

## 신규 항진균물질 AF-011A의 생물학적 활성 및 구조분석

서정우 · 임용호 · 김성호 · 현봉철 · 김창완 · 연창석  
이덕근 · 김광표 · 정재경 · 이철훈\*  
제일제당(주) 종합연구소

### Biological Properties and Structural Analysis of Novel Antifungal Antibiotics AF-011A

Suh, Jung-Woo, Yoong-Ho Lim, Sung-Ho Kim, Bong-Chul Hyun,  
Chang-One Kim, Chang-Suek Yon, Duk-Keun Lee, Kwang-Pyo Kim,  
Jae-Kyong Jung and Chul-Hoon Lee\*

Microbiology Laboratory, R & D Center, Cheil Foods & Chemicals, Inc., 522-1,  
Dokpyong-Ri, Majang-Myon, Ichon-Kun, Kyunggi-Do 467-810, Korea

**Abstract** — AF-011A is a novel antifungal cyclic glyco-peptide isolated from *Pseudomonas cepacia* AF6008. AF-011A is a mixture of AF-011A<sub>1</sub> and AF-011A<sub>2</sub>. Each compound contains glycine(1), serine(2), asparagine(1), 2,4-diaminobutyric acid(1),  $\beta$ -hydroxytyrosine(1), xylose(1) and a methylene chain amino acid(1). Additionally, A<sub>1</sub> contains one  $\beta$ -hydroxyasparagine that is replaced with an asparagine in A<sub>2</sub>. AF-011A showed high *in vitro* antifungal activity against various animal and plant pathogenic fungi and caused no irritation on the skin of rabbits.

전보(1)에서는 강력한 항진균력(*in vitro*)을 갖는 AF-011A를 *Pseudomonas cepacia* AF6008로부터 분리, 정제하여, AF-011A의 물리 화학적 특성을 규명하였다. 본 논문에서는 AF-011A의 생물학적 활성, 즉 광범위성, 피부자극 및 감염동물시험 등에 대한 연구 결과와 AF-011A<sub>1</sub>과 AF-011A<sub>2</sub>의 구조분석에 대하여 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

이하의 모든 생물학적 활성연구에 사용된 시료는 AF-011A<sub>1</sub>과 AF-011A<sub>2</sub>의 혼합물을 사용하였다.

#### 최소저지농도(MIC)의 측정

희석평판법으로 potato dextrose agar 배지를 사용하였다. 사용한 fungi는 총 8종으로 Table 1에 표

시하였으며, 배양은 30°C 에서 48~72시간 배양 후 MIC값을 측정하였다.

#### 능약활성시험(*in vivo*)

AF-011A를 농도별로 식물체에 분사 도달한 다음 24시간이 경과된 후, 벼도열병균과 토마토역병균은 포자용액을 분사하여, 벼잎집무늬마름병균과 오이회색곰팡이균은 균사 disc를 발라 감염시켰으며 밀녹병균과 보리흰가루병균은 분무법에 의해 감염시켰다.

#### 피부자극성시험(*in vivo*)

4개월된 Newzeland white rabbit(2~3 kg) 2마리를 이용하여 전처리한 AF-011A를 1 g/ml의 농도로 용해하여 2.5×2.5 cm 크기의 4개소에 찰과와 비찰과로 24시간 적용하였다. 관찰은 1, 2, 3, 7일 후 각각 반응을 조사하였다.

#### 감염동물 실험(*in vivo*)

19 g에서 20 g되는 수컷 ICR 마우스 5마리를 한

균으로 3개 균으로 나누어  $5 \times 10^7$  cfu/mouse의 *Cryptococcus neoformans* 균을 생리식염수에 현탁하여 정맥 주사에 의해 감염시켰다(2, 3). 감염 후 24시간이 지나서 AF-011A 및 Amphotericin-B를 1% DMSO가 포함된 생리식염수에 녹여서 1.0 mg/kg의 농도로 정맥주사하였다.

**Pyrolyzer gas chromatography 측정**

Pyrolyzer GC는 JHP-35 Pyrolyzer/Schimadzu GC 15A와 컬럼 CBP-5를 사용하였으며 열분해 온도 590 °C (3초), 컬럼주입온도 230°C, 검지기온도 300°C의 조건 하에서 수행하였다. 이 실험의 목적은 AF-011A의 HCl 가수분해 후의 아미노산 분석 결과 얻은 aspartic acid가 본래의 구성요소인지 또는 asparagine이 전환된 것인지를 확인하기 위함이다.

**NMR 연구**

AF-011A의 구조 분석을 위하여 Bruker ARX400 기종을 사용하였으며, 시료는 DMSO-d<sub>6</sub>에 용해하여 측정하였다. 구성성분 중의 하나인 방향족화합물의 규명을 위하여 homo-COSY와 hetero-COSY를 측정하였고, methylene 사슬구조의 규명과 구성성분들의

서열을 결정하기 위하여 two-dimensional-NOESY 측정을 실시하였다.

**결과 및 고찰**

**생물학적 활성**

정제한 AF-011A의 항진균 효과를 조사한 결과, Table 1에 나타난 바와 같이 대표적 Imidazole계 항진균제인 Ketoconazole에 비하여 그 효과가 현저하게 높았으며 Polyene계 항진균제인 Amphotericin-B보다 우수하였다. 또한 조사된 모든 동·식물성 진균류에 대하여 매우 광범위하고 우수한 항진균력을 나타냈다.

