

## *Streptomyces* sp. 9602 균주로부터 페튜니아 캘러스 생장억제물질의 분리

김명조 · 곽상수\*

KIST 생명공학연구소 식물생화학 Research Unit

### Isolation of a petunia cell growth inhibitor from *Streptomyces* sp. 9602

KIM, Myong-Jo · KWAK, Sang-Soo\*

Plant Biochemistry Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon, 305-600, Korea. \*Corresponding author

To search for a compound inhibiting the petunia callus growth from *Streptomyces* sp., we investigated the activity in the culture broth of 400 strains. The active compound was successively purified with solvent fractionation, silica gel column chromatography from *Streptomyces* sp. 9602 strain, and identified as 2,5,7-trihydroxy-3-(5'-hydroxyhexyl)-1,4-naphthoquinone by  $^1\text{H-NMR}$ , EI-MS, IR and UV. It inhibited the callus growth of petunia by 50% at 32  $\mu\text{g/mL}$ .

**Key words:** growth inhibitor, petunia callus, *Streptomyces* sp.

식물은 외부로부터 병충해 등의 생물학적 스트레스를 받으면 생체방어물질을 생산한다(Takahashi et al., 1991). 식물을 포함하여 생물상호작용에 있어 화학물질이 관여하여 일어나는 현상을 allelopathy라 하며 여기에 관여하는 화학물질인 allelochemical은 많은 종류의 것이 있다(Rice, 1984). 특히 미생물이 생산하는 물질중에는 식물의 발아, 생장 등에 영향을 주는 것과 phytoalexin 등의 이차대사산물을 유도하는 화합물이 있다.

식물배양세포는 일정한 조건에서 재현성 있는 실험이 가능하고 배양세포가 지닌 화학적 전능성(chemical totipotency)을 이용하여 식물유래의 고부가가치 유용물질을 대체 생산하는 방법으로 많이 이용되고 있다(Hamill et al., 1987). 대부분의 배양세포는 외부로부터 탄소원을 공급받으면서 높은 스트레스조건에서 배양되기 때문에 이를 극복하기 위하여 세포는 항산화물질을 포함한 다양한 항스트레스성 물질을 생산한다(Takeda et al., 1990; Kim et al., 1994; You et al., 1995; Jang et al., 1995). 일반적으로 자연상태에서 미생물이 식물에 감염할 경우 특정 식물에만 감염하는 숙주특이성(host-specificity)을 나타낸다. 배양세포는 식물체가 지닌 이러한 기주특이성에 있어서는 식물체보다 낮은 것으로 생각된다. 따라서 식물배양세포는 생리활성물질을 탐색하기 위한 생물검정의 소재로도 이용이 가능하다. 녹색 배양세포를 사용하여 광합성 전자전달계를 억제하는 화합

물의 검정에 이용될 수 있음이 시사되었다(Sato et al., 1991). 미생물이 생산하는 제초활성물질을 식물배양세포를 검정계로 이용하여 분리된 바도 있다(Kim et al., 1996). 이러한 점에서 배양세포는 유용물질을 탐색하는 생물검정계로 이용될 수 있을 것이라는 점에 착안하여, 본 연구에서는 페튜니아 캘러스의 생장을 지표로 토양 방선균으로부터 캘러스 생장억제물질을 탐색하고자 하였다.

#### 재료 및 방법

##### 방선균의 분리 및 배양

방선균은 강원대학교 부속농장(강원도 춘천시 동면 소재)을 비롯하여 춘천지역에서 채취한 토양을 실온에서 7일간 음건하였다. 건조된 토양시료 1 g를 준비된 10 mL의 멸균 증류수에 넣고 진탕한 후, 상등액을 멸균 증류수로 1000배 희석하였다. 이를 NB (Nutrient Broth, DIFCO) 한천배지(지름 9 cm 페트리디쉬)에 얇게 접종하여 27°C에서 4일간 암배양하였다. 배양후 나타난 colony를 현미경으로 관찰하면서 약 400 균주의 방선균(*Streptomyces*)을 분리한 후, 4°C에 보존하고 실험에 사용하였다. 분리한 방선균을 NB 액체배지에 접종하여 27°C 암조건에서 4일간 배양한 배양액을 활

성조사에 사용하였다(Kim, 1996).

