

## 방선균이 생산하는 아미노산 대사길항물질, YS-460의 분리 정제 및 특성

박 부 길  
강원대학교 식품·생명공학부

**Purification and Properties of Amino Acid Antimetabolite YS-460 from *Streptomyces* sp. Boo-Kil Park.**  
*Division of Food and Biotechnology, College of Agricultural Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea* — An amino acid antimetabolite named YS-460 was isolated from the culture filtrate of a newly isolated Actinomycetes identified as *Streptomyces* sp. Fermentation was carried out in the synthetic medium at 30°C for 5 days. Purification was done by ion exchange resin, active carbon, silica gel column chromatography and obtained 38 mg of pure active substance per liter of the broth. YS-460, an amino acid like substance, has the molecular formula of  $C_7H_{11}NO_3$ . Its structure determined to be furanomycin by spectral analysis. It is active against some bacteria on a chemically defined medium and reversed competitively by L-isoleucine and non-competitively by L-leucine and L-valine.

미생물이 생산하는 대사길항물질의 탐색에 관한 연구는 오래 전부터 여러 나라에서 활발히 수행되어 왔으며 미국의 Hoffman-La Roche사의 Scannell(1-6), Pruess(7-9), Eli Lilly사의 Molly(10), 독일의 Bayer(11, 12), 일본의 Inouye(13), Sugiura(14), 국내의 박(15, 16) 등에 의하여 amino acid, peptide, 핵산 관련 대사길항물질들이 다수 발견 보고되어 있다. 일반적으로 항생물질의 screening 방법과는 달리 최소 검정배지상에서의 대사 저해에 amino acid, 핵산, vitamin 등의 필수 대사 물질을 첨가함으로써 대사 저해가 회복되는 현상을 이용하여 대사길항물질을 screening 함으로써 새로운 화합물의 발견이 가능하게끔 되었다. 대사길항물질은 필수 대사 산물의 구조 analogue의 경우가 대부분이며 주로 amino acid analogue의 대사길항물질이 많이 알려져 있다. 그 중에서도 glutamine의 대사길항물질(6, 7, 11)인 경우는 dipeptide 또는 tripeptide 물질이 많고 phosphinothricyl-alanyl-alanine(11), plumbe-mycin(15) 등은 tripeptide로 밝혀져 있다. 필자는 이와 같은 견지에서 방선균이 생산하는 새로운 amino acid 대사길항물질의 탐색을 목적으로 screening 한 결과 토양에서 새로이 분리한 *Streptomyces* sp. strain 460의 배양액에서 L-isoleucine에 대해서는 경쟁적으로 길항하며 L-leucine과 L-valine에 대해서는 비경쟁적으로 길항하고 특정시험균에 대해 항균성을 나타내는 물질의 존재를 확인하였다. 본 보에서는 amino acid 대사길항물질의 screening 방법, 생산균주의 분리, 유효 물질의 분리 정제 및 이화학적, 생물학적 성상을 구명하였기에 보고하고자 한다.

