

## 抗酵母性 物質에 關한 研究

(第 II 報) 窒素代謝와의 關係

徐 正 埴, 宋 邦 鎬\*, 兪 春 發\*

慶北大學校 農科大學 農化學科

\*慶北大學校 大學院 農化學科

Studies on the inhibitory substance of yeast growth

(Part II) Effect on the nitrogen uptake

Jung-Hwn Seu, Bang-Ho Song\*, Choon-Bal Yu\*

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture

Kyung-Pook National University, Taegu, Korea

Graduate school of Kyung-Pook National University\*

(Received March 24, 1973)

### Abstract

The biochemical characteristics of Astradix -P, isolated from *Astragalus membranaceus Bunge* as yeaststatic substance, were reported on a previous paper. And on this report, some relation to the nitrogen metabolism of yeast was studied. Inorganic or organic source of nitrogen easily uptaking yeast did not show any antagonistic action to the inhibitory action of Astradix -P on the yeast growth. Especially an organic nitrogen source, arginine, histidine and lysine, classified to basic amino acid, was reacted as an antagonistic substance to the sample. But, ornithine, a basic amino acid, did not show any antagonistic action to the sample.

In the mixed media containing neutral and acidic amino acids as a nitrogen source, yeast growth was inhibited strongly. If the basic amino acid was added to the same mixed media, the yeast growth was not inhibited by Astradix-P therefore, the antagonistic action of basic amino acid to the Astradix-p was readily observed.

The yeast static action of Astradix-P was partially related to the isoelectric point of amino acid as a nitrogen source. Yeast cells which propagated under the media containing growth inhibitor, Astradix -P, did not bring any remarkable denaturation of cell structure by electro-microscopic observation.

### I. 緒 論

*Astragalus membranaceus Bunge* 로 부터 分離

한 抗酵母性物質인 Astradix-P (*Astragalus membranaceus Bunge* Radix Peptide)에 關한 一般的 性質에 對해서는 徐<sup>1)</sup> 등이 이미 發表한 바 있

다. 卽 이 Astradix-P 가 酵母類中에서도 特別 酸性 酵母에 對해서 강한 抗生作用을 나타내며 이 抗生效果를 나타내는데 있어서 檢定培地에 含有되는 營養素中 炭素源인 一般糖類와 無機物質은 全然 그 效果에 對해서 影響을 주지 않으며 또한 이 物質은 pH 및 熱에 對한 安定性이 매우 크다는 點等이다.

그리하여 本人等은 本 物質의 抗菌機作을 좀더 알고저 本 研究를 한 結果 이 Astradix-P 의 抗生效果가 酵母의 窒素代謝에 有關함을 알았기에 그 結果를 여기에 報告하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 供試菌株

本 實驗에 供試된 菌株는 慶北大學校 農科大學 農化學科 應用微生物學 研究室에 保管되어 있는 yeast 를 使用하였다.

### 2. 培養液

本 實驗에 使用한 酵母增殖用培地는 Henneberg 培地 (N-free)이며 組成은 sucrose 10%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2%,  $KH_2PO_4$  0.5% 이었다. 여기에 各 아미노酸 23種을 窒素源으로 0.1%~1.5%씩 添加하여 (최종 pH 4.0~5.0) 酵母增殖培地로 使用하였다.

### 3. 抗 酵母性 物質

本 實驗에 使用한 抗酵母性物質은 本 研究室에서 *Astragalus membranaceus Bunge*에서 分離한 peptide 性 物質(Astradix-P)이었다.

### 4. 使用한 아미노酸

本 實驗에 使用한 아미노酸는 不純物이 含有되어 있지 않는 一級試藥으로서 日本 協和醱酵工業社의 製品을 使用하였다.

### 5. Astradix-P 試料 添加方法

培養液에 抗酵母性 物質 Astradix-P 를 添加할 때는 試料의 一定量을 培養用 培地에 溶解하여 添加하고 對照區로서는 試料를 含有하지 않는 培養液을 同量 添加하였다.

