

## *Streptomyces* sp. 182-27 균주가 생산하는 아미노산 대사길항물질의 정제와 특성

박 부 길  
강원대학교 식품공학과

### Isolation and Properties of Amino Acid Antimetabolite from *Streptomyces* sp. 182-27

Park, Boo-Kil

\*Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,  
Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

**Abstract** — A *Streptomyces* strain No. 182-27, which produced amino acid antimetabolite, was isolated from soil. During the course of screening for new amino acid antimetabolites from the culture broths of *Actinomycetes*, we found that the strain produced a substance active against Gram-positive bacteria and its activity was reversed by L-leucine on the synthetic minimal agar medium in the culture broth. The morphological and cultural characteristics serve to identify the producing organism strain 182-27 as the *Streptomyces*, although the species of this strain should be resolved in further studies. Fermentation was carried out in the synthetic medium at 28°C for 78 hours. The fermentation yield reached about 2 mg per liter of the broth. Purification was done by ion exchange resin, active carbon, silica gel column chromatography and obtained 20 mg of pure active substance from the 20 l culture broth. The 182-27 substance was obtained as white powder, mp 188°C. From the physicochemical characteristics of the substance, it was amino acid like substance but unknown about its chemical structure. It is active against some Gram-positive bacteria and reversed by L-leucine.

최근 여러 연구실에서는 미생물 기원의 대사길항물질의 탐색에 관심을 가지고 연구하고 있으며 미국의 Hoffman-La Roche사의 Scannell(1-7), Pruess(8-12), Eli Lilly사의 Molley(13), 독일 Tübingen 대학의 Bayer(14, 15), 일본의 Sugiura(16, 17), 국내의 박(18) 등에 의하여 아미노산, 펩타이드, 핵산 관련 대사길항물질이 다수 발견 보고되고 있다. 일반적으로 항생물질의 screening 방법과는 달리 최소 검정배지에 있어서의 대사저해에 핵산, 아미노산, vitamin 등의 첨가로 대사저해 회복을 screening함으로써 새로운 화합물의 발견이 가능하게끔 되었다.

대사길항물질은 필수 대사산물의 구조 analogue의 경우가 대부분이며 주로 아미노산 analogue의 대사

길항물질이 많이 알려져 있다. 그 중에서도 glutamine의 대사길항물질(6, 9, 14)인 경우는 dipeptide 또는 tripeptide 물질이 많고 L-threonine의 대사길항물질인 plumbemycin(18)이 tripeptide로 밝혀져 있다. 기타 아미노산 대사길항물질의 경우는 대개 그의 analogue가 대부분이다.

필자는 이와같은 견지에서 방선균이 생산하는 새로운 아미노산 대사길항물질의 탐색을 목적으로 screening한 결과 토양에서 분리한 *Streptomyces* sp. 182-27의 배양액에서 L-leucine에 길항작용을 나타내고 특정시험균에 대해 항균성을 나타내는 물질의 존재를 확인하였다. 현재까지 보고된 L-leucine 대사길항물질은 L-2-amino-4-pentynoic acid(2)가 있으나 L-methionine에 의해서도 길항당하므로 약간의 상이점이 있어 본 물질의 신규 가능성을 기대할 수가 있다.

본보에서는 이러한 screening 방법, 생산균주의 분

**Key words:** Antimetabolites, L-leucine antimetabolite, 182-27 substance

\*Corresponding author

류동정, 유효물질의 추출정제 및 약간의 이화학적, 생물학적 성질을 규명하였기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### Screening 방법

**생산균의 분리** : 각지에서 채취한 토양시료를 10배수의 멸균수에 현탁하여 soluble starch 1%,  $K_2HPO_4$  0.05%,  $NH_4Cl$  0.05%, agar 1.5%로 조제된 배지에서 30°C, 4~7일간 평판배양하였다. 평판배지상에 생성된 colony 중 방선균으로 보이는 colony를 modified Bennett's agar에서 사면배양하여 순수분리하였다.

**배양과 시험균** : 방선균의 배양은 Table 1에 표시한 액체배지에서 30°C, 3~5일간 왕복 진탕배양하였다. 배양액의 생물학적 검정은 Scannell 등(2)의 방법에 따랐으나 여기서는 Davis-Mingiolis 최소검정배지(19) 대신에 Table 2에 표시한 Stephenson-Whetham 배지(20)(W-W 배지)를 사용하였다.

Davis-Mingiolis 최소배지는 장기간 Hoffman La Roche group에 의하여 사용되어 왔기 때문에 S-W 합성배지를 선택하였다. 시험균은 *Bacillus subtilis* IFO 12210과 *Escherichia coli* IFO 13168을 사용하였다.

**검정방법** : 일차로 각 방선균의 배양액을 paper disc( $\Phi 7.5$  mm, Toyo Rochi)에 적셔서 S-W 합성배지와 polypeptone(Daigo brand) 0.2%와 0.1% yeast extract(Daigo brand)를 첨가한 합성배지(Table 2의 S-W complex medium) 위에 각각 놓고 S-W 합성배지에 활성을 나타내나 S-W complex 합성배지에는

활성을 나타내지 않는 균주를 선발하였다. 이차 검정으로는 일차에서 활성을 나타내는 배양액의 주위에 아미노산 수용액(mg/ml)을 적신 paper disc를 놓고 특정 아미노산에 대해 항균활성이 회복되는 것을 검색, 선발하였다. 시험균은 *Bacillus subtilis* IFO 12210을 Bouillon에 하룻밤 진탕배양하여 saline solution(0.85%)으로 2회 세척 후 평판배지 100 ml당 균 현탁액 5 ml를 첨가하여 합성배지로 하였다.

### 생산균주의 분류동정

균주의 형태학적 검정은 sucrose-nitrate agar 배지와 inorganic salt-starch agar 배지에서 28°C, 약 2주간 배양한 균의 형태를 광학현미경으로 검정하였으며, 포자 표면은 modified Bennett's agar 배지에서 생육한 균주의 포자를 전자현미경으로 관찰하였다. 배양학적 성상은 주로 International Streptomyces Project(ISP)(21)에 나타난 배지를 사용하여 28°C, 14일간 배양하면서 균의 생육과 포자형성, 포자의 색상, reverse side의 색조 및 가용성 색소 등을 현미경 및 육안으로 관찰하였으며 Waksman에 의해 추천된 배지(22)도 병용하였다. 탄수화물의 자화성은 Pridham과 Gottlieb(23)의 방법에 따랐으며 세포벽의 아미노산 조성은 Boone과 Pine(24)의 방법에 따랐다. 기타 생리적 특성은 상법에 준하였다.

