

α -아밀라아제 저해제 생성 방선균, *Streptomyces minoensis* DMCJ-144의 저해제 생산을 위한 최적 배양 조건

서성옥 · 최응철# · 김병각
서울대학교 약학대학
(Received July 28, 1992)

Optimum Culture Conditions for α -Amylase Inhibitor Production of *Streptomyces minoensis* DMCJ-144, a α -Amylase Inhibitor Producing *Actinomycetes*

Seong-Ok Seo, Eung-Chil Choi# and Byong-Kak Kim
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—*Streptomyces minoensis* DMCJ-144 isolated from soil produces the α -amylase inhibitor. Optimum culture conditions for α -amylase inhibitor production of the strain were determined in this experiment. The optimum composition of the culture medium was studied by supplementing various carbon sources, nitrogen sources, vitamins, and metal salts to the basal medium containing 1% glucose, 0.1% asparagine, 0.005% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% K_2HPO_4 , 0.005% NaCl. Other culture conditions such as the culture temperature, initial pH of the medium, aeration, and culture time were also investigated. When the strain was cultured in a 100 ml flask containing 20 ml of 2% glucose, 0.5% beef extract, 0.0002% riboflavin, 0.0002% thiamine · HCl, 0.01% $ZnCl_2$, 0.005% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.005% K_2HPO_4 , 0.005% NaCl, pH 7.2, 180 rpm at 30°C, the maximum production of the α -amylase inhibitor was observed after 5 days of the cultivation.

Keywords □ α -amylase inhibitor, *Streptomyces minoensis* DMCJ-144, optimum culture conditions.

α -Amylase는 carbohydrate의 α -1, 4 glycosidic linkage를 α -maltose, glucose와 소량의 α -dextrin으로 분해시키는 효소이다.¹⁾ 소장 점막의 미용모막에는 α -D-glucosidase를 포함하여 β -galactosidase,²⁾ glucoamylase, sucrase- α -dextrinase 및 trehalase³⁾ 등이 존재하며, 이들 효소에 의한 분해산물은 glucose, fructose 및 galactose이다.⁴⁾ 사람에게 있어서, glucose의 이상 대사는 당뇨병, 비만, 고지혈증과 같은 질병을 유발시키며,^{5,6)} 이러한 질병이 증가 되어감에 따라 탄수화물 분해 효소 저해제는 탄수화물 의존성 질환의 치료제로서 이용 가능성이 주목되고 있다.⁷⁾

특히, 이 저해제들은 전분의 소화속도를 지연시킴으로써, 그 흡수 kinetics에 영향을 미치게 되어 치료 기간 중의 혈당량의 고른 분포를 가능케 하여 식이 요법의 치료 효과를 극대화시킬 수 있고,⁸⁾ insulin 및 sulfonyleurea류의 당뇨병 치료 약물과 병행하여 사용될 때 dose의 감소, 치료 기간의 단축 및 부작용의 경감 등에 유용성이 있는 것으로 보고 있다.^{9-11,12)}

이 분야의 연구는 주로 일본과 독일에서 많이 연구되어 왔으며, α -amylase 저해제는 주로 oligosaccharide 계통의 물질과 peptide 계통의 물질들로 보고되었다. 이전에 보고된 oligosaccharide 계통의 저해제로는 S-AI,¹³⁾ AT I-I, -II,¹⁴⁾ BAYe 4609,¹⁵⁾ oligostatin,¹⁶⁾ amylostatin,¹⁷⁾ trestatin^{18,19)} 등이 있고 peptide 계통의

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

저해제로는 Goto 등의 X-2와 Murao 등에 의해 보고된 haim 등이 있다.²⁰⁾

본 실험에서는 토양으로부터 α-amylase 저해제를 생산하는 방선균 *Streptomyces minoensis* DM CJ-144 균주에 대해, 생성되는 저해제의 생산성 향상 및 공업적 이용을 가능하게 하기 위해서 이 균주의 최적 탄소원, 질소원, vitamin, 금속염을 조사하고 그 결과로 얻은 최적 배지 조성에서 최적 배양 온도, pH, aeration, 배양 시간을 결정하고자 하였다.

