



# 혐기성 세균에 의한 생체 활성 물질의 탐색 (IV)

Screening of the New Biologically Active  
Compounds Produced by Anaerobes (IV)

연구기관  
한국과학기술연구원  
부설 유전공학연구소

과 학 기 술 처

# 제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “미생물에 의한 신규 생체활성물질 탐색”사업의 세부과제 “혐기성 세균에 의한 생체활성물질의 탐색(Ⅳ)”사업의 4차년도 최종보고서로 제출합니다.

1992 . .

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원부설 유전공학연구소  
총괄책임자 : 민태익 (미생물공학연구실 책임연구원)  
연구책임자 : 오태광 (응용미생물연구실 책임연구원)  
연구원 : 윤기홍 (응용미생물연구실 선임연구원)  
          성문희 (응용미생물연구실 선임연구원)  
          이정기 (응용미생물연구실 연구원)  
          김형권 (응용미생물연구실 연구원)  
          태동년 (응용미생물연구실 연구원)  
          박승춘 (응용미생물연구실 위촉연구원)

# 요 약 문

## I. 제 목

협기성 세균에 의한 생체활성물질의 탐색(IV)

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

근래, 물질 특허제도의 도입으로 종래의 생산기술 방식을 벗어난 새로운 물질의 개발이 시급히 요청되면서, 생물공학 관련 분야에서도 미생물을 이용한 새로운 생리활성물질의 개발에 박차를 가하고 있다.

현재까지 생체활성물질의 개발은 주로 토양속의 *Actinomycetes*, *Fungus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* 등과 같은 호기성 미생물을 대상으로 이루어졌으며, 현재까지도 이들로부터 면역 조절제 등 새로운 생리활성물질을 얻고 있다.

편성협기성 세균의 경우는 호기성 미생물의 경우와는 달리 시료의 채취와 분리, 배양 그리고 screening 방법의 문제점 등으로 인하여 생체활성물질 탐색은 거의 이루어지지 않았다.

그러나 최근에는 협기성 세균의 배양기술이 발달함에 따라 대부분의 협기성 미생물을 분리할 수 있게 되었으므로, 현재까지 활성물질의 탐색에서 제외되었던 편성협기성 미생물을 대상으로 생체활성물질을 검색할 필요가 있다고 생각된다. 편성협기성 세균은 토양에 뿐만 아니라 해양이나 사람과 동물 등의 장내에도 다양하게 분포할 뿐만 아니라 이들 미생물들의 성장이나 생체에 미치는 역할 등이 해명되지 않은 상태이므로 새로운 생리활성물질 탐색의 시료로 적절하다고 여겨진다. 또한 해양미생물은 지역적 위치나 심도등에 따라 그 분포 및 종류가 다양하며 어류의 장내 미생물 또한 해명되지 않은 부분이 많으므로 새로운 탐색 대상이 될 수 있을 것이다.

이와같은 기존의 탐색대상물을 벗어난 새로운 환경의 미생물들을 검색함으로써 새로운 생체활성물질의 발견 가능성은 더욱 높아질 것이다.

### Ⅲ. 연구의 내용 및 범위

#### 1. 토양 시료에서 혐기성 세균의 분리

토양을 채취하여 혐기적 배양 조건하에서 세균을 분리하여 산소 요구 정도에 따라 편성혐기성 세균과 통성혐기성 세균으로 분류하여 모든 편성세균과 생리활성이 있는 통성혐기성 세균을 glycerol에 넣어 보관하였다.

#### 2. 분리된 혐기성 세균으로부터 항생물질 탐색

##### 1) 항생물질 검정법

항생물질 검정균을 이용하여, 분리한 혐기성 세균의 배양액을 시료로 하여 paper disc 방법으로 항균 활성을 검정하였다.

##### 2) 항생물질 생산균주의 탐색

분리한 혐기성 세균의 항균활성물질 생산능을 검사하여, 항생물질 생산균을 선정하고 항생물질 생산의 안정성 등을 조사하였다.

##### 3) 항생물질 정제

1, 2차 탐색에서 항생물질 생산능이 뛰어나고, 재현성이 확실하고 용매추출이 가능한 균주 An-12-1, An-21-1를 선발하여 이 균주가 생산하는 항생물질의 예비 분리 단계를 결정하고 분리 정제 단계를 수행하였다.

### Ⅳ. 결과 및 활용에 관한 건의

#### 1. 토양 시료에서 혐기성 세균의 분리

계룡산, 지리산, 주황산, 경주 영일만 등에서 838점의 토양시료를 채취하여 현재 590개의 토양시료에서 혐기성세균을 분리하였다. 분리한 혐기성세균은 모두 1,567주였으며 이 중에서 편성혐기성 세균은 356주, 통성혐기성

세균은 1,211 주였다.

## 2. 분리된 혐기성 세균으로 부터 항생물질 생산균 탐색

분리된 혐기성 세균의 배양상등액을 시료로 1, 2차 탐색한 결과 An-12-1, An-21-1을 선발하여 분리 정제 단계를 수행하였다.

# S U M M A R Y

## I. Project Title

Studies on the Screening of Biologically Active Compounds Produced by Anaerobic Bacteria.

## II. Objectives and Importance of the Project

Because the production of biologically active compounds by microorganisms is one of the most important areas of biotechnology, the search for the novel biologically active compounds is the basis of the developments in the field of biotechnology.

Up until now, most of the searches for the biologically active compounds are restricted to the aerobic microorganisms such as fungi, bacilli and actinomycetes. Strict anaerobes have not been used in the studies due to the difficulties in their handling. Because most of the known biologically active compounds are produced by aerobes and because techniques are available to handle anaerobes, anaerobes are the most promising candidates for the searches to find microbes producing novel compounds.

For this reason anaerobes were isolated and used to screen strains having antimicrobial activities.

### III. Contents and Scope of the Project

#### 1. Isolation of anaerobic bacteria from soil samples

Soil samples were collected and used to isolate anaerobic bacteria. Isolates were tested for their abilities to produce antimicrobial activities, and classified into strict anaerobes and aerotolerant anaerobes. All strict anaerobes and strains with antimicrobial activities have been preserved in glycerol stocks.

#### 2. Screening of isolates for antimicrobial activities

##### 1) Screening method

The isolates were grown using an appropriate medium, and the culture filtrates were used to test antimicrobial activities by paper disc method.

##### 2) Selections of strains having antimicrobial activities

Strains having antimicrobial activities were tested for the consistencies of their antimicrobial activities.

##### 3) Purification of antimicrobial compound produced by isolates An-12-1, An-21-1

Isolates An-12-1, An-21-1 were selected from the repeated screening procedures and their culture filtrates were used to purify the antimicrobial compounds.

#### IV. Results and Proposals for their Application

##### 1. Isolations of anaerobic bacteria from soil samples

Anaerobic bacteria were isolated from 590 soil samples out of 838 samples collected around Korea and Malaysia. The number of anaerobes isolated were 1567 consisting of 356 strict anaerobes and 1211 aerotolerant anaerobes.

##### 2. Screening of strains having antimicrobial activities

Paper disc method was employed to screen 40 strict anaerobes from 356 strains and 5 aerotolerant anaerobes out of 653 strains. From the second screening program 4 strains were selected from 45 strains screened based on consistent and stronger activities. Isolate An-12-1, An-21-1 were grown using 19L carboy and the culture filtrates were used to purify the antimicrobial compounds. The selected strains showed wide antimicrobial spectra consistently.

##### 3. Purification of the antimicrobial compounds.

Antimicrobial compounds produced by An-12-1, An-21-1 were purified by solvent extraction, silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography and HPLC.



#### 4. Proposals for the 5th year study

The results showed that about 10% of the strict anaerobes have antimicrobial activities, and that the partially purified antimicrobial compounds are not known compounds. These results show that strict anaerobes are better candidates to search novel biologically active compounds. Studies will be continued to isolate strict anaerobes from soil as well as unusual sources such as intestines of terrestrial and marine animals, and to characterise the antimicrobial compounds produced by anaerobes.

# C O N T E N T S

|   |    |
|---|----|
| Chapter I. Introduction .....                                     | 15 |
| Chapter II. Materials and Methods .....                           | 19 |
| I. Isolation and cultivation of anaerobic bacteria<br>.....       | 19 |
| II. Screening of antibiotic producing anaerobic<br>bacteria ..... | 21 |
| III. Purification of antibiotics .....                            | 25 |
| Chapter III. Results and Discussion .....                         | 31 |
| I. Antibiotic produced by strain An-12-1 .....                    | 31 |
| II. Antibiotic produced by strain An-21-1 .....                   | 41 |
| Reference .....   | 61 |

# 목 차

|   |    |
|---|----|
| 제 1 장 서 론 .....                         | 15 |
| 제 2 장 실험재료 및 방법 .....                   | 19 |
| 제 1 절 혐기성 세균의 분리와 배양 .....              | 19 |
| 제 2 절 분리된 혐기성 세균으로 부터 향생물질 생산균 탐색 ..... | 21 |
| 제 3 절 향생물질의 분리정제 .....                  | 25 |
| 제 3 장 결과 및 고찰 .....                     | 31 |
| 제 1 절 An-12-1 균주가 생산하는 향생물질 .....       | 31 |
| 제 2 절 An-21-1 균주가 생산하는 향생물질 .....       | 41 |
| 참 고 문 헌 .....                           | 61 |

## 제 1 장 서 론

항생제는 동·식물의 질병치료에 가장 널리 쓰이는 물질이다. 즉 항생제는 인류에 도움이 되는 동·식물의 박테리아성 또는 곰팡이성 질병에 걸리는 것을 막아준다. 뿐만 아니라 항생제에 대한 연구를 통해 세포내 물질대사 경로에 대한 지식을 얻을 수 있고, genetic markers로 이용하여 유전공학적인 기술에 이용할 수 있다.<sup>1) 2)</sup>

항생제는 미생물에 의해 생산되어 다른 미생물의 성장을 일시적 또는 영구적으로 억제하는 저분자 물질이다.

항생물질은 이차대사 산물의 일종으로 미생물의 이차대사 산물 중 가장 많이 알려진 물질에 속한다. 항생물질에 대한 연구는 1929년 Fleming이 *Penicillium notatum*으로 부터 penicillin을 발견함으로써 부터 시작되었고 1944년에는 Waksman이 *Streptomyces griseus*로 부터 streptomycin을 분리하여 최초로 방선균에서 항생물질을 발견하였다. 이 두가지 항생물질의 발견 이래 새로운 항생물질을 개발하려는 연구가 활발하게 진행되어 최근까지 미생물에서 발견된 항생제는 모두 6,500여 종에 이르게 되었다. 이중 4,200여종이 방선균에서 발견되었고, 일반 세균에서는 800여종만이 발견되었다.<sup>3) 4)</sup> 항생물질도 다른 이차대사 산물과 마찬가지로 특정한 group에 한정되어 생산되는 경향이 있다. 항생물질을 많이 생산하는 미생물들은 *Pseudomas*를 제외하면 대부분이 spore를 형성하는 fungi나 *Actinomycetales*, *Bacillus* 등으로 항생물질의 생산이 세포의 differentiation과 밀접하게 관련되어 있는 것으로 생각되었다.<sup>5) 6)</sup> 그러나 이차대사 산물이 세포의 분화에 광범위한 작용을 할 것이라는 생각은 토론의 여지가 많이 있다고 생각된다.

최근에는 탐색의 폭을 넓혀 위에 열거한 미생물군 외의 일반 세균에서도 특이한 항생물질을 많이 생산하고 있다. 예를 들면 *Chromobacterium*과 *Agr-obacterium*에서 monocyclic  $\beta$ -lactam 항생제인 monobactam을 분리하였으며,<sup>7) 8) 9)</sup> *Serratia*와 *Erwinia*에서는 carbapenem에 속하는 SQ 27,860을 분리하였으며, *Flavobacterium*에서는 7-formamido-cephalosporins을<sup>10)</sup>, *Lysobacter*와 *Angiococcus*에서는 Anticandial 항생제와 lactone-lactam 항생제를 각각 분리하였다.<sup>11) 12)</sup> 따라서 신규 활성물질의 탐색 대상이, 방선균이나 곰팡이 등 제한된 미생물군을 벗어나 이때까지 제외되었던 일반세균에까지 확장되고 있으며, 더 나아가서는 극한 상황에서 성장하는 미생물군들로부터 새로운 생리활성물질을 찾으려는 노력들도 이루어지고 있다. 또한 해양미생물에 대한 관심도 높아져 해양생물에서 생리활성물질을 탐색하여 새로운 항생물질을 얻었는데, 바닷물은 염의 함량이 높으므로 염에 의하여 대사가 변환되어 새로운 항생물질의 생산이 가능하다고 생각할 수 있다.

그러나 이러한 노력에도 불구하고 혐기성 미생물에서 신규 생리활성물질을 발견하였다는 보고는 거의 없는 상태이다. 편성혐기성 세균의 경우는 호기성 세균과는 달리 시료의 채취와 분리, 배양 그리고 screening 방법의 문제점 등으로 혐기성 세균을 대상으로 한 생리활성 물질의 탐색이 이루어지지 않았다는 생각이 들지만 최근에는 혐기성 세균의 배양기술이 발달함에 따라 대부분의 혐기성 미생물을 분리할 수 있게 되었으므로 현재까지 생리활성물질의 탐색에서 제외되었던 편성 혐기성 세균을 대상으로 신물질을 탐색할 필요가 있다고 생각된다. 현재까지 보고된 혐기성 세균에서 발견된 항균물질로는 *Streptococcus cremoris*와 *S. lactis*의 nisin과 *Clostridium*의 여러가지 종에서 생산되는 bacteriocin들이 있다.

Nisin은 분자량 3,500 정도의 peptide계 항균 활성물질로 Gram 양성세균과 *Neisseria*에 대해 항균 활성을 나타내며 food preservative로 이용되며 true antibiotics라기 보다는 bacteriocin으로 분류한다.<sup>13)</sup>

Clostridia에서는 *C. botulinum*이 생산하는 botocin, *C. perfringens*의 perfringocin, *C. butyricum*이 생산하는 butyricin 등이 발견되었는데 이들도 역시 항생제라기 보다는 bacteriocin에 속하며 활성 spectrum이 매우 좁아 *Clostridium*속의 다른 종이나 Gram 양성 세균에 대해서만 활성을 나타낸다.<sup>14-18)</sup> 이외에는 경북대학교의 하지홍 교수팀이 국내의 다양한 토양 시료로부터 *Clostridium*을 분리하여 Gram 양성, Gram 음성세균 및 진균에 대해 광범위한 생육 저해 현상을 일으키는 균주를 선별하였으며 본 실험에서도 항균 spectrum이 넓고 열과 pH에 강한 항균 활성물질을 생산하는 strict anaerobe를 분리하여 그로부터 항생물질을 분리·정제하고 있다. 이런 점들을 볼 때 혐기성 세균에서의 항균 활성물질 탐색도 신물질 개발의 접근 방법으로써 가능성이 있다고 여겨진다. 그리고, 현재까지 탐색 대상이 되어 왔던 토양 혐기성 세균외에도 다른 생태계의 혐기성 세균을 탐색 대상으로 포함시킨다면 그 가능성은 더욱 커질 것으로 보인다. 편성 혐기성 세균은 해양이나 사람과 동물의 장내에 다양하게 분포할 뿐만 아니라 이들 미생물들의 성장이나 생체에 미치는 역할 등이 해명되지 않은 상태이므로 새로운 생리 활성물질의 탐색 시료로 적절하다고 여겨진다. 이와 같은 기존의 탐색 틀을 벗어난 새로운 환경의 미생물들을 검색함으로써 새로운 생리 활성물질 개발의 가능성은 더욱 높아질 것이다.

