

GOVP1199913214

668.65
L293A

최 종
연구보고서

식물 병원균 선택성 원예용
저독성 · 무공해 항생물질 개발

Development of Selective and
Biorational Antibiotics for Horticulture

연구 기관
한국인삼연초연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “식물병원균 선택성 원예용 저독성·무공해 항생물질 개발”
과제 (세부과제 “포트 및 포장시험을 통한 항생물질의 생물활성 검정”)의 최종보
고서로 제출합니다.

1998. 12. 20

주관연구기관명 : 한국인삼연초연구원

총괄연구책임자 : 김 시 관

연 구 원 : 위 재 준

연 구 원 :곽 이 성

연 구 원 :유 건 식

연 구 원 :여 운 형

협동연구기관명 : 영일화학공업(주)

협동연구책임자 : 유 지 원

여 백

요 약 문

I. 제 목

식물병원균 선택성 원예용 저독성·무공해 항생물질 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

해충, 잡초, 식물병원균등에 의한 농작물의 피해는 전체 수확량의 30%를 차지한다고 알려져 있다. 따라서 식량자원의 지속적인 공급을 위하여는 농약이 절대적으로 필요하다 하겠다. 그러나 의약품에 비해 농약이 지구환경에 미치는 영향은 실로 엄청나다. DDT의 경우 독성이 강해 사용 및 생산금지 조치가 내려진 후 수십년이 지난 현재에도 토양중에 상당량 잔류되어 있다. 또한 tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD)은 월남전에서 미군이 사용하였던 제초제 (2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid, 일명 Agent Orange) 유기합성시 극미량 생성되는 부산물이나 그 독성은 지금까지 인간에 의하여 만들어진 화합물중 가장 강하다고 하여 악명 높으며 우리나라에서도 월남전 참전용사 일부와 그 직계 자손들이 고엽병이란 질병으로 고통받고 있다.

농약중 일부는 최근 환경호르몬으로 규정되어 내분비계를 교란시키는 것으로 밝혀지고 있다. 특히, 세계야생동물보호기금 (WWF)은 1998년 8월 3일 현재 농약으로 사용되고 있는 화합물중 2,4,5-T, 2,4-D, DDT, DDT-metabolites, malathion, tributyltin oxide 등 총 45종의 화합물을 내분비계 장애물질로 규정짓고 있다. 또한 일본 의약품 식품위생연구소는 74종의 화합물을 내분비계 장애물질로 규정하였다. 여기서 간과하여서는 안될 것이 이들 화합물 모두가 유기합성에 의하여 생산된다는 점이다.

반면, 미생물 유래 항생물질 농약이 갖는 화학적, 생물학적 의의는 매우

크다. 즉 biodegradable 하기 때문에 토양내 잔류성이 문제시 되지 않으며 선택성이 뛰어나기 때문에 인체에 독성이 거의 없고 농약으로만의 이용을 목적으로 의약품 항생물질과는 독자적으로 개발되었을 경우 교차내성과 같은 문제점이 전혀 없다. 또한 항생물질은 매우 독특하고 복잡한 구조를 가지고 있는 것이 많으므로 유기합성의 중요한 lead 화합물이 된다.

따라서 본 연구팀은 무공해성 농약개발이라는 세계적인 추세에 호응하고 또한 10여년간의 농약용 항생물질 개발 경험을 바탕으로 식물병원균에 선택적 항균활성을 나타내는 무독성·무공해 농약을 개발하는 것을 목적으로 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 유용미생물 분리용 토양 시료의 채취

- 가. 기후별 특성을 고려한 토양시료 채취
- 나. 지역별 특성을 고려한 토양시료 채취
- 다. 인간의 발이 거의 닿지 않은 처너림속의 토양채취
- 라. 해안지역 토양 시료 채취

2. 미생물 분리 및 보존

- 가. 분리 대상 미생물 : 중온성 및 고온성의 actinomycetes 대상
- 나. 분리방법: pour plate 혹은 streaking method
- 다. 미생물 보존 : 10% glycerol에 현탁시킨 후 -20°C에 보관
 - 신규 항생물질 생산 균주 : 동결건조 후-70°C에 보존

3. 유용균주의 동정

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, International Streptomyces Project, Numerical Taxonomy 방법을 병용하였다.

4. 항균활성 검정

가. *in vitro* 항균활성

in vitro 항균활성 검정에 사용한 검정균은 주로 원예작물 병원균을 대상으로 하였으며 기타 비병원성 균주는 항균스펙트럼과 신·기지 여부를 판단하는데 이용되는 균주들을 주축으로 하였다.

나. 농약용 살균제로서의 선택성 조사

- 인체 병원균에 대한 항균활성 조사도 병행함으로써 농약으로서의 선택성은 물론 의약 용 항생물질로서의 개발 가능성도 함께 조사하였다.
- 검정방법 : paper disc agar diffusion method에 따라 행하였다.

다. *in vivo* (pot 및 field 시험) 활성 검정

- 활물기생성 곰팡이 : 나병 식물체에 형성된 포자를 Brush inoculation method에 준하여 어린 식물체에 접종하였다.
- 일반 곰팡이 : 병원균별로 적합한 배지를 선택하여 접종한 후 포자 및 유주자 형성을 충분히 유도시킨 다음 현탁액을 만들어 식물체에 분무 접종하였다.
- 세균류 : 액체 배지에서 배양시킨 후 멸균 생리식염수에 현탁하여 상처 접종하였음.
- 방제가는 $(1 - \frac{\text{약제처리구의 병반수}}{\text{약제비처리구의 병반수}}) \times 100$ 에 의거 산출하였다
- *Erwinia carotovora* 외 11균주에 대한 방제 및 치료효과 조사 이외에도 활물기생성 병원균인 *Sphaerotheca fuliginea* (오이 흰가루병)과 *Puccinia recondita* (밀 붉은 녹병)등에 대한 pot 시험도 병행하여 수행하였다.
- Pot 시험은 3-5엽기의 유묘 식물을 이용하며 병원균별로 발병이 잘되는 작물을 선택하였다.

5. 항생물질의 분리 및 동정

가. 1차 분리, 정제 시험

- 산성, 중성, 알카리 조건하에서의 열 안정성, 유기용매 (EtOAc, BuOH) 분배성, 활성탄 흡착성, 양·음 이온교환수지 흡착성 조사

나. 활성물질의 분리 및 정제

- 1차 분리, 정제 시험 결과를 토대로 유기용매 추출, macroreticular resins (Amberlite XAD-2, Diaion HP-20), 이온교환수지, silica gel column chromatography, silica gel 및 ODS flash column chromatography, cellulose column chromatography, preparative TLC, HPLC등을 이용하여 단일물질로 분리, 정제하였다.

다. 분리 항생물질의 구조 및 신·기지 여부 동정

- UV, IR, NMR, Mass spectrometer를 이용하여 물리·화학적 특성조사 및 구조동정하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 토양시료의 채취 :

토양시료는 국내 231점, 국외 104점, 계 335점을 채취하였다. 국외 토양은 필리핀, 일본, 미국 동북부, 캐나다 및 베트남의 토양을 채취하였고 국내 토양의 경우 동해안 일대, 진도, 백령도 및 거제도 등지로부터 토양시료를 채취하였다. 또한, 다양한 미생물분리하기 위하여 대나무밭, 과수원, 채소밭, 논, 포도밭, 소나무 서식지, 활엽수 서식지, 원예작물 재배지 (비닐하우스) 등으로 부터 토양시료를 채취하였다.

나. 토양미생물의 분리, 배양 및 보존 :

1년차에는 방선균 591균주, 곰팡이 330균주를 분리하였으며 2년차에는 fastidious actinomycetes 117균주와 oligotrophic actinomycetes 16균주를 분리하였다. 또한, 3년차에선 고농도의 cycloheximide 존재하에서 생육가능한 actinomycetes 46균주를 분리하였다. 분리한 균주에 대하여는 modified bennet's agar 혹은 potato dextrose agar 중 균사의 성장과 포자형성이 양호한 배지를 선택하여 사면배양한 다음 면전을 고무전으로 교체하여 실온에 보존하면서 사용하였다. 한편, 항생물질을 생산하는 것으로 밝혀진 균주에 대하여는 포자와 균사체를 20% glycerol 액에 현탁시킨 다음 -20℃에 보존하였다. 또한, 신규 항생물질을 생산하는 것으로 밝혀진 균주에 대하여는 생명공학연구소의 유전자은행에 등록함과 동시에 동결건조하여 -70℃에 보존하였다.

다. 유용 미생물의 선발 :

지금까지 분리한 균주중 방선균 770균주와 곰팡이 330 균주, 총 1,100를 배양하여 *Erwinia carotovora* (EC)의 10균주를 피검정균으로 하여 1차 항생물질 생산여부를 조사하였다. 그 결과, 방선균 68균주, 곰팡이 4균주, 계 72균주가 식물병원균에 대하여 항균활성을 가진 항생물질을 생산하는 것으로 밝혀졌다. 이들 균주 배양액에 대하여는 포트시험을 통한 *in vivo* 항균활성을 검정함과 동시에 일부는 항생물질을 분리, 정제하였다. 특히, *Streptomyces* 9244, *Str. melanosporofaciens*, *Kitasatosporia kimorexae* 및 *Streptomyces* 192균주의 항균활성이 강하게 나타났다.

라. 항생물질의 분리 및 정제 :

1) *Str.* 9244균주가 생산하는 항생물질의 분리 및 정제 : 균사체 아세톤 추출물은 감압농축하여 아세톤을 제거한 다음 배양여액과 함께 Diaion HP-20 8

리터에 흡착시킨 후 수지를 40리터의 증류수로 세척하고 흡착된 활성물질은 100% 메타놀 35리터로 용출하였다. 메탄올 용출분획은 감압농축한 다음 CH₂Cl₂-60% MeOH로 solvent partition을 하여 항세균성 항균력을 가진 CH₂Cl₂층 (하층)을 얻었으며 상층에 대하여는 농축하여 메탄올을 제거한 다음 부탄올로 용매분배하여 항진균성 항균활성을 나타내는 부탄올 분획을 얻었다. CH₂Cl₂분획은 농축하여 ODS flash column chromatography (60%-->100% MeOH)를 행하였다. 활성물질이 함유된 80% 메탄올 용출분획은 다시 감압농축한 다음 Sephadex LH-20 gel filtration [*n*-hexane/CH₂Cl₂/MeOH (4:2:1)], ODS HPLC (Cosmosil, 20 x 250 mm, 63% MeOH containing NaClO₄, 275 nm) 방법으로 최종정제하여 3개의 활성물질을 얻었다.

한편, 항진균활성을 나타내는 부탄올층에 대하여는 ODS flash chromatography (MeOH gradient), Sephadex LH-20 gel filtration (MeOH), ODS HPLC (Cosmosil, 20 x 250 mm, 63% MeOH containing NaClO₄, 275 nm) 방법으로 분리, 정제하여 4개의 화합물을 얻었다. 활성물질 각각의 분획은 다시 초순수 증류수를 동량 정도 가한 다음 ODS open glass column에 흡착시키고 초순수 증류수로 세척함으로써 염을 제거한 후 absolute MeOH로 용출하여 순수분리된 활성물질을 얻었다.

2) *Streptomyces melanosporofaciens*가 생산하는 항생물질의 분리, 정제 :

균사체 추출물은 상등액과 합친 다음 Diaion HP-20 (8 l)에 흡착 크로마토그래피, *n*-BuOH 용매 분배, ODS flash chromatography, Sephadex LH-20 gel filtration, silica gel flash column chromatography, ODS MPLC, polyamine HPLC, ODS HPLC 분취를 통하여 4개의 활성물질을 분리하였다. 활성물질 각각의 분획은 다시 초순수 증류수를 동량 정도 가한 다음 ODS open glass column에 흡착시키고 초순수 증류수로 세척함으로써 염을 제거한 후 absolute MeOH로 용출하여 순수분리된 활성물질을 얻었다.

3) A192 균주가 생산하는 항생물질의 분리 및 정제 :

균사체 아세톤 추출물은 상등액과 합친 다음 Diaion HP-20 (500 ml) 흡착 크로마토그래피, 60% 메탄올/CH₂Cl₂ 용매 분배를 수행함으로써 *Xanthomonas citri*와 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)에 항균활성을 나타내는 dichloromethane 층과 60% 메탄올층으로 나누었다. 60% 메탄올층은 다시 *n*-BuOH로 용출함으로써 *Pyricularia oryzae* 및 *Rhizoctonia solani*에 항균활성을 가진 유기용매층을 얻었다. CH₂Cl₂층은 다시 ODS flash column chromatography, Sephadex LH-20 gel filtration, ODS HPLC 분취함으로써 항세균성 항생물질을 얻었다.

한편, 항진균활성을 나타내는 *n*-BuOH층에 대하여도 dichloromethane 층과 유사한 방법으로 ODS flash column chromatography, Sephadex LH-20 gel filtration, ODS MPLC로 분리하여 활성분획을 얻었다.

4) *Kitasatosporia kimorexae*가 생산하는 항생물질의 분리 및 정제 :

균사체의 아세톤 추출물은 여과하여 균사체를 제거한 다음 감압농축함으로써 아세톤을 제거한 후 배양여액과 합쳤다. 이것은 다시 Diaion HP-20 흡착 크로마토그래피, ODS flash column chromatography, ODS HPLC 분취하였다. 분취한 4개분획은 diethylamine (DEA)와 TFA를 제거하기 위하여 LC용 초순수증류수를 동량정도 가한 후 ODS resin (open glass column)에 흡착시켰다. ODS에 흡착된 활성물질에 대하여는 수지를 충분한 양의 증류수로 세척한 다음 100% MeOH로 용출하여 농축한 후 동결건조함으로써 백색의 무정형 분말을 얻었다.

마. 항생물질의 구조동정

1) *Str.* 9244 균주가 생산하는 항생물질 :

S9244-3의 물리·화학적 특성은 : pale yellow amorphous powder;

$[\alpha]_D^{23} +3.6^\circ$ (c 0.52, MeOH); UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ) 228 (23,000), 266 (27,200), 275 (32,000), 285 (27,000); IR ν_{\max} (film) 3350 (OH or NH), 2930, 1825 (β -lactone), 1690 (amide), 1645, 1240, 1040 cm^{-1} ; ESI-MS m/z 724 ($M+\text{MeOH}+\text{Na}$) $^+$, 692 ($M+\text{Na}$) $^+$, 579, 507; HRESI-MS m/z 670.3706 calcd. for $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{O}_9$ (Δ -2.6mmu) 였다.

ESI mass spectrum data로부터 분화합물의 분자량은 oxazolomycin 보다 14가 크다는 사실을 알 수 있었다. ^1H , ^{13}C , $^1\text{H}-^1\text{H}$, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ COSY 및 HMBC NMR spectra 결과로부터 S9244-3의 전평면구조는 신규의 "16-methyloxazolomycin"로 결정하였다.

한편, S9244-1은 비교적 양이 적으며 S9244-3과 매우 유사하나 ^1H NMR spectrum 상에서 약간의 차이를 나타냈다. 즉, 3.5 ppm 부근과 5.5~6.7 ppm 사이 (olefinic protons)에서 차이를 보였다. 상기 화합물은 UV와 NMR spectra로부터, 분자량 700 내외의 polyene계 화합물로 추측되며 추측되므로 계속하여 분자구조 해석을 진행하고 있다.

한편, 항진균성 항균활성을 나타내는 BuOH 추출분획으로부터 S9244-451, -452, -453, -454 4개의 화합물을 분리, 정제하였다. NMR 및 Mass data 분석을 통하여 3개의 화합물은 tetramycin A (451), tetrin A (453), B (454)로 동정되었다. 그러나 S9244-452는 양은 비교적 다른 3개의 화합물에 비하여 적으나 신규화합물이 확실시 되어 구조를 동정하였다. 즉, negative FAB-MS 분석 결과 분화합물은 m/z 678 ($M-\text{H}$) $^-$ 으로 밝혀졌으며 이는 HRFAB mass 분석 결과 (678.3149, Δ +2.3 mmu)가 뒷받침하였다.

IR spectrum에 있어서는 OH and/or NH (3450), CO_2H (2750), lactone (1710), CO_2^- (1580), 및 carbon-carbon 이중결합 (1635, 1515)가 존재한다는 사실이 확인되었다. 본 화합물은 ^1H , ^{13}C , $^1\text{H}-^1\text{H}$, $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ COSY, HMBC data 고찰에 의해 분자식 $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{O}_9$ 인 신규물질로 동정되어 tetricin A로 명명함과

동시에 1998년 12월 특허출원하였다.

2) A192균주가 생산하는 항세균성 항생물질의 구조동정 :

S192a는 positive FAB/MS에서 m/z 1,270 ($M+H$)⁺를 나타냈다. 이 화합물은 분홍색을 띄고 있어 장파장 흡수를 보이고 있으며 ¹H, ¹³C NMR data로부터는 conjugated quinolone 골격에 아미노산이 결합된 화합물로 추정할 수 있었다. 또한, spectroscopy data를 기초로 하여 문헌조사를 한 결과 본 화합물은 actinomycin 계열의 화합물임을 알 수 있었다. 결국 분자량 (1,269)으로부터 본 화합물은 actinomycin C2 혹은 C2a로 추정되나 아미노산 배열이 다를 수도 있으므로 추후 HMBC나 NOESY data 해석을 통하여 신기지어부를 결정코저 한다.

한편, S192b의 경우 UV (365 nm), ¹H, ¹³C NMR data 해석으로부터 이중결합을 4개 가지고 있는 polyene이면서 polyol을 가지고 있는 macrolide계 항생물질로 추정된다.

3) *Kitasatosporia kimorexae*가 생산하는 항생물질 :

본 균주는 HPLC로 분취한 분획을 *in vitro* bioassay한 결과 적어도 8개 이상의 항생물질 유도체를 생산하는 것으로 밝혀졌다. 이들중 함량이 가장 많은 화합물 (이하 KK-1로 약칭)의 물리·화학적 특성은 백색의 무정형 분말로서 융점은 260~280, molecular weight: 1,472 (FAB/MS), UV $\lambda_{\max}^{\text{CHCl}_3}$ MeOH (1:1) (E cm^{1%}): 238 (1,250), 274 (644), 286 (555), 300 (408), 318 (314); IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3400, 2920, 2350, 1650, 1510, 1430, 1380, 1280, 1240, 1170, 1070, 1040이었다. 또한, Dragendorff와 iodine에는 양성이었으나 ninhydrin, anisaldehyde-H₂SO₄ 및 Rhydon-Smith에는 음성을 나타냈다.

아미노산 분석결과 aspartic acid (or asparagine), glycine, threonine, proline, cystein, isoleucine과 미동정 아미노산 3종류가 각각 1몰비로 존재함이

시사되었다. 본 화합물은 NMR 용매인 DMSO- d_6 내에서 안정성이 매우 불량하여 결국 구조동정은 실패하고 말았으나 본 화합물은 유사한 특성을 지닌 기지의 항생물질중 jingsimycin, 5102-2, cystargin, globopeptin, cyclothiazomycin과는 분자량에 있어, saramycetin과는 아미노산 조성이 달라 신규물질로 동정되어 1998년 3월 특허등록되었다.

4) *Str. melanosporofaciens*가 생산하는 항생물질의 구조동정 :

*Streptomyces melanosporofaciens*가 생산하는 항생물질중 main은 FAB-MS 측정결과 분자량이 1,142였다. 또한, double bond를 4개 가지고 있으며, acetal, polyhydroxyl 및 NH_2 moiety를 가지고 있다는 점, 그리고 분리, 정제과정에서 양이온교환수지인 IRC-50에 흡착되고 silica gel TLC에서 alkali 조건이 아니면 전개되지 않는다는 점등으로 미루어 보아 basic macrolide로 추정한다.

바. 생물활성 검정

1) 최소발육저지농도 : 16-Methyloxazolomycin은 세균인 *Bacillus subtilis*와 녹조류인 *Chlorella vulgaris*에 대하여 각각 5.0, 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 MIC 값을 나타냈다. Tetricin A의 경우는 *Pyricularia oryzae*, *Colletrichum lagenarium* 및 *Rhizoctonia solani*에 대하여 2.0~3.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 MIC 값을 나타냈다. KK-1은 *Pyricularia oryzae*, *Colletotrichum lagenarium* 및 *Valsalceratosperma*에 대하여 각각 0.5, 1.0, 4.0 $\mu\text{g/ml}$ 로 매우 강한 항균활성을 나타냈다. 이외에도 *Botritis cinerea*, *Alternaria kikuchina* 및 *Bipolaris oryzae*에 대하여도 8~16 $\mu\text{g/ml}$ 을 나타냄으로서 비교적 강한 항균활성을 나타냈다. KK-1은 식물병원성 곰팡이에 있어 세포벽 합성을 저해함으로써 나타나는 현상인 균사팽윤 (mycelial swelling)을 야기하는 것으로 관찰되었다.

2) *in vivo* 항균활성

Kitasatosporia kimorexae 배양액에서 *Pyricularia oryzae*와 활물기생성 곰팡이인 *Sphaerotheca fuliginia*에 대하여 우수한 예방효과를 나타냈다. 한편, *Streptomyces* 9244균주가 생산하는 항생물질은 항세균성, 항진균성 및 algaecidal 물질로서 *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*는 물론, 활물기생성 곰팡이인 *Sphaerotheca fuliginia*에 대하여 매우 양호한 예방효과를 나타냈으나 담배 식물체에 대하여 약해 (제초효과)가 나타났다. 또한, *Streptomyces melanosporofaciens*가 생산하는 항생물질 역시 *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia oryzae*, *Botrytis cinerea* 등에 대하여 우수한 예방효과를 나타냈으나 벼에 대하여 약해가 나타났다. 이 외에도 A181, A287, A197, A296, A254, A187균주가 생산하는 항생물질의 경우 오이 잿빛곰팡이와 토마토 역병에 대하여 85% 이상의 방제가를 나타냈다.

사. 신규항생물질 생산균주의 동정 :

신규 항생물질로 16-methyloxazolomycin과 tetracin A를 생산하는 *Str.* 9244 균주는 생육특성, 형태학적 특성, 당이용성 및 세포벽의 아미노산 조성 조사에 의하여 *Streptomyces* 속의 균주임을 알았다.

8. 특허출원

Streptomyces 9244 균주가 생산하는 항생물질중 16-methyloxazolomycin 과 tetracin A에 관하여는 각각 1998년 6월과 12월에 특허출원하였다.

여 백

S U M M A R Y

I . Title

Development of selective and biorational low-toxic antibiotics for horticulture

II . Objectives and Importance of the Study

Loss due to harmful insects, weeds and phytopathogen accounts for 30% of total crop. Accordingly, it can be said that pesticide is indispensable for the intermittent supply of food. However, environmental impact by pesticides are much greater than that of medicine. For example, pretty large amount of DDT is still detected from the soil even several decades after its prohibition of usage. In addition, tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD), a contaminant of 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid which had been used as a defoliant during Vietnamese war has been regarded as the most potent environmental pollutant. In our country, veterans and their progenitors of Vietnamese war are still suffering from a TCDD-induced disease.

Recently, some of the pesticides have been known to disrupt endocrine system. Especially, World Wild Life Protection Fund (WWF) defined 45 kinds of pesticides including 2,4,5-T, 2,4-D, DDT, DDT-metabolites, malathion and tributyltin oxide as endocrine disruptor as of August 3rd, 1998. Japanese Drug and Food Hygiene Research Institute declared 74 kinds of pesticides and heavy metal as the endocrine disruptor. Interestingly, all of those compounds are chemically

synthesized.

On the other hand, pesticides from microbial resource have a great advantage with respect to chemistry and biology, to say that they are biodegradable and low toxicity against mammals including human beings. They also serve as lead compounds for organic synthesis because of their chemical novelty and complexity. They invoke no problem like cross-resistance if developed independently from medicinal antibiotics.

From these viewpoints, attempts have been made to develop new antibiotics from microbial origin to satisfy recent worldwide trend of developing biorational and low toxic antibiotics for horticulture.

III. Contents and scope of the Study

1. Soil sampling for microbial isolation

Soil samples were collected by taking into accounts of climate, continent, virgin forest and/or costal district.

2. Isolation and preservation of microorganism

Meso- or thermophilic microorganism was isolated for their advantage of industrilization by employing pour plate or streaking method. Important cultures were stored at -20°C after suspending in 10% glycerol. Organisms producing new antibiotics were stored at -70°C after lyophilized.

3. Taxonomical identification

Identification of the microorganism producing new antibiotics was

carried out by the methods described in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology and International Streptomyces Project.

4. Antimicrobial assay

a. *in vitro* antimicrobial assay

Test microorganisms for *in vitro* antimicrobial assay were consisted mainly of phytopathogens of horticulture and other non-pathogenic germs which could be used for the investigation of antimicrobial spectrum.

b. Investigation of selectivity as a pesticide

Antimicrobial assay against human pathogens was also carried out to find the possibility of antibiotics for human and selectivity. Paper disc agar diffusion method was employed for *in vitro* antimicrobial assay.

c. *In vivo* (pot and field test) antimicrobial activity

- Activity against absolute parasitic fungi : Spores on affected leaves were inoculated to young plants by the brush inoculation method.
- General fungi : Suspension of spore was sprayed on leaves.
- Bacteria : Submerged culture was inoculated in the scratch.
- Preventive value = $(1 - \frac{\text{diseased spot on treated leaf}}{\text{diseased spot on non-treated leaf}}) \times 100$
- Preventive value against *Sphaerotheca fuliginea* and *Puccinia recondita* was also investigated including 11 pathogens.
- Pot test was carried out with young host plants of 5~6 leaf-stage.

5. Isolation and Characterization of Antibiotics

a. Preliminary test

- Heat stability, extraction by organic solvents (EtOAc, BuOH), active carbon adsorption, adsorption to cationic or anionic ion-exchange resins were investigated.

b. Isolation and purification

- Based on the preliminary test, solvent extraction, macroreticular resins (Amberlite XAD-2, Diaion HP-20) adsorption, adsorption to ion-exchange resin, silica gel column chromatography, silica gel and ODS flash column chromatographies, cellulose column chromatography, preparative TLC, HPLC techniques, etc. were used for the purification of the active compounds.

c. Determination of chemical structure

- UV, IR, NMR and mass spectrometers were employed for the determination of chemical structure.

IV. Results and Application

1. Results

A. Collection of soil samples :

Total of 335 soil samples [domestic 231 samples, abroad 104 samples (Phillipine, Japan, USA, Canada)] were collected. Domestic soils were collected from east coast, Jindo, Paekryongdo and Geojedo. Soil samples in bamboo field, orchard, vegetable field, rice field, pine tree forest, wide-leaved forest, field for horticulture (vinyl house), etc. were collected to isolate different varieties of organisms.

B. Isolation, fermentation and preservation of organism :

At the first year of this study, 591 actinomycetes and 330 fungi were isolated from the soil samples collected from southern part of the United States. At the 2nd year, 117 fastidious actinomycetes and 16 oligotrophic actinomycetes were isolated. At the 3rd year, 46 actinomycetes which can survive in the presence of high cycloheximide concentration were isolated.

They were slant cultured on modified Bennet's agar or potato dextrose agar and kept at room temperature after switching cotton plug into rubber stopper. Organisms identified to produce antibiotics were kept at -20°C after suspending spores and mycelium in 20% glycerol. In addition, organisms identified to produce new antibiotics were registered to gene bank after freeze-dried and kept at -70°C.

C. Selection of useful organisms :

Total of 1,100 strains were subjected to antimicrobial screening during 3 years. Seventy two strains including 68 actinomycetes and 4 fungi were found to produce compounds which showed antimicrobial activity against phytopathogens including *Erwinia carotovora*. *In vivo* test showed that broth filtrates of *Str.* 9244, *Str. melanosporofaciens*, *Kitasatosporia kimorexae* and A192 had potent activity.

D. Isolation and Purification of Antibiotics :

1) Antibiotics produced by *Str.* 9244 : Mycelial acetone extract was concentrated under the reduced pressure and applied to Diaion HP-20. It

was then washed with distilled water and subsequently eluted with methanol. Methanol eluate was dried and subjected to solvent distribution with CH₂Cl₂/60% MeOH. CH₂Cl₂ layer (lower layer) with antibacterial activity and upper layer with antifungal activity were separated. CH₂Cl₂ layer was concentrated and subjected to ODS flash column chromatography (60%-->100% MeOH) to yield bioactive 80% methanol fraction. It was further subjected to Sephadex LH-20 gel filtration [*n*-hexane/CH₂Cl₂/MeOH (4:2:1)] and ODS HPLC (Cosmosil, 20 x 250 mm, 63% MeOH containing NaClO₄, 275 nm) to obtain purified 9244-3.

On the other hand, antifungal butanol layer was applied to ODS flash column chromatography (MeOH gradient), Sephadex LH-20 gel filtration (MeOH), ODS HPLC (Cosmosil, 20 x 250 mm, 63% MeOH containing NaClO₄, 275 nm) to give 4 active compounds. Active compounds were adsorbed to ODS open glass column after adding same volume of ultra pure distilled water, washed with the water to eliminate salt and eluted with absolute MeOH.

2) Antibiotics produced by *Streptomyces melanosporofaciens* :

Pool of mycelial acetone extract and broth filtrate was subjected to Diaion HP-20, *n*-BuOH partition, ODS flash column chromatography, Sephadex LH-20 gel filtration, silica gel flash column chromatography, ODS MPLC, polyamine HPLC and ODS HPLC to obtain 4 active compounds. Active compounds were adsorbed to ODS open glass column after adding same volume of ultra pure distilled water, washed with the water to eliminate salt and eluted with absolute MeOH.

3) Antibiotics produced by A192 :

Pool of mycelial acetone extract and broth filtrate was subjected to Diaion HP-20 and 60% methanol/CH₂Cl₂ partition to yield CH₂Cl₂ layer active against *Xanthomonas citri* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and 60% methanol layer with antifungal activity. 60% Methanol layer was further extracted with *n*-BuOH to give solvent layer active against *Pyricularia oryzae* and *Rhizoctonia solani*. CH₂Cl₂ was then applied to ODS flash column chromatography, Sephadex LH-20 gel filtration and ODS HPLC to obtain 2 compounds with antibacterial activity.

On the other hand, *n*-BuOH layer was subjected to ODS flash column chromatography, Sephadex LH-20 gel filtration and ODS MPLC to give active compounds.

4) Antibiotics produced by *Kitasatosporia kimorexae* :

Pool of mycelial acetone extract and broth filtrate was subjected to Diaion HP-20, ODS flash column chromatography and ODS HPLC. Active compounds were adsorbed to ODS open glass column after adding same volume of ultra pure distilled water, washed with the water to eliminate salt and eluted with absolute MeOH to yield amorphous white powder.

E. Structure Determination of Antibiotics

a. Antibiotics produced by *Str.* 9244 :

Physico-chemical properties of S9244-3 were : pale yellow amorphous powder; $[\alpha]_D^{23} +3.6^\circ$ (*c* 0.52, MeOH); UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ) 228

(23,000), 266 (27,200), 275 (32,000), 285 (27,000); IR ν_{\max} (film) 3350 (OH or NH), 2930, 1825 (β -lactone), 1690 (amide), 1645, 1240, 1040 cm^{-1} ; ESI-MS m/z 724 ($M+\text{MeOH}+\text{Na}$)⁺, 692 ($M+\text{Na}$)⁺, 579, 507; HRESI-MS m/z 670.3706 calcd. for $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{O}_9$ (Δ -2.6mmu).

ESI mass spectrum data suggested that molecular weight of S9244-3 was 14 daltons larger than that of oxazolomycin. ^1H , ^{13}C , $^1\text{H}-^1\text{H}$, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ COSY and HMBC spectra afforded us to determine the chemical structure of S9244-3 as "**16-methyloxazolomycin**".

On the other hand, yield of S9244-1 was relatively small. It showed very similar physico-chemical properties to S9244-3. However, ^1H NMR spectra of those 2 compounds showed slightly different properties in the vicinity of 3.5 and 5.5~6.7 ppm (olefin). S9244-1 is thought to be polyene group antibiotic with molecular weight of about 700.

On the other hand, antifungal butanol layer gave 4 active compounds: S9244-451, -452, -453 and -454. NMR and mass data led us to identify 3 known antibiotics as tetramycin A (451), tetrin A (453) and B (454). However, S9244-452 was thought to be a new antibiotic. Negative FAB-MS suggested m/z 678 ($M-\text{H}$)⁻. This was further supported by HRFAB mass data (678.3149, Δ +2.3 mmu).

