

## Streptomyces sp. 3D3 균주가 생산하는 항고추역병성 항생물질

윤봉식 · 김창진 · 이인경 · 히로유키 고시노<sup>1</sup> · 유익동\*  
한국과학기술연구원 생명공학연구소, <sup>1</sup>이화학연구소, 일본

**An Antifungal Compound Against *Phytophthora capsici* Produced by *Streptomyces* sp. 3D3.** Bong-Sik Yun, Chang-Jin Kim, In-Kyoung Lee, Hiroyuki Koshino<sup>1</sup> and Ick-Dong Yoo\*. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejeon 305-600, Korea <sup>1</sup>The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Wako-Shi, Saitama 351-01, Japan - During the screening for the antifungal compounds against *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight of red pepper, we isolated a strong active compound, bafilomycin C<sub>1</sub>, produced by strain 3D3. The producing organism was identified as *Streptomyces* sp. based on taxonomic studies. The antifungal compound was purified from culture broth by HP-20 column chromatography, ethylacetate extraction, silica gel column chromatography and HPLC, and was identified as bafilomycin C<sub>1</sub> by color reaction, UV and <sup>1</sup>H-NMR spectral data analysis. Bafilomycin C<sub>1</sub> showed strong antifungal activity against various phytopathogenic fungi.

고추역병균인 *Phytophthora capsici*는 Peronosporales (노균병균목) Pythiaceae(역병균과)에 속하는 Phycomycetes(조균류)의 일종으로 균사에 격막이 없는 다핵 균사체로 무성포자에 의하여 번식하는 식물병원균이다(1). 이 균은 분생포자 혹은 유주자에 의하여 전염되며 분생포자는 비, 바람등에 의하여 잎, 줄기등에 정착한 후, 기공 또는 각피를 통하여 식물체내에 침입, 발병한다. 고추역병균은 고온다습한 조건에서 발아, 발병을 유발하므로 장마시작을 전후하여 전국적으로 일시에 전반, 발병하여 방제가 매우 어려운 식물병원균이다(2).

한편, 농약이 농업생산성에 크나큰 역할을 담당함에도 불구하고 잔류독성에 의한 환경오염 및 생태계파괴는 물론, 비대상 생물에 대한 악영향등으로 사회적 문제를 야기시키고 있다. 이같은 문제를 해결하고자 자연상태에서 쉽게 분해되어 환경에 미치는 영향을 최소화 할 수 있고 대상생물에 대하여 높은 선택성을 지닌 새로운 농약의 개발을 모색해 왔으며 그 중의 하나가 미생물의 2차대사산물을 농약으로 이용하는 농업용 항생물질의 개발이다. 이와같은 연구는 1960년대 중반에 처음으로 농업용 항생물질로 개발된 살균제 blasticidin S를 시발점으로 급속히 진전하여 kasugamycin, polyoxin, validamycin 등의 살균제, avermectin, tetranactin 등의 살충제 및 bialaphos, cycloheximide 등의 제조제가 개발, 실용화되었다(3-5).

필자들은 고추역병 방제를 위하여 미생물 배양액으로부터 새로운 항고추역병성 항생물질을 탐색하던 중(6-8) *Streptomyces* sp. 3D3 균주가 강력한 항균활성을 나타내는 것을 발견하였다. 본 연구에서는 *Streptomyces* sp. 3D3 균주가 생산하는 항생물질을 분리, 정제하고 물리

화학적 특성, NMR 분석에 의한 구조결정, 생물학적 특성등을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 방선균의 분리 및 활성균주의 선발

전국각지의 경작지 및 산림지에서 채취한 토양으로부터 변형된 Bennet 배지(glucose 10 g, peptone 2 g, beef extract 1 g, yeast extract 1 g, cycloheximide 0.05 g, agar 20 g/l, pH 7.3) 및 HV agar 배지(humic acid 1 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, KCl 1.7 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g, CaCO<sub>3</sub> 0.01 g, vitamin B complex trace, cycloheximide 0.05 g/l, pH 7.2)를 분리배지로 하여 균총의 형태적 특성이 상이한 약 2,000주의 방선균을 분리, 배양하였다. 활성균주의 선발을 위해 1차적으로 고추역병균인 *Phytophthora capsici*에 대한 배양액 및 균체 아세톤 추출물의 항균활성(paper disk법)을 조사하였으며, 2차적으로 *in vivo* test(pot test)를 실시하였다. 그 결과, 고추역병균에 강한 항균활성을 나타내는 *Streptomyces* sp. 3D3 균주를 선발하였다.