## 제 2 장 실험 재료 및 방법

### 제 1 절 혐기성 세균의 분리와 배양

#### 1. 토양 시료의 채취

충청남도 계룡산, 경상북도 주왕산, 경주 영일만, 경상남도 지리산 등의 인적이 드문 산간지역을 다니며, 지표에서 5 - 10 cm 깊이의 토양을 채취하였다.

#### 2. 혐기성 세균의 분리와 배양

##### 1) 혐기성 세균의 분리

토양시료 1 ~ 2 g 을 혐기상태로 만들어진 10 ml 생리식염수가 든 anaerobic glove box내에서 C-SPY 평판배지 표면에 0.1 ml씩을 각각 도말하여 2 ~ 4일간 glove box내에서 배양한 후 나타난 colony중 서로 다른 형태의 colony를 선택하여 새로 만든 C-SPY 평판 배지에 한 colony당 두 개씩 streaking하여 하나는 혐기상태의 35 °C glove box내에서 2 ~ 4일간 배양하고 다른 하나는 호기적 상태의 37 °C incubator에서 2일간 배양하였다. 그 결과 호기적 조건과 혐기적 조건 모두에서 성장이 일어나면 통성혐기성 세균으로 분류하고 혐기적 조건에서만 자라는 균들은 편성혐기성 세균으로 분류하였다.

##### 2) 분리용 배지

토양으로부터 혐기성 세균을 분리, 배양하는데 사용한 배지는 chopped meat carbohydrate (CMC : ATCC 1102) 배지의 조성을 변형한 C-SPY

배지를 사용하였으며 그 조성은 Table 1에 나타내었다.

혐기성 세균을 배양하기 위해서는 배지를 산소가 없는 상태로 만들어야 하므로 다음과 같이 처리하였다. 삼각 flask내에서 배지성분들을 증류수로 완전히 녹여 전열기 위에서 끓여 용존산소를 제거한 다음 50 °C 정도로 식혀서 환원제로서 cysteine을 0.5 g/l로 넣어 주었다. 다음에 5N NaOH

Table 1. Composition of the C-SPY medium used for the isolation and cultivation of anaerobic bacteria.

| Components     | Quantities | Components                      | Quantities |
|----------------|------------|---------------------------------|------------|
| soil extract   | 100 ml     | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1 g        |
| Bacto-peptone  | 15 g       | NH <sub>4</sub> Cl              | 0.5 g      |
| yeast extract  | 10 g       | 0.2% resazurin                  | 0.4 ml     |
| glucose        | 4 g        | salt solution II                | 1 ml       |
| soluble starch | 1 g        | vitamin solution                | 1 ml       |
| cellobiose     | 1 g        | cysteine                        | 0.5 g      |
| maltose        | 1 g        | adjust pH to 7                  |            |
| D. W. up to 1L |            |                                 |            |

\* Salt solution II was consisted of 1.5g nitrilotriacetic acid, 0.1g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.17g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.1g ZnCl<sub>2</sub>, 0.1g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.01g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.01g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.017g Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 0.026g NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.0g NaCl per 1 liter distilled water.

\*\* Vitamin solution was consisted of 0.002g biotin, 0.002g folic acid, 0.01g pyrimidineHCl, 0.005g thiamineHCl, 0.005g pantothenic acid, 0.0001g cyanocobalamine, 0.005g p-aminobenzonic acid and 0.005g lipoic acid per 1 liter distilled water.



나 HCl을 사용하여 pH를 7.0으로 맞춘 후 배지와 배양용 pressure tube나 vial을 산소를 제거한 질소 gas로 계속 차환시키면서 dispenser로 배지를 분주하였다. 다음에 butyl 고무마개로 입구를 막고 aluminium cap으로 밀봉을 한 후 121°C, 15psi에서 20분간 멸균을 하였다.

### 3) 분리균의 배양과 보존

단일 colony로 분리된 혐기성 세균을 혐기상태로 만들어진 10 ml의 C-SPY 액체배지가 든 pressure tube에 한 백금니 접종하여 35°C water bath에서 2-3일간 배양한 다음 5,000 rpm으로 원심분리하여 배양상등액은 주사기로 뽑아 항균활성을 조사하는데 사용하고 균체는 멸균된 증류수 0.5 ml을 넣어 잘 suspend시킨 다음 멸균된 1.5 ml의 60% glycerol에 넣어 -70°C의 deep freezer에 보관하였다. 이때 산화가 일어난 곳에는 Ti(III)NTA를 소량 넣어주어 환원시켰다.

## 제 2 절 분리된 혐기성 세균으로부터 항생물질 생산균 탐색

### 1. 항생물질 생산균 검정법

#### 1) 시험균 및 시험균 배양배지

혐기성 세균은 성장수율이 호기성 세균과 방선균보다 매우 낮기 때문에 항생물질을 생산한다 하더라도 그 양이 적기 때문에 배양상등액 자체를 시료로 사용하여 항균활성을 조사할 때는 고감수성 검정균에 의해서 대부분의 활성이 확인되었다. 따라서 Gram음성 시험균으로는 고감수성균인 *E. Coil*

BE 1186 (BE) 과 *Salmonella typhimurium* 1102 (SL) 를 주로 사용하였으며 2차 screening에서는 *Bacillus subtilis* NIHJ-PCI 219 (BS) 와 multi-resistant mutant인 *Staphylococcus aureus* R-209 를 사용하였다. (Table 2)

Table 2. Test microorganisms used to measure antimicrobial activities.

| Test organism                         | Characteristics                                 | Abbreviations |
|---------------------------------------|---|---------------|
| <i>E. coli</i> AB 1157                | mother strain of BE                             | AB            |
| <i>E. coli</i> BE 1186                | hypersensitive mutant of AB                     | BE            |
| <i>S. typhimurium</i> SL 1102         | hypersensitive mutant of TV                     | SL            |
| <i>Staphylococcus aureus</i> R-209    | antibiotic multi-resistant mutant of ATCC 6538P | R-209         |
| <i>Bacillus subtilis</i> NIHJ-PCI 219 |   | BS            |
| <i>Candida albicans</i>               |   | CAN           |

기존의 항생제에 대해 내성을 갖는 균들이 생김에 따라 이들 항생제의 사용이 제한되고 있다. 따라서 기존의 항생제와 함께 작용하여 내성을 갖고 있던 균들의 성장을 저해하는 물질을 찾고자 하였다. 이와같은 조항생물질을 찾기 위해서 tetracycline, chloramphenicol, ampicillin, kanamycin에 대해 내성을 갖는 균을 개발하여 검정균으로 사용하였다 (Fig 1). 이 균의 4가지 항생제에 대한 MIC와 검정 plate 제작시 사용한 농도는 Table 3과 같다.

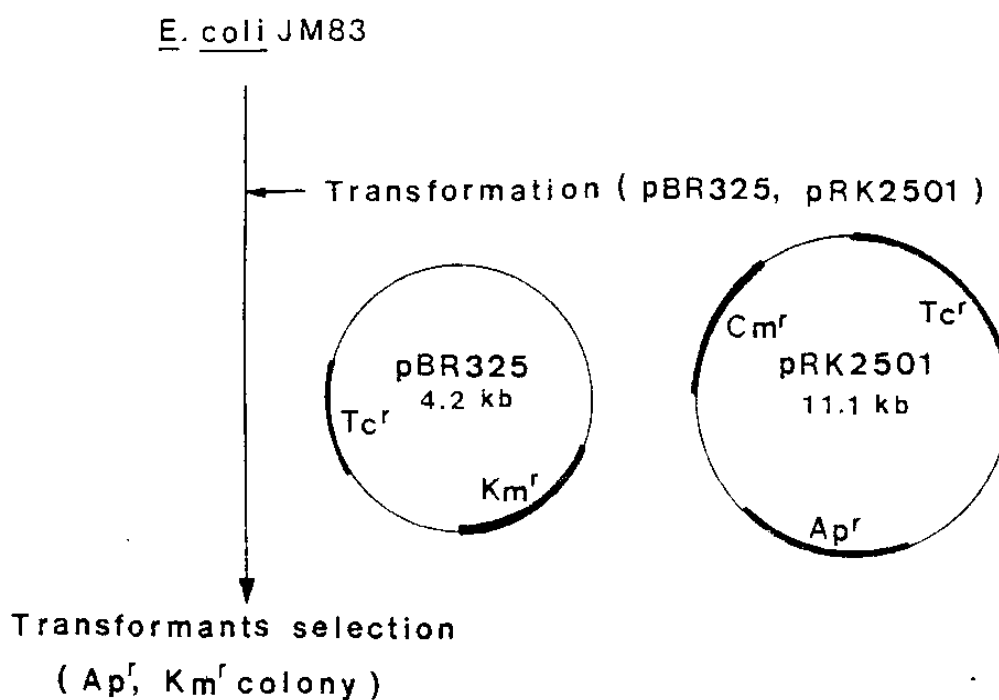


Fig 1. Development of new test organism harboring multiple antibiotic resistant markers.

Table 3. MIC determination of multi-antibiotics for *E. coli* JM83(pBR 325 and pRK 2501)

| Antibiotics     | MIC( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | Working concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |
|-----------------|--------------------------------|---|
| Ampicillin      | 800                            | 350   |
| Chloramphenicol | 400                            | 150   |
| Kanamycin       | 800                            | 350   |
| Tetracycline    | 80                             | 30  |

## 2) 시험균의 전 배양과 검정 Plate 제작

각각의 시험균을 5 ml LB배지가 든 culture tube에 접종하여 37 °C에서 14 - 18 시간 진탕 배양하였다. 멸균된 액화 LB-agar ( 1% ) 배지를 45 °C 정도로 식힌 후 전배양한 시험균 배양액을 흡광도를 측정하여 그 세포 농도에 따라 0.2 ~ 0.5% 접종하여 균질화되도록 잘 흔들어 준 다음 직경 90 mm petri dish에 15 ml씩 수평으로 부어 굳혀 검정 plate로 사용하였다.

## 3) 항생물질 생산균 검정법

혐기성 세균은 대사산물로서 여러가지 산들과 ethanol, butanol 그리고 acetone 등 solvent를 생산하고 배양액의 pH가 4.5 이하로 떨어지기 때문에 이들 산, solvent, pH에 의한 균의 성장억제 효과를 방지하기 위하여 먼저 배양상등액을 NaOH를 사용하여 중성으로 맞추어 주었다. 중화된 배양상등액 100  $\mu$ l를 직경 8 mm의 종이 disc 두 장에 흡수시켜 충분히 말린 다음 검정 plate에 disc를 올려놓고 plate를 냉장고에 두 시간 정도 방치하여 상등액의 물질이 plate에 확산되게 한 후 37 °C incubator에서 12시간 배양하였다.

배양후 나타나는 생육저지환을 조사하여 항생물질 생산 여부와 그 활성의 정도를 조사하였다.

## 2. 항생물질 생산균주의 탐색

### 1) 1차 screening

토양시료로부터 분리한 혐기성 세균을 편성혐기성 세균과 통성혐기성 세균으로 구분하여 모든 편성혐기성 세균과 임의로 선발한 통성혐기성 세균을 3 - 5일간 35 °C에서 배양한 후 그 배양상등액을 시료로 하여 시험균에 대

한 활성을 조사하여, 항균활성을 지니고 있는 혐기성 세균을 1차 선정균주로 선발하였다.

## 2) 2차 screening

1차 screening에서는 배양상등액 원액을 시료로 하여 항균활성을 조사하였기 때문에 활성은 거의 고감수성균에서만 나타났다. 2차 screening에서는 배양액을 10-20배 농축시킨 액을 시료로 하여 1차 screening에서 선발된 균주를 재확인함과 동시에 검정균에 대한 항생역가와 항균 spectrum을 조사하여 역가가 높고 항균 spectrum이 넓은 균주를 2차로 선발하여, 이 균주들이 생산하는 항생물질의 분리를 위한 여러가지 성질들을 조사하였다.

# 제 3 절 항생물질의 분리정제

## 1. 항생물질 정제를 위한 기본적 성질조사

2차 screening에서 선정된 균주에서 이들이 생산하는 항생물질의 정제 단계를 결정하기 위하여 항생물질의 용매추출여부, pH안정성, 활성탄에 대한 흡착 여부, 이온교환수지에서의 특성 등을 조사하였다.

### 1) pH 안정성

배양액을 pH 2, 7, 10으로 각각 조절하여 100℃에서 10분간 가열한 후 다시 pH를 중성으로 조절하여 10배 농축한 후 시험균에 대한 활성을 조사하여 pH 안정성을 판정하였다.

## 2) 유기용매 추출성

배양상등액을 pH 2, 7, 10으로 각각 조절한 후 butanol과 hexane로의 향생물질 전이 여부를 조사하였다. 즉, pH를 2, 7, 10으로 각각 조절한 시료액 10 ml씩을 유기용매 10 ml과 잘 섞어준 다음 수층과 유기용매층을 따로 분리한 다음 유기용매층과 수층에서의 활성을 조사함으로써 pH 변화에 따른 유기용매로의 전이 정도를 조사하였다.

## 3) 활성탄에 대한 흡착성

원심분리관에 pH 2, 7, 10으로 조절된 배양상등액 20 ml과 활성탄 2 g을 넣고서 잘 섞은 후 원심분리하여 상등액과 활성탄을 분리하였다. 활성탄에 흡착된 부위는 pH 10 (초기 pH를 2로 한 경우), pH 7, pH 2 (초기 pH를 10으로 한 경우)로 조절된 60% (v/v) acetone 20 ml씩으로 탈착시키고 감압농축하여 acetone을 제거하고 증화시킨 후 비흡착부위의 평균력을 측정하여 pH 변화에 따른 향생물질의 활성탄에 대한 흡착여부를 판정하였다.

## 4) 이온 교환수지에 대한 특성

양이온 교환수지로는 Dowex-50 × 4 (H<sup>+</sup>, Sigma), 음이온 교환수지로 Dowex-1 × 8 (Cl<sup>-</sup>, Sigma)를 사용하였다. 각 이온교환수지 10 ml씩을 10 ml 주사기에 주입하고 배양상등액 20 ml씩을 통과시키고 물로 씻은 후, 양이온 교환수지는 1 N NH<sub>4</sub>OH로, 음이온 교환수지는 1 N HCl로 용출시켜 증화시킨 다음 각 부위를 감압 농축하여 교환수지에 흡착되는 부위와 통과하는 부위의 평균활성을 조사하였다.

