

Streptomyces sp. 유래 Polyene 계 항만고병 항생물질의 분리

김광석 · 서영배*
경북대학교 미생물학과

Isolation of Polyene Antifungal Antibiotics Against Gummy Stem Light Caused by *Didymella bryoniae*.
Kim Kwang Seok and Young-Bae Seu*. Department of Microbiology, Kyungbook National University, Taegu 702-701, Korea – Antifungal agents, flavofungin and fungichromin were isolated from the fermentation culture broth of a *Streptomyces* sp. SKM338. Biological evaluation of these antibiotics indicated that the compounds possesses broad spectrum antifungal activity against various pathogens. Especially, these compounds inhibited throughly growth of *Didymella bryoniae*, caused Gummy stem blight of melons, occurs in the south-eastern Korea. Inhibition of this pathogen may be prevented from directly reducing both pre- and post-harvest yields.

Key words: *Didymella bryoniae*, antifungal substance, polyene, flavofungin, fungichromin, filipins

소득 증가에 따른 식생활의 고급화 및 다양화로 식품 소비형태의 변화가 나타나고, 이러한 변화는 식량작물 생산 및 경지 이용에 큰 영향을 주고 있다. 작물별로 재배면적을 보면 식량작물은 지속적인 감소추세에 있는 반면 수익성이 높은 과채류 등은 상대적으로 증가하는 경향을 보이고 있다. 과채류 재배농가의 증가와 함께 노지에 비해 생산시기의 확대와 생산성 증가, 기후환경에 의한 피해 방지 등의 장점 [6, 7]을 가지고 있는 시설재배가 급격하게 증가하고 이에 따른 부작용도 나타나기 시작했다.

경북 성주지역에서 대량 재배하는 참외의 경우 시설재배 생산에 있어서 가장 큰 문제점은 연작재배에 따라 주년 발생하는 병충해이다. 병충해의 방제가 완전하지 않은 경우에는 시설재배지에 집중적으로 발생하여 화학농약의 과도한 사용을 유발하고 이에 따른 환경파괴 및 생태계의 변화 등의 부작용을 초래하고 있다.

곰팡이인 *Didymella bryoniae*에 의한 만고병은 뿌리혹선충과 더불어 참외 성장의 가장 큰 병충해로 나타나고 있다 [9]. 이 병충해는 기주 범위가 광범위하고 번식 속도와 감염 전파 속도가 매우 빠른 특성을 가져 매년 참외 생산에 가장 심각한 피해를 주고 있다. 곰팡이 *D. bryoniae*에 대한 선택적인 농약도 없을 뿐 아니라 이 곰팡이의 광범위한 내성 때문에 때로는 무분별한 살균제로 만고병에 대처하기도 한다 [8, 10]. 따라서, 만고병에 대한 강력하고 경제적인 천연물질 및 다양한 2차 대사산물을 생산하는 균주를 조사할 필요성이 대두되었다.

본 연구에서는 각종 분비 효소 뿐 아니라 수많은 항생물질의 생산균으로 잘 알려진 방선균 중에서 영남지방의 참외 재배에 있어서 막대한 피해를 주고 있는 *D. bryoniae*에 의한 만고병에 대한 항곰팡이 활성이 뛰어난 균주를 분리하여 분리 방선균이 생산하는 항생물질을 조사하였다.

재료 및 방법

만고병균의 분리

만고병과 검은 부식 증상을 가진 잎과 줄기와 과실은 성주 지역의 온실에서 키운 참외로부터 수집하였다. 각각의 식물체에서 얻은 잎과 줄기 부분은 폴리에틸렌 비닐 봉지에 각각 나누어 담아서 저온 상태로 실험실까지 운반하였다. 조직 단편은 0.5% sodium hypochlorite 용액으로 30~60초 동안 처리하여 표면을 소독한 후 QPDA(one-quarter-strength potato dextrose agar) 배지에 얹어, 실온(22°C~25°C)에서 12시간의 광 노출 조건하에서 배양시켰다. 조직 단편으로부터 분리된 *D. bryoniae* 균주는 참외 전문 연구기관인 농촌진흥원 산하 성주과채류시험장으로부터 분양 받은 검정균주와 비교 확인 후 실험에 사용하였으며 콜로니는 PDA 배지에 옮겨 4°C에서 보존하였다.

