

Streptomyces sp. LAM-593이 생산하는 수용성 항진균성 항생물질

이동희 · 박승림 · 권태종 · 정호권
건국대학교 미생물공학과

초록 : 토양에서 분리한, 수용성 항진균성물질(solumycin)을 생산하는 *Streptomyces* sp. LAM-593의 배양액으로부터 butanol 추출, alumina와 2회의 Sephadex LH-20 column chromatography 등의 방법으로 물질을 정제하고 여러가지 성질을 조사한 결과는 다음과 같다. 본 물질은 silica gel TLC에서 단일 spot를 나타내었으며 ethanol-ammonia water-water (8 : 1 : 1), butanol-ethanol-water (5 : 1 : 4 및 5 : 2 : 2), 50% methanol계에서의 Rf치는 각각 0.24, 0.46, 0.57, 0.84였고, 물 methanol, acidic aq, butanol 등에 잘 용해하였으며 Fehling과 Molish 반응에서 양성인 342, 361, 380, 404nm에서 peak를 나타내는 heptaene계 물질이었다. 그리고 *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Trichophyton*, *Trichosporon* 등의 진균에 대해서는 항균력이 컸으나 여러가지 세균에 대해서는 활성이 거의 없었다.

항진균성 항생물질에 대한 연구는 1960년대 이후부터 진균성 질환의 치료 목적과 더불어 각종 농작물의 항생물질을 이용한 병충해 방제나 농산물 가공, 식품의 방부 보존을 목적으로 활발히 진행되고 있다.^{1, 2)} 그러나 매년 많이 발견되는 새로운 물질중에서 안전성이나 유효성 및 경제성을 만족시키는 항진균성물질은 극히 드문 실정이다.³⁾ 진균성 질환은 인체의 면역기능이 약화된 경우에 발병하기 쉬우며, 국부 또는 전신적인 피부질환을 일으키거나 호흡기 및 소화기 계통의 급만성 질환을 일으킨다. 항진균성 물질은 작용면에서 볼때, 진균의 생육을 억제하거나 사멸시키는 물질인데 현재 임상적으로 사용되고 있는 amphotericin B를 비롯한 몇종의 물질은 인체에 대한 독성이나 물에 대한 용해성이 낮은 관계로 사용에 만족스럽지 못한 것으로 평가되고 있으며^{4, 5)}, 특히 그 대부분이 비수용성이기 때문에 여러가지 진균성 질환의 치료에 난점이 많다고 밝혀져 있다.¹⁾

그래서 저자들은 수용성 항진균성 물질에 관해서 연구하던중 토양으로부터 물질 생산능이 우수한 *Streptomyces*속 균주 LAM-593을 분리하였기에 배양후 정제하여 얻은 물질의 성질에 관해서 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 선별

Glucose 1%, peptone 0.2%, yeast extract 0.01%, agar 1.8% 조성의 배지 (pH 7)를 사용하여 토양을 균원시료로 해서 분리한 *Streptomyces* 1530여 균주를 대상으로 시험균주로 *Candida albicans* IFO 0583과 *Cryptococcus neoformans*를 사용하여 투명대의 크기로 27균주를 1차 선별하였으며, 1차 선별된 균을 배지 조성을 달리한 액체배양으로 물질생산능이 우수하고 butanol에 쉽게 전용되는 물질을 생산하는 균주

Key words : *Streptomyces* sp. LAM-593, water-soluble antifungal antibiotic

Corresponding author : D. H. Yi

LAM-593을 최종 선별하여 본 연구에 사용하였다.

균의 배양

Soluble starch 1%, glycerol 1%, soybean meal 0.3%, peptone 0.2%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, NaCl 0.05%, silicon oil 0.01% 조성의 배지 (pH 9.5) 2.5 L를 5L fermenter (Mituwa KMJ-5S)에 넣고 전배양한 배양액을 3% 수준으로 접종하여 통기량 0.9 vvm, 교반속도 200 rpm으로 30°C에서 60시간 배양하였다.

