

## Development of Functional Halogenated Phenylpyrrole Derivatives

Min-Hee Jung<sup>1</sup>, Hee Jeong Kong<sup>2</sup>, Young-Ok Kim<sup>2</sup> and Jin-Ho Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science & Biotechnology, BB21+, Kyungsoo University, Busan 48434, Korea

<sup>2</sup>Biotechnology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

Received August 14, 2023 /Revised September 26, 2023 /Accepted October 11, 2023

Pyrrolnitrin, pyrrolomycin, and pyoluteorin are functional halogenated phenylpyrrole derivatives (HPDs) derived from microorganisms with diverse antimicrobial activities. Pyrrolnitrin is a secondary metabolite produced from L-tryptophan through four-step reactions in *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia plymuthica*, etc. It is currently used for the treatment of superficial dermatophytic fungal infections, has high antagonistic activities against soil-borne and foliar fungal infections, and has many industrial applications. Since pyrrolnitrin is easily decomposed by light, it is difficult to widely use it outdoors. As an alternative, fludioxonil, a synthetically produced non-systemic surface fungicide that is structurally similar and has excellent light stability, has been commercialized for seed and foliar treatment of plants. However, due to its high toxicity to aquatic organisms and adverse effects in human cell lines, many countries have established maximum residue levels and strictly control its levels. Pyrrolomycin and pyoluteorin, which have antibiotic/antibiofilm activity against Gram-positive bacteria and high anti-oomycete activity against the plant pathogen *Pythium ultimum*, respectively, were isolated and identified from microorganisms. This review summarizes the biosynthesis and production of natural pyrrolnitrin derived from bacteria and the characteristics of synthetic fludioxonil and other natural phenylpyrrole derivatives among the HPDs. We expect that a plethora of highly effective, novel HPDs that are safe for humans and environments will be developed through the generation of an HPD library by microbial biosynthesis and chemical synthesis.

**Key words :** Antimicrobial activity, fludioxonil, fungicide, halogenated phenylpyrrole derivative, pyrrolnitrin

### 서 론

다양한 생물활성을 갖는 천연의 할로겐화 페닐피롤 유도체들(halogenated phenylpyrrole derivatives, HPD)은 여러 미생물에서 분리, 확인되었으며, 대표적으로는 *Pseudomonas pyrocinia* 유래의 피롤니트린(pyrrolnitrin, PRN, 3-chloro-4-(3-chloro-2-nitrophenyl)pyrrole,  $C_{10}H_6Cl_2N_2O_2$ ), *Actinosporangium vitaminophilum* 유래의 pyrrolomycins A-J, *Streptomyces* sp. 유래의 dioxapyrrolomycin과 neopyrrolomycin, *P. aeruginosa*와 *P. fluorescens* 유래의 pyoluteorin, *P. bromoutilis*와 *Alteromonas luteoviolaceus* 유래의 pentabromopseudilin, 그리고 *Actinoplanes* sp. 유래의 pentachloropseudilin (PM-E) 등이 보고되어 있다[7, 33, 50](Fig. 1,

Fig. 4; Table 1). 그 중에서 PRN은 세균, 효모, 곰팡이 등에 대한 광범위한 항균활성을 보이며, pyoluteorin은 높은 항진균 활성, pyrrolomycins, pentabromo-, pentachloropseudilin은 높은 항그람양성균 활성을 갖는 등의 특징이 있다[4, 7, 27, 30, 36].

천연의 HPD중 가장 잘 알려진 PRN은 염소 두 분자와 하나의 니트로(nitro)기를 함유한 화합물로, *Pseudomonas* (*P. pyrocinia*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* 등), *Burkholderia cepacia*, *Serratia plymuthica*, *Acinetobacter haemolyticus* 등에서 포식자, 기생충, 질병 그리고 중간 혹은 환경과의 경쟁과 같은 극한 조건에서 숙주 미생물이 생존하기 위해 만들어내는 2차 대사산물이다[36]. *Pseudomonas*, *Serratia* 유래의 관련된 효소의 생화학적 특징, 유전 정보, 유전자 배열 등이 보고되어 있으며, PRN 농도는 100 mg/L 이하의 매우 낮은 수준이다 [36]. PRN은 표재성 피부 사상진균 감염(superficial dermatophytic fungal infection)의 치료용으로 사용되며, 토양 유래(soil-borne) 및 엽면(foliar) 진균감염(fungal infection)에 높은 길항작용을 하며, 환경오염에 대한 우려가 없고 인체에 무해한 장점으로 인해 농업, 제약 및 산업적 측면에서 응용가치가 높다[23, 50].

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-663-4716, Fax : +82-0504-238-7072

E-mail : [jhlee83@ks.ac.kr](mailto:jhlee83@ks.ac.kr)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. Characteristics of halogenated phenylpyrrole derivatives

Halogenated phenylpyrrole derivatives	Halogen type	Biological activity	Property and application	Source	References
Pyrrrolnitrin	Cl	Antifungal, antibiotic activities	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Photosensitivity</li> <li>• Production of 100 mg/L pyrrrolnitrin in <i>Pseudomonas fluorescens</i></li> <li>• Treatment for superficial dermatophytes</li> </ul>	Microbial production	[18, 27, 36, 48]
Fludioxonil	F	Antifungal activity	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Increased photostability</li> <li>• Non-systemic surface fungicide</li> </ul>	Chemical synthesis	[21]
Pyrrrolomycin	Cl or Br	Broad spectrum of biological activities, e.g., antibacterial, antibiofilm, and antifungal activities	Antimicrobial agents	Microbial production	[4, 49]
Pyoluteorin	Cl	Antifungal, antibacterial activities	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Toxic against Oomycetes</li> <li>• Production of 214 mg/L pyoluteorin in <i>Pseudomonas protegens</i></li> <li>• Biocontrol agent</li> </ul>	Microbial production	[44, 56]

