

Aspergillus terreus로부터 항진균성 물질의 분리 및 구조분석

김근기 · 박기훈 · 문석식¹ · 강규영*

경상대학교 농화학과, ¹공주대학교 화학과

초 록 : 시설내 토양으로부터 식물병원균에 활성을 갖는 길항균을 탐색하는 과정에서 주요 식물 병원균인 *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* 및 *Fusarium oxysporum*에 활성을 갖는 4종류의 길항균(AF1, AF2, AF3, AF4)을 분리하였다. 이들중 가장 높은 활성을 나타낸 AF2균을 동정한 결과, 생육한 균은 짙은 오렌지색과 황갈색을 띄었으며, 현미경의 morphology는 column형의 conidial head와 foot cell로부터 끈게 뺀 분생자와 2중층의 포자낭병을 형성했다. 그리고 MY20 agar 배지에서 투명한 둥근세포의 형성등이 *Aspergillus terreus*의 형태와 일치 하였다. Pot에서 병원균과 *A. terreus*를 동시에 처리하여 오이의 생육을 조사한 결과, 토양중량당 *A. terreus*의 균체를 1% 처리에 40%, 5% 처리에 57%, 10% 처리에는 75% 병발생율을 억제시켰다. 그리고 *A. terreus*의 배양여액으로부터 activity-guided fractionation을 실시하여 항진균성 물질인 화합물 I 을 얻었다. ¹H, ¹³C NMR, DEPT, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC 및 질량스펙트럼을 분석한 결과 화합물 I 은 butyrolactone I (α -oxo- β -(p-hydroxyphenyl)- γ -(p-hydroxy-m-3,3-dimethyl-allylbenzyl)- γ -methoxycarbonyl- γ -butyrolactone, C₂₄H₃₀O₇, M.W. = 424)로 동정되었다.(1997년 11월 26일 접수, 1997년 12월 15일 수리)

서 론

우리나라 시설원예는 1960년대 농업용 필름이 생산 보급되면서 급속히 발전하였다. 현재 국내의 시설하우스 재배면적은 1995년 현재 44,790 ha로 최근 연평균 15%의 신장을 거듭하고 있다.¹⁾ 하우스내 재배환경은 기존의 농업환경에 비해 더욱 집약적이며, 그 생태적, 재배적 환경도 크게 다르다. 고온다습한 환경 및 연작에 의한 병해충발생이 심한 반면,²⁾ 밀폐된공간에서의 농약살포로 인한 작업환경의 열악성, 다량의 시비와 고온에 의한 염류집적등³⁾ 재배환경의 특수성을 들 수 있다. 이러한 시설내의 특수환경에 적합한 병해충방제 system을 개발하여 농약사용의 최적화가 절실하다고 본다 이를 위한 일환으로 무공해 생물농약의 개발에 대한 관심이 점차 높아지고 있으며, 특히 길항균을 이용한 생물농약으로의 접근이 많은 연구자들에 의해 진행되고 있다.⁴⁻⁷⁾

시설하우스내 토양미생물의 균총을 soil dilution agar법⁸⁾으로 배양한후 근접한 균의 생육을 억제시키는 4종류의 곰팡이 AF1, AF2, AF3, 및 AF4를 각각 분리하였다. 이렇게 분리된 균을 주요 식물병원균인 *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* 및 *Fusarium oxysporum*과 대치배양하여 병원균들의 생장저해 작용 스펙트럼을 조사하였다.

이들중 AF2가 가장 높은 활성을 나타내는 길항곰팡이였으며, 이 곰팡이는 *Aspergillus terreus*로 동정되었다. *A. terreus*를 배양하여 배양액으로부터 항곰팡이성 화합물 I 을 분리하고 이것의 구조를 2D-NMR(¹H-¹H COSY,

HMQC, HMBC)를 이용하여 동정하였기에 그 결과를 보고한다.

*A. terreus*는 불완전 사상균으로 칼럼형 포자를 형성하여 담황색 또는 황갈색을 띤다. 또한 이 균은 aspergillosis의 원인균중의 하나로 간주되고⁹⁾ 있으나, cdc2 와 cdk2 kinase^{10,11)}를 저해하는 butyrolactone I과 그 유도체^{12,13)}에 대한 연구, 그리고 벼의 잎집무늬마름병 발생을 억제¹⁴⁾하는 길항균으로도 알려져있다.

