

Actinomycetes KGT-37 균주가 생산하는 항생물질 Echinomycin의 구조해석 및 항균활성

여운형 · 김영호 · 윤봉식¹ · 박은경*
한국인삼연초연구원, ¹KIST 생명공학연구소

Structural Elucidation and Antimicrobial Activity of an Antibiotic, Echinomycin, Produced by Actinomycetes KGT-37

Woon-Hyung Yeo, Young Ho Kim, Bong-Sik Yun¹ and Eun Kyung Park*

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejon 305-600, Korea

ABSTRACT : An actinomycetes isolate KGT-37 obtained from a ginseng field soil was found to produce an antibiotic. The antimicrobial compound was isolated from the broth culture and purified by silica gel column chromatography, preparative thin layer chromatography (TLC), and high performance liquid chromatography (HPLC). On the basis of nuclear magnetic resonance (NMR) analyses including ¹H-¹H COSY, HMQC, and HMBC, the antibiotic compound was identified as echinomycin, a depsipeptide antibiotic. The ¹H and ¹³C-NMR signals of echinomycin which had not been assigned yet were completely assigned in this study. The antibiotic showed growth-inhibitory activity against Gram-positive microbes including plant pathogens such as *Corynebacterium lilium* and *Streptomyces scabies* and fungal pathogens, *Pyricularia grisea* and *Alternaria mali*.

Key words : antimicrobial activity, echinomycin, structure elucidation.

미생물로부터 유래하는 생리활성물질에 대한 연구는 인체의 병원미생물에 대한 항균물질의 탐색에서 처음 시작된 이후 지금까지 지속적으로 수행되어져 왔다. 최근에는 미생물로부터 항균물질 외에도 항종양물질, 살충 또는 제초활성 등 농용 항생물질, 면역조절물질, 효소저해제, 고혈압 및 저혈압 치료제, 항염증물질, 기타 당뇨, 비만, 치매 등의 치료물질들이 탐색되고 있다(1).

미생물 중에서도 토양내에 존재하는 방선균은 분리와 배양이 용이하고 다양한 종류의 의약 및 농업용 유용물질들을 생산하기 때문에 집중적으로 연구되어 왔다. 한편 항균물질 탐색은 스크리닝 방법이 상대적으론 간편하여 물질 탐색에 있어서 가장 많은 연구대상이 되어 왔고, 이에 따라 수많은 종류의 물질들이 이미 밝혀져 방선균이 생산하는 새롭고 유용한 항균물질을 발견하기는 대단히 어렵다. 그러나 방선균의 다양성과 지역에 따른 생태종 등을 감안할 때 여전히 많은 종류

의 방선균이 조사되지 않았을 것으로 예상된다. 또한 비록 알려진 물질이라 하더라도 아직까지 밝혀지지 않은 생리활성을 조사함으로써 새로운 항균물질 개발에 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

미생물 기원의 농용 항생물질은 일반적으로 대상 병원균에 대한 선택독성이 높고 인축에 대한 부작용이 적다는 장점을 갖고 있어 꾸준한 연구의 대상이 되고 있다. 특히 최근 들어 합성농약의 오용 및 남용으로 인한 환경오염이 사회적인 문제로 대두되면서 생분해성이 뛰어나 잔류독성이 적어 생태에 비교적 안전한 생물농약으로서의 항생물질 탐색에 관심이 모아지고 있다.

이에 따라 필자들은 토양 방선균으로부터 유용한 항균활성물질을 탐색할 목적으로 다양한 토양으로부터 방선균을 분리하고 이들의 항균활성물질을 스크리닝하여 왔다. 이 과정에서 그림 양성세균에 강한 생육 억제효과를 보이는 방선균 균주 KGT-37을 선별하였고, 본 방선균이 생산하는 항균물질의 분리·정제 및 구조동정을 실시한 결과 이 물질이 Yoshida 등(7)이

*Corresponding author.