항진균성물질의 정제 및 단일성 확인

배양액의 원심분리한 상등액을 pH 6으로 조절한 후 butanol 추출, silicagel 처리, alumina와 2회의 Sephadex LH-20 column chromatography 등의 방법을 사용하여 정제하였으며, 단일성 및 Rf치를 조사하기 위하여 silica gel thin layer chromatography를 행하였고 이때 사용한 plate의 크기는 3×20cm였으며 전개용매는 ethanol-ammonia water-water (8 : 1 : 1, v/v/v), n-butanol-ethanol-water (5 : 1 : 4 및 5 : 2 : 2, v/v/v) 및 50% methanol을 사용하였다. 그리고 spot는 10% H₂SO₄ 용액으로 발색시켰다.

항진균 활성 측정

항진균성 물질의 활성은 cup법⁶⁾으로 측정하였다. 즉 5mm 두께의 Sabouraud agar 평판을 만들어 *C. neoformans* 현탁액 0.5mL를 도달한후 표면을 건조시킨뒤 penicylinder를 올려 놓고 항생물질용액 30 μL를 적하하여 30°C에서 48시간 배양한후 형성된 투명대의 크기를 측정하였다. 그리고 항균 spectrum 조사는 정제된 물질의 수용액을 serial dilution method로 희석하여 각 시험균에 대한 minimal inhibition concentration (MIC)를 결정하였다. 이때 효모의 경우에는 Sabouraud 배지를, 곰팡이의 경우는 glucose-malt extract 배지를, 세균의 경우는 nutrient 배지를 사용하였다.

결과 및 고찰

항진균성 물질의 생산

위의 '재료 및 방법'에서와 같은 방법으로 배양하

면서 균의 증식, 항진균성물질의 생산, pH의 변화를 경시적으로 측정한 결과는 Fig. 1과 같았다. 즉 약 20시간 후부터 균은 크게 증식하기 시작하여 40시간 만에 정지기에 도달하였다. 그리고 항진균성 물질의 생산은 대수증식기 초기부터 생성되기 시작한 후 급격히 증가하여 정지기인 약 50시간 후에 최대에 달하였으며 pH는 약 30시간까지는 하강하다가 그후부터 완만히 상승하였다. 따라서 본 연구에서는 2일간 배양한 후 배양액을 회수하였다.

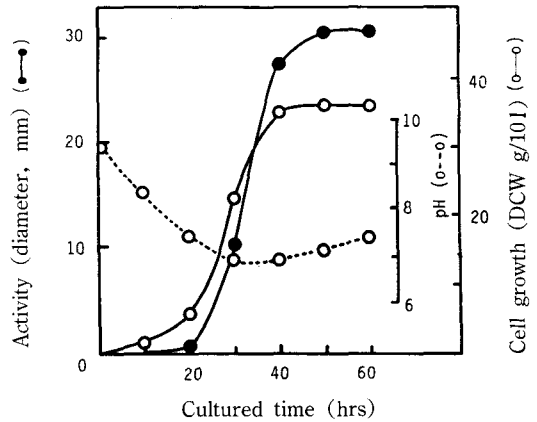


Fig. 1. Production of antifungal antibiotic with *Streptomyces* sp. LAM-593 in batch fermenter.

항진균성 물질의 정제

*Streptomyces*속 균주 LAM-593의 배양액을 원심분리한 상등액을 사용하여 Fig. 2의 방법에 따라 정제하였다. 즉 배양액을 0.5N HCl로 pH 6으로 조절한 다음 1/5량의 n-butanol로 3회 추출하여 감압건조한 후 alumina column에 흡착시켜 50% methanol로 용출하여 감압건조한 다음 Sephadex LH-20 column chromatography를 2회 행하였으며 methanol로 용출하였다. 활성부분을 모아 감압농축하여 얻은 결정을 아주 소량의 methanol로 수회 세척하여 건조한 분말상태의 시료를 이하의 실험에 사용하였다. 이때의 수율은 배양액 1L당 21mg이었다. 그리고 얻은 결정의 형태는 Fig. 3과 같았으며 solumycin이라고 명명하였다.

