

Streptomyces sp.가 生産하는 抗真菌性 抗生物質에 관한 研究

(第 2 報) 抗真菌性 抗生物質 *trans*-Cinnamamide 의 生成

裴 武 · 高永熹 · 李和錫* 趙振鎬*

韓國科學技術院 · 應用微生物研究室

*韓國科學技術院 · 應用化學研究部

(1982년 1 월 20일 접수)

Studies on the Antifungal Antibiotics Produced by a *Streptomyces* sp.

(Part 2) The Occurrence of *trans*-Cinnamamide
in *Streptomyces* No. 297

Moo Bae, Yung Hee Kho, Wha Suk Lee and Jin Ho Cho

Korea Advanced Institute of Science and Technology

P.O. Box 131, Dongdaemun, Seoul, Korea

(Received January 20, 1982)

Abstract

t-Cinnamamide has been isolated from the culture filtrate of the isolates, *Streptomyces*, sp. No. 297. The identity of the compound was established by UV and IR spectra, NMR, mass spectra and by chemical reactions. Through antimicrobial activity test using a two-fold serial agar dilution method, *t*-cinnamamide showed strong growth inhibitory activity against *Pellicularia sasakii*, *Pyricularia oryzae* and some pathogenic fungi, but not inhibitory over prokaryotes tested.

서 론

前報⁽¹⁾에서 *Streptomyces* sp. No. 297 이 生成하는 抗真菌性 抗生物質은 2 가지로서 하나는 연한 황색의 분말이고 다른 하나는 백색 침상결정이었다. 본 연구에서는 백색침상결정으로 얻어진 抗真菌性 抗生物質의 物理化學的 特性을 규명하고 구조를 결정하여 표준물질과 비교하였고 본 물질의 항균 spectrum 을 조사하였다.

실험재료 및 방법

사용균주

전보⁽¹⁾에서 분리선정한 *Streptomyces* sp No. 297 을 항진균성 항생물질 생성균주로서 사용하였으며 항균성 시험을 위한 각종 시험균은 한국과학기술원 응용미생물연구실에 보존된 것을 사용하였다.

배양방법

전보⁽¹⁾에서 사용한 발효배지 100ml을 500ml들이의 진탕 플라스크에 넣고 균을 접종한 후 28°C, 200rpm으로 5일간 진탕배양하였다.

항진균성 항생물질의 추출정제

전보⁽¹⁾에서와 같은 방법으로 정제하였으며 재결정한 KM-B를 시료로 하였다.

항진균성 항생물질의 물리화학적 성상

각종 용매에 따른 용해성과 화학반응은 상법에 따라 실험하였다. 자외선 흡수 스펙트럼은 Beckman Model 25 spectrophotometer를 사용하여 조사하였고 융점은 Yanaco micro-melt

ing point 측정기구로, 선광도는 Perkin-Elmer Model 141을 이용하여 측정하였다. 수소핵자기 공명 스펙트럼은 tetramethylsilane을 표준물질로 하여 Varian EM-360 A(60 M Hz)에서 얻었다. 적외선 흡수 스펙트럼은 Hewlett Packard 5895 A Gc/Ms를 이용하였다⁽²⁻⁴⁾.

실험결과 및 고찰

抗真菌性 抗生物質 KM-B의 物理化學的 特性.

抗生物質 KM-B를 재결정시킨 것을 광학현미경으로 본 것은 Fig. 1과 같이 침상결정이었다. 융점(M.P.)은 144~146°C였고 EtOH에서의 선광성은 다음과 같이 없었다.



Fig. 1. Photomicrograph of Crystalline KM-B

$$\begin{aligned} [\alpha]_D^{25} &= \frac{100 \cdot a}{l \cdot c} \quad a = 0 \\ [\alpha]_D^{25} &= 0 \quad (Cl, EtOH) \end{aligned}$$

이 물질은 H₂SO₄, H₃PO₄에 용해하나 색소를 형성하지 않으며 NaOH와 HCl 용액에 불용성으로 중성물질이다. 또한 MeOH, EtOH, PrOH, BuOH, Me₂CO, EtOAC, DMFO, DMSO, dioxane, pyridine에 잘 녹고 CHCl₃에 약간 용

