

α -Amylase 저해제 생성균 *Streptomyces actuosus* DMCJ-49와 *Streptomyces minoensis* DMCJ-144의 종간 융합에 의한 균주 개량

김지현 · 최응철 · 김병각
서울대학교 약학대학

(Received January 23, 1991)

Strain Improvement by Interspecific Fusion of *Streptomyces actuosus* DMCJ-49 and *Streptomyces minoensis* DMCJ-144 producing α -Amylase Inhibitor

Ji-Hyun Kim, Eung-Chil Choi and Byong-Kak Kim
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742 Korea

Abstract—*Streptomyces actuosus* DMCJ-49 and *Streptomyces minoensis* DMCJ-144 produce the α -amylase inhibitor. Inerspecific protoplast fusion technique was used to increase the productivity of α -amylase inhibitor. Four auxotrophic mutants were obtained respectively from two strains by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (3 mg/ml) treatment. The optimum conditions for the protoplast formation of *Streptomyces actuosus* DMCJ-49 *ade*⁻ was as follows: 1.2% w/v of glycine, 3 mg/ml of lysozyme, and 30 min of lysozyme treatment followed by 36 hr. incubation in the protoplast formation medium. In case of DMCJ-144-*his*⁻ those were 1.2% w/v, 3 mg/ml, 30 minutes and 60 hours, respectively. Regeneration was accomplished with hypertonic soft agar medium that contained 0.4 M sucrose, 20 mM CaCl₂, 50 mM MgCl₂ and low levels of phosphate. Fusion of protoplasts carrying different auxotrophic markers was achieved by treatment with polyethylene glycol. The optimum concentration of polyethylene glycol 1450 for the production of recombinants was 40% w/v. When the protoplasts were treated with 40% polyethylene glycol for 30 minutes, the frequency of recombinants was 6.5×10^{-3} and the α -amylase inhibition activity of *ade*⁻*his*⁻ No. 4, which is the fusant with the most improved activity increased from 33 to 125 I.U./ml.

Keywords □ α -amylase inhibitor, *Streptomyces actuosus*, *Streptomyces minoensis*, protoplast fusion.

탄수화물의 주종인 전분은 위장관에서 α -amylase에 의해, 그리고 소장 maltase에 의해 glucose로 가수분해 되어 결국 혈류로 흡수되어 혈당량 및 insulin level의 상승을 가져온다. 따라서 α -amylase와 같은 효소의 작용을 제한 조절할 수 있을 경우, 전분의 소화속도를 지연시킴으로써 그 흡수 kinetics 및 혈당량의 분포에 영향을 미치게 되어, 탄수화물의 조절이상으로 고생하는 당뇨병상이나 비만증상의 환자에게 있어서 식이요법의 치료효과를 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다. 실제 α -amylase 저해물질을 insulin 및 sulfonylurea류의 당뇨병 치료약물과 병행하여 사

용시 dose의 감소, 치료기간의 단축 및 부작용의 경감 등 유용성이 있는 것으로 보고된 바 있다. 또한, 동물실험에서는 α -amylase 저해물질을 투여함으로써 전분의 가수분해로 인해 생기는 포도당이 adipose tissue의 지질성분으로 전환되는 것을 차단할 뿐 아니라 혈중당의 농도를 감소시키는 효과를 보여주었다.^{1,2)} 이러한 α -amylase 저해물질들은 크게 oligosaccharide 계통물질과 polypeptide 계통물질로 나누어 질 수 있으며 일본과 독일에서 활발히 연구되어 왔는데 다케다 제약회사에서 보고한 AO-128¹⁾ 및 독일 Bayer사의 acarbose가 대표적이라 할 수 있고 우리나라에

서도 이 분야의 연구가 필요하다고 생각된다. 미생물의 2차 대사산물들은 비교적 저분자 물질이므로 인체 독성면이나, 대량생산면에 있어서 고등식물이나 동물에서 얻어지는 고분자 물질에 비해 큰 잇점을 가지고 있는데, 특히 저분자 물질은 고분자 물질에 비해 상대적으로 소화관내에서 효소에 의해 분해될 확률이 적으며, 단일물질로 정제하기 유리하고 안정성 유지가 용이하다. 이와 같은 미생물의 2차 대사산물인 α -amylase 저해물질의 생산성 향상 및 공업적 이용을 가능하게 하기 위해서는 최적 발효조건을 결정하고, 인공 돌연변이, 재조합 등을 적용하여 균주를 개량해야 한다. 재조합의 경우 특정 유전자만의 도입(transformation)에 의한 것 보다는 원형질체 융합에 의해 그 비율을 증가시킬 수 있다고 보고된 바 있으며,⁵⁾ 실제 *Streptomyces rimosus*의 종내융합으로 oxytetracycline의 생산성이 향상되었고⁶⁾ 종간융합으로서 *Streptomyces fradiae*와 *Streptomyces bikiensis*간의 융합을 Godfray 등이 시도한 바도 있다.⁷⁾ 본 연구에서는 한국 토양에서 분리하여 보관, 분석한 바 있는 α -amylase 저해제 생성균주인 *Streptomyces actuosus* DMCJ-49⁸⁾ 균주와 *Streptomyces minoensis* DMCJ-144⁹⁾ 균주의 종간융합을 통해 균주개량을 시도하여 저해물질의 생산성 향상을 시도하였다.

