

Streptomyces sp. G91353이 생산하는 N-Acetyl-Phenylalanine의 항균활성

권오성^{1,3} · 박해룡² · 윤봉식¹ · 황지환² · 이재찬¹ · 박동진¹ · 김창진^{1*}
¹한국생명공학연구원 대사체기능연구센터, ²경남대학교 식품생명학과, ³(주) 빅스

Antimicrobial Activity of N-Acetyl-Phenylalanine Produced from *Streptomyces* sp. G91353. Kwon, Oh-Sung^{1,3}, Hae-Ryong Park², Bong-Sik Yun¹, Ji-Hwan Hwang², Jae-Chan Lee¹, Dong-Jin Park¹, and Chang-Jin Kim^{1*}. ¹Functional Metabolomics Research Center, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Daejeon 305-600, Korea, ²Department of Food Science & Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea, ³BIGS Co., Jincheon-gun 365-842, Korea – For screening of the compounds exhibiting antimicrobial activities against the D-alanyl-D-alanine of Gram positive bacteria, approximately 2,500 actinomycetes isolated from soil were examined for antimicrobial activity. In consequence, we recently isolated the *Streptomyces* sp. G91353 strain produced an active compound, A91353, that inhibits the growth of Gram positive bacteria. A91353 was identified as N-acetyl-phenylalanine by various spectroscopic methods. The minimum inhibitory concentration (MIC) values of N-acetyl-phenylalanine on Gram positive bacteria such as *Streptococcus pyogenes* 308A, *Streptococcus pyogenes* 77A were determined as 50 µg/ml, respectively, but did not effect on Gram negative strains. These results indicate that N-acetyl-phenylalanine have an antimicrobial activity, which may be caused by the disturbance of D-alanyl-D-alanine synthesis.

Key words: Antimicrobial activity, D-alanyl-D-alanine, actinomycetes, N-acetyl-phenylalanine, MIC

1928년에 Fleming이 penicillin을 발견한 후 지금까지 많은 신규 항생제가 알려지고 있다. Penicillin이 발견된 당시에는 거의 모든 세균에 대하여 효과가 있었으나, 1960년대에 이르면서 각종 항생제에 대한 내성균이 출현하기 시작하였다. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA)는 1961년에 최초로 보고된 이후[12, 14] teicoplanin과 vancomycin을 제외한 대부분의 항생제에 다제내성(multiple antibiotics resistance)을 보이면서 강력한 항균제가 꾸준히 개발됨에도 불구하고 전 세계적으로 병원 내 원인균으로 문제가 되고 있다[5, 17]. MRSA에 의한 감염증의 치료는 비-β-lactam계 항생제를 필요로 하며[10], 또한 이들은 여러 종류의 항생제에 대해서 내성을 나타내므로, 치료에 많은 어려움이 따른다[18]. 이 뿐만 아니라, 현재까지 MRSA의 가장 확실한 치료제인 vancomycin도 1980년대 이후 과도한 항생제의 사용으로 인하여 vancomycin resistant *S. aureus* (VRSA)[4, 8, 11, 13, 20]와 vancomycin resistant *Enterococci* (VRE)[3, 15]가 국내뿐만 아니라 프랑스, 스코틀랜드, 남아프리카 등에서 분리되었다. 이들 내성균주는 항생제 교차 내성(multidrug-resistant)을 가지고 있고, 항 MRSA와 항 VRE의 활성을 갖는 물질들이 개발되었지만[16, 19] 이들 내성균주의 완벽한 박멸은 기대하기 어렵다. 지금까지 10,000

종 이상의 항생물질이 천연물로부터 분리, 보고되고 있지만 광범위한 항균 스펙트럼을 지닌 항생물질인 경우 내성 균주의 출현빈도가 높고 독성이 강한 것이 특징이므로 특정 병원균에 대한 선택적인 활성을 가진 항생제에 대한 탐색연구가 요구되어지고 있다.