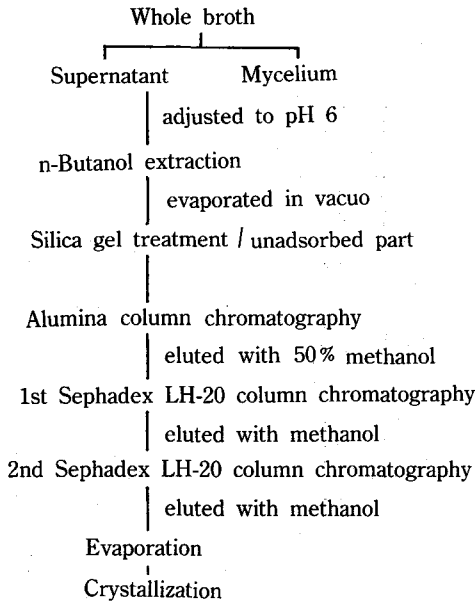


Fig. 2. Purification procedure of the antibiotic.

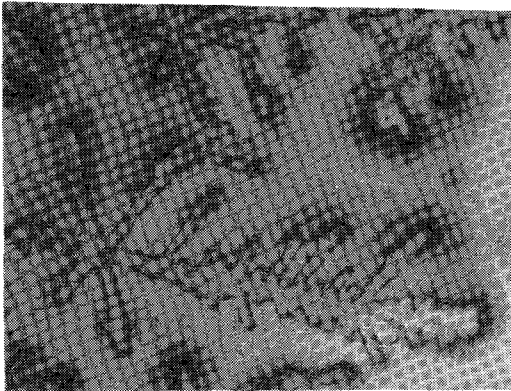


Fig. 3. Crystals of the antibiotic.

항진균성 물질의 안전성

1) pH 안정성 : 본 물질의 pH 안정성을 조사하기 위하여 3mg/10mL 농도의 수용액을 pH 3에서 12까지 각 단계별로 조절한후 실온에서 48시간 방치후 잔존 항균력을 측정한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 pH 7~9 부근에서 가장 안정하였으며, 산성영역에서 보다 알카리에서 비교적 더 안정하였다.

2) 열안정성 : pH 안정성에서와 동일한 용액을 80

℃와 100℃에서 각각 열처리하면서 경시적으로 그 잔존활성도를 측정한 결과는 Fig. 5와 같았다. 즉 80℃에서 2시간 처리하였을 때와 100℃에서 40분간 처리하였을 때 약 50% 실패하였으며 100℃에서 2시간 처리하였을 경우에는 완전히 실패하였다. 그리고 열처리하는 과정중에서 침전이 생성되었는데 시간에 비례하여 생성량이 증가하였으며 침전물은 항진균활성이 없었다.

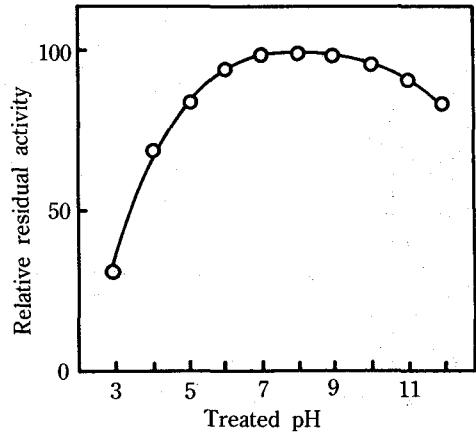


Fig. 4. pH stability of the antifungal antibiotic.

