

抗酵母性物質에 관한 研究

(第 1 報) 分離 및 그 生化學的作用과 性質에 對해서

徐 正 埴 · 高 永 喜*

慶北大學校 農科大學 農化學科

*慶北大學校 大學院

Studies on the inhibitory substance of yeast growth

(Part 1) Isolation and biochemical characteristics of yeast growth inhibitor.

Jung-Hwn Seu, Yung-Hee Kho*

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture
Kyung-Pook National University

*Graduate School of Kyung-Pook National University.

(Received Mar. 8, 1972)

Summary

A kind of peptide which possesses an yeaststatic activity was isolated from *Astragalus membranaceus* Bunge and following characteristics was obtained.

1. The isoelectric pH of this peptide was 8.2 and histidine, an alkaline amino acid, was identified from this peptide.
2. This substance shows conspicuous heat stability and does not indicate any remarkable reduction of yeaststatic activity even for 5 hours treatment at 100°C. or for 30 minutes at 121°C.
3. The inhibitory activity of the yeast growth is not originated from the yeastcidal action but yeaststatic effect of this sample.
4. The sample shows strong stability ranging from pH 2 to 10.
5. The saccharide; glucose, sucrose, maltose, gives no effect on the yeaststatic activity of the sample even high concentration, 15 percent, and also no effect gives by magnesium, calcium and phosphate salts.
6. The available concentration of this sample on the inhibition of yeast growth was located at the ppm extent, for example, the concentration of fifty percent growth inhibition to *Saccharomyces cerevisiae* or *S. carsbergensis* was 4 ppm and 3 ppm to *Candida pulcherrima*, 13 ppm to *S. coreanus*, 18 ppm to *S. sake* and 38 ppm to *C. tropicalis*.
7. On the alcohol fermentation of *S. coreanus*, the peptide, an yeast growth inhibitor, gives no effect at all.
8. This substance is named as Astradix-P (*Astragalus membranaceus*, Radix, Peptide).

I. 緒 論

現在 抗微生物性物質 Antimicrobial substance 이라 함은 微生物을 死滅시키거나 혹은 그 發育을 억제하는 物質을 말하는 것이다. 또 이들 物質이 作用하는 微生物의 種類에 따라 抗細菌性物質 Antibacterial substance, 抗黴性物質 Antifungal substance, 抗濾過性微生物性物質(抗 Virus 性物質) Antiviral substance 등으로 分類하며⁽¹⁾ 또 이들 物質의 由來에 따라 人工的 抗微生物性藥品과 生物에서 起因하는 生物性 抗微生物性物質로 分類하고 前者에 있어서는 다시 無機藥品(例: halogen 化合物, hydrogen peroxide, ozone, potassium permanganate 등의 酸化劑, acid, alkali, 重金屬鹽類 등)과 有機藥品(例: phenol 類, 重金屬化合物, 安息香酸類, alcohol 등)으로 나누며 後者인 生物由來의 物質로서는 植物性物質^(1,2,4) (例: quinine, chaulmoogra oil 등), 動物性物質(例: lysozyme, lactenin 등) 및 微生物性物質(例: 各種 抗生物質)로 分類한다. 특히 이 微生物性物質인 抗生物質은 現在 數千種類가 發見되어 있으며 그 中 많은 種類의 物質이 여러가지 目的으로 實用化되고 있는 實情이다.⁽³⁾

著者들은 植物性分 中の 抗酵母性物質의 檢索을 試圖한 바 한 植物로부터 抗酵母性物質 Antiyeast substance 을 얻었으며 이 物質은 그 製法의 용이함과 安定性이 매우 크며 여러가지 面에서 興味있는 結果를 얻었기에 여기 그 結果를 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

[A] 供試菌株

本 實驗에 供試된 菌株은 本 研究室에 保管되어 있는 yeast 菌株로서 다음과 같다.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NCYC 478
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	IAM 4727
<i>Saccharomyces sake</i>	
<i>Saccharomyces coreanus</i>	
<i>Candida pulcherrima</i>	NCYC 166
<i>Candida utilis</i>	IAM 4295
<i>Candida tropicalis</i>	IFO 0589
<i>Candida parakrusei</i>	
<i>Candida tropicalis</i>	
<i>Candida albicans</i>	
<i>Candida japonica</i>	IFO 1119

Candida krusei
Candida guilliermondii
Candida pseudotropicalis
Cryptococcus neoformans
Torulopsis sp.