IR spectrum suggested the presence of OH and/or NH (3450), CO_2H (2750), lactone (1710), CO_2^- (1580) and carbon-carbon double bond (1635, 1515). ^1H , ^{13}C , $^1\text{H}-^1\text{H}$, $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ COSY and HMBC data made us to establish molecular formula as $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{O}_9$ and chemical structure as **tetricin A**. This compound was applied to patent in December, 1998.

2) Antibiotics produced by A192 :

Positive FAB/MSS data of 192a showed m/z 1,270 $(M+H)^+$. This compound showed pinkish color, suggesting long wavelength adsorption. 1H and ^{13}C NMR data suggested conjugated quinolone with amino acids. Further study on spectroscopic data suggested that this compound belonged to actinomycin group antibiotic with m.w. 1,269. Consequently, it was thought to be actinomycin C2 or C2a. But further study on amino acid sequence is under progress by HMBC and NOESY analysis.

On the other hand, S192b with UV maximum at 365 nm was found to be tetraene polyol macrolide on the basis of 1H and ^{13}C NMR data.

3) Antibiotics produced by *Kitasatosporia kimorexae* :

Final purification of the antibiotics produced by the strain gave 8 active compounds. The main active compound (hereinafter referred to as KK-1) was subjected to the analysis of physico-chemical properties: amorphous white powder, melting point; 260~280, molecular weight; 1,472 (FAB/MS), UV $\lambda_{max}^{CHCl_3}$, MeOH (1:1) (E $cm^{1\%}$); 238 (1,250), 274 (644), 286 (555), 300 (408), 318 (314), IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} ; 3400, 2920, 2350, 1650, 1510, 1430, 1380, 1280, 1240, 1170, 1070, 1040. It showed positive color reaction to Dragendorff and iodine but negative to ninhydrin, anisaldehyde- H_2SO_4 and Rhydton-Smith.

Amino acid analysis showed the presence of aspartic acid (or asparagine), glycine, threonine, proline, cystein, isoleucine and unidentified 3 amino acids at 1 molar ratio. It was quite unstable in NMR solvent (DMSO- d_6). Even though we failed to determine the chemical structure,

KK-1 was identified to be different from jingsimycin, 5102-2, cystargin, globopeptin and cyclothiazomycin in molecular weight, and from saramycetin in amino acid composition, thus enabled us to be patented in March, 1998.

4) Antibiotics produced by *Str. melanosporofaciens* :

Main antibiotic among several compounds produced by *Streptomyces melanosporofaciens* showed m/z 1,142 (FAB-MS). ^1H and ^{13}C NMR spectra suggested the presence of 4 double bonds, acetal, polyhydroxyl and NH_2 moiety. This compound was adsorbed to cationic exchange resin (IRC-50) and did not elute on silica gel TLC unless the solvent system was alkali. From these findings, we could conclude that KK-1 belonged to basic macrolide.

F. Biological Assay

a. **Minimal inhibitory concentration** : 16-Methyloxazolomycin revealed MICs of 5.0 and 10.0 $\mu\text{g/ml}$ against *Bacillus subtilis* and *Chlorella vulgaris*, respectively. Tetracin A showed MICs of 2.0~3.0 $\mu\text{g/ml}$ against *Pyricularia oryzae*, *Colletrichum lagenarium* and *Rhizoctonia solani*. On the other hand, KK-1 showed MICs of 0.5, 1.0 and 4.0 $\mu\text{g/ml}$ against *Pyricularia oryzae*, *Colletotrichum lagenarium* and *Valsa ceratosperma*, respectively. It also showed potent activity against *Botrytis cinerea*, *Alternaria kikuchiana* and *Bipolaris oryzae* with MICs of 8~16 $\mu\text{g/ml}$. KK-1 was found to induce mycelial swelling in *Pyricularia oryzae* and *Fusarium oxysporium* by inhibiting most probably fungal cell wall biosynthesis.

2) *In vivo* antimicrobial activity

Broth filtrate of *Kitasatosporia kimorexae* showed potent protective effect against *Pyricularia oryzae* and *Sphaerotheca fuliginia*. On the other hand, antibiotics with antibacterial, antifungal and algaecidal activity produced by *Streptomyces* 9244 showed potent activity against *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani* and *Botrytis cinerea*, including absolute parasitic *Sphaerotheca fuliginia*. However, it showed toxicity against host plant of tobacco plant. Antibiotics produced by *Streptomyces melanosporofaciens* showed potent *in vivo* activity against *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia oryzae* and *Botrytis cinerea*. In addition, antibiotics produced by strains of A181, A287, A197, A296, A254 and A187 also showed higher preventive value than 85% against gray mold disease induced by *Botrytis cinerea* and late blight induced by *Phytophthora infestans*.

G. Taxonomy of *Str.* 9244 :

Str. 9244 which produces 2 new antibiotics, 16-methyloxazolomycin and tetracin A was found to be a *Streptomyces* sp. on the basis of cultural, morphological and chemotaxonomical characteristics.

8. Patenting

16-Methyloxazolomycin and tetracin A produced by *Streptomyces* 9244 was patented as of June and December, 1998, respectively.

여 백

Contents

I. Introduction	31
1. Objectives and Scope	31
A. Objectives	31
B. Scope	33
a. Soil sampling for the isolation of microorganism	33
b. Isolation and preservation of microorganism	34
c. Identification of the useful microorganism	35
d. Antimicrobial assay	35
e. Isolation and characterization of antibiotics	37
II. Collection of Soil Sample	39
1. Introduction	39
2. Results	40
III. Isolation, Culture and Preservation of Soil Microorganism	42
1. Introduction	42
2. Results	44
IV. Selection of Useful Microorganism	47
1. Introduction	47
2. Results	48
A. <i>in vitro</i> antimicrobial activity	48
V. Isolation and Purification of Antibiotics	52
1. Introduction	52
2. Results	54
A. Antibiotics produced by <i>Streptomyces</i> 9244	54

B. Antibiotics produced by <i>Streptomyces melanosporofaciens</i> ...	58
C. Antibiotics produced by A192	60
D. Antibiotics produced by <i>Kitasatosporia kimorexae</i>	63
VI. Structure Determination of Antibiotics	67
1. Introduction	67
2. Results	69
A. Antibiotics produced by <i>Streptomyces</i> 9244	69
B. Antibiotics produced by A192	86
C. Antibiotics produced by <i>Kitasatosporia kimorexae</i>	90
D. Antibiotics produced by <i>Str. melanosporofaciens</i>	95
VII. <i>in vivo</i> Biological Assay	98
1. Introduction	98
2. Results	99
A. Minimal inhibitory concentration	99
B. <i>in vivo</i> antimicrobial activity	102
VIII. Identification of Microorganism	104
1. Introduction	104
2. Results	105
XI. Patenting	108
1. Introduction	108
2. Results	109
1. Patent for 16-methyloxazolomycin	109
2. Patent for tetracin A	118

목 차

제 1 장 서 론	31
제 1절 연구개발의 목적과 범위	31
1. 연구개발 목적	31
2. 연구개발의 범위	33
가. 유용 미생물 분리용 토양시료의 채취	33
나. 미생물 분리 및 보존	34
다. 유용균주의 동정	35
라. 항균활성 검정	35
마. 항생물질의 분리 및 동정	37
 제 2 장 토양시료의 채취	 39
제 1절 서설	39
제 2절 연구결과	40
 제 3장 토양 미생물의 분리, 배양 및 보존	 42
제 1절 서설	42
제 2절 연구결과	44
 제 4장 유용 미생물 선발	 47
제 1절 서설	47
제 2절 연구결과	48
1. <i>in vitro</i> 항균활성	48
 제 5장 항생물질의 분리 및 정제	 52
제 1절 서설	52
제 2절 연구결과	54
1. <i>Str.</i> 9244 균주가 생산하는 항생물질	54

2. <i>Str. melanosporofaciens</i> 균주가 생산하는 항생물질	58
3. A192 균주가 생산하는 항생물질	60
4. <i>Kitasatosporia kimorexae</i> 균주가 생산하는 항생물질	63
제 6장 항생물질의 구조동정	67
제 1절 서설	67
제 2절 연구결과	69
1. <i>Str.</i> 9244 균주가 생산하는 항생물질의 구조동정	69
2. A192 균주가 생산하는 항생물질의 구조동정	86
3. <i>Kitasatosporia kimorexae</i> 균주가 생산하는 항생물질	90
4. <i>Str. melanosporofaciens</i> 균주가 생산하는 항생물질	95
제 7장 <i>in vivo</i> 생물활성 검정	98
제 1절 서설	98
제 2절 연구결과	99
1. 최소발육저지농도 (MIC)	99
2. <i>in vivo</i> 항균활성	102
제 8장 신규 항생물질 생산균주의 동정	104
제 1절 서설	104
제 2절 연구결과	105
제 9장 특허출원	108
제 1절 서설	108
제 2절 연구결과	109
1. 16-Methyloxazolomycin의 특허출원	109
2. Tetricin A의 특허출원	118

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구개발의 목적

해충, 잡초, 식물병원균등에 의한 농작물의 피해는 전체 수확량의 30%를 차지한다고 알려져 있다. 따라서 식량자원의 지속적인 공급을 위하여는 농약이 절대적으로 필요하다 하겠다. 그러나 의약품에 비해 농약이 지구환경에 미치는 영향은 실로 엄청나다. DDT의 경우 독성이 강해 사용 및 생산금지 조치가 내려진 후 수십년이 지난 현재에도 토양중에 상당량 잔류되어 있다. 또한 tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD)은 월남전에서 미군이 사용하였던 제초제 (2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid, 일명 Agent Orange) 유기합성시 극미량 생성되는 부산물이나 그 독성은 지금까지 인간에 의하여 만들어진 화합물중 가장 강하다고 하여 악명 높으며 우리나라에서도 월남전 참전용사 일부와 그 직계 자손들이 고엽병이란 질병으로 고통받고 있다.

농약중 일부는 최근 환경호르몬으로 규정되어 내분비계를 교란시키는 것으로 밝혀지고 있다. 특히, 세계야생동물보호기금 (WWF)은 1998년 8월 3일 현재 농약으로 사용되고 있는 화합물중 2,4,5-T, 2,4-D, alachlor, aldicarb, amitrole, atrazin, benomyl, beta-HCH, cabaryl, chlordane, cypermethrin, DBCP, DDT, DDT-metabolites, dicofol, dieldrin, endosulfan, esfenvalerate, ethiparathion, fenvalerate, lindane, heptachlor, h-epoxide, kelthane, kepone, malathion, mancozeb, maneb, methomyl, methoxychlor,

metiram, metribuzin, mirex, nitrofen, oxychlordane, permethrin, synthetic pyrethroids, toxaphene, transnonachlor, tributyltin oxide, trifluralin, vinclozolin, zineb, ziram과 같이 총 45종의 화합물을 내분비계 장애물질로 규정짓고 있다. 또한 일본 의약품 식품위생연구소는 74종의 화합물을 내분비계 장애물질로 규정하였다. 여기서 간과하여서는 안될 것이 이들 화합물 모두가 유기합성에 의하여 생산된다는 점이다.

의약품에서의 독성문제는 죽어가는 환자가 다른 선택의 여지가 없다고 판단되면 어느정도의 독성은 감수하여야 한다는 것이 당연한 사실로 받아들여지고 있는 반면 농약의 독성은 질병과 무관하게 모든 사람에게 무차별적으로 해를 준다는 점에서 사용시 더욱 신중해야 한다. 쌀이나 채소류와 같이 우리가 주식으로 이용하는 농작물에 농약이 잔류되어 있다고 할 경우 1회에 섭취하는 양은 극미량이라고 하나 매일매일의 섭취에서 오는 체내 축적과 이에 따른 독성문제는 심각하게 받아들여져야 할 것이다. 또한 농약으로 사용하는 화합물이 인체 병원균에 대하여도 항균활성을 나타낼 경우는 교차내성 (cross resistance)을 유발시키므로 바람직하지 못하다. 따라서 농약으로 사용하는 화합물은 독성 및 교차내성의 관점에서 신중히 고려되어야 한다. 최근 국민경제의 향상과 더불어 무공해 농작물에 대한 선호도가 날로 증가하고 있으며 이는 농약에 대한 국민들의 인식과 공포심이 잘 반영되어 있다고 사료된다.

년간 살균제 소비량은 5.763 M/T으로서 우리가 매일 섭취하는 채소류에 상당량 잔류되어 있을 것으로 생각한다. 또한 이들 농약중 미국, 구라파, 일본등지에서는 인체 병원균에 대하여 교차내성을 일으킨다는 이유 때문에 농약으로서의 사용이 금지된 streptomycin이 채소류의 썩음병 방제를 위하여 상당량 사용되고 있다. 국내 농작물에 대한 농약 규제가 심각하게 제기되고 있지 않는 이유는 농민들을 보호하기 위한 수단에 불과할 뿐이다. 국내 농산물도 수입 농산물과 같이 엄격하게 규제한다면 심각한 문제가 대두될 것이다. 그러나 정부는

농민을 보호하기 위한 방편으로 언제까지 전국민의 건강을 소홀히 할 것인가에 대하여는 의문점이 제기된다.

미생물 유래 항생물질 농약이 갖는 화학적, 생물학적 의의는 매우 크다. 즉 biodegradable 하기 때문에 토양내 잔류성이 문제시 되지 않으며 선택성이 뛰어나기 때문에 인체에 독성이 거의 없고 농약으로만의 이용을 목적으로 의약품 항생물질과는 독자적으로 개발되었을 경우 교차내성과 같은 문제점이 전혀 없다. 또한 항생물질은 매우 독특하고 복잡한 구조를 가지고 있는 것이 많으므로 유기합성의 중요한 lead 화합물이 된다.

따라서 본 연구팀은 무공해성 농약개발이라는 세계적인 추세에 호응하고 또한 10여년간의 농약용 항생물질 개발 경험을 바탕으로 식물병원균에 선택적 항균활성을 나타내는 무독성·무공해 농약을 개발하는 것을 목적으로 하였다.

2. 연구개발의 범위

가. 유용미생물 분리용 토양 시료의 채취

일반적으로 새로운 미생물이 새로운 항생물질을 생산할 가능성이 높다는 것은 잘 알려진 사실이다. 따라서 새로운 미생물을 분리하기 위하여는 미생물 분리원이 되는 토양을 특이한 환경으로부터 채집하는 것이 유리하다. 토양 미생물총 (soil microflora)은 기후나 지역에 따라 매우 상이하기 때문에 하기의 사항에 주안점을 두고 본 연구를 추진하였다.

- 1) 기후별 특성을 고려한 토양시료 채취 및 미생물 분리: 열대성, 아열대성 기후의 토양과 국내 산악지, 갯벌, 동굴, 채소밭, 과수원 등지의 토양을 대상으로 채취하였다.
- 2) 지역별 특성을 고려한 토양시료 채취 및 미생물 분리: 국내 섬지방 및 대륙

과 고립되어 진화한 미생물 분리를 위하여 섬나라 (Phillipine) 토양시료를 채취하였다.

- 3) 인간의 발이 거의 닿지 않은 처너림속의 토양채취 : 대관령 및 강원도 양양의 자연산 송이 서식지 토양과 같이 오염되지 않은 토양을 대상으로 하였다.
- 4) 해안지역 토양 시료 채취 : 진도, 동해안 해변가를 중심으로 토양시료를 채취하였다.

나. 미생물 분리 및 보존

1) 분리 대상 미생물

- * 산업화를 고려한 미생물 분리: 중온성 및 고온성 미생물 대상.
- * rare, fastidious 및 oligotrophic actinomycetes를 대상으로 분리하였다.

2) 분리를 위한 배지의 선택

- 일반 방선균: starch-casein agar, modified benett's agar, chitin agar 배지를 사용하여 분리하였다.
- oligotrophic 방선균: confined medium (일반 영양배지의 1/1000 수준)을 사용하여 분리하였다.

3) 토양시료의 전처리 방법: 70°C/48 시간

4) 분리방법: 상법인 pour plate method (일반 방선균)와 streaking method (funic acid 및 oligotrophic media)를 이용하였다.

5) 미생물 보존

- 미생물 종류별로 적당한 배지를 선택하여 slant 배양한 후 포자와 균사를 긁어 취해 10% glycerol에 현탁시킨 후 -20°C에 보관하였다.
- 수시로 사용하여야 하는 경우에는 사면 배양한 후 면전을 고무전으로 교체하여 실온에 보관하면서 사용하였다.
- 유용균주에 대하여는 동결건조 후 -70°C에 보존하고 신규 항생물질을 생

산하는 균주에 대하여는 유전자 은행에 기탁함과 동시에 동결건조 후 -70℃에 보존하였다.

다. 유용균주의 동정

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, International Streptomyces Project, Numerical Taxonomy 방법을 병용하였다.

라. 항균활성 검정

1) *in vitro* 항균활성

표 1과 같이 *in vitro* 항균활성 검정에 사용한 검정균은 주로 원예작물 병원균을 대상으로 하였으며 기타 비병원성 균주는 항균스펙트럼과 신·기지역부를 판단하는데 이용되는 균주들을 주축으로 하였다.

2) 농약용 살균제로서의 선택성 조사

- 인체 병원균에 대한 항균활성 조사도 병행함으로써 농약으로서의 선택성은 물론 의약용 항생물질로서의 개발 가능성도 함께 조사하였다.
- 검정방법 : 세균과 효모는 액체배양을 한 후 일정액을 취하여 검정용 agar plate를 제작하며 곰팡이의 경우는 한천 배지에서 배양하여 포자를 충분히 형성시킨 다음 일부를 취하여 멸균증류수를 가한 뒤 균질하였다. Slurry 상태의 균질액은 potato sucrose agar나 potato dextrose agar 배지와 혼합하여 검정용 plate를 제작한다. 항균활성 시험은 “paper disc agar diffusion method”에 따라 행하였다.

표 1. 항생물질 검정용 (*in vitro*) 균주

종 류	균 주 명	원 인 병 명
G(+) bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209 P <i>Staphylococcus aureus</i> Resistance (R-209) <i>Bacillus subtilis</i> IAM 1069 (NIIII PCI 219P)	황색포도상 구균 다제내성 포도상 구균 고초균
G(-) bacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 13130 <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>oryzae</i> IFO 3312 <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>citri</i> IFO 3781 <i>Erwinia carotovora</i> IFO 1008	채소 세균병 수도 흰빛 잎마름병균 감귤궤양병균 야채 무름병균
Yeast	<i>Candida albicans</i> IAM 4905 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 1008	칸디다 병균 효모균
Fungi	<i>Alternaria mali</i> IFO 8984 <i>Botrytis cinerea</i> IFO 5365 <i>Glomerella cingulata</i> IFO 9767 <i>Cochliobolus miyabeanus</i> IFO 5277 <i>Colletotrichum lagenarium</i> IFO 7513 <i>Pyricularia oryzae</i> IFO 5994 <i>Fusarium oxysporum</i> IFO 9761 <i>Rhizoctonia solani</i> IFO 6258	사과 갈색점무늬병균 야채 갯빛곰팡이병균 사과 탄저병균 깨씨 무늬병균 오이등의 탄저병균 도열병균 채소 시들음병균 채소 갈록병균
Algae	<i>Chlorella vulgaris</i> IFO 15941	녹조류

2) *in vivo* (pot 및 field 시험) 활성 검정

- 활물기생성 곰팡이 : 나병 식물체에 형성된 포자를 “Brush inoculation method (Kusaka J. *Pesticide Sci.*, 4, 345, 1979)”에 준하여 어린 식물체에 접종하였다.
- 일반 곰팡이 : 병원균별로 적합한 배지를 선택하여 접종한 후 포자 및 유주자 형성을 충분히 유도시킨 다음 현탁액을 만들어 식물체에 분무 접종하였다. 단 *Pyricularia oryzae* (도열병균)의 경우 한천배지상에서 장기 보존할 경우 병원성을 상실하기 때문에 쌀겨나 벧집배지에 배양하여 포자를 형성시

킨 후 포자 현탁액을 접종하였다.

- 세균류 : 액체 배지에서 배양시킨 후 멸균 생리식염수에 현탁하여 상처접종 하였다.

- 방제가는 $(1 - \frac{\text{약제처리구의 병반수}}{\text{약제비처리구의 병반수}}) \times 100$ 에 의거 산출하였다

- 표 1에서 열거한 식물병원균 (*Erwinia carotovora* 외 11균주)에 대한 방제 및 치료효과 조사 이외에도 활물기생성 병원균인 *Sphaerotheca fuliginea* (오이 흰가루병)과 *Puccinia recondita* (밀 붉은 녹병)등에 대한 pot 시험도 병행하여 수행하였다.

- Pot 시험은 3-5엽기의 유묘 식물을 이용하며 병원균별로 발병이 잘되는 작 물을 선택하였다.

마. 항생물질의 분리 및 동정

1) 1차 분리, 정제 시험

- 산성, 중성, 알칼리 조건하에서의 열처리 (100°C/15분)로 안정성 조사
- 산성, 중성, 알칼리 조건하에서의 유기용매(EtOAc, BuOH) 분배성 조사
- 산성, 중성, 알칼리 조건하에서의 활성탄 흡착 및 용출성 조사
- 산성 (Dowex-1) 및 염기성 (Dowex-50) 이온교환수지 흡착성 조사

2) 활성물질의 분리 및 정제

- 1차 분리, 정제 시험 결과를 토대로 유기용매 추출, macroreticular resins (Amberlite XAD-2, Diaion HP-20), 이온교환수지, silica gel column chromatography, silica gel 및 ODS flash chromatography, cellulose column chromatography, preparative TLC, HPLC등을 이용하여 단일물질로 분리, 정제하였다.

3) 분리 항생물질의 구조 및 신·기지 여부 동정

- UV, IR, NMR, Mass spectrometer를 이용하여 물리·화학적 특성조사 및 구조동정하였다.
- 신·기지 여부는 일본이화학연구소 항생물질 연구소나 Kitasato 연구소의 항생물질 data base 및 chemical abstract (CA)를 이용하여 검색하였다.

제 2 장 토양시료의 채취

제1절 서 설

우리보다 먼저 항생물질 개발에 착수한 미국, 일본의 경우 미생물 분리를 위한 토양시료 채취 대상지역을 전세계로 확장하고 있다. 미국의 제약회사들은 1950년대부터 필리핀, 인도네시아와 같은 아열대성 지역을 대상으로 광범위하게 토양시료를 채취하여 왔으며, 연구자가 유학한 일본 이화학연구소 항생물질 연구실의 경우만 하더라도 중국의 우루무치 사막지방, 필리핀, 인도네시아, 아프리카 등지로부터 토양시료를 채취하여 유용미생물을 분리하고 있었다. 막대한 비용과 위험을 무릅쓰고 열대우림지역과 사막지방으로 가는 것은 다름아닌 새로운 유용 미생물을 찾기 위해서이다. 즉, 흙 한줌으로부터 엄청난 경제적 이득을 가져다 주는 미생물을 분리하기 위함이다.

1997년 8월 24일 KBS 일요스페셜 “생물자원 시대, 종이 유출되고 있다” 프로와 26일 조선일보 사설에는 “생물자원 유출”이라는 기사가 실렸다. 21세기의 가장 중요한 자원인 생물종이 우리가 의식하지 못하는 사이에 유출되고 있다는 자체도 놀라울 뿐만 아니라 그렇게 유출된 우리 생물종으로 외국의 연구자가 훨씬 깊은 연구를 함으로써 엄청난 이익을 챙기고 있는 데도 불구하고 우리는 전혀 권리 주장을 할 수 없다는 사실이 더더욱 안타깝다. 이와 같이 생물자원이란 기술 선진국이 먼저 연구할 경우 외국의 소유가 된다는 사실이다. 미생물종에는 항생물질을 생산함으로써 엄청난 이익을 가져다 주는 균주가 많다. 예를 든다면 *Streptomyces venezualae*, *Str. paraguayensis*는 일찍이 미국이 각각 베네쥬엘라와 파라과이 토양으로부터 분리하여 토양시료의 채취지역을 따서 이름부쳤으며 현재 항생물질을 생산하고 있는 균주들이다.

효소세제로 사용되고 있는 cellulase, protease 및 lipase를 생산하는 *Bacillus subtilis*는 일본 이화학연구소의 Horikoshi 박사에 의하여 아프리카 알카리성 토양에서 분리된 미생물이다. Horikoshi 박사는 세척액의 경우 pH 10~11가 된하다는 사실에 착안하여 호염성 세균을 탐색하였고 이를 위하여 아프리카나 사막지역의 알카리성 호수 주변의 토양에서 미생물을 분리할 것을 시도하였다. 그 결과 호염성 세균인 *Bacillus subtilis*를 분리하였으며 이로부터 효소를 분리하여 세제로 이용함으로써 매년 엄청난 royalty를 받고 있다.

이와 같이 미생물의 서식지가 되는 토양을 잘 선택하고 target-oriented screening system을 가지고 접근함으로써 우리에게 엄청난 경제적 이익을 가져다 주는 미생물을 분리할 수 있다는 사실에 역점을 두고 다양한 환경의 토양 시료를 채취하였다.

제2절 연구결과

토양시료는 국내 231점, 국외 104점, 계 335점을 채취하였다. 필리핀의 토양 시료는 본과제의 2차년도 계획서에 준하여 과제책임자가 직접 산악지, 고산지대, 사탕수수밭, 고냉지 채소재배지역, 코코넛 농장, 활화산지대등 다양한 환경에서 채취하였으며, 미국과 캐나다의 토양은 본과제와는 별도로 해외출장가는 길에 총괄 과제책임자가 직접하였고, 일본 및 베트남의 토양은 당연구원 직원에게 부탁하여 채취한 것이다. 국내 토양의 경우 포항 (영일만 일대), 강릉 및 동해안 일대, 동굴속, 탄광지역, 산악지등지로부터 토양시료를 채취하였다 (표 2). 섬지역은 진도, 백령도 및 거제도를 중심으로 토양시료를 채취하였다. 또한, 다양한 미생물분리하기 위하여 대나무밭, 과수원, 채소밭, 논, 포도밭, 소나무 서식지, 활엽수 서식지, 원예작물 재배지 (비닐하우스) 등으로 부터 토양시료를 채취하였다.

표 2. 토양시료 채취 현황

채취장소	시료수	채취장소	시료수
선운사	7	Puerto Azul	6
변 산	5	Tarlac	7
영 월	10	Parksangjan	10
박달재	7	Matabunkai	7
치악산	5	Batangas	7
장 평	5	Calilaja	9
평 창	3	Tagaytai	10
대관령	10	Baquio	15
정 선	10	Wisconsin, USA	3
거제도	5	San Fransco	5
옥 천	5	Guelph, Canada	3
영 동	3	Vancouver	5
보 은	10	Saitama, Japan	2
괴 산	3	Mt. Fuzi, Jpn	2
거제도	6	Wako city, Jpn	3
강원 고성	6	Vietnam	10
경남 통영	5	대관령	5 (3년차)
제주시	5	강원, 영월	5
서귀포	5	강원, 평창	5
전북 남원	5	강원, 강릉	5
강원 강릉	4	전남, 진도	5
강원 동해	3	전남, 해남	5
경북 울진	2	전남, 고흥	5
강원 원덕	2	전남, 강진	5 (3년차)
포항 구룡포	3	백령도	10
경주 토암산	4	충북, 박달재	3
경남 함양	5	강원, 설악산 일대	10
경남 적상산	3	강원, 고성, 장평	10
덕유산	5	강원, 정선	7
총 시료수	335		

제 3장 토양 미생물의 분리, 배양 및 보존

1. 서 설

그 동안 수천가지 항생물질이 개발되었기 때문에 새로운 항생물질을 분리해 낸다는 것이 날로 어려워지고 있는 것이 사실이다. 그러나 1) 미생물 분리원이 되는 토양을 특이한 환경으로 부터 채취, 2) 새로운 미생물 자원 (rare, fastidious, oligotrophic actinomycetes)의 분리, 3) 독창적인 검색 방법등을 병용한다면 충분히 가능성이 있다고 판단된다. 당연구실에서도 최근 rare 및 oligotrophic actinomycetes 배양액으로 부터 새로운 항생물질을 분리하였으며 이외에도 다음과 같은 항생물질들이 최근 rare, fastidious 및 oligotrophic actinomycetes 배양액으로 부터 분리 보고되고 있다.

표 3. 신규 항생물질을 생산하는 소수종 방선균

생 산 균 주	물 질 명	효 과
<i>Micromonospora</i>	dapiramicin,	antifungal
	rustomicins	
	crisamicin B, D, E*	antibacterial, anticancer
<i>Kitasatosporia</i>	cystargin	antifungal
	phosalacin	"
	kimorexins*	"
<i>Actinomadura</i>	cationomycin	anticoccidial
<i>Nocardia</i>	maduramicins	"

*당연구실에서 개발한 항생물질

1955년까지만 하더라도 개발된 항생물질의 수는 불과 550개에 불과하였다. 그러나 그후 20년간은 신규 항생물질이 폭발적으로 분리되어 무려 5,500개의 화합물이 새로이 분리되기에 이르렀다. 현재는 15,000개 정도의 화합물이 분리, 보고되고 있다. 물론 이들중 일부는 녹조류, 리첸류 (lichens), 고등식물 및 동물원으로부터 분리된 화합물도 상당수 있겠으나 64% 정도는 미생물원으로부터 분리된 것들이다. 이처럼 항생물질 개발을 위하여 미생물자원을 선호하는 것은 동·식물원에 비하여 대량 배양이 용이하고 생산에 있어 경제적으로 유리하다는 점 때문이다.

물론, 종이 전혀 다른 미생물이 동일한 항생물질을 생산하는 예는 가끔 있으나 새로운 미생물이 신규 항생물질을 생산할 확율은 동일 미생물에 비하여 높다고 할 수 있다. 이러한 이유 때문에 기존의 분리방법으로는 잘 분리되지 않는 새로운 방법들이 많은 학자들에 의하여 제시되고 있다. 특히, 일본의 Nonomura 등은 humic acid를 이용하는 방법으로 세균의 생육을 저해함으로써 방선균류만을 선택적으로 분리하는 방법을 제시하였다. Nonomura 박사는 tunicamycin과 nalidixic acid (20 mg/l)를 첨가할 경우 actinomycetes와 *Micromonospora*의 생육은 저하되지 않는 반면, 일반 세균과 곰팡이의 생육이 현저히 저하되었다고 하였다. 이외에도 열처리 방법, SDS 처리법, phenol 처리법, cycloheximide를 첨가하는 방법 등을 제시하고 있다.

한편, 영국의 Goodfellow 박사는 영양분중 탄소원이나 질소원을 한정함으로써 새로운 분리방법을 제시하고 있다. 그외에도 sodium chloride, sodium azide, phenylethanol, thallos acetate, crystal violet 등을 일정량 첨가하는 방법등을 제시하고 있다. 그러나 한정된 연구인력으로 이상의 방법들을 모두 동원하여 미생물을 분리한다는 것은 현실적으로 불가능하다. 따라서 당 연구팀은 토양의 열처리 방법과 humic acid 한천, oligotrophic media 혹은 항생물질 (cycloheximide) 첨가법을 병용하여 미생물을 분리하였다.

한편, 미생물 보존기술 역시 매우 중요하다. 방선균의 경우 일반 modified benett's agar나 starch casein agar 배지에서 배양할 경우 포자를 형성하지 않는 경우가 있다. 이러한 방선균은 장기 보존이 어렵다. 따라서 포자를 형성시

킬수 있는 배지를 찾아내야만 하는데 통상 potato dextrose (or sucrose) agar, soil extract agar등을 이용하기도 한다. 미생물의 경우 일단 사멸하면 다시 동일 토양을 사용하여 분리하더라도 쉽게 분리되지 않는 경우가 가끔 있으므로 신중하게 보존하여야만 한다.

제 2절 연구결과

토양 미생물의 분리는 1년차에 있어서는 이미 확보하고 있는 미국의 California, Nevada, Utah 주의 토양을 대상으로 actinomycetes 속과 곰팡이를 중심으로 분리하였다. 1년차에는 modified Bennett's agar를 사용하여 일반 방선균과 곰팡이를 함께 분리하였으나 2년차부터는 분리 방선균의 수보다는 rare 혹은 fastidious actinomycetes를 분리할 목적으로 fuming acid agar, oligotrophic agar 혹은 modified benett's agar를 사용하였으며 3년차에는 modified benett's agar에 cycloheximide를 첨가하는 방법을 사용하였다.

