碩士學位論文

토양에서 분리된 *Streptomyces* sp. BL93이 생산하는 항세균성 물질

濟州大學校 大學院

食品工學科

吳 炫 娅

1997年 12月

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

An Antibacterial Compound Produced by *Streptomyces* sp. BL93 Isolated from Soil

Hyun-Jeong Oh
(Supervised by professor Young-Hwan Ko)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF ENGINEERING

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND
ENGINEERING GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1997. 12

토양에서 분리된 *Streptomyces* sp. BL93이 생산하는 항세균성 물질

地道敎授 高 榮 煥

吳 炫 娅

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

1997年 12月

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

吳炫娅의 工學碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 金 洙 賢 ㊞

委 員 高 榮 煥 ㊞

委 員 任 尙 彬 ㊞

濟州大學校 大學院

1997年 12月

목 차

Abstract ·····1

I. 서 론·····3

II. 재료 및 방법

1. 재 료 ·····8

2. 실험방법·····15

1) 방선균의 선별 ····· 15

2) 방선균의 동정 ····· 15

3) ISP 분류 기준에 의한 항생물질 생산균주의 동정 ····· 15

4) 화학적 분석 방법 ·····18

5) 항균활성 검정 ····· 18

6) 항생물질의 생산 및 분리 정제 ·····20

7) 항생물질의 특성 및 분석 ····· 21

제주대학교 중앙도서관

III. 결과 및 고찰

1. 항세균성 물질 생산균의 선별 23

2. 분리 균주의 항균활성 23

3. 항생물질 생산 균주 9-3의 동정 28

4. Jar fermenter 배양 34

5. 항생물질의 특성 및 분리 정제.....35

IV. 요 약 45

참고문헌 46

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Abstract

Actinomycetes have been known to be useful target microorganisms for screening of biologically active compounds. Three hundred and seven isolates of Actinomycetes were obtained from soil samples of Cheju Is. Three percents among those isolates showed antibacterial activity. One of them, isolate BL93, showed relatively strong activity against *Escherichia coli 8749, Staphylococcus aureus 6538,* and *Pseudomonas solanacearum 10692.* The isolate BL93 was identified tentatively to be *Streptomyces* species based upon physiological and morphological characteristics. Arginine-glycerol salt(AGS) medium containing 20% soil extract was used for the production of antibiotics by the isolate BL93. After growth for 9 days at pH 4.5 and 28℃ in jar fermenter, antibiotic concentration reached to the maximum. The culture broth was centrifuged and filtered with 0.2 μm syringe filter for the purification of antimicrobial compounds. The cell-free culture filtrate was concentrated by vacuum evaporation and then passed through cation exchange resin column. The resin-binding fraction had antibacterial activity. The active fractions were reconcentrated and loaded on ultragel permeation column for desalting. The active compound was fairly soluble in methanol, ethanol and acetone, but insoluble in hexane. The UV absorption

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

spectrum showed peaks at 296nm. The antibiotics did not lose activity even after heating at 100℃ for 30min and was stable in acidic and neutral pH solution.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

I. 서 론

방선균에 관한 연구는 1875년에 Ferdinand Cohn이 사람의 눈물에서 *Streptothrix foesteri*라는 방선균을 처음 발견함으로써 시작되었다. 1914년에 이르러서는 A. Krainsky가 토양 미생물로서 *Actinomyces griseus*에 관한 연구 결과를 최초로 보고함으로써 토양 중에도 방선균이 널리 분포하고 있다는 사실이 알려지기 시작하였다.

일반적으로 항생물질은 Tyndall에 의해서 미생물 상호간의 길항작용이 관찰된 후 1929년 Fleming에 의해 발견된 penicillin을 시초로 하여 Waksman과 Woodruff(1940)가 *Streptomyces antibioticus*에서 actinomycin을 분리하고, Schatz 와 Waksman(1944)이 *Streptomyces griseus*에서 streptomycin을 분리하여 폐결핵의 치료약으로 사용하면서 *Streptomyces*속을 포함한 방선균류(Actinomycetes)는 항생물질의 생산균으로서 산업적으로나 의학적으로 중요한 미생물로 다루어지게 되었다. 즉, Streptomycin이 발견된 이후 많은 연구자들에 의해 방선균을 항생물질 생산균주의 대상으로서 연구를 하기에 이르렀고, 그 결과 많은 새로운 항생물질이 발견되었으며, 동시에 방선균 분류학 등의 연구 분야도 많은 발전을 가져왔다. 그 후 방선균으로부터 항생물질 외에 여러 가지 생리활성 물질들이 계속 분리되면서(Parry 와 Li, 1997 ; 박, 1992 ; 이 등, 1995 ; 문 등, 1995 ; 류 등, 1995)방선균에 대한 새로운 항생물질 탐색이 진전되고 있으며, 최근에는 재조합을 이용한 항생제 생산에 연구도 이루어지고 있는 실정이다(Diez 등, 1997).

한편, 방선균은 형태적으로 곰팡이처럼 균사상으로 생육하는 특성을 지니고 있으나 그람양성 세균이며 Actinomycetales order에 속하는 원핵

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

미생물이다(김, 1997 ; 홍, 1995). 곰팡이와 유사한 균사를 형성하므로 과거에는 곰팡이로 분류된 적도 있다. 1970년대에 이르러서는 생리생화학적인 분석방법의 발전으로, 세포내의 GC함량이 높고 분화하는 성질을 가진 원핵미생물로 인식되고 있다.

1960년대 이전의 방선균에 대한 연구는 *Streptomyces*가 주 대상이었으며 종명을 결정하는데 있어서 형태적 특징이 중요시 되었었다. 그러나 이 시기에는 신물질을 생산하는 방선균은 신종 균주로 보고되는 혼란한 시기였으므로 Gottlieb와 Shirling(1966)의 주도하여 International Streptomyces Project(ISP)를 수행하면서 국제적인 조정 작업이 이루어졌다. 그 후 *Micromonospora*속 방선균으로부터 gentamycin이 발견되면서 *Streptomyces*이외의 소위 희소방선균이 주 연구 대상으로 부각되기 시작하였다. 그래서 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(Williams 등, 1989)에는 40종의 희소 방선균 속이 기재되었다. 그 후 이를 보강 체계화하여 1994년판 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(Williams 등, 1994)는 방선균을 8개 그룹으로 나누어 분류 보고하고 있다. 이는 균사, conidia, sporangia 등의 형태적 특징과 세포벽의 화학성분 등을 중심으로 분류하고 있다.

제주대학교 중앙도서관

방선균의 분리는 일반적으로 ISP에 의한 방법(Shirling, 1966)을 이용하여 배양학적 특성에 있어서 기균사의 색깔, 배면의 색깔, 수용성 색소 등, 형태적 특징으로 포자 사슬형태, 포자 표면 특성 등 형태적 특징을 관찰 비교하고 그 외에 여러 가지 당이용성을 근거로 분류하였다. 방선균을 분리하는데 있어서 세포벽의 구성당과 amino acid 분석 결과는 방선균의 분류 체계를 재 평가하는 계기를 마련하였다(Schleifer, 1977). Lechevalier(1970), Keddie, Bousfield는 세포벽 가수분해물에서

diaminopomelic acid(DAP)와 당을 분석하여 4가지의 wall chemotype으로 분리하였다. Wall chemotype I은 DAP가 LL-form이며 당이 없는 경우이고, Wall chemotype II은 meso DAP이면서 당은 arabinose와 xylose가 있는 경우이고, Wall chemotype III은 meso DAP이면서 당은 madulose가 존재하거나 어떤 특징적인 당이 없는 경우이고, Wall chemotype IV은 meso DAP이면서 arabinose와 galactose가 있는 경우로 구분하였다. *Streptomyces*의 경우에 DAP는 LL-form으로 존재하며 특징적인 당은 나타나지 않는다.

최근에는 지방산, isoprenoid quinone 및 극성 지질분석에서 얻어진 화학 물질들이 방선균 속의 식별에 중요한 지표로 활용하고 있다. 그 예로, 방선균의 isoprenoid quinone은 다른 그람양성 세균에 존재하는 menaquinone을 함유한다. 단지, 방선균에 존재하는 menaquinone의 경우 isoprenoid 측쇄가 포화되어 있는 경우가 대부분이고, 복수종의 quinone이 존재하는 등 일반적인 그람양성 세균에 비하여 복잡한 경향을 나타낸다. 이외에도 DNA와 G+C%, DNA hybridization, 16S RNA, 5S rRNA 등의 핵산을 분석하여(Labeda 등, 1997) 방선균의 분류, 동정뿐 아니라, 진화 및 계통관계를 밝히는데 중요한 자료로 쓰여지고 있다.

제주대학교 중앙도서관

일반적으로 항생제는 antimicrobial spectrum, 작용기작, 생산균, 합성방법, 화학구조에 따라 분류한다. 이 중 화학구조에 항생제의 분류는 다음과 같다(Sykes, 1985 ; Perkins, 1982 ; Demain과 Inamine, 1970 ; Weaver와 Pattee, 1964 ; Weisblum 등, 1971; Routien, 1960 ; Hotta and Okami, 1996 ; Gallo 등, 1972 ; Kim 등, 1989).