IFO 0589

[B] 培養液

本 實驗에 使用한 酵母培地는 다음과 같다.

- i) Malt extract broth medium.....Difco 社製 malt extract broth 20g 을 1l 의 tap water 에 溶解한 것
- ii) Malt extract glucose medium.....Malt extract broth medium 에 glucose 를 2% 로 添加한 것
- iii) Malt extract medium.....麥芽汁培地로서 常法에 依하여 調製했음

[C] 抗酵母性物質의 分離 및 精製

Astragalus membranaceus Bunge 에서 分離精製한 peptide 性物質이며(以下 Astradix-P 라 略稱함) 그 調製法은 다음 Fig. 1 과 같다.

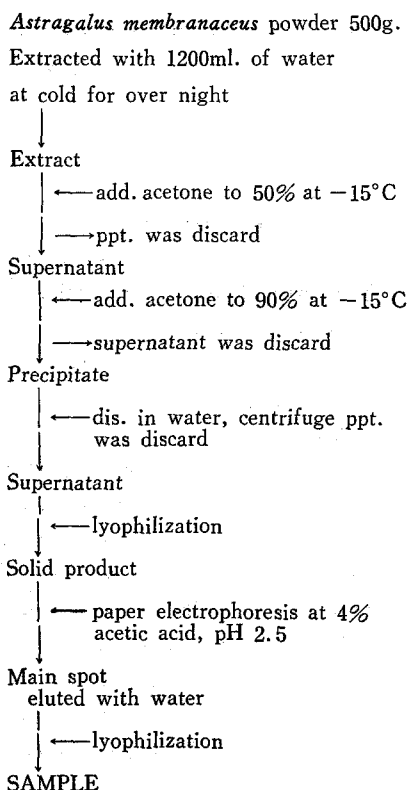


Fig. 1. Preparation of sample (Astradix-P).

[D] 培養方法

試驗管(1.3×15cm)에 上記 培養液 4.0ml 씩을 注入한 後 常法에 依해서 高壓殺菌한 後 菌株를 接種하여 30~34°C 에서 20~30 時間 振盪培養했으며 振盪條件은 往復式으로서 振盪回數는 60回/分, 振幅은 4cm 이었다.

[E] 試料添加方法

培養液에 抗酵母性試料를 添加할 때는 試料의 一定量을 實驗에 使用하는 것과 같은 殺菌培養液에 溶解하여 이 試料液을 殺菌된 培養用培地에 無菌의으로 添加하였고 對照區로서는 試料를 含有하지 않는 培養液을 同量 添加하였다.

[F] 試驗菌株의 接種方法

對象菌株의 菌體 一定量을 取하여 殺菌培地에 均一하게 懸濁한 後 그 一定量을 接種하였다.

[G] 酵母細胞數의 測定方法

液體培養에서 酵母의 增殖程度를 測定하는 가장 確實한 方法은 直接 細胞數를 計測하는 方法이므로 本 實驗에서는 Thoma의 hematemeter를 使用하였다.

III. 實驗結果

[1] Astradix-P의 濃度가 酵母生育에 미치는 影響

試料를 Malt extract broth 培地에 各各 다른 濃度로 (5µg/ml~300µg/ml) 添加하여 各 酵母를 接種하여 이 試料의 抗生效果를 調査한 結果는 다음 Fig. 2~5 및 Table 1과 같다.

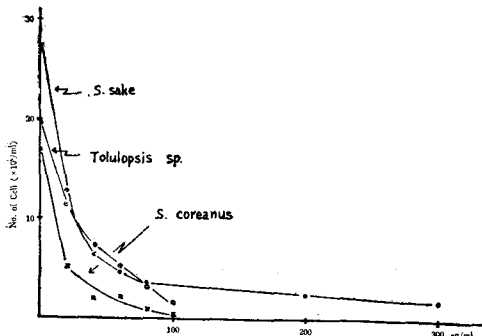


Fig. 2. Inhibitory effect of sample on yeast growth

[2] 酵母에 對한 Astradix-P의 殺菌作用

殺菌試驗管에 殺菌한 0.6% NaCl 溶液 3ml를 넣고 여기에 試料를 150µg/ml가 되도록 添加한 後 *Saccharomyces coreanus*의 一定量을 加하여 懸

