

Streptomyces sp.가 生産하는 抗真菌性 抗生物質에 관한 연구

(제 1 보) 생산균주의 선별과 抗真菌性 抗生物質의 分離精製

裴 武 · 高永熹

한국과학기술원, 응용미생물연구실

(1982년 1월 20일 수리)

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

(Part 1) Selection of the Antibiotics Producing
Organism and Isolation of the Antibiotics

Moo Bae, Yung Hee Kho

Applied Microbiology Laboratory,

Korea Advanced Institute of Science and Technology,

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

(Received January 20, 1982)

Abstract

The work has been carried out for the development of antifungal antibiotics possessing curative effect in the control of sheath blight disease of rice plant. Soil samples were collected from over 1600 spots throughout the country. More than 1300 specimens which seem to be the genus *Streptomyces* were isolated from the soil samples. Screening procedures consist of respective processes by four steps. Those are growth inhibition test in liquid culture, paper disk method, dendroid test and green house test. 102 isolates appeared to be active against *Pellicularia sasakii* when all specimens isolated were examined by the first growth inhibition test.

Finally a strain of *Streptomyces* forming strong antifungal substances against *P. sasakii* was selected from a soil sample of Mt. Soyo, Kyeongi Province. Antifungal substances formed by the strain were isolated and purified from the culture broth and examined for antimicrobial activities as to be specific against fungi but not active on bacterial growth.

서 론

벼의 도열병, 흰빛잎마름병과 함께 3대 병해인 문고병을 방제하기 위한 많은 약제들이 현재 개발되어 있으나 실용화되고 있는 것은 유기비소제로서 네오아소진이 있고 수염항생제로는

Polyoxine과 Validamycin이 있다.⁽¹⁾

유기비소제인 네오아소진은 As_2O_3 가 토양중에 잔류하여 환경오염을 일으키기 때문에 사용에 제한을 할 필요가 있다. Polyoxine은 *Streptomyces cacaoi* var. *asoensis*가 생산하는 purine계 구조를 가지는 抗生物質로서 1965년 Su-

zuki 등⁽²⁾에 의하여 A 및 B가 분리되었고 그 후 A~M까지 13개의 유사성분이 분리되었다.⁽³⁻⁷⁾ Polyoxine은 곰팡이 세포벽의 특유성분인 chitin의 생합성을 저지하는 것이므로 사람, 가축, 어류등에는 毒性이 낮고 작물에 대하여도 藥害가 적다. Validamycin은 *Streptomyces hygroscopicus* var. *limonensis*의 대사산물로 aminoglycoside계 항생물질이며 A~F형 중 A형이 가장 활성이 강하다. 동물에 대한 독성이 매우 약하고 in vitro 보다 실제 농장에서 더 강한 효과를 나타내는 특성이 있다.⁽⁸⁻¹⁰⁾

벼 문고병의 병원균은 *pellicularia sasakii*로 사상균이고 강한 포자에 의하여 재발하기 쉬운 병중의 하나로서 다수확 품종인 통일벼 계통의 재배 후반기에 많이 발생한다. 본 연구에서는 벼 문고병 방제를 위한 새 항진균성 항생물질을 개발하기 위하여 토양에서 유용한 균주를 분리 선정 하였고 이 균주의 배양물에서 강한 항진균성 물질을 정제하였는바 그 결과를 발표한다.

실험재료 및 방법

시험균

문고병균은 농업기술연구소 소장의 *Pellicularia sasakii* 를 사용하였고 抗菌活性을 조사하기 위한 시험균은 한국과학기술원 응용미생물연구실에 보존중인 각종 균을 사용하였다.

균주의 분리

Bacto Actinomycetes Isolation-agar (AIA), Czapeck 배지를 사용하여 토양에서 상법에 따라 분리하였으며 Bennet-agar slant에 보존하였다.

