

토양시료로부터 α -glucosidase 저해제 생성 방선균의 분리

최성숙 · 정남용 · 김경재¹ · 하남주^{1*}
삼육의명대학 식품과학과, ¹삼육대학교 약학과

탄수화물 분해 효소인 α -glucosidase의 활성을 저해하는 물질을 생성하는 미생물을 검색하기 위하여 토양 시료로부터 수종의 미생물을 검색하였다. 토양 시료에서 강력한 α -glucosidase 저해제를 생성하는 방선균PM718을 분리하였고 그 저해제의 활성을 기저물질인 acarbose와 비교 측정 한 결과 우수한 활성을 나타냄을 확인하였다. 또한 그 활성은 pH 변화에도 안정된 활성을 유지하는 것을 확인하였다.

Key words □ Actinomycetes, α -glucosidase inhibitor, carbohydrate digestion.

방선균들은 유용한 2차 대사산물을 생성하는 경우가 많다(26). 특히 항생물질을 생산하는 방선균의 경우는 감염성 질병의 치료에 크게 기여하였다. 항생물질뿐 아니라 이들 방선균들로부터 생성되는 각종 효소 저해제는 매우 가치 있는 약리작용을 나타낸다. 현재까지 가장 많이 연구된 효소 저해제로는 탄수화물 분해 효소인 α -amylase inhibitor 이며 이것은 1933년 Chrza와 Janicki가 보고한 메밀로부터 얻은 저해제가 최초의 것이다. 그 후 밀, 흑두, 호밀, 땅고 등의 식물에서 amylase inhibitor가 발견되었으며(16) 미생물 유래의 저해제로는 *Streptomyces*속(7,13-15), *Cladosporium*속(17), *Actinoplanes*속(21)등에서 분리하여 보고된 바 있다. 고등 식물이나 동물에서 얻어지는 효소 저해제는 비교적 고분자 물질인데 반해 미생물의 이차대사의 결과로 생산되는 저해제들은 비교적 저분자 물질이므로 인체 독성면이나 대량 생산면에 있어서 큰 이점을 가지고 있으며 특히 저분자 물질은 고분자 물질에 비해 상대적으로 소화관 내에서 효소에 의해 분해될 확률이 적고 단일물질로 정제하기에 유리하며 안정성 유지가 용이하다.

탄수화물 분해 효소의 하나인 α -glucosidase의 활성을 저해하는 물질은 당뇨병, 비만증, 고지혈증등 전분의 흡수와 관련된 질병을 치료하는데 커다란 효과가 있는 것으로 알려져 있다(2,8). 탄수화물은 3대 영양소의 하나로서 소장 점막에 위치한 α -glucosidase-hydrolase에 의해 분해되어 포도당 형태로 흡수된다. 탄수화물을 주 영양원으로 섭취하는 사람들의 경우 탄수화물의 대사에 이상이 생기면 당뇨병, 비만증 및 고지혈증등과 같은 질병이 유발될 수 있으므로(19) 이러한 탄수화물 분해 효소 저해능은 질병의 치료제로서의 가치가 주목되고 있다(23).

탄수화물 대사이상의 결과로 생기는 질병 중 특히 당뇨병의 경우 그에 따른 심각한 합병증이 유발되기 때문에 주의가 필요

하며(24) 따라서 당뇨병 환자의 혈당을 정상수준으로 유지하기 위한 많은 방법들이 개발되고 있다. 당뇨병 환자의 혈당조절의 어려움 중 하나는 식후의 급작스러운 혈당의 상승으로 이는 여러 요인(위내공복, 췌장의 효소분비, 흡수능력, 섭취한 당의 종류, 가공방법)에 의해 좌우된다(9,11). α -glucosidase 저해제를 경구 투여하는 것이 전분의 소화속도를 지연시킴으로써 투여 기간중 혈당의 고른 분포를 가능케 하여 식이요법의 치료효과를 극대화 하며 고혈당 및 당뇨병합병증 개선에 효과적이란 보고가 있다(3,5,20). 또한 인슐린 및 sulfonylurea류의 당뇨병 치료 약물과 병행사용시 약물의 용량감소, 치료기간의 단축 및 부작용의 경감 등의 효과가 있는 것으로 보고되었다(12,18).