### 6. 培養方法

殺菌된 試驗管(1.3cm×15cm)에 上記 培養液과 試料를 注入한 後 100°C 水浴에서 10分間 殺菌한 後 菌株를 接種하여 30~32°C에서 24~40時間 培養하였다.

### 7. 實驗菌株의 接種方法

供試菌株의 菌體 一定量을 取하여 殺菌된 培地에 均一하게 懸濁한 後 그 一定量을 接種하였다.

### 8. 酵母生育度の 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 酵母數를 計測하는 方法이므로 本 實驗에서는 Thoma의 hematometer를 使用하였다.

### 9. 電子顯微鏡 試料調製方法

固定; 2%  $O_3O_4$  in phosphate buffer pH7.4  
包埋; epon resin  
染色; uranyl acetate, lead acetate

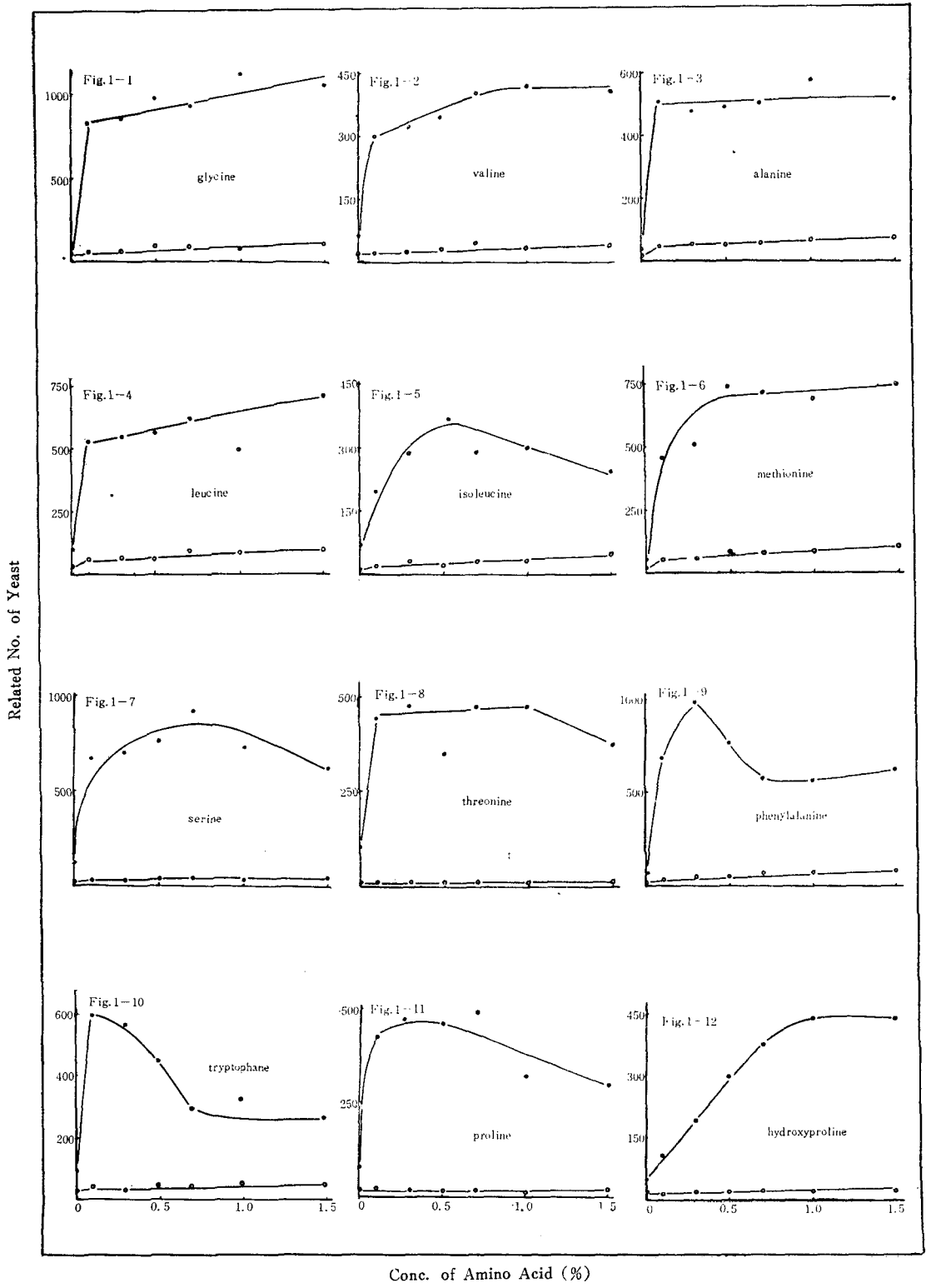
Table 1. The effect of several N-sources Contained in Henneberg medium on the yeaststatic activity of Astradix-Padded.