## 2. 균주 An-12-1 가 생산하는 항생물질의 분리정제

### 1) 발 효

10 ml C-SPY 배지에서 48시간 키운 배양액을 70 ml C-SPY 배지에 5% 접종하여 다시 48시간 배양한 것을 종균으로 사용하였다.

이 종배양액을 19리터 용량의 carboy에 혐기적으로 멸균처리된 13 C-SPY 배지에 5%로 접종하여 35 °C에서 5일간 배양하였다.

### 2) 유기용매 추출

이 균주가 생산하는 항생물질은 중성에서 butanol로의 전이가 가장 잘 일어나는 중성물질이다. 따라서 5일간 배양한 후 배양상등액의 pH를 7로 조절한 다음 butanol을 두차례 반복 처리하여 butanol층만을 모았다. 이렇게 얻은 butanol층을 감압농축하여 다음의 분리정제단계를 수행하였다.

### 3) 1st silica gel column chromatography

Butanol 추출후 감압농축한 시료를 chloroform-methanol(9:1) 혼합용매로 녹이고, 동일한 용매로 silica gel 600 g을 45 × 500 mm 유리관에 충전시켜 column을 씻는다. 이어서 C-M(4:1) 혼합용매로 용출시키며 100 ml씩 분획 채취하였다. 채취된 각 분획구의 *E. coli* BE 1186에 대한 항균력을 조사하고, 활성을 나타내는 분획구는 함께 모아서 감압농축하였다.

### 4) 2nd silica gel column chromatography

1st silica gel column을 통해 모은 시료를 C-M(9:1) 혼합용매로 녹이고, 동일한 용매로 silica gel 300 g을 20 × 700 mm 유리관에 충전시켜 column 상단에 시료를 가한 다음 동일 용매로 용출시켜 씻는

다. 이어서 C-M(4:1) 혼합용매로 용출시키며 10 ml씩 분획 채취하였다.

각 분획구의 항균력을 조사하여 활성을 띠는 분획구를 모두 모아서 감압 농축하였다.

#### 5) Sephadex LH-20 column chromatography

두번째 silica gel column을 통과한 시료를 C-M(1:1) 혼합용매로 녹이고, 동일한 용매로 Sephadex LH-20 gel 100g을 25 × 950mm 유리관에 충전시켜 column 상단에 시료를 가한 다음 동일용매로 용출시키며 5 ml씩 분획 채취하였다.

활성을 띠는 분획구를 모아 감압농축하였다.

#### 6) HPLC

활성물질의 최종분리단계로써 HPLC를 수행하였다. column은 reverse phase C-18 (20 × 250 mm)을 사용하고 80% Methanol을 전개용매로 하여 3 ml/min의 속도로 용출시켰다.

#### 7) 발색반응

HPLC로 분리된 물질의 화학적 성질을 알아보기 위해서 황산, Bromo-cresol Green, Ninhydrin Rhodamin B, Anilinphthalate, 4-dimethylaminobenzaldehyde, 2', 7'-dichlorofluorescein, Dragendorff's reagent, Molybdophosphoric acid 등 여러가지 발색시약을 사용하였다.

### 3. 균주 An-21-1 이 생산하는 항생물질의 분리 정제

#### 1) An-21-1 균주의 동정

An-21-1 균주의 동정은 Bergey's manual of system bacter-



iology, Macfaddin의 Biochemical tests for identification of medical bacteria(2nd edition) 및 Cowan and Steel의 Manual for the identification of medical bacteria에 준하여 동정하였다.

## 2) An-21-1 균의 배양

10 ml C-SPY 액체배지가 든 pressure tube에서 37 °C 2일 배양한 An-21-1 배양액을 70 ml 액체배지가 든 10개 vial에 5% 접종하여 같은 조건으로 2일 배양한 것을 종균으로 사용하였다. 이 종배양액을 13L 액체배지가 든 carboy에 5% 균을 접종한 후 37 °C에서 5일간 혐기배양하였다. 배양기간 동안 20시간 간격으로 배양액을 소량 수확하여 시간별, 세포농도, pH 변화 그리고 항균활성역가 변화 정도를 조사하였다. 배양한 배양액을 5,000 rpm에서 15분간 원침하여 상층액을 항생제 분리정제에 사용하였다(Fig. 11).

## 3) An-21-1 균주의 배양액으로 부터 항생물질의 분리 및 정제

배양상등액 13 l를 감압하에 농축하여 1 l로 만들어 동량의 CHCl<sub>3</sub>를 넣어 3회 반복 추출한 후 남아있는 물층에 동량의 butanol를 넣어 3회 반복 추출하여 부탄올 가용분을 얻었다. 부탄올 가용분을 MeOH에 녹여 silica gel에 입힌 후 용매가 완전 제거될 때까지 건조하여 CHCl<sub>3</sub> : MeOH 혼합용매로 silica gel gradient column chromatography를 행하였다. Bioassay를 실시하여 얻어진 활성분획을 모아 2차 silica gel 컬럼 크로마토그래피를 행한 후 한데 모은 활성분획을 polyamide column 크로마토그래피를 실시하였다.

이때 사용한 용매는 물 → 30% MeOH → 60% MeOH 순으로 사용하였으며

각 분획들을 bioassay하여 모은 활성분획을  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} (20:1)$  혼합 용매로 Lobar silica gel 컬럼 크로마토그래피를 행하였다.  $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} (7:1)$ 을 사용한 normal phase  $\text{SiO}_2$  TLC에서  $R_f = 0.46$ 의 단일 spot의 활성분획들을 모아 RPC 18 column으로 HPLC를 수행하여 90% AcCN 용매조건 ( $\text{FR} = 2.0 \text{ ml/min}$ , UV abs, at 220 nm)에서  $R_t = 11.23$ 의 단일 피크를 모아 항생효과를 나타내는 순수물질로 분리하였으며 compound A1이라 하였다.

#### 4) Compound A1의 기기분석

분리 정제된 compound A1을 thermal analysis하여 용융점을 관찰하였으며, KBr disc 법으로 IR spectra를 조사하였다. 소량의 시료를 deuteriated  $\text{CDCl}_3$ 에 녹여 270MHz와 500MHz의  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$  및 DEPT, homo-COSY, hetero-COSY를 조사하였으며 Mass spectrum을 조사하였다.

### 제 3 장 결과 및 고찰

#### 제 1 절 균주 An-12-1 가 생산하는 항생물질의 분리정제

이 균주가 생산하는 항생물질의 분리정제를 위해 기본실험을 수행한 결과, 이 물질은 중성에서 Butanol 층으로 잘 전이되는 비극성 물질임을 알수 있다. 이 사실로부터 이 항생물질을 분리하기 위해서 다음과 같은 분리정제 과정을 수행하였다.

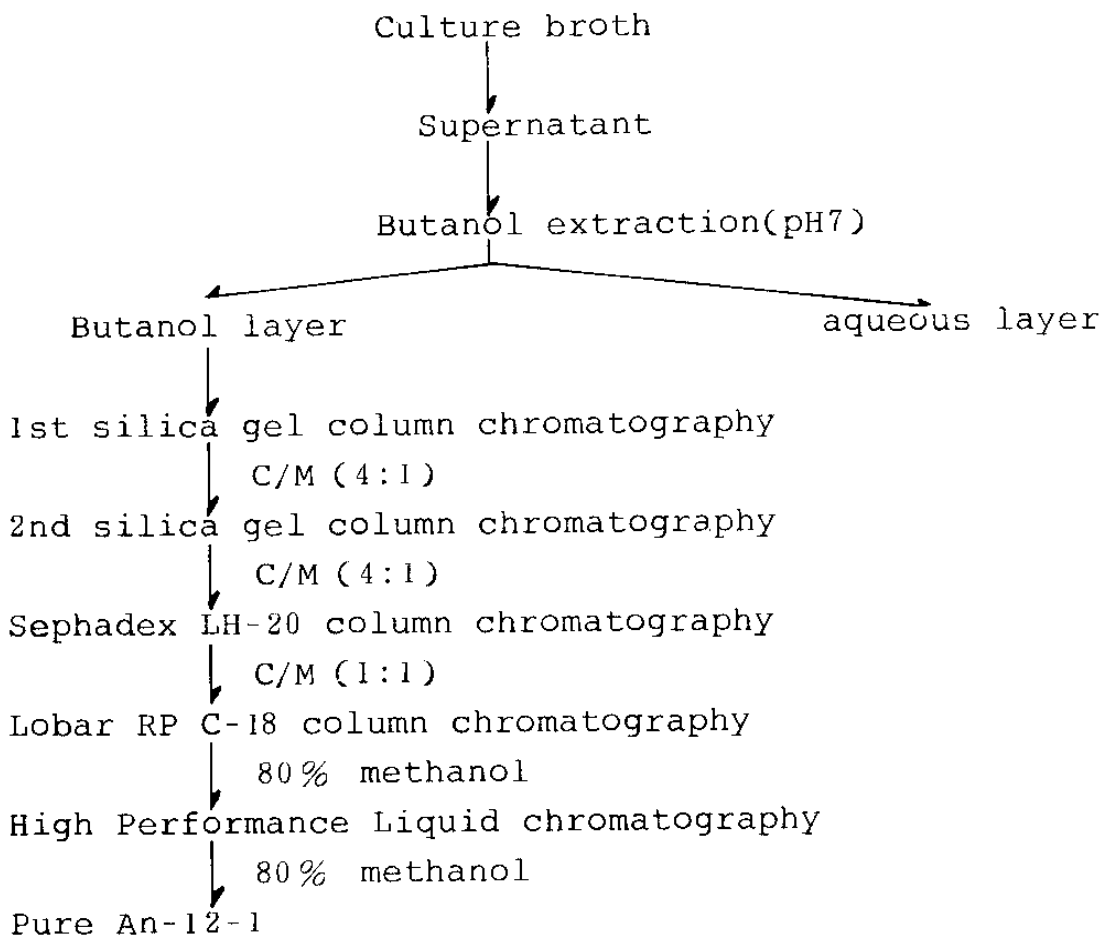


Fig.2 Schematic Presentation of antibiotic purification from strain An-12-1

### 1. An-12-1 균의 배양

이 균은 Gram 양성인 쌍구균이며, 통성 혐기성균이다.

이 균을 호기적 조건과 혐기적 조건에서 배양한 결과를 Fig 3에 나타내었다. 혐기적 조건에서 배양한 경우에, 초기 성장속도가 더 빠르지만, 호기적 배양의 경우보다 생성된 균체량이 훨씬 적었다.

혐기적 조건에서 초기 성장속도가 빠른것은 혐기적 배양으로 키운 균을 종균으로 사용했기 때문이며, 생성 균체량이 적은 것은 에너지 수율이 호기적 경우보다 떨어지기 때문이다.

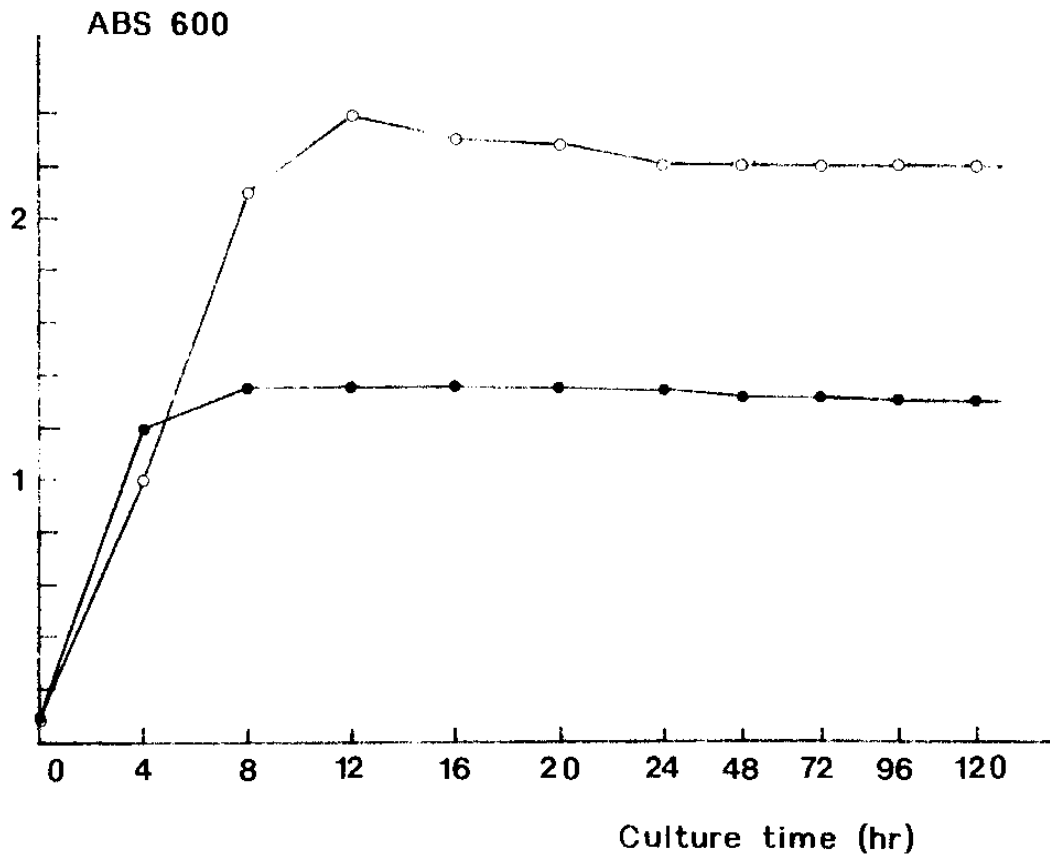


Fig.3 Growth Curve of Strain An-12-1.

—●—●—; anaerobic cultivation

—○—○—; aerobic cultivation

An-12-1 균은 24시간 배양후부터 항생물질을 생산하기 시작하며 48시간 배양후에 항생물질의 양이 최대로 유지된다.

Fig.4 에서 보듯이, 혐기적 배양시에 균체량이 적게 생성됨에도 불구하고 항생물질이 훨씬 많이 생산된다.

이것은 An-12-1 균의 생리대사의 차이에 기인한다고 추정된다.

본 연구에서는 13리터의 C-SPY 배지에 균을 5% 접종한 후 37℃ Water-bath 에서 혐기적으로 배양하였다.

