

## 방선균 GT103 균주가 생산하는 Actinomycin C<sub>2</sub>의 동정 및 연초 병원균에 대한 항균활성

여운형 · 김영호 · 김상석 · 박은경\*  
한국인삼연초연구원

### Identification of Actinomycin C<sub>2</sub> Produced by Actinomycetes Isolate GT103 and Its Antimicrobial Activity Against Tobacco Pathogens

Woon Hyung Yeo, Young Ho Kim, Sang Seock Kim and Eun Kyung Park\*  
Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

**ABSTRACT :** An antimicrobial compound extracted from the broth filtrate and mycelial extract of the culture of actinomycetes isolate GT103 was purified by solvent extraction, silica gel column chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC), and tested for antibiotic activity against some pathogens of tobacco (*Nicotiana tabacum*) *in vitro*. The antimicrobial compound inhibited strongly the growths of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Colletotrichum tabacum*, and *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* which are major pathogens of *N. tabacum*. The compound showed control efficacy of 90% against *C. tabacum* infection on tobacco (cv. Xanthi-nc) at the concentration of 10 µg/ml when it was sprayed on the tobacco leaves before inoculation with the spore suspension of the fungus. The compound was identified as actinomycin C<sub>2</sub> with molecular weight of 1,268, containing actinocin chromophore, through the analyses with UV, IR, FAB-MS, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectrometries.

**Key words :** antimicrobial compound, actinomycetes, tobacco pathogens, control efficacy, actinomycin C<sub>2</sub>.

연초는 주로 잎을 사용하는 경제작물로 우리 나라 농가의 중요 소득원의 하나이다. 연초에 발생하는 식물병은 세계적으로 모두 53종이 기록되어 있고, 이 가운데 23종이 우리 나라에서도 발생하고 있다(2). 이들 병해 중 우리 나라에서는 담배 모자이크 바이러스와 감자 바이러스 Y가 최근에 가장 높은 발생율을 보이고 있다(4,8). 그러나 곰팡이나 세균에 의한 병해도 매년 지속적으로 발생하고 있으며, 그 중 주요 병해는 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*에 의한 담배 줄기속마름병과 *Pseudomonas solanacearum*에 의한 세균성마름병, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*에 의한 담배 역병 등이다. 또한 *Colletotrichum tabacum*에 의한 담배 탄저병은 묘상기에 주로 발생하며 경우에 따라서 이식기 연초 유품 확보에 지장을 초래하기도 한다.

연초에 있어서 곰팡이나 세균에 의한 병해의 억제

방제는 주로 합성농약이나 농용항생제에 의존해 왔으나, 최근 재배품종, 재배방법 및 재배환경의 변화 등의 원인으로 일부 병의 경우 발병 환경이 변하고 약제 연용에 따른 내성 균주의 증가가 예상되어 기존의 약제로는 방제효과를 기대하기가 점차 어려워질 것으로 판단된다. 특히 약제 연용에 따른 내성 균주의 발생에 대해 효과적으로 대처하기 위해서는 기존의 농약과는 약제의 작용 기작에 있어서 상이한 약제 개발이 요구되고 있는데, 이에 대처하는 한 방법으로 미생물이 생산하는 항균물질에서 농약 개발을 시도하고 있다. 이미 개발된 미생물 기원의 항균활성 물질인 blasticidin S(9), polyoxins(5), validamycin(6), kasukamycin(11) 등의 경우에서와 같이 독성이 낮고 내성 균주의 출현이 적다는 점에서 미생물을 이용한 항균활성 물질의 개발은 기존약제의 효과감소 문제를 해결할 수 있는 하나의 방안이 될 수 있다.

저자들은 담배에 발생하는 주요 병의 방제를 위해 토양에 풍부하게 존재하는 방선균류(actinomycetes)를

\*Corresponding author.

분리하고 이들이 생산하는 2차 대사산물로부터 항균 활성물질을 탐색하여 왔다. 최근 방선균의 한 균주 (GT103)가 생산하는 물질이 담배의 주요 병원균인 줄기속마름병균(*E. carotovora* subsp. *carotovora*), 탄저병균(*C. tabacum*), 역병균(*P. nicotianae* var. *nicotianae*) 등에 *in vitro*에서 강한 항균활성을 보이며, 담배 탄저병에 대해 *in vivo* 상태에서 높은 방제효과를 보여, 이 균주가 생산하는 활성물질의 분리·정제 및 구조동정을 실시하였다.