본 연구에서는 토양 시료로부터 α -glucosidase 저해제를 생성하는 방선균을 분리하여 그 균주의 형태적, 생리적 특징을 연구하고 아울러 분리 배양된 방선균이 생성하는 α -glucosidase 효소 저해제의 활성과 기저물질인 acarbose의 활성을 비교 검토하여 보고자 한다.

재료 및 방법

토양시료

본 삼육대학교 및 학교 인근 곳곳 표층 2-5 cm 깊이에서 총 20 종의 토양 시료를 채취하여 본 실험에 사용하였다

사용배지

방선균 분리용 배지는 Bennett's medium (1) (glucose 10 g, peptone 2 g, beef extract 1 g, yeast extract 1 g, agar 20 g D.W. 1 l, pH 7.3)에 항생제(cycloheximide 50 μ g/ml, chloramphenicol 10 μ g/ml)를 첨가하여 사용하였다. 분리된 방선균의 α -glucosidase 저해제 생성여부를 검색하기 위하여 사용한 액체배지는 G-media (1) (soluble starch 10 g, glucose 20 g, soybean meal 25 g, yeast extract 4 g, beef extract 1 g, NaCl 2 g, CaCO₃ 2 g, K₂HPO₄

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-3399-3653, Fax: 02-948-5370
E-mail: hanj@syu.ac.kr

0.05 g, D.W. 1 l, pH7.3)이다. 균주의 배양 특징을 확인하기 위하여는 ISP-medium 2, 3, 4 및 Nutrient media (Difco, Gaithersburg, USA)를 사용하였다.

시약

효소인 α -glucosidase는 Sigma (G-5003, from bakers yeast)시약을 사용하였으며 α -amylase는 Sigma (A-6255, from porcine pancreas)시약을 사용하였다. 그 외의 시약들도 Sigma 시약 및 특급시약을 사용하였다.

방선균의 분리

토양시료를 실온에서 풍건하고 그 1g을 멸균 생리식염수 10 ml에 10^{-3} 까지 현탁 희석 후 각 0.1 ml을 Bennett's media에 도말 하였다. 28°C에서 2 주간 배양하면서 배지상에서 출현하는 방선균 집락을 새로운 Bennet's media에 계대배양하여 이들을 28°C에서 1 주일간 배양 후 형태적 특징을 서로 비교하여 서로 다른 방선균주를 선별하였다.

균주의 형태, 배양 및 생리적 특징

분리된 균주의 형태학적 특징을 관찰하기 위하여 Bennett's 배지에서 배양 후 우선 Gram 염색을 실시하여 광학현미경 관찰을 하였다. 본 균주의 전자현미경 관찰(25)을 위하여 ISP-4 배양배지에 28°C에서 2 주간 배양하여 사용하였다. 시료를 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)로 완충된 2.5% glutaraldehyde (pH 7.2) 용액에 담가 6 시간 동안 4°C에서 전 고정하였고 동일한 완충액으로 완충된 2% osmiumtetroxide 용액으로 4°C에서 2 시간 동안 후고정을 한 후 상승농도의 ethanol (60, 70, 80, 90, 95, 100%)을 이용하여 탈수하였다. 탈수된 조직은 통법에 의하여 isoamyl acetate로 치환후 CPD (citric point dryer, Hitachi, HCP-2) 로 건조시켰다. 건조된 시료를 시료대에 부착한 후 Ion coater (Eiko, IB-5)를 사용하여 20 nm 두께의 gold coating을 시행한 후 주사현미경(Hitachi, S-450)으로 관찰하였다. Catalase test는 Bennet's 배지에서 1 주일간 배양한 집락을 갖고 시행하였다. 각종 ISP 배지에서의 배양정도, 기균사 생성여부, 색소 생성 여부를 관찰하여 배양적 특징을 관찰하였다.

효소저해제 생성을 위한 균주의 배양

순수 분리된 각 방선균 균주를 G-media에 접종후 28±1°C에서 1 주일간 진탕 배양하였다. 배양액을 2,600×g (Eppendorf, F-46-30-11)에서 15 분간 원심분리하여 그 상등액을 효소 저해제 활성 측정용 시료로 사용하였다.