해하나 Et₂O, benzene, hexane, pet. ether 및 물에는 녹지 않는다. 이 물질의 중요한 화학반응은 Table 1과 같다. 즉, 이 물질은 ketone기가 존재하고 이중결합이 있는 유기물임을 알 수 있다. 이 물질을 MeOH에 녹여 농도를 6.5 μg/ml 되게 하여 U.V. spectrum을 본 것은 Fig 2와 같은데 274.5 nm에서 최대흡광을 보이고 있으며 215 nm에서 peak를 나타내어 aromatic

Table 1. Chemical Reaction of KM-B

Reaction	Result	Properties
Fehling test	negative	double bond
Collens reaction	negative	
FeCl ₃ reaction	negative	
KMnO ₄ reaction	positive	
HIO ₃ reaction	negative	
C.H. detection	positive	C.H.
Halogen detection	negative	ketone
Ketone detection	positive	
Alcohol detection	negative	

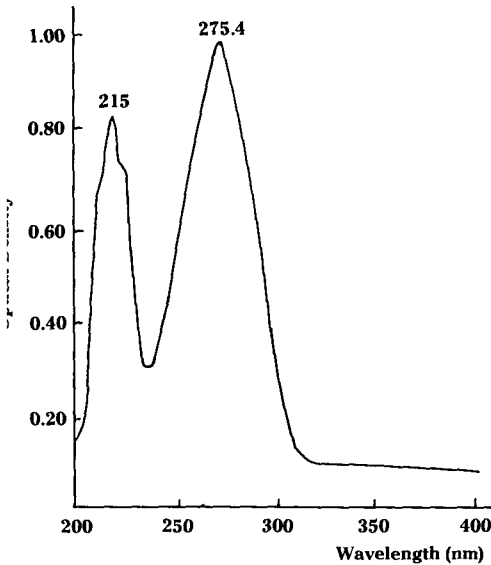


Fig. 2. Ultra Violet Spectrum of KM-B in MeOH (6.5 µg/ml)

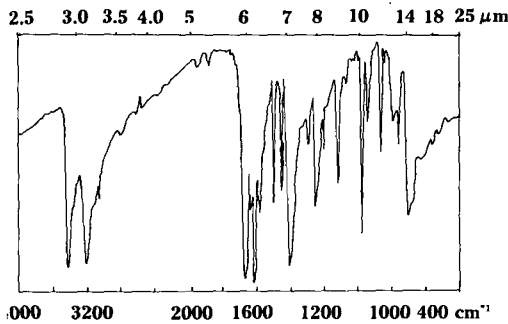


Fig. 3. IR Spectrum of KM-B (KBr wafer)

compound의 존재를 알 수 있다. 이 물질의 IR Spectrum은 Fig 3과 같이 3330 cm⁻¹에서의 νNH(asymmetric), 3200 cm⁻¹ νNH(symmet-

ric), 1600 cm⁻¹ νc = 0, 1600cm⁻¹ δNH를 나타내는 amide임을 알 수 있다.

원소분석결과 c : 74.9%, H : 6.3%, N : 9.9%였고 Fig. 5와 같은 mass spectrum에 의하면 본 물질의 분자량은 147.1로서 원소조성과 함께 계산하면 C₉H₉NO가 된다. 즉,

*** Elemental analysis**

Found	Calculated for C ₉ H ₉ NO
C: 74.9(%)	73.5(%)
H: 6.3	6.1
N: 9.9	9.5

Mass spectrum에 의한 해석은 아래와 같이 이루어질 수 있는데 이러한 결과는 본 물질이 aromatic ring을 가진 amide임을 알 수 있다.

*** Interpretation of mass spectrum**

M ⁺	: 147.1
M-1	: 146
M-NH ₂	: 131
$\begin{matrix} \text{O} \\ \\ \text{M}-\text{C}-\text{NH}_2 \end{matrix}$: 103
$\text{M}-\text{CH}=\text{CH}-\begin{matrix} \text{O} \\ \\ \text{C}-\text{NH}_2 \end{matrix}$: 77

다음 이 물질을 CF₃COOH에 녹여 NMR spectrum을 본 것은 Fig. 4와 같다. 즉, δ 6.69 (J = 16Hz)와 δ 8.11에서 doublet로서 *trans* form임을 알 수 있고 δ 7.30~7.85는 multiplet로서 δ 6.69(d) peak를 one proton으로 보면 aromatic portion의 proton은 5개로 phenol ring임을 알 수 있다. 이상과 같은 결과를 종합하면 향생물질 KM-B는 *trans*-cinnamic acid amide(*trans*-cinnamamide)임을 결론지을 수 있으며 mass spectrum에서 얻은 peak를 Fig 5와 같이 설명할 수 있다.

