

韓國 土壤菌叢 抗生物質 生成菌에 관한 研究(第4報)

스트렙토마이세스屬 菌株 DMC-42의 分離 및 그 抗菌作用

金華基 · 金禎禹 · 金河元 · 崔應七 · 金炳珪

서울대학교 藥學大學 微生物藥品化學教室

Studies on Antibiotic Producers of Korean Soil Microbes(IV)

Isolation and Antibiotic Activity of *Streptomyces* Strain DMC-42

Hwa Ki Kim, Jung Woo Kim, Ha Won Kim, Eung Chil Choi and

Byong Kak Kim

Department of Microbial Chemistry, College of Pharmacy

Seoul National University, Seoul 151, Korea

Abstract: To find antibacterial strains of the soil microorganisms in Korea, they were isolated from the soil samples of different locations and screened for antibacterial activity against several standard microorganisms. An isolate among them had antibacterial activities against gram-positive and gram-negative bacteria. The examination of its morphological, biochemical, cultural and physiological characteristics according to the International Streptomyces Project methods showed that it belongs to the genus *Streptomyces*. This strain appears to be a novel strain when it was compared with those species of the genus which have been so far reported. The antibiotic metabolite was produced in the submerged culture of the strain. This metabolite was extracted from the culture filtrate and purified by ion-exchange column chromatography. Physico-chemical properties of the antibacterial metabolite were characterized.

Keywords: *Streptomyces*, strain DMC-42, Antibiotic activity, Microbial metabolite.

항생물질이 화학요법제로 각광을 받기 시작한 이래 새로운 항생물질을 발견하기 위하여 꾸준히 screening이 진행되어 왔다.

항생물질 생성균은 Fleming이 *Penicillium notatum*에서 penicillin을 분리한 이래 Schatz등이 *Streptomyces*의 발견을 비롯하여 항생물질을 생산하는 *Streptomyces* 속균의 분리가 많으며 오늘날에 있어서도 계속적으로 새로운 항균성 미생물의 분리가 이루어지고 있다.

*Streptomyces*속균은 항생물질을 생산하는 토양 미생물의 약 60%를 차지하고 있어서 이들에 대한 특허와 약간의 물리적 변화만으로 새로운 종으로 설정하는 사례는 이들에 대한 분류에 커다란 문제로 되어왔다. 그래서 그러한 문제점을 해결하려는 노력으로 1966년부터 1977년에 걸쳐 Shirling의 주도하에 세계 18개국 40

여 실험실에서 International Streptomyces Project(=ISP)를 통해서 지금까지 보고된 모든 종을 통일된 실험방법과 분류방법에 의하여 재분류한 결과 1974년까지는 458종으로 발표하였고 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(1974)에는 416종 47아종이 수록되었다. 한국의 토양에서 분리한 *Streptomyces*속의 분류 및 동정에 관한 연구로는 Lee등(1976)이 24종을 분류, 동정하였고 Cho등(1977)도 6종을 분리, 동정하였다. 또한 Seo등(1977)도 항생물질 생산 *Streptomyces*의 분리 및 동정에 관한 연구에서 *S. albus* subsp. 혹은 *S. globosus*를 동정하였고 항생물질은 paper chromatography를 통해서 tetracycline으로 확인하였다. 그러나 균을 동정하는데 있어서 제일 먼저 확인하여야 할 세포벽성분의 분석을 시행치 않았으며 항균성분에 관한 연

구도 제대로 분리, 정제를 시행치 않은 상태이다. 이에 저자들은 우리나라 토양 중에서 항균력이 있는 *Streptomyces*속을 분리하여 세포벽성분 분석을 시행하였고 ISP의 통일된 개념에 준하여 동정하였으며 이 균주를 대량으로 액내배양하여 생산된 항생물질을 column chromatography를 통하여 분리, 정제하였고 이 물질의 물리, 화학적인 성질 및 항균 범위 등에 관하여 연구하였으므로 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

항균성 물질 생성 균주의 검색

1) 토양 시료

전국 각지의 토양을 채취하였으며 지표면에서 5~10 cm사이의 건조한 토양을 채취하였다.

2) 배 지

Oat meal agar배지(Oat meal 20 g, distilled water 1,000 ml, agar 20 g)를 균 분리용 배지 및 보존배지로 사용하였으며 항균 실험용 배지로는 Nutrient agar 배지(Nutrient broth 8 g, agar 20 g, distilled water 1,000 ml)를 사용하였다.

3) 항균력 검사 균주

항균력의 검사에 사용한 균주는 서울대학교 의과대학에서 분리, 동정하여 분양된 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis* 등이었다.

