

## 밀의 抗黑銹病 抗生物質의 研究〔Ⅱ〕

單離 精製 및 그 性狀에 關하여

鄭 永 基

(東洲女子專門大學)

## Studies on antibiotic against wheat black rust [ II ]

Isolation, Purification and some properties

JEONG, Young Kee

(Dong Ju Women's Junior College, Pusan, Korea)

### ABSTRACT

The substance produced by *Bacillus subtilis* 480HS<sub>20</sub> showed specific anti *Puccinia graminis* activity and narrow antimicrobial activity. The anti *Puccinia graminis* substance was found to be peptide antibiotic which had molecular weight of about 1,500 by sephadex LH-60 gel-filtration. The amino acid composition of the substance was composed of Ser (1), Glu (3), Ile (1), Gyr (2) and His (1).

The compound was yellowish powder and its melting point was 214~216°C. UV spectrum in methanol showed single peak at 278(E 1% 1cm 15.2) and important peak at 3,350~3,320, 2,940, 1,635, 1,520~155, 1,240~1,230cm<sup>-1</sup> were observed in IR Spectrum.

The substance was soluble in methanol but insoluble in water, ethyl acetate and chloroform.

The antibiotic 480HS<sub>20</sub> showed a little antimicrobial activity against *Pyricularia oryzae* but no antimicrobial activity was observed against Gram+ and Gram - bacteria and molds except *Pyricularia oryzae*.

### 緒 論

1958年 東京大學의 米原 等に 의해 처음으로 開發된 農用抗生物質 blasticidin S 以後로 抗生 作質의 農業에의 利用에 對한 研究가 활발히 進 行되고 있다. 밀의 黑銹病菌 *Puccinia graminis* pers에 有效한 物質의 Screening法과 生産菌의 性狀에 關해서는 第一報에서 報告했다.

*Bicillus subtilis* 480HS<sub>20</sub>에 의하여 生産되는 有效物質은 檢定菌 *P. graminis*에 對하여는 特 異하게 강한 活性을 보이면서 다른 세균이나 곰팡이에 對한 抗菌 Spectrum은 無效果 내지는 극히 弱한 活性을 보였다. 特히 本物質은 鹽基性 에는 약간 不安定하나 熱과 자외선에 安定한 物 質로 判斷되어 Antibiotic 480HS<sub>20</sub>이라 假稱하고 그 單離 精製를 行했다.

材料 및 方法

1. 培養條件의 檢討

一般的으로 抗生物質의 生産은 培養條件에 의하여 많은 影響을 받으므로 培養條件, 特히 生産培地의 組成과 培養溫度의 檢討는 매우 重要하다. 生産菌은 前報에서 細菌이라고 同定되었기 때문에 抗生物質 生産에 好適한 培地組成을 찾기 위하여 여러가지 組成에 對해서 檢討했다. 이때의 活性檢定은, Antibiotic 480HS<sub>20</sub>이 버의 도열병균인 *Pyricularia oryzae*에 對하여 人工培地上에서 活性을 보였기 때문에 이 菌을 檢定菌으로 하여 paper disc 法으로 檢定했다. 試驗한 各 培養組成을 Table 1 에 나타냈다.

Table 1. Components of each media used on production medium examination

media	V <sub>4</sub>	N	P	A	B	C	D	E	F
Soybean meal	1.5			2.0		2.0		3.0	2.0
Soluble strach	2.5			4.0				2.0	0.1
peptone	0.5		1.0		2.0		0.5		
glucose			1.5						
glycerin			1.0			4.0			0.1
meat ext.			1.0		1.0		0.5		
yeast ext.		0.2							0.3
*C.S.L.				1.0					
NaCl	0.5	0.5			0.3				0.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2								0.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>				0.05					0.1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O				0.05		0.05		0.2	
KCl				0.03					
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O						0.04			
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O						0.005			
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O						0.05			
CaCO <sub>3</sub>	0.4	4.0	0.01					0.1	0.3
pH	7.2~7.4	6.4	7.2	7.5	6	7.5	7.0	7.5	7.0

\* C.S.L: Corn Steep Liquor

Table 1에서 보인 各 培地들은 500ml의 三角 flask에 100ml씩 分注하여 各各에 2ml의 種菌을 植菌하고 27°C에서 6日間 振盪培養하면서 매일 培養液을 sampling하여 活性을 檢討했으며 그 結果는 Table 2와 같다.