실험방법

시험균주—한국토양 재료에서 분리되어 modified blue value method를 이용한 assay system의 검색에 의해 α -amylase 저해제를 생산하는 균주로 선발되어 slant에 보관중인 *Streptomyces minoensis* DMCJ-144⁹⁾를 개량대상 균주로 하였고, *Streptomyces actuosus* DMCJ-49⁸⁾를 융합대상 균주로 사용하였다.

배지—균주 보관과 포자형성에는 sporulation agar slant medium(ATCC medium 5)을 사용하였고, mutagenesis와 auxotrophs의 선별에는 완전배지(complete medium)와 최소배지(minimal medium)를 사용하였다.¹⁰⁾ 균사체 배양에는 medium S를 사용하였으며, glycine 함유시는 앞의 medium S를 최종 부피의 80%되도록 조제한 후 멸균하고, 계산량의 멸균수와 10%w/v glycine 용액을 첨가하였다. 원형질체 형성 및 회색에 사용한 medium P와 세포벽 재생에 사용한 medium R2를 사용하였으며¹¹⁾ fusion 후 용

합균주의 선별을 위한 최소재생 배지는 medium R2에서 casamino acid와 L-proline을 제하고 alanine을 첨가하여 사용하였다.¹²⁾ 융합균주의 활성검색을 위하여 oat meal medium을 사용하였다.

돌연변이 유발 및 영양 요구성 균주의 선별—Delic 등¹³⁾의 방법에 의해 돌연변이를 유발시켰다. 즉 sporulation agar slant medium에 접종하여 29°C에서 10일간 배양시켜 충분히 포자를 형성시킨 후 0.05% triton X-100을 가하여 소수성인 포자를 모았다. 돌연변이 유발을 위해 포자의 pellet에 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG)를 녹인 TM buffer(pH 9.0) 5 ml를 가하여 30°C에서 적당시간 shaking하여 돌연변이를 유발시켰다. 돌연변이 유발시 NTG의 농도는 1 mg/ml와 3 mg/ml 두 농도로 하였고, 처리시간은 30분 간격으로 30~180분으로 하여 최적조건을 구하였다. NTG로 처리한 포자를 plate당 100개 가량의 colony가 자라도록 complete medium(CM)에 접종하였다. 3~4일 배양 후 CM에서 자란 colony를 velvet replica를 이용하여 CM과 minimal medium(MM)으로 옮긴 후, 2~3일 배양하고 MM에서 자라지 않는 colony를 CM에서 골라내어 3~4회 재 test를 거친 후 안정한 auxotrophs를 CM slant에 옮겨 보관하였다. 이들 auxotroph의 양영요구 물질을 밝혀내기 위해 auxonography method를 사용하였다.¹⁴⁾

원형질체 생성—원형질체 생성과정은 Shirahama 등¹⁵⁾이 사용한 방법의 일부를 변경하여 실시하였다. 각 균을 slant로부터 medium S에 접종하여 29°C에서 48시간 전 배양하고 동일 크기의 집락을 glycine 첨가배지로 옮겨 배양하였다. 적당한 시간까지 배양한 배양액을 0.3 M sucrose 용액으로 2회 세척하고 원심분리(1,000×g, 10 minutes)하여 그 pellet에 lysozyme 용액 5 ml를 가하여 32°C에서 30~120분간 shaking하였다. 이 때 protoplast 생성에 영향을 주는 요인들을 조사하기 위하여 medium S 중의 glycine 농도, 균사체 배양시간, lysozyme 농도 및 lysozyme 처리시간 등을 달리하여 그 최적조건들을 구하였다.

원형질체 재생—위와같이 하여 얻은 protoplast 용액을 medium P에 회색하여 미리 건조시킨 medium R2에 0.1 ml씩 접종한 다음 그 위에 soft agar를 4 ml씩 overlay한 후 29°C에서 더 이상 colony가 생기지 않을 때까지 배양하였다.¹⁶⁾ 재생빈도는 다음과 같이 계산하였다.