AF-011A의 곰팡이에 대한 사멸효과는 Table 2와 같다. 최소 저지농도인 0.1 µg/ml에서 2일간 처리했을 경우 생존률이 *Candida albicans*는 0.04%, *Microsporum gypseum*의 경우 0.05%로 거의 사멸하였으며 이로써 AF-011A는 살균제(fungicidal agent)임을 알 수 있었다.

그러나, MIC 측정시에 human serum을 최종농도 50%로 하여 *Candida albicans*와 *Torulopsis glabrata*에 대한 MIC 측정결과 항진균효과가 16배 이상 급격히 감소하였으며, 이는 AF-011A가 혈청단백질에

**Table 1. Antifungal spectrum of AF-011A, Ketoconazole and Amphotericin-B in vitro by agar dilution method (µg/ml)**

Microorganism	Ketoconazole	Amphotericin-B	AF-011A
1 <i>Alternaria mali</i> KCTC 1936	50.0	0.195	0.1
2 <i>Torulopsis glabrata</i> KCTC 1714	12.5	0.78	0.025
3 <i>Cryptococcus neoformans</i> KCTC 1197	3.13	0.39	0.025
4 <i>Aspergillus niger</i> KCTC 2119	12.5	12.5	0.1
5 <i>Microsporum gypseum</i> MCTC 1252	6.25	100.0	0.05
6 <i>Epidermophyton floccosum</i> KCTC 1246	6.25	50.0	0.05
7 <i>Trichophyton mentagrophytes</i> KCTC 6085	12.5	25.0	0.1
8 <i>Candida albicans</i> KCTC 1940	100.0	0.39	0.1

**Table 2. Effect of AF-011A on pathogenic fungi**

Fungi	Treated Conc. (µg/ml)	Treated AF-011A Inoculum treated	1 day-treated		2 day-treated	
			cfu	Survival(%)	cfu	Survival(%)
<i>Candida albicans</i> (KCTC 1940)	0.1		5310	53	370	4
	0.2	10 <sup>5</sup> cfu/ml	680	7	0	0
	0.4		0	0	0	0
<i>Microsporum gypseum</i> (KCTC 2119)	0.05		6170	62	520	5
	0.2	10 <sup>5</sup> cfu/ml	820	8	0	0
	0.4		0	0	0	0

**Table 3. Antifungal activity of AF-011A against plant pathogens**

Diseases	Control value(%)				
	500	250	50	10	2 ppm
RCB*	99	98	96	79	0
RSB	95	100	100	85	30
CGM	100	100	100	100	61
TLB	96	82	39	16	16
WLR	0	—	—	—	—
BPM	0	—	—	—	—

\*abbreviations:

RCB *Pyricularia oryzae* 벼도열병

RSB *Rhizoctonia solani* 벼잎집무늬마름병

CGM *Botrytis cinerea* 오이회색곰팡이병

TLB *Phytophthora infestans* 토마토역병

WLR *Puccinia recondita* 밀녹병

BPM *Erysiphe graminis* 보리흰가루병

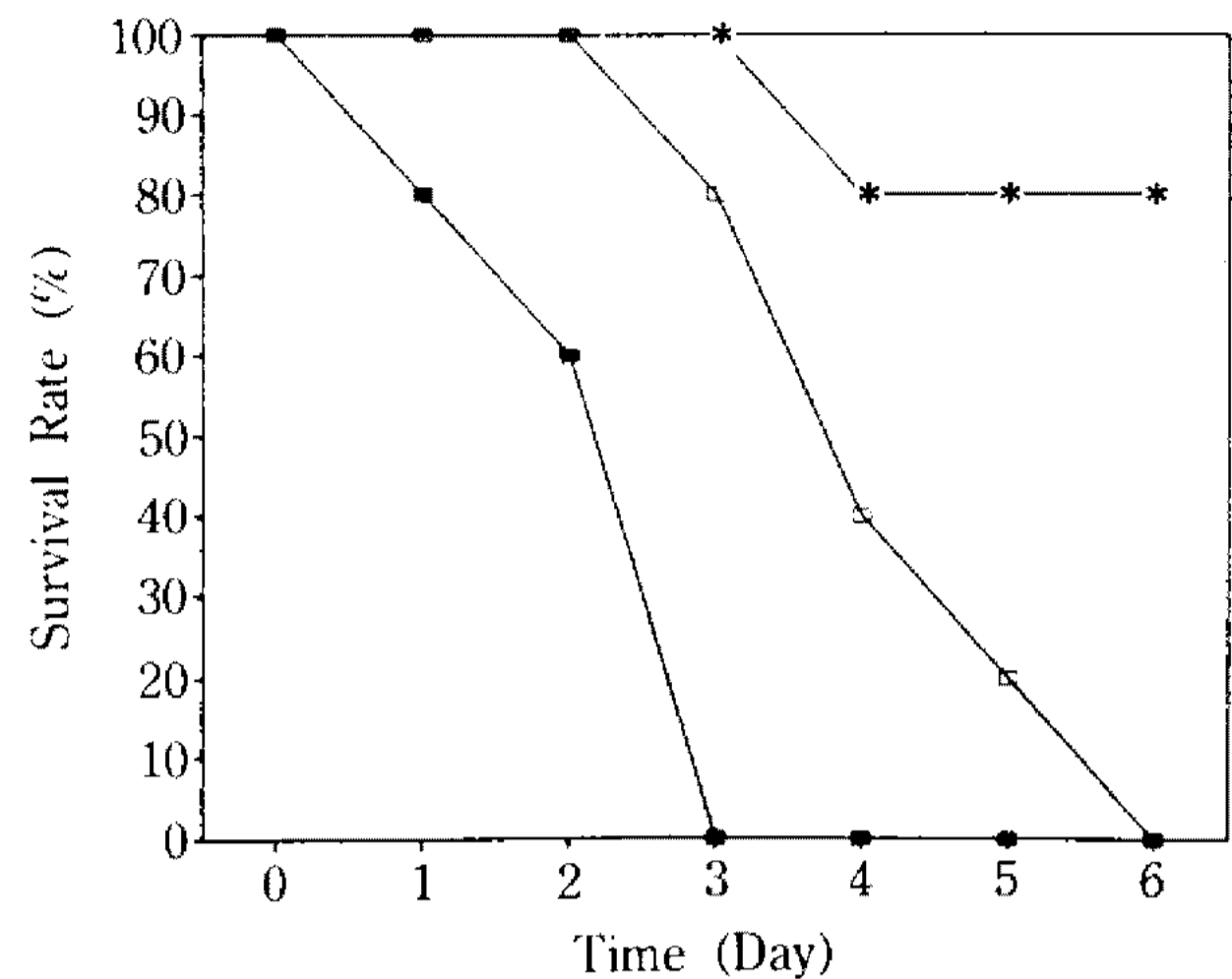
의하여 결합되었거나 분해되어 역가의 감소가 일어난 것으로 추측된다. 이같은 결과로 보아 정맥주사에 의한 AF-011A의 감염동물 치료효과(*in vivo*)의 경우에도 급격한 역가의 감소를 예견할 수 있다.