### 생산균주의 분리, 배양, 활성 검정 및 동정

방선균 분리를 위한 시료로는 춘천 근교의 산림 토양 시료를 사용하였으며 1g의 토양시료를 10배수의 멸균수에 현탁하고 그 상등액 1백금이를 soluble starch 1%,  $NH_4Cl$  0.05%,  $KH_2PO_4$  0.05%, agar 1.5%로 조제된 평판배지에 도말하고 30°C, 4~7일간 배양한 후 생성된 colony중 방선균으로 보이는 colony만을 선발, modified Bennett's agar에서 사면배양하여 순수 분리하였다. 선발된 방선균의 배양은 500 ml erlenmeyer flask에 glucose 1%,  $(NH_4)_2SO_4$  0.264%,  $KH_2PO_4$  0.238%,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0.565%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01%, trace salts mixture 1 ml/l를 함유한 합성 배지 100 ml를 주입 살균하고 방선균 사면배지에서 1백금이를 접종하여 30°C, 3~5일간 왕복 진탕하였다. 배양액의 항균활성 검정은 Scannell 등의 방법(2)에 따랐으나 여기서는 Davis-Mingiolis 최소 검정 배지(17) 대신에 Stephenson-whetham 배지(S-W medium)(18)를 사용하였다. 항균활성 검정용 시험균으로는 *Bacillus subtilis* IFO 12210과 *Escherichia coli* IFO 13168을 사용하였다. 일차로 각 방선균의 배양액을 paper disc( $\phi 7.5$  mm, Toyo Rochi)에 적셔서 S-W 합균배지와 polypeptone(Daigo brand) 0.2%와 0.1% yeast extract(Daigo brand)를 첨가한 합균배지(S-W complex medium)위에 각각 놓고 S-W 합균배지상에서는 활성을 나타내나 S-W complex 합균배지상에서는 활성을 나타내지 않은 균주를 선발하였다. 이차 검정으로는 일차 검정에서 활성을 나타내는 배양액의 주위에 amino acid 수용액(mg/ml)을 적신 paper disc를 놓고 특정 amino acid에 대해 항균활성이 길항되는 것을 검색, 선발하였다. 시험균은 *Bacillus subtilis* IFO 12210을 Bouillon에 하룻밤 진탕 배양하고 saline solution으로 2회 세척후 검정 평판 배지 100 ml당 균 현탁액

\*Corresponding author.

Key words: Amino acid antimetabolites, L-isoleucine antimetabolite, furanomycin

5 ml를 첨가하여 함균배지로 하였다. 총 630주의 공시 균주에서 비교적 항균 활성이 강하고 L-isoleucine에 경쟁적으로, L-leucine과 L-valine에 대해서는 비경쟁적으로 길항하는 물질을 생산하는 한균주 YS-460을 최종 선발하였다. 균주의 형태학적 검정은 sucrose-nitrate agar와 inorganic salt-starch agar에서 28°C, 14일간 배양하면서 균의 형태를 광학현미경으로 검정하였으며 배양학적 성상은 주로 international streptomyces project(ISP)에 나타난 배지를 사용하여 28°C, 14일간 배양하면서 균의 생육과 포자 형성, 포자의 색상, 배지 색조 등을 관찰하였으며 세포벽의 amino acid 조성은 Boone과 Pine(20)의 방법에 따랐다. 균주의 형태학적, 배양학적 성상, 기균사의 포자형성과 세포벽 성분의 amino acid 조성(LL-DAP) 등으로 보아 선발균주 strain YS-460을 *Streptomyces* sp.로만 동정하였다.

### 대사길항 물질의 생산 및 분리정제

배양생산은 500 ml의 flask에 상기의 생산배지 100 ml를 분주, 살균하고 strain YS-460의 종 배양액(Modified Bennett's, 30°C, 48 hrs) 각 2%씩 접종하여 recip-

rocal shaker(109 rpm)에서 30°C, 5일간 배양하였다. 배양액을 여과하여 균체를 제거한 배양여액을 pH 3.1로 조정 후 ion-exchange resin column(Dowex 50 w×8, H<sup>+</sup> form, 50~100 mesh, column size 5×47 cm)에 흡착시키고 증류수로 충분히 세척 후 5% pyridine 수용액으로 용출하여 100 ml/씩 분획 후 활성부분을 감압 농축하였다. 위 농축액을 carbon column(active carbon powder : cellulose powder : 1 : 1, 3×28 cm)에 주입 후 증류수로 충분히 세척 후 50% acetone으로 활성물질을 용출하여 탈색시켰다. 활성부분을 감압 농축하고 silica gel column(BuOH : AcOH : H<sub>2</sub>O, 4 : 1 : 2, column size 3.5×35 cm) chromatography를 2회 반복하여 TLC상에서 단일 spot를 나타내는 활성물질을 얻었다. 최종적으로 ethanol-H<sub>2</sub>O계의 용매에서 결정화하여 YS-460 substance의 침상결정을 얻었다. 분리 정제의 개략을 Fig. 1에 나타냈다.

