

## *Streptomyces hygroscopicus* MJM1004가 생산하는 항진균성 항생 물질의 분리 및 구조 결정

배주윤 · 권형진 · 서주원\*

명지대학교 생명공학연구소, 생명과학과

**초 록** : 새로운 천연물 농약 또는 생산균주를 개발하기 위하여 *Streptomyces* 속의 여러 균주를 대상으로 항진균 물질을 탐색하여 항진균 물질 생산 균주 *Streptomyces hygroscopicus* MJM1004를 선발하였다. 항진균 물질의 생산을 위한 발효 배지를 선정하기 위하여 여러 탄소원, 질소원과 무기원을 대상으로 균체 성장 정도와 항진균 물질의 생산성을 조사하였으며, 생산 배지는 2% soybean meal, 1% glucose, 2% starch, 0.3% CaCO<sub>3</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.05% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 조성으로 하였다. *S. hygroscopicus* MJM1004 균주의 균체에서 추출된 항진균 물질은 *Candida albicans*와 여러 식물 병원성 곰팡이들에 대하여 광범위한 저해 효과를 나타내었다. *S. hygroscopicus* MJM1004 균체로부터 분리된 항진균 물질, SH-1004를 핵자기공명법(<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DQF COSY, HMQC 및 HMBC)을 통하여 분석한 결과 azalomycin F complex임을 확인할 수 있었다. Positive FAB mass spectrum을 통하여 SH-1004는 azalomycin F4a 와 F5a 가 1.8 : 1의 비율로 혼합된 물질임을 확인하였다. (1999년 5월 12일 접수, 1999년 9월 20일 수리)

### 서 론

합성 농약의 사용은 농업 생산성 개선에 크게 기여해왔으나 그 과용은 잔류 독성에 의한 환경오염 및 생태계 파괴 등의 부작용을 유발하고 있다. 이와 같은 문제점의 해결 방안으로서 환경 친화적 방제 기술의 개발이 제시되어져 왔다.<sup>1)</sup> 자연 상태에서 쉽게 분해되고 대상 병원균에 대하여 선택성을 지닌 농약으로서 미생물의 이차 대사 산물을 개발하려는 노력은 이러한 대안의 하나라고 할 수 있겠다. 이와 같은 천연물 농약 개발의 사례로서, *Streptomyces griseochromogenes*에서 벼 도열병균인 *Pyricularia oryzae*에 선택적 효과가 있는 blasticidin S가 분리되어 실용화되었고,<sup>2)</sup> *Streptomyces kasugaensis*의 대사 물질에서 분리된 kasugamycin이 blasticidin S와 같은 용도로서 실용화되었다.<sup>3)</sup> 그 외 실용화된 농업용 항진균제로는 polyoxins와 validamycin 등이 있다.<sup>4,5)</sup>

기존의 항생제들에 저항성을 보이는 병원균들의 출현으로 새로운 항생물질을 개발하려는 시도가 target-directed screening, drug design이나 genetic recombination등의 방법을 이용해 이루어지고 있으나,<sup>6)</sup> 새로운 물질의 발견보다는 기존 항생제의 새로운 활성의 재발견에 대한 빈도가 높아지고 있다.<sup>7,8)</sup> 한 예로 cyclosporin이나 FK-506, rapamycin과 같은 항생제는 원래는 약한 항진균활성을 가진 항생제로 알려졌으나 최근 임상학적으로 매우 유용한 면역억제제로 재발견되었다.<sup>9-11)</sup> 또한 actinomycetes 중 분리가 용이하지 않고 연구도 거의 된 바 없는 rare actinomycetes가 많은 관심을 받고있지만 현재까지 새로운 선도 물질은 약 70%가 *Streptomyces* 종에서 발견되고있는 실정이다.<sup>12)</sup>

본 연구에서는 rapamycin, FK-506 등을 포함한 많은 항생제를 생산하는 *Streptomyces hygroscopicus*에서 식물병해 곰팡이에 활성을 갖는 항진균 화합물을 분리하고자 하였다. 먼저 활성물질을 생산하는 균주를 선별하였고 활성물질의 최적 생산조건을 결정하였으며 이 물질을 분리 정제하여 구조분석을 수행하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용 균주 및 배지