균주의 선정

액침배양법 : 시험관(28×200mm)에 Table 1의 발효배지 5ml를 넣고 Bennet-agar slant에 보존 중인 분리균을 접종, 28°C에서 200stroke/min로 5일간 진탕배양 하였다. 3,000×g, 10분간 원심분리한 배양액 0.5ml을 potato-dextrose broth 4.5ml에 혼합하여 멸균하고, 여기에 별도로 25°C에서 3일간 potato-dextrose

Table 1. Medium Composition Used for the Culture of Isolates

| | |
|---------------------------------|--------|
| Glucose | 10 (g) |
| Glycerin | 5 |
| Defatted soybean meal | 10 |
| NaCl | 5 |
| CaCO ₃ | 5 |
| NH ₄ NO ₃ | 5 |
| Yeast extract | 5 |
| Distilled water | 1ℓ |
| pH 7.6 | |

agar에서 성장시킨 문고병균을 1白金耳중점한 후 25°C에서 3일간 진탕배양하여 문고병균의 성장을 억제하는 균주를 1차 선정하였다.

Paper disk 법 : 원심분리한 배양액을 paper disk에 흡착시킨 후 Iwasa 등⁽¹¹⁾의 방법에 따라 미리 준비된 시험균을 산포해 둔 bioassay용 plate에 일정 수 놓고 25°C에서 24시간 배양한다음 나타나는 생육저지환의 크기를 측정하였다.

Dendroid test 법⁽¹²⁾ : 적당한 농도로 희석한 분리균주의 배양액 1ml을 함유한 Water-agar 20ml를 petri dish 상에 부어 굳히고 별도로 potato dextrose agar를 φ6mm cork borer로 agar piece를 만들어서 평판 중앙에 놓은 후 문고병균을 접종시키고 25°C에서 48시간 성장시킨 다음 발육억제된 정도와 비정상 생육 (*abnormal branching*)한 것을 2차 선정하였다(Fig. 1).

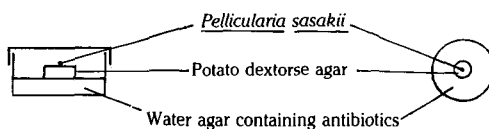


Fig. 1. Dendroid Test Method

Green house test⁽¹⁰⁾ : 실험실적으로 선발된 균주에 대한 최종선정 단계로서 직접 벼를 育苗하여 약제의 효능시험을 하였다.

벼를 육성하기 위하여 polyethylene pot (10×10cm)에다 부식토를 넣고 基肥로서 토양 10kg 당 유안 10g, 과린산석회 12g, 염화칼륨 4g을 넣었다.

育苗은 농업기술연구소에서 분양받은 밀양23호를 pot 당 10粒씩 파종하고 4~5葉이 나왔을 때 시험적기로 하였다. Tween 80, 0.1%를 함유한 분리균의 배양액 20ml를 pot의 30cm거리에서 spray한 후 약액이 마른 다음 별도로 성장시킨 문고병균의 agar piece를 第1葉鞘 부근에 부착시키고 25~32°C, 상대습도 70~100%의 vinyl house에 두어서 4~5일 후 문고병 발생상태를 관찰, 병반의 길이를 약제 처리하지 않은 대조구와 비교하여 이병되지 않은 것을 최종 선정 하였다.

선정된 균주의 배양

抗真菌性 活性을 갖는 물질을 추출정제하기 위하여 Table 1과 같은 조성의 배지 15ml를 250ml삼각 플라스크에 넣고 선정된 균주를 1백금이 접종하여 28°C에서 200rpm으로 30시간 배양하여 접종용으로 하였다. 같은 조성의 배지 150ml를 500ml진탕 플라스크에 취하고 전 배양한 균액 3ml를 접종하고 28°C에서 200rpm으로 4일간 진탕배양 하였다.