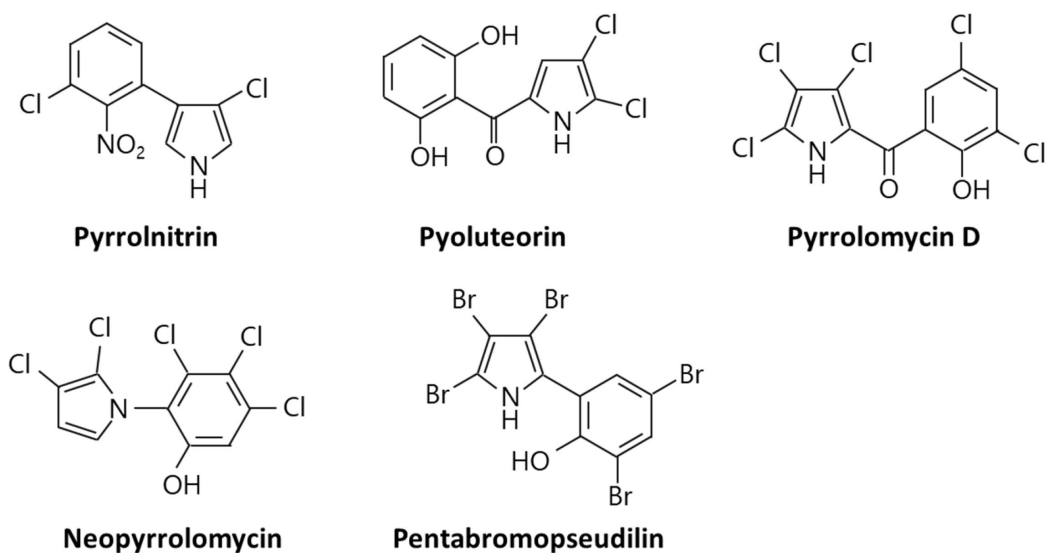


Fig. 1. Chemical structure of natural halogenated phenylpyrrole derivatives.

그러나, 빛에 노출되면 피롤 링의 광산화에 의해 잘 분해되어 항진균 활성이 소실되어 생물 살균제(bio-fungicide)로의 적용에는 어려운 문제가 있었다[23]. 그 대안으로 Syngenta(주)에서 PRN과 구조적으로 유사하며, 빛에 대한 내성이 증가하며, 높은 항진균 활성을 갖는 화학합성품인 펜피콜로닐(fenpiclonil)과 플루디옥소닐(fludioxonil)이 개발되었다[21](Fig. 2; Table 1). 현재 플루디옥소닐은 여러 진균병의 예방 용도로 수확 전/후 단계의 잎, 과일, 종자 살포에 광범위하게 사용되고 있다. 그러나, 플루디옥소닐의 장기 사용에 따른 일부 내성 진균의 출현, 수생 생물체

에 대한 높은 독성, 사람세포에 대한 내분비 교란, 면역독성과 같은 건강 측면에서의 많은 문제점들이 제기되고 있다[11]. 한편, 다양한 생리활성을 지닌 천연의 HPD에 대한 요구가 증대됨에 따라, PRN뿐만 아니라 pyrrolomycins pyoluteorin, pentachloropseudilin 등의 물질 분리, 유전자 및 효소, 물질 생산, 생리활성 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[4, 7, 30](Table 1). 본 논문은 여러 HPD 중에서 세균 유래의 PRN의 생합성에 관한 특징과 생산, 합성 HPD중 플루디옥소닐의 특징, 그 외 천연 HPD의 특징 등을 정리하여 보고하고자 한다.

## 본 론

### 천연 피롤니트린

#### 피롤니트린 생합성 과정과 효소 특징

미생물에서 PRN의 생합성은 전구체인 L-트립토판으로부터 4 단계의 효소촉매 반응을 통해 이루어진다(Fig. 2). 1단계는 L-트립토판이 tryptophan 7-halogenase (PnA, RebH) 효소촉매에 의해 7-chloro-L-tryptophan (7-Cl-Trp)으로 전환되는 반응으로, 1분자의 O<sub>2</sub>, Cl<sup>-</sup>와 조효소인 FADH<sub>2</sub>를 요구한다[9]. 2단계는 monodechloroaminopyrrolnitrin (MDAP) synthase (PnB) 효소촉매에 의해 7-Cl-Trp의 인돌(indole) 환이 페닐피롤로 재배열되고 탈탄산 과정을 거쳐 MDAP로 전환되는 반응이다[36]. 3단계는 MDAP가 MDAP halogenase (PnC) 효소촉매에 의해 aminopyrrolnitrin (APRN)으로 전환되는 반응으로, 1분자의 O<sub>2</sub>, Cl<sup>-</sup>, FADH<sub>2</sub>를 각각 요구한다. 최종단계는 APRN이 APRN oxygenase (PnD) 효소촉매에 의해 PRN이 생합성되는 반응으로, 1분자의 O<sub>2</sub>와 FADH<sub>2</sub>를 각각 요구한다. 1, 3, 4단계의 반응은 공통적으로 FADH<sub>2</sub>를 조효소로 요구하며, 각각의 효소는 FADH<sub>2</sub>를 공급하는 flavin reductase 와 two-component halogenase 또는 oxygenase system을 구성한다. Tryptophan 7-halogenase는 *P. fluorescens* 유래의 PnA와 *Lechevalieria aerocolonigenes* 유래의 RebH가 그 기능이 잘 알려져있다. 구조기반 생화학적 연구에 의하면, PnA에 결합된 FADH<sub>2</sub>는 O<sub>2</sub>와 반응하여 peroxy-flavin을 형성한 후 Cl<sup>-</sup>에 의해 분해되어 차아염소산(HClO, hypochlorous acid)이 만들어 지고, 효소 내의 터널을 통해 L-트립토판이 위치한 부위로

이동하여 위치선택성(regioselective) 반응을 통해 7번 탄소에 염소가 첨가된 7-Cl-Trp이 생성된다[9]. RebH와 RebF (flavin reductase)의 특성에 관한 연구에 의하면, FADH<sub>2</sub>는 환산을 통해 RebH로 전달되는 도중에 산소가 쉽게 가로챌 수 있어 1분자의 염화반응에 약 230 분자의 FADH<sub>2</sub>가 필요할 만큼 비효율적인 반응으로, 낮은 산소분압에서 그 반응이 약 10배 더 효율적으로 진행되는 것으로 확인되었다[55]. 또한, RebH는 염화이온 이외의 다른 여러 할로젠 이온 중에서 브롬화 이온(bromide ion)을 이용하여 7-bromo-L-tryptophan을 만드는 활성이 있다[51, 55]. 한편, *P. fluorescens* 유래의 PnD와 PnF도 two-component arylamine oxygenase system을 구성하며, 대부분의 다른 two-component system과는 달리 단백질-단백질 상호작용 (protein-protein interaction)을 통해 환원된 FADH<sub>2</sub>를 PnD에 전달하여 APRN으로부터 보다 더 효율적으로 PRN을 형성하는 것으로 보고되었다[25].