방선균의 분리 및 배양

토양으로부터 방선균을 분리하기 위하여 방선균의 증식을 촉진하는 것으로 알려진 humic acid를 함유한 배지 Humic acid-Vitamin 배지(humic acid 1.0 g/L, Na₂HPO₄ 0.5 g/L, KCl 1.7 g/L, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g/L, CaCO₃ 0.01 g/L, cycloheximide 0.05 g/L, agar 18 g/L, vitamin solution 1 ml/L)를 사용하여 방선균을 선택적으로 분리하는 Hayakawa

*Corresponding author
Tel. 82-53-950-5380, Fax: 82-53-955-5522
E-mail: ybseu@knu.ac.kr

[4]의 방법에 따라 분리하였으며, 분리된 방선균의 보존에는 Bennet 한천 배지(yeast extract 1.0 g/L, beef extract 1.0 g/L, N.Z amine type A 2.0 g/L, glucose 10.0 g/L, agar 15 g/L)를 사용하였다. 분리한 방선균주로부터 항진균성 물질을 생산하기 위하여 각 방선균의 포자를 100 ml의 액체 배지가 들어있는 500 ml Erlenmyer flask에 한 백금이 접종하여 30°C에서 왕복진탕으로 5일간 배양하였다. 이 때 사용한 배지는 GSS 배지(soluble starch 10 g/L, glucose 20 g/L, soybean meal 25 g/L, beef extract 1 g/L, yeast extract 4 g/L, NaCl 2 g/L, CaCO₃ 2 g/L, K₂HPO₄ 0.25 g/L, pH 7.2)를 사용하였다. 발효는 1L Erlenmyer flask에 seed 배지와 동일하게 만든 배지 0.3 L에 50 ml의 seed culture(1% glucose, 0.5% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.003% FeSO₄ · 7H₂O)를 접종하고 rotary shaker를 이용해서 180 rpm, 30°C, 5일 동안 배양하였다.

항진균 활성 방선균의 분리

자연계로부터 분리 소장하고 있는 방선균을 대상으로 Paper disc method로 항진균 활성을 나타내는 방선균을 선별하였다. Paper disc method는 Petri dish에 PDA 배지를 붓고 수평으로 굳힌 다음 전 배양한 곰팡이 *D. bryonoe*의 포자 현탁액과 1% agar 배지의 혼합액 5 ml을 균일하게 피복하고 수평으로 굳혀 검정 plate로 사용하였다.

여기에 30°C에서 5일간 배양한 방선균 배양액 일정량을 8 mm의 paper disc에 흡수시키고 풍건 후 검정 plate 위에 올려놓고 27°C에서 2일간 배양시켜 생육 저지환을 형성하는 방선균을 1차로 선별을 하였다(Fig. 1). 일차로 선별한 균주는 삼각 플라스크(500 ml)를 사용하여 100 ml의 배지에 배양하고 배양액을 비극성유기용매 ethyl acetate와 극성의 butanol로 각각 추출하여 유기용매 추출여부에 따라 2차 선별을 거친 후 최종 선별을 시도하였다. 선별된 각 균주의 배양 추출물을 역시 paper disc method로 활성검정을 실시한 후 배양액에 1 N HCl 또는 1 N NaOH를 첨가하여 pH

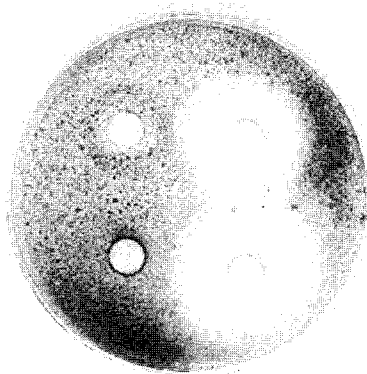


Fig. 1. The paper disc method. The clear zone on the plate is showed to antifungal activity by SKC338-1 against *D. bryonoe*.

를 2, 7, 10으로 조절한 상태에서 용매추출을 실시하여 활성 물질의 pH 안정성을 조사하였다. 활성물질의 열 안정성은 배양액을 90°C에서 5분간 열처리 한 후 조사하였으며 그리고 배양액에 2%의 활성탄을 첨가한 후 원심분리를 거쳐 상층액의 활성을 조사 함으로써 활성물질의 활성탄에 대한 흡착여부를 조사하였다. 이러한 예비실험을 거쳐 방선균 배양액의 ethyl acetate 추출물로부터 강력한 항진균활성을 나타내는 균주를 최종 선별하였다.

