대한의진균학회지 제 1권 제 1호 1996
Kor J Med Mycol Vol. 1, No. 1, 1996

■ 원 저 ■

방선균 WCM-9가 생산하는 Polyene 항진균성 항생물질(AF1)의 생물학적 성상

연세대학교 원주의과대학 미생물학교실, 건국대학교 공과대학 미생물공학과*

신운섭 · 정선호* · 이동희* · 이경호 · 김수기 · 박주영 · 고춘명

=Abstract=

Biological Properties of a Polyene Antifungal Substance(AF1) Produced from *Streptomyces sp.* WCM-9

Woon-Seob Shin, Seunho Jung*, Dong-Heui Yi*, Kyoung-Ho Lee, Soo Kie Kim, Joo-Young Park and Choon-Myung Koh

Department of Microbiology, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju Korea
Department of Microbiological Engineering, College of Engineering, Kon Kuk University, Seoul, Korea*

Background: Pathogenic fungi infect humans, especially immunocompromised patients, with superficial or deeply invasive pattern. In the past 20 years, fungal infections have been increased dramatically resulted by increment of organ transplantation, cancer, AIDS patients, or use of broad-spectrum antibacterial agents. Fungal infections are now important causes of morbidity and mortality of hospitalized patients. but there is no effective antifungal antibiotics as well as antibacterial antibiotics

Objective: Effective new antifungal antibiotics are needed for the treatment of mycosis. So in an effort to develop effective antifungal antibiotics, we screened over 600 isolates of *Streptomyces spp.* from soil.

Methods: Antifungal producing strain was selected using disk diffusion method, An antifungal substance (AF1) was purified with ethyl acetate extraction, silica gel column chromatography and reverse phase HPLC. MICs of AF1 were detected by agar dilition method.

Results: The compound showed UV maxima of 307, 321, 340, 359 nm indicating methylpentaene. Minimum inhibitory concentrations of the AF1 were 3.7 μg/ml against mold, and 3.7 - 7.4 μg/ml against *Candida species*. AF1 was also active against *Cryptococcus neoformans*, with MIC of 0.9 μg/ml. The concentration of AF1 for K^+ ion release from human red blood cell and hemolysis were 5 μg/ml.

Conclusion: The antibiotic purified from culture broth of *Streptomyces sp.* WCM-9 was a polyene antifungal antibiotic which have broad spectrum antifungal activity.

Key Words: Antifungal antibiotics, Polyene, Streptomyces

†별책요청 저자: 신운섭, 강원도 원주시 일산동 162 연세대학교 원주의과대학 미생물학교실, 우편번호 220-701

서 론

병원성 진균 중 *Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitidis* 및 *Paracoccidioides brasiliensis*는 건강한 사람에게도 감염[1]을 일으키나, *Candida* 균종을 비롯한 몇몇의 진균들은 인체에 정상균총으로 존재하며 특히 숙주의 면역 기능이 저하될 때 치명적인 전신성 진균증을 일으키기도 한다.[2,3,4]

최근에는 만성 소모성 질환, 후천성 면역 결핍증, 암 및 장기 이식 등의 증가로 인한 면역 기능 저하자의 증가와, 광범위 항생제, 화학 요법제 및 면역 억제제의 빈번한 사용으로 인하여 전신성 진균증이 증가하고 있으나[5], 이들의 치료를 위한 항진균제는 한정되어 있고 임상적 사용에도 문제점을 지니고 있다.

항진균제의 실제 사용시 문제점으로 5-fluorocytosine에 대한 내성균의 출현 빈도가 매우 높아 치료제로서는 단독 약제로 사용하는 것보다 amphotericin B와 복합투여로 사용되고 있는 형편이다.[6] Azole 계통의 항진균제 역시 내성 균주의 출현 빈도가 높고,[7,8] 정균 작용을 함으로써 일부 전신성 진균 감염증에 사용되기도 하지만 주로 피부 진균증에 사용된다. 한편 항진균제를 생산하는 미생물로서는 *Aspergillus* 등[9,10]의 곰팡이 종류와 *Streptomyces* 등[11,12]의 방선균이 알려져 있다. 방선균은 다양한 2차 대사산물을 생산하며 streptomycin, tetracycline, gentamycin 등 현재 이용되는 많은 항생물질들은 이들 대사 산물들로부터 발견되었고[13], 특히 많은 방선균이 polyene 계 항생물질을 생산하는 것으로 알려져 있다.[14] 진균증 치료제 개발은 1950년대에 방선균으로부터 amphotericin B가 발견된 후 약 300종의 polyene이 보고되어 30개 정도의 구조가 밝혀졌고,[11,14] amphotericin B, nystatin 등이 실용화되었다.