Conc. (%)		0.1	0.2	0.5	0.7	1.0	1.5
Urea	Sample*	25**	26	29	26	26	21
	Control	698	704	562	431	297	254
Peptone	Sample	153	728	752	454	1065	1374
	Control	683	1111	1118	1012	1276	1299
Casein-hydrolysate	Sample	52	920	1236	1114	—	1588
	Control	1005	1759	1832	—	—	2251
$(NH_4)_2SO_4$	Sample	1	—	—	—	—	1
	Control	1174	1934	1351	1364	2134	1391
$NH_4NO_3$	Sample	1	—	—	—	—	0
	Control	795	596	457	351	302	226
$(NH_4)_2HPO_4$	Sample	1	—	—	—	—	3
	Control	842	924	956	849	587	436

\* Astradix-P added

\*\* Number of yeast cells

Used yeast; *Saccharomyces coreanus*



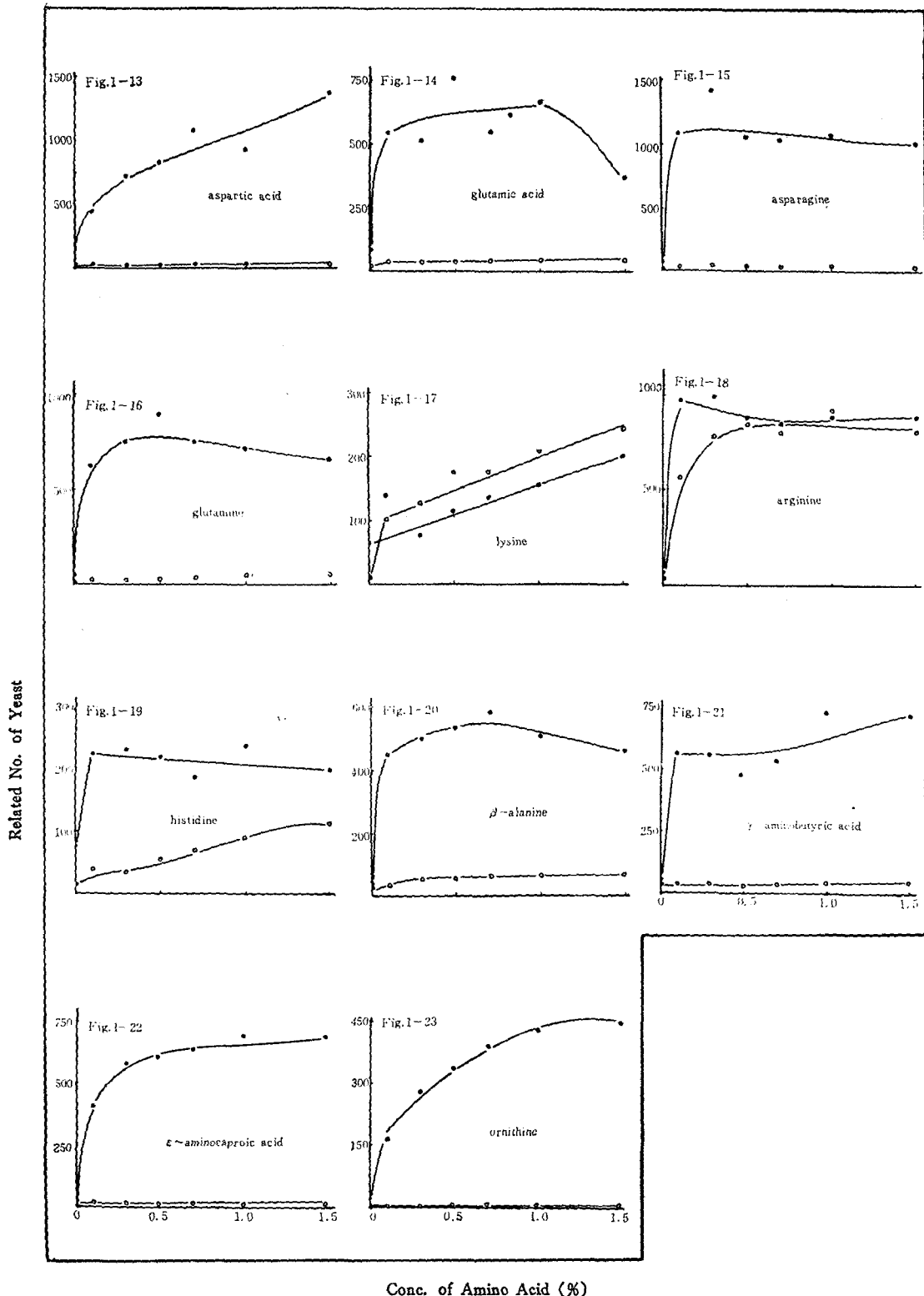


Fig.1. The activity of the sample(As:tradix-p) on the media containing amino acid for yeast growth. (●-● control, ○-○ sample)

### Ⅲ. 結 果

#### 1. 아미노酸 이 Astradix-P의 抗菌作用에 미치는 影響

酵母培地에 窒素源으로서 아미노酸을 添加하였을 때 本 試料의 抗生効果에 미치는 影響을 實驗하였다.

方法은 N-free의 Henneberg 培地에 各各의 아미노酸을 0.1%~1.5% 單一窒素源으로 添加하고 Astradix-P를 最終濃度 100 μg/ml 가 되도록 添加한 後 *Saccharomyces coreanus*를 接種하여 30°C에서 增殖狀態에 따라 24~40時間 培養한 結果는 Fig. 1과 같다.