The antibiotic solution (3mg/10 ml) was treated in the various pH ranged from 3 to 12 at room temperature for 48 hrs.

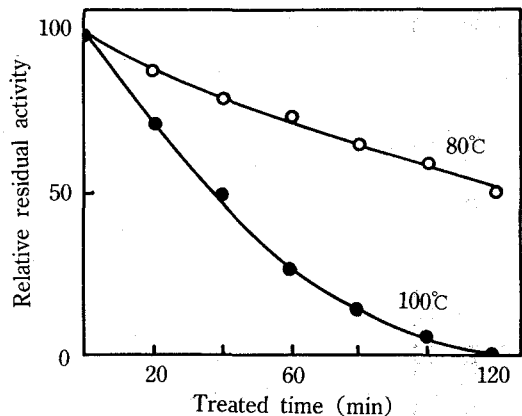


Fig. 5. Heat stability of the antifungal antibiotic.

The antibiotic solution(0.3mg/10ml) was pretreated at 80℃ and 100℃ for the given time prior to assay of residual antibiotic activity.

항진균성 물질의 물리, 화학적 성질

1) Thin layer chromatography : 정제된 수용성 항진균성물질의 순도 및 Rf치를 조사하기 위하여 silica gel TLC를 행한 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 사용한 몇가지 전개용액에거 모두 단일 spot가 관찰되었기 때문에 단일 물질로 정제되었음을 알 수 있었고, Rf치는 Table 1에 나타난 바와 같이 ethanol-ammonia water-water (8 : 1 : 1)계에서 0.24, butanol-ethanol-water (5 : 1 : 4)계에서 0.46, butanol-ethanol-water (5 : 2 : 2)계에서 0.57, methanol-water (5 : 5)계에서 0.84였다.

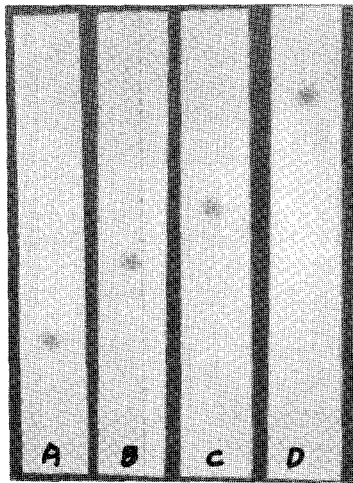


Fig. 6. Silica gel thin layer chromatography.

The size of plate was 3×20cm, and coloration of the spot was carried out by 10% sulfuric acid.
Solvent system : A : Ethanol-ammonia water-water (8 : 1 : 1), B : n-Butanol-ethanol-water (5 : 1 : 4), C : n-Butanol-ethanol-water (5 : 2 : 2), D : 50% methanol

Table 1. Rf value of the antifungal antibiotic

Solvent system	Rf value
Ethanol-ammonia water-water (8 : 1 : 1)	0.24
n-Butanol-ethanol-water (5 : 1 : 4)	0.46
n-Butanol-ethanol-water (5 : 2 : 2)	0.57
Methanol-water (5 : 5)	0.84

Estimation of Rf value was carried out with silica gel TLC. Plate size was 3×20cm, and coloration of the spot was performed with 10% sulfuric acid.

2) 각종 용매에 대한 용해성 : 정제된 항진균성 물질의 각종 용매에 대한 용해성을 조사한 결과는 Table 2에서와 같이 물과 methanol, acidic aq. butanol 등에는 잘 용해하였으나 butyl acetate, dimethylformamide 및 acetonitrile 등에는 약간 용해하였으며 ethanol, propanol, acetone, ethyl acetate, chloroform, benzene, n-hexane, isoamyl alcohol, acetic acid 등에는 거의 용해하지 않았다. 현재까지 보고된 수용성 항진균성 물질은 hydroheptin, antibiotic A-2, antibiotic 23-68 등이 있으나 hydroheptin과 antibiotic A-2는 ethanol에도 잘 용해하였으며, antibiotic 23-68은 ethanol과 pyridin 및 acetone에도 잘 용해하였다고 알려져 있기 때문에 본 물질과는 용해성에서 큰 차이를 보여준다.⁸⁾ 그리고 본 물질은 물에 잘 용해하였으므로 일반적인 항진균제가 비수용성이기 때문에 야기되는 여러가지 문제점을 해결할 수 있을 것이므로 실제의 임상적인 응용에서 많은 이점이 있으리라 여겨진다.