Polyene 계 항생제는 독성, 용해도 및 조직 침투성이 문제되고 있으나, 균을 완전히 사멸시킬 수 있고 내성균의 출현 빈도가 낮은 장점이 있어 현재까지 polyene계 항진균제를 대용할 만한 전신성 진균치료제는 개발되지 않았으며, 특히 *Cryptococcus neoformans*에 의한 뇌수막염 치료제로는 amphotericin B와 5-fluorocytosine을 병용하여 사용한다.[6] 그러나 polyene 중 methylpentaene 계통은 인체에 독성이 매우 큰 단점이 있어 인체 진균 감염증에는 사용하지 못하고 있으며 filipin 등의 약제는 작물 방제용으로만 사용되고 있다. 따라서 수용성을 높이고 독성이 적은 경구 투여용 개발을 위한 여러 가지 유도체가 합성되고 있다.[15]

진균 감염에 대한 숙주의 방어 기전은 세포 매개 면역 기능[16]이 중요하며 특히 전신성 진균감염은 면역 기능이 저하된 환자에서 발생한다. 그러므로 치료를 위하여는 단지 진균의 성장을 저해하는 것보다는 균을 사멸시킬 수 있는 항진균제가 필수적이다. 피부 진균증의 치료에 있어서도 재발 방지 목적 외에도 사멸 효과가 있는 항진균제가 치료 기간을 단축시킬 수 있다. 그러나 아직까지는 광범위 항생제와 같이 독성이 낮고 항균범위도 넓은, 효과적인 항진균제는 매우 한정되어 있어 이의 개발에 많은 연구가 진행되고 있다.

따라서 본 연구에서는 토양에서 분리한 방선균 배양액으로부터 진균 사멸 효과가 있는 항진균성 물질을 분리하였고, 분리한 물질의 생물 활성을 조사하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 균의 분리 및 선별

항진균성 항생물질을 생산하는 방선균을 분리하기 위하여 원주 근교의 산림 부식토를 채취하여 균원 시료로 사용하였으며 평판도말 배양법으로 600 여주의 방선균을 분리하였다.

항진균제 생산균을 선별하기 위하여 100 ml 삼각 플라스크에 starch 1%, soybean meal 0.2%, K_2HPO_4 0.1% 배지를 20 ml씩 분주하고 방선균 포자를 접종하여 30℃ 배양기에서 1주일간 배양하였다. 배양 후 여과액을 종이 원판(paper disc, 직경 7 mm, 두께 2 mm)에 30 μl씩 흡수시켜 *C. albicans* ATCC 10231과 *A. niger* ATCC 9642를 도말한 평판 배지 위에 각각 올려놓은 후 30℃ 배양기에서 1주일 동안 배양하여 발육 저지대를 관찰하였다. 이때 *C. albicans* ATCC 10231과 *A. niger* ATCC 9642에 대하여 동시에 발육을 저지하는 균주를 선별하여 실험에 사용하였다.

2. 균주의 배양

항진균성 항생물질을 생산하기 위하여 100 ml 삼각 플라스크에 starch 1%, soybean meal 0.2%, K_2HPO_4 0.1%의 전배양 배지를 20 ml 씩 분주하

고 항진균성 항생물질 생산균으로 선별된 방선균 WCM-9의 포자를 접종하고 30℃ 배양기에서 2일간 배양하여 종균으로 사용하였다. 항진균성 항생물질의 생산은 생산용 배지(starch 1%, soybean meal 0.2%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4$ 0.05%, sodium acetate 0.2%)를 1 l 플라스크에 200 ml씩 분주하여 종균 1 ml를 접종하여 30℃ 왕복진탕기(제일 이화학)에서 진탕배양(진폭 4cm, 70 strokes/min)하였다.