4) 분리 방법

토양 시료 1g정도를 멸균 시험관에 채취하여 멸균 증류수 10 ml를 무균적으로 주입하고 강하게 진탕후 이 중 1 ml를 취하여 9 ml의 증류수가 든 멸균 시험관에 넣고 희석후 다시 같은 방법으로 희석하여 1,000배 희석액 및 10,000배 희석액을 만들었다. 이 중 1 ml를 취하여 Oat meal agar배지 위에 도말하고 27 ± 1 °C에서 3일간 배양하였다.

생성된 방선균의 colony를 취하여 oat meal agar slant에 옮겨 3일 배양하였다.

5) 항균 실험

분리한 균주를 oat meal배지에 4일간 액내 배양후 여과하여 배양액과 균체를 나누고 균체는 건조후 acetone으로 추출하였다. 배양액과 acetone 추출액은 paper dick (Toyo Seisakusho Co., Ltd., Tokyo, Japan)에 50 μl씩 취하여 실험용 disk를 만들었다. 항균력 검사균주를 Nutrient broth에 1일간 배양하여 각각 1 ml씩 취하여 N.B. agar배지에 200 ml로 희석하여(200 : 1) Petri-

dish에 10ml씩 취하여 항균 실험용 배지를 만들었다.

이들 배지에 배양액과 acetone추출액의 disk를 각각 올려 놓은후 1일간 배양하여 그 저지원의 크기를 측정하였다.

Strain DMC-42 균주의 분류 및 동정

1) 생화학적 실험

세균종 Strain DMC-42로 명명된 균주를 Staneck 등(1974)이 실시한 방법으로 다음 실험을 실시하였다.

i) Diaminopimelic acid(DAP) isomer의 동정

DMC-42를 Yeast extract-malt extract배지에서 3일간 배양하여 얻은 배양물을 감압여과하여 균체를 얻었다. 균체를 동결 건조한 후 밀봉용기에 건조균체 3 mg과 6 N염산 1 ml를 넣은후 100 °C로 18시간 동안 가열 가수분해 하였다. 가수분해물을 냉각 시킨후 여과지를 이용하여 여과하였다. 여액을 40 °C에서 감압농축하고 잔류 염산을 완전히 제거하기 위하여 증류수 소량을 넣어 용해시킨 후 다시 농축하였다. 농축물에 소량의 증류수를 넣어 용해시켜 cellulose plate(microcrystalline)에 5 μl정도를 spot 하였다. 이것을 methanol : water : 10N HCl : pyridine(80 : 17.5 : 2.5 : 10 by volume)의 용매계에서 전개시켰다. spot 확인은 acetonic ninhydrine(0.1%w/v)을 분사 시킨후 100 °C에서 2분간 가열하였을때 나타나는 olive green→노란색으로 하였다. 표품으로는 Sigma사 제품인 DL-α, E-DAP를 사용했다.

ii) 단당류의 동정

단당류의 분석을 위하여 동결건조된 cell액 25 mg을 1 N황산 1.5 ml와 함께 밀봉용기를 넣은 다음 2시간동안 100 °C에서 가수분해 시켰다. 냉각 후 가수분해물을 원심분리 tube에 옮긴후 pH가 5.2~5.5가 될때까지 포화 Ba(OH)₂를 가하였다. 침전물을 원심분리에 의하여 제거한 후 상등액을 농축하고 0.3 ml의 증류수를 가하였다.

이 가수분해물 1 μl를 cellulose plate에 spot하고 표품으로 1%의 galactose와 arabinose, xylose를 포함한 것과 *Mycobacterium smegmatis*의 가수분해물을 사용하였다. 이를 n-butanol : distilled water : pyridine : toluene(10 : 6 : 6 : 1, v/v)의 용매계에서 전개시켰다. spot 확인을 위해서 acid aniline phthalate를 사용하였다.

2) 형태학적 특징

i) 고체 배지상에서의 성장 형태

① 배지 : Yeast extract-malt extract agar, Oat meal agar, Inorganic salts-starch agar, Glycerol-asparagine

agar, Glucose-asparagin agar, Glucose-peptone agar, Glucose-nitrate agar배지를 ISP methods에 의해 조제 사용하였다.

배지의 조성은 다음과 같다.

a) Yeast extract-malt extract agar(ISP No.2 medium) : Yeast extract 4.0 g, Malt extract 10.0 g, Glucose 4.0 g, Agar 20.0 g, Distilled water 1,000 ml.

b) Oat meal agar(ISP No.3 medium) : Oat meal 20.0 g, Agar 18.0 g, Distilled water 1,000 ml.

c) Inorganic salts-starch agar(ISP No.4 medium) : Souble starch 10.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g, K_2HPO_4 (anhydrous basic) 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g, NaCl 1.0 g, CaCO_3 2.0 g, Agar 12.0 g, Trace salts soln. 1.0 ml, Distilled water 1,000 ml.