Table I—The optimum conditions for mutagenesis in *Streptomyces actuosus* DMCJ-49 and *Streptomyces minoensis* DMCJ-144 with NTG.

| Time (min) | concentration (mg/ml) | <i>Strep. actuosus</i> DMCJ-49 | | <i>Strep. minoensis</i> DMCJ-144 | |
|------------|-----------------------|--------------------------------|------------------------|----------------------------------|------------------------|
| | | surviving fraction | mutation frequency (%) | surviving fraction | mutation frequency (%) |
| 0 | — | (1.000) | — | (1.000) | — |
| 30 | 1 | 0.251 | 0.020 | 0.362 | 0.030 |
| | 3 | 0.003 | 1.102 | 0.025 | 0.051 |
| 60 | 1 | 0.550 | 0.011 | 0.240 | 0.043 |
| | 3 | 0.001 | 5.220 | 0.014 | 0.202 |
| 90 | 1 | 0.240 | 0.050 | 0.320 | 0.044 |
| | 3 | 0.002 | 1.427 | 0.004 | 1.132 |
| 120 | 1 | 0.058 | 0.119 | 0.210 | 0.064 |
| | 3 | 0.003 | 1.032 | 0.044 | 0.240 |
| 150 | 1 | 0.048 | 0.137 | 0.190 | 0.094 |
| | 3 | 0.002 | 1.341 | 0.024 | 0.588 |
| 180 | 1 | 0.039 | 0.189 | 0.241 | 0.046 |
| | 3 | 0.003 | 1.032 | 0.016 | 0.236 |

Table II—Mutant strains of *Streptomyces* sp. used in the experiment.

| Strain* | Genotype** | Strain* | Genotype** |
|------------------------|------------|-------------------------|------------|
| <i>Strep. actuosus</i> | prototroph | <i>Strep. minoensis</i> | Prototroph |
| DMCJ 49-1 | ade | DMCJ 144-1 | his |
| DMCJ 49-2 | cyt | DMCJ 144-2 | ade |
| DMCJ 49-3 | hyx | DMCJ 144-3 | met |
| DMCJ 49-4 | thi | DMCJ 144-4 | thi |

*All mutants were prepared by NTG mutagenesis using spores.

**Abbreviation : ade, adenine ; his, histidine ; cyt, cytosine ; thi, thiamine ; met, methionine ; hyx, hypoxanthine

Regeneration frequency =

$$\frac{\text{The number of regenerated colonies diluted with P buffer}}{\text{Total number of protoplasts per plate}} \times 100$$

원질질체 융합¹⁷⁾—두 auxotroph의 protoplast를 최소 재생배지에 각각 접종하여 back mutation을 검토하는 한편, 융합을 수행하기 위해 두 auxotroph의 protoplast를 동량 섞어서 원신분리하여 상등액을 따라내었다. pellet을 현탁한 후 적당한 polyethylene glycol(PEG) 용액을 0.9 ml 가하여 1분 동안 실온에서 서서히 흔들면서 반응시킨 다음 4 ml의 medium P를 가하고 원심분리(1,000×g, 10 minutes)하여 PEG 작용을 중지시켰다. medium P를 1.0 ml 가한 후 적당히

희석하여 medium R2 및 최소 재생배지에 0.1 ml씩 접종하고 29°C에서 배양하여 2일 간격으로 colony 수를 세었다.

융합빈도는 다음과 같이 계산하였다.

Fusion frequency =

$$\frac{\text{The number of prototrophic colonies grown on R2 minimal medium}}{\text{Total number of colonies grown on R2 complete medium}}$$

Total number of colonies grown on R2 complete medium

융합균주의 활성검색—최소 재생배지에서 생성된 융합균주의 활성조사를 위해 먼저 oat meal 배지로 옮겨서 배양한 후 배양 여액으로 modified blue value method¹⁸⁾에 의하여 α-amylase 저해력을 측정하여 prototroph와 비교하였다.