### YS-460 물질의 이화학적·생물학적 성상

YS-460 물질은 침상결정으로 융점 221°C였으며 hexane, benzene, ethyl acetate 등의 유기용매에는 불용성이고 methanol, 물 등에는 용해되는 수용성 물질이었다. Ninhydrin, o-tolidine-KI 등의 정색반응에서 양성을 나타냈고 KMnO<sub>4</sub> 수용액을 탈색시켰다. BuOH : AcOH : H<sub>2</sub>O(4 : 1 : 2)의 용매계의 TLC상의 R<sub>f</sub>치는 0.34로 단일 spot를 나타냈다.

YS-460 물질의 IR spectrum(KBr)에서는 3120, 2565, 2000, 1635, 1570, 1525 cm<sup>-1</sup> 등에서 흡수를 나타냈다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum(Fig. 2)에서 8개의 proton signal을 볼 수 있으며 δ1.21 ppm(3H, d)에 methyl group에 해당하는 doublet proton signal, δ3.82 ppm(1H, d)에 α 위치의 methine 유래의 proton signal, δ5.07 ppm(1H, quintet), 5.41 ppm(1H, m)에 각 1개씩의 ether에 결합된 methine proton, 그리고 δ5.80과 δ6.14 ppm에 AB-type quartet 유래의 proton signal을 확인할 수가 있