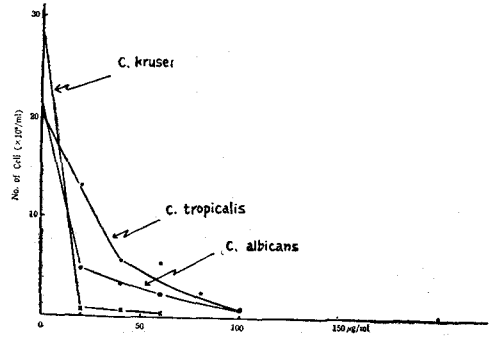


Fig. 3. Inhibitory effect of sample on yeast growth

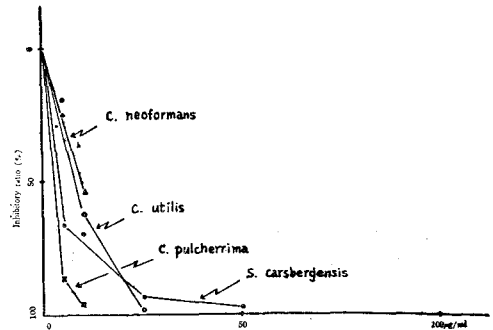


Fig. 4. Inhibitory effect of sample on yeast growth

濁한 後 이것을 30°C water bath에서 處理하면서 經時的으로 이 菌液을 一白金耳씩 取하여 malt extract broth 培地에 接種하여 30°C에서 25 時間 振盪培養한 後 培養液中の 細胞數를 計測하였으며 그 結果는 다음 Fig. 6과 같다.

[3] 培養時間에 따른 Astradix-P의 生育阻害效果

Malt extract broth 液에 試料의 濃度가 100µg/ml와 200µg/ml가 되도록 各各 調製하여 여기에 *Saccharomyces coreanus*를 接種하여 32°C에서 80 時間 振盪培養하여 얻은 結果는 다음 Fig. 7과 같다.

[4] 無機成分이 Astradix-P의 抗菌作用에 미치는 影響

酵母培養에 있어서 必須的으로 添加되는 無機成分인 MgSO₄, KH₂PO₄, CaCl₂가 比較的 높은 濃度에서 試料의 抗生效果에 어떠한 影響을 미치는 가를 實驗하였다.

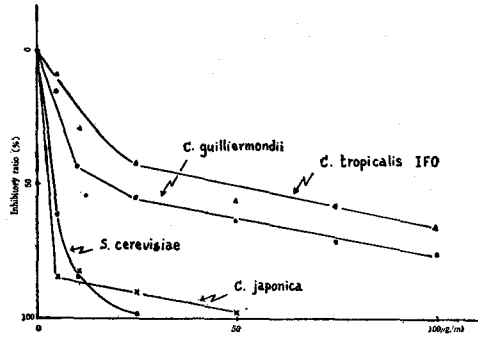


Fig. 5. Inhibitory effect of sample on yeast growth

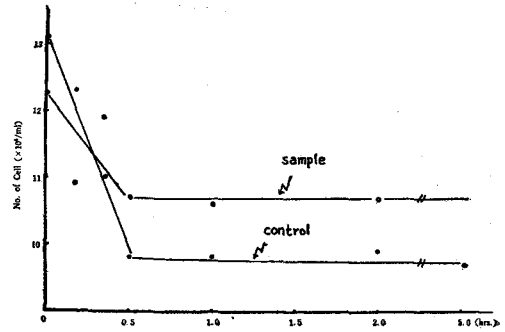


Fig. 6. The yeastcidal effect of sample

Table 1. Inhibitory concentration of the sample on the yeast growth.

Strain of yeast	*GI ₅₀ (µg/ml)	medium
<i>Saccharomyces coreanus</i>	13	malt ext. broth
<i>Saccharomyces sake</i>	18	"
<i>Saccharomyces coreanus</i>	4	malt ext.
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> IAM 4727	4	malt ext. broth
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 478	4	"
<i>Candida parakrusei</i>	no effect	"
<i>Candida japonica</i> IFO 1119	2	"
<i>Candida tropicalis</i>	25	"
<i>Candida albicans</i>	13	"
<i>Candida krusei</i>	6	"
<i>Candida pseudotropicalis</i>	no effect	"
<i>Candida pulcherrima</i> NCYC 166	3	"
<i>Candida utilis</i> IAM 4295	8	"
<i>Candida guilliermondii</i>	18	"
<i>Candida tropicalis</i> IFO 0589	37.5	"
<i>Cryptococcus neoformans</i> IFO 0545	9	"
<i>Torulopsis spp.</i>	26	"

* GI₅₀: Concentration of sample on the 50% growth inhibition.