실험방법

실험균주—한국 토양에서 채취된 균주들에서 modified blue value method¹¹⁾를 이용한 검정계에 의해 선발된 균주 *Streptomyces minoensis* DM CJ-144를 이용하였다.

배지 및 배양방법—보관중인 균주의 순수 배양을 위한 배지로는 oat meal agar 배지(Oat meal 20g, yeast extract 1g, agar 20g, distilled water 1l, pH 7.0~7.4)를 사용했고, α-amylase 저해제 생산을 위한 최적 배양 조건을 조사하기 위해서는 glucose 10.0g, asparagine 1g, K₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, distilled water 1l를 기본 배지로 하고 여기에 여러가지 탄소원, 질소원, vitamin, 금속염 등을 첨가하여 100 ml 삼각 플라스크에 20 ml씩 주입하였다. 순수 배양된 단일 colony를 접종하여 27°C에서 6일간 180 rpm으로 진탕 배양하였다.

저해활성의 측정—저해활성은 α-amylase와 시료를 반응시킨 후 잔류하는 효소 활성을 modified blue value method로 측정하여 앞의 연구에서 적용한 다음 계산식¹²⁾에 의해 계산하였다.

$$\text{Percent inhibition(P.I.)} = \frac{T - C}{B - C} \times 100(\%)$$

위에서 T, C와 B는 test, control 및 blank 각각의 optical density이다. 1 inhibition unit는 50% 저해 활성을 보이는 저해 물질의 양으로 하였다.

균체량 측정—배양이 끝난 배양액을 원심 분리한 다음 동결 건조하여 건조 중량을 측정하였다.

실험결과 및 고찰

탄소원의 영향—α-amylase 저해제 생산에 미치는

Table I—Effects of carbon sources on α-amylase inhibitor production

Carbon source	Growth	Inhibitory activity (%)
Arabinose	++	29 (15)
Fructose	++	19 (10)
Galactose	++++	87 (45)
Glucose	++++	100 (52)
Glycerol	+++	87 (45)
Inositol	+++	81 (42)
Lactose	++	23 (12)
Mannose	++	19 (10)
Maltose	++	19 (10)
Raffinose	++	15 (8)
Rhamnose	++	19 (10)
Soluble starch	++++	85 (44)
Sorbitol	+++	87 (45)
Salicin	+	4 (2)
Sucrose	+	4 (2)
Xylose	+++	81 (42)

Each carbon source was supplemented to a final concentration of 1% to the medium containing 1% glucose, 0.1% asparagine, 0.005% K₂HPO₄, 0.005% MgSO₄. The cultivation was carried out at 27°C for 6 days.

() : Percent inhibition

탄소원의 영향을 조사하기 위하여 각종 탄소원을 기본 배지에 1%로 첨가하고, pH 7.0~7.4로 조절하여 27°C에서 6일간 배양한 뒤 저해 활성을 조사하였다. 그 결과, Table I와 같이 균체 증식에 있어서는 glucose, galactose, soluble starch가 가장 좋았고, glycerol, inositol, sorbitol도 비교적 좋았다. 그리고, 저해제 생산에 있어서는 glucose가 가장 좋았으며 galactose, sorbitol, soluble starch가 그 다음으로 좋았다. 한편, sucrose나 salicin을 첨가하였을 때에는 균의 성장과 저해제 생산둘 다 저조하였다. Table I에 최적 탄소원 glucose를 1%로 첨가하였을 때의 저해 활성을 100으로 한 다음 그것에 대한 상대 활성을 표시하였고, 괄호안은 각각의 탄소원 첨가시의 % inhibition을 표시하였다.

Fig. 1에는 최적 탄소원으로 선발된 glucose를 0.5%에서 4%까지 각 농도별로 첨가하였을 때 균체 증식과 저해제 생산을 나타내었는데, 둘 다 glucose를 2%로 첨가하였을 때 가장 우수하였다.