### 농약활성

AF-011A의 농약활성을 측정한 결과 벼도열병, 잎집무늬마름병 그리고 오이회색곰팡이병에는 10 ppm의 농도에서 80% 이상의 강력한 방제효과를 보였으나 토마토역병의 경우엔 250 ppm이 유효농도인 것으로 나타났다(Table 3). 특기할 점은 AF-011A의 강력한 활성이 담자균류인 밀녹병 및 보리흰가루병의 유발균에는 전혀 활성을 보이지 못하고 있다는 것이다. 그러나 상기의 결과로 보아 AF-011A에는 기존의 어떠한 농약에 비해서도 매우 광범위하며 강력한 역가를 나타낼 수 있었다.

### 감염동물시험

Fig. 1과 같이 1% DMSO 용액만을 주사한 대조군은 감염 3일 후 생존률이 0%를 보였으며, Amphotericin-B를 처리한 군의 경우는 6일째의 생존률이 80%를 보여 확실한 치료 효과를 보여주고 있는 것에 비해 AF-011A를 처리한 군은 6일 후에 생존률이 0%가 되었다. 대조군에 비해서는 유효한 약효가 인정되어 지나 대조약물인 Amphotericin-B에 대해서는 현격한 역가의 열세를 보였다. 주목할 점은 *in vitro*에서



**Fig. 1. Efficacies of AF-011A and Amphotericin-B against Cryptococcal Infection in ICR Mice(■—■; Control, □—□; AF-011A 1 mg/kg, \*—\*; Amphotericin-B 1 mg/kg).**

MIC값을 측정한 결과(Table 1)에서는 AF-011A의 항진균활성이 대조약물인 Amphotericin-B에 비해 월등히 우수했으나, *in vivo*에서의 활성측정 결과는 동일한 대조약물에 비하여 현격한 열세를 보인 점이다. 이는 앞서 언급한 혈청단백질과의 상관관계에 의하여 급격한 역가의 감소가 유발되었기 때문으로 생각된다.

피부자극성시험의 결과는 찰과 및 비찰과 모두 무자극성인 것으로 판명되었다.

### 생물학적 활성에 대한 고찰

이상과 같은 실험들에서 얻은 결과로 AF-011A는 *in vitro*에서는 매우 광범위하고 우수한 결과를 보이나 심재성 진균감염증 치료가능성을 동물실험을 통해 확인한 결과 투여경로상의 어려움이 대두되는 바 의약품으로의 개발은 매우 제한적일 것으로 보이나, 농약활성의 경우 효능 측면과 효과의 광범위성을 고려할 때 개발 가능성이 매우 높다고 생각되어진다.

### AF-011A의 구조

$\beta$ -Hydroxytyrosine의 규명: 전보(1)에서 언급하였듯이  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼에서 6.67 ppm과 7.13 ppm의 두 doublet은 AF-011A가 방향족화합물을 포함하고 있음을 보여주며, 아미노산들 중에 7 ppm 부근에서 두개의 doublet을 보이는 것은 tyrosine이 유일하므로 이 peak 들은 tyrosine에 의한 것임을 알 수 있다. 그러나 HCl 가수분해 후 HPLC에 의한 아미노산 분석시에 tyrosine의 peak을 발견할 수 없었기 때문에 AF-011A는 tyrosine의 유도체를 함유하고 있음을 알