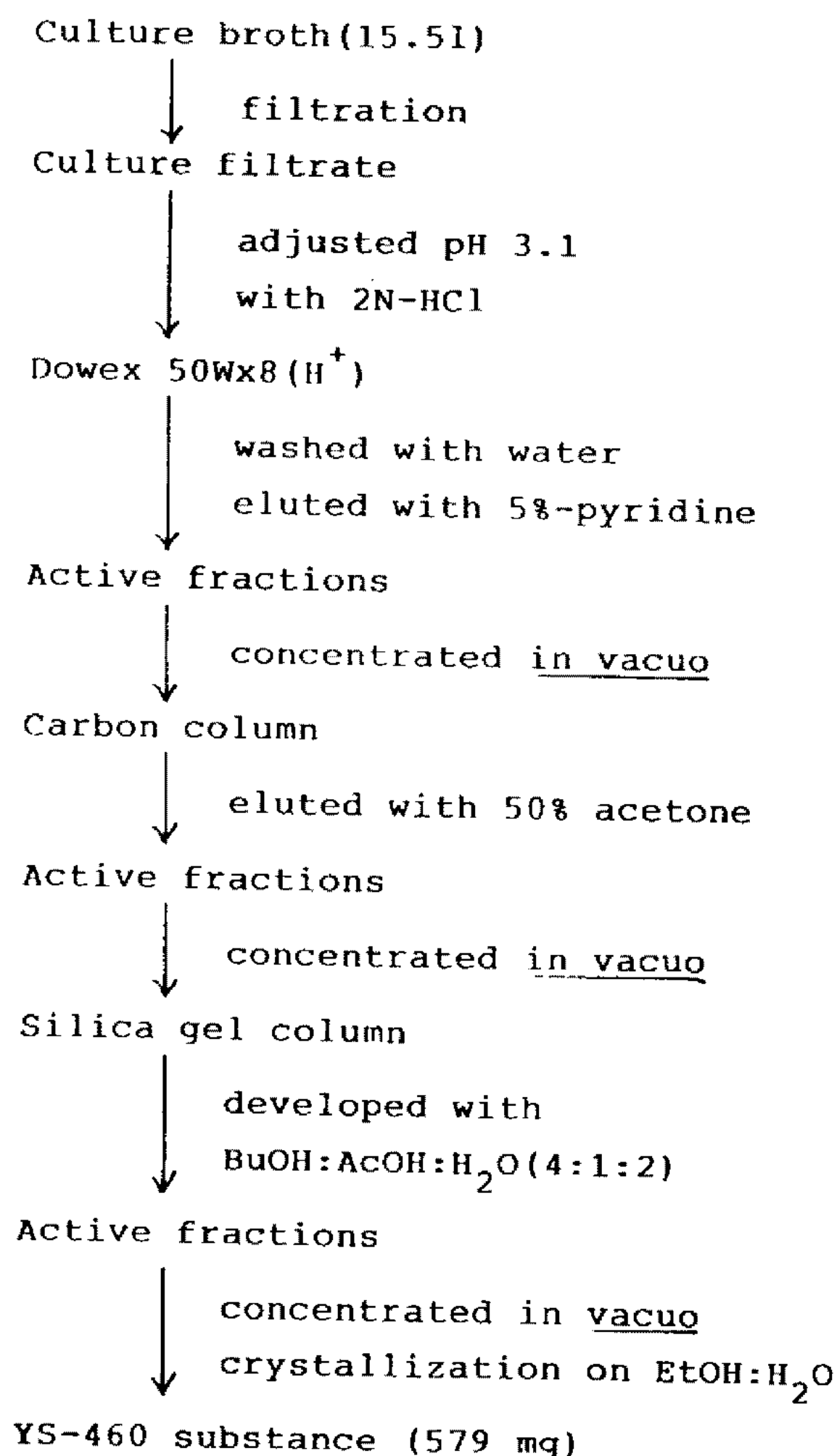


Fig. 1. Isolation procedure of YS-560 substance.

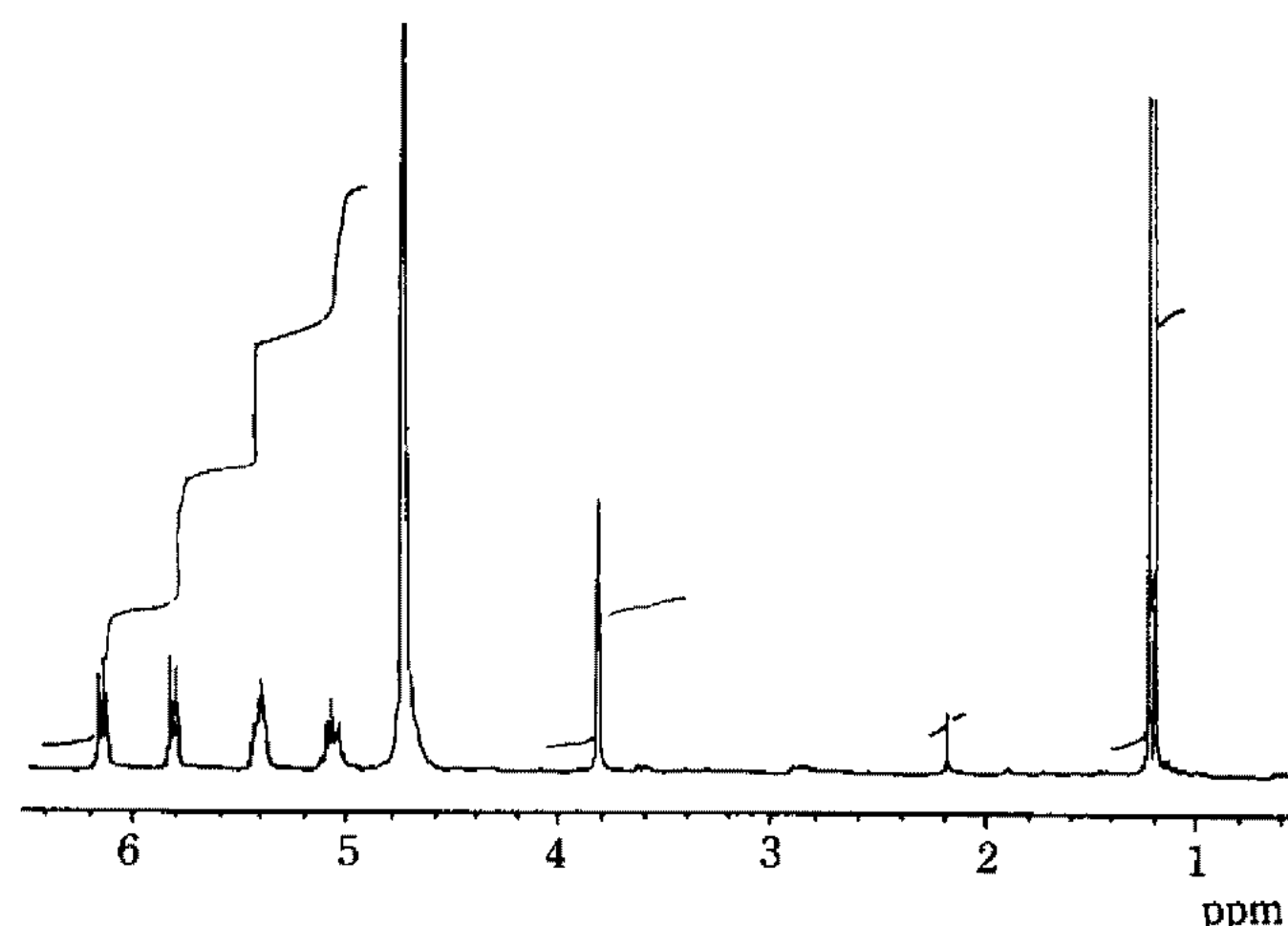
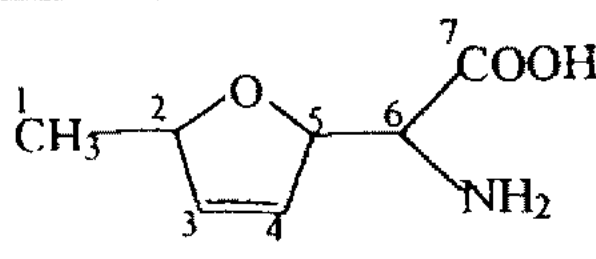