보고한 echinomycin으로 동정되었다. 이 연구에서는 아직까지 미흡한 부분으로 남아 있는 echinomycin의 ¹H 및 ¹³C NMR signal에 대한 완전한 assign과 조사되지 않은 몇몇 식물 병원균에 대한 이 물질의 항균활성을 관하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

토양 방선균의 분리 및 배양. 1994년도 충북 증평 근교 인삼포장에서 수집한 토양을 80°C로 24시간 열 처리하여 전조시킨 후 1g을 취하여 10 ml의 멸균 중 류수로 허석하고 방선균 분리용 배지(soluble starch 10 g, casein 1 g, KH₂PO₄ · 7H₂O 1.02 g, agar 15 g/L, pH 7.0~7.5)에 pour plate method로 처리하고 27°C에서 7~14일간 배양 후 방선균을 분리하였다. 분리된 방선균은 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°C에서 5~7일간 배양하고 4°C에서 냉장보존하면서 필요시 계대하여 사용하였다. 항균물질 생산을 위한 분리 방선균의 배양은 C4 액체배지(glucose 20 g, soluble starch 10 g, meat extract 1 g, soybean flour 25 g, K₂HPO₄ 0.05 g/L, pH 7.3)를 사용하여 27°C, 250 rpm 조건으로 96시간 실시하였다. 1차 항균활성 조사는 방선균의 배양여액을 paper disc(φ 8 mm)에 흡수시켜 전조한 후 *Bacillus subtilis*와 *Alternaria mali*를 대상으로 실시하였으며 우수한 항균활성을 보이는 균주를 선별하였다. 그 결과 KGT-37 균주가 가장 우수한 항균활성을 나타내어 본 균주가 생산하는 항균물질을 분리·정제하고 물질의 구조동정을 실시하였다.

활성물질의 분리 및 정제. C4 액체배지에서 27°C, 250 rpm 조건으로 96시간 배양한 KGT-37 균주 배양액을 원심분리하여 균체와 상징액으로 분리하고 균체는 70% 합수 acetone으로 추출 후 농축하여 상징액과 합한 후 ethyl acetate로 3회 반복 추출·농축하였다. 이 추출물을 소량의 chloroform에 녹인 후 chloroform-methanol(9 : 1~5 : 5, stepwise)을 전개용매로 하여 silica gel column chromatography를 실시하였다. 활성분획은 농축 후 chloroform-methanol(20 : 1)을 용매로 하여 preparative thin layer chromatography(TLC)를 수행하였으며, chloroform-methanol(25 : 1)로 2차 preparative TLC를 실시하였다. 활성분획은 소량의 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 후 55% 합수 acetonitrile을 용매로 하여 high performance liquid chromatography(HPLC) (Capcell pak, φ10 mm × 250

mm, C18, 240 nm)로 최종 정제한 후 동결건조하여 순수하게 정제된 항생물질 GT-37을 얻었다(Fig. 1). 한편 각각의 단계마다 분리되는 물질은 paper disc법으로 항균활성을 조사하였다.

물리·화학적 특성 조사. KGT-37이 생산하는 항균물질을 순수분리하여 정제한 후 이 물질의 물리화학적 특성 조사와 구조 동정을 실시하였다. ¹H-, ¹³C-nuclear magnetic resonance(NMR) spectrum 측정은 활성물질을 CDCl₃로 녹인 후, tetramethyl silane(TMS)을 내부표준물질로 하여 Bruker NMR spectrometer(400 MHz)로 실시하였다. UV spectrum은 chloroform을 용매로 하여 Shimadzu UV-260 spectrophotometer로 측정하였으며, 분자량은 JEOL HX 100 mass spectrometer를 사용하여 FAB 모드(positive)로 측정하였다. 융점은 Fisher Johns 측정기를 사용하였다. 활성물질의 최종정제에 사용한 HPLC는 Waters 510 기종을 사용하였고, TLC 분석은 Merck사 제품의 silica gel 60 F₂₅₄를 사용하였다.

항균활성조사. 항균 활성 측정을 위한 검정균으로는 그램 음성 세균으로 *Escherichia coli* 등 4종, 그램 양성 세균으로는 감자 더塍이병균인 *Streptomyces scabies* 등 5종, 곰팡이는 *Candida albicans*와 *Saccharomyces cerevisiae* 2종의 효모와 *Pyricularia grisea*, *Alternaria mali*, *Colletotrichum tabacum*, *Fusarium solani* 등 식물병원균을 사용하였다. 검정균용 배지로서 세균은 Bouillon 배지(meat extract 3 g, peptone 10 g, NaCl 5 g/L, pH 7.0) 또는 GB 배지(glycerol 30 ml, meat extract 5 g, peptone 10 g, NaCl 3 g/L, pH