#### 피롤니트린 생합성 관련 유전자의 특징

L-트립토판으로부터 PRN 생합성에 관련된 유전자는 *P. fluorescens* BL915에서 알려진 이후, *P. fluorescens* Pf-5, *P. chlororaphis* PA23, *Burkholderia cepacia* LT4-12-W, *B. ambifaria* AMMD, *Serratia plymuthica* G3, *Melittangium boletus*, *Myxococcus fulvus* 등에서 유전자 배열, DNA 및 단백질 서열정보가 밝혀졌다[8, 13, 22, 32, 36]. 대부분 4개 유전자가 반응 순서대로 나열된 하나의 오페론 *prnABCD*로 구성되어 있는 반면에, *M. fulvus*의 경우 *prnBCD*가 하나의 오페론으로 구성되어 있으며, *prnA*는 *prnD*의 말단

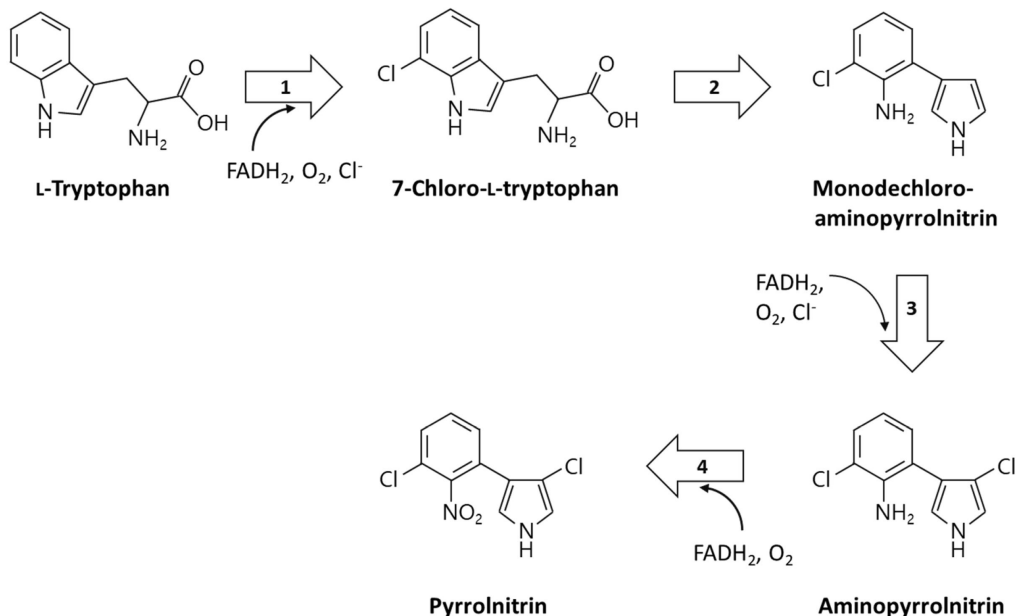


Fig. 2. Pyrrolnitrin biosynthetic pathway from L-tryptophan. 1, PnA (tryptophan 7-halogenase); 2, PnB (monodechloroaminopyrrolnitrin synthase); 3, PnC (monodechloroaminopyrrolnitrin halogenase); 4, PnD (aminopyrrolnitrin oxygenase).

반대방향으로 유전자가 배치되어 있다[22]. 4가지 단백질은 세균 종류에 관계없이 각각 매우 높은 상동성을 나타내었다. *P. fluorescens*에서 *prnD* 뒤에 putative transmembrane transporter를 암호화하는 *prnE*, flavin reductase를 암호화하는 *prnF*가 위치하며, 생물정보 분석에 의하면 이 유전자들은 *prnABCD*와 하나의 오픈론으로 구성되어 있는 것으로 추정된다[25]. 한편, *S. plymuthica* 유래의 *prnABCD* 오픈론의 프로모터(promoter) 부위를 분석한 결과, 추정되는  $s^{70}$ -10 box (TAATCT)와  $s^S$  확장된 -10 box (TCTAACAT)는 서로 중첩되어 있으며, 이는 *prnABCD* 오픈론이 RpoS-의존형 프로모터를 가지고 있는 것으로 판단된다. 또한, 정족수 감지(quorum sensing)와 RpoS 단백질이 함께 작용하여 *prnABCD*의 전사를 활성화하여 PRN의 생합성을 조절하며[29], RNA 결합단백질인 Hfq는 RpoS 번역 촉진 및 PRN의 생산을 자극하는 전사 후 조절제로 작용하는 것으로 보고되었다[57].

#### 미생물에 의한 피롤리트린 생산

PRN은 자연계에서 야생형, 특히 근권(rhizospheric) 미생물에서 많이 분리되었는데, 대표적으로 *P. pyrrocinia*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens*, *B. cepacia*, *Corallococcus exiguus*, *Cystobacter ferrugineus*, *Enterobacter agglomerans*, *M. fulvus*, *S. marcescens*, *S. plymuthica*, *A. vitaminophilum* 등이 있다[6, 29, 36, 45]. 식물과 관련된 미생물에서 자가유도신호(autoinducer signal)로 작용하는 *N*-acylhomoserine lactone을 매개로한 정족수 감지를 통해 PRN의 생산이 조절되는 것으로 보고되었다[36]. 배지 조건에 따라 생산농도는 다르며, 100 mg/L 이하로 매우 낮은 수준이다. *P. aureofaciens* ATCC 15926은 최소배지에서 0.3 mg/L 이하로 생산하며, 화학약제를 처리하여 얻은 변이균주에서 농도가 약 30배 증가되었다[41]. 생산용 배지와 pH는 PRN 분비의 중요인자로 알려져 있으며, *P. cepacia* LT4-12-W는 pH 5.8에서 글루탐산 나트륨을 함유한 최소 배지에서 60.5 mg/l 생산되었다[39]. 한편, *tac* 프로모터에 연결된 *S. primuthica* 유래의 *prnABCD* 오픈론을 *Escherichia coli* DH5a에 발현하여 PRN 생산을 확인하였다[29]. 유사하게, *P. fluorescens* 유래의 *prnABCD* 오픈론의 프로모터를 *tac*으로 교체하여 *P. fluorescens* BL915에 도입한 결과, 100 mg/L PRN이 생산되었다[27]. 그러나, 아직 대사공학을 통해 개발된 이종의 미생물에서 고농도로 PRN이 생산되는 결과는 보고된 바 없다.

#### 피롤리트린 생물활성과 그 응용

PRN은 *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. smegmatis*와 같은 세균, *Candida albicans*, *C. utilis*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*와 같은 효모, *Trichophyton asteroids*, *Sporotrichum*