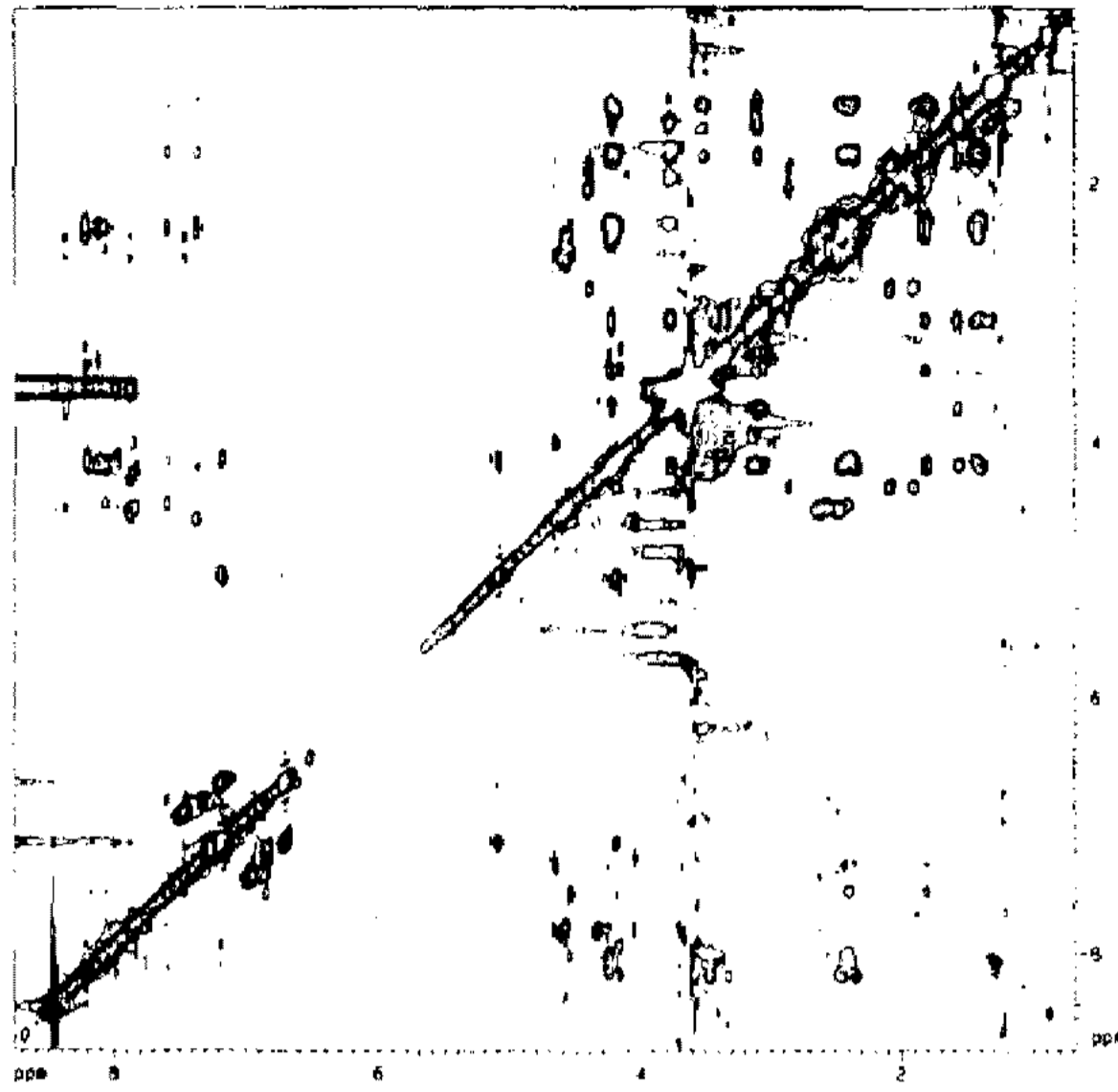


Fig. 2. Phase-sensitive NOESY of AF-011A(2 K $\times$ 256 at 293 K, NS=96).

수 있다.

Two-dimensional NOESY 결과(Fig. 2) 상기의 두 peak들이 서로 연관되어 있을 뿐 아니라 4.16 ppm과 5.07 ppm의 peak들과도 연관되어 있고, 2D-hetero-COSY 결과 위의 4개의 peak들이 4.16/60.3, 5.07/71.0, 6.67/114.8, 7.13/127.2( $^1\text{H-NMR}$  peak/ $^{13}\text{C-NMR}$  peak)로 되어 있음을 알 수 있었다. 기타 자세한  $^{13}\text{C-NMR}/^1\text{H-NMR}$  data 및 그의 assignments의 결과는 Table 4에 표시하였다. 정상적인 tyrosine의 경우는 3.0/37의 연관 peak이 나타나는데 반해 AF-011A의 경우엔 5.07/71.0의 연관 peak이 있는 것으로 보아  $\beta$  위치에 하이드록실기가 붙은 것으로 판단되었다. 이의 확인을 위하여 다음의 화학적 실험을 수행하였다(4). AF-011A를 DMSO에 녹인 후 UV spectrum을 측정한 결과 278 nm의  $\lambda_{\text{max}}$  값을 보였으나, 시료에 trifluoroacetic acid(TFA)를 가하고 10분간 방치 후엔  $\lambda_{\text{max}}$  값이 312