재료 및 방법

길항균의 분리 및 배양

시설하우스 토양으로부터 토양미생물의 균총을 soil dilution agar법⁸⁾으로 30°C에서 배양하면서 근접미생물의 생육을 저해시키는 수종의 곰팡이를 1차 분리하였다. 이들중 주요작물 병원균의 생육을 저해시키는 길항곰팡이(antagonistic fungi) AF1, AF2, AF3, AF4를 각각 분리하였다. 그중 가장 항균활성이 큰 AF2 균주를 선발하여 실험에 이용했다. AF2는 modified Czapek-Dox medium(CDM: KNO₃대신 2 g/l asparagine)으로 30°C에서 150 rpm으로 6일간 배양하고 배양여액으로부터 길항물질을 분리하였다.

길항균의 동정

선발된 AF2균을 1/5 PDA 배지에 배양한 후 일반적인 형태와 현미경 morphology를 관찰하고, Raper 등이⁹⁾ 발표한 균 동정법에의해 균을 동정하였다.

찾는말 : *Aspergillus terreus*, 식물병원균, butyrolactone I, 항진균성 물질

*연락처

식물 병원균 및 길항균의 항균스펙트럼

실험에 사용한 식물병원균은 *P. capsici*(역병), *B. cinerea*(잿빛곰팡이), 및 *P. ultimum*, *R. solani*, *F. oxysporum*(토양병원균)으로 한국 화학연구소에서 분양받아 사용하였다. 항균스펙트럼을 petri plate 대치배양으로 조사했다. 배지는 1/5 strength PDA 로 각 병원균과 AF1~4균을 동시에 접종하여 28°C에서 1~6일간 배양한 다음 inhibition zone을 측정하여 항균활성을 조사하였다.

Pot에서 오이 생육 검정

분리한 길항균과 주요 토양 병원균을 동시에 처리한 pot에서 오이의 생육상태를 검정했다. 토양 병원균인 *P. ultimum*, *F. oxysporum*, 그리고 *R. solani*의 mixture를 pot 토양 중량당 1% 되게 처리하고, 길항균을 각각 1%, 5%, 10% 수준으로 처리하여 온실에서 4-5일 배양함으로 인해 병원균과 길항균의 상호작용을 유도시킨 후 균일하게 밭아시킨 오이를 파종하여 오이의 생육상태를 관찰했다.

유효성분의 분리

AF2 균을 CDM배지에서 6일간 배양한 다음 배양액 10 l를 cheese cloth (4 layer)로 여과한 다음 chloroform(3 l × 3)로 추출하였다. 유기층을 brine 으로 씻고 Na₂SO₄로 건조시킨다음 감압농축시켜 암갈색의 조추출물 3.5 g을 얻었다. 조추출물을 silica gel(230-400 mesh)로 충전시킨 column(3 × 20 cm)에 loading하여 chloroform/acetone의 비율을 순차적으로 높이면서 (100/1 → 10/1 → 1/1) 용리시켜 27개의 fraction 을 얻었으며, 이 분획물들에 대한 항균 실험을 수행하였다. 활성분획을 감압농축하여 60 mg의 연노란색 혼합물을 얻었다. 이 혼합물을 silica gel 로 충전된 column(1 × 20 cm)에 loading 시켜 Hexane/EtOAc 의 비율을 순차적으로 높이면서 (5/1 → 2/1) 로 용리시켜 항곰팡이성 물질인 화합물 I 을 16 mg 얻었다. *R_f*: 0.61 (Hexane : Ethylether : Acetone : Methanol = 2 : 6 : 2 : 1)(Fig. 3. A).