질소원의 영향—2% glucose, 0.005% MgSO₄·7H₂O, 0.005% NaCl을 포함하는 배지에서 pH 7.0~7.4로

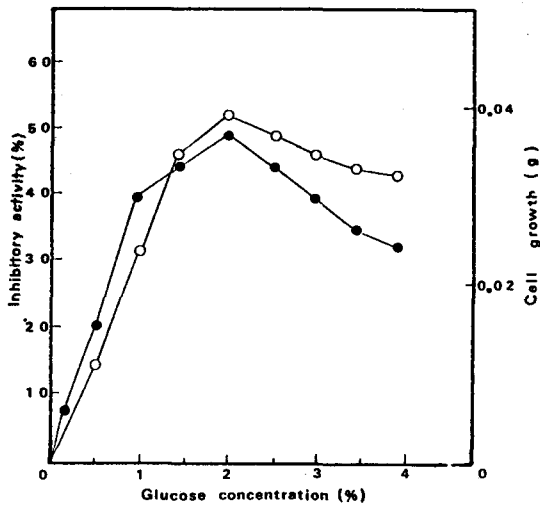


Fig. 1—Effect of glucose concentration on alpha-amylase inhibitor production by *Streptomyces minoensis* DMCJ-144.

○—○ : inhibitory activity ●—● : cell growth

Table II—Effects of nitrogen sources on α -amylase inhibitor production

Nitrogen source	Growth	Inhibitory activity (%)
Arabinose	+++	87 (65)
Beef extract	++++	100 (75)
Casein	++++	81 (61)
Malt extract	+++	83 (62)
Peptone	+++	95 (71)
Soy bean meal	++	89 (67)
Urea	+++	77 (58)
Yeast extract	++++	93 (70)
(NH ₄) ₂ HPO ₄	+	65 (49)
(NH ₄) ₂ SO ₄	+	64 (48)
NH ₄ H ₂ PO ₄	+	60 (45)
NH ₄ Cl	++	83 (62)
NaNO ₃	+++	67 (50)

Each nitrogen source was supplemented to a final concentration of 0.3% to the medium containing 2% glucose, 0.005% MgSO₄·7H₂O, 0.005% NaCl, and pH 7.0~7.4. The cultivation was carried out at 27°C for 6 days.

조절하여 27°C 에서 6일간 배양한 후 저해제 생산에 미치는 질소원의 영향을 조사하였다. 그 결과는 Table II에 나타난 바와 같이 저해제 생산과 균체증식 둘 다 유기 질소원이 무기 질소원보다 좋았고, 무기 질소원 중에서는 NH₄Cl이 저해제 생산과 균체 증식이

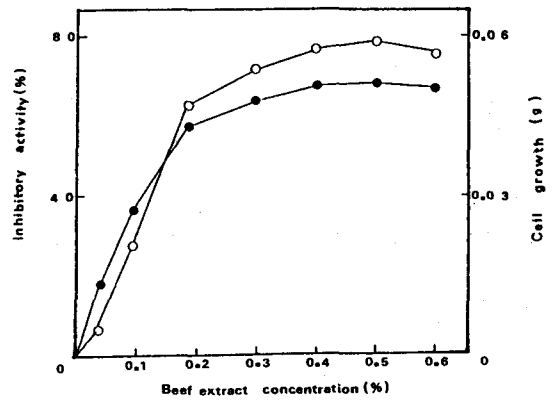


Fig. 2—Effect of beef extract concentration on alpha-amylase inhibitor production by *Streptomyces minoensis* DMCJ-144.

○—○ : inhibitory activity ●—● : cell growth

비교적 좋았다. 그리고 beef extract, peptone, yeast extract와 같은 복합 성분이 저해제 생산이 우수하였으며, 그중에서도 beef extract가 가장 좋았다.

Table II에 beef extract를 0.3%로 첨가하였을 때의 저해 활성을 100으로 한 다음 그에 대한 각각의 상대 활성을 나타내었다. 팔호안은 각각의 질소원 첨가시의 % inhibition을 표시한 것이다.

Fig. 2에는 beef extract를 0%에서 0.6%까지 각 농도별로 첨가하였을 때의 균체 증식과 저해 활성을 표시하였다. 첨가 농도가 0.2%일 때까지는 균체증식이나 저해제 생산이 급격히 증가하였고, 0.5%일 때 균체 증식이나 저해제 생산 둘 다 가장 좋았다.