*schenkii*, *Penicillium atrovenerum*, *P. oxalicum*, *Histoplasma capsulatum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium sambucinum*과 같은 곰팡이 등에 대한 광범위한 항균활성을 갖는 화합물이다[12, 18, 36, 48]. 특히 *Trichophyton* sp.의 표제성 피부 사상진균 감염의 치료용으로 사용되며, *R. solani*, *F. sambucinum*와 같은 토양 유래 진균과 *F. graminearum*, *F. culmorum*, *Pyrenophora tritici-repentis*와 같은 엽면감염 진균에 높은 항균활성을 갖는다[29, 50]. *R. solani*에 오염된 토양에서 PRN 처리 목화 묘목은 생존율이 13%에서 70%로 증가되며, PRN을 생산하는 *P. fluorescens* 배양액을 처리한 결과에서도 79%의 묘목이 살아남는 것으로 확인되었다[15]. 또한, PRN은 목화와 오이의 모잘록병(damping-off disease), 밀의 황갈색병(tan spot), 사과(pome fruits)의 저장 곰팡이, 목화의 묘목병(seedling disease), 감자의 건부병(dry rot), 해바라기의 균핵 시들음(sclerotinia wilt) 등에 대한 방제용으로 다방면에서의 응용가치가 있다[27]. 따라서, PRN은 진균류에 감염된 식물에 대한 생물학적 방제에 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다. 또한, PRN은 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)에 대한 살선충(nematicidal) 및 배척(repellent) 활성을 갖는 것으로 알려졌다[31]. 그러나, PRN은 빛에 노출되면 피롤 환의 광산화에 의해 잘 분해되어 항진균 활성이 소실되어 생물 살균제(bio-fungicide)로의 적용에는 어려운 문제가 있다[23, 40]. *Neurospora crassa*를 이용한 작용기작에 관한 연구에 의하면, 낮은 농도의 PRN은 전자전달계에서 산화적 인산화의 짝풀림제(uncoupler)로 작용하며, 고농도에서는 플라빈 부위와 cytochrome C oxidase에서 전자 수송을 차단함으로써 생육을 저해하는 것으로 확인되었다[24]. *S. cerevisiae*를 이용한 연구에서도 PRN은 숙신산(succinate) 또는 NADH와 coenzyme Q사이의 전자수송을 차단함으로써 세포의 생육을 억제하는 것으로 알려졌다[48].

#### 합성 플루디옥소닐(fludioxonil)

PRN과 비교하여 광안정성이 증가하면서, 높은 항진균 활성을 갖는 구조적으로 유사한 화학 합성품인 펜피클로닐과 플루디옥소닐은 신젠타(주)(Syngenta AG)에서 개발되었다[1, 21](Fig. 3). 현재 플루디옥소닐은 수확 전/후 단계의 아몬드, 아보카도, 보리, 콩, 당근, 면화, 인삼, 포도, 쌀, 귀리, 감자, 토마토 등 식물의 잎, 과일, 종자 처리용으로 사용되는, 합성으로 생산되는 대표적인 페닐피롤계(phenylpyrrole)의 비침습성 표면 살균제(non-systemic surface fungicide)이다[21].

합성 페닐피롤류는 곰팡이의 발생, 포자 발아, 발아관신장, 균사체 성장의 모든 단계를 저해하여 균사 내부의 팽윤과 세포벽 합성에 영향을 미쳐서, 결과적으로 균사가 팽창하여 말단의 용해를 야기하는 것으로 추정된다. 플루디옥소닐을 처리하면 미토콘드리아 막에서 전자전달을

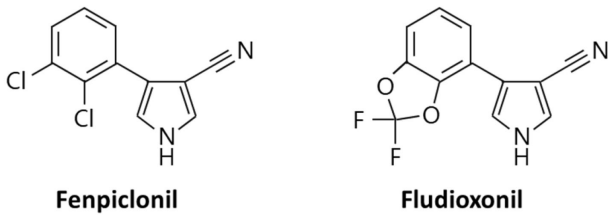


Fig. 3. Chemical structure of synthetic fenpiclonil and fludioxonil.

차단하여 활성산소의 발생을 초래하거나, nitrosogluthathione (GSNO) reductase를 저해하여 GSNO의 축적을 유도하거나, triosephosphate isomerase를 저해하여 methylglyoxal의 방출을 유도할 수 있는 것으로 알려졌다[3, 21]. 축적된 물질들은 그룹 III hybrid histidine kinase의 시스테인(cysteine) 잔기들을 산화(oxidation), glycation, 또는 nitrosation시키면, 이 효소의 kinase 활성이 phosphatase 활성으로 전환되어 high osmolarity glycerol (HOG) 신호경로를 상시 활성화를 유도하는 것으로 확인되었다. HOG 경로는 진균류가 식물에 침투하는 과정에서 외부 삼투압 스트레스를 인지하고 세포의 항상성을 유지하는데 관여되는 경로로, 플루디옥소닐 처리에 의해 최종적으로 이 경로의 상시 활성화를 유도하여 군사가 팽창/용해되어 진균류가 죽는 것으로 여겨진다[20].

1990년대 시장에 도입된 이후 플루디옥소닐에 대한 내성을 갖는 일부 *Alternaria brassicicola*, *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *S. homoeocarpa*, *Stemphylium solani* 등과 같은 field strain들이 분리되었다[2, 10, 17, 38, 53]. 장기간 사용함에 따라 플루디옥소닐 잔유물이 물 침전물, 토양, 농작물, 과일, 채소, 와인등에서 발견되며, 조류, 물벼룩, 제브라피시(zebrafish) 등의 수생생물에 높은 독성을 야기하는 문제가 보고되었다[11, 28]. 인간 유방암 세포주에서 항에스트로겐 활성을 갖는 잠재적인 내분비 교란물질로 작용하는 것으로 여겨지며[35, 47], 두꺼비(*Rhinella arena-rum*)에 심각한 기형을 유발할 수 있는 것으로 확인되었다[46]. 따라서, 식품 및 환경 건강 위험을 고려하여 유럽 식품 안전청은 다양한 작물, 채소 및 과일에서 플루디옥소닐에 대한 최대 잔류 한계치를 설정했으며, 우리나라에서도 일일 섭취 허용량(acceptable daily intake, ADI)은 0.4 mg/kg bw/day으로 정해져 있으며, 잔류허용 기준량은 82개의 식품에서 0.02-40 mg/kg 수준으로 관리하고 있다[16].

#### 기타 천연 할로겐화 페닐피롤유도체

다양한 합성품 또는 천연품의 항균제가 시장에서 사용되고 있지만, 지속적인 내성균주의 출현, 사람, 동물, 식물에 대한 유해성, 잔류성, 환경 생태계에 미치는 영향 등에 대한 문제점들이 대두되면서, 각국에서는 엄격한 규제를 통해 관리되고 있는 상황이다[36]. PRN이외의 할로겐화

페닐피롤 구조를 갖는 화합물 및 그 유도체들에 대한 연구들이 많이 진행되고 있으며, 그 예로 방선균, *A. vitaminophilum* 유래의 pyrrolomycins, *Streptomyces* sp. 유래의 dioxapyrrolomycin과 neopyrrolomycin, *P. aeruginosa*와 *P. fluorescens* 유래의 pyoluteorin, *P. bromoutilis*와 *A. luteoviolaceus* 유래의 pentabromopseudilin, 그리고 *Actinoplanes* sp. 유래의 pentachloropseudilin 등이 있다[7, 33, 50](Fig. 1, Fig. 4). 이에 PRN 이외의 HPD 중에서 pyrrolomycin과 pyoluteorin에 대해 구체적으로 설명하고자 한다.