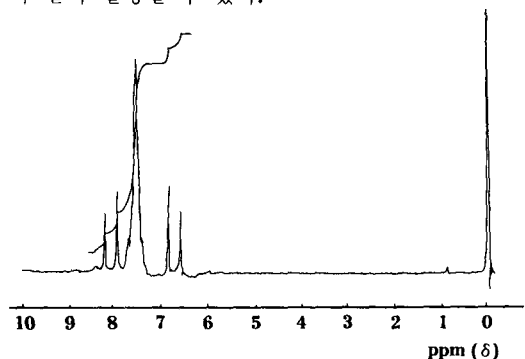


Fig. 4. NMR Spectrum of KM-B

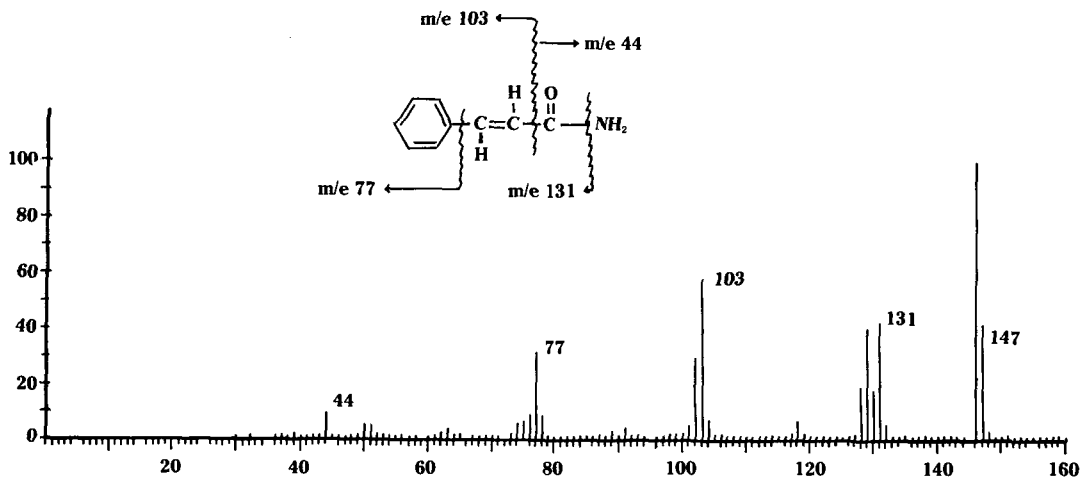


Fig. 5. Mass Spectrum of KM-B

다음 이 물질 100 mg을 15% NaOH 5 ml속 에 넣고 1 시간 reflux 시키면서 가열한 후 반응 액을 얼음속에서 급냉시키고 진한 염산으로 산 성화시키면 *trans*-cinnamic acid가 되어 침전 하게 되는데 이것을 여과, 건조하여 $CDCl_3$ 에 녹이고 NMR spectrum을 본 결과 δ 12.20 (s, 1H), 7.30 (d, 1H), 7.17~7.63 (m, 5H), 6.41 (s, 1H)로 나타났으며 *trans*-cinnamic acid와 일치하기 때문에 본 물질 KM-B는 *trans*-cinnamamide임을 확인하였다. 본 연구에서 얻어진 항진균성 항생물질 KM-B와 표준 *trans*-cinnamamide와 비교하면⁽⁵⁾ Table 2와 같이 정확하게 일치하고 있어서 *Streptomyces sp.* No. 297이 생산하는 항진균성 항생물질 중 백색침상결정 KM-B는 *trans*-cinnamamide임을 확인하였다.

trans-Cinnamamide의 각종 미생물에 대한 抗菌 spectrum을 조사하기 위하여 1/2씩 농도 구배가된 agar dilution method를 이용하였다. 세균에 대하여는 nutrient agar, 곰팡이는 potato dextrose agar, 효모는 yeast-malt agar를 사용하였고 *trans*-cinnamamide를 DMFO에 녹여서 배지에 첨가하여 DMFO의 농도가 1%로 되도록 하였으며 그 결과는 Table 3과 같다. 즉, *trans*-cinnamamide는 버 紋枯病菌 *P. saskii* 및 도열병균인 *P. oryzae*에 대한 강한 抗菌力이 있음을 나타내나 세균 및 효모에 대한 抗菌力은 없다.