구조분석

적외선 스펙트럼은 Bruker IFS 66분광기를 사용하여 얻었으며, 자외선-가시광선 스펙트럼은 Beckman Du-70분광기를 이용하여 얻었다. 고유광회전도 값은 JASCO DIP-370 polarimeter를 이용하였다. 핵자기공명(¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC) 스펙트럼은 Bruker-AW500 분광기를 이용하여 얻었다. 화학적 이동값은 tetramethyl silane(TMS)을 내부기준물질로 하여 ppm으로 나타내었다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 나타난 단일선, 이중선 및 다중선을 각각 s, d, m 으로 표시하였다. 질량스펙트럼은 JMS-DX300 분광기를 사용하였다.

결과 및 고찰

길항균의 분리 및 동정

시설하우스내 토양으로 부터 근접한 균의 생육을 억제시

키는 4종류의 길항균 AF1, AF2, AF3, AF4를 각각 분리하였다. 이들 분리균을 *P. capsici*, *B. cinera*, *R. solani*, *P. ultimum* 및 *F. oxysporum*과 대치배양하여 병원균들의 생장저해 작용 스펙트럼을 얻었다. 그 결과 AF2가 가장 높은 항균활성을 보였으며, 균동정을 위해 균의 morphology를 관찰했다. 1/5 PDA 배지에 생육한 균은 짙은 오렌지색과 황갈색을 띄었으며, 현미경의 morphology는 column형의 conidial head와 foot cell로 부터 끈게 뻗은 분생자와 2중층의 포자낭병을 형성했다. 그리고 MY20 agar 배지에서 생육한 균의 균사에 투명한 등근세포의 형성등이 *Aspergillus terreus*의 형태와 일치 하였다.

Pot에서 오이 생육 검정

Pot에 병원균과 *A. terreus*를 동시에 처리하여 오이의 생육을 검정한 결과, 병원균 *P. ultimum*, *F. oxysporum*, *R. solani*의 mixture를 각각 1% 처리한 Pot에서는 93.4%의 병발생율을 보였으나, *A. terreus*접종원을 1%, 5%, 10% 처리한 pot에서 각각 53.3%, 26.7%, 20.0%의 병발생율을 보였다. 즉 길항균을 접종한 토양 혼합물 1% 처리에 40%, 5% 처리에 57%, 10% 처리에는 75% 병발생율을 억제시킬 수 있었다(Fig. 1).

항균물질의 순수분리 및 구조분석

항균물질을 배양여액의 열처리로 조사한 결과 항균물질의 분비임을 알고, 6일동안 배양한 *A. terreus*배양액의 chloroform 분획물을 fresh-chromatography를 반복적으로 수행하여 항곰팡이성 물질인 화합물 I 을 얻었다. 화합물 I 은 UV(254 nm), phosphomolybdic acid(PMA) 및 ninhydrine용액에 양성반응을 나타내었다.

순수분리한 화합물 I (Fig. 2. A)은 20 µg을 처리한 paper disc assay법으로 주요 작물병원균에 대한 항균스펙트럼을 조사한 결과, 강력한 생육억제 현상을 보였다(Fig. 2. B).

순수분리한 화합물 I 은 구조규명을 위해 기기분석을 실시했다. ¹H-NMR 스펙트럼 (Table 1)에서 AB형태의 스핀분리(J = 8.25 Hz)가 7.08 ppm의 2H(d)와 6.86 ppm의 2H(d)사이에서 관찰되었고, ¹H-¹H COSY 스펙트럼에서 이들 양성자들 사이의 cross피크가 관찰되었다. 아울러 HMQC스펙트럼에서 130.4 ppm과 116.6 ppm의 탄소 피크와 각각 연결되어 있음이 관찰되었다. 이것은 화합물 I 의 1,4 위치에 치환체를 가진 벤젠고리에 2'-H와 6'-H 그리고 3'-H 와 5'-H가 각각 대칭적으로 존재함을 알려준다. ¹H-



Fig. 1. Antagonistic effect of antagonistic fungus(AF2) on cucumber growth inoculated with mixed pathogens.