* Trace salts solution: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, Distilled water 1,000 ml.

d) Glycerol asparagine(ISP No.5 medium) : Glycerol 10.0 g, L-Asparagine (anhydrous basic) 1.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, Agar 12.0 g, Trace salts soln. 1.0 ml, Distilled water 1,000 ml.

e) Glucose-asparagine agar(Krainsky's medium) : Glucose 10.0 g, Asparagine 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, Agar 15.0 g, Distilled water 1,000 ml.

f) Glucose nitrate agar : Glucose 5.4 g, NaNO_3 1.5 g, KH_2PO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, Thiamine. HCl 2 ml of a 1,000 ppm stock soln.

g) Glucose-peptone agar : Peptone 2.0 g, Glucose 10.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KH_2PO_4 0.5 g, Agar 15.0 g, Distilled water 1,000 ml.

② 실험 방법

DMC-42 균주를 각 배지에 동시에 접종하여 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 14일간 배양하여 성장의 정도와 성숙한 전체의 색깔 및 colony의 상면과 低面의 색깔, 용성 색소의 생성 여부 등을 관찰하였다.

3) 현미경 관찰

① 배지 : Oat meal agar

② 실험 방법

Petri dish에 배지를 부은후 cover glass 를 끼우고 멸균한 다음 DMC-42 균주를 접종하였다.

$27 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 14일간 배양한 후 cover glass를 빼내 현미경상에서 포자 사슬의 형태 및 배열 상태 등을 관찰하였다.

4) 생리적 특성

i) 탄소원 이용 여부 실험

Pridam 등의 방법(1948)에 의하여 실험하였다.

① 배지 및 탄소원

Trypton yeast extract broth (Pridham and Gottlieb, 1948) : Tryptone 5.0 g, Yeast extract 3.0 g, Distilled water 1,000 ml. Basal medium : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.64 g, KH_2PO_4 2.38 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5.56 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.00 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6.40 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.10 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7.90 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.50 mg, Agar 15.00 g

탄소원 : Milliporefilter에 의해 여과 멸균하여 10% 용액을 만들고 멸균하여 60°C 로 냉각시킨 basal medium의 최종 농도가 1%로 되게 첨가하였다. 사용한 당은 D-glucose, D-xylose, L-arabinose, L-rhamnose, D-fructose, D-galactose, raffinose, D-mannitol, inositol, salicin, sucrose 등이었다.

② 실험 방법

상기의 방법으로 각각의 당이 들어있는 배지를 만들고 DMC-42 균주를 Trypton yeast extract액체 배지에서 2일 배양후 만든 washed inoculum을 접종한 후 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 10~16일 배양하고 탄소원의 이용 여부를 관찰하였다. glucose가 들어있는 배지를 positive control로 하고 탄소원이 들어있지 않은 배지를 negative control로 하였다.

ii) Melanin 색소 생성에 관한 실험

① 배지

ISP방법에서 Shirling과Gottlieb가 1966년에 사용한 것으로 성분은 다음과 같다 : Glycerol 15.0g, L-Tyrosine 15.0 g, L-Asparagine 1.0 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 ml, Trace salts soln. 1.0 ml, Agar 20.0 g, H_2O 1,000 ml, pH 7.2~7.4

② 실험 방법

Petri dish에 상기 배지를 만들어 부은후 균한 다음 DMC-42 균주를 접종하여 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 1~2일간 배양 하였을때 colony 주위에 짙은 회색~청흑색의 색소가 생산되는가를 관찰하였다.

iii) 젤라틴 가수분해

① 배 지

0.4% gelatin을 첨가한 Nutrient broth agar배지를 사용하였다.

② 실험 방법

Gerhardt등의 방법(1981)에 의해 실험하였다.

상기의 배지에 균을 접종하여 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 3~4일

간 배양 한후 gelatin침전제인 15% HgCl₂ in 20% (v/v) HCl을 가하여 colony 주위에 투명부위의 생성 여부를 관찰하였다. 투명할 경우는 양성으로 하고 혼탁할 경우를 음성으로 하였다.

iv) 전분 가수분해

① 배 지

0.2% Soluble starch를 첨가한 N.B.배지.

② 실험 방법

Gerhardt등의 방법(1981)에 의해 실험하였다.

상기 배지에 DMC-42 균주를 접종하고 27 ± 1°C에서 3~4일간 배양한 후 iodine soln을 가하여 colony 주위를 관찰하여 무색이면 양성으로 하고 청색이면 음성으로 하였다.

DMC-42 균주의 배양과 항균성물질의 항균범위 및 분리, 정제

1) DMC-42 균주의 배양

i) 배 지

Oat meal 배지를 사용하였다.

Oat meal 30 g, Trace salts soln. 1ml, Distilled water 1,000 ml, pH 7.0.

