

Streptomyces 屬 菌株가 生成한 物質의 生物活性에 관한 研究

第 I 報 生成物質의 分離 및 그 生化學的 性質

宋 邦 鎬 · 徐 正 埴
慶北大學校 農科大學 農藝化學科

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

Part I. Isolation and Biological Characterization of the Substance

Bang Ho Song and Jung Hwn Seu

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

(Received May 9, 1975)

Abstract

A biological active substance was isolated from the cultured medium of *Streptomyces* sp. and its biochemical characteristics were investigated. Isolation process of the substance was as follows; the pH of filtrate of the cultured medium was adjusted to 3.0 with N-hydrochloric acid and saturated with sodium chloride, then chloroform was added to this filtrate in one fifth portions and stirred vigorously. After extracting the active substance with chloroform in 3 stages, the chloroform layer combined and evaporated after dehydrating with sodium sulfate.

The substance was found to be toxic to various fresh water fishes; the lethal dose for an average size *Pseudorasbora parva* T. et. S. was 50 μ g per ml. In the acidic condition, the toxicity of the substance remained for a long time, while in the alkaline state, the toxicity was decreased very fast. This substance was found to be stable to organic solvents, but labile to heat treatment. The maximal revival time of *Pseudorasbora parva* T. et. S. was about 20 minutes in 25 μ g/ml of the substance solution.

序 論

을 生成한다는 事實이 發表된 以來 病原性微生物의 毒素에 대한 研究는 헤아릴 수 없을 정도로 많이 研究되었다.

1884年 Loeffler⁽¹⁾에 의하여 細菌이 有毒性 物質

한편 1960年 英國에서 眞菌類인 *Aspergillus fl.*

avus의 代謝生産物인 aflatoxin⁽²⁾이 강한 發癌性物質이라는 것이 알려진 이래 증진까지 非病原性이라고 取扱되어 온 여러가지 微生物의 毒性生成 與否에 관한 研究도 또한 많이 이루어 졌으며 특히 糸狀菌類에 의하여 生成되는 毒性物質은 약 200種에 달하게 되었다. 한편 非病原性 微生物에 의하여 生成된 微生物毒으로써 代表的인 것은 aflatoxin으로서 그 生化學的 性質^(3~4), 癌原性⁽⁵⁾ mycotoxicosis 關係⁽⁶⁾ 등에 대한 詳細한 研究가 遂行되었으며 근래에 와서 Townsend等⁽⁷⁾에 의하여 *Penicillium rubrum* 으로부터 rubratoxin A 및 B가 分離되었고 또 黃變米毒으로써 Sankawa 등에 의하여 leteoskyrin⁽⁸⁾ 및 islantitoxin⁽⁹⁾을 *Penicillium islandicum*에서 單離하였다.

본 研究는 放線菌類에서 微生物性 生理活性物質을 檢索하던 중 魚類에 대하여 강한 毒性을 나타내는 物質을 生成하는 菌 1株를 分離하여 이 菌株가 生成한 物質의 性質을 究明한 結果 魚類에 대하여 비교적 강한 毒作用을 나타냄을 알았다. 魚類의 棲息은 현재 農藥, 工場廢水 등 環境汚染에 의하여 많은 영향을 받고 있으며 그 原因으로서는 주로 化學的 有毒藥品에 의한 殺魚作用을 들고 있으며 점차 大規模化되어 가고 있는 微生物工業에서 由來되는 有毒性物質에 대하여서는 큰 關心을 나타내지 않고 있다.

일반적으로 殺魚性物質로서 化學的 有毒性藥品에 의한 毒性은 John⁽¹⁰⁾ David⁽¹¹⁾ 등에 의하여 많은 研究가 이루어졌으며 또 生物由來의 毒性物質로서는 植物界에서 大田⁽¹²⁾ 및 宗像⁽¹³⁾ 이 *Justica hayatai* var. *decumbens*에서 얻은 justicidin 및 河津^(14~15) 등이 *Callicarpa candicans*에서 分離한 Callicarpone 등이 있으며, 이들 物質은 이미 그 化學的 構造까지 解明^(12~16)되었다. 그러나 微生物界에서 生成되는 物質이 魚類에 미치는 毒作用에 관한 研究는 거의 알려진 바 없는 實情이다. 이와같은 觀點에서 본 研究는 *Streptomyces*屬에서 얻은 毒性物質이 魚類에 미치는 毒作用 및 그 生化學的인 性質을 究明했기에 報告하는 바 이다.