이상의 방법으로 1년차에는 방선균 591 균주, 곰팡이 330 균주를 분리하였으며 2년차에는 fastidious actinomycetes 117균주와 oligotrophic actinomycetes 16 균주를 분리하였다. 또한, 3년차에선 고농도의 cycloheximide 존재하에서 생육가능한 actinomycetes 46 균주를 분리하였다. 분리한 균주에 대하여는 modified benett's agar 혹은 potato dextrose agar 중 균사의 성장과 포자형성이 양호한 배지를 선택하여 사면배양한 다음 면전을 고무전으로 교체하여 실온에 보존하면서 사용하였다. 한편, 항생물질을 생산하는 것으로 밝혀진 균주에 대하여는 포자와 균사체를 20% glycerol 액에 현탁시킨 다음 -20℃에 보존하였다. 또한, 신규 항생물질을 생산하는 것으로 밝혀진 균주에 대하여는 생명공학연구소의 유전자은행에 등록함과 동시에 동결건조하여 -70℃에 보존하였다.

표 4-1. 미국 서남부 지역 토양으로부터의 미생물 분리 현황 (1년차)

Soil source	No. of isolate		Soil source	No. of isolate	
	Actinomycetes	Fungus		Actinomycetes	Fungus
Big Basin	6	10	Yosemite	15	6
"	3	6	"	3	4
Davis	8	6	"	1	0
Donor Lake	7	8	"	7	4
Chico	8	5	"	6	6
Lake Tahoe	11	8	Weimar	28	8
"	13	10	"	0	1
Napa Valley	12	6	"	21	8
"	8	11	"	0	0
Yosemite	13	11	Santa Rosa	13	3
"	2	0	"	7	1
"	16	1	"	10	6
"	22	6	"	0	1
"	18	12	"	21	5
"	9	1	"	2	4
Napa Valley	6	8	"	5	8
"	6	1	"	14	7
Davis	15	4	"	1	7
"	7	10	"	4	3
Big Basin	30	2	"	3	15
Yosemite	24	4	"	27	1
"	0	1	"	4	0
"	1	0	"	7	0
"	5	0	"	2	6
"	14	0	"	24	2
"	1	5	"	2	4
"	2	0	"	6	2
"	14	10	"	-	7
"	6	2	"	2	1
"	4	7	"	8	2
Yosemite	0	5	"	4	1
"	3	9	"	3	7
"	5	7	"	12	-
"	10	5	Elk beach	10	3
"	10	11	"	-	5
Subtotal	319	192	Subtotal	272	138
Total			921		

표 4-2. 토양별 방선균 분리 현황 (2년차)

토양별	균주수			토양별	균주수		
	BM	OM	PM		BM	OM	PM
Sequoia park, USA		7		Redwood Nat'l PK	3		4
Bryce canyon	7	3		Oregon Crater Lake	1		
Bakersfield	12	2		Olympic Nat'l PK	2		1
Camel beach	13	4		Columbia	5		5
San Diego	8		1	Utah Crater Lake	3		1
Montrey	2			Grass valley	8		15
Sequoia Clover Crk.	3			Death valley	35		13
Grand Canyon	15						
계					117	16	35

*BM; Bennet's agar medium, OM; oligotrophic agar, PM; potato dextrose agar

표 4-3. 토양별 방선균 분리 현황 (3년차)

토양별	균주수	토양별	균주수
강원 강릉	5	대구	1
일본 와코우시	3	충북, 일죽	2
강원 정선	1	지리산	2
제도도	8	강원 동해시	3
경주	4	필리핀 Matabunkai	3
일본 후지산	1	Tagaitai	8
공주	2	Parksangjan	2
계			46

제 4장 유용 미생물 선발

제 1절 서 설

항생물질을 개발하기 위한 탐색법으로 곰팡이의 경우 고전적인 방법은 검정용 plate에 미생물 배양액을 첨가 혹은 침지한 cup 혹은 paper disc를 올려놓고 곰팡이를 한가운데 접종함으로써 균사성장 저해활성을 측정, 저지환이 형성되면 항생물질을 생산하는 것으로 판정하였다. 그러나 곰팡이의 경우 균사성장 (spreading), 포자형성 (sporulation), 포자의 발아 (germination) 억제활성을 함께 조사하여야 한다. 특히, 곰팡이의 경우 포자가 바람에 의하여 날라와 식물 잎에 부착하여 온도와 습도가 적당하면 발아하여 병을 일으킨다는 특성 때문에 antigermination 활성을 가진 항생물질이 식물병 방제를 위하여는 매우 유리할 수 있다. 그러나 고전적인 항균력 시험방법으로는 antispreading만을 조사하는데 그치므로 항진균성 항생물질을 검색하는 방법으로는 적합하지 않다. 따라서 본 연구팀은 균사성장, 포자형성 및 포자발아 억제력을 동시에 관찰할 수 있는 방법을 선택하였다. 즉, potato dextrose 혹은 potato sucrose agar 배지에서 미리 배양하여 포자와 균사를 충분히 형성시킨 다음 일부를 취하여 tissue homogenizer를 이용, 균질하고 균질액중 일정량을 취하여 중층으로 접종함으로써 검정용 배지를 제작하였다.

한편, 세균의 경우 액체 배지에서 1일간 배양한 seed culture를 미리 만들어 둔 한천배지에 중층으로 접종하여 검정용 플레이트를 제작하였다. 항균활성 검정은 paper disc agar diffusion 방법을 사용하였다. 사용한 검정균주는 대부분 식물병원성 곰팡이와 세균성 *Xanthomonas* 및 *Erwinia*를 사용하였다. 이와 같은 방법은 비교적 오래된 방법이기도 하나 최근까지 광범위하게 이용되고 있다.

제 2절 연구결과

1. *in vitro* 항균활성

지금까지 분리한 균주중 방선균 770균주와 곰팡이 330 균주, 총 1,100를 배양하여 *Aspergillus niger* (AN), *Alternaria mali* (AM), *Glomerella cingulata* (GC), *Fusarium oxysporium* (FO), *Botrytis cinerea* (BC), *Pyricularia oryzae* (PO), *Rhizoctonia solani* (RS), *Colletotrichum lagenarium* (CM), *Cochliobolus miyabeanus* (CM), *Xanthomonas citri* (XC), 및 *Erwinia carotovora* (EC)를 피검정균으로 하여 1차 항생물질 생산여부를 조사하였다. 그 결과, 방선균 68균주, 곰팡이 4균주, 계 72균주가 식물병원균에 대하여 항균활성을 가진 항생물질을 생산하는 것으로 밝혀졌다. 이들 균주 배양액에 대하여는 포트시험을 통한 *in vivo* 항균활성을 검정함과 동시에 일부는 항생물질을 분리, 정제하였다.

특히, *Streptomyces* 9244, *Str. melanosporofaciens*, *Kitasatosporia kimorexae* 및 *Streptomyces* 192균주의 항균활성이 강하게 나타났다. 방선균 배양액의 경우 *Xanthomonas*나 *Erwinia* 속 병원균에 대하여 항균활성을 나타내는 균주가 극소수인데 반하여 *Streptomyces* 192 균주는 *Xanthomonas* sp.에 비록 약하기는 하나 항균력을 가진 화합물을 생산하는 것으로 나타났으므로 상기 4균주가 생산하는 항생물질을 우선적으로 분리, 정제하였다.

표 5-1. 선발균주의 식물병원균에 대한 항균활성 (1년차)

(inhibition zone : mm)

Activity Strain No.	Test microorganism										
	AN	AM	GC	FO	BC	PO	RS	CL	CM	EC	XC
A96-53*	10	13	10								
A96-72	10	13	10								
A96-76		10	13								
A96-116	13	15	10	10		16					11
A96-147		14				14					
<i>Streptomyces</i> 9244		20				17	25				
F96-53**		14									
F96-54					13						
F96-64			13								
F96-74					13						
<i>Str. melanosporofaciens</i>			15	15	17	25	17		17		
<i>Kitasatosporia kimorexae</i>				25		42	35				

*Abbreviations : XC : *Xanthomonas citri*, EC : *Erwinia carotovora*,
 BC: *Botrytis cinerea*, CL: *Colletotrichum lagenarium*, PO : *Pyricularia oryzae*
 RS : *Rhizoctonia solani*, CH : *Chlorella vulgaris*

표 5-2. 선발균주의 식물병원균에 대한 항균활성 (2년차)

(inhibition zone ; mm)

균주명	검정균							균주명	검정균						
	XC	EC	BC	CL	PO	RS	CH		XC	EC	BC	CL	PO	RS	CH
A149			15	26	34	25		A217				19	17	20	
A150			10					A250							12
A157					15			A254	10		10	12	13		
A158						12		A255							11
A162	11			13	13	16	25	A258				20		20	
A164				13	11		14	A263						25	
A166			12					A264				22		20	
A169			11				11	A268					11	17	20
A172			12					A269			18	19	25	18	13
A174			11					A274				12			14
A177							14	A287	10		11	12	11		
A181	14		12		11	16	15	A289							14
A185							10	A294	16			14	15	17	23
A187	18		15	11	12	21		A296	14			14	13	16	22
A189						20		A303	13			14	16	19	24
A192	16		16	13	12	18		A305					18		
A193	14		16	14	12	18		A315				11	14	14	
A194	14		16	11	12	14		A332					14		
A197	16		13	11	12			A335					11		
A200						11		A338							14
A208				19	15	22		A339					12	18	20
A212				18	16	18		A342					29		
A213				19	20	24									

표 5-3. 선발균주의 식물병원균에 대한 항균활성 (3년차)

(inhibition zone ; mm)

No	XC	EC	BC	CL	PO	RS	CH	Soil source
195-3	0	0	0	0	25	0	0	강원 홍천
201-1	0	0	0	0	0	9	12	강원 정동진
202-2	9.5	0	0	0	0	0	0	일본 와코우시
204-1	0	0	0	0	0	19	0	제주도 도화순
207-1	0	0	13	0	14.5	15	23	“
208-1	0	0	28	0	0	8	0	“
214-3	13.5	0	9	0	20	9	17	일본 와코우시
214-4	0	0	14	0	26	27	0	“
234-7	0	0	9	17	9	0	22	Phil., Matabunkai
235-1	0	0	0	14	8	0	0	“
235-4	0	0	0	0	0	9	10	“
235-7	0	0	0	0	14	0	0	“
235-8	0	0	0	0	0	0	(19)	“
235-9	0	0	0	0	0	(20)	(11.5)	“
235-10	0	0	0	0	0	9	9	“
235-11	0	0	0	0	0	9	9	“
235-21	0	0	0	0	0	0	10	“
236-5	0	0	10	0	13	0	15	Phil., Tagaytay
236-6	0	0	10	0	13	0	15	“

제 5장 항생물질의 분리 및 정제

제1절 서 설

항생물질이든 생리활성물질이든 새로운 유기화합물을 개발하기 위하여 가장 많은 시간과 인력이 요구되는 분야가 바로 물질의 분리, 정제이다. 천연 유기화합물의 경우 물리·화학적 특성에 따라 크게는 지용성과 수용성 화합물로 나눈다. 지용성 화합물은 극성도에 따라 다시 비극성 지용성과 극성 지용성 화합물로 나누며 수용성 화합물은 관능기의 종류 및 유무에 따라 산성, 중성 양성, 염기성 화합물로 나눌 수 있다. 따라서, 이들은 물리·화학적 특성에 따라 분리, 정제방법을 달리하여야만 한다.

1980년대까지만 하더라도 수용성이나 극성지용성 유기화합물의 분리, 정제는 용이하지 않았다. 그러나 최근 각종 인공합성 수지의 개발과 HPLC와 같은 분취기기의 개발로 이제는 분리하지 못하는 화합물이 거의 없을 정도이다. 하지만 극성 지용성 화합물이나 수용성 화합물은 단일 물질로 정제하기가 여전히 까다로운 것이 사실이다. 특히, 안정성 (stability)이 불량한 화합물의 경우 분리, 정제기법의 응용에 많은 제한을 받게된다. 예를 든다면, 염기성화합물의 경우는 일반 silica gel에 octadecilsilane (ODS)를 결합시킨 reverse-phase HPLC를 이용하는데 문제점이 있으며, 또한 알칼리 상태에서 안정성 좋지 않을 경우 또다른 난관에 부딪치게 된다.

천연 유기화합물 특히, 미생물원으로부터 활성물질을 분리, 정제하기 위하여는 다양한 물질에 대한 경험과 유기화학적 지식 및 인공합성 수지에 대한 많은 정보를 알고 있어야만 한다. 최단시간에 분리를 하기 위하여는 우선 물질의 특성, 즉, 안정성, 극성/비극성 지용성 혹은 수용성 여부와 수용성의 경우 산 혹은

염기성 여부, PK value등을 충분히 조사한 후 본격적으로 분리, 정제에 착수하는 것이 유리하다. 그 이유는 미생물이 생산하는 유기화합물의 경우 식물자원에서부터 분리되는 화합물에 비하여 안정성이 불량한 화합물이 매우 많으며 경우에 따라서는 정제되면 될수록 안정성이 저하되는 화합물도 있다.

농약용이든 의약품이든 새로운 항생물질을 개발한다는 것은 매우 어렵다. 게다가 독성시험을 무사히 통과하여 산업화에까지 이르는는 더더욱 험난하다. 이와 같은 이유로 최근 학계나 정부출연연구기관에서는 항생물질 농약보다 수월한 미생물 농약을 개발하려는 움직임이 있다. 미생물 농약이란 농약의 침투가 되지 않아 방제가 어려운 지하부 병원균 (soil-born disease, 예 : *Fusarium*속 등)에 대하여는 어느정도 효과를 기대할 수 있으나 지상부 병원균에 대하여는 성공한 예가 극히 드물다. 또한 지하부에 미생물을 접종한다 하더라도 타 미생물과의 경쟁, 주위환경 요인 (영양분, 온도, 습도등) 때문에 근권부위에 colonization하기가 매우 어렵다는 단점이 있다.

농작물의 가식부에 미생물 농약을 살포할 경우 야기될 수 있는 독성문제는 심각할 수 있다. 미생물 배양액속에 함유된 유기화합물은 수천가지에 이른다. 수천가지 화합물이 일으킬 수 있는 독성문제는 한가지 화합물이 일으키는 것에 비해 수천배가 높다는 것은 자명한 사실이다. 따라서 농작물 가식부에 살포하여야 하는 미생물 농약의 개발은 처음부터 신중히 고려되어야 한다고 사료된다. 미생물 농약이란 과학수준이 발달하지 못한 국가에서 활성물질을 분리, 정제하여 특허화할 수 있는 지식과 기술이 부족하기 때문에 단순히 미생물 배양액을 농작물에 뿌려 주었던 지극히 원시적인 방법이다. 이러한 경우 만약 그 배양액속에 새로운 무독성 항생물질이 함유되어 있다면 분리, 정제 기술을 보유한 국가에게 물질특허만 빼앗기는 결과를 초래하게 된다. 그 실예가 mildiomyacin으로서 생산균은 중국에서 미생물 농약으로 사용하던 *Streptoverticillium rimafaciens*이었으나 일본과학자 Harada등에 의해 물질정제가 되어 특허권은 일본이 소유하게 된 것을 들 수 있다.

제 2절 연구결과

1. Str. 9244 균주가 생산하는 항생물질의 분리 및 정제 :

본 균주는 C4 배지에서 항생물질의 생산량이 적어 항생물질 생산량 증대를 위하여 적합한 배지를 조사한 결과 일반적으로 곰팡이 배양에만 사용하는 것이 상식화되어 있는 쌀배지에서의 생산량이 C4 배지에서 보다 2배 이상에 달하는 것으로 나타났다 (그림 1). 특히, 녹조류에 항균활성을 가진 항생물질은 저지환의 직경이 2.7배나 증가할 정도로 생산량이 높게 나타난다는 사실을 알았다. 그러나 생산하는 항생물질의 패턴이 C4배지에서와는 다소 상이하여 항생물질의 분리, 정제를 위한 배양액 확보를 위하여는 결국 C4배지를 이용하였다.

즉, 보존중에 있는 사면배지로부터 포자를 긁어 취해 C4배지 100 ml를 함유한 500 ml용 삼각플라스크에 접종한 다음 28℃, 250 rpm으로 24시간 종배양 (seed culture) 하였다. 종배양액은 다시 소포제 (antifoamant)를 첨가한 동일 배지 30리터를 함유한 50리터용 발효조에 1%를 접종하여 96시간 배양하였다. 배양초기의 log phase에는 교반속도를 50 rpm, aeration; 10 liters/분으로 하였으며 24시간 이후부터는 교반속도를 250 rpm, aeration; 30 liters/분으로 증가시켜 배양하였다.

활성물질의 분리 및 정제는 그림 2에서 보는 바와 같이 broth out 한 배양액을 원심분리하여 배양여액과 균사체를 분리하였다. 균사체에 대하여는 70% 아세톤 15 리터를 첨가하여 1야 진탕 추출한 다음 원심분리 (10,000 rpm/30 min) 하여 상등액을 취하였다. 균사체 아세톤 추출물은 감압농축하여 아세톤을 제거한 다음 배양여액과 함께 Diaion HP-20 8리터에 흡착시킨 후 수지를 40리터의 증류수로 세척하고 흡착된 활성물질은 100% 메탄올 35리터로 용출하였다. 메탄올 용출분획은 감압농축한 다음 CH₂Cl₂-60% MeOH로 solvent partition을 하여 항세균성 항균력을 가진 CH₂Cl₂층 (하층)을 얻었으며 상층에 대하여는 농축하여

메탄올을 제거한 다음 부탄올로 용매분배하여 항진균성 항균활성을 나타내는 부탄올 분획을 얻었다. CH₂Cl₂분획은 농축하여 ODS flash column chromatography (60%-->100% MeOH)를 행하였다. 활성물질이 함유된 80% 메탄올 용출분획은 다시 감압농축한 다음 Sephadex LH-20 gel filtration [*n*-hexane/CH₂Cl₂/MeOH (4:2:1)], ODS HPLC (Cosmosil, 20 x 250 mm, 63% MeOH containing NaClO₄, 275 nm) 방법으로 최종정제하여 그림 3에서 보는 바와 같이 3개의 활성물질을 얻었다.

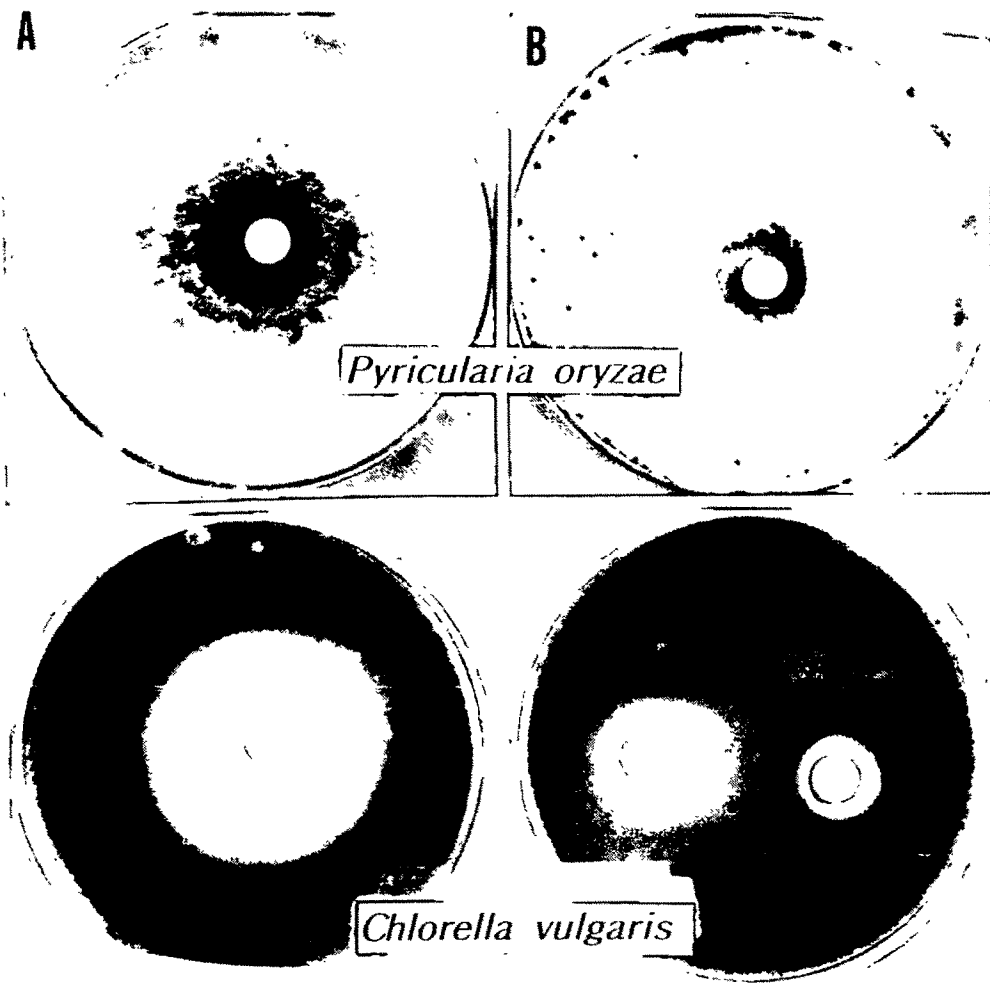


그림 1. S9244균주의 배지종류에 따른 항균활성 비교.
A : Rice medium, B : C4 medium

한편, 항진균활성을 나타내는 부탄올층에 대하여는 ODS flash chromatography (MeOH gradient), Sephadex LH-20 gel filtration (MeOH), ODS HPLC (Cosmosil, 20 x 250 mm, 63% MeOH containing NaClO₄, 275 nm) 방법으로 분리, 정제하여 4개의 화합물을 얻었다. 활성물질 각각의 분획은 다시 초순수 증류수를 동량 정도 가한 다음 ODS open glass column에 흡착시키고 초순수 증류수로 세척함으로써 염을 제거한 후 absolute MeOH로 용출하여 순수분리된 활성물질을 얻었다 (그림 4).

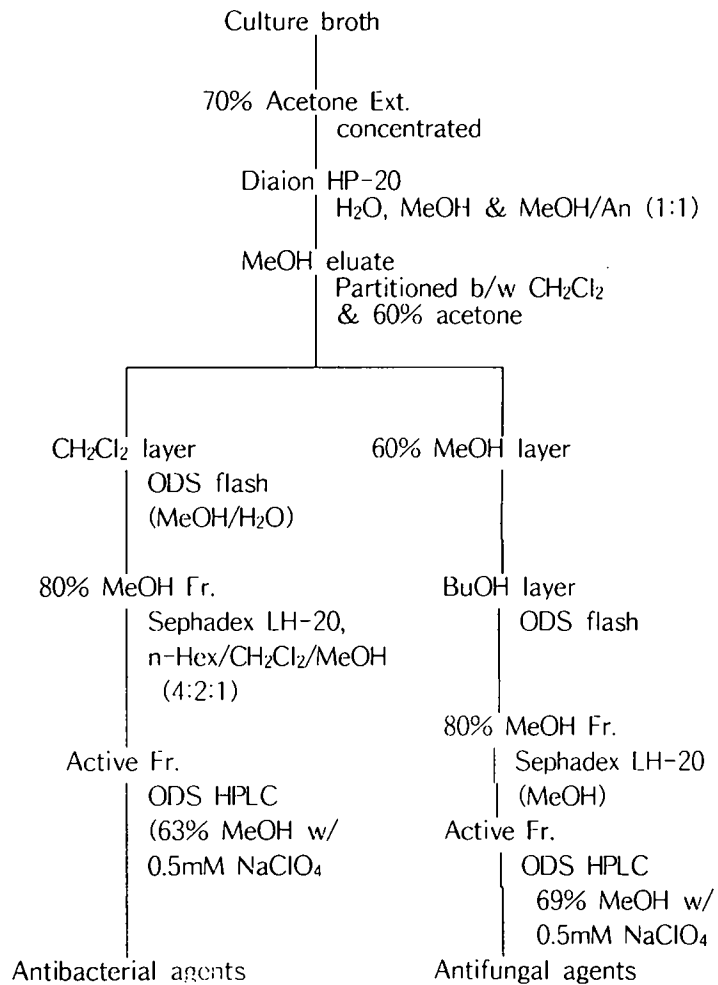


그림 2. S9244 균주가 생산하는 항생물질의 분리, 정제 scheme.

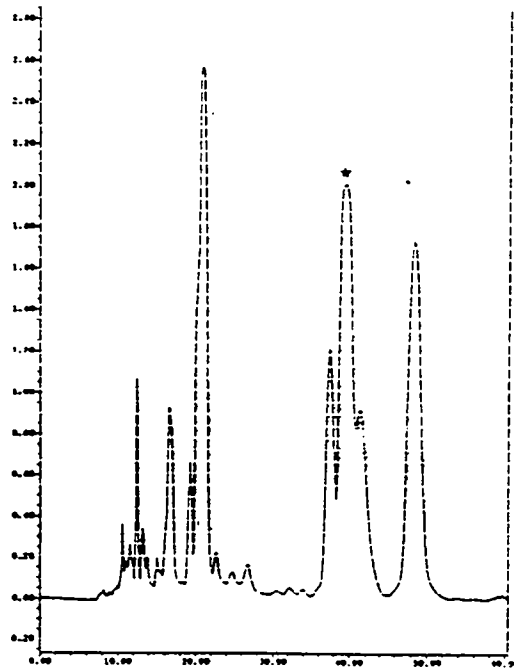


그림 3. S9244균주가 생산하는 항세균성 항생물질의 HPLC profile.

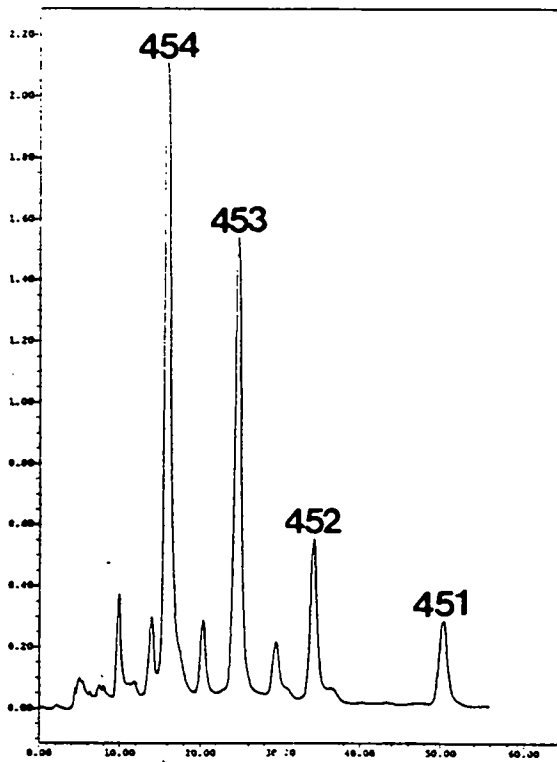


그림 4. S9244 균주가 생산하는 항진균성 항생물질의 HPLC profile

2. *Streptomyces melanosporofaciens*가 생산하는 항생물질의 분리, 정제 :

보존중에 있는 사면배지로부터 포자를 긁어 취해 C4배지 100 ml를 함유한 500 ml용 삼각플라스크에 접종한 다음 28℃, 250 rpm으로 24시간 종배양 (seed culture) 하였다. 종배양액은 다시 소포제를 첨가한 동일 배지 30리터를 함유한 50리터용 발효조에 1%를 접종하여 96시간 배양하였다. 배양초기의 log phase에는 교반속도를 50 rpm, aeration; 10 liters/분으로 하였으며 24시간 이후부터는 교반속도를 250 rpm, aeration; 30 liters/분으로 증가시켜 배양하였다.

배양이 완료된 C4 배양액 30리터는 원심분리하여 상등액과 군사체를 분리한 다음 군사체는 70% 아세톤 15리터로 하룻밤 추출하였다. 군사체의 아세톤 추출물은 여과하여 농축함으로써 유기용매를 제거하였다. 군사체 추출물은 상등액과 합친 다음 Diaion HP-20 (8 l)에 흡착시킨 후 증류수 (50 리터)로 1차 세척하고 메탄올 (40 litre)로 용출하여 활성분획을 얻었다. 활성분획중 1/2은 pot 및 field 시험용으로 사용하고 나머지 1/2은 농축하여 메탄올을 제거한 다음 *n*-BuOH로 용매 분배하여 농축하였다. *n*-BuOH 추출분획은 다시 ODS flash (40, 60, 80, 100% MeOH gradient) column chromatography를 수행하여 활성분획인 80% MeOH 용출분획을 얻었다. 활성분획은 다시 Sephadex LH-20 (85% aqueous MeOH) gel filtration을 함으로서 활성분획 7.6 그램을 얻었다. 이것은 다시 CHCl₃-MeOH (9:1, 7:3, 5:5, absolute MeOH)을 용매계로 silica gel flash column chromatography를 하여 4개의 분획으로 나누었다. 이들 분획중 활성이 가장 강한 분획을 우선적으로 ODS MPLC (87% MeOH containing 0.1N NH₄OH, pH 7.2 adjusted by TFA, UV 220 nm), polyamine HPLC (98% MeOH), ODS HPLC (Cosmosil 20 x 250 mm, 84% MeOH, 230 nm) 분취를 통하여 4개의 활성물질을 분리하였다. 활성물질 각각의 분획은 다시 초순수 증류수를 동량 정도 가한 다음 ODS open glass column에

흡착시키고 초순수 증류수로 세척함으로써 염을 제거한 후 absolute MeOH로 용출하여 순수분리된 활성물질을 얻었다. (Fig. 5).

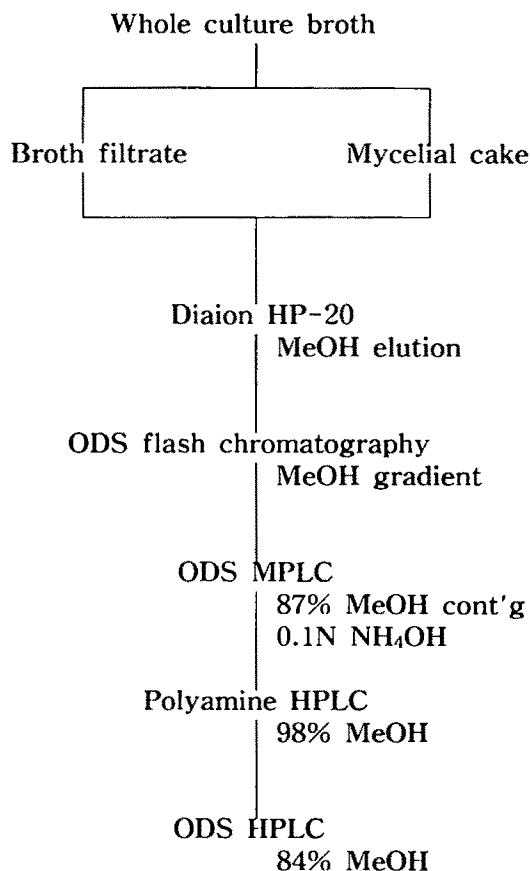


Fig. 5. Schematic presentation of the isolation and purification of antibiotics produced by *Streptomyces melanosporofaciens*.

본 균주가 생산하는 항생물질은 염기성 macrolide 화합물로 추정되나 산과 알칼리 조건하에서 매우 불안정한 것이 특징이다. 또한 염기성 화합물의 공통적 특징이기는 하나 본균주가 생산하는 항생물질의 경우 분리, 정제가 매우 까다로운 특성을 가지고 있다. 즉, ODS (역상) column을 이용하여 단일 피크를 분취하였음에도 불구하고 polyamine column으로 분석하여 보면 2개의 화합물이 존

재하였다. 따라서 일단 polyamine HPLC column (20 x 250 mm)을 이용하여 1차 분취한 다음 ODS column으로 재분취하는 방법을 택하였다. 그 결과 그림 6에서 보는 바와 같이 순도가 비교적 높은 단일물질을 얻을 수 있었다.