3. 항진균성 항생물질의 정제

항진균성 항생물질 생산 균주 WCM-9의 배양액으로부터 항진균성 항생물질을 분리 정제하기 위하여 먼저 유기 용매에 대한 전용성과 용매에 대한 용해성 그리고 이온성을 조사하였으며 column chromatography와 HPLC를 이용하여 항진균 활성물질 AF1과 AF2를 최종 정제하여 AF1을 실험에 사용하였다(Fig. 1).

4. 항진균성 항생물질의 활성 측정

AF1의 항진균 활성을 측정하기 위하여 시료 30 μl를 paper disk에 침적시킨 후 시험균을 도말한 평판 배지 위에 올려놓고 30℃ 배양기에서 48시간 배양하여 평판 위에 생긴 발육 저지대의 직경을 측정함으로써 항진균 활성을 측정하였다.

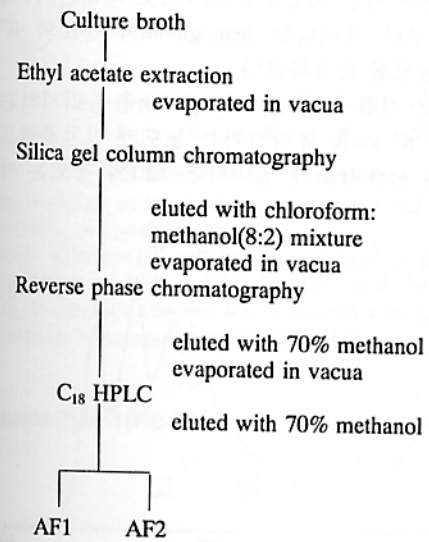

Fig. 1. Purification procedure of the antifungal substance from the culture broth of *Streptomyces sp.* WCM-9.

5. 최저 발육 억제 농도의 측정

AF1의 각종 병원성 그람양성 및 그람 음성 세균과 병원성 진균 및 식물 병원균에 대한 항균양상을 조사하기 위하여 한천희석(agar dilution)법[20]으로 최저 발육억제농도(minimum inhibitory concentration; MIC) 를 측정하였다.

AF1 0.6 mg을 50% methanol 2 ml에 녹여 2단계씩 계단 희석한 후 각 농도의 항진균성 항생물질 2 ml를 50℃의 한천 배지 18 ml에 넣어 잘 혼합하여 평판 배지를 만들어 시험균을 접종하였다. 세균에 대한 항균력을 측정하기 위하여는 Mueller-Hinton 한천 배지를 사용하여 시험균주를 접종하고, 37℃에서 48시간 배양하여 시험 세균의 발육 유무를 육안으로 관찰하므로써 MIC를 판정하였다. 진균에 대한 항균력 측정은 Sabouraud dextrose 한천 배지를 사용하였으며, 효모는 37℃ 배양기에서 3일간 배양하였고, 사상균은 상온에서 7 - 14일 배양하여 균의 발육여부로서 MIC를 측정하였다.

6. 진균 사멸 효과

AF1의 *C. albicans*에 대한 사멸 효과를 측정하기 위하여 Sabouraud dextrose 액체 배지에 6시간 배양시킨 *Candida albicans*를 원심분리기에서 인산 완충액(pH 7.2)으로 3회 세척하였다. 세척후 진균 부유액을 여러 농도의 AF1과 1×10^6 cells/ml이 되도록 혼합하여 37℃ 수조에서 1시간 진탕 배양하였다. 배양한 후 다시 *C. albicans*를 인산 완충액(pH 7.2)으로 세척하고 Sabouraud dextrose 평판 배지에 도말하여 37℃ 배양기에서 48시간 배양하였다. 이 때 *C. albicans*의 사멸 정도는 Sabouraud dextrose 평판 배지 위에 형성되는 집락을 계수하여 측정하였다.

