

Streptomyces 屬 菌株가 生成한 物質의 生物活性

(第三報) 精製 및 營養要求性

宋 邦 鎬 · 徐 正 埴

慶北大學校 農科大學 農化學科

Biological Active Substance Produced by a Strain of *Streptomyces* sp.

(Part. III) Purification and Nutritional Requirement.

Bang Ho Song and Jung Hwn Seu

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,
Kyungpook National University, Taegu, Korea

Abstract

A piscicidal substance was isolated from the culture medium of *Streptomyces umbrinosus* by avicel column chromatography and avicel thin layer chromatography after extration with chroloform. Bluegreen fluorescence was emitted under UV irradiation. Factors which govern toxin production and nutrition requirement for high toxin titres were observed. Nutritional uptake for toxin production was not corresponded with that for cell growth. Alanine, valine, serine asparagine, arginine, histidine, urea and sodium nitrate as a carbon source and glucose, mannose, rhamnose, xylose, arabitol and starch as a carbon source were recognized as a favorable nutrient for high toxin production. Magnesium was essential factor whereas vitamins were not effective. Most of toxin was formed simultaneously with cell growth in esponential phase. Maximal production was observed for six days culture at 30 C. Tissues of gill, kidney and pnaecreas in *Cyprinus carpio* were denatured extreamly after treating with the substance. Atrophied nucleous, indented membrane and degraded cytoplasm with necrotic affectness were noted on each tissue. The chemical formula of the substance was designated as $C_{38}H_{66}NO_4$.

序 論

放線菌의 二次代謝生成物으로써 그 生物活性을 檢索하든 中 魚類에 對해 特異적으로 毒作用을 나타내는 物質을 強하게 分泌하는 菌 1 株를 分離하였으며 그 毒性物質의 粗精製 및 여러가지 淡水魚에 對한 殺魚性, 生化學的 性質, 毒作用의 特異性等

에 對해서는 이미 報告하였다.^(1,2)

本報에서는 毒性物質의 分離精製, 生成機構 및 最適生成條件을 究明키 爲한 營養要求性的 檢討, 殺魚性物質處理組織의 形態學的 觀察等의 結果를 發表코져 한다.

Antifungal antibiotics 로써 強한 殺魚性을 나타내는 『Antimycin A⁽³⁾』는 그 化學構造가 解明되어

7種의 類似體가 알려져있으며 呼吸毒으로써의 殺魚作用은 물론 培地에서의 生成機構 및 營養要求性 等도 Birch等⁽⁴⁾에 依해 詳細히 檢討되었으 며 phyllomycin⁽⁵⁾도 paper chromatography 上으로 5種의 類似體가 報告되어 CHCl₃ 및 aceton 可溶性에 따라 精製되고 結晶까지 얻어졌다.

本 殺魚性物質도 放線菌由來로서 呼吸毒이며 大部分의 性質이 類似하나 他生物에 比해 魚類에 對한 選擇毒性, 有機溶媒에 對한 安定性, UV, IR spectrum 및 元毒分析, 營養要求性等이 既存物質과 相異함을 볼때 새로운 殺魚性物質로 推定된다.

一般의 複合培地에서의 毒素生成은 單純培地에 比해 優越함이 알려져 있다. 本 殺魚性物質도 그 毒性物質의 本體는 아직 모르지만 大豆粕을 培地로 使用하였을때 他의 合成培地보다 強하게 毒素가 生成되었으 며 單純培地에서 各 營養源의 利用性을 檢討코져 여러가지 成分을 基礎培地에 單一成分으로 添加하여 主으로써 必須營養源을 檢索하였으며 아울러 毒性物質의 生成을 爲한 最適條件의 培地組成을 確立하였다.

또 本 毒性物質 處理後 致死直前의 鯉魚를 組織學的으로 檢討하여 그 殺魚作用의 特異性을 究明하였다.

材料 및 方法

供試菌株

本 實驗에 使用한 菌株는 前報⁽¹⁾에서 發表한 *Streptomyces*屬 菌株였다.

供試魚類

亦是 前報⁽¹⁾에서 發表한 바와 같이 참붕어(*Pseudorasbora parva* Temminck et Schlegel) 및 잉어(*Cyprinus carpio* L.)를 供試魚類로 하였다.

毒性物質의 分離

毒性物質을 얻기 爲하여 다음과 같은 組成의 培養基를 使用하여 選別된 供試菌을 培養하였다.

즉 glucose 2.0%, soybean meal 1.0%
peptone 0.5% NaCl 0.2%

의 液體培地(pH7.2)를 常法에 따라 殺菌하여 30°C에서 5~7日間 靜置培養한 後 그 培養液을 HCl로 pH3.0으로 調節하여 NaCl을 飽和시킨後 毒性物質을 chloroform에 轉溶시켜 이 chloroform 部分을 飽和 NaCl 溶液으로 1回 洗滌하고 無水 Na₂SO₄로서 organic phase를 乾燥시킨 後 濃縮하여

毒性物質을 얻었으며 이 物質은 UV 照射下에서 灰青色의 螢光을 나타내었다.

여기서 얻은 油狀의 活性物質을 다시 chloroform에 溶解하여 avicel column (1.1×10.0cm) chromatography時 chloroform으로 溶出시켰을 때 活性部分은 吸着되지 않았다. 이 非吸着部分을 再次 avicel column에 通過시켜 다시 非吸着部分을 減壓濃縮하여 油狀의 試料를 얻어 thin layer chromatography로써 純粹한 試料를 얻었다. 이때 使用한 avicel thin layer plate의 두께는 0.25mm이었다.