*Streptomyces hygroscopicus* subsp. *limoneus* KCTC1715, 1716, 1717과 *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* KCTC9029, *Streptomyces hygroscopicus* KCTC9030, 9031 그리고 *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *angustmyceticus* KCTC1089는 생명공학연구소 유전자은행(KCTC)에서 분양 받았으며, *Streptomyces hygroscopicus* MJM1004는 본 실험실 수집한 균주로서 본 실험에 사용하였다. 위에 언급된 *S. hygroscopicus* 균주들은 ISP2 배지(1% malt extract, 0.4% yeast extract, 0.4% glucose, 2% agar)에서 배양하였다. 항균 활성 측정에 이용된 *Candida albicans* ATCC28366은 YPD 배지(1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 1.5% agar)에서 배양하였다. 식물 병원성 곰팡이로서 *Penicillium* spp. KACC40249, *Rhizoctonia solani* KACC40102, *Trichoderma* spp. KACC40541, *Botrytis cinerea* KACC F1, *Fusarium oxysporum* KACC40027 그리고 *Colletotrichum gloeosporioides* KACC40005는 농촌진흥청 농업과학기술원에서 분양받았으며 potato dextrose agar(PDA) 평판배지에서 유지, 배양하였다.

#### 균주의 배양 및 항진균 활성 검정

종균배양은 250 ml 삼각 플라스크에 50 ml의 배지를 넣은 후

찾는말 : *Streptomyces hygroscopicus*, antifungal agent, phytopathogenic fungi, azalomycin F  
\*연락처자

28°C에서 2~3일 진탕 배양하였으며, 발효배양은 5~10%의 종균을 접종한 후 종균 배양과 같은 조건에서 4일 진탕 배양하였다. 배양 미생물의 생장은 packed mycelium volume(PMV)을 측정하였다.<sup>13)</sup>

*Candida albicans*를 이용한 활성 검정에 있어서는 지시종을 YPD 배지에서 37°C로 하룻밤 종균 배양한 후 PGA 배지 (0.2% peptone, 0.5% glucose, 1.5% agar)에 최종 OD<sub>600</sub>이 0.2~0.3이 되도록 접종하여 petri dish에 10 ml씩 분주하였다. 이와 같이 준비된 평판에 시료를 처리한 paper disc(φ, 7 mm)를 올려놓고 37°C에서 하루 배양한 후 생육 저지환을 측정하였다.<sup>14)</sup>

기타 식물 병원성 진균류를 이용한 활성 검정을 위하여서는 지시종들을 PDA 배지에서 이틀동안 배양한 후 시료가 처리된 paper disc (φ, 7 mm)를 올려놓고 25°C에서 3~4 일 배양한 후 생육 저지환을 측정하였다.

**구조분석 및 이화학적 특성조사**

구조분석을 위한 NMR 측정은 JNM-LA400 NMR spectrometer(JEOL)를 사용하였으며 용매는 CD<sub>3</sub>OD를 사용하였다. Chemical shift value는 CD<sub>3</sub>OD를 internal standard 로 하여 ppm단위로 나타내었다. 시료의 분자량 측정은 VG 70-VSEQ(VG Analytical)를 이용하여 positive FAB mass로 측정하였으며 matrix는 *m*-nitrobenzylalcohol을 사용하였다.

**결과 및 고찰**

**균주선별**

종균 배양 배지 선별을 위하여 ISP2 배지와 함께 SH, DX 배지를 이용하였다. SH 배지는 2.5% glucose, 1% starch, 0.3% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.2% CaCO<sub>3</sub>로 조성된 제한 배지에 soybean meal을 2%로 첨가하여 준비하였다. DX 배지는 1% dextrin, 0.2% N-Z amine

**Table 1. Effect of seed culture media on the mycelial growth of *S. hygroscopicus* strains**

Strains	Media		
	DX	ISP2	SH
<i>S. hygroscopicus</i> KCTC9029	++	+++	+++
<i>S. hygroscopicus</i> KCTC9030	+	+++	+++
<i>S. hygroscopicus</i> KCTC9031	-	-	+++
<i>S. hygroscopicus</i> MJM1004	-	-	++
<i>S. hygroscopicus</i> KCTC1715	-	+++	+++
<i>S. hygroscopicus</i> KCTC1716	-	+++	+++
<i>S. hygroscopicus</i> KCTC1717	-	+++	+++
<i>S. hygroscopicus</i> KCTC1089	-	+++	+++

Culture was carried out at 28°C. Mycelium growth was measured by Packed Mycelium Volume (PMV). +++; represents excellent growth. ++; moderate. +; poor. -; no growth. SH; 2% soybean meal, 2.5% glucose, 1% starch, 0.3% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.2% CaCO<sub>3</sub>. ISP2; 1% yeast extract, 0.4% malt extract, 0.4% glycerol. DX; 1% dextrin, 0.2% N-Z amine type A, 0.1% yeast extract, 0.1% beef extract, 0.001% CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O.