材料 및 方法

1. 菌源試料의 採取 및 菌의 分離

본 실험에 사용한 菌株는 大邱 近郊 및 八公山一帶의 土壤을 菌源으로 하여 分離하였으며 그 分離用培地(pH 7~7.5)는 다음과 같다,

glucose	1.0%	peptone	0.5%
beef extract	0.5%,	NaCl	0.5%

上記 組成의 基質을 水에 溶解하여 常法에 따라 殺菌 후(15Lb, 15분간) 三段稀釋 및 劃線法으로 分離한 약 200餘 株의 放線菌類를 대상으로 하였다.

2. 毒性 測定方法

菌의 生育環境中에 生性되는 毒性物質의 檢索方法은 魚類에 대한 殺魚作用의 強弱으로서 判定하였다.

즉 上記 分離用 培地에 각 菌株를 接種 후 30°C에서 5일간 靜置培養하였으며 그 培養濾液을 一定濃度로 稀釋하여 *Pseudorasbora parva* (T. et. S. 참붕어)를 棲息시켰을 때 그 生存時間을 測定하므로써 毒性의 程度를 나타내었다. 일반적으로 한시험구에 대하여 4~5마리의 *Pseudorasbora parva*를 20~50ml의 水에서 棲息시켰다.

3. 菌에 選別

上記 測定方法에 의하여 각 菌株의 毒性物質 生成能을 檢討한 결과 가장 강한 毒性物質을 生成하는 菌 1株 (At-268)를 얻었으며 菌의 形態學的 觀察, 營養源의 利用性 및 培地에서 生育狀態의 肉眼的 觀察 등으로 붙여 選別된 菌株는 *Streptomyces*屬으로 推定되었다.

4. 供試 魚類

毒性의 測定對象 魚類는 다음과 같으며, 주로 *Pseudorasbora parva* (Temminck et. Schlegel)⁽¹⁷⁾를 대상으로 하였다.

Pseudorasbora parva

Temminck et. Schlegel(참붕어)

Cyprinus carpio L. (잉어)

Zacco platypus T. et. S. (피라미)

Carassius auratus L. (붕어)

Carassius carassius K. (gold fish, 금붕어)

Parasilurus astos L. (메기)

Misgurnus mizolephus G. (미꾸라지)

이상의 魚類를 本校 校庭內의 못과 北慶 達城郡 洛東江 流域에서 採取하였다.

5. 毒性物質의 分類

毒性物質을 얻기 위하여 다음과 같은 培養液을 使用하여 選別된 菌株를 培養하였다.

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

즉 上記 培地(pH 7.2)를 常法에 따라 殺菌하여 菌을 培養 후 培養液으로부터 毒性物質을 分離

하는 과정은 Fig. 1 과 같다.

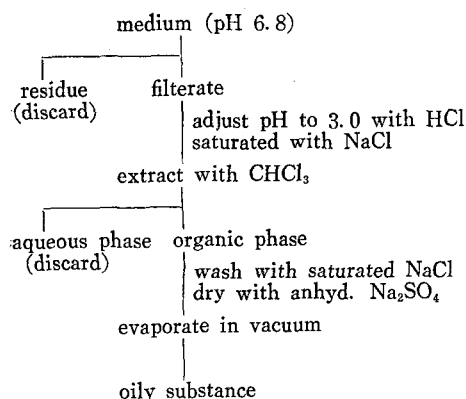


Fig. 1. Isolation of Active Substance from the Cultured Medium of *Streptomyces* sp.

즉培養濾液을 pH 3.0에서 NaCl로飽和시켜 毒性物質을 chloroform에 轉溶시킨 후 濃縮하여 毒性物質을 分離하였으며, 이 物質은 UV照射下에서 灰青色螢光性을 나타내는 物質이었다.