Vitamin의 영향—저해제 생산을 위한 최적 질소원이 복합 성분이기 때문에 vitamin의 영향이나 금속 염의 영향을 조사하기에는 부적합하므로 단일 성분으로 된 질소원 asparagine을 0.5%로 첨가하고, 2% glucose, 0.005% MgSO₄·7H₂O, 0.005% K₂HPO₄, 0.005% NaCl을 포함하는 배지에 각종 vitamin을 0.0002%로 첨가하였다. 그 결과, Table III와 같이 첨가한 vitamin 모두가 첨가하지 않았을 때보다 좋았고, 저해제 생산에 있어서는 riboflavin, thiamine·HCl, folic acid, biotin 등이 첨가하지 않았을 때보다 약 10~20% 정도 촉진시켰다. vitamin을 첨가하지 않았을 때의 저해 활성을 상대적으로 표시하였고, 팔호안은 각각의 vitamin 첨가시의 % inhibition을 표시하였다.

Table III—Effects of vitamins on α-amylase inhibitor production

Vitamin	Growth	Inhibitory activity (%)
None	+++	82 (65)
Ascorbate-Na	++++	72 (57)
d-Biotin	++++	95 (75)
Folic acid	++++	96 (76)
Niacin	++++	71 (56)
Nicotinamide	++++	76 (60)
p-Aminobenzoic acid	++++	91 (72)
Ca-pantothenate	++++	67 (53)
Pyridoxin. HCl	++++	71 (56)
Riboflavin	++++	100 (79)
Thiamine. HCl	++++	98 (77)
Ribo. + Thia.	++++	106 (84)
Ribo. + Thia. + Fol.	++++	109 (86)
Ribo. + Thia. + Bio.	++++	108 (85)
Ribo. + Thia. + Fol. + Bio	++++	109 (86)

Each vitamin was supplemented to a final concentration of 0.0002% to the medium containing 2% glucose, 0.5% asparagine, 0.005% K₂HPO₄, 0.005% MgSO₄·7H₂O, 0.005% NaCl, and pH 7.0~7.4. The cultivation was carried out at 27°C for 6 days.

None : 2% glucose, 0.5% asparagine, 0.005% K₂HPO₄, 0.005% MgSO₄·7H₂O, and 0.005% NaCl.

() : Percent inhibition

한편, 저해 활성에 대한 최적 vitamin인 riboflavin과 그 밖의 양호한 vitamin인 thiamine · HCl, folic acid, biotin 등을 복합 첨가시켰을 경우의 저해 활성의 변화를 조사하였는데, 모두 다 riboflavin 단독 첨가 시보다 좋았고, 다시 양호한 vitamin을 세 가지 이상 첨가시켰을 경우의 저해 활성을 조사하였는데, 양호한 vitamin 두 가지를 첨가하였을 때의 저해 활성과 차이가 없음을 알았다.

금속염의 영향—저해제 생산에 미치는 금속염의 영향을 조사하기 위하여 2% glucose, 0.5% asparagine, 0.0002% riboflavin, 0.005% K₂HPO₄, 0.005% NaCl을 포함하는 배지에 각종 금속염을 1 mM 농도로 첨가하고 pH 7.0~7.4로 조절하여 27°C 에서 6일간 배양한 후 저해 활성을 측정하였다. 그 결과는 Table IV에 나타나는 바와 같이 ZnCl₂, ZnSO₄, MgSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, CaCl₂ 등은 저해제 생산을 촉진시켰고, FeSO₄, Li₂SO₄ 등은 저해제 생산을 감소시켰다. 금속염을 첨가하지 않았을 때의 저해 활성을

Table IV—Effects of metal salts on α-amylase inhibitor production

Metal salt	Growth	Inhibitory activity (%)
None	+++	83 (79)
CaCl ₂	++++	90 (85)
CaSO ₄	++++	84 (80)
CuSO ₄	+++	92 (87)
FeSO ₄	++	57 (54)
Li ₂ SO ₄	++	54 (51)
MgCl ₂	+++	90 (85)
MgSO ₄	++++	95 (90)
MnSO ₄	+++	78 (74)
ZnCl ₂	++++	100 (95)
ZnSO ₄	++++	96 (91)

Each metal salt was supplemented to a final concentration of 1 mM to the medium containing 2% glucose, 0.5% asparagine, 0.0002% riboflavin, 0.005% K₂HPO₄, 0.005% NaCl, and pH 7.0~7.4. The cultivation was carried out 27°C for 6 days.