실험결과 및 고찰

돌연변이 유발 및 영양요구성 변이주의 선별—Sporeulation agar medium에서 10일간 배양했을 때 *Streptomyces actuosus* DMCJ-49 균주 및 *Streptomyces minoensis* DMCJ-144 균주 모두 양호하게 포자를 형성하였다. 두 균주에 표식(marker)을 붙이기 위하여 NTG는 Table I에서 나타난 바와 같이, *Streptomyces actuosus* DMCJ-49 균주는 3 mg/ml의 농도로 60분간, *Streptomyces minoensis* DMCJ-144 균주는 3 mg/ml의 농도로 90분간 반응시킴이 적당함을 알 수

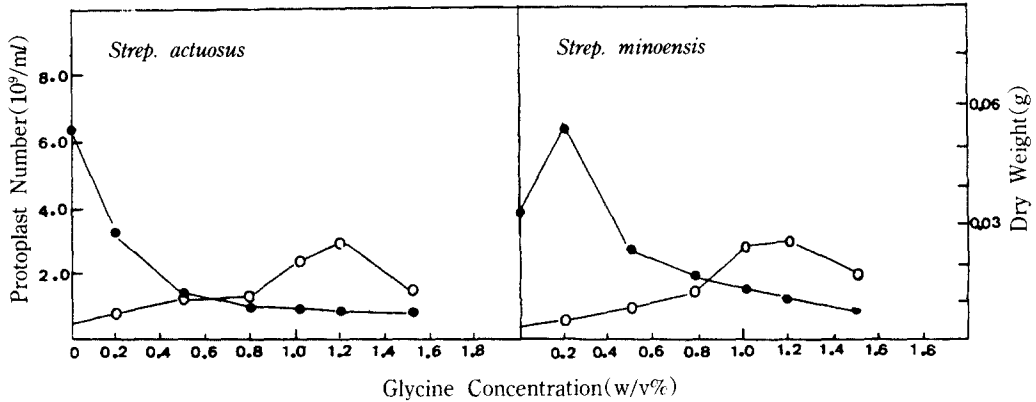


Fig. 1—Effect of glycine concentration of culture medium on growth(●) and protoplast formation(○).

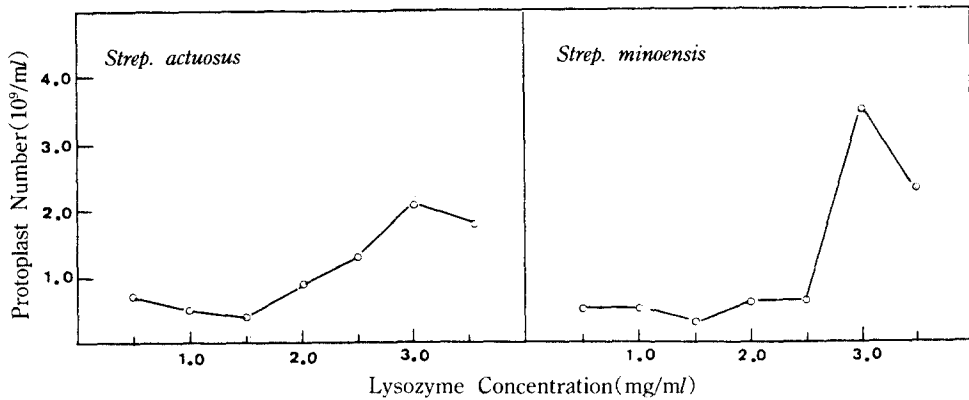


Fig. 2—Effect of lysozyme concentration on protoplast formation.

있었다. 이 최적조건에서 30회의 실험을 실시한 결과 Table II에 표시된 안정한 영양요구성 변이주를 얻을 수 있었다. NTG의 처리시, 각 처리시간 마다 1 mg/ml 보다는 3 mg/ml의 농도에서 더욱 생존정도가 낮았으며 돌연변이 빈도는 높음을 알 수 있었다. *Streptomyces actuosus* DMCJ-49 균주는 0.1%의 생존율에서, *Streptomyces minoensis* DMCJ-144 균주는 0.4%의 생존율에서 돌연변이 정도가 높게 나타났으며, 이는 *Streptomyces*속의 여러 다른 균에서의 경우와 유사하였다.¹¹⁾

균사체 성장 및 원형질체 생성에 대한 glycine의 효과—glycine을 0.2%w/v에서 1.5%w/v까지 변화시켜 2일간 배양하여 glycine 농도에 따른 원형질체 생성량을 알아보았다. 원형질체는 2 mg/ml 농도의 lysozyme 5 ml를 가하고 32°C에서 30분간 반응시켜 생성시켰다. 이와 같이 실험한 결과 Fig. 1에 도시한 바와

같이 1.2%w/v까지는 S배지에 glycine을 첨가함에 따라 원형질체 생성량이 증가하였으며, 균사체의 성장은 저해되었다. DMCJ-49-ade 및 DMCJ-144-his의 경우 모두 1.2%w/v의 glycine 농도에서 원형질체의 생성량이 최대가 되었다. *Streptomyces actuosus* DMCJ-49 균주의 경우 0.2%w/v의 glycine이 함유된 S배지에서 자란 균사체가 glycine이 없는 S배지에서의 균사체보다 더욱 성장한 것을 볼 수 있는데, 이는 log phase의 초기에 낮은 농도의 glycine이 어느 정도 영양원으로서 작용한 것으로 사료된다.

