

## ***Streptomyces nigrifaciens* GMT-497이 생산하는 항생물질 MT-497의 분리와 화학적 특성**

이영선 · 안순철 · 이정형 · 이현선 · 윤병대 · 안종석\* · 민태익  
한국과학기술연구원 유전공학연구소 미생물공학실

## **Purification and Chemical Characterization of Antibiotic MT-497 Produced by *Streptomyces nigrifaciens* GMT-497**

Lee, Yeong-Seon, Soon-Cheol Ahn, Jeong-Hyung Lee, Hyun-Sun Lee,  
Byung-Dae Yoon, Jong-Seog Ahn\* and Tae-Ick Mheen

Laboratory of Microbial Technology, Genetic Engineering Research Institute,  
KIST, P.O. Box 17, Daeduk Science Town, Daejeon, 305-606, Korea

**Abstract** — Antibiotic MT-497 was purified from the culture broth of *Streptomyces nigrifaciens* GMT-497, which was isolated from soil, by solvent extraction, silica column chromatography and recrystallization. It was confirmed that MT-497 has antibacterial activity against only G(+) bacteria. Through the analysis of UV, melting point, IR spectrum, <sup>1</sup>H-NMR and composition of amino acids, MT-497 was identified as one of the actinomycin antibiotics containing actinocin chromophore and the peptide with threonine, proline, methyl valine, sarcosine and aspartic acid.

전보에서 보고된 토양에서 분리한 *Streptomyces nigrifaciens* GMT-497(1)이 생산하는 항생물질 MT-497은 G(+)세균에만 강력한 항균활성을 나타내며 UV, IR spectrum의 분석을 통해 actinomycin계열 항생물질들(2)과 toxifertilin(3, 4)과 매우 유사하였음을 알았다. 그러나 toxifertilin에 대해서는 더 이상의 구조분석이 보고되어 있지 않아 같은 물질인지 확인할 수 없었으며, actinomycin계열의 항생물질들은 지금까지 20여가지가 보고되어 있으나 *S. nigrifaciens*로부터는 분리된 적이 없었다(2, 5).

따라서 토양으로부터 분리한 *S. nigrifaciens* GMT-497이 생산하는 항생물질 MT-497을 순수 분리 정제하여 이화학적 성질을 조사하고 기기분석을 실시하여 항생물질 MT-497의 화학적 특성을 규명하고 구조를 추정하고자 하였다.

### **재료 및 방법**

#### **사용균주**

항생물질 MT-497을 생산하는 *Streptomyces nigrifaciens* GMT-497은 토양으로부터 분리하였다(1). 항균활성을 측정하기 위하여 검정균으로는 세균으로 *Escherichia coli* KCTC 1923, *E. coli* KCTC 1924, *Salmonella typhimurium* KCTC 1925, *S. typhimurium* KCTC 1969, *Pseudomonas aeruginosa* IFO 13130, *Staphylococcus aureus* IFO 12732, *S. aureus* KCTC 1928, *Mycobacterium phlei* IFO 3158, *Bacillus subtilis* IFO 3513을 사용하였고 *Candida albicans* IFO 1594, *Aspergillus niger* KCTC 1225, *Penicillium chrysogenum* KCTC 1262을 사용하였다(6).

#### **배지 및 배양방법**

*S. nigrifaciens* GMT-497로부터 항생물질 MT-497을 생산하기 위하여 sucrose 1.0%, soluble starch 1.0

**Key words:** Antibiotic MT-497, *Streptomyces nigrifaciens*, actinomycin  
\*Corresponding author

%, glucose 1.0%, yeast extract 0.4%, beef extract 0.1%, soybean meal 2.5%, NaCl 0.4%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.005%로 구성된 배지를 사용하였으며, 이 배지 7.0l에 2일간 전배양된 종균을 2.0%(V/V)로 접종하여 10l의 발효조(Microferm, New Brunswick Scientific Co. Inc., USA)에서 통기량 0.8 vvm, 교반속도 300 rpm, 28°C에서 5일간 배양하였다.

**항균활성 및 MIC의 측정**

항생물질 MT-497을 농도별로 희석하면서 각 검정균에 대한 MIC와 항균활성을 측정하였다(7).

