosidase 등 분해효소의 작용을 저해함으로써 균 성장을 억제하는 것으로 판단되며, cellobiose와 CMC 배지 뿐 아니라 직접 β-glucosidase의 작용을 받지않는 PG 첨가배지에서도 균 성장을 억제하는 것은 β-glucosidase가 전체 분해효소계에 작용하거나 포자발아에 있어서 중요한 역할을 하기 때문인 것으로 추정된다.

과피감염시의 억제효과

실제 *P. sp.-L4*의 lemon 변패에 대한 dNM의 효과를 살펴본 결과, Fig. 11에 나타난 바와 같이 10 µg/ml의 농도(4회 투여)에서 균의 증식, 또는 효소작용을 막아 균의 감염을 완전히 억제하는 효과를 보여, dNM의 사용에 의해 과실의 변패를 효율적으로 방지할 수 있는 가능성을 제시하였다.

dNM은 Moranolin이라는 이름으로 한방식물인 桑白皮의 성분으로서(18) 처음 발견된 후, 미생물(19)에서도 발견되고 효소에 대한 저해능이 밝혀짐에 따라 현재 당뇨병 치료제로 개발중인 BAY m 1066의 core compound로서 이용되고 있다. 또 당뇨병의 치료제이외에 저해하는 enzyme의 세포내 기능 및 존재에 대한 최근 연구의 발달에 따라 cancer 또는 virus의 증식억제, 유전자 조작된 효모세포의 단백질 분비 촉진 또는 식물종자의 발아 억제 등 다양한 용도가 개발되고 있으며(20-23), 많은 유

도체 개발에 의해 rhamnosidase 저해, cellulase 저해 등 다양한 용도개발이 진행되고 있다(24, 25). dNM은 일부 진균의 효소작용에 대한 연구에 사용된 보고가 있으나(26), 식물 병원균에 의한 감염 억제물질로서의 효과는 아직 보고되지 않았으며 본 연구에서와 같이 진균에 의한 식물체 감염에 있어서 β -glucosidase 등 이당류 분해 효소의 기능과 역할이 점차 밝혀짐에 따라 보다 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 보인다.

요 약

*P. sp.-L4*의 lemon 감염시 key enzyme인 β -glucosidase에 대한 저해물질 생산균을 방선균으로부터 검색하였으며 분리된 균은 *Streptomyces sp.*로 확인되었다. 생성된 저해물질 BGI-1은 열, 산, 알칼리 및 각종 단백질, 당 분해효소에 대해 매우 안정하였다. 배양액으로부터 활성탄처리, 한외여과, 양이온 및 음이온 교환수지, 활성탄 column, acetone 침전 및 분취용 HPLC 등의 방법을 이용하여 단일성분의 저해물질을 분리정제하였다. BGI-1은 *P. sp.-L4*의 β -glucosidase 이외에 다양한 이당류 분해효소에 대해 저해능을 가졌으며, 저해시 경쟁적 저해양상을 나타내었다. 정제된 BGI-1의 구조 및 질량을 확인하기 위하여 IR, ^1H - 및 ^{13}C -NMR, FAB/Mass spectrometry 등의 기기분석을 수행한 결과 분자량이 164($\text{M}^+ + 1$)이고 $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4$ 의 분자식을 가진 것으로 밝혀졌으며, 검색 결과 1-deoxynojirimycin(dNM)으로 동정되었다. dNM은 agar plate 및 실제 lemon 감염시에 *P. sp.-L4*의 효소작용 또는 균성장을 억제하여 변패를 방지하는 효과를 나타내었다.

감사의 말

본 연구의 일부는 서울대학교 분자 미생물학 연구센터의 지원을 받아 수행하였다.

참고문헌

1. Shah, D. M., C. M. T. Rommens and R. N. Beachy. 1995. Resistance to diseases and in transgenic plants: progress and applications to agriculture. *Trends Biotechnol.* **13**: 362-368.
2. Tanaka, Y. and S. Omura. 1993. Agroactive compound of microbial origin. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 57-87.
3. Bullerman, L. B. 1986. Mycotoxins and food safety. *Food Technol.* **40**: 56-59.
4. Gelderblom, W. C. A., K. Jaskiewicz, W. F. O. Marasas, P. G. Thiel and R. M. Horak. 1988. Fumonisin-Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:

- 1806-1811.
5. 이철훈. 1996. 신물질 발굴을 위한 미생물 스크리닝 분야의 연구전략. *생물산업.* **9**: 27-31.
6. Omura, S. 1992. Trends in the search for bioactive microbial metabolites. *J. Indust. Microbiol.* **10**: 135-156.
7. Vandamme, E. J. 1994. The research for novel microbial fine chemicals, agrochemicals and biopharmaceuticals. *J. Biotechnol.* **37**: 89-108.
8. Aharonowitz, Y., S. Bauer, S. Loya, R. Schreiber, I. Barash and D. L. Gutnik. 1989. A specific bacterial inhibitor of the extracellular polygalacturonase of *Geotrichum candidum*. p. 151-159. In A. L. Demain *et al.*(ed.), *Novel microbial products for medicine and agriculture*, Elsevier, Netherland.
9. Woo, J. T., S. Miura, S. Murakawa and A. Endo. 1991. Chrogalin, a heat-stable glycoprotein that inhibits polygalacturonase: Isolation, characterization and biological activity. *J. Ferment. Bioeng.* **72**: 7-10.
10. Lafitte, C., J. P. Barthe, J. L. Montillet and A. Touze. 1984. Glycoprotein inhibitors of *Colletrichum lindemuthianum* endopolygalacturonase in near isogenic lines of *Phaseolus vulgaris* resistant and susceptible anthracnose. *Physiol. Plant Pathol.* **25**: 39-53.
11. Nuss, L., A. Mache, A. J. Clark, J. Grisvard, M. Dron, F. Cervone and G. de Lorenzo. 1996. Differential accumulation of PGIP mRNA in two near-isogenic lines of *Phaseolus vulgaris* L. upon infection with *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **48**: 83-89.
12. Sinha, S. N., B. L. Ghosh and S. N. Ghose. 1981. Detection of cellulase inhibitor in the wheat bran culture of *Aspergillus terreus*. *Can. J. Microbiol.* **27**: 1334-1340.
13. Kawaguchi, T., K. Sugimoto, H. Hayashi and M. Arai. 1996. Structure and activity of cellulase inhibitors enzymatically synthesized from cellooligosaccharides and 1-deoxynojirimycin. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 344-346.
14. Higashi, K., J. Hirose, H. Hori and T. Ishiyama. 1996. Cutinostatin B as a new cutinase inhibitor produced by *Actinomycetes*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 401-404.
15. 김창진, 이강현, 아끼라 시마즈, 유익동. 1994. 다수배지의 사용에 따른 방선균의 중복 분리빈도. *한국산업미생물학회지.* **22**: 329-331.
16. Sherling, E. B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **16**: 313-340.
17. Gottlieb, D. 1974. Actinomycetales. Pp 657-881. In Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons(8th ed.), *Bergey's manual of determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins. USA.
18. Yagi, M., T. Kouno, Y. Aoyagi and H. Murai. 1976. The structure of Moranoline, a piperidine alkaloid from *Morus* species. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* **50**: 571-572.
19. Maruo, S. and S. Miyata. 1980. Isolation and characterization of a new trehalase inhibitor, S-GI. *Agric. Biol. Chem.* **44**: 219-221.
20. Grace, M. E., P. N. Graves, F. I. Smith and G. A. Gra-

- bowski. 1990. Analyses of catalytic activity and inhibitor binding of human acid β -glucosidase by site directed mutation. *J. Biol. Chem.* **265**: 6827-6835.
21. Karlsson, G. B., T. D. Butters, R. A. Dwek and F. Platt. 1993. Effects of the iminosugar N-butyldeoxynojirimycin on the N-glycosylation of recombinant gp 120. *J. Biol. Chem.* **268**: 570-576.
22. Greber, U. F., K. Sode and F. Meussdoerffer. 1988. Effect of the glucosidase inhibitor 1-deoxynojirimycin on protein secretion from *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* **10**: 246-251.
23. Konishi, Y., A. Okamoto, J. Takahashi, M. Aitani and N. Nakatani. 1994. Effects of Bay m 1099, an α -glucosidase inhibitor, on starch metabolism in germinating wheat seeds. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 135-139.
24. Tan, A., L. van de Broek, S. van Boeckel, H. Ploegh and J. Bolscher. 1991. Chemical modification of the glucosidase inhibitor 1-deoxynojirimycin. *J. Biol. Chem.* **266**: 14504-14510.
25. Kawaguchi, T., K. Sugimoto, H. Hayashi and M. Arai. 1996. Structure and activity of cellulase inhibitors enzymatically synthesized from cellooligosaccharides and 1-deoxynojirimycin. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 344-346.
26. Carrel, F. L. Y. and G. Canevascini. 1991. Effect of β -glucosidase inhibitors on synthesis of cellulase and β -glucosidase in *Sporotrichum(Chrysosporium) thermophile*. *Can. J. Microbiol.* **37**: 459-464.

(Received 7 November 1996)