## 재료 및 방법

토양방선균의 분리 및 선발. 유기질이 풍부한 지역에서 수집한 토양을 80°C로 24시간 열처리하여 건조시킨 후 1g을 취하여 10 ml의 멸균 증류수로 희석하고 방선균 분리용 SCA배지(soluble starch 10 g, casein 1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.02 g, agar 15 g/l, pH 7.0~7.5)에 pour plate method로 평판하고 27°C에서 5~8일간 배양하여 배지에서 자라나온 방선균 균총을 분리하였다. 분리된 방선균 균총의 각각은 방선균 보존용 사면배지(N-Z amine 1 g, yeast extract 1 g, malt extract 1 g, glucose 5 g, soluble starch 5 g, agar 15 g/l, pH 7.3)에 계대 후 27°C로 5~7일간 배양하여 포자형성을 확인한 후 4°C에서 냉장보존하였다. 항균활성은 분리방선균을 C4-액체배지(glucose 20 g, soluble starch 10 g, meat extract 1 g, soybean flour 25 g, NaCl 2 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05 g/l, pH 7.3) 20 ml에 96시간 진탕배양(27°C, 250 rpm)한 후 배양여액과 균체추출물을 사용하여 paper disc법으로 공시 검정균에 대한 항균활성을 조사하였다. 이 시험에서 사용된 검정균으로 세균은 담배 줄기속마름병균(*E. carotovora* subsp. *carotovora*), 담배 세균성마름병균(*P. solanacearum*)을, 곰팡이로는 담배 탄저병균(*C. tabacum*)과 담배 역병균(*P. parasitica* var. *nicotianae*)을 사용하였다. 검정균의 생육을 강하게 억제하는 방선균 균주를 선발하였으며 이 중에서 GT103이 이들 검정균에 대한 항균활성이 현저히 높아 본 시험의 연구 재료로 사용하였다.

GT103 균주의 배양. GT103균주의 항균활성 물질 생산을 위한 배양은 C4-액체배지를 사용하였으며, 사면배지상의 공시균주를 500 ml용 삼각플라스크에 접종한 후 27°C, 250 rpm으로 24시간 前培養하였다. 本培養은 전배양액을 본 배양액 100 ml에 1 ml 비율로 접종한 후 전배양과 동일한 조건으로 96시간 배양하였다.

활성물질의 분리·정제. C4-액체배지에서 96시간

배양한 GT103 균주의 배양액을 원심분리하여, 균체와 상정액을 분리하였다(Fig. 1). 균체의 활성물질은 70% 함유 acetone으로 추출하고 농축 후 배양 상정액과 합하여 ethylacetate로 3회 반복하여 추출하고 농축하였다. 이 추출물을 소량의 chloroform에 녹인 후 silica gel(70~230 mesh)이 충전된 column에서 chloroform과 methanol을 100 : 0 → 95 : 5 → 90 : 10 → 80 : 20 → 70 : 30 순으로 활성물질을 용출하였다. 이들 각 용출액의 항균활성을 검정균을 사용하여 paper disc method로 확인하였고, 그 중 활성분획은 농축 후 소량의 chloroform에 녹여 chloroform-ethylacetate-methanol(50 : 50 : 5)의 전개용매로 preparative thin layer chromatography(Prep. TLC)로 분리하였다. 활성분획은 소량의 acetonitrile에 녹인 후 70% 함유 acetonitrile을 용매로 하여 HPLC(Capcell pak C<sub>18</sub>, 10 mm × 250 mm, UV 200 nm)로 최종 정제하였다.

활성물질의 물리·화학적 특성조사. 활성물질의 물리·화학적 특성조사를 위해 HPLC는 Waters 510 기종을 사용하였고, proton(<sup>1</sup>H)과 carbon(<sup>13</sup>C) nuclear magnetic resonance spectrum은 중수소화된 chloroform을 용매로 하고 tetramethylsilane(TMS)를 내부표준물질로 하여 Bruker NMR spectrometer(400 MHz)를 사용하여 분석하였다. UV spectrum은 methanol을 용매로 하여 Shimadzu UV-260 spectrophotometer로 측정하였으며 분자량은 JEOL HX 100 mass spectrometer를 사용하여 FAB 모드(positive)로 측정하였다. IR spectrum은 Analect RFX-65 spectrophotometer를 사용하여 KBr법으로 측정하였고 TLC 분석은 Merck사 제품의 silica gel 60 F<sub>254</sub>를 사용하였으며 녹는점 측정은 Fisher Johns 측정기를 사용하였다.