7. 용혈 활성 및 K^+ 이온 측정

AF1의 분류와 적혈구에 대한 영향을 조사하기 위하여 용혈 활성 및 K^+ 이온유리를 측정하였다. 적혈구의 분리는 원심분리관에 2% ficoll을 8 ml 넣은 후, 그 위에 사람 혈액(O 형) 1ml을 ficoll과 섞이지 않도록 조심스럽게 상층하고, 1,000xg에서 15분 동안 원심분리하였다[18]. 그후 적혈구를 인산 완충액 (pH 7.2)으로 2회 세척한 후 1×10^6 cells/ml로 맞추고, 여러 농도의 항진균제와 혼합하여 37℃ 수조에서 1시간 반응시켜 이때 유리

되는 hemoglobin과 K^+ 이온을 측정하였다. Hemoglobin은 spectrophotometer를 이용하여 450 nm에서 측정하여 정량하였으며, K^+ 이온의 농도는 ion selective membrane electrode를 사용하여 측정하였다.

결 과

1. 항진균성 항생물질 생산균의 선별

토양으로부터 분리한 600여주의 방선균으로부터 *C. albicans* ATCC 10231과 *A. niger* ATCC 9642에 대해 사멸 효과가 있는 항진균성 항생물질을 분비하는 방선균을 선별하기 위하여 평판 배지에 생긴 *A. niger* ATCC 9642의 발육 저지대 직경을 1주일간격으로 측정하였을 때 변화되지 않는 것을 항진균성 항생물질 생산균으로 선별하여 이를 WCM-9이라고 명명하고 이하의 실험에 사용하였다(Fig. 2).

2. 자외선 흡수대

항진균성 항생물질 AF1을 분류하기 위하여 자외선 흡수대를 조사하였다. AF1을 methanol에 녹여 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 자외선 흡수대를 측정한 결과 290, 307, 321, 340, 359 nm 파장에서 자외선 흡수대를 나타내었다(Fig. 3).

3. 항균 spectrum

AF1의 항균 spectrum을 조사하기 위하여 그람 양성세균 중 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P와 그람 음성 세균 중 *Escherichia coli* ATCC 25922 그리고 수종의 진균에 대한 최저 발육 억제 농도를 측정하였다(Table 1).

AF1은 50 μg/ml 농도에서 세균에 대하 여는 전혀 항균 작용이 없었으며 실험에 사용한 대부분의 진균에 대하여는 최저 발육 억제 농도가 약 0.9 μg/ml에서 7.0 μg/ml로 진균에 대하여 강한 항진균력을 나타내었다. 또한 효모균류보다 사상균류에 2배정도 항진균력이 높았으며, *Cryptococcus neoformans*에 대해서는 최저 발육 억제 농도가 1 - 2 μg/ml로서 가장 항진균력이 높았다. 그리고 AF1은 진균에 대한 최저 발육 억제 농도와 최저 살균 농도가 동일하였다.

4. 진균 사멸 효과

AF1의 *C. albicans*에 대한 사멸효과를 측정한 결과 *C. albicans* 은 AF1 2 μg/ml의 농도에서 50%의 사멸률을 나타내었으며 10 μg/ml의 농도에서 처리하였을 때는 90% 이상의 균이 사멸되었고 배양 시간을 48시간 더 연장하여도 진균 집락의 수는 더이상 증가하지 않았다(Fig. 4).

5. 적혈구 용혈과 K^+ 이온 유리

본 실험에서는 분리 정제한 항진균성 항생물질 AF1의 분류와 세포막에 대한 영향을 알아보기 위하여 사람 적혈구를 AF1으로 처리한 후 적혈구로부터 유리되는 hemoglobin의 농도와 K^+ ion의 농도를 측정하였다.

