

Streptomyces neyagawaensis 38D10 균주가 생산하는 concanamycin B의 항고추역병 활성

김창진* · 이인경 · 윤봉식 · 유익동
한국과학기술연구원 유전공학연구소

Concanamycin B, Active Substance Against *Phytophthora capsici* Produced by *Streptomyces neyagawaensis* 38D10 Strain

Kim, Chang-Jin*, In-Kyoung Lee, Bong-Sik Yun and Ick-Dong Yoo
Genetic Engineering Research Institute, KIST, Daejeon 305-606, Korea

Abstract — During the screening of antifungal compounds from microbial secondary metabolites to control phytophthora blight of red pepper caused by *Phytophthora capsici*, a soil isolate, strain 38D10 was selected. Based on taxonomic studies, this strain was identified as *Streptomyces neyagawaensis*. The antifungal compound was purified from culture broth by HP-20 column chromatography, ethyl acetate extraction, silica gel column chromatography, HPLC and identified as concanamycin B by UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, SIMS analysis. Concanamycin B had strong antifungal activity against some phytopathogenic fungi but not antibacterial activity and the preventive value were 50% and 100% at 125 ppm and 250 ppm in pot assay.

고추역병균인 *Phytophthora capsici*는 Peronosporales(노균병균목) Pythiaceae(역병균과)에 속하는 Phycmycetes(조균류)의 일종으로 균사에 격막이 없으며 많은 핵을 가진 균사체를 형성하고 무성포자에 의해 번식되는 식물 병원균의 일종이다(1). 이 균은 일반적으로 분생포자 혹은 유주자(zospore)에 의해서 전염되는데 분생포자는 비, 바람 등에 의해 숙주식물의 잎이나 줄기에 정착된 후 발아된 균사가 기공 또는 각피를 통하여 식물체내에 침입하여 발병을 일으킨다. 또 분생포자는 저온에서는 유주자낭이 되어 다수의 유주자를 형성한 후 고온 다습한 조건이 되면 이 유주자는 일시에 발아하여 역병이 확산 전파된다(2). 따라서 고추역병은 장마시작을 전후하여 전국적으로 삼시간에 번지기 때문에 방제가 매우 어려운 식물병이라 하겠다. 이와같은 고추역병을 방제하기 위한 방법으로는 유기합성 농약의 사용, 병저항성 품종의

육성 보급 및 길항미생물을 이용한 생물학적 방제(3-5) 등이 시도되고 있으나 상기와 같은 이유로 큰 효과를 거두지 못하고 있는 실정이다.

한편 미생물이 생산하는 발효산물을 생물농약으로 활용하고자 하는 연구가 일찍부터 시도되어 이미 살균제로 kasugamycin, validamycin, polyoxin, mildiomycin, 살충제로 tetranactin, avermectin, 제초제로서 bialaphos, cycloheximide 등이 개발되어 실용화되고 있다(6-8).

필자들은 전보(9)에 이어서 미생물 대사산물로부터 농업용 항생물질 탐색 연구를 수행하던 중(10, 11), 고추역병에 강력한 방제효과를 나타내는 항생물질 생산균주를 선발하고, 그 물질의 분리, 정제 및 이화학적, 생물학적 특성 등을 조사하였기에 보고한다.

재료 및 방법

방선균의 분리 및 선발

전국 각지의 산, 들, 밭 토양으로부터 토양시료를 채취한 후 humic acid-vitamin agar 배지(HA 배지,

Key words: *Streptomyces neyagawaensis*, *Phytophthora capsici*, concanamycin B, phytophthora blight, red pepper

*Corresponding author

humic acid 1 g, Na₂HPO₄ 0.5 g, KCl 1.7 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, CaCO₃ 0.01 g, vitamin B complex trace, cycloheximide 50 mg/l, pH 7.2)를 사용하여 방선균 약 3,000균주를 분리한 후 paper disc법(10)으로 항균활성을 조사하였다. 그 결과 선발된 균주는 충청북도 청원군 구룡리 부근 산림 토양에서 분리한 38D10균주이며 고추 역병균인 *Phytophthora capsici*에 강한 항균활성을 나타내었다(10, 11).