**항생물질의 분리정제**

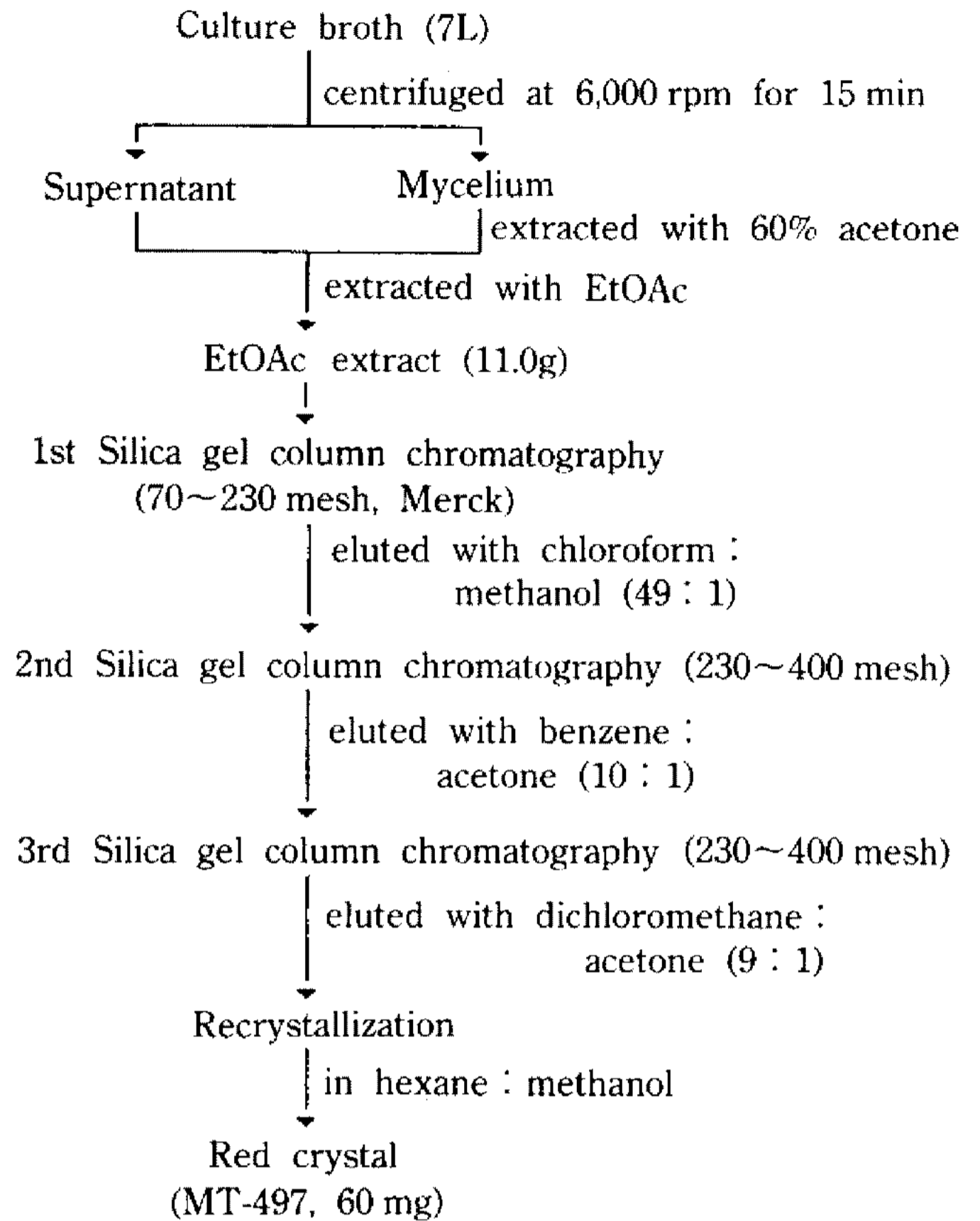
5일간 배양한 균체배양액을 원심분리하여 균체와 배양상등액을 분리하였다. 배양상등액은 ethyl acetate로 추출하고 균체는 60% acetone으로 추출한 후 ethyl acetate로 재추출하여 배양상등액의 ethyl acetate 추출물과 합하였다. 이를 silica(70~230 mesh, Merck) column chromatography에서 chloroform : methanol(98 : 2)을 용매로하여 활성분획을 용출시키고, 다시 2차 silica(230~400 mesh, Merck) column chromatography에서 용매로 benzene : acetone(10 : 1)을 이용하여 활성분획을 얻은 후 최종적으로 3차 silica (230~400 mesh, Merck) column chromatography에서 용매로 dichloromethane : acetone(9 : 1)을 사용하여 활성분획을 용출시켰다. 이 활성분획물을 hexane과 methanol을 사용하여 2회 재결정화하여 붉은색 침상의 결정을 얻었다.

**사용기기**

MT-497의 분리 정제에는 Shimadzu LC-6A HPLC를 사용했으며 UV absorption spectrum은 Shimadzu UV-260 spectrophotometer를 사용하여 얻었다. IR spectrum은 Analect fx-6160 FT-IR spectrophotometer를 이용하였고, proton nuclear magnetic resonance spectrum은 Bruker AM-200 NMR spectrometer를 사용하여 분석하였다. 아미노산 분석에는 Biotronic model 5,000 amino acid analyzer를 사용하였다.

**결과 및 고찰**

**항생물질 MT-497의 분리 정제**



**Fig. 1. Purification procedures of antibiotic MT-497 from *Streptomyces nigrifaciens* GMT-497.**

*S. nigrifaciens* GMT-497을 7.0l 배양하여 균체 추출물과 배양상등액을 ethyl acetate로 용매추출하여 11.0g의 조시료를 얻었으며 1차 silica column chromatography에서 2.0g, 2차 silica column chromatography에 의해 1.1g, 최종 3차 silica column chromatography에서 620 mg의 시료를 얻었다. 이 시료를 hexane과 methanol을 이용한 2차의 반복 재결정화에 의해 60 mg의 결정분말을 얻었다(Fig. 1).

최종적으로 얻은 결정을 HPLC로 확인한 결과 단일 peak로 확인되었고(Fig. 2), HPLC의 column과 용매를 달리해도 단일 peak로 나타나 순수하게 분리되었음을 확인하였다. 따라서 이 최종결정 분말로 얻은 물질을 항생물질 MT-497로 명명하였다.

**항균활성**

항생물질 MT-497의 여러가지 미생물에 대한 항균활성을 MIC로 Table 1에 표시하였다. 항생물질 MT-497은 항생물질 다제내성 변이주인 *Staphylococcus aureus* KCTC 1928에도 상당한 항균활성을 보일 정도로 그람양성세균에는 강력한 항균활성을 나타내었