#### 3D3 균주의 동정

3D3 균주의 분류학적 특성조사는 International *Streptomyces* Project(ISP)의 분류기준 및 동정방법에 준하여 행하였다(9-14).

#### 3D3 균주의 배양

Glucose-soybean meal-soluble starch 배지(soluble starch 10 g, glucose 20 g, soybean meal 25 g, beef extract 1 g, yeast extract 4 g, NaCl 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g/l, pH 7.3)를 이용하여 5L jar fermentor(한국발효기)에서 배양하였으며, 배양조건은 다음과 같다. 500 ml 삼각

\*Corresponding author.

Key words: *Phytophthora capsici*, phytophthora blight, bafilomycin C<sub>1</sub>

flask 상에서 배양된 전배양액을 1% 수준으로 jar fermentor에 접종하고 27°C, 1 vvm, 250 rpm 조건하에서 5일간 배양하였다. 배양중 매 24시간마다 배양액을 채취하여 균생육정도, pH 및 항균활성을 조사하였다.

**구조분석 및 이화학적 특성조사**

구조분석을 위한 NMR측정은 JEOL GX-500 NMR spectrometer를 사용하였으며 내부표준물질은 TMS(tetramethylsilane)를, 용매는 CDCl<sub>3</sub>를 사용하였다. UV spectrum은 ethanol을 용매로 하여 Shimadzu UV-260 spectrophotometer로 측정하였으며 TLC 분석은 Merck사 제품의 silica gel 60 F<sub>254</sub>를 이용하였다.

**생물활성**

항균활성은 세균, 효모, 곰팡이 등을 대상으로 paper disc법(7)에 의하여 조사하였으며 disc 당 50 µg의 시료를 처리하였다. 고추역병에 대한 *in vivo* 활성은 6×6 cm 크기의 pot에 고추묘 2주씩을 이식하여 5엽기까지 생육시킨 후 사용하였다. 조사방법은 각 pot당 *Phytophthora capsici*의 포자현탁액 1 ml을 접종하고, 활성물질의 정제과정 중 ethylacetate 추출물을 단계적 농도로 처리하여 항고추역병 활성을 조사하였다.

**결과 및 고찰**

**선발균주의 동정**

3D3 균주의 배양적 특성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. Yeast-malt extract agar, glycerol-asparagine agar, tyrosine agar 배지에서 기균사의 생육 및 포자형성이 양호하였으며 균총색은 적회색을 나타내었다. 배지이면의 색은 분홍색을 띠며 oatmeal agar 배지에서는 연한 황갈색의 수용성 색소를 생성하였다.

포자사슬은 나선형, 포자모양은 난형으로 전자현미경에서 관찰된 표면의 모양은 smooth 형에 속하였다(Fig. 1). 세포벽 구성 성분중 LL-diaminopimelic acid를 함유하고 있으며 melanin 색소는 생성하지 않았고 전분 및 casein을 가수분해하며 NaCl에 대한 내염성은 7% 이하였다. 12종의 탄소원을 대상으로 당이용성을 조사한 결과 D-fructose, galactose, D-glucose, D-mannitol 등은 잘

이용하였으나 myo-inositol, raffinose, rhamnose, salicin, sucrose, cellulose 등은 이용하지 못하였다(Table 2).

이상의 분류학적 특성을 토대로 ISP 분류 key 및 기타 방선균 분류기준과 비교검토한 결과 본 균주는 *Streptomyces*속에 속하는 것으로 동정하였으며 그 중 *S. xantholiticus*, *S. capuensis*, *S. argenteolus* 등과 유사한 분류학적 특성을 지녔으나, 각 균주 공히 배지이면의 특성 및 탄소원 이용등에서 차이를 나타냄으로써 본 균주를 *Streptomyces* sp. 3D3으로 명명하였다.