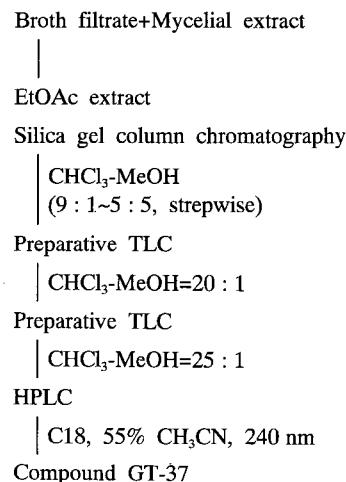


Fig. 1. Isolation procedure for antibiotic GT-37.

6.8), 효모는 Sab 배지(glucose 30 g, malt extract 10 g, peptone 1 g, agar 15 g/L, pH 7.8~8.0), *Streptomyces scabies*와 곰팡이는 PDA배지를 각각 사용하였다. 항균활성조사에서 최소저지농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 정제된 활성물질을 소량의 DMSO에 녹인 후 각각의 배지와 농도별로 희석, 분주 한 후 그 위에 검정균을 점접종하는 agar dilution 법(4)에 의하여 조사하였다.

결과 및 고찰

물리·화학적 특성 및 화학구조. 항생물질 GT-37은 흰색의 결정상이었으며 dimethyl sulfoxide, chloroform, ethyl acetate 등에는 가용성이나 물에는 불용성이었다. UV-visible 흡수는 242, 323 nm에서 최대 흡수 peak를 보였고, ninhydrin, Dragendorff 등의 발색 시약에 양성반응을 나타내었다(Table 1). FAB-MS 측정결과, $(M+H)^+$ 가 m/z 1101에서 확인되어 본 활성물질의 분자량이 1100으로 추정되었으며 융점은 110~114°C이었다. 활성물질의 구조는 ^1H 및 ^{13}C -NMR, ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC를 포함한 다양한 ^1D 및 ^2D -NMR spectra의 해석에 의하여 수행되었다. ^1H -NMR spectra의 해석 결과, 2.8~3.3 ppm 사이에 질소와 결합한 4개의 methyl proton signal, 4.4~5.0 ppm 부근에 peptide의 α 위의 proton 및 7.4~8.6 ppm 부근에 다수의 amide proton으로 사료되는 signal이 관측되었다. 또한 ^{13}C -NMR spectra에서 161~175 ppm 부근에 다수의 carbonyl 탄소가 관측되어 본 활성물질이 peptide 화합물임을 알 수 있었다. HMQC와 ^1H - ^1H COSY spectra의 해석 결과 2개의 N-methylvaline 및 2개의 N-methylalanine의 존재를 포함하여 10개의 부분구조를 해석 할

Table 1. Physico-chemical properties of antibiotic GT-37

Analysis	Properties
Appearance	White crystal
UV $\lambda_{\text{CHCl}_3 \text{max}}$ nm	242, 323
MP(°C)	110~114
FAB-MS (m/z)	1101.3[M+H] $^+$
Rf in $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (25 : 1)	0.42
Colour reaction	
Ninhydrin	Positive
Dragendorff	Positive
Solubility	
soluble	DMSO, CHCl_3 , EtOAc
slightly soluble	MeOH
insoluble	H_2O

