

## 방선균 분리주 G-37이 생산하는 항생물질의 물리·화학적 특성과 항균활성

여운형\*, 김영호, 채순용, 박은경  
한국인삼연초연구원

### Physico-chemical and Antagonistic Properties of Antibiotics Produced by Actinomycetes Isolate G-37

Woon Hyung Yeo\*, Young Ho Kim, Soon Yong Chae, and Eun Kyung Park  
*Korea Ginseng & Tobacco Research Institute*

**ABSTRACT** : Antibiotic and physico-chemical properties of an active compound from actinomycetes isolate G-37, of which the culture filtrate had an inhibitory effect against tobacco mosaic virus(TMV) infection, were examined. The active compound, which was purified by ethylacetate extraction, silica gel column chromatography, preparative thin layer chromatography, and high performance liquid chromatography, showed strong antibacterial activities especially against Gram-positive bacteria including *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea* and *Staphylococcus aureus*. From the <sup>1</sup>H-NMR, FAB/MS, UV spectral data, and physico-chemical properties, the active compound of G-37 appears to belong to a peptide antibiotic group. Among the known peptide antibiotics in the antibiotic group, No. 280, A-30912, and Taitomycin showed molecular weights and ultra violet spectrum similar to those of the active compound from G-37, but was not identical to the compound, which suggests that it may be a new peptide antibiotics.

**Key words** : Actinomycetes, antibacterial activity, peptide antibiotic group

---

\* 연락 저자 : 305 - 345, 대전광역시 유성구 신성동 302번지, 한국인삼연초연구원

\* Corresponding author : *Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, 302 Shinsong-Dong, Yusong-Gu, Taejon 305 - 345, Korea.*

## 서 론

## 재료 및 방법

미생물로부터 유용한 활성물질의 탐색은 Waksman(1940)에 의해 토양미생물 상호간의 길항 관계를 발견 이후 활발하게 수행되어 왔다. 미생물 중에서 방선균에 의한 활성물질에 관한 연구가 대부분을 차지해 지금까지 발견된 물질 중 약 45%가 방선균 생산물질로 보고되었으며 이중 대부분은 Streptomyces속 방선균에서 분리되었다(Welington, 1983). 농용항생제로서도 Blasticidin S 개발 이후 방선균으로부터 Kanamycin, Polyoxin, Validamycin 및 Miltiomycin 등의 항생제가 개발되어 진균 및 세균성 식물병 방제에 널리 활용되어 왔고 (Iso & Yamaguchi, 1977; Isono et. al., 1965; Waksman, 1969), 또한 그동안 수많은 방선균이 탐색되고 새로운 항균물질이 개발되었다. 그 결과 최근에 이르러서는 새로운 항균물질의 개발이 점차 어려워지고 있으며, 농용항생제의 개발은 연구에 투자되는 경비와 인력을 감안할 때 항균물질만을 대상으로 하기에는 실용성이 매우 낮아졌다.

이에 따라 종래에는 대부분 항균활성물질을 대상으로 연구가 되었으나 근래에는 항종양성 물질, 살충 또는 제초활성 등의 농업용 항생물질, 면역조절 물질, 효소저해제, 고혈압 및 저혈압치료제, 항염증 물질 기타 당뇨, 비만, 치매 등의 치료물질들이 미생물로부터 탐색되고 있고(Deman, 1889), 식물병 방제에 있어서도 최근에는 항바이러스 물질의 개발에 관심이 더해지고 있다. 결국, 미생물의 다양성과 밝혀지지 않은 생물활성을 목표로 하는 스크리닝은 유용한 신규활성물질의 개발 가능성을 제시하고 있다.

필자들은 다양한 활성물질을 생산하는 것으로 알려진 토양 방선균류 및 담자균류를 이용하여 담배 모자이크 바이러스(TMV)의 감염을 억제하는 활성물질을 스크리닝 하던 중 배양여액에서 80% 이상의 감염억제효과를 나타내는 방선균 G-37 균주를 선발하였다. 이 G-37 균주의 활성물질을 구명하기 위하여 G-37 균주가 생산하는 물질을 분리·정제하고 물리·화학적 특성 및 항균활성 검정을 실시하였다.