1) Carbohydrate-containing antibiotics(Huddleston 등, 1997)

aminoglycosides(streptomycin), c-glycoside(vancomycin)

2) Macrocyclic lactones (Horan, 1997)

macrolide antibiotics(erythromycin), polyen antibiotics(candicidin)

3) Quinones and related antibiotics

tetracyclines(tetracycline)

4) Amino acid and peptide antibiotics

β-lactam antibiotics(penicillin), peptide antibiotics(bacitracin)

thiazolyl peptide antibiotics(Pusecker 등, 1997 ; Louiuro 등, 1997)

5) Heterocyclic antibiotics containing oxygen

polyether antibiotics(monesin)

6) Heterocyclic antibiotics containing nitrogen

nucleoside antibiotics(polyoxins)

7) Alicyclic derivatives

cycloalkane derivatives(cyclohexamide)

8) Aromatic antibiotics

benzene derivatives(chloramphenicol)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

한편, 방선균은 2차 대사산물의 다양성으로 인하여 생리활성물질의 종류도 다양하다. 지금까지 미생물로부터 탐색된 10,000여종의 생리활성 물질 가운데 약 2/3에 해당하는 64% 정도가 방선균으로부터 발견되었으며, 세균으로부터는 약 13%, 곰팡이로부터는 약 23%가 발견되어 (Berdy, 1989) 각종 생리활성물질의 탐색에 있어서 방선균이 차지하는 비중은 매우 크다. 이러한 이유 때문에 의약, 농업, 식품 소재 등 각종

생물 소재 산업에 있어서 산업적으로 가장 중요한 미생물로 부각되고 있다. 이러한 것으로 미루어 볼 때, 방선균을 이용한 항생물질 탐색 연구 그리고 이에 따른 방선균 분류학 연구는 급속한 진전이 있을 것으로 전망된다. 이러한 항생물질의 연구는 세균이나 진균 감염증에 유효한 물질에서 암이나 비루스병에 유효한 물질 탐색까지 발전되고 있으며, 최근에는 내성균, gram 음성 간균 등에 유효한 새로운 항생물질이나 항생물질 유도체의 연구 및 제암 항생물질 연구에까지 활발히 이루어지고 있는 실정이다. 최근에는 항생물질에 대한 내성균의 잦은 출현으로 인해서 특정속의 병원균에 대하여만 선택적으로 강한 항균활성을 가진 화합물의 탐색이 선호되고 있다.

미생물은 다양한 생리대사기작을 가지며 많은 종류의 생체활성물질을 만들어 내고 있으며, 현재 사용되고 있는 생물 공업제품의 생체 대사물질들은 미생물의 대사물질로부터 개발되고 있는 실정이다. 이러한 점들을 고려해 볼 때 탐색되지 않은 미생물에서 새로운 생리활성 물질을 발견할 수 있는 가능성이 높기 때문에 미생물을 이용한 생리활성 물질 탐색은 뜻깊은 일이라 생각된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

본 연구에서는 새로운 항생물질의 탐색을 목적으로 제주도 토양에서 분리된 방선균을 각각 배양하여 이 배양액을 대상으로 *Escherchia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas solanacearum*에 대해서 선택적으로 항균활성을 나타내는 방선균 10개 균주를 1차 선별하였으며, 1차 선별된 균주중에서 가장 높은 항균 활성을 보이는 BL93 균주를 최종선별하였다. 그리고 최종 선발된 BL93 균주의 동정과 방선균이 생산해내는 항생물질의 분리정제에 대한 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 토양 방선균

제주도 토양에서 분리된 307개의 방선균을 대상으로 항생물질 생산 여부를 검색하였다.

2) 사용균주

(1) 항생물질 생산균

토양에서 분리된 방선균 307균주 중에서 항균활성이 우수한 BL93 균주를 최종 선별하여 항생물질 생산균으로 사용했다.

(2) 항생물질 검정균

토양으로부터 분리한 방선균 중 신규 항생물질 생산균 선별을 위한 시험균주는 Table 1과 같다.

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 1. Test microorganisms for the screening of antimicrobial activities

Test organism	Source of strains
Escherrichia coli 8749	American type culture collection
Staphylococcus aureus 6538	American type culture collection
Pseudomonas solanacearum 10692	American type culture collection

3) 사용배지

(1) 방선균 분리용 배지

방선균 순수분리, 계대배양하기위한 배지는 Table 2와 같은 조성의 Arginine-glycerol salts(AGS) agar 를 사용하였다.

Table 2. Medium AGS composition for isolation of actinomycetes

Arginine monohydrochloride	1.0g
Glycerol	12.5g
K_2HPO_4	1.0g
NaCl	0.5g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5g
$Fe_2(SO_4)_3 \cdot 6H_2O$	0.01g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.001g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.001g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.001g
Agar	15.0g
Cyclohexamide	50mg
Nystatin	50mg
Soil extract	200㎖
Distilled water	800㎖

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

(2) 검정균의 배양 배지

항균 활성 검정을 위한 각 시험균주의 배지 조성은 Table 3과 같다.

Table 3. Medium composition for cultivation of test microorganism

Test microorganisms	Composition	
Escherrichia coli 8749	Nutrient agar	
Staphylococcus aureus 6538	Nutrient agar	
Pseudomonas solanacearum 10692	PS agar	
	Peptone	10.0g
	Casein hydrolysate	1.0g
	Glucose	5.0g
	Agar	17.0g
	Distilled water	1L

(3) 균주 동정용 배지(Shirling and Gottlieb, 1966)

분리된 균주의 배양학적 특징을 관찰하기 위해서 사용한 ISP 배지는 다음과 같다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

① Yeast malt extract agar (ISP 2)

Bacto-yeast extract	4.0g
Bacto-malt extract	10.0g
Bacto-dextrose	4.0g
Bacto-agar	20.0g
Distilled water	1.0 ℓ

② Oatmeal agar (ISP 3)

Oatmeal	20.0g
Agar	18.0g
Distilled water	1.0 ℓ

③ Inorganic salts starch agar (ISP 4)

Soluble starch	10.0g
K_2HPO_4	1.0g
$MgSO_47H_2O$	1.0g
$(NH_4)_2SO_4$	2.0g
$CaCO_3$	2.0g
Trace salt solution	1.0㎖
Agar	20.0g
Distilled water	1.0 ℓ

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

④ Glycerol asparagine agar (ISP 5)

Glycerol	10.0g
Asparagine	0.5g
K_2HPO_4	1.0g
Agar	15.0g
Trace salt solution	1.0ml
Distilled water	1.0L
pH	7.0~7.2

⑤ Peptone yeast extract iron agar (ISP6)

Bacto-peptone	15.0g
Proteose peptone	5.0g
Ferric ammonium citrate	0.5g
Dipotassium phosphate	1.0g
Sodium thiosulfate	0.08g
Yeast extract	1.0g
Bacto agar	15.0g
Distilled water	1.0L
pH	7.0~7.2

⑥ Tyrosine agar (ISP7)

Glycerol	15.0g
L-tyrosine	0.5g
L-asparagine	1.0g
KH_2PO_4	0.5g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5g
NaCl	0.5g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01g
Trace salt solution	1.0ml
Bacto agar	10.0g
Distilled water	1.0L
pH	7.2~7.4

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

* Trace salt solution (for media ISP 3,4,5,7)

$FeSO_4$	0.1g
$MnCl \cdot 4H_2O$	0.1g
$ZnSO_4 \cdot 7H_20$	0.1g
Distilled water	100ml

(4) 항생물질 생산용 배지

항생물질 생산용 배지의 조성은 Table 4와 같다. 즉, AGS(Table 2) 배지의 구성분 중에서 agar와 항생제 대신, Tween 20 을 첨가한 Table 4와 같은 조성의 배지를 사용하였다.

Table 4. Culture medium for the antibiotic production

Arginine monohydrochloride	1.0g
Glycerol	12.5g
K_2HPO_4	1.0g
NaCl	0.5g
$MgSO_4 \cdot 7H_20$	0.5g
$Fe_2(SO_4)_3 \cdot 6H_20$	0.01g
$CuSO_4 \cdot 5H_20$	0.001g
$ZnSO_4 \cdot 7H_20$	0.001g
$MnSO_4 \cdot H_20$	0.001g
Soil extract	200㎖
Tween 20	0.01%
Distilled water	800㎖

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

4) 시약

본 실험에 사용한 LL-DAP와 meso-DAP는 Sigma사 제품을 사용하였고, 유기용매는 1급 또는 특급시약을 사용하였다. Sigma 사의 cellulose를 입힌 glass plate와 silica gel을 입힌 glass plate를 TLC용으로 사용하였다.

5) 사용기기

Ion-exchange column chromatography와 gel permeation chromatography는 LKB사의 것을 사용했으며, Fraction collector는 Vision Scientific Co., LTD의 Model KMC-2000을 사용하였다. Spectrophotometer는 HP사의 것을 사용하였으며, Conductivity는 ORION사의 model 115를 사용하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2. 방법

1) 방선균의 선별

순수분리된 307개의 균주를 AGS 액체배지에서 27~30℃에서 160rpm으로 7~21일 간 진탕배양하였다. 배양액중의 항균 활성이 가장 높은 1개 균주를 최종적으로 선발하였다.

2) 방선균의 동정 (Williams 등, 1989)

분리된 방선균의 동정은 ISP법에 따라, 육안 및 전자 현미경을 이용한 형태학적 특징과 세포벽 성분인 diaminopimeric acid(DAP)의 형태를 조사하였다.

3) ISP 분류 기준에 의한 항생물질 생산균주의 동정

(1) 배양학적 특징 (Williams 등, 1983)

① 배양

선별된 균주는 ISP 배지에 배양하면서 7일, 14일, 21일 간격으로 생육정도, 기균사의 색깔, 수용성 색소 유무 및 멜라닌 생성유무를 확인하였다. 기균사는 Tresner-Backus color wells 과 비교하여 white, gray, yellow, green, blue, violet 등으로 기록하였으며, 배면 색깔은 yellow, olive, yellowish brown 등으로 나타내었다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

② 포자의 형태와 단면

포자의 형태와 표면은 Shiring와 Gottlieb (1966)의 방법을 변형하여 사용하였다. 균주를 Yeast malt extract agar에서 21일간 배양한 후 5% glutaraldehyde solution 으로 4℃에서 6시간 처리한 후 phosphate buffer로 세척하였다. 50, 60, 70, 80, 90%, 100% 에탄올 용액으로 단계적으로 30분씩 탈수 과정을 거쳐 critical point dryer를 사용하여 건조하였다. 이것을 gold와 paradium으로 ion coating한 후 주사 전자 현미경으로 10,000배, 15,000배에서 포자의 표면과 형태를 관찰하였다.