### 생산균의 액체배양

500 ml용 진탕 flask에 전술한 Table 1의 액체배지 100 ml를 분주하고 고압살균 후 종배양액 각 2%를 접종하여 reciprocal shaker(109 rpm)에서 28°C, 78

Table 1. Composition of fermentation medium

Glucose	10 g
$(NH_4)_2SO_4$	2.64
$KH_2PO_4$	2.38
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	5.65
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.00
*Trace salts mixture	1 ml
Distilled water	1000 ml
pH 7.3	
*Trace salts mixture	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.64 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.11
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.75
ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.15
Distilled water	100 ml

Table 2. Composition of minimal and complex agar media

Stephenson-Whetham	medium	Stephenson-Whetham	Complex medium
Glucose	5 g	Glucose	5 g
$(NH_4)_2HPO_4$	4	$(NH_4)_2HPO_4$	4
$KH_2PO_4$	1	$KH_2PO_4$	1
NaCl	1	NaCl	1
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.03	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.03
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.7	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.7
Agar	15	Yeast extract	1
Distilled water	1000 ml	Polypepton	2
		Agar	15
		Distilled water	1000 ml

시간 진탕배양하였다. 종배양은 보존균의 사면배양에서 1백금이를 종배지(1% glucose, 0.5% polypeptone, 0.3% yeast extract, 0.003%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )에 접종하고 30°C, 48시간 진탕배양하였다. 최적배지 조성을 설정하기 위하여 Table 1의 기본배지에다 여러가지 탄소원과 질소원을 첨가하여 배지조성을 검토하였다.

#### 활성물질의 분리 정제

총 배양액 20l를 여과하여 균체를 제거하고 배양여액을 2N HCl으로 pH 3.5로 조정하고 Dowex 50×8 이온교환수지 column chromatography, active carbon 처리, silica gel column chromatography 등에 의하여 활성물질을 분리 정제하였다.

#### 활성물질의 이화학적 성질 및 생물학적 성질

활성물질의 이화학적 성질을 알아보기 위하여 분리 정제된 활성물질의 Rf치, 정색반응, 용해성 등을 검정하였으며 UV-spectrum과 IR-spectrum을 측정하였다. 최소 저지농도(MIC)는 최소한천배지 위에서 agar dilution assay법으로 측정하였으며 paper disc method에 의한 저지원의 크기도 조사하였다. 또한 길항물질인 L-leucine에 대한 항균성의 길항작용을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

#### 방선균의 분리

각 지역에서 채취한 토양시료에서 227주의 방선균을 분리하여 1차 screening한 결과 37주의 활성균주를 얻었다. 선발된 37주를 2차 screening하여 *Bacillus subtilis* IFO 12210의 시험균에만 활성을 나타내고 L-leucine에 의해 항균활성이 저해되는 물질을 생산하는 방선균을 강원도 추곡리에서 채취한 토양시료에서 분리하였으며, 그 균주의 단포자 분리균중 활성이 강한 균주를 선발하여 strain 182-27로 잠정 명명하였다.

#### 생산균주의 분류동정

**배양학적 성상** : 182-27 균주의 배양학적 성상을 Table 3에 표기하였다. Nutrient agar medium과 Waksman medium No. 2에서 생육이 불량하였으며 대부분의 배지에서는 생육이 양호하였다. 기균사의 색상은 whitish gray 계통이었으며 vegetative mycelium은 white 계통이었고, soluble pigment는 ISP No. 5, ISP No. 7에서 brown 색을 띠었다.

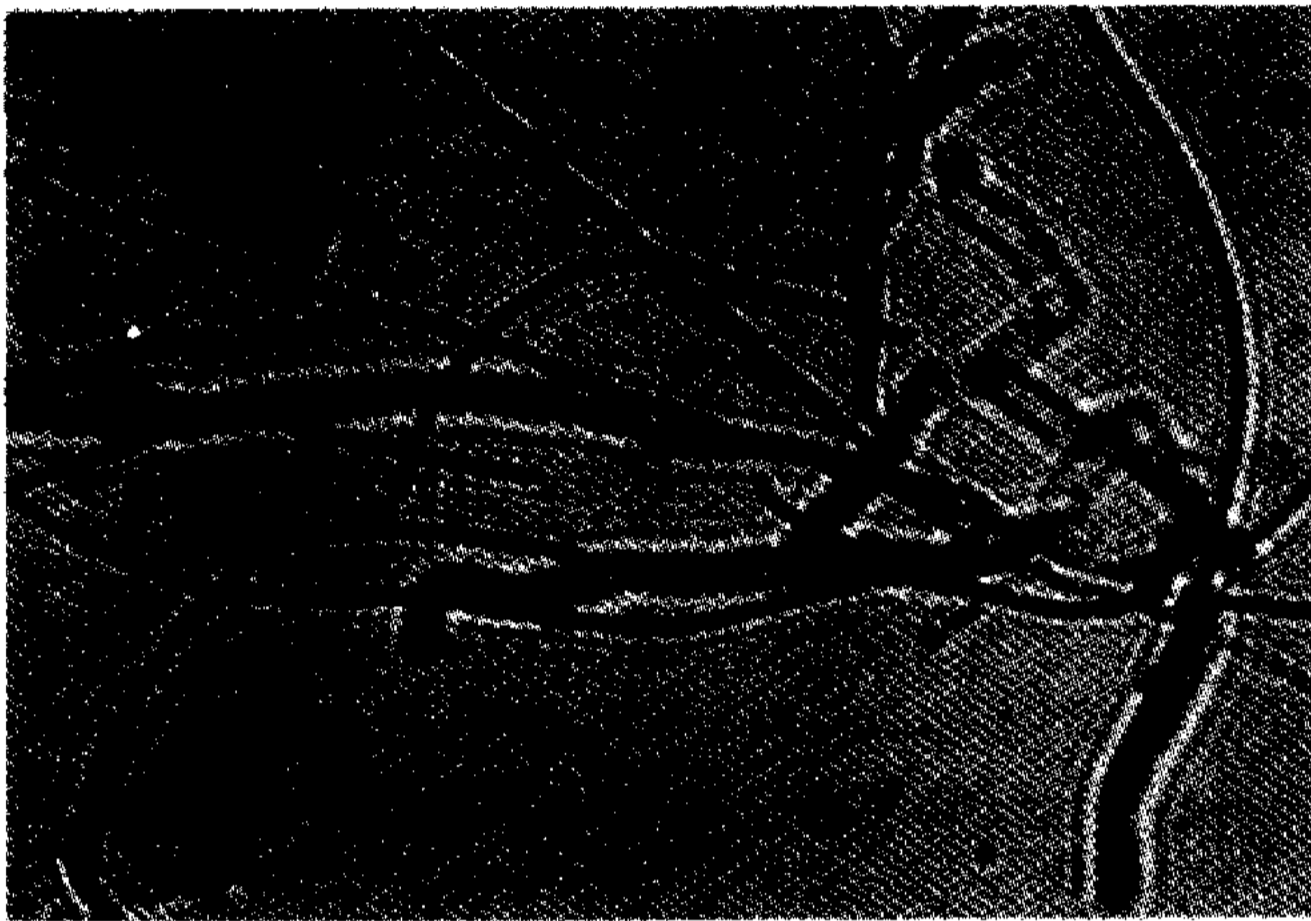
**형태학적 성상** : Modified Bennett's agar에서 28°C, 4일간 배양하여 나타난 형태학적 특성의 결과를 Table 4에 나타냈다. 포자 연쇄형태는 광학현미경으로