효소저해제 활성의 측정

α -glucosidase inhibitor

Dahlqvist (4)등의 방법을 변형하여 사용하였다. 저해제 활성의 측정은 기질 *p*-nitrophenyl- α -D-glucoside (PNPG)을 사용하여 α -glucosidase에 의하여 분해되어 나오는 *p*-nitrophenol의 양을 흡광도로 측정하는 방법을 사용하였다. 대조물질로는 기지물질인

acarbose (Bayer, 25 μ g/ μ l)를 사용하였다. 먼저 0.1 M phosphate buffer (pH7.2) 0.05 ml와 α -glucosidase 용액(2 unit/ml) 0.05 ml, 방선균 배양액(원액의 20배 희석액) 0.01 ml를 혼합 후 37°C에서 5 분간 전반응 하였다. 기질용액인 2 mM PNPG 용액 0.1 ml을 가하여 37°C에서 10 분간 반응후 1 M Na₂CO₃ 용액 0.1 ml을 가하여 반응을 중지시킨 후 생성된 *p*-nitrophenol의 양을 405 nm 에서 흡광도 측정으로 확인하였다. Control은 방선균 배양액 대신 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)용액을 사용하였으며 blank로는 방선균 배양액 및 효소액 대신 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)용액을 사용하였다.

α -amylase inhibitor

분리 배양된 방선균이 α -amylase 저해 기능을 가지는지 확인하기 위하여 α -amylase와 시료를 반응시킨 후 잔류하는 효소활성을 전분-요오드의 정색반응으로 측정하는 modified blue value method (12)에 따라 실시하였다. α -amylase 용액(16 unit/ml) 0.05 ml, 방선균 배양액 (20배 희석액) 0.01 ml를 혼합하여 37°C 수욕중에서 5 분간 전반응 시킨 후 soluble starch soln. (3 mg/ml in BBS) 0.1 ml을 첨가하고 37°C 수욕중에서 10 분간 진탕하면서 반응을 시킨 후 Lugol soln. (I₂ 7.5 g, KI 15 g, D.W. 1000 ml) 0.05 ml을 가한 후 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조균은 시료용액 대신 D.W.를 0.01 ml을 가하였으며 blank는 효소용액 대신 0.1 M phosphate buffer (pH7.2) 0.05 ml, 시료대신 D.W. 0.01 ml을 넣어 사용하였다.

α -glucosidase 저해제의 pH 의존성

저해제 활성이 확인된 PM718 균이 생성하는 α -glucosidase 저해제의 pH 안정성을 확인하기 위해 균을 G-media 500 ml에 7 일 동안 30±2°C에서 진탕 배양하였다. 배양액을 3,000×g에서 15 분간 원심분리 후 상등액을 56°C에서 30 분간 열처리하였다. 상등액을 4등분한 후 N-HCl, N-NaOH, 5N-HCl 및 5N-NaOH 용액을 이용하여 각각 pH 2, 7, 8 및 10으로 조절 후 60°C에서 30 분간 열처리하였다. 다시 시료의 pH를 중성으로 조절 후 α -glucosidase 저해제 활성을 Dahlqvist (4)의 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

방선균의 분리

20 종의 토양 시료로부터 53 종의 방선균을 분리하였고 이 균의 배양액을 대상으로 효소 저해제 활성을 측정하였다. 기지물질인 acarbose 정도의 효소 활성을 나타낸 균주 PM718을 분리하였다.

PM718균주의 형태적, 생리적 특징

광학현미경으로 관찰한 결과 그람양성의 균으로 포자는 완전한 직선상의 사슬 모양이며, ISP No. 3 고체 배지상에서 갈색(brown)의 기질균사(substrate mycelium)와 회색(gray)의 기균사(aerial mycelium)를 형성함을 확인하였다(Table 1). 분리균의 전

Table 1. Morphological and Physiological Characteristics of Strain PM718

Charateristics	PM 718
Gram stain	+
Catalse production	+
Chain morphology	rectiflexus(RF)
Spore ornamentation	smooth
Diffusible pigment	+
Growth at 45°C	+
pH range of growth	5-10