그러나 이러한 탐색의 중요성에도 불구하고 현재까지 일반적으로 사용되고 있는 항생물질 탐색 방법은 단순한 agar diffusion assay법에 의존하고 있다. 이 방법은 간단하고 대량 탐색에 적합한 장점이 있지만, 탐색의 분자 표적이 없기 때문에 선택적인 항생물질의 탐색은 거의 불가능한 실정이다. 일반적으로 항생제가 항균효과를 나타내기 위한 작용기 작은 크게 5가지로 나누어지는데, 1) 세균의 세포벽 합성 억제(β-lactam계 항생제, teicoplanin, vancomycin) 2) 세포막 구조와 기능의 변화(polymyxin B) 3) 단백질 합성의 억제(aminoglycosides, macrolides, chloramphenicol) 4) 세균대사의 억제(sulfonamides) 5) 핵산대사의 방해(rifampin, quinolones) 등으로 나누어질 수 있다. 이 중 세포벽 합성을 저해하는 경우가 선택적인 항균활성을 나타내고, 인축독성이 거의 없기 때문에 항생제 탐색의 중요한 목표가 되고 있다.

그람양성균 세포벽의 주성분인 D-alanyl-D-alanine(D-ala-D-ala)는 세포벽 구조 형성을 위해 요구되는 transpeptidation/transglycosylation 반응의 전구체 혹은 실질적인 기질이 되며[2], teicoplanin, vancomycin, ristocetin A와 같은 glycopeptide 계열의 항생제와 특이적으로 결합하는 것으로 보고되어 있다[9]. 이런 특이적인 친화성은 그람양성균의 세

*Corresponding author
Tel: 82-042-860-4332, Fax: 82-042-860-4595
E-mail: changjin@kribb.re.kr

포벽 합성을 선택적으로 저해할 수 있는 항생물질의 분리, 정제 및 탐색에 있어서 아주 좋은 수단으로 인식되고 있다 [6, 7]. 따라서 본 연구에서는 MRSA나 VRSA에 효과적인 새로운 항생물질을 개발하고자 D-ala-D-ala를 분자표적으로 하는 항균성 물질을 탐색하고자 하였다.

토양에서 분리한 방선균 배양액 2,500 주를 대상으로 탐색한 결과, *Streptomyces* sp. G91353 균주의 배양액으로부터 활성물질인 A91353을 분리하였다. 물리·화학적 특성과 구조분석을 통하여 A91353은 α -amino acid의 유도체로 알려져 있는 N-acetyl-phenylalanine으로 동정되었으며 그람양성균에 대한 항균 활성은 현재까지 보고되어 있지 않다. 그러므로 본 연구에서는 세포벽 합성을 저해하는 항균활성을 가지고 있는 N-acetyl-phenylalanine의 분리 및 정제와 생물학적 활성 등을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료

본 연구에 사용한 방선균 배양액은 한국생명공학연구원 항산화소재연구실에 의해 토양으로부터 분리된 방선균 2,500 주를 분양받아 실험에 사용하였다.

사용균주

Streptomyces sp. G91353은 $N\alpha, N\epsilon$ -Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala(Sigma)를 분자표적으로 하는 항균성 물질을 생산하는 생산균주로서 본 실험에서 분리되었고, *Bacillus subtilis* KCTC1912는 항균 물질의 분리를 위한 검정균주로 이용되었다. 본 연구에서 분리된 항균성 물질의 생물학적 활성 측정을 위해 그람양성균으로서 *Streptococcus pyogenes* 308A, *Streptococcus pyogenes* 77A가 사용되었고, 그람음성균으로서 *Enterobacter cloacae* P99, *Enterobacter cloacae* 1321E, *Escherichia coli* O78, *Escherichia coli* DC 0, *Pseudomonas aeruginosa* 9027, *Pseudomonas aeruginosa* 1592E가 사용되었다.