선발균주의 동정

선발된 38D10균주의 미생물학적 특성을 조사하기 위하여 형태적 특성, 배양적 특성, 생리적 특성 및 탄소 이용성 등을 조사하였다. 조사방법은 방선균 동정 실험법(12) 및 International Streptomyces Project(ISP) 방법에 준하였다(13-18).

항생물질의 생산

항생물질의 생산은 glucose-soybean meal-soluble starch(GSS 배지, soluble starch 10 g, glucose 20 g, soybean meal 25 g, beef extract 1 g, yeast extract 4 g, NaCl 2 g, K₂HPO₄ 0.5 g/l, pH 7.3)를 사용하였는데 5 l jar fermentor(한국발효기)를 이용하여 500 ml 삼각 flask상에서 전 배양된 seed를 1% 수준으로 접종하고 27°C, 1 vvm, 250 rpm 조건하에서 배양하였다. 배양중 매 24시간마다 배양액을 채취하여 균 생육정도, pH 및 항균활성을 조사하였다.

항생물질의 분리 정제

5일간 배양된 균 배양액을 원심분리한 후 그 상등액과, 70% acetone으로 추출한 균사체 추출물을 혼합한 후 Diaion HP-20(6Φ×30 cm, Nippon Rensui Co.) column에 통과시켜 70% acetone으로 활성물질을 용출시키고 이를 농축한 후 ethyl acetate로 추출하였다. 그 후 silica gel(3.5Φ×25 cm, Merck Co., No. 7734) column chromatography상에서 chloroform-methanol=30:1~10:1의 용매로 전개시키고 얻어진 활성분획을 최종적으로 HPLC(ODS column, 10Φ×30 cm, 70% acetonitril, UV 254 nm, 2 ml/min)를 통하여 순수분리하였다.

구조분석 및 이화학적 특성 조사

구조분석을 위한 NMR 분석은 Jeol GX-500 및 Jeol EX-270 기기를 이용하였는데 이때 표준물질로는 TMS(tetramethylsilane)을 사용하였고 용매는 CDCl₃를

이용하여 측정하였다. 분자량 결정은 NBA(m-nitrobenzyl alcohol)를 matrix로 하여 SIMS(selective ion mass spectroscopy, Hitach M-80 mass spectrometer)를 측정하였다. 또한 UV spectrum(Uvikon 930 Kontoron Instrument)은 ethanol을 용매로 하여 측정하였다.

항고추역병 활성

항균활성은 본 연구실에서 시험균(10)으로 사용하고 있는 세균, 효모, 곰팡이 등에 대하여 paper disc법(10)에 의해 조사하였다. 또한 고추역병에 대한 *in vivo* assay는 6Φ×6 cm 크기의 pot에 고추묘 2주씩을 이식하여 5엽기가 될 때까지 생육시켜 사용하였다. 조사방법은 pot당 *Phytophthora capsici* 포자 약 100개 정도가 현탁된 포자현탁액 1 ml를 접종하고, 38D10 균주 배양액으로부터 ethyl acetate로 추출한 crude 추출액을 환산하여 최종농도 1,000 ppm까지 되도록 단계적으로 처리하여 항고추역병 활성을 조사하였다.

결과 및 고찰

선발균주의 동정

선발된 38D10균주의 형태적 특성을 광학현미경 및 전자현미경을 통하여 관찰한 결과 기균사의 형태는 나선형이었고 포자의 크기는 1.0×1.9 μm~1.8×2.2 μm이었으며 포자의 표면은 smooth하였다(사진 생략). 각종 ISP 배지상에서의 배양적 특성을 조사하여 Table 1에 나타냈다. 본 균주는 오토밀 한천배지, 무기염류 전분 한천배지, 타이로신 한천배지상에서는 양호한 생육을 보인 반면 효모-맥아 한천배지, 펩톤-효모 한천배지상에서의 균 생육은 불량하였다. 기균사의 색상은 회색계통인 색상을 나타낸 반면 배지 뒷면의 색상은 회색내지 검은색을 나타내었다. 또한 substrate mycelium의 생육은 비교적 양호하였으며 색상은 대체적으로 흰색을 나타내었다.