#### 2. 其他 窒素成分이 Astradix-P의 抗菌作用에 미치는 影響

아미노酸類 以外の 窒素源을 培地에 添加하였을 때에 本 試料에 미치는 影響을 調査하기 爲하여 urea, peptone, casein hydrolysate (for bacteriology, E. Merk 製), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 등을 0.1%~0.5%로 添加하여 上法과 같이하여 實驗한 結果는 Table 1과 같으며 使用한 菌株는 *Saccharomyces coreanus* 이었다.

#### 3. 混合 아미노酸이 Astradix-P의 抗菌作用에 미치는 影響

各各의 아미노酸에 依한 影響을 調査한 後 이 아미노酸을 모두 混合하여 酵母增殖培地에 添加하였을 때에 本試料의 作用에 미치는 影響을 實驗하였다.

方法은 앞에서 實驗한 아미노酸中 알카리性 아미노酸인 arginine, lysine, histidine 등을 除外한 19種의 아미노酸을 同量씩 混合하여 培地에 0.1~1.5%가 되도록 添加하고 試料는 最終濃度 100 μg/ml 가 되도록 添加하였다.

또 別個로 酸性, 中性의 混合된 아미노酸이 培地에 알카리性 아미노酸과 試料를 上記와 같은 濃

Table 2. The activity of Astradix-p on the media containing mixed amino acids

Case	Conc. (%) of amino acid	Conc. (%) of amino acid						
		0	0.1	0.3	0.5	0.7	1.0	1.5
Mixed Amino acid	Sample	5	22	21	18	14	15	10
	Control	37	503	432	560	265	121	84
	Arginine*		565		571		674	616
	Lysine*		153		356		413	510
	Histidine*		16		22		24	62

\* in mixed amino acids with Astradix-p.