(2) 형태학적 특징 (Williams 등, 1983)

선발균주는 균사가 잘 형성되는 inorganic salts starch agar, oatmeal agar, yeast extract malt extract agar, 평판 배지에 도말하여 27℃에서 21일간 배양한 후, 전자현미경으로 포자사슬 형태, 포자 표면형태, 포자 크기 등을 관찰하였다. 포자 표면은 smooth, spiny, warty, hairy, rigous로 구분하였으며, 포자의 사슬 형태는 rectiflexibles, rectiaculiaperti, spirales 및 verticillate로 구분하였다.

제주대학교 중앙도서관

(3) 생리학적 특성 (Gerhardt 등, 1994)

① Gelatin 액화력

기본배지 (0.5% bacto peptone, 0.3% beef extract, 1.5% agar)에 gelatin 0.4%(w/v)를 첨가한 2개의 평판배지에 각 선별균주를 도말한 후 28℃에서 배양하면서 7일과 14일후 gelatin 액화력을 관찰하였다. gelatin 액화력은 각 평판 배지에 acidified $HgCl_2$ 용액을 8~10ml씩 부어 나타난 clear zone의 크기로 측정하였다.

② 전분 분해력

Gelatin 액화력 측정에 사용한 기본배지에 전분 1%(w/v)를 첨가한 평판배지에 2개의 각 선별균주를 도말한후 28℃에서 배양했다. 전분 분해력은 요드용액(KI: 2.0g, I_2: 1.0g in 300ml D.W)을 7일과 14일 배양된 각각의 plate에 8~10ml씩 부어 나타난 clear zone의 크기를 측정하였다.

③ 멜라닌 생성

제주대학교 중앙도서관

선발된 균주는 peptone yeast extract iron배지와 tyrosine 평판배지에 배양하면서 7일과 14일 후에 멜라닌 생성여부를 확인하였다.

(4) 탄소원 이용 시험

여과 멸균된 10% 탄소원을 Gottlieb의 기본배지에 각 당이 1%(w/v) 되도록 첨가한 후 시험균주를 접종하였다. 탄소원이 첨가되지 않은 negative control과 glucose가 첨가된 positive control의 생장과 비교하여 negative control 보다 더 잘 자랐을 때를 양성으로 기록하였다.

4) 화학적 분석 방법

(1) diaminopimelic acid와 amino acid의 확인(Hasegawa 등, 1983)

6*N* HCl에 균사체를 넣고 100℃에서 1시간 동안 가수분해 한 후 가수분해물을 cellulose TLC로 분석하였다. 전개용매로는 methanol : distilled water : 6N HCl : pyridine (80 : 26 : 4 : 10)를 사용하였고, 0.2% ninhydrin을 발색 시약으로 사용하였다. 표준물질로는 LL-DAP와 meso-DAP의 혼합된 제품을 사용하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

5) 항균활성 검정

(1) 방선균의 배양

분리된 방선균을 배양하기 위해서 15㎖ test tube에 항생물질 생산용 배지를 5㎖씩 분주한 후, 균을 접종하여 28℃에서 진탕 배양기(160rpm)로 7일~14일간 배양하였다.

(2) 검정균의 배양

E. coli 8749와 *S. aureus* 6538는 nutrient agar를 사용하여 37℃에서 배양하였고, *P. solanaecearum* 10692는 PSA 배지를 사용하여 32℃에서 진탕 배양하였다.

(3) 항균활성 측정

배양액 중의 항균 활성 측정은 paper disc법, 시험관 희석 배양법으로 조사하였다.

① paper disc법 (Fairgrother와 Martin, 1951)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

미리 배양한 검정균 배양액을 도말해 놓은 각각의 검정 평판 배지에 시료 40㎕를 직경 8mm의 paper disc(Toyo) 올려 놓고, 1일간 배양하여 검정균의 생육 저지환의 크기를 측정하였다.

② 시험관 희석 배양법(Routien, 1961 ; Stanley 등, 1989)

검정균 배양용 배지 5ml에 10~100㎕의 항균활성 시료를 섞고, 1일간 배양 후의 검정균 생육정도를 600nm에서의 흡광도로 비교하였다.

6) 항생물질의 생산 및 분리 정제

(1) 항생물질의 생산

300㎖용량의 flask에 100㎖의 항생물질 생산용 배지를 넣고 종균을 접종한 후 28℃, 160rpm에서 7~10일간 진탕배양하였다. 이 배양액을 seed culture로 사용하여 자체 제작한 fermenter에서 대량배양하였다. 즉, 20ℓ 용량의 fermenter에 5ℓ의 항생물질 생산용 배지를 넣고 종균 배양액 5%를 접종한 후 7-10일간 배양하여 얻은 배양액을 분리정제에 사용하였다.

배양액으로부터의 항균성 물질의 분리 정제는 Fig. 1과 같은 과정을 거쳐 실시하였다.

Culture broth(5ℓ)
↓
Centrifugation(5,000g, 15min)
↓
Filtration by 0.25μm filter
↓
Concentration by vacuum evaporation
↓
AG MP-50 Ion exchange column chromatograpy
↓
Ultra gel permeation chromatograpy
↓
Freeze drying
↓
Antibacterial compounds

Fig. 1. Isolation procedures for antibacterial compounds

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

7) 항생 물질의 특성 및 분석

항생물질의 특성 및 분석은 김 등(1996)과 Method in Enzymology (1975) 의 실험방법에 준하였다.

(1) 항생물질의 물리화학적 특성

항생물질의 물리화학적 특성을 알아보기 위하여 산, 알칼리, 중성 조건에서 butanol, ethyl acetate, chloroform 유기용매에 대한 추출성, 여러가지 양이온, 음이온 교환수지, 활성탄에 대한 흡착성을 조사하였다. 유기용매에 대한 추출성은 시료액 1㎖에 각각의 유기용매를 넣고 잘 흔든 후에 물층과 유기용매층으로 분리하여 유기용매층은 휘발시킨후 각각의 항균력 측정을 통해 유기용매 전용성을 조사하였다. 양이온 교환수지인 AG MP-50에 대한 흡착성은 1㎖의 배양액에 0.01g 의 수지를 넣고 난 후 배양액의 항균력을 측정하여 흡착성을 조사하였다. 수지에 흡착이 되는 것이 확인되면 5ml의 resin에 10㎖ 배양액을 흡착 시킨 후, 0.5M NaCl, 0.5M KCl, 0.5M NH_4Cl 등의 용액으로 용출 경향을 조사하였다.

pH 안정성은 다음과 같이 배양액을 pH 3~pH 12까지 각 단계별로 조절한 후 실온에서 48시간 방치한 후 잔존 항균력을 측정한다. 열 안정성은 100℃ 30분간 열처리 하면서 경시적으로 그 잔존 활성도를 측정하였다.

(2) TLC

정제된 수용성 항균성 물질의 순도 및 Rf치를 조사하기 위하여 silica gel TLC를 행하였다. 전개용매로는 다음과 같이 4종류를 사용하였다.

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

propanol : pyridine : acetic acid : water(15 : 10 : 3 : 12)

propanol : pyridine : acetic acid : water(18 : 5 : 5 : 8)

chloroform : methanol : 17% ammonia(2 : 1 : 1)

butanol : acetic acid : water(3 : 1 : 1)

(3) 각종 용매에 대한 용해성

분리 정제된 물질을 각각 소량 취해서 감압 건조후 methanol, ethanol, buthanol, acetone, ethyl acetate, chloroform, hexane, 증류수 등에 용해시켜 항균성 성분의 용해성을 조사하였다.

(4) 발색반응

분리 정제된 물질의 특성은 ninhydrin, H_2SO_4 등에 대한 정색반응으로 판정하였다.

(5) UV spectrum

활성물질을 파장 190~500nm의 범위에서 scanning 하였다.

제주대학교 중앙도서관

III. 결과 및 고찰

1. 항세균성 물질 생산균의 선별

항세균성 물질 생산균의 1차 선별을 위하여 *E. coli, S. aureus, P. solanacearum*의 검정균에 대하여 paper disc법으로 생육저지대를 관찰하였다. 그 결과 총 307주의 방선균 중에서 3.3%에 해당하는 10개 분리주가 *E. coli, S. aureus, P. solanacearum*에 공통적으로 항균 활성을 나타내었다. 박(1992)도 광주 근교의 밭토양에서 방선균 균주들을 분리하여 paper disc법과 시험관 희석 배양법으로 항균력을 측정한 결과 *E. coli, S. aureus, P. solanacearum*에 대하여 높은 항균력을 가진 균주들을 분리하였다고 보고하였다.

2. 분리균주의 항균활성

제주대학교 중앙도서관

항균활성을 나타내는 분리균주들을 배양하여, 배양액 중의 항균 활성을 paper disc법으로 측정하였다 (Table 5). 검정균 3종에 대해서 방선균 10주가 항균활성을 나타내었다. 그 중에서 BL93 균주가 비교적 가장 강한 활성을 보였다. BL522b 균주는 *P. solanacearum*에 대해서 특이하게 항균효과가 높았다. 그러므로, BL522b 균주는 식물병원균에 억제효과가 있는 물질 탐색에, BL93 균주는 광범위한 항균 활성을 보였으므로 이 균주는 항생물질 생산에 좋은 재료가 될 것으로 판단된다.