### 캘러스의 배양 및 생장억제활성

페튜니아 캘러스는 페튜니아의 잎절편을 3% sucrose와 0.2% Gelrite가 첨가된 MS (Murashige and Skoog, 1962) 고체배지에서 2개월간 27°C 광조건(18시간)에서 배양하여 유도하였다. 캘러스의 계대배양은 동일배지를 사용하여 4주간격으로 10회 실시한 후 캘러스 생장억제실험에 사용하였다. 미생물 배양액의 캘러스 생장 억제활성은 배양액(200 µL)을 포함한 MS 고체배지 4 mL를 유리시험관(직경 25 mm)에 넣고 감압 멸균한 후, 캘러스 생체중 0.5 g을 시험관에 넣고 25°C에서 3주간 암배양하였다. 캘러스 생장억제활성은 균주배양액의 첨가구와 무첨가구에서 자란 캘러스의 무게를 측정하여 %생장억제율을 구하였다. 활성은 3반복하여 조사하였다.

### 방선균 9602 균주로부터 활성물질의 분리

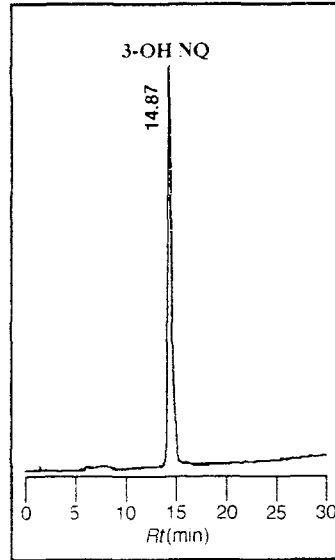
캘러스의 생장억제를 나타낸 방선균 9602 균주를 NB배지 10 mL가 첨가된 시험관(직경 25 mm)에 옮겨 3일간 배양한 후, 배양액을 300 mL NB배지를 함유한 1 L용 배양병(20 개)에 이식하여 27°C 암조건에서 4일간 배양하였다. 배양액(6 L)을 원심분리(10,000 rpm × 10분)하여 균체와 배양액을 분리하였다. 배양액을 1 N 염산수용액으로 pH 4.0으로 조정후, 동량의 ethyl acetate (EtOAc)로 2회 추출하였다. EtOAc 가용부를 무수황산나트륨으로 건조시킨 후 회전농축기로 감압농축하여 EtOAc 추출물을 얻었다.

EtOAc 추출물을 실리카겔을 이용하여 활성분획을 분리하였다. 실리카겔(Wakogel C-100, 310 g)을 유리칼럼(직경 6.0 × 80 cm)에 충전시킨 후 cellulose powder에 흡착시킨 EtOAc 추출물을 EtOAc-benzene 용매계로 농도구배 용출시켰다. 30-50% EtOAc 활성분획을 실리카겔(Wakogel C-300, 150 g)의 유리칼럼(직경 2.5 × 100 cm)에 충전시킨 후 EtOAc-benzene 용매계의 농도구배로 활성물질을 분리하였다.

### 결과 및 고찰

#### 방선균으로부터 활성물질의 분리

토양 방선균 400종으로부터 페튜니아 캘러스 생장억제활성을 조사한 결과, 대부분의 균주에서는 활성이 없었으나 균주 9602는 강한 활성을 나타내었다(결과 미제시). 활성 방선균 9602의 배양액 5.7 L로부터 ethyl acetate (EtOAc) 추출물 6.21 g을 얻어, 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 사용하여 활성물질을 분리한 결과, 활성은 30 - 50% EtOAc 분획에서



**Figure 1.** HPLC profile of 2,5,7-trihydroxy-3-(5'-hydroxyhexyl)-1,4-naphthoquinone (3-OH NQ) isolated from the culture broth of *Streptomyces* sp. 9602 as a growth inhibitor of petunia cells. The compound was loaded onto an Inertsil ODS (4.6 × 250 mm, GL Science, Tokyo) eluting with a linear gradient of 30% to 90% methanol for 30 min at a flow rate of 0.8 mL/min. The compound was detected at 254 nm.

용출되었다. 활성분획을 농축하여 얻은 1.3 g을 2차 실리카겔 칼럼 크로마토그래피에서 주황색의 활성물질 69 mg을 얻었다. TLC 상의 활성물질의 Rf 값은 전개용매로 benzene : EtOAc (6 : 4)를 사용하였을 때 0.25를 나타내었다. 분리한 물질은 ODS 칼럼을 이용한 HPLC에서 하나의 peak를 나타내어 충분한 순도를 나타냄이 확인되었다(Figure 1).

#### 활성물질의 구조해석

활성물질의 물리화학적 성질은 다음과 같다.