Table 4.  $^{13}\text{C}/^1\text{H-NMR}$  Assignments of AF-011A

$^{13}\text{C}(\text{ppm})$	$^1\text{H}(\text{ppm})$	Multiplicity	Assignment	$^{13}\text{C}(\text{ppm})$	$^1\text{H}(\text{ppm})$	Multiplicity	Assignment		
1	13.87	0.85	q	$\text{CH}_3(\text{mc})$	27	67.47	3.50	d	$\text{C}_\alpha(\text{mc})$
2	22.02	1.25	t	$\text{CH}_2(\text{mc})$	28	69.45	3.32	d	$\text{C}(\text{Xyl})$
3	24.81	1.26	t	$\text{CH}_2(\text{mc})$	29	70.96	5.07	d	$\text{C}_\beta(\text{OH-Tyr})$
4	28.65	1.24	t	$\text{CH}_2(\text{mc})$	30	72.06	3.98	d	$\text{CH-OH}(\text{mc})$
5	28.97	1.24	t	$\text{CH}_2(\text{mc})$	31	73.12	2.98	d	$\text{C}(\text{Xyl})$
6	29.00	1.24	t	$\text{CH}_2(\text{mc})$	32	74.60	3.06	d	$\text{C}_\beta(\text{OH-Asn})$
7	29.03	1.24	t	$\text{CH}_2(\text{mc})$	33	76.39	3.37	d	$\text{CH-OH}(\text{mc})$
8	29.04	1.24	t	$\text{CH}_2(\text{mc})$	34	76.46	3.11	d	$\text{C}(\text{Xyl})$
9	29.30	1.24	t	$\text{CH}_2(\text{mc})$	35	77.32	3.76	d	$\text{CH-OH}(\text{mc})$
10	29.95	1.88/2.06	t	$\text{C}_\beta(\text{DAB})$	36	102.13	4.199	d	$\text{C}_1(\text{Xyl})$
11	30.11	1.53	t	$\text{CH}_2(\text{mc})$	37	114.69	6.67	d	$\text{C}_e(\text{OH-Tyr})$
12	31.24	1.24	t	$\text{CH}_2(\text{mc})$	38	114.69	6.67	d	$\text{C}_e(\text{OH-Tyr})$
13	35.98	2.885	t	$\text{C}_\gamma(\text{DAB})$	39	127.05	7.13	d	$\text{C}_8(\text{OH-Tyr})$
14	36.53	2.40/2.59	t	$\text{C}_\beta(\text{Asn})$	40	127.05	7.13	d	$\text{C}_8(\text{OH-Tyr})$
15	38.76	1.38/1.75	t	$\text{CH}_2(\text{mc})$	41	132.29	—	s	$\text{C}_\gamma(\text{OH-Tyr})$
16	40.90	2.31/2.43	t	$\text{CH}_2(\text{mc})$	42	156.44	—	s	$\text{C}_\zeta(\text{OH-Tyr})$
17	42.00	3.97	t	$\text{C}_\alpha(\text{Gly})$	43	167.69	—	s	$\text{C}=\text{O}$
18	44.48	4.26	d	$\text{C}_\alpha(\text{OH-Asn})$	44	169.32	—	s	$\text{C}=\text{O}$
19	49.84	4.59	d	$\text{C}_\alpha(\text{Asn})$	45	169.72	—	s	$\text{C}=\text{O}$
20	50.91	4.36	d	$\text{C}_\alpha(\text{DAB})$	46	170.04	—	s	$\text{C}=\text{O}$
21	55.63	4.28	d	$\text{C}_\alpha(\text{Ser 2})$	47	170.91	—	s	$\text{C}=\text{O}$
22	55.69	4.14	d	$\text{C}_\alpha(\text{Ser 1})$	48	171.03	—	s	$\text{C}=\text{O}$
23	60.40	4.16	d	$\text{C}_\alpha(\text{OH-Tyr})$	49	171.07	—	s	$\text{C}=\text{O}$
24	61.43	3.43/3.34	t	$\text{C}_\beta(\text{Ser 1})$	50	171.40	—	s	$\text{C}=\text{O}$
25	61.69	3.60/3.67	t	$\text{C}_\beta(\text{Ser 2})$	51	171.81	—	s	$\text{C}=\text{O}$
26	65.69	3.3/3.04	t	$\text{C}_5(\text{Xyl})$	52	173.49	—	s	$\text{C}=\text{O}$

mc(methylene chain amino acid), DAB(2, 4-diaminobutyric acid), Xyl(Xylose), OH-Tyr( $\beta$ -hydroxytyrosine), OH-Asn ( $\beta$ -hydroxyasparagine)