Table 5. Growth inhibition of test strains by actinomycete isolates

Isolates	Test strains		
	E.coli 8739	*S.aureus 6538*	*P.solanacearum 10692*
BL53	14	13	12
BL520	14	13	13
BL522a	13	13	12
BL522b	15	12	18
BL93	19	18	13
BL918	13	13	12
BL106Ba	15	13	13
BL106Bb	13	12	11
BL106Bb2	15	12	11
BL127B	12	10	11

The values in the table indicate the diameter(mm) of growth inhibition zone.

토양에서 분리된 방선균 BL93의 항균성 유무를 재확인하고 보다 정확하게 항균활성을 검정하기 위하여 시험관 희석배양법을 사용하였다. 그 결과, BL93균주의 배양액을 극히 소량만 배지에 첨가하여도 검정균 3종류 모두가 생육 저해를 받았다. (Fig 2, 3, 4)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Pusecker 등(1997)은 해양의 *Streptomycete*로부터 생산된 새로운 Phenazine 유도체인 Dihydrophenomycin Methyl Ester는 *E. coli* , *Bacillus subtilis, Candida albicans*의 성장을 억제하였다고 보고하였다.

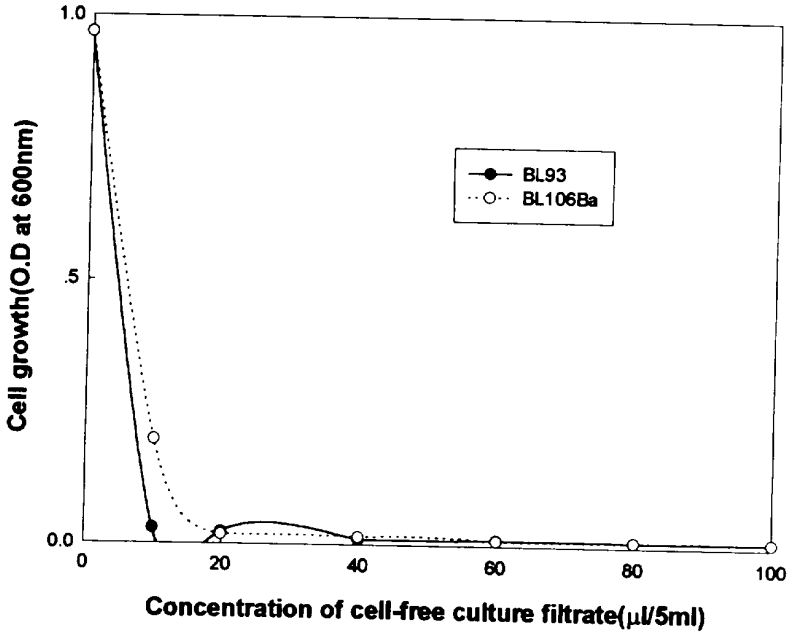
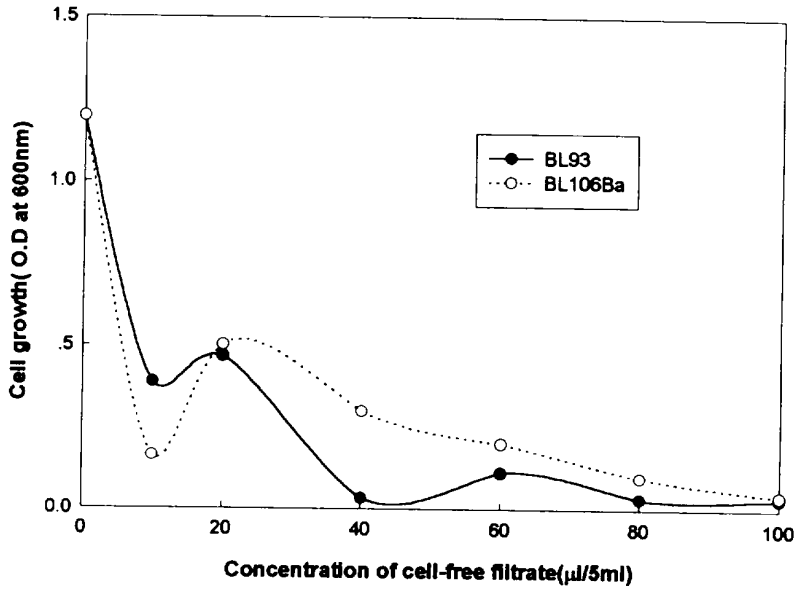


Fig. 2. Antibacterial activity of actinomycete isolates on *Escherichia coli* 8749

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

시험관 회석 배양법으로 *E. coli*에 대한 항균활성을 측정한 결과 (Fig. 2)배양액 10㎕만 첨가해도 완벽한 생육 저해가 관찰되었다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 3. Antibacterial activity of actinomycete isolates on *Staphylococcus aureus* 6538

*S. aureus*에 대한 항균활성은 *E. coli*에 비해 다소 높은 농도인 40㎕/5㎖에서 생육저해 효과가 나타났다(Fig. 3).

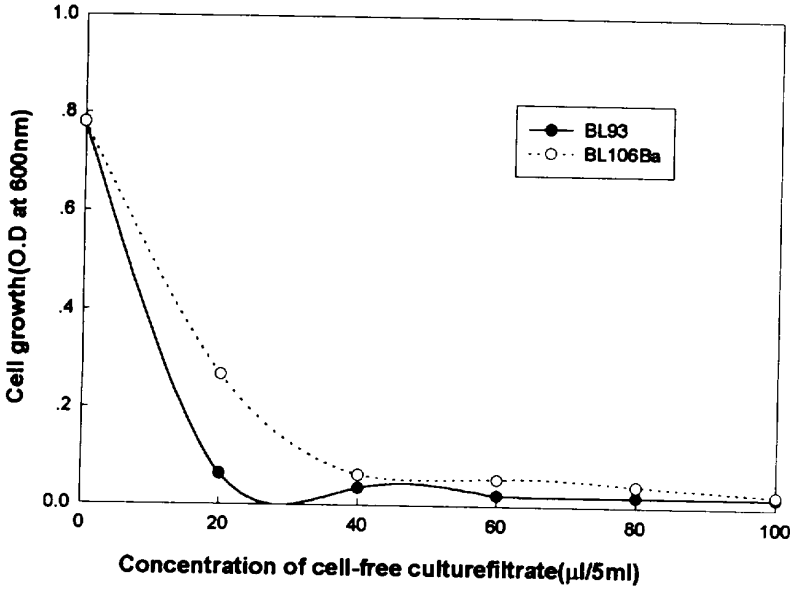


Fig. 4. Antibacterial activity of actinomycete isolates on *Pseudomonas solanacearum* 10692

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

*P. solanacearum*에 대한 항균활성은 20㎕/5㎖ 수준에서 생육을 충분히 저해할 수 있었다. 위와 같이 방선균 배양액의 검정균에 대한 생육저지도를 측정한 후, 상대활성이 가장 우수한 BL93 균주를 항생물질 생산 균주로 최종 선별하였다.

BL93 균주의 배양액의 항균 활성은 *E. coli*에 대해서 가장 효과적이었고, 그 다음 *P. solanacearum, S. aureus* 순서였다. 따라서, 이 항생물질은 gram 양성균보다 음성균에 보다 효과적이라고 추정된다. 그러므로 BL93 균주의 항균활성 물질은 gram 양성균과 gram 음성균에 유효한 항균 스펙트럼을 보이는 물질이라 생각된다. 이는 신(1995)등이 분리한 토양 방선균이 gram 양성균과 gram 음성균에 광범위한 항균 활성을 보인다는 보고와 일치하였다.

3. 항생물질 생산 균주 BL93의 동정

1) 배양학적 및 형태학적 특징

최종 선별된 BL93균주의 동정을 위해 I.S.P 분류 방법에 따라 ISP의 각 배지상에서 7, 14, 21일간 배양하면서 배양상의 특성을 관찰한 결과는 Table 6과 같았다. 이 균주의 전자 현미경 관찰 결과는 Fig 5와 같았으며, 배지 종류에 따른 생육 형태는 Table 6과 같이 기균사의 색깔은 violet 또는 pink로 나타났다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 6. Cultural characteristics of the isolate BL93 on various agar media

Medium	Growth	Aerial mycelium color	Reverse color	Soluble pigment
Yeast malt extract agar(ISP2)	Good	violet	yellowish brown	None
Oatmeal agar(ISP3)	Good	violet to slight pink	light browm	None
Inorganic salts starch agar(ISP4)	Good	white brown to pink	dark ivory	None
Glycerol asparagine agar(ISP5)	Good	light violet	ivory	None
Peptone yeast extract iron agar(ISP6)	Poor	yellow	yellow	None
Tyrosine agar(ISP7)	Good	violet	dark brown	None

This strain was cultivated for 21days on ISP media.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2) 당 이용성 및 생리학적 특징

항세균성 항생물질 생산균으로 선별한 방선균 BL93의 당 이용성을 조사하기 위하여 Shirling과 Gottlieb의 방법(1966)에 따라 carbon utilization basal salt agar에 각종 탄소원을 1% 농도로 첨가한 배지에 28℃에서 21일간 배양하였다. 배양한 후 BL93의 생육정도를 대조군과 비교함으로써 당 이용성을 판정하였다(Table 7). 그 결과 대부분의 당을 잘 이용하였다. BL93 균주의 생리적 특성 결과 starch 및 gelatin을 잘 분해하였다(Table 7).