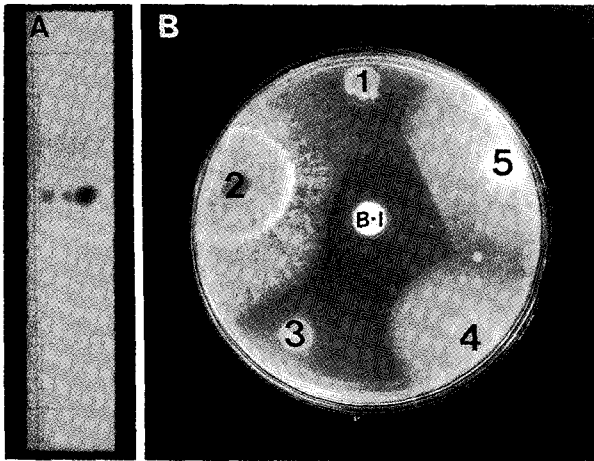


Fig. 2. The purified antifungal compound and its biological activity by petriplate assay. A : Purified antifungal compound I identified on a TLC plate (Hexane : Ethylether : Acetone : Methanol = 2 : 6 : 2 : 1). B : Biological activity of purified antifungal compound on phytopathogenic fungus (①, *R. solani*; ②, *B. cinerea*; ③, *P. ultimum*; ④, *F. oxysporum*; ⑤, *P. capsici*; (B I), Butyrolactone I-20 μ g was applied on a paper disc).

Table 1. ^1H - and ^{13}C -NMR spectral data of compound I (in CD_3OD , 500 MHz, chemical shift in ppm).

Carbon No.	δC	δH
1	170.3	
2	139.7	
3	123.2	
4	86.9	
5	39.7	3.42 (m, 2H)
6	171.6	
7	53.8	3.77 (s, 3H)
1'	128.5	
2'+6'	130.4	7.08 (d, J=8.25Hz, 2H)
3'+5'	116.6	6.86 (d, J=8.25Hz, 2H)
4'	159.3	
1''	125.1	
2''	129.8	6.54 (dd, J=8.15, 2.04Hz, 1H)
3''	115.1	6.52 (d, J=8.15Hz, 1H)
4''	155.1	
5''	133.0	
6''	132.4	6.42 (d, J=2.15Hz, 1H)
7''	28.7	3.08 (m, 1H)
8''	123.6	5.06 (m, 1H)
9''	129.3	
10''	25.9	1.66 (s, 3H)
11''	17.8	1.57 (s, 3H)

NMR스펙트럼에서 6.54 ppm ($2''\text{-H}$)의 1H (dd, J=2.04, 8.15 Hz)와 6.52 ppm ($3''\text{-H}$)의 1H (d=8.15 Hz)가 관찰되고 $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ COSY 스펙트럼에서 이들 양성자 사이에만 cross peak가 나타난 것은 $2''\text{-H}$ 와 $3''\text{-H}$ 가 서로 vicinal로 존재하고 또다른 양성자는 이웃하지 않고, 즉 4차탄소($1''\text{-C}$ 와 $4''\text{-C}$)가 있다는 것을 나타낸다. $2''\text{-H}$ (6.54 ppm)의 스핀분리가 d가 아니고 dd인 것은 allylic 위치, 즉 5-H의 존재함을 나타낸다. 6.42 ppm의 양성자가 이중선(d)이지만 J 값이 2.54 Hz로 대단히 작은 것은 이웃하는 양성자가 없이, 즉 양쪽에 4차탄소($5''\text{-C}$, $1''\text{-C}$)가 존재하고 allylic 위치에 5-H가 존재함을 나타낸다. $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ COSY 스펙트럼에서 5.06 ppm ($8''\text{-H}$)의 양성자가 3.08 ppm ($7''\text{-2H}$)의 양성자 및 1.68 ppm ($10''\text{-3H}$)와 1.57 ppm ($11''\text{-3H}$)의 양성자들과 각각 상관관계가 있는 것은 화합물 I이 2-methyl-2-butenyl기를 가지고 있음을 쉽게 알 수 있다. 3.77 ppm의 3개의 양성자는 methylester가 있음을 확인시켜준다. HMBC 스펙트럼에서 6.54 ppm의 양성자 ($2''\text{-H}$) 및 6.42 ppm의 양성자 ($6''\text{-H}$)가 155.1 ppm의 탄소와 각각 cross 피크가 있는 것은 $4''\text{-C}$ 위치에 OH기가 붙어 있음을 나타낸다. 왜냐하면 155.1 ppm 부근의 탄소는 전형적으로 OH기가 붙어있는 방향족 탄소를 의미하기 때문이다. 같은 이유에서 7.08 ppm의 2개의 양성자 ($2'+6'$)가 HMBC스펙트럼에서