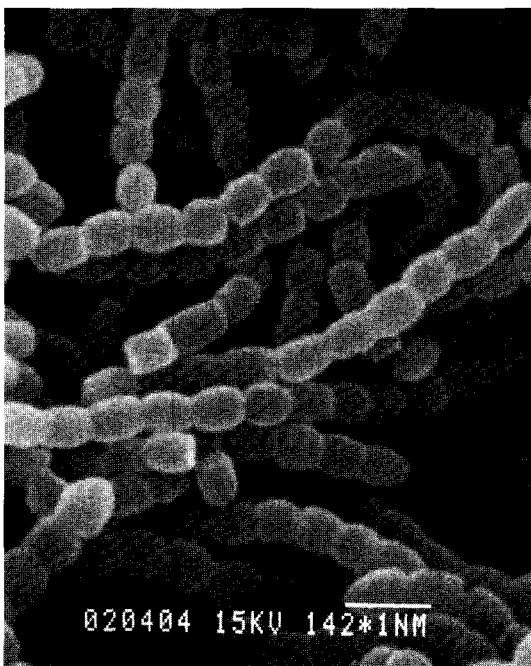


Fig. 1. Scanning electron micrograph of aerial mycelia of PM718 grown on ISP-4 agar at 30°C for 14 days ($\times 10,000$). bar=1 μ m

Table 2. Cultural Characteristics of the PM718 on various media^a

Media	colony	color of reverse	soluble pigment	production of aerial mycelium(color)
Bennett's agar	Violet	Violet	Brown	Trace(white)
Nutrient agar	White	Yellow	Yellow	None
ISP medium-2	Gray	Violet	Violet	White
ISP medium-3	Gray	Brown	Brown	Gray
ISP medium-4	Gray	Violet	Brown	Gray

^acolor description was made after incubation for 14 days at 30 \pm 2°C

자현미경적 소견은 포자사슬은 rectiflexus (RF)하며 포자의 모양은 원통형이었으며 표면은 매끈하였다(Fig. 1). 복합배지(Bennet's media 및 Nutrient 배지) 및 ISP (#2,3,4)배지에서의 배양은 양호

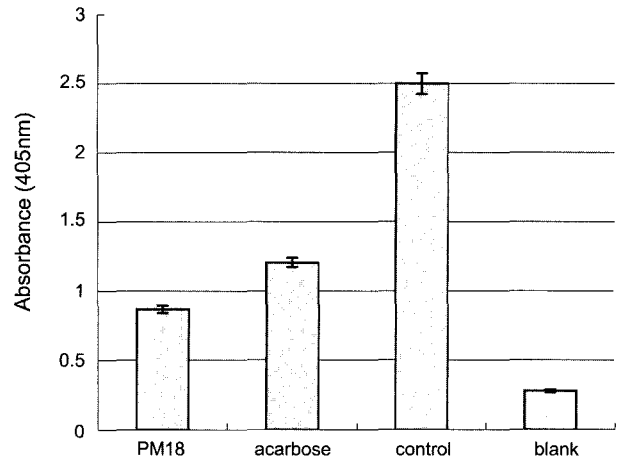


Fig. 2. Inhibitory activity of PM718 culture broth on α -glucosidase activity *in vitro*.

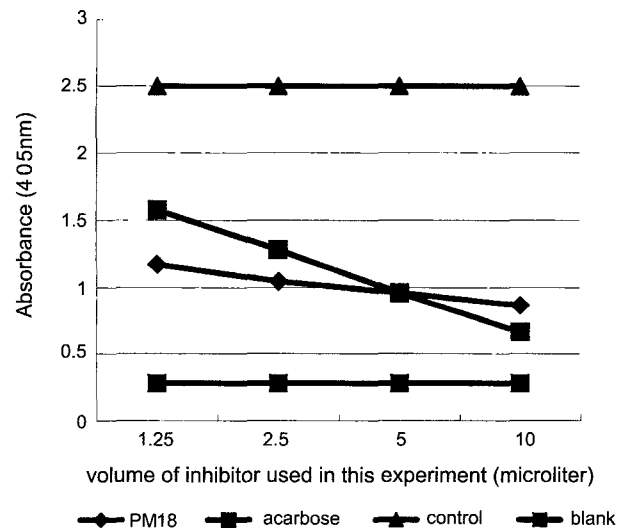


Fig. 3. Concentration dependence of inhibitory activity of PM718 on α -glucosidase *in vitro*.