한편 생리적 특성 및 당 이용성 등을 조사하여 Table 2에 나타내었다. 본 균주는 melanin 색소를 생성하며 casein은 분해하나 starch는 분해하지 못하였고 gelatin 액화능력이 없으며 skim milk를 응고시키지 못하였다. 또한 균사 세포벽 성분인 diaminopimelic acid(DAP)를 분석한 결과 L.L-DAP 형태를 나타냈다. 당 이용정도는 salicin 과 cellulose를 제외한 대부분의 당을 이용하였다. 이상의 미생물학적 특성을

Table 1. Cultural characteristics of strain 38D10

Culture media	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Reverse side color	Soluble pigment
Yeast-malt extract agar	Scant, white, french grey	Moderate, white	Raw umber	None
Oatmeal agar	Abundant, french grey	Very good, pale yellow	Grey	None
Inorganic salts starch agar	Abundant, white, french grey	Moderate, white	Grey	None
Glycerol-asparagine agar	Moderate, white, french grey	Moderate, white	Grey	None
Peptone-yeast extract agar	Scant, absence of sporulating aerial mycelium	Poor, white	Black	Melanoid pigment
Tyrosine agar	Abundant, white, french grey	Moderate, white	Black	Melanoid pigment

Table 2. Comparison of taxonomic characteristics of strain 38D10 with *Streptomyces neyagawaensis*

	38D10	<i>Streptomyces neyagawaensis</i>
Spore chain morphology	Spiral	Spiral
Spore surface	Smooth	Smooth
Aerial mass color	French grey	Brownish grey
Reverside color	Grey to black	Yellowish gray to dark grey
Cell wall constituent	L.L-DAP	L.L-DAP
Formation of melanoid pigment		
Tryptone-yeast extract broth	Positive	Positive
Peptone-yeast extract iron agar	Positive	Positive
Tyrosine agar	Positive	Positive
Hydrolysis of starch	Negative	
Liquefaction of gelatin	Negative	
Coagulation of skim milk	Negative	
Hydrolysis of casein	Positive	
Tolerance of NaCl	Below 4%	
Carbon utilization		
L-Arabinose	+	+
D-Fructose	+	+
Galactose	+	
myo-Inositol	+	+
D-Mannitol	+	+
Raffinose	+	+
L-Rhamnose	+	+
Salicine	-	
Sucrose	+	+
Cellulose	-	
D-Xylose	+	+

종합하여 볼 때 본 균주는 *Streptomyces neyagawaensis* 또는 그 근연종으로 판단되어 본 균주를 *Streptomyces neyagawaensis* 38D10 균주로 명명하였다.

항생물질의 발효 및 분리정제

38D10균주의 발효조건을 검토하여 Fig. 1에 나타내었다. 배양액 중의 고추역병균에 대한 활성물질은

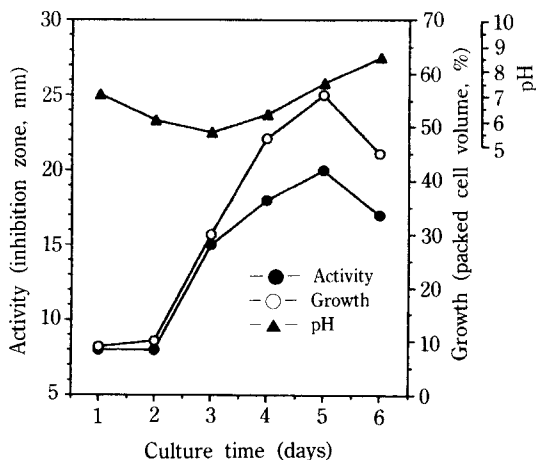
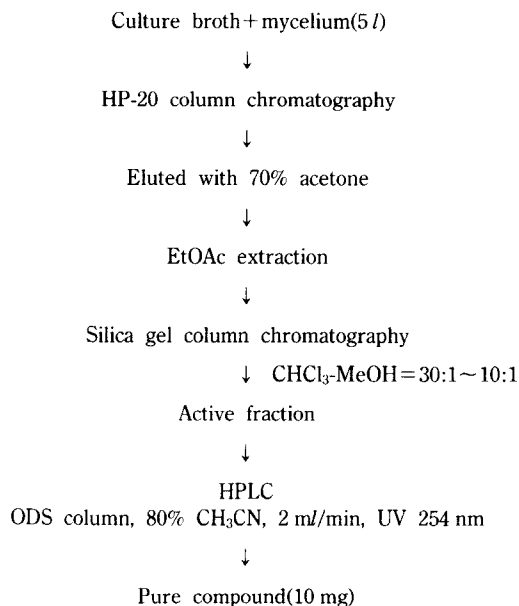