활성물질의 항균활성. 항균활성 검정을 위한 검정

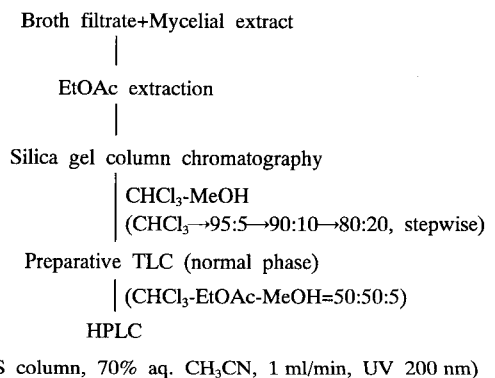


Fig. 1. Purification scheme of the active compound from actinomycetes isolate GT103.

균용 배지는 PSA배지( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2 g, peptone 5 g, sucrose 20 g, agar 15 g, potato extract broth 1 L, pH 7.0~8.0)를 사용하였다. 각 검정균에 대한 최소저지농도(MIC)는 순수하게 정제된 활성물질을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 농도별로 희석한 후 검정균용 배지와 혼합하여 한천희석(agar dilution)법(3)으로 조사하였다.

활성물질의 담배 탄저병 방제효과. 온실내 포트에서 재배 중인 4~5엽기의 담배 Xanthi-nc 품종 유묘를 사용하였다. 순수정제된 활성물질을 소량의 DMSO에 녹인 후 멸균증류수를 첨가하여 최종농도가 50, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 준비한 후 준비된 담배 유묘에 분무처리하였다. 활성물질을 처리한 후 약 3시간이 경과한 다음, 감자한천배지(PDA)에서 5~7일간 배양한 담배 탄저병균(*C. tabacum*)의 포자를 150배 현미경 시야에서 70개 정도가 보이도록 살균증류수로 희석한 후 분무접종 하였다. 접종 후 비닐봉지를 씌워 습도를 유지시키면서 27°C의 배양기에서 1일 16시간 조명(4,000 lux) 조건으로 5~7일간 배양하였다. 방제효과(%)는 활성물질을 처리하지 않은 대조구와 비교하여 발병지수(disease index)를 한 잎에서의 병면적에서 0 %이면 0, 1~5%이면 1, 6~20%이면 2, 21~40%이면 3, 41~70%이면 4, 71~100%이면 5로 하여 평균 발병지수를 산출하였으며, 방제효과는 다음 식에 의해 조사하였다.

$$\text{방제효과}(\%) = \left(1 - \frac{\text{처리 유묘 평균 발병지수}}{\text{무처리 유묘 평균 발병지수}}\right) \times 100$$

## 결과 및 고찰

활성물질의 분리·정제. 활성물질은 ethylacetate에 추출되는 비교적 극성이 작은 화합물로 silica gel column chromatography에서 chloroform-methanol(90 :

10)로 대부분 용출되었고, 70% 함유 acetonitrile을 용매로 한 HPLC 정제(flow rate: 4 ml/min)시 28분대에 단일 peak로 분리되었다(Fig. 2). 이 물질의 chloroform-ethylacetate-methanol을 50 : 50 : 5 비율의 전개용매를 사용한 TLC 상에서의  $R_f$ 값은 0.39였다.