토양방선균의 분리 및 배양 : 1994년도 충북 증평 근교 인삼포장에서 수집한 토양을 80°C로 24시간 열처리하여 건조시킨 후 1 g을 취하여 10 ml의 멸균 증류수로 희석하고 방선균 분리용 배지(soluble starch 10 g, casein 1 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.02 g, agar 15 g/l, pH 7.0-7.5)에 pour plate method로 처리하고 27°C로 5-8일간 배양하여 방선균을 분리하였다. 분리된 방선균은 방선균 보존용 slant 배지(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 배양하고 4°C에서 냉장보존하였다(Williams, 1974). 항바이러스 활성조사를 위한 분리방선균의 배양은 C<sub>4</sub> broth 배지(glucose 20 g, soluble starch 10 g, meat extract 1 g, soybean flour 25 g, NaCl 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05 g/l, pH 7.3) 20 ml에 접종한 후 27°C, 250 rpm으로 4일간 수행하였다.

항바이러스활성조사 : 방선균 배양액을 10,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상정액과 균체를 분리하였으며 상정액을 취하여 항바이러스 활성검정용 시료로 사용하였다. 즉 검정 시료 500μl를 TMV 이병즙액(농도 : 바이러스 이병건엽의 100배액, v/v) 500μl와 혼합하여 3-4 엽기의 담배(Nicotiana tabacum Xanthi-nc)잎에 반엽집종법(박동, 1994)으로 처리하고 4-5일 후에 국부병반의 형성을 관찰하였다. 항바이러스 활성은 TMV 이병즙액만 접종한 대조반엽에 나타난 국부병반의 수와 처리반엽에서 나타난 병반수를 비교하여 조사하였다.

항균활성조사 : G-37 균주가 생산하는 활성물질의 항균활성은 배양여액, butanol(BuOH)추출물, ethylacetate(EtoAC)추출물로 구분하여 조사하였다. 항균활성측정을 위한 검정균으로는 세균으로서 *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus* sp. *Staphylococcus aureus*(R-209), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescenes*, *Salmonella typhimurium*을 사용하였고, 효모로서 *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*를, 곰팡이로서 *Pyricularia grisea*, *Colletotrichum tabacum*, *Fusarium solani*를 사용하였다. 검정균용 배지로서 세균은

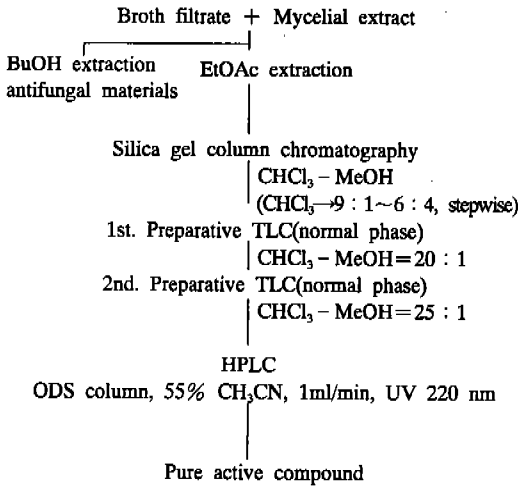


Fig. 1. Purification scheme of the active compound from isolate G-37

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 6.8), 효모는 Sab 배지(glucose 30 g, malt extract 10 g, peptone 1 g, agar 15 g/l, pH 7.8-8.0), 곰팡이는 PDA배지를 각각 사용하였으며 최소저지농도(MIC)는 정제된 활성물질을 Dimethylsulfoxide(DMSO)에 농도별로 희석한 후 각각의 검정균용 배지와 혼합하여 agar dilution 방법으로 조사하였다.