**Table 3. Cultural characteristics of strain 182-27**

Culture media	Growth and sporulation	Color of aerial mycelium	Soluble pigment	Reverse side
Sucrose-nitrate agar (Waksman med. No. 1)	good good sporulation	whitish gray	none	yellowish white
Glucose-asparagine agar (Waksman med. No. 2)	moderate no sporulation	white	none	yellowish white
Glycerol-asparagine agar (ISP No. 5)	good good sporulation	gray with white spots	brown	brown
Tyrosine agar (ISP No. 7)	good good sporulation	gray	brown	brown
Inorganic salts-starch agar (ISP No. 4)	abundant well sporulation	gray	yellow	dark yellow
Nutrient agar	moderate no sporulation	white	yellow	yellow
Yeast ex. -malt ex. agar (ISP No. 2)	abundant well sporulation	gray	none	dark yellow
Oatmeal agar (ISP No. 3)	abundant well sporulation	gray	none	tint yellow
Peptone-yeast ex. iron agar (ISP No. 6)	good good sporulation	white	none	yellow
Bennett's agar	abundant well sporulation	gray	yellow	yellow

**Table 4. Morphological characteristics of strain 182-27**

Form of spore-forming hyphae: RF
Number of spore: 10~20 ea.
Surface of spore: smooth
Existence of zoospore: not observed
Existence of sporangium: not observed
Formation of spore: aerial mycelium
Formation of substrate mycelium: not observed

**Fig. 1A. Aerial mycelium of strain 182-27 (Waksman No. 1).****Fig. 1B. Electron microphotograph of spores of strain 182-27 (Waksman No. 1).**

검정한 결과 *rectus flexibilis*(RF)(Fig. 1A)로 판정되었으며 전자현미경으로 검정한 포자 표면은 smooth (Fig. 1B)로 나타났다.

**생리학적 성상:** 182-27 균주의 생리학적 성상은 Table 5에 나타냈다.

**탄수화물의 자화성 및 세포벽 성분의 조성:** Priddyham-Gottlieb의 배지를 basal agar medium으로 하여 각 탄소원을 2% 첨가하고 28°C, 7~14일 배양한

**Table 5. Physiological characteristics of strain 182-27**

Test	Media employed	Response
Hydrolysis of starch	ISP No. 4	positive
Tyrosinase reaction	ISP No. 7	positive
Liquefaction of gelatin	G-P gelatin med.	negative
Peptonization of milk	skim milk med.	weak positive
Coagulation of milk	skim milk med.	negative
Melanin formation	ISP No. 7	positive
	ISP No. 6	negative
	ISP No. 1	negative
Temp. range of growth	P-G liquid med.	20~40°C
Optimum temp.	P-G liquid med.	28°C

**Table 6. Utilization of carbon sources by strain 182-27**

Carbon source	Utilization
D-Xylose	-
L-Arabinose	-
D-Glucose	++
D-Fructose	++
D-Galactose	++
L-Rhamnose	++
Sucrose	±
Maltose	+
Raffinose	+
D-Mannitol	+
i-Inositol	+
Salicin	±

++ = good utilization

+ = normal utilization

- = poor utilization

**Table 7. Identification of strain 182-27**

Color of mature sporulated aerial mycelium:	gray series
Spore chain morphology:	RF
Production of melanoid pigments:	positive
Surface of spore:	smooth
Utilization of carbon sources:	Table 6

결과를 Table 6에 나타냈다.

**182-27 균주의 동정:** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(25)에서 검색한 결과를 Table 7에 요약하였다.

이상의 결과 182-27주는 *Streptomyces*속의 gray series에 속하는 것으로 판명되며 포자의 연쇄모양, melanin 색소형성, 포자표면의 성상과 당 자화성 등의

**Table 8. Effect of carbon sources on production of 182-27 substance**

Carbon source	pH	Growth*	Zone-diameter (mm)**
Arabinose	4.66	+	27
Xylose	5.80	+	25
Galactose	4.60	++	25
Glucose	4.40	++	26
Fructose	4.15	++	26
Rhamnose	6.60	+	21
Maltose	6.70	+	22
Sucrose	6.83	±	11
Dextrin	5.91	+	26
Soluble starch	6.80	±	16
Potato starch	4.68	+	28
Glycerine	6.80	-	0
Basal medium;	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.64 g	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.38	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	5.65	
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.00	
	Trace salts	1 ml	
	Distilled water	1000 ml	

pH, growth and titer of 182-27 substance shown in Table 8 are values of 3 days beer.