하였으며 모든 배지에서 갈색-자주색의 기증 균사를 형성하였다 (Table 2).

α -glucosidase 효소활성의 저해

PM718균주의 배양액의 α -glucosidase 효소활성의 저해능을 Dahlqvist (4)등의 방법을 변형하여 측정하였으며 측정결과 기질 물질인 acarbose만큼 우수한 억제효과를 나타냄을 확인하였다. (Fig. 2, 3)

α -glucosidase의 분해산물인 p-nitrophenol의 양을 흡광도로 측정한 결과 2 mM PNPG 용액에 acarbose를 처리한 균에서 생성된 p-nitrophenol의 양은 0.798 mM이었으며 PM718균주의 배양액을 처리한 균에서 생성된 p-nitrophenol의 양은 0.63 mM로서 뛰어난 α -glucosidase 효소저해능력을 나타냄을 확인하였다.

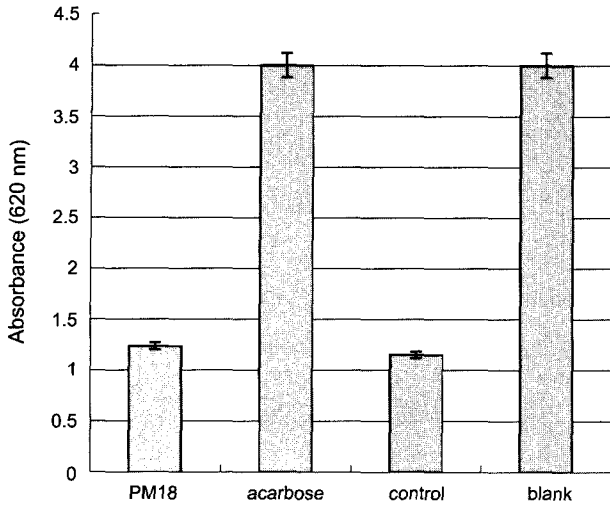


Fig. 4. Inhibitory activity of PM718 culture broth on α -amylase activity *in vitro*.

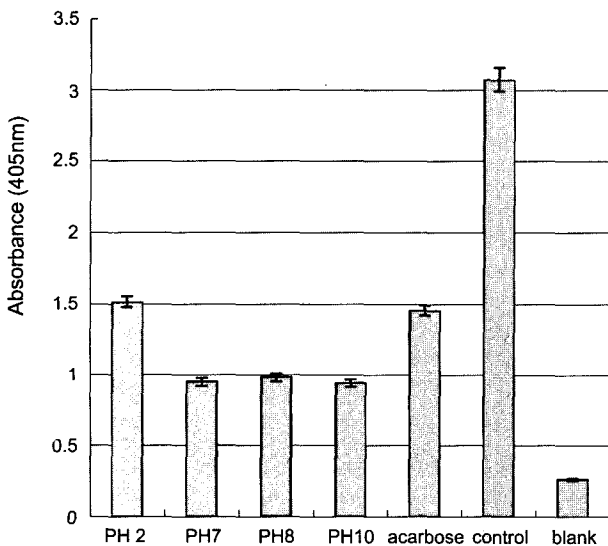


Fig. 5. pH dependence of α -glucosidase inhibitor of PM718 *in vitro*.

α -amylase 효소 활성의 저해

Modified blue value method로 α -amylase 효소활성의 저해효과를 측정한 결과 PM718 균주의 배양액은 α -amylase의 활성을 저해하지는 못하는 것으로 확인되었다(Fig. 4).

α -glucosidase 저해제의 pH 안정성

PM718 균주가 생산하는 α -glucosidase 효소 활성 저해제가 열에 대한 안정성과 pH에 대한 안정성을 갖고 있는지를 확인하기 위하여 배양상등액의 pH를 2, 7, 8 및 10으로 조절 후 60°C에서 30 분간 열처리 후 효소활성의 저해 효과를 측정해본 결과 저해 효과가 pH 2에서 약간 감소하는 결과를 보이기는 하였으나 pH에 의하여 그 효과가 심하게 변하지 않고 유지되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 즉 생체내 위장관과 유사한 환경에서도 본 저해제의 활성이 크게 변하지 않는 것을 확인할 수 있었다.