Table 2. Antifungal activity during the cultivation in each media

media	V <sub>4</sub>	P	A	B	C	D	E	F
1	-	+	+	+	+	±	±	-
2	-	±	±	±	-	±	±	-
3	-	±	±	±	-	±	+	-
4	-	±	±	±	-	+	-	+
5	-	+	+	±	-	+	-	+
6	-	+	+	+	-	+	-	+

± : Diameter of inhibition zone is 25~30mm  
 ± : Diameter of inhibition zone is 20~24mm  
 + : Diameter of inhibition zone is 15~19mm  
 ± : Diameter of inhibition zone is under 14mm  
 - : No activity

여기에서 培地A는 3日째에 強한 活性을 보였으나 더 빠른 時間에 活性物質을 生産하는 C培地를 生産培地로 선택했다. 또, 같은 培地로서 培養溫도와 活性物質生産量을 檢討하기 위하여 27°C와 38°C에서 各各 6日間 培養하면서 매일 活性과 生産菌의 生育狀態, pH의 變化를 觀察했다. 그 結果는 Fig. 1에서 보는 바와 같다.

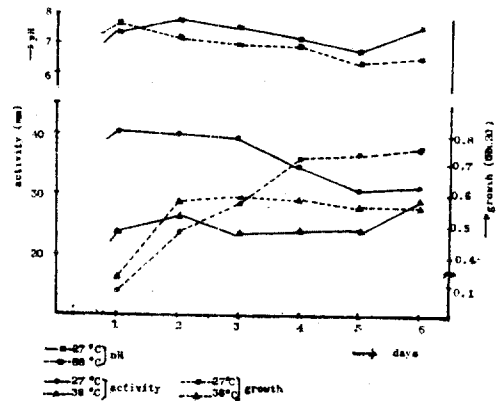


Fig. 1. Time course of Strain No. 480HS<sub>20</sub>

培養液의 活性은 27°C와 38°C의 比較에서 27°C의 경우는 1日째부터 매우 높은 Peak를 보이는 反面, 38°C에서는 菌의 生育狀態는 양호했으며 2日째부터 活性의 Peak를 보이긴 하나 27°C의 活性에 비해 매우 弱했다.

2. Jar-fermenter에 의한 大量培養

Jar-fermenter 培養은 三角 flask의 培養과 規模가 다르기 때문에 培養 21時間째부터 5時間의 間隔으로 活性의 經時變化를 檢討했다. 이때 培地는 生産培地(C培地)를 使用하고 溫度는

27°C로 했다. Jar-fermenter에서 時間經過에 따른 活性의 變化는 Fig. 2에서 보인다.

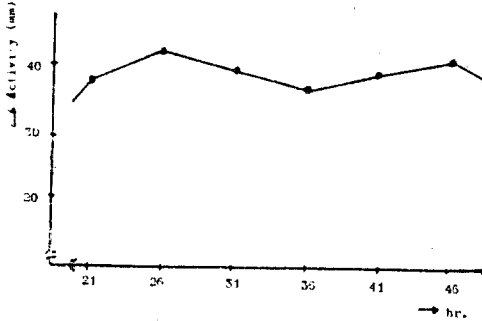


Fig. 2. Time Course in Jar-fermenter Culture

Jar-fermenter 培養에서는 26時間제에 活性의 最高에 達했으며 36時間제에는 弱한 活性을 보였으나 그後 43時間제부터 다시 強한 活性을 보였다. 그러나 다른 時間에 強한 活性을 보인 26時間제를 broth out의 適當한 時點으로 採했다. Jar-fermenter의 條件은 15l/min의 通氣로 攪拌은 300rpm으로 했다.

3. 單離過程의 活性部分判定

本物質은 *P. graminis* 外에 人工培地の *P. oryzae*에도 效果가 있음이 확인되었으므로 單離過程에서의 活性區分은 日本玉川大學에서 分離한 道稈병균 *P. oryzae* K<sub>2</sub>를 使用하여 判定하였다. *P. oryzae* K<sub>2</sub>의 培地組成은 yeast extract 0.2%, starch 1%, agar 1%, pH. 5.8로 하였으며 27°C에서 배양하였다.