*Trace salts soln : FeSO₄·7H₂O 0.1 g, MnCl₂·4H₂O 0.1 g, ZnSO₄·7H₂O 0.1 g, Distilled water 1,000 ml.

ii) 종균 배양

Oat meal agar 배지에서 자란 균주를 무균적으로 분리하여 상기배지 10 ml를 가한 50 ml삼각 flask에 접종하여 27 ± 1°C에서 180 rpm으로 3일간 진탕배양하였다.

iii) 본 배양

상기 배지 100 ml를 포함한 500 ml 삼각 flask에 종균 배양액 10 ml를 접종하여 27 ± 1°C에서 180 rpm으로 5일간 진탕 배양하였다.

2) Time course 측정

위와 같은 방법으로 본 배양을 실시하여 1일부터 7일 경과 후에 성장의 변화와 pH의 변화 및 항균력의 변화등을 측정하였다.

성장 정도의 측정 방법은 배양액을 원심분리하여 균사의 부피를 ml/10 ml culture broth로 표시 하였고 항균력의 측정은 *Staphylococcus aureus*의 균 plate를 사용하여 생긴 지긴원의 크기를 mm로 표시하였다.

3) 항균 스팩트럼 검사

i) 사용 균주 : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus licheniformis*, *Streptococcus*

fragilis, *Mycobacterium smegmatis*, *Escherichia coli*.

ii) 배지 : Nutrient broth agar

iii) 방법 : 항균성 물질 생성균주 검색에 사용한 항균실험 방법을 적용하였다. 대조 항생물질로는 Ampicillin (2 mg/ml), Chloramphenicol(8 mg/ml), Gentamicin (0.2 mg/ml)을 사용하였다.

4) 항균성 물질의 분리 및 정제

5일간 배양한 culture broth를 여과지(Toyo Roshi Co.)를 통하여 여과한 다음 batch법에 의하여 active carbon (Fujizawa Pharm. Co.)으로 배양액을 처리하였다. 즉 배양액에 약 2%에 해당하는 active carbon을 가한 다음 30분간 강하게 흔들어서 여러가지 색소 물질을 흡착시키고 여과지를 통하여 여과하였다.

여액을 전처리한 Amberlite IRA-400 (OH⁻, Rohm and Hass Co.)로 충전한 column (3.3×65)에 느린 속도로 통과시켰다. Column resin중에 부착된 불순물을 제거하기 위해 bed volume의 10배에 해당하는 탈이온수를 통과시켰다. 다음 bed volume의 약 3배에 해당하는 0.5 N NH₄OH로 활성 물질로 용출시켰다. active fraction을 농축 해서 Amberlite CG-400 (OH⁻, Rohm and Hass Co.) column(2.6×55)에 흡착시켰다. 1차로 bed volume의 3배에 해당하는 탈이온수로 column을 세척하고 2차로 bed volume의 10배에 해당하는 0.05 N NH₄OH로 세척하고 마지막으로 0.1 N NH₄OH 3배에 해당하는 양으로 세척하였다.

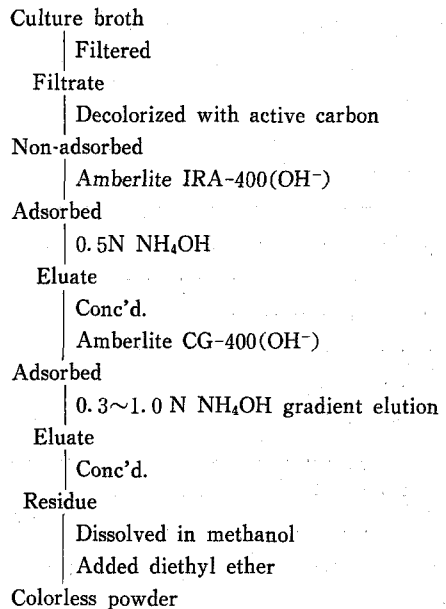


Fig. 1. Purification procedure.

세척이 끝난후 0.3~1N NH₄OH로 gradient elution 시켰다. 용출된 부분중 active fraction이고 TLC(용매 MeOH : CHCl₃=1 : 3) 상에서 단일로 확인된 부분만을 모아서 완전히 농축하였다. 농축물을 methanol로 녹인 다음 diethyl ether를 가하여 생성된 침전을 원심 분리하여 취하였다. 이 침전에 잔존하는 습기를 감압 농축에 의해 완전제거하여 무색의 분말을 얻었다. 분리, 정제 과정을 Fig. 1에 도시하였다.

5) 항균성물질의 기기분석 및 ninhydrin test

분리, 정제에 의하여 얻은 무색의 분말을 기기분석 및 ninhydrin test를 통해서 그 성질 추정에 이용했다.