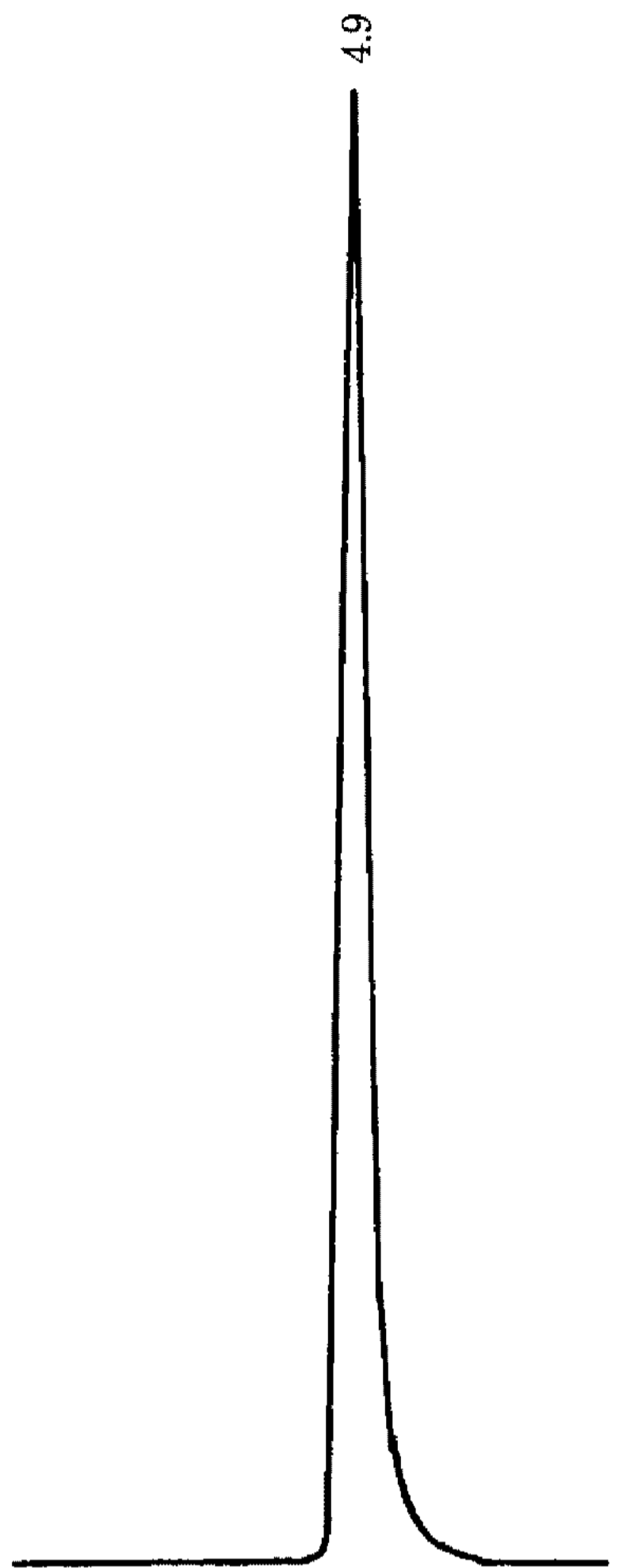


Fig. 2. High performance liquid chromatogram of antibiotic MT-497.

Column: RP-18,  $\Phi$  4 mm  $\times$  25 cm, mobile phase: MeOH/H<sub>2</sub>O(8/2), flow rate: 1 ml/min, detector: UV 254 nm.

으며 그람음성세균 중 항생물질 고감수성 변이주인 *Salmonella typhimurium* KCTC 1969에 약한 항균활성을 보였고, 세포벽 결손 변이주인 *Pseudomonas aeruginosa* N-10에는 강력한 항균활성을 보였다. 한편 *Candida albicans*를 포함한 여러가지 곰팡이에 대해서는 항균활성이 없었다.

#### 이화학적 성질

항생물질 MT-497의 이화학적 성질은 Table 2와 같다. MT-497은 붉은색 침상 결정이며 산, 알칼리에 상당히 안정하고 chloroform, methanol, ethyl acetate 등의 유기용매에는 잘 녹으나 hexane에는 거의 녹지 않는다. 융점은 237°C에서 용해되기 시작하여 240~243°C에서 분해되었고, ninhydrin과 anisaldehyde-H<sub>2</sub>

Table 2. Physico-chemical properties of antibiotic MT-497

Appearance:	red needle crystal
Stability:	stable in acid and alkali
Solubility:	
soluble	chloroform, methanol, ethyl acetate
insoluble	hexane
Melting point:	240~243°C(decomp.)
Elemental analysis:	C: 57.4% H: 6.94% N: 11.5% O: 25.1%
Color reactions:	
positive	ninhydrin, anisaldehyde-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
negative	iodine, molybdophosphoric acid

Table 1. MIC values of antibiotic MT-497 against bacteria and fungi.

Test organisms	Categories	MIC ( $\mu$ g/ml)
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1923 (AB)	Gram(-)bacteria	>200
<i>E. coli</i> KCTC 1924 (BE)	〃	>200
<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC 1925 (TV)	〃	>200
<i>S. typhimurium</i> KCTC 1969 (SL)	〃	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 13130 (Pa)	〃	>200
<i>P. aeruginosa</i> N-10 (L)	〃	0.2
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 12732 (209)	Gram(+)bacteria	0.5
<i>S. aureus</i> KCTC 1928 (R-209)	〃	2
<i>Mycobacterium phlei</i> IFO 3158 (Ph)	〃	0.2
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3513 (Bs)	〃	0.1
<i>Candida albicans</i> IFO 1594	Yeast	>200
<i>Botrytis cinerea</i> IFO 5365	Fungi	>200
<i>Pyricularia oryzae</i> IFO 5994	〃	>200
<i>Aspergillus niger</i> KCTC 1225	〃	>200
<i>Penicillium chrysogenum</i> KCTC 1262	〃	>200