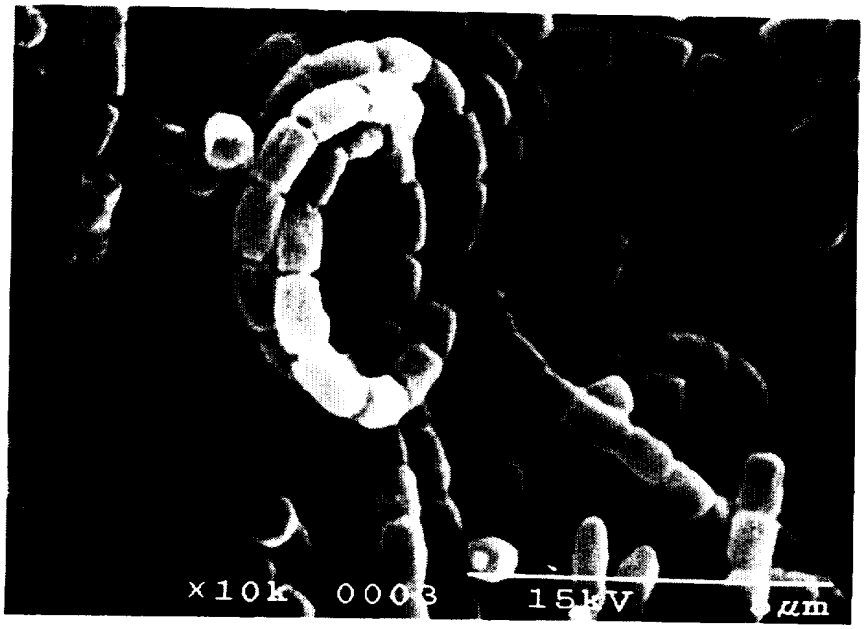
Table 7. Physiological characteristics of the isolate BL93.

Physiological characteristics	*Streptomyces sp.*	BL93
Liquefaction of gelatin	+	+
Hydrolysis of starch	+	+
Utilization of Carbon source		
Galactose	+	+
Manitol	+	+
Rhamnose	+	+
xylose	+	+
cellulose	+	+
Saccharose	+	+
fructose	+	+
lactose	+	+
Sorbitol	-	-
Inositol	-	-
Ribose	-	-

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

+ : positive , - : negative

A



B

Fig. 5. Microscopic morphology of the isolate BL93.

A: Spore chain, spiral (Scanning electron microscope, 10,000x)

B: Spore surface, smooth(Scanning electron microscope, 15,000x)

The isolate was incubated at 28℃ for 21 days on Yeast-malt extract agar plate, and the spore chain and surface were observed with scanning electron microscope.

방선균을 동정할 때는 균사의 모양, 포자의 연결 상태(spore chain) 및 포자의 표면 모양(spore surface)이 방선균의 분류에 중요한 기준이 된다.(Williams 등, 1989). 최종선발된 방선균 BL93균주의 형태학적 특성을 조사하기 위하여 BL93균주를 Yeast-malt extract agar에 접종한 후 28℃에서 21일간 배양한 후 주사전자현미경으로 포자의 연결 상태와 표면 상태를 관찰하였다. (Fig. 5)

관찰 결과 BL93의 포자 연결 모양은 나선형(spiral)이었고, 포자의 표면상태는 smooth 형이었다. *Streptomyces*속은 포자의 연결상태를 rectiflexibilis, spiral, roof형으로 나누고 포자 표면의 모양을 spiny, hairy, warty, smooth로 구분하나 가장 대표적인 모양은 rectiflexibilis와 smooth형이다(Williams 등, 1989). 항균성 항생물질 생산균인 BL93균주를 전자현미경을 이용한 형태학적인 관찰에서도 일반적인 *Streptomyces* 속과 같이 포자의 발달이 양호하였으며, 포자의 연결형태는 나선형(spiral) 이었고, 포자의 표면은 smooth형이었다. 이는 대부분의 토양에서 분리한 방선균의 포자의 형태와 일치하였다(윤 등, 1996 ; 안 등, 1991).

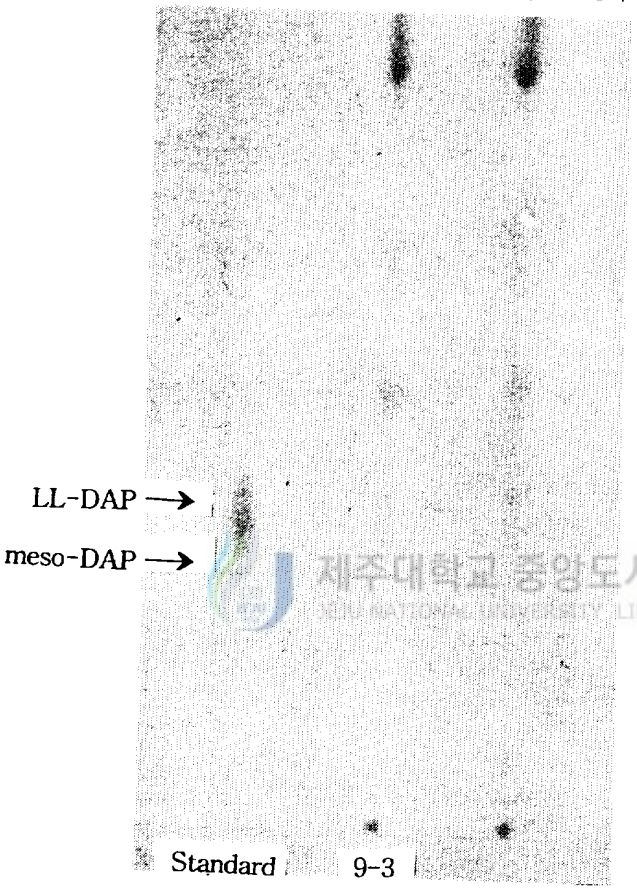
제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3) 세포벽 조성

Diaminopimelic acid(DAP)는 방선균 분류의 중요한 지표로 이용된다. 항세균성 물질 생산균으로 분리된 BL93의 세포벽 성분중 DAP의 type을 조사하기 위하여 Hasegawa(1983)의 방법에 따라 BL93의 균체를 6*N* HCl로 121℃에서 15분간 가수분해하고, 가수 분해물을 methanol : water : 6*N* HCℓ : pyridine (80 : 26 : 4 : 10, v/v) 혼합 용매로 상승 전개시켜 TLC를 시행하였다. 그 후 0.2% ninhydrin으로 100℃으로 2분간 발색

시킨 후 관찰한 결과 LL-DAP를 관찰 할 수 있었다(Fig. 6).

이는 대부분의 토양에서 분리한 방선균의 DAP isomer분석 결과와 일치하였다(서 등, 1996 ; 박, 1992 ; 문 등, 1995 ; 이 등, 1995 ; 서 등, 1996). *Streptomyces, Nocardioide, Kinespora*는 DAP가 대표적인 LL 형이고, 그외의 방선균은 DAP가 meso의 형태를 띠었다. 이들 결과로부터 방선균 BL93은 *Streptomyces* 속에 속하는 균주로 생각되었다.



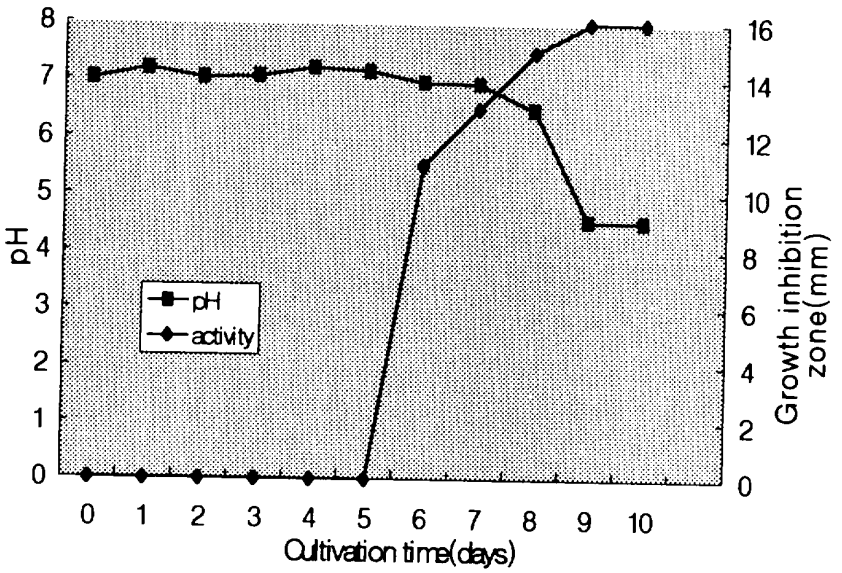
제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 6. Thin layer chromatography of cell wall diaminopimelic acid isomers of the isolate BL93.

The spot on microcrystaline cellulose TLC plate(10×20 cm) was developed with ninhydrin at 100℃ for 2 min.

4. Jar Fermenter 배양

20 ℓ Jar fermenter에서 대량 배양중의 배양기간에 따른 항생물질의 활성과, pH의 변화를 조사한 결과는 Fig. 7 과 같았다.



제주대학교 중앙도서관

Fig. 7. Changes in antibacterial activity and pH during cultivation in jar fermenter

Fig. 7에서 보는 바와 같이 항생물질의 생산은 전형적인 2차 대사산물의 경향을 보였고, 약 9일 배양후에 항균 활성 성분이 급격히 생산되면서 배양액의 pH가 감소하였다. 배양경과에 따른 pH의 변화는 배양초기의 pH 7에서 배양 9일 만에 pH 4.5로 감소하였다. 이는 Tanaka 등(1997)과 Fujh 등(1997)의 보고와 같이 다른 2차대사산물처럼 균의 증식이 이루어진 후 항세균성 물질 생산이 최적을 나타냄을 볼 수 있었다.