結果 및 考察

1. 毒性

본 物質의 活成度를 測定하기 위하여 6.25 μ g/ml에서 200 μ g/ml까지의 각 濃度에서 體重 0.3~0.6g, 體長 3.0~4.0cm의 *Pseudorasbora parva*의 生存時間을 보던 다음 Fig. 2.와 같다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 본 物質은 50 μ g/

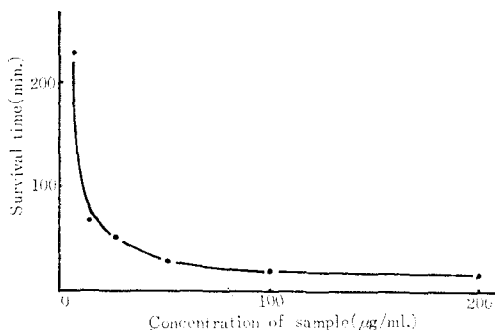


Fig. 2. Toxicity of the Substance Extracted from the *Streptomyces* sp. Culture on *Pseudorasbora parva*. Five *Pseudorasbora parva* (body weight; 0.3-0.6g, body length; 3.0-4.0 cm) in each group were inhibited by different concentrations of sample solution at room temperature.

ml 濃度에서 약 30分, 25 μ g/ml濃度에서 50分만에 *Pseudorasbora parva*를 致死케 하였으며 100 μ g/ml 이상의 濃度에서는 20分 이내에 致死시키는, 魚類에 대하여 상당히 강한 毒作用을 나타내는 物質임을 알 수 있었다. 본 物質의 농도별 質試驗區는 50 ml의 水물에 5 마리씩의 *Pseudorasbora parva*를 樓息시켰을 때 魚類의 生存時間을 測定하였으며 對照區에서는 48時間까지 正常的으로 樓息하였으므로 이하 試驗에서는 對照區의 生存時間을 省略하였다.

2. 魚種 및 魚體重에 따른 毒性的 比較

韓國産 淡水魚로서 代表的인 *Carassius carassius* L. 및 *Cyprinus carpio* L. 등 약 10餘種에 대하여 50 μ g/ml 濃度의 본 毒性物質溶液에서 各種 魚類를 樓息시켰을때 그 毒作用을 比較해 본 結果는 다음 Table 1과 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 어느 一定 體重이상에서는 魚類의 種에 관계없이 生存時間이 비슷하며 同一種類의 魚類에서는 *Pseudorasbora parva* (T. et. S.)나 *Zacco platypus* (T. et. S.) 등은 體重이 증가함에 따라 生存力이 더 強함이 認定되었으나 *Cyprinus carpio* L. 과 같은 魚類는 큰 差異가 없음을 알았다. 이 結果는 *Cyprinus carpio* L.의 경우 毒性物質의 作用 이외에도 좁아진 生育環境이 크게 그 生存時間을 短縮시켰으리라 推測된다. 또 본 物質의 毒性이 50 μ g/ml에서 體重 1g 정도까지의 魚類의 生存時間은 약 1시간 정도이며 그 이상에서는 약 5시간까지 生存할 수 있음을 알았으며 특히 *Cyprinus carpio*이 다른 魚類에 비하여 비교적 強하게 본 毒性物質에 대하여 耐性을 나타냄을 알 수 있었다.

3. 毒性物質의 pH에 대한 安定性

본 毒性物質을 500 μ g/ml 濃度에서 1/30M McIlvaine 완충액 pH 2.2에서 pH 8.0까지 각 단계의 溶液에 37°C에서 15시간까지 處理하면서 經時的으로 그 殘存毒성을 檢討하였다. 그 緩衝溶液處理한 후 본 物質의 最終濃度가 25 μ g/ml되게 稀釋하여 그 殘存活性을 *Pseudorasbora parva*에 대한 生存時間으로 測定하였으며, 對照區에도 동일한 濃度의 緩衝溶液을 添加해 본 결과 緩衝溶液 自體는 全然 魚類에 대하여 影響이 없음을 確認하였으며 그 결과는 Fig. 3과 같다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 본 毒性物質의 pH에 대한 安定性은 pH 4에서 가장 安定하였으며 pH 2 및 pH 6에서는 5시간 이후 서서히 物質

Table 1. Toxicity of the Substance Extracted from the *Streptomyces* sp. culture on the Fresh Water Fishes of Different Kinds. Five fishes of each species were exposed simultaneously into the water containing the toxic substance at 50 μ g per ml level at 20°C and their average survival time was recorded.