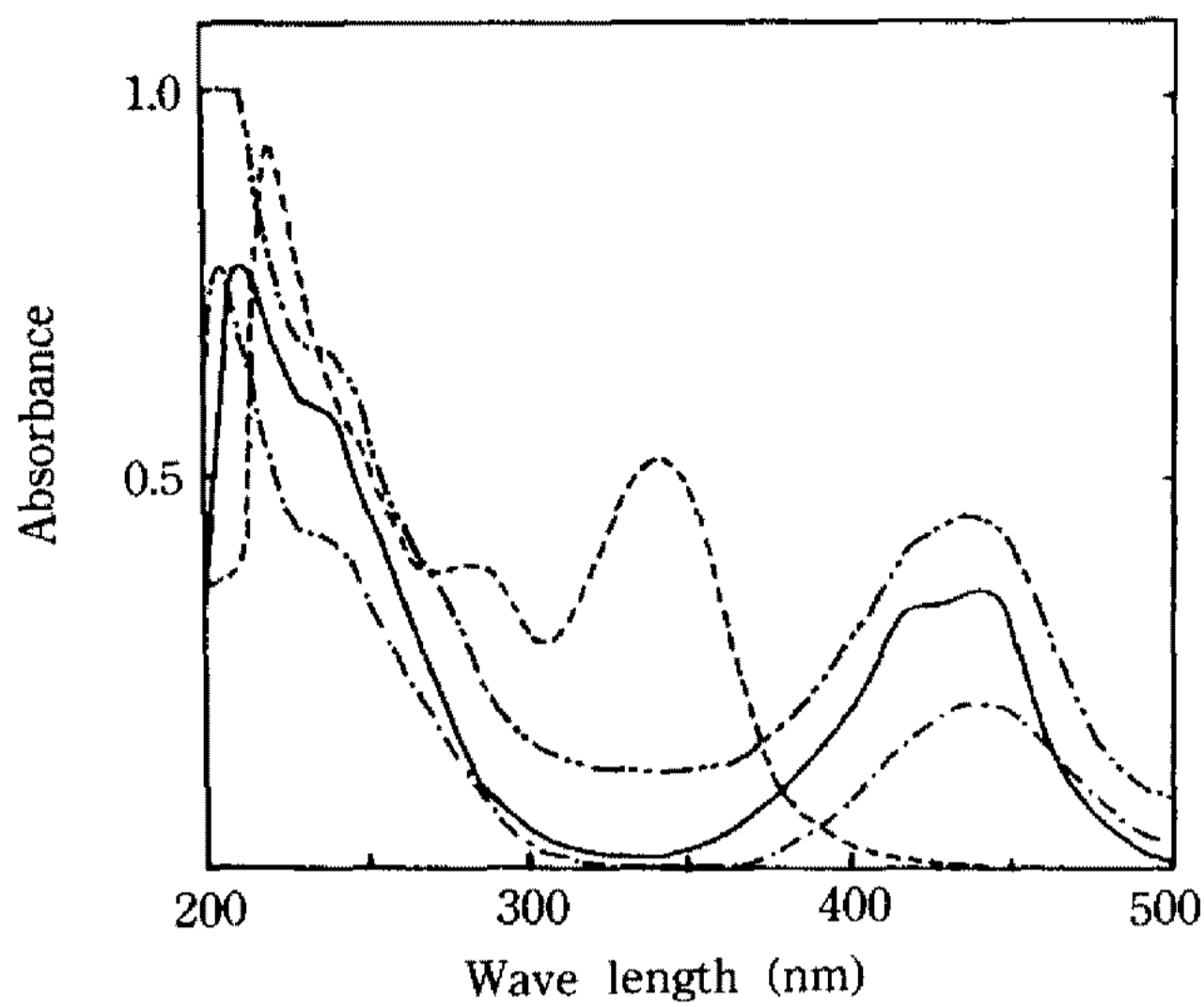


Fig. 3. UV spectrum of antibiotic MT-497.

— : MeOH  
 - - - : MeOH+0.1N HCl  
 ..... : MeOH+0.1N NaOH  
 - · - · : H<sub>2</sub>O

SO<sub>4</sub>에서의 정색반응은 양성으로 나타났다. 또한 원소분석 결과는 C : 57.4%, H : 6.94%, N : 11.5%, O : 25.1%로 나타났다.

UV 흡수 spectrum

항생물질 MT-497의 UV 흡수 spectrum은 Fig. 3과 같다. MT-497의 methanol(20 mg/ml)에서의 최대 흡수파장은 212, 237, 420, 442 nm이었고, 알칼리성에서는 222, 283, 345 nm로 blue shift가 일어나고, 산성에서는 204, 240, 442 nm로 약간의 red shift가 일어났다. MT-497의 UV흡수 spectrum은 toxifertilin (4)을 비롯한 기타 actinomycin 계열의 항생물질(2, 3)의 UV흡수 spectrum과 매우 유사하게 나타났다.

IR spectrum

항생물질 MT-497의 FT-IR(Fourier transform infrared) spectrum은 Fig. 4와 같다. 3,400~3,200 cm<sup>-1</sup> 사이에 -NH 및 -NH<sub>2</sub>와 3,050 cm<sup>-1</sup>에서 vinylic C-H, 2,960~2,870 cm<sup>-1</sup>에서 aliphatic C-H가 존재함을 나타냈다. 또한 1,748 cm<sup>-1</sup>에서 ester의 carbonyl, 1,649 cm<sup>-1</sup>에서 amide의 carbonyl, 1,640 cm<sup>-1</sup>와 1,581 cm<sup>-1</sup>에서 unsaturated ketone, 1,193 cm<sup>-1</sup>에서 C-O의 흡수 band가 나타났다. actinomycin계열의 항생물질 및 toxifertilin의 IR spectrum과 MT-497의 IR-spectrum을 비교한 결과 전반적으로 유사함을 알 수 있