**Table 2. Effect of production media compositions on the mycelial growth and the production of antifungal agents from *S. hygroscopicus* MJM1004**

Strain	Fermentation media	Mycelium growth <sup>a</sup>	Final pH	Bioactivity in broth <sup>b</sup>	Bioactivity in mycelium <sup>c</sup>
<i>S. hygroscopicus</i> KCTC1715	F1	++	6.8	-	-
	F2	+++	6.2	-	-
	F3	+++	7.8	-	-
	F4	++	7.8	-	-
	F5	+++	6.0	-	-
<i>S. hygroscopicus</i> KCTC1716	F1	++	7.8	-	-
	F2	++	7.0	-	-
	F3	++	7.8	-	-
	F4	++	7.8	-	-
	F5	++	6.0	-	-
<i>S. hygroscopicus</i> KCTC1717	F1	+++	7.4	-	-
	F2	+++	6.2	-	-
	F3	++	8.0	-	-
	F4	++	7.4	-	-
	F5	+++	6.0	-	-
<i>S. hygroscopicus</i> KCTC1089	F1	+++	7.4	-	-
	F2	+++	6.6	-	-
	F3	+++	6.0	-	-
	F4	++	7.6	-	-
	F5	+++	6.2	-	-
<i>S. hygroscopicus</i> KCTC9029	F1	+++	6.2	-	-
	F2	++	6.2	-	-
	F3	+++	6.7	-	-
	F4	+++	8.0	-	-
	F5	++	6.0	-	-
<i>S. hygroscopicus</i> KCTC9030	F1	+++	7.3	±	-
	F2	+++	7.2	±	-
	F3	+++	6.6	±	-
	F4	+	8.0	±	-
	F5	++	6.0	-	-
<i>S. hygroscopicus</i> KCTC9031	F1	+++	7.1	-	+
	F2	+++	7.4	-	+
	F3	++	8.0	-	+
	F4	++	8.0	-	-
	F5	++	6.0	-	+
<i>S. hygroscopicus</i> MJM1004	F1	+	6.1	+++	+
	F2	++	6.8	++	+++
	F3	+++	7.2	-	+
	F4	+	7.6	+++	+++
	F5	+	7.0	+	++

Fermentation was carried out at 28°C for 4 days (F1; 1% glucose, 2% starch, 0.5% yeast extract, 0.5% N-Z amine type A, 0.3% CaCO<sub>3</sub>, F2; 3% glucose, 2% soybean meal, 0.5% starch, 0.5% peptone, 0.3% CaCO<sub>3</sub>, F3; 4% starch, 2% fish meal, 0.3% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.5% corn steep liquor, 0.01% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3% CaCO<sub>3</sub>, F4; 2% dextrin, 1% glycerol, 0.5% yeast extract, 0.3% KNO<sub>3</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.3% CaCO<sub>3</sub>, F5; 3% soybean meal, 3.5% glucose, 0.3% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.3% CaCO<sub>3</sub>).

<sup>a</sup>Mycelium growth was measured by Packed Mycelium Volume (PMV). +++; represents excellent growth. ++; moderate. +; poor. -; no growth.

<sup>b</sup>The antifungal activity was measured in the diameter of inhibition zone using agar diffusion method, applying the sample on paper discs (φ, 7 mm). +++; 25 mm ± 2.0, ++; 21 mm ± 2.0, +; 17 mm ± 2.0.

<sup>c</sup>+++; 30 mm ± 2.0, ++; 25 mm ± 2.0, +; 17 mm ± 2.0.

type A, 0.1% yeast extract, 0.1% beef extract, 0.001%  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 로 조성된 복합 배지로 준비하였다. Table 1에 나타난 바와 같이 SH, ISP2 배지에서는 대체적으로 높은 생장율을 보인 반면, DX 배지에서는 KCTC9029를 제외한 모든 균주들이 낮은 생장율을 보였다. 이후의 발효 실험은 모든 균주에 대하여 우수한 생장율을 보였던 SH 배지를 종균 배양 배지로 이용하여 진행하였다.

항진균 활성 물질을 생산하는 균주를 선별하기 위하여 몇 가지 선별된 발효 배지에서의 항진균 활성의 생산을 검정하였다. 탄소원으로는 glucose, starch, dextrin, glycerol을 조합하여 3.4~4%의 농도로 첨가시켰다. 유기질소원은 soybean meal, yeast extract, peptone, N-Z amine type A, corn steep liquor, fish meal을 사용하였으며, 1~2.5%의 농도로 사용하였다. 무기질소원으로는  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  등을 사용하였다. 발효 배양 후 배양액과 균체 추출물에서의 항진균 활성을 조사한 결과 6가지의 균주 중 MJM1004만이 유의성 있는 활성을 보였으며, 검출된 항진균 활성은 균체의 생장율과는 상관성이 없는 것으로 나타났다(Table 2). 따라서, MJM1004 균주를 항진균 물질 생산 균주로 선정하였으며, 이 균주에서의 활성물질의 생산을 최적화하는 배지 조성을 조사하였다.