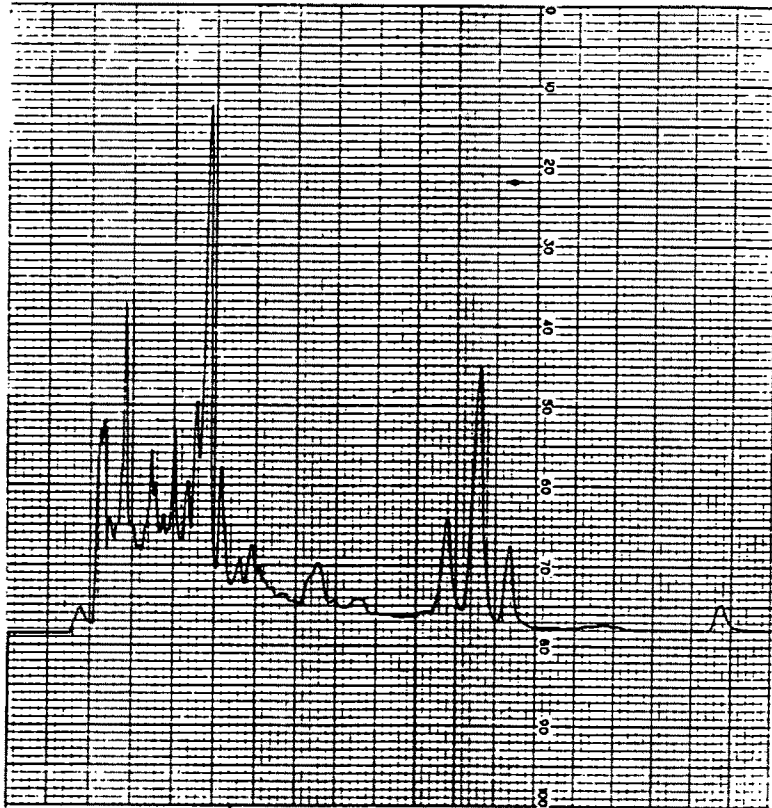


그림 6. S161 균주가 생산하는 항생물질의 HPLC Profile.

3. A192 균주가 생산하는 항생물질의 분리 및 정제 :

보존중에 있는 사면배지로부터 포자를 긁어 취해 C4배지 100 ml를 함유한 500 ml용 삼각플라스크에 접종한 다음 28℃, 250 rpm으로 24시간 종배양 (seed culture) 하였다. 종배양액은 다시 동일 배지 100 ml씩을 함유한 500 ml 용 삼각플라스크 20개에 접종하여 동일 조건으로 96시간 배양하였다.

배양이 끝난 배양액은 원심분리하여 상등액과 균사체로 분리한 다음 균사체는 70% 아세톤 1리터로 하룻밤 추출하였다. 균사체의 아세톤 추출물은 여과하여 농축함으로써 유기용매를 제거하였다. 균사체 아세톤 추출물은 상등액과 합친 다음 Diaion HP-20 (500 ml)에 흡착시키고 증류수로 세척한 다음 메탄올 (2 litre)로 용출하여 활성분획을 얻었다. 활성분획은 농축하여 메탄올을 제거한 다음 60% 메탄올에 suspension 시킨 후 CH_2Cl_2 을 첨가하여 용매 분배를 수행함으로써 *Xanthomonas citri*와 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)에 항균활성을 나타내는 dichloromethane 층과 60% 메탄올층으로 나누었다. 60% 메탄올층은 다시 *n*-BuOH로 용출함으로써 *Pyricularia oryzae* 및 *Rhizoctonia solani*에 항균활성을 가진 유기용매층을 얻었다 (Fig. 7).

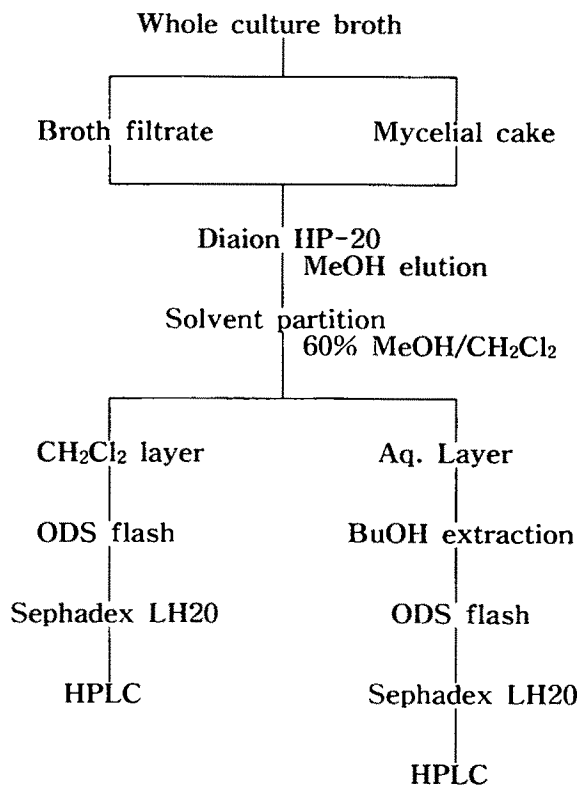


Fig. 7. Schematic presentation of the isolation and purification of antibiotics produced by *Streptomyces* 192.

CH₂Cl₂층은 다시 ODS flash (40, 60, 80, 100% MeOH gradient) column chromatography를 수행하여 활성분획 (80%)을 얻었다. 활성분획은 다시 Sephadex LH-20 [hexane-CH₂Cl₂- MeOH (4 : 2 : 1)] gel filtration을 수행하여 활성분획 (41 mg)을 얻었다. 이것은 62% Aq. MeOH를 용매계로하여 ODS HPLC 분취함으로서 최종정제하였다 (그림 8). 구조동정은 이들중 함량이 가장 많은 화합물에 대하여 우선적으로 실시하였다.

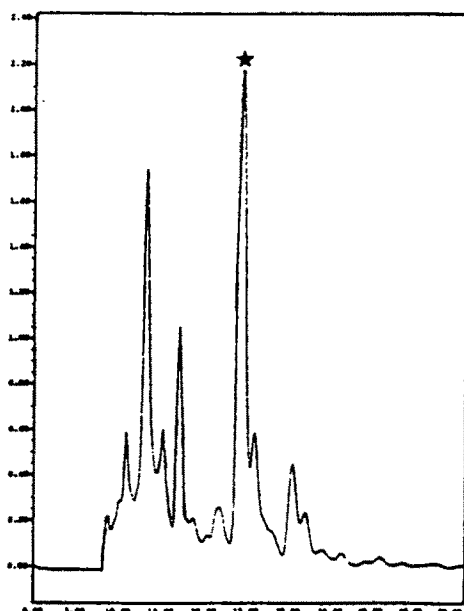


그림 8. S192 균주가 생산하는 항세균성 항생물질의 HPLC Profile.

한편, 항진균활성을 나타내는 *n*-BuOH층에 대하여도 dichloromethane 층과 유사한 방법으로 ODS flash (MeOH gradient) column chromatography, Sephadex LH-20 (MeOH) gel filtration, ODS MPLC로 분리하여 활성분획 (350 mg)을 얻었다. 본 활성성분에 대하여는 현재 62% MeOH를 용매계로 하

여 ODS HPLC 정제중에 있으며 (그림 9) main compound에 대하여 우선적으로 물리·화학적 특성을 조사중에 있다.

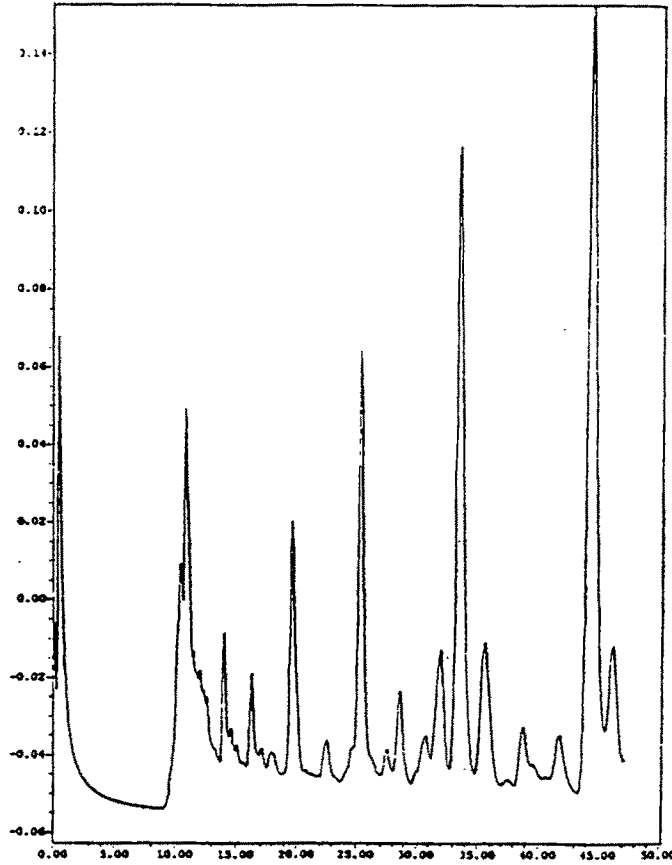


그림 9. S192 균주가 생산하는 항진균성 항생물질의 HPLC Profile.

4. *Kitasatosporia kimorexae*가 생산하는 항생물질의 분리 및 정제 :

보존중에 있는 사면배지로부터 포자를 긁어 취하여 항생물질 생산용 C4 액체배지 100 ml를 함유한 500 ml 삼각플라스크에 접종한 다음 32℃, 250 rpm에서 24시간 증배양 (seed culture) 하였다. 증배양액을 접종원으로 하여 소포제 (antifoamant)를 첨가한 동일배지 30 리터를 함유한 50리터용 발효조에 300 ml를 접종하였다. 배양초기의 log phase에는 교반속도를 50 rpm, aeration; 10 리

터/분으로 하였으며 24시간 이후부터는 교반속도; 250 rpm, aeration; 30 리터/분으로 조절하여 96시간 배양하였다.

활성물질의 분리, 정제는 그림 10에서 보는 바와 같이 broth out한 배양액을 원심분리하여 배양여액과 균사체 (mycelial cake)를 분리하였으며 균주는 균사체내에도 상당량 (배양여액의 1/2 수준)의 항생물질을 함유하고 있으므로 균사체는 70% 아세톤 10리터씩 2회에 걸쳐 하룻밤 추출하였다. 균사체의 아세톤 추출물은 여과하여 균사체를 제거한 다음 감압농축함으로써 아세톤을 제거한 후 배양여액과 합쳤다. 이것은 다시 Diaion HP-20 10리터에 흡착시킨 다음 증류수 40리터로 세척후 45% 메탄올과 100% 메탄올로 용출하였다. 활성물질을 함유한 100% 메탄올 용출분획은 감압농축하여 갈색분말을 얻었다. 활성분획은 ODS flash column chromatography (Aq. MeOH)를 이용하여 분획화하였다 (그림 10).

활성물질중 main은 주로 80% 메탄올 용출분획에 존재하였으며 minor 성분들은 60% 용출분획에 존재하였다. Main 활성물질의 최종정제는 MeOH : CH₃CN : 0.1% DEA (65 : 10 : 35, pH 6.5)를 용매계로, ODS HPLC (그림 11)를 수행하였으며 용매계의 pH는 trifluoroacetic acid (TFA)를 사용하여 조절하였다. 분취한 4개분획은 diethylamine (DEA)와 TFA를 제거하기 위하여 LC용 초순수증류수를 동량정도 가한 후 ODS resin (open glass column)에 흡착시켰다. ODS에 흡착된 활성물질에 대하여는 수지를 충분한 양의 증류수로 세척한 다음 100% MeOH로 용출하여 농축한 후 동결건조함으로써 백색의 무정형 분말을 얻었다. Main 활성물질에 대하여는 구조동정을 위한 물리·화학적 특성을 조사하였으나 본물질은 극히 한정된 유기용매 (DMSO)에만 용해되며 또한 NMR 용매로서 용해성이 가장 좋은 DMSO-*d*₆에서 쉽게 분해되므로 구조를 규명하는데는 실패하였다. Minor 성분 역시 stability가 매우 불량하여 분리, 정제 하였으나 신규항생물질임을 입증할 수 있는 구조동정은 어려울 것으로 판단된다.

따라서 본균주가 생산하는 항생물질에 대하여는 배양여액 수준이나 부분정제 단계에서 field test를 거쳐 안정성과 약효의 지속성을 평가한 후 계속 추진 여부를 결정할 예정이다.

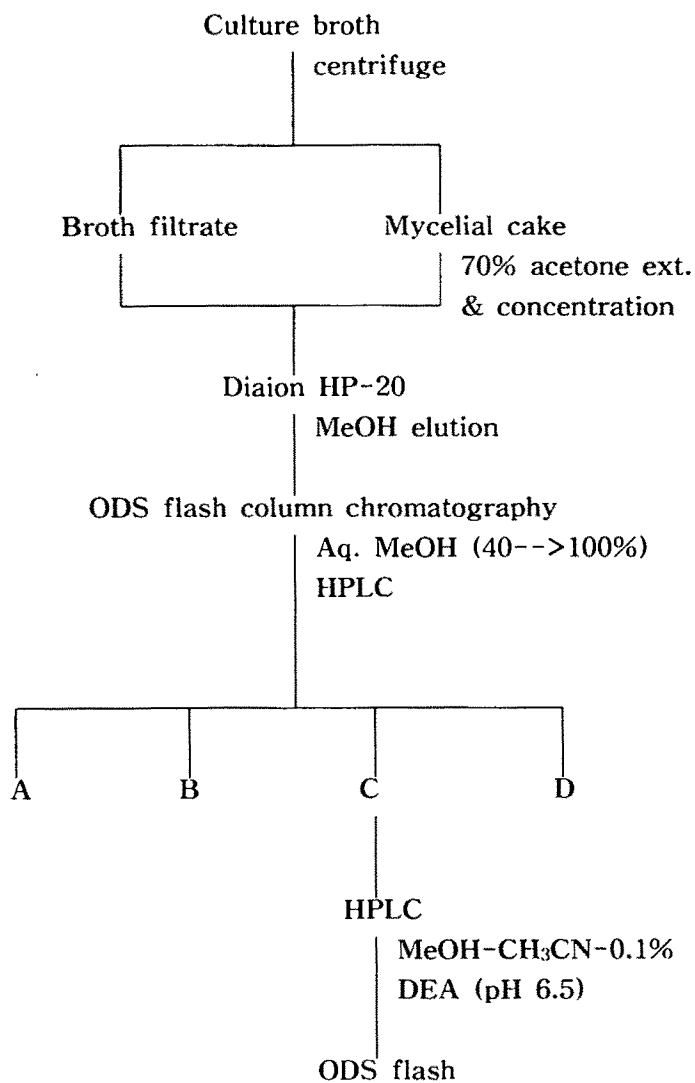


그림 10. *Kitasatosporia kimorexae*가 생산하는 항생물질의 분리, 정제 과정.

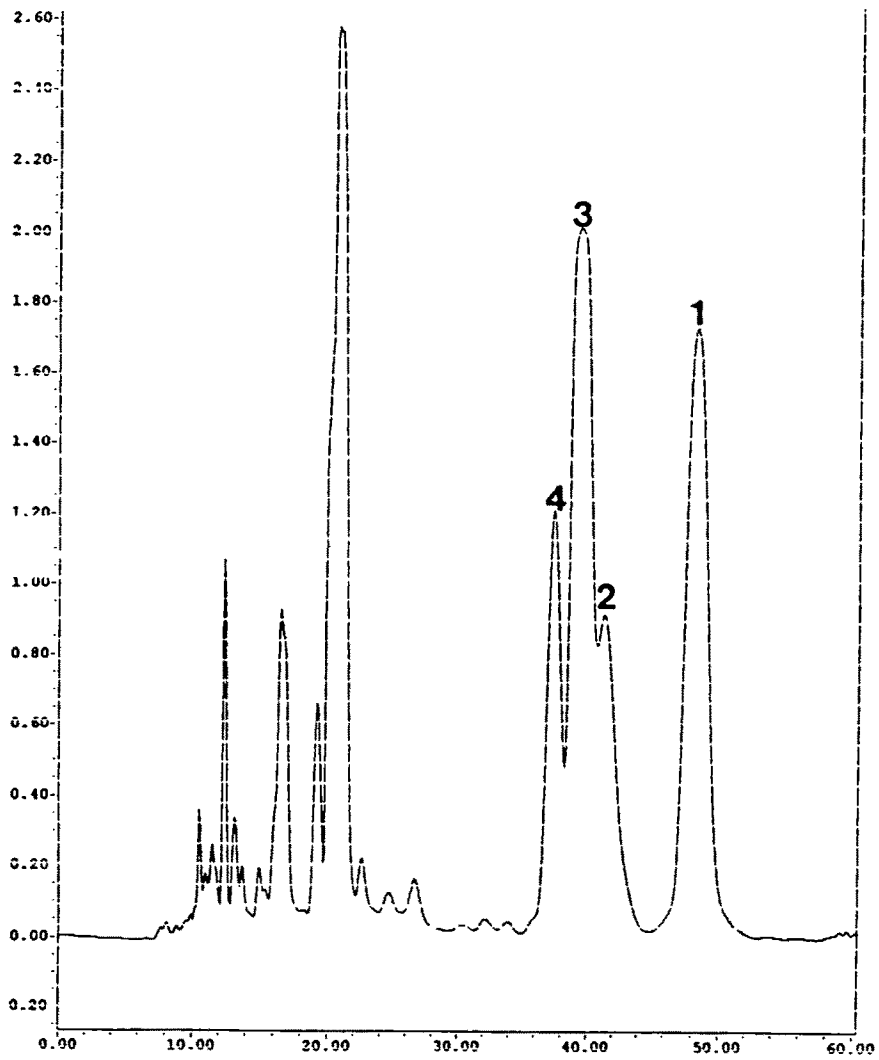


그림 11. *Kitasatosporia kimorexae*가 생산하는 항생물질의 HPLC profile

제 6장 항생물질의 구조 동정

제1절 서 설

수천가지에 이르는 항생물질이 이미 개발되었기 때문에 새로운 항생물질을 개발하기란 극히 어려운 것이 사실이다. 그러나 특이한 환경으로부터 미생물 분리원이 되는 토양시료의 채취, rare, fastidious 및 oligotrophic actinomycetes 분리 기술등을 동원한다면 충분히 새로운 항생물질을 개발해 낼 수 있다고 확신한다. 또한 현재 사용중인 농약의 내성출현, 세계시장의 영속성, 신장성 (년간 3-4%), 금후 취해질 GR에 대비한 유기합성 제제들의 사용금지 조치등을 고려한다면 전망은 매우 밝다고 하겠다.

미생물 대사산물은 새로운 항생물질의 보고이며 그 화학구조 역시 인간의 유기합성 지식으로는 도저히 상상도 하지 못하는 복잡한 것이 대부분이다. 그러므로 이와 같은 독특한 골격구조는 유기합성의 훌륭한 lead 화합물이 될 수 있다. 항생물질 농약은 화학적, 생물학적면에서 그 의의가 매우 크다. 항생물질이란 유기합성제제와는 달리 자연계에서의 분해성, 생물활성의 선택성, 특이한 작용기작등과 같은 고유의 특성을 가지고 있다. 게다가 항생물질 생산은 유기합성 제제와는 전혀 다른 공정으로 제조된다. 즉, 발효공정 자체가 화석자원 (fossile resources)를 이용하는 것이 아니라 동·식물 유래의 단백질이나 탄수화물등을 이용하는 미생물대사 과정이다. 발효공정은 모든 항생물질 생산에 공통된 것이므로 하나의 발효장치를 이용하여 여러가지 다른 항생물질을 생산할 수 있다는 장점을 지니고 있다. 미생물을 이용한 항생물질 생산의 또 다른 장점은 화학구조가 얼마나 복잡하며 부제탄소 (asymmetric carbon) 수가 몇개이든 광학적으로 순수 (optically pure)한 화합물만을 생산한다는 점이다.

과거에는 유기화합물의 구조동정을 위하여 상당히 많은 양의 화합물을 순수 분리하여 복잡한 화학분해 반응 (산, 알카리), 관능기의 조사를 위한 정색반응 (color reaction) 등을 거쳐야만 하였다. 즉, 토양에서 직접 분리한 야생균주는 항생물질 생산량이 리터당 1~10 mg에 불과하므로 처음부터 엄청난 양을 배양하여 물질분리를 시작하여야만 하였다. 그러나 최근에는 질량분석기 (EI or FAB mass spectrometer), 핵자기공명분광광도계, 적외선 분광광도계등의 개발로 대부분 유기화합물의 분자해석이 가능하여졌다 하여도 과언이 아니다. 물론 모든 화합물이 쉽게 분자구조 해석되는 것은 아니므로 경우에 따라서는 화학적 처리가 불가피한 경우도 있다. 즉, peptide계 항생물질의 경우 고리를 형성하고 있으면서 분자량이 2,000 정도이면 carbonyl carbon과 NH proton의 심한 overlapping 때문에 assign하기가 극히 힘들다. 따라서, 약산이나 알카리로 처리하여 linear form으로 가수분해한 다음 FAB/MS를 이용한 분자구조 해석을 한다. 이렇게 하여 분자구조를 해석하더라도 결국은 강산 (6 N HCl)으로 가수분해하여 각각의 아미노산을 분리한 다음 증명하여야만 한다. 미생물이 생산하는 아미노산의 경우 동·식물체에서 분리되는 21가지 일반 아미노산과 달리 이상 아미노산이 많다.

또한, NMR을 이용한 분자구조 해석은 어디까지나 가설에 불과하다. 그러므로 완벽한 화학구조 해명을 위하여는 X-ray crystallography에 의한 입체구조 (stereochemistry)의 해석이 필수적이다. 따라서 외국 유명 학술지에 게재된 화학 구조조차 가끔 저자 자신이 정정을 하는 경우가 있다. 그러나 X-ray crystallography에 의한 분자구조해석에는 몇가지 제약이 뒤따른다. 가장 큰 제약은 우선 투명한 단결정을 얻어야만 한다는 사실이다. 대부분 유기화합물의 경우 결정은 얻어지나 투명한 단결정 (single crystal)이 아니어서 X-ray 회절기를 이용한 분자구조해석이 불가능한 경우가 대부분이다.

분자구조해석을 위하여는 우선 순수 분리된 화합물이 절대적으로 필요하다.

여기서 순수란 말은 절대적이라기 보다는 상대적인 의미를 지닌다. 즉, 불순물의 함량이 적어도 5% 미만이어야만 한다는 뜻이다. 대부분 화합물의 경우 신·기지 물질 동정을 위하여는 1~수 mg의 순수분리된 양만 있으면 충분하다. 그러나 분자구조를 해명하기 위하여는 적어도 10 mg 이상의 순수분리된 화합물이 필요하다 하겠다.

자외선 (UV) 및 적외선 (IR) 분광광도계의 경우 숙련된 화학자가 아니더라도 신뢰할 수 있을 정도의 데이터를 얻을 수 있는 단계까지 진보되어 있다. 또한 ^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C , HMBC, NOESY 등과 같은 NMR spectrometer의 분석기법의 발달은 분자구조해석의 획기적인 발전을 가져왔다. 따라서 본 연구에서는 EI or FAB/MS, NMR (400 MHz), IR spectrometer를 이용하여 분자구조를 해석하였다.

제 2절 연구결과

1. *Streptomyces* 9244 (S9244) 균주가 생산하는 항생물질의 구조동정 :

S9244가 생산하는 항생물질중 항세균성 항생물질 4개 화합물 가운데 2개의 화합물은 구조동정 결과 기지항생물질인 oxazolomycin과 curromycin으로 동정되었다. 그러나 HPLC chart 상에서 3에 해당하는 화합물의 물리·화학적 특성은 이들 기지 화합물과 달라 구조동정을 실시하였다.

S9244-3은 ^1H NMR spectrum (Fig. 12)을 조사하여 본 결과 δ 6.7과 7.7에서 2개의 singlet olefin protons와 δ 5.6~6.7에서 10개의 olefin protons가 관측되었다. 또한, 3.39 ppm과 2.89 ppm의 sharp singlets는 각각 $-\text{OCH}_3$ 와 $-\text{NCH}_3$ 로 판단된다. 한편, 1.76 ppm의 singlet methyl은 olefin methyl임을 시사하였으며 이외에도 1.32, 1.22, 1.06 ppm에서 singlet methyl 3개와 1.77, 1.17, 0.94 ppm에서 doublet methyl의 존재가 확인되었다.

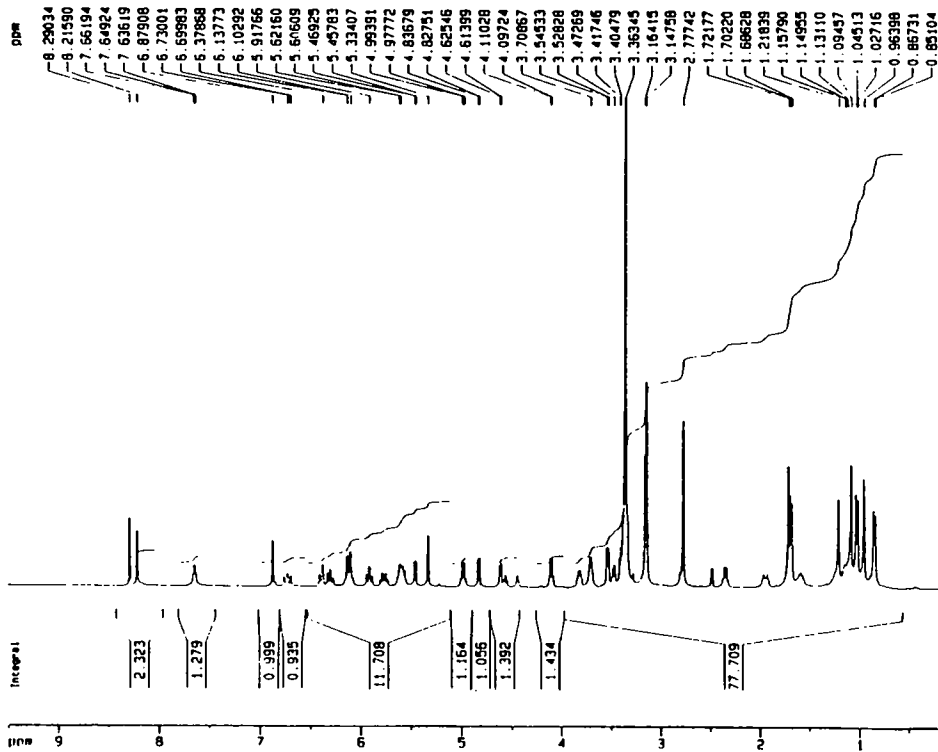


Fig. 12. ^1H NMR spectrum of S9244-3 in CDCl_3 (400 MHz).

한편, ^{13}C NMR spectrum 분석결과 174.2, 170.2, 176.6 ppm에서 3개의 ketone이, 57.1 ppm에서 methoxy가, 27.1 ppm에서 N-methyl이, 17.9 ppm에서는 singlet methyl이, 125~140 ppm 사이에서 olefin 유래 carbon이 10개 관측되고 있다. 또한 81.8, 84.7, 46.7, 141.0, 151.1 ppm에서 4급탄소 유래 carbon이 5개 관찰되었다.

Carbon Spectrum from using Probe

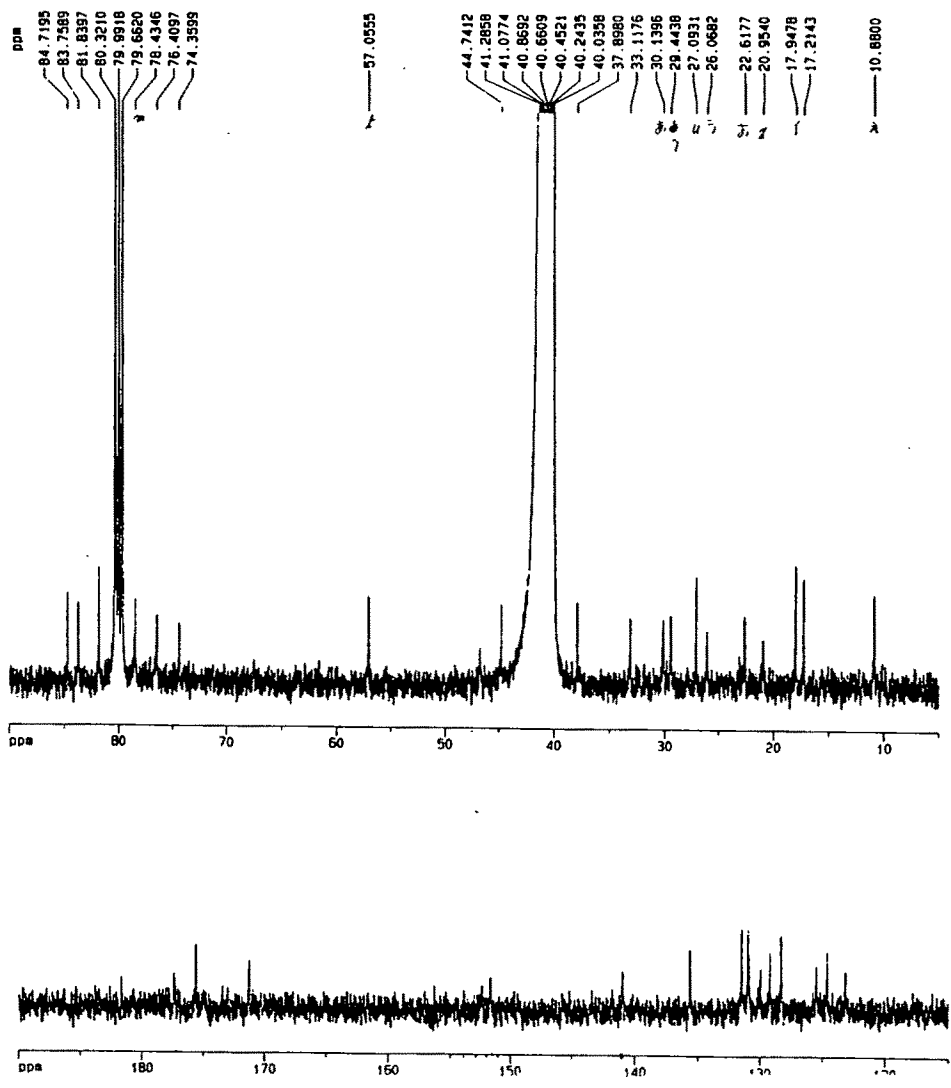


Fig. 13. ^{13}C NMR spectrum of S9244-3 (100 MHz, CDCl_3).

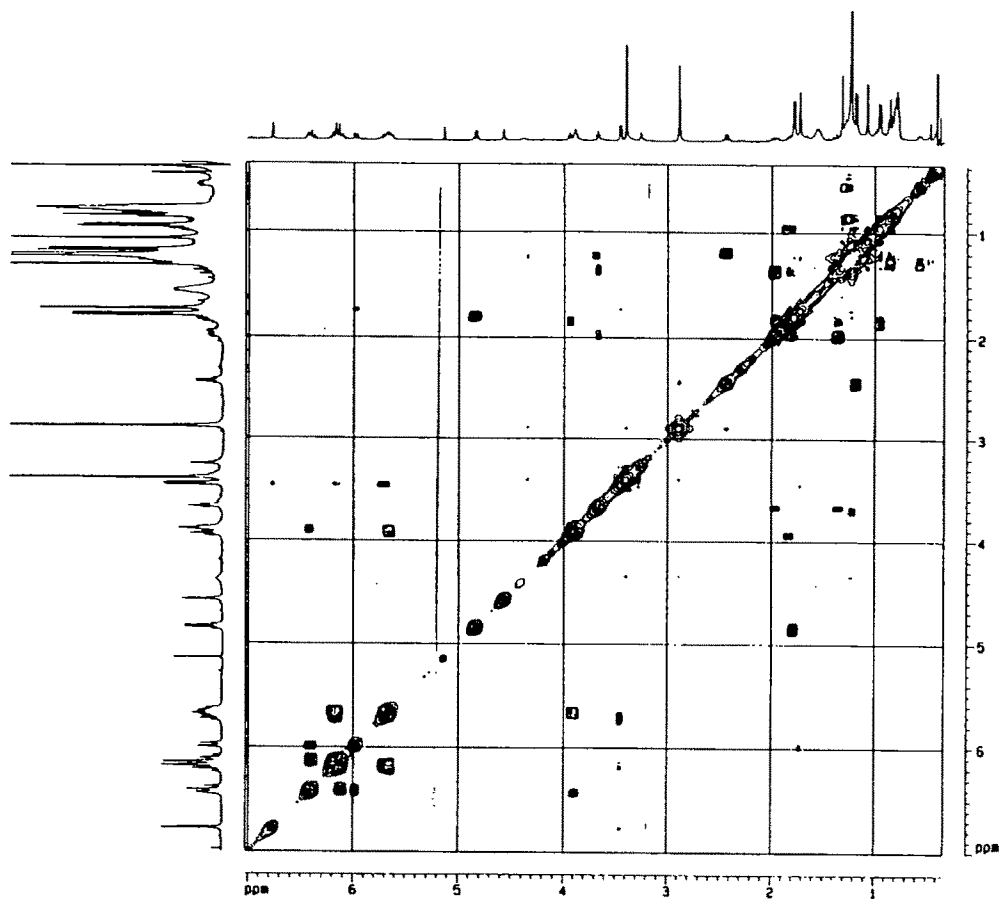


Fig. 14. ^1H - ^1H COSY spectrum of S9244-3 in CDCl_3 (400 MHz).