**활성물질의 분리 및 정제:** 활성물질의 정제는 butanol 추출물과 ethylacetate 추출물로 구분하여 실시하였으며 우선 비극성 화합물 분획인 ethylacetate 추출물로 *Sarcina lutea*에 대한 항균활성을 조사하면서 정제하였다. 즉 4일간 배양한 배양액을 원심분리하여 균체와 배양상정액을 분리하였다(Fig. 1). 균체는 70% 함수 acetone으로 추출하고 농축 후 배양상정액과 합하여 ethyl acetate로 3회 반복 추출하였다. 추출물은 소량의 chloroform에 녹인 후 silica gel resin이 충전된 column에 loading하고 chloroform과 methanol을 10 : 1 → 9 : 1 → 8 : 2 → 7 : 3으로 활성물질을 전개하였다. 활성분획은 농축 후 chloroform - methanol (20 : 1)로 preparative thin layer chromatography(Prep. TLC) 하였으며 chloroform - methanol (25 : 1)로 2차 prep. TLC를 실

시하였다. 활성분획은 소량의 DMSO에 녹인 후 55% 함수 acetonitrile을 용매로 하여 high performance liquid chromatography (Capcell pak, 10 mm × 250 mm, C<sub>18</sub>, 230 nm)로 최종 정제하였다.

**활성물질의 물리·화학적 특성조사:** HPLC는 Waters 510 기종을 사용하였고, proton nuclear resonance spectrum은 중수소화된 chloroform을 용매로 하고 Tetramethylsilane(TMS)를 내부표준물질로 하여 Bruker NMR spectrometer (400 MHz)를 사용하여 분석하였다. UV spectrum은 acetonitrile을 용매로 하여 Shimadzu UV-260 spectrophotometer로 측정하였으며 분자량은 JEOL HX 100 mass spectrometer를 사용하여 FAB 모드(positive)로 측정하였다. TLC 분석은 Merck사 제품의 silica gel 60 F<sub>254</sub>를 사용하였으며 녹는점 측정은 Fisher Johns 측정기를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

**활성물질의 분리 및 정제:** G-37 균주의 ethylacetate 추출물은 비교적 극성이 작은 화합물로서 silica gel column chromatography 수행시 chloroform - methanol (9 : 1)에서 대부분 용출되었고 55% 함수 acetonitrile을 용매로 한 HPLC 정제시 28분대에 단일피크 (Fig.2)로 분리되었다. chloroform과 methanol을 25 : 1 비율로 사용한 TLC 상에서의 Rf값은 0.42 였다.

**활성물질의 항균활성:** G-37 균주의 활성물질은 배양여액을 사용한 1차 스크리닝에서 *Pyricularia grisea*, *Colletotrichum tabacum*, *Fusarium solani* 등의 식물병원성 곰팡이와 그람양성세균에 항균활성을 보였으며 담배 모자이크 바이러스의 감염을 80% 억제하였다. 그러나 배양여액의 BuOH 추출물은 세균에는 활성을 보이지 않고 식물병원성 곰팡이에만 활성을 나타내었다(자료미제시). 정제된 EtOAc 추출물은 *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus* sp. *Staphylococcus aureus* R-209 등의 그람 양성 세균에 특히 강한 항균활성을 보여 최소저지농도(MIC)가 0.09-0.78 μl/ml로 나타났다 (Table 1). 이상의 결과로 볼 때, G-37이 생산하는 항균물질은 추출용매에 따른 항균활성 spectrum이