結果 및 考察

1. antibiotic 480HS<sub>20</sub>의 單離와 精製

이 抗生物質의 活性은 培養液 中에 있는 것이 判明되었기 때문에 單離는 Fig. 3과 같은 過程에 따라 이루어졌다. 즉, 培養液을 遠心分離에 의하여 菌體를 濾別한 濾液에서 n-butanol로 活性物質을 抽出했다. n-butanol을 溜去한 後, pH 9로 調等하여 HP-20에 吸着시키고, pH 2의 methanol로써 溶出한다. 活性部分을 濃縮시켜 Sephadex Lit-60(溶媒: methanol)의 Column에 通過시키면 活性區分으로서, Antibioti 480HS<sub>20</sub>의 黑褐色의 粗分末을 얻는다. 이 粗分末을 最終精製物 1g를 1Unit로 했을때 1mg當 113Unit의 力價를 나타내었다.

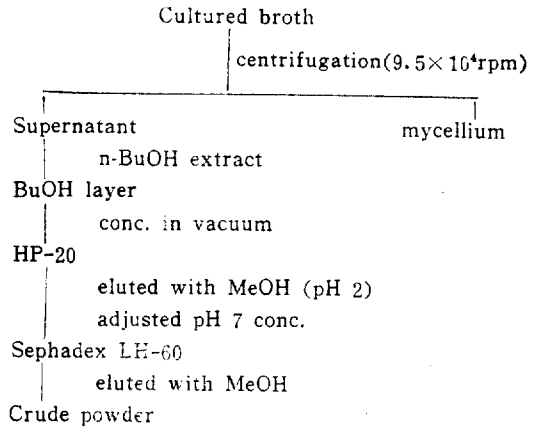


Fig. 3. Isolation of Antibiotic 480-HS<sub>20</sub> from Culture Broth

다음에 이 粗分末을 CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 1 : 3의 溶媒로서 silica gel column chromatography를 行하여 그 活性區分을(Fig. 4 참조) silica gel TLC(CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 1 : 3과 MeOH)로써 展開分

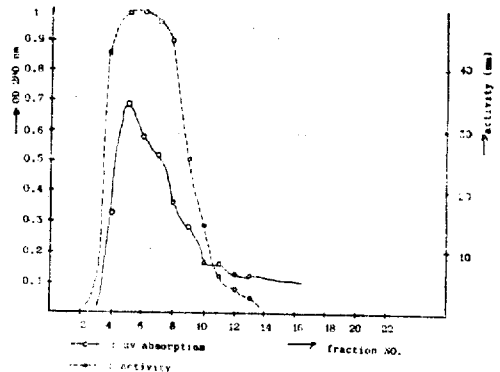


Fig. 4. Elution Pattern of active principle from silica gel column

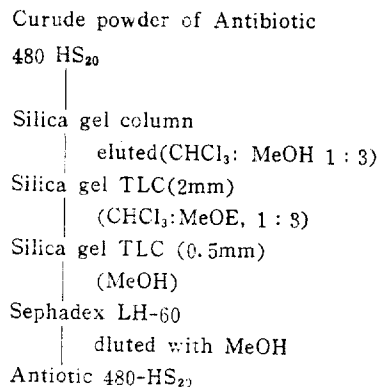


Fig. 5. Purification of Antibiotic 480-HS<sub>20</sub>

離하여 sephadex LH-60 column chromatography를行하면 antibiotic 480HS<sub>20</sub>의 연노란 粉末을 얻을 수 있다. 精製過程은 Fig. 5에서 보인다.

## 2. Antibiotic 480HS<sub>20</sub>의 性狀

### 1) 物理 化學的 性質

精製過程에서 얻은 yellowish powder의 antibiotic 480HS<sub>20</sub>은 M.P.가 214~216°C로 分子量은 約 1,500으로 推定되었다.