원형질체 생성에 미치는 lysozyme 농도의 효과—원형질체 생성에 있어서 적당한 lysozyme 농도의 결정을 위해 1.2%w/v glycine이 첨가된 S배지에서 수확한 균사체에 0.5 mg/ml에서 3.5 mg/ml 사이의 여러 다른 농도의 lysozyme 용액 5 ml를 가하였다. 이들을 32°C에서 30분간 반응시킨 후 원형질체를 생

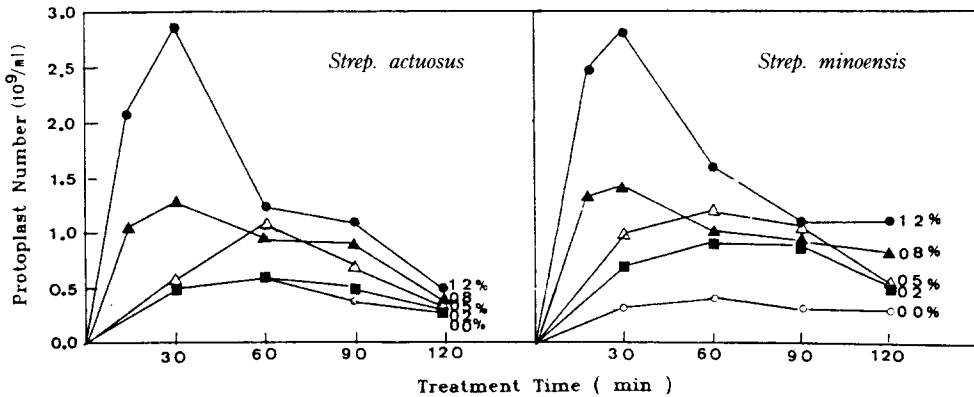


Fig. 3—Effect of lysozyme treatment time on protoplast formation.

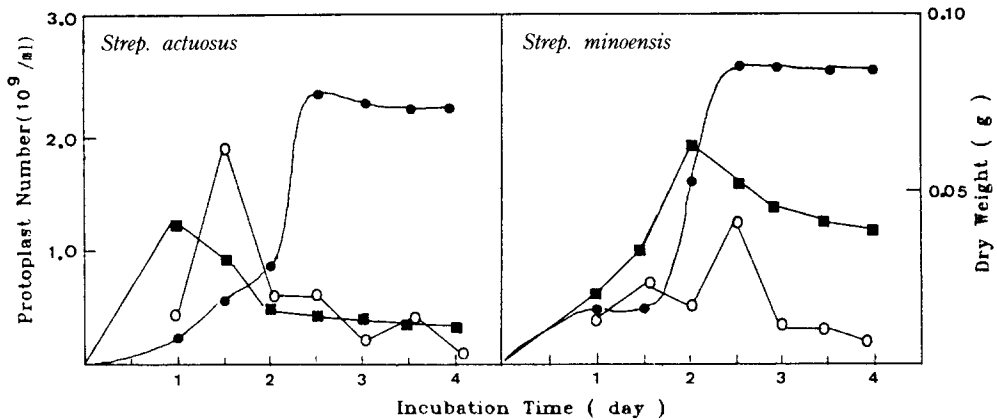


Fig. 4—Effect of culture time on protoplast formation(○) and growth curve with(■) and without glycine(●).

성시켰다(Fig. 2). DMCJ-49-ade⁻ 와 DMCJ-144-his⁻ 모두 3.0 mg/ml의 lysozyme 농도에서 원형질체가 최대량으로 생성되었다.