Molecular formular: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>

Melting point (°C): 166-167

EI-MS (*m/z*, rel. int.): 306(M<sup>+</sup>)(76), 288(55), 220(100), 137(39)

UV λ max (MeOH) nm(ε): 214(24400), 263(17700), 314(11300), 382(3350), 460(2450)  
(MeOH + OH<sup>-</sup>) nm(ε): 227(21800), 289(30100), 375(8780), 580(2900)

IR γ max (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3370, 1650-1630, 1340, 1160

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, aceton-d<sub>6</sub>): δ 12.68 (1H, s), 7.06 (1H, d, *J*=2.0 Hz), 6.59 (1H, d, *J*=2.0 Hz), 3.70 (1H, s, *J*=6.5 Hz), 2.54 (2H, t, *J*=5.7 Hz), 1.6-1.4 (6H, m), 1.09 (3H, d, *J*=6.5 Hz)

활성물질은 고분해능 mass spectra에 분자 ion peak (*m/z* 306)를 보였고 UV흡수는 214, 263, 314, 382 nm에서 강한 흡수를 나타냈다. <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼(Figure 2)에 의해 방향족 상의 meta coupling proton (δ7.06, 6.59, *J*=2.0 Hz)의 존재가, δ12.86 (1H, s)의 proton은 카르보닐기의 페리위치로 페놀성 수산기의 존재가 추정되었다. 고자장인 δ6.59의 proton이 2개

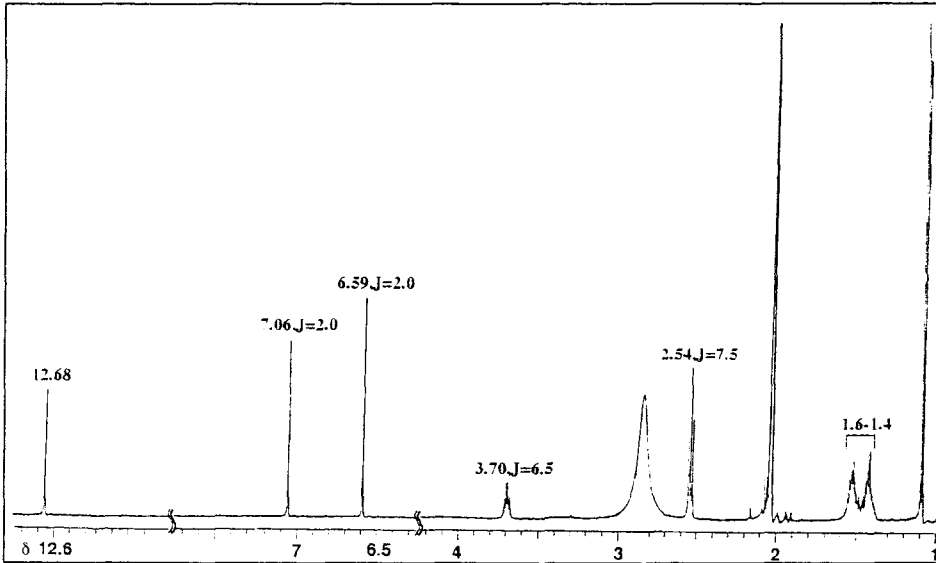


Figure 2. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, acetone-d<sub>6</sub>) spectrum of 2,5,7-trihydroxy-3-(5'-hydroxyhexyl)-1,4-naphthoquinone (3-OH NQ) isolated from the culture broth of *Streptomyces* sp. 9602 as a growth inhibitor of petunia cells.

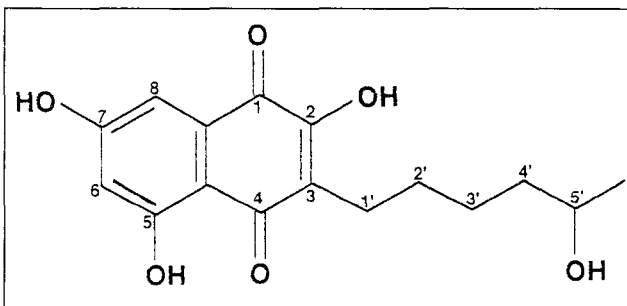


Figure 3. Chemical structure of 2,5,7-trihydroxy-3-(5'-hydroxyhexyl)-1,4-naphthoquinone (3-OH NQ) isolated from the culture broth of *Streptomyces* sp. 9602 as a growth inhibitor of petunia cells.