배지 및 배양방법

종배지 및 생산배지로서 GSS 배지(soluble starch 1%, glucose 2%, soybean meal 2.5%, beef extract 0.1%, yeast extract 0.4%, NaCl 0.2%, CaCO₃ 0.2%, K₂HPO₄ 0.0025%, pH 7.2)를 사용하였다. 분리균주로부터 항균성 물질을 생산하기 위하여 500 ml의 Erlenmeyer flask 2개에 각각 100 ml씩 분주한 종배지에 *Streptomyces* sp. G91353 균주의 사면배양 1~2 백급이를 접종하고 28°C에서 3일간 진탕 배양하여 배양기의 종배양액으로 사용하였다. 3 L 생산배지를 함유한 5 L jar-fermentor(KF-5 L, KoBioTech, Korea)에 종배양액 200 ml를 접종하여 28°C에서 8일간 1 vvm, 400 rpm으로 배양하였다. 검정배지는 Muller-Hinton 배지(Difco

Laboratories, Detroit, MI)를 사용하였다.

항균활성 방선균의 탐색 및 항균활성 측정

자연계 토양으로부터 분리 소장하고 있는 방선균을 대상으로 agar diffusion assay법[1]을 사용하여 항균 활성을 나타내는 방선균을 선별하였다. 항균활성 측정에 사용된 평판 배지의 조제는 생육배지를 멸균하여 배양된 1%의 검정균을 접종시킨 Muller-Hinton 배지 5 ml를 Petri dish에 균일하게 피복하고 수평으로 응고시켜 검정 plate로 사용하였다. 검정 plate에 방선균 배양액 60 μ l를 paper disc(8 mm, Advantec)에 흡수시키고, 풍건 후 배지 위에 밀착되도록 올린 다음 $N\alpha, N\epsilon$ -Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala 20 mg/ml를 모세관으로 1 방울씩 paper disc 바로 옆에 분주하였다. 그 후, 37°C에서 8~12시간 동안 배양한 다음 생육 저지환의 형태를 관찰하여 paper disc 옆에 분주된 D-ala-D-ala와 affinity가 있어서 그 형태가 타원형으로 나타난 투명 환을 탐색하였다. 또한 본 연구에서 분리된 항균성 물질의 세균에 대한 최소저해농도(minimal inhibitory concentration; MIC)를 측정하였다[1]. 항균성 물질을 25, 50, 100, 200 μ g/ml로 희석하고 검정균을 함유한 평판배지 위에 놓은 후 37°C에서 12시간 배양한 다음 육안으로 관찰했을 때 미생물이 증식되지 않는 농도를 최소저해농도로 결정하였다.

항균물질 분석

UV spectrum은 methanol을 용매로 하여 HP8452A(Hewlett Packard, U.S.A.)를 이용하여 측정하였으며 분자량은 EIMS(electron ionization mass spectroscopy)로 측정하여 결정하였다. ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectra는 Varian UNITY 300 NMR spectrometer를 이용하여 측정하였으며 내부표준물질로는 TMS(tetramethylsilane)를 측정용매는 CD₃OD를 사용하였다.

결과 및 고찰

항균성 물질 생산 미생물의 탐색 및 분리

토양으로부터 분리한 2,500주의 다양한 방선균 배양액으로부터 생육 저지환 형성여부를 통한 항균성 물질 생산 균주를 1차적으로 분리하였으며, 이들로부터 최종적으로 가장 항균 활성이 우수하고 생육 저지환의 모양이 D-ala-D-ala와 affinity가 있어 타원형으로 형성된 1개 균주를 최종적으로 선별하였다. 이렇게 분리된 항균성 물질 생산 미생물을 ISP(International Streptomyces Project) 방법에 따라 동정하였으며, 그 결과 *Streptomyces*속 균주로 동정되었고(결과 미제시), *Streptomyces* sp. G91353으로 명명하였다. 이 미생물의 형태학적 특성은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 oatmeal 한천 배지 상에서 28°C, 7일간 배양 후 전자현미경으로 관찰하였다. *Streptomyces* sp. G91353의 포자 연쇄형태는 나선