실험결과 및 고찰

抗真菌性 抗生物質 生成菌株의 선발

우리나라 전국 각지역의 山野, 河川, 늪지대 등에서 중고등학교 교사들의 협조를 얻어 임의로 총 1620점의 토양시료를 채취하였다. 토양시료 1g을 멸균식리식염수에 희석하고 AIA 배지 Isolated *Streptomyces* sp. (1359 strains)

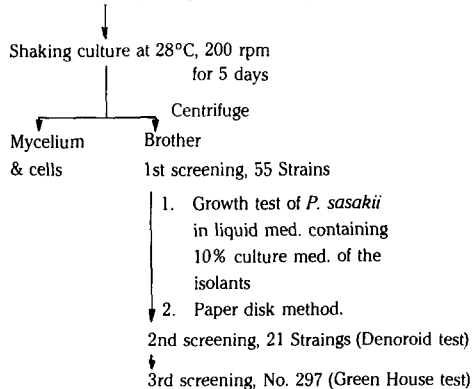


Fig. 2. Screening Procedure for the Selection of Isolants.

와 Czapeck 배지를 이용하여 상법에 따라 배양하여 육안으로 보아 외부형태가 다른 방선균주 1359주를 분리하였다. 분리균주의 3차에 걸친 선정과정은 Fig. 2과 같다. 즉, 분리균주를 발효배지 5ml에 접종, 5일간 진탕배양한 후 원심분리한 액을 시료로 하여 액침배양법에 의하여 紋枯病菌의 성장을 보이지 않고; paper disk method에 의하여 생육 阻止環을 나타내는 균주 55주를 1차 선별하였고 Dendroid test에 의하여 균사의 생육에 저해를 보이는 21주를 2차 선별하였으며 green house test에 의하여 紋枯病에 대한 치료효과를 나타내는 No. 297을 최종 선정하였다. 2차 선별에 의하여 취득된 21주의 배양액을 紋枯病菌에 대하여 抗菌力시험을 하였을 때의 결과는 Table 2와 같다. 여기서 비교적 강한 抗菌力을 나타내는 11주를 선별하여 green house test를

Table 2. Growth Inhibition of Isolates Against *Pellicularia sasakii*

| Strain No. | Paper disk method* | Dendroid test (1/100 dilution)** |
|------------|--------------------|----------------------------------|
| 114 | 0.98 | 5.37 |
| 144 | 1.13 | 4.42 |
| 154 | 1.16 | 4.67 |
| 165 | 0.86 | 4.42 |
| 242 | 1.96 | 5.52 |
| 273 | 1.25 | 4.60 |
| 282 | 0.85 | 4.15 |
| 297 | 1.90 | 3.16 |
| 335 | 0.92 | 3.14 |
| 419 | 1.20 | 3.76 |
| 423 | 0.86 | 3.80 |
| 442 | 0.92 | 3.85 |
| 478 | 1.35 | 3.56 |
| 563 | 0.98 | 3.76 |
| 714 | 0.70 | 3.70 |
| 725 | 1.28 | 3.23 |
| 759 | 1.32 | 3.52 |
| 806 | 1.25 | 4.70 |
| 887 | 2.03 | 2.72 |
| 1121 | 0.96 | 4.15 |
| 1271 | 0.82 | 5.40 |

* Clear zone size (cm)

** Diameter of propagated hyphae (cm)

하였을 때의 결과는 Table 3과 같은데 숙주 (host) 식물인 벼에 대하여는 生理毒性이 없고 紋枯病에 대한 치료효과를 나타내는 No. 242와 No. 297 중에서 抗菌活性이 강한 No. 297 균주를 최종 선정하였다.

Table 3. Effect of Culture broth of Isolates Against Sheath Blight of Rice Plants in Green House Test

| Strain No. | Expanding Rate (%) | | | | Phytotoxicity |
|------------|--------------------|-----|-----|---------|---------------|
| | 4 | 6 | 8 | 14 days | |
| 144 | 100 | 100 | — | — | — |
| 154 | 100 | 100 | — | — | — |
| 242 | 0 | 0 | 10 | 10 | — |
| 273 | 80 | 100 | — | — | + |
| 297 | 0 | 0 | 0 | 10 | — |
| 419 | 65 | 100 | — | — | ± |
| 478 | 0 | 20 | 40 | 100 | ++ |
| 725 | 90 | 100 | — | — | — |
| 759 | 60 | 100 | — | — | — |
| 806 | 0 | 80 | 100 | — | + |
| 887 | 25 | 30 | 50 | 50 | — |

$$\text{Expanding Rate (\%)} = \frac{\text{Average length of lesion per stem treated}}{\text{Average length of lesion per stem untreated}} \times 100$$