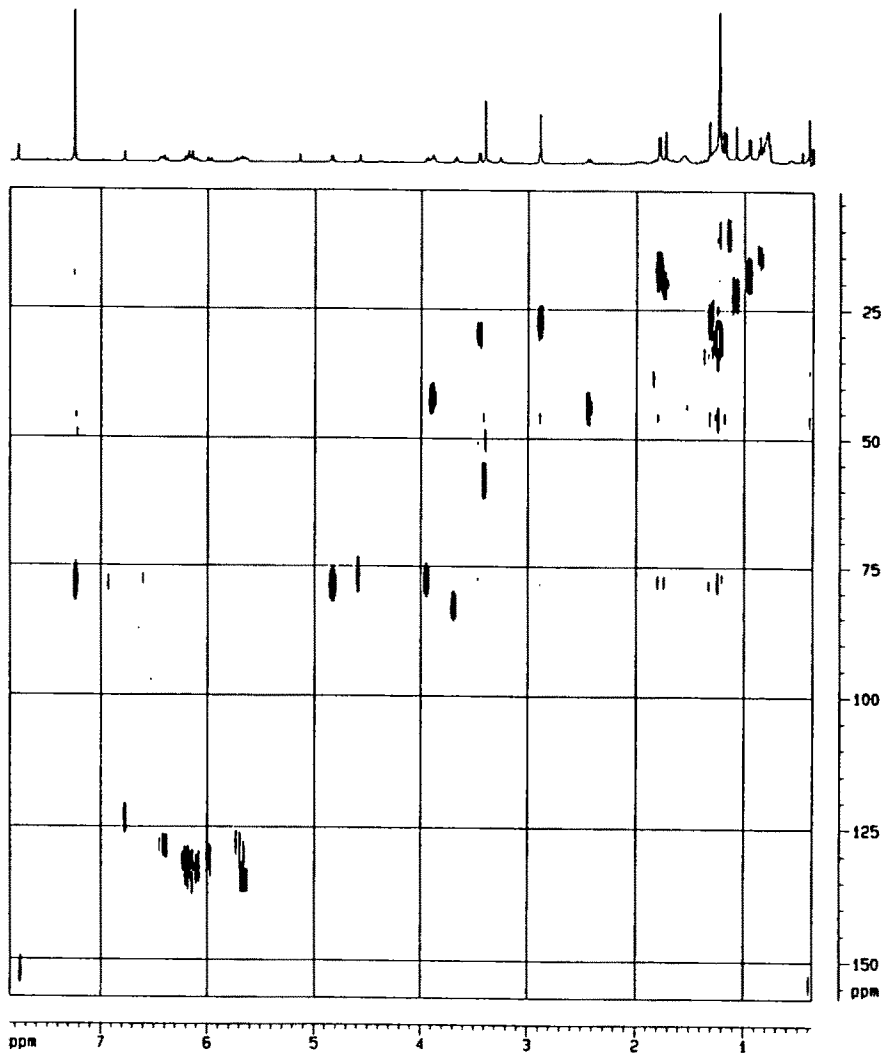


Fig. 15. ^1H - ^{13}C COSY spectrum of S9244-3 in CDCl_3 .

S9244-3의 물리·화학적 특성은 : pale yellow amorphous powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{23} +3.6^{\circ}$ (c 0.52, MeOH); UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ) 228 (23,000), 266 (27,200), 275 (32,000), 285 (27,000); IR ν_{max} (film) 3350 (OH or NH), 2930, 1825 (β -lactone), 1690 (amide), 1645, 1240, 1040 cm^{-1} ; ESI-MS m/z 724 ($\text{M}+\text{MeOH}+\text{Na}$) $^+$, 692 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 579, 507; HRESI-MS m/z 670.3706 cacl. for $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{O}_9$ (Δ -2.6mmu) 였다.

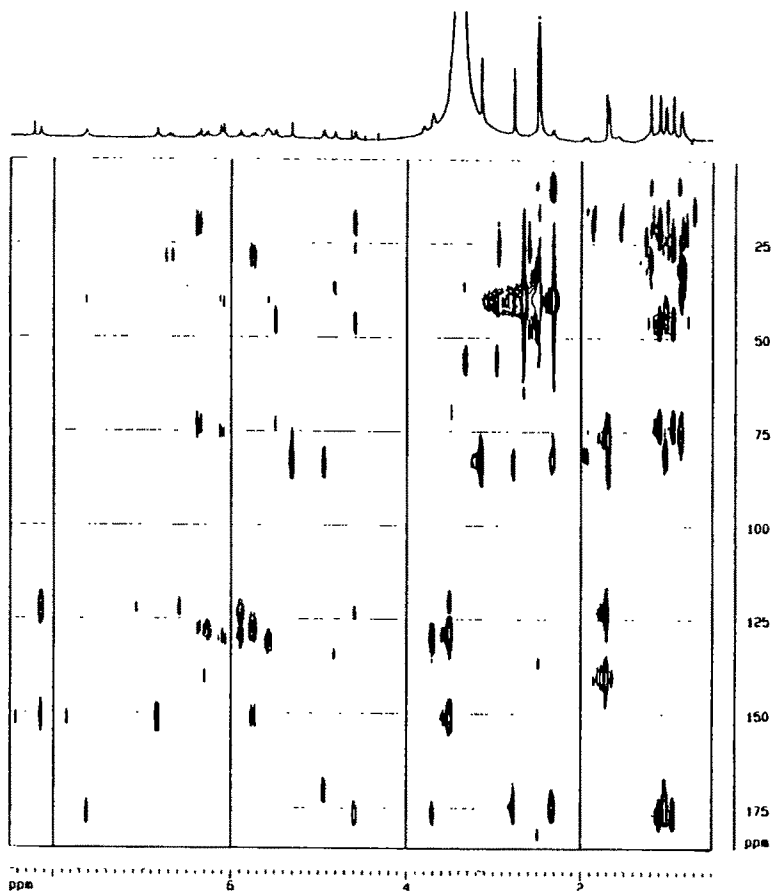


Fig. 16. HMBC spectrum of S9244-3 in CDCl_3 .

또한, ESI mass spectrum data로부터 분화합물의 분자량은 oxazolomycin 보다 14가 크다는 사실을 알 수 있었다. ^1H 및 ^{13}C NMR spectra에 있어서는 oxazolomycin의 oxymethylene 대신 δ 1.69/17.9의 doublet methyl과 δ 4.82/78.4의 quartet oxymethine이 관측됨으로서 본 화합물은 oxazolomycin의 oxymethylene protone 하나가 methyl로 치환되어 있다는 사실을 의미한다. 또한 methyl group은 HMBC상에서 H16과 C3 및 C15간의 C16- CH_3 와 C16 및 C15간, 상관피크로부터 탄소 16번 위치에 귀속시킬 수 있었다.

CDCl₃를 용매로 하여 측정된 ¹H NMR spectrum은 olefinic region에서의 심한 중복으로 인하여 triene과 diene systems의 geometry는 용매를 바꾸어 DMSO-*d*₆에서 spin coupling constants를 이용하여 측정하였다. Mass data로부터는 분자량이 669 (M⁺, ESIMS) 임을 확인할 수 있었으며 ¹H 및 ¹³C NMR data 고찰로부터는 분자식이 C₃₆H₅₁N₃O₉임을 알았다. ¹H-¹H (Fig. 14) 및 ¹H-¹³C COSY (Fig. 15) spectra과 HMBC (Fig. 16) 해석으로부터 그림 7에서 보는바와 같은 4개의 부분구조를 추정할 수 있었다. 즉, ¹H-¹H COSY data 해석으로부터 unit A의 C5~C8의 구조가, HMBC 해석으로부터 pyrrole ring의 존재가 추정되었다. 또한, 결합상수 *J*₆₋₇ (14.8 Hz) 값으로부터 C6와 C7이 중결합의 geometry는 *E*일 것으로 관측되었다. Unit B의 부분구조는 ¹H-¹H COSY spectrum 해석으로 예상할 수 있었으며 HMBC 분석결과 methoxy-9'이 C9에 결합되어 있다는 사실을 알 수 있었다. Unit C에서 C19-C20은 HMBC상에서 20위치의 proton과 C18의 ester carbonyl 및 C19와의 상관관측됨으로써 확인할 수 있었다. Unit D의 부분구조 역시 HMBC 해석을 통하여 추정할 수 있었으며 carbonyl C24와 4급탄소 23은 -NCII₃와 결합하고 있음이 확인되었다. 부분구조간의 연결은 HMBC 상관관계로부터 도출하였다. 즉, H-25와 C25, H-24와 C26의 상관관계로부터 unit c와 unit a를 연결할 수 있었으며, unit b와 unit d의 연결은 H-8와 C6, H-7과 C6의 HMBC상의 상관피크로부터 C7-C6의 결합을 추정할 수 있었다.

한편, 부분구조 (Fig. 17) unit a와 unit b의 연결은 unit e와 같은 *α, α*-dimethyl-*β*-hydroxyl-carbonyl 골격의 존재를 확인함으로써 가능하였다. Carbonyl (δ 176.2)은 아마이드성 카보닐로 추정했으며 H-15로부터 이 carbonyl carbon으로의 HMBC 상관이 관측됨으로써 가능하였다. 또한, unit a의 36-CH₃와 C18간의, C18의 OH와 C17과의 HMBC 상관관계로부터 C18-C19의 결합을 추정할 수 있었다.

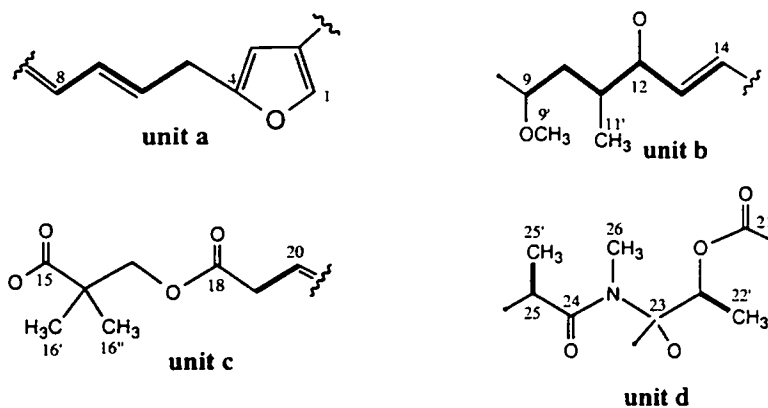
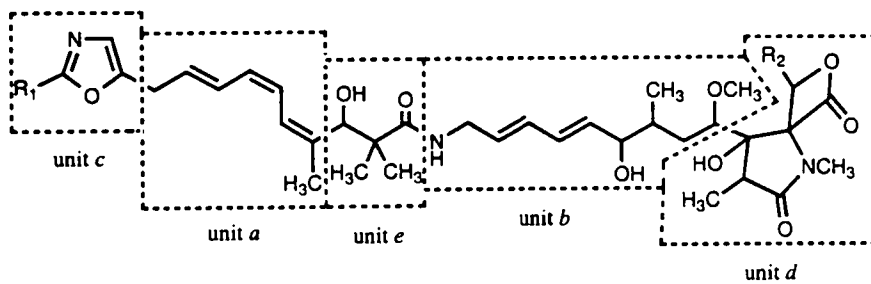


Fig. 17. Partial structure of S9244-3.

이상의 결과로부터 Table 6에서 보는 바와 같이 모든 proton과 carbon을 귀속시킬 수 있었으며 Fig. 18에서 보는바와 같은 S9244-3의 전평면구조는 신규의 "16-methyloxazolomycin"로 결정하고 1998년 6월 특허출원하였다.



9244-3	$R_1=H, R_2=CH_3$
9244-1 (curromycin A)	$R_1=CH_3, R_2=CH_2OCH_3$
9244-2 (curromycin B)	$R_1=CH_3, R_2=CH_3$
9244-4 (oxazolomycin)	$R_1=H, R_2=H$

Fig. 18. Structure of 16-Methyloxazolomycin.

Table 6. ^1H and ^{13}C NMR data of 16-methyloxazolomycinin in $\text{DMSO}-d_6$.

Position	δ ^{13}C	δ ^1H (mult., J Hz)	HMBC
1	174.2		H2, NCH_3 , H13
2	44.7	2.34 (H, q, 6.6)	H13
3	81.8		H2, H13, H16, 3-OH
4	83.7	3.38 (H, t, 6.9) ^a	O- CH_3 , 3-OH
5	33.1	1.95 (H, m) 1.15 (H, m)	H7, H14
6	37.9	1.58 (H, m)	H8, H14, 7-OH
7	76.4	3.81 (H, m)	H8, H9, 7-OH
8	129.5	5.57 (H, dd, 16.8, 11.2)	H9, H10, 7-OH
9	130.0	6.14 (H, dd, 11.2, 16.8)	H7, H10, H11
10	131.5	6.09 (H, dd, 14.3, 10.8)	H8, H11, H12
11	134.0	5.59 (H, m)	H10, H12
12	42.2	3.71 (2H, m)	H10, H11, NH
13	20.8	1.03 (3H, d, 6.6)	H2
14	17.2	0.86 (3H, d, 6.2)	
15	84.7		H4, H16, 16- CH_3 , NCH_3
16	78.4	4.82 (H, q, 6.3)	16- CH_3
17	170.2		H16
1'	176.2		H12, H3', H14', H15', NH
2'	46.7		H14', H15', 3'-OH
3'	74.4	4.59 (H, s)	H5', H14', H15', H16'
4'	141.0		H3', H6', H16'
5'	124.6	6.35 (H, d, 11.3)	H3', H16'
6'	125.5	6.27 (H, dd, 10.9, 11.3)	H5', H7'
7'	128.2	5.90 (H, dd, 11.5, 10.9)	H6', H9'
8'	129.1	6.70 (H, dd, 11.5, 14.5)	H6', H7', H9', H10'
9'	129.8	5.75 (H, dt, 14.5, 4.5)	H7', H10'
10'	29.4	3.52 (2H, br d, 7.0) ^b	H8', H9'
11'	151.1		H9', H10', H12', H13'
12'	122.9	6.84 (H, s)	H10', H13'
13'	152.1	8.14 (H, s)	H12'
14'	22.6	0.95 (3H, s)	H3', H15'
15'	26.1	1.10 (3H, s)	H3', H14'
16'	20.9	1.70 (3H, s)	H3', H5'
16- CH_3	17.9	1.69 (3H, d, 6.3)	H3
NCH_3	27.1	2.77 (3H, s)	
OCH_3	57.1	3.15 (3H, s)	H4
3-OH		5.31 (H, s)	
7-OH		4.82 (H, s)	
3'-OH		5.49 (H, s)	
NH		7.63 (H, br t, 5.9)	

^a, ^b Proton chemical shifts and coupling constants were deduced from the ^1H NMR spectrum in CDCl_3 .

한편, S9244-1은 비교적 양이 적으며 S9244-3과 매우 유사하나 ^1H NMR spectrum (Fig. 19) 상에서 약간의 차이를 나타냈다. 즉, 3.5 ppm 부근과 5.5~6.7 ppm 사이 (olefinic protons)에서 차이를 보였다. 상기 화합물은 UV와 NMR spectra로부터, 분자량 700 내외의 polyene계 화합물로 추측되며 추측되므로 계속하여 분자구조 해석을 진행하고 있다.

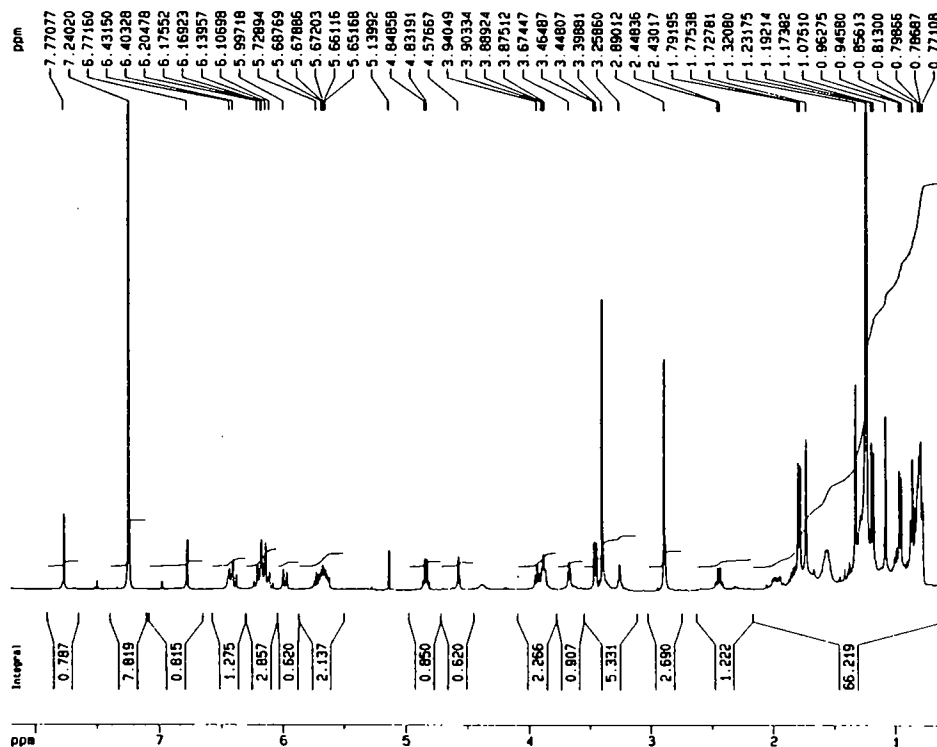


Fig. 19. ^1H NMR spectrum of S9244-1 (400 MHz, CDCl_3)

한편, 항진균성 항균활성을 나타내는 BuOH 추출분획으로부터 그림 4에서 보는 바와 같이 S9244-451, -452, -453, -454 4개의 화합물을 분리, 정제하였다. NMR 및 Mass data 분석을 통하여 3개의 화합물은 tetramycin A (451), tetrin A (453), B (454)로 동정되었다. 그러나 S9244-452는 양은 비교적 다른 3개의 화합물에 비하여 적으나 신규화합물이 확실시 되어 구조를 동정하였다.

즉, negative FAB-MS 분석결과 본화합물은 m/z 678 ($M-H$)⁻으로 밝혀졌으며 이는 HRFAB mass 분석 결과 (678.3149, $\Delta +2.3$ mmu)가 뒷받침하였다.

본 화합물의 CD₃OD 용매내에서의 ¹H NMR spectrum (Fig. 20)은 tetrin B와 매우 유사하였다. 즉, 3개의 methyl doublets (δ 0.95, 1.07, 1.22), 4.64 ppm에 anomeric proton을 가진 11개의 oxygenated methins, 1개의 nitrogenated methine (3.22 ppm), 및 10개의 olefinic protons이다. ¹³C (Fig. 21) 및 HMQC NMR data로부터 2개의 carbonyls, hemiketal carbon, sp² carbon을 가진 24개의 methins, 4개의 methylenes, 3개의 methyls를 포함한 총 34개 carbons의 존재를 확인할 수 있었다. 이로부터 41개의 nonexchangeable hydrogen atoms가 귀속되었다. 따라서 본 화합물의 분자식으로부터 총 11개의 불포화도를 알 수 있었으며 이중 7개는 10개의 olefinic carbon과 2개의 carbonyl carbons에 기인한 것을 알 수 있었다. 이외의 sp² carbon은 더이상 관찰되지 않았으므로 나머지 4개의 불포화수는 4환 고리로 구성되어 있다는 사실을 추측할 수 있었다. IR spectrum에 있어서는 OH and/or NH (3450), CO₂H (2750), lactone (1710), CO₂⁻ (1580), 및 carbon-carbon 이중결합 (1635, 1515)가 존재한다는 사실이 확인되었다. 또한, ¹H-¹H (Fig. 22) 및 ¹³C-¹H (Fig. 23) COSY data 고찰에 의해 분자식은 C₃₆H₅₂N₃O₉로 추정하였다.

또한, ¹H-¹H COSY, TOCSY 및 HMQC spectra의 세밀한 해석으로부터 98.1 ppm의 4급탄소 (C9)로 분리된 하나의 D-mycosamine system (δ 99.3, 69.8, 57.5, 71.6, 74.8, 18.3; unit a), 2개의 spin systems (units b 및 c)의 존재를 예측할 수 있었다. 이들 단위별 연결은 HMBC (Fig. 24)해석에 의하여 가능하였다. 즉, H7, H10, H13/C9 간의, H2, H3, H25/C1 간, H1'/C15와 C5' 간의 상관관계로부터 가능하였다. 또한, H11/CO₂H 사이의 cross peak로부터 C12는 carbonyl carbon에 연결되어 있음을 알았다. 한편, 수산기의 위치는

CD₃OD 및 CH₃OH를 이용한 deuterium-induced ¹³C NMR isotope shift experiment로부터 알 수 있었다.

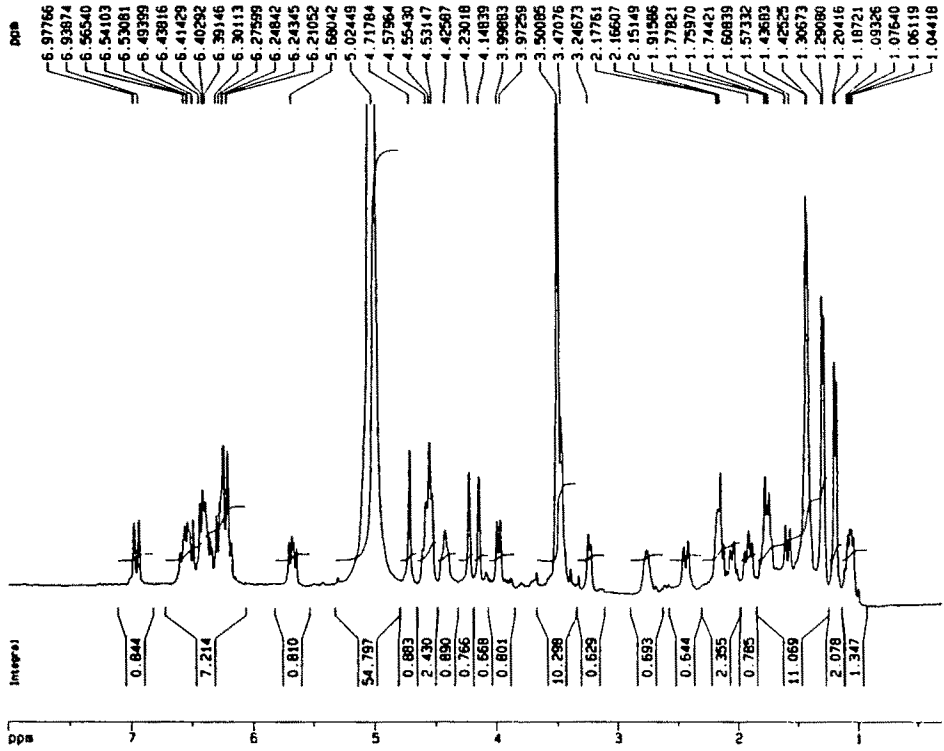


Fig. 20. ¹H NMR spectrum of S9244-452 in CD₃OD (400 MHz).

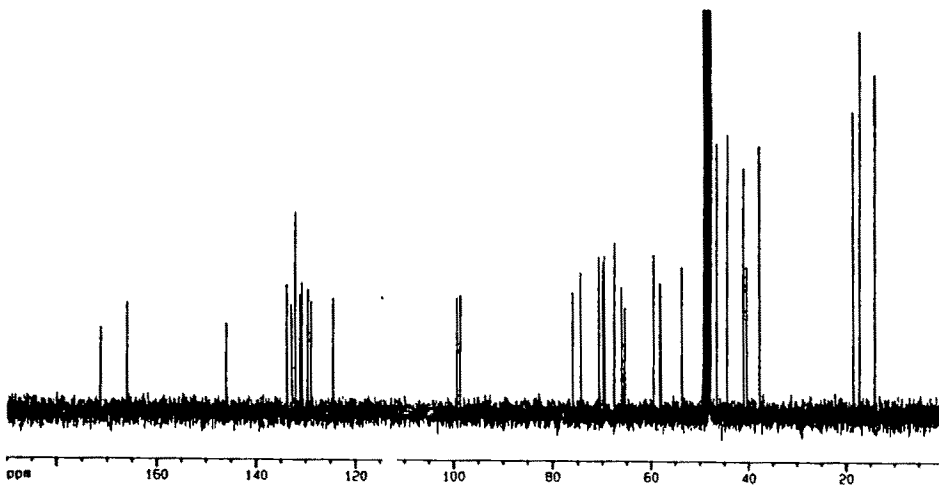


Fig. 21. ¹³C NMR spectrum of S9244-452 in CD₃OD (100 MHz).

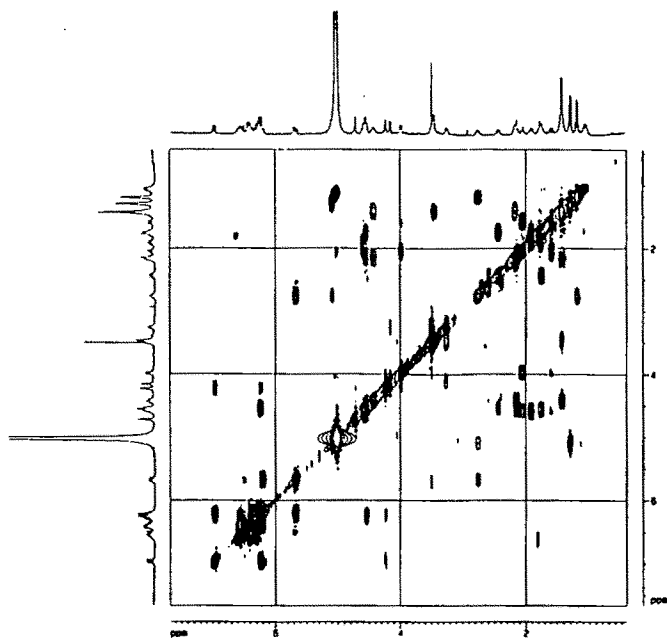


Fig. 22. ^1H - ^1H COSY spectrum of S9244-452 in CD_3OD

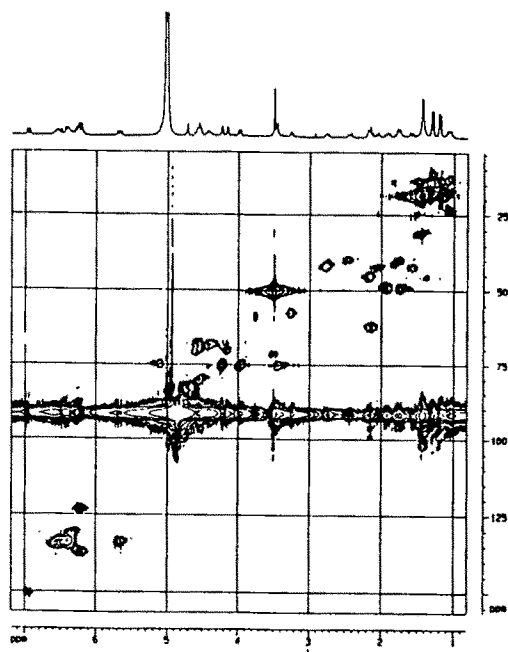


Fig. 23. ^1H - ^{13}C COSY spectrum of S9244-452 in CD_3OD

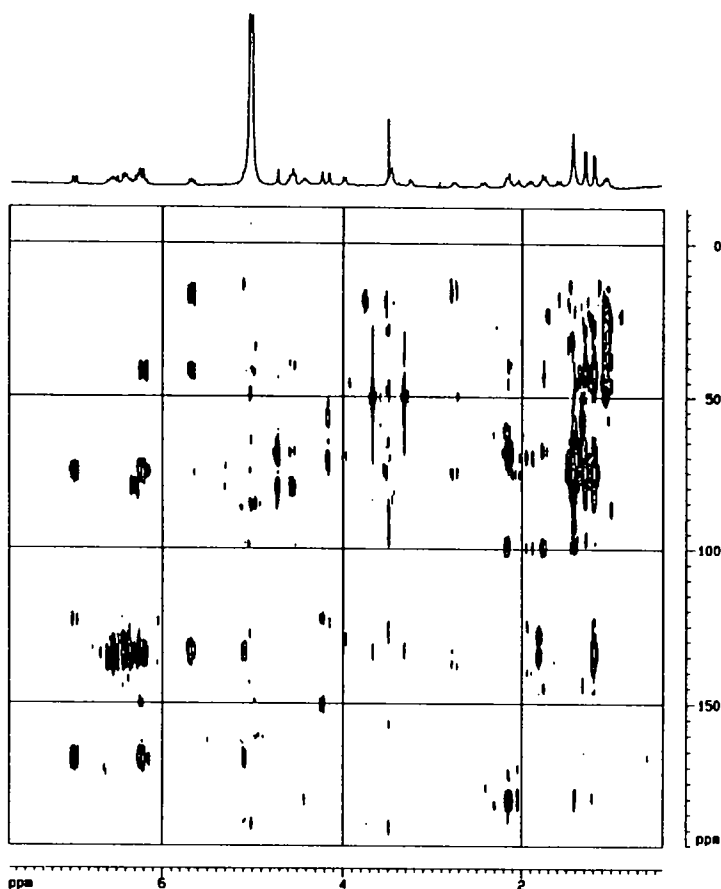


Fig. 24. HMBC spectrum of S9244-452 in CD₃OD.

Heteroatom을 가진 carbon중 H의 중수소 치환에 의하여 비교적 크게 저자장 shift (~0.1 ppm)한 위치는 3'>2'>7>4'>11'>9 순으로 나타났다. 반면, C4와 C5를 가진 다른 oxygenated carbons의 shift는 0.5 ppm 미만으로 long-range coupling을 시사하였다. 이러한 사실은 C4와 C5가 ether-linkage (epoxy group)를 하고 있다는 사실을 강력하게 시사하였다. 이러한 사실은 dimethoxyethane/water (2:1)가 HCl을 함유한 용액에서의 chlorohydrin으로의 전환과 methanolic HCl 용액 11에서의 diol monomethyl ether로의 전환과 같은 화학반응이 뒷받침하였다.

C17부터 C22 분획까지에 귀속된 수소를 제외한 모든 수소에 대한 coupling constant (J)는 CD_3OD 에서 측정하였다. C17부터 C22까지의 segment에 귀속된 수소의 경우 CD_3OD 용액내에서는 proton resonance가 degeneration 되므로 보다 해상력이 양호한 $DMSO-d_6$ 를 NMR 용매로하여 측정하였다. 또한 coupling constant 값 [$J_{2,3}$ (15.3 Hz), $H_{16,17}$ (15.7), $J_{18,19}$ (16.4), $J_{20,21}$ (14.6), $J_{22,23}$ (14.4) 및 $J_{23,24}$ (1.0)]으로부터 이중 결합과 epoxide ring의 geometries는 *trans*이라는 사실을 알았다. UV data에 있어서는 280, 292 (ϵ 720), 304 (1,100) 및 318 (970) 값으로부터 16*E*, 18*E*, 20*E*, 22*E*-tetraene system을 하고 있다는 사실을 알았다.

본 화합물의 구조에서 carboxyl group-substituted tetrahydropuran ring의 상대적 입체구조는 $J_{H,H}$ 와 NOE (Fig. 25) 분석으로 결정하였다. 즉, H10ax-H12와 H11-H13간의 NOE spectrum은 1,3-diaxial이며 이는 C12에 결합된 CO_2H 가 평면상태 (equatorial)로 펼쳐진 tetrahydropyran ring이 의자모형을 하고 있다는 사실을 의미하였다. 또한, H11-H12 (9.6 Hz), H12-H13 (10.7 Hz)의 큰 $J_{H,H}$ 값은 H11이 axial이며 hydroxyl group이 평면구조를 하고 있다는 사실을 말한다. 나아가 NOE spectrum 상에서 H13과 H11 혹은 H18간에 상관성이 전혀 관측되지 않는다는 점으로부터 C9의 hydroxyl 역시 axial이라는 사실을 알았다. 이상의 결과로부터 tetrahydropyran ring상 부제탄소의 입체구조는 9*S*, 11*R*, 12*S* 및 13*R*이라 결정하였다.