AF1은 적혈구로부터 hemoglobin을 유리시키는 농도와 K^+ ion을 유리시키는 농도가 일치하였으며 50% hemolysis가 일어나는 AF1의 농도는 약

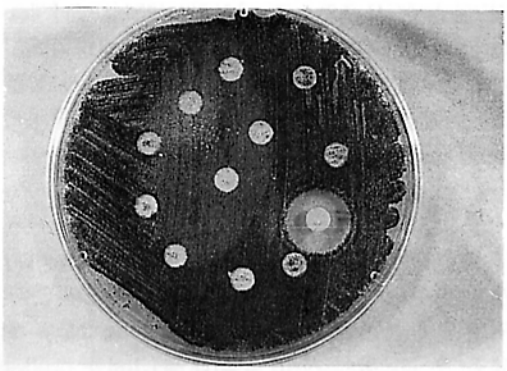

Fig. 2. Fungicidal clear zone of the antifungal antibiotics against *Aspergillus niger* ATCC 9642.
The paper disc absorbed with 30 μl of WCM-9 culture broth was put on the Sabouraud dextrose agar plate spreaded with suspension of *Aspergillus niger* spore, and the plate was incubated at 30℃ for 7days.

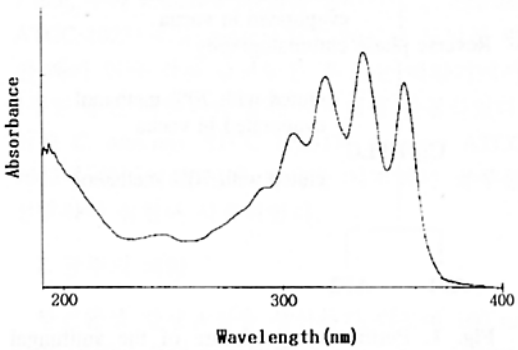

Fig. 3. UV spectrum of the antifungal antibiotics in methanol.

Table 1. Antibiotic spectrum of the antifungal antibiotics against microorganisms

Strains	MIC (μg/ml)
	AF1
Candida albicans ATCC 36801	7.50
Candida albicans ATCC 36802	7.50
Candida albicans ATCC 10231	7.50
Candida krusei ATCC 2159	7.50
Candida glabrata ATCC 38326	7.50
Candida tropicalis ATCC 14056	3.75
Candida parapsilosis ATCC 7330	3.75
Candida guilliermondii ATCC 56822	3.75
Cryptococcus neoformans	1.87
Aspergillus niger ATCC 9642	3.75
Trichophyton mentagrophytes	3.75
Microsporium canis	3.75
Epidermophyton floccosum	3.75
Fusarium solani	3.75
Piricularia oryzae	3.75
Staphylococcus aureus ATCC 6538P	> 50
Escherichia coli ATCC 25922	> 50

MIC (minimum inhibitory concentration) was measured with agar dilution method.

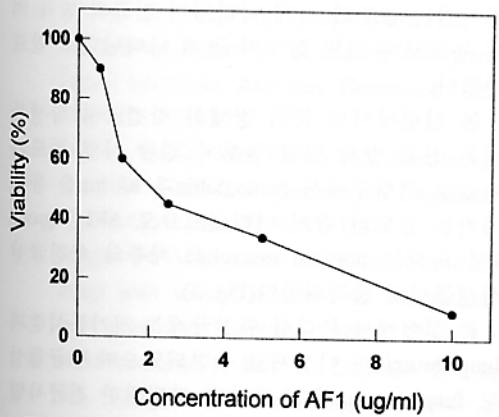

Fig. 4. Effect of the antifungal antibiotic(AF1) on the viability of *Candida albicans*.
Candida albicans(10^6 cells/ml) was treated at each concentration of AF1 at 37°C for 1hr., and the viability of *Candida albicans* was measured with colony count on Sabouraud dextrose agar plate.

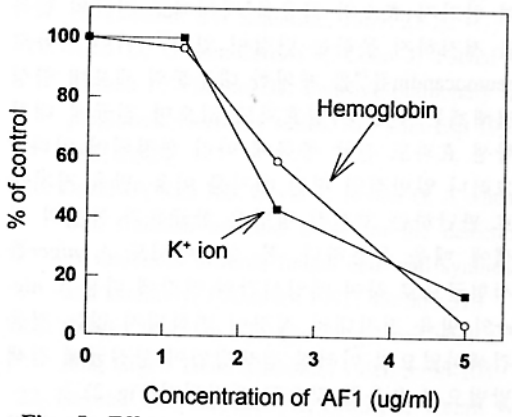

Fig. 5. Effect of antifungal antibiotics on the hemolysis and K^+ ion release of human RBC.
Human red blood cell(10^6 cells/ml) were treated at each concentration of AF1 at 37℃ for 1hr., and the hemoglobin from RBC was measured with spectrophotometer at UV 450 nm and K^+ ion leakage was measured with ion selective membrane eletrode.