\*\* Astradix-P

\*\*\* relative No. of yeast cells

度로 添加한 後 菌株를 接種하여 30°C에서 26時間 培養한 結果는 Table 2 및 Fig. 2와 같으며 菌株는 *Saccharomyces coreanus* 이었다.

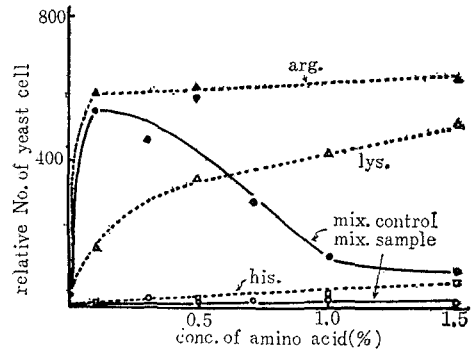


Fig. 2. The activity of Astradix-P on the media containing mixed amino acids.

#### 4. 各 菌株에 따른 알카리性 아미노酸의 Astradix-P에 미치는 影響

本 試料가 培地中에 알카리性 아미노酸이 存在할 때에는 *Saccharomyces coreanus* 菌株의 경우 그 抗菌作用이 떨어진다는 것을 앞의 實驗을 통해 알고 그 外의 다른 yeast 菌株에서의 影響을 알아 보기 爲해 本 實驗을 하였다.

方法은 *Saccharomyces coreanus* 外 13種의 yeast를 對象으로 試料가 100 μg/ml 含有된 培地에 알카리아미노酸 (arginine, lysine, histidine 및 ornithine)을 各各 0.3%로 添加한 後 菌株를 接種하여 30°C에서 25時間 培養한 結果는 Table 3과 같다.

#### 5. Arginine 이 Astradix-P의 抗菌作用에 미치는 影響

本 試料가 酵母의 培地中에 arginine 이 存在할 때에는 그 抗生효과가 減少한다는 것을 알고 arginine 및 試料를 同時에 添加하여 그 濃度를 다르게 하였을 때의 本 試料의 抗生효과를 알아 보았다.

方法은 上記 培養液에 arginine 을 0.1%와 0.3%가 되게 添加한 後 試料를 同一 培地에 溶解하여 最終濃度 10 μg/ml~1000 μg/ml 가 되도록 加하고 對照區에는 試料를 含有치 않은 培地를 同量 添加하였다.

이 培養液을 100°C 水浴에서 10時間 殺菌한 後 *Saccharomyces coreanus*를 接種하여 30°C에서 40

Table 3. The activity of Astradix-P on the various yeast strains on different N-source

Strain	Arginine		Lysine		Histidine		Ornithine	
	Astra-dix-P	control	Astra-dix-P	control	Astra-dix-P	control	Astra-dix-P	control
Saccharomyces cerevisiae	150	114	—	—	—	—	7	186
S. coreanus	284	449	—	—	—	—	3	273
S. carsbergensis	108	407	—	—	—	—	9	239
Candida tropicalis	770	668	411	358	68	112	204	291
C. utilis	189	375	203	243	123	146	96	305
C. pulcherima	1226	2470	146	244	42	338	70	552
C. albicans	882	661	322	257	171	322	517	296
C. guilliamondii	1114	1331	1091	1039	136	103	600	1086
C. intermedia	1497	1882	418	728	165	824	419	1584
C. japonica	148	278	37	114	39	87	77	290
Cryptococcus laurentii	160	168	140	69	75	112	99	172
Cry. neofomans	162	273	34	93	85	77	89	185
Rhodotorula gramanis	356	332	236	217	188	237	305	274
R. glutilis	215	277	345	277	479	302	308	335

(Unit: relative No. of yeast cells)

時間 培養한 結果는 Table 4 와 같다.

Table 4. The Astradix-P activity on various concentration of Arginine.