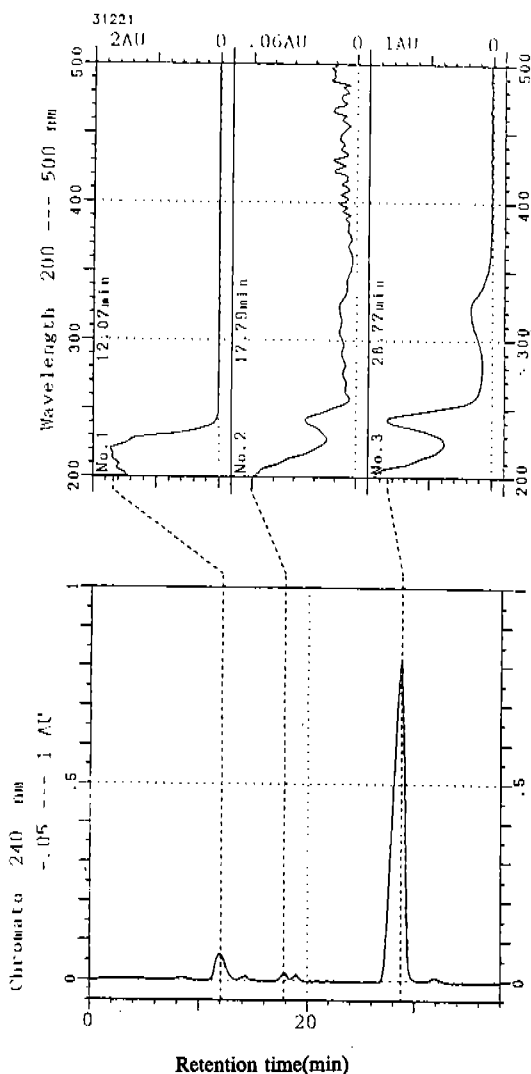


Fig. 2. HPLC profile of the active compound from isolate G-37

현저하게 달랐으며, 이는 구조적으로 매우 상이한 항균물질이 2종류 이상 존재하는 것을 나타낸다고 하겠다. 한편 배양여액에서 80% 이상의 항바이러스 활성을 보인 것과는 달리 순수정제된 EtOAc 추출물은 항바이러스 활성을 보이지 않았는데, 이는 항바이러스 활성을 보이는 물질이 EtOAc 용매에는 추출되지 않거나, 항균물질 정제과정에서 분해 또는 소실된 것이 아닌가 생각된다. 항바이러스 활성을 나타내는 물질의 조사를 위해 추후에 추출 방법

Table 1. Minimum inhibitory concentration values of the active compound from isolate G-37

Test microorganism	*MIC ( $\mu$ g/ml)
<i>Escherichia coli</i>	1.56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>125
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	>125
<i>Salmonella typhimurium</i>	>125
<i>Staphylococcus aureus</i> R-209	0.78
<i>Bacillus subtilis</i>	0.09
<i>Sarcina lutea</i>	0.09
<i>Streptococcus</i> sp.	0.09
<i>Candida albicans</i>	>125
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	>125
<i>Pyricularia grisea</i>	>125
<i>Fusarium solani</i>	>125
<i>Colletotricum tabacum</i>	>125

\* Minimum inhibitory concentration : agar dilution method was employed.

Table 2. Physico-chemical properties of the active compound from isolate G-37

Appearance	white powder
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{CN}}$ nm	242, 323
FAB-MS(m/z)	1101.3[M+H] <sup>+</sup>
Rf	
CHCl <sub>3</sub> -MeOH(25 : 1)	0.42
Colour reaction	
Ninhydrin	positive
Dragendorff	positive
Melting point(°C)	110~114
Solubility	
soluble	DMSO, CHCl <sub>3</sub> , EtOAc
insoluble	H <sub>2</sub> O

을 달리한다든지, 또는 BuOH 추출물과 H<sub>2</sub>O 분획물을 이용한 항바이러스 활성의 조사가 이루어져야 할 것이다.