사용기기 :

i) UV Spectra : Hitachi Model ESP-3 T, Reading spectrometer. 용매 : Distilled water.

ii) IR spectra : Beckmann IR-20 A, Neat법.

iii) NMR spectra : Varian FT-80 A; 용매 : D₂O; internal reference : DSS.

iv) Mass spectra : Hewlet-Packard 5985B, GC/MS system; 조건 : Source heating : 200°C, Electron beam :

70 eV 1,800 V.

결 과

균주 선발

100여종의 분리된 균주 중에서 oat meal 배지에 특히 잘 자라며 사용된 Gram positive균 중에서 *Staphylococcus aureus*에만 항균력을 나타내며 사용된 Gram negative 균중에서는 *Escherichia coli*에만 특이적으로 항균력을 나타내는 균주를 Strain DMC-42라 명명하였다.

Strain DMC-42의 분류 및 동정

세포벽 성분 분석 결과를 Fig. 2, 및 3에 도시하였다. 세포벽에는 L-DAP가 존재하였고 구성단당류 중 galactose나 arabinose, xylose등이 포함 되어 있지 않았다. 따라서 이 균주는 cell wall type I에 해당하였다. 형태학상의 특징은 먼저 여러가지 고체 배지상에서 자란 결과를 Table I에 표시하였다. I.S.P. 배지상에서는 비교적 성장이 양호하였고 균체의 색깔의 주종

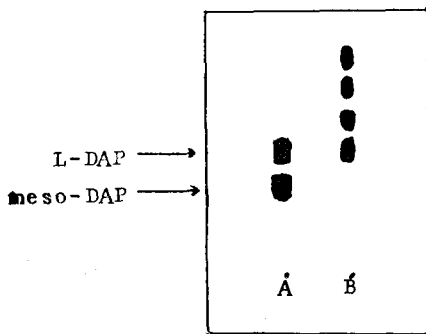


Fig. 2. Separation of DAP isomers by TLC. (A) standard DAP mixture, (B) strain DMC-42.

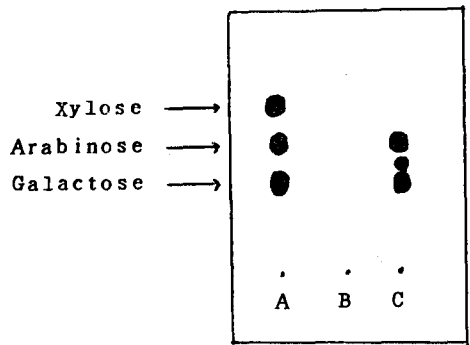


Fig. 3. Separation of monosaccharides in whole cell hydrolyzates. (A) standard mixture, (B) Strain DMC-42, (C) *Mycobacterium smegmatis*.

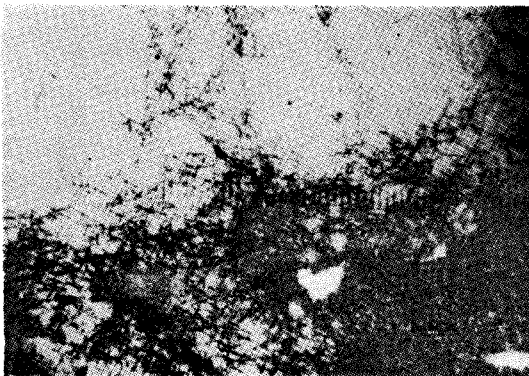


Fig. 4. Aerial mycelium of strain DMC-42(×150).

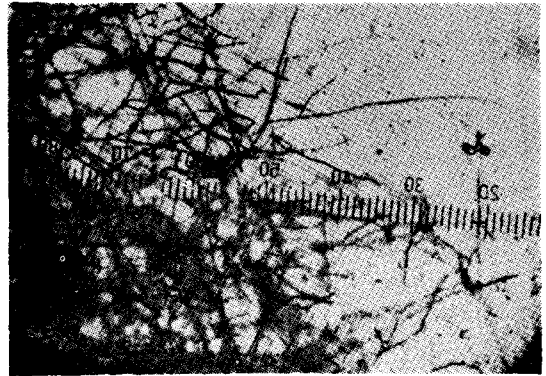


Fig. 5. Spore chain of strain DMC-42(×1500).

Table I. Cultural characteristics of *Streptomyces* DMC-42.

Medium	Growth	Reverse phase	Aerial mycelium	Soluble pigment
Yeast extract malt extract agar (ISP No. 2 medium)	good	brownish yellow	gray	brownish yellow
Oat meal agar (ISP No. 3 medium)	moderate	slightly gray	whitish gray	none
Inorganic salts-starch agar (ISP No. 4 medium)	good	slightly gray	whitish gray	none
Glycerol-asparagine agar (ISP No. 5 medium)	moderate	brownish yellow	white	brownish yellow
Glucose-asparagine agar	good	whitish gray	whitish gray	none
Glucose-peptone agar	moderate	gray	gray	none
Glucose-nitrate agar	poor	faint yellow	whitish gray	faint yellow

을 이루는 색은 회색이었으며 풍부한 공중균사가 관찰되었다. 또한 colony의 低面의 색깔은 옅은 노랑색을 관찰할 수 있을뿐 특별한 색은 관찰할 수 없었다. 용성색소도 특이한 색소를 관찰할 수 없었다.