None : 2% glucose, 0.5% asparagine, 0.0002% riboflavin, 0.005% K₂HPO₄, and 0.005% NaCl.

() : Percent inhibition

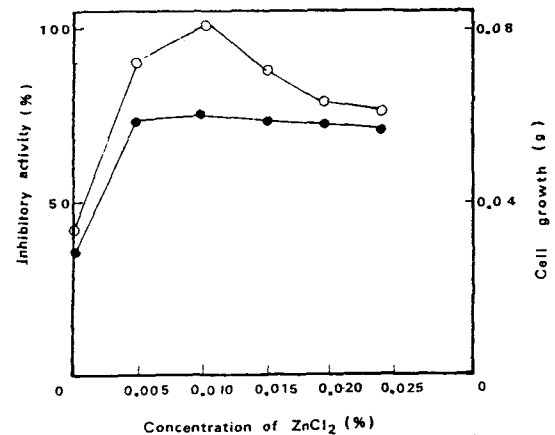


Fig. 3—Effect of concentration of ZnCl₂ on alpha-amylase inhibitor production by *Streptomyces minoensis* DMCJ-144.

○—○ : inhibitory activity ●—● : cell growth

100으로 할 때 그에 대한 각각의 금속염 첨가시의 저해 활성을 상대적으로 표시하였고, 팔호안은 각각의 금속염을 첨가하였을 때의 % inhibition을 표시하였다.

Fig. 3은 금속염 중 저해제 생산에 최적인 ZnCl₂를 0%에서 0.025%까지 각 농도별로 첨가시켰을 때의

Table V—Comparison of α -amylase inhibitor production in the various media

Media	Inhibitory activity (%)
(2% Glucose, 0.5% Beef extract, 0.0002% Riboflavin, 0.01% $ZnCl_2$, 0.005% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% NaCl, 0.005% K_2HPO_4)	110
()+0.0002% Thiamine. HCl	120
()+0.0002% Thiamine. HCl + 0.005% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$,	125
Oat meal medium	100

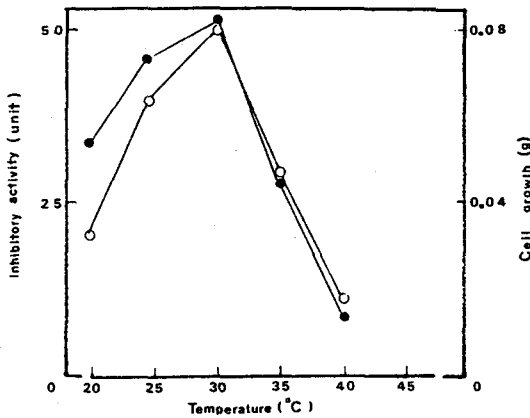


Fig. 4—Effect of cultural temperature on the inhibitor production.

○—○ : inhibitory activity ●—● : cell growth

균체 증식과 저해 활성을 표시하였다. 첨가 농도가 0.01%일 때 저해제 생산이 가장 우수하였다.

여러 배지들에서의 저해제 생산 비교—본 실험을 통해 얻은 2% glucose, 0.5% beef extract, 0.0002% riboflavin, 0.01% $ZnCl_2$, 0.005% K_2HPO_4 , 0.005% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% NaCl을 포함하는 배지와 여기에 다른 탄소원, 질소원, vitamin, 금속염 등을 첨가한 배지 그리고 oat meal 배지에서의 균체 증식과 저해제 생산을 조사하였다. Table V는 각각의 배지에서의 저해 활성을 % inhibition으로 표시하였고, 표에서 보는 바와 같이 본 실험을 통해 얻은 배지와 thiamine · HCl을 단독으로 첨가한 배지, thiamine · HCl과 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 를 복합첨가한 배지 모두는 oat meal 배지에서보다 저해제 생산능이 우수하였다.