**항진균 활성물질의 생산조건**

*S. hygroscopicus* MJM1004에서의 항진균 활성 물질의 생산성을 증대시키기 위하여 발효배지의 탄소원과 질소원 그리고 미량원소를 시험하였다. 탄소원 선별시 기본배지는 MJM1004의 항진균 활성 생산에 있어서 가장 효율적이었던 F4배지를 기본배지로 하였다. 탄소원으로서 starch가 균체의 생장에 효율적

**Table 3. Effect of carbon source in production media on the growth and the production of antifungal agents from *S. hygroscopicus* MJM1004**

Carbon source (%)	Mycelium growth <sup>a</sup>	Final pH	Bioactivity in broth <sup>b</sup>	Bioactivity in mycelium <sup>c</sup>
dextrin (2%), glycerol (1%)	+	5.5	+	+
dextrin (3%)	+	7.9	-	-
glycerol (3%)	++	6.3	+	++
starch (2%), glycerol (1%)	+	7.8	+++	+++
glucose (2%), glycerol (1%)	++	6.1	+++	+
sucrose (2%), glycerol (1%)	+	8.0	+++	+
sucrose (2%), glucose (1%)	+	7.2	+	++
glucose (3%)	++	7.2	+	+
starch (2%)	+++	8.0	++	++
sucrose (2%)	+++	8.0	-	+
starch (2%), glucose (1%)	+++	7.8	+++	+++
starch (1%), dextrin (2%)	+++	7.8	+	++

Fermentation was carried out at 28°C for 4 days in basic medium (0.5% yeast extract, 0.3%  $\text{KNO}_3$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3%  $\text{CaCO}_3$ ) containing different carbon sources.

<sup>a</sup>Mycelium growth was measured by Packed Mycelium Volume (PMV). +++; represents excellent growth. ++; moderate. +; poor. -; no growth.

<sup>b</sup>+++; represents excellent growth. ++; moderate. +; poor. -; no growth.

<sup>c</sup>The antifungal activity was measured in the diameter of inhibition zone using agar diffusion method, applying the sample on paper discs ( $\phi$ , 7 mm). +++; 19 mm  $\pm$  1.0, ++; 17 mm  $\pm$  1.0, +; 15 mm  $\pm$  1.0.

<sup>d</sup>+++; 21 mm  $\pm$  2.0, ++; 17 mm  $\pm$  2.0, +; 13 mm  $\pm$  2.0.

**Table 4. Effect of nitrogen source in production media on the growth and the production of antifungal agents from *S. hygroscopicus* MJM1004**

Nitrogen source (%)	Mycelium growth <sup>a</sup>	Final pH	Bioactivity in broth <sup>b</sup>	Bioactivity in mycelium <sup>c</sup>
soybean meal (2)	+++	7.2	+++	+++
fish meal (2)	++	7.2	+	++
corn steep liquor (2)	+	7.6	++	+
yeast extract (0.5)	+	7.5	+++	+
peptone (0.5)	+	8.0	++	-
beef extract (0.5)	+	8.0	+++	+
tryptone (0.5)	+	8.0	+++	-
$\text{KNO}_3$ (0.5)	++	7.4	+	+
$\text{NH}_4\text{NO}_3$ (0.5)	+	7.4	-	+
$\text{NH}_4\text{Cl}$ (0.5)	+	7.5	-	-
peanut meal (2)	+++	7.4	+	+++

Fermentation was carried out at 28°C for 4 days in basic medium (2% starch, 1% glucose, 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3%  $\text{CaCO}_3$ ) containing different nitrogen sources.

<sup>a</sup>Mycelium growth was measured by Packed Mycelium Volume (PMV). +++; represents excellent growth. ++; moderate. +; poor. -; no growth.

<sup>b</sup>The antifungal activity was measured in the diameter of inhibition zone using agar diffusion method, applying the sample on paper discs ( $\phi$ , 7 mm). +++; 16 mm  $\pm$  2.0, ++; 14 mm  $\pm$  2.0, +; 12 mm  $\pm$  2.0.

<sup>c</sup>+++; 16 mm  $\pm$  1.0, ++; 14 mm  $\pm$  1.0, +; 12 mm  $\pm$  1.0.