營養實驗

各 營養源의 利用한 對한 基礎培地는 다음 Table 1과 같으며 各各의 營養源을 加한 培地에 菌을 接種하여 30°C에서 5~10日間 培養後 그 培養液의 一定量을 取하여 供試魚類에 對한 殺魚力을 測定하므로써 毒性物質 生産에 對한 營養源의 效果를 判定하였다.

Table 1. The composition of media for utilization of nutrient elements

Media	Composition	pH
N-Source	Glucose	1.0%
	K ₂ HPO ₄	0.05%
	NaCl	0.01%
	N-Source	0.05%
C-Source	Asparagine	0.05%
	L-Serine	0.01%
	L-Alanine	0.01%
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01%
	K ₂ HPO ₄	0.05%
	C-Source	1.0%
Vitamin added	Glucose	1.0%
	Asparagine	0.05%
	L-Alanine	0.01%
	L-Serine	0.01%
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%
	K ₂ HPO ₄	0.05%
Metal Salt added	Vitamin	2μg/ml
	Glucose	1.0%
	Asparagine	0.05%
	K ₂ HPO ₄	0.05%
	Metalion	10 ⁻⁴ mol

菌體量 測定方法

100ml 三角 flask에 培養基(glucose 2.0%, asparagine 0.05%, L-alanine 0.01%, L-serine 0.01%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, K₂HPO₄ 0.05%, pH6.8) 15ml를 注入하여 常法에 依해서 殺菌한 後 種菌을 接種하여 30°C에서 靜置培養하면서 經時的으로 flask 3個씩을 取하여 그 菌體를 遠心集菌해서

蒸溜水로서 2회 洗滌하고 다시 acetone 10ml 로서 2회 脫水한 後 乾燥하여 重量을 測定하였으며 g/l 로 表示하였다.

電子顯微鏡 試料의 製作法

供試魚類의 臟器組經을 1mm³의 크기로 끊어서 1% O₃O₄ 溶液으로 4°C에서 40分間 固定하였으며 脫水는 ethanol 50, 70, 80, 90%의 順으로 各各 10分間 시키고 無水 ethanol에 30分間 2回處理하였고 propylene oxide로 置換하여 Luft氏⁽⁶⁾ 方法에 依하여 epon mixture 溶液으로 抱埋하여 Poter-Blum Ultramicrotome MT-2B type로 400~500Å 程度로 薄切하고 Reynolds⁽⁷⁾ 法에 依해 二重染色한 後 Hitachi Hu-11C 電子顯微鏡으로 觀察하였다.

I. R Spectrum 測定⁽⁸⁾

精製試料를 chloroform에 溶解시켜 測定하였으며 이때 Hitachi EPI-G₃, IR-L₂ 0.025mm Demountful cell을 使用하였다.

U. V. Spectrum 測定

Shimadzu double beam U. V. -200를 使用하여 Chloroform을 溶劑로하여 測定하였다.

元素分析

精製된 試料는 CaCl₂上에서 減壓乾照한 後 分析에 供試했으며 元素分析은 韓國科學技術研究所에 依賴하여 分析하였다.

重要試藥

本 實驗에 使用된 Amino 酸은 和光純藥製이며 菌 同定用으로 使用된 糖은 Sigma Co.로 부터 購入한 것이다. nicotinic amide는 Merck製이며 기타의 vitamine은 和光純藥製이고 yeast extract는 日本東洋酵母工業의 것이며 avicel은 日本 후나코시 藥品製이다. 그외의 것은 市販 一紙試藥을 使用하였다.

結 果

物質의 精製

本 毒性物質은 前述한 方法으로 培養液에서 chloroform으로 抽出, 濃縮하여 얻은 粗試料부터 始作하였다.

1) Column chromatography

粗試料를 avicel column (1.1×10.0cm)에 乾燥

CHCl₃를 溶劑로 하여 chromatography 하면 有効物質은 非吸着 fraction에 溶出되나 他物質은 avicel에 吸着됨으로 이 方法에 依해서 有効物質을 精製하였으며 그 過程은 다음 Fig 1와 같다. 活性部分인 非吸着 fraction을 모아 減壓濃縮하여 thin layer chromatography를 行하였다.

2) Thin layer Chromatography

Avicel column chromatography의 活性部分을 avicel plate에 n-butanol, methanol, water=2:1:1의 solvent 系를 使用하여 chromatography를 했을때 有効物質은 solvent front 가까이 移動하며 extra spot가 starting point에 남았다. 또한 이 兩 spot는 다 같이 螢光性을 나타내었다. 그러나 上記의 avicel column chromatography의 活性部分을 減壓濃縮하여 chloroform에 溶解한 後 展開液 chloroform:acetone=9:1, chloroform:methanol:acetone=8:1:1 및 toluene:acetone:methanol=2:5:3을 各各 使用하여 chromatography한 結果 各各의 R_f 置가 1.0, 0.83, 0.92의 單一 spot로 나타났다. n-butanol:methanol:water=2:1:1의 展開液과 같이 물이 存在하는 solvent 系에 展開하거나 試料를 물에 溶解시켜 chromatography를 했을 境遇에는 恒常 starting point에 extra spot가 남아있었다. 이때 starting point에 位置하는 物質은 有効物質이 물과 接觸해서 生成된다는 것을 알 수 있었으며 이것은 有機溶劑가 混存할 時 더 強하게 生成되는 傾向을 나타내었다. 이때 solvent front 가까이 移動하는 物質 및 原點에 位置한 物質은 다같이 毒作用을 나타내었으나 後者는 그 活性이 아주 弱화된 것으로 判定되었다. 그리고 TLC上에서 移動하지 않는 後者의 物質은 avicel column에 吸着되었다.