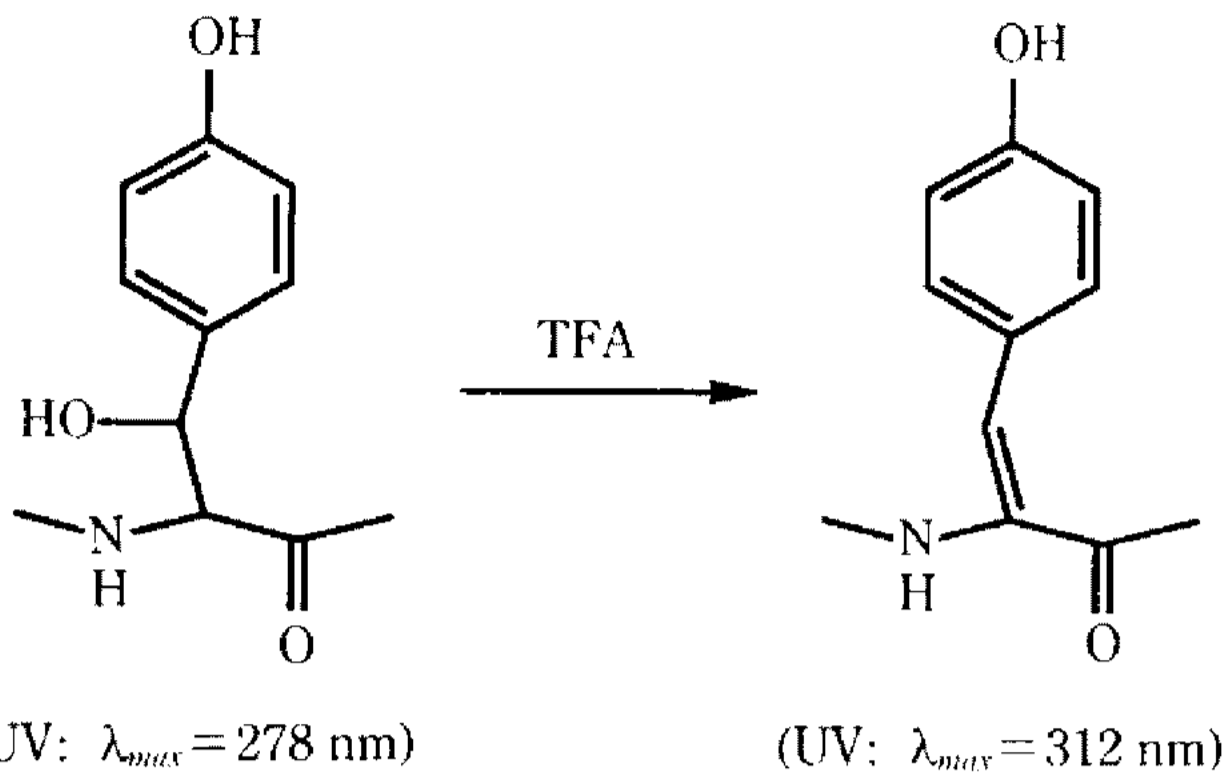


Fig. 3. Reaction of  $\beta$ -hydroxytyrosine with TFA.

nm로 shift되었음을 확인하였다. 이 현상은 TFA에 의해서  $\beta$  위치에 붙은 OH-기가  $\alpha$  위치의 수소와 함께 떨어져 이중결합을 형성하여 peptide 결합의 카르보닐기와 conjugation을 이루어  $\lambda_{max}$  값이 34 nm 증가한 것으로 설명된다(Fig. 3). 따라서 AF-011A에 포함된 방향족화합물은  $\beta$ -hydroxytyrosine임이 확인되었다.

**Asparagine의 규명:** 아미노산 분석결과 aspartic acid와  $\beta$ -OH-aspartic acid가 확인되었으나, 이는 acid hydrolysis 중에 asparagine과  $\beta$ -OH-asparagine이 전환되었을 경우도 가능하므로 이를 정확히 규명하기 위하여 pyrolyzer를 이용한 gas chromatography 분석을 실시하였다. Fig. 4의 (b)와 (c)는 표준시료 Asparagine과 Aspartic acid의 열분해 GC 결과이며, (a)는 AF011A를 동일한 조건으로 분석한 결과이다. AF-011A의 열분해 GC 결과, retention time 47분 근처의 peak가 asparagine의 peak과 동일한 것으로 증명되었으며, 따라서 AF-011A에는 asparagine과  $\beta$ -hydroxy-asparagine이 함유되어 있다.

**Methylene chain의 규명:** AF-011A의 6N HCl 가수분해 후에  $C_{18}$  column을 통과시켰을 경우에 흡착된 성분을 50% IPA로 용출하여 분석한 결과, methyl와 아미노기를 갖는 methylene 사슬구조로 확인되었다. NMR 측정결과 0.85 ppm의 triplet( $^1H$ -NMR)과 13.9 ppm(q,  $^{13}C$ -NMR)의 peak으로 이 chain에 methyl가 한개 존재함을 확인하였다. 또한  $^1H$ -NMR의 1.25 ppm의 큰 peak과  $^{13}C$ -NMR의 22.0~31.2 peak 들은  $CH_2$ 군의 긴 사슬이 존재함을 보여준다. 또한 산 가수분해로 이 긴사슬이 분리되는 점으로 보아, 이 구조도 다른 아미노산들과의 peptide 결합에 의하여 연결된 아미노산의 일종임을 알 수 있으며, 18개의 탄소로 구성되어 있음을  $^{13}C$ -NMR을 이용하여 밝혀 내었다.