항진균 활성 물질의 분리정제

항진균 활성 물질의 분리정제 과정은 Fig. 2와 같다. 균주의 배양액을 8000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 얻은 배양 상등액과 균체를 각각 ethyl acetate로 3번 추출하여 ethyl acetate층을 진공상태에서 농축하였다. 이렇게 하여 얻어진 농축 잔사물은 silica gel column chromatography를 2번 행하였다. 먼저 column(40 × 200 mm)을 hexane-EtOAc와 EtOAc-MeOH의 solvent system으로 용출 하였다. Chromatography의 용출은 hexane : EtOAc의 비율을 1 : 5에서 1 : 20으로 단계적으로 하였고 그 후에 EtOAc : MeOH를 5 : 1로 용출하였다. 그리고 두 번째 column chromatography (10 × 150 mm)는 CHCl₃ : MeOH : acetonitrile를 5 : 1 :

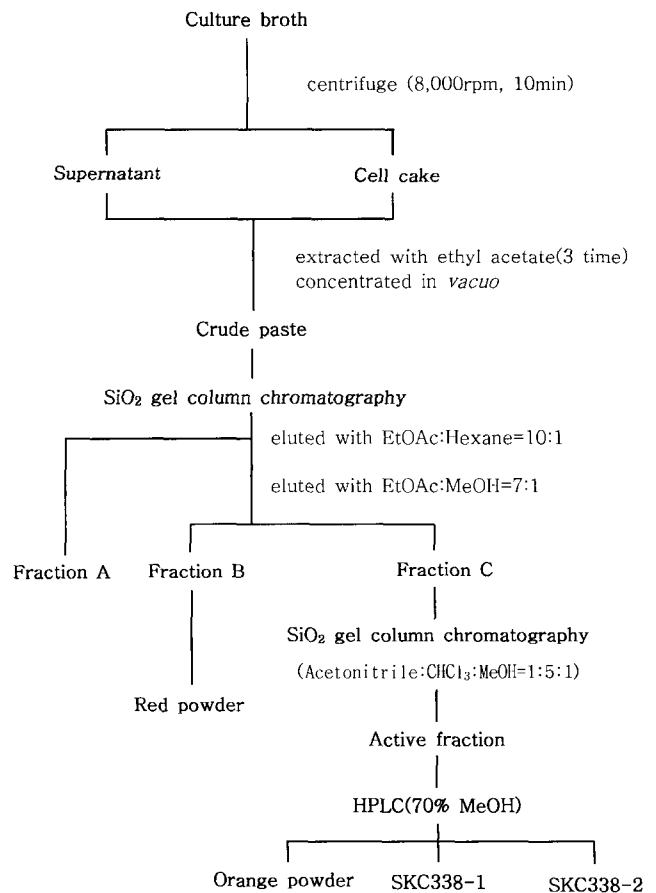


Fig. 2. Isolation procedure of antifungal antibiotics.

1 용매로 용출 하였는데 여기에서 활성이 있는 fraction을 얻을 수 있었다. 각 fraction은 TLC와 UV(265 nm)로 검출하였다. 활성 fraction을 모아 진공상태에서 농축시켜 노란색의 분말을 얻었다. 그 분말을 소량의 methanol에 용해시켜 photodiode array detector를 이용한 역상 HPLC column (20 mm×250 mm, J'sphere ODS-H80)으로 정제하였다. 이 column에서 HPLC 조건은 70% MeOH로 분당 1.5ml의 유속으로 용출시켰으며, 265 nm의 UV로 검출하였다. 그 결과 retention time이 26분에 오렌지색 결정 형태의 물질을 얻을 수 있었고, 각각 40분과 48분의 retention time에서 노란색 분말형태의 순수한 물질 SKC338-1과 SKC338-2를 얻었다.