인 것으로 관찰되었으며, starch와 glucose를 함께 탄소원으로 사용하였을 때 배양액과 균체 추출물에서의 항진균 활성이 높은 것으로 관찰되었다(Table 3). Glycerol과 starch, glucose, sucrose를 각각 혼합하여 탄소원으로 이용하였을 때에도 높은 항진균 활성을 관찰할 수 있었으나 생산 단가를 고려하여 이후의 발효 실험에서는 2% starch와 1% glucose를 탄소원으로 이용하였다.

질소원 선별시 기본배지는 2% starch, 1% glucose, 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3%  $\text{CaCO}_3$ 를 사용하였다. 유기 질소원으로는 soybean meal, fish meal, corn steep liquor, yeast extract, peptone, beef extract, tryptone, peanut meal을, 무기 질소원으로는  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 을 사용하여 항진균 활성 생산성을 조사하였다. Table 4에서 보여지듯이 무기 질소원은 균체의 항진균 활성물질 생산에 그다지 적합하지 않은 것으로 관찰되었으며, 유기 질소원 중 soybean meal 사용시 배양액과 균체 추출물 모두에서 강한 항진균 활성을 나타내었다. Soybean meal 2%를 기본으로 여타 질소 공급원을 0.3~0.5% 혼합하여 사용하였을 때에도 항진균 활성의 증가는 관찰할 수 없었다. 따라서, soybean meal 2%를 질소원으로 이용하였다. 이상에서 확립된 탄소원과 질소원을 기본으로 한 후 여러 미량원소가 항진균 활성 물질의 생산에 미치는 영향을 시험하였으나 유의성 있는 활성의 증가는 관찰할 수 없었다.

이상의 배지 선별 과정을 통하여 발효 배지 조성은 2% soybean meal, 1% glucose, 2% starch, 0.3%  $\text{CaCO}_3$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 로 하였다. 위의 최종 발효 배지 선정에 있어서 인산원으로  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 를 0.05% 첨가하였을 때 균체 생산과 항진균 활성 물질 생산 모두 유의성있는 증가를 보였다(Table 5).

**Table 5. Effect of mineral elements on the growth and the production of antifungal agents from *S. hygroscopicus* MJM1004**

Composition of media	Mycelium growth <sup>a</sup>	Final pH	Bioactivity in broth <sup>b</sup>	Bioactivity in mycelium <sup>c</sup>
soybean meal 2%	+++	6.3	++	++
soybean meal 2%, MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.05%	+++	6.9	++	+++
soybean meal 2%, MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.05%, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.05%	+++	6.8	+++	+++

Fermentation was carried out at 28°C for 4days in basic medium (1% glucose, 2% starch, 0.3% CaCO<sub>3</sub>) containing mineral sources.

<sup>a</sup>Mycelium growth was measured by Packed Mycelium Volume (PMV). +++; represents excellent growth. ++; moderate. +; poor. -; no growth.

<sup>b</sup>The antifungal activity was measured in the diameter of inhibition zone using agar diffusion method, applying the sample on paper discs (φ, 7 mm). +++; 16 mm ± 1.0, ++; 14 mm ± 1.0, +; 12 mm ± 1.0.

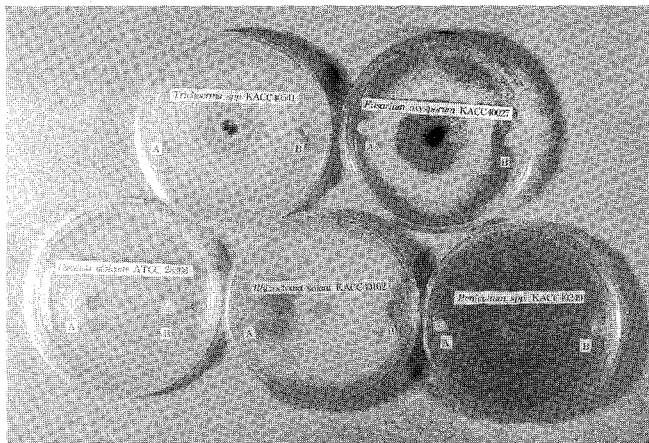
<sup>c</sup>+++; 17 mm ± 1.0, ++; 15 mm ± 1.0, +; 13 mm ± 1.0.