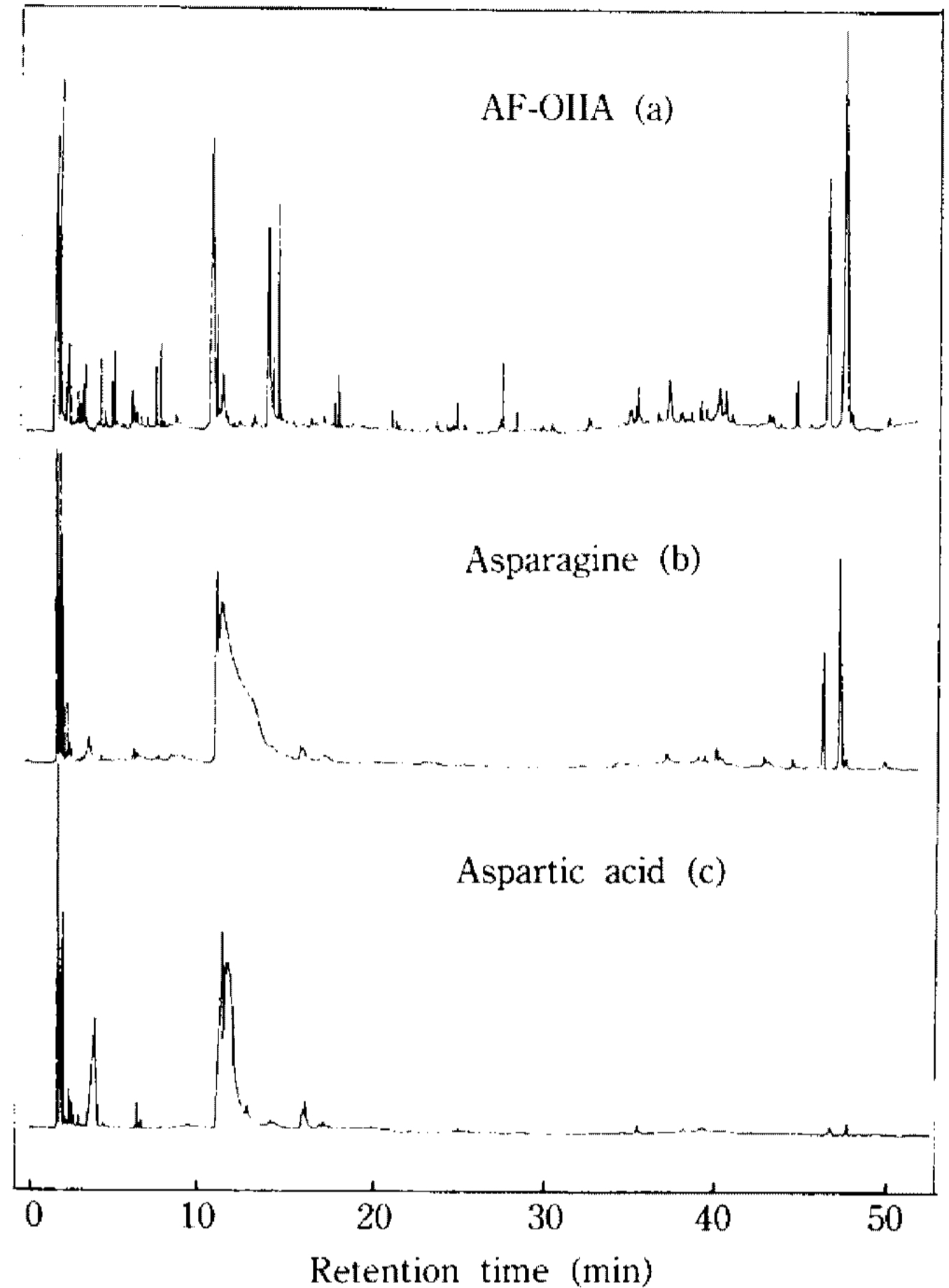


Fig. 4. Pyrolyzer GC of AF-011A.

**AF-011A의 primary structure:** Two dimensional-NOESY를 통하여 peptide결합을 형성하고 있는 아미노산들의 서열을 결정 하였으며(Fig. 5), NOESY 결과 xylose가 methylene 사슬 아미노산에 연결되어 있는 것으로 확인되었다.

**AF-011A의 구조에 관한 고찰:** 이상의 구조분석 결과 AF-011A는 1987년 미국의 Squibb사에서 발견한 Xylocandin A(5)와 매우 유사한 구조인 것으로 판단 된다. 메틸렌사슬 아미노산을 제외한 다른 아미노산들의 조성과 분자량이 같고 xylose를 함유하고 있는 것도 동일하나, Xylocandin A의 표준시료를 입수할 수가 없었으며 Xylocandin A의 1차구조도 밝혀져 있지 않았기 때문에 두 물질간의 구조와 활성 측면에서의 직접 비교는 불가능하였다. 그러나 전보(1)에서도 언급하였듯이 AF-011A와 Xylocandin A의 항진균활성의 차이는 비록 구성 아미노산의 조성은 동일 하더라도 서열이 상이하기 때문에 또는 메틸렌사슬 아미노산의 구조적 차이에 기인할 수 있기 때문에 본 연구에서는 정밀한 two dimensional NMR 연구를 통하여 peptide 결합을 이루고 있는 AF-011A의