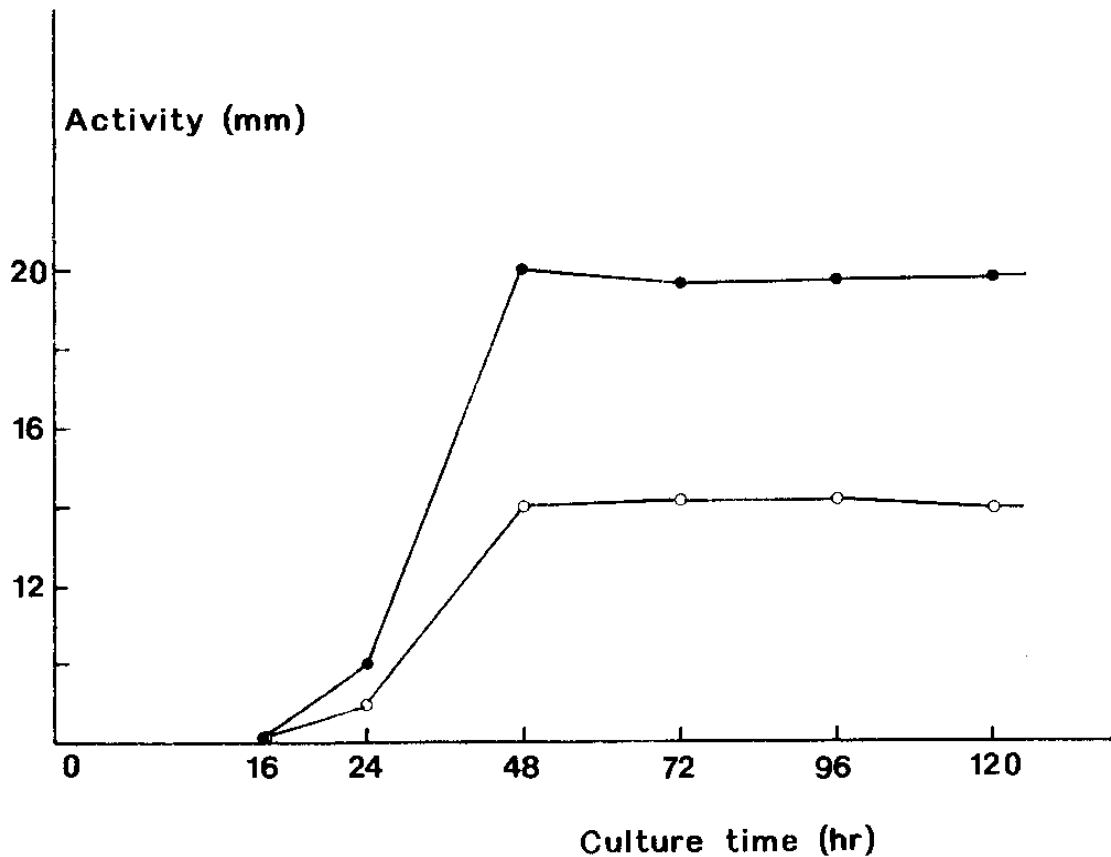


Fig.4 Antibiotic production by An-12-1 strain.

—●—●—; anaerobic cultivation

—○—○—; aerobic cultivation

## 2. Butanol Extraction

An-12-1 균주를 35 °C에서 5일간 혐기적으로 배양한 후, 원심분리해서 (6,000 × g) 상등액만을 모았다.

Rotary evaporator 를 이용해서 13 ℓ 배양상등액을 1 ℓ 로 농축하고, 5N NaOH 를 사용해서 pH를 7로 맞추었다.

동일량의 butanol 을 넣고 충분히 섞고 방치한 후에 butanol 층을 모았다. 이 과정을 세 차례 수행하여 얻은 3 ℓ butanol 층을 다시 감압농축 하였다.

## 3. 1st Silica Gel Column Chromatography

농축된 butanol 추출액에 silica gel powder 를 넣어 추출성분을 silica gel 에 모두 붙이고, silica gel column 의 상단에 가하였다. 분리하고자 하는 항생제보다 비극성 물질들을 제거하기 위해 C/M(9:1) 혼합용매로 column 을 충분히 씻었다.

용매를 C/M(4:1) 로 바꾸어 흘리며 100 ml 씩 분획 채취하였다. 각 분구획구중 *E. coli* BE 에 대해서 활성을 갖는것을 모두 모아 감압농축하였다.

## 4. 2nd Silica Gel Column Chromatography

첫번째 silica gel column 을 통해 모은 활성부위를 다시 C/M(9:1) 혼합용매에 녹이고, 똑같은 방법으로 silica gel column chromatography 를 다시 수행하였다. 이번에는 10 ml 씩 분획 채취하여 활성부위를 모았다.

## 5. Sephadex LH-20 Column Chromatography

항생물질을 분리하기 위해서 이번에는 분자량에 따라 비극성 물질을 분리하는 sephadex LH-20 column chromatography를 수행했다. 두 차례의 silica gel column chromatography를 통해 모은 활성물질을 chloroform-methanol (1:1) 용매에 녹이고, 같은 용매로 chromatography를 수행하였다.

## 6. High Performance Liquid Chromatography

LH20 column에서 얻은 활성물질의 순수 분리정도를 알아보고 그 물질을 분취하기 위해서 HPLC를 수행하였다. LH-20 column으로 정제한 시료에 몇가지 불질이 섞여 있었으나 HPLC로 활성부위를 모은 결과 순수분리되었다.

Photodiode array detector를 장치한 HPLC로 분리함으로써, 항생물질이 순수분리됐음을 확인하였다.

## 7. 발색반응

여러가지 발색시약으로 항생물질 An-12-1의 성질을 조사한 결과 이것은 비펩티드성이며 COOH기를 갖고 있는 것으로 밝혀졌다.

Table 4. Color reaction (An-12-1)

| Reagents                            | Activities       | Result |
|-------------------------------------|------------------|--------|
| 20 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |                  | +      |
| Bromocresol Green                   | acids            | +      |
| Ninhydrin                           | amine            | -      |
| Rhodamin B                          | Fatty acids      | -      |
| Anilinphthalate                     | Reducing sugars  | -      |
| 4-dimethylaminobenzaldehyde         | alkaloids        | -      |
| 2',7' - Dichlorofluorescein         | lipids           | -      |
| Dragendorff's reagent               | alkaloids        | -      |
| Molybdophosphoric acid              | lipids, steroids | -      |

### 8. UV Spectrum

항생제의 특성을 알아보기 위해서 UV Spectrum 을 조사했다.

최대 흡수파장이 208, 223, 275 nm 이었고, 산이나 알카리에서도 Shift 되지 않았다.

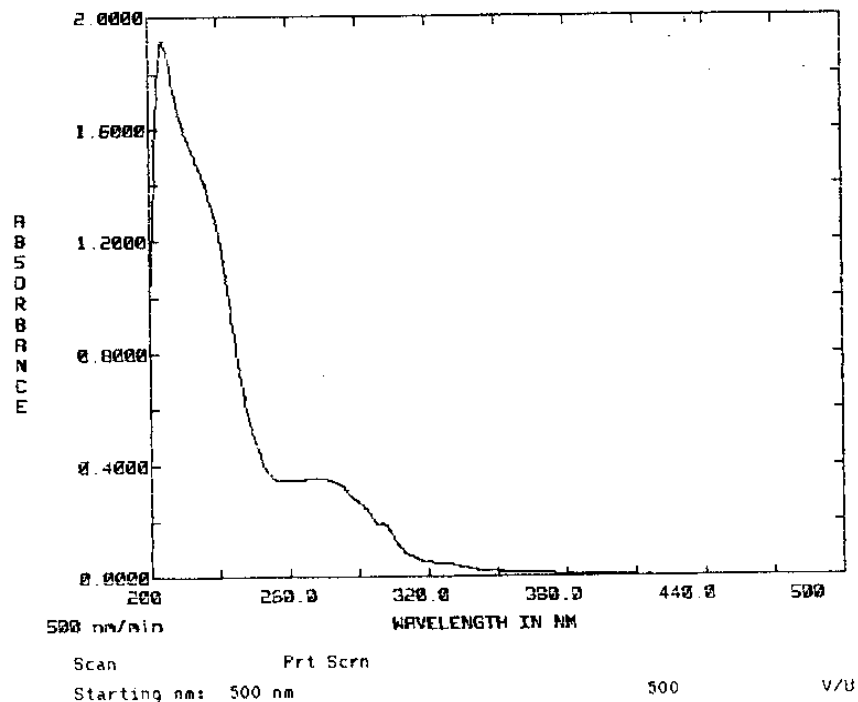


Fig.5 UV Spectrum of Antibiotic An-12-1



## 9. IR Spectrum

항생물질 An-12-1 의 IR Spectrum 을 조사한 결과,  $\text{CH}_3-$ ,  $-\text{CH}_2-$ ,  $\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$  기를 갖고있는 것으로 밝혀졌다. (Fig.6 )

## 10. NMR Spectrum

$^1\text{H}$  NMR과  $^{13}\text{C}$  NMR을 조사한 결과를 Fig.7 과 Fig.8 에 나타내었다. 정확한 구조식을 알 수 없으나, 저분자의 산계통의 물질임을 알 수 있다.

DEPT,  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  COSY 및 Mass Spectrum 을 조사하여 분자구조를 밝히는 연구가 진행되어야 한다.

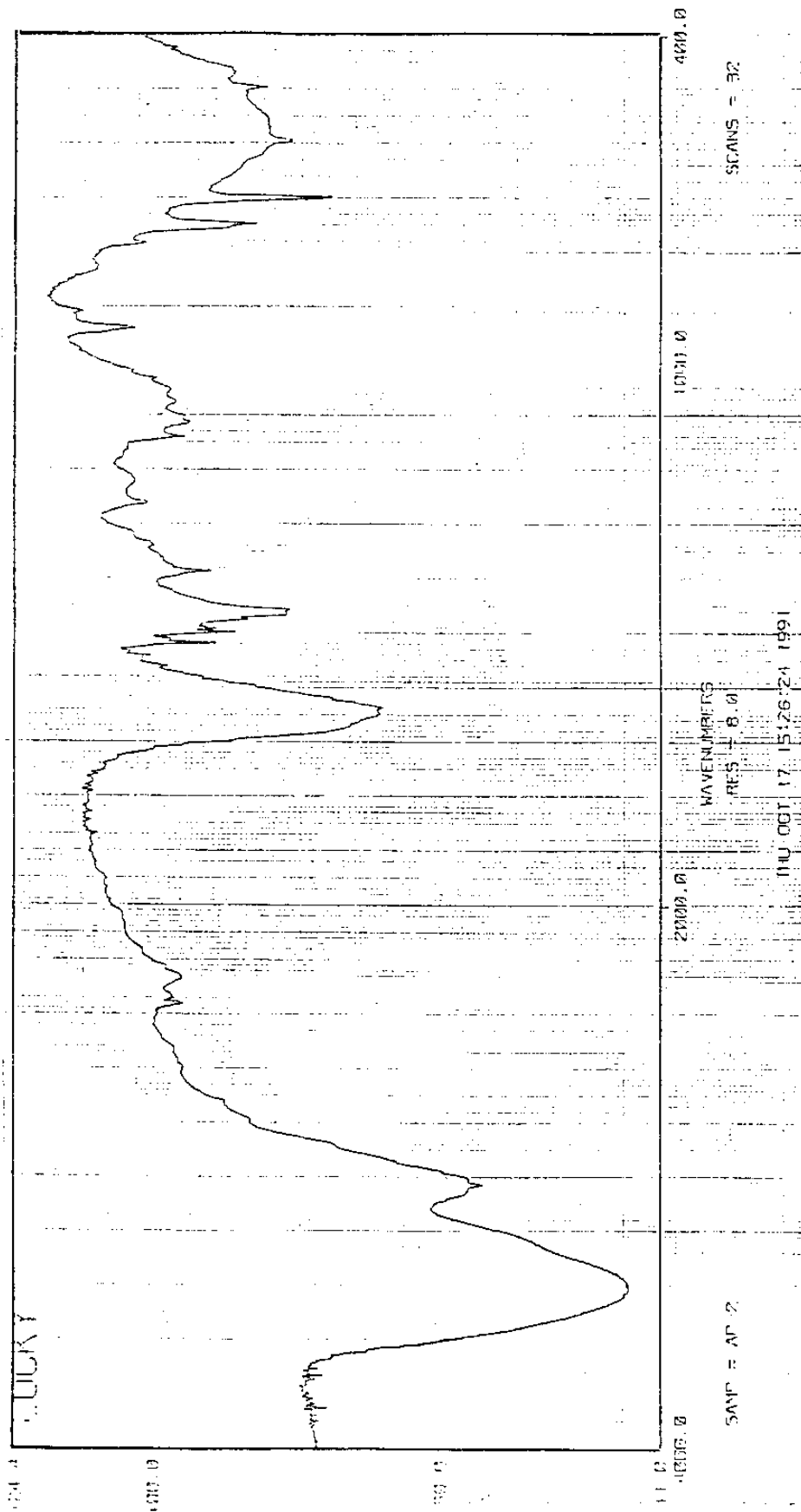


Fig. 6 IR spectrum of antibiotic An-12-1

RIKEN  
 17-FEB-92 20:42:25  
 QFTLE 304  
 CPDNO 24  
 EXMAG 10M  
 112.00 MHz  
 5300.0 Hz  
 32768  
 5405.4 Hz  
 1E  
 3.021 sec  
 3.959 sec  
 4.7 us  
 28.6 C  
 0.00 sec  
 0.10 Hz  
 14  
 OPERATOR :

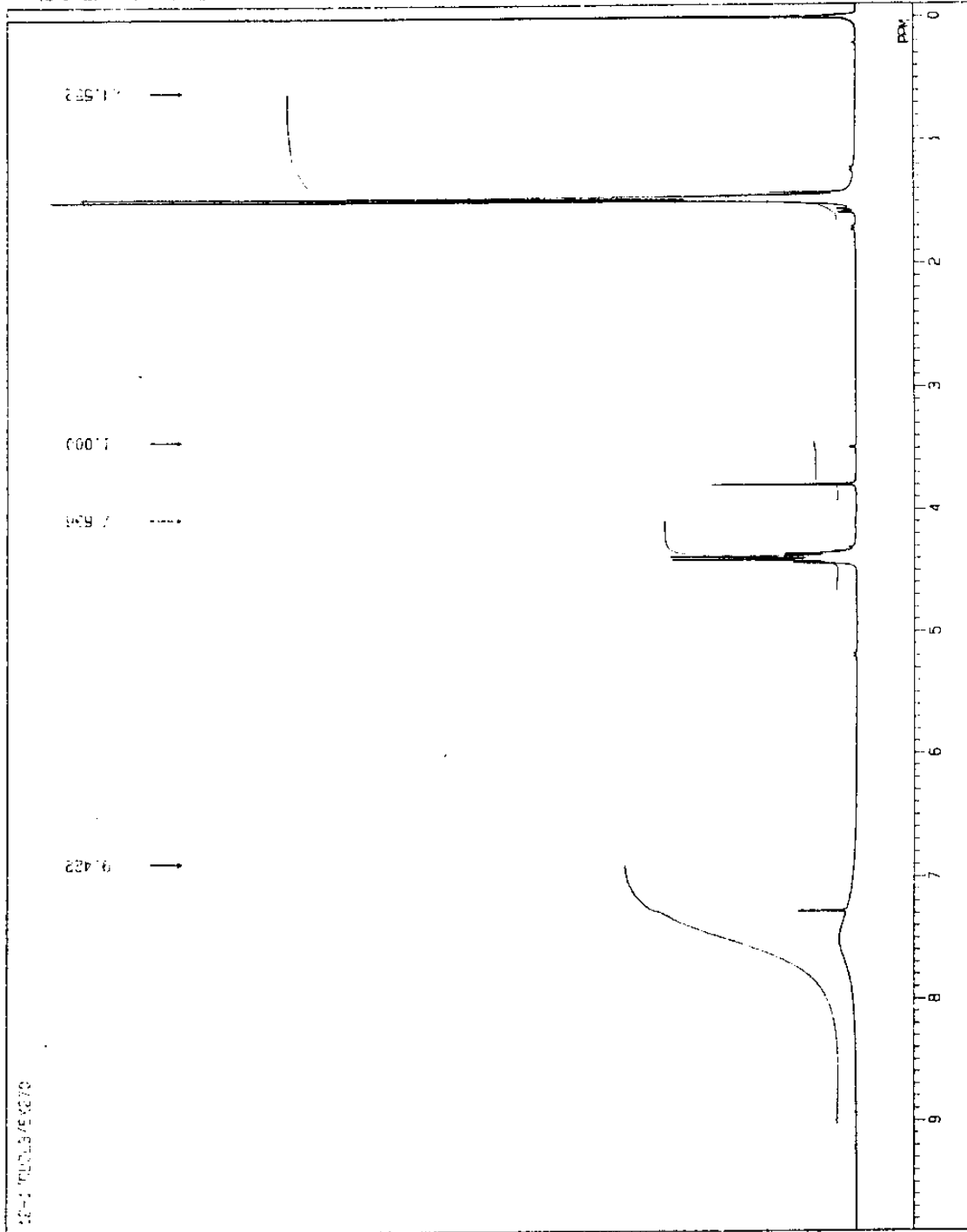


Fig. 7 Proton nuclear magnetic resonance spectrum of antibiotic An-12-1



## 제 2 절 An-21-1 균주가 생산하는 항생물질

### 1. An 21-1 균의 동정

C-SPY agar 배지에 증식된 An-21-1 균의 집락을 취하여 그람 염색을 수행한 결과, 그람 양성 연쇄상구균으로 아포를 형성하지 않으며 운동성이 없는 균으로 밝혀졌다. ( Table 5 ). 전자현미경학적 관찰에서는 직경이 0.9-1.1  $\mu\text{M}$  크기의 coccus로 구성된 비교적 짧은 연쇄상구균으로 2-25 개 cocci로 구성된 것으로 나타났다. ( Fig.9 )