**항진균 활성물질의 활성 검정**

이상의 연구를 통하여 확립된 조건을 바탕으로 *S. hygroscopicus* MJM1004가 생산하는 항진균 물질의 특성을 조사하였다. 100 ml 배양액의 mycelium pellet을 취하여 20 ml의 methanol로 세 번 추출한 후 감압 하에서 건조하였다. 이를 *sec*-BuOH : water(4 : 1)의 용매로 녹여 TLC에 *sec*-BuOH : water(4 : 1)로 전개시킨 후 항진균 활성을 검사하였을 때 R<sub>f</sub> 0.2-0.3 위치에서 활성을 확인할 수 있었으며, 이 항진균 물질을 SH-1004으로 명명하였다. SH-1004의 항진균 활성의 특성을 파악하기 위하여 현재까지 항진균 천연물질로서 가장 널리 실용화되어있는 polyoxin B와 항진균 spectrum을 비교해본 결과 polyoxin B가 *Colletotrichum gloeosporioides*에만 제한적으로 활성을 보인 반면, SH-1004는 조사 대상으로한 모든 식물 병원 균주에 대하여 광범위한 항진균 활성을 보임을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

**활성물질의 추출 및 정제**

*Streptomyces hygroscopicus* MJM1004에서 생산되는 항진균 물질이 식물 병원성 곰팡이들에 활성이 있음을 확인한 후 이 활성물질의 분리, 정제하였다. 정제 과정중의 항진균 활성 측



**Fig. 1. In vitro antifungal activities of SH-1004, an antifungal agent isolated from *S. hygroscopicus* MJM1004, and polyoxin B.**

**Table 6. Antifungal spectrum of SH-1004, an antifungal agent isolated from *S. hygroscopicus* MJM1004, and polyoxin B**

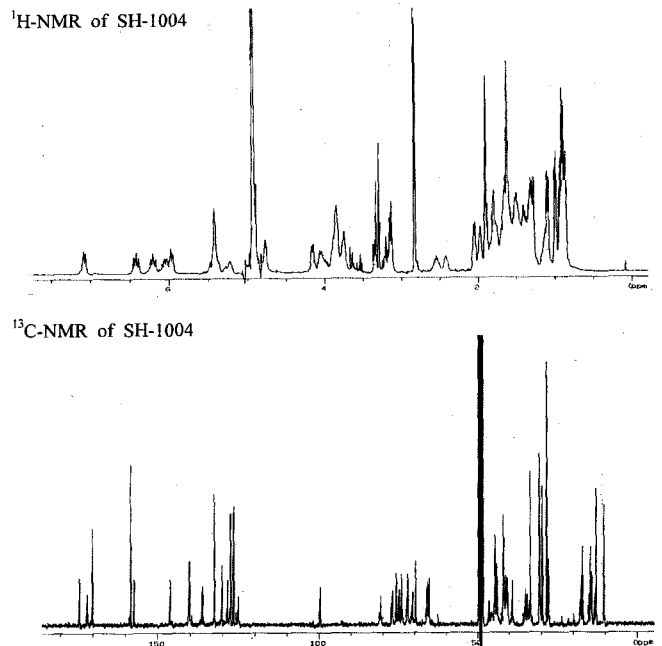
Test organisms	SH-1004	Polyoxin B
<i>Fusarium oxysporum</i> KACC40027	+++	-
<i>Penicillium spp.</i> KACC40249	+++	-
<i>Collectotrichum gloeosporioides</i> KACC40005	+	++
<i>Candida albicans</i> ATCC 28366	+++	-
<i>Rhizoctonia solani</i> KACC40102	++	-
<i>Trichoerma spp.</i> KACC40541	++	-
<i>Botrytic cinera</i> KACC F1	++	-

The antifungal activity was measured in the diameter of inhibition zone using agar diffusion method, applying the sample at a concentration of 20 µg on paper discs (φ, 7 mm). +++; 17 mm ± 2.0, ++; 13 mm ± 2.0, +; 9 mm ± 2.0.

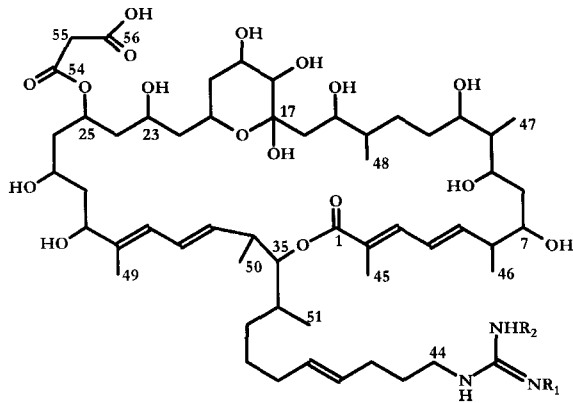
정은 Fig. 1에서 나타나듯이 가장 용이하고 민감한 *C. albicans* 를 이용하였다. 2L의 배양액을 4°C, 6000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻어진 mycelium을 500 ml의 methanol로 세 번 추출하였다. 추출액을 감압하에서 농축시킨 후 silica gel column chromatography에서 BuOH : MeOH : water(8 : 1 : 2)를 용매로 전환시켜 몇 개의 분획으로 분리한 후 활성이 있는 분획을 모아 ODS column에 흡착시킨 후 water, 50% methanol, methanol 순으로 용출하였다. 활성분획을 모아 감압하에서 농축하였다. 이를 silica gel preparative TLC상에서 BuOH : MeOH : water (8 : 1 : 2)을 용매로 전개하여 활성분획을 모아 methanol로 용출시킨 후 감압 농축하여 연한 노랑색의 가루 약 15 mg을 얻었다. 정제된 SH-1004를 이용하여 광범위한 항진균 활성을 확인하였다(Table 6).