5. 항생물질의 특성 및 분리정제

1) 항생물질의 용해도

항생물질은 비교적 극성이 강한 용매에서 용해도가 높았다. 물에 대한 용해도가 가장 높았다. 유기 용매층에 대한 추출성을 조사한 결과 대부분 물 층에서 항균 활성이 나타났다. 유기 용매에 대한 전용성 실험에서 chloroform, ethyl acetate에는 전용되지 않았고, buthanol, water에는 전용이 잘 되었다(이 등, 1991). 따라서 이 항생물질은 비교적 극성이 강한 물질로 생각되었다(Table 7).

Table 7. Solubility of antibacterial compounds from the isolate BL93

	culture broth	extraction solvent					
		butanol		chloroform		ethylacetate	
		O[a]	H[b]	O[a]	H[b]	O[a]	H[b]
Antibacterial activity(%)	100	73	133	0	113	0	106

[a] : organic layer

[b] : aqueous layer

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2) 열 안정성

항균활성 검정균으로는 *E. coli*와 *S. aureus*를 사용하여 BL93균주의 배양액을 100℃에서 30분간 가열 처리하여 가열처리 전후의 활성을 비교하였다(Table 8). 100℃에서 가열 처리해도 항균활성은 거의 손실이 되지 않는 것으로 보아 이 화합물은 열에 매우 안정한 것으로 추정되었다.

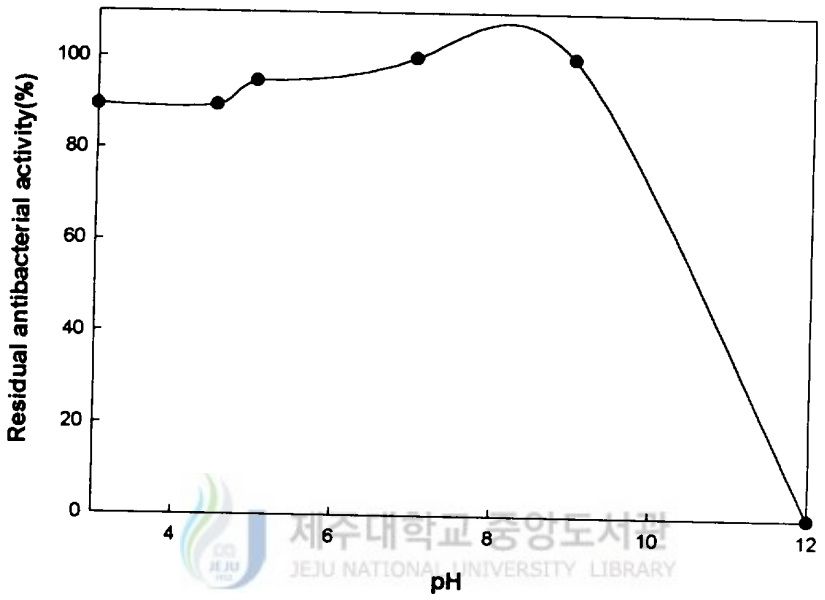
Table 8. Thermostability of antibacterial compounds from actinomycete BL93

Test strains	Antibacterial activity(%)	
	Not heated	Heated at 100℃ for 30min
E. coli 8749	100	100
S. aureus 6538	100	95

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3) pH 안정성

방선균 BL93이 생산하는 항균성 물질을 일정 pH에서 48시간 방치후 잔존 활성을 측정하였다(Fig. 8).



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

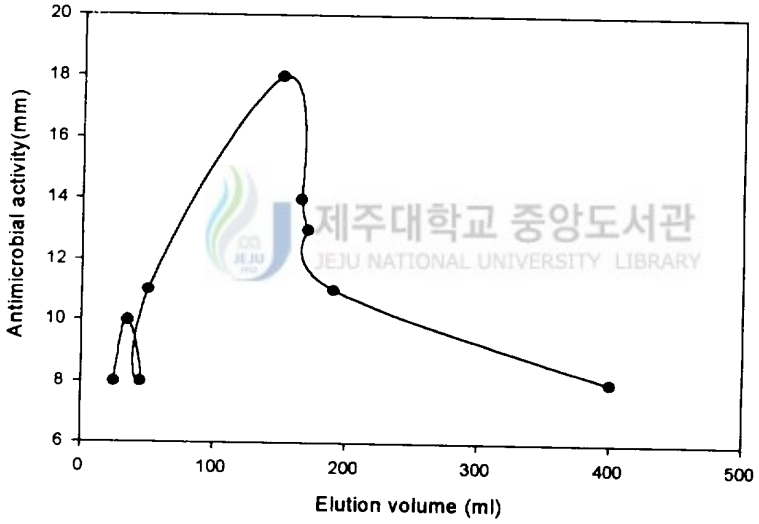
Fig. 8. pH stability of antibacterial compounds from actinomycete BL93.

항균활성은 비교적 산성에서 중성 영역에서 안정하였으나, 염기성 영역에서는 항균활성이 급격히 소실되었다.

4) 항생물질의 분리정제 및 조건

① AG MP-50 ion column chromatography

BL93 균주의 항생물질을 분리정제하기 위하여 무균세포배양액을 40배 감압농축하고, AG MP-50(강 양이온 교환 수지)에 흡착 시킨 후 0.5M NH_4Cl로 용출시켰다. 분당 0.5cm의 유속으로 용출시키면서 5㎖씩 분획하여 항세균성 활성을 측정한 결과(Fig. 9) elution volume 100㎖에서 200㎖ 까지 활성이 나타나므로 이 부분을 모아서 감압농축 후 다음 단계의 정제 과정을 시행하였다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 9. Distribution of antimicrobial activites after AG MP-50 ion exchange column chromatography

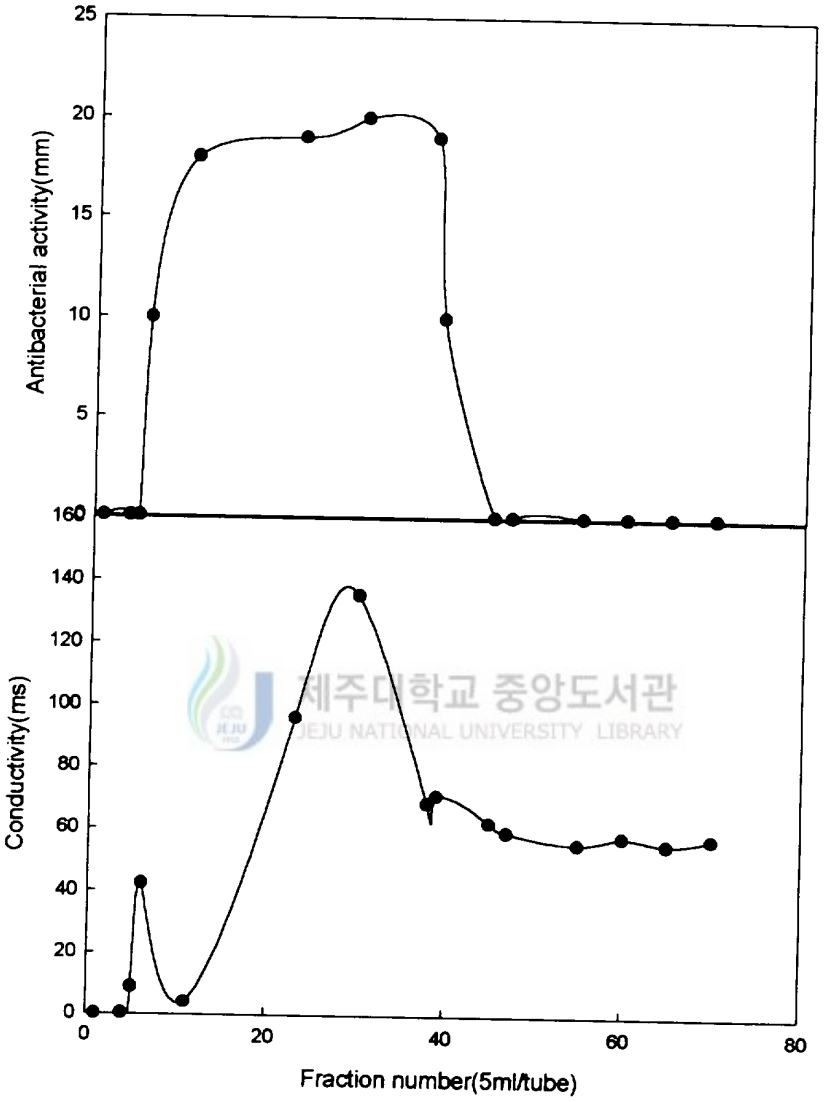
Fig 9에서 보는 바와 같이 항균 활성 특성을 나타내는 부분의 특성은 종 모양을 나타내었다. 이는 양이온 교환수지에 흡착한 배양액의 용출 경향이 바르게 되었음을 알 수 있었으며, Cooper(1977)와 Ma(1996)가 보고한 바와 일치하였다.

또한 AG MP-50에 흡착 시킨 후 0.5M NH_4Cl로 용출시켜 활성부위 확인 방법으로 conductivity를 측정한 결과(Fig. 10) 활성부위와 conductiity는 대체로 비례적인 관계를 보였다. Conductivity는 ion의 수를 알 수 있으므로 활성 부분이 어느 정도의 염 농도에서 resin과 교환이 일어나는 지를 알 수 있다. 따라서, 본 물질의 항균활성은 conductivity가 40ms에서 나타났다. 즉 이 부분에서 resin과 NH_4의 교환이 일어나면서 활성 부분이 용출됨을 알 수 있었다.