균주에 대한 생화학적 특성은 Table 6, 7과 같은 결과를 얻었다. 이 균은 gelatin에 대한 분해능이 없었고, catalase test는 음성이었으며 생육 최적온도는 37 $^{\circ}\text{C}$  이고 최적 pH는 7.0 이었다.

NaCl이 2-6% 첨가된 배지에서는 정상적으로 증식하였으나 8% 이상 첨가 하였을 때는 증식하지 않았다. 이 균주는 glucose, fructose, lactose, sucrose 등을 잘 분해하였고 zylose, maltose, cellobiose, raffinose, salicin, glycerol에 대한 이용능은 낮았으며, 특히 arabinose, cellulose, rhamnose, sorbitol, trehalose, mannitol은 전혀 이용하지 않았다.

그러므로 본 균주는 Genus *Streptococcus* 중 *Enterococci*에 속하는 *Streptococcus faecium*에 속하는 균주라고 사료되나 더 명확한 분류를 위해 혈청학적 및 핵산 분류학적 시험이 요구된다. 따라서 본 실험에서는 이 균을 *Streptococcus* sp. An-21-1로 명명하였다.

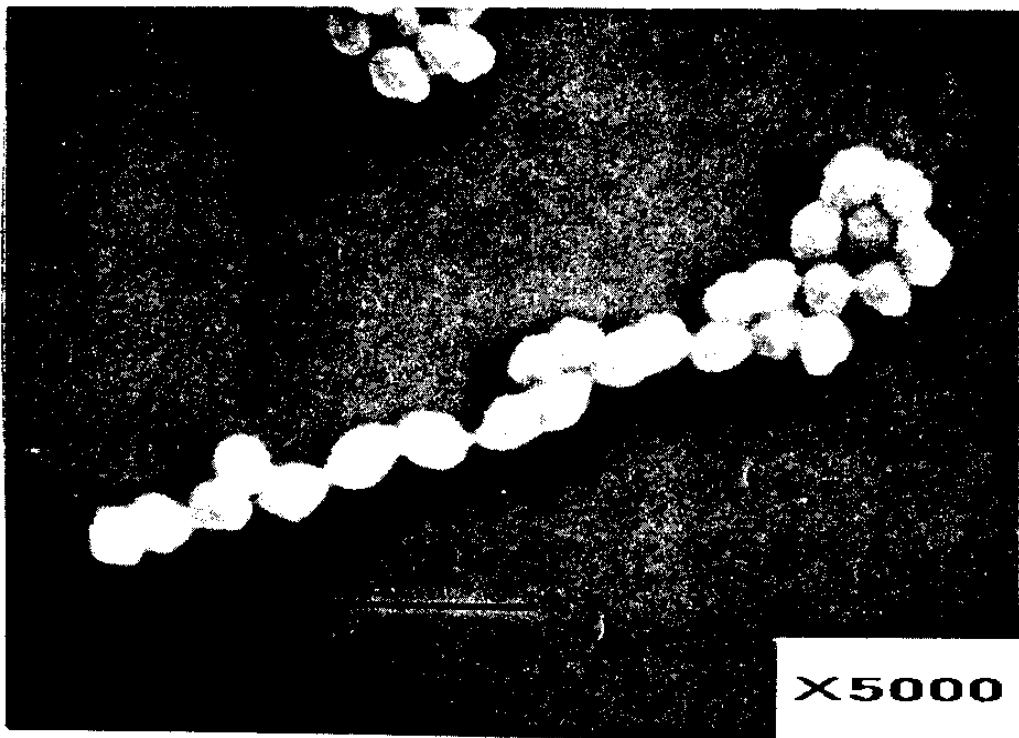
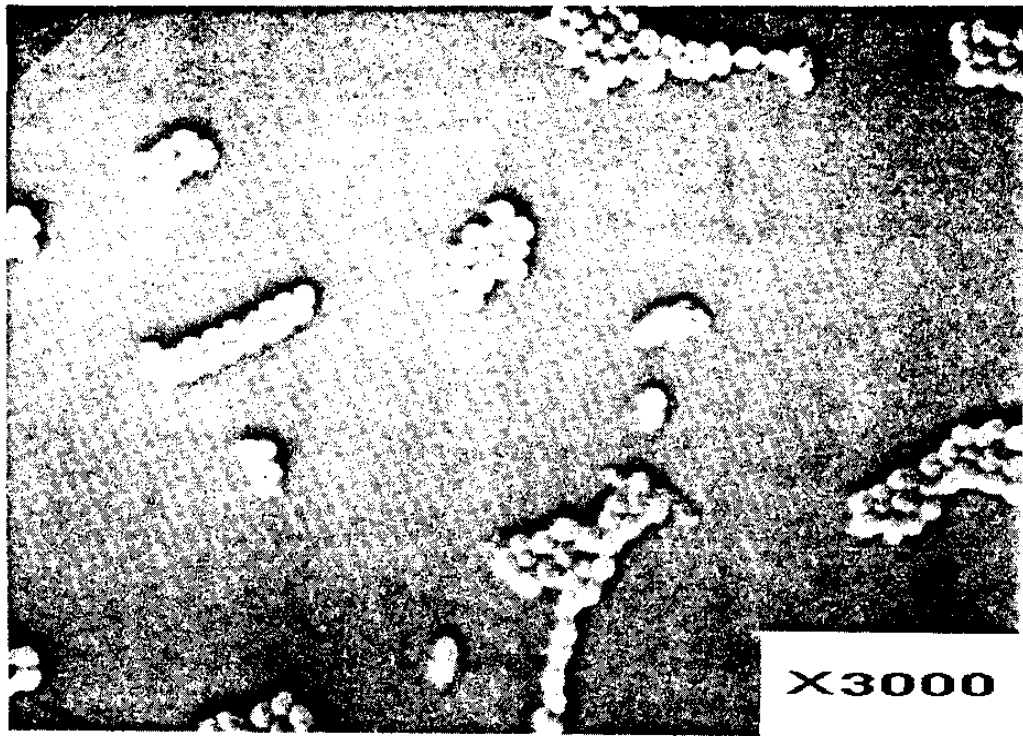


Fig.9 Electron microscope of Strain An-21-1

Table 5. Morphological and cultural characteristics of strain An-21-1

---

|                                      |                       |
|--------------------------------------|-----------------------|
| <u>Morphological characteristics</u> |                       |
| shape :                              | coccus                |
| Gram stain :                         | positive              |
| motility :                           | non - motile          |
| spore :                              | non - spore forming   |
| <u>Cultural characteristics</u>      |                       |
| C-SPY agar plate :                   | good growth           |
|                                      | circular colony form  |
|                                      | white                 |
|                                      | convex colony surface |

---

Table 6. Physiological characteristics of tested strain An-21-1

---

| <u>Factor</u>       | <u>Characteristics</u> |
|---------------------|------------------------|
| Optimum temperature | 37 °C                  |
| Optimum pH          | 7                      |
| Obligate anaerobe   | -                      |
| NaCl tolerance 2%   | +                      |
| 4%                  | +                      |
| 6%                  | +                      |
| 8%                  | +                      |
| MacConkey agar      | -                      |
| O/F test            | F                      |
| Catalase test       | -                      |
| Citrate utilization | -                      |
| Esculin hydrolysis  | +                      |
| Gelatin hydrolysis  | -                      |
| + : Positive        | - : Negative           |

---

Table 7. Carbon utilization of strain An-21-1

| Carbon Source        | Growth |
|----------------------|--------|
| D-Glucose            | ++     |
| D-Fructose           | ++     |
| L-Arabinose          | -      |
| Cellulose            | -      |
| D-Xylose             | +      |
| L-Rhamnose           | -      |
| Lactose              | ++     |
| Sorbitol             | -      |
| Maltose              | +      |
| Cellobiose           | +      |
| Sucrose              | ++     |
| Raffinose            | +      |
| Trehalose            | -      |
| Salicin              | +      |
| Mannitol             | -      |
| Glycerol             | +      |
| Acid production from |        |
| Glycerol             | +      |
| Maltose              | +      |
| Lactose              | +      |
| Mannitol             | -      |
| Raffinose            | +      |
| Salicin              | +      |
| Sucrose              | +      |
| Trehalose            | +      |
| Arabinose            | -      |
| Sorbitol             | -      |
| Glucose              | +      |

++ : utilized    + : very slightly utilized    - : not utilized



## 2. An-21-1 균주의 배양

배양기간 동안의 세포성장, pH 변화, 그리고 항생역가의 변화는 Fig. 10에 나타내었다. 균의 성장은 20 시간까지는 급격히 일어났지만 그 이후로는 사멸기로 들어갔으며, pH는 첫날 4.96으로 떨어진 후 거의 일정하게 유지되었다. 항생물질 생산능은 120 시간에 최대치를 나타내었다. 따라서 이 균주의 항생물질을 효율적으로 얻기 위해서는 배양 실시 5 일째의 배양액을 이용하는 것이 좋은 것으로 나타났다.

## 3. Compound A1의 분리 및 정제

An-21-1 균주의 배양액을 원심분리한 후 얻어진 배양액을 농축하여, Fig. 11과 같이 몇 차례의 컬럼 크로마토그래피를 행한 후 항생효과를 갖는 물질로 compound A1를 분리 및 정제하였다.

compound A1은 UV 흡수가 없는 물질로  $\text{CHCl}_3$  : MeOH (7:1) 용배의  $\text{SiO}_2$  TLC에서 0.46의  $R_f$  값을 나타내며 20% 황산발색을 실시한 결과 노란색을 띠다가 점차로 청록색으로 변화하였으며 anisaldehyde -  $\text{H}_2\text{SO}_4$  발색에서는 보라색을 나타내었다. dragendorff reagent 나 ninhydrin에서는 음성반응을 보였다.

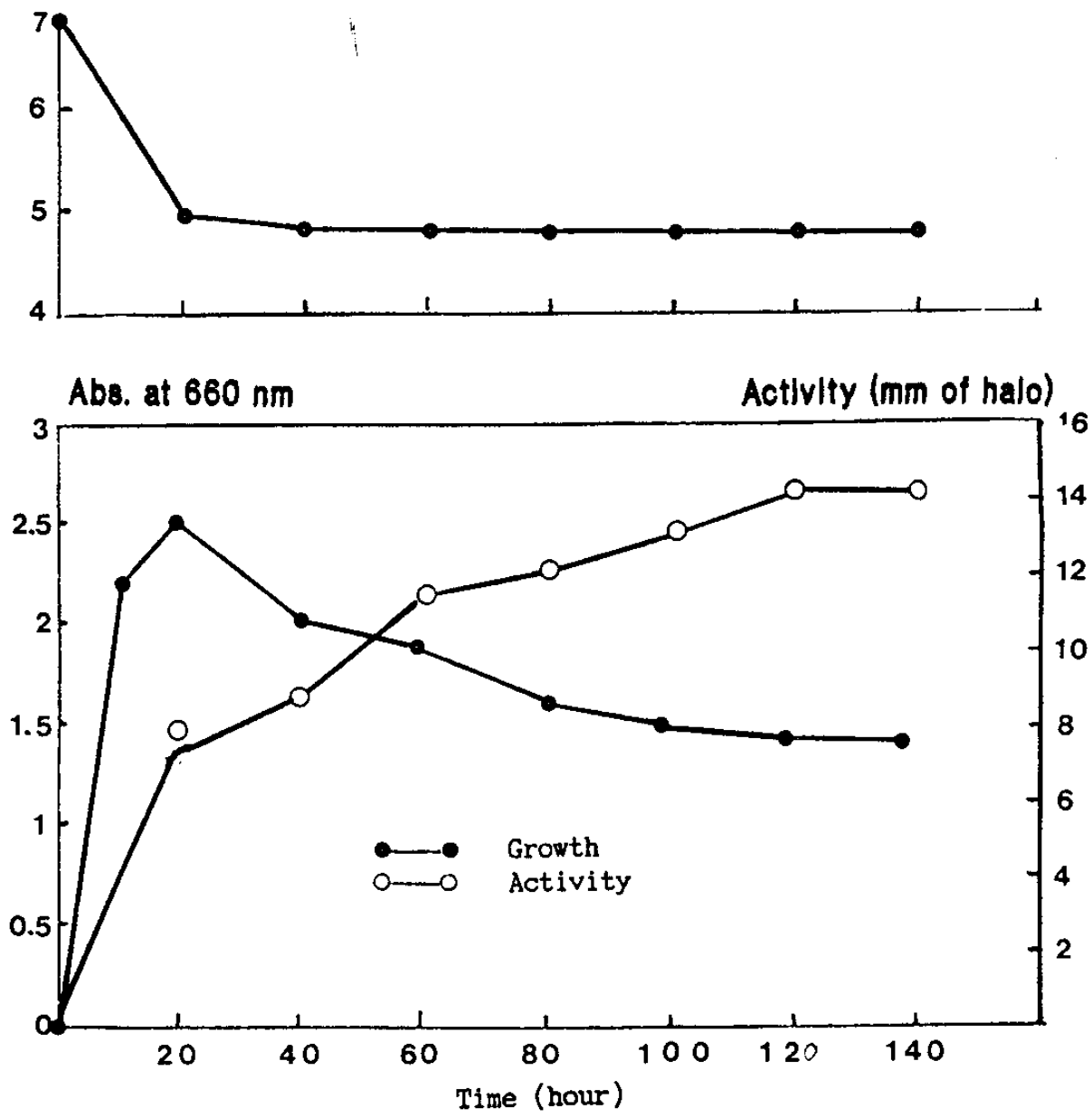


Fig.10 Growth and antibiotic production by strain An-21-1  
 Activity was tested by using *E.coli* BE 1186  
 as test microorganism.