2.5 μg/ml 이었다(Fig. 5).

고 찰

장기이식, 항암제의 사용 및 면역 결핍 바이러스의 감염에 의한 면역 기능이 저하된 환자의 증가와 함께 침습성 캔디다증은 20년 전보다 10배 정도 증가하였으며 침습성 아스파길러스증 (aspergillosis)은 골수이식 환자 또는 면역 억제 환자에게 발생하여 사망의 원인이 되기도 한다.[19]

그러나 침습성 및 전신성 진균증 치료를 위하여는 사멸 효과가 있는 항진균제가 요구되나 amphotericin B 이외에는 선택할 약제가 없는 실정이며 따라서 새로운 항진균제의 개발이 필요하다.

미생물로부터 새로운 항진균제를 개발하기 위해서는 검색법의 정립이 필요한데 진균은 세균과는 달리 항진균제의 특이 표적 구조가 적은 편이다. 현재 이용되는 검색 방법으로는 형태 변화 유도 물질의 검색과,[20] chitin synthase나 glucan synthase 등의 세포벽 합성 효소 저해제 검색법,[21] 그리고 평판 배지에서 발육 억제를 관찰하는 일반적인 방법 등이 있다. 형태 변화 유도 물질 검색법은 주로 세포벽 합성 저해제를 검색할 수 있는 방법으로서 nikkomycin과 papulacandin 등이 발견되었다.[22,23] 이 검색법은 새로운 작용 기전의 항진균제 검색법으로는 효과적일 수 있지만 균을 사멸시킬 수 있는 항진균제를 찾을 수 없는 단점을 가지고 있다. 또한 세포벽 합성 저해제 검색법도 진균에 대한 선택적 독성을 나타내는 물질 검색 방법으로 효과적일 수 있다는 가정 하에 많이 연구되고 있으나, 진균의 세포벽 구성 성분인 chitin과 glucan의 함량이 균종에 따라 다르며, 세포벽 합성 효소인 chitin synthase와 glucan synthase에는 여러 가지 isoenzyme이 존재하여 한가지 효소의 작용을 저해해도 진균의 발육을 저지하지 못하는 단점이 있다[21]. 이런 이유로 peumocandin류[24]를 제외한 대부분의 세포벽 합성 저해제는 진균 사멸효과도 없으며 진균에 대한 항생 효과도 진균 종류에 따라 한정되어 있다.[24] 그러나 일반적인 평판 배지를 이용, 발육 저지대로 판단하는 고전적 방법은 항균효과 물질의 검색에 매우 유용하다. 본 실험에서도 *A. niger*를 시험균으로 하여 배양시간의 연장에 따른 *A. niger*의 발육 저지대의 직경이 변화되지 않는 것을 검색하였으며 이러한 검색방법이 항진균제 검색 방법으로 유용할 것으로 생각된다(Fig. 2).

AF1이 polyene group에 속하는지 알아보기 위하여 자외선 흡수대를 조사한 결과 AF1은 307, 321, 340, 359에서 자외선흡수대가 관찰되었다(Fig. 3). 이것은 methylpentaene으로 보고된 fungichromin(γmax: 307, 321, 340, 359)과 elizabethin (γmax: 307, 321, 340, 359)의 자외선 흡수대와 유사하였으며,[25,26] methylpentaene 계통의 공통적인 자외선 흡수대는 (320-324, 338-342, 355-360 nm)이라고 알려져 있으므로 AF1은 methylpentaene 계통의 항진균제로 판단되었다. Polyene계통의 항생물질들은 대부분 항세균활성은 없으며 항진균활성이 있다고 알려져 있다. 따라서 AF1의 항균활성을 측정한 결과 세균에는 항균활성이 없었으며 진균류에는 0.9 - 7.5 μg/ml의 MIC를 나타내었다(Table 1). 본 항진균성 항생물질은 methylpentaene으로 알려진 filipin이나 fungichromin, 그리고 elizabethin의 항진균력이 진균에 대한 최저 발육 억제 농도가 약 5 μg/ml이었다는 보고와 거의 유사하였으며,[11] 또한 최근에 Kobinata 및 Cidaria 등[27,28]이 RK-397과 AB023의 진균에 대한 최저 발육 억제 농도가 10 - 100 μg/ml 이라는 보고보다는 본 실험에서 정제한 항진균성 항생물질의 항진균력이 더욱 우수하였다.