Fishes	Body weight (g)	Body length (cm)	Survival time (min.)
<i>Pseudorasbora parva</i> L.	0.2	2.5	26
	1.0	5.0	52
<i>Cyprinus carpio</i> L.	2.0	4.0	304
	132.0	15.0	419
<i>Carassius carassius</i> K.	20.0	8.5	320
tadpole	0.2	2.8	85
<i>Zacco platypus</i> (T. et. S.)	0.5	3.0	28
<i>Carassius carassius</i> L. (gold fish)	5.0	6.5	68
	4.0	4.5	272
<i>Misgurnus mizolephus</i> G.	22.5	15.0	960
<i>Parasilurus astos</i> L.	66.0	17.2	233

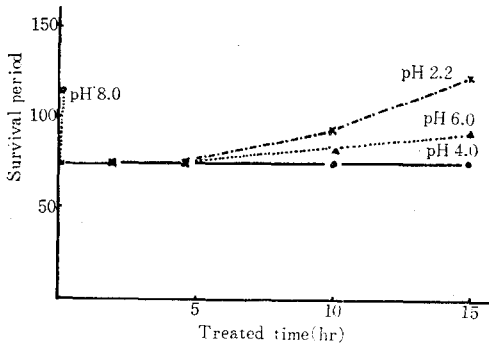


Fig. 3. Stability of the Sample in various pH. One mg of the substance extracted from the *Streptomyces* sp. Culture was dissolved in 2 ml of different pH 15hr., and then buffer solution, treated at 37°C from 0 to 15hr., and then diluted with 40 ml of pond water. *Pseudorasbora parva* fishes were exposed in the solution at room temperature, and their survival times were determined.

의 활성이失活됨을 알 수 있었다. 특히 pH 8.0의 弱 alkali성에서는 5분간 處理함으로써 *Pseudorasbora parva*의 生存時間이 현저히 길어짐을 볼 때 본 毒性物質은 alkali성에서는 극히 不安定한 物質임을 알았다.

4. 溫度에 대한 安定性

본 毒性物質의 溫度에 대한 安定性を 檢査하고자 25 μ g/ml의 溶液을 30°C에서 90°C까지 단계별로 5시간까지 處理하면서 經時的으로 殘存活性能을 常法에 따라 *Pseudorasbora parva*에 대한 生存時間을 測定하였던 바 그 결과는 Fig. 4와 같다.

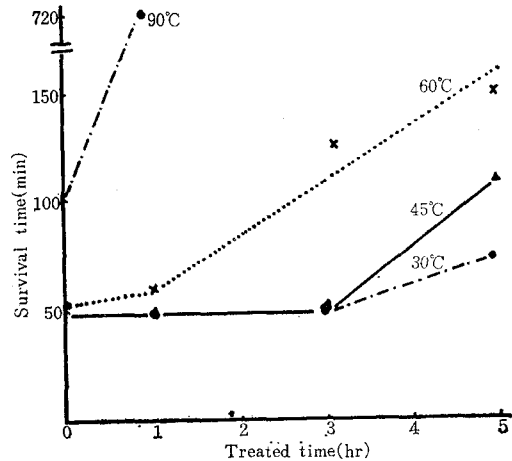


Fig. 4. Thermal Stability of the Substance. One mg of the extract was diluted in 10ml of water and treated at given temperature. After thermal treatment *Pseudorasbora parva* were exposed into the solution to determine their survival time.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 본 毒性物質은 溫度에 대하여 비교적 不安定한 物質임을 알았다.

즉 45°C에서 3시간 이후 서서히 失活되었으며 60°C에서는 1시간이후 특히 90°C에서는 1시간 處理하였을 때 活性的 대부분이 失活됨을 알 수 있었다. 이때 溫度處理에 의하여 溶液內의 酸素의 溶存量이 減少됨으로써 다소 영향을 미쳤으리라 생각된다.

5. 水溶液 狀態에서의 安定性

본 物質을 最高 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지의 각 濃度에서 水溶液狀態에서의 安定性を 檢討코져 30°C에서 약 70시간까지 處理하면서 經時的으로 그 殘存毒性을 測定하여 水溶液狀態에서 그 物質의 安定水을 檢討한 結果는 Fig. 5와 같다.