방법은 試料 100µg/ml를 含有한 malt extract

Table 2. The effect of inorganic salt on the yeaststatic activity of sample

salt	yeast cell (10 ⁶ /ml.)	
	sample add. (100µg/ml)	none (control)
MgSO ₄	0.3	17.1
CaCl ₂	0.3	16.5
KH ₂ PO ₄	0.3	17.0
None	0.3	17.3

broth 液體培地에 MgSO₄·7H₂O, KH₂PO₄, CaCl₂를 各 0.5%가 되도록 添加한 後 여기에 *Saccharomyces coreanus*를 接種한 後 30°C에서 20時間 振盪培養한 結果는 다음 Table. 2와 같다.

[5] 糖濃度가 Astradix-P의 抗菌作用에 미치는 影響

培地中の 糖의 濃度가 試料의 抗菌作用에 어떠한 影響을 미치는가에 對해서 實驗하였다.

방법은 試料 100µg/ml가 含有된 malt extract broth 培地에 glucose와 sucrose를 0%~15%까지

各各 加한 後 여기에 *Saccharomyces coreanus* 를 一定量 接種하여 33°C에서 25時間 振盪培養한 結果는 다음 Table 3과 같다.

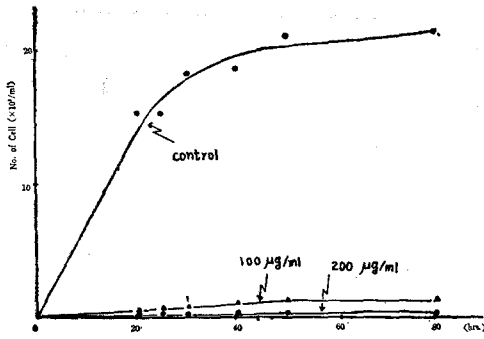


Fig. 7. The yeaststatic effect on culture time

[6] Astradix-P의 熱安定性

1) 100°C에 있어서의 熱安定性

500μg/ml의 Astradix-P水溶液을 100°C의 water bath에서 處理하여 經時的으로 이 溶液 1ml를 取하여 malt extract 培養液 4ml에 加한 後 (final concentration 100μg/ml), 여기에 *Sacchromyces coreanus* 를 接種하여 30°C에서 25時間 振盪培養한 結果는 다음 Fig. 8과 같다.

2) 121°C에 있어서의 熱安定性

Table 3. The effect of saccharide on yeaststatic activity of sample

conc. (%)	case	sample add. (100μg/ml)		control	
	sugar	sucrose	glucose	sucrose	glucose
0		0.20*	0.20	16.3	16.3
3		0.18	0.20	18.6	17.9
6		0.15	0.22	18.0	19.9
9		0.18	0.15	19.0	19.2
12		0.20	0.18	18.3	19.5
15		0.18	0.18	19.1	17.5

* : unit...10⁶/ml, yeast cell number.

500μg/ml의 Astradix-P水溶液을 121°C (15Lb steam pressure)에서 經時的으로 處理하여 이 액 1ml를 4ml의 malt extract 培養液에 加한 後 (final concentration 100μg/ml), 여기에 *Saccharomyces coreanus* 를 接種하여 30°C에서 25時間 振盪培養한 結果는 다음 Fig. 9와 같으며 또 final sample concentration 25μg/ml의 實驗도 위와 같은 方法으로 했으며 熱處理液의 濃度는 125μg/ml이었다.

[7] Astradix-P의 pH安定性

蒸溜水에 HCl, 혹은 NaOH를 加하여 pH를 2~10까지 各各 調節한 後 이 各 pH區에 sample을 500μg/ml가 되도록 加하여 25°C에 放置하면서 經時的으로 이 處理液 1ml씩을 取하여 4ml의 malt extract glucose 培養液에 加한 後 여기에 *Saccharomyces coreanus* 를 接種하여 30°C에서 24時間 振盪培養한 結果는 다음 Table 4와 같다.

Table 4. pH stability of sample.