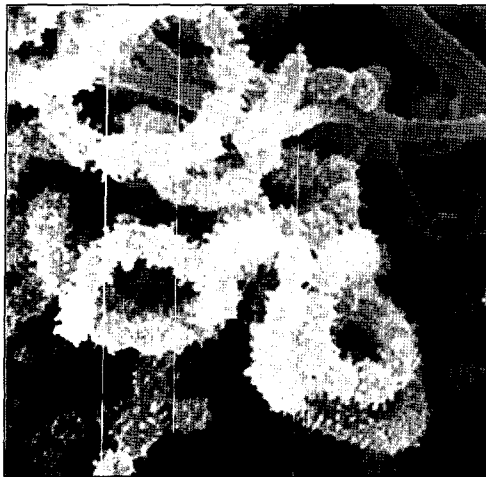


Fig. 1. Scanning electron microscopy of *Streptomyces* sp. G91353.

상의 형태를 나타내었으며, 포자의 표면은 거친 형태였고, 기생균사는 비교적 잘 성장 분기하며 통상의 조건에서는 분단하지 않는 특성이 있음을 확인하였다.

생산균주의 배양

멸균된 3 L의 생산배지를 함유한 5 L jar-fermentor에 종 배양액 200 ml를 접종하여 28°C에서 8일간 400 rpm으로 배양하였다. 종배양 접종 후 3일째부터 생육이 왕성하게 일어났으며 6일째에 최대 생육을 보였고, 그 후 약간 감소되는 경향을 나타내었다(Fig. 2). 또한 그람양성균에 대한 생육 억제능을 가지는 항균성 물질의 생산은 5일째부터 시작하였으며 8일째까지 증가하였고, 최대 14 mm 이상 생육 저지환을 형성하였다. pH는 배양 2일째부터 약간 감소하였으나 4일째 이후부터는 서서히 증가하는 경향을 보였다(Fig. 2).

항균성 물질의 분리 및 정제

선발된 *Streptomyces* sp. G91353 균주의 배양액으로부터

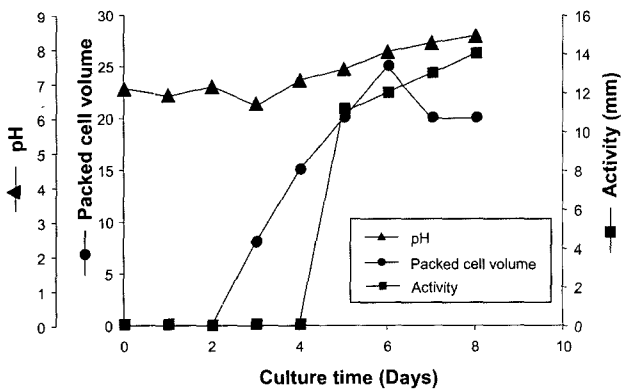


Fig. 2. Cell growth of *Streptomyces* sp. G91353 and antimicrobial activity against *B. subtilis* in 5 L jar-fermentor containing 3 L of GSS medium.

생육 억제능을 지닌 항균성 물질의 분리는 Fig. 3과 같다. 배양액 3 L를 6,000 rpm에서 30분간 원심 분리 후, 그 상등액을 HP-20 Diaion chromatography를 실시하였으며 전개용매 30%, 50% methanol 조건에서 활성분획을 확인하였다. 획득한 활성분획에 대하여 용매추출을 실시하였으나 용매추출이 거의 이루어지지 않아 활성이 있는 물 분획을 양이온 교환수지인 Dowex-50 ion exchange column chromatography를 실시하여 배양액을 흡착한 후, 증류수로 세척하고 1 N NH₄OH를 이용하여 활성물질을 분리, 건조하였다. 활성분획을 butanol : methanol : water(4 : 1 : 2) 전개용매 조건으로 silica gel column chromatography를 실시한 후, 동일한 전개용매 조건에서 sephadex LH-20 column chromatography를 실시하여 활성분획을 획득하였다. 이를 ODS column chromatography(30% methanol)를 거친 후 최종적으로 30% methanol 조건에서 HPLC를 실시하여 retention time 25분에서 활성분획을 분리하였다. 그람양성균