**항생물질의 발효**

배양일수에 따른 *Streptomyces* sp. 3D3 균주의 항생물질 생산성, 생육정도 및 pH의 경시적 변화를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 활성 물질은 배양 2일째부터 생

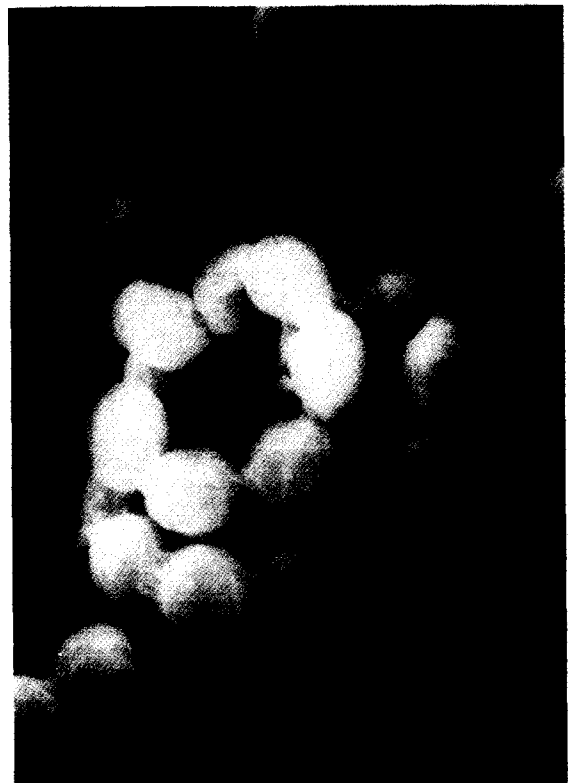


Fig. 1. Electronmicrograph of aerial spore chains of strain 3D3 (bar: 2 µm).

Table 1. Cultural characteristics of strain 3D3.

Media	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Reverse side color	Soluble pigment
Yeast-malt extract agar	Abundant, reddish grey	Poor, white	Coral red	none
Oatmeal agar	Moderate, grey	Good, white	Coral red	brown gold
Inorganic salts-starch agar	Scant, reddish grey	Poor, white	Reddish grey	none
Glycerol-asparagine agar	Good, reddish red	Moderate, white	Grey	none
Peptone-yeast extract agar	None	Moderate, white	Yellow ochre	none
Tyrosine agar	Abundant, reddish grey	Moderate, white	Yellow ochre	none

**Table 2. Morphological and physiological characteristics of strain 3D3.**

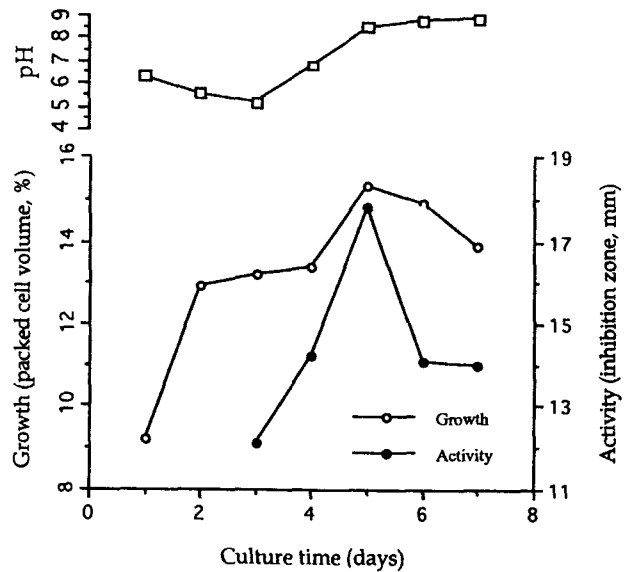
Spore chain morphology	Spiral
Spore type	Oval
Spore size	0.6×0.7~0.8 μm
Spore surface	Smooth
Aerial mass color	Reddish grey
Cell wall constituent	LL-DAP
Formation of melanoid pigment	
Tryptone-yeast extract broth	-
Peptone-yeast extract-iron agar	-
Tyrosine agar	-
Liquefaction of gelatin	+
Coagulation of skim milk	-
Hydrolysis of starch	+
Hydrolysis of casein	+
Tolerance of NaCl	below 7%
Optimal growth temperature	24~27°C
Utilization of	
L-Arabinose	±
D-Fructose	+
Galactose	+
myo-Inositol	-
D-Mannitol	+
Raffinose	-
Rhamnose	-
Salicin	-
Sucrose	-
Cellulose	-
D-Xylose	±