물리·화학적 특성. 활성물질의 성상은 붉은색의 결정상이었으며 DMSO, methanol, ethanol, chloroform, acetone, ethylacetate 등에는 가용성이었고, diethylether에는 어느 정도 가용성이었으나 hexane과 물에는 불용성이었다. 활성물질은 206, 236, 442 nm에서 최대 흡수 peak를 보였으며, 융점은 240°C 정도로 이 온도에서 물질의 붕괴가 시작되었으나 정확한 용

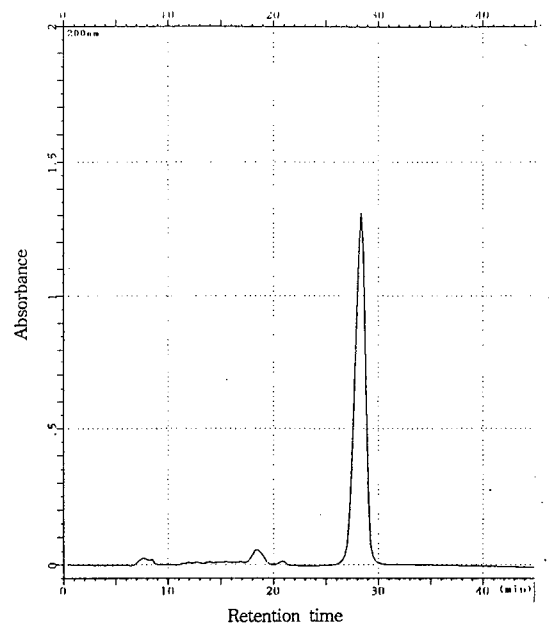


Fig. 2. HPLC profile of the active compound from actinomycetes isolate GT103.

Table 1. Physico-chemical properties of the active compound produced by actinomycetes isolate GT103

Analysis	Properties
Appearance	red crystal
$\text{UV}\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm)	206, 236, 442
FAB-MS (m/z)	1269 [M+H] <sup>+</sup>
$R_f$ value ( $\text{CHCl}_3$ -EtOAc-MeOH (50 : 50 : 5))	0.39
Melting point (°C)	ca. 240
Solubility	
soluble	DMSO, MeOH, EtOH, $\text{CHCl}_3$ , EtOAc
hardly soluble	Diethylether
insoluble	Hexane, $\text{H}_2\text{O}$
IR ( $\text{cm}^{-1}$ )	3400~3200, 3050, 2960~2870, 1748

점은 측정할 수 없었다(Table 1). 활성물질의 IR spectrum은 Fig. 3과 같다. IR spectrum상의 3,400~3,200  $\text{cm}^{-1}$  사이에 -NH 및  $\text{NH}_2$ 와 3,050  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -CH=CH<sub>2</sub>의 -CH-, 2,960~2,870  $\text{cm}^{-1}$ 에서 aliphatic CH 흡수 peak가 확인되었으며, 1,748  $\text{cm}^{-1}$ 에서 ester의 carbonyl, 1,649  $\text{cm}^{-1}$ 에서 amide의 carbonyl, 1,640과 1,581  $\text{cm}^{-1}$ 에서 불포화 ketone, 1,193  $\text{cm}^{-1}$ 에서 CO의 흡수 peak들이 각각 확인되었다. 활성물질의 성상과 특징적인 UV 흡수 양상 및 IR spectrum으로 볼 때 actinomycin group(1)의 항생물질로 추정되었으며, <sup>1</sup>H-NMR spectrum(Fig. 4) 분석 결과, actinomycin group의 항생물질들이 공통적으로 갖고 있는 발색단인 actinocin(10)의 특징적인 peak가 관찰되었다. 즉 5.98 ppm, 6.58 ppm의 피크는 actinocin의 7번과 8번 탄소의 proton으로, 2.56 ppm, 2.24 ppm의 peak는 actinocin의 4번과 6번 탄소의 methyl proton으로 추정되었다. 1.27 ppm의 methyl proton, 4.5 ppm부근의  $\alpha$ -

proton, 5.2 ppm 부근의  $\beta$ -proton과 7.21 ppm의 carbonyl에 연결된 -NH proton들은 이 활성물질이 actinomycin group의 항생물질들이 공통적으로 갖고 있는 threonine을 포함하고 있음을 추측케 하였다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum(Fig. 5) 분석 결과 209.5 ppm에서 ketone carbon peak가 관측되었으며 166~179 ppm에서는 아미노산의 펩타이드 결합에서 유래한 carbonyl carbon이 11개 관측되었다. 또한 114.2~148.1 ppm에서는 actinocin을 구성하는 aromatic carbon이 10개 관측되었다. 한편 32.5 ppm, 35.5 ppm, 39.9 ppm, 42.6 ppm에서는 -N-CH<sub>3</sub> carbon이 관측되었다. Proton 및 carbon NMR spectrum의 분석 결과, GT103 균주가 생산하는 항균활성물질은 actinomycin group의 펩타이드 항생물질이었으며 FAB-MS(Fig. 6) 측정 결과, (M + H)<sup>+</sup>가 m/z 1269에서 확인되어 본 활성물질을 분자량 1,268, 분자식 C<sub>63</sub>H<sub>88</sub>N<sub>12</sub>O<sub>16</sub>의 actinomycin C<sub>2</sub>로 동정하였다.