원형질체 생성에 미치는 lysozyme 처리시간의 효과—lysozyme을 3 mg/ml의 농도로 32C에서 30분간격으로(30분~120분) 반응시켰다. 앞의 Fig. 1에서 lysozyme 농도를 2 mg/ml로 하였을 때 glycine의 최적농도가 1.2%w/v이었으므로, 최적 lysozyme 농도인 3 mg/ml에서 glycine 농도를 변화시켜가며 원형질체 생성에 미치는 처리시간의 영향을 같이 보았다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 S배지 중에 glycine 농도가 높을수록 원형질체 생성량이 많았으며, 1.2%w/v의 glycine이 함유된 S배지에서 자란 균사체를 lysozyme으로 30분간 처리함으로써 충분한량의 원형질체를 얻을 수 있었다. 최적시간에 원형질체 생성량이 최대로 된 후 반응시간이 연장됨에 따라 그 생성량이 감소하는

현상을 볼 수 있는데, 이는 생성된 원형질체에 lysozyme이 작용함으로써 원형질체가 파괴되고 세포 내용물이 노출되어 주위의 원형질체를 깨뜨려 감소를 가져온다고 사료된다. 또한 glycine의 농도가 높을수록 최적 lysozyme 처리시간이 짧아졌는데 이는 glycine의 농도가 높을수록 세포벽이 더욱 약해져 lysozyme에 민감하게 되는 것으로 생각된다.

원형질체 생성에 미치는 균사체 배양시간의 효과—Fig. 4에서는 배양시간에 따른 원형질체 생성량을 알아봄과 더불어 glycine이 첨가되지 않은 S배지에서의 성장과 glycine이 1.25%w/v 농도로 첨가된 S배지에서의 성장상태를 비교해 보았다. 그 결과 DMCJ-49-ade 은 36시간, DMCJ-144-his⁻은 60시간에서 원형질체 생성이 가장 많았고 두 균주 모두 성장이 급격히 감소되는 때에 원형질체 생성이 최대로 되었음을 볼 수 있었다. glycine이 첨가된 경우, 처

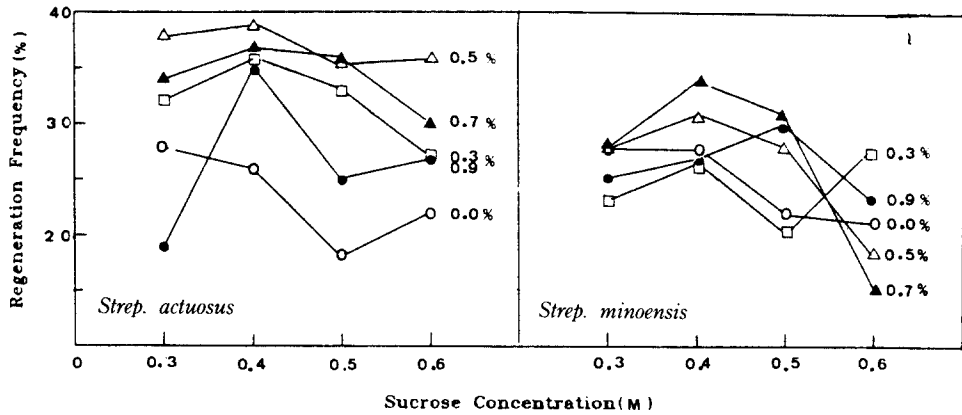


Fig. 5—Effect of sucrose concentration and soft agar concentration on protoplast regeneration.

Table III—Effects of the molecular weight, concentration and treatment time of PEG for the protoplast fusion.

| PEG | | Treatment time (min) | Recombination frequency |
|------|--------|----------------------|-------------------------|
| Mw. | %(w/v) | | |
| — | — | 3 | 2.2×10^{-5} |
| 1450 | 40 | 3 | 1.2×10^{-3} |
| 3550 | 40 | 3 | 2.5×10^{-4} |
| 6000 | 40 | 3 | 1.8×10^{-4} |
| 1450 | — | 3 | 1.4×10^{-5} |
| 1450 | 20 | 3 | 2.5×10^{-4} |
| 1450 | 40 | 3 | 1.1×10^{-3} |
| 1450 | 60 | 3 | 5.7×10^{-4} |
| 1450 | 40 | 0 | 2.3×10^{-5} |
| 1450 | 40 | 3 | 8.0×10^{-4} |
| 1450 | 40 | 10 | 1.2×10^{-3} |
| 1450 | 40 | 30 | 6.5×10^{-3} |
| 1450 | 40 | 50 | 4.3×10^{-3} |

음에는 성장속도가 증가하다가 *Streptomyces actuosus* DMCJ-49 균주는 24시간 이후부터, *Streptomyces minoensis* DMCJ-144 균주는 48시간 이후부터 급격히 감소하는 현상을 보이는데 이는 첨가한 glycine이 처음에는 영양원으로서의 구실도 하여 세포벽을 약하게 하는 상태에서 증식시키다가 일정시기에 달하여 세포벽이 급격히 파괴되는 것으로 추측된다.

이상에서와 같은 조건으로 원형질체를 형성시킨 결과 S배지 10 ml에 배양했을 경우 10^{10} 개 이상의 원형질체를 얻을 수 있었고 균사체 1 mg당 2.0×10^6 개 이상의 원형질체가 생성되었다.