현미경 관찰결과 포자사슬의 형태는 *rectus-flexibilis* (Fig. 4 and 5)임을 관찰하였고 포자사슬은 길며 21일 쯤에는 균사가 포자화하는 것을 관찰하였다. 또한 생리적인 특징으로는 melanin 색소를 생성치 않았고 전분과 제라틴을 가수분해시켰다.

탄소화합물 이용여부는 Table II에 그 결과를 표시하였다. 표에서 볼수있는 바와 같이 D-xylose와 D-fructose, D-galactose 및 sucrose를 강력하게 이용하는 반면 L-arabinose, L-rhamnose, D-mannitol, salicin 등은 이용치 않았다.

Strain DMC-42균주의 배양과 항균성물질의 항균 범위 및 물리화학적 특성

배양 실험 결과를 Fig. 6.에 도시하였다. 균의 성장은 3일 이후에 최대를 나타냈으며 항균력은 3일과 4일에 최대가 되었다가 5일 이후에 감소 되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 pH의 변화는 거의 없었으나 약간씩 산성으로 변하는 것을 관찰 할 수 있었다. 이 균주에 의해서 생성된 항균성물질의 항균범위는 사용한 gram positive균 중에서는 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923과 *Staphylococcus aureus* 6538에만 강력한 항균력을 나타냈으며 또한 사용된 gram negative균 중에서도 *Escherichia coli*에만 특이적으로 강력한 항균력을 나타냈다. 그 결과를 Table I에 표시하였다.

또한 이 물질의 물리, 화학적 특성은 염기성물질로 수용성이고 acetone에는 약간 누으며 chloroform이나 ether, benzene등에는 녹지않으며 흡습하는 성질을 가지고 있다. IR data에서 관찰할 수 있는 peak는 3300

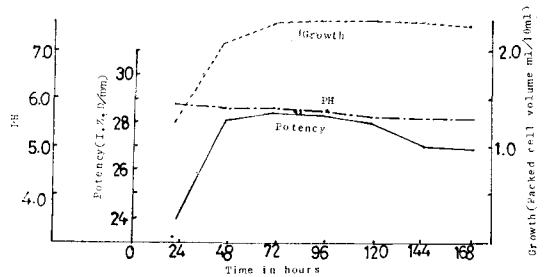


Fig. 6. Time course of strain DMC-42.

Table II. Carbon source utilization of *Streptomyces* DMC-42.

Carbon sources	
D-Glucose	+
D-Xylose	+
L-Arabinose	-
L-Rhamnose	-
D-Fructose	+
D-Galactose	+
Raffinose	±
D-Mannitol	-
Inositol	±
Salicin	-
Sucrose	+

(+ : utilized, ± : poorly utilized, - : not utilized)

~3400 cm⁻¹부분의 O-H신축진동, 2920 cm⁻¹ 부분의 C-H 신축진동, 1000~1100 cm⁻¹부근의 C-H, C-O의 변각 진동, 그리고 1650 cm⁻¹부근에서 C-O의 신축 진동을 관찰 할 수 있었다(Fig. 7). 또한 NMR에서는

Table III. Antibacterial spectrum.

Test Organism	Inhibition Zone Diameter(mm)			
	Culture Filtrate	Chloramphenicol (8 mg/ml)	Ampicillin (2 mg/ml)	Gentamicin (0.2 mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	24	24	21	12
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	27	23	24	13
<i>Streptococcus fragilis</i>	—	29	19	13
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	—	26	17	12
<i>B. megaterium</i>	—	21	13	12
<i>B. licheniformis</i>	—	22	14	12
<i>Sarcina lutea</i>	—	44	46	17
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	—	26	25	13
<i>Escherichia coli</i>	28	15	19	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	15	—	12

(— : no inhibition)

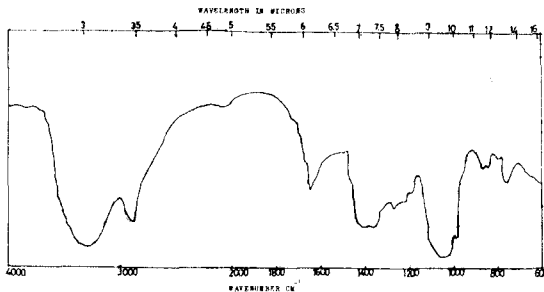


Fig. 7. IR spectrum.