159.3 ppm의 탄소와 cross 피크가 있는 것은 $4'\text{-C}$ 에 OH기가 붙어 있음을 확인시켜준다. 또한, HMBC 스펙트럼에서 6.42 ppm의 양성자($6''\text{-H}$)와 2-methyl-2-butenyl기에 존재하는 $7''\text{-C}$ (29.7 ppm)와 cross 피크가 있는 것은 2-methyl-2-butenyl기가 $5''\text{-C}$ 에 붙어 있음을 확인시켜준다. HMBC 스펙트럼에서 $2''\text{-H}$ (6.54 ppm) 및 $6''\text{-H}$ (6.42 ppm)의 2개의 양성자가 39.7 ppm (5-C)의 탄소와 cross 피크가 있는 것은 C-5가 $1''\text{-C}$ 에 연결되어 있음을 말해준다. 적외선 스펙트럼에서 3500 cm^{-1} 및 1740 cm^{-1} 에서 OH기 및 ester와 lactone의 carbonyl기가 관찰되었다. 질량스펙트럼에서 분자량($m/e = 424$)이 확인되었고, 원소분석에서 C : 67.6%, H : 5.4%, (이론치; C : 67.9%, H : 5.7%)는 화합물 I의 분자식인 $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_7$ 와 잘 일치하였다. 분광학적인 자료를 종합할 때 화합물 I은 1977년 Kiriya 등 이들은 *Aspergillus terreus* var. *africanus* IFO 8835의 건조균체로부터 석유에테르 추출물을 얻어 순수분리한 후 이 화합물을 구성부분별로 합성, 산화 및 환원분해 과정을 거치고 또 이들 자료를 재조합하여 확인한 butyrolactone I (α -oxo- β -(p-hydroxyphenyl)- γ -(p-hydroxy-m-3,3-dimethylallylbenzyl)- γ -methoxycarbonyl- γ -butyrolactone)임이 확인되었다(Fig. 3). 이어 butyrolactone I의 구조는 생합성되는 과정을 이용하여 확인되었다. 경작도양에서 분리한 길항균으로부터 그 물질의 활성이 확인되고, 순수분리하여 이들의 구조를 GC/Mass, 2D-NMR 등을 이용한 전체적인 구조분석은 본 연구가 처음이다.

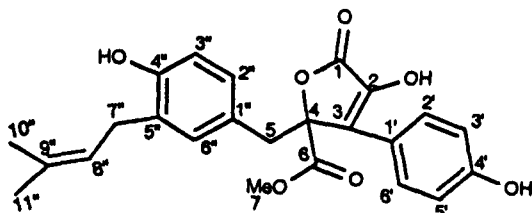


Fig. 3. Chemical structure of compound I.

이후 Butyrolactone I은 cycline dependent kinase(cdk)의 cdk2와 cdc kinase를 선택적으로 저해하며, retinoblastoma protein(pRB)의 인산화와 세포주기의 진행저해제로서 작용을 한다는 것이 알려졌다.^{10,11)}

감사의 글

본 연구는 1996년도 교육부 학술연구지원 및 1997년도 한국과학기술재단 연구지원(post-Doc)에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며, 연구비 지원에 대하여 감사드립니다.