Fig. 2. <sup>1</sup>H NMR spectrum of YS-460 (270 MHz, D<sub>2</sub>O)

**Table 1. Structure of Furanomycin and  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  NMR Data for compound 460**

		
Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	20.80	1.21
2	84.09 <sup>a)</sup>	5.07
3	124.14 <sup>b)</sup>	5.80
4	136.04 <sup>b)</sup>	6.14
5	83.99 <sup>a)</sup>	5.41
6	57.31	3.82
7	172.07	

Chemical shifts are indicated in ppm downfield from internal DSS, measured in  $\text{D}_2\text{O}$

<sup>a),b)</sup> These assignments might be exchangeable.

었다. 이상의 IR spectrum과 NMR spectrum에서 YS-460 물질이 기존의 furanomycin(21)과 일치함을 알 수 있었다. Furanomycin의 구조식과 YS-460 물질의 NMR data를 Table 1에 나타냈다.

최소 검정 배지에서의 YS-460 물질의 항균성 시험을 paper disc 법으로 행하고 각종시험균에 대한 발육저지원을 측정하여 본 결과 시험균 *Bacillus subtilis* IFO 12210에 대해 강한 항균 활성을 나타냈고(30 mm in diameter, 500 ug/ml), *Escherichia coli* IFO 13168에 대해서도 항균활성을 보였으며(26 mm in diameter, 500 ug/ml) 진균에는 항균활성을 나타내지 않았다. 아미노산 대사길항물질인 YS-460은 최소검정배지상에서 *Bacillus subtilis* IFO 12210, *Escherichia coli* IFO 13168 등에 항균활성을 나타내고 그 활성이 L-isoleucine에 의해 경쟁적으로, L-leucine과 L-valine에 대해서는 비경쟁적으로 길항되기 때문에 기존의 아미노산과는 reversal pattern이 달라 신규의 가능성이 있는 것으로 사료되었으나 구조 분석결과 furanomycin으로 판명되었다. Furanomycin은 *E. coli* H에 대해서는 L-isoleucine antagonist로 알려졌다나 *B. subtilis*와 *E. coli* 모두가 L-isoleucine에 대해서는 경쟁적으로, L-leucine과 L-valine에 대해서는 비경쟁적으로 길항된다는 사실을 밝혔다.