선정된 No. 297 균주가 生成한 물질의 抗菌 Spectrum

선정된 균주 No. 297를 발효배지에 접종, 진탕배양한 후 원심분리한 배양액을 각종 미생물을 시험균으로 하여 抗菌活性을 본 결과는 Table 4와 같다. 즉, 대표적인 곰팡이 11종과 2종의 효모에 대하여 매우 강한 抗菌活性이 있으나 抗細菌性이 없는 抗真菌性 抗生物質이 생성되는 것이 본 균주의 특징이었다. 본 균주는 다음 3보에서 보고될 것이나 *Streptomyces* 속에 속하는 균주로 밝혀졌다.

抗真菌性 抗生物質의 분리 및 정제

배양이 끝난 발효액을 원심분리하여 얻은 上澄液을 pH 및 온도에 따른 安定性을 시험하였으며 각종 유기용매를 사용하여 抗生物質의 이

Table 4. Antimicrobial Activity of the Culture Broth from Isolates N. 297

| Organism | Inhibition zone (mm)* |
|---------------------------------|-----------------------|
| Fungi | |
| <i>Pellicularis sasakii</i> | 19.0 |
| <i>Pyricularia oryzae</i> | 16.5 |
| <i>Cochliolus myabeanus</i> | 16.5 |
| <i>Rhynchosporium oryzae</i> | 15.5 |
| <i>Fusarium moniforme</i> | 12.6 |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | 19.2 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | 9.2 |
| <i>Aspergillus flavus</i> | 8.3 |
| <i>Trichoderma viride</i> | 16.4 |
| <i>Penicillium notatum</i> | 14.7 |
| Yeast | |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 20.8 |
| <i>Candida albicans</i> | 16.9 |
| Bacteria | |
| <i>Bacillus cereus</i> | 0 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 0 |
| <i>Eschericia coli</i> | 8.3 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 2.2 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 2.3 |
| <i>Sarcina lutea</i> | 0 |
| <i>Xanthomonas oryzae</i> | 5.6 |

* By cup method.

동성을 조사함으로써 추출방법을 확립하였다⁽¹²⁾. 極性용매의 경우는 침전물에서 抗菌力を 측정하였으며 非極性용매의 경우는 용매층과 물층에서의 抗生物質 移行性和 移動性率을 조사하였다. 추출정제 과정중에 抗生物質의 移動은 物質의 특성에 따라 bioassay 방법과 화학적 정량방법을 병행하여 추적하였으며 Fig. 3와 같은 용매 추출과정을 거쳐 紋枯病菌에 대한 抗菌活性을 가진 두가지 물질을 얻었는데 편의상 처음 얻어진 연한 황색분말을 KM-A라 하고 백색침상결정으로 얻어진 것은 KM-B라 하였다. 즉, 원심분리된 배양액에 1/4량의 n-BuOH로서 2회 추출한 것을 농축하여 syrup 상태로 되면 소량의 MeOH에 녹이고 여기에 MeOH량의 9배가 되는 acetone을 가하여 생성되는 침전을 회수하고 건조하여 연한 황색분말의 KM-A를 얻었다. MeOH-acetone에 용해된 부분을 농축하여 syrup 상태로 되면 ethylacetate로 추출 및 농축한