Fig. 1. Time course of concanamycin B fermentation.

배양 2일째부터 증가하기 시작하여 배양 5일째에 가장 높은 활성을 나타내었고 그 이후는 감소하는 경향이 있었다. pH의 변화는 배양 초기에는 약간 저하하다가 3일째부터 증가하기 시작하여 pH 8 부근까지 이르는 전형적인 방선균의 생육양상을 나타냈다. 한편 다음과 같은 정제과정을 거쳐 배양액 5 l로부터 최종적으로 10 mg의 순수 정제된 물질을 얻었다.



항생물질의 구조분석 및 이화학적 특성

38D10균주가 생산하는 항생물질의 이화학적 특성은 Table 3과 같다. 즉 본 항생물질은 백색분말로 UV

Table 3. Physico-chemical properties of concanamycin B from strain 38D10

Appearance	White powder
UV λ_{max}^{EtOH} nm	240, 283
SIMS	874(M+Na) ⁺ , 890(M+K) ⁺
Molecular formula	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₄
Rf* Hexane: EtOAc(2:3)	0.28
Benzene: EtOAc(3:2)	0.03
CHCl ₃ : MeOH(10:1)	0.22
Color reaction	
Ninhydrin	Positive
Bromocresol green	Positive
2,4-DNPH	Positive
Anisaldehyde	Positive
FeCl ₃	Negative
Solubility	
Soluble	MeOH, EtOH, CHCl ₃
Insoluble	H ₂ O

*TLC: silica, Merck 5715

λ_{max}^{EtOH} 240, 283 nm에서 극대 흡수피크를 보임으로써 conjugated diene 및 $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -unsaturated lactone 구조를 포함함을 시사하였으며 SIMS 분석결과 874에서 (M+Na)⁺ peak가, 890에서 (M+K)⁺ peak가 관찰되어 본 물질의 분자량은 851로 확인되었다. 또 NMR에 의한 구조분석 결과에서도 분자식은 C₄₅H₇₃NO₁₄로 결정되었다. 발색반응을 조사한 결과 ninhydrin, bromocresol green, 2,4-DNPH, anisaldehyde 반응에서는 양성반응을 나타냈으나 FeCl₃ 반응에서는 음성반응을 나타냈다. 또한 본 물질은 MeOH, EtOH, CHCl₃에는 용해되나 H₂O에는 불용인 지용성 물질이었다.

한편 Fig. 2의 ¹H-NMR spectrum의 분석 결과, 3.25 ppm과 3.65 ppm에서 O-CH₃에서 유래된 2개의 methyl signal(16-OCH₃, 2-OCH₃)을 확인하였고 0.8 ppm~2.0 ppm 부근에서 10개의 methyl기로부터 유래된 signal을 관측할 수 있었다. 또한 6.55 ppm, 5.2 ppm~6.4 ppm 사이에서 이중결합에 연유한 CH signal 7개(저자장부터 14, 3, 5, 13, 27, 26, 15번 탄소의 CH signal)를 관측할 수 있었고 5.03 ppm, 3.95 ppm, 3.84 ppm, 3.75 ppm, 3.73 ppm, 3.34 ppm 등에서 산소에 인접한 signal들을 관측할 수 있었다. 그리고 3.6 ppm~4.8 ppm에서 당 구조에서 유래한 signal을 관측할 수 있었다. 또 ¹³C-NMR spectrum(Fig. 3)상에서는 167.8 ppm과 157.5 ppm에서 carbonyl과 ester