② Ultra-gel permeation chromatography

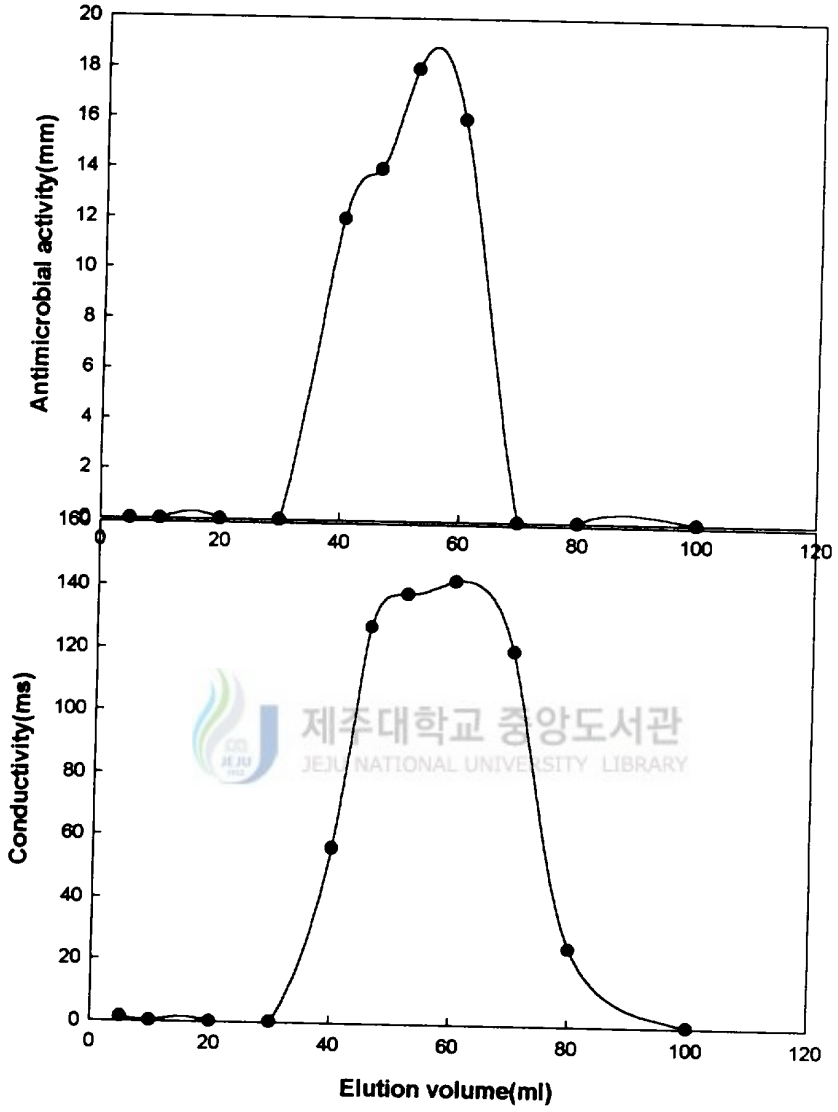
Fig. 11는 이온교환 수지를 통과시킨 시료를 농축한 후, ultra gel permeation chromatography을 처리한 결과인데, void volume 2배 지점에서 활성이 나타나는 것으로 보아, 활성 부위는 conductivity가 높은 부위와 일치하였다.

제주대학교 중앙도서관



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 10. Conductivity by fraction number after AG MP-50 ion exchange column chromatography

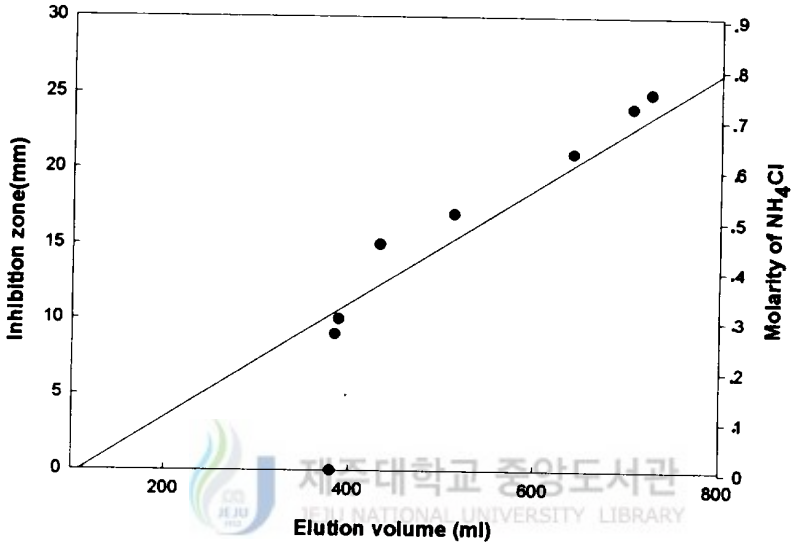


제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 11. Conductivity and antibacterial activity after ultra gel Permeation chromatography

③ NH_4Cl gradient on a strong cation exchanger column chromatography

양이온 교환 수지 AG MP-50을 사용하여 방선균 BL93이 생산하는 항균성 물질을 분리할 때 항균성 화합물과 NH_4Cl간에 교환이 일어나는 경향을 파악하였다(Fig. 12).



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 12. Resolution of antibacterial compounds from actinomycete isolate BL93 by AG MP-50 cation exchange chromatography with a NH_4Cl gradient

시료를 양이온 교환 수지에 흡착시킨 후, NH_4Cl의 농도를 0.0M에서 1.0M까지 점진적으로 높여가면서 용출시켰을 때, NH_4Cl 농도가 약 0.3 M 부근에서 항균성 화합물이 처음으로 감지되었다. 위의 결과는 Borders(1975)의 보고에 의한 strepthrin-like antibiotics의 ion exchange chromatography의 경향과 유사하여 본 물질은 수용성 물질이며, 광범위한 항균활성을 가지는 물질임이 재 확인되었다.

5)항생물질의 UV 흡수 특성

활성 물질을 파장 190~500nm의 범위에서 scanning 하였다.
활성부위를 UV-scanning spectrum을 한 결과는 Fig. 13. 에 나타난 바와 같이 296nm에서 최대의 흡수대를 가지고 있었다. 이는 300nm 근처에서 nitroso화합물과 탄소화합물이 흡광한다는 Willard(1981)의 보고와 비교하여 볼 때 BL93 균주의 항균활성을 나타내는 화합물에도 nitroso화합물과 탄소화합물이 포함되어 있을 것으로 추정할 수 있었다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

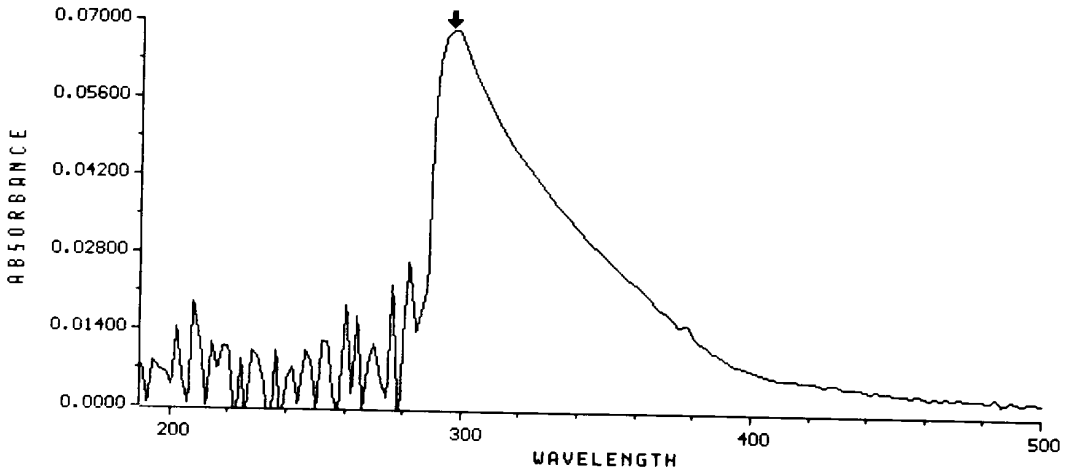


Fig. 13. UV absorbtion spectrum of the antibacterial compound from actinomycete BL93

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

6) 항생물질의 발색반응

정제된 시료를 TLC를 한 후에 여러 가지 발색시약에 대하여 발색반응을 측정한 결과 ninhydrin 에는 양성반응을 보이는 것으로 보아 아미노 그룹이 함유되어 있을 것으로 추정된다.

이상의 결과를 종합하여 BL93 compound는 수용성이며, 탄소화합물과 nitroso기를 가지고 있으며, 아미노 group이 함유되어 있을것으로 추정된다. 또한 내열성이 강한 것으로 보아 고분자 물질보다는 저분자 물질로 이루어져 있을 것으로 추정된다.

IV. 요약

본 연구에서는 새로운 항생물질의 탐색을 목적으로 제주도의 토양에서 분리된 방선균 307주를 각각 배양하여 이 배양액을 대상으로 *Escherchia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas solanacearum*에 대해서 선택적으로 항균활성을 나타내는 방선균 10개 균주를 1차 선별하였으며, 1차 선별된 균주중에서 가장 높은 항균 활성을 보이는 BL93 균주를 최종선별하였다. 또한 BL93 균주를 동정하고, 이 방선균이 생산하는 항생물질 분리정제에 대한 연구를 수행하였다.

ISP법에 따른 균주 동정결과 *Streptomyces sp.*로 추정되었다.

배양조건은 28℃에서 200hrs 후, pH는 4.5 였을 때 항생물질이 최대로 생산되었다.

항생물질을 정제하기 위해서 양이온 교환수지인 AG MP-50을 선택하여 ion exchange column chromatography를 실시하였으며, 용출용 용매로는 NH_4Cl 용액을 사용하였으며, 염농도 0.3M 부근에서 활성물질이 처음으로 감지되었다. 탈염 조건으로 ultra gel permeation chromatography를 실시하여 활성 물질을 분리 하였으며, 이 활성물질의 UV-spectrum은 296nm에서 최대 흡광도를 나타내었다. 그리고 이 물질은 ninhydrin 반응에 양성반응을 보였고, pH 및 열에 비교적 안정하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

참고문헌

안종석, 이영선, 안순철, 이정형, 이지행, 윤병대, 민태익, 1992. Actinomycin계열 항생물질 MT-497을 생산하는 방선균 분리주 No. 497의 동정. 한국산업미생물학회지, 19(6), 561~567.