성되어 배양 5일째에 가장 높은 생산성을 보였고 균의 생육 또한 배양 5일째가 가장 좋았다. 배양 중의 pH 변화를 조사한 결과 배양초기에는 pH 5 부근까지 저하하였으나 배양 3일째부터 증가하기 시작하여 8일째에는 pH 9 부근에 이르는 전형적인 방선균의 생육양상을 나타내었다.

#### 활성물질의 분리 및 정제

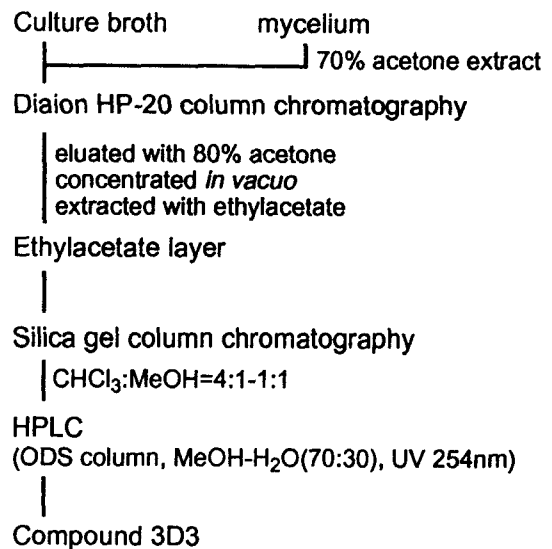
활성물질의 분리, 정제 과정을 Fig. 3에 나타내었다. 5일간 배양한 균 배양액을 원심분리한 후, 그 상등액과 70% acetone으로 추출한 균사체 추출물을 혼합한 후, Diaion HP-20 resin에 흡착, 70% acetone으로 활성물질을 용출하였다. 용출된 활성분획을 농축한 후 ethylacetate로 추출하고, 유기용매층을 농축 후 silica gel column chromatography(chloroform-methanol=4:1:1)를 수행하였다. 최종적으로 HPLC(ODS column, φ10×300 mm, 70% CH<sub>3</sub>CN, UV 254 nm)에 의하여 활성물질을 순수분리하였다.

#### 활성물질의 물리화학적 특성 및 구조분석



**Fig. 2. Fermentation profiles for the production of compound 3D3.**

The fermentation was carried out in a 5-liter jar fermentor at 27°C, 1 vvm and 250 ppm.



**Fig. 3. Isolation procedure of compound 3D3 produced by *Streptomyces* sp. 3D3.**

3D3 균주가 생산하는 항생물질은 백색분말로 UV 245, 285 및 330(sh.) nm에서 최대 흡수 피크를 나타내었으며 산, 알칼리조건에서 장파장 shift를 보였다. 본 화합물의 관능기를 조사하기 위하여 발색반응을 조사한 결과 bromocresol green, vanillin, 2,4-dinitrophenylhydrazine 반응에서는 양성이었으며 ninhydrin, Dragendorff's reagent, ferric chloride 반응에서는 음성으로 나타났다. 이들의 물리화학적 특성 및 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼(Fig. 4)의 분석결과 본 활성물질은 macrolide계의 bafilomycin(15-18)과 매우 유사함을 알 수 있었다. 즉 6.66(s), 6.50(d), 5.80

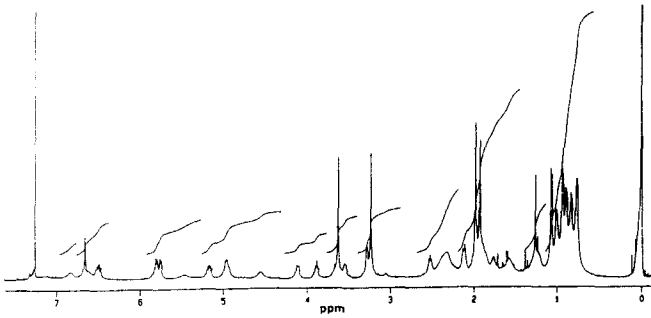


Fig. 4. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound 3D3 (CDCl<sub>3</sub>).