배양 온도와 초기 pH의 영향— α -amylase 저해제 생산 최적 배지에서 21°C 부터 40°C 까지 여러 온도

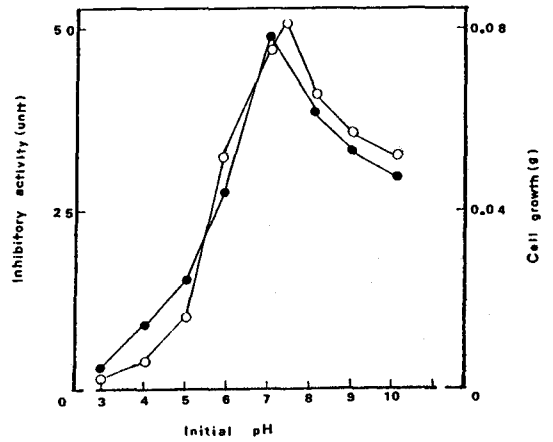


Fig. 5—Effect of initial pH of the culture medium on the inhibitor production.

The cultivation was carried out at 27°C for 6 days in the medium 2% glucose, 0.5% beef extract, 0.0002% riboflavin, 0.0002% thiamine. HCl, 0.01% $ZnCl_2$, 0.005% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.005% K_2HPO_4 , and 0.005% NaCl.

○—○ : inhibitory activity ●—● : cell growth

에서 6일 동안 배양하여 균체 증식과 저해 활성을 조사하였다. 그 결과, Fig. 4와 같이 30°C 에서 배양하였을 때 저해제 생산과 균체량이 가장 높게 나타났고, 30°C 이상에서는 저해제 생산과 균체 증식 둘 다 급격히 감소하였다. 그리고 저해제 생산과 미치는 initial pH의 영향을 조사하기 위하여 pH 3.0에서 pH 10.0까지 변화시키면서 배양한 결과가 Fig. 5에 나타나 있다. pH 7.0 부근에서는 균체 증식이 가장 왕성하였고, pH 7.2에서 저해제 생산이 가장 좋았다.

통기의 영향— α -amylase 저해제 생산 최적 배지 조성에서 pH를 7.2로 조절한 후 저해제 생산에 미치는 통기의 영향을 조사하기 위하여 정체 배양에서부터 50 rpm씩 간격을 두고 250 rpm까지 증가시키면서 30°C 에서 6일간 배양하였다. 그 결과, Fig. 6에 나타난 바와 같이 저해제 생산과 균체 증식이 180 rpm까지는 계속 증가하다가 그 이상에서는 감소되었다.

배양 시간의 영향—본 실험을 통해 얻은 최적 배지 조성(2% glucose, 0.5% beef extract, 0.0002% riboflavin, 0.01% $ZnCl_2$, 0.005% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.005% K_2HPO_4 , 0.005% NaCl)에서 pH를 7.2로 조절하여 30°C 에서 배양하면서 배양시간

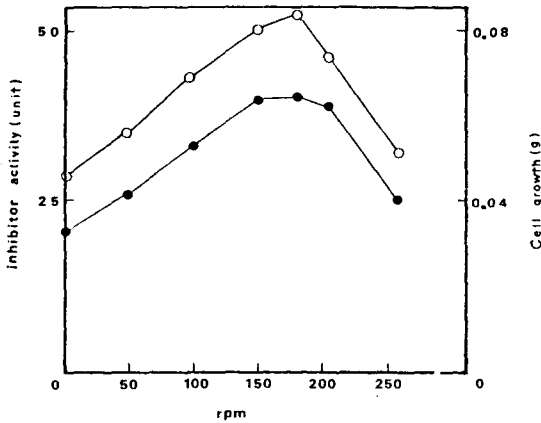


Fig. 6—Effect of agitation of the culture medium on the inhibitor production.