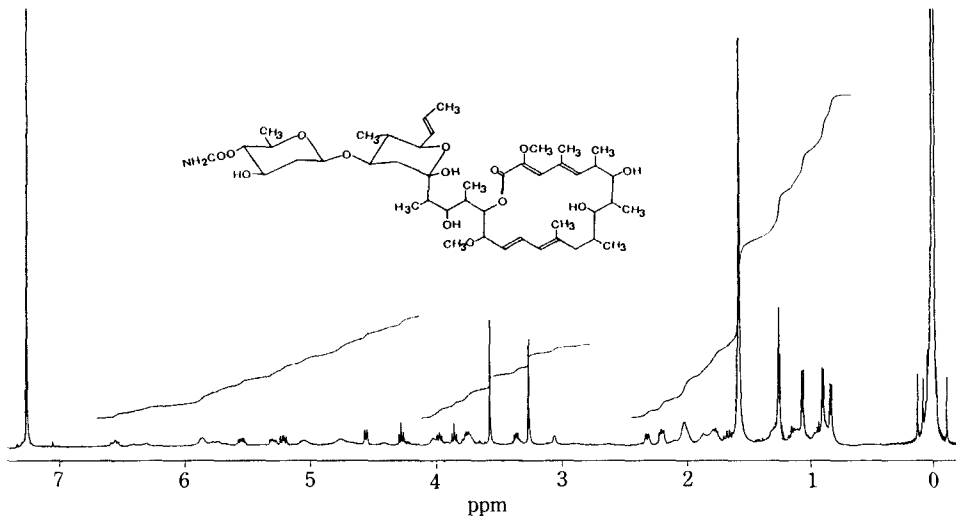


Fig. 2. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of concanamycin B from strain 38D10(500 MHz, CDCl_3).

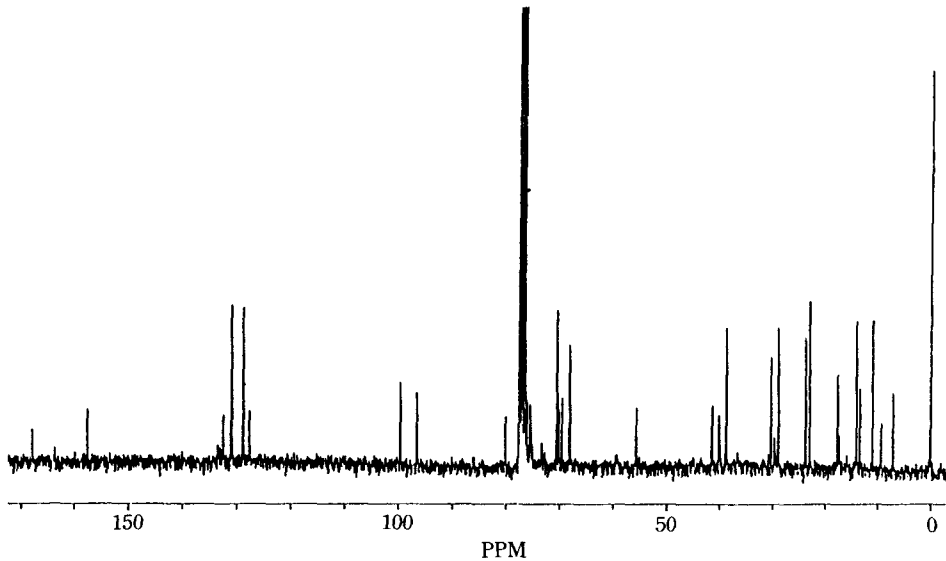


Fig. 3. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of concanamycin B from strain 38D10(67.5 MHz, CDCl_3).

signal을, 125~135 ppm에서 이중결합에 관련된 탄소의 signal을, 99.6 ppm과 96.5 ppm에서 O-C-O 결합에 유래된 signal(21, 1' 탄소)이 관측되었으며 65~80 ppm 부근에서 O-CH₃ signal 및 당 구조와 관련된 signal 등이 관측되었다. 그리고 5 ppm~30 ppm 사이에서 10개의 methyl signal이 관측되었다.