#### 4. Compound A1의 구조결정

An-21-1 균주로부터 항생제 compound A1의 분리는 Fig.11에 나타난 Step에 따라 분리하여 재결정하여 HPLC로 분석한 결과 Fig.12와 같은 단일물질임을 알았다.

항생제의 UV spectrum은 end absorption 하였고 IR spectrum은 Fig.13과 같이 hydroxyl group, carbonyl group을 가짐을 알았고 Fig.14에서와 같이 hydroxy와 methoxy group의 proton이 보이고 1-2.5 ppm 사이의 peak는 전형적인 terpenoid 계통의 물질이 나타내는 peak을 가졌다. Carbon NMR와 DEPT NMR은 Fig.15, Fig.16에 나타나 있는데 174 ppm에 carboxyl의 탄소, 68-73 ppm 사이의 O-methyl의 탄소를 볼 수 있고 DEPT 결과에서 CH<sub>3</sub>가 4개, CH<sub>2</sub>가 9개, CH가 9개, 사급탄소가 2개, C=O가 1개로 나타나서 C<sub>26</sub>H<sub>46</sub>O<sub>6</sub>의 시정식을 보이지만 Fig.17의 MS결과 분자량이 422로 나타나서 C<sub>26</sub>H<sub>46</sub>O<sub>6</sub>에서 CH<sub>3</sub>OH가 분자중간에 contamination된 것으로 판단되어서 최종 시정식도 C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>O<sub>5</sub>로 결정하였고 이를 확인하기 위해서 Fig.18에서와 같이 High resolution mass를 행한 결과 일치됨을 확인했다. 이와같은 시정식으로 Chemical Abstract을 1941년부터 1991년까지 찾아본 368개의 유사물질을 찾을 수가 있고 이중, 3,7,12-trihydroxy-24-cholanic acid methylester와 가장 유사하였다. 이 물질의 구조와 NMR data는 Fig.19에 나타나 있는데 항생제 Compound A1과는 약간 다르고 특히, Fig.20, Fig.21의 H-H cosy와 C-H cosy 결과에서 다른 물질임으로 확인하였고 Fig.22에 용융점도 차이가 남을 알았다. 따라서 항생제 An-21-1은 신규가능성이 매우 높아서 현재 최종적으로 3,7,12-trihydroxy-24-cholanic acid methylester의 진품을 구하여 차이점을 확인후 신물질로 특허를 출원할 계획이다.

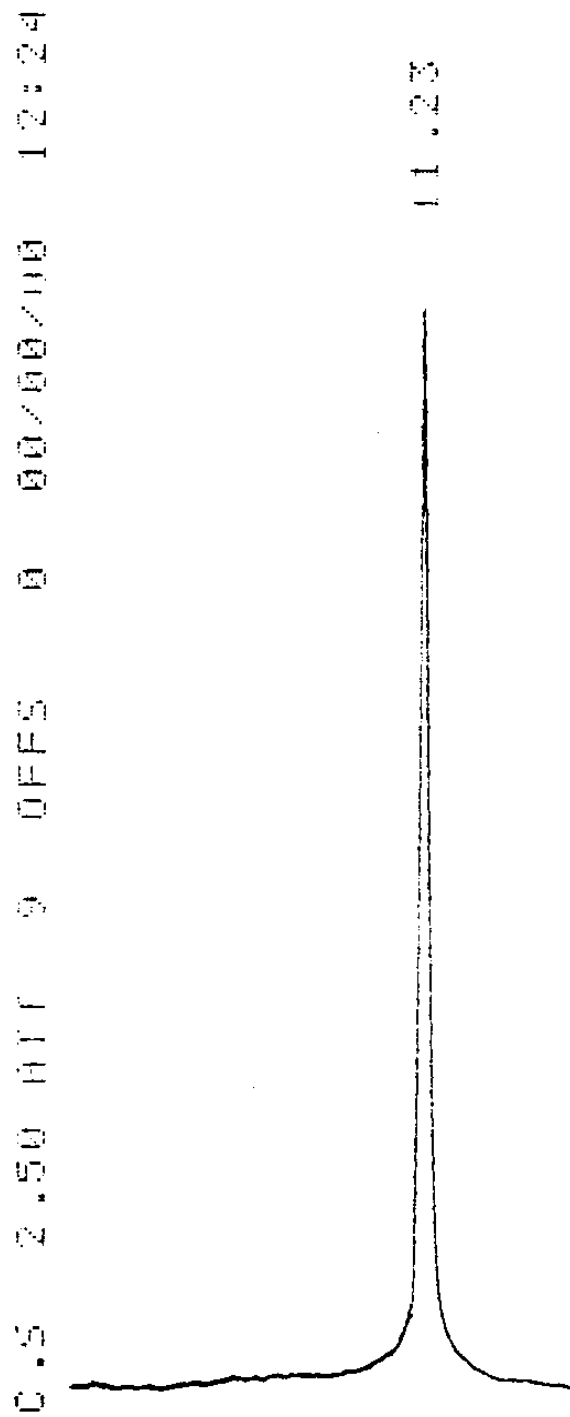


Fig.12 HPLC chromatogram of antibiotic An-21-1 ; column ; ODS  
solvent : 90 % AcCN, Detector : UV 220nm

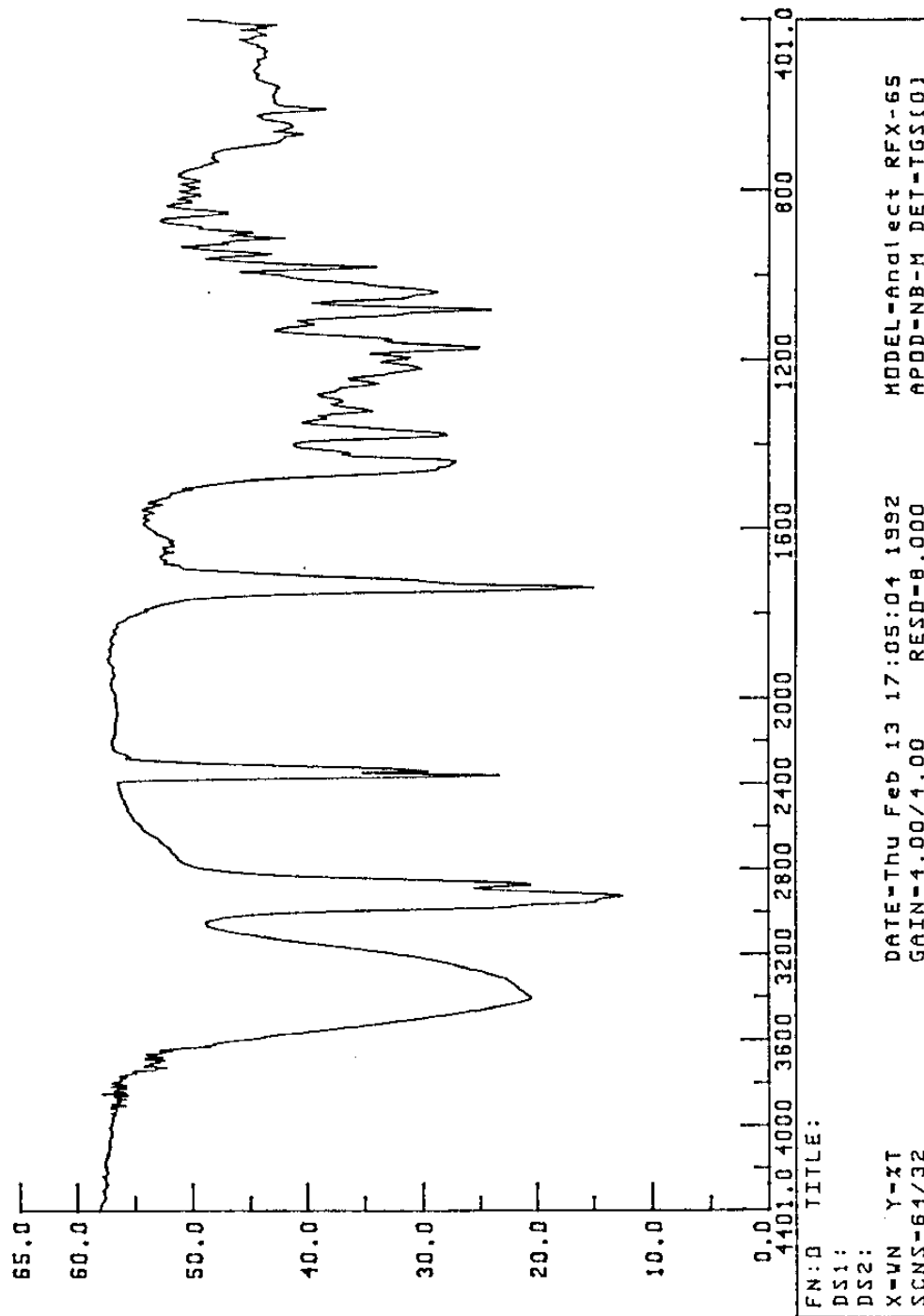


Fig.13 IR spectrum of antibiotic An-2I-1

RIKEN  
 19-FEB-82 08:00:05  
 OFILE 314  
 ORNUC 1H  
 EXMOD RMH  
 OFR 270.05 MHz  
 OBSRT 112.00 MHz  
 OBFIN 500.0 Hz  
 POINT 32768  
 FREQU 5405.4 Hz  
 SCANS 16  
 ACQTM 3.031 sec  
 PD 3.969 sec  
 PM1 4.7 us  
 IPRNUC 1H  
 CTEMP 20.4 C  
 SLVNT CDCL3  
 EXREF 0.00 ppm  
 BF 0.16 Hz  
 RGAIN 17  
 OPERATOR :

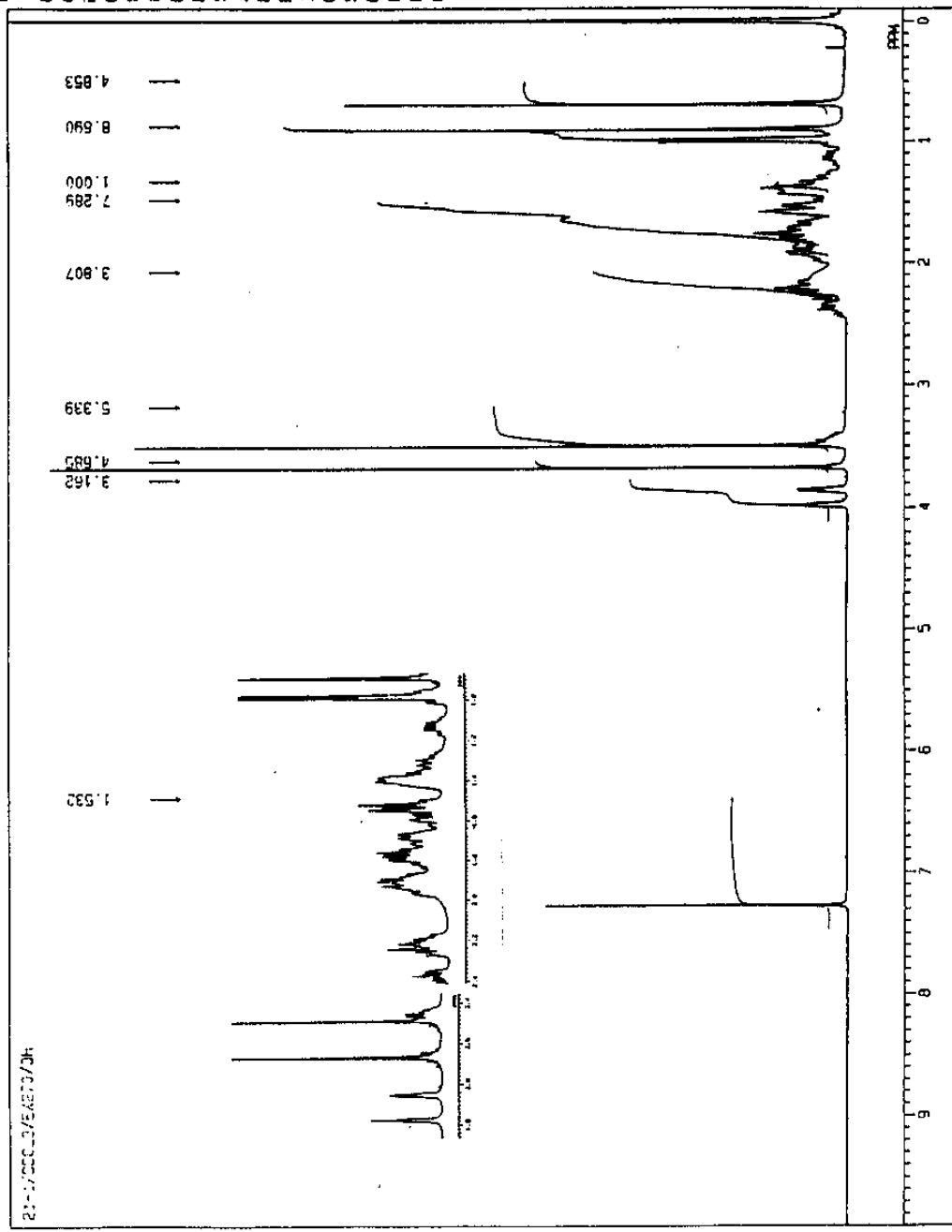


Fig.14 Proton nuclear magnetic resonance spectrum of antibiotic An-21-1

19-725-02 09:14:01  
 OFILE 0150  
 OBNUC 13C  
 EXMOD BCM  
 OFR 67.80 MHz  
 OBSET 135.00 kHz  
 OBFIN 5000.0 Hz  
 POINT 32755  
 FREQU 20000.0 Hz  
 SCANS 14563  
 ACQTM 0.819 sec  
 PD 2.181 sec  
 PH1 3.3 us  
 IRNUC 1H  
 CTEMP 21.4 C  
 SLYNT COCL3  
 EXREF 0.00 ppm  
 BF 0.16 Hz  
 RBAIN 26  
 OPERATOR :