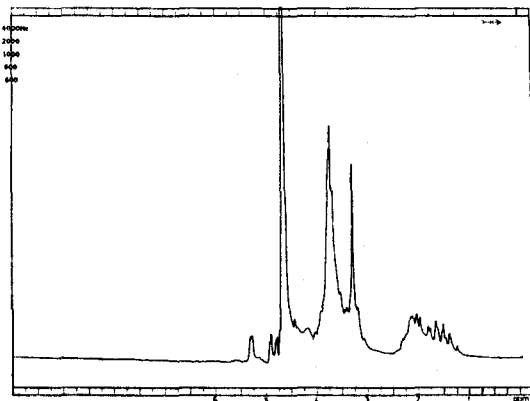


Fig. 8. 80 MHz PMR spectrum.

3.30 ppm에 N-CH₃에 의한 peak와 3.5~4.0 ppm에서 -OCH₃에 의한 peak 및 5.30 ppm에서 anomeric H에 의한 peak를 관찰 할 수 있었다(Fig. 8). 또한 UV scanning결과 UV흡수가 없었고 mass spectrum분석 결과 356에서 parent peak를 나타냈다. Ninhydrin test

결과 positive를 나타냈다. 이들 기기 data와 ninhydrin 결과 이 물질은 구조내에 당을 함유하고 있으며 amino기가 존재함을 알 수 있다. 따라서 이 물질은 aminoglycoside 계통의 항생물질로 인정된다.

고 찰

우리나라 토양에서 분리한 토양균인 Strain DMC-42 균주를 분류하는데 있어서, 제일 먼저 세포벽 성분을 분석하여 cell wall type I임을 알았다. cell wall type I에 해당하는 Actinomycetes로는 Streptomyces속과 Streptoveticillium속이 알려져 있으나, 이 균주는 현미경관찰 결과 Streptoveticillium속이 아니고 Streptomyces속임이 확인되었다. 따라서 이를 I.S.P.의 통일된 개념에 준하여 분류하였다.

즉, 균체의 주종을 이루고 있는 색깔은 회색이며 멜라닌 색소는 생성치 않았고 포자사슬의 배열형태는 Rectus-flexibilis임을 알 수 있다. 이러한 사실들을 기초로 하여 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology와 I.S.P.에 지금까지 기재되어 있는 종과 비교하여 종을 확정하려고 하였으나 탄소화합물의 이용에 있어서 type species와 일치하는 종을 찾을 수 없었다. 따라서 새로운 균주가 될 가능성이 크다고 사료된다.

그러나 Lee 등(1976)의 경우에는 탄소화합물의 이용에 차이가 있을 경우에는 각 배지에서 특성, 균체의 색깔, 포자사슬의 형태, 용성색소의 생성등의 기재를 참고로 하여 동정하였다. Lee 등(1976)의 방법에 의하

여 동정해보면 이 균주는 *Streptomyces avellaneus*와 가장 유사하였다. *Streptomyces avellaneus*는 최근에 보고된 균주로 연구가치가 충분히 있다고 생각한다.

이 균주에 의해서 생성된 항균성물질은 수용성이 높고 극성이 커서 IRA-400과 CG-400등의 ion-exchange column chromatography를 통하여 분리, 정제하였다. 또한 이물질의 기기분석을 시행하여 본 결과, IR spectrum이 나타낸 것은 구조내에 당이 존재한다는 것이다. 또한 NMR spectrum에서는 $-NCH_3$ 에 의한 peak가 나타나 있었으며, UV흡수는 전혀 없었다. 위와 같은 기기분석 data를 종합해 볼때 이는 aminoglycoside 구조의 항생물질로 인정된다.

Mass spectrum에서는 parent peak가 356으로 구조내에 당이 2개정도 존재하는 것으로 추정된다. 그러나 분리 및 정제과정에 있어서 대부분의 기지 aminoglycoside계통의 항생물질, 예로 Deushi등이 분리한 sporaricin(1979)과 같은 경우에, IRC-50과 CG-50 등을 사용하여 정제를 시행하였으나, 이 물질의 경우, IRA-400과 CG-400등을 사용해서 정제하였다는데 차이가 있다.

또한 이 물질의 항균 범위는 사용된 Gram양성균 중에서는 특이하게 *Staphylococcus aureus*에만 강력한 항균력을 나타내며, Gram 음성균중 특이하게 *Escherichia coli*에만 강력한 항균력을 나타내었다. 이러한 특성은 다른 aminoglycoside계통의 항생물질과 상이한 점이다.

이 물질이 왜 이와같이 단일종의 균에만 선택적으로 항균력을 가지고 있는가를 구명한다면, 매우 흥미로운 원리가 될 것이다. 또 이 물질의 특이한 성질중의 하나는 흡습하는 성질을 가지고 있다는 사실이다.

