

Streptomyces sp. 가 生産하는 抗眞菌性 抗生物質에 関한 研究

(第 4 報) Tetraene 系 抗眞菌性 抗生物質의 生成 및 그의 性狀

高永熹, 裴 武

한국과학기술원 응용미생물연구실

(1982년 8월 26일)

Studies on the Antifungal Antibiotics Produced by a *Streptomyces* sp.

(Part 4) The Occurrence of Tetraene Substance and Its Physiological Properties

Yung H. Kho and Moo Bae

Korea Advanced Institute of Science and Technology

P.O. Box 131, Dongdaemun, Seoul, Korea

(Received August 26, 1982)

Abstract

Streptomyces griseorubiginosus var. *soyoensis* previously identified, produced two kinds of antifungal antibiotics, *trans*-cinnamamide and another new substance. The latter was identified to be a new substance of tetraene family by establishment of UV, IR, NMR, mass spectra and chemical reactions and tentatively named as Tetraene KM-A.

Through an antimicrobial activity test using serial agar dilution method, Tetraene KM-A showed strong growth inhibitory activity against fungi and yeasts, but not against procaryotes tested. The inhibitory action of Tetraene KM-A on fungi was remarkably ineffective when some of sterols were added to the cultural media.

LD₅₀ of the Tetraene KM-A to mice and rats by intravenous injection were 84.3 and 90.4 mg/kg respectively. LD₅₀ to mice by oral feeding was 1503 mg/kg.

서 론

벼 紋枯病菌에 대한 抗眞菌性 物質을 生成하는 菌株를 선정하고 菌株의 微生物學的 性質을 조사하여 동정하였으며 이 菌株의 배양액에서 두가지의 抗眞菌性 抗生物質을 추출, 정제하여

그중 백색침상결정으로 얻어진 것은 *trans*-cinnamamide 였음을 이미 보고하였다.¹⁻³⁾

本報에서는 두가지 물질중 연한 황색 분말로 얻어진 抗眞菌性 抗生物質에 대한 物理化學的 性狀과 各種 微生物에 대한 抗眞菌 spectrum 및 生理毒性的 生物學的 性狀에 대한 시험결과를 보고한다.

실험재료 및 방법

사용균주

抗眞菌性 抗生物質 生産菌株로서 전보³ 에서 동정한 *Streptomyces griseorubiginosus* var. *soyoensis* 를 사용하였고 生成된 抗眞菌性 物質의 抗眞菌 spectrum 조사를 위한 시험균으로는 한국과학기술원 응용미생물연구실에 보존중인 것을 사용하였다.

항진균성 항생물질의 발효생산 및 추출정제

전보³에서 사용한 발효배지 100 ml을 500 ml의 진탕 플라스크에 넣고 균을 접종하여 28°C, 200 rpm으로 5 일간 진탕 배양한 후 종균으로 하였으며 같은 조성의 발효배지 5 l를 10 l 들이의 Marubishi Jar Fermentor (Model MD-500)에 넣고 접종량 2%로 하고 28°C에서 통기량 2.5 l/min. 교반량 200rpm으로 48시간 배양하였다. 배양이 끝난후 원심분리하여 균체를 제거한 배양액을 전보³에서와 같은 방법으로 정제하였으며 이때 얻어진 연한 황색의 분말을 시료로 하였다.

물리화학적 성상

각종 용매에 대한 용해성과 화학반응은 상법에 따라 실험하였다. 융점은 Yanaco micro-melting point 측정기기로, 자외선 흡수스펙트럼은 Beckman Model 25 spectrophotometer를 사용하여 조사하였다. 수소핵자기 공명 스펙트럼은 tetramethylsilane을 표준물질로하여 Varian EM-360A (60M H₂)에서 얻었다. 적외선 흡수 스펙트럼은 Hewlett Packard 5895 A G.C.M.를 이용하였다^{4,6}.

抗眞菌性 시험

各種 시험균에 대한 本 物質의 抗眞菌性을 알아보기 위하여 serial agar dilution method로 생육 저지최소농도를 결정하였다. 試料의 일정량을 소량의 MeOH에 녹인후 非 ion性 界面活性劑인 polyoxyethylene alkylaryl ether가 0.05% 함유된 물에 1/2씩 濃度 勾配를 만들어 배지중에 현탁시켰다. 이때 배지로서 곰팡이에 대하여는 potato

dextrose agar, 細菌은 nutrient agar, 酵母는 yeast-malt extract agar를 사용하였다.

毒性試驗

Mouse와 rat를 이용하여 경구독성 및 복강 주사에 의한 LD₅₀을 산출하였다. 공시동물을 性別 구분없이 체중이 비슷한 것끼리 group을 지어 飼育場에 넣고 육추용 분말사료: 밀가루, skim milk = 30 : 30 : 1의 사료를 주면서 1주일 동안 변화된 환경에 적응시킨후 藥劑를 투여하였다. KM-A를 멸균된 생리식염수에 녹여서 복강주사하고 경구투여는 stomach tube를 이용하여 강제로 투여하였으며 그 후 2주일동안 관찰하여 사망율을 조사하였다. 투여량은 대수법으로 scale을 정하였으며 최종적으로 group 당 10마리씩 사용하여 약제를 투여하였다⁷.

실험결과 및 고찰

抗眞菌性 抗生物質 KM-A의 物理化學的 特性

分離精製된 KM-A의 단일물질 여부를 알기 위하여 시료 소량을 MeOH에 녹인 다음 Whatman No. 1 filter paper (2×20cm)에 10 μl spotting 하여 여러가지 solvent system에서 실온상승법으로 전개시켰다¹² Solvent를 완전히 날려보내고 UV chamber 속에서 UV long wave로 물질의 이동을 확인한 뒤 *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 0478을 시험균으로 하여 bioassay한 후 R_f치를 확인하였으며 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. Paper Chromatogram of KM-A in Various Solvent Systems

Solvent	Rf
5% Dimethylformamide in MeOH	0.85
BuOH-EtOH-H ₂ O (5:1:4)	0.75
PrOH-H ₂ O (7:3)	0.91
BuOH sat'd with H ₂ O	0.23
50% Aq. Acetone	0.90
BuOH-EtOH-H ₂ O (5:1:5)	0.75
t-BuOH-H ₂ O (4:1)	0.45
3% NH ₄ Cl	0.78
BuOH-MeOH-H ₂ O	0.65
H ₂ O	0.75
BuOH-Pyridine-H ₂ O (6:4:3)	0.78
Dimethylformamide-H ₂ O (1:9)	0.70

Table 2. Chemical Reaction of KM-A

Reaction	Resitive
Molish	Positive
Fehling	"
Biuret	Negative
Ninhydrin	"
Millon	"
Sakaguchi	"
Conc. H ₂ SO ₄	Violet→blue→dark brown

즉, 本物質 KM-A는 paperchromatography 상의 여러가지 solvent system에서 單一 spot를 나타내는 것으로보아 單一物質임을 確認할 수 있다

本物質 KM-A의 용점(M. P.)은 190°C 이상으로 250°C 까지도 용점이 확실하지 않고 黒變하여 polyene 계 항생물질의 특성을 갖고 있었으며 몇 가지 화학반응을 본 결과는 Table 2와 같다.

Molish 반응과 Fehling 반응은 양성으로서 2층 결합의 존재를 나타내고 있으며 Biuret, Ninh-

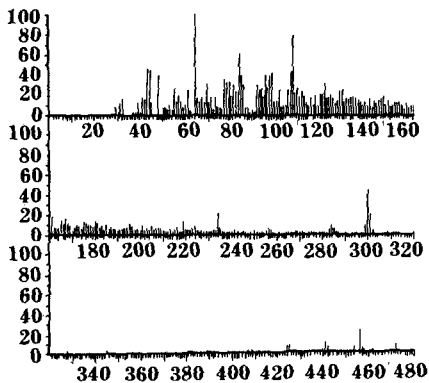


Fig. 1. Mass Spectrum of KM-A

hydrin, Sakaguchi 반응은 음성으로 나타나 蛋白質 및 peptide 性物質은 아님을 알 수 있다. 진한 황산으로 작용시킬때 처음에는 紫色을 띄우다가 靑色으로 變하는데 이것은 polyene 系 抗生物質의 일반적 반응과 동일하다.

KM-A의 元素分析 결과는 C 45.7%, H 7.3% N 3.4%였으며 Fig. 1과 같은 mass spectrum에 의하면 分子量은 472로서 元素組成과 함께 계산하면 C₁₇H₃₅O₁₃N가 된다. 즉,

* Elemental analysis

Found	Calculated for C ₁₇ H ₃₅ O ₁₃ N
C : 45.7 (%)	43.2 (%)
H : 7.4	7.4
N : 3.4	3.6

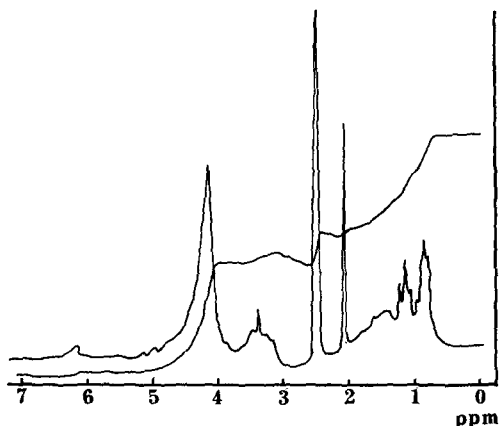


Fig. 2. NMR Spectrum of KM-A

KM-A의 NMR spectrum은 Fig. 2와 같았는데 정확한 해석은 내릴수 없으나 매우 복잡한 구조를 하고 있음을 알 수 있다. 本物質의 용해도를 보면 MeOH, pyridine, dimethylformamide, dimethylsulfoxide, aq. acetone, aq. EtOH, aq. BuOH 등에는 잘 용해하나 물과 EtOH에는 약간 용해하며, acetone ethylacetate, benzene, hexane, ethyl ether, chloroform 등에는 不溶이었다.

KM-A의 U. V. spectrum은 Fig. 3과 같았는데 290, 303 및 318mm에서 peak를 나타내어 전형적인 tetraene 系 임을 나타내고 있다. 赤外線 分光은 Fig. 4와 같은데 3400, 2940, 1720, 1570, 1390, 1170, 1070, 1005, 880, 580, 800, 750 cm⁻¹에서 peak로 나와 역시 전형적인 polyene 系 化合物임을 나타내고 있으나 peak의 높이와 양상등에서 기존의 tetraene 系 化合物과 정확하게 일치되는 것은 없다.

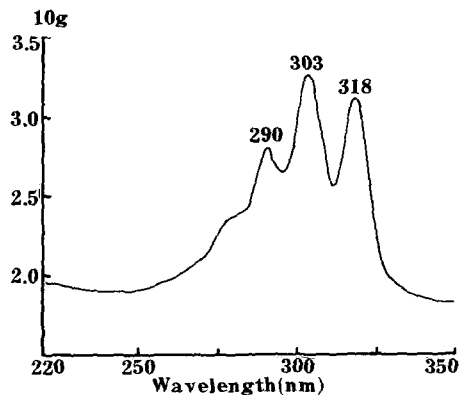


Fig. 3. Ultra Violet Spectrum of KM-A in MeOH.

이상의 諸特性을 綜合하여 볼때 本 抗生物質 KM-A는 polyene macrolide系 抗生物質中 tetraene系로서 새로운 抗生物質임을 결론지을 수 있기 때문에 本 物質 KM-A를 “Tetraene KM-A”라 命名하였다.

抗菌 Spectrum

Tetraene KM-A의 여러가지 미생물에 대한 생육저지최소농도는 Table 3과 같다. 즉, 곰팡이류 및 효모류에 대하여 抗菌성이 인정되나 抗細菌성은 없었다. 병원성 곰팡이 및 효모류에 대하여 강한 抗眞菌성을 나타내어 이의 응용성이 기대된다.

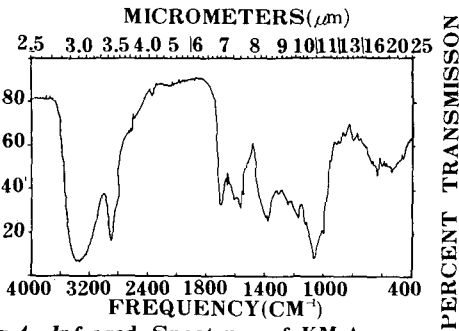


Fig. 4. Infrared Spectrum of KM-A (KBr wafer)

현재까지 알려져 있는 모든 polyene계 항생물질은 효모류 및 纖維狀 곰팡이에 대하여는 抗菌作用이 있으나 抗細菌성은 대부분 없는 것으로 나타나 있는데 本物質도 비슷한 경향을 나타내었다. Kinsky 등^{10,11}은 sterol류와 polyene 항생물질과의 관계 즉, polyene-sterol 복합체와 抗菌성을 작용시키는 작용사이에 직접적인 연관이 있는 것으로 추측하였다. 즉, polyene macrolide에 의한 영향을 받지 않는 세균류는 원형질막속에 sterol류를 함유하지 않은 반면 대부분의 곰팡이나 효모류는 함유하고 있다. 이것은 polyene 항생물질이 sterol과 결합하여 抗菌作用을 나타낸다는 것을 의미한다. 本 研究에서도 Tetraene KM-A가 抗眞菌성을 나타냄에 있어 sterol류에 의한 영향을 조사하여 抗菌機作을 조사하였다. 몇가지 대표적인 sterol류를 EtOH에 녹인후 Tween 80, 0.1% 함유한 PDA배지에 100 μ g/mg 되게 첨가시킨 후 곰팡이를 접종시켜 菌成長을 조사한 결과는 Table 4와 같다.

즉, sterol류를 첨가하였을 때는 抗眞菌성이 나타나지 않았는데 이것은 Tetraene KM-A가

Table 3. Minimal Inhibitory Concentration of Tetraene KM-A against Various Microorganisms

Organism	MIC (μ g/ml)
Fungi	
<i>Rhizopus boreus</i> Yousei IFO 4746	100
<i>Aspergillus awamori</i> var. <i>fumeus</i>	12.5
<i>Asp. flavus</i>	100
<i>Asp. niger</i> Sherumanni IAM 2059	25
<i>Chaetonium</i> sp.	25
<i>Penicillin arellaneum</i> 3201	25
Pathogenic fungi	
<i>Trichophytum metacrophyte</i>	12.5
<i>Trichophytum rubrum</i>	12.5
<i>Microsporium gypseum</i>	12.5
<i>Epidermophytum ploccosin</i>	12.5
Phytopathogenic fungi	
<i>Pyricuralia oryzae</i>	12.5
<i>Pellicuralia sasakii</i>	12.5
<i>Chochliolus myabeanus</i>	25
<i>Rynchosporium oryzae</i>	25
<i>Fusarium moniliforme</i>	50
<i>Rhizoctonia solani</i>	50
Yeast	
<i>Candida pulcherima</i> NCYC 166	6.25
<i>C. tropicalis</i>	50
<i>C. utilis</i> (Henneberg) NCYC 359	25
<i>C. utilis</i> ATCC 9950	12.5
<i>Cryptococcus neoformans</i> IFO 545	12.5
<i>Saccharomyces carsbergensis</i> ATCC 9098	12.5
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 478	12.5
<i>Torulopsis halophilis</i> IAM 4791	25
<i>Rhodonula glutinis</i>	100
<i>Candida guiliamondi</i>	12.5
<i>Rhodonula graminis</i>	6.5
Bacteria	
<i>Bacillus subtilis</i>	>300
<i>B. cereus</i> IAM1656	>300
<i>Eschericia coli</i>	>300
<i>Proteus</i> sp.	>300
<i>Sarcina lutea</i>	>300
<i>Staphylococcus</i> sp.	>300

Table 4. Inhibition of Fungus Growth by Tetraene KM-A in the Presence of Sterols at 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Level

Sterol added	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	<i>P. sasakii</i>	<i>P. oryze</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>A. niger</i>
None	12.5	12.5	12.5	>25
Cholesterol	>300	>300	>300	>300
Ergosterol	>300	>300	>300	>300
Lanosterol	>300	>300	>300	>300

sterol류와 민감하게 결합하여 不活性化 하였음을 의미한다. 따라서 Tetraene KM-A는 sterol이 함유되지 않은 세균류에 대하여는 생육저지 작용이 없으나 원형질막에 sterol을 함유하고있는 효모 및 곰팡이류의 성장을 저지한다는 것을 알 수 있다. 결론적으로 Tetraene KM-A의 抗菌機作은 곰팡이 및 효모류의 원형질막에서 sterol과 결합하여 細胞의 滲透壓을 變化시켜 生育을 저지하는 것으로 볼 수 있다.

Tetraene KM-A의 安全性

Mouse와 rat에 대한 tetraene KM-A의 복강주사에 의한 LD₅₀은 각각 84.3, 90.4 mg/kg이었으며 mouse에 대한 경구투여시 LD₅₀은 1503 mg/kg이었다.

즉, 복강주사에 의한 것은 비교적 독성이 강하나 경구투여에 의한 독성은 低毒性이었다. 일반적으로 polyene계 항생물질은 정맥주사 및 복강주사에 의하여 체내에서 cholesterol과 결합하여 hemolysis 현상을 나타내어 毒性을 나타내는 것으로 알려져 있으며¹³⁻¹⁵ 본 結果도 이러한 현상에 의한 것으로 생각된다. 경구투여에서 低毒性을 나타낸 것은 Tetraene KM-A가 산성에서는 失活되며 따라서 경구투여시 胃液의 pH가 酸性이기 때문에 毒性이 낮아진 것으로 보인다.

요 약

Streptomyces griseorubiginosus var. *soyensis*에 의하여 두가지의 抗真菌性 抗生物質이 생성되었는데 하나는 *trans*-cinnamide 이었고 다른 하나는 UV, IR, NMR, mass spectrum 및 화학반응의 결과로 새로운 tetraene系 화합물이 밝혀져 이 物質을 Tetraene KM-A라 하였

다. 本物質의 抗菌性を 조사한 결과 곰팡이 및 효모류에 대하여는 강한 抗真菌性を 나타내었으나 抗細菌성은 없었다. 배지에 sterol류를 첨가하였을때 Tetraene KM-A의 抗菌力이 없어지는 것으로 보아 stesoid와 결합함을 알 수 있고 抗菌作用도 이와 관련이 있는 것으로 판단하였다. Tetraene KM-A의 mouse 및 rat에 대한 복강주사에 의한 LD₅₀은 각각 84.3과 90.4 mg/kg이었으며 mouse에 대한 경구독성은 1503 mg/kg이었다.

참 고 문 헌

- 1) Bae, M. and Y. H. kho : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **10**, 33(1982)
- 2) Bae, M., Y. H. kho, W. S. Lee and J. H. cho : *ibid.*, **10**, 39(1982)
- 3) Kho, Y. H., S. H. Jung and M. Bae : *ibid.*, **10**, 117(1982)
- 4) Charlson, A. J., P. A. J. Gorin and A. S. Perlin : *Methods in Carbohydrate chem.*, **1**, 419, Academic Press, New York (1963)
- 5) Lindberg, B., L. J. Lonngren and D. A. Powell : *Carbohydr. Res.*, **78**, 111(1980)
- 6) Kenne L., B. Lindberg, K. Petersson, E. Katzenellenbogen and E. Romanowska : *Carbohydr. Res.*, **78** 119(1980)
- 7) Hagan, E. C. : *Appraisal of the safety of chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics.* p17, ed. by the Association of Food and Drug Officials of U. S. A. (1975)
- 8) Bhacca, N. S. : *NMR Catalog* (1963)
- 9) Gottlieb, Carter, H. E., Lung-chi Wu, and Sloneker : *Phytopathology* **50**, 594(1960)
- 10) Kinsky, S. C. : *Biochem. Biophys. Res. Commu.* **4**, 353(1961)
- 11) Kinsky, S. C. : *J. Bacteriol.* **83**, 829(1962)
- 12) Williams, S. T. and Cross, T. : *Methods in Microbiol.* (Ribons, N. ed.) **4**, 295 (1971)
- 13) Seneceb, H : *Antibiot. Chemothr.* **2**, 435(1952)
- 14) McCarthy, F. J. : *Antibiotic. Annuat*, 719(1954-1956) 14)
- 15) Utahara, R. : *J. Antibiot.* **A7**, 117 (1953)