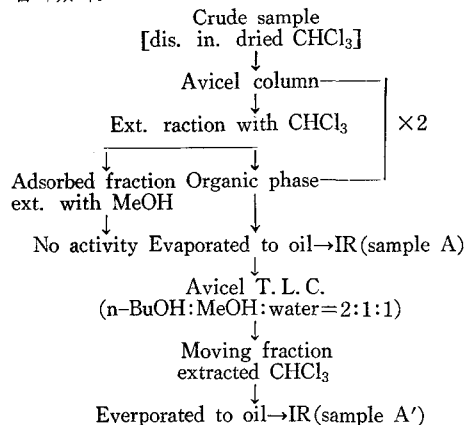


Fig. 1. Isolation procedure of sample.

위의 Fig 1의 sample A와 A' 각을 I.R. Spectrum sample로 해서 그 결과를 비교하였으며 sample A fraction은 以下各實驗에 供試하였다. 그 결과 毒性物質이 單一物質로 精製되었음을 알았으며 또 A-sample과 A'-sample이 同一한 物質임을 알았다. 또한 以下各實驗에서 使用한 試料은 Sample-A와 같이 精製하여 使用하였다.

毒性物質 生成에 미치는 營養物質의 影響

1) Complex media에서의 toxin 生成能

Peptone, beef extract, asparagine 및 soybean meal 등을 窒素源으로 한 여러가지 培養基에서 種菌을 培養하여 毒性物質의 生成能을 檢討한 結果는 다음 Table 2과 같이 glucose-asparagine 培地에서 比較的 높은 生成能을 나타내었고 glucose 및 窒素源의 濃도가 높은 soybean 培地에 서 더욱 좋은 生成能을 나타내었다.

Table 2. Producibility of toxin in complex media

medium	final pH	toxicity*
glucose	1.0%	
peptone	0.5	
beef ext.	0.5	
NaCl	0.5	8.0
glycerine	1.0	15.5hr
beef ext.	0.5	
peptone	1.0	
NaCl	0.3	8.0
glucose	1.0	3.5
asparagine	0.05	
K ₂ HPO ₄	0.05	4.5
glucose	2.0	1.5
soybean	1.0	
peptone	0.5	
NaCl	0.2	7.4
NaCl	0.2	0.7

*The applied fish was *Pseudorasbora parva*.

2) Toxin 生成에 미치는 Amino acid 및 無機窒素源의 影響

Glucose 1.0%, KH₂PO₄ 0.05%, NaCl 0.01%를 基礎培地로 하고 各各의 窒素源을 0.05% 濃度로 加하여 毒性物質의 生成能을 檢討한 結果는 Table 3과 같다. 卽 cystine 및 hydroxyproline을 利用하여 生育할 수 없었으며 asparagine, arginine, alanine, valine, histidine 및 serine을 使用한 培養基에서 toxin 生成能이 比較的 높았다. 또 無機窒素源中에서는 尿素가 가장 높은 生成能을 나타내었다.

Table 3. Effect of amino acid on the production of toxin

amino acid	growth	pH	toxicity (min)
glycine	卅	none	122
alannine	卅	specific	97
β-alanine	卅		410
valine	卅		85
leucine	卅		130
isoleucine	卅		120
serine	卅		95
threonine	卅		105
cysteine	卅		500
cystine	±		—*
methionine	卅		—
glutamic acid	卅		500
aspartic acid	卅		180
glutamine	卅		200
asparagine	卅		84
lysine	卅		160
hydroxylysine	+		—
arginine	卅		60
histidine	卅		97
phenylalanine	卅		—
tyrosine	+		—
tryptophan	卅		650
proline	卅		500
hydroxyproline	—		—
γ-aminobutylic acid	卅		650
control (no amino acid)	±		—
control (soybean)	卅		60

Basal medium: glucose 1.0%, K₂HPO₄ 0.05%, NaCl 0.01%.

One twentieth percent of nitrogen compound was added to the basal medium.

— : no growth, ± : slight growth,

+ : moderate growth, 卅 : fair growth,

卅 : good growth, 卅 : excellent growth

※ Toxicity was not observed

3) Toxin 生成에 미치는 金屬 ion의 影響

一般的으로 毒性物質의 生成에는 金屬이 主要하게 關與한다는 事實은 이미 잘 알려져 있으며⁽⁹⁾ 특히 二次的 代謝産物의 生成에는 金屬鹽의 適切한 平衡이 必要함이 強調되고 있다.

本實驗에서는 Table 5에서 보는바와 같이 Mg⁺⁺이 必須的으로 重要하게 關與한다고 생각되며 Fe⁺⁺이 Fe⁺⁺⁺보다 더 重要하게 作用한다고 推定된다.

Table 4. Effect of inorganic nitrogen sources on production of toxin

N-source	growth	pH	toxicity (min)
(NH ₄) ₂ HPO ₄	##	6.2	157
(NH ₄) ₂ SO ₄	++	6.6	—
NaNO ₃	###	6.6	122
(NH ₄) ₂ CO	###	6.6	96
control (no N-source) ±			—
control (soybean) ###			60

Basal medium, other preparations and symbols are same as Table 3.

