

검정해면으로부터 항균성을 가진 방선균의 분리 동정 및 항균물질의 구조

이종수 · 최종덕
경상대학교 수산가공학과, 해양산업연구소

Identification of an Actinomycetes Strain, MSA-1, Originated from Sponge, *Halichondria okadai*, and its Antimicrobial Component

Jong-Soo LEE, Jong-Duck CHOI

Dept. of Marine Food Science and Technology, Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Kyeongsang 650-160, Korea

An Actinomycetes strain, MSA-1, containing antimicrobial component was isolated from the black sponge, *Halichondria okadai*, and was identified to a genus level by morphological and chemotaxonomic methods. The gray colored spores were oval type with smooth surface and formed flexibilis spore chains. The cell wall of this strain was type I containing D-aminopimelic acid (D-DAP) and no specific sugar was detected. Phospholipid of the cell membrane was PII type including phosphoethanolamine and the major fatty acids of total lipid were branched anteiso-15 : 0, iso-16 : 0, 16 : 0 and iso-17 : 0. From these results and other characteristics described in the Bergey's Manual, this strain was identified as a *Streptomyces* sp.

Meanwhile, 10 mg of pale yellow colored antimicrobial component was isolated by HPLC method from the cultured *Streptomyces* sp. (70 g of cryophilized mycellia). By crystallographic analysis, HIRESMS and NMR assignment, the antimicrobial component produced from the strain MSA-1 was elucidated as the staurosporine (indol[2,3-a]carbazole alkaloid).

Key words: sponge, *Halichondria okadai*, *Streptomyces*, staurosporine, antimicrobial, indol[2,3-a]carbazole-alkaloid

서 론

해양에 서식하는 생물은 종의 다양성에서 뿐 아니라 자원량의 측면에서도 육상 생물을 능가한다. 또한, 각종 염류를 함유한 해수중의 다양한 환경 조건들에 적응하며 살아가는 이들 해양 생물들은 각기 독특한 구조를 가진 화학 물질들을 생산하기도 하며 특이한 생물활성을 나타내기도 한다. 이중 해면동물(porifera)은 강장동물과 함께 비식용 부착 생물로서 전 세계적으로 수천 종에 달하며 생리활성 물질의 보고라 할수 있을 만큼 많은 종류의 물질들이 발견되고 있다 (Ireland et al., 1993, Faulkner, 1994). 우리나라 연안에도 여러 종류의 해면이 서식하고 있으며 Lee et al. (1991)은 검정 해면으로부터 항균성을 비롯한 tumor promoter, protein phosphatase 저해등의 생리활성을 가진 okadaic acid, dinophysistoxin-1을 분리하였고, 신 (1994)은 제주도과 거문도 근해에서 채취한 20여종의 해면에 대하여 항암성을 검색하였으며 이중 *Pachastrella* sp.와 *Jaspis* sp.의 공생체로부터 강력한 항암성을 가진 pectenotoxin-2를 분리하였다.

한편, 이들 해면류는 생리적으로 해수가 자유로이

출입할수 있는 무수한 소공 (pore)과 위강 (gastral cavity)으로 되어 있어 체내에 여러 가지 미생물들이 공생하고 있으며, 이들 해면에 포함된 생리활성 물질들은 시기와 지역에 따라 함량이 일정하지 않은 점등으로 보아 어떤 생리활성 물질은 일차 생산자가 해면이 아니라 공생 미생물로 밝혀졌다 (Colwell et al., 1989, Stierle et al., 1988, 이, 1995).

연구자들은 이미 검정해면으로부터 각종 공생 미생물들을 검색하였으며 이들 중에서 특히 항균활성이 강한 방선균주를 분리하여 일부 생리적, 형태적, 배양 특성등을 보고하였다 (Choi and Park, 1993). 금번에는 이에 추가하여 형태적, 화학적 분류 특성에 의하여 균주를 동정하였으며, 균주를 대량 배양하여 얻은 균체로부터 항균물질을 분리 정제하고 각종 기기 분석과 X선 결정 해석에 의하여 구조를 동정하였다.

시료 및 방법

균주의 분리 및 배양

경남 통영시 소재의 미륵도 인근 조간대에서 채취한

검정해면 (*Halichondria okadae*) 으로부터 항균성을 가진 방선균주를 Actinomycetes 분리 배지를 이용하여 분리하였으며, 동정을 위하여는 ISP 2 배지 (yeast extract 4g, malt extract 10g, glucose 4g, aged sea water 750 ml, 증류수 250 ml, agar 15g, pH 7.4) 를 사용하여 30°C에서 7일간 배양하였다. 한편, 항균물질의 분리를 위한 대량배양에는 Marine Broth-2216배지 (DIFCO) 를 사용하여 30°C에서 3일간 진탕배양하였다 (Choi and Park, 1993).