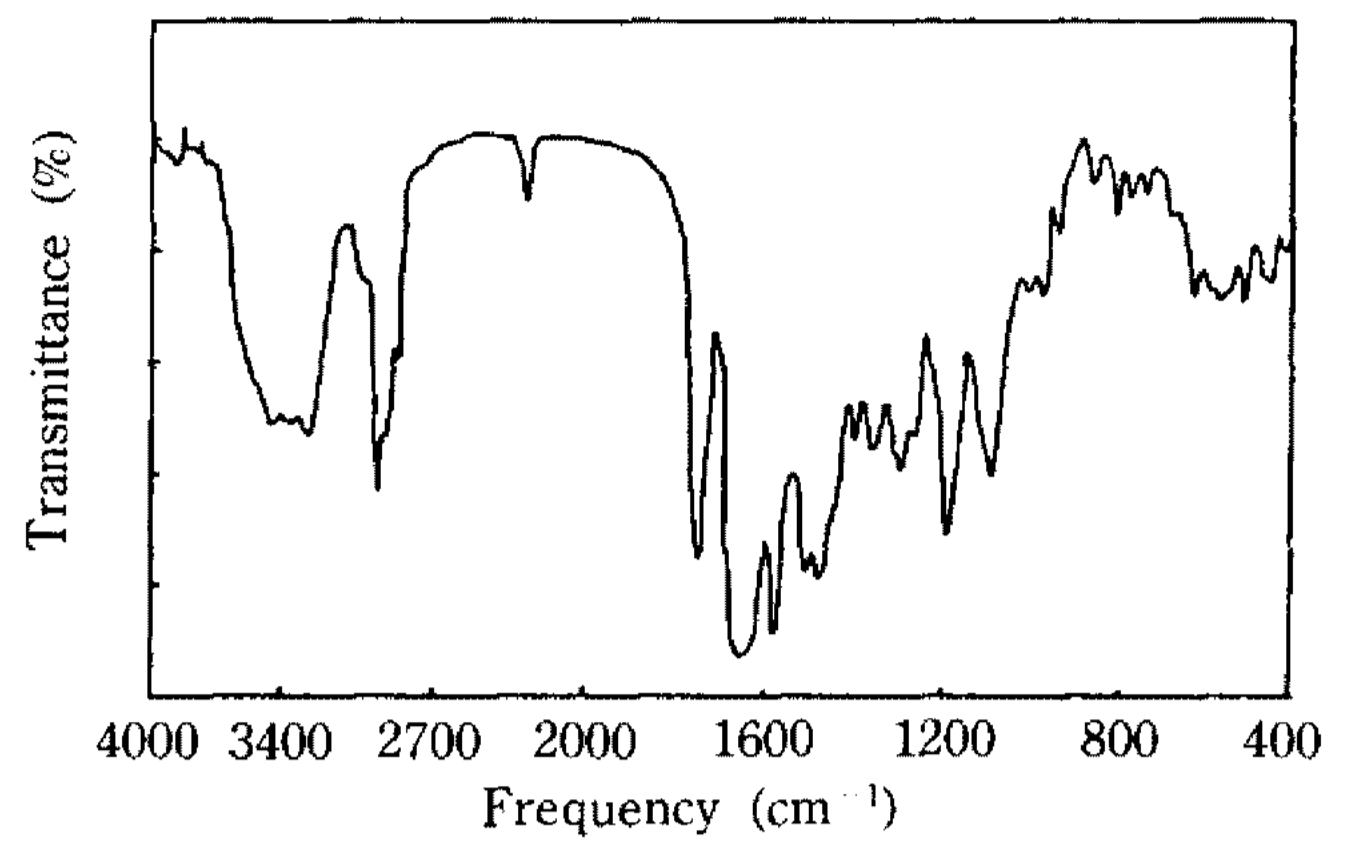


Fig. 4. FT-IR spectrum of antibiotic MT-4997.

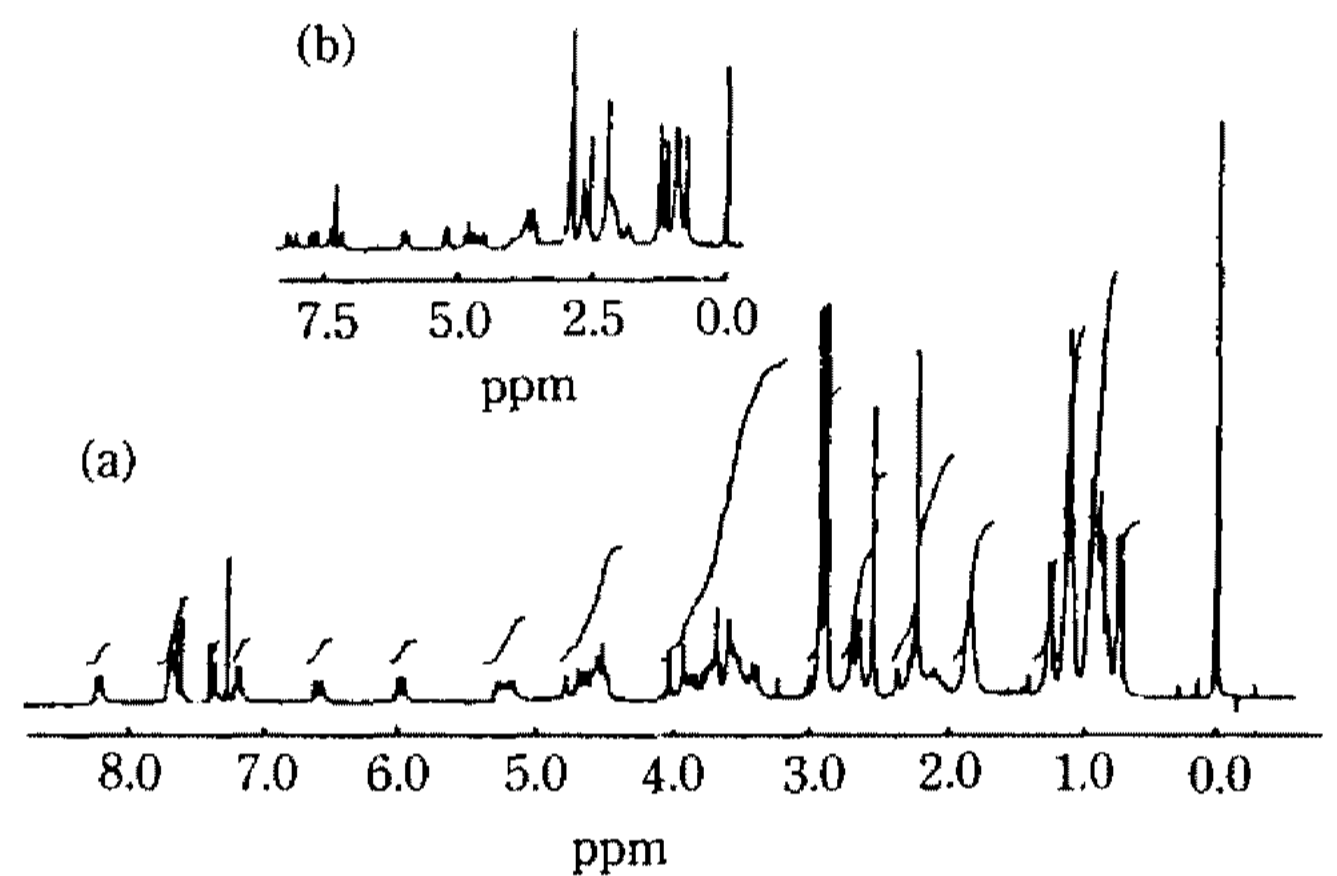


Fig. 5. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of antibiotic MT-497 (a) and actinomycin D (b).