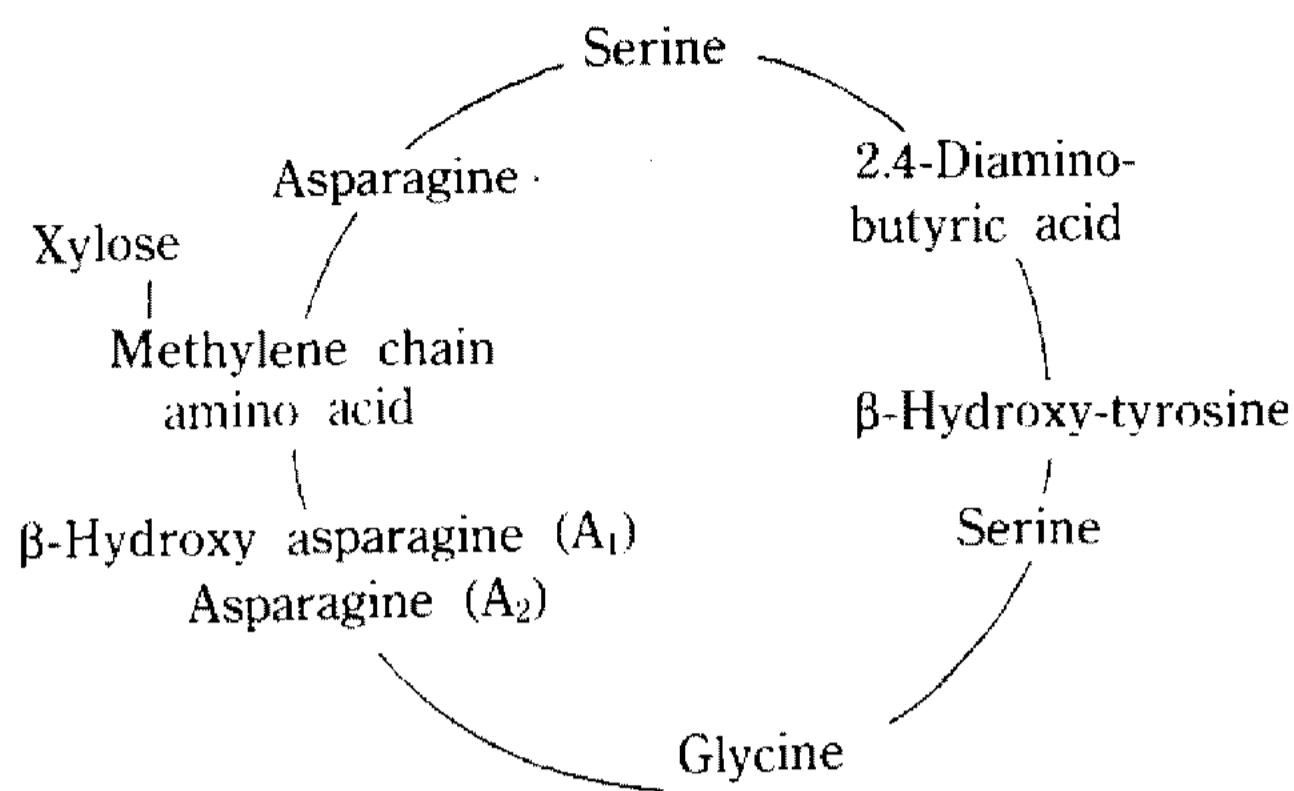


Fig. 5. Primary structure of AF-011A.

amino acids의 서열을 밝혀내었고, xylose가 methylene 사슬 아미노산에 결합되어 있는 것도 규명하였다. 또한 pyrolyzer GC를 통한 asparagine의 규명은 아미노산 분석 부문의 새로운 방법을 확립하였다는 의미가 있다. 현재 methylene 사슬 아미노산의 정확한 구조와 AF-011A의 3차구조 규명이 진행 중에 있다.

요 약

토양에서 분리한 *Pseudomonas cepacia* AF6008로부터 항진균물질 AF-011A를 분리, 정제하여 생물학적 활성을 조사한 결과 *in vitro*에서는 기존의 항진균물질들보다 매우 우수한 활성을 보였으나, 감염동물시험에서는 Amphotericin-B보다 역가가 열세한 상황으로 반전되었다. 그 이유는 혈청단백질과 AF-011A의

상관관계에 의한 것으로 추측된다. 반면, 농약활성은 역가 측면이나 광범위성 측면에서 매우 우수한 결과가 얻어졌다. NMR을 이용한 AF-011A의 구조분석으로 조성물이 모두 확인되었으며 1차구조를 규명하였다.

참고문헌

1. 김성호, 현봉철, 서정우, 김창완, 연창석, 이덕근, 김광표, 정재경, 임용호, 이철훈, 1993. 신규 항진균물질 AF-011A의 생산균주 동정, 정제 그리고 물리화학적 특성. 한국산업미생물 학회지 21: 556-563
2. Clark, J.M., R. Whitney, S.J. Olsen, R.J. George, M. Swerdel, L. Kunselman and D.P. Bonner. 1991. Anphotericin-B Lipid Complex Therapy of Experimental Fungal Infections in Mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 615-621.
3. Petranyi, G., J.G. Meingassner and H. Mieth. 1987. Activity of Terbinafine in Experimental Fungal Infections of Laboratory Animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1558-1561.
4. Pieroni, O., G. Montagnoli, A. Fissi, S. Merlino and F. Ciardelli. 1975 Structure and Optical Activity of Unsaturated Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 97: 6820-6826.
5. Meyers, E., G.S. Bisacchi, L. Dear, W.C. Liu, B. Minassian, D.S. Slusarchyk, R.B. Sykes, S.K. Tanaka and W. Trejo. 1987. Xylocandin: A New Complex of Antifungal Peptides, I. Taxonomy, Isolation and Biological Activity. *J. Antibiot.* 40: 1515-1519.

(Received August 19, 1993)