#### Pyrrolomycins

Pyrrolomycins (PM)은 벤질(benzyl)과 피롤(pyrrole) 잔기 사이에 카보닐 연결체(carbonyl linker)를 가진 할로겐화 물질로(Fig. 1), 천연 PM은 PM-A, -B, -C, -D, -E, F3, -G, -H, -I, -J, dioxapyrrolomycin 등이 분리되었다(Fig. 4) [4, 49]. 주로 방선균(*S. vitaminophilus*, *Streptomyces* sp. UC 11065, *S. fumanus*)과 *Actinosporangium* sp.에서 생산되며, 그람양성균, 음성균에 대한 항세균/항생물막 활성, 항진균, 구충제, 항중식, 살충, 살진드기 활성을 포함하는 광범위한 생리활성을 갖는다[4]. 천연 및 합성 PM들에 대한 여러 병원성 그람 음성 및 양성세균에 대한 항생제 활성 평가에 따르면, PM 종류에 따라서 다양한 항생제 활성을 갖으며, 특히 PM-D와 PM-F의 경우 *S. aureus*, *S. faecalis*, *Bacillus anthracis*에 대해 매우 높은 항생제 활성을 나타냈다[42, 43]. 항-황색포도상구균 생물막(anti-staphylococcal biofilm)활성을 평가한 결과, 천연 PM-F3와 합성 PM-20a가 가장 우수한 항생물막 활성을 보이는 것으로 평가되었다[4, 37]. PM은 간단한 페닐피롤 구조체에 여러 탄소위치에 염소, 브롬이 첨가되어 다양한 라이브러리(library)를 제공하는 천연품 및 합성품이 만들어 질수 있으며, 이러한 PM 유도체들은 높은 약효, 안전성 등을 제공할 수 있는 새로운 항생제를 개발할 수 있는 토대가 될 것으로 판단된다[4].

#### Pyoluteorin

Pyoluteorin (PLT)는 type I polyketide synthase와 type II nonribosomal peptide synthetase 혼성 경로(hybrid pathway)를 통해서 제공되는 4,5-dichlorinated pyrrole 그룹과 resorcinol 잔기로 구성되어 있다[14, 44](Fig. 1). 난균류(Oomycetes), 세균, 진균류, 일부 식물에 독성으로 작용하며, 특히 농업에서 중요한 식물 병원균인 난균류 *Pythium ultimum*에 높은 항균작용이 알려져 있다[30]. *Pseudomonas* sp.의 많은 종에서 밝혀진 PLT 생합성에 관련된 10개의 유전자는 2가지 오페론인 *pltLABCDEFG*와 *pltRM*로 구성되어 있으며, LysR-type transcriptional regulator PltR에 의해 *pltLABCDEFG* 오페론의 발현이 활성화된다[26, 34]. PLT 수송에 관련된 유전자는 ATP-binding cassette trans-

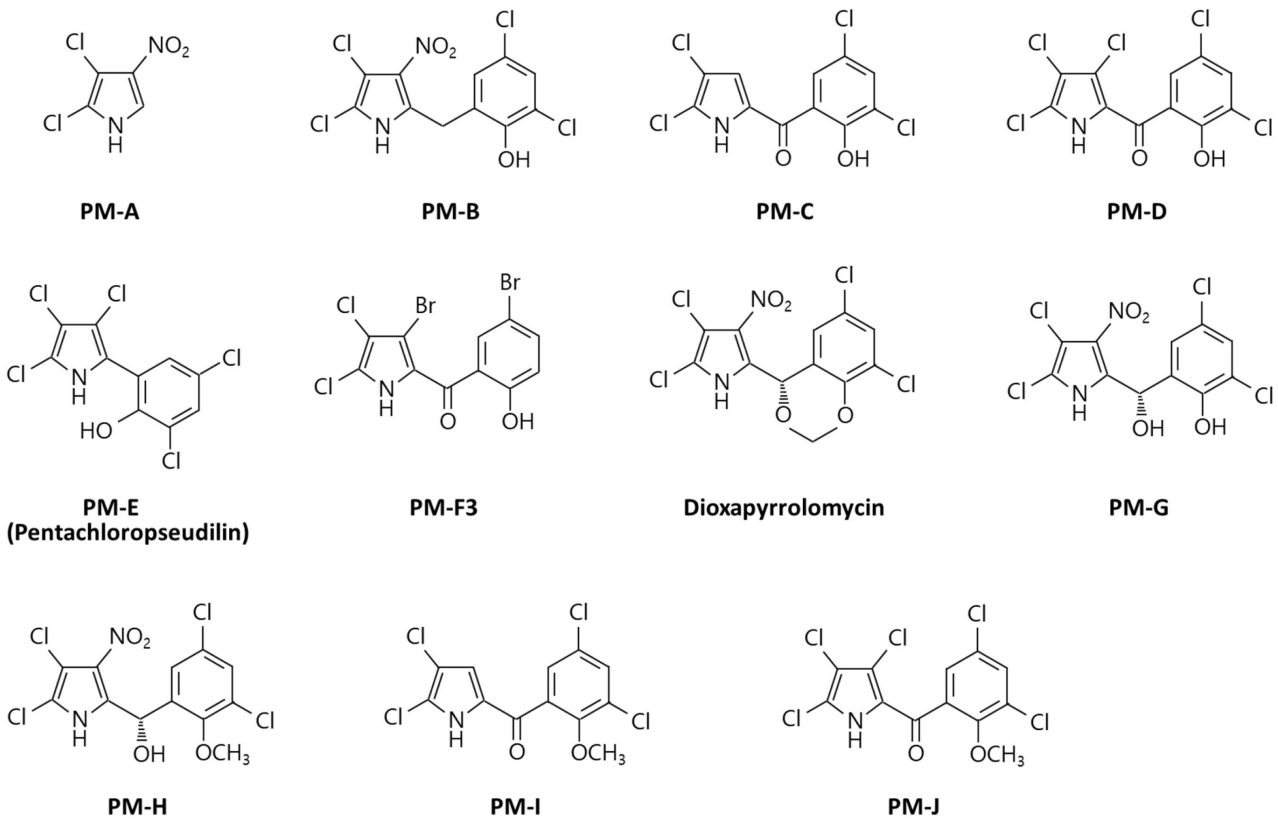


Fig. 4. Chemical structure of pyrrolomycin (PM) derivatives.

port 오페론 *pltIJKNOP*와 *pltZ* 유전자로 구성되어 있으며, TetR-type regulator PltZ에 의해 *pltIJKNOP*의 발현이 부정적으로 조절된다[19]. *P. protegens* H78에서 PLT 생합성은 복합 Gac/Rsm 조절 네트워크에 의해 조절되며[52], *P. aeruginosa* M18의 경우 3가지 정족수 감지 시스템인 LasI/LasR, RhII/RhIR, Pqs/PqsR에 의해서 강하게 부정적으로 조절받는 것으로 확인되었다[5, 54]. 또한, ATP-의존형 protease Lon, 정체기 sigma 인자 RpoS, 질소 대사-관련 sigma 인자 RpoN에 의해서도 PLT의 생합성이 조절된다[44]. 자연계에서 분리한 균에서 생산되는 PLT의 농도는 매우 낮았는데, *P. fluorescens* S272를 이용하여 에탄올을 탄소원으로 사용하여 배양한 결과 약 150 mg/L가 생산되었다[56]. 최근 *P. protegens*를 이용하여 대사공학을 통해 관련 조절 유전자를 결손하고 수송유전자의 과발현을 통해 기존 균주보다 14.3배 증가된 214 mg/L의 PLT를 생산하였다[44].