원형질체 재생—세포벽 재생에 미치는 sucrose⁵⁾ 및

soft agar⁶⁾ 농도의 효과를 관찰하기 위하여 DMCJ-49-ade 와 DMCJ-144-his 각각의 원형질체를 sucrose의 농도를 다양하게한(0.3~0.6 M) R2 배지에 집중한 후 soft agar의 농도를 달리하여(0.3~0.9%) overlay 하였다. 세포벽 재생에 최적인 sucrose 및 soft agar의 농도는 DMCJ-49-ade 의 경우 0.4 M sucrose, 0.5% soft agar이며, DMCJ-144-his 의 경우는 0.4 M sucrose, 0.7% soft agar이었다(Fig. 5). sucrose의 농도는 Keller 등¹⁰⁾의 실험에서 나타난 0.25 M 보다 다소 높은 농도이었으며 soft agar는 Pigac 등¹¹⁾의 0.6% soft agar와 비교시 DMCJ-49 균주는 0.1% 낮은 농도, DMCJ-144 균주는 0.1% 높은 농도를 나타내었다. 이와 같은 조건에 의해서 실험한 결과 원형질체의 재생빈도는 30%에서 40% 사이로 나타났다.

원형질체 융합—Table II에 나타난 영양요구성 균주의 원형질체를 최소재생배지에 집중하여 back mutation을 관찰한 결과 융합에 사용될 원형질체양인 10^6 cells/ml까지는 reversion이 되지 않았다. 사용한 PEG의 분자량 및 농도, 처리시간 등은 Table III에 나타내었다. 실험에 사용한 PEG 중 분자량 1450의 것이 최대 융합율을 보였으며, 이 분자량의 PEG를 농도가 40%로 30분간 처리했을 때 융합율이 최대이었다. 이는 Hranueli 등¹⁹⁾이 *Streptomyces rimosus*를 융합한 PEG의 조건과 유사하였다.

융합균주의 α-amylase 저해활성의 검색—총 350개의 융합균주들을 modified blue value method에 의해 α-amylase 저해활성을 검색하였다. 그 결과 개량대상인 *Streptomyces minoensis* DMCJ-144 균주의 α-amylase 저해활성보다 높은 저해활성을 나타내는 융

Table IV—The protoplast fusion frequencies of several genetic crosses to select higher α -amylase inhibition activity.

| Cross* (genotype) | Frequency (%) | Cross* (genotype) | Frequency (%) |
|------------------------------------|------------------|------------------------------------|------------------|
| (DMCJ 49)×(DMCJ 144) | | (DMCJ 49)×(DMCJ 144) | |
| ade ⁻ ×his ⁻ | 26.3 | hyx ⁻ ×his ⁻ | 7.3 |
| ade ⁻ ×met | 7.1 | hyx ⁻ ×ade | 9.1 |
| ade ⁻ ×thi ⁻ | 4.2 | hyx ⁻ ×met | 14.4 |
| cyt ⁻ ×his | 9.3 | hyx ⁻ ×thi ⁻ | 18.3 |
| cyt ⁻ ×ade ⁻ | 5.2 | thi ⁻ ×his ⁻ | 21.0 |
| cyt ⁻ ×met | 8.3 | thi ⁻ ×ade | 4.3 |
| cyt ⁻ ×thi | 5.7 | thi ⁻ ×met | 12.4 |

*cross : auxotroph of *Streptomyces actuosus* DMCJ 49 (left)×auxotroph of *Streptomyces minoensis* DMCJ 144(right)

Abbreviation : ade, adenine ; his, histidine ; cyt, cytosine ; thi, thiamine ; met, methionine ; hyx, hypoxanthine

합균주수의 백분율이 Table IV와 같았다. DMCJ-49-ade⁻×DMCJ-144-his⁻의 경우 융합재생 균주중 26.3%가 prototroph의 저해활성보다 높게 나왔으며 이중 ade⁻×his⁻의 No.4인 균주는 125 i.u./ml로 prototroph의 저해활성에 비해 3배의 증가를 나타내었으며, 이 외에도 ade×his No.103은 71 i.u./ml, thi⁻×ade의 No.36은 62 i.u./ml로 2배 정도의 증가를 보였다.