Table 5. Effect of metal ions on production of toxin

ions	metal salts	growth	pH	toxicity (min)
Fe ⁺⁺	Fe ₂ SO ₄	++	6.2	188
Fe ⁺⁺⁺	Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·7H ₂ O	+	6.0	850
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	++	5.6	940
Mg ⁺⁺	MgSO ₄ ·7H ₂ O	###	5.6	35
	MgCl ₂	###	6.4	35
Mn ⁺⁺	MnCl ₂	+	6.4	1240
	MnSO ₄	++	6.5	94
Pb ⁺⁺	(CH ₃ COO) ₂ Pb·3H ₂ O	++	6.0	—
Al ⁺⁺⁺	Al ₂ (SO ₄) ₃ ·18H ₂ O	###	5.6	150
Co ⁺⁺	Co(CH ₃ COO) ₂	—	6.4	—
Zn ⁺⁺	ZnCl ₂	+	6.4	—
Cu ⁺⁺	CuSO ₄	++	6.4	168
None		++	6.2	—

Basal medium: glucose 1.0%
 asparagine 0.05%
 K₂HPO₄ 0.05%

10⁻⁴M metal ion was added to the basal medium.

Symbols are same as Table 3.

Mg⁺⁺은 一般의 菌의 糖代謝過程을 促進하여 菌의 發育을 旺盛하게 하기 때문에 2次的으로 毒素가 多量으로 生成된다고 생각할 수 있다. 特히 diptheria 毒素의 生成에 必須的으로 要求되는 Fe⁺⁺는 本 菌의 毒素에도 重要하게 作用함을 할 수 있으며 welchii 菌의 -毒素生成의 重要한 因子인 Zn⁺⁺은 本 菌이 全然 利用하지 않음을 알 수 있었다. 또 金屬을 添加하지 않는 對照區에서는 毒素의 生成이 全然 없음을 볼 때 Fe⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ 등의 金屬이 本 毒素의 生成에 必須的으로 關與한다고 생각되며 이에 비해 Pb⁺⁺, Co⁺⁺, Zn⁺⁺는 別 다른 影響이 없음을 알았다.

4) Toxin 生成에 미치는 vitamin 의 影響

glucose 2.0%, asparagine 0.05%, L-alanine 0.01%, L-serine 0.01%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, K₂HPO₄ 0.05%를 基礎培地로 하여 毒性物質 生成能을 調査한 結果는 다음 Table. 6 과 같이 vitamin 에 對해서 特異的인 影響을 나타내지 못하였다.

Table 6. Effect of vitamin on production of toxin

vitamins	growth	pH	toxicity (min)
nicotine amide	none specific	5.5	67
riboflavin		5.0	67
biotin		5.0	63
thiamine		5.5	100
pyridoxine		4.6	65
folic acid		5.0	59
vitamin B ₁₂		5.0	101
Ca-pantothenate		5.0	48
inositol		5.6	67
p-aminobenzoic acid		5.0	93
yeast ext.		5.8	70
control		5.4	59

Basal medium: glucose 2.0%
 asparagine 0.05%
 L-alanine 0.01%
 L-serine 0.01%
 MgSO₄·7H₂O 0.05%
 K₂HPO₄ 0.05%

Vitamin was added to the basal medium as a final concentration of 2μg/ml.

5) Toxin 生成에 미치는 炭素源의 影響

Asparagine 0.05%, L-alanine 0.01%, L-serine 0.01%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, K₂HPO₄ 0.05%를 基礎培地로 하고 各種 炭素源을 1.0% 加하여 그 生成能을 調査한 結果는 Table. 7 과 같다.

D-glucose, D-mannose, L-rhamnose, D-ribose, D-xylose, D-arabitol, starch 등이 本物質의 生産에 主된 炭素源으로 利用됨을 알 수 있었으며 D-galactose 는 生育은 促進되었으나 毒素는 거의 生産되지 않았다. Pentose 中에서 L-rhamnose, D-ribose, D-xylose 에서 높았고 D-araninose 및 L-arabinose 에서는 生成能이 낮았으며 Saccharose, maltose 및 raffinose 에서는 대단히 낮았다. 糖 alcohol 中에서는 D-arabitol 이 가장 좋았으며 他的 炭素源은 毒性物質 生成能이 대단히 低下되었다.

Table 7. Effect of saccharide on production of toxin

C-source	growth	pH	toxicity (min)
D-glucose	卍	5.0	25
D-fructose	卍	5.5	115
D-galactose	卍	6.6	—
D-mannose	卍	6.2	30
L-rhamnose	卍	5.4	20
D-arabinose	+	6.8	—
L-arabinose	卍	4.5	120
D-ribose	卍	5.4	23
D-xylose	卍	6.2	52
D-erythrose	±	4.5	—
D, L-glyceraldehyde	±	5.4	—
saccharose	+	6.6	1020
maltose	卍	6.6	310
raffinose	卍	6.8	—
inositol	卍	7.0	—
xylitol	卍	7.3	—
D-sorbit	+	6.8	1020
D-arabitol	卍	6.4	21
salicin	+	6.8	—
inulin	+	7.0	—
starch	卍	6.5	44
none	+	7.2	—

Basal medium: asparagine 0.05%
 L-alanine 0.01%
 L-serine 0.01%
 MgSO₄·7H₂O 0.01%
 K₂HPO₄ 0.05%

Two percent saccharide was added to the basal medium.

Symbols are same as Table 3.