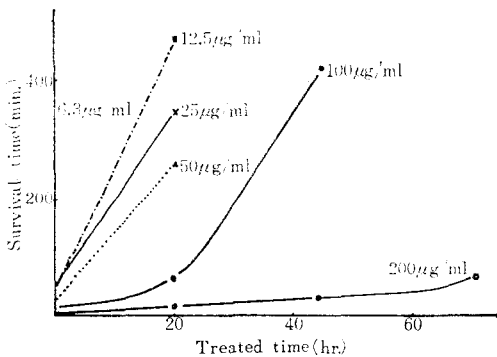


Fig. 5. Stability of the Extract in Aqueous Solution. The culture extract was treated at 30°C from 0 to 60 hr, and *Pseudorasbora parva* fishes were exposed to determine their survival time.

Fig. 5에서 보는바와 같이 본 物質의 濃度가 점차 높아질 수록 급히 失活되었고 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の 濃度에서는 처음부터, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度에서는 20시간 이후 시간에 비례하여 급히 失活되었다.

6. 有機溶媒에서의 安定性

본 物質의 精製過程中 物質의 失活性 與否를 檢討코져 MeOH, EtOH, CHCl_3 , acetone 등의 有機溶媒로서 毒性物質을 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 溶解시켜서 각 溶液을 30°C에서 5일간 放置하면서 經時的으로 그 殘存毒性을 測定하여 物質의 安定性を 檢討한 結果 Fig. 6에서 보는 바와 같이 본 物質은 chloroform이나 acetone 등에서는 약 5일까지 處理하였을 때 *Pseudorasbora parva*의 生存時間이 거의 변하지 않으므로 전연 物質이 失活되지 않음을 알

았으며 MeOH, EtOH 등에 의하여서는 시간에 비례하여 서서히 失活되었다. 그러나 역시 5일 정도 經過하였을 때 그 生存時間이 약 2배 정도만 延長됨을 볼 때 일반적으로 본 物質은 有機溶媒에서 상당히 安定함을 알 수 있었다.

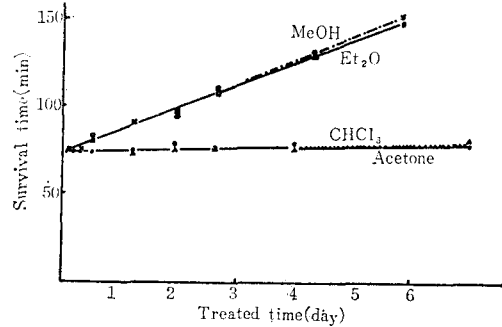


Fig. 6. Stability of the Extract in Organic Solvent. One mg of the extract was dissolved in 2 ml of different kinds of organic solvents. Being placed at 30°C for a given time, the organic solvent was removed completely in vacuum, then the remained sample dissolved in 40ml of pond water. *Pseudorasbora parva* fishes were exposed in this solution and their survival times were determined.

본 毒性의 測定은 有機溶媒에서 一定時間 處理 후 濃縮하여 완전히 溶媒를 除去한 후 最終濃度 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 稀釋한 水溶液에서 調査하였다.

7. 回生 能力

본 毒性物質의 作用에 있어서 그 毒作用의 樣狀을 究明코져 一定時間까지 본 毒性物質의 溶液에서 魚類를 棲息시킨 후에 다시 新鮮한 물에 넣어 주므로써 그 回生能力을 檢討하였다. 즉 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 본 毒性物質 水溶液에 *Pseudorasbora parva*를 30분간 棲息시키면서 10분 이후부터 5분 간격으로 다시 신선한 물에 옮겼을 때 Fig. 7에서 보는 바와 같이 약 20분 이상 본 毒性物質에 의하여 處理를 받은 경우는 거의 致死되었고 또 그 致死時間이 一定함을 알았으며 그 이하의 作用時間에서는 生存時間이 현저히 延長되었다. 따라서 본 物質은 일반적으로 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度에서 그대로 계속 棲息시켰을 때의 生存時間 약 40분과 거의 一致하였고 20분 이후의 狀態에서는 回生能力이 없음을 알았으며, 본 毒性物質이 *Pseudorasbora parva*에 作

用하는 경우 25 μ g/ml 溶液中에서 20분간 生存하였을 때가 回生の 最終限界임을 알게 되었다.