균주의 형태적, 화학적 특성 분석

형태적 특성은 ISP-2 배지에서 배양하면서 기균사의 생육상태와 색깔을 조사하였으며 기균사 및 포자의 형태는 주사현미경으로 관찰하였다.

화학 분류학적 특성으로 세포벽중의 diaminopimelic acid (DAP)와 당조성, 인지질, 지방산 조성등을 조사하였다 (Goodfellow and Minnikin, 1985).

DAP 분석은 cap tube에 건조 균체 0.5g을 6N HCl 2 ml를 가하여 밀봉후 100°C에서 18시간 분해하여 여과한 여액을 감압 건조한 다음 0.5 ml의 증류수에 녹여 cellulose F plate (Merck)를 이용한 TLC에서 표준품 (Sigma)과 비교하였다 (solvent : MeOH-pyridine-10 N HCl-Water, 80 : 10 : 12.5 : 17.5, detection : 0.2% ninhydrin in acetone, 100°C, 2min.).

전 균체의 당 분석은 0.5g의 건조 균체로부터 Stanek et al. (1974)의 방법에 따라 균체 가수분해액을 조제한 다음 TLC를 이용한 Schaal (1985)의 방법으로 행하였다.

인지질은 Bligh 와 Dyer 법 (1959)으로 지질을 추출한 다음 sep-pak silica cartridge에서 중성지질과 인지질을 분획하여 (Juaneda and Rocquelin, 1985) Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) plate를 사용한 TLC로서 확인하였다. 이때 전개 용매로 chloroform-MeOH-acetic acid-water (65 : 45 : 1 : 2)을 사용하였으며, 검출은 Dittmer 시약을 사용하였고 phosphatidyl choline의 검출은 dragendorff 시약을 사용하였다.

지방산 조성은 총지질을 검화후 지방산은 methyl ester화하여 capillary column (Supelcowax-10, 0.32 cm, id.×30 m)을 부착한 GC로서 분석하였다 (Moon, 1993).

항균물질의 추출, 분리 및 정제

500 ml 들이 삼각 flask에서 방선균을 총 20 l 배양하여 균체를 filter로 여과한 다음 다시 증류수로 세척후 여과를 3회 반복하여 순수한 균체만을 모아 동결건조 하였다. 동결건조한 균체 (70g)는 MeOH를 300 ml를 가하여 균질화한 다음 감압 여과하였다. 잔사를 동일하게 재추출하여 여과액을 합한 다음 감압 농축하여 조추출물을 얻었다.

조추출물은 hexane과 80% MeOH로 분획하였으며, 항균성이 있는 함수 MeOH 획분은 다시 chloroform으로 추출하였다.

chloroform 획분은 이후 Develosil ODS Q3 column (Nomura Chemical Co., Japan, 1 cm, id.×40 cm)에서 85% MeOH로 용출 시킨 다음 silica column (Kieselgel 60, 1 cm, id.×20 cm)에서 chloroform-MeOH (95 : 5)로 용출하여 활성획분을 얻었다. 이 획분은 최종적으로 Develosil TMS-5 column (1 cm, id.×25 cm)상에서 MeOH을 용매로 한 HPLC로 정제하였다 (용매: MeOH, 유속: 3 ml/min.).

항균 물질의 monitoring

물질을 분리하는 전 과정에서 항균성의 유무는 *Bacillus subtilis* (Nutrient agar에 배양)와 *Aspergillus oryzae* (potato-dextrose agar에 배양)의 생육 저지 여부를 paper disk법 (Lee et al., 1991)으로 확인하였다. 한편, HPLC에서는 UV 254 nm에서 monitoring하였으며 TLC는 Kieselgel F₂₅₄을 이용하여 chloroform-MeOH (95 : 5)를 용매로 전개하였으며 검출은 254 nm의 UV lamp로 조사하여 확인하였다.

각종 기기를 이용한 기기 분석

UV spectrum은 MeOH를 용매로하여 U-best UV spectrophotometer (JASCO, Japan)로 측정하였다.

질량 분석은 glycerol을 matrix로하여 Fast Atom Bombardment (FAB)-MS를 양이온 mode에서 측정하였으며 (JMS-DX 303 HF Mass Spectrophotometer, Nihon Denshi, Japan), HIREMS는 Electron Impact (EI)상에서 positive mode로 측정하였다.

proton 및 ¹³C 핵자기 공명 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) spectrum은 CD3OD을 용매로 500 MHz (Varian Unity-500 NMR spectrometer, Varian)에서 측정하였다.