본 실험에서는 방선균의 2차 대사산물중 하나인 α -glucosidase inhibitor를 생성하는 방선균을 토양 시료로부터 검색하였다. α -glucosidase는 소장에 분포하는 이당류 분해효소로서 이 효소는 당뇨병환자에 있어서는 식이성 당에 의하여 특이적으로 유도되는 것으로 알려졌다(3,5,20). 주요 에너지원으로 섭취하는 탄수화물은 당뇨병환자에서 특이적으로 sucrase, maltase, lactase등의 이당류분해 효소의 활성을 증가시키는 것을 알 수 있다. 사람의 경우 효소활성만 증가하는 것이 아니고 육탄당의 흡수도 또한 증가하는 것을 알 수 있다. 당뇨병환자의 경우 육탄당의 세포내 운반이 증가한 결과 이당류 분해효소의 활성이 증가하는 것으로 사료된다. 이러한 요인들이 당뇨병 환자에 있어서 식후에 갑작스럽게 혈당이 상승하는 것의 이유로 설명된다(6). 따라서 당뇨병환자에게는 설탕과 같은 단순당을 피하기를 권한다. 단순당은 다당류에 비해 장관내에서 쉽게 흡수되고 고혈당을 쉽게 유발한다. 특히 인슐린 비의존성 당뇨병환자의 (Non-Insuline Dependent Diabetes Mellitus, NIDDM) 경우에 있어서 식후 고혈당을 조절하는 것이 합병증의 발병을 감소시키는데 특히 중요하다(6,10,22). 본 실험을 통해 확인된 강력한 α -glucosidase 저해제 활성을 갖고 있는 PM718 균주는 균주동정, 생성 저해제의 특성과 생체내 저해 효과등이 규명되면 탄수화물 대사 이상 질환의 증상개선에 유용한 물질로 개발 가능성이 있는 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 토양에서 강력한 α -glucosidase inhibitor를 생성하는 방선균 PM718균주를 분리하였고 그 효소활성의 저해능은 기질물질인 acarbose 에 못지 않게 우수하며 pH변화에도 안정하게 그 활성을 유지하는 것을 확인하였다.

감사의 말씀

본 연구는 2001학년도 삼육대학 및 삼육의명대학 교비연구비의 일부로 수행되었으며 이에 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Atlas, R.M. 1993. Handbook of microbiological media, Parks, L.C., 1st ed., CRC, Fla, U.S.A.
2. Brodbeck, U. 1980. Enzyme inhibitors, Verlag Chemie p. 109-112.
3. Caspary, W.F. 1978. Sucrose malabsorption in man after ingestion of α -glucosidase inhibitor. *Lancet*. 1, 1231-1233.
4. Dahlqvist, A. 1970. Assay of intestinal disaccharidase. *Enzymol. Biol. Clin.* 11, 52-56.
5. De Boer, S.Y., A.A.M. Masclee, W.F. Lam, J. Schipper, J.B.M.J. Jansen, and C.B.H.W. Lamers. 1993. Hyperglycemia modulates gallbladder motility and small intestinal transit time in man. *Dig. Dis. Sci.* 38, 2228-2235.
6. Denfronzo, R.A., E. Ferrannini, and V. Koivisto. 1983. New concepts in the pathogenesis and treatment of noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Am. J. Med.* 17, 52-81.
7. Fukuhara, K., H. Murai, and S. Muraio. 1982. Amylostatin, other