The cultivation was carried out at 30°C for 6 days in the medium 2% glucose, 0.5% beef extract, 0.0002% riboflavin, 0.0002% thiamine. HCl, 0.01% ZnCl₂, 0.005% MgSO₄·7H₂O, 0.005% CuSO₄·5H₂O, 0.005% K₂HPO₄, 0.005% NaCl, and pH 7.2.

○—○: inhibitory activity ●—●: cell growth

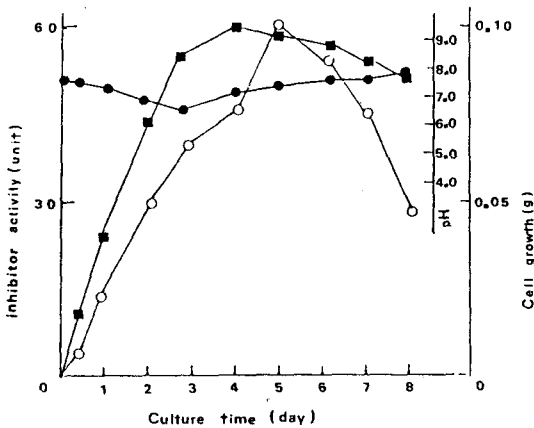


Fig. 7—Time course of alpha--amylase inhibitor production by *Streptomyces minoensis* DM CJ-144. The composition and initial pH of the culture medium were 2% glucose, 0.5% beef extract, 0.0002% riboflavine, 0.0002% thiamine.HCl, 0.01% ZnCl₂, 0.005% MgSO₄·7H₂O, 0.005% CuSO₄·5H₂O, 0.005% K₂ HPO₄, 0.005% NaCl, and pH 7.2. The cultivation was carried out at 30°C.

○—○: inhibitory activity ●—●: pH

■—■: cell growth

Table VI—Optimum cultural conditions for α-amylase inhibitor production by *Streptomyces minoensis* DM CJ-144

Glucose	2%
Beef extract	0.5%
Riboflavin	0.0002%
Thiamine. HCl	0.0002%
ZnCl ₂	0.01%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.005%
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.005%
K ₂ HPO ₄	0.005%
NaCl	0.005%
Initial pH	7.2
Temperature	30°C
Agitation	180 rpm
Culture time	5 days

에 따른 pH의 변화, 저해제 생산량, 균체량을 조사한 결과는 Fig. 7과 같다. 배양 3일째까지는 pH가 서서히 낮아지다가 배양 4일째부터는 다시 증가하여 배양 8일째에는 pH 7.8까지 증가하였다. 균체 증식은 배양 4일째 최고치에 도달하였으며, 저해제 생산은 배양 5일째에 가장 좋았다.

이상에서 얻은 *Streptomyces minoensis* DM CJ-144 균주로부터의 α-amylase 저해제 생산을 위한 최적 배양 조건을 Table VI에 요약하였다.

결 론

Streptomyces minoensis DM CJ-144의 α-amylase 저해제 생산을 위한 최적배양 조건을 조사한 결과, 2% glucose, 0.5% beef extract, 0.0002% riboflavin, 0.0002% thiamine · HCl, 0.01% ZnCl₂, 0.005% MgSO₄·7H₂O, 0.005% CuSO₄·5H₂O, 0.005% K₂HPO₄, 0.005% NaCl를 포함하는 배지에서 pH를 7.2로 조절하고 30°C 에서 180 rpm으로 진탕 배양하면서 5일 동안 배양할 때 저해제 생산량이 최고였다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 일반기초연구비(911-04 07-073-2)와 서울대학교 RCNDD의 지원에 의해 수행된 것으로 지원에 깊이 감사합니다.