X선 결정 해석

정제된 항균 물질을 benzene-acetone 혼합 용매계에서 단결정을 작성하였으며, 단결정에 대한 X선 해석은 직접법으로 MULTAN에 유사한 신법 SIR94 (MAC SCIENCE)을 이용하여 MXC 18 (MAC SCIENCE)로 행하였다.

결과 및 고찰

형태적 특성

균주를 ISP-2 배지에서 30°C, 7일간 배양한 기질균사는

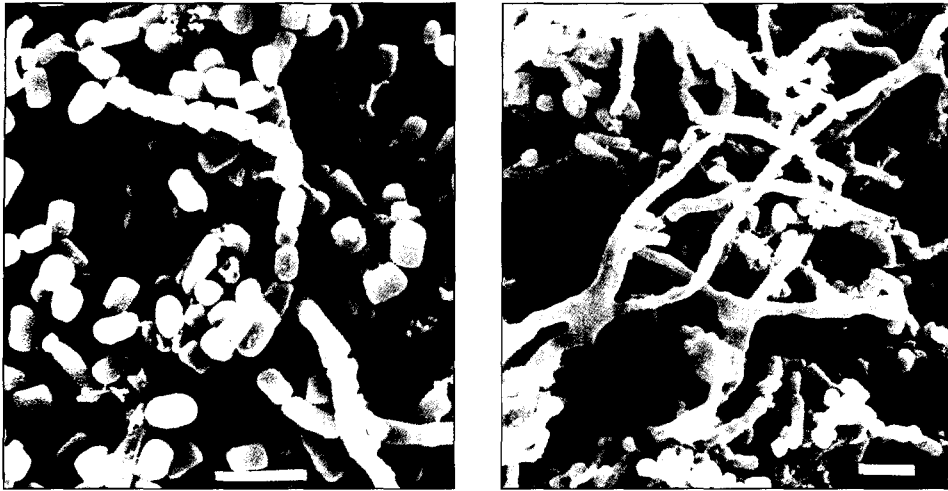


Photo 1. Scanning Electron Micrograph (SEM) of aerial spore chains of *Streptomyces* sp. strain MSA-1, cultured 7 days at 30°C on ISP-2 medium (Bar 10 μ m).

brown색을 나타내었으며, 그 위로 ivory색의 기중균사를 형성하였다. 기중균사가 발달한 포자의 형태는 oval 형태이며 10개 이상의 포자들이 연결되어 flexibilis형의 포자 시슬을 이루고 있었다 (Table 1). 또, 포자의 표면은 주사전자 현미경으로 관찰한 결과, 특이적인 돌출물을 갖고 있지 않은 smooth 형태였다 (Photo 1).

화학분류학적 특성 및 균주의 동정

세포벽 가수분해물로부터는 L-form의 DAP isomer가 검출되었고, 특정한 당이 검출되지 않는 것으로 보아 세포벽은 type I형이었다. 인지질은 phosphatidylethanolamine이 검출되어 PII type으로 확인되었으며, 지방산은 총 16개가 동정되었고, 그 중 iso-14 : 0 (5.4%), anteiso-15 : 0 (34.9%), iso-16 : 0 (27.1%), 16 : 0 (7.1%), iso-17 : 0 (5.1%) 등 iso, anteiso의 branched 지방산이 주요 지방산이었다 (Table 1).

이상의 결과와 Choi and Park (1993)의 생리적 특성에 관한 보고를 검토하여 이 방선균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 의해 *Streptomyces* sp.로 동정하였다 (Goodfellow, 1989, Lechevalier, 1989, Locci, 1989).

항균 물질의 성상

TMS 칼럼에서 항균물질은 15분에 용출하였으나 tailing 현상을 나타내었으며, 최종적으로 10 mg의 항균물질을 분리 정제하였다. 그러나, HPLC 상의 tailing에도 불구하고 TLC 에서는 Rf 0.4에 진한 녹색으로 하나의 spot를 나타내어 불순물이 없음을 알수 있었으며, drageendorff 시약을 분무하여 가열하면 주황색으로 발색되어 3급 또는 4급 질소의 존재가 추정되었다. 정제된 물질은

연한 노란색의 무취 분말로서, 물과 hexane에는 녹지 않았고, DMSO에 잘 용해하였다. 또, MeOH 및 chloroform에는 약간 녹았으며, MeOH 용액중에서는 냉동고에 보관중에도 결정이 생성되었다.

항균물질의 각종 spectra 해석

MeOH 용액중에서 측정된 UV spectrum에서는 292 nm 파장에서 최대 흡수를 나타내었다. 한편, positive mode에서 측정된 FAB-MS spectrum에서는 m/z 467에 $[M+H]^+$ 의 분자 이온 peak가 나타나 분자량은 466으로 추정되었다 (Fig. 1). 또, HIREMS 에서는 m/z 466.1956 (Err : -4.8 mmu)이 관측되었으며 이에 상당

Table 1. Morphological and chemotaxonomic characteristics of *Streptomyces* sp. strain MSA-1, isolated from sponge (*Halichondria okadai*), cultured at 30°C for 7 days on ISP-2 medium (pH 7.4).

Spore chain morphology	Flexibilis
Spore surface ornamentation	Smooth
Form of spore	Oval
Color of aerial spore mass	Gray
Aerial mycelium	Chains of arthrospores
Ccolor of substrate mycelium	Bbrown
Substrate mycelium	Not fragmentation
Cell wall type	I
DAP	L-DAP
Sugar isomer	Not applicable
Phospholipid	PII
Major fatty acid	iso-14 : 0, anteiso-15 : 0, iso-16 : 0, 16 : 0, iso-17 : 0

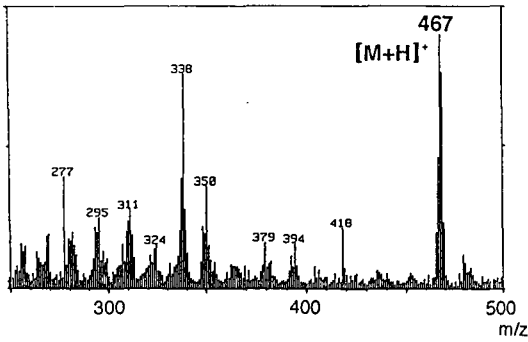


Fig. 1. Higher field of FAB-MS spectrum for antimicrobial component (positive mode).

하는 분자식으로 질소를 4개 포함한 $C_{28}H_{26}O_8N_4$ 를 얻었으며, 이 분자식은 검색 결과 기지 물질인 staurosporine (Buckingham, 1994)과 일치하였다.

단결정의 X선 해석에 의한 구조 해석

단위격자를 결정하기 위한 예비측정에서 결정계는 monoclinic 이었고, 격자 정수는 각각 $a=24.58(1) \text{ \AA}$,

$b=7.627(4) \text{ \AA}$ $c=15.947(6) \text{ \AA}$ $\alpha(a)=90.00(0)$ degree, $\beta(b)=118.26(3)$ degree, $\gamma(c)=90.00(0)$ degree, $Z=4$ 이었다. 또한, 단결정 밀도 (Dobs ; Dcalc)는 $1.20 : 1.17 \text{ g/cm}^3$, space group은 C2로 나타났다. 이러한 단위격자를 가진 연한 노란색의 판상 결정에 대하여 2,581 점의 독립된 반사를 측정하여 X선 결정구조를 해석하여 staurosporine의 결정 구조를 해석한 Furusaki et al. (1982)의 자료와 비교하였다.

이 결과, 이 결정 한 분자에는 아세톤 한 분자가 결합한 단위 격자를 형성하고 있었고, Fig. 2에 나타낸 바와 같은 골격의 구조를 갖는 것으로 해석되었으며 (등방성 온도 인자, 결합각, 결합 거리, 비틀림각 data 생략), 이는 staurosporine의 구조와 일치하였다.

Proton 및 ^{13}C NMR spectrum

500 MHz에서 MeOH- d_4 를 용매로하여 측정된 proton 및 ^{13}C NMR spectrum을 Fig. 3과 Fig. 4에 나타내었다. proton NMR 상에서는 7 ppm 이하의 저자장측에는 벤젠환에 결합된 8개의 methin proton에 해당하는 signal

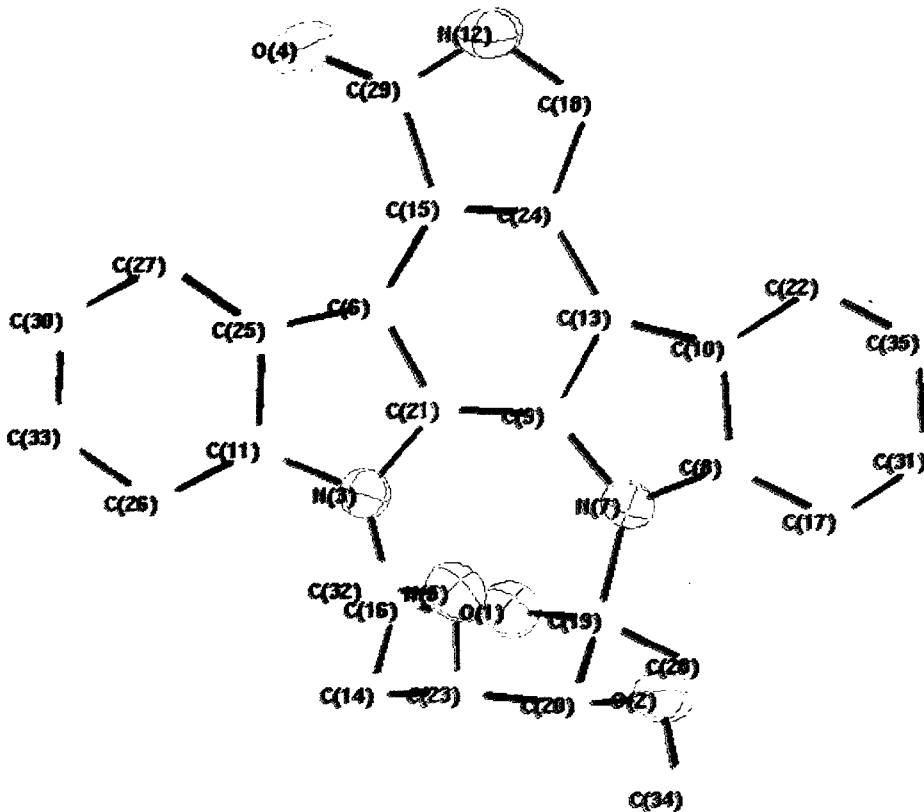


Fig. 2. Perspective view of the antimicrobial component molecule (showing the crystallographic numbering).

Table 2. Comparison of the ^1H and ^{13}C chemical shifts (ppm) assignment between staurosporine (Str) and antimicrobial component (Amc) isolated from *Streptomyces* sp. strain MSA-1

Position	^1H		^{13}C		Position	^1H		^{13}C	
	Amc	Str*	Amc	Str*		Amc	Str*	Amc	Str*
1-H	7.24	7.26	109.8	106.9	10-H	7.42	7.41	126.5	124.1
2-H	7.41	7.46	127.1	125.0	11-H	7.89	7.91	116.4	115.1
3-H	7.32	7.35	121.2	119.7	11a			141.6	139.7
4-H	9.23	9.42	127.9	127.1	12a			132.7	130.7
4a			125.2	123.4	12b			128.9	128.3
4b			117.2	115.3	13a			138.9	136.6
4c			134.7	132.2	2'			94.3	91.1
5			176.4	173.6	3'-H	4.00	3.86	85.1	84.1
6-H	—**	6.81			4'-H	3.31	3.33	53.8	50.4
7-H	4.89	4.99	47.9	46.0	5'-H	2.63	2.71	31.8	30.1
7a			120.3	118.4		2.41	2.39		
7b			116.2	114.0	6'-H	6.53	6.52	83.0	80.1
7c			126.6	124.6	Me	2.36	2.33	30.8	30.0
8-H	7.96	7.87	122.8	120.6	OMe	2.97	3.37	59.7	57.3
9-H	7.27	7.30	122.2	119.9	NMe	1.85	1.54	34.0	33.3

* data are from Meksuriyen and Cordell, 1988) measured in CDCl_3 .

** not observed.

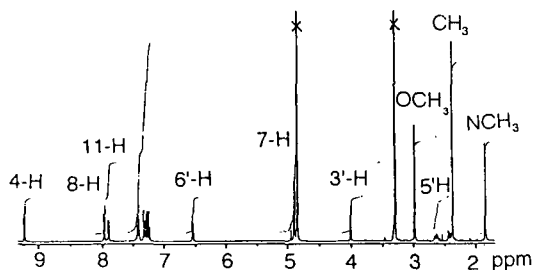


Fig. 3. Proton NMR spectrum of antimicrobial component isolated from *Streptomyces* sp. strain MSA-1 associated with black sponge (MeOH-*d*, 500 MHz). Numbers mean the position of proton at Fig. 5.

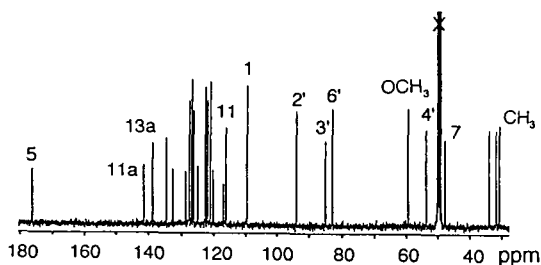


Fig. 4. ^{13}C NMR spectrum of antimicrobial component isolated from *Streptomyces* sp. strain MSA-1 associated with black sponge (MeOH-*d*, 500 MHz). Numbers mean the position of carbon at Fig. 5.

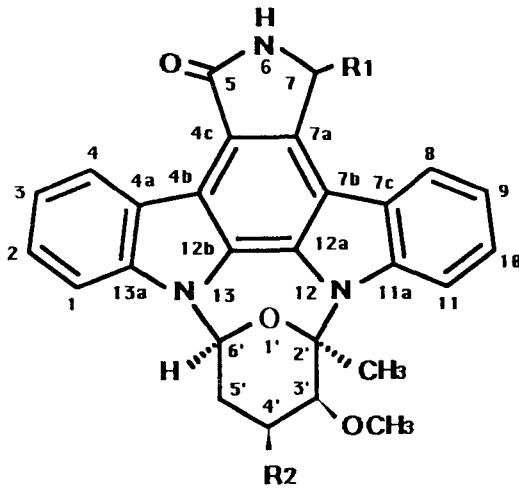
들이 관측되었으며, 6.53 ppm에는 한 개의 oxy methine proton의 존재가 확인되었다. 3개의 methyl proton은 각각 1.85 ppm, 2.36 ppm, 2.97 ppm에 singlet의 peak로 관측되었으며 (Fig. 3), 비등가의 methylene proton이 1.5 ppm 부근에 관측되었다.

한편, ^{13}C NMR spectrum에서는 176.4 ppm에 1개의 carbonyl 탄소, 100 ppm~160 ppm 사이에 18개의 방향족 탄소 그리고, 미지의 탄소 9개의 signal이 각각 관측되었다 (Fig. 4). 특히, 83 ppm~100 ppm 사이의 3개의 signal은 acetal 또는 carbinalamine으로 추정되었다.

Proton 및 ^{13}C NMR spectrum의 chemical shift는 Table 2에 나타내었다. 이미 X선 결정 해석에서 정제된 항균물질은 staurosporine으로 추정되었기 때문에 이들의 귀속은 staurosporine 및 그의 유도체들 (Fig. 5)의 NMR spectrum을 귀속한 Meksuriyen and Cordell (1988)과 Koshino et al. (1992a,b) 등의 data와 비교하였다. 이들의 chemical shift 값은 MeOH-*d*를 용매로 사용하였기 때문에 signal이 관측되지 아니한 6위 및 4위의 NH proton 이외에는 완전히 일치하였다.

이상의 MS, NMR 및 X선 결정구조 해석에 의하여 해면으로부터 분리한 방선균이 생산한 항균물질은 indolo[2,3-*a*]carbazole alkaloid 유도체인 staurosporine으로 동정되었다.

이 물질은 일본 Iwate 지방의 토양에서 분리된 방선균주 *Streptomyces staurosporeus* AM-2282으로부터 Omura et al. (1977)에 의하여 항균성 물질로서 최초로



	R ₁	R ₂
Staurosporine	H	NHCH ₃
UCN-01	OH	NHCH ₃
UCN-01-Me	OCH ₃	NHCH ₃
RK-286C	H	OH
CGP41251	H	N (COPh) ₂ CH ₃

Fig. 5. Structure of staurosporine and its derivatives.

발견되었다. 한편, 이 균주는 Takahashi et al. (1995)에 의하여 *Saccharothrix aerocolonigenes* (Labeda 1986) subsp. *staurosporeus* subsp. nov.로 재명명되었으며, 금번에 staurosporine을 생산하는 것으로 발견된 방선균주는 화학적 분류 특성상 세포벽의 DAP isomer가 L형이며 meso형의 아미노산 DAP를 가진 *Sacch. aerocolonigenes*와는 다른 속이다.

수종의 *Streptomyces* 균주들로부터 여러 종류의 staurosporine 유도체들이 보고되었으며 (Fig. 5, Omura et al., 1995, Buckingham, 1994), 특히, 11-Hydroxystaurosporine 및 3,11-Hydroxystaurosporine은 갈색명계의 일종인 *Eudistoma* sp. 로부터 발견되었다 (Kinnel and Scheuer, 1992).

staurosporine은 마우스에 대하여 급성 독성 (6.6 mg/kg, ip.)을 나타내며 세균보다는 곰팡이와 효모에 대한 항균성이 강하다 (Meksuriyen and Cordell, 1992). 항균성 뿐 아니라, 혈압 강하 작용, 형구 응집 저지 작용, protein kinase C 억제 작용, 항암 작용, macrophage-activating property, immunosuppressive activity등 여러 가지 생리활성이 있는 것으로 알려졌으며 각종 생화학 시약으로서 널리 이용되고 있는 천연물의 하나이다 (Omura et al., 1995).

미생물은 2차 대사산물이 다양하며 지금까지 미생물로부터 탐색된 10,000 여종의 생리활성 물질 중 2/3가 방선

균으로부터 발견된 것으로서 방선균은 의약, 식품소재등 각종 생물 소재 산업에 있어서 산업적으로 가장 중요한 미생물로 인식되고 있다 (Kim et al., 1996; 김, 1997). 한편, 현재까지는 대부분 육상의 토양이나 생물을 주대상으로 하여 연구가 되어져 왔으며, 해양생물을 시료로 한 연구는 많지 않다 (이, 1995). 따라서, 금후 해양으로부터 방선균을 찾아내고 이들이 생산하는 생리활성물질을 보다 적극적으로 탐색하고 이용하여야 할 것이다.

한편, 검정해면으로부터 staurosporine을 생산하는 방선균이 동정된 것은 처음으로서 현재 이 균주의 종동정과 함께 이 균주가 생산하는 또 다른 생리활성을 검색 중에 있으며, staurosporine의 대량 배양조건도 검토 중에 있다.

요 약

검정해면 (*Halichondria okadai*)에 공생하는 것으로 추정되는 항균성을 가진 방선균주를 분리하여 SEM, 형태학적, 화학 분류학적 방법에 의하여 균주를 동정하였으며, 이 균주를 marin broth 2216 배지에서 대량배양하여 균사체로부터 항균물질을 각종 HPLC에 의하여 분리하고 X선 결정 구조 해석, MS, NMR spectrum에 의하여 구조를 확인하였다.

ISP 2 배지에서 30°C, 7일간 배양 결과, 기질균사는 갈색을 띄었고 그위로 ivory색의 기중균사를 형성하였다. spore chain은 flexibilis로서 10개 이상의 oval 형의 포자가 사슬을 형성하고 있었으며 표면은 smooth하였다. 한편, 화학적 특성으로는 L-form의 DAP를 가지며 특징적인 당이 없는 cell wall type I 이었고, 인지질은 PII형 이었으며, 주요 지방산은 iso-14:0, anteiso-15:0, iso-16:0, 16:0 및 iso-17:0 이었다. 이들 결과와 Bergey's Manual에 의해서 이 균주는 *Streptomyces* sp.로 동정하였다.

대량 배양한 동결 건조 균체 70g 으로부터 10mg의 연한 노란색의 항균 물질을 분리 정제하였다. 질량 분석에서 이 물질의 분자량은 466으로 확인되었고, 이를 benzene-acetone 용매중에서 결정화하여 X선 결정 구조 해석을 행한 결과 indolo[2,3-a]carbazole alkaloid의 staurosporine으로 판명되었으며 proton 및 carbon NMR data도 이와 잘 일치하였다.

감사의 말씀

이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비(지방대학육성)에 의하여 연구되었으며 이에 감사

드립니다. X선 결정 구조를 해석하여 주신 Nissan Chemical Industries Ltd. 생물과학 연구소의 biotechnology group, 균주를 동정하여 주신 해양연구소의 이홍금 박사, 지방산을 동정하여 주신 본 대학의 정보영 교수, SEM을 촬영하여 주신 부산 백병원의 성희경 박사, MS, NMR spectrum을 측정하여 주신 Tohoku University의 Yasumoto 교수께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Bligh, E.G., and W.J. Dyer. 1959. A rapid method of lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911~917.
- Buckingham, J. 1994. Dictionary of natural products. vol. 9. Chapman and Hall. London. pp. 5233.
- Choi, J.D. and W.Y. Park. 1993. I. Isolation and cultural conditions of the marine Actinomycetes No. 101 producing antimicrobial compounds. Identification of the marine microorganisms producing bioactives. *Bull. Korean. Fish. Soc.* 26, 305~311 (in Korean).
- Colwell, R., D. Santavy, F. Singleton, T. Breschel, and T. Davidson. 1989. Marine bioactive metabolites. In *Current Topics in Marine Biotechnology* (eds. Miyachi, S., I. Karube, and Y. Ishida). Jap. Soc. Mar. Biotech., Tokyo. pp. 37~40.
- Faulkner, D.J., 1994. Marine natural products. *J. Nat. Prod. Rep.*, pp. 361~387.
- Furusaki, A., N. Hashiba, T. Matumoto, A. Hirano, Y. Iwai, and S. Omura. 1982. The crystal and molecular structure of staurosporine, a new alkaloid from a *Streptomyces* strain. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 55, 3681~3685.
- Goodfellow, M. and D.E. Minikin. 1985. *Chemical Method in Bacterial Systematics*. Academic Press. London. pp. 131~143.
- Ireland, C.M., B.R. Copp, M.P. Foster, L.A. McDonald, D.C. Radisky, and J.C. Swersey. 1993. Biomedical potential of marine natural products. In *Marine Biotechnology* (eds. Attaway, D.H., and O.R. Zaborsky). Marine Biotechnology vol I. Plenum Press. New York. pp. 1~44.
- Juaneda, P. and G. Rocquelin. 1985. Rapid and convenient separation of phospholipids and nonphosphorous lipids from rat heart using silica cartridges. *Lipids*, 20, 40~41.
- Kim, S.Y., D.J. Park, O.S. Kwon, C.Y. Lim, P.K. Kim, S.W. Lee, and C.J. Kim. 1996. Evaluation of antimicrobial activities of domestic actinomycetes strains. *Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol.* 24, 166~172 (in Korean).
- Kinnel, R.B., and P.J. Scheuer. 1992. 11-Hydroxystaurosporine: A highly cytotoxic, powerful protein kinase C inhibitor from a tunicate. *J. Org. Chem.* 57, 6327~6329.
- Koshino, H., H. Osada, and K. Isono. 1992a. A new inhibitor of protein kinase C, RK-1409 (7-oxostaurosporine). *J. Antibiotics*, 45, 195~198.
- Koshino, H., H. Osada, S. Amano, R. Onose, and K. Isono. 1992b. A new inhibitor of protein kinase C, RK-1409B (4'-demethylamino-4'-hydroxy-3'-epistaurosporine). *J. Antibiotics*, 45, 1428~1432.
- Lechevalier, H.A. 1989. A practical guide to generic identification of Actinomycetes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol. 4. (eds. S.J. Williams, M.E. Sharpe, and J.G. Holt). Williams and Wilkins Press. Baltimore, pp. 2344~2347.
- Lee, J.S., S.K. Moon, and I.S. Kim. 1991. Studies on the antibacterial, antifungal components in some Korean marine sponges. *Bull. Korean Fish. Soc.* 193~202.
- Locci, R. 1989. Streptomyces and related genera. A practical guide to generic identification of Actinomycetes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol. 4. eds. S.J. Williams, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. Williams and Wilkins Press, Baltimore. pp. 2451~2492.
- Meksuriyen, D. and G.A. Cordell. 1988. Biosynthesis of staurosporine, 1. ¹H- and ¹³C-NMR assignment. *Nat. Prod.*, 51, 884~891.
- Moon, S.K. 1993. Studies on the lipid components in Sweetfish from Korea-I. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 26, 235~240 (in Korean).
- Omura, S., Y. Sasaki, Y. Iwai, and H. Takeshima. 1995. Staurosporine, a potentially important gift from a microorganism. *J. Antibiotics*, 48, 535~548.
- Schaal. 1985. Identification of clinically significant actinomycetes and related bacteria using chemical techniques. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics* (eds. Goodfellow, M. and D.E. Minikin). Academic Press, New York. pp. 359~381.
- Staneck, J.I., and G.D. Roberts. 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin layer chromatography. *Appl. Microbiol.* 119, 226~231.
- Stierle, A.C., J.H. Cardellina, and F.A. Singleton. 1988. A marine *Micrococcus* produce metabolites ascribed to the sponge *Tedais ignis*. *Experientia*, 44, 1021.
- Takahashi, Y., M. Shinose, A. Seino, Y. Iwai, and S. Omura. 1995. Transfer of staurosporine-producing strain *Streptomyces staurosporeus* AM-2282 to the genus *Saccharothrix aerocolonigenes* (Labeda 1986) subsp. *staurosporeus* subsp. nov. *Actinomycetol.* 9, 19~26.
- 김장진. 1997. 산업적 유용 방선균의 분리 및 분류. *생물산업*, 10, 34~43.
- 신중현. 1994. 한국근해 저서 균체생물로부터 신물질 추출연구. 과학기술처. BSPN 00229-734-4.
- 이홍금. 1995. 해양생물의 공생미생물로부터 생리활성물질의 탐색. *생물화학*, 9, 25~30.

1997년 12월 31일 접수

1998년 7월 6일 수리