(treated at 25°C)

treated pH	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0 hrs.	0.95*	0.90	0.80	0.90	0.75	0.75	0.90	0.95	1.05
1	0.90	0.90	0.85	0.88	0.87	0.82	0.92	1.02	1.20
2	1.00	1.00	0.75	0.80	0.90	0.90	1.02	1.05	1.25
3	1.05	1.09	0.90	0.85	0.85	0.83	1.20	1.01	1.45
4	1.00	1.02	0.87	0.87	0.95	0.76	1.12	1.15	1.26
5	1.10	1.09	0.75	0.90	0.85	0.90	1.05	1.20	1.40
control (no sample)	22.5								

* : unit... 10⁶/ml yeast cell number

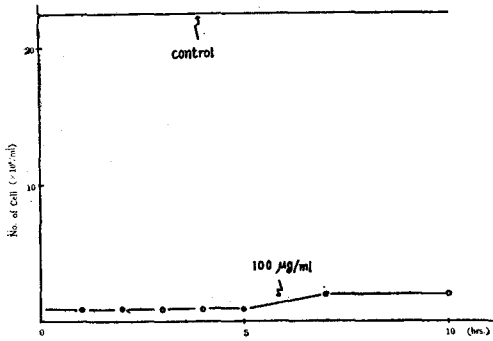


Fig. 8. The heat stability of sample (treated at 100°C)

[8] Astradix-P의 Isoelectric Point

本 Astradix-P 는 여러가지의 saccharide 反應 및 alkaloid 反應에서는 陰性を 나타내나 protein 性物質의 反應인 biuret reaction, xanthoprotein reaction, folin's reagent reaction, tannic acid treatment 및 ninhydrin treatment 에서는 陽性を 나타내며 T.C.A. treatment 에서는 陰性を 나타내었다. 또 sample 은 phosphate buffer 와 borate buffer 를 使用하여 調査한 바 그 PI 가 8.2 인 alkaline peptide 이었으며 또 histidin 反應은 陽性이었다.

[9] Astradix-P 가 Alcohol 醱酵에 미치는 影響

本 sample 이 yeast 의 alcohol fermentation 에 미치는 影響을 實驗하였다.

Table 5. The effect of sample on alcohol fermentation of yeast.

fermentation time	weight of carbon dioxide	
	control	sample (170 ^μ g/ml)
5 hrs.	0.545g.	0.524g.
10	1.008	0.989
15	1.671	1.706
20	2.009	2.031
25	2.421	2.452
30	2.721	2.781
40	3.214	—
50	3.475	3.567
60	3.675	3.763
80	3.807	3.894

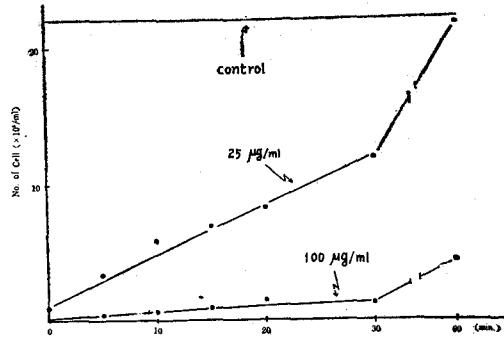


Fig. 9. The heat stability of sample (treated at 121°C)

醱酵液은 sucrose 15g, KH₂PO₄ 0.1g, MgSO₄ · 7H₂O 0.1g, tap water 100ml 이었으며 이 液의 pH 를 4.0 으로 調節하여 500ml 의 三角 flask 에 넣은 後 여기에 醱酵管을 부착한 後 Astradix-P 170^μg/ml 와 *Saccharomyces coreanus* 生菌體 2g 을 加하여 30°C 에서 醱酵시키면서 CO₂ 의 發生量을 測定하였으 며 그 結果는 다음 Table 5 와 같다.

IV. 綜合的 考察

酵母의 生育을 阻害하는 抗生物質로서는 現在 Tricomycin 등 約 10 種이 實用되고 있으나 이것은 모두 微生物由來의 抗生物質이며 그 外에 動物이나 植物等 生物由來의 抗酵母性物質은 아직 發表된 것을 보지 못하였으므로 本人등은 植物性 抗酵母性物質을 檢索코져 200餘種의 植物을 對象으로 調査한 바 *Astragalus membranaceus* Bunge 에서 力價가 比較的 強한 抗酵母性物質을 分離하였으며 이 物質에 對한 여러가지 性質을 考察하면 다음과 같다.