항균물질 분석

UV spectrum은 methanol을 용매로하여 HP8452A spectrophotometer(Hewlett Packard, USA)를 이용하여 측정하였으며 IR spectrum의 측정은 KBr cell을 사용해서 FT/IR-610 spectrometer(Jasco, Japan)를 이용하여 측정하였다. $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectra는 ARX-400 NMR spectrometer (Bruker, Germany)을 이용하여 측정하였으며 내부표준물질로 TMS(tetramethylsilane)를 측정용매는 CD_3OD 를 사용하였다. 분자량은 JMS-700 mass spectrometer(JEOL, Japan)를 사용하여 결정하였다.

결과 및 고찰

항진균 활성 균주의 분리

분리된 1700여 균주 중 1차 선별과정에서 156균주가 활성을 나타내었으며, 그중 활성이 강한 57균주를 대상으로 유기용매 추출과정을 거쳐 2차로 30균주를 선별한 다음 3차 선별 과정을 행하였다. 2차 선별과정에서 활성을 나타낸 30균주 중에서 활성물질의 유기용매 추출과정을 거쳐 비극성의 ethyl acetate에 추출되는 5균주와 극성용매 butanol에 추출되는 6균주를 선별하여 이들의 열 안정성, pH 안정성, 활성탄 흡착여부, ion exchange resin의 선택성 등을 검토한 후 ethyl acetate 추출물에서 참외 만고병에 대한 강력한 항균활성을 나타내는 균주를 최종적으로 선별하여 *Streptomyces* sp. SKM338로 명명하였다(Fig. 1).

배양 온도, pH 및 금속이온에 의한 항진균 물질 생산성

배양 온도 및 배지의 초기 pH가 항진균 활성 균주의 성장과 항진균 물질 생산성에 미치는 영향을 조사하기 위해 GSS배지 100 ml에 전배양액 1%를 접종하여 180rpm에서 5일간 배양하였다. 배양온도는 10°C에서 45°C까지 5°C간격으로 각각을 배양하여 확인하였으며, 배지의 초기 pH는 1N HCl 혹은 1N NaOH를 이용하여 배지의 pH가 3.0~10.0 되게 조절하여 30°C, 5일간 배양하였다. 여러 가지 염이나 금속이온이 항진균 물질의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위

해 GSS 배지에서 염 및 금속화합물을 제외한 기본배지에서 0, 5, 10, 15 mM의 다양한 염 및 금속화합물 각각을 첨가한 후 180 rpm에서 30°C, 5일간 배양하여 항진균 활성을 비교하였다. 그 결과 pH 7.0 중성 부근에서 균의 증식 및 활성 물질의 생성이 가장 높게 나타났다. pH 3, 4 정도의 산성 영역, pH 10의 강 알칼리 영역에서는 활성 물질도 생산되지 않았고 균도 증식하지 않았다. pH 5~9에서는 상대적으로 균의 성장은 좋았으나 pH 5에서 항생제의 생산은 좋지 않았다. 활성 물질 생산을 위한 최적온도를 조사한 결과 물질의 생산과 균의 증식은 각각 15~30°C에서 상대적으로 좋았으며 30°C에서 가장 좋았음을 보여주었으나 40~45°C의 고온에서는 균의 증식과 물질 생산능이 급격하게 감소하였다. 일반적으로 대사산물은 처음부터 끝까지 일정 온도 하에서 생산되기 때문에 좋은 생육 온도의 범위에서 좋은 대사산물의 생산량도 높게 나타나지만 균 생육의 최적 온도가 항진균 활성물질 생산 최적 온도와 다른 경우도 종종 볼 수 있다. 따라서 균의 생육과 항생제 생산에 미치는 온도의 영향은 각각 나누어서 고려해야 하는데 이 실험에서는 균의 생육 최적 온도와 항생제 생산의 최적 온도는 거의 비슷하였다.

여러 가지 염이나 금속이온은 방선균 KSM338 균주의 생육에 영향을 거의 주지 않았으나, 항진균 활성 물질의 생산 및 분비에는 많은 영향을 주는 것으로 나타났다. 무기염류 중에서 항생물질의 생산을 증가시키는 것으로 잘 알려진 KH_2PO_4 [15]는 15 mM 농도에서 최적의 활성을 나타내었다. Cu^{2+} 와 Co^{2+} 를 제외하고는 대부분의 금속이온들은 활성 물질의 생산에 효과적이었다. 특히, Ca^{2+} 은 활성 물질의 생산에 가장 효과적인 것으로 나타났으며, 최적 농도는 10 mM 이었다. 항진균 활성물질에 금속이온이 영향을 주는 것은 활성물질의 합성에 관여하는 효소를 저해하거나 활성화함으로써 생합성에 영향을 주기 때문인 것으로 보이며, 때로는 막의 물질수송에 영향을 주기도 한다[12].