의 수산기 사이에 귀속되어 naphthoquinone의 5와 7위치에 수산기가 존재하는 것으로 확인되었다. Allyl methylene proton ( $\delta$ 2.54, 2H, t,  $J=7.5$ ) 및 allylic계열 이온 peak ( $m/z$  220,  $M^+ - C_5H_{10}O$ )의 존재로부터 hydroxyhexyl 측쇄가 있는 것으로 확인되었다.  $\delta$ 1.09의 doublet ( $J=6.5$  Hz) methyl proton 및  $\delta$ 3.70의 sextet ( $J=6.5$  Hz) methyne proton의 존재로부터 측쇄의 5' 탄소위치에 수산기가 있는 것으로 결정하였다. 또한 활성물질의 acetylation <sup>1</sup>H-NMR스펙트럼에 의해 acetoxy기의 methyl proton에 귀속되는 4개의 singlet peak중 3개가 비교적 저자장( $\delta$ 2.42, 2.37, 2.32)에 위치하는 것으로부터 phenolic 수산기 3개가 존재하는 것을 알 수 있었다(결과 미제시). 이상의 결과로부터 활성물질의 구조를 2,5,7-trihydroxy-3-(5'-hydroxyhexyl)-1,4-naphthoquinone (Figure 3, 이하 3-OH NQ으로 약함)으로 결정하였다. 이 화합물은 식물의 발아와 생장을 억제하는 naphthoquinone계 화합물로 Kobayashi 등(1987)에 의해 *Penicillium*균주로부터 알팔파 캘러스 생장억제물질로 처음으로 보고된 바 있다.

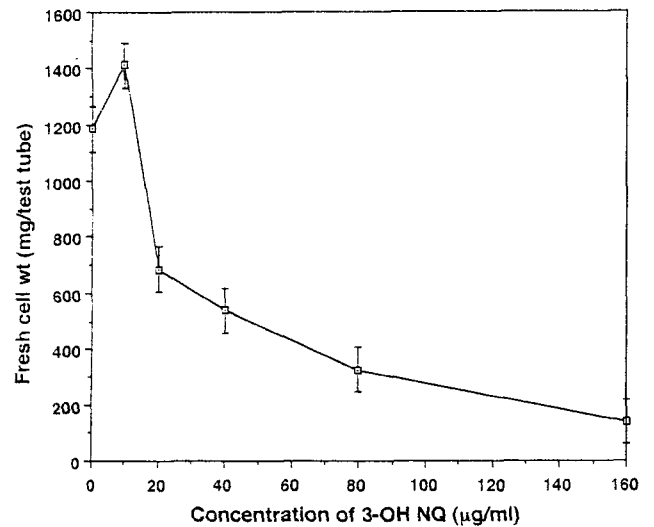


Figure 4. The effects of 2,5,7-trihydroxy-3-(5'-hydroxyhexyl)-1,4-naphthoquinone (3-OH NQ) on the cell growth of petunia. The data are means  $\pm$  standard deviations of three replicates.

### 활성물질의 식물 캘러스의 생장억제활성

활성물질(3-OH NQ)을 20  $\mu$ g/mL 농도로 페튜니아 캘러스배양에 첨가하였을 때, 캘러스의 생장은 약 42% 억제되었고, 40  $\mu$ g/mL에서는 약 53% 억제되었다(Figure 4). 캘러스의 생장을 50% 억제시키는 농도(IC<sub>50</sub>)는 약 32  $\mu$ g/mL였다. 10  $\mu$ g/mL의 저농도에서는 캘러스의 생장을 오히려 약 20% 촉진시켰다. 식물생장억제물질 중 저농도에서 생장을 촉진하는 경우가 간혹 보고된 바 있으나 이에 대해서는 자세히 검토할 필요가 있다.

본 연구에서 토양 방선균(*Streptomyces* sp.)으로부터 페튜

니아 배양세포에 생장억제활성을 나타내는 naphthoquinone 계 화합물로 3-OH NQ를 분리하였다. 천연으로부터 naphthoquinone류 화합물이 식물의 생장에 영향을 주는 물질이 몇 종 보고되어 있다. 호도나무(*Juglans nigra*)로부터 분리된 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone)은 토마토와 알팔파의 생장을 억제하는 allelochemical로 잘 알려진 물질이다(Davis, 1928). Wilson과 Rice (1968)는 해바라기(*Helianthus annuus*) 잎의 침적물로부터  $\alpha$ -naphthol 유도체를 분리한 바 있다. 미생물로부터는 *Fusarium solani*로부터 식물생장억제물질로 novarubin이 분리된 바 있다(Owens, 1969). 본 연구에서 분리한 3-OH NQ는 식물의 생장을 억제하는 naphthoquinone계 화합물로 Kobayashi 등(1987)이 *Penicillium* 균주로부터 알팔파 캘러스의 생장억제물질로 보고된 바 있어, 다양한 미생물에 존재하는 식물생장억제물질로 간주된다.