- amylase inhibitors produced by *Streptomyces diastaticus*. *Agric. Biol. Chem.* 46(8), 2021-2030.
8. Gray, G.M. 1975. Carbohydrates digestion and absorption. *New Eng. J. Med.* 292, 1225-1230.
 9. Horowitz, M., K.M. Cunningham, J.M. Wishart, K.L. Jones, and N.W. Read. 1996. The effect of short term dietary supplementation with glucose on gastric emptying of glucose and fructose and oral glucose tolerance in normal subject. *Diabetologia.* 39, 481-486.
 10. Lembcke, B., M. Diederich, U.R. Flsch, and W. Creutzfeldt. 1990. Post-prandial glycemic control, hormonal effects and carbohydrate malabsorption during long term administration of the α -glucosidase inhibitor miglitol. *Digestion* 47, 47-55.
 11. Madariaga, H., P.C. Lee, L.A. Heitlinger, and E. Lebenthal. 1988. Effects of graded α -glucosidase inhibition on sugar absorption *in vivo*. *Dig. Dis. Sci.* 33, 1020-1024.
 12. Murao, S. and S. Ogura. 1977. Isolation of α -amylase inhibitor-producing microorganism. *Agric. Biol. Chem.* 41, 919-924.
 13. Murao, S. and K.Ohyama. 1979. Chemical of an amylase inhibitor, S-AI. *Agric. Biol. Chem.* 43, 679-681.
 14. Murao, S., A. Goto, Y. Matsuo, and K. Ohyama. 1981. New proteinous inhibitor(Haim) of animal α -amylase from *Streptomyces fricesporeus* YM-25. *Agric. Biol. Chem.* 44, 1679-1681.
 15. Murao, S., N. Oouchi, A. Goto, and M. Arai. 1983. New proteinous inhibitor(Haim) from *Streptomyces corichorisii*. *Agric. Biol. Chem.* 47(2), 453-454.
 16. Nakatani, H. 1988. Selective inhibition of histidine-modified pancreatic α -amylase by proteinaceous inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. *Arch. Bioche. Biophys.* 263, 364-368.
 17. Narimaza, S. 1982. α -amylase inhibitor from fungus *Cladosporium herbarium* F 828, *J. Biol. Chem.* 257, 3120-4125.
 18. Puls, W. and Keup, U. 1975. Recent advances in obesity reserch I, p391. A. Howard(ed), London, Newman.
 19. Puls, W., H.P. Krause, L. Muller, H. Schutt, R. Sitt, R. and G. Thomas. 1983. Inhibition of the rate of carbohydrate and lipid absorption by the intestine. 4th, Int. Congr. Obesity, New York.
 20. Rosenstock, J. and P. Raskin. 1988. Diabetes and its complications : blood glucose control vs. genetic susceptibility. *Diab. Metab. Rev.* 4, 417-435.
 21. Schmidt, D.D., B. W-Frommer, L. Junge, W. Muller, E. Truscheit Wingender, and D. Schafer. 1977. α -glucosidase inhibitors new complex oligosaccharides of microbial origin. *Naturwissenschaften* 64, 535-536.
 22. Tandon, R.K., L.M. Srivastav, and S.C. Pandey, 1975. Increased disaccharidase activity in human diabetics. *Am. J. Clin. Nutr.* 28, 621-625.
 23. Truscheit, F., W. Fromer, B. Jung, L. Muller, D.D. Schmidt and W. Wingender. 1981. Chemistry and Biochemistry of microbial α -glucosidase inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20, 744-761.
 24. Winegrad, A.I. 1987. Does a common mechanism induce the diverse complication of diabetes ? *Diabetes* 36, 396-406.
 25. Yasin, A.F., E.A. Galinski, A. Wohlfarth, K.D. Jahnke, K.P. Schallz and H. G. Trupper. 1993. A new actinomycete species. *Int. J. syst. Bacteriol.* 43, 266-271.
 26. Zahner, H. 1985. The secondary metabolism of microorganism: an inexhaustible source for new products. *Pestic. Sci.* 16, 424-425.

(Received May 19, 2002/Accepted June 4, 2002)

ABSTRACTS : Isolation of α -glucosidase Inhibitor Producing Actinomycetes from Soil Sample

Sung-Sook Choi, Nam-Yong Chung, Kyoung-Je Kim¹ and Nam-Joo Ha^{1*} (Dept. of Food Science, Sahmyook College, ¹Dept. of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 137-742, Korea)

To find α -glucosidase inhibitors produced by Actinomycetes, bacteria belonging to Actinomycetes were isolated from soil sample using Bennett's medium. The inhibitory activity induced by these bacteria on α -glucosidase, which is the key enzymes for carbohydrates digestion and the prevention of diabetic complications, was investigated. A strain of these bacteria, PM718 potently inhibited α -glucosidase activity *in vitro*.