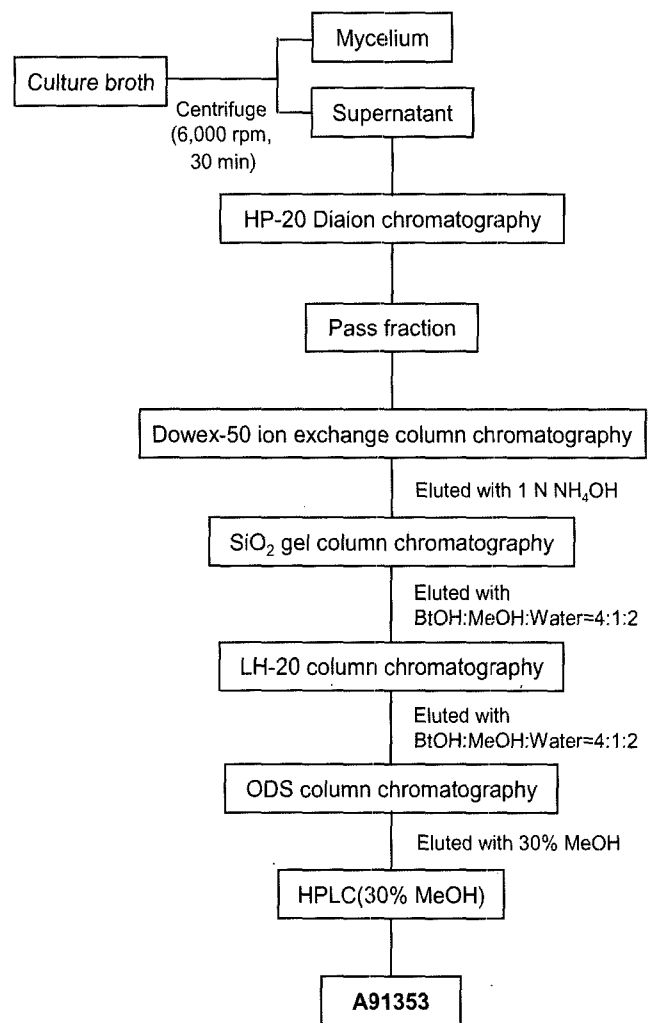


Fig. 3. Purification procedure of the antimicrobial substance from the culture broth of *Streptomyces* sp. G91353.

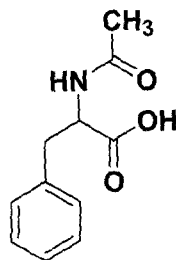
에 대해 항균 활성을 가지는 A91353의 구조는 ESI-MS와 NMR study를 근거로 하여 결정하였다. A91353의 분자식은 ESI-MS spectroscopy에 의해 C₁₁H₁₃NO₃로 밝혀졌으며 분자량은 207이었다. 또한 여러 가지 database 검색과 문헌조사를 통하여 A91353이 α-amino acid의 유도체로 알려진 N-acetyl-phenylalanine의 구조와 같다는 것을 확인하였다(Fig. 4).