참고문헌

1. 강상현 (1995) 우리나라의 원예시설 단지화 현황. 한국 생물 생산시설 환경학회 **4**(2), 7-11.
2. 추호열, 김희규, 박중춘, 이상명, 이정임 (1987) 남부지방 시설원예의 유형과 재배환경 및 병해충발생에 관한연구. 충발생 양상과 상토의 선택에 따른 뿌리혹선충의 발생. 한국 식물보호학회지 **26**, 195-201.
3. 엄성균, 강위급, 하호성, 박중춘 (1979) 남부지방 시설원예지대의 하우스내 토양의 화학적 성질에 관한 연구. 한국원예학회지 **20**(1), 36-46.
4. Lewis, J. A., and G.C. Papavizas (1987) Permeability Change in Hyphae of *Rhizoctonia solani* Induced by germinating preparations of *Trichoderma* and *Glodadium*. *Physiol. & Biochem.* **77**, 699-703.
5. Kommedahl, T., and I. C. Mew (1974) Biocontrol of Corn Root infection in field by seed treatment with antagonists. *Phytopathology* **65**, 296-300.
6. Burr, T. J., M. N. Schroth, and T. Scshow (1978) Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. *Phytopathol.* **68**, 1377-1383.
7. Radheshyam, K. J., A. F. Marcel and G. S. Ralph (1970)

- Isolation and Characterization of a *Pseudomonas* strain that restricts growth of various phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1054-1058.
8. Allen, O. N. (1957) In Experiments in soil bacteriology. Ed. 3. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn.
 9. Raper, K. B., D. I. Fennell, and P. K. C. Austwick (1973) The genus *Aspergillus*. Robert E. Krieger Publishing Co. New York.
 10. Kitagawa, M., T. Okabe, H. Ogino, H. Matsumoto, I. Suzuki-Takahashi, T. Kokubo, H. Higashi, S. Saitoh and A. Okuyama (1993) Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase. *Oncogene* **8**, 2425-2432.
 11. Kitagawa, M., H. Higashi, I. S. Takahashi, T. Okabe, H. Ogino, Y. Taya, S. Nishimura, and A. Okuyama (1994) A cyclin-dependent kinase inhibitor, butyrolactone I, inhibits phosphorylation of RB protein and cell cycle progression. *Oncogene* **9**, 2549-2557.
 12. Kiriyaama, N., K. Nitta, Y. Sakaguchi, Y. Taguchi, and Y. Yamamoto(1977) Studies on the Metabolic Products of *Aspergillus terreus*. III. Metabolites of the Strain IFO 8835. (1). *Chem. Pharm. Bull.* **25**, 2593-2601.
 13. Nitta, K., N. Fujita, T. Yoshimura, K. Arai, and Y. Yamamoto (1983) Metabolic Products of *Aspergillus terreus*. IX. Biosynthesis of Butyrolactone Derivatives isolated from Strain IFO 8835 and 4100. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 1528-1535.
 14. Robin, G., A. K. Roy, and R. Gogoi (1996) Effect of soil pH and media on the antagonism of *Aspergillus terreus* to the rice sheath blight fungus. *Indian Phytopathology* **49**, 32-36.

Isolation and Structure Identification of Antifungal Substance from *Aspergillus terreus*

Keun-ki Kim, Ki-Hun Park, Suk-sik Moon¹ and Kyu-Young Kang^{*}(*Gyeongsang National University, Department of Agricultural Chemistry, Chin-ju 660-701, Korea.*, ¹*Kongju National University, Department of Chemistry, Kongju 314-701, Korea*)

Abstract : In the course of search antagonistic fungi from soil in green house, four kind of fungi (AF1, AF2, AF3, AF4) were isolated, which have activities against *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinera*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* and *Fusarium oxysporum*. The AF2 was identified according to the morphological description of *Aspergillus terreus*. This antagonistic fungus inhibiting various plant pathogens was effective to reduce disease incidence of cucumber seedlings caused by mixed inoculum of *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* and *Fusarium oxysporum*. Antifungal compound I was isolated and purified by fresh chromatography from *A. terreus*. The ¹H and ¹³C assignment of compound I was achieved from two-dimensional ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC with the add of homonuclear and heteronuclear double resonance experiment. The compound I was identified butyrolactone I (α -oxo- β -(p-hydroxyphenyl)- γ -(p-hydroxy-m-3,3-dimethyl-allylbenzyl)- γ -methoxy-carbonyl- γ -butyrolactone, C₂₂H₂₆O₇, M.W. = 424).

Key words : *Aspergillus terreus*, plant pathogen, butyrolactone I, antifungal substance.

^{*}Corresponding author