Conc. of Astradix-P	Conc. of Arginine							
	0	10	50	100	200	500	1000	μg/ml
0.1 %	325*	233	83	57	96	199	290	
0.3	809	465	237	143	129	253	407	

(\*relative No. of yeast cells)

6. 아미노酸的 等電點과 Astradix-P 의 抗菌作用과의 관계

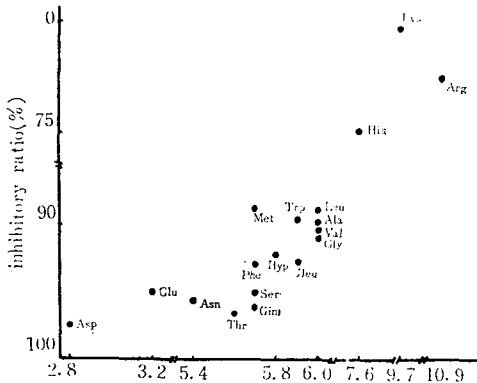


Fig. 3. The sample activity concerning with isoelectric point of amino acid.

本 試料의 抗菌作用에 있어서 各種 아미노酸中 酸性, 中性 아미노酸은 本 試料의 作用에 拮抗作用이 없었으나 알칼리性 아미노酸에 屬하는 arginine, histidine 및 lysine 이 本 試料의 阻害能에 對해 아주 強하게 拮抗한다는 것을 알고 各 아미노酸의 等電點과 本 試料의 阻害能과의 關係를 알아본 結果는 Fig. 3 과 같다.

7. Astradix-P 의 精製

Astradix-P 를 精製하기 爲하여 sephadex-G 10 의 Column (1.9cm×159cm) 에 Astradix-P 100~300mg 을 加하여 蒸溜水로써 展開한 結果 3 個의 fraction 을 分取할 수 있었으며 中 最終 fraction 에서 酵母生育 阻害能이 認定되었다. 이 active fraction 에 過量의 acetone 을 加하여 結晶을 얻었으며 (photo 1 參照) 이 結晶은 paper chromatography 및 paper electrophoresis 에서 單一 spot 로 나타나며 또한 粗 Astradix-P 를 paper chromatography 와 electrophoresis 로써 active fraction 으로 分離한 試料와 同一한 Rf 值나 mobility 를 나타내었다. 그러나 이 와같이 하여 얻은 結晶은 全然 酵母에 對한 growth inhibitory activity 가 나타나지 않았으며 이 原因은 試料가 結晶化되는 過程에서 分子內의 或種의 活性에 絶對的으로 關與하는 어떤 部分이 離脫된 現象이 아닌가 推測되며 여기에 對해서는 더 檢討 되어야 할 것으로 본다.

8. 電子顯微鏡의 所見

Malt extract broth (Difco 製) 1.5%, glucose

1.0%를 함유한 培養基에 Astradix-P를 最高 5 $\mu$ g/ml까지 濃度別로 加하여 여기에 *Saccharomyces coreanus* 菌株을 接種하여 30°C에서 35時間 培養後 生理食鹽水로 3回 菌體를 洗滌하여 遠心 集菌한 後 2% O<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (phosphate buffer pH 7.4)로 拭 固定하여 常法<sup>(8-11)</sup>에 準하여 EtOH로 拭 脫水, propyren oxide로 置換하여 epon 混合液에 包埋 重合하였다.

이와같이하여 얻은 菌體를 porterblum ultramicrotome MT2 Type B로 拭 450~500Å로 薄切하여 uranyl acetate 및 lead acetate로 二重染色한 後 電子顯微鏡으로 觀察하였다. 그 結果 本 試料가 酵母의 增殖을 阻害함에 있어 細胞內의 構造에 影響을 주었다는 所見은 本 實驗結果로서는 確實히 認定되지 않았다(photo 2 參照)

#### IV. 考 察

本 抗酵母生物質인 Astradix-P의 抗生效果에 있어서 酵母生育에 比較的 多量으로 要求되는 無機物 中 Mg, Ca, P, Na 및 炭素源로서 代表的인 glucose, maltose, sucrose 등은 그 濃度에 關係없이 抗生效果에 대해서는 全然 影響을 주지 않음이 徐, 高<sup>1)</sup>에 의해 發表되었다.

그러나 窒素源에 있어서는 그 種類에 따라 Astradix-P의 抗生效果가 다르게 나타나고 있다.