Aminoglycoside계통의 항생물질 중에 흡습하는 성질을 가지고 있는 항생물질로는 Iwasa등이 분리한 validamycin(1970)이 있다. validamycin은 이 물질과 IR spectrum의 pattern이나 물리적, 화학적 성질등이 유사하지만 항균범위에 현저한 차이가 있었다. 따라서 이 물질이 신물질일 가능성이 높다고할 수 있다. 이 물질의 항균력이 대단히 강하며, 특이한 항균범위를 가지고 있기 때문에 앞으로 실용화될 가치가 있다고 생각하며, 더 연구를 진행코져 하는 바이다.

적 요

한국 토양 균 중에서 항균력이 있는 토양균을 분리하여 균 동정을 실시하였고 생성된 항균성 물질에 관해

실험하였던 바, 이 균주는 *Streptomyces*속 임이 확인되었고 동정 결과 type species와 일치하는 것은 없었으나 *Streptomyces avellaneus*와 가장 유사한 것으로 동정되었다. 이 균주에 의해서 생성된 항균성 물질의 항균범위는 사용된 Gram-positive균 중에서 *Staphylococcus aureus*에만 항균력을 나타내며 사용된 Gram-negative균 중에서는 *Escherichia coli*에만 항균력을 나타냈다. 이 균주에 의해 생성된 항균성 물질을 ion-exchange column chromatography 등을 통하여 분리, 정제하였고, 여러가지 물리, 화학적 성질을 관찰해 본 결과 aminoglycoside계통의 항생물질로 인정되었다.

감사의 말씀

이 연구에 소요되는 경비의 일부는 産學協同財團의 연구비로 충당되었으며 이 지원에 대하여 깊이 감사하는바이다. 이 논문을, 우리의 연구를 격려하여 주셨던 서울大學校 藥學大學 名譽教授 故 金泳根博士님께一周忌를 맞이 하여 올리는 바입니다.

문 헌

- Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., Cowan, S.T., Holt, J.G., Liston, J., Murray, R.G.E., Niven, C.F., Ravin, A.W. and Stanier, R.Y. (1974): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins Company, Baltimore, pp.599-881.
- Cho, S.H., Ahn, C.S. and Kwon, Y.H. (1977): The isolation and identification of some *Streptomyces*. *Kor. J. Microbiol.* 15:170-175.
- Deushi, T., Iwasaki, A., Kamiya, K., Kunieda, T., and Mizoguchi, T. (1979): A new broad-spectrum aminoglycoside antibiotic compound, Sporaricin. *J. Antibiotics* 32:173-179.
- Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg N.R., and Phillips, G.B. (1981), *Manual of Method for General Bacteriology*, American Society for Microbiology, Wash., D.C., pp.415-422.
- Iwasa, T., Yamamoto, H., and Shibata, M. (1970): Studies on validamycin, new antibiotics. *J. Antibiotics* 23:592-602.
- Kim, J.C., Kim, J.H., Kim, J.W., Kim, H.W., Lee,

- C.O., Choi, E.C., and Kim, B.K. (1984): Studies on antibiotic producers of Korean soil microbes (III). *Seoul Univ. J. Pharm. Sci.* 9:20-30.
- Kim, J.W., Choi, E.C., and Kim, B.K. (1984): Studies on antibiotic producers of Korean soil microbes(II). *Kor. J. Mycol.* 12:85-92.
- Kim, K.W., Choi, E.C., Shim, M.J., and Kim, B.K. (1984): Studies on antibiotic producers of Korean soil microbes(I). *Kor. J. Pharmacogn.* 15:15-23.
- Lee, D.Y., Kim, S.W., and Ko, K. (1981): Studies on the development of antibiotic-producing *Streptomyces* in western area of Korea. *Kor. J. Mycol.* 9:103-108.
- Lee, M.J., Hah, Y.C., and Ahn, C.S. (1976): Studies on the isolation and identification of genus *Streptomyces*. *Kor. J. Microbiol.* 14:25-35.
- Pridham, T.G. and Gottlieb, D. (1948): The utilization of carbon compounds by some *Actinomycetales* as an aid for species determination. *J. Bacteriol.* 56:107-114.
- Seo, Y.M., and Hong, S.W. (1977): On the isolation of antibiotic-producing *Streptomyces* sp. from soil. *Kor. J. Microbiol.* 15:93-99.
- Shirling, E.B., and Gottlieb, D. (1966): Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Intern. J. Syst. Bac.* 16:313-340.
- Staneck, J.H., and Roberts, G.D. (1974): Simplified approach to identification of aerobic *Actinomycetes* by thin layer chromatography. *Appl. Microbiol.* 19: 226-231.

<Received January 7, 1985;

Accepted February 4, 1985>