이상과 같이 이화학적 특성 및 기기분석을 통한 구조해석 결과들을 종합하여 볼 때 본 항생물질은 18 membered macrolide 항생물질인 concanamycin B

(19)로 추정되었으며 authentic concanamycin B와 HPLC상에서 비교한 결과 concanamycin B와 본 물질은 동일한 retention time에서 피크가 관찰되어 38D10 균주가 생산하는 항생물질은 concanamycin B로 동정하였다.

고추역병 활성

Concanamycin B 물질로 동정된 본 항생물질의 *in vitro*상에서의 항균 spectrum을 조사하여 Table 4에

Table 4. Antimicrobial spectra of concanamycin B from strain 38D10 (Concentration: 40 ppm)

Test microorganisms	Inhibition zone diameter(mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 12732	0
<i>Staphylococcus aureus</i> R-209	0
<i>Mycobacterium phlei</i> IFO 3158	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0
<i>Escherichia coli</i> AB 1151	0
<i>Escherichia coli</i> BE 1186	0
<i>Salmonella typhimurium</i> TV 119	0
<i>Salmonella typhimurium</i> SL 1102	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 13130	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> N 10	0
<i>Phytophthora capsici</i>	28
<i>Phytophthora parasitica</i>	36
<i>Botrytis cinerea</i>	36
<i>Alternaria mali</i>	17
<i>Fusarium solani</i>	19
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	16
<i>Candida albicans</i> IFO 1594	20

Table 5. In vivo antifungal activity of concanamycin B from strain 38D10

Concentration (ppm)	1000	500	250	125	60	30
Preventive value(%)	100	100	100	50	25	0

나타냈다. 그 결과 이 항생물질은 세균에는 gram 양성세균, gram 음성세균 모두에 대해서 전혀 항균활성이 없었고 고추 및 참깨 역병균, 오이잣빛 곰팡이 병균 등의 곰팡이와 효모에 강한 항균활성을 나타냈다. 한편 고추역병에 대한 *in vivo* 활성을 조사하였을 때 Table 5에서와 같이 고추역병에 대한 방제가는 125 ppm에서 50%의 방제율, 250 ppm에서는 100%의 방제율을 나타내었고 이때 사용한 시료의 순도는 10% 정도로 추정된다.

Concanamycin B는 α , β , γ , δ -unsaturated lactone ring과 긴 side chain을 가졌으며 hemiketal 구조로 연결된 2-deoxy-D-rhamnose를 포함하고 있는데 1982년 mouse의 비장 lymphocyte proliferation을 저해하는 물질로써 *Streptomyces diastatochromogenes*에 의해 생산됨이 보고(19)된 바 있다. 또 최근에는 endosomes과 lysosomes의 acidification 저해물질로서

보고되었다(20, 21). 그러나 고추 역병균에 대하여 강력한 항균활성이 있음과 동시에 *in vivo* pot 시험에 의해 고추역병을 방제할 수 있는 가능성이 있음은 본 연구에서 처음으로 밝혀졌다.

요 약

국내에서 크게 문제시 되고 있는 고추역병 방제용 농업용 항생물질 농약을 탐색하던 중 고추역병균인 *Phytophthora capsici*균에 강한 항균활성을 나타내는 균주를 선발하고 그 균주가 생산하는 항생물질을 분리, 정제한 후 구조를 결정하였고 정제된 물질에 대한 항균활성과 항고추역병 활성을 조사하였다. 선발된 38D10균주의 형태적, 배양적, 생리적 특성 등을 조사한 결과 본 균주는 *Streptomyces neyagawaensis*로 동정되어 본 균주를 *Streptomyces neyagawaensis* 38D10 균주로 명명하였다. 또한 균 배양액으로부터 HP-20 column chromatography, ethyl acetate extraction, silica gel column chromatography, HPLC 등을 통하여 항고추 역병성 항생물질을 정제한 후 UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, SIMS 등의 기기분석을 한 결과 본 물질은 concanamycin B로 동정되었다. Concanamycin B의 항균활성은 세균에는 활성을 나타내지 않았으며 곰팡이와 효모에 강한 활성을 나타냈다. 고추역병에 대한 *in vivo* 조건에서의 방제가는 125 ppm에서 50%, 250 ppm에서 100%의 방제율을 나타냈다.