이 物質은 一種의 低級의 peptide 이며 여러가지의 protein 反應에서 陽性を 나타내었으며 이 物質의 粗試料 中에는 他의 peptide 가 多數 混存하고 있으며 이의 精製로서는 electrophoresis 가 가장 適當하다고 생각되었다. 그리고 이 物質은 實驗에 供試한 16種의 酵母에 對해서 比較的 強한 阻害能을 나타내나 *Candida parakrusei* 와 *C. pseudotropicalis* 에 對해서는 全然 作用이 없으며 醱酵性酵母인 *Saccharomyces* 屬에서 그 作用이 比較的 強하게 나타나는 것 같다 (Table 1 및 Fig. 2~5 參照) 그리고 Fig. 6 에서 보는 바와 같이 本 物質은

yeastcidal activity 는 없으며 yeaststatic 로 作用함을 알 수 있으며 아직 本報에는 發表되지 않았으나 實驗結果로는 nitrogen 代謝를 阻害하는 것으로 判明되었다. 또 이 物質은 yeast 의 增殖을 지연시키는 것이 아니고 그 增殖을 眞正하게 阻害한다는 것을 Fig. 7.에서 알 수 있다. 또 本物質의 作用에 있어서 酵母生育에 必要한 Mg, Ca 와 PO_4 鹽 및 carbon source 로서 代表的인 glucose, maltose, sucrose 는 Table 2, 3에서 보는 바와 같이 本物質의 阻害作用에 對해서 全然 影響을 주지 않는다는 것을 알게 되었다. 또 本物質은 比較的 高濃度에서는 $100^\circ C$ 에서 10時間 加熱하여도 不過 數%의 力價의 減少밖에 나타나지 않으며 이것은 一般微生物由來의 抗生物質에 比較해서 아주 熱安定性이 크다는 것을 말하고 있다. (Fig. 8 參照) 더구나 $121^\circ C$ 의 高溫에서 30分間 處理하여도 큰 力價의 變動이 없으나 低濃度에 있어서는 그 失活이 高濃도에 比較해서 더 強하게 일어나며 (Fig. 9 參照) 이것은 抗生物質, 例로서 penicilline⁽⁶⁾과 같은 傾向을 나타냄을 알았다.

한 편 pH 安定性에 있어서도 Table. 4에서 보는 바와 같이 pH 2 부터 10까지의 範圍內에서는 5時間 處理하여도 不過 數%의 失活밖에 일어나지 않고 아주 安定하다. 그리고 本物質의 Isoelectric pH가 8.2로서 basic peptide이며 또 이 物質은 Table. 5.에서 보는 바와 같이 酵母의 alcohol 醱酵에 對해서는 全然 影響을 주지 않으며 단지 그 增殖만을 抑制한다는 興味있는 結果를 얻게 되었다.

V. 要 約

Astragalus membranaceus Bunge 로 부터 抗酵母性物質 Yeaststatic substance 인 一種의 peptide (Astradix-P)를 얻었으며 이 物質의 特性은 다음

과 같다.

- 1) 이 物質은 一種의 peptide이며 그 PI 는 8.2로 나타났다.
- 2) 이 物質은 酵母의 增殖을 阻害하며 이 阻害는 靜菌效果에 起因한다.
- 3) 本物質은 熱安定性이 매우 커서 $100^\circ C$ 에서 10時間, 혹은 $121^\circ C$ 에서 30分間 加熱하여도 거의 失活하지 않는다.
- 4) pH에 對해서도 安定하며 pH 2~pH 10까지는 別 影響이 없다.
- 5) 本物質의 作用에 있어서 glucose, sucrose, maltose 등의 糖類는 그 濃度에 關係없이 全然 影響을 미치지 아니한다.
- 6) 本物質의 作用에 있어서 Mg, Ca, PO_4 등 鹽類도 全然 影響을 미치지 않는다.
- 7) 本物質은 酵母類의 生育을 抑制하며 그 有效濃度는 $\mu g/ml$ 의 範圍에 있으며 例로서, *Saccharomyces carlsbergensis*, *S. cerevisiae* 등 菌株의 G.I. 50는 $4\mu g/ml$ 이며, *S. coreanus*, *S. sake*는 13, 18 $\mu g/ml$ 이며, *Candida pulcherrima*는 3 $\mu g/ml$, *C. tropicalis*는 38 $\mu g/ml$ 로 나타났다.
- 8) 本物質은 酵母의 alcohol 醱酵에 對해서 全然 影響을 미치지 않는다.

參 考 文 獻

1. 梅澤純夫(外)抗菌性物質, 培風館 (1955)
2. T. Okada et al; Agr. Biol. Chem.; 34, 1084 (1970)
3. 市野一磨(外), 抗生物質 Hand Book; 6, 産業圖書 (1969)
4. K. G. Belyukova; Microbial Zh.; 30, 390 (1968)
5. 市野一磨(外)抗生物質 Hand Book; 114, 産業圖書 (1969)