Table 2. Solubility of the antifungal antibiotic

Soluble good in water, base, aq. butanol (acidic), methanol
Soluble fair in butyl acetate, dimethylformamide, acetonitrile
Soluble poor in ethanol, propanol, iso-butanol, acetone, ethyl acetate, chloroform, n-hexane, benzene, acetic acid, iso-amyl alcohol, carbon disulfide

3) 화학반응 : 몇가지 화학반응에 대한 본 물질의 특성은 Table 3에서 보는 바와 같이 Fehling 반응과 Molish 반응이 양성이기 때문에 2중결합을 가지고 있다는 것과, ninhydrin, biuret, Sakaguchi 및 Hopkins-Cole 반응이 음성이기 때문에 peptide성 물질이 아니라는 것을 알 수 있었다. 그리고 진한 황산으로 작용시켰을 때 자갈색으로 변화하였으며 0.5% KMnO₄와의 반응에서는 옅은 핑크색을 띄었다.

4) U. V. spectrum : 본 물질의 methanol 용액으로 UV spectrum을 조사한 결과는 Fig. 7과 같이 342, 361, 380, 404 nm에서 peak를 나타내어 heptaene계의 일반적인 흡수파장(first 3 λ maxima : 361, 382, 405,

Table 3. Chemical reaction of the antifungal antibiotic

Reaction	Result
Fehling	Positive
Molish	Positive
Ninhydrin	Negative
Hopkins-Cole	Negative
Biuret	Negative
Sakaguchi	Negative
c-H ₂ SO ₄	Violet brown
KMnO ₄	Pink

±2nm)과 일치하였기 때문에 heptaene계의 항진균성 물질로 추정되었다.⁷⁾ 그러나 본 물질과 유사한 파장을 가진 trichomycin-A, takamycin, distamycin, antifungin 및 fulvomycin-C 등의 항진균제는 비수용성이며, 수용성인 antibiotic A-2는 360, 380, 402nm에서 peak를 나타내어 본 물질과는 상당한 차이가 있었으며⁸⁾ hydroheptin은 341, 359, 379, 402 nm에서 peak를 나타내어 본 물질과 유사하였으나 그 수용액이 pH2~9에서 ammonium sulfate로 쉽게 침전되어 ammonium sulfate로 침전되지 않는 본 물질과는 상이하다고 생각된다.⁹⁾ 또한 위의 화학반응에서도 진한 황산으로 반응시켰을 때 전형적인 polyene계 항생물질의 발색 과정 (자색-청색)과는 다르게 변색되었기 때문에 일반적인 polyene계 항생물질과는 상이한 구조를 가지고 있다고 생각된다.

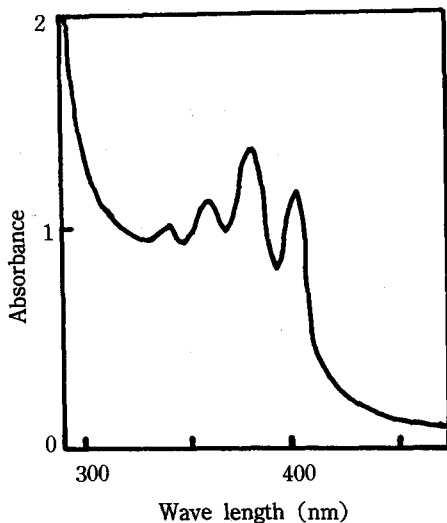


Fig. 7. UV spectrum of the antifungal antibiotic in methanol.