항진균 활성 물질의 물리화학적 특성

정제된 항진균성 물질의 여러 물리화학적 성상은 Table 1에 종합하여 정리하였다. 정제된 물질의 용해성은 methanol, ethanol과 acetone에 대해서는 가용성, ethyl acetate와 chloroform에서는 조금 용해되며, hexane, diethyl ether와 물에는 불용성이었다.

SKC338-1 물질의 UV spectrum은 methanol 용액에서 288, 305, 320, 344, 358 nm에서 최대흡광도를 보였고, SKC338-2 물질은 308, 320, 342, 360 nm에서 최대흡광도를 보였다. 이와 같은 흡광도는 pentaene을 가지고 있는 polyene macrolide 계열의 항생물질들이 가지고 있는 독특한 화학적 구조로 나타난다[14]. 양 물질 모두 IR spectrum에서 3400 cm^{-1} 의 강한 hydroxy group과 1730 cm^{-1} 에서 carbonyl group, 1450 cm^{-1} 에서 olefin, 1196 cm^{-1} 에서 ester group 등 polyene macrolide 계 화합물의 특성을 잘 나타내었다.

Table 1. Physico-chemical properties of SKC338-1 and SKC338-2.

	SKC338-1	SKC338-2
Appearance	Yellow powder	Light yellow powder
UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm	288, 305, 320, 344, 358	300, 308, 320, 342, 360
Molecular weight	650	670
Solubility :		
Soluble	MeOH, EtOH, BtOH	MeOH, EtOH, BtOH
Slightly soluble	CHCl ₃ , EtOAc	CHCl ₃ , EtOAc
insoluble	H ₂ O, Hexane	H ₂ O, Hexane
Rf value (TLC)		
EtOAc :MeOH(4:1)	0.61	0.64
CHCl ₃ :MeOH:Acetonitrile(5:1:1)	0.37	0.39
HPLC Rt (min)	40.2	47.9

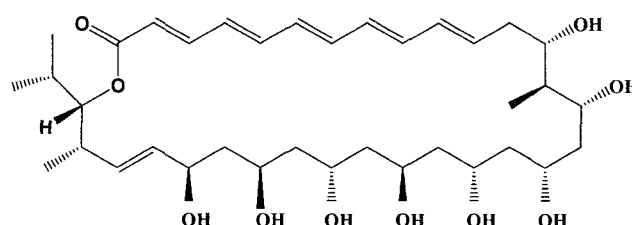
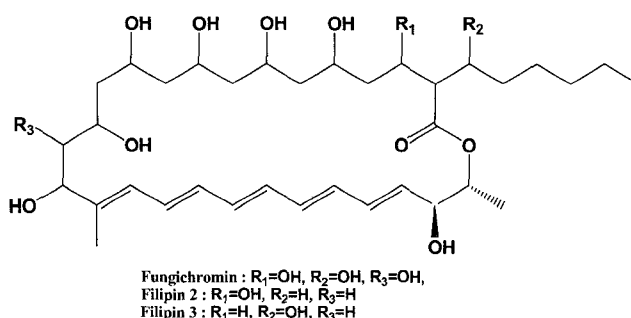
여러 가지 용매계를 사용하여 전개한 TLC plate 상에서 각각의 물질은 특정의 Rf 치를 갖는 단일 spot으로 나타났다 (Table 1).

SKC338-1 물질의 분자량은 FAB-MS 분석에서 m/z 651.9(M+H)⁺로 나타났으며, 정확한 구조를 결정하기 위해 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectra 분석을 실시하였다. Proton-NMR은 6.0-6.5 ppm에서 다량의 olefin proton과 3.5-4.3 ppm에서 -CHOH proton 등이 특징적으로 잘 나타났으며, carbon-NMR에서는 172 ppm에서 한 개의 carbonyl carbon, 140-128 ppm에서 12개의 olefin carbon, 85-60 ppm에서 9 개의 hydroxy carbon, 그리고 3개의 methine, 7개의 methylene, 4개의 methyl carbon 등 36개의 carbon peak가 관찰되었다. 이러한 기기분석 data를 근거로 polyene계 2차 대사산물들에 대하여 조사한 결과 SKC338-1 물질이 Bognar[2] 등에 의하여 분리 보고된 분자량 650의 flavofungin(Fig. 3)으로 밝혀졌으며 물리화학적 성질과 spectral data들은 보고된 결과와 좋은 일치를 나타내었다.