### 결론

할로젠화 페닐피롤 유도체(HPD)들은 항생제, 항진균제, 항바이오플럼, 살선충 효과 등의 광범위한 생물활성 기능을 갖는 물질로, 대표적으로 미생물에서 생산되는 천

연품의 피롤리트린, 피롤로마이신, 피오루테오린 등과 합성품의 펜피클로닐, 플루디옥소닐 등이 있다. 피롤리트린은 표재성 피부 사상진균 감염의 치료용으로 현재 사용하고 있지만, 빛에 의해 분해되는 문제로 인해 광범위하게 사용하는데 제한이 있다. 대안으로 합성 플루디옥소닐이 비 침습성 표면 살균제로 식물의 종자 및 잎 처리용으로 상업적으로 사용되고 있다. 그러나, 환경적인 측면에서의 잔류성과 수생생물에 대한 높은 독성 등의 문제점이 있다. 그 외의 천연 HPD들도 다양한 생리활성을 나타내지만 아직 상업적으로 응용된 사례는 없는 상황이다. 페닐피롤 유도체는 여러 개의 염소, 브롬이 첨가될 수 있기 때문에 미생물에 의해서 다양한 라이브러리를 갖는 HPD의 생산이 가능하며, 더욱이 화학합성법으로 더 다양한 합성 HPD를 생산할 수 있기 때문에, 향후 보다 더 사람, 동물, 식물 등에 안전하면서 그 치료효과가 우수한 기능한 HPD를 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

### 감사의 글

본 논문은 해양수산부 국립수산물과학원(수산물과학연구사업 R2023019) 및 부산광역시 2023년도 BB21<sup>+</sup> 사업의 지원을 받아 수행되었습니다.

## The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## References

- Apell, J. N., Pflug, N. C. and McNeill, K. 2019. Photodegradation of fludioxonil and other pyrroles: The importance of indirect photodegradation for understanding environmental fate and photoproduct formation. *Environ. Sci. Technol.* **53**, 11240-11250.
- Avenot, H., Simoneau, P., Iacomi-Vasilescu, B. and Bataillé-Simoneau, N. 2005. Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene AbNIK1 from *Alternaria brassicicola* that confer high dicarboximide and phenylpyrrole resistance. *Curr. Genet.* **47**, 234-243.
- Brandhorst, T. T., Kean, I. R. L., Lawry, S. M., Wiesner, D. L. and Klein, B. S. 2019. Phenylpyrrole fungicides act on triosephosphate isomerase to induce methylglyoxal stress and alter hybrid histidine kinase activity. *Sci. Rep.* **9**, 5047.
- Cascioferro, S., Raimondi, M. V., Cusimano, M. G., Raffa, D., Maggio, B., Daidone, G. and Schillaci, D. 2015. Pharmaceutical potential of synthetic and natural pyrrolomycins. *Molecules* **20**, 21658-21671.
- Chen, Y., Wang, X., Huang, X., Zhang, X. and Xu, Y. 2008. Las-like quorum-sensing system negatively regulates both pyoluteorin and henazine-1-carboxylic acid production in *Pseudomonas* sp. M18. *Sci China C: Life Sci.* **51**, 174-181.
- Chernin, L., Brandis, A., Ismailov, Z. and Chet, I. 1996. Pyrrolnitrin production by an *Enterobacter agglomerans* strain with a broad spectrum of antagonistic activity towards fungal and bacterial phytopathogens. *Curr. Microbiol.* **32**, 208-212.
- Chinthalapudi, K., Taft, M. H., Martin, R., Heissler, S. M., Preller, M., Hartmann, F. K., Brandstaetter, H., Kendrick-Jones, J., Tsiavaliaris, G., Gutzeit, H. O., Fedorov, R., Buss, F., Knölker, H. J., Coluccio, L. M. and Manstein, D. J. 2011. Mechanism and specificity of pentachloropseudilin-mediated inhibition of myosin motor activity. *J. Biol. Chem.* **286**, 29700-29708.
- Costa, R., van Aarle, I. M., Mendes, R. and van Elsas, J. D. 2009. Genomics of pyrrolnitrin biosynthetic loci: evidence for conservation and whole-operon mobility within gram-negative bacteria. *Environ. Microbiol.* **11**, 159-175.
- Dong, C., Flecks, S., Unversucht, S., Haupt, C., van Pée, K. H. and Naismith, J. H. 2005. Tryptophan 7-halogenase (PrnA) structure suggests a mechanism for regioselective chlorination. *Science* **309**, 2216-2219.
- Firoz, M. J., Xiao, X., Zhu, F. X., Fu, Y. P., Jiang, D. H., Schnabel, G. and Luo, C. X. 2016. Exploring mechanisms of resistance to dimethachlone in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pest. Manag. Sci.* **72**, 770-779.
- Geng, Q., Sun, P., Tang, G., Li, P. and Zhai, Y. 2021. Improved antifungal activity and reduced aquatic toxicity of fludioxonil by complexation with  $\beta$ -cyclodextrin. *J. Mol. Struct.* **1246**, 131167.
- Gordee, R. S. and Matthews, T. R. 1969. Systemic antifungal activity of pyrrolnitrin. *Appl. Microbiol.* **17**, 690-694.
- Hammer, P. E., Burd, W., Hill, D. S., Ligon, J. M. and van Pée, K. 1999. Conservation of the pyrrolnitrin biosynthetic gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**, 39-44.
- Hansen, M. L., Wibowo, M., Jarmusch, S. A., Larsen, T. O. and Jelsbak, L. 2022. Sequential interspecies interactions affect production of antimicrobial secondary metabolites in *Pseudomonas protegens* DTU9.1. *ISME J.* **16**, 2680-2690.
- Howell, C. and Stipanovic, R. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* **69**, 480-482.
- [https://www.mfds.go.kr/brd/m\\_218/view.do?seq=33313&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm\\_seq\\_1=0&itm\\_seq\\_2=0&multi\\_itm\\_seq=0&company\\_cd=&company\\_nm=&page=1](https://www.mfds.go.kr/brd/m_218/view.do?seq=33313&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=1)
- Hu, J., Zhou, Y., Gao, T., Geng, J., Dai, Y., Ren, H., Lamour, K. and Liu, X. 2019. Resistance risk assessment for fludioxonil in *Sclerotinia homoeocarpa* in China. *Pestic. Biochem. Physiol.* **156**, 123-128.
- Huang, R., Feng, Z., Chi, X., Sun, X., Lu, Y., Zhang, B., Lu, R., Luo, W., Wang, Y., Miao, J. and Ge, Y. 2018. Pyrrolnitrin is more essential than phenazines for *Pseudomonas chlororaphis* G05 in its suppression of *Fusarium graminearum*. *Microbiol Res.* **215**, 55-64.
- Huang, X., Zhu, D., Ge, Y., Hu, H., Zhang, X. and Xu, Y. 2004. Identification and characterization of *pltZ*, a gene involved in the repression of pyoluteorin biosynthesis in *Pseudomonas* sp. M18. *FEMS Microbiol. Lett.* **232**, 197-202.
- Jacob, S., Foster, A. J., Yemelin, A. and Thines, E. 2015. High osmolarity glycerol (HOG) signalling in *Magnaporthe oryzae*: Identification of MoYPD1 and its role in osmoregulation, fungicide action, and pathogenicity. *Fungal Biol.* **119**, 580-594.
- Kilani, J. and Fillingner, S. 2016. Phenylpyrroles: 30 Years, two molecules and (nearly) no resistance. *Front. Microbiol.* **7**, 2014.
- Kimer, S., Hammer, P. E., Hill, D. S., Altmann, A., Fischer, I., Weislo, L. J., Lanahan, M., van Pée, K. H. and Ligon, J. M. 1998. Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* **180**, 1939-1943.
- Lamberth, C. 2012. Phenylpyrrole fungicides. In: Lamberth, C. and Dinges, J. (eds) *Bioactive Heterocyclic Compound Classes: Agrochemicals*, pp. 155-162, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Lambowitz, A. M. and Slayman, C. W. 1972. Effect of

- pyrrolnitrin on electron transport and oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **112**, 1020-1022.
25. Lee, J. K. and Zhao, H. 2007. Identification and characterization of the flavin:NADH reductase (PrnF) involved in a novel two-component arylamine oxygenase. *J. Bacteriol.* **189**, 8556-8563.
  26. Li, S., Huang, X., Wang, G. and Xu, Y. 2012. Transcriptional activation of pyoluteorin operon mediated by the LysR-type regulator PltR bound at a 22 bp *lys* box in *Pseudomonas aeruginosa* M18. *PLoS One* **7**, e39538.
  27. Ligon, J. M., Hill, D. S., Hammer, P. E., Torkewitz, N. R., Hofmann, D., Kempf, H. J. and van Pée, K. H. 2000. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest. Manag. Sci.* **56**, 688-695.
  28. Liu, X., Wang, X., Zhang, F., Yao, X., Qiao, Z., Deng, J., Jiao, Q., Gong, L. and Jiang, X. 2022. Toxic effects of fludioxonil on the growth, photosynthetic activity, oxidative stress, cell morphology, apoptosis, and metabolism of *Chlorella vulgaris*. *Sci. Total Environ.* **838(Pt 2)**, 156069.
  29. Liu, X., Yu, X., Yang, Y., Heeb, S., Gao, S., Chan, K. G., Cámara, M. and Gao, K. 2018. Functional identification of the *prnABCD* operon and its regulation in *Serratia plymuthica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 3711-3721.
  30. Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C., Haas, D. and Défago, G. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO on its disease suppressive capacity. *Phytopathology* **82**, 190-195.
  31. Nandi, M., Selin, C., Brassinga, A. K., Belmonte, M. F., Fernando, W. G., Loewen, P. C. and de Kievit, T. R. 2015. Pyrrolnitrin and hydrogen cyanide production by *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 exhibits nematocidal and repellent activity against *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* **10**, e0123184.
  32. Nascimento, F., Vicente, C., Cock, P., Tavares, M., Rossi, M., Hasegawa, K. and Mota, M. 2018. From plants to nematodes: *Serratia grimesii* BXF1 genome reveals an adaptation to the modulation of multi-species interactions. *Microb. Genom.* **4**, e000178.
  33. Nogami, T., Shigihara, Y., Matsuda, N., Takahashi, Y., Naganawa, H., Nakamura, H., Hamada, M., Muraoka, Y., Takita, T., Iitaka, Y. and Takeuchi, T. 1990. Neopyrrolomycin, a new chlorinated phenylpyrrole antibiotic. *J. Antibiot (Tokyo)*. **43**, 1192-1194.
  34. Nowak-Thompson, B., Chaney, N., Wing, J. S., Gould, S. J. and Loper, J. E. 1999. Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* **181**, 2166-2174.
  35. Orton, F., Rosivatz, E., Scholze, M. and Kortenkamp, A. 2011. Widely used pesticides with previously unknown endocrine activity revealed as *in vitro* antiandrogens. *Environ. Health Perspect.* **119**, 794-800.
  36. Pawar, S., Chaudhari, A., Prabha, R., Shukla, R. and Singh, D. P. 2019. Microbial pyrrolnitrin: Natural metabolite with immense practical utility. *Biomolecules* **9**, 443.
  37. Raimondi, M.V., Schillaci, D. and Petruso, S. 2007. Synthesis and anti-staphylococcal activity of new halogenated pyrroles related to pyrrolomycins F. *J. Heterocycl. Chem.* **44**, 1407-1411.
  38. Ren, W., Shao, W., Han, X., Zhou, M. and Chen, C. 2016. Molecular and biochemical characterization of laboratory and field mutants of *Botrytis cinerea* resistant to fludioxonil. *Plant Dis.* **100**, 1414-1423.
  39. Roitman, J. N., Mahoney, N. E. and Janisiewicz, W. J. 1990. Production and composition of phenylpyrrole metabolites produced by *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 381-386.
  40. Sako, M., Kihara, T., Tanisaki, M., Maki, Y., Miyamae, A., Azuma, T., Kohda, S. and Masugi, T. 2002. Novel photodegradation of the antifungal antibiotic pyrrolnitrin in anhydrous and aqueous aprotic solvents. *J. Org. Chem.* **67**, 668-673.
  41. Salcher, O. and Lingens, F. 1980. Isolation and characterization of a mutant of *Pseudomonas aureofaciens* ATCC 15926 with an increased capacity for synthesis of pyrrolnitrin. *J. Gen. Microbiol.* **118**, 509-513.
  42. Schillaci, D., Petruso, S., Cascioferro, S., Raimondi, M. V., Haagensen, J. A. and Molin, S. 2008. *In vitro* anti-Gram-positive and antistaphylococcal biofilm activity of newly halogenated pyrroles related to pyrrolomycins. *Int. J. Antimicrob. Agents* **31**, 380-382.
  43. Schillaci, D., Petruso, S., Raimondi, M. V., Cusimano, M. G., Cascioferro, S., Scalisi, M., La Giglia, M. A. and Vitale, M. 2010. Pyrrolomycins as potential anti-staphylococcal biofilms agents. *Biofouling* **26**, 433-438.
  44. Shi, H., Huang, X., Wang, Z., Guan, Y. and Zhang, X. 2019. Improvement of pyoluteorin production in *Pseudomonas protegens* H78 through engineering its biosynthetic and regulatory pathways. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 3465-3476.
  45. Sultan, Z., Park, K., Lee, S. Y., Park, J. K., Varughese, T. and Moon, S. S. 2008. Novel oxidized derivatives of antifungal pyrrolnitrin from the bacterium *Burkholderia cepacia* K87. *J. Antibiot (Tokyo)*. **61**, 420-425.
  46. Svartz, G., Meijide, F. and Coll, C. P. 2016. Effects of a fungicide formulation on embryo-larval development, metamorphosis, and gonadogenesis of the South American toad *Rhinella arenarum*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **45**, 1-7.
  47. Teng, Y., Manavalan, T. T., Hu, C., Medjakovic, S., Jungbauer, A. and Klinge, C. M. 2013. Endocrine disruptors fludioxonil and fenhexamid stimulate miR-21 expression in breast cancer cells. *Toxicol. Sci.* **131**, 71-83.
  48. Tripathi, R. K. and Gottlieb, D. 1969. Mechanism of action of the antifungal antibiotic pyrrolnitrin. *J. Bacteriol.* **100**, 310-318.
  49. Valderrama, K., Pradel, E., Firsov, A. M., Drobecq, H., Bauderlique-le, R. H., Villemagne, B., Antonenko, Y. N. and Hartkoorn, R. C. 2019. Pyrrolomycins are potent natural protonophores. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**,



- e01450-19.
50. van Pée, K. H. and Ligon, J. M. 2000. Biosynthesis of pyrrolnitrin and other phenylpyrrole derivatives by bacteria. *Nat. Prod. Rep.* **17**, 157-164.
51. Veldmann, K. H., Dachwitz, S., Risse, J. M., Lee, J. H., Sewald, N. and Wendisch, V. F. 2019. Bromination of L-tryptophan in a fermentative process with *Corynebacterium glutamicum*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**, 219.
52. Wang, Z., Huang, X., Liu, Y., Yang, G., Liu, Y. and Zhang, X. 2017. GacS/GacA activates pyoluteorin biosynthesis through Gac/Rsm-RsmE cascade and RsmA/RsmE-driven feedback loop in *Pseudomonas protegens* H78. *Mol. Microbiol.* **105**, 968-985.
53. Wu, D. X., Zhang, R. S., Han, X., Wang, J. X., Zhou, M. G. and Chen, C. J. 2015. Resistance risk assessment for fludioxonil in *Stemphylium solani*. *Ann. Appl. Biol.* **167**, 277-284.
54. Yan, A., Huang, X., Liu, H., Dong, D., Zhang, D., Zhang, X. and Xu, Y. 2007. An rhl-like quorum-sensing system negatively regulates pyoluteorin production in *Pseudomonas* sp. M18. *Microbiology* **153(Pt 1)**, 16-28.
55. Yeh, E., Garneau, S. and Walsh, C. T. 2005. Robust in vitro activity of RebF and RebH, a two-component reductase/halogenase, generating 7-chlorotryptophan during rebeccamycin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 3960-3965.
56. Yuan, Z., Cang, S., Matsufuji, M., Nakata, K., Nagamatsu, Y. and Yoshimoto, A. 1998. High production of pyoluteorin and 2,4-diacetylphloroglucinol by *Pseudomonas fluorescens* S272 grown on ethanol as a sole carbon source. *J. Ferment. Bioeng.* **86**, 559-563.
57. Zhou, M., Gao, K., Zeng, J., Yu, X., Wu, Y., Ge, J., Duan, Y. and Liu, X. 2012. Role of the RNA-binding protein Hfq in *Serratia plymuthica*. *Front. Biosci. (Elite Ed).* **4**, 1263-1275.

## 초록 : 기능성 할로겐화 페닐피롤 유도체들의 개발

정민희<sup>1</sup> · 공희정<sup>2</sup> · 김영옥<sup>2</sup> · 이진호<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>경성대학교 식품생명공학과, <sup>2</sup>국립수산과학원 생명공학과)

피롤니트린, 피롤로마이신, 피오루테오린 등은 미생물 유래의 다양한 항균활성을 갖는 기능성 할로겐화 페닐피롤 유도체들이다. 그 중에서 피롤니트린은 *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia plymuthica* 등에서 L-트립토판으로부터 4단계 반응을 거쳐 만들어내는 이차대사산물이다. 현재 표재성 피부 사상진균 감염의 치료용으로 사용되며, 토양유래 및 엽면 진균감염에 높은 길항작용을 하며, 인체에 무해하여 산업적 응용가치가 높다. 한편 피롤니트린은 빛에 의해 잘 분해되기 때문에 야외에서 광범위하게 사용하는데 어려움이 있다. 그 대안으로 구조적으로 유사하고 광 안정성이 우수한 합성으로 생산되는 비 침습성 표면 살균제인 플루디옥소닐이 개발되어, 주로 식물의 종자 및 엽면 처리용으로 광범위하게 사용되고 있다. 그러나, 수생생물에 높은 독성을 야기하며, 인간 세포주에서 잠재적인 내분비 교란물질로 작용할 수 있는 위험요인이 있어 각국에서 잔류허용 기준량을 설정하여 관리하고 있다. 한편, 천연 피롤로마이신, 피오루테오린과 같은 화합물이 미생물에서 분리, 확인되었으며, 각각, 그람양성균에 대한 항생/항생물막 형성, 식물 병원 난균류 *Pythium ultimum*에 높은 항균활성을 갖는다. 본 총설은 여러 기능성 할로겐화 페닐 피롤 유도체 중 세균 유래의 피롤니트린의 생합성에 관한 특징과 생산, 합성 플루디옥소닐의 특징, 그 외 천연 페닐피롤 유도체들의 특징등을 요약하였다. 우리는 다양한 천연 HPD의 미생물에 의한 생산과 화학합성법에 의한 다양한 합성 HPD의 개발을 통해 인간과 환경에서 높은 치료 효능과 안전성을 제공하는 새로운 HPD의 개발을 기대한다.