었다(2-4). 따라서 MT-497은 toxifertilin이나 actinomycin계열의 항생물질에 해당한다고 생각할 수 있었으나 toxifertilin에 대한 더 이상의 기기분석 결과나 구조규명에 대한 보고는 없었다(4).

<sup>1</sup>H-NMR spectrum

항생물질 MT-497의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum은 Fig. 5와 같다. 7.36 ppm(d, 1H, J=7.8 Hz)과 7.69 ppm(d, 1H, J=7.8 Hz)의 peak은 1,2,3,4,-tetra substituted aromatic ring에 의한 것이고, 2.26 ppm(s, 3H)과 2.56 ppm(s, 3H)은 double bond에 결합된 -CH<sub>3</sub>임을 알 수 있다. 8.19 ppm, 7.18 ppm 등에서 나타난 proton은 amide proton으로 분자구조내에 많은 amide bond (peptide bond)가 있음을 추정할 수 있다. 0.7~1.3 ppm 사이에는 aliphatic CH<sub>3</sub>, 1.8~2.2 ppm 사이에는 aliphatic CH<sub>2</sub>, 2.89~2.94 ppm 사이에는 4개의 -N-CH<sub>3</sub>의 peak가 나타났으며, 3.3~6.0 ppm 사이에는 hetero atom 주위의 proton들이 나타났음을 알 수

**Table 3. Chemical shift comparison of the actinomycin D and antibiotic MT-497**

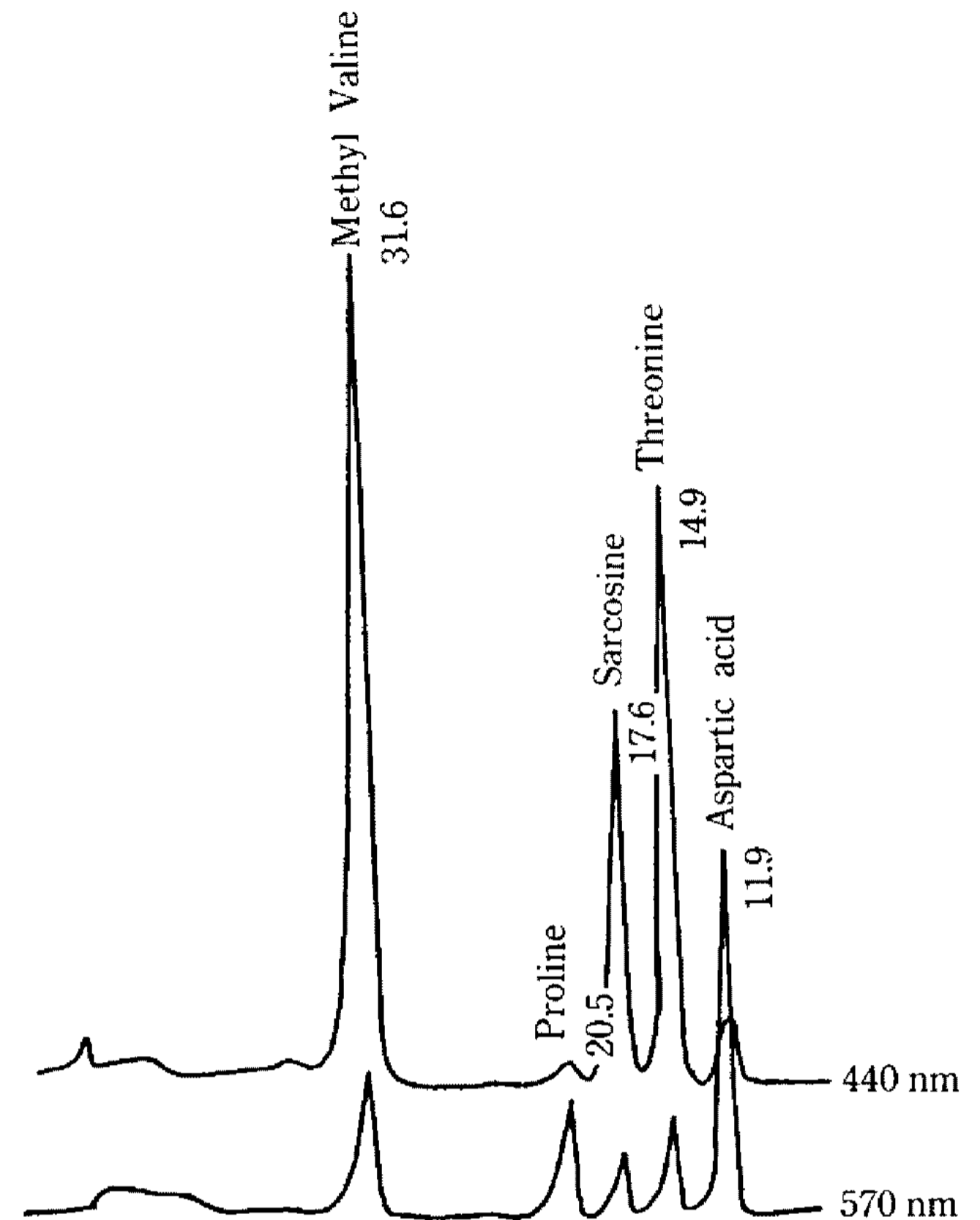
Proton	Actinomycin D (CDCl <sub>3</sub> )		MT-497 (CDCl <sub>3</sub> )	
	ppm	<i>J</i> *	ppm	<i>J</i> *
4-CH <sub>3</sub>	2.24		2.26	
6-CH <sub>3</sub>	2.56		2.55	
Ar C <sub>7</sub> H	7.37	7.8	7.36	7.8
Ar C <sub>8</sub> H	7.64	7.8	7.69	7.8
Ar NH	7.3~7.4		7.36	
Thr-CH <sub>3</sub>	1.27	6.0	1.27	
α-CH-Thr(2)	4.51	2.0~2.5(αβ)	4.51	
α-CH-Thr(1)	4.62	~6.5(α-NH)	4.62	
β-CH-Thr	5.15	6.0(βγ)	5.15	
β-CH-Thr	5.21	2.0~2.5(βα)	5.2	
NHC=O Thr(2)	7.2	6.8	7.18	
NHC=O Thr(1)	7.82	6.2		
D-Val-CH <sub>3</sub>	0.91	6.5	0.91	
D-Val-CH <sub>3</sub>	1.13	6.5	1.1	
β-CH-D-Val	~2.2		2.23	
α-CH-D-Val	3.62		3.62	
α-CH-D-Val	3.62		3.62	
NHC=O D-Val	7.94	6.0	7.65~7.77**	
NHC=O D-Val	8.09	5.7	8.19**	
4-CH <sub>2</sub> (2H)-Pro	1.85		1.86	
3+4-CH <sub>2</sub> -Pro	2.1~2.2		2.2	
CH <sub>2</sub> N-Pro(2H)	2.67		2.67	
CH <sub>2</sub> N-Pro(2H)	3.7~3.75		3.7~3.75	
α-CH-Pro	~3.9		3.9	
α-CH-Pro	~4.0		4.0	
Sar(2)	3.63		3.63	
	4.72	17.8	4.72	
Sar(1)	3.63		3.63	
	4.79	17.8	4.75	
MeVal-CH <sub>3</sub>	0.76		0.76	
MeVal-CH <sub>3</sub>	0.96		0.96	
β-CH-MeVal	2.6~2.75		2.6~2.75	
α-CH-MeVal	5.98	~7.5	5.96	
α-CH-MeVal	6.03	~7.5	6.57**	
NCH <sub>3</sub>	2.89		2.89	
NCH <sub>3</sub>	2.94		2.94	