활성물질의 물리·화학적 특성 : 활성물질의 성상은 흰색의 분말상이었으며 DMSO, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc 등에는 가용성이었으나 물에는 불용성이었다. 활성물질은 242, 323 nm에서 최대 흡수피크를 보였으며 ninhydrin, dragendorff 등의 발색시약에 양성반응을 보였다(Table 2). FAB-MS (Fig. 3) 측정결

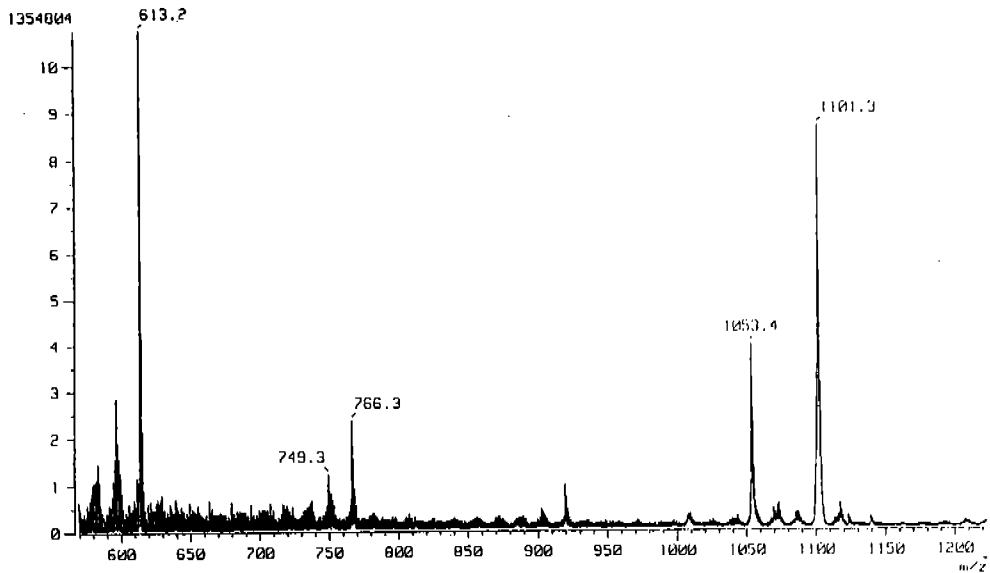


Fig. 3. Mass spectrum of the active compound from isolate G-37

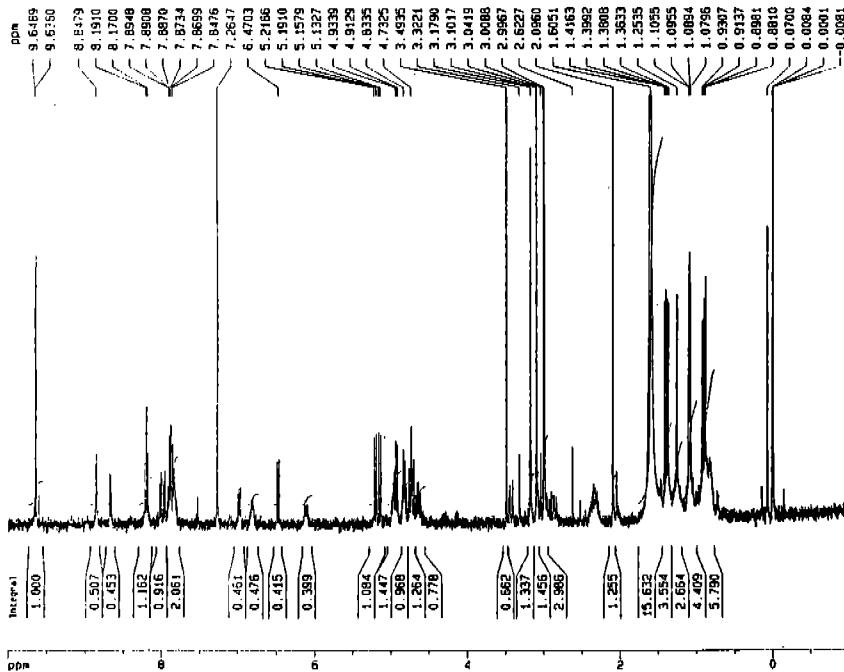


Fig. 4. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the active compound from isolate G-37