Schutz 등⁽⁶⁾은 合成法으로 製造한 *trans*-cin-

Table 2. Physico-chemical Properties of KM-B and Authentic *trans*-Cinnamamide

	KM-B	<i>trans</i> -Cinnamamide
Nature	white crystal, needles neutral, insoluble in H_2O	white crystal needle neutral, insoluble in H_2O
M.P.	144-145°C	145-147°C
U.V. (in MeOH)	λ_{max} 274.5nm	275nm
Molecular Formula	C_9H_9NO	C_9H_9NO
[α] _D ²⁰	0 (C, 1 MeOH)	0 (C, 1 MeOH)
IR	3360: γ NH (asymmetric) 3160: γ NH (asymmetric) 1660: γ C=O 1600: δ NH	Same as KM-B
M.W.	147.1 (mass)	147.15
NMR in CF_3COOH	7.30-7.85 (d) 6.69 (d)	Same as KM-B
	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{C}(\text{H})=\text{C}(\text{H})-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2$ 8.11 (d) J = 16Hz	

namamide 및 그들의 유도체가 *Microsporium gypseum*, *M. canis*, *Trichophyton rubrum* 및 *T. metachrophyte*에 대하여 抗菌性이 있음을 밝혔으나 *P. saskii*와 *P. oryzae*에 대하여는 실험

Table 3. Minimal Inhibitory Concentration of *t*-Cinnamide against Various Microorganisms

Organism	MIC (ug/ml)
<i>Pellicularia sasakii</i>	0.5
<i>Pyricularia oryzae</i>	12.5
<i>Rhizoctonia solani</i>	25
<i>Chochliolus myabeanus</i>	100
<i>Rynchosporium oryzae</i>	100
<i>Fusarium moniliforme</i>	100
<i>Asp. oryzae</i>	100
<i>Trichoderma viride</i>	100
<i>Trichophyton metacrophyte</i>	50
<i>Epidermophyllum placcosin</i>	100
<i>Microsporium gypseum</i>	50
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 478	300
<i>Candia albicans</i>	300
<i>Candida utilis</i>	300
<i>Mycobacterium</i> sp.	300
<i>Eschericia coli</i>	300
<i>Sarcina lutea</i>	300
<i>Bacillus subtilis</i>	300

하지 않았으며 아직도 여기에 대한 보고는 없는데 본 실험의 결과에 의하면 *trans*-cinnamide가 *P. sasakii*, *P. oryzae* 및 그외 몇가지病原性眞菌類에 대한 抗菌力이 강하게 있었다. 본 抗菌性物質이 紋枯病菌등에 강한 抗菌力을 나타냄에도 불구하고 細菌類에는 抗菌力을 나타내지 않음은 特徵的性質로서 본연구에서 菌培養液으

로부터 分離, 精製하여 MASS-spectrum, NMR 등 연구장비를 사용함으로써 화학구조를 밝힌 것은 새로운 結果인 것이다.

요 약

抗眞菌性 抗生物質 生産菌으로 分離된 *Streptomyces* 屬 No. 297 菌의 培養液으로부터 抗菌物質을 分離·精製하여 針狀結晶을 얻었다. 이 物質은 UV. IR. spectra, NMR, Mass-spectra 및 여러化學反應試驗을 통하여 *t*-cinnamide로 同定되었다.

抗菌 spectra를 조사해본 결과 *Pellicularia sasakii*, *Pyricularia oryzae* 기타 몇 病原性眞菌類에 강한 抗菌性을 나타내며 細菌類에는 抗菌力이 극히 약한것이 특징이다.

참고문헌

- 1) Moo, B. and Y.H. Kho : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **10**, 33, (1982)
- 2) Charlson, A.J., P.A.J. Gorin and A.S. Perlin : *Methods in Carbohydrate Chem.* **1** 419 Academic Press, New York (1963)
- 3) Lindberg, B., Lindquist, J. Lonngren and D.A. Powell : *Carbohyd. Res.*, **78**, 111 (1980)
- 4) Kenne, L., B. Lindberg, K. Petersson, E. Katzenellenbogen and E. Romanowska : *Carbohyd. Res.*, **78**, 119 (1980)
- 5) Bhacca, N.S. : NMR Catalog (1963)
- 6) Schultz, H.W. and Gail A. Wiese : *J. Am. Pharm. Assoc.*, **48**, 750 (1959)