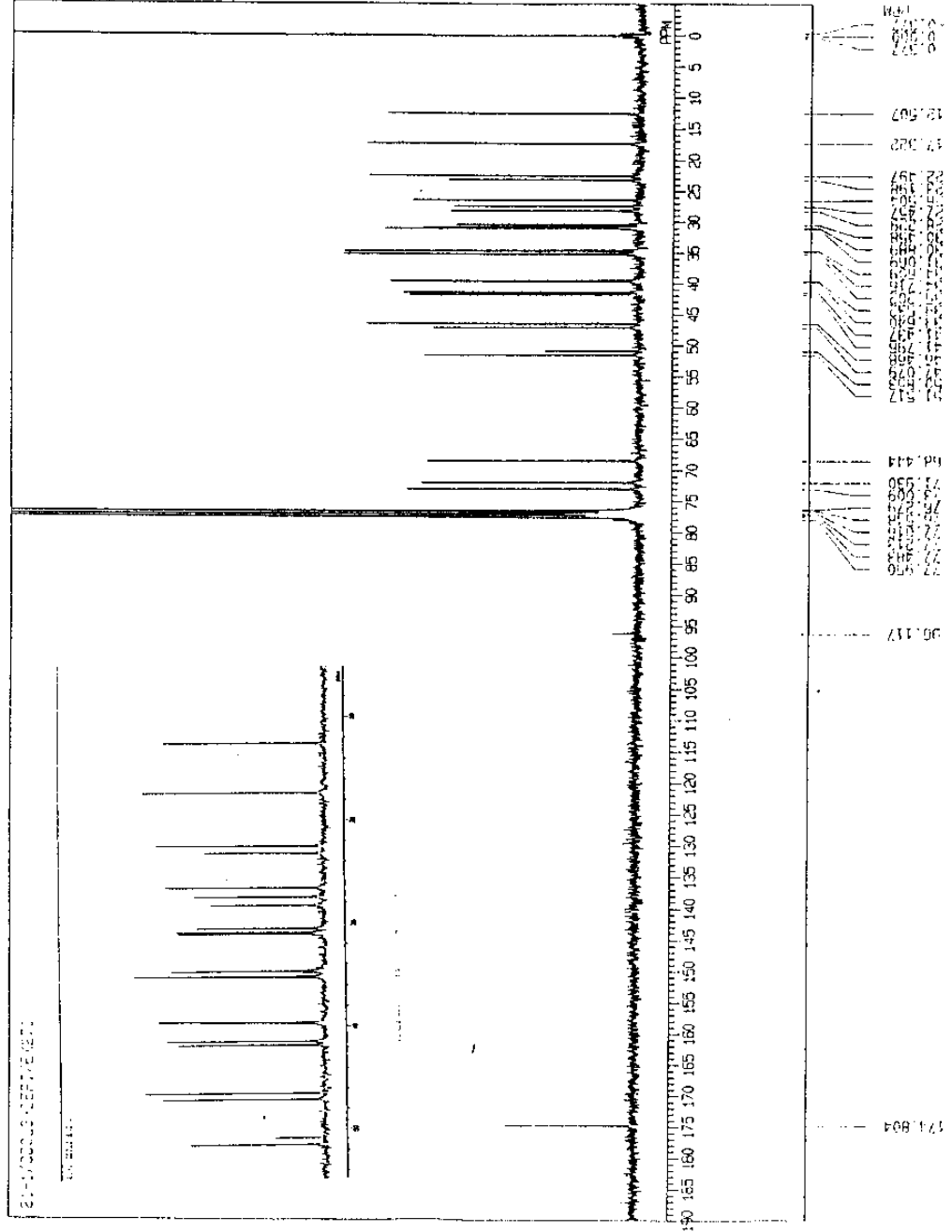


Fig.15 Carbon nuclear magnetic resonance spectrum of  
 antibiotic An-21-I



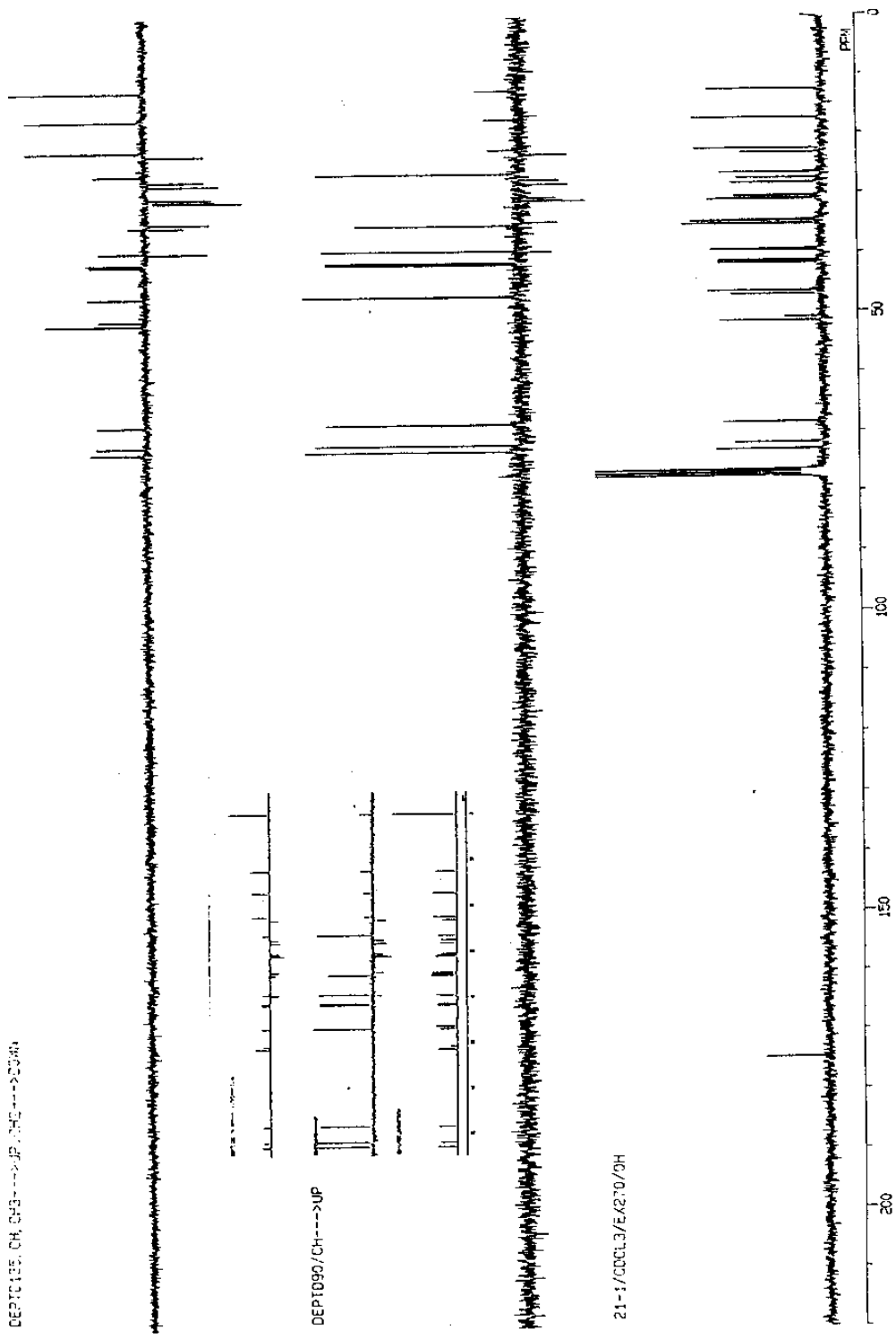
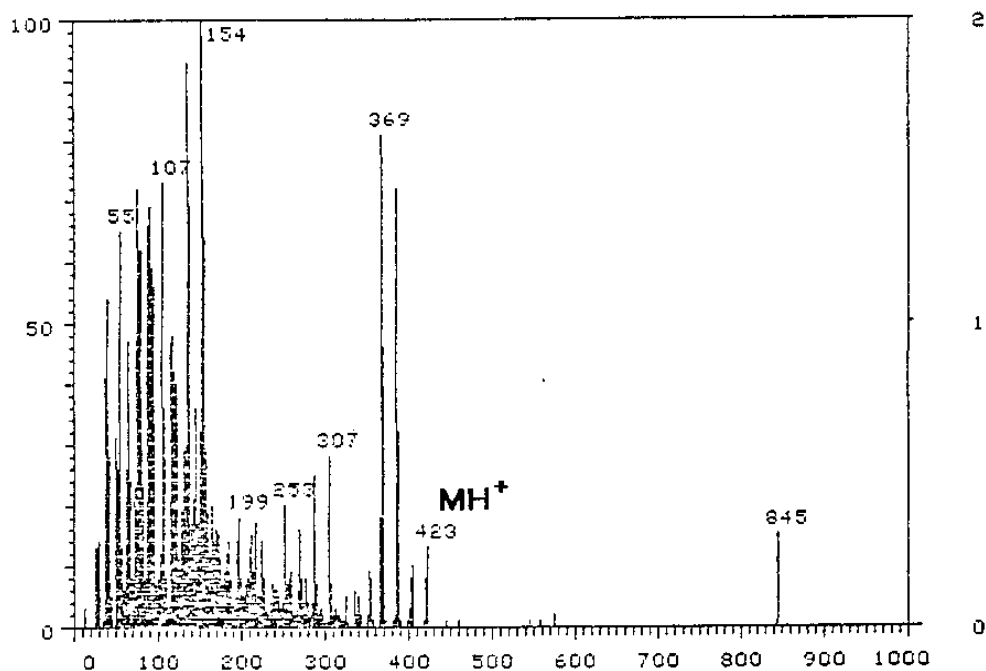


Fig.16 DEPT spectrum of antibiotic An-21-1

21-1(NBA)  
SAMPLE NO. : 186 SCAN NO. : 1\*20 RT(MIN.): 0.0



21-1 +NaCl(NBA)  
SAMPLE NO. : 187 SCAN NO. : 1\*16 RT(MIN.): 0.0

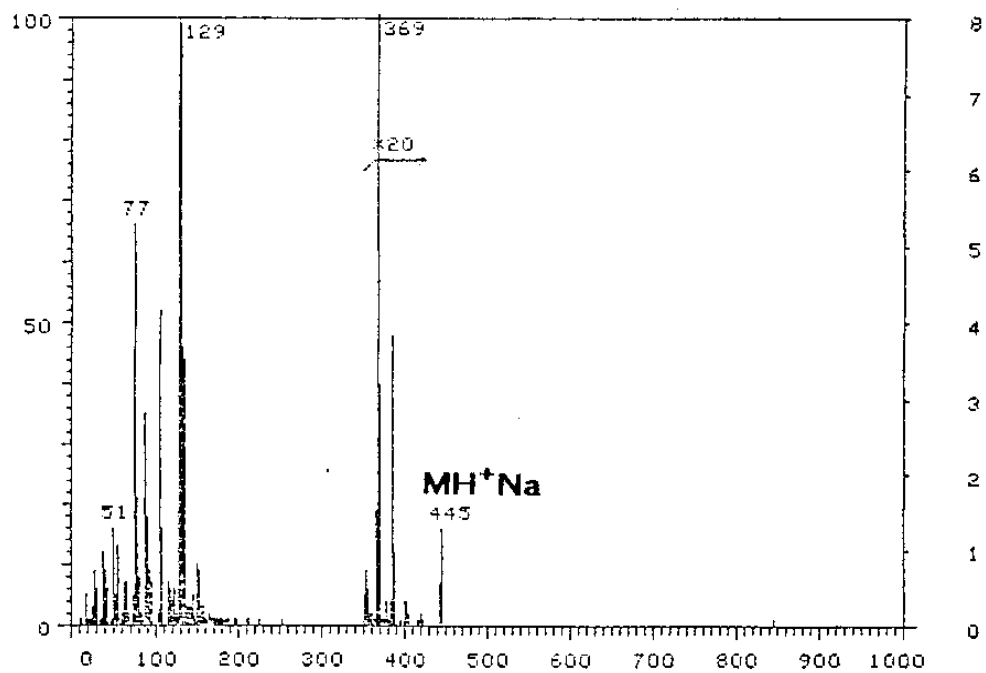


Fig.17 Selected ion mass spectrum of antibiotic An-21-1

[ Theoretical Ion Distribution ]  
 Molecular Formula : C25 H43 O5  
 (M/Z 423.3110, MR 423.6134, U.S. 4.5)  
 Base Peak : 423.3111, Averaged MW : 423.6154(al), 423.6162(w)

[ Elemental Composition ]  
 Data : oh1  
 Elements : C 60/5, C\* 0/0, H 90/0, O 12/0  
 Mass Window : 10 ppm ( 5 - 20 ppm)  
 Unsaturation : 0.0 - 10.0  
 M/Z INT. Error(mmu) [ppm] U.S. Composition  
 845.6142 94.7 -0.1 8.5 C50H95O10

[ MASS SPECTRUM ]

Data : oh1  
 Sample : 21-1.nba.psg  
 Mode : EF-FAB [Pos.]  
 R.T. : 4.803  
 Scan# : 13  
 B.P. : M/Z = 845.3948 Int. = 60.41  
 DI(Deg.C) : 0.0

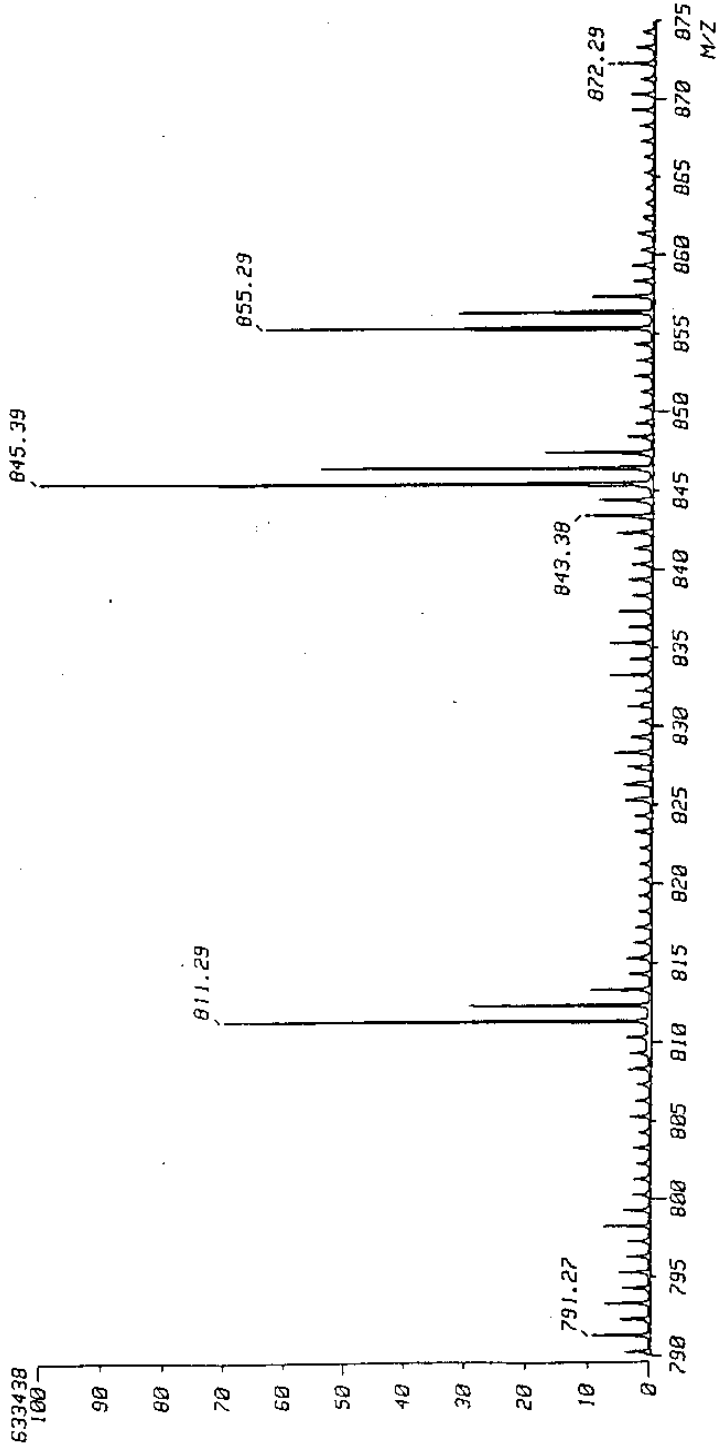
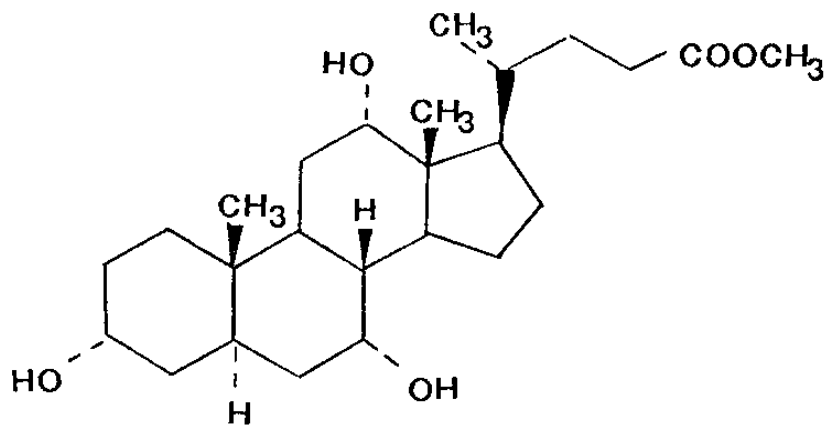