Kotler-Brajtburg 등[29], Gale 등[30] 및 Hammond 등[31]은 polyene을 화학 구조와 생물 활성에 따라 group 1과 group 2로 분류하였으며, group 1에 속하는 항진균제는 적혈구에서 hemoglobin과 K^+ ion을 유리시키는 농도가 같으며 진균의 발육 억제 농도와 사멸 농도가 같게 나타난다고 보고하였다. 여기에는 triene, tetraene, pentaene 및 hexaene 계통이 속한다고 하였다. 아울러 group 2에는 heptaene 계통이 속하며 이들은 적혈구에서 K^+ ion을 유리시키는 농도보다 hemoglobin을 유리시키는 농도가 높게 나타나며 진균의 발육 억제 농도보다 사멸 농도가 높게 나타난다고 발표하였다.

본 실험에서도 분리 정제한 항진균성 항생물질은 진균 발육 억제 농도와 진균 사멸 농도가 같았고 적혈구에서 hemoglobin과 K^+ ion을 유리시키는 농도가 같게 나타났으므로 AF1은 group 1에 속하는 polyene macrolide 계통의 항진균성 항생물질로 생각되었다(Fig. 5).

본 실험에서 분리한 항진균제는 기기분석결과 fungichromin의 이성체로 추정되었으며 항균활성도 fungichromin과 유사하게 광범위한 진균사멸 효과를 나타내었다.

결 론

항진균성 항생물질을 찾기위하여 600여종의 방선균을 분리하였으며 이들 배양액으로부터 곰팡이와 효모에 효과적인 항진균물질을 분비하는 방선균인 *Streptomyces sp.* WCM-9를 검색하였다.

Streptomyces sp. WCM-9 배양액으로부터 HPLC을 이용하여 항진균성 항생물질이 307, 321, 340, 359 nm로 methylpentaene 계통의 물질이었다. AF1의 곰팡이와 효모에 대한 최저발육억제농도는 각각 0.9 μg/ml 와 3.7-7.4 μg/ml으로 곰팡이와

효모에 대하여 광범위한 항진균 효과를 나타내었으며, 적혈구로부터 K^+ 이온을 유리시키는 농도와 용혈을 일으키는 농도가 같은 group 1에 속하는 항진균성 항생물질이었다.