본 실험에서와 같이 식물배양세포는 in vitro 실험계지만 식물의 생장에 영향을 주는 활성물질을 탐색할 수 있는 유용한 생물검정계로 이용될 수 있음이 시사된다(Sato et al., 1991; Kim et al., 1996). 식물세포는 외부의 화학물질인 elicitor에 대해 생체방어물질을 생산하는 점을 고려하여, 3-OH NQ를 페튜니아 배양세포를 비롯하여 다양한 배양세포에 처리하였을 때 phytoalexin의 유도 등을 구명하는 일은 흥미로운 일이라 하겠다. Kobayashi (1995)는 식물배양세포와 미생물을 공동배양하였을 경우에만 만들어지는 항미생물성 유용물질의 생산에 대한 가능성을 제시하였다. 따라서 식물배양세포계는 유용물질의 탐색을 위한 좋은 소재로서 이용이 기대된다.

## 적 요

토양 방선균(*Streptomyces* sp.)으로부터 페튜니아 캘러스의 생장을 억제하는 물질을 탐색하기 위하여 400 균주의 배양액을 대상으로 활성을 조사하였다. 방선균 9602 균주의 배양액으로부터 캘러스 생장억제물질을 용매분획과 2차의 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 사용하여 활성물질을 분리하였다. 활성물질은  $^1\text{H-NMR}$ , EI-MS, IR, UV 등을 사용하여 2,5,7-trihydroxy-3-(5'-hydroxyhexyl)-1,4-naphthoquinone (3-OH NQ)으로 동정하였다. 3-OH NQ는 페튜니아 캘러스 생장을 32  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 50% 억제하였다.

## 인 용 문 헌

Davis EF (1928) The toxic principle of *Juglans nigra* as identified with synthetic juglone and its toxic effects on tomato and alfalfa. *Am J Bot* 15: 620

- Hamill JD, Parr AJ, Rhodes MJC, Robins RJ, Walton NJ (1987) New routes to plant secondary products. *Bio/Technology* 5: 800-804
- Jang MS, Huh GH, Kim SW, Park IH, Liu JR, Kwak SS (1996) Comparison of catalase and other antioxidant enzyme activities in various plant cell lines. *Korean J Plant Tissue Culture* 23: 157-160
- Kim MJ (1996) Uptake and exudation of phenolic compounds by wheat plants and chemical analysis of the exudate compounds. Ph.D. thesis. The Graduate School of Natural Science and Technology. Okayama University. Japan. pp 16-17
- Kim SK, Kwak SS, Jung KH, Min SR, Park IH, Liu JR (1994) Selection of plant cell lines for high yields of peroxidase. *Korean Biochem J* 27: 132-137
- Kim WG, Kim JP, Park DJ, Kim CJ, Kwak SS, You ID (1996) AB3217-A and B, herbicidal compounds related to anisomycin from *Streptomyces* sp. ME-13. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* 39: 153-158
- Kobayashi A (1995) A new strategy for production of novel secondary metabolites in plant tissue culture. In *International Symposium on Functional Biomaterials*. Seoul National University. pp 191-208
- Kobayashi A, Yata S, Kawazu K (1987) A new naphthoquinone compound as a cell growth inhibitor of plant cultured cells from *Penicillium* sp. 5-11. Abstract No 4N-9, The Annual Meeting of the Agricultural Chemical Society of Japan. Tokyo p 723
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Owens LD (1969) Toxins in plant disease: Structure and mode of action. *Science* 165: 18-25
- Rice ER (1984) Allelopathy. Academic Press Inc. pp 1-422
- Sato F, Yamada Y, Kwak SS, Ichinoshe K, Kishida M, Takahashi N, Yoshida S (1991) Photoautotrophic cultured plant cells: A novel system to survey new photosynthetic electron transport inhibitors. *Z Naturforsch* 46: 563-568
- Takeda S, Sato F, Ida K, Yamada Y (1990) Characterization of polypeptides that accumulate in cultured *Nicotiana tabacum* cells. *Plant Cell Physiology* 31: 215-221
- Takahashi N, Marumo S, Ootake N (1991) *Bioactive Natural Product Chemistry*, 2nd Edition, Tokyo University Press. pp 1-418
- Wilson RE, Rice EL (1968) Allelopathy as expressed by *Helianthus annuus* and its role in old-field succession. *Bull Torrey Bot Club* 95: 432-448
- You SH, Kim SW, Kim SH, Liu JR, Kwak SS (1996) Selection and isoenzyme analysis of plant cell lines for high yields of superoxide dismutase. *Korean J Plant Tissue Culture* 23: 103-106

(1997년 3월 12일 접수)