1H NMR spectrum의 저자장에서는 10개의 중복된 olefin 수소가 관측되었으며, 3.5 ~ 5.2 ppm 사이에서 다수의 oxymethine 수소를, 고자장에서는 2개의 doublet methyl 수소가 관측되었다. 보다 자세한 구조는 DEPT, 2D-NMR (1H - 1H COSY, HMQC, HMBC)의 해석으로 가능하였다. 즉, COSY 상관관계로부터 Fig. 26와 같은 3개의 부분구조를 추정하였다.

또한, HMBC 실험에 의해 위의 각 부분구조를 연결할 수 있었다. 즉, unit a의 H-7과 H-8의 수소로부터, unit b의 H-10, H-11 및 H-13으로부터, 그리고 H-13으로부터 한 acetal 4급탄소 (δ 99.3)로의 HMBC cross peak에 의해 unit a와 unit b를 연결할 수 있었다. 또한, unit c의 H-9과 unit b의 H-15로부터 anomeric carbon (H-1', δ 99.5)로의 HMBC 상관에 의해 anomeric 탄소가 C-15에 결합되어 있음을 확인할 수 있었다. 마지막으로 unit a의 H-2, H-3 그리고 unit b의 H-25로부터 carbonyl 탄소 (δ 167.3)로의 HMBC 상관에 의해 unit a와 unit b가 ester 결합으로 연결된 tetraene macrolide로 추정했다. 또한, mass data 분석결과 tetrin B보다 2 dalton 적다는 사실과 DEPT 상에서 tetrin B의 methylene 하나 대신 oxymethine이 관측됨에 따라 Table 7과 같이 모든 proton과 carbon을 귀속시킴과 동시에 그림 27과 같은 전평면구조를 구명하였다.

본 화합물은 항생물질 data base를 검색한 결과 신규물질로 동정되어 tetricin A로 명명함과 동시에 1998년 12월 특허출원하였다.

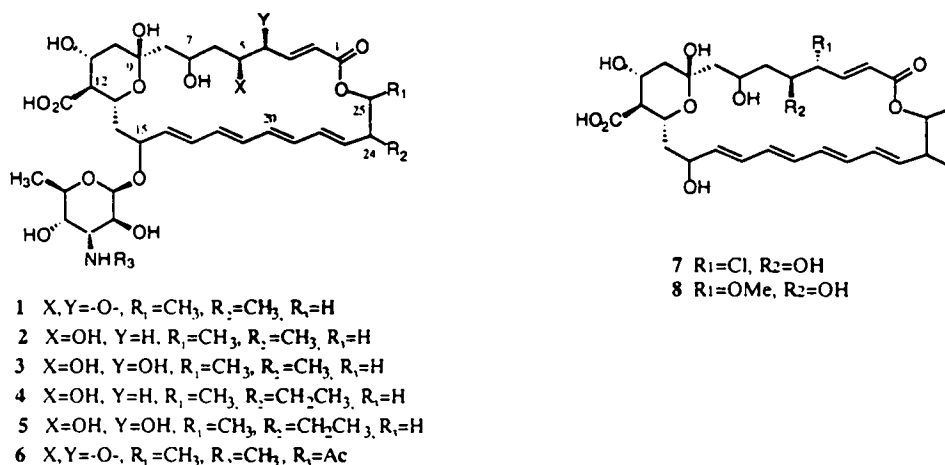


Fig. 27. Chemical structure of Tetricin A.

Table 7. Assignment of NMR data of tetracin A in CD₃OD.

Assign	δ C	δ H (multi., J Hz)	Assign	δ C	δ H (multi., J Hz)
1	165.8		17	131-134 ^a	6.19 ^c
2	124.2	5.92 (H, d, 15.5)	18	131-134	6.36 ^d
3	146.4	6.62 ^b	19	131-134	6.62 ^b
4	54.7	3.48	20	131-134	6.36 ^d
5	58.8	2.86	21	131-134	6.62 ^b
6	41.7	2.11	22	131-134	6.19 ^c
		1.25	23	129.8	5.77 (H, dd, 14.6, 9.0)
7	66.2	4.43	24	40.6	2.51 (H, m)
8	46.8	1.76	25	67.2	4.72 (H, m)
		1.88 (H, dd, 13.5, 7.6)	26	13.8	1.07 (3H, d, 6.1)
9	98.1		27	17.2	0.95 (3H, d, 6.3)
10	37.6	1.34 (H, dd, 13.6, 4.6)	CO ₂ H	171.4	
		2.03 (H, dd, 13.6, 10.7)	1'	99.3	4.64 (H, d, 1.3)
11	65.7	4.16 (H, ddd, 10.7, 4.6, 9.6)	2'	69.8	4.06 (H, dd, 2.8, 1.3)
12	57.6	2.08 (H, dd, 9.6, 10.7)	3'	57.5	3.22 (H, dd, 2.8, 9.2)
13	69.2	4.38 (H, dd, 10.7, 8.6)	4'	71.6	3.28 (H, dd, 9.6, 9.2)
14	44.1	1.66 (H, ddd, 8.6, 15.4, 5.0)	5'	74.8	3.39 (H, m)
		2.20 (H, dd, 15.4, 5.0)	6'	18.3	1.22 (3H, d, 6.5)
15	76.4	6.19 ^c			
16	128.6	5.91 (H, dd, 8.8, 15.4)			

^{a-d}: Not assignable owing to protons or carbons overlapping.

2. A192균주가 생산하는 항세균성 항생물질의 구조동정 :

Str. 192균주가 생산하는 항생물질중 MRSA에 항균력을 가지며 함량도 가장 많은 S192a에 대하여 우선 분리, 정제하여 구조동정을 시도하였다. 이물질은 positive FAB/MS에서 m/z 1,270 (M+H)⁺를 나타냈다. 이화합물은 분홍색을 띄고 있어 장파장 흡수를 보이고 있다. ¹H-NMR (Fig. 28)측정시 MeOH-*d*₃를 용매로 사용하였을 경우 저자장의 수소가 관측되지 않았으나 DMSO-*d*₆에서는 NH 수소가 관측되었으며 일부의 α -H와 3개의 N-methyl 수소도 관측되었다. 또한, ¹³C NMR (Fig. 29)로부터는 12개의 carbonyl 탄소, 1개의 conjugated ketone, 12개의 olefinic proton이 관측되었다. 이러한 사실로부터 본화합물은 conjugated quinolone 골격에 아미노산이 결합된 화합물로 추정할 수 있었다

(그림 30). 또한, spectroscopy data를 기초로 하여 문헌조사를 한 결과 본화합물은 actinomycin 계열의 화합물임을 알 수 있었다. 결국 분자량 (1,269)로부터 본화합물은 actinomycin C2 혹은 C2a로 추정되나 아미노산 배열이 다를 수도 있으므로 추후 HMBC나 NOESY data 해석을 통하여 신기지어부를 결정코저 한다.

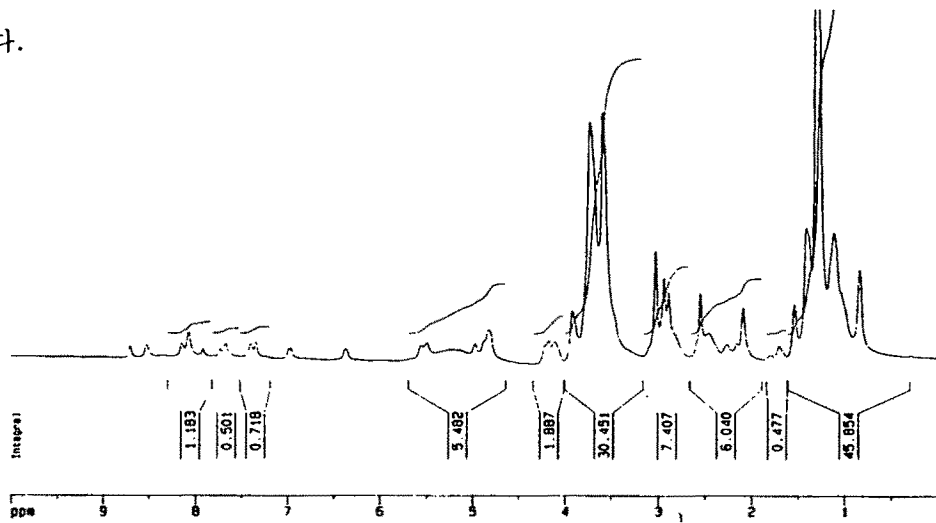


Fig. 28. ¹H NMR spectrum of S192a in pyridine-*d*₆ (400 MHz).

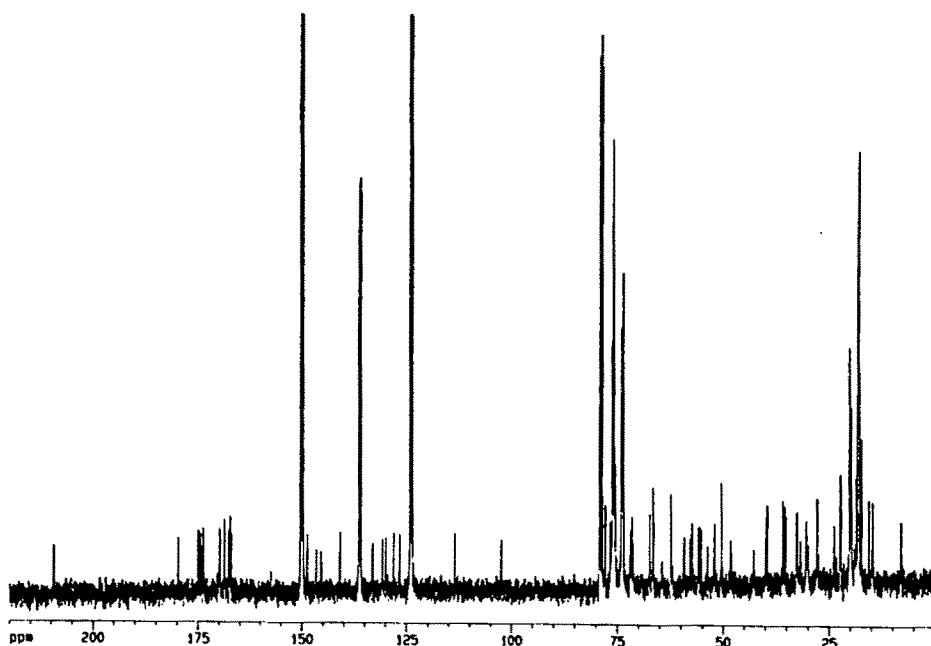
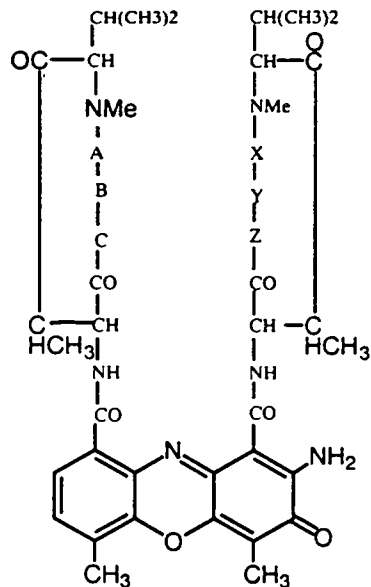


Fig. 29. ¹³C NMR spectrum of S192a in pyridine-*d*₆ (100 MHz).



actinomycin C2

A=X=Sar
 B=Y=L-Pro
 C=D-alloisoleucine
 Z=D-Val

actinomycin C2a

A=X=Sar
 B=Y=L-Pro
 C=D-Val
 Z=D-alloisoleucine

그림 30. *Str.* 192균주가 생산하는 항세균성 S192a의 예상구조.

한편, S192b의 경우 6.91, 7.20, 7.32 ppm에서 sp^2 polyene 유래로 추측되는 olefinic proton이 관측되고 있으며, 8.66 ppm에서 나타난 broad singlet은 NH일 가능성도 있겠으나 본 NMR 측정시 사용한 용매가 MeOH라는 점을 고려할 때 그 가능성은 희박하다 할 수 있겠다 (Fig. 31). 또한 4.0~5.4 ppm 사이에서는 oxymethine and/or oxymethylene이 관측되고 있다. ^{13}C NMR spectrum (Fig. 32)에서 172 ppm의 signal은 ester일 것으로 추정한다. 125~140 ppm 사이에서 olefinic carbon이 8개, 65~80 ppm 사이에서 oxymethine and/or oxymethylene 유래 carbon이 관찰되었다. 또한, 본 화합물은 UV 365 nm 부근에서 강한 흡수패턴을 보이고 있는 점으로 보아 이중결합을 4개 가지고 있는 polyene이면서 polyol을 가지고 있는 macrolide계 항생물질로 추정된다. S192b의 구조에 대하여는 현재 동정중에 있으나 본 균주 역시 항생물질 생산량

이 비교적 낮아 대량 배양하여 계속 구조동정 연구를 수행할 예정이다.

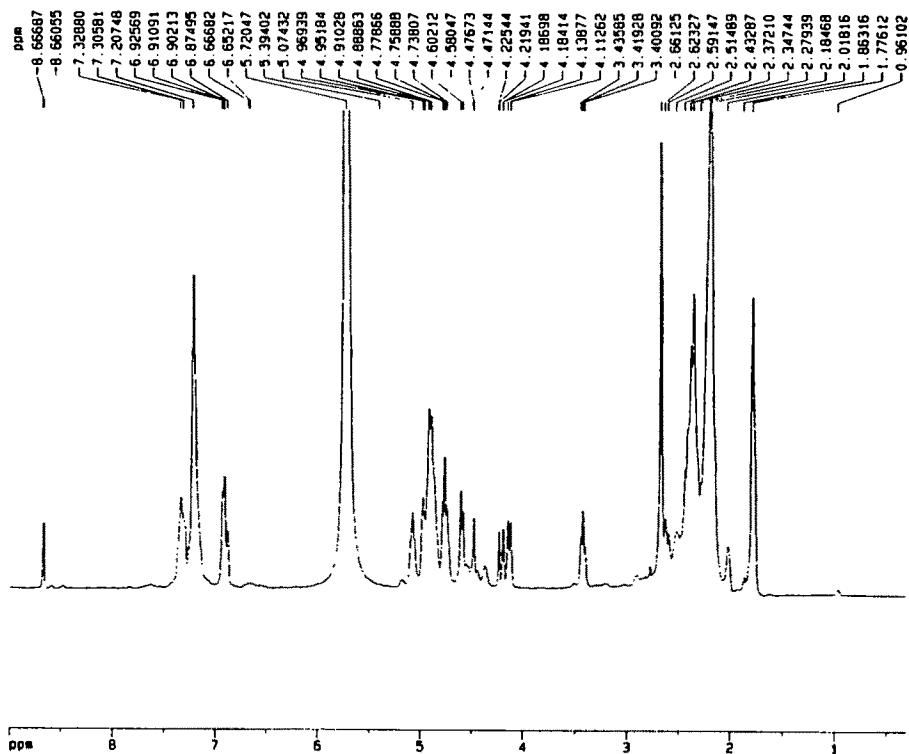


Fig. 31. ^1H NMR spectrum of S192b in CD_3OD (400 MHz).

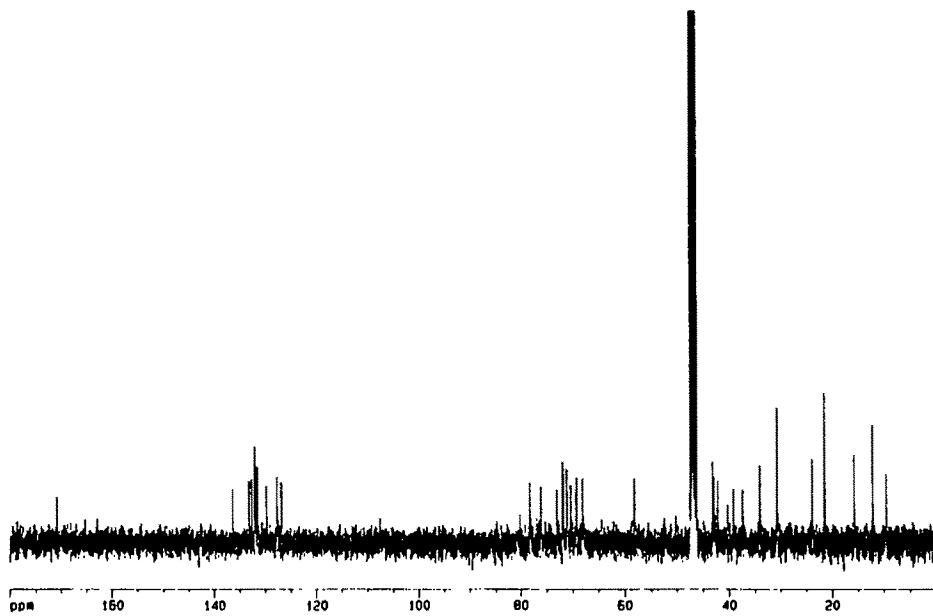


Fig. 32. ^{13}C NMR spectrum of S192b in CD_3OD (100 MHz).

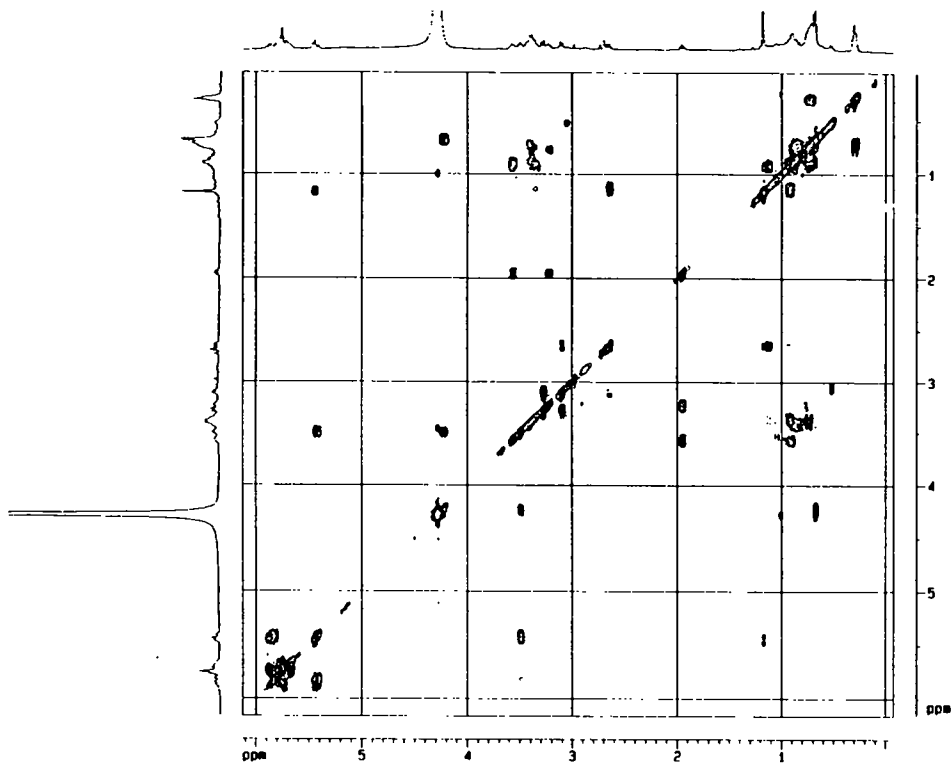


Fig. 33. ^1H - ^1H COSY spectrum of S192b in CD_3OD .

3. *Kitasatosporia kimorexae*가 생산하는 항생물질 :

본 균주는 HPLC로 분취한 분획 (그림 11)을 *in vitro* bioassay한 결과 적어도 8개 이상의 항생물질을 생산하는 것으로 밝혀졌으며 이들 각각의 UV spectrum (data not shown here)을 조사한 결과 유사한 흡수패턴을 보이므로 이들 모두는 유도체인 것으로 추정된다. 본 화합물들은 분말 상태에서 실온에 수개월 방치하여도 매우 안정하나 산, 알칼리 조건하에서는 극히 불안정한 것이 특징이다. HPLC 분취시 사용한 용매계 (75% MeOH containing 0.01% TFA, pH 3.5)를 사용할 경우 분취하여 동결건조한 다음 $\text{DMSO}-d_6$ 에 용해시키면 1시간 이내에 모두 분해되어 ^1H NMR (Fig. 34)과 ^1H - ^1H (Fig. 36) spectra 외의 물리·화학적 특성은 조사할 수 없었다. 따라서, 용매계를 바꾸어 약산성 조건

(pH 6.5)으로 하였으며 pH 조절도 이온강도와 비점이 낮은 trifluoroacetic acid (TFA)를 사용하였다. 또한, diethylamine과 TFA를 제거할 수 있는 방법도 개선하여 분취 즉시 증류수를 가하여 유기용매의 최종농도가 40% 미만이 되도록 조절한 다음 ODS 수지를 사용하여 flash column chromatography를 행하였다.

이와 같이 매우 mild한 조건에서 최종정제하였음에도 불구하고 이들은 DMSO 용액중에서도 불안정하여 NMR, 특히 측정에 장시간이 소요되는 ^{13}C NMR (Fig. 35), HMBC, HMQC 측정과정중 분해되므로 구조동정에 어려움을 겪었다. 따라서 많은 양 (수백 밀리그램)의 시료를 확보하여 한가지를 분석한 후 버리는 방법을 취하였다. 이들중 함량이 가장 많은 A (이하 KK-A로 약칭)를 우선적으로 대량 분리하여 NMR (^1H - ^1H COSY, HMBC, NOESY, HMQC), FAB/MS (spectrum data), amino acid composition을 조사하였다. 분화합물은 분자량 (FAB/MS) 1,472의 peptide 물질로서 ^1H 및 ^{13}C NMR spectra를 해석한 결과 8.80, 8.31, 7.92 ppm의 sharp singlets으로부터 thiazole ring이 3개 존재한다는 사실을 알 수 있었다 [thiazole-1; CH-5 (8.80, 126.9), C-2 (167.9), C-4 (148.7), thiazole-2; CH (8.31, 127.0), C-2 (166.3), C-4 (146.9), thiazole-3; CH-5 (7.92, 127.1), C-2 (166.9), C-4 (149.2)].

KK-1의 물리화학적 특성은 백색의 무정형 분말로서 용점은 260~280, molecular weight: 1,472 (FAB/MS), UV $\lambda_{\max}^{\text{CHCl}_3}$, MeOH (1:1) (E cm $^{1\%}$): 238 (1,250), 274 (644), 286 (555), 300 (408), 318 (314); IR ν_{\max}^{KBr} cm $^{-1}$: 3400, 2920, 2350, 1650, 1510, 1430, 1380, 1280, 1240, 1170, 1070, 1040이었다. 또한, Dragendorff와 iodine에는 양성이었으나 ninhydrin, anisaldehyde-H $_2$ SO $_4$ 및 Rhydon-Smith에는 음성을 나타냈다.

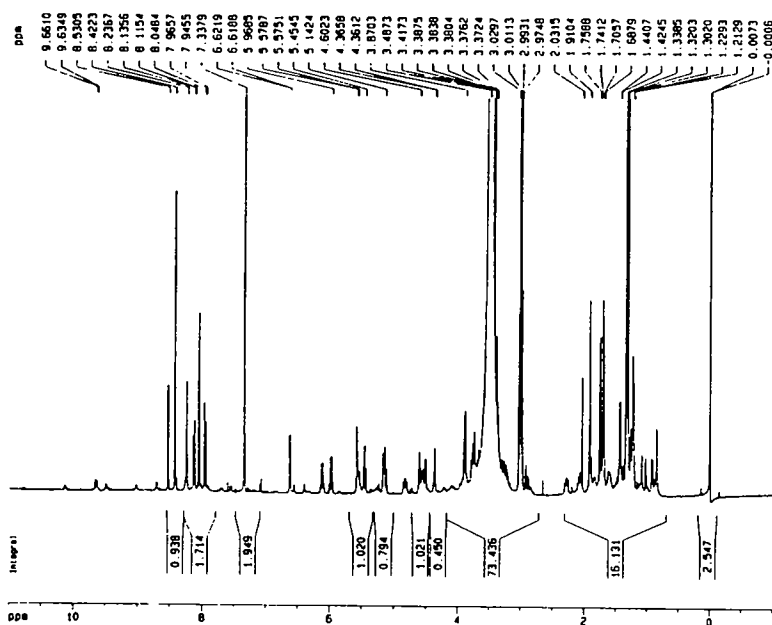


Fig. 34. ^1H NMR spectrum of KK-1 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

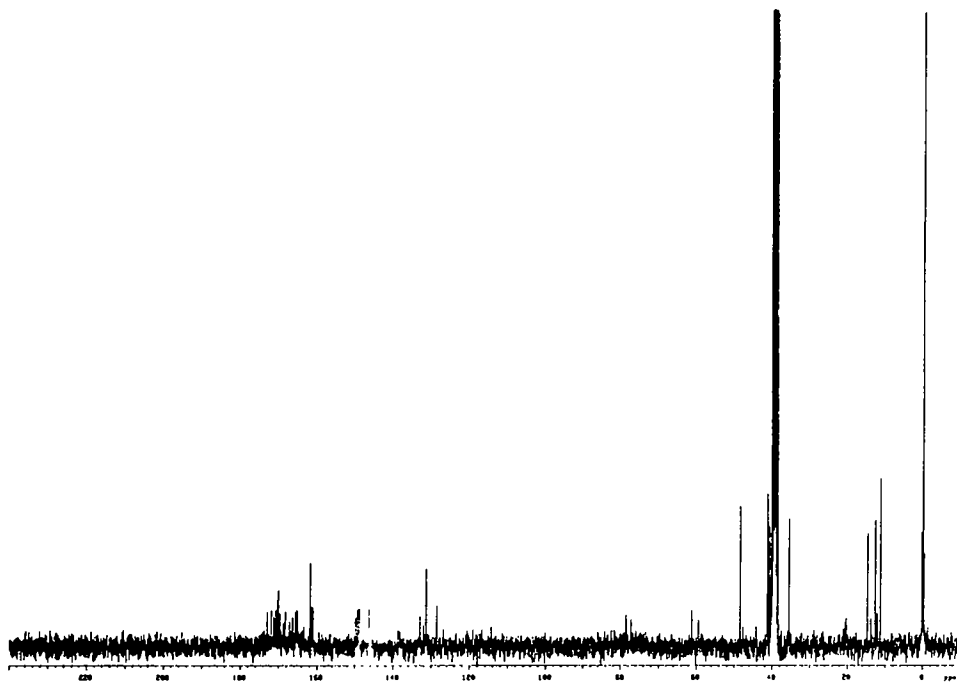


Fig. 35. ^{13}C NMR spectrum of KK-1 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

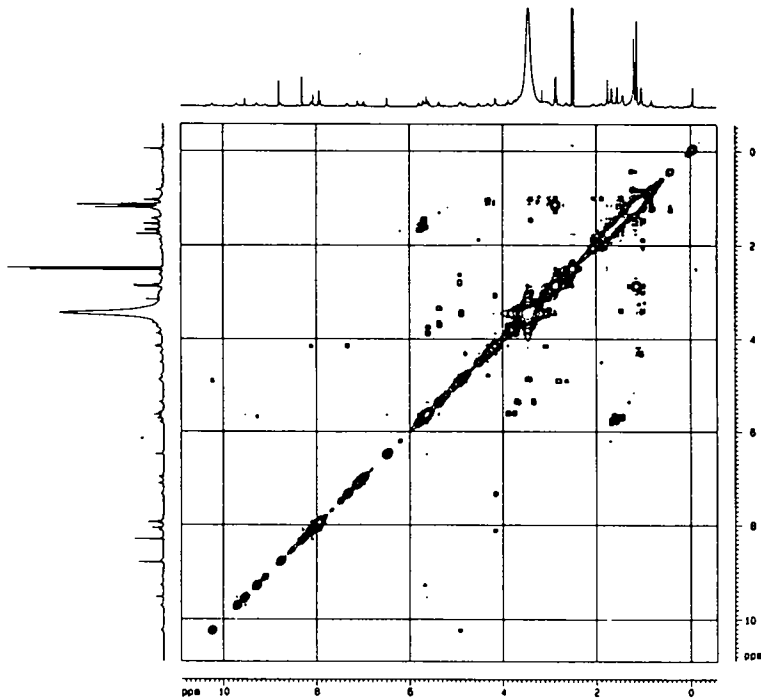


Fig. 36. ^1H - ^1H COSY spectrum of KK-1 in $\text{DMSO}-d_6$.

아미노산 분석결과 (그림 37) aspartic acid (or asparagine), glycine, threonine, proline, cystein, isoleucine과 미동정 아미노산 3종류가 각각 1몰비로 존재함이 시사되었다. 이들 아미노산은 ^1H - ^1H COSY spectrum상에서 proline의 경우 δ 4.50 (α proton), 2.07 과 1.87 (β protons), 1.05와 1.50 (γ protons), 3.00과 3.40 (δ protons)간에, aspartic acid (or asparagine)는 NH (10.23), alpha proton (4.90), beta proton (2.62, 2.77) 사이에, alanine은 NH (9.28), alpha proton (5.68), beta proton (1.43)와의 사이에 상관이 관측되어 아미노산 분석결과를 뒷받침해 주었다. 또한, H-3 (δ 5.80, 1H, quartet, $J=7.0$ Hz), H-4 (1.67, 3H, doublet, $J=7.0$ Hz)와 H-3 (5.72, 1H, quartet, $J=7.1$ Hz), H-4 (1.55, 3H, doublet, $J=7.1$ Hz)로부터 두 개의 2, 3-dehydrobutyric

system의 존재가 확인되었다. 그러나 isoleucine은 NMR상에서 확인되지 않으며 glycine과 threonine은 N-치환된 것으로 추정되나 금후 보다 상세한 분석이 요구된다. 또한, cycteine 역시 NMR 상에서 관측되지 않으며 이는 thiazole ring이 산가수분해되어 생성된 artifact로 사료된다.

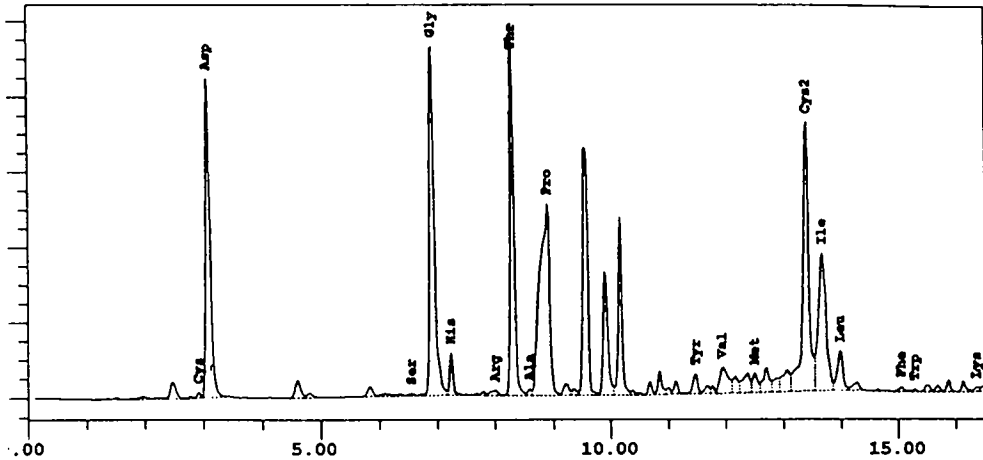


그림 37. KK-1의 아미노산 자동분석 결과.

본 화합물에 대하여는 HMBC 측정을 시도하였으나 NMR 용매인 DMSO- d_6 내에서 안정성이 매우 불량하여 ^{13}C NMR을 측정할 수 있을 정도의 시간내에도 분해되는 특성을 가지고 있었다. 또한, MeOH나 $CHCl_3$ 와 같은 일반 중수소화 용매에 대한 용해성이 매우 나빠 NMR 측정시 사용용매에 제한이 많이 뒤따랐다. 결국 *Kitasatosporia kimorexae*가 생산하는 항생물질의 구조동정은 실패하고 말았으나 본 화합물은 유사한 특성을 지닌 기지의 항생물질중 jingsimycin, 5102-2, cystargin, globopeptin, cyclothiazomycin과는 분자량에 있어, saramycetin과는 아미노산 조성이 달라 신규물질로 동정되어 1998년 3월 특허등록되었다.

4. *Str. melanosporofaciens*가 생산하는 항생물질의 구조동정 :

*Streptomyces melanosporofaciens*가 생산하는 항생물질중 main은 FAB-MS 측정결과 분자량이 1,142였으며 (Fig. 38), ^1H NMR spectrum (Fig. 39)을 측정한 결과 4.41 ~ 6.14 ppm 사이에서 olefinic proton이, 4.05 ~ 3.13 ppm 사이에서 sugar 유래이거나 단순히 oxymethin일 가능성이 있는 proton이 관측되고 있다. 또한 3.58 ppm에서는 methoxy, 2.82 ppm에서는 methylene과 결합한 NH_2 가, 2.05 ~ 0.83 ppm 사이에서 aliphatic proton이 관찰되고 있다.