N-acetyl-phenylalanine의 항균활성 측정

Streptomyces sp. G91353으로부터 생산된 N-acetyl-phenylalanine의 항균활성을 측정하기 위하여 agar diffusion assay를 실시하였다. 분리된 N-acetyl-phenylalanine의 농도가 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 µg/ml가 되도록 각각 희석한 다음 paper disc에 60 µl씩 분주하였다. 풍건된 paper disc를 *B. subtilis*가 접종된 검정 plate 위에 밀착되도록 올려진 다음 20 mg/ml의 Nα,Nε-Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala를 모세관으로 1 방울씩 paper disc 바로 옆에 분주하였다. 또한 대조구로서 50 µg/ml의 penicillin G를 60 µl 분주하여 그 활성을 비교하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 것처럼, penicillin이 분주된 대조구에서는 생육저지환이 완전한 원형으로 보이는 반면 N-acetyl-phenylalanine이 분주된 생육저지환은 D-ala-D-ala가 분주된 부분에서 더 이상 확산되지 못하여 타원형으로 나타났다. 이것은 N-acetyl-phenylalanine이 paper disc 옆에 분주된 D-ala-D-ala와 상호작용하여 결합함으로써 그 결과 더 이상 확산되지 못한 것으로 사료된다. 반면에 D-ala-D-ala가 분주되어 있지 않은 부분은 강력한 항균 활성을 나타내었으며, 농도 의존적으로 항균활성을 나타내었다. 이 결과는 N-acetyl-phenylalanine이 그람양성균의 세포벽 주성분인 D-ala-D-ala와 상호작용 함으로써 D-ala-D-ala의 결합을 저해하여 세균의 세포벽 합성을 억제함을 보여주는 것이다. 따라서 N-acetyl-phenylalanine은 현재 큰 문제로 대두되고 있는 MRSA 혹은 VRSA에 대해서도 강력한 항균작용을 나타낼 것으로 사료된다.

최소생육저해 농도 측정

N-acetyl-phenylalanine을 그람음성과 양성의 대표균주에



N-acetyl-phenylalanine

Fig. 4. Chemical structure of N-acetyl-phenylalanine.

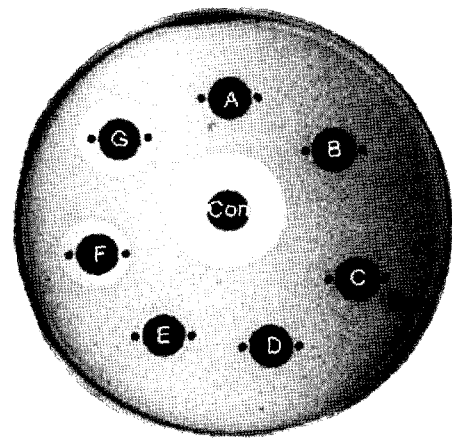


Fig. 5. Antimicrobial activity of N-acetyl-phenylalanine in a dose-dependent manner by agar diffusion assay method with aliquot of D-ala-D-ala (20 mg/ml). Test plate was inoculated the *B. subtilis* KCTC1912 and control (Con) was used 50 µg/ml of penicillin G. A~G paper discs represent antimicrobial activity of 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 µg/ml of N-acetyl-phenylalanine, respectively. ● represent aliquot of D-ala-D-ala.

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the N-acetyl-phenylalanine against Gram positive and Gram negative strains.

Strains		MIC (µg/ml)
Gram positive	<i>Streptococcus pyogenes</i> 308A	50
	<i>Streptococcus pyogenes</i> 77A	50
	<i>Enterobacter cloacae</i> P99	>100
Gram negative	<i>Enterobacter cloacae</i> 1321E	>100
	<i>Escherichia coli</i> O78	>100
	<i>Escherichia coli</i> DC 0	>100
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027	>100
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1592E	>100

대해 고체배지에서 agar diffusion assay법을 이용하여 최소 생육저해 농도를 측정하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 N-acetyl-phenylalanine의 최소생육저해 농도는 그람음성균들에 비해 그람양성균들에 대하여 50 µg/ml로 비교적 강한 최소생육저해능을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 분리된 N-acetyl-phenylalanine은 그람음성균 보다 그람양성균에 대해 더 민감하게 작용함을 알 수 있었다.

요 약

토양 미생물인 방선균의 배양액으로부터 그람양성균에 대해 항균활성을 가지는 항균성 물질을 탐색하였다. 2,500주의 방선균 배양액을 탐색하여 항균성 물질 생산균주 *Streptomyces* sp. G91353을 분리하였고, 그로부터 생산된 항균성 물질인 A91353을 분리·정제 하였다. A91353은 다양한 구조해석 연구에 의하여 N-acetyl-phenylalanine으로 동

정되었으며 *Sc. pyogenes* 308A, *Sc. pyogenes* 77A 등과 같은 그람양성균에 대해 선택적이며, D-alanyl-D-alanine과 상호작용 하여 그람양성균의 세포벽 합성을 저해하는 것으로 사료된다. N-acetyl-phenylalanine의 최소생육저해 농도는 그람양성균에 대해서 50 µg/ml이었으며, 그람음성균에 대한 활성은 나타나지 않았다.