## 참고문헌

- Scannell, J.P., D.L. Pruess, T.C. Demny and T. Williams. 1970. L-3-(2,5-Dihydrophenyl)alanine, an antimetabolite of L-phenylalanine produced by a *Streptomyces*. *J. Antibiot.* **23**: 618-619.
- Scannell, J.P., D.L. Pruess, T.C. Demny, F. Weiss, T. Williams and A. Stempel. 1971. Antimetabolites produced by microorganism II, L-2-amino-4-pentynoic acid. *J. Antibiot.* **24**: 239-244.
- Scannell, J.P., D.L. Pruess, M. Kellet, T.C. Demny and A. Stempel. 1971. Antimetabolites produced by microorganism III, 2-Aminopurine-6-thiol (Thioguanine). *J. Antibiot.* **24**: 328-329.
- Scannell, J.P., D.L. Pruess, T.C. Demny, L.H. Sello, T. Williams and A. Stempel. 1972. Antimetabolites produced by microorganism V, L-2-Amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid. *J. Antibiot.* **25**: 122-127.
- Scannell, J.P., H.A. Ax, D.L. Pruess, T. Williams T.C. Demny and A. Stempel. 1972. Antimetabolites produced by microorganism VI, L-N5(1-Imino ethyl) ornithine. *J. Antibiot.* **25**: 179-184.
- Scannell, J.P., D.L. Pruess, J.F. Blount, H.A. Ax, M. Kellet, F. Weiss, T.C. Demny, T. Williams and A. Stempel. 1975. Antimetabolites produced by microorganism XII, (S)-Alanyl-3- $\{\alpha$ -(S)-chloro-3-(S)-hydroxy-2-oxo-3-azetidiny methyl $\}$ -(S)-alanine, a new  $\beta$ -lactam containing natural product. *J. Antibiot.* **28**: 1-6.
- Pruess, D.L., Scannell, J.P., H.A. Ax, M. Kellet, F. Weiss, T.C. Demny and A. Stempel. 1973. Antimetabolites produced by microorganism VII, L-(N<sup>5</sup> phosphono)-methionine-S-sulfoximinyl-L-alanyl-1-alanine. *J. Antibiot.* **26**: 261-266.
- Pruess, D.L., Scannell, J.P., M. Kellet, H.A. Ax, J. Janeck, T. Williams, A. Stempel, and J. Berger. 1974. Antimetabolites produced by microorganism X, L-2-Amino-4-(2-aminoethoxy)-trans-3-butenoic acid. *J. Antibiot.* **27**: 229-233.
- Pruess, D.L., Scannell, J.P., J.F. Blount, H.A. Ax, J. Janeck, T. Williams and A. Stempel. 1974. Antimetabolites produced by microorganism XI, 1-(S)-Hydroxy-2-(S,S)-valylamido-cyclobutane-1-acetic acid. *J. Antibiot.* **27**: 754-759.
- Molly, B.B., D.H. Lively, R.M. Gale, M. German, L.D. Boeckk, C.E. Higgins, R.E. Kastner, L.L. Huckstep and N. Neuss. 1972. A new dipeptide antibiotic from *Streptomyces collinus*, Linden bein. *J. Antibiot.* **25**: 137-140.
- 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-alanine. *Helv. chim. Acta.* **55**: 224-239.
- Kinig, W.A., H. Kneifel, E. Bayer, G. Müller and H. Zähler. 1972. Metabolic products of microorganisms, 116. O-[L-Norvalyl-5]-isourea, a new arginine antagonist. *J. Antibiot.* **26**: 44-50.
- 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.
- Sugiura, M., M. Kisumi and I. Chibata. 1985.  $\beta$ -Methylnorleucine, a novel antagonist of isoleucine. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 1889-1890.
- 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.
16. Park B.K. 1992. Isolation and properties of Amino acid antimetabolite from *Streptomyces* sp. 182-27. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**(3): 335-343.
  17. Davis, B.D. and E.S. Mingioli. 1950. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B<sub>12</sub>. *J. Bacterial.* **60**: 17-28.
  18. 醫科學 研究所 學友會編. 1958. 細菌學 實習 提要. Pp. 85. 丸善(東京).
  19. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. *Intern. J. Syst Bact.* **16**: 313-340.
  20. Boone, C.J. and L. Pine. 1968. Rapid method for characterization of Actinomycetes by cell wall composition. *Applied Microbiol.* **16**: 279-284.
  21. Katagiri, K., K. Tori, Y. Kimura, T. Nagasaki and H. Minato. 1967. A new antibiotic Furanomycin, an isoleucine antagonist. *J. Med. Chem.* **10**: 1149-1154.

(Received 5 December 1995)