SKC338-2 물질의 분자량은 FAB-MS 분석에서 m/z 693.3(M+Na)⁺로 나타났으며, 물리화학적인 특성에 관한 데이터와 NMR, IR 및 UV spectra 분석을 통해서 flavofungin과 매우 유사한 전형적인 polyene 계열의 항생물질임이 나타났다. 특히 SKC338-2 물질이 fungichromin 혹은 filipins와 유사한 것으로 보여 졌다[1, 3, 11].

Bergy와 Eble[1]에 의해 밝혀진 filipin complex의 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 분석의 화학적 전위 결과를 참고로 하여, 몇 가지의 spectral data, 특별히 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectra의 데이터 분석을 통하여 SKC338-2 물질이 carbon 수 34개의 fungichromin(Fig. 4)으로 밝혀졌으며, 다른 filipin complex(Fig. 4)가 소량 불순물의 형태로 존재하고 있음을 알 수 있었다.

Polyene macrolide계 항생물질은 강력한 항진균, 항바이러스 활성을 나타내는 수많은 천연 화합물들이 polyene macrolide계 물질에 속해 있다. 이 중에는 이미 항진균 요법제로 성공적으로 사용되고 있는 것도 알려져 있다[13]. 이

**Fig. 3. Structure of Flavofungin.****Fig. 4. Structure of Fungichromin and Filipins.**

계열의 물질은 sterol을 포함하고 있는 생체막의 투과성을 선택적으로 변화시켜 항생작용을 나타내게 된다. 항진균성 항생물질인 fungichromin 결정은 전형적인 filipin pentaene chromophore 구조를 가진 최소 8 종류의 화합물의 혼합체로 발견되었다. 이 실험에서 우리들도 방선균 SKM338 균주로부터 이 화합물을 결정상태로 분리할 수 있었다. Flavofungin, fungichromin, filipin 등은 약 200여 종류의 화합물질이 알려져 있는 macrocyclic polyene계 항생물질에 속하며, 이 들은 주로 방선균 Streptomyces 속에 의해 생성되며 항진균성, 항원생동물 활성을 나타내는 것이 많다. 이들 화합물들은 모두 구조적으로는 macrocyclic lactone의 환상구조 안에 5개의 결합형 이중결합의 사슬을 가지는 동시에 hydroxyl 그룹을 가진 포화된 영역도 갖고 있다. 이들은 대체로 포유동물 세포에 독성을 나타내며 그 작용 양상이 비특이적이며 불안정한 화합물이다. 예를 들면 열이나 빛이 있

는 어떤 조건하에서 filipin의 생물학적 활성과 UV 최대 흡수 피크가 동시에 사라져 버리는 경우도 알려져 있다. 뿐만 아니라 진한 methanol이나 ethanol 용액 상태로 4°C에 두게 되면 급격한 분해가 일어나게 된다. 그러나 이러한 그들의 독성이나 불안정성, 또 다른 많은 종류의 항진균성 항생물질의 개발에도 불구하고 amphotericin B나 nystatin 같은 polyene계의 항생물질은 아직도 사람의 진균증 감염 치료에서 최고의 치료제로 남아 있다[5, 14]. 또한 sterol에 결합하는 특성을 갖고 있는 polyene계 화합물은 고콜레스테롤 치료제로, 항암 또는 항바이러스 활성으로 현재도 많은 주목을 받고 있다. 이러한 사실로 방선균으로부터 분리된 polyene계 항곰팡이 물질 flavofungin, fungichromin, filipin등은 만고병의 예방을 위한 생물농약뿐 아니라 의약품으로의 개발 가능성에 대해서도 기대해 볼 수 있겠다.