항균활성 및 방제효과. GT103 균주가 생산하는 활성물질은 담배 줄기속마름병균(*E. carotovora* subsp. *carotovora*), 담배 탄저병균(*C. tabacum*), 담배 역병균(*P. nicotianae* var. *nicotianae*) 등에 강한 항균활성을 보여 최소저지농도(MIC)가 0.78~6.25  $\mu\text{g/ml}$ 였으나 담

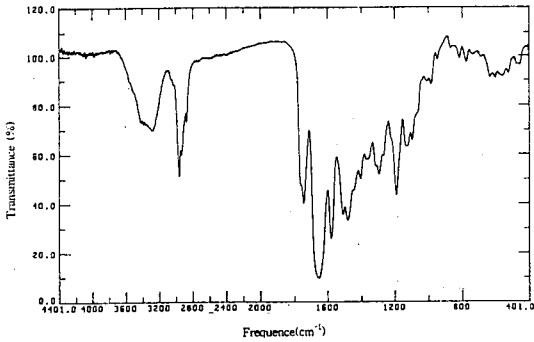


Fig. 3. IR spectrum of the active compound from actinomycetes isolate GT103.

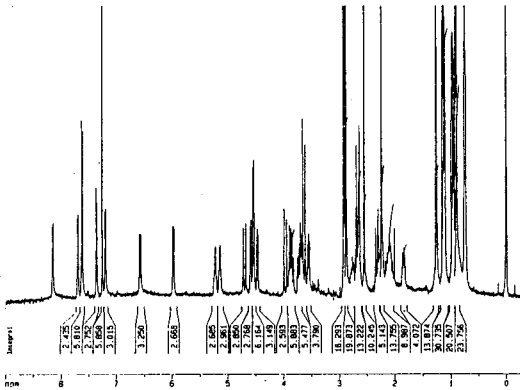


Fig. 4. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the active compound from actinomycetes isolate GT103.

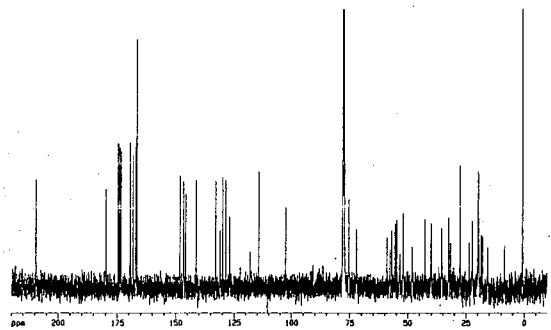


Fig. 5. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of the active compound from actinomycetes isolate GT103.

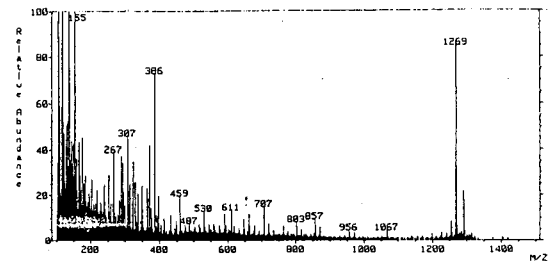


Fig. 6. Mass spectrum of the active compound from actinomycetes isolate GT103.

**Table 2.** Minimum inhibitory concentration (MIC) values of the active compound produced by actinomycetes isolate GT103

Test microorganism	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	0.781
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	> 100
<i>Colletotrichum tabacum</i>	1.562
<i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i>	6.250

<sup>a</sup> Agar dilution method was employed.

**Table 3.** Effect of the active compound produced by actinomycetes isolate GT103 on the control of anthracnose of tobacco caused by *Colletotrichum tabacum*

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Disease index <sup>a</sup>	Control value (%) <sup>b</sup>
50	0.0	100
10	0.4	90
1	2.2	45
Untreated control	4.0	0

<sup>a</sup> Disease indices indicate the percentages of diseased leaf areas: 0 : 0%, 1 : 1~5%, 2 : 6~20%, 3 : 21~40%, 4 : 41~70%, and 5 : 71~100%, respectively. Numbers are averages of 5 replications.