Table 2. ^{13}C and ^1H -NMR data for compound GT-37 in $\text{DMSO}-d_6$

Position	δ_{C}	δ_{H}
Serine (1)		
NH		8.34 (d, 7.9) ^a
αCH	50.8	4.97 (dd, 7.9, 3.7)
βCH_2	63.3	4.55 (dd, 10.4, 3.7)
CO	167.8	4.50 (d, 10.4)
Alanine(1)		
NH		7.88 (d, 6.7)
αCH	46.8	4.70 (m)
βCH_3	16.0	1.32 (d, 6.7)
CO	172.4	
Bridge(1)		
NCH_3	31.2	2.86 (s)
αCH	59.0	6.45 (d, 8.5)
βCH	51.1	4.78 (d, 8.5)
SCH_3	14.4	2.01 (s)
CO	169.1	
N-methylvaline(1)		
NCH_3	30.8	3.20 (s)
αCH	62.7	4.79 (d, 9.8)
βCH	27.5	2.17 (m)
γCH_3	19.8	0.97 (d, 6.7)
γCH_3	19.3	0.85 (d, 6.1)
CO	169.9	
Serine(2)		
NH		8.50 (d, 8.5)
αCH	50.9	4.93 (dd, 8.5, 4.3)
βCH_2	64.2	4.58 (d, 11.0)
CO	167.2	4.45 (dd, 11.0, 4.3)
Alanine(2)		
NH		7.97 (d, 7.3)
αCH	46.1	4.82 (m)
βCH_3	16.0	1.32 (d, 6.7)
CO	172.2	
Bridge(2)		
NCH_3	29.0	2.88 (s)
αCH	53.0	6.00 (d, 10.4)
βCH_2	26.0	3.26 (d, 15.3)
CO	170.2	2.75 (dd, 15.3, 10.4)
N-methylvaline(2)		
NCH_3	31.6	3.23 (s)
αCH	61.5	4.87 (d, 9.2)
βCH	27.7	2.10 (m)
γCH_3	18.8	0.75 (d, 6.1)
γCH_3	19.9	0.91 (d, 6.7)
CO	170.1	
Quinoxaline		
1	143.9, 143.8	
2	143.3, 143.2	
3a	143.0, 143.0	
4	129.0, 129.0	8.06 (br d, 7.9) 8.02 (br d, 7.3)
5	128.2, 128.2	7.43 (br), 7.43 (br)
6	131.2, 131.1	7.57 (br), 7.57 (br)
7	131.9, 131.9	7.71 (br), 7.69 (br)
7a	138.7, 138.5	

^a Proton resonance multiplicity and coupling constant (Hz) in parentheses (s: singlet, d: doublet, m: multiplet, br: broad).

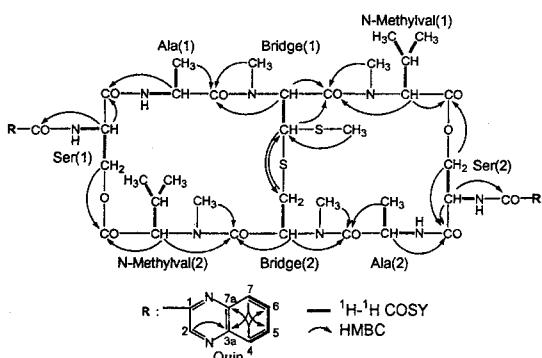


Fig. 2. Structure of compound GT-37 elucidated by ^1H - ^1H COSY and HMBC experiments.

수 있었으며 이 결과로부터 본 화합물이 다양한 이상 아미노산으로 구성되어 있음을 알 수 있었다(Table 2). 각 아미노산의 연관성을 HMBC로 해석하였으며 그 결과는 Fig. 2와 같다. 즉 β 위의 proton으로부터 관측된 자신의 carbonyl 탄소와 α 위의 proton으로부터 관측된 이웃한 아미노산의 carbonyl 탄소의 관측에 의하여 구성 아미노산의 연관성을 밝혔고 또한 amide proton으로 관측된 long range correlations에 의하여 그 구조를 확인하였다. 이상의 NMR실험에 의하여 화합물 GT-37의 전체 구조를 밝혔으며 database에 의한 구조 검색 결과, 항균활성 물질로 알려진 echinomycin과 동일 화합물임을 알 수 있었다(4). Echinomycin은 1959년에 화학 분해 실험에 의하여 구조가 밝혀졌으나 (5) 구조의 복잡성에 의하여 완전한 구조는 1975년 Dell 등에 의하여 결정되었다(6). 그러나 ^1H 및 ^{13}C signal들의 assign은 보고되지 않았는데, 본 연구에서 이에 대한 완전한 해석이 이루어졌다고 볼 수 있다.

항균활성. 항생물질 GT-37은 감자 더뎅이병균 (*Streptomyces scabies*)과 *Corynebacterium lilyum* 등 식물병원균을 포함하는 그람 양성 세균에 특이적으로 강한 항균 활성을 보여 0.09~0.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최소저지농도(MIC)를 보였으며, 벼 도열병균(*Pyricularia grisea*), 사과 점무늬낙엽병균(*Alternaria mali*) 등에도 항균활성을 나타내었다(Table 3). 그러나 *E. coli*를 제외한 그람 음성 세균과 효모 및 균부병균(*Fusarium solani*)과 담배 탄저병균(*Colletotrichum tabacum*) 등의 곰팡이 병원균에 대해서는 항균활성이 나타나지 않았다.