\**J*: coupling constant

\*\*Difference in chemical shift between actinomycin D and MT-497.

있다.

항균 spectrum과 이화학적 성질, UV, IR spectrum의 분석결과 MT-497은 toxifertilin 및 actinomy-

**Fig. 6. Amino acid analysis in acid hydrolysate of antibiotic MT-497.**

Column: BTC 270 ion exchanger, detection reagent: ninhydrin, detector: UV 440, 570 nm.

cin계열의 항생물질과 유사하였다. 그러나 toxifertilin에 대한 구조 규명을 위한 더 이상의 기기분석 결과가 없으므로 비교가 불가능하였다. 따라서 MT-497의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum과 유사한 <sup>1</sup>H-NMR spectrum을 나타내는 것은 actinomycin계열의 항생물질들 뿐이었다(8). MT-497의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 actinomycin계열의 chromophore(actinocin)의 특징적인 peak가 7.69 ppm, 7.36 ppm과 2.26 ppm, 2.56 ppm에서 나타났다. 7.69 ppm과 7.36 ppm의 peak는 actinocin의 7번, 8번 carbon의 proton에 의한 것이고, 2.26 ppm과 2.56 ppm은 각각 actinocin의 4번과 6번의 methyl proton에 의한 것으로 알 수 있다. 따라서 MT-497은 actinocin chromophore를 갖는 점과 amide bond들이 여러개 존재하는 것으로 보아 actinomycin계열의 항생물질임을 추측할 수 있었다.

Actinomycin계열 항생물질 중 MT-497과 <sup>1</sup>H-NMR spectrum이 가장 유사한 것으로는 actinomycin D임을 알 수 있었다(8). 따라서 actinomycin D와 MT-497의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum을 비교하여 Table 3에 정리