6) 培養時間과 toxin 生成과의 關係

最終的으로 培地組成을 glucose 2.0%, asparagine 0.05%, L-alanine 0.01%, L-serine 0.01%, Mg-SO₄·7H₂O 0.01%, K₂HPO₄ 0.05%로 하여 培養 時間에 따라 菌體生成量과 毒性物質의 生成과의 關係를 調査한 結果는 Fig. 2와 같다. 毒性物質의 生成은 菌의 增殖과 比例하여 增加하였으나 8日 後부터 急히 破壞되는 現象을 나타내었다.

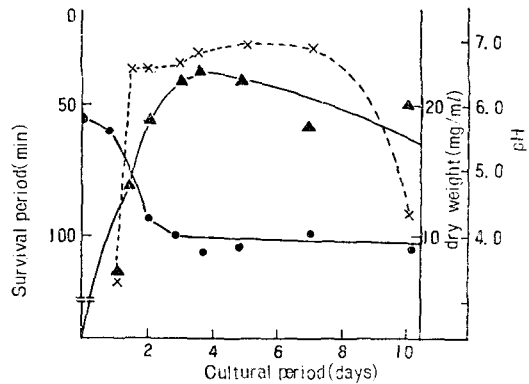


Fig. 2 Time course of toxin production,

▲—▲ cell growth
 ×—× toxin production
 ●—● pH

IR Spectra

前述한 方法으로 精製한 sample A와 A'에 對해서 各各 IR spectrum⁽⁶⁾을 測定한 結果兩 試料가 同一한 spectrum을 나타내었으므로 單一物質로 精製되었음을 確認하였다. 그러나 本 IR spectrum으로 試料를 同定할 수 있는 information은 얻을 수 없었다. (Fig. 3)

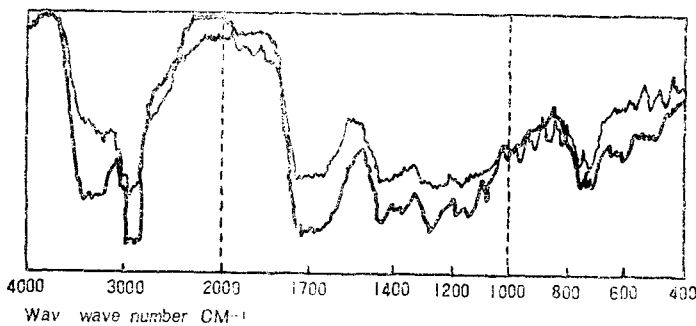


Fig. 3 IR spectrum of purified sample

Thick line: sample A
 Thin line: sample A'

U. V Spectra

本試料를 chloroform 에 溶解하여 200~400nm 의 波長에서 그 吸光度를 測定하였으나 特異한 吸光을 나타내지 않았다.

元素分析

精製試料를 分析하여 C ; 75.6%, H ; 11.1%, N ; 2.33%, O ; 10.97% 等の 組成比를 얻었으며 이 結果로써 化學式을 算出した 結果 $C_{38}H_{66}NO_4$ 로 나타났다. 이 化學式의 N 含量으로 보아 本物質은 monomer 狀態라고 믿어진다.

毒性 試料에 依한 魚類 組織의 細胞學的 觀察

本 毒性物質이 魚類에 作用하여 미치는 毒作用을 組織學的으로 觀察하였다. 體長 20.5cm, 體重 165g 의 健全한 잉어를 100 μ g/ml 濃度の 毒性物質 溶液 500ml 에 7時間 飼育시킨 後 致死直前의 잉어를 屠殺하여 必要한 組織을 摘出하여 前述한 方法으로 固定하여 電子顯微鏡用 標本을 만들었으며 對照區로서는 同等크기의 잉어(同時 同一地區에서 捕獲한것)를 淸水 500ml 에 7時間 飼育시킨 後 使用하였다.

1) 腎臟組織의 所見

本 物質로써 處理된 잉어의 腎臟組織의 電子顯微鏡의 所見을 對照群과 比較해보면 核의 甚한 收縮과 더불어 核膜의 屈曲이 甚하게 일어나며 mitochondria 의 擴張 및 crist cristae 의 消失이 나타났다. 또 小包體의 消失 및 細胞質의 變性和 強한 壞死 亦是 觀察되었다. (Fig. 4, 5)

2) 아가미 組織의 所見

核의 收縮이 심하고 s-ER(smooth surface endoplasmic reticulum)의 出現이 顯著하며 細胞質의 一部에는 심하게 破壞된 現象이 나타나며 더우기 아가미 突起細胞의 表面部分에 變化가 明確히 나타났다. (Fig. 6, 7)

3) 腎臟組織의 所見

核의 變化는 그다지 認定되지 않았으나 細胞의 異物處理 器官인 lysosome 의 數가 늘어나고 mitochondria 의 擴張과 더불어 s-ER 의 出現이 많아지며 細胞質의 破壞가 多少 認定되었다.

考 察

殺魚性 物質에 對해서는 植物由來의 成分이 大田, (10-11) 宗像(12) 및 河律(13-16) 등에 依해 報告되었으며 微生物由來의 成分으로써는 1948年 Leben 等(17)에 來해 發表된 Antinycin A 가 가장 잘 알려

져 있다.

本 實驗에서는 土壤에서 分離한 放線菌 *Streptomyces umbrosus* 가 生成한 殺魚性 物質을 分離하여 aflatoxin 抽出(18)時와 같이 chloroform 으로 抽出한 後 avicel column chromatography 및 avicel thin layer chromatography 로 精製하여 純粹한 物質을 얻을수 있었으며 이 物質은 T. L. C. 와 I. Respectrum 上에서 單一物質임이 確認되었다.