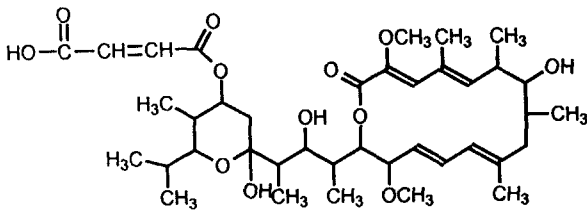


Fig. 5. Structure of bafilomycin C<sub>1</sub>.

(d), 5.75(d), 5.17(dd) ppm에 bafilomycin의 불포화 lactone ring에 유래하는 olefinic proton signal, 3.63 및 3.24 ppm에 methoxy signal, 4.96, 4.11, 3.89, 3.56, 3.28 ppm에서 oxymethine signal 등이 관찰되었으며 이들의 chemical shift치는 bafilomycin의 chemical shift치와 일치함을 알 수 있었다. Bafilomycin은 A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> 등 6종류가 보고되어 있으며, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>는 구조 중에 fumarylester group을 지녔으며 그로 인해 산, 염기 조건하에서 UV shift를 나타낸다. 본 화합물 또한 산, 염기 처리시 UV shift를 보여 bafilomycin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> 중의 하나로 추정되었으며, CHCl<sub>3</sub>-MeOH(9 : 1)을 전개용매로 하여 TLC plate 상에서의 R<sub>f</sub>치를 비교한 바 본 화합물은 bafilomycin C<sub>1</sub> 및 C<sub>2</sub>와 유사한 것을 알 수 있었다. Bafilomycin C<sub>1</sub> 및 C<sub>2</sub>의 구조상의 차이는 C<sub>1</sub>의 경우는 methoxy가 2개, C<sub>2</sub>의 경우는 methoxy가 3개 존재한다. 본 화합물은 3.23 및 3.63 ppm에서 2개의 methoxy signal만이 관측되었으므로 bafilomycin C<sub>1</sub>(Fig. 5)으로 동정되었다.

**활성물질의 생물활성**

그람 양성·음성 세균, 곰팡이, 효모등을 대상으로 항균활성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 그람 양성세균에는 전반적으로 약한 활성을 나타내었으며 그람 음성 세균에는 세포벽이 소실된 *Pseudomonas aeruginosa* N10 외에는 활성을 나타내지 않았다. 또한 고추역병균인 *Phytophthora capsici*를 포함하여 *Phytophthora parasitica*(참깨역병균), *Botrytis cinerea*(오이 잿빛 곰팡이병균), *Alternaria mali*(사과 점무늬 낙엽병균) 등의 식물 병원성 곰팡이에 대하여 광범위한 항균활성을 나타내었다. 한편

**Table 3. Antimicrobial spectra of compound 3D3 produced by *Streptomyces* sp. 3D3.**

Test microorganisms	Inhibition zone diameter (mm)
<b>Bacteria</b>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	16
<i>Mycobacterium phlei</i>	12
<i>Bacillus subtilis</i>	11
<i>Escherichia coli</i>	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 13130	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> N 10	11
<b>Fungi</b>	
<i>Phytophthora capsici</i>	23
<i>Phytophthora parasitica</i>	27
<i>Botrytis cinerea</i>	22
<i>Alternaria mali</i>	18
<i>Fusarium solani</i>	0
<b>Yeast</b>	
<i>Candida albicans</i>	0

**Table 4. In vivo antifungal activity of compound 3D3.**

Concentrations (ppm)	250	60
Preventive value (%)	83	50

고추역병에 대한 *in vivo* 활성을 조사한 결과를 Table 4에 나타내었다. 정제과정 중 ethylacetate 추출물을 단계적 농도로 희석하여 분무 처리한 결과, 60 mg/l에서 50%의 방제율, 250 mg/l에서 83%의 방제율을 나타내었으며 이때 사용한 시료의 순도는 HPLC 상에서 대략 10% 정도이었다.