참고문헌

- Ribeiro, O.K. 1983. Physiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*. Pp. 55-70. In D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia and P.H. Tsao (ed.), *Phytophthora, Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- 本橋精一, 野村健一. 1979. 野菜の病害蟲診斷, Pp. 306-310 農山漁村文化協會.
- Shim, J.S., H.S. Cho, K.S. Kim, and K.H. Choi. 1988. A study on the antagonists inhibiting the pathogene of bacterial with on pepper and sesame plants. *Res. Rept. RDA(Agr. Institutional cooperation)* 31: 127-135.
- 김용기, 최용철, 유갑희, 이경휘. 1989. 길항미생물 AC-1(*Bacillus* sp.) 처리시 고추역병 방제효과 및 토양미생물에 의한 영향. 농사시험 연구 논문집(작물보호편) 31: 13-18.
- 이은중, 조의규, 민완해, 김정수. 1987. 역병균에 대한

- 길항균 이용 연구. 과학기술처 연구보고서 Pp. 1-80.
6. Omura, S. 1992. The Search for Bioactive Compounds from Microorganisms. Pp. 213-262 Springer-Verlag, Tokyo.
 7. Blumauerova, M., V. Kristufek, J. Jizba, P. Sedmera, and V. Landa. 1989. Research of Streptomyces producing pesticides and plant growth regulators. Pp. 237-252. In M.E. Bushell, U. Grafe (ed.), *Bioactive Metabolites from Microorganisms. Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 21, Elsevier, Amsterdam.
 8. 岡田齊夫, 坂 齊, 玉木佳藍, 本吉總藍. 1991. Bio農藥·生育調節劑開發利用 manual, Pp. 293-305. Lifescience Infomation Center.
 9. 이인경, 김창진, 김신덕, 유익동. 1990. *Streptomyces parvullus* 균주가 생산하는 항고추 역병성 항생물질. 한국산업미생물학회지 **18**: 142-147.
 10. 김창진, 유익동, 이인경, 윤봉식. 1991. 과채류 병해 방제용 유용항생물질 탐색에 관한 연구(I), 과학기술처 연구보고서, Pp. 1-77.
 11. 김창진, 유익동, 이인경, 박동진. 1992. 과채류 병해 방제용 유용항생물질 탐색에 관한 연구(II), 과학기술처 연구보고서, Pp. 1-66.
 12. 清野昭雄. 1985. 放線菌の同定實驗法, 日本放線菌研究會編.
 13. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Method for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
 14. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1968. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* II species description from first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **18**: 69-189.
 15. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1968. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* III. Additional species descriptions from first and second studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **18**: 279-399.
 16. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1969. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* IV species descriptions from the second, third and fourth studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **19**: 391-512.
 17. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1972. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* V. Additional description. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **22**: 265-394.
 18. Nomura, H. 1974. Key for classification and identification of 458 species of the *Streptomyces* included in ISP. *J. Ferment. Technol.* **52**: 78-92.
 19. Kinashi, H., K. Someno and K. Sakaguchi. 1984. Isolation and characterization of concanamycins A, B and C. *J. Antibiotics* **37**: 1333-1343.
 20. Woo, J.T., C. Shinohara, K. Sakai, K. Hasumi and A. Endo. 1992. Inhibition of the acidification of endosomes and lysosomes by the antibiotic concanamycin B in macrophage J774. *Eur. J. Biochem.* **207**: 383-389.
 21. Woo, J.T., C. Shinohara, K. Sakai, K. Hasumi and A. Endo. 1992. Isolation, characterization and biological activities of concanamycins as inhibitors of lysosomal acidification. *J. of Antibiotics* **45**: 1108-1116.

(Received June 25, 1993)