Echinomycin은 그람 양성 및 음성 세균과 몇 가지 바이러스에 대해 활성을 나타내는 것으로 보고되어 있는데(2), 본 연구에서는 그람 양성 세균에 보다 강한 항균활성을 나타내는 것으로 나타났다. 특히 감자 더

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of the antibiotic GT-37 from actinomycetes isolate KGT-37

Test microorganism	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ^a
Gram negative bacteria	
<i>Escherichia coli</i>	1.56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 100
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	> 100
<i>Salmonella typhimurium</i>	> 100
Gram positive bacteria	
<i>Streptomyces scabies</i>	0.39
<i>Staphylococcus aureus</i> R-209	0.78
<i>Corynebacterium lilyum</i>	0.78
<i>Bacillus subtilis</i>	0.09
<i>Sarcina lutea</i>	0.09
<i>Streptococcus</i> sp.	0.09
Yeast	
<i>Candida albicans</i>	> 100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	> 100
Fungi	
<i>Pyricularia grisea</i>	12.5
<i>Alternaria mali</i>	25
<i>Fusarium solani</i>	> 100
<i>Colletotrichum tabacum</i>	> 100

^a Agar dilution method was employed.

뎅이병균인 *Streptomyces scabies*와 *Corynebacterium lilyum*에 대한 항균활성은 본 연구에서 처음 보고된 것으로 이 두 병의 방제를 위해서 씨감자와 톨립 인경을 이 약제나 균의 배양액에 침지하여 병방제 효과를 조사할 필요가 있다고 생각된다. 또한 이 물질은 담배모자이크 바이러스(TMV)의 감염을 억제하였는데(자료 미제시) 앞으로 이 물질의 항바이러스 효과에 대해서도 연구가 이루어져야 할 것이다.

요 악

항균물질을 생산하는 방선균 KGT-37를 인삼밭 토양에서 분리하여 배양액으로부터 항균물질을 분리하고 silica gel column chromatography, preparative TLC, HPLC로 정제하였다. ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC 등 NMR 분석결과 KGT-37이 생산하는 항균물질은 cyclic depsipeptide계의 항생물질인 echinomycin으로 동정되었으며 이 연구에서 지금까지 assign되지 않았던 ^1H 과 ^{13}C 의 NMR signal이 완전히 assign되었다. 이 항균활성물질은 감자더뎅이병균인 *Streptomyces scabies*와 *Corynebacterium lilyum*을 포함하는 그람 양성 세균에 특히 강한 항균 활성을 보였으며, 도열병균 및

점무늬낙엽병균 등 병원곰팡이에도 항균활성을 나타내었다.

참고문헌

1. Bushell, M. E. and Grafe, U. 1989. Bioactive metabolites from microorganisms. In: *Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 27. Elsevier, Amsterdam.
2. Bycroft, B. W. 1988. *Dictionary of Antibiotics and Related Substances*. Chapman and Hall Ltd., New York. 298pp.
3. Dell, A., Williams, D. H., Morris, H. R., Smith, G. A., Feeney, S. J. and Roberts, G. C. K. 1975. Structure revision of the antibiotic echinomycin. *J. Am. Chem. Soc.* 97 : 2497-2502.
4. Hash, J. H. 1975. *Methods in Enzymology*, Vol. 43. Academic Press.
5. Keller-Schierlein, W., Mihailovic, M. L J. and Prelog, V. 1959. The structure of echinomycin. *Helv. Chim. Acta*. 42 : 305-322.
6. Martin, D. G., Mrzsa, S. A., Biles, C., Stewart, J. C., Baczynskyj, L. and Meulman, P. A. 1975. Structure of quinomycin antibiotics. *J. Antibiotics* 28 : 332-336.
7. Yoshida, T. and Kadagiri, K. 1961. Studies on quinoxaline antibiotics. II. Isolation and properties of quinomycins A, B and C. *J. Antibiotics Ser. A* 14 : 330-334.