**활성물질의 물리화학적 특성 및 구조분석**

SH-1004의 <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR spectrum은 Fig. 2과 같다. <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서는 aromatic proton에서 유래하는 것으로 여



**Fig. 2. <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR spectrum of SH-1004.**



## Azalomycin F complex.

$R_1 = R_2 = \text{CH}_3$	(F <sub>5a</sub> , MW 1095)
$R_1 = \text{H}; R_2 = \text{CH}_3$	(F <sub>4a</sub> , MW 1081)
$R_1 = R_2 = \text{H}$	(F <sub>3a</sub> , MW 1067)

Fig. 3. Structure of azalomycin F.

겨지는 peak들이 7.11(d), 6.42(dd), 6.21(dd), 6.03(dd), 5.97(d) ppm에서 관찰되었으며, 5.42 ppm에서 3개의 proton signal이 관찰되었다. HMQC를 통하여 이들 proton이 결합되어있는 탄소는 <sup>13</sup>C-NMR에서 125~150 ppm에 있는 peak로 관찰되었다. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY를 통하여 이들이 2개 이상의 분리된 conjugated group을 형성하고 있음을 확인할 수 있었으며, HMBC를 통하여 2개의 conjugated group(7.11, 6.42, 6.03 ppm; 5.97, 6.21, 5.42 ppm)이 carboxyl ester(<sup>13</sup>C, 170.1 ppm)로 연결되어 있음을 짐작할 수 있었다. 또한, 이 화합물은 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서 5.30과 3.30 ppm 사이에 12개의 proton peak를 보여주었다. HMQC를 통하여 이들 proton이 결합한 탄소는 65~85 ppm 사이에 나타남을 확인할 수 있어 이들이 수산화 탄소들임을 짐작할 수 있었다. 이상의 결과에서 이 화합물 구조는 특징적으로 이중 결합 conjugated 잔기와 polyhydroxyl 잔기를 갖고 있음을 확인할 수 있었다. 광범위한 항진균 활성과 더불어 위에서 제안된 구조적인 특징에 기초하여 SH-1004는 polyene계통의 화합물로 추정할 수 있었다. 따라서, polyene 계통의 화합물들의 물리화학적 특성을 조사해본 결과 SH-1004는 azalomycin F 복합체(Fig. 3)임을 확인할 수 있었다.<sup>15-17)</sup> Azalomycin F 복합체의 구성 성분인 F<sub>3a</sub>, F<sub>4a</sub>와 F<sub>5a</sub>는 <sup>13</sup>C-NMR 상에서 각각 158.7, 158.3와 157.3 ppm의 위치에 guanido carbon에 해당하는 peak를 나타내는 것으로 보고되어져 있다.<sup>16)</sup> 반면, SH-1004의 <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 158.2와 157.3 ppm의 위치에 peak를 관찰할 수 있었다. 이에 기초하여 SH-1004는 azalomycin F<sub>4a</sub>와 F<sub>5a</sub>의 복합체임을 짐작할 수 있었다. 또한 SH-1004의 positive FAB mass 분석결과(% intensity, molecular formula) *m/z*, 1083.4(33, C<sub>56</sub>H<sub>95</sub>N<sub>3</sub>O<sub>17</sub>+H)와 1097.4(18, C<sub>57</sub>H<sub>97</sub>N<sub>3</sub>O<sub>17</sub>+H)에서 molecular ion peak를 나타내었다.<sup>16)</sup> 따라서, SH-1004는 azalomycin F<sub>4a</sub>와 F<sub>5a</sub>가 1.8:1 비율로 함유된 혼합물임을 확인할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술부, 한국과학재단 지정 명지대학교 천연신기능성 소재 연구센터의 지원에 의한 것입니다.