한편, ^{13}C NMR spectrum (Fig. 40)에서는 176.7 ppm에서 $\text{O}=\text{C}-\text{O}$ 가, 158.3 ppm에서는 $=\text{C}-\text{OR}$ 가, 158.7 ~ 129.9 ppm 사이에서 sp^2 carbone이 8개 관측되고 있다는 점으로 보아 본 화합물은 4개의 이중결합을 가지고 있다는 사실을 알았다. 또한, 99.8 ppm의 signal은 ketal일 가능성이 시사되었으나 DEPT (data not shown here)를 측정한 결과 4급 탄소였으므로 acetal로 추정된다. 또한, 79.8 ~ 64.3 ppm 사이에서 sp^3 carbon이, 29.9 ~ 10.6 ppm 사이에서 aliphatic carbon이 12개 정도 관측되고 있다.

본 화합물은 230 nm에서 UV 흡광도를 가지는 점으로 보아 이중결합이 연이어 2개이며 다른 2개의 이중결합은 연이어 있거나 따로 떨어져 존재하는 것으로 사료된다. 이상의 결과들을 종합하여 볼 때 본 화합물은 double bond를 4개 가지고 있으며, acetal, polyhydroxyl 및 NH_2 moiety를 가지고 있다는 점, 그리고 분리, 정제과정에서 양이온교환수지인 IRC-50에 흡착되고 silica gel TLC에서 alkali 조건이 아니면 전개되지 않는다는 점등으로 미루어 보아 basic macrolide로 추정한다.

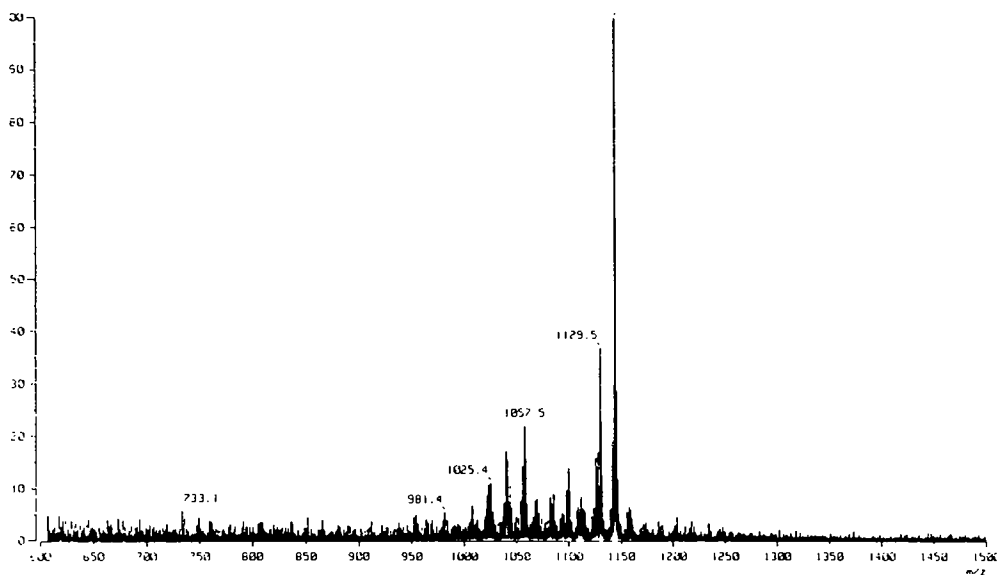


Fig. 38. FAB-MS spectrum of the main compound produced by *Str. melanosporofaciens*.

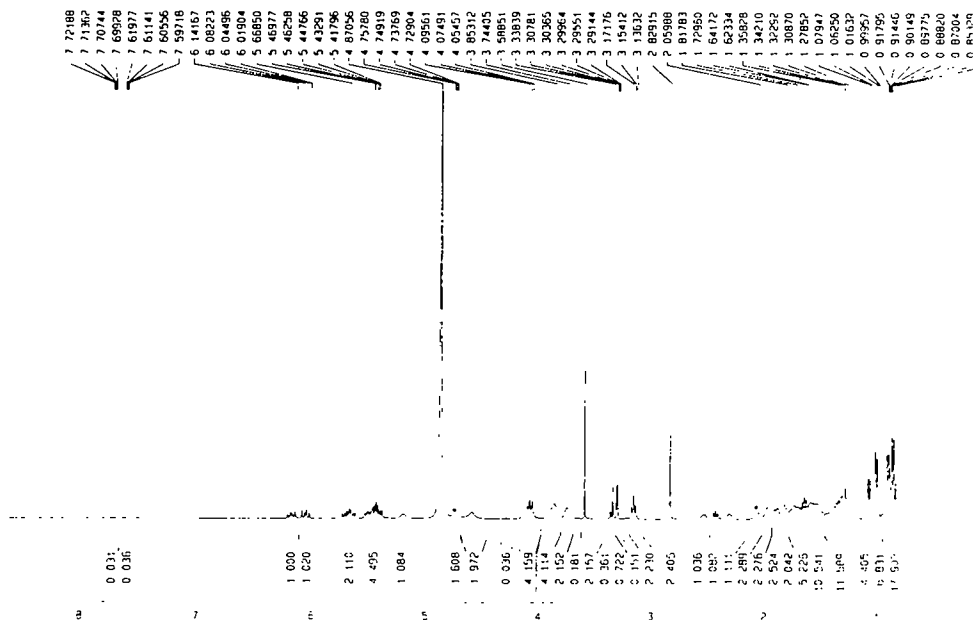


Fig. 39. ^1H NMR spectrum of the main compound produced by *Str. melanosporofaciens*.

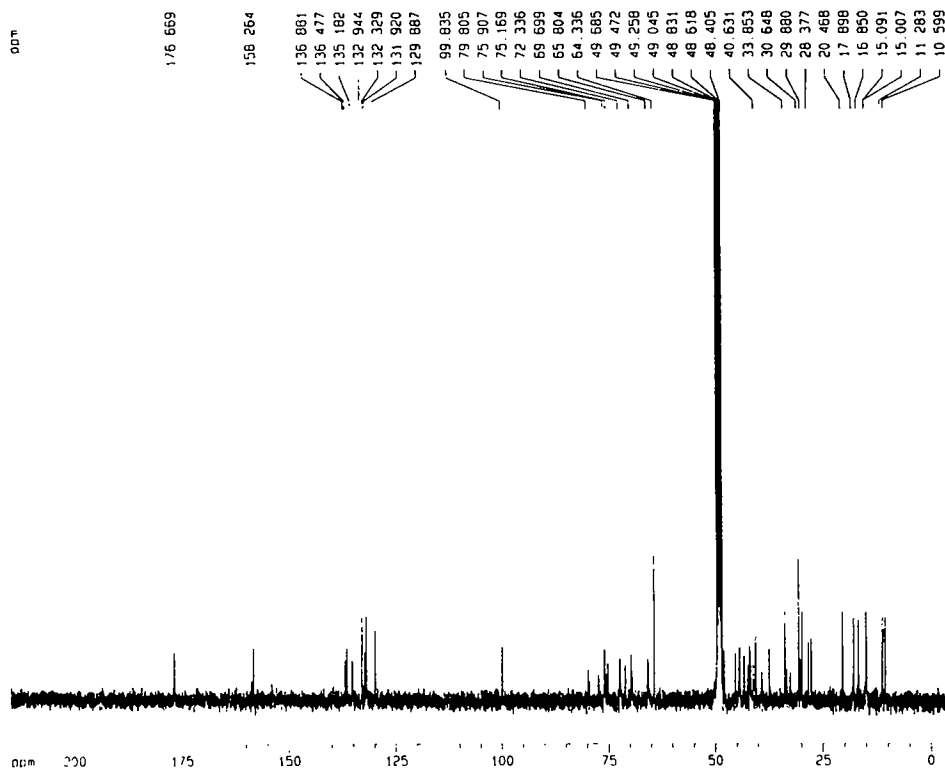


Fig. 40. ¹³C NMR spectrum of the main compound produced by *Str. melanosporofaciens*.

제 7장 생물활성 검정

제 1절 서설

물론 항생물질 농약의 경우 유기합성제제에 비하여 생산비가 높은 것은 사실이다. 그러나 돌연변이에 의한 균주개량, 발효공정기술 개발, 유전공학 기술을 이용한 균주 개발등을 통하여 최근에는 엄청난 생산비 절감을 가져오고 있다. 또한 생산비 측면에서 유기합성제제에 비하여 다소 불리하다 하더라도 인축에 대한 독성, 자연환경 보호등과 같은 관점에서 볼때 그 단점은 충분히 극복되리라 사료된다. 항생물질 농약은 일본을 비롯한 동남아 국가들을 중심으로 약 30년간 사용하여 왔으나 독성이나 교차내성과 같은 문제는 한건도 제기된 바 없다는 사실로 볼때 그 안전성은 충분히 증명된다고 하겠다.

항생물질 농약의 경우 1) 인축에 대한 안전성, 2) 내성균주의 출현이 매우 느림, 3) 자연계에서 쉽게 분해된다는 장점을 가지고 있다. 그러나 생물농약이 갖추어야 할 조건은 1) 직사광선 (자외선)에 대한 안정성, 2) 약효가 오래 지속될 수 있어야 한다는 지속성, 3) 자연계에서 분해되어야 한다는 분해성, 4) 이로운 생물체에는 독성이 없는 선택성, 5) 저농도 (10~50 μ g/liter)에서도 높은 효과를 발현하여야 하는 점, 6) 저항성균의 출현이 없거나 느려야 한다는 점, 7) 인축의 병원균과 교차내성을 유발하지 않아야 한다는 점을 고루 갖추어야만 한다. 그러나 내성균주의 출현에 대하여는 대체 살균제를 사용하거나 전혀 작용점이나 작용기전이 다른 살균제를 병용할 경우 해결할 수 있다.

현재까지 개발된 농약중 *Streptomyces* spp. 배양액으로부터 분리, 개발된 항생물질은 표 8에서 보는 바와 같다. 이중 validamycin, tetranactin, bialaphos는 가장 이상적인 농약으로 인정받고 있는 반면, antimycin A,

cellocidin, cycloheximide, blasticidin S는 포유류와 식물체 자체에 대한 독성 때문에 농약으로의 사용이 극히 제한되고 있다.

농약의 사용량은 의약품 항생물질 시장규모에 절대 뒤지지 않는다는 점과 지금까지 개발된 항생물질 농약의 내성균 출현 및 독성등을 감안한다면 새로운 항생물질 개발분야는 전망이 매우 밝다고 하겠다.

표 8. *Streptomyces* spp.가 생산하는 항생물질 농약

Insecticides	Herbicides	Pesticides	
Antimycin	Anisomycin	Aabomycin A	Laurusin
Aureothin	Bialaphos	Antimycin A	Miharamycin A
Avermectins	Cycloheximide	Bihoromycin	Mildiomycin
Cycloheximide	Herbicidins	Blasticidin S	Nikkomycin
Milbemycins	Herbimycin	Cellocidin	Novobiocin
Pierricidins	Toyocamycin	Chloramphenicol	Oxytetracycline
Tetranactin		Cycloheximide	Polyoxins
		Ezomycin	Streptomycin
		Kasugamycin	Validamycin A

제 2절 연구결과

1. *in vitro* 항균활성

본 연구에서 신규 항생물질로 동정된 16-methyloxazolomycin, tetracin A 및 KK-1의 최소발육저지농도 (minimal inhibitory concentration)은 표 9와 같다. 즉, 16-methyloxazolomycin은 세균인 *Bacillus subtilis*와 녹조류인 *Chlorella vulgaris*에 대하여 각각 5.0, 10.0 μ g/ml의 MIC 값을 나타냈다. 거의 모든 항생물질의 경우 곰팡이에 항균활성을 나타내는 화합물이 녹조류에 대

하여 항균활성을 가지나 본 화합물의 경우는 항세균성이면서 algaecidal activity를 나타내므로 매우 흥미롭다. 따라서 본 화합물에 대하여는 세포 (항암) 독성에 대하여도 조사해 보고자 한다.

한편, tetracin A의 경우는 *Pyricularia oryzae*, *Colletotrichum lagenarium* 및 *Rhizoctonia solani*에 대하여 2.0~3.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 MIC 값을 나타냈다. 본 화합물은 항진균 선택성 항생물질로 algaecidal activity를 나타내지 않았다. 따라서 본 화합물에 대하여도 금후 세포 (항암)활성을 조사코져 한다.

Table 9. MIC ($\mu\text{g/ml}$) of 16-methyloxazolomycin, tetracin A and KK-1.

Test organism	16-Methyloxazolomycin	Tetracin A	KK-1
<i>Pyricularia oryzae</i>	-	3.0	0.5
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	-	2.5	1.0
<i>Valsa ceratosperma</i>	-	ND	4.0
<i>Botrytis cinerea</i>	-	ND	16.0
<i>Alternaria kikuchiana</i>	-	ND	16.0
<i>Bipolaris oryzae</i>	-	ND	8.0
<i>Rhizoctonia solani</i>	-	2.0	-
<i>Bacillus subtilis</i>	5.0	-	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	10.0	-	-

*ND : not detected

KK-1은 *Pyricularia oryzae*, *Colletotrichum lagenarium* 및 *Valsa ceratosperma*에 대하여 각각 0.5, 1.0, 4.0 $\mu\text{g/ml}$ 로 매우 강한 항균활성을 나타냈다. 이외에도 *Botrytis cinerea*, *Alternaria kikuchina* 및 *Bipolaris oryzae*에 대하여도 8~16 $\mu\text{g/ml}$ 을 나타냄으로서 비교적 강한 항균활성을 나타냈다. KK-1은 식물병원성 곰팡이에 있어 세포벽 합성을 저해함으로써 나타나는 현상

인 균사팽윤 (mycelial swelling)을 야기하는 것으로 관찰되었다 (그림 41). 곰팡이 세포벽은 chitin 혹은 β -glucan으로 구성되어 있어 이와 같이 곰팡이의 세포벽 합성저해 현상을 일으키는 항생물질의 경우 포유동물이나 식물체에는 target site가 없으므로 독성이 없는 것이 특징이다. 따라서 본 화합물의 경우 자외선이나 장기간 보존시 안정성 (stability)이 양호하면 농약으로 개발될 가능성이 매우 높다고 할 수 있다.

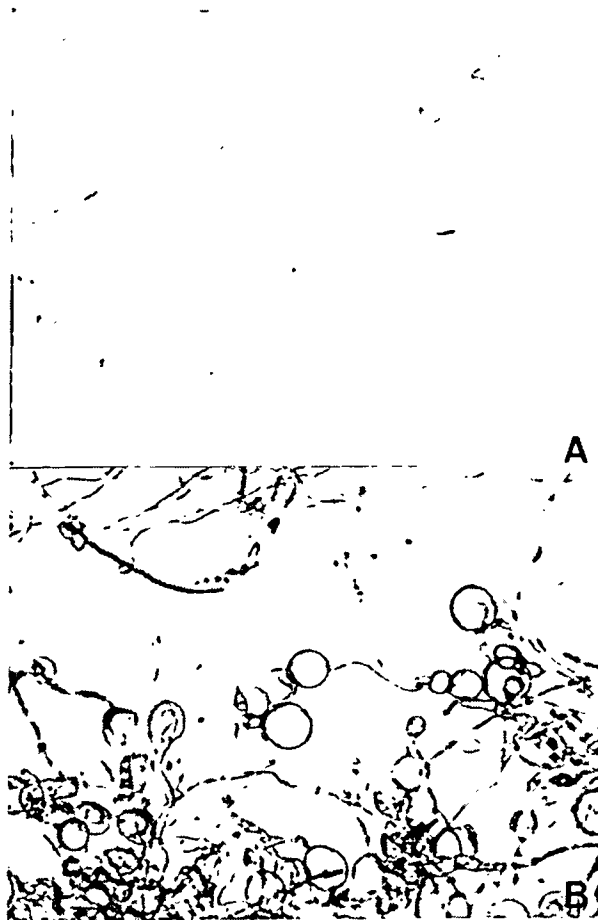


Fig. 41. Mycelial swelling of *Pyricularia oryzae* (A) and *Fusarium oxysporium* (B) induced by KK-1.

2. *in vivo* 항균활성

1차 항생물질 스크리닝 과정에서 선발된 균주를 대상으로 식물체를 이용한 생물활성검정을 수행하였던 바, 표 9에서 보는 바와 같이 *Kitasatosporia kimorexae* 배양액에서 *Pyricularia oryzae*와 활물기생성 곰팡이인 *Sphaerotheca fuliginia* (그림 42)에 대하여 우수한 예방효과를 나타냈다. 본 실험에서 흰가루병 방제효과를 조사하기 위하여 사용한 숙주식물이 비록 보리이기는 하나 흰가루병의 경우 시설 원예작물, 특히 오이의 하우스 재배시 심한 피해를 일으킨다. 그러나 아직 흰가루병균에 대한 뚜렷한 방제약이 개발되지 않고 있으므로 본 균주가 생산하는 항생물질의 경우 농약으로의 개발이 기대된다.

한편, *Streptomyces* 9244균주가 생산하는 항생물질은 항세균성, 항진균성 및 algaecidal 물질로서 *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*는 물론, 활물기생성 곰팡이인 *Sphaerotheca fuliginia*에 대하여 매우 양호한 예방효과를 나타냈으나 담배 식물체에 대하여 약해 (제조효과)가 나타났다. 지금까지 보고된 polyene계 화합물들은 항진균성이면서 녹조류에 대하여 항균력을 나타내는 것이 특징인 반면, 본화합물들은 항세균성이면서 algaecidal하기 때문에 매우 흥미롭다. 따라서 본 균주가 생산하는 항생물질중 항세균성 화합물에 대하여는 금후 제조제로서의 효과를 기대한다.

또한, *Streptomyces melanosporofaciens*가 생산하는 항생물질 역시 *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia oryzae*, *Botrytis cinerea* 등에 대하여 우수한 예방효과를 나타냈으나 벼에 대하여 약해가 나타났다. 이 외에도 본과제 수행시 분리한 방선균의 경우 표 9에서 보는 바와 같이 식물병원균 특히, 원예작물 병원성균에 대하여 매우 양호한 예방효과를 나타냈다. 특히, A181, A287, A197, A296, A254, A187균주가 생산하는 항생물질의 경우 오이 잿빛곰팡이와 토마토 역병에 대하여 85% 이상의 방제가 나타났다. 그러나 이들 균주가 생산하는 항생물질은 아직 신·기지 여부가 동정되지 않아 금후 물질동정을 완료한 후 보다 상세한 *in vivo* 생물활성 검정을 실시할 예정이다.

표 10. 선발균주의 *in vivo* 생물활성 검정 결과

검정균 균주명	도열병	벼잎집무늬 마름병	오이잣빛 곰팡이병	토마토 역병	밀잎 늙병	보리 흰가루병
<i>S. melanosporofaciens</i>	100	100	-	-	95	95
<i>Streptomyces</i> 9244	100	95	90	-	95	95
<i>Kit. kimorexae</i>	100	-	-	10	100	100
A194	95	85	94	74	96	70
A162	16	15	70	14	76	12
A192	91	96	94	78	98	37
A193	93	90	95	78	96	70
A449	0	0	55	0	33	70
A181	96	93	89	91	100	90
A287	93	85	96	92	100	75
A450	100	80	78	50	100	99
A197	93	60	95	91	100	92
A303	86	50	96	85	100	50
A296	95	92	97	92	99	80
A254	80	75	94	85	97	80
A187	86	80	92	88	100	90

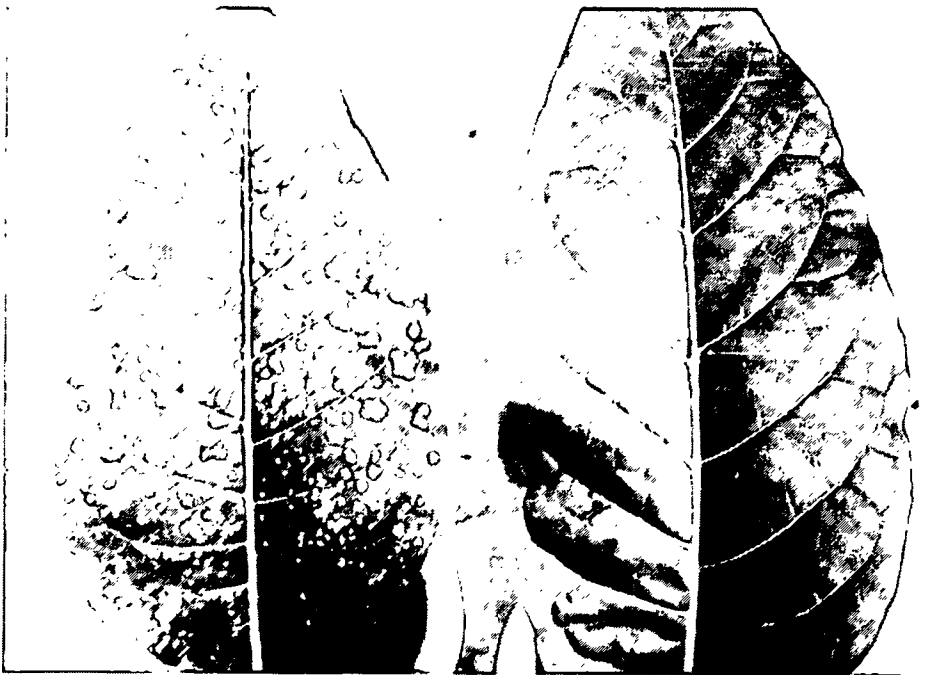


그림 42. *Kit. kimorexae* 배양액의 담배 흰가루병에 대한 방제효과

제 8장 신규 항생물질 생산균주의 동정

제 1절 서 설

1944년 Waksman에 의하여 *Streptomyces griseus*로부터 방선균 최초의 항생물질인 streptomycin이 개발된 이래 토양 방선균은 항생물질의 보고로 인식되고 있으며 현재도 역시 actinomycetes 목에 속하는 미생물은 생리활성물질의 가장 풍부한 자원으로 여겨지고 있다. 그러나 그동안 수많은 항생물질이 개발되면서 항생물질의 novelty를 강조하기 위하여 발견자 각자가 생산균주에 대하여 나름대로 새로운 이름을 붙여왔다. 즉, International Streptomyces Project 방법에 의거 미생물을 동정하여 조금이라도 다른 특성이 나타나면 새로운 종으로 등록하였던 것이다. 그러나 탄소원이나 질소원의 이용성이 조금씩 다르다고 하여 새로운 종이라고 하기에는 무리가 뒤따른다.

미생물 동정에 있어서 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"는 성서처럼 사용되는 reference이다. 1972년 제 7판의 Bergey's Manual만 하더라도 비록 페이지수는 방대하나 곰팡이, 세균, 방선균등을 모두 책한권에 수록할 수 있었다. 그러나 1989년 제 8판이 발간될때에는 너무나 방대하여 4권으로 나누어 출판하기에 이르렀다. 이와 같이 미생물은 매년 엄청난 수가 새로이 분리, 보고되고 있다. 방선균의 경우도 예외는 아니어서 8판 Bergey's Manual에서는 volume 4에 따로 집대성 되어 있다. 이전까지만 하더라도 방선균의 동정은 International Streptomyces Project (ISP) 방법에 준하여 균동정하였으나 Anderson과 Goodfellow가 새로운 numerical taxonomy 방법을 제안하면서 호응을 얻어 8판 Bergey's Manual은 numerical taxonomy법에 근거하여 동정하는 방법이 제시되고 있다. 그러나 numerical taxonomy 방법의 경우 139개 항

목에 달하는 특성을 조사하여야 함과 동시에 모두 조사하더라도 Taxon programe과 같은 software의 도움없이는 균동정하기가 매우 어렵다는 사실이다. 또한 균동정을 하더라도 reference 균주와 비교하기 위하여는 결국 ISP에 등록된 균주와 비교하는 것이 필수적이라는 점이다.

최근에는 화학분석기기를 이용한 chemotaxonomy 방법도 종종 이용되고 있다. 예를 들면 방선균 동정에 가장 널리 이용되는 diaminopimelic acid의 이성체 type을 조사함으로써 genus를 쉽게 알아내는 방법이다. 이 방법의 경우 어느 속에 속하는지는 쉽게 알 수 있으나 같은 속중에서 어떤 종에 속하는 균주인가를 알기 위하여는 결국 numerical taxonomy와 ISP 방법을 적절히 병용함이 바람직하다고 사료된다.

2. 연구결과

균주동정은 International Streptomyces Project (ISP) 방법에 준하여 행하였다. 본 균주는 oatmeal agar와 peptone-yeast extract iron agar 배지를 제외한 모든 ISP 배지에서 대체로 생육이 양호한 편이었으며 기균사의 발달도 양호한 것으로 나타났다. 기질균사의 색깔은 연한 황색을 띄었으며 사용한 모든 배지에서 용해성 색소는 생성하지 않았다 (표 11). 포자의 형태는 cylindrical이었으며 포자의 표면은 smooth type였다 (그림 43). 이외에도 본균주는 멜라닌 색소를 생성하지 않았으며 세포벽의 diaminopimelic acid는 LL-type으로써 *Streptomyces* 속의 균주임을 알 수 있었다 (표 12). 단일 탄소원의 이용성 시험에서 D-glucose, L-arabinose, inositol, D-mannitol, D-fructose, raffinose, melibiose는 매우 용이하게 이용하나 기타의 탄소원은 이용하지 못하는 것으로 나타났다 (표 13).

Table 11. Cultural characteristics of S9244 strain

Medium	Growth	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble pigment
Yeast Ex.-malt Ex. agar (ISP No. 2)	Good	Good/W	Pale yellow	None
Oatmeal agar (ISP No. 3)	Moderate	Moderate/G.W	Pale yellow	None
Inorganic salts-starch agar (ISP No. 4)	Good	Moderate/G.W	Pale yellow	None
Glycerol-asparagine agar (ISP No. 5)	Good	Good/W	Pale yellow	None
Peptone-yeast Ex.-iron agar (ISP No. 6)	Moderate	Moderate/W	Pale yellow	None
Tyrosine agar (ISP No. 7)	Good	Good/G	Brown	None
Glucose-asparagine agar	Good	Moderate/W	Pale yellow	None
Bennet's agar	Good	Good/W	Pale yellow	None
Nutrient agar	Moderate	Good/W	Pale yellow	None

Table 12. Morphological characteristics of S9244 strain

Morphology	Characteristics	Morphology	Characteristics
Spore shape	cylindrical	Spore chain	<i>rectiflexibles</i>
Spore size (μ m)	0.2~0.3 x 0.6~0.8	morphology	
Spore surface	smooth	Spore number/chain	10~20 이상
ornamentation		Spore mortality	none

Table 13. Carbohydrate utilization of S9244 strain

Carbon source	Utilization	Carbon source	Utilization
D-Glucose	+	L-Rhamnose	±
L-Arabinose	+	Sucrose	-
D-Xylose	-	Raffinose	+
Inositol	+	Cellobiose	-
D-Mannitol	+	Melibiose	+
D-Fructose	+		

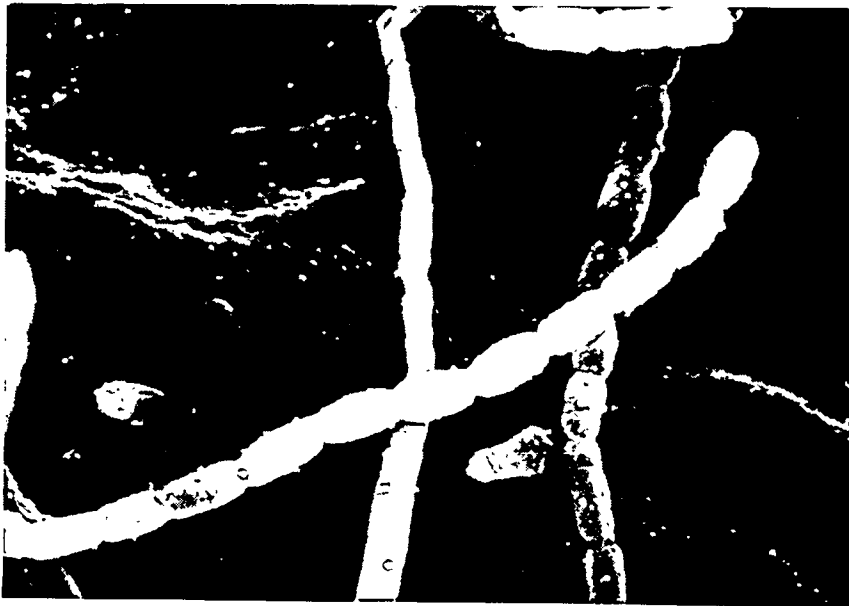


그림 43. S9244군주 포자의 전자현미경 (SEM) 사진.

제 9장 특허출원

제 1절 서 설

항생물질농약이란 독점성이 매우 강한 품목이다. 설령 특허기간이 종료되었다 하더라도 기득권을 가진 제조회사는 판매망과 생산설비를 갖추고 있기 때문에 타회사가 새로이 투자한다고 하더라도 성공가능성은 매우 희박하다. 특허출원이나 학회발표시에 보고된 생산균주의 생산수율은 야생균주 상태에서의 생산수율에 불과하다. 산업화에 들어간 생산균주는 그동안 전통적인 돌연변이 기술을 통한 균주개량, 최적생산조건 확립등의 과정을 통하여 수백배에서 수천배에 가까울 정도로 생산수율을 향상 시켜 놓은 상태이다. 또한 타 기업체에서 동등 이상의 생산수율을 기대하고 투자한다고 할 경우 기득권을 가진 제조회사는 크게는 판매가를 낮추어 1/3로 덤핑하는 경우가 종종 있다. 국내 모 제약회사가 특허권이 완료된 제품이라 하여 상당한 설비투자를 해 가면서 경쟁을 시도하였으나 상기 사실을 무시하였기 때문에 막대한 손실을 감수하고 말았던 사례가 있다. 따라서 항생물질의 경우 결코 기술이전을 해주려고 하지 않는 것이 항생물질 제조업계의 특징이다.

이와 같은 이유에서 당 연구팀은 3년간에 걸쳐 항생물질을 개발 연구를 수행하는 과정에서 신규항생물질로 개발한 16-methyloxazolomycin, tetracin A 및 kimorexin A에 대하여 우선적으로 국내특허를 출원하였다.

제 2절 연구결과

1. 16-Methyloxazolomycin의 특허 출원 (1998년 6월 특허출원)

명세서

1. 발명의 명칭

스트렙토마이세스(*Streptomyces sp.*)속 균주가 생산하는 신규 항균-항녹조류 항생물질, 십육-메칠옥사졸로마이신 (16-methyloxazolomycin)

2. 발명의 상세한 설명

본 발명은 방선균류의 일종인 스트렙토마이세스(*Streptomyces sp.*) 속 균주가 생산하는 신규 항균-항녹조류 항생물질 및 제조 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 그람 양성균 및 녹조류에 대한 생육저해작용을 갖는 트리엔계의 신규 화합물 십육-메칠옥사졸로마이신 (16-methyloxazolomycin) 및 토양에서 분리한 방선균류의 일종인 스트렙토마이세스(*Streptomyces sp.*)속의 균주로부터 신규 화합물인 십육-메칠옥사졸로마이신 (16-methyloxazolomycin)의 제조방법에 관한 것이다.

농약용 항생물질의 꾸준한 개발에도 불구하고 작물에 대한 약해유발, 환경오염, 저항성 병원미생물의 출현등 그 부작용이 심각하여 독성이 없고 환경오염이 없는 새로운 물질의 개발이 날로 절실히 요구되는 상황이다. 지금까지 10,000여종 이상의 생리활성물질이 미생물 배양액으로부터 분리 되고 있으며 그중 일부는 실용화에 이른 것도 있다. 또한 미생물은 대사물질의 다양성 때문에 그들의 대사

산물중에는 유용한 생리활성물질이 많아 개발 가능성이 매우 높다 하겠다. 이러한 취지에서 본 발명자들은 식물병원균에 대하여 항균활성 물질을 분리하여 농약용 항생물질을 개발코저 신규 항생물질을 탐색하던 중 대전지역으로부터 분리한 토양 방선균이 생산하는 신규 항생물질, 십육-메칠옥사졸로마이신(16-methyloxazolomycin)을 분리, 정제하여 구조를 밝히고, 이 화합물이 그람 양성 세균 및 녹조류에 활성이 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다. 따라서 본 발명은 항균활성과 항녹조류 활성을 보이는 트리엔계의 신규 화합물을 제공하는 것이다. 한편 본 발명의 또 다른 목적은 방선균류인 스트렙토마이세스(*Streptomyces sp.*)속 G9244에 대한 생물활성은 1차로 항균활성을 조사하였고 정제된 활성물질을 사용하여 2차로 항녹조류 활성을 조사하였다. G9244균주로부터 십육-메칠옥사졸로마이신(16-methyloxazolomycin) 화합물을 얻기 위한 분리정제는 그람 양성 세균인 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)에 대한 생육억제를 지표로 삼아 실시하였으며 이하 본 발명을 실시예에 따라 구체적으로 기술하면 다음과 같다.