요 약

*D. bryoniae*를 원인균으로 하는 참외 만고병에 대해서 항만고병 활성물질을 생산하는 미생물을 방선균으로부터 선별 분리한 후 배양액으로부터 항균활성물질의 규명을 시도하였다. 항진균 물질과 같은 이차대사산물의 생산에 증가시키는 K_2HPO_4 와 칼슘이온이 포함된 GSS배지에서 방선균 SKM338 균주를 180 rpm, 30°C, 5일 동안 배양하여 얻어진 배양 상등액으로부터 물리화학적 방법으로 항진균 활성이 있는 물질을 분리 정제한 결과 참외의 만고병에 대한 생물농약으로 개발 가능한 방선균 유래의 항진균성 물질은 NMR, IR, UV 및 Mass spectral data 분석 등을 통해 polyene macrolide계에 속하는 항생물질인 Flavofungin, Fungichromin, Filipins로 밝혀졌으며 이들의 응용을 기대해 본다.

감사의 글

본 연구는 경북대학교 연구지원사업의 지원으로 진행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Bergy, M. E. and T. E. Eble. 1968. The filipin complex. *Biochemistry* **7**(2): 653-659.
- Bognar, R., B. O. Brown, W. J. S. Lockley, S. Makleit, T. P. Toube, B. C. L. Weedon, and K. Zsupan. 1970. The structure of flavofungin. *Tetrahedron Lett.* **7**: 471-474.
- Whitfield, G. B., T. D. Brock, A. Ammann, D. Gottlieb, and H. E. Carter. 1955. Filipin, an antifungal antibiotic: Isolation and properties. *J. Am. Chem. Soc.* **77**: 4799-4801.
- (a) Masayuki, H. and H. Nonomura. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* **65**: 501-509. (b) Masayuki, H. and H. Nonomura. 1987. Efficacy of artificial humic acid as a selective nutrient in HV agar used for the isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* **65**: 609-616.
- John, P. S., S. M. A. Pickett, A. M. Pickett, E. J. Vandamme, and C. W. Bird. 1981. Antibiotics from the newly isolated *Streptomyces elizabethii*. I. Production of a polyene antifungal agent (Elizabethin) and actinomycin in shake flask cultures. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **31**: 167-177.
- Keinath, A. P. 1995. Fungicide timing for optimum management of gummy stem blight epidemics on watermelon. *Plant Disease*, **79**: 354-358.
- Keinath, A. P. 1996. Soil amendment with cabbage residue and rotation to reduce gummy stem blight and increase growth and yield of watermelon. *Plant Disease*, **80**: 564-570.
- Keinath, A. P. 1998. Resistance to bonomyl and thiophanate-methyl in *Didymella bryoniae* from South California and New York. *Plant Disease*, **82**: 479-454.
- Keinath, A. P., M. W. Farnham, and T. A. Zitter. 1995. Morphological, pathological, and genetic differentiation of *Didymella bryoniae* and *Phoma* spp. isolated from cucurbits. *Phytopathology*, **85**: 364-369.
- McGrath, D. J., Vawdrey, L., and Wilker, I. O. 1993. Resistance to gummy stem blight in muskmelon. *HortScience*, **28**: 930-931.
- Hiroshi, N., P. H. Harrison, K. Arai, T. T. Nakashima, L. A. Trimble, and J. C. Vederas. 1988. Biosynthesis and full NMR assignment of fungichromin, a polyene antibiotic from *Streptomyces cellulosa*. *J. Am. Chem. Soc.* **110**: 2938-2945.
- Ohnishi Y, K. Hirano, J. Nishimura, M. Furue, H. Kanaide. 2001. Inhibitory effects of brefeldin A, a membrane transport blocker, on the bradykinin-induced hyperpolarization-mediated relaxation in the porcine coronary artery. *Br. J. Pharmacol. Sep.* **134**: 168-78.
- Strippoli V., F. D. D'Auria, N. Simonetti, D. Basti, and T. Bruzzese. 1997. *In vivo* and *in vitro* antifungal activity of the polyene derivative SPA-S-753 against encapsulated form of *Cryptococcus neoformans*. *Infection*, **25**: 27-31.
- Schreiber, S. L. and M. T. Goulet. 1987. Stereochemical studies of the skipped-polyol polyene macrolide class: Determination of mycoticin A and B. *Tetrahedron Lett.* **38**: 6001-6004.
- Tunac, J. B. and L. E. McDaniel. 1985. Effect of phosphate and copper on the fermentation of hydroheptin. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1192-1195.

(Received May 28, 2004/Accepted Sep. 6, 2004)