#### 分子量의 推定

Antibiotic 480HS<sub>20</sub>의 分子量을 알기 위하여 精製物質을 high mass에 걸어 보았으나 600 以上에서는 peak가 나타나지 않은 것으로 일단 高分子物質임을 斷定할 수 있었다. 本物質을 acetylation하여 다시 試圖해 보았으나 같은 結果였다. 그래서 分子量을 推定하는 方法으로 vitamin B<sub>12</sub>와 함께 gel여과하여 分子量을 比較하였다. 즉, 分子量 1,355인 vitamin B<sub>12</sub>와 antibiotic 480HS<sub>20</sub>을 혼합하여 sephadex LH-60으로 gel여과(column volume : 1.3×40.7cm, 溶媒: MeOH)시킨 結果 vitamin B<sub>12</sub>와 antibiotic 480HS<sub>20</sub>의 活性區分이 거의 같이 溶出됐다(Fig. 6 참조). 그런데 本物質의 amino acid 組成으로 算出된 分子量이 1,423이라는 點으로 이 物質은 約 1,500 前後의 分子量을 가짐을 推定할 수 있었다.

#### TLC(silica gel)

Antibiotic 480HS<sub>20</sub>은 silica gel TLC의 CHCl<sub>3</sub>: MeOH, 1:3의 展開溶媒에서 Rf值 0.21, MeOH

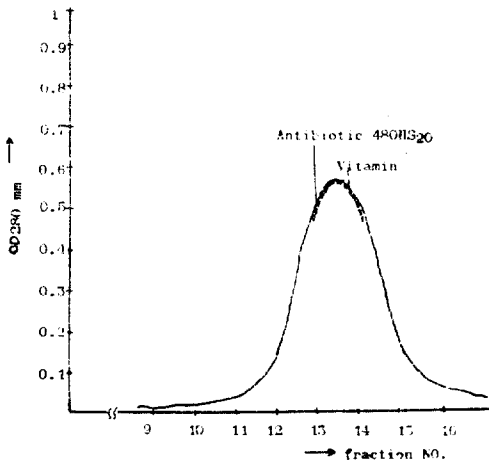


Fig. 6. Sephadex LH-60 gel filtrate chromatogram of antibiotic 480HS<sub>20</sub> and vitamin B<sub>12</sub>

에서의 Rf值 0.42에서 各各 單一 spot를 나타냈다.

#### 溶解性

本物質의 溶解性을 檢定한 結果 Table 3에서 보이는 바와 같이 methanol 以外의 有機溶媒에는 難溶性을 보였다. 즉, methanol, ethanol, n-butanol, chloroform, acetone, ethyl acetate, 증류수 各 1ml에 sample 600g씩 녹여 그 活性을 試驗한 結果 methanol만은 完全溶解하고, ethanol, acetone은 약간 녹으나 n-butanol과 水等에 전혀 녹지 않았다.

Table 3. Solution of Antibiotic 480HS<sub>20</sub>

Solvent	Activity*(mm)	units/(ml)
Methanol	25	600
Ethanol	20	250
n-Butanol	11	43
Acetone	21	300
Chloroform	0	0
Ethyl acetate	0	0
Water	0	0

\* Diameter of anti-*P. oryzae* zone on synthetic medium

#### Amino acid analysis

Antibiotic 480HS<sub>20</sub>은 精製過程에서 ninhydrin에 의한 color reaction이 positive라는 것으로부터 遊離 amino基를 가진 物質로 推定하고 amino acid分析을 했다. 最終精製物을 適當量 取하여 6N-HCl을 加하여 120°C에서 24時間 酸加水分解했다. paper chromatography(n-butanol: ethylacetate: 水, 2:1:1)에서 amino acid의 種類를 확인한 後 amine acid 分析機로 分析한 結果, Ser(1), Glu(3), Pro(1), Ile(1), Tyr(2), His(1)이 分析되었다.

#### UV, IR 吸收 spectra

Antibiotic 480HS<sub>20</sub>의 UV 吸收 spectrum은  $\lambda_{max}^{MeOH}$  278nm( $E_{1\%}^{1cm}$  = 15.2)에 單一 吸收대로 나타났다(Fig. 7 참조).

IR의 吸收 spectrum은 peptide型의 吸收를 보이며 그 主要 peak는 3,350~3,320, 2,940, 1,635, 1,520~1,500, 1,240~1,230cm<sup>-1</sup>로 나타났다(Fig. 8 참조).