Bafilomycin은 그람양성 세균, 곰팡이, 효모등에 대한 항균활성과 함께 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 저해활성이 있는 것으로 보고된 바 있다(15-18). 그러나 bafilomycin C<sub>1</sub>(Fig. 5)이 고추역병균에 대하여 강한 방제효과를 나타내는 것은 본 연구에 의하여 처음으로 밝혀졌다.

**요 약**

미생물 배양액을 이용하여 고추역병방제를 위한 농업용 항생물질을 탐색하던 중 고추역병균인 *Phytophthora capsici*에 강한 항균활성을 나타내는 3D3 균주를 선발하였다. 선발된 균주의 배양적, 형태적, 생리적 특성을 조사한 결과 *Streptomyces*속에 속하는 것으로 동정하였고 따라서 *Streptomyces* sp. 3D3으로 명명하였다. 배양액으로부터 HP-20 column chromatography, EtOAc extraction, silica gel column chromatography 및 HPLC에 의하여 활성물질을 분리 정제하였으며, 발색반응, UV

흡수,  $^1\text{H-NMR}$  등 각종 spectrum 분석을 통하여 본 활성물질을 bafilomycin C<sub>1</sub>으로 동정하였다. *Streptomyces* sp. 3D3이 생산한 compound 3D3은 다양한 식물 병원성 곰팡이에 대하여 강한 항균활성을 나타내었다.

### 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.
- Omura, S. 1992. The Search for Bioactive Compounds from Microorganisms, Pp. 213-262 Springer-Verlag, Tokyo.
- 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.
- 岡田齊夫, 坂齊, 玉木佳藍, 本吉總監. 1991. Bio農藥生育調節劑開發利用 manual, Pp. 293-305. Life science Information Center.
- 이인경, 김창진, 김신덕, 유익동. 1990. *Streptomyces parvulus* 균주가 생산하는 항고추 역병성 항생물질. 한국산업미생물학회지 **18**: 142-147.
- 김창진, 유익동, 이인경, 윤봉식. 1991. 과채류 병해방제용 유용항생물질 탐색에 관한 연구(I), 과학기술처 연구보고서, Pp. 1-77.
- 김창진, 이인경, 윤봉식, 유익동. 1993. *Streptomyces neyagawaensis* 38D10 균주가 생산하는 concanamycin B의 항고추역병 활성. 한국산업미생물학회지 **21**: 322-328.
- Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Method for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
- 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.
- 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.
- 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.
- Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1972. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* V. Additional description. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **22**: 265-394.
- Nomura, H. 1974. Key for classification and identification of 458 species of the *Streptomyces* included in ISP. *J. Ferment. Technol.* **52**: 78-92.
- Hensens, O.D., R.L. Monaghan, L. Huang, and G. Albers-Schönberg. 1983. Structure of the sodium and potassium ion activated adenosinetriphosphatase inhibitor L-681,110. *J. Am. Chem. Soc.* **105**: 3672-3679.
- Werner, G., H. Hagenmaier, K. Albert, H. Kohlshorn, and H. Drautz. 1983. The structure of the bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. *Tetrahedron Lett.* **24**: 5193-5196.
- Werner, G., H. Hagenmaier, H. Drautz, A. Baumgartner, and H. Zähler. 1984. Metabolic products of microorganisms. 224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. *J. Antibiotics* **37**: 110-117.
- Huang, L., G. Albers-Schönberg, R.L. Monaghan, K. Jakubas, S.S. Pong, O.D. Hensens, R.W. Burg, D.A. Ostlind, J. Conroy, and E.O. Stapley. 1984. Discovery, production and purification of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> activated ATPase inhibitor, L-681,110 from the fermentation broth of *Streptomyces* sp. MA-5038. *J. Antibiotics* **37**: 970-975.

(Received 29 September 1995)