<sup>b</sup> Control value (%) =

$$\left( 1 - \frac{\text{average disease index of treated seedlings}}{\text{average disease index of untreated seedlings}} \right) \times 100$$

배 세균성마름병(*P. solanacearum*)에 대해서는 항균활성을 보이지 않았다(Table 2). 한편 담배 탄저병에 대한 방제효과는 50 ppm 처리시 100%의 방제효과를 보였으며 10 ppm에서 90%, 1 ppm에서 45%의 발병억제효과를 나타내었다. 한편 처리 최고농도인 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서 담배에 대한 약해는 관찰되지 않았다. Actinomycin group의 항생물질들은 지금까지 20여 가지가 알려져 있고 넓은 항균 스펙트럼을 갖는 항생물질로서 강한 독성으로 임상적 가치는 없으나 동물 종양에 대한 억제효과가 보고되어 있다(10). 그러나 본 실험의 경우에서와 같이 식물병에 대한 방제효과는 보고되지 않아 앞으로 이 물질의 연초 병해를 위한 보다 심도 있는 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

토양에서 분리한 방선균류(actinomycetes) GT103 균주의 배양여액 및 균체추출물은 담배의 주요 병원균

인 담배 줄기속마름병균(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*), 담배 탄저병균(*Colletotrichum tabacum*), 담배 역병균(*Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*) 등에 강한 항균활성을 보였다. 항균활성물질은 용매 추출, silica gel chromatography, HPLC 등을 실시하여 분리·정제하였으며 UV, IR, FAB-MS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 분석결과 actinomycin group의 펩타이드계 항생물질인 actinomycin C<sub>2</sub>로 동정되었다. 이 활성물질의 담배 탄저병에 대한 방제효과는 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 100%, 10  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 90%의 방제효과를 보였다.

## 참고문헌

1. Anthony, B. M. and Katz, E. 1978. Actinomycin. In: *Antibiotics Isolation, Separation and Purification*, Vol. 15, ed. by J. M. Weinstein and G. H. Wagman. Elsevier, New York.
2. 한국식물보호학회. 1986. 한국식물병·해충·잡초 명감, 개정판. 633pp.
3. Hash, J. H. 1975. *Methods in Enzymology*, Vol. 43. Academic Press, New York.
4. 홍순근, 손준수, 이영근, 오명희, 강여규. 1991. 연초병해충의 생리·생태적 특성구명 및 방제법 개발. 한국인삼연초연구소 담배연구보고서(경작분야 육종 및 환경편), pp. 133-205.
5. Isono, K. and Suzuki, S. 1966. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics Part II. Degradative study of polyoxin A. *Agric. Biol. Chem.* 30 : 813-814.
6. Iwasa, T., Higashide, E. and Shibata, M. 1971. Studies on validamycines, new antibiotics III. Bioassay methods for the determination of validamycin. *J. Antibiotics* 24 : 114-118
7. 이영근, 손준수. 1993. 비병원성 bacteriocin 생성 *Pseudomonas solanacearum*의 저온성 균주를 이용한 담배 세균성마름병 방제효과. 한국연초학회 10 : 193-200.
8. 손준수, 김정화, 박은경, 이영근, 오명희, 강여규. 1990. 연초병해충의 생리 생태적 특성구명 및 방제법 개발. 한국인삼연초연구소 담배연구보고서(경작분야 육종 및 환경편), pp. 133-205.
9. Takeuchi, S., Hirayama, K., Ueda, K., Sakai, H. and Yonehara, H. 1958. Blasticidin S, a new antibiotic. *J. Antibiotics* 11 : 1-5.
10. 田中信男, 中村昭四郎. 1977. 抗生物質大要(化學と生物活性), 第2版, 東京大學出版會, pp. 61-65.
11. Umezawa, H., Okami, Y., Hashimoto, T., Suhara, Y., Hamada, M. and Takeuchi, T. 1965. A new antibiotic, kasukamycin. *J. Antibiotics Ser. A* 18 : 101-103.