Berdy J., 1989. The discovery of new bioactive microbial metabolites: screening and identification. Bushell M. E. and U. Grafe(ed..), pp. 3~25.

Borders, D. B., Ion-exchange chromatography of streptothricin-like antibiotics. *In: Method in enzymology 43 권. Antibiotics*, 1975. 425 pp.

Cooper, T. G., 1977. The tools of biochemistry. A wiley-interscience publication, pp. 136~193.

Demain, A. L. and E. Inamine, 1970. Biochemistry and regulation of streptomycin and mannosido streptomycinase. *Bacteriological Reviews*, 34(1), 1~19.

Diez, B., E. Mellado, M. Rodriguez, R. Fouces, J. L. Barvedo, 1997. Recombinant microorganism for industrial production of antibiotics. *Biotech. Bioengin.*, 55(1), 216~225.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fairbrother, R. W., and G. Martin, 1951. Disc method for determining sensitivity to antibiotics. *J. Clin. Path.*, 4, 374~378.

Fujh, N., F. Tanaka, Y. Yamashita, T. Ashizawa, S. Chiba and H. Nakano, 1997. UCE 6, a new antitumor antibiotic with topoisomerase I-mediated DNA cleavage activity produced by Actinomycetes : Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J. Antibiot.*, 50(6), 490~495.

Gallo, M. and E. Katz, 1972. Regulation of sencondary metabolite biosynthesis: Catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose. *J. Bacteriol.*, 109(2), 659~667.

Gerhardt, P. R., G. E. Murray, W. A. Wood and N. R. Krieg, 1994. Methods for general and molecular bacteriology. American society for Microbiology, pp. 409~417.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

홍순광, 1995. 방선균의 2차 대사 및 형태분화. 미생물과 산업, 21(1), 34~42.

Hasegawa, T., M. Takizawa and S. Tanida, 1983. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 29, 319~322.

Horan, A. C., M. C. Shearer, V. Hegde, M. L. Beyazova, B. C. Brodsky, A. King, R. Berrie, K. Cardaci and M. Nimeck, 1997. A family of novel macrocyclic lactones, the saccharocarcins produced by *Saccharothrix aerocolonigenes* subsp. *antibiotica*. *J. Antibiot.*, 50(2). 119~125.

Huddleston, A. S., N. cresswell, M. Cristina, P. Neves, J. E. Beringer, S. Baumberg, D. I. Thomas and E. M. H. Wellington, 1997. Molecular detection of streptomycin-producing streptomycetes in Brazilian soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(4), 1288~1297.

Hotta, K. and Y Okami., 1996. Diversity in aminoglycoside antibiotic resistance of actinomycetesand its explioitation in the search for novel antibiotics. *J. Indus. Microbio.*, 17, 352-358.

김소연, 박동진, 권오성, 임채영, 김판경, 이상화, 김창진, 1996. 국내 분리 방선균의 항균활성 특성. 한국산업미생물학회지, 24(2), 166-172.

김원곤, 김종평, 김창진, 유익동, 1996. *Streptomyces tubercidicus* ME-9189 균주가 생산하는 nucleoside계 제초 활성 물질. 한국산업미생물학회지, 24(1), 82~86.

김창진, 1997. 산업적 유용 방선균의 분리 및 분류. 생물산업, 10(2), 34~43.

제주대학교 중앙도서관

김창진, 이형규, 김영호, 김시관, 서영배, 이현선, 윤봉식, 1996. 신물질 탐색. 자유아카데미, pp. 391~417.

Kim, K. H., Y. A. Joe, S. R. Choi and Y. M. Goo, 1989. Comparative stuides on Streptomycin producing strains and media, *Korean J. Biotechol. Bioeng.*, 4(2), 162-166.

이동선, 하상철, 신우창, 김태호, 김홍중, 박용하, 김종국, 홍순덕, 1995. DNA Topoisomerase I inhibitor를 생산하는 방선균 분리균주의 수리동정. 한국산업미생물학회지, 23(2), 123~130.

이동희, 박숭림, 권태종, 정호권, 1991. *Streptomyces sp.* LAM-593이 생산하는 수용성 항진균성 항생물질. 한국농화학회지, 34(2), 180~186.

Labeda, D. P., M. D. Lechevalier, and R. T. Testa, 1997. *Streptomyces stramineus sp.* a new species of the verticillate streptomycetes. *Int. J. Sys. Bac.*, 47(3), 747~753.

Lechevalier, M. P., and H. Lecheavalier, 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic Actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 20, 435~443.

Lociuro S, P. Tavecchia, E. Marzorati, P. Landini, B. P. Goldstein, M. Denaro, R. Ciabatti, 1997. Antimicrobial activities of chemically

제주대학교 중앙도서관

modified thiazolly peptide antibiotic MDL 62,879(GE2270A), *J. Antibiot.*, 50(4), 6~9.

문성훈, 하상철, 이동선, 김종국, 홍순덕, 1995. Angiotensin converting enzyme(ACE)저해제를 생성하는 방선균 분리주의 동정 및 최적 발효조건. 한국산업미생물학회지, 23(4), 439-445.

Ma S. J., J. H. Kuk, B. S. Ko and K. H. Park, 1996. Isolation and characterization of antimicrobial substances from Bark of Aralia elata, *Ann. RCNBMA*, 5, 134~140.

박경수, 1992. 밭 토양에서 분리한 방선균의 생리적 특성. 한국토양학회지, 25(4), 394~400.

박부길, 1992. *Streptomyces* sp. 182-27 균주가 생산하는 아미노산 대사길항물질의 정제와 특성. 한국산업미생물학회지, 20(3), 335~343.

Parry, R. J., and W. Li, 1997. Purification and characterization of isobutylamine N-Hydroxylase from the Valanimycin producer *Streptomyces viridifaciens* MG456-hF10. *Archives of biochemistry and biophysics*, 339(1), 47~54.

Perkins, H.R., 1982. Vancomycin and realated antibiotics. *Phamacology and Therapeutics*, 16, 181-197.

제주대학교 중앙도서관

Pusecker, K., H. Laatsch, E. Helmke and H. Weyland, 1997. Dihydrophencomycin methyl ester, a new phenazine derivative from a marine *Streptomycete*. *J. Antibiot.*, 50(6), 479~483.

류병호, 이주화, 신동분, 김동석, 1992. *Streptomyces* S-217에 의한 Tryosin 저해물질의 생산 및 정제. 한국산업미생물학회지, 20(5), 534~542.

Reading, C. and M. Cole, 1977. Antimicrobial Agents and Chemother., 11, 852.

Routien, J. B., 1961. Distribution of Streptomycetes that produce antibiotics. *J. Bacteriol.*, 81, 218~222.

서원나, 박정희, 이지영, 김인섭, 이계준, 배 무, 1996. 진균 세포벽 형성 저해물질 생성 *Streptomyces*속 세균의 분리 및 동정. 한국 산업미생물학회지, 24(1), 27-36.

신진이, 박재홍, 배동훈, 유주현, 1995. 항암성 항생물질을 생산하는 토양 방선균 YBE-316의 분리 및 동정. 한국산업미생물학회지, 23(3), 297~303.

Schartz, A., E. Bugie and S. A. Waksman. 1944. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

gram-negative bacteria. *Proceeding of the society for experimental biology and medicine.* 55, 66~69.

Schleifer, K. H and Kandler, 1977. *Bacteriol. Rev.,* 36, 407~477.

Shirling, E.B. and D. Gottlieb, 1966. Method for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.,* 16, 313-340.

Stanley, T. W., M. E. sharpe, and J. G. Helt, 1989. Bergey' mannual of systematic Bacteriology, Vol. 4, William and wilkinstimore, U.S.A.

Sykes, R. B., Wells, J. B., 1985. Screening for β-lactam antibiotics in nature. *J. Antibiot.,* 38, 119~121.

Tanaka, H., K. Matsuzaki, H. Nakashima, T. Ogino, A. Matsumoto, H. Ikeda, H. B. Woodruff and S. Omura, 1997. Chloropeptins, new anti-HIV antibiotics inhibiting gp 120-cd4 binding from *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.*, 50(1), 58~65.

Weaver, J. R., and P. A. Pattee, 1964. Inducible resistance to erythromycin in *Staphylococcus aureus. J. Bacteriol.*, 88(3), 574-580.

Weisblum, B., C. Siddhikol, C. J. Lai and V. Demohn., 1971. Erythromycin-inducible resistance in *Staphylococcus aureus* :

제주대학교 중앙도서관

Requirements for induction. *J. Bacteriol.,* 106(3), 835~847.

Williams, S. T., J. G. Holt, N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, 1989. Bergey's Mannual of determinative Bcteriol. 9th ed., pp. 605-703.

Williams, S. T., M. E. Sharpe, J. G. Holt, 1989. Bergey's Mannual of Syst. Bacteriol. 8th., Williams and Wilkins Co. pp. 2299~2617.

Williams, S. T., M. Goodfellow, G. Alderson, E. Wellington, Sneath, M. H. & M. J. Sackin, 1983. Numerical classification of Streptomyces and related genera. *J. Microbiol.,* 129, 1743-1830.

윤봉식, 김창진, 이인경, 히로유끼 고시노, 유익동, 1996. *Streptomyces* sp. 3D3 균주가 생산하는 항고추병성 항생물질. 한국산업미생물학회지, 24(1), 77~81.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY