

*Penicillium islandicum*에 의한 Skyrin의 생합성

조성환 · 존 에이 앤더슨*

경상대학교 농과대학, 텍사스 테크 대학교*
(1984년 7월 11일 수리)

Biosynthesis of Skyrin in *Penicillium islandicum*

Sung-Hwan Cho and John A. Anderson*

Gyeongsang National University, Texas Tech University*

Abstract

Skyrin was extracted from *Penicillium islandicum* cultivated on synthetic Czapek-Dox medium. A preliminary experiment in *Penicillium islandicum* using [^{14}C]-acetate proved the incorporation of [^{14}C] into skyrin. In the cell-free system using the fungus [^3H]-emodin and [^3H]-emodinanthrone were shown to give some reliable evidences for the biosynthesis of skyrin. The incorporation of [^2H]-emodin was less significant than that of [^3H]-emodinanthrone. As a result of the cell-free experiment, the biosynthetic pathway of skyrin by the fungus was suggested as follows: emodinanthrone→emodin→skyrin.

서 론

*Penicillium islandicum*은 곡류에 기생하여 독소물질인 황색색소 Skyrin을 비롯하여 luteoskyrin, iridoskyrin, islandicin등을 생성하여 황변미를 초래하는 균주이다¹⁾. 이 균주는 처음 1912년 Iceland에서 제조된 요구르트의 일종인 "Skr"에서 분리·동정되었다²⁾. 이 곰팡이로 부터 생산·정제된 색소의 이름을 skyrin이라 명명하였다. Raistrick등³⁾은 *Penicillium islandicum* NRRL 1175의 대사산물로 부터 황색색소인 skyrin과 flavoskyrin을 분리하였고, 1950년대초에 Shibata등⁴⁾은 썩은 나무곰팡이로부터 orange색소와 황색색소를 따로 분리하고 각각 enothiamin, radicalisin이라 명명했으나

Raistrick연구팀이 *Penicillium* spp.에 의해 생합성된 rugulosin을 분리·동정한 이후 이들은 썩은 나무곰팡이 색소가 각각 skyrin과 rugulosin임을 재 확인하였다. 이와같이 *Penicillium* spp.에 의하여 생성되는 anthraquinoid mycotoxin은 acetyl- 및 malonyl-CoA로 부터 polyketide를 경유하여 생합성되며 [^{14}C]-acetate등 방사성동위원소를 함유한 출발물질로 진행된 사양실험결과에서 이와같은 경로가 입증되어 왔다.^{5~7)} 한편, [^{14}C , ^{18}O]-acetate를 사용하는 실험에서 *P. islandicum*은 [^{18}O]로 구성된 skyrin을 생합성함을 알 수 있었으며, 이때 skyrin의 단량체인 emodin에도 [^{18}O]가 5군데 주입되어 있다는 사실이 밝혀져 acetate→polyketides→emodin→skyrin의 생합성 경로를 예상할 수 있게 하였다.^{6,8)} 이와 같은 대사경로는 emodin

* 본 연구는 1983년도 농촌진흥청 농업과학협동기금의 지원으로 이루어졌음

이 *Penicillium brunneum* Udagawa의 중요대사 산물이며 [¹⁴C]-emodin이나 [¹⁴C]-emodinanthrone 모두 *P. islandicum* NRRL 1036의 feeding experiment에서 skyrin등의 anthraquinoids로 주입된다는 연구결과^{9,10})에 의하여 확인될 수 있었다.

그러나 앞서 열거한 연구보고들은 대부분 [¹⁴C]-함유기질물질을 첨가한 배지에서 균주를 배양하여 그 기질물질이 대사산물로 주입되는 비율을 측정함으로써 대사경로를 추정하는 Feeding experiment이었다. 따라서, 본 연구에서는 균체로부터 효소를 추출·정제하고 [³H]등의 방사성동위원소를 함유한 기질물질을 이용하여 균체의 효소반응시켜 skyrin 생합성경로를 밝히는 cell-free system의 실험을 행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

재료 및 방법

1. 균주배양

Penicillium islandicum NRRL 1175는 malt extract agar 배지 (Table 1.)를 slant media로 하여 2달마다 계대배양한 것을 30°C의 암실에서 1달 동안 배양하고 4°C에서 보관하면서 액체배양용 균주로 이용하였다.

멸균된 0.6% NaCl 용액을 균이 배양된 slant media에 부어 glass beads를 사용하여 균질한 현탁용액을 glass wool상에서 여과하여 사용전까지 0°C에 보관하였다. 이 균주포자현탁액을 살균·냉각한 Czapek-Dox media에 접종하여 30°C의 암실에서 배양하였다.

2. 균사체로부터 Emodin의 분리 및 동정

0.84mCi의 carboxyl labeled sodium acetate (4.8mg, specific activity; 11.7mCi/mmole)를 84ml의 증류수에 용해·살균한 용액을 8일간 배양한 9개의 flask배지표면에 생육한 균사체 밑에, 분주한 후, 계속해서 12일간 배양하였다. 배양이 완료된 균사체는 증류수로 3번 세척하고 3일간 풍건하고 Gatenbeck⁵⁻⁷⁾ 및 Gröger등¹¹⁾의 방법에 의하여 색소추출물중에서 skyrin을 확인하고, Na₂S₂O₄로 분해한 후, Silica column chromatography를 행하고 정제한 emodin KBr disk를 만들어 IR-spectrophotometer (Beckman Co., U.S.A.)에 의하여 작성된 IR-spectrum을 표준제품 emodin (Sigma Chemical Co., U.S.A.)의 것과 비교·동정하였다.

3. 효소기질인 [³H]-Emodin 및 [³H]-Emodinanthrone의 조제

가. [³H]-Emodin의 조제 : 유리시험관에 포장되어 있는 [³H]-emodin (Sigma Chemical Co. 제품 135m Ci/25ml ethanol)의 꼭지를 file로 절단하여 수기에 옮기고 계속 소량의 ethanol로 세척하여 모은 것을 rotary vacuum evaporator를 사용하여 증발·건조하고 실온에서 포화될 때까지 chloroform으로 용해시킨 후 감압·증발하여 결정체를 생성시켜 ice box에서 냉각하고 glass filter를 사용하여 여과해서 황색색의 순수한 [³H]-emodin 결정 161.5mg을 얻고, 이것의 일부를 ethanol에 용해시켜 효소기질로 사용하였다.

나. [³H]-Emodinanthrone의 합성 : 이상에서 조제한 [³H]-emodin의 일부에 CH₃COOH 및 50% HI를 가한 후 가열하고 감압·증발하여 39.2%의 수량에 해당하는 [³H]-emodinanthrone 결정체를 얻고 (Diagram 1.) 이것을 N,N-dimethylformide에 용해시켜 탈기한 후 N₂ gas로 충전하여, [³H]-emodin과 같이 4°C 냉장고에 보관하여 다음 효소 실험의 기질로 이용하였다.

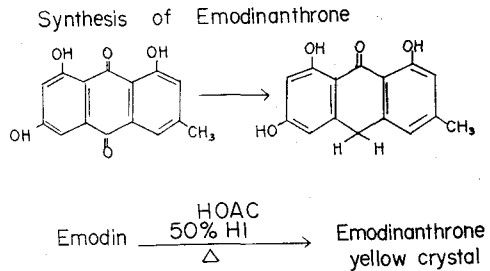


Diagram 1. Synthesis of emodinanthrone by the oxidation of emodin

4. Skyrin 생성 균체효소의 정제^{12,13)}

배양하여 얻은 균사체를 냉동시켜 보관 하면서 그 일부를 취하여 buffer용액을 가한후 Virtis '45' homogenizer를 사용하여 1분 간격으로 2번 최대 속도로 균질화한 시료 용액을 얻고 이 균질용액을 20°C에서 8000r.p.m.으로 20분간 냉동원심분리 하였다. 그 상등액을 투석·농축하여 얻은 용액을 시료로 하여 potassium phosphate buffer (pH 7.4)를 전개용매로 Sephadex column chromatography를 행하고 280nm에서 UV-monitoring system이 부착된 Fraction collector를 이용하여 효소 단백부를 수집, 균체의 효소반응의 효소용액으로 정제하

였다.

5. 균체의 효소실험

배양 균체로 부터 정제한 효소의 최적 활성조건

을 규명하여 다음 Table 1.과 같이 알실에서 효소 기질 및 기타 반응물질을 vial속에 혼합하고 25°C 의 water bath에서 진탕하면서 12시간 동안 반응시켰다.

Table 1. Incubation experiments of cell-free system under various conditions

Reactant	Code No.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Enzyme*3		0.9ml	0.9ml	0.9ml	—	0.9ml	0.9ml	0.9ml	—
Boiled Enzyme		—	—	—	0.9ml	—	—	—	0.9ml
Emodin*1		20μl	20μl	20μl	20μl	—	—	—	—
Emodinanthrone*2		—	—	—	—	20μl	20μl	20μl	20μl
H ₂ O ₂ (0.9%)		—	20μl	—	—	—	20μl	—	—
Glucose+Glucose oxidase		—	—	ample	—	—	—	ample	—

*1. 3.5mg ³H Emodin/10ml Ethyl alcohol

*2. 3.5mg ³H Emodinanthrone was dissolved in 10ml. of dimethylformamide in vial equipped with rubber septum stopper and kept under N₂. The aliquot was taken up and adden to incubation mixture.

*3. Protein in enzyme solution: 1.625μg/μl

균체의 효소반응액을 N₂ gas로 증발·농축 시킨 후 TLC plate상에 spotting하여 chloroform-methanol-2% formic acid (10 : 1 : 1)의 혼합액을 전개용매로 전개시킨다. 건조한 TLC plate를 Packard 7220 radioactivity scanner에 걸어 radioactivity를 가진 반응물질의 방사능폭선을 그려 각 spot를 분리·확인한 후 각 부위에 해당하는 TLC plate의 silica gel을 끊어내어 vial에 넣고 20ml의 scintillation cocktail (Aldrich chemical Co., U.S.A. 제품)을 첨가하여 세계 진탕하고 Scintillation counter (Beckman, U.S.A.)로 각 용액의 radioactivity (cpm)을 측정하였다. 이 측정치를 다음 공식에 대입하여 첨가된 Emodin (또는 Emodinanthrone)의 total cpm에 대한 skyrin 부분의 획득비를 구하고 대조구의 그것을 빼서 효소반응에 의한 skyrin 전환율(%)을 계산하였다.

$$\text{cpm Skyrin} = \frac{\text{Area of Skyrin}}{\text{Area of Emodin(or Emodinanthrone)}}$$

$$\times \text{cpm } ^3\text{H Emodin Standard (or } ^3\text{H Emodinanthrone)}$$

$$\% \text{ Skyrin} = \frac{\text{cpm of Skyrin region}}{\text{Total cpm added}} \times 100$$

배양균체로 부터 정제한 효소의 최적반응조건을 알기 위하여 pH 4~8의 Buffer solution에서 각 균체의 효소반응계를 작용시켜 Emodin→Skyrin전환 비율을 측정 한 결과는 Tabel 2와 같다. 즉, 효소 반응계에 의한 emodin의 skyrin 전환율은 반응계

의 pH 5에서 가장 높은 비율을 보였다. 따라서 본 실험의 효소반응계는 완충용액으로 pH 5.0이 되도록 조정하여 효소반응시킨후 생성물을 분리·정제하여 각각의 전환율을 산출하였다.

Table 2. % Conversion from emodin to skyrin in the cell-free experiments according to pH of the reaction mixture

pH of Reaction Mixture		% Conversion of
Initial pH	Final pH	Emodin→skyrin
4	3.2	1.2
5	4.8	2.3
6	5.9	1.2
7	6.8	0.9
8	7.5	0.7

결과 및 고찰

1. 균사체로 부터 Emodin및 Skyrin의 분리및 동정

[¹⁴C]-acetate배지에 균주를 접종·배양하고 균사체로 부터 황갈색의 색소물질을 용출하여 이것을 Silica column chromatography에 의해 3~4개의 color band로 분리한후, skyrin band를 acetone으로 추출하여 TLC plate상에 spotting하고 CHCl₃

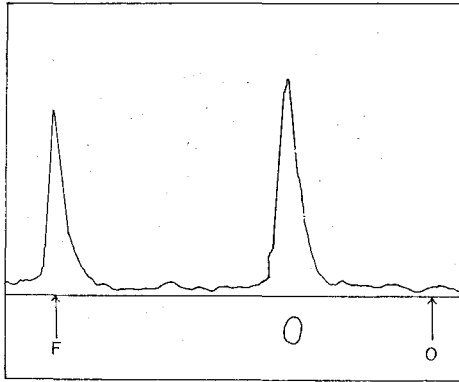


Fig. 1. Radioactivity scan of skyrin isolated from the cultures of *Penicillium islandicum*
 O : origin F : Front

—MeOH—HCOOH (2%) (10 : 1 : 1) 용액으로 전개시키고 Packard 7220 radioactivity scanner에 걸어 Fig. 1에서와 같이 radioactive skyrin band를 확인할 수 있었다.

Gatenbeck⁹⁾, Sankawa등¹⁰⁾의 Feeding experiment에서 skyrin으로 주입되는 radioactive acetate의 specific incorporation rate(%)가 5이하인데 비하여 본실험에서는 7.5를 나타내었다. 아울러, 위방법에서 수거한 skyrin을 Na₂S₂O₄로 분해하고 정제하여, 표준제물과 IR-spectrum이 동일한 m.p. 256~257°C의 황색결정인 emodin 315mg을 얻을 수 있었다(Fig. 2.).

Fig. 1.과 Fig. 2.의 실험결과로 미루어, 본 실험에서 사용한 *Penicillium islandicum*은 acetate배지에서 emodin의 이중합체인 독성색소성분 skyrin을 생합성함을 확인할 수 있었다.

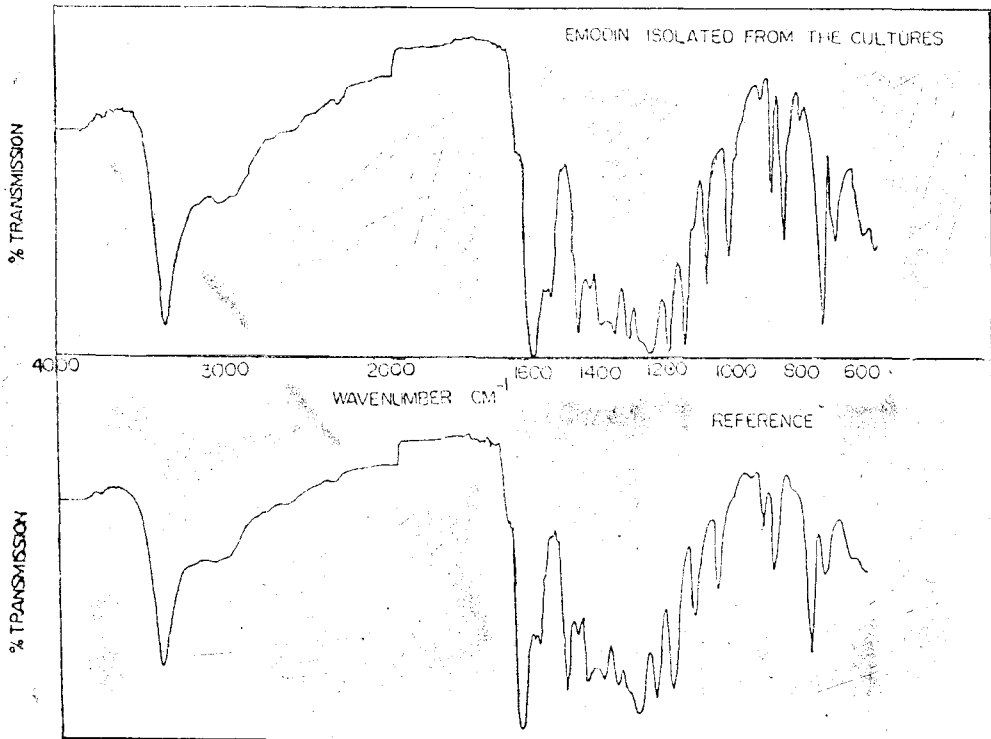


Fig. 2. IR-spectra of emodin isolated from the cultures of *Penicillium islandicum*.

2. Liquid Chromatography

배양균사체를 buffer용액으로 균질화하고 원심분리한 후, 투석·농축한 조효소용액을 Sephadex G-200 Column Chromatography에 의하여 정제한 결과는 Fig. 3.과 같다.

즉, Fig. 3은 각 tube에 대한 280nm에서의 흡광도를 도시한 것이다. 효소단백분획을 모아 냉동건조한 후 methanol에 녹이고 여과하여 시료속에 함유되어 있는 다량의 불순물을 제거하고 감압농축한 다음, 기질물질 emodin에 반응시켜 작성한

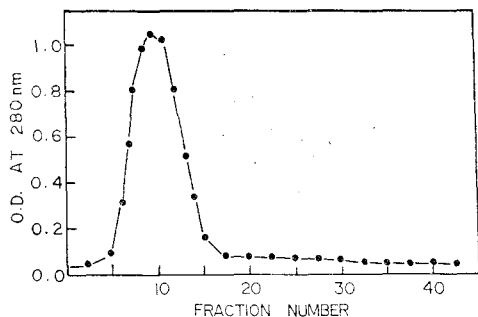


Fig. 3. Gel filtration of the crude enzymes extracted from the cultured mycelia of *Penicillium islandicum* on Sephadex G-200.

Lineweaver-Burk plot로 부터 산출한 V_{max} 값은 $78.5 \mu\text{moles/liter}\cdot\text{min}$ 이었고 K_m 값은 $3.9 \times 10^{-5} M$ 이었다.

3. 균체의 효소반응에 의한 Skyrin의 생합성

Emodin을 기질로 하여 일정시간 반응시킨 효소 반응액을 TLC plate에 spotting하여 전개한 후 radioactivity scanner에 걸어, radioactivity peak를 나타내는 각 생성물을 동정하고 각 silica band를 긁어 내어 scintillation cocktail solution으로 용출하여 scintillation counter에 의하여 radioactivity를 측정된 결과는 Table 3과 같았다.

즉, emodin을 기질로 한 효소반응 결과, skyrin

Table 3. Radioactivity of isolated compounds in the cell-free experiments using emodin as substrate

Code No.	Enzyme Reactions	Radioactivity (cpm)				%	Conversion ratio (%)
		Origin	skyrin	Emodin	Above Emodin		
I	Control (Emodin+Enzyme)	13,627	3,628	179,221	1,845	1.8	0.2
II	Control+H ₂ O ₂	9,997	4,130	126,409	1,087	2.9	1.3
III	Control+Glucose +Glucose oxidase	10,057	4,817	106,287	1,555	3.9	2.3
IV	Boiled Control	41,306	3,812	184,656	3,890	1.6	0.0

$$\% \text{ Skyrin} = \frac{\text{cpm of skyrin region}}{\text{total cpm}} \times 100$$

이 생합성되는 것을 알 수 있었다. 처리구간별로 볼 때 효소만이 반응에 관여한 control 구(I)보다는 효소반응액에 첨가된 H₂O₂(II)나, glucose에 glucose oxidase가 작용하여 발생하는 H₂O₂에 의하여 효소반응이 더 촉진되는 것(III)으로 나타났으며 효소반응에 의한 skyrin으로의 전환율은 각각 (I)시험구 0.2%, (II)시험구 1.3%, (III)시

험구 2.3%이었다.

한편, emodinanthrone을 기질로 한 효소반응의 생성물은 emodin의 경우와는 달리, skyrin 이외에도 Rf값이 가장 작은 곳에 위치한 미확인 물질과 산화반응결과 생성된 emodin등의 존재가 확인되었다.

효소반응에 의한 emodinanthrone→skyrin으로

Table 4. Radioactivity of isolated compounds in the cell-free experiments using emodinanthrone as substrate

Code No.	Enzyme Reactions	Radioactivity (cpm)						%	Conversion ratio (%)
		Origin	Compound 'X'	Skyrin	Emodin	Emodin-anthrone	Above Emodin		
V	Control (Emodinanthrone +Enzyme)	28,819	14,369	1,458	6,380	381	929	2.8	1.6
VI	Control+H ₂ O ₂	30,787	10,992	3,244	4,542	11,020	769	5.3	4.1
VII	Control+Glucose+Glucose oxidase	32,564	7,351	3,789	1,737	16,777	724	6.0	4.8
VIII	Boiled Control	16,954	6,729	3,521	1,638	169,461	1,135	1.2	0.0

의 전환율은 control 시험구가 1.6%인데 반하여 H₂O₂첨가구는 4.1%, glucose & glucose oxidase 첨가구 4.8%로서 H₂O₂가 효소반응의 촉진기능을 가진다는 점은 emodin의 경우와 같았다.

이상의 결과에서 emodin과 emodinanthrone 모두 skyrin으로 전환되었다는 것을 확인할 수 있었다. emodin은 emodinanthrone 보다 낮은 비율로 skyrin으로 전환되었으며 첨가된 [³H]-emodin의 30%정도가 배양액으로 부터 회수되었다. 이것은 emodinanthrone이 *P. islandicum* NRRL 1036에 의해 생성되는 모든 anthraquinones으로 쉽게 전환될 수 있으며, emodin도 상당량 전환되기는 하나 20%가량의 emodin이 균주배양액 중에서 그대로 회수될 수 있었다는 Sankawa의 Feeding experiment결과⁹⁾와 일치하는 것이다. 이러한 실험결과를 토대로 하여 볼 때 emodinanthrone은 skyrin 생합성의 절대적인 중간대사산물로 생각된다. 아울러, Table 4에서 보는 바와 같이 [³H]-emodinanthrone이 일부 emodin으로 전환되어 radioactivity를 보이는 것으로 보아, emodinanthrone→emodin으로의 산화반응기작이 존재함을 확인할 수 있으며, 이 결과는 *P. islandicum*에 의한 생합성기작에서 aromatic ring의 hydroxylation은 먼저 부분적인 수소화반응이 있는 후(anthraquinone 생성)에 일어나며 더 hydration 반응이 진행되어 anthrone이 생성된다는 Sankawa등^{10,14)}의 이론(Diagram 2.)으로 그 기작을 설명할 수 있다.

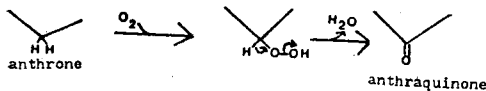


Diagram 2. The oxidation of the anthrone to the anthraquinone

한편, emodinanthrone 및 emodin을 효소기질로 한 실험결과(Table 3 및 4)에서, 이 두물질 모두가, skyrin의 생합성경로에서 전환성이 높은 전구체 물질임이 확인될 수 있었다.

이상의 결과를 토대로 *P. islandicum*에 의한 skyrin생합성 경로를 종합해 보면 acetate→→→emodinanthrone→emodin→skyrin으로 생각할 수 있다(Fig. 4).

물론, 이와같은 skyrin의 생합성경로를 확립하기 위하여는 emodinanthrone, emodin등의 작용기능과 아울러 dimerization기작 등에 대한 더 많은 결과가 밀반출되어야 할 것으로 생각된다.

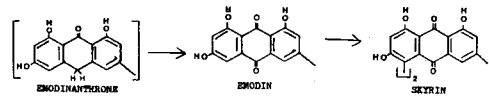


Fig. 4. Conversion of emodinanthrone to skyrin in *Penicillium islandicum*.

초 록

*Penicillium islandicum*은 Czapek-Dox 배지를 이용하여 어두운 곳에서 배양되었을때 황적색 색소인 skyrin을 생합성 하였다. [¹⁴C]-acetate 배지에 이 균주를 접종·배양하여 얻어진 대사산물로부터 radioactive skyrin을 순수 정제·분리할 수 있었고 이를 sodium dithionite처리하여 Emodin이 합성되는 것을 동정할 수 있었다.

한편, *Penicillium islandicum*의 배양액에서 추출·정제된 효소를 이용한 균체의 효소실험에서 [³H]-emodin과 [³H]-emodin은 skyrin생합성의 유력한 전구체물질임이 밝혀졌으며, 효소반응결과 [³H] emodinanthrone(4.8%)이 [³H]-emodin보다 radioactive skyrin으로 주입되는 비율이 더 크다는 것을 알 수 있었다.

균체의 효소실험결과, skyrin이 생합성되는 경로는 emodinanthrone→emodin→skyrin으로 진행되었다.

참 고 문 헌

1. Pieper, S. Steyn.: The Biosynthesis of Mycotoxins. A study in secondary metabolism. pp. 357~358. Academic Press (1980).
2. Sopp, O.J.O.: Skyr. Nor. Vidensk. Selk, Christ., 161 : 10(1912).
3. Breen, J., Dacre, J.C., Raistrick, H. and Smith, G.: Biochem. J., 60 : 618(1955).
4. Shibata, S., Tanaka, O., Chilhara, T. and Mitsuhashi, H.: Pharm. Bull., 1 : 302(1953).
5. Gatenbeck, S.: Acta Chem. Scand., 12 : 1211 (1958).
6. Gatenbeck, S. and Mosbach, K.: Acta Chem. Scand., 13 : 1561(1959).
7. Gatenbeck, S. and Barbesgard, P.: Acta Chem. Scand., 14 : 230(1960).
8. Gatenbeck, S.: Acta Chem. Scand., 14 : 102

- (1960).
9. Sankawa, U., Ebizuka, Y., and Shibata, S.: Tetrahedron Letters, 23 : 2125(1973).
10. Sankawa, U., Shimada, H., and Yamasaki, K.: Tetrahedron Letters, 28 : 3375(1978).
11. Gröger, D., Erge, D., Franck, B., Ohnsorge, U., Flasch, H. and Huper, F.: Chem. Ber., 101 : 1970(1968).
12. Kim, I.S., Kim, S.U. and Anderson, J.A.: Phytochemistry, 20 : 2311(1981).
13. Anderson, J.A.: J. Chromatog., 33 : 536 (1968).
14. Hayashi, K., Kikuchi, M. and Okamoto, Y.: Shokubutsugaku Zasshi, 72 : 220(1959).