실시예 1: 방선균 G9244균주의 분리 배양

본 발명에 사용한 균주 G9244는 저영양성 미생물 분리용 배지를 사용하여 대전지역에서 채취한 토양으로부터 분리하였다. 즉 미리 건조시켜 놓은 토양시료 약 1 g을 멸균 증류수 10 ml에 현탁시켜 10^{-1} 부터 10^{-5} 배 까지 희석한 다음, 배네트(Bennet)한천 (가용성 스타치 10 g, 카세인 1 g, 인산이수소칼륨 0.5 g, 황산마그네슘 1.02 g, 한천 15 g, pH 7.2), 부식산 한천 (부식산 1 g, 인산수소나트륨 0.5 g, 염화칼륨 1.71 g, 황산마그네슘 0.05 g, 황산철 0.01 g, 탄산칼슘 0.02 g, 한천 15 g, pH 7.0)배지에 각각 1ml씩 접종하였다. 배네트 한천은 포어 플레이트(pour plate)방법으로 접종했으며, 부식산 한천과 희석 한천은 스트릭

(streck) 방법으로 접종하였다. 플레이트는 27°C에서 7-8일간 배양하여 방선균 콜로니중에서 외관상 형태와 색깔이 상이하다고 판단되는 콜로니만을 분리하여 동일배지에 접종함으로써 단포자 분리를 행하였다. 순수 분리된 균들은 모디파이드 베네트 한천 배지 [엔-제트 아민 에이 (N-Z amine A) 1 g, 효모엑기스 1 g, 포어엑기스 1 g, 글루코스 5 g, 수용성 스타치 5 g, 한천 15 g, pH 7.3]에 사면접종하여 27°C에서 10-14일간 배양함으로써 균사와 포자를 풍부하게 형성시킨 후 면전을 고무전으로 교체한 다음 실온에 보관하였다. 또한 1차 스크리닝에서 항생물질을 생산하는 것으로 밝혀진 균주에 대해서는 20% 글리세롤에 포자를 현탁시킨 후, 20°C에 보관하였다.

실시에 2: 분리주 G9244균주의 동정

G9244균주의 분류 동정은 인터네셔널 스트렙토마이세스 프로젝트 (ISP)의 분류기준 및 동정방법에 준하여 행하였다. G9244균주의 배양적 특성을 조사한 결과는 표 14와 같다. 즉 대부분의 한천배지에서의 생육 상태는 양호한 편이다. 공시된 배지에서 기균사의 형성은 양호한 편이며 기저균사는 연노랑 혹은 갈색을 띄었으며 어떤 배지에서도 수용성 색소를 생성하지 않았다. 포자 (표 15)는 0.2-0.6 μm 크기의 실린더형이다. 또한 11종의 탄소원을 대상으로 당 이용성을 조사한 결과 (표 16), 디-글루코스, 엘-아라비노스, 이노시톨, 디-플락토스, 라피노스 그리고 멜리비오스 등을 잘 이용하는 것으로 알려져 있다. 또한 본 균주의 세포벽 디아밀로피멜릭산의 타입은 엘엘 타입이었다. 이상의 분류학적 특성을 토대로 ISP 분류기준 및 기타 방선균 분류기준과 비교한 결과, 본 균주는 스트렙토마이세스 (*Streptomyces* sp.) 속에 속하는 것으로 동정하였으며 따라서 스트렙토마이세스 (*Streptomyces* sp.) G9244로 명명하였다.

표 14. 분리주 G9244균주의 배양적 특성

사용 배지	생육상태	기중균사	기저균사	수용성색소
이스트-말트익스 트랙트 한천	양호	양호	연노랑	무
오트밀 한천	보통	보통	연노랑	무
무기염-스타치 한천	양호	보통	연노랑	무
글리세롤-아스파 라긴 한천	양호	양호	연노랑	무
펩톤-익스트랙트 -철 한천	보통	보통	연노랑	무
타이로신 한천	양호	보통	갈색	무
배네트 한천	양호	양호	연노랑	무
뉴트리언트 한천	보통	양호	연노랑	무

표 15. G9244균주의 형태적 특성

형태	특성	형태	특성
포자	실린더형	포자 사슬 형태	직유연형
포자크기	0.2-0.6 μ m	포자수/사슬	10-20
포자표면 관찰	부드러움	포자 운동성	무

표 16. 분리주 G9244균주의 탄화수소 이용성

탄소원	이용도	탄소원	이용도
디-글루코스	+	엘-람노스	+/-
엘-아라비노스	+	수크로스	-
디-크실로스	-	라피노스	+
이노시톨	+	셀로비오스	-
디-마니톨	+	멜리비오스	+
디-프룩토스	+		

실시에 3: 십육-메틸옥사졸로마이신의 분리 정제

G9244균주가 생산하는 활성물질은 실시에 1의 배양방법으로 배양한 균배양액으로부터 획득하였으며 그람 양성 세균인 바실러스 서브틸리스에 대한 항균활성을 지표로 하여 수행한 분리정제 방법은 다음과 같다. 즉 배양액을 원심분리하여 배양 상등액만을 취한 후, 이 상등액을 다이온 에이취피-20 (Diaion HP-20)에서 물, 메탄올, 70% 아세톤으로 각각 용출하였다. 메탄올 활성분획을 디클로로메탄 (CH₂Cl₂)과 60% 메탄올 (MeOH)로 용매분배하고 하층을 농축하여 오디에스 플래쉬 크로마토그래피 (ODS flash chromatography)에서 수용성 메탄올로 용출하여 활성을 보인 80% 메탄올 용출 분획을 얻었다. 이 분획은 농축한 다음 다시 세파덱스 엘에이취-20 (Sephadex LH-20)에서 n-헥산/디클로로메탄/메탄올[n-hex/ CH₂Cl₂/MeOH (4:2:1)로 겔 여과(gel filtration)하였다. 얻은 활성분획을 최종적으로 역상 고압 액체크로마토그래피 [Cosmosil MS(waters), 2.0x25 cm, 220 nm검출]에서 0.5 밀리몰 과염소산나트륨 (NaClO₄)을 포함하는

63% 메탄올을 용매로 사용하여 분취함으로서 신규 화합물인 십육-메칠옥사졸로마이신을 분리, 감압농축, 동결건조함으로써 연노란 색의 무정형 분말을 얻었다.

실시에 4: 십육-메칠옥사졸로마이신의 활성 조사

십육-메칠옥사졸로마이신의 항균 활성을 측정하기 위하여 그람 양성 및 음성 세균과 효모, 곰팡이, 녹조류 등의 검정균을 사용하였으며 정제된 활성 물질은 디메틸설폰옥사이드 (DMSO)에 농도별로 희석한 후 각각의 검정균용 배지와 혼합하여 한천배지 희석법으로 조사하였다. 그 결과 표 17과 같이 십육-메칠옥사졸로마이신은 그람 양성 세균과 녹조류에 대해 각각 5.0, 10 피피엠 (ppm)의 최소발육저해 농도를 보였으며 곰팡이와 효모류에는 조사된 농도 범위내에서 항균 활성을 보이지 않았다.

표 17. 십육-메칠옥사졸로마이신의 최소 발육저해 농도

바실러스 서브틸리스	5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
에스케리키아 콜라이	-
슈도모나스 아에루기노사	-
잔토모나스 캄페스트리스	-
켄디다 엘비칸스	-
사카로마이세스 세레비제	-
보트라이시스 시네리아	-
콜레토티리쿰 타바쿰	-
피리클라리아 오리제	-
리족토니아 솔라니	-
클로렐라 불가리스	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

실시에 5: 십육-메칠옥사졸로마이신의 물리 화학적 특성

실시에 3에서 얻어진 십육-메칠옥사졸로마이신의 이화학적 특성은 다음과 같다.

- 1) 물질의 성상: 연노랑색 무정형의 분말
- 2) 분자량: 669
- 3) 분자식: $C_{36}H_{51}N_3O_9$
- 4) 질량분석치: (M^+); 669 (m/z)
- 5) 자외선 흡수 스펙트럼 [$UV\lambda_{max}$ (MeOH)]: 228, 266, 275, 285 nm
- 6) 핵자기공명 (NMR)스펙트럼

디메틸설포옥사이드(DMSO- d_6)를 용매로 하고 테트라메실실란 (TMS)을 표준물질로하여 측정한 수소핵자기공명 (1H -NMR)스펙트럼, 탄소핵자기공명 (^{13}C - NMR) 스펙트럼은 각각 제 44도 및 제 45도와 같다.

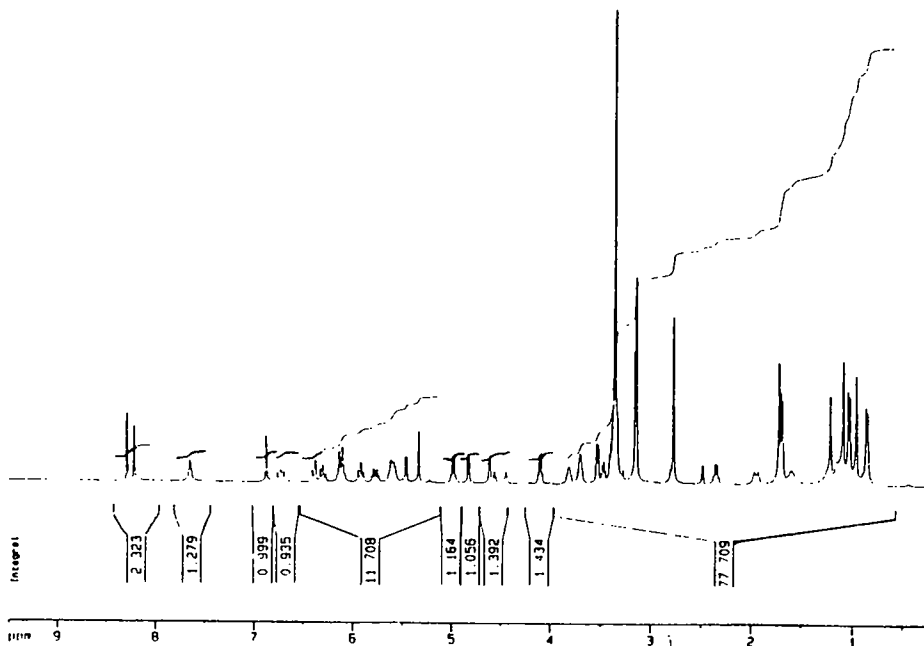


그림 44. 십육-메칠옥사졸로마이신의 수소핵자기공명 (1H -NMR) 스펙트럼

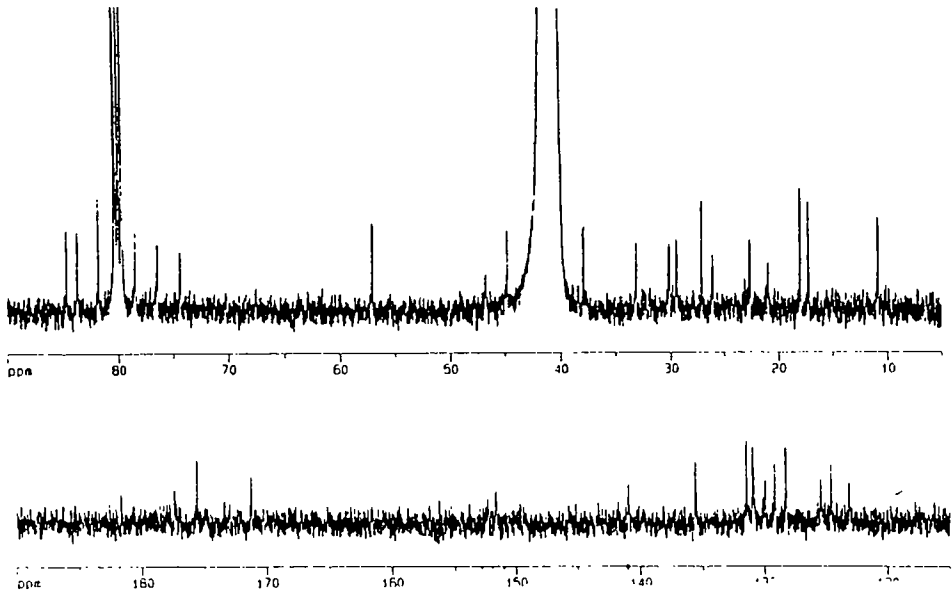


그림 45. 십육-메틸옥사졸로마이신의 탄소핵자기공명 (^{13}C -NMR) 스펙트럼

7) 화학구조

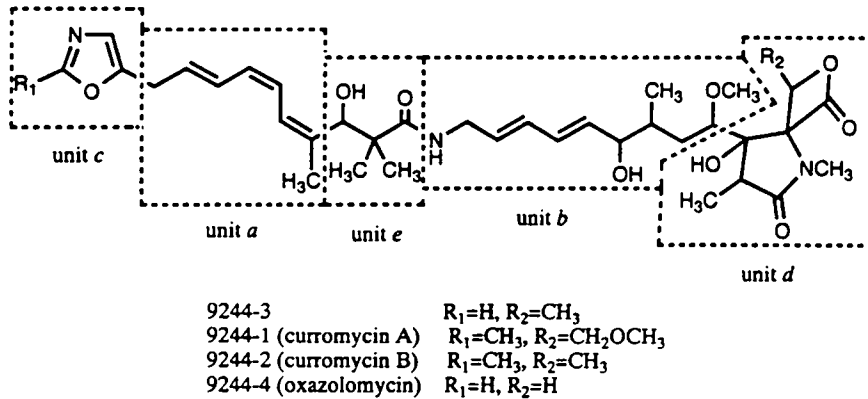


그림 46. 십육-메틸옥사졸로마이신의 화학구조(1)

3. 특허청구범위

(1) 상기의 구조식 (1)으로 표시되는 트리엔계 항균활성 항생물질 십육-메틸옥

- 사졸로마이신, 그의 유도체 및 화학적, 약학적으로 허용 가능한 이들의 염
- (2) 방선균 분리균주 스트렙토마이시스 에스피 (*Streptomyces* sp.)으로부터
상기 구조식 (1)로 표시되는 십육-메칠옥사졸로마이신을 분리함을 포함하는 십
육-메칠옥사졸로마이신의 제조 방법
- (3) 십육-메칠옥사졸로마이신 또는 그의 유도체를 유효성분으로 포함하는 항
균, 항녹조류 활성물질

2. Tetracin A의 특허 출원 (1998년 12월 특허출원)

【요 약 서】

【요약】

본 발명은 방선균류의 일종인 스트렙토마이세스(*Streptomyces* sp.) 속 균주가 생산하는 신규 항진균성 항생물질의 분리 및 제조 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 곰팡이에 대한 생육저해작용을 갖는 폴리엔계의 신규 화합물 테트리신-에이(tetracin A) 및 토양에서 분리한 방선균류의 일종인 스트렙토마이세스(*Streptomyces* sp.)속의 균주로부터 신규 화합물인 테트리신-에이(tetracin A)의 제조방법에 관한 것이다.

농약용 항생물질의 꾸준한 개발에도 불구하고 작물에 대한 약해 유발, 환경오염, 저항성 병원미생물의 출현 등 그 부작용이 심각하여 독성이 없고 환경오염이 없는 새로운 물질의 개발이 절실히 요구되는 상황이다. 지금까지 10,000여종 이상의 생리활성물질이 미생물 배양액으로부터 분리되고 있으며 그중 일부는 실용화에 이른 것도 있다. 또한 미생물은 대사물질의 다양성 때문에 그들의 대사산물중에는 유용한 생리활성물질이 많아 개발 가능성이 매우 높다 하겠다. 이러한 취지에서 본 발명자들은 식물병원균에 대하여 항균활성을 나타내는 물질을 분리하여 농약용 항생물질로 개발코자 탐색하던 중 대전지역에서 채취한 토양에서 분리한 방선균이 생산하는 신규 항생물질, 테트리신-에이(tetracin A)을 분리, 정제하여 구조를 밝히고, 이 화합물이 곰팡이에 활성이 있음을 확인하였으므로 본 특허를 출원코자 한다.

【명 세 서】

【발명의 명칭】

신규 항균 항생물질인 테트리신-에이(tetracin A) 및 그 제조방법

(Isolation of tetracin-A, a new antifungal and antibiotic produced by a *Streptomyces* sp.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래 기술】

본 발명은 방선균류의 일종인 스트렙토마이세스 (*Streptomyces* sp.) 속 균주가 생산하는 신규 항진균성 항생물질의 분리 및 제조 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 토양에서 분리한 방선균류의 일종인 스트렙토마이세스 (*Streptomyces* sp.) 속의 균주로부터 곰팡이에 대해 생육저해작용을 갖는 폴리엔계의 신규 화합물 테트리신-에이 (tetracin-A)의 분리 및 제조방법에 관한 것이다.

농약용 항생물질의 꾸준한 개발에도 불구하고 작물에 대한 약해 유발, 환경오염, 저항성 병원미생물의 출현 등 그 부작용이 심각하여 독성이 없고 환경오염이 없는 새로운 물질의 개발이 절실히 요구되는 상황이다. 지금까지 10,000여종 이상의 생리활성물질이 미생물 배양액으로부터 분리되고 있으며 그중 일부는 실용화에 이른 것도 있다. 또한 미생물은 대사물질의 다양성 때문에 그들의 대사산물중에는 유용한 생리활성물질이 많아 개발 가능성이 매우 높다 하겠다.

이러한 취지에서 본 발명자들은 식물병원균에 대하여 항균활성을 나타내는 물질을 분리하여 농약용 항생물질을 개발코자 탐색하던 중 대전지역에서 채취한 토양에서 분리한 방선균이 생산하는 신규 항생물질, 테트리신-에이 (tetracin-A)를 분리, 정제하여 구조를 밝히고, 이 화합물이 진균류인 곰팡이에 활성이 있음을 확인하였으므로 본 특허를 출원코자 한다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

본 발명은 항진균 활성을 보이는 폴리엔계의 신규 화합물을 제공하는 것이다. 한편, 본 발명의 또 다른 목적은 방선균류인 스트렙토마이세스 속 (*Streptomyces* sp.) KGTRI9244에 대한 생물활성은 1차로 항균활성을 조사하였고 정제된 활성물질을 사용하여 2차로 항진균 활성을 조사하였다.

【발명의 구성 및 작용】

KGTRI9244 균주로부터 테트리신-에이 (tetracin-A) 화합물을 얻기 위한 분리, 정제는 곰팡이 리족토니아 솔라니 (*Rhizoctonia solani*)에 대한 생육억제를 지표로 하여 실시하였으며 이하 본 발명을 실시예에 따라 구체적으로 기술하면 다음과 같다.

실시예 1: 방선균 KGTRI9244균주의 분리 및 배양

본 발명에 사용한 균주 KGTRI9244는 저영양성 미생물 분리용 배지를 사용하여 대전지역에서 채취한 토양으로부터 분리하였다. 즉 미리 건조시켜 놓은 토양 시료 약 1 g을 멸균 증류수 10 ml에 현탁시켜 10^{-1} 부터 10^{-5} 배 까지 희석한 다음, 베네트 (Bennet) 한천 (가용성 스타치 10 g, 카세인 1 g, 인산이수소칼륨 0.5 g, 황산마그네슘 1.02 g, 한천 15 g, pH 7.2) 배지에 각각 1ml씩 포어플레이트 방법으로 접종하였다. 플레이트는 27°C에서 7-8일간 배양하여 방선균 콜로니 중에서 외관상 형태와 색깔이 상이하다고 판단되는 콜로니만을 분리하여 동일배지에 접종함으로써 단포자 분리를 행하였다. 순수 분리된 균들은 모디파이드 베네트 한천 배지 [엔-제트 아민 에이 (N-Z amine A) 1 g, 효모엑기스 1 g, 육즙 1 g, 글루코스 5 g, 가용성 전분 5 g, 한천 15 g, pH 7.3]에 사면접종하여 27°C에서 10-14일간 배양함으로써 균사와 포자를 풍부하게 형성시킨 후 면전을 고무전으로 교체한 다음 실온에 보관하였다. 또한 1차 스크리닝에서 항생물질을

생산하는 것으로 밝혀진 균주에 대해서는 20% 글리세롤에 포자를 현탁시킨 후, -20°C에 보관하였다.

실시예 2: KGTRI9244균주의 동정 (16-메칠옥사졸로마이신 생산균주와 동일)

*16-메칠옥사졸로마이신 (16-methyloxazolomycin)은 1998년 6월 30일 특허출원 (제26497호)

실시예 3: 테트리신-에이의 분리 및 정제

Streptomyces KGTRI9244균주가 생산하는 활성물질은 실시예 1의 배양방법으로 배양한 균배양액으로부터 획득하였으며 곰팡이 리족토니아 솔라니에 대한 항균활성을 지표로 수행한 분리정제 방법은 다음과 같다. 즉, 배양액을 원심분리하여 상등액을 취한 후, 이 상등액을 디아이온 에이취피-20 (Diaion HP-20)에 통과시킨 다음 수지 4~5 배량의 물, 메탄올, 70% 아세톤으로 각각 용출하였다. 메탄올 활성분획은 디클로로메탄 (CH_2Cl_2)과 60% 메탄올로 용매분배하고 하층을 농축하여 오디에스 플래쉬 크로마토그래피 (ODS flash chromatography)에서 수용성 메탄올로 용출하여 활성을 보인 70% 메탄올 용출분획을 얻었다. 이 분획은 농축한 다음 다시 세파덱스 엘에이취-20 (Sephadex LH-20)에서 n-헥산/디클로로메탄/메탄올 [n-hexane/ CH_2Cl_2 / MeOH (4:2:1)]로 겔 여과 (gel filtration) 하였다. 활성분획은 최종적으로 역상 고압 액체크로마토그래피 [Cosmosil MS (waters), 2.0 x 25 cm, UV 검출기 220 nm]에서 63% 메탄올을 용매로 사용하여 분취, 감압농축, 동결건조함으로써 신규 화합물인 테트리신-에이의 연노란 색 무정형 분말을 얻었다.

실시예 4: 테트리신-에이의 활성 조사

테트리신-에이의 항균 활성을 측정하기 위하여 그람양성 및 음성 세균과 효모, 곰팡이, 녹조류 등의 검정균을 사용하였으며 정제된 활성 물질은 디메틸설포옥사이드 (DMSO)에 농도별로 희석한 후 각각의 검정균용 배지와 혼합하는 한천배지 희석법 (agar dilution method)으로 조사하였다. 그 결과 표 21와 같이 테트리신-에이는 곰팡이 콜레토티리쿰 타바쿰, 피리쿨라리아 오리제, 리족토니아 솔라니에 대해 각각 2.5, 3.0, 2.0 피피엠(ppm)의 최소발육저지농도를 보였으며 그람양성 세균과 효모류, 녹조류에는 조사한 농도 범위내 (1 mg/ml)에서 항균활성을 보이지 않았다.

표 21. 십육-메칠옥사졸로마이신의 최소 발육저지 농도

바실러스 서브틸리스	-
에스케리키아 콜라이	-
슈도모나스 아에루기노사	-
잔토모나스 시트리	-
켄디다 엘비칸스	-
사카로마이세스 세레비제	-
보트라이시스 시네리아	-
콜레토티리쿰 타바쿰	2.5 µg/ml
피리쿨라리아 오리제	3.0 µg/ml
리족토니아 솔라니	2.0 µg/ml
클로렐라 불가리스	-

실시예 5: 테트리신-에이의 물리 화학적 특성

실시예 3에서 얻어진 테트리신-에이의 이화학적 특성은 다음과 같다.

- 1) 물질의 성상: 연노랑색 무정형의 분말
- 2) 분자량: 679
- 3) 분자식: $C_{34}H_{49}N_1O_{13}$
- 4) 질량분석치: (M^+) 669 (m/z)
- 5) 자외선 흡수 스펙트럼 ($UV\lambda_{max}^{MeOH}$): 280, 292, 304, 318 nm
- 6) 핵자기공명(NMR)스펙트럼

디메틸설포옥사이드 (DMSO- d_5)를 용매로 하고 테트라메실실란을 표준 물질로 하여 측정한 수소핵자기공명 (1H -NMR) 스펙트럼, 탄소핵자기공명 (^{13}C -NMR) 스펙트라는 각각 그림 47 및 48와 같다.

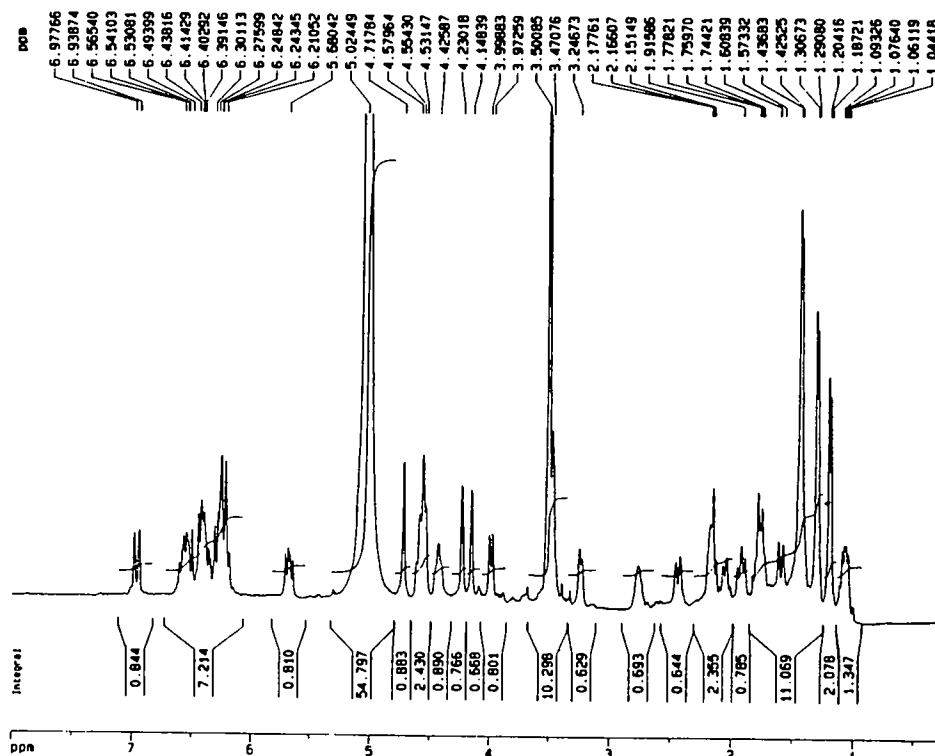


그림 47. 테트리신-에이의 수소-핵자기공명 (1H -NMR) 스펙트럼

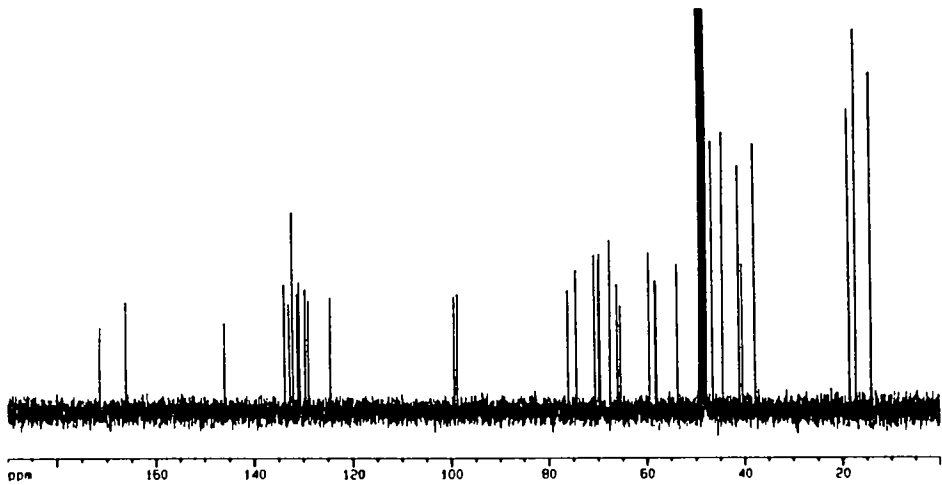


그림 48. 테트리신-에이의 탄소 핵자기공명 (^{13}C -NMR) 스펙트럼

【발명의 효과】

스트렙토마이세스 KGTRI 9244 균주가 생산하는 신규항생물질인 테트리신-A는 금후 농약 혹은 의약품 항생물질이나 항암제로의 활용성이 기대된다.

【특허청구의 범위】

【청구항1】

일반식 (I)으로 표시되는 폴리엔계 항균활성 항생물질인 테트리신-A

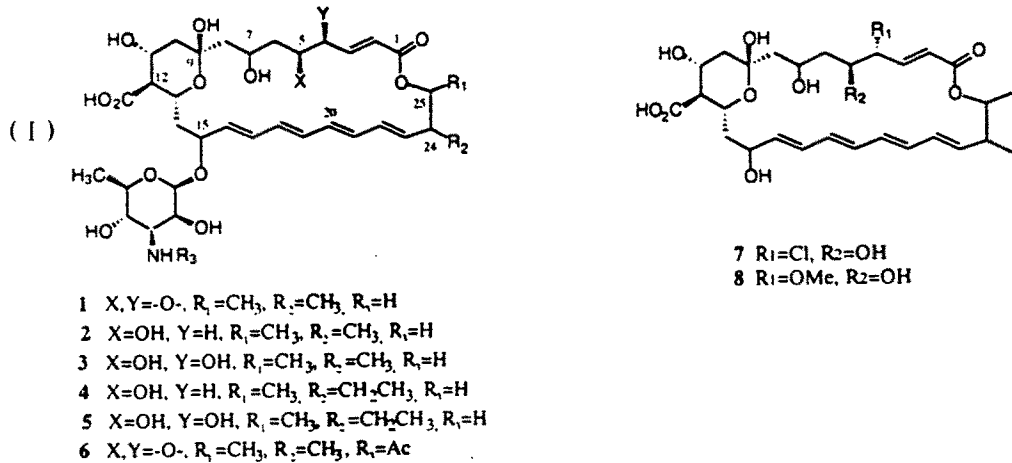


그림 49. 테트리신-에이의 화학구조식

【청구항2】

스트렙토마이세스 (*Streptomyces* sp.) 속 균주 배양액을 다이아이온 (Diaion) HP-20을 이용하여 흡착, 용출시키고 이를 용매 분배하여 세파덱스 (Sephadex) LH-20 크로마토그래피로 분취하고 다시 에취피엘씨 (HPLC)로 분취하는 처리로 테트리신-A를 제조하는 방법.

다. *Kitasatosporia kimorexae*가 생산하는 항생물질의 특허등록

1998년 3월 특허등록 됨 (등록번호 : 제 141322호)

*학회발표

1. Geonseek Ryu, Seungjin Hwang, Woon-Hyung-Yeo and Si-Kwan Kim: Tetricin A, a new glycosylated polyene macrolide antibiotic produced by a *Streptomyces* sp. GK9244, *Journal of Natural Products*, 1998. 12 (accepted).
2. Geonseek Ryu and Si-Kwan Kim: Absolute stereochemistry determination of 16-methyloxazolomycin produced by a *Streptomyces* sp., *Journal of Antibiotics*, 1998. 10 (accepted).
3. Geonseek Ryu, Seungjin Hwang and Si-Kwan Kim: 16-Methyloxazolomycin, a new antimicrobial and cytotoxic substance produced by a *Streptomyces* sp., *Journal of Antibiotics*, **50** (12), 1064-1066 (1997).
4. Kim, Si-Kwan, Woon-Hyung Yeo, and Sang-Seock Kim: Identification and fermentation of a *Streptomyces* producing aurodox group antibiotics. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6** (4), 260-264 (1996).
5. Kim, Si-Kwan, Woon-Hyung Yeo, and Sang-Seock Kim: Isolation, physico-chemical properties and biological activity of aurodox group antibiotics. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6** (4), 265-269 (1996).