即 Table 1에서 보는 바와 같이 nitrogen source로서 無機物質인 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 등을 Astradix-P의 抗生力을 檢定하는 培地에 營養源으로 加했을 때는 그 抗生効力에 아무런 影響이 나타나지 않는 反面 여러가지의 아미노酸 및 lower peptide 등의 混合體인 peptone 이나 casein hydrolysate에 있어서는 그 濃度에 따라 나타나는 效果에 差異가 있으므로 求하기 困難한 peptide를 除外한 有機窒素源인 各種의 아미노酸를 對象으로 그 影響을 調査한 바 中性 및 酸性 아미노酸에 屬하는 19種의 아미노酸과 urea에 있어서는 Fig. 1, Table 1에서 보는 바와 같이 全然 影響을 미치지 못하며 또 이 들 各아미노酸의 混合物에 있어서도 Fig. 2에서 보는 바와 같이 아무런 影響을 주지 않는다. 그러나 알칼리性 아미노酸인 arginine, histidine, lysine 등이 檢定培地에 窒素源으로서 多量 含有되어 있을 때는 Fig. 1-17~19에서 보는 바와 같이 Astradix-P의 抗生作用을 強하게 拮抗한다는 事實을 알게 되었다.

이 들 알칼리性 아미노酸의 拮抗作用은 他的 中性 및 酸性 아미노酸 混存에 關係없이 그 濃度에

關係함을 Fig. 2에서 볼 수 있으며 또 한편 各 아미노酸이 Astradix-P의 抗生에 拮抗하는 程度와 그 아미노酸의 pI와의 關係는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 그 pI가 높아짐에 따라 拮抗能이 차차 커져서 7以上이 되면 아주 強하게 拮抗함을 알게 되었다.

이와 같은 現象에 對해서는 本 Astradix-P가 酵母의 alcohol 醱酵에 對해서는 全然 影響을 미치지 못함과 (Table 5 參照) 또 Table 3에서 보는 바와 같이 各 酵母의 種에 따라 그 結果가 서로 다른을 볼때 그 作用機緒가 그리 簡單하지 않음을 推測케 하고 있다.

Table 5. The effect of Astradix-P on alcohol fermentation of yeast.

Fermentation time (hours)	Weight of carbon dioxide	
	Control	Astradix-P (170 $\mu$ g/ml)
5	0.545g	0.524g
10	1.008	0.989
15	1.671	1.767
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

(from J. H. Seu's report. J. Korean Agr. Chem. Soc. 15, 19 1972)

한편 他的 微生物性 抗生物質의 檢定에서도 그 培地, 即 營養素의 組成 및 濃度에 關係서는 多少의 影響이 있음은 잘 알려진 事實이나<sup>2-7)</sup> 本 物質과 같이 極端인 現象은 아직 發表된 바 없으며 이러한 現象은 微生物의 窒素代謝 究明에 도움이 되리라고 생각된다.

또 本 物質의 有效部分을 分離하여 結晶을 얻었으나 이 結晶은 全然 酵母의 生育阻害活性을 나타내지 않았으며 이 原因에 對해서는 結晶化 過程에서 必須의 한 部分이 全體 分子에서 離脫된 것에 그 原因이 있거나 或은 物質이 變性된 것이라고 推測되며 이것은 더 究明되어야 할 것으로 생각된다.

그리고 이 物質의 低濃度 添加培地에 酵母를 加하여 徐徐히 增殖된 酵母를 集菌하여 電子顯微鏡으로 觀察한 結果 細胞內 構造에는 別로 特異한 所見을 나타내지 않는 點에서 볼때 이 物質이 直

接적으로作用하는 강한細胞毒的物質(cytotoxic substance)은 아닐 것이라고 생각된다.

## V. 結 論

本抗酵母性物質 Astradix-P의 抗生機作은 이物質이 酵母의 窒素代謝에 關係함을 알았으며 그結果를 要約하면 다음과 같다.

1) Astradix-P는 酵母의 營養素中 無機窒素源인 各種의 암모니아鹽의 代謝를 防害한다.