감사의 글

본 연구는 한국생명공학연구원 기관고유사업의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Bauer, A. W., M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* **45**: 493.
- Barna, J. C. J. and D. H. Williams. 1984. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Ann. Rev. Microbiol.* **38**: 339-357.
- Cheong, H. J. 1997. Vancomycin resistant enterococci. *J. Korean Soc. Chemother.* **15**: 27-43.
- Chesneau, O., A. Morvan, and N. E. Solh. 2000. Retrospective screening for heterogeneous vancomycin resistance in diverse *Staphylococcus aureus* clones disseminated in French hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**: 887-890.
- Cohen, S., M. M. Morita, and M. Bradford. 1991. A seven-year experience with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Med.* **91**(Suppl3B): 233S-237S.
- Corti, A. and G. Cassani. 1985. Synthesis and Characterization of D-alanyl-D-alanine-agarose: A new bioselective adsorbent for affinity chromatography of glycopeptide antibiotics. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **11**: 101-110.
- Corti, A., A. Soffientini, and G. Cassani. 1985. Binding of the glycopeptide antibiotic teicoplanin to D-alanyl-D-alanine-agarose: The effect of micellar aggregates. *J. Appl. Biochem.* **7**: 133-137.
- Ferraz, V., A. G. Duse, M. Kassel, A. D. Black, T. Ito, and K. Hiramatsu. 2000. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* occurs in South Africa. *S. Afr. Med. J.* **90**: 1113.
- Good, V. M., M. N. Gwynn, and D. J. Knowles. 1990. MM 45289, a potent glycopeptide antibiotic which interacts weakly with diacetyl-L-lysyl-D-alanyl-D-alanine. *J. Antibiot.* **43**: 550-555.
- Hackbarth, C. J. and H. F. Chambers. 1989. Methicillin resistant *Staphylococci*: Detection methods and treatment of infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 995-999.
- Hood, J., G. F. S. Edwards, B. Cosgrve, E. Curran, D. Morrison, and G. G. Gemmell. 2000. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* at a Scottish hospital. *J. Infect.* **40**: A11.
- Jevons, M. P. A., W. Coe, and M. T. Parker. 1963. Methicillin resistance in *Staphylococcus*. *Lancet* **1**: 904.
- Kim, M. N., C. H. Pai, J. H. Woo, J. S. Ryu, and K. Hiramatsu. 2000. Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3879-3881.
- Knox, R. and J. T. Smith. 1961. The nature of Penicillin resistance in *Staphylococci*. *Lancet* **2**: 520-522.
- Leclereq, R. E., E. Derlot, J. Duval, and P. Courvalin. 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin. *New Engl. J. Med.* **319**: 157-161.
- Lee, M. J., D. S. Lim, M. S. Lee, W. H. Yoon, and C. H. Kim. 1997. Characterization of *Streptomyces* sp. AMLK-135 producing anti-MRSA antibiotics. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 397-401.
- Mandell, G. L., R. G. Douglas, and J. E. Bennett. 1990. *Principles and practice of infectious disease*, pp. 1489. 3rd ed. Churchill Livingstone, New York, U.S.A.
- Maple, P. A., J. M. Hamilton-Miller, W. Brumfitt. 1989. World-wide antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* **1**: 537-540.
- Rhee, K. H., K. H. Chio, C. J. Kim, and C. H. Kim. 2001. Identification of *Streptomyces* sp. AMLK-335 producing antibiotic substance inhibitory to vancomycin-resistant Enterococci. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 469-474.
- Smith, T. L., M. L. Pearson, and K. R. Wilcox. 1999. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *New Engl. Med.* **340**: 489-501.

(Received Sep. 5, 2006/Accepted Dec. 1, 2006)