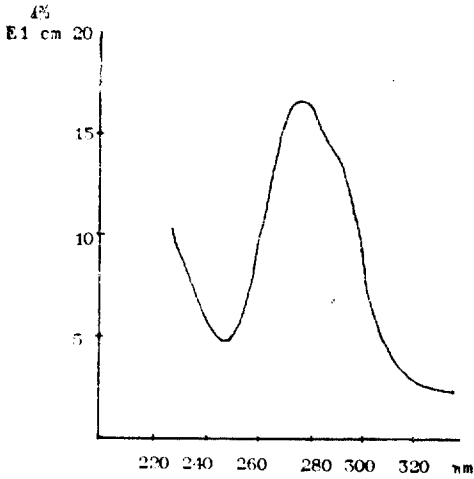


Fig. 7. UV spectrum of Antibiotic 480HS<sub>20</sub>

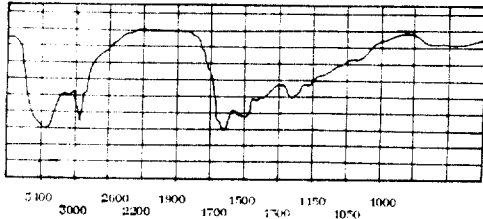


Fig. 8. IR Spectrum of Antibiotic 480HS<sub>20</sub>

Table 4. Physicochemical properties of Antibiotic 480HS<sub>20</sub>

Nature	yellowish powder
MP(°C)	214~216
MW	about 1,500
Anal. found	C 56.90%
	H 7.80%
	O 25.87%
	N 9.43%
Color reaction	ninhydrin
TLC(silica gel)	Rf 0.21(CHCl <sub>3</sub> :MeOH, 1:3)
	Rf 0.42(MeOH)
Solubility	soluble in MeOH
	slightly soluble in EtOH and acetone
	insoluble in water and other solvent
Amino acid analysis	Ser(1) Glu(3), Pro(1), Ile(1), Tyr(2), His(1)
UV nm(E <sub>1%</sub> <sup>1cm</sup> )	278(15.2)
IR(KBr)cm <sup>-1</sup>	3350~3320, 2940, 1635, 1520~1500 1240~1230

以上の Antibiotic 480HS<sub>20</sub>의 物理, 化學的 性狀을 Table 4에 총괄하여 요약했다.

2) 生物學的 性狀

antibiotic 480HS<sub>20</sub>의 抗菌 spectrum은 Table 5에 보이는 바와 같이 一般糸狀菌 *P. oryzae*에 弱한 活性을 보이는 以外에 gram 陽性, gram 陰性菌에 對하여는 活性을 보이지 않았다.

Table 5. Antimicrobial spectrum of Antibiotic 480HS<sub>20</sub>

test organisms	concentration	
	100r/ml	200r/ml
<i>Serratia marcescens</i>	—	—
<i>Escherichia coli</i>	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—
<i>Bacillus subtilis</i>	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—
<i>Sarcina lutea</i>	—	—
<i>Mycobacterium 607</i>	—	—
<i>Mucor ramanianus</i>	—	—
<i>Penicillium chrysogenum</i>	—	—
<i>Pyricularia oryzae</i>	15.5	18.5

本物質은 抗菌 spectrum이 매우 좁은 反面에 밀의 黑銹病菌 *P. graminis*에 對하여는 100g/ml에서 完全히 效果가 있었다. Antibiotic 480HS<sub>20</sub>의 標準檢量線 즉 *P. oryzae*를 檢定菌으로 하여 plate에서 阻止圓의 直徑과 그 力價와 의 關係는 100units/ml의 濃度에서 *P. oryzae*에 15.5mm의 阻止圓을 만들었다. 標準檢量線은 Fig. 9에 나타냈다.

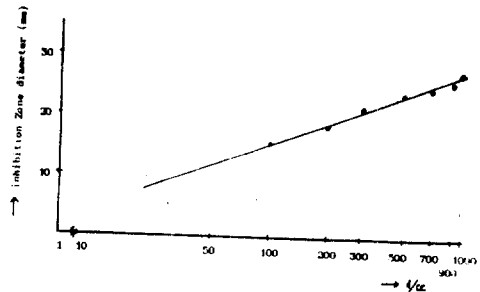


Fig. Standard curve of antifungal activity of the antibiotic 480HS<sub>20</sub> against *P. oryzae*

## 摘 要

밀의 黑銹病菌 *P. graminis pers*에 有效한 物質을 얻은 것을 目的으로 本 screening을 실시한 結果 *P. graminis*에 特異하게 活性을 가지는 antibiotic 480HS<sub>20</sub>을 얻었다. 이 物質은 下記의 몇 가지 特徵을 가진다.