문헌

- 1) Truscheit, E., Frommer, W., Junge, B., Muller, L., Schmidt, D. and Wingender, W.: Chemistry and biochemistry of microbial α -glucosidase inhibitor. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, **20**, 744 (1981).
- 2) Wallenfels, K. and Malhotra, P.O.: β -Galactosidase in *The Enzyme*, 3rd ed., Vol. VII, Academic Press, pp. 617-663 (1972).
- 3) Murao, S., Miyata, S.: Isolation and characterization of a new trehalase inhibitor, S-GI. *Agric Biol. Chem.*, **44**, 219 (1980).
- 4) Lemboke, B., Folsch, U.R. and Creutzfeldt, W.: Effect of 1-desoxynojirimycin derivatives on small intestinal disaccharidase activities and active transport *in vitro*. *Digestion* **33**, 120 (1985).
- 5) Puls, W., Keup, U., Krause, H.P., Thomas, G. and Hoffmester, F.: *Proceedings of First International Symposium on Acarbose*, ed. by W. Creutzfeldt, Excerpta Medica, Amsterdam, p. 16 (1982).
- 6) Puls, W., Keup, U., Krause, H.P., Thomas, G. and Hoffmeister, F.: Glucosidase inhibitor. A new approach to the treatment of diabetes, obesity and hyperlipoproteinemia. *Naturwissenschaften* **64**, 536 (1977).
- 7) Taylor, R.H., Barker, H.M., Bowey, E.A. and Canfield, J.E.: Regulation of the absorption of dietary carbohydrate in man by two new glycosidase inhibitors. *Gut*, **27**, 1471 (1986).
- 8) Puls, W., Krause, H.P., Muller, L., Schutt, H., Sitt, R. and Thomas, G.: Inhibitors of the rate of carbohydrate and lipid absorption by the intestine. *4th Int. Congr. Obesity*, New York (1983).
- 9) Puls, W. and Keup, U.: *Recent advances in Obesity Research I*, (A. Howard, ed) London, p. 391 Newman (1975).
- 10) Brodbeck, U.: Enzyme inhibitors in *Verlag Chemie*, pp. 109-162 (1980).
- 11) Murao, S. and Ogura, S.: Isolation of α -amylase inhibitor-producing microorganism. *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 919 (1977).
- 12) Kwak, J.H., Choi, E.C. and Kim, B.K.: Studies on screening and isolation of α -amylase inhibitors of soil microorganisms(I) Isolation and activities of the inhibitor of *Streptomyces* strain DMC-225. *Arch. Pharm. Res.*, **8**, 67 (1985).
- 13) Gray, G.M.: Carbohydrate digestion and absorption. *New Engl. J. Med.* **292**, 1225 (1975).
- 14) Murao, S. and Ohyama, K.: Chemical structure of an amylase inhibitor, S-AI. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 679 (1979).
- 15) Namik, S., Kangour, K., Nagate, T., Sugita, K., Ohmura, S. and Ohzeki, M.: Amylase inhibitor TAI. *Denpun Kagaku* **26**, 134 (1979).
- 16) Schmidt, D.D., Frommer, W., Junge, B., Muller, L., Wingender, W., Truscheit, E. and Schafer, D.: α -glucosidase inhibitors new complex oligosaccharides of microbial origin. *Naturwissenschaften* **64**, 535 (1977).
- 17) Itoh, J., Omoto, S., Shomura, T. and Ogino, H.: Oligostatins, new antibiotics with amylase inhibitory activity I. Production, isolation and characterization. *J. Antibiotic*, **34**, 1424 (1981).
- 18) Fukuhara, K., Murai, H. and Murao, S.: Amylostatins, other amylase inhibitors produced by *Streptomyces diastaticus*. *Agric. Biol. Chem.*, **46**(8), 2021 (1982).
- 19) Kazuteru, Y., Tamotsu, F., Yasuji, S. and Prison, W.: Trestatin, α -amylase inhibitor, in *Novel Microbial Products for Medicine and Agriculture*, p. 117 (1989).
- 20) Yokose, K., Ogawa, K., Sano, T., Watanabe, K., Maruyama, H.B. and Suhara, Y.: New α -amylase inhibitor, Trestatin. *J. Antibiotics* **36**, 1157 (1983).
- 21) Marao, S., Goto, A., Matsui, Y. and Ohyama, K.: New proteineous inhibitor (Haim) of animal α -amylase from *Streptomyces griseosporus* YM-25. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1679 (1981).