결 론

융합균주 선별을 위한 marker로 사용하기 위하여 3 mg/ml 농도의 NTG를 사용하여 30°C에서 60분(DMCJ-49) 및 90분간(DMCJ-144) 반응시켜 각각 4 종류의 영양요구성 균주들을 얻었으며, 이들을 융합에 사용하였다. 효율적인 원형질체 생성을 위하여 1.2% w/v의 glycine을 함유한 S배지에서 *Streptomyces actuosus* DMCJ-49는 1.5일 *Streptomyces minoensis* DMCJ-144는 2.5일 배양 후 3 mg/ml lysozyme 용액으로 32°C에서 30분씩 처리하였다. soft agar를 overlay한 0.4 M sucrose가 함유된 배지에서 재생시켰을 때 두 균주 모두 30% 이상의 재생율을 나타내었으며 분자량 1450인 PEG를 40% 농도로 30분간 처리하여 융합을 유도하였다. 융합균주에 대하여 α -amylase에

대한 저해활성을 본 결과 ade⁻×his⁻ No.4의 경우 prototroph에 비하여 3배 이상의 증가를 나타내었다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 목적기초연구비로 수행된 것으로 동 재단에 깊이 감사한다.

문 헌

- 1) Brodbeck, U. : *Enzyme inhibitors*, Verlag Chemie Weinheim. p. 109 (1980).
- 2) Puls, W. and Keup, U. : *Recent advances in obesity reserch* I, (A. Howard, ed) London, Newman p. 391 (1975).
- 3) Niwa, T., Inouye, S., Tsuruoka, T., Kanze, Y. and Niida, T. : Nojirimycine as a potent inhibitor of glucosidase. *Agric. Biol. Chem.* **34**, 966(1970).
- 4) Sochynsky, R. and Hardcastle, J. : Therapeutic categories main volume, *Pharma projects* **10**, 56 (1989).
- 5) Keller, U., Poschmann, S., Kregel, U., Kleinkauf, H. and Kraepelin, G. : Studies of protoplast fusion in *Streptomyces chrysomallus*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1725(1983).
- 6) Pigac, J., Harmeli, D., Smokvina, T. and Alacevic, M. : Optimal cultural and physiological conditions for handling *Streptomyces rimosus* protoplasts. *App. Environ. Microbiol.* **44**, 1178(1982).
- 7) Godfrey, O., Ford, L. and Huber, M.L.B. : Interspecies matings of *Streptomyces fradiae* with *Streptomyces bikiniensis* mediated by conventional and protoplast fusion technique. *Can. J. Microbiol.* **24**, 994(1978).
- 8) 염대현, 최응칠, 김진웅, 김병각 : *Streptomyces* sp. DMCJ-49 균주가 생산하는 α -amylase 저해제 MB4-03의 분리와 구조분석. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**, 338(1990).
- 9) 정영자, 최금화, 최응칠, 김병각 : 토양미생물이 생산하는 α -amylase 저해제에 관한 연구 *Streptomyces* DMCJ-144 균주의 저해성분의 분리 및 작용, *Seoul Univ. J. Pharm. Sci.* **14**, 1(1989).
- 10) Hopwood, D.A. : Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*. *Bac. Rev.* **31**, 373

- (1967).
- 11) Okanishi, M., Suzuki and Umezawa : Formation and Reversion of *Streptomyces* protoplasts : cultural condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol.* **80**, 389(1974).
 - 12) Nakano, M.M., Ishihara, H. and Ogawara, H. : Fusion of protoplasts of *Streptomyces lavendulae*. *J. Antibiot.* **35**, 359(1982).
 - 13) Delic, V., Hopwood, D.A. and Friend, E.J. : Mutagenesis by NTG in *Streptomyces coelicolor*. *Mut. Res.* **9**, 167(1970).
 - 14) Clowes, R.C. and Hayes, W. : *Experiments in microbial genetics*, printed in Girford p. 228 (1968).
 - 15) Shirahama, T., Furumai, T. and Okanishi, M. : A modified regeneration method for *Streptomyces* protoplasts. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 1271(1981).
 - 16) Baltz, R.H. : Genetic recombination in *Streptomyces fradiae* by protoplast fusion and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.* **107**, 93(1978).
 - 17) Ochi, K., Hitchcock, M.J. and Katz, E. : High frequency fusion of *Streptomyces parvulus* and *Streptomyces antibioticus* protoplasts induced by polyethylene glycol. *J. Bacteriol.* **139**, 984(1979).
 - 18) Murao, S., Ohyama, K. and Ogura, S. : Isolation of amylase inhibitor-producing microorganism. *Agric. Biol. Chem.* **41**, 919(1977).
 - 19) Hranueli, D., Pigac, J., Smokvina, T. and Alacevic, M. : Genetic interactions in *Streptomyces rimosus* mediated by conjugation and by protoplas fusion. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1415(1983).