Fig.18 High resolution mass spectrum of antibiotic An-2I-1



### 3,7,12-Trihydroxy-24-cholanic acid methylester

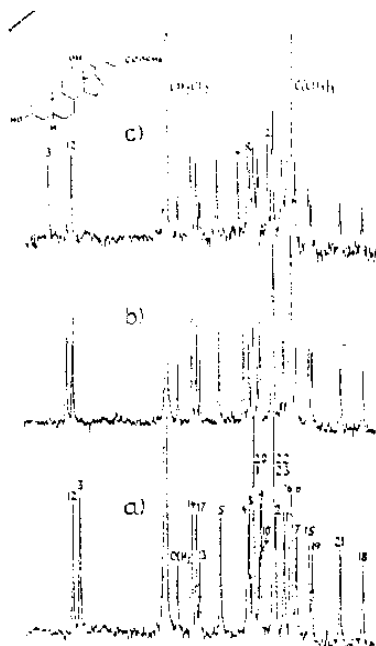


Figure 1. Changes in the  $^{13}\text{C}$  spectrum at 15.09 MHz of methyl cholate (2a) in methylene chloride on addition of successive increments of  $\text{Eu}(\text{dpm})_3$ . The highest concentration of  $\text{Eu}(\text{dpm})_3$  is for c with 0.2 mol equiv of chelate/mol of 2a; a contains no chelate.

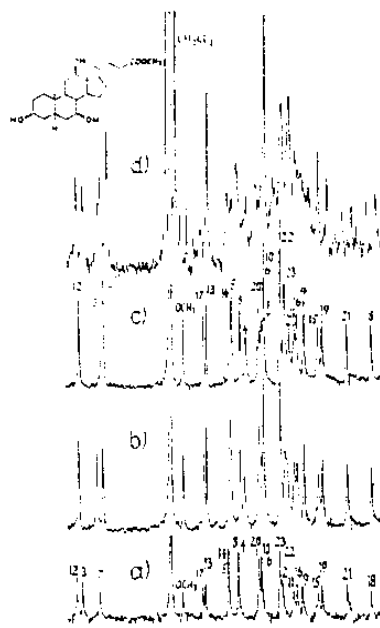


Figure 2. Changes in the  $^{13}\text{C}$  spectrum at 15.09 MHz of methyl cholate (4a) in methylene chloride on addition of successive increments of  $\text{Pr}(\text{fod})_3$ . The highest concentration of  $\text{Pr}(\text{fod})_3$  is for d with 0.2 mol equiv of chelate/mol of 4a; a contains no chelate.

Fig.19 Molecular structure and NMR spectrum of 3,7,12-trihydroxy-24-cholanic acid methylester

```

48 Mac64 10 11.17
*****
A HINDOMU KLKLEVC
*****
NAME:
P1 9.2 UF
P2 9.2 UF
P3 20.0 UF
P4 0.400 MS
P5 1.000 MS
P6 150.000 MS
LOGG1
PULSE 1224
PRCG 2500.00
SCANS 5
DUMMY 4
ACQTM 0.2005 SEC
PD 4.500 SEC
RGAIN 20
NSAIN 13
TEMP 40.0 C
IRSET 152.00 KHZ
IRFIN 10157.0 HZ
IRATH 511
IRRFW 50.0
GENT 512
C-FREQ 2500.0 HZ
SB 0.000 HZ
PC 0.000 HZ
RF 0.000 HZ
CWS 0.000 HZ
DWP 0.000 HZ
IH 70.00000
SLVNT CDCL3
LKLEV 16F
RGAIN 25
LKSIG 2575
OPERATE

```

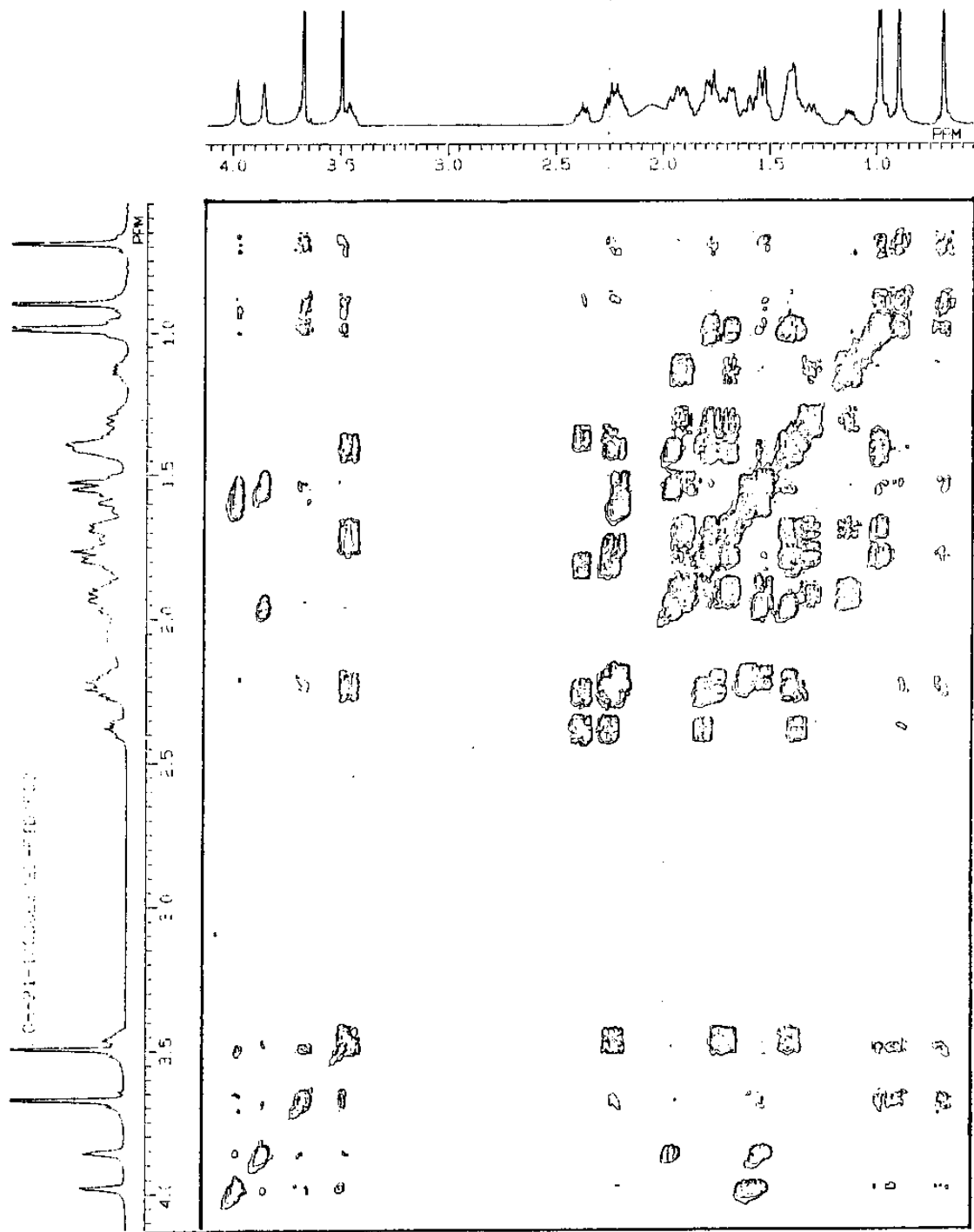
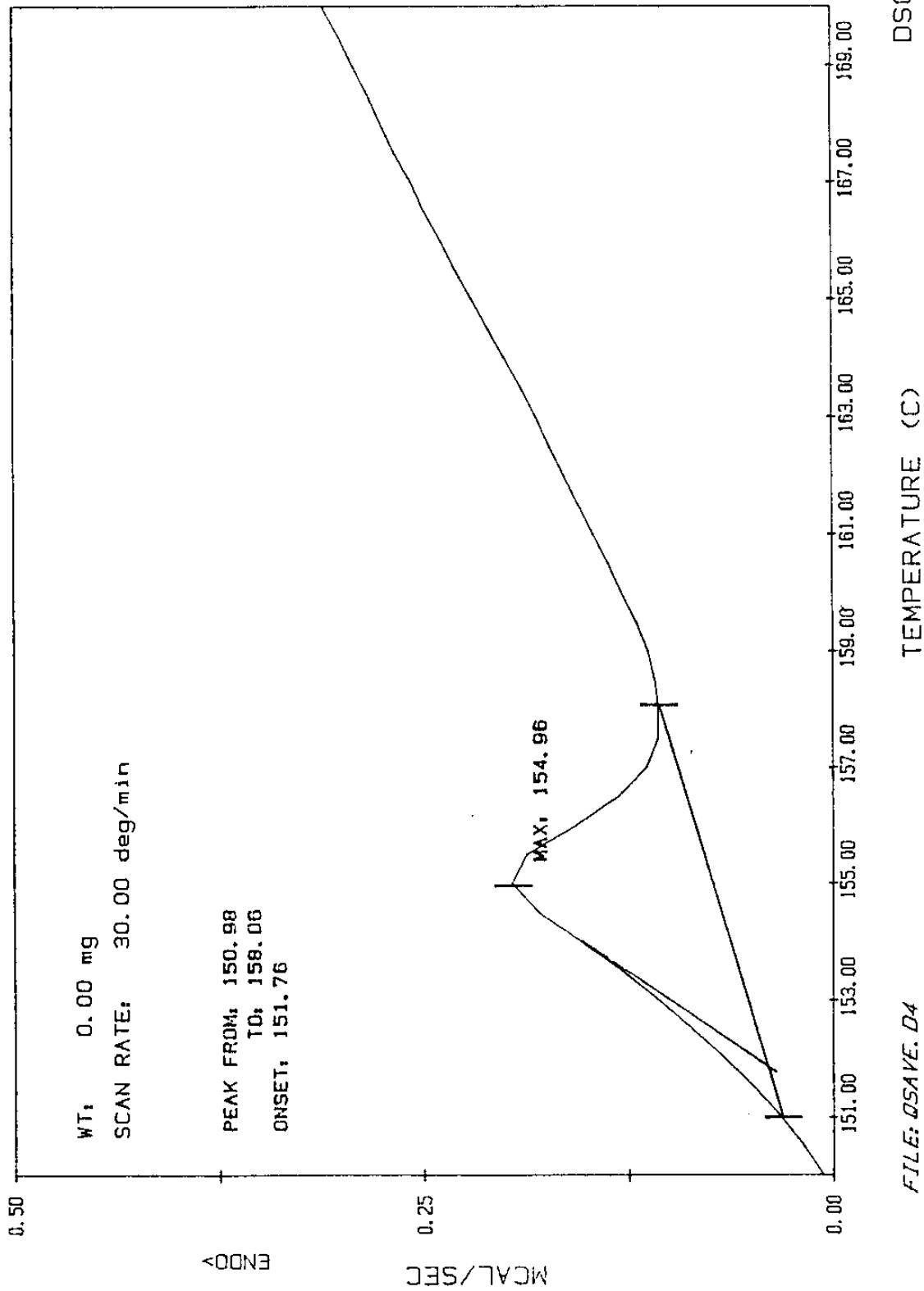


Fig.20 H-H cosy spectrum of antibiotic An-21-1





FILE: QSAVE.D4

DATE: 92/03/21 TIME: 10:13

PERKIN-ELMER Thermal Analysis

Fig.22 Differential scanning calorimetry chromatogram of antibiotic An-2I-1

## 참 고 문 헌

- (1) Lancini,G.and Parenti,F.,1982. "Antibiotics" Springerv-  
erlag.
- (2) Aszalos,A., 1986. "Modern Analys of Antibiotics" Dekker
- (3) Bycroft,B.W., 1988. "Dictionary of Antibiotics and Rel-  
ated Substances" Chapman and Hall.
- (4) Demain,A.L., 1981. Science 214:987-995
- (5) Lee,S.G.et al., 1975. J. Cell Biol. 66:233-242
- (6) Martin,J.F., and Demain,A.L., 1987. "The filamentous f-  
ungi, Developmental Biology" Vol.3 (J.E.Smith and D.R.  
Berry. Eds)
- (7) Wells,J.S. et al., 1982. J. Antibiot. 35:184-188.
- (8) Wells,J.S. et al., 1982. J. Antibiot. 35:295-299.
- (9) Wells,J.S. et al., 1982. J. Antibiot. 35:300-305.
- (10) Singh,P.D. et al., 1984. J. Antibiot. 37:773-780.
- (11) Meyers,E. et al., 1985. J. Antibiot. 38:1642-1648.
- (12) Kunze,B. et al., 1985. J. Antibiot. 38:1649-1654.
- (13) Hurst,A., 1981. "Advances in applied Microbiology" (D.  
Perlman,ed.) Academic Press, New York, U.S.A.
- (14) Clarke,D.J. et al., 1976. J. Gen.Microbiol. 95:67-77
- (15) Hongo,M. et al., 1968. Agr.Biol.Chem. 32:27-33.
- (16) Hongo,M. et al., 1968. Agr.Biol.Chem. 32:703-780.
- (17) Mahony,D.E. et al., 1971. Can.J.Microbiol. 17:1-16
- (18) Hauschild,A.W.. 1973. Can.J.Microbiol. 19:881-885.



## 주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.