## 참고문헌

- Lewis, W. J., Lenteren, J. C., Phatak, S. C. and Tumilson, J. H. (1997) A total system approach to sustainable pest management. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **94**, 12243-12248
- Seto, H. and Yonehara, H. (1997) Studies on the biosynthesis of blasticidin S. VII Isolation of demethylblasticidin S. *J. Antibiot.* **30**, 1023-1024
- Hamao, U., Yoshiro, O., Tomio, T. and Tetsuji, I. (1965) Kasugamycin as a plant disease preventive agent, U. S. Patent 3856969
- Hector, R. F. (1993) Compounds active against cell walls of medically important fungi. *Clinic. Microbiol. Rev.* **6**, 1-21
- Satoshi, H., Yukihiko, K., Takashi, I. and Hiroichi, Y. (1972) Validamycin C, D, E and F antibiotics, U. S. Patent 4011391
- Hutchinson, C. R. (1997) Antibiotics from genetically engineered microorganisms, pp. 683-696. In W.R. Strohl, *Biotechnology of Antibiotics*. Marcel Dekker Inc., NY.
- Choi, S. -W., Kim, B. -C., Choi, S. -J., Kim, D. -S., Yeo, I. -H., Moon, S. -O. and Oh, D. -H. (1997) Isolation and purification of anticancer material produced by *Streptomyces endus* YP-1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 483-489.
- Yun, B. -S., Kim, C. -J., Lee, I. -K., Koshino H., and Yoo, I. -D. (1996) An antifungal compound against *Phytophthora capsici* produced by *Streptomyces* sp. 3D3. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 77-81
- von Wartburg, A. and Traber, R. (1988) Cyclosporins, fungal metabolites with immunosuppressive activities, pp. 1-33. In G. P. Ellis and G. B. West (eds.), *Progress in Medicinal Chemistry*, Vol. 25, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Caulfield, C. E. and Mussler, J. Y. (1989) Macrocyclic immunomodulators. *Annu. Rept. Med. Chem.* **25**, 195-204
- Sehgal, S. N. and Chang, J. Y. (1990) Rapamycin: A new immunosuppressive macrolide. *Transpl. Immunol. Lett.* **7**, 12-14
- Berdy, J. (1995) Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites?. pp. 13-34. In Devabog, V. G., Dudnik, Y. V. and Danilenko, V. N. *Proceedings of the Ninth International Symposium on the Biology of the Actinomycetes*. Moscow: All-Russia Scientific Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms.
- Posten, C. H. and Cooney, C. L. (1993) Growth of Microorganisms, pp. 113-162. In Rehm, H. -J. and Reed, G. *Biotechnology*, Vol. 1, Biological Fundamentals. VCH, Weinheim.
- Lancini, G., Parenti, F. and Gallo, G. (1995) The activity of antibiotics, pp. 15-36. *Antibiotics A Multidisciplinary Approach*. 2nd ed., Plenum Press, NY.
- Iwasaki, S., Namikoshi, M., Sasaki, K., Fukushima, K. and Okuda, S. (1982) Studies on macrocyclic lactone antibiotics. V. The structures of azalomycins F<sub>3a</sub> and F<sub>5a</sub>. *Chem. Pharm. Bull.*

- 30, 4006-4014.
16. Chandra, A. and Nair, M. G. (1995) Azalomycin F complex from *Streptomyces hygroscopicus*, MSU/MN-4-74B. *J. Antibiot.* **48**, 896-898.
17. Mukhopadhyay, T., Vijayakumar, E. K. S., Nadkarni, S. R., Sawant, S. N. and Kenia, J. (1995) 2-Demethylazalomycin F<sub>4a</sub> and F<sub>5a</sub>, two new antifungal metabolites from *Actinomyces* sp. HIL Y-9120362.

---

**Isolation and Structural Determination of Antifungal Antibiotic from *Streptomyces hygroscopicus* MJM1004**

Ju-Yun Bae, Hyong-Jin Kwon and Joo-Won Suh\*(*Institute of Biological Science and Biotechnology, Myongji University, Yongin, 449-728, Korea*)

**Abstract :** Several *Streptomyces* strains were tested for potent antifungal agents active against phytopathogenic fungi. Among the tested, *S. hygroscopicus* MJM1004 showed a potent antifungal activity when assayed using *Candida albicans* as indicator organism. With the strain of MJM1004, fermentation medium for the production of an antifungal agent was developed with varying carbon sources, nitrogen sources, and mineral elements, which resulted in the highest productivity in the medium containing 2% soybean meal, 1% glucose, 2% starch, 0.3% CaCO<sub>3</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. The active compound showed a broad spectrum of antifungal activity against several plant pathogenic fungi. The antifungal compound was purified and showed the physicochemical characteristics similar to azalomycin F complex in NMR and MS analysis.

---

Key words : *Streptomyces hygroscopicus*, antifungal agent, phytopathogenic fungi, azalomycin F

\*Corresponding author