Mycotoxin 의 生成(19-25)에 對해서는 最近에도 많이 研究되고 있으며 複合培地에서는 毒素生成이 優秀하나 單純培地에서는 發育은 旺盛하지만 毒素生成이 아주 劣等하여 A型 botulinus 菌의 境遇 複合培地의 10%程度밖에 生成되지 않았다. (26-27) Kindler 等(28)에 依하면 單純培地에 tryptophan 의 量을 100倍 增加시키면 複合培地에 匹敵하는 毒素가 生成되었으며 또 아미노酸의 種類 및 量의 關係가 毒素生成에 重要한 因子로 作用하는 境遇도 있다. 卽, 炭疽菌毒素의 因子인 防禦抗原(29)의 生成에는 必要하나 發育에는 無關한 數種의 아미노酸(leucine, isoleucine, methionine, proline, phenylalanine, histidine)이 알려져 있으며 Kannan 等(3)은 *S. antibioticus* NRRL 2838 의 合成培地에 tryptophane 을 添加해 주었을 境遇 菌의 生育에는 影響이 없으나 Antimycin A 의 生成이 增加됨을 發表하였다.

細菌의 毒素나 酵素의 生成, 病原性의 保持 또는 各種의 secondary metabolite 의 生成等に 金屬鹽의 適切한 共存이 必要하며(30-31) 菌의 發育에는 影響이 없을 程度의 金屬鹽濃도가 毒素生成에 重要하게 作用할 境遇가 있다. 그 例로 diphtheria 毒素生成에 對한 鐵의 影響을 들 수 있으며(32) 그 逆으로 Neft 等(33)은 *Streptomyces* sp. AY-B-265 에 依한 Antimycin A 의 生成에 鐵이 阻害作用을 나타냈을 報告하고 있다. Murata(34) 等은 welchii 菌의 α -毒素生成에 Zn^{++} , Mn^{++} 의 影響을 調査했으며 最近 Steele(20) 等은 Ochratoxin A 生成에 미치는 Zn^{++} , Cu^{++} , Fe^{++} 의 效果를 報告하였다. Maggon 等(35)은 aflatoxin 生成에 미치는 trace metal 의 影響을 調査한 結果 Cd, Ba, V 는 阻害하고 Cu, Zn, Fe, B, Mo 및 Ca 는 促進했으며 Co 는 影響이 없었다고 한다.

菌의 發育에 關係없이 毒素生成에만 必要한 vitamin 에 對한 報告로써 welchii 菌에 對한 biotin 의 效果를 들 수 있으며(34) 葡萄狀 球菌의 Hyaluronidase 生成에는 大量의 thiamine 이 必要함이 報



Fig. 4 Normal kidney in *Cyprinus carpio* L. Smooth surfaced nucleus is round, euchromatin, and enwrapped with double layer. Relatively, much mitochondria recognized. ($\times 6000$)

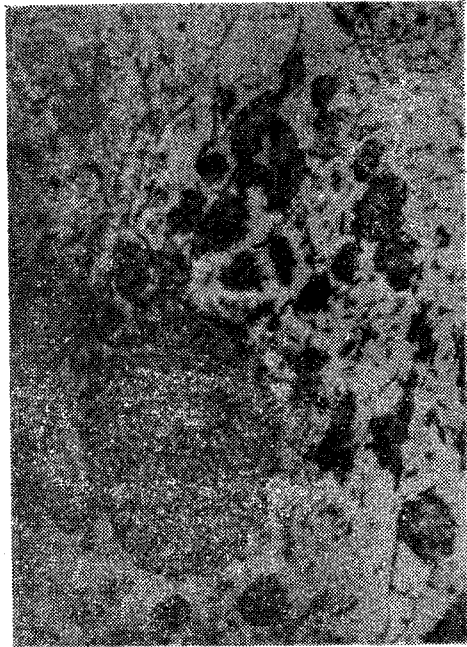


Fig. 5 Kidney treated with the piscicidal substance. Nucleus atrophied remarkably with indentation and occasional loss of cristae on the membrane. Mitochondria is slightly swollen. Vacant area observed as a result of serious cytoplasmic degradation. ($\times 6000$)

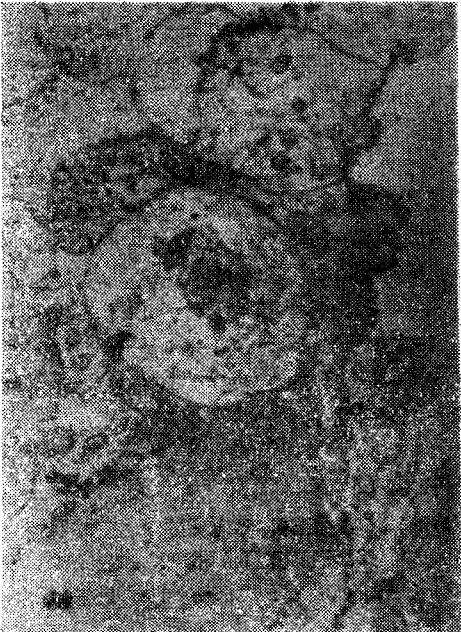


Fig. 6 Normal gill in *Cyprinus carpio* L. Erythrocyte revealed in below area. Round type of nucleus and free ribosome noted in cytoplasm. Most of mitochondria distributed in near nucleus. ($\times 6000$)



Fig. 7 Gill treated with the piscicidal substance. A large vacuole with necrotic affectness noted on some part of cytoplasm. Nucleus atrophied and indentation occurred in the membrane. ($\times 6000$)

告되고 있다.⁽³⁶⁾

糖은 大部分 毒素生成菌의 發育의 energy 源으로 되므로 그 毒素生成에 미치는 影響은 發育에 關與하는 間接的인 것이 많다. 또한 糖은 境地成分으로써 大量 含有되어 있으므로 그 代謝產物이 培地の pH 나 地의 成分의 代謝를 바꾸고 그 結果로써 毒素의 生成에 影響을 미칠 可能性도 고려하여야 한다.⁽³⁷⁻³⁸⁾ *Clostridium botulinum* A, B 型 菌의 無糖培地에서의 毒素生成량은 金糖培地の 1/1000 以下에 達했으며 glucose 는 botulinus 菌의 毒素生成을 促進함과 아울러 自家融解를 助長한다.

本 殺魚性物質의 生成은 天然窒素源으로서 大豆 粕을 使用했을 境遇 가장 좋았고 asparagine 도 좋은 效果를 나타내었다. 合成培地에서 窒素源으로써는 25種의 아미노酸中 alanine, valine, serine, asparagine, arginine 및 histidine 이 우수하였으며 tryptophane 은 別로 影響이 없었다. 또 cysteine, glutamic acid, proline 等은 菌의 發育에는 좋은 效果를 나타내었으나 毒素生成에는 別로 影響이 없었으며 無機窒素源으로는 尿素가 가장 좋았다.

金屬鹽으로써 培地中에 Mg^{++} 을 加했을 境遇 toxin 生成能이 顯著히 增加했으며 金屬을 添加하지 않는 境遇는 毒素가 거의 生成되지 않았다. 또 Antimycin A 와 같이 Fe 에 依한 阻害效果도 認定되었으며 vitamin 은 本 毒素生成에 無關하였다.

炭素源의 影響으로써 glucose, manose, L-rhamnose, D-ribose, D-xylose 를 使用했을 境遇에는 그 生成이 좋았으나 galactose, arabinose 의 境遇에는 그 生成이 대단히 나빴다.

또 glyceraldehyde, erythrose, saccharose, maltose, raffinose 및 糖alcohol 中 D-arabitol 以外の 糖에서는 거의 毒素가 生成되지 않았으며 여기에서 arabinose 의 境遇에는 生成되지 않았으나 arabitol 을 使用했을 境遇 毒素生成이 顯著한 것은 興味로운 現象이다. Polysaccharide 中 inulin 은 效果가 없음에 比하여 溶性澱粉은 좋은 效果를 나타내었다.

以上の 結果 本 物質의 生合成은 HMP Cycle 에서 ribose→ribulose→xylulose→(xylose)→fructose→glucose 의 代謝經路가 認定되며 이들 pentose 中の 한 種이 毒性物質生合成의 inducer 나 或은 precursor 로써 關與한다고 推測할 수 있으며 이 點은 앞으로 꼭 究明코져 한다.

菌의 發育과 毒素가 培地中에 出現하는 時期와 의 關係는 菌種이나 毒素의 種類에 따라 다르지만 대개 두가지 型으로 나눌 수 있다. Welchii 菌의 α

毒素⁽³⁹⁾나 diphtheria 毒素⁽⁴⁰⁾等은 菌의 增殖 期間中에 出現하지만 破傷風毒素⁽⁴¹⁻⁴²⁾나 Botulinus 毒⁽⁴³⁾은 菌이 自家融解를 받아 崩壞하는 過程에서 出現한다. 本 菌이 殺魚性物質 生成은 前者의 境遇와 같이 對數增殖期의 初期부터 菌의 發育과 平行하여 毒素가 生産되었다.

精製 試料의 元素分析 結果 C, H, N, O 의 比는 38 : 66 : 1 : 4로서 그 化學式은 $C_{38}H_{66}NO_4$ 로 算出되었으며 이는 Schmidt-Kastner⁽⁵⁾가 發表한 phyllomycin 의 $C_{24}H_{32}N_2O_9$ 및 Antimycin A⁽³⁾의 $C_{28}H_{40}N_2O_9$ 과는 아주 다르며 monomer type 라고 믿어진다.

또 本物質은 IR 및 UV spectruin 에서도 phyllomycin 과는 別個의 物質로 推定⁽⁵⁾되며 Alkal 處理 및 Acetone 에서의 安定性等⁽¹⁾에서 상당한 差異가 있음을 볼때 異種의 物質로 認定된다.

要 約

供試菌의 培養濾液으로부터 毒性物質을 chloroform 에 轉溶하여 濃縮한 後 avicel column chromatography 및 avicel TLC 로 精製하였다. 毒性物質 生成에 要求되는 營養源은 生育에 必要한 營養源과 一致하지 않았으며 Valine, asparagine, arginine, 尿素, D-glucose, D-mannose, L-rhamnose, D-ribose, D-xylose, D-arabitol, starch 等이 毒性物質 生成에 要求됨이 認定되었다. 또한 五炭糖의 代謝過程中 ribose, xylose, fructose, glucose 가 代謝되는 過程이 本 物質生成의 主된 經路로 推定된다. Vitamin 類는 無關함에 比해 Mg 가 必須的으로 要求되었다. 物質의 生成은 菌의 增殖에 比例되었으며 6 日間 30°C 에서 培養했을 때 가장 많이 生成되었다. 毒性物質 處理後의 잉어 組織은 아가미 腎臟 膀胱等에서 核膜의 屈曲과 더불어 核의 甚한 收縮과 細胞質의 壞死가 顯著하였다. 本 物質의 化學式은 $C_{38}H_{66}NO_4$ 로 推定되며 UV 照射時 灰青色 螢光을 나타내었다.

參 考 文 獻

- (1) 宋邦鎬, 徐正墳; 韓産徴誌 3, 2, 63(1975)
- (2) 宋邦鎬, 徐正墳; *ibid.*, 3, 2, 69(1975)
- (3) Lennon, R. E.; *Advan. Appl. Microbiol.* 16, 55 (1973)
- (4) Birch, A. J., Cameron, D. W., Harada, Y., and Rickards, R. W.; *J. Chem. Soc., London*, 303(1962)

- (5) Schmidt-Kastner G.; Justus Liebig's *Ann. Chem.* **668**, 122(19636)
- (6) Luft, J.H.; *J. Biophy, Biochem, Cytol.* **9**, 409(1961)
- (7) Reynolds, E.S.; *J. Cell. Biol.*, **17**, 208(1963)
- (8) Silverstein, R.M., G.C. Bassler, T.C. Morrill; spectrometric identification of organic compounds, John Wiley & sons Inc. p.73(1974)
- (9) 村田良介:蛋白質 核酸 酵素 **13**, 972(1968)
- (10) Ohata K. and MK. Munakata; *Tetrahedron letters* **12**, 923(1970)
- (11) Ohata, K., S. Marumo, Y. Chen and K. Munakata; *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 3, 431(1971)
- (12) 宗像桂; 講演要旨集, 日本農化學會 59(1966)
- (13) 河津一儀; 有機合成化學 **30**, 7, 615(1972)
- (14) Kawazu K. and T.Mitsui; *Tetrahedron letters*, **30**, 3519(1966)
- (15) Kawazu, K.; *Jap. Agr. Res. Quarterly*, **3**, 2, 20(1968)
- (16) Kawazu, K.; K. Koshimizu and T.Mitsui; *Agr. Biol. Chem.* **38**, 5, 1093(1974)
- (17) Leben C. and G. W. Keitt; *Phytopathology*, **38**, 989(1948)
- (18) 栗飯原景昭, 失野信禮; 食品衛生と微生物, 朝倉書店, p.116(1970)
- (19) Scheusner, D.L., L.L. Hood, L.G. Harmon; *J. Milk Food Technol.*, **36**(5), 249(1973)
- (20) Steele, J.A., N.D. Davis, U.L. Diener; *Appl. Microbiol.*, **25**(5), 847(1973)
- (21) Untermann, F.; *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg., I, Orig. A.*, **219**(4), 426(1972)
- (22) Fung, D.Y.C.; *J. Milk Food Technol.*, **35**(10), 577(1972)
- (23) LeBars, J.; *Ann. Rech. Vet.*, **4**(3), 487(1973)
- (24) Raskin, B.M., V.K. Golshmid; *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, **50**(11), 145(1973)
- (25) Reiss, J.; *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensmittel.*, **2**(9), 171(1973)
- (26) Mager, J., S.H. Kindler; *J. Gen. Microbiol.*, **10**, 130(1954)
- (27) Kindler, S.H., J. Mager, N. Grossowicz; *J. Gen. Microbiol.*, **15**, 396(1956)
- (28) Kindler, S.H., J. Mager; *J. Gen. Microbiol.*, **15**, 394(1956)
- (29) Puziss, M., G.G. Wright.; *J. Bacterio.*, **68**, 474(1954)
- (30) Weinberg, E.D.; *Perspectives in Biology and Medicine*, **5**, 432(1962)
- (31) Mueller, J.H.; *J. Immunol.*, **42**, 343(1941); **42**, 353(1941)
- (32) Pappenheimer, A.M., S.J. Johnson; *Brit. J. Exptl. Pathol.*, **17**, 335(1936)
- (33) Neft, N. and T.M. Farley; *Antimicrob. Ag. Chemother*, **1**, 274(1972a)
- (34) Murata, R., A. Yamamoto, S. Soda, A. Ito.; *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, **18**, 189(1965)
- (35) Maggon, K.K., S. Gopal, T.A.V. Subramanian; *Biochem. Physiol. Pflanz. BFP*, **164**, 523(1973)
- (36) Rogers, H.J.; *J. Gen. Microbiol.*, **16**, 22(1956)
- (37) Pardee, A.B.; *Microbial Reaction to Environment* (ed. Soc. Gen. Microbiol.), p.13, Univ. Press, Cambridge (1961)
- (38) Pope. C.G.; *Invern. Arch. Allergy*, **5**, 115(1954)
- (39) Murata, R., A. Yamamoto, S. Soda, A. Ito.; *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, **18**, 189(1965)
- (40) Mitsuhashi, S., M. Kurokawa, Y. Kojima; *Japan. J. Exptl. Med.*, **20**, 261(1949)
- (41) Raynaud, M., J. Alouf, R. Mangalo; *Ann. Inst., Pasteur*, **96**, 276(1959)
- (42) Seki, T., M. Takaki, H. Hirabayashi, H. Yamaguchi; *Med J. Osaka Univ*, **5**, 271(1954)
- (43) Miller, P.A., M.D. Eaton, C.T. Gray; *J. Bacteriol.*, **77**, 733(1959)