Each carbon source was added on 2% level.

\*Growth was measured by visual estimation; ++ = well, + = good, ± = moderate, - = poor

\*\*Inhibition zone (mm) by paper disc agar diffusion method using *Bacillus subtilis* IFO 12210

결과를 종합하여 판단하여 볼 때 references상의 유연균을 발견할 수가 없었다. 신 균종 여부는 많은 type culture와 비교실험을 하지 않아 알 수가 없고 본보에서는 다만 기균사의 포자형성과 세포벽 성분의 조성(LL-DAP) 등으로 보아 *Streptomyces* sp.로만 동정하였다.

### 생산조건의 검토

**탄소원의 영향** : Pridham-Gottlieb basal medium에 각종의 탄소원을 2% 첨가하여 28°C, 78시간 진탕배양한 결과 arabinose, glucose, fructose, potato starch 등에서 생산이 양호했으며 sucrose, soluble starch 등에서는 생산이 저조하였고 glycerine에서는 생산되지 않았다(Table 8).

**질소원의 영향** : 탄소원 때와 같은 방법으로 배양한 결과(Table 9) asparagine, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 등에서 생산이 좋았으며 yeast extract는 culture

**Table 9. Effect of nitrogen sources on production of 182-27 substance**

Nitrogen source	pH	Growth*	Zone-diameter (mm)**
Polypepton	6.80	++	18
Meat extract	6.80	++	20
Asparagine	6.40	++	28
Dry yeast	6.78	++	20
Yeast extract	6.90	+++	17
Urea	5.78	++	24
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.51	++	28
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	4.53	++	28
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	6.76	++	21
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.70	++	26
Basal medium;	Glucose	20 g	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.38	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	5.65	
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.00	
	Trace salts	1 ml	
	Distilled water	1000 ml	

pH, growth and titer of 182-27 substance shown in Table 9 are values of 3 days beer.

Each nitrogen source was added on 2% level.

\*Growth was measured by visual estimation; ++ good, +++ well

\*\*Inhibition zone (mm) by paper disc agar diffusion method using *Bacillus subtilis* IFO 12210

mass량은 다른 질소원보다 많았으나 항균성은 약했다. 이것은 배지내에 함유되어 있는 유기질소원에 의해 항균력이 길항되어 약화된 것으로 추정된다.

**본 배양** : 이상의 각종 탄소원과 질소원의 영향을 검토한 결과 탄소원은 glucose, 질소원은 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 선정, 사용하였다. 본 배양은 500 ml flask에 배지 100 ml를 분주, 살균하고 종 배양액 각 2% 접종하여 reciprocal shaker(109 rpm)에서 28°C, 78시간 배양하였다. 그의 발효경과를 Fig. 2에 나타냈다. 통상 78시간으로 역가가 최고에 달했으며 이후 역가는 급속히 감소하였다. 그때의 pH는 약 4.3이었다.

### 대사길항물질의 분리 정제

본 배양 여액 20 l를 2 N HCl으로 pH 3.5로 조정후 ion-exchange column(Dowex 50×8, H<sup>+</sup> form, 50~100 mesh, column size, 5×47 cm)에 흡착시키고 물로 충분히 세척한 후 5% pyridine 수용액으로 용출시켜 100 ml씩 분획 후 활성부분을 모아 45°C에서 감압농축하여 약 230 mg의 유상물질을 얻었다. 이