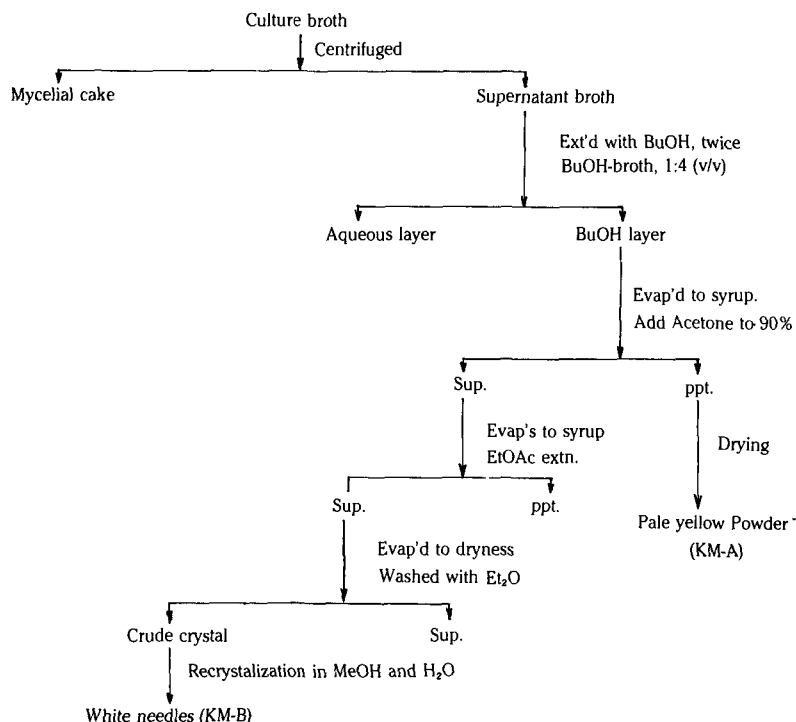


Fig. 3. Purification Procedure of the Antibiotics.

후 ethyl ether로 3회 씻었으며 이때 형성된 crude crystal을 MeOH에 녹이고 여기에 물을 MeOH의 5배량 가하여 4°C 냉장고에서 하루 동안 방치한 후 재결정된 백색침상결정 KM-B를 얻었다.

요 약

벼 紋枯病 방제를 위한 새로운 抗真菌性 抗生物質을 개발하기 위하여 우리나라 전국 각지역에서 임의로 채취한 1600여점의 토양시료에서 방선균 1300여주를 분리하고 액침배양법, Denroid test, green house test 등으로 벼에 대한 生理毒性이 없으면서 벼 紋枯病에 치료효과를 나타내는 방선균 1주를 소요산 부근의 토양시료에서 분리, 선정하였다. 분리선정균의 배양액에서 항진균성 항생물로서 연한 황색의 무정형 분말과 백색침상결정의 두가지를 분리, 정제하였다.

참고문헌

1) Bae, M. : *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **6(3)**, 141 (1978)

2) Suzuki, S., K. Isono, J. Nagatsu, T. Mizutani, Y. Kawashima and T. Mizuno : *J. Antibiot. Ser A*, **18**, 131 (1965)
 3) Isono, K., J. Nagatsu, Y. Kawashima and S. Suzuki : *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 848 (1965)
 4) Isono, K., and Suzuki S. : *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 813 (1966)
 5) Suzuki, S., K. Isono, J. Nagatsu, Y. Kawashima, K. Yamagata, K. Sasaki and K. Hashimoto : *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 817 (1967)
 6) Isono, K., J. Nagatsu, K. Kobitani, K. Sasaki and S. Suzuki : *Agr. Biol. Chem.* **31**, 190 (1967)
 7) Isono, K. and S. Suzuki : *Agr. Biol. Chem.* **32**, 190 (1967)
 8) Iwasa, T., H. Yamamoto and M. Shibata : *J. Antibiot.*, **23**, 595 (1970)
 9) Iwasa, T., Y. Kameda, M. Asia, S. Horii and K. Mizuno : *J. Antibiot.*, **24**, 119 (1971)
 10) Iwasa, T., E. Higashide, H. Yamamoto and M. Shibata : *J. Antibiot.*, **24**, 107 (1971)
 11) Iwasa, T., E. Higashide and M. Shibata : *J. Antibiot.*, **24**, 114 (1971)
 12) 友田宣編 微生物工業講座 9 20-25 (1975)