- 1) 分子量 約 1500의 peptide 抗生物質이다.
  - 2) 抗菌 spectrum이 매우 좁고 밀의 黑銹病에는 100g/ml에서 特異한 活性을 보인다.
  - 3) IR spectrum에서 보면 leucinamycin과 비슷하지만 UV吸收 및 amino acid의 組成이 틀리고 抗菌 spectrum도 相異하므로 antibiotic 480HS<sub>20</sub>은 leucinamycin과 확실히 다른 物質로 判明되었다.
- 以上の 結果로 Antibiotic 480HS<sub>20</sub>은 從來의 報告된 抗生物質과 다른 新抗生物質일 可能性이 있다고 본다.

## 引用文獻

- 1) Junichi Shoji, Ryuzi Sakazaki, Kenzoloizumi and Mikao Mayama. 1975. Studies on antibiotics from the genus *Bacillus*. Isolation of a new peptide antibiotic Complex 61~62 *J.A.* 28 No. 2 129~131
- 2) Junichi, Shoji, Hiroshi Hinov, Yoshihara wakisaka Kenzo Koizumi and Mikao Mayama. 1975. Study on Antibiotics form the genus *Bacillus*. Isolation of a new peptide antibiotic TC-119 *J.A.* 28 No. 2 126~128
- 3) J.R. Evans and Eunice J Napier. 1978. G 1499~2, A new quinoline compound isolated from the fermentation broth of *Cytophaga Johnson* II. *J.A.* 31 No. 10 952~958
- 4) Katsuo Takeda, Satoshi Okuno, Yoshitami Ohashi and Tamotsu Furnmai 1978. Conversion of neamine analogs into butiorosin analogs by mutants of *Bacillus circulans*, *J.A.* 31 No. 10 1023~1030
- 5) Mikito Ito and Yasuo Kayama. 1972. Jolipeptin, A new peptide antibiotic. I. Isolation, physicochemical and biological characteristics. *J.A.* 25 No. 304~308
- 6) 中村昭四郎, 田中信男, 抗生物質大要 15~22
- 7) Nobora yoshida, Shunii Hayashi, Yishiki Tami and Koichi Ogata. 1974. M-81, A new peptide antibiotic produced by *Streptomyces griceus* Sub sp. *Psychrophilus* at moderate temperature. *J.A.* 27 No. 2 128~132
- 8) 大岳望, 鈴木昭憲, 高橋信孝, 室伏旭米原弘, 物質의 單離と精製 (天然物活性物質을 さわ中心として) 57~119
- 9) Ruiko Ōiwa, Michiko katagiri, Naohisa Tanaka, Rokuro Masuma and Satoshi Omura. 1975. A new peptide antibiotic KM-8. *J.A.* 28 No. 10 819~820
- 10) Ryo Okachi, Seigo Takasawa, Tomoyasu Sato, Isao kawamoto and Takashi Nara. 1977. Fortiminins A and B, New Aminoglycoside antibiotics II. Isolation, physico-chemical and chromatographic properties. *J.A.* 30 No.7 541~551
- 11) Satoshi Yaginuma, Naoki Muto, Masaru Otani. 1979. A-10947, A new peptide antibiotic from *Actinoplanes*. *J.A.* 32 No. 9 967~969
- 12) Takaki Nishikiori, Rokurow Masuma, Yuzuru Iwai and Satoshi Omura. 1978. Aurantinin, A new antibiotic of bacterial origin. *J.A.* 31 No. 6 525~532
- 13) Takashi Nara, Nitsuyoshi Yamamoto, Isakawamoto, Tomoyaru Sato, and Seiji Sato. 1977. Fortimicins A and S, New Aminoglycoside antibiotics I. producing organism fermentation and biological preperetes of fortimicins. *J. Antibiotics* 30 No. 533~540
- 14) William L. parker, Marlene L. Rathnum, Loretta D. Dean, Edward E. Brown. 1977. Polymixin F, Anew peptide antibiotic. *J. Antibiotics* 30 No. 9 767~769
- 15) Yoshiyuki Takahara, Yoko Takeuchi, and Wawao Murao. 1979. Isolation of a new peptide antibiotic, permetin A, from *Bacillus Circulans* *J. Antibiotics* 32 No. 2 115~120