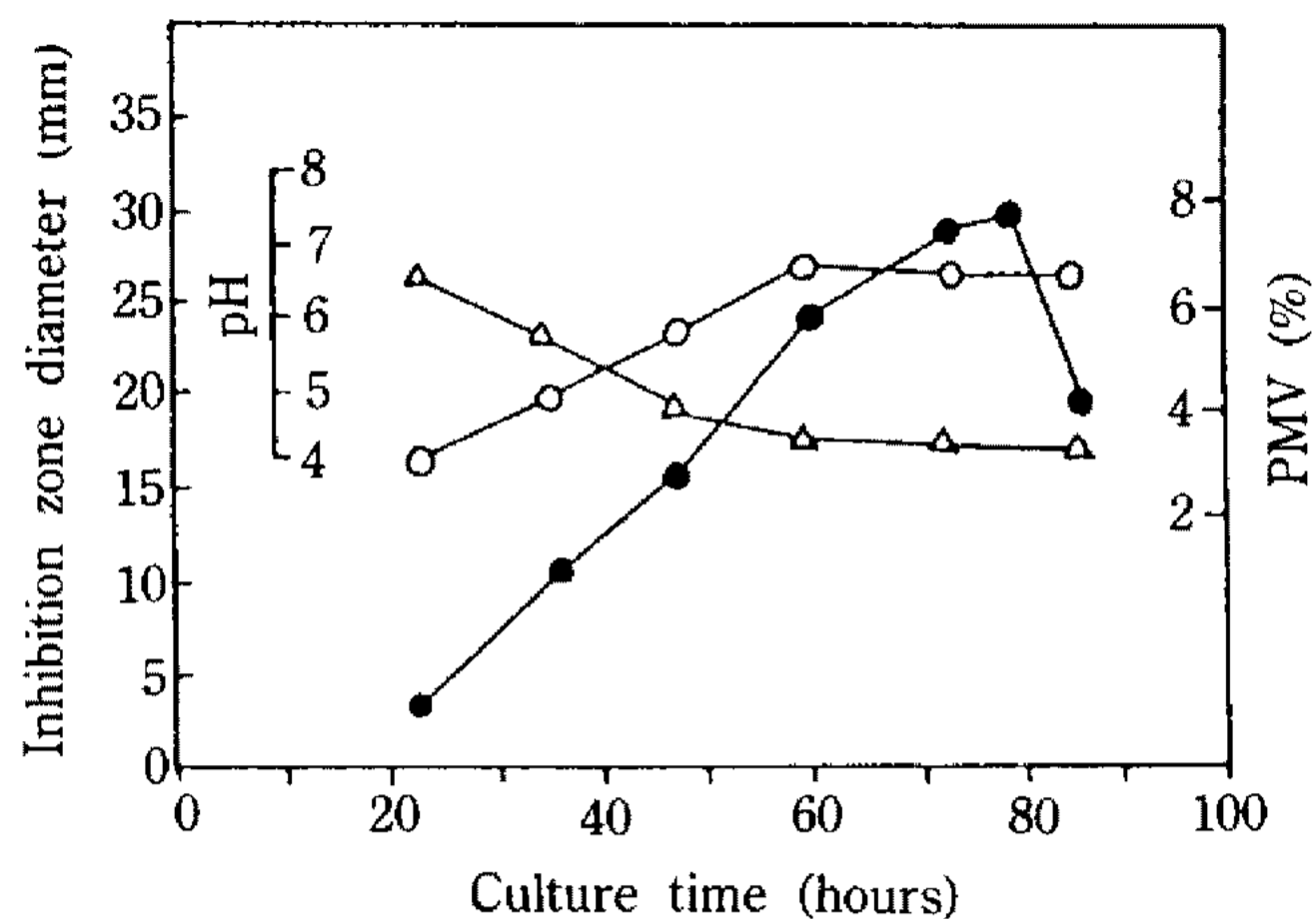


Fig. 2. The time course of 182-27 substance fermentation by *Streptomyces* sp. 182-27 in synthetic medium.

○—○: growth, packed mycelial volume (%)

△—△: pH

●—●: 182-27 substance production

유상물질을 소량의 0.1 M pyridine-formate buffer (pH 2.9)로 용해하고 미리 동일 buffer(pH 3.1)로 완충화한 Dowex 50×8 ion-exchange column(pyridine form, 200~400 mesh, column size 2.5×70 cm)에 charge 후 동일 buffer로 전개하였다. 각 fraction(10 ml/tube/20 min)을 bioassay로 활성을 검정 후 활성부분을 모아 감압농축하고 carbon column(2.5×10 cm)에 흡착시키고 70% methanol로 용출하여 색소를 제거하였다. 이 활성물질을 소량의 용매(BuOH : AcOH : H<sub>2</sub>O, 2 : 1 : 1)에 녹여 silica gel column(3.5×36 cm)에 charge 후 같은 용매로 전개하였다. 전개된 각 fraction(3.5 ml/tube/10 min) 중 TLC상에서 단일 spot를 나타내는 활성부분을 모아 감압농축 후 182-27의 활성물질 약 20 mg을 얻었다. 분리정제의 개략을 Fig. 3에 나타냈다.

### 182-27 물질의 이화학적 성질

182-27 물질은 백색분말로 융점 188°C였으며 hexane, benzene, ethyl acetate 등의 유기용매에는 불용이었으며 methanol, 물 등에는 잘 용해되는 수용성물질이었다. 182-27 물질의 Rf치는 Table 10과 같다.

활성물질의 spot 확인은 bio-autogram과 ninhydrin 정색반응으로 하였다. 182-27 물질의 pH와 열에 대한 안정성을 조사한 결과(data 생략) pH와 열에 대해서는 비교적 안정하였다. 182-27 물질의 수용액의 UV-spectrum은 270 nm에서 최대 흡수를 나타냈다. IR-