참 고 문 헌

1. Bennett JE, Kwon-Chung KJ. Medical mycology. Philadelpia: Lea & Febiger, 1992; 201-707
2. Ahern DG. Medically important yeasts. Ann Rev Microbiol 1978; 32: 59-68
3. Bodey GP. Candidiasis in cancer patients. Am J Med 1984; 77: 13-19
4. Bodey GP, Anaissie EJ. Chronic systemic candidiasis. Eur J Clin Microbiol Infect. Dis 1989; 8: 855-857
5. Herbrecht-R. The changing epidemiology of fungal infections: are the lipid-forms of amphotericin B an advance? Eur J Haematol (Suppl) 1996; 57: 12-17
6. Medoff G, Brajtburg J, Kobayashi GS. Antifungal agents useful in therapy of systemic fungal infections. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1983; 23: 303-330
7. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of Candida species to fluconazole. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1-8
8. Borgers M. Mechanism of action of antifungal drugs with special reference to the imidazole derivatives. Rev Infect Dis 1980; 2: 520-534
9. Mukhopadhyay T, Roy K, Coutinho L, Rupp RH, Ganguli BN. Fumifungin, a new antifungal antibiotic from *Aspergillus fumigatus* fresenius 1863. J Antibiot 1987; 40: 1050-1052
10. Kobayashi H, Sunaga R, Furihata K, Morisaki N, Iwasaki S. Isolation and structures of an antifungal antibiotic, fusarielin A, and related compounds produced by a *Fusarium* sp. J Antibiot 1995; 48: 42-45
11. Hamilton-Miller JM. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. Bacteriol Rev 1973; 37: 166-196
12. Ubukata M, Shiraishi N, Kobinata K, Kudo T, Yamaguchi I, Osada H, Shen Y, Isono K. RS-22A, B and C: new macrolide antibiotics from *Streptomyces violaceusniger* 1. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. J Antibiot 1995; 48: 289-292
13. Goodfellow M, Williams ST, Mordarsik M. Actinomycetes in biotechnology. London: Academic Press, 1988: 1-32
14. Martin JF, McDaniel LE. Production of polyene macrolide antibiotics. In: Ferlman D, ed. Advances in applied microbiology vol 21. New York: Academic Press, 1977: 2-52
15. Littman ML, Horowitz PL. Coccidioidomycosis and its treatment with amphotericin B in man. Am J Med 1958; 24: 568-592
16. Sasada M, Johnston RB. Macrophage microbicidal activity. Correlation between phagocytosis associated metabolism and killing of candida by macrophage. J Exp Med 1990; 152: 85-98
17. Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine. 3rd ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1991: 1-14
18. Leslie H, Frank CH. Practical immunology 3rd ed. London: BW Scientific, 1989: 21-22
19. Alba D, Gomez-Cerezo J, Cobo J, Fachal C, Molina F, Vazquez JJ. Invasive pulmonary aspergillosis. Necropsy series. Rev Clin Esp 1995; 195: 22-25
20. David JF, Kim KB, David C, Robert G. A whole-Cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. J Antibiot 1995; 48: 306-310
21. Nafsika HG, Jan ST. The fungal cell wall as a drug target. Trend Microbiol 1995; 3: 98-104
22. Baguley CB, Rommele G, Gruner J, Wehrli W. Papulacandin B; an inhibitor of glucan syntheses in yeast spheroplasts. Eur J Biochem 1979; 97: 345-351
23. Cabib E. Differential inhibition of chitin synthetases 1 and 2 from *Saccharomyces cerevisiae by* polyoxin D and nikkomycins. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 170-173
24. George KA, Amy MF, Charles J, Gill LK, Jeffrey GS, David GK, Bill P, Helmut K, Kenneth B. Evaluation of water-soluble pneumocandin analogs L-733560, L-705589, and L-731373 with mouse models of disseminated aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis. Antim-

icrob Agents Chemother 1995; 39: 1077-1081
25. Bird, CW. Antibiotics from the newly isolated *Streptomyces elizabethii*. II. isolation and characterization of the antibiotics. J Chem Tech Biotechnol 1981; 31: 368-370
26. Pandey RC, Guenther EC, Aszalosl AA. Physicochemical and biological comparison of polyene macrolide antibiotics fungichromin, lagosin and cogomycin. J Antibiot 1982; 35: 988-996
27. Kobinata K. RK-397, a new oxopentaene antibiotic. J Antibiot. 1993; 46: 1616-1618
28. Cidaria D, Borgonovi G, Pirali G. AB023, Novel polyene antibiotics 1. Taxonomy of the producing organism, fermentation and antifungal activity. J Antibiot 1993; 46: 251-254
29. Kotler-Brajtburg J. Classification of polyene antibiotics according to chemical structure and biological effects. Antimicrob Agents Chemother 1979; 15: 716-722
30. Gale EF. The release of potassium ions from *Candida albicans* in the presence of polyene antibiotics. J Gen Microbiol 1974; 80: 451-465
31. Hammond SM, Lambert PA, Kliger BN. The mode of action of polyene antibiotics: induced potassium leakage in *Candida albicans*. J Gen Microbiol 1974; 81: 325-330