2) Astradix-P는 酵母의 有機營養素中 中性 및 酸性 아미노酸의 代謝를 防害한다.

3) 그러나 알카리性 아미노酸인 arginine, lysine, histidine, ornithine 등은 本 Astradix-P의 抗生效果에 對해서 抵抗의으로 作用하나 對象菌種에 따라 多少의 差異는 認定된다.

4) 아미노酸이 Astradix-P에 拮抗하는 能力은 그 pI와 關係가 있다.

5) 營養素로서 有機窒素源인 아미노酸의 混用은 拮抗作用에 無關하다.

6) 電子顯微鏡的으로 調査한 結果 本物質은 直接的으로 作用하는 cytotoxic substance가 아닌 것으로 보여진다.

## 參 考 文 獻

1. 徐正頃 外: 韓農化 15, 1, 19 (1972)
2. 市野一磨 外: 抗生物質 Handbook, 産業圖書 (1969)
3. 津田恭介 外: 微生物藥品化學, Vol 5, 241 地人圖書 (1971)
4. 水野傳一: 微生物化學, 南山堂 107 (1955)
5. 赤松金芳 外: 藥勿眞實齋書, 廣川書店 209, (1960)
6. 傳染病研編: 細菌學實習提要, 丸善, 468(1968)
7. Frobisher, M: Microbiology 295, Toppan (1968)
8. 日本電子顯微鏡學會編: 電子顯微鏡試料技術集 誠文堂 (1970)
9. Dalton, A. J.: A chromeosmium fixative for electron microscopy. Anat. Record. 121, 281, (1955)
10. Luft, J. H.: A new fixative for electron microscopy J. B. B. C. 2, 799, (1956)
11. Palade, G. E.: A study of fixation for electron microcophy J. Exp. Med. 95, 285, (1952)





photo. 1. crystal of Astradix-P (inactive)

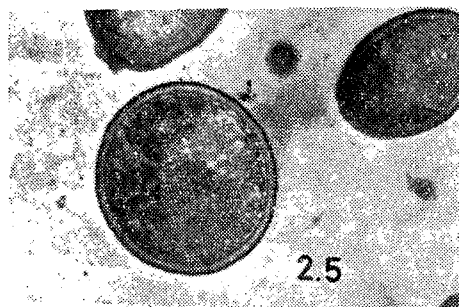


photo. 2~3

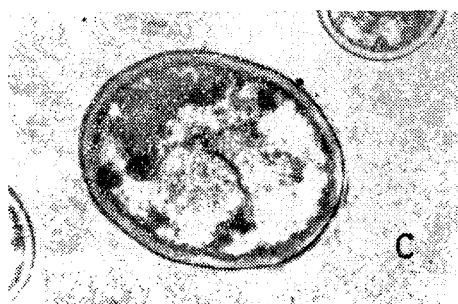


photo. 2~1



photo. 2~4

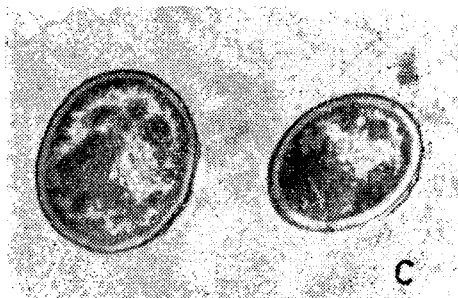


photo. 2~2

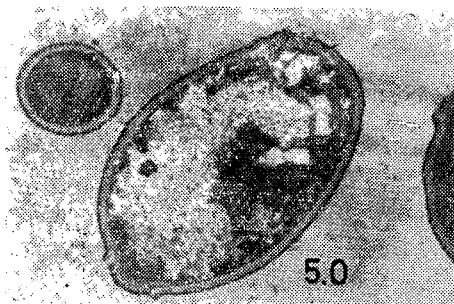


photo. 2~5

photo. 2. Electromicroscopic Picture

2~1, 2 control

2~3 treated with 2.5 $\mu$ g/ml Astradix-P

2~4, 5 treated with 5.0  $\mu$ g/ml Astradix-P