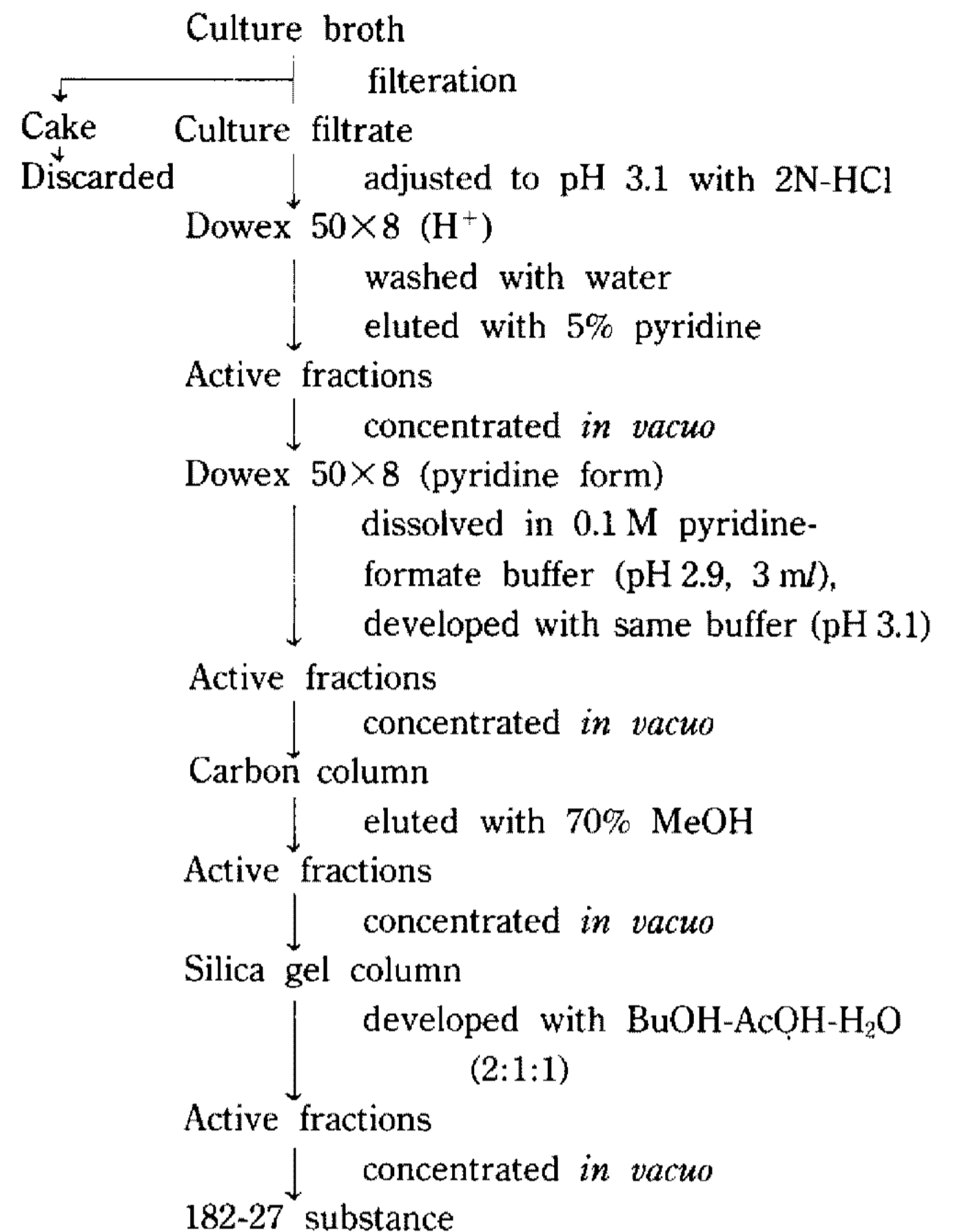


Fig. 3. Isolation procedure of 182-27 substance.

Table 10. Rf values of 182-27 substance

Solvent system	Rf value*
n-BuOH-AcOH-H <sub>2</sub> O (2:1:1)	0.44
n-BuOH-AcOH-H <sub>2</sub> O (3:1:1)	0.58
n-Propanol-pyridine-AcOH-H <sub>2</sub> O (15:10:3:12)	0.84
Isoamyl alcohol-pyridine-H <sub>2</sub> O (7:7:6)	0.11

\*Thin layer chromatography on Merck's Kiesel gel GF<sub>254</sub>

spectrum은 Fig. 4에 나타냈다. KBr disc로 측정된 IR-spectrum은 2,950 cm<sup>-1</sup>, 1,740 cm<sup>-1</sup>, 1,560 cm<sup>-1</sup> 등에서 흡수를 나타냈다.

### 182-27 물질의 생물학적 성질

한천 disc법에 의한 항균성 : 182-27 물질의 수용액을 적신 paper disc(φ 7.5 mm)를 최소검정배지 위에 놓고 각종 시험균에 대한 발육저지력을 측정한 결과는 Table 11과 같다.

최소검정배지상에서의 항균성은 *Proteus vulgaris*, *Alkaligenes faecalis*와 *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*에 강한 항균성을 나타냈으나 기타 세균 및 효모,

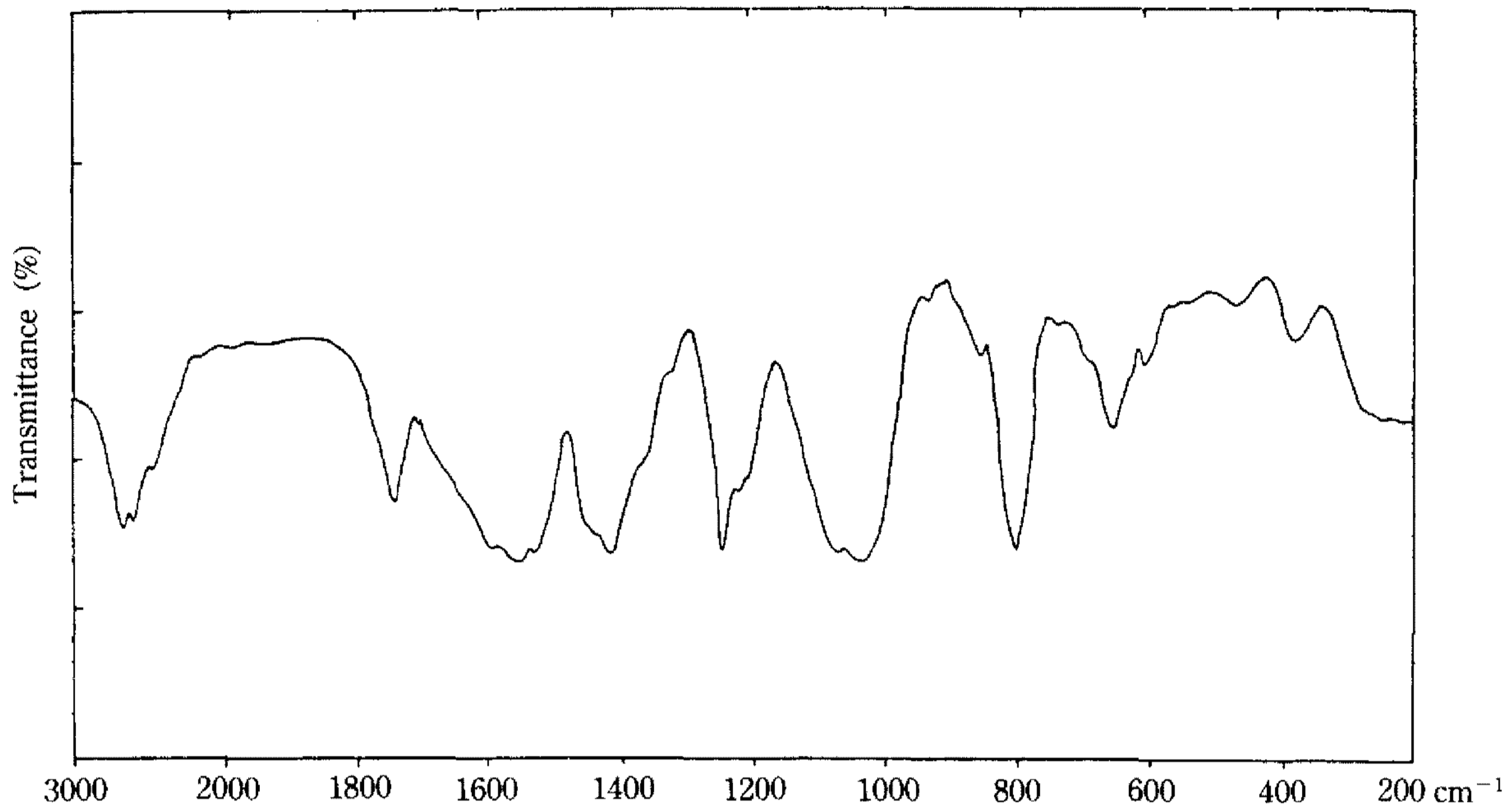


Fig. 4. IR spectrum of 182-27 substance (KBr).

Table 11. Antimicrobial spectrum of 182-27 substance

Microorganism	1000 ( $\mu\text{g/ml}$ )	500	Zone diameter (mm)*				
			100	50	25	12.5	6.25
<i>Proteus vulgaris</i> IFO 3167	23	16	14	12	—	—	—
<i>Alkaligenes faecalis</i> IFO 13111	25	22	18	16	13	11	—
<i>Bacillus brevis</i> IFO 3331	27	23	19	16	15	14	11
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 12210	30	26	18	16	12	—	—
<i>Micrococcus roseus</i> IFO 3768	12	9	—	—	—	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 3060	13	9	—	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i> K-12 IFO 3301	—	—	—	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i> B IFO 13168	—	—	—	—	—	—	—
<i>Pseudomonas putida</i> IFO 3738	—	—	—	—	—	—	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 0309	—	—	—	—	—	—	—
<i>Candida tropicalis</i> IFO 0589	—	—	—	—	—	—	—
<i>Penicillium notatum</i> IFO 4640	—	—	—	—	—	—	—
<i>Penicillium chrysogenum</i> IFO 4897	—	—	—	—	—	—	—
<i>Aspergillus niger</i> IFO 4416	—	—	—	—	—	—	—

\*Paper disc ( $\phi$  7.5 mm) soaked in 182-27 substance solution was placed on minimal agar medium inoculated with test organism.

Incubation was done for 16 hr at 37°C

곰팡이에서는 약하거나 항균성을 나타내지 않았다.

**한천평판 희석법에 의한 항균성 :** 182-27 물질을 각 농도별로 희석하여 한천평판배지를 만들고 같은 시험균에 대하여 항균력을 측정된 결과(data는 생략)는 한천 disc법과 같은 양상을 나타냈다. 몇종의 시험균에만 항균성을 나타내는 특이성을 보였다.

**182-27 물질의 L-leucine에 의한 길항 :** 182-27 물질의 항균성은 L-leucine에 의해 길항되어 일정농도의 L-leucine을 첨가한 검정배지에서는 그의 항균활성이 완전히 소실되었다. *Bacillus subtilis* IFO 12210을 시험균으로 하여 182-27 물질과 L-leucine과의 길항현상을 측정된 결과를 Table 12에 나타냈다.

**Table 12. Reversal of inhibition of 182-27 substance by L-leucine**

L-Leucine ( $\mu\text{g/ml}$ )	182-27 substance	
	1000 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$
0	30*	25
20	25	21
50	24	18
100	21	15
200	15	0
400	0	0
800	0	0
1000	0	0

\*Inhibition zone diameter (mm)

The antibacterial activities of test solutions containing various concentrations of 182-27 substance and L-leucine were examined using *Bacillus subtilis* on the Stephenson-Whetham medium.

Inhibition diameter measured by paper disc method.

L-leucine 100~200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 완전히 길항되었다.

#### 기지 아미노산 대사 길항물질과의 비교

미생물이 생산하는 대사 길항물질은 많은 종류가 보고되고 있으며(26) 그 중에서도 방선균이 생산하는 것과 아미노산과 길항하는 아미노산 유사 구조물질이 대부분을 차지하고 있다. 아미노산 중에서도 L-aspartic acid와 L-glutamic acid의 대사길항물질(4), L-phenylalanine의 대사길항물질(1), L-arginine의 대사길항물질(5, 7, 15), L-cysteine의 대사길항물질(11, 12) 등은 몇 종 알려져 있으나 L-leucine에 의해서 길항하고 Gram 양성균에 대하여 항균활성을 나타내는 물질은 L-2-amino-4-pentynoic acid(2)만이 알려져 있다. 182-27 물질은 지금까지 알려진 대사길항물질과는 그의 이화학적, 생물학적 성상이 다르며 따라서 182-27 물질은 그의 이화학적 성질로 미루어 보아 아미노산 계열의 새로운 물질로 추정되나 그의 화학구조가 밝혀질 때까지는 단언할 수가 없다.

#### 요 약

미생물이 생산하는 대사길항물질을 screening한 결과 최소검정배지상에서 Gram 양성균에 항균활성을 나타내고 L-leucine에 의하여 그 항균활성이 길항당하는 182-27 물질을 생산하는 방선균을 토양에서 새

로이 분리하였다.

본 생산균을 분류 동정한 결과, 유연균을 찾아볼 수가 없고 신 균종으로 동정하기에는 많은 type culture와의 비교분류를 하여야만 하므로 여기서는 다만 기균사의 포자형성과 세포벽 성분의 조성, 형태학적 성상 등으로 보아 *Streptomyces* sp.로만 동정하였다.

182-27 균주의 배양조건을 검토하고 최적조건에서 대량배양하여 그 배양여액으로부터 이온교환수지, silica gel column chromatography 등에 의하여 활성 물질을 분리 정제하였으며 배양액 약 20l에서 약 20 mg의 백색분말을 얻었다.

182-27 물질은 그의 이화학적 성질로 보아 아미노산 유연물질로 추정할 수가 있으나 그의 화학구조는 아직 밝혀지지 못했다. 생물학적 성질은 최소검정배지상에서 Gram 양성균에 항균력을 나타냈고 이러한 항균력은 L-leucine의 첨가에 의해 저해 당했다.

#### 감사의 말씀

본 연구는 1990년도 문교부 자유공모과제로 선정되어 수행되었으며 연구지원을 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. Scannell, J.P., D.L. Pruess, T.C. Demny, T. Williams. 1970. L-3-(2,5-Dihydrophenyl) alanine, an antimetabolite of L-phenylalanine produced by a Streptomyces. *J. Antibiot.* **23**: 618-619.
2. Scannell, J.P., D.L. Pruess, T.C. Demny, F. Weiss, T. Williams and A. Stempel. 1971. Antimetabolites produced by microorganisms II. L-2-Amino-4-pentynoic acid. *J. Antibiot.* **24**: 239-244.
3. Scannell, J.P., D.L. Pruess, M. Kellett, T.C. Demny and A. Stempel. 1971. Antimetabolites produced by microorganisms III. 2-Aminopurine-6-thiol(Thioguanine). *J. Antibiot.* **24**: 328-329.
4. Scannell, J.P., D.L. Pruess, T.C. Demny, L.H. Sello, T. Williams and A. Stempel. 1972. Antimetabolite produced by microorganisms V. L-2-Amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid. *J. Antibiot.* **25**: 122-127.
5. Scannell, J.P., H.A. Ax, D.L. Pruess, T. Williams, T.C. Demny and A. Stempel. 1972. Antimetabolites produced by microorganisms VI. L-N<sup>5</sup>-(1-Iminoethyl) ornithine. *J. Antibiot.* **25**: 179-184.
6. Scannell, J.P., D.L. Pruess, J.F. Blount, H.A. Ax, M. Kellett, F. Weiss, T.C. Demny, T.H. Williams and A. Stempel. 1975. Antimetabolites produced



- by microorganisms XII. (S)-Alanyl-3-[ $\alpha$ -(S)-chloro-3-(S)-hydroxy-2-oxo-3-azetidylmethyl]- (S)-alanine, a new  $\beta$ -lactam containing natural product. *J. Antibiot.* **28**: 1-6.
7. Scannell, J.P., D.L. Pruess, H.A. Ax, A. Jacoby, M. Kellett and A. Stempel. 1976. Antimetabolites produced by microorganisms XIII. The synthesis and microbiological production of a novel amino acid, L-2-amino-4-(2-aminoethoxy) butanoic acid. *J. Antibiot.* **29**: 38-43.
  8. Westely, J.W., D.L. Pruess, L.A. Volpe, T.C. Demny and A. Stempel. 1971. Antimetabolite produced by microorganisms IV. L-Threo- $\alpha$ -amino- $\beta$ - $\gamma$ -dihydrobutyric acid. *J. Antibiot.* **24**: 330-331.
  9. Pruess, D.L. J.P., Scannell, H.A. Ax, M. Kellett, F. Weiss, T.C. Demny and A. Stempel. 1973. Antimetabolites produced by microorganisms VII. L-(N<sup>5</sup>-Phosphono) methionine-S-sulfoximinyll-alanyl-L-alanine. *J. Antibiot.* **26**: 261-266.
  10. Maehr, H., J.F. Blount, D.L. Pruess, L. Yarmchuk and M. Kellett. 1973. Antimetabolites produced by microorganisms VII. N<sup>5</sup>-Hydroxy-L-arginine, a new naturally occurring amino acid. *J. Antibiot.* **26**: 284-288.
  11. Pruess, D.L., J.P. Scannell, M. Kellett, H.A. Ax, J. Janecek, T. Williams, A. Stempel and J. Berger. 1974. Antimetabolites produced by microorganisms X. L-2-Amino-4-(2-aminoethoxy)-*trans*-3-butenic acid. *J. Antibiot.* **27**: 229-233.
  12. Pruess, D.L., J.P. Scannell, J.F. Blount, H.A. Ax, J. Jaecek, T. Williams, and A. Stempel. 1974. Antimetabolites produced by microorganisms XI. 1-(S)-Hydroxy-2-(S,S)-valylamido-cyclobutane-1-acetic acid. *J. Antibiot.* **27**: 754-759.
  13. Molloy, B.B., D.H. Lively, R.M. Gale, M. Gorman, L.D. Boeckk, C.E. Higgins, R.E. Kastner, L.L. Huckstep and N. Neuss. 1972. A New dipeptide antibiotic from *Streptomyces collinus*, Lindenbein. *J. Antibiot.* **25**: 137-140.
  14. Bayer, E., K.H. Gugel, K. Hägele, H. Hagenmaier, S. Jessipow, W.A. König und H. Zähler. 1972. Stoffwechsel produkte von mikroorganismen, phosphinothricin und phosphinothricyl-alanyl-alanin. *Helv. Chim. Acta* **55**: 224-239.
  15. König, W.A., H. Kneifel, E. Bayer, G. Müller and H. Zähler. 1973. Metabolic products of microorganisms, 116, O-[L-Norvalyl-5]-isourea, a new arginine antagonist. *J. Antibiot.* **26**: 44-50.
  16. Sugiura, M., M. Kisumi and I. Chibata. 1985.  $\beta$ -Methylnorleucine, a novel antagonist of isoleucine. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 1889-1890.
  17. Inouye, S., S. Shomura, T. Tsuruoka, Y. Ogawa, H. Watanabe, J. Yoshida and T. Niida. 1975. L- $\beta$ -(5-Hydroxy-2-pyridyl)-alanine and L- $\beta$ -(3-hydroxyureido)-alanine from *Streptomyces*. *Chem. Pharm. Bull.* **23**: 2669-2677.
  18. Park, B.K., A. Hirota and H. Sakai. 1977. Structure of plumbemycin A and B, antagonist of L-threonine from *Streptomyces plumbeus*. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 573-579.
  19. Davis, B.D. and E.S. Mingioli. 1950. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B<sub>12</sub>. *J. Bacteriol.* **60**: 17-28.
  20. 醫科學研究所學友會編. 1958. 細菌學實習提要, p.85 丸善 (東京).
  21. Shirling, E.B., and D. Gottlieb. 1966. Cooperative description of type cultures of Streptomyces. *Intern. J. Syst. Bact.* **16**: 313-340.
  22. Waksman, S.A. 1961. Vol. 2. Classification, identification and description of genera and species, pp. 328-334. In, *The Actinomycetes*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
  23. Pridham, T.G. and D. Gottlieb. 1948. The utilization of carbon compounds by some Actinomycetes as an aid for species determination. *J. Bacteriol.* **56**: 107-114.
  24. Boone, C.J. and L. Pine. 1968. Rapid method for characterization of Actinomycetes by cell wall composition. *Applied Microbiol.* **16**: 279-284.
  25. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, pp. 758-792. 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
  26. Pruess, D.L. and J.P. Scannell. 1974. Antimetabolite from Microorganisms, pp. 19-54. In D. terlman (ed), *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 17, Academic Press, New York.

(Received February 15, 1992)