과, (M+H)<sup>+</sup>가 m/z 1101.3에서 확인되어 본 활성물질의 분자량은 1100으로 추정되었으며 용점은 110-114 °C 이었다. <sup>1</sup>H NMR spectrum (Fig. 4)의 분석결과 9.6 ppm에서 2개의 aldehydic(-CHO) proton에서 유래한 것으로 보이는 exchangeable proton이 관측되었으며 7.8-8.8 ppm에서 아미노산의 펩타이드 결합에서 유래한 amide proton이 관찰되었다. 한편 6.0-7.0 ppm의 doublet로 관측되는 proton들은 benzene ring에서 유래한 것으로 추측되었으며, 4.7-5.2 ppm에서는 아미노산의 α-proton으로 추정되는 피크들이, 0.8-1.6 ppm에서는 methyl proton이 관찰되었다. 발색반응과 UV spectrum 및 <sup>1</sup>H NMR spectrum의 분석결과, 본 활성물질은 펩타이드계 항생물질로 추정되었다. Data base 조사 결과 본 활성물질과 유사한 펩타이드계 항생물질은 *Streptomyces flavochromogenes*가 생산하는 NO. 280, *Aspergillus nidulans*가 생산하는 A-30912, *Actinoplanes utahensis*가 생산하는 Taitomycin 등 3종이 조사되었는데 분자량과 UV spectrum에서 유사한 특성을 나타내었다. 그러나 항균활성과 생산균주 및 용해성에서 차이를 보여 본 연구에서 분리된 활성물질은 새로운 펩타이드 항생물질로 생각되었다.

## 결 론

방선균류와 담자균류를 이용하여 담배모자이크 바이러스 감염을 저해하는 활성물질을 탐색하던 중 배양여액수준에서 80% 이상의 감염억제를 보이는 방선균 G-37 균주를 선발하였다. G-37 균주가 생산하는 활성물질중 EtOAc 추출물을 각종 silica gel column chromatography를 사용하여 분리·정제하고 물리·화학적 특성 및 <sup>1</sup>H NMR spectrum을 분석한 결과 펩타이드계 항생물질로 추정되었으며 분자량은 1100 이었다. 본 활성물질은 추출용매에 따른 항균활성이 현저하게 달랐으며 BuOH 추출물은 항진균활성을, EtOAc 추출물은 그람 양성 세균에 강력

한 항균활성을 나타내었다. 조사된 활성물질의 물리·화학적 특성을 근거로하여 data base 검색을 실시한 결과, 기존의 No. 280, A-30912, Taitomycin (Shimo, 1959) 등의 펩타이드계 항생물질이 G-37 균주가 생산하는 활성물질과 유사한 물리·화학적 특성 및 UV spectrum을 나타내었으나 용해성과 항균활성 및 생산균 등에서 상이한 점을 보였다.

## 참 고 문 헌

1. Demain, M. E., G. A. Somkuti, J. C. Hunter-Cevera, and H. W. RossMoore. (1889) Novel microbial products for medicine and agriculture. Elsevier, Netherlands.
2. Iso, I. and T. Yamaguchi. Ann. Phytopath. Soc. Japan 43 : 301-303 (1977)
3. Isono, K., J. nagatus, Y. Kawashima, and S. Suzuki. Agr. Biol. Chem. 29 : 848-854 (1965).
4. 박은경, 김영호, 김시관, 채순용. (1994) 바이러스 병 방제 및 항균 살충 생물제어기술 개발. 한국인삼연초연구원. 담배연구보고서 162-182
5. Shimo, M. et al. (1959) J. Antibiot., Ser. A. 12 : 1-12
6. Waksman, S. A. (1940) Antagonistic interrelationships among microorganisms. Chronica Botanica on Microorganisms 6 : 145-148
7. Waksman, S.A. Success and failure in the search for antibiotics. Adv. Appl. Microbiol. 11 : 1-16 (1969).
8. Wellington, E. M. H. and T. Cross. (1983) Taxonomy of antibiotic-producing actinomycetes and new approaches for their selective isolation. Progress in Industrial Microbiol. 17 : 7-35
9. Williams and Wilkins. (1974) Bergey's manual determinative bacteriology. 8th ed. 5 : 69-73