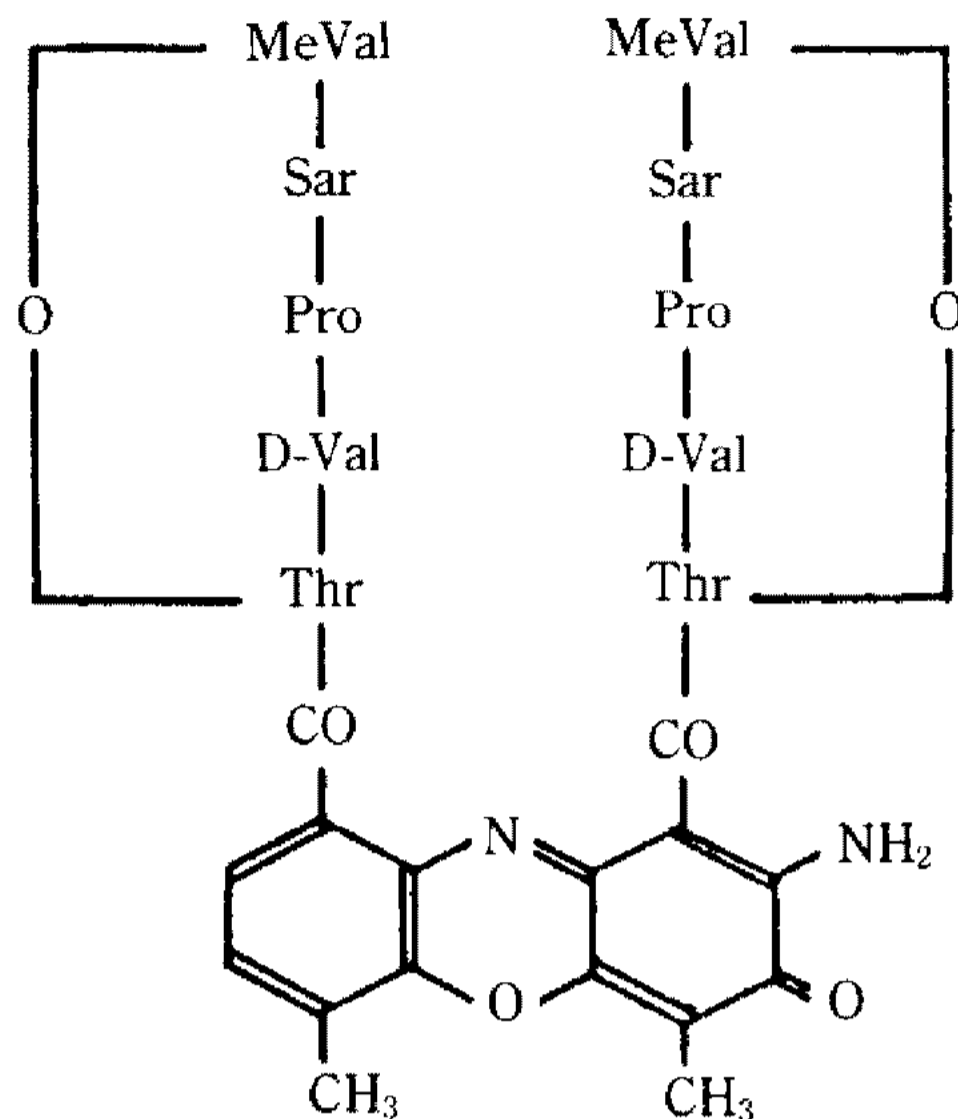


Fig. 7. Structure of actinomycin D.

MeVal: methyl-valine, Sar: sarcosine, Pro: proline, D-Val: D-valine, Thr: threonine.

하였다. Chromophore인 actinocin에서 유래한 proton의 chemical shift는 모두 일치하였고 아미노산들에서 유래한 proton의 chemical shift는 일부를 제외하고는 거의 같이 나타나고 있었다. 따라서 MT-497은 actinomycin D의 peptide내의 구성아미노산과 약간의 차이가 있는 것으로 추정되었다.

#### 아미노산의 분석

항생물질 MT-47을 6N-HCl로 가수분해하여 아미노산을 분석한 결과는 Fig. 6과 같다. 용출시간에 따라 순차적으로 aspartic acid, threonine, sarcosine, proline, methyl valine이 검출되었으며, proline의 검출은 440 nm의 파장에서 확인 할 수 있었다. 따라서 항생물질 MT-497는 actinocin chromophore를 갖고 이들 아미노산으로 구성된 peptide를 갖는 actinomycin계열의 항생물질임을 알 수 있었다. 한편, 항생물질 MT-497내의 아미노산과 actinomycin D내의 아미노산을 비교해 보면(Fig. 7) threonine, proline, sarcosine, methyl valine은 일치하나 valine 대신 aspartic acid가 존재하는 차이점을 알 수 있다(10). 그리고 이러한 아미노산 조성을 갖는 항생물질 MT-497은 기존의 actinomycin계열의 항생물질들과는 아미노산 조성에서 차이점을 보이고 있으나(2, 5) peptide내의 아미노산 배열순서 등의 정확한 구조를 결정하기 위해서는  $^{13}\text{C}$ -NMR, 2D-NMR 등의 기기분석을 위한 지속적인 연구를 진행시켜야 할 필요성이 있다.

#### 요 약

토양에서 분리한 *Streptomyces nigrifaciens* GMT-497로부터 G(+) bacteria에만 강한 항균활성을 갖는 항생물질 MT-497을 용매추출, silica column chromatography와 재결정화를 통하여 분리 정제하였다. MT-497의 UV, 융점, 원소분석, IR spectrum,  $^1\text{H}$ -NMR과 구성아미노산 분석을 통해 actinocin chromophore와 threonine, proline, methyl valine, sarcosine, aspartic acid로 구성된 peptide을 갖는 actinomycin계열의 항생물질로 동정하였다.

#### 감사의 말

본 연구는 과학기술처의 국책연구개발사업비의 지원을 받아 수행되었으며 관계자 여러분에게 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. Ahn, J. S., S.C. Ahn, J.H. Lee, B.D. Yoon, Y.S. Lee, T.I. Mheen: *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, submitted (1991)
2. Bycroft, B.W.: *Dictionary of Antibiotics and Related Substances*, Chapman and Hall Ltd., New York (1988)
3. Umezawa, H.: *Index of Antibiotics from Actinomycetes*, Vol. 1, 2, Japan Scientific Societies Press, Tokyo (1978)
4. Yagishita, K., H. Jinnouchi and H. Yamamoto: *Bull. Coll. Agr. Vet. Med., Nihon Univ.*, **35**, 1 (1978)
5. Anthony, B.M. and E.Katz: *Actinomycin in Antibiotics Isolation, Separation and Purification*, (Weinstein J.M. and G.H. Wagman, eds.) Vol. 15, Elsevier, New York (1978)
6. 민태익, 안종석, 이영선, 이정형, 안순철, 이지행: 방선균류의 신규생체활성물질 탐색, KIST, 유전공학센터, 과학기술처 연구보고서 (1989)
7. Hash, J.H.: *Methods in Enzymology*, Academic Press, Vol. 43 (1975)
8. Arison, B.H. and K. Hoogsten: *Biochemistry*, **9**, 3976 (1970)
9. Ciferri, O., A. Albertini and G. Cassani: *Biochem. J.*, **96**, 853 (1965)
10. Meienhofer, J. and E. Atherton: *Adv. Appl. Microbiol.*, **16**, 203 (1973)

(Received October 17, 1991)