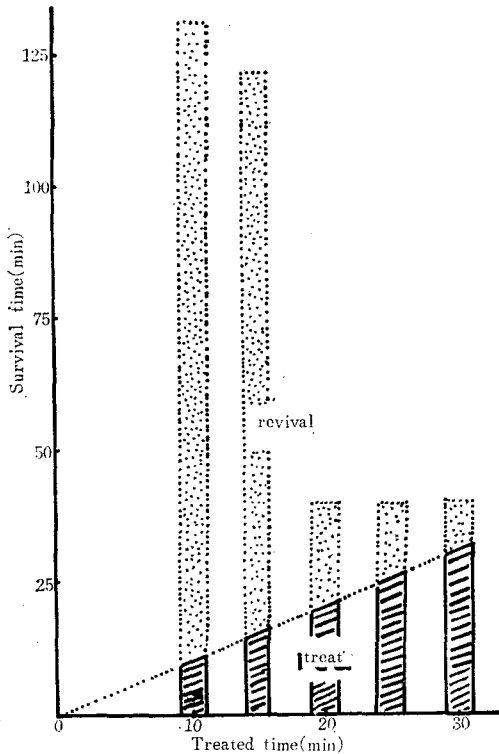


Fig. 7. Revival Ability of the Fish after Inhabited in the Sample Solution.

Pseudorasbora parva was inhabited in 40 ml of the aqueous sample solution for a given time, then the fishes were introduced in the fresh pond water to determine the revival ability.

要約

*Streptomyces*屬에서 分離한 物質의 生物學的 活性를 檢索하던 中 魚類에 對한 毒性物質을 強하게 生成하는 菌 1株를 選別하여 그 生化學的 性質을 檢討하였다.

1. 分離한 物質의 毒性은, 예로서 *Pseudorasbora parva* T. et. S. (體重 0.~0.5g, 體長 3.0~4.0cm)에 對한 殺魚力은 50 μ g/ml에서 30分, 25 μ g/ml에서 50分이었으며 *Carassius carassius* L. (體重 2.0g, 體長 5.0cm)은 50 μ g/ml 溶液中에서 70

分間 生存할 수 있었다.

2. 본 物質은 酸性 및 有機溶媒에서는 比較적 安定하여 pH 4.0에서 15시간까지 處理하였을 경우, 또 CHCl₃, acetone 溶液中에서 약 5일간까지 處理하였을 때에도 거의 毒性이 減少되지 않았다. alkali성 및 열에 대하여서는 不安定한 物質으로써 pH 8.0에서 5분간 處理하였을 때 物質이 상당히 失活되었으며 60°C以上の 온도에서는 比較적 急激히 失活되었다.

3. 25 μ g/ml 水溶液中에서 *Pseudorasbora parva*에 對하여 약 20분간 이상 處理로서는 回生이 不可能함을 알았다.

이상과 같은 性質을 가진 본 毒性物質은 選別된 菌株의 培養濾液을 pH 3.0으로 下降하여 NaCl로 飽和시킨 후 CHCl₃에 轉溶하여 濃縮하므로써 比較적 簡單한 方法으로 分離할 수 있었다.

參 考 文 獻

- (1) Davis, B. D.: Microbiology Harper & Row, 612 (1970).
- (2) 栗飯原景昭: 食品衛生の微生物(朝倉), 1(1970).
- (3) Wogan, G. N.: Bacterial Rev., 30, 460 (1966).
- (4) Wogan, G. N.: Cancer Res., 28, 2282(1968).
- (5) Kraybill, H. F. and Shimkin, M. B.: Advan. Cancer Res., 8, 191 (1964).
- (6) 新井正: 食衛誌, 7, 289 (1966).
- (7) Townsend, R. J., Moss, M. O. and Peck, H. M. J. Pharmacol., 18, 471 (1966).
- (8) Sankawa, U.: Tetranedron Letters, 5557(1968)
- (9) Maruno, S.: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan 23, 428 (1959).
- (10) John, S. B.: Water Res., 3, 793 (1969).
- (11) David, I. R.: Chem. Can., 21, 16(1969).
- (12) 大田啓: 講演要旨, 日本農化, 438 (1972).
集 學會
- (13) 宗像桂: ibid. " 59 (1966).
- (14) 河洋一儀: ibid. " 442 (1972),
- (15) 河洋一儀: ibid. " 166 (1974).
- (16) 大東: ibid. " 165 (1974).
- (17) 楊洪準; 韓國陸水學會誌, 6, 19 (1973).