항균 spectrum

Streptomyces LAM-593이 생산하는 수용성 항진균성 물질(solumycin)의 각종 미생물에 대한 항균 spectrum을 조사한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같이 여러가지 세균에 대해서는 항생작용이 없었고, 곰팡이중에서는 *Aspergillus*에 대한 MIC가 비교적 높았으며, *C. albicans*에 대해서는 조사된 2종의 시험균주가 MIC의 큰 차이를 나타내었는데 이러한 예는 antibiotic A-19009¹⁰⁾ 및 antibiotic L-671, 329와 aculeacin¹¹⁾에서도 볼 수 있었다. 그러나 이들 물질들은 *Candida*에 대해서 특히 항생력이 강한 반면에 *C. neoformans*에 대해서는 거의 작용력이 없었으나 본 물질은 효모에 대한 항균 spectrum이 비교적 광범위하였다. 하지만 효모중에서 산막효모인 *H. angusta*와 분열 효모인 *S. pombe*에 대해서는 항균작용이 약하였다. 그리고 본 물질의 *C. albicans*에 대한 MIC (5~20 µg/mL)는 neoactins¹²⁾의 0.19~1.56 mg/mL, L-671, 329와 aculeacin¹¹⁾의 0.25~0.5µg/mL에 비해서는 높았지만 phosphazomycin A¹³⁾의 30 µg/mL, octacosamicin A와 B¹⁴⁾의 12.5~25 µg/mL, bacillomycin F¹⁵⁾의 40 µg/

Table 4. Antimicrobial spectrum of antifungal antibiotic from *Streptomyces* sp. LAM-59

Microorganism	MIC (µg/ml)
<i>Candida albicans</i> (clinical)	5
<i>Candida albicans</i> IFO 0583	20
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2.5
<i>Hansenula angusta</i>	100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
<i>Saccharomyces diastaticus</i>	5
<i>Saccharomyces lactis</i>	80
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	100
<i>Zygosaccharomyces mandshuricus</i>	5
<i>Trichosporon fermentans</i>	2.5
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	20
<i>Trichophyton rubrum</i>	20
<i>Aspergillus candidus</i> YUFE 1096	40
<i>Aspergillus flavus</i> IFO 6343	80
<i>Aspergillus niger</i>	40
<i>Aspergillus parasiticus</i> KFU 3074	40
<i>Aspergillus terreus</i> YUFE 1084	80
<i>Aspergillus versicolor</i>	40
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	100
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	100
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	100
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14458	100

mL와는 유사한 값이었다. 그리고 본 물질의 *C. neoformans*의 생육에 미치는 농도별 영향을 조사한 결과는

Fig. 8과 같이 생균수와 총균수의 증가를 현저히 억제하였으며 MIC에 가까운 3 µg/mL 농도에서는 살균 (fungicidal) 효과가 있음을 알 수 있었다.

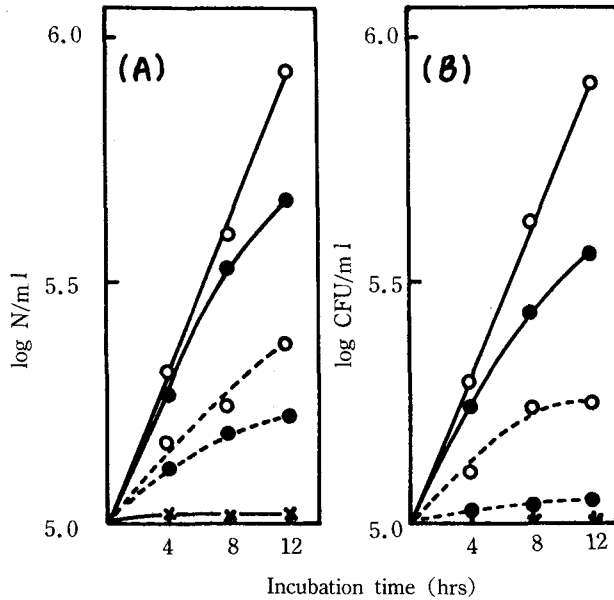


Fig. 8. Effect of the antifungal antibiotic on the growth of *Cryptococcus neoformans*.

A : Total cell number, B : Viable cell number, ○—○ : control, ●—● : 0.05 µg/ml, ◻—◻ : 1 µg/ml, ◼—◼ : 2 µg/ml, ×—× : 3 µg/ml

사 사

이 논문은 1989년도 문교부지원 한국학술진흥재

단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구 되었음.

참 고 문 헌

- Berdy, J. : Appl. Microbiol., 18 : 309 (1974)
- Vandamme, E.J. : Biotechnology of industrial antibiotics, p.3, Dekker, New York (1984)
- 岡本六郎 : 醱酵工學, 64 : 281 (1986)
- Vikmon, M., A. Stadler-Szőke and J. Szejtli : J. Antibiotics, 38 : 1822 (1985)
- Shadomy, S., H.J. Shadomy and G. E. Wagmer : Antifungal compounds, eds. M.R. Siegel and D.S. Hugh, p. 437, Dekker, New York (1977)
- Spooner, D.F., and G. Sykes : Methods Microbiol., 7B : 211 (1972)
- Mechlinski, W. : CRC handbook of microbiology (2nd ed.) Vol. V, p. 527, CRC Press (1984)
- Berdy, J. : Handbook of antibiotic compounds, Vol. II, p. 253, CRC Press (1980)
- Omura, S., Y. Tanaka, K. Hisatome, S. Miura, Y. Takahashi, A. Nakagawa, H. Imai and H. B. Woodruff : J. Antibiotics, 41 : 1910 (1988)
- Andruszkiewicz, R., H. Chmara and E. Borowski : J. Antibiotics, 37 : 1479 (1984)
- Fromtling, R.A., and G. K. Abruzzo : J. Antibiotics, 42 : 174 (1989)
- Roy, S.K., Y. Inouye and S. Nakamura : J. Antibiotics, 40 : 266 (1987)
- Uramoto, M., Y.C. Shen, N. Takizawa, H. Kusakabe and K. Isono : J. Antibiotics, 38 : 665 (1985)
- Dobashi, K., N. Matsuda, M. Masa, H. Nagawana, T. Takita and T. Takeuchi : J. Antibiotics, 41 : 1525 (1988)
- Mhammedi, A., F. Peypoux, F. Besson and G. Michel : J. Antibiotics, 35 : 306 (1982)

Solumycin : A water-soluble antifungal antibiotic from *Streptomyces* sp. LAM-593

Dong-Heui Yi, Seung-Lim Park, Tae-Jong Kwon and Ho-Kwon Chung (Department of Microbiological Technology, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea)

Abstract : A water soluble antifungal antibiotic, Solumycin, was separated from the culture broth of *Streptomyces* sp. LAM-593, isolated from soil, by butanol extraction, alumina-, 1st and 2nd Sephadex LH-20 column chromatography. The substance was pale yellow crystal which gave a single spot at Rf value 0.24 with ethanol-ammonia water-water (8 : 1 : 1), 0.46 with butanol-ethanol-water (5 : 1 : 4), 0.84 with 50% methanol on silica gel TLC. It was dissolved well in water, methanol and acidic aq. butanol but not in ethanol, acetone, ethyl acetate, chloroform, acetic acid etc., and gave positive Fehling and Molish reaction. The UV spectrum in methanol showed absorption at 342, 361, 380, and 404 nm. The antibiotic was active against fungi such as *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Trichophyton* and *Trichosporon*, but not to bacteria such as *Bacillus*, *Escherichia* and *Staphylococcus*.