

## 항생물질을 생성하는 토양균의 대량 검색을 위한 새로운 방법

구양모 · 이윤영\* · 조영애 · 이영복 · 정원운 · 이창훈 · 고영선 · 조희영 · 정연숙  
서울대학교 약학과, \*서울대학교 화학과

(Received May 29, 1991)

### A New Method for the Screening of Soil Microorganisms Producing Antibiotics

Yang Mo Goo, Youn Young Lee, Young Ae Joe, Young Bok Lee, Wonyun Chung,  
Chang Hoon Lee, Young Sun Koh, Hee Yeong Cho and Youn Sook Chung

*Department of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea*

*Department of Chemistry, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea*

**Abstract**—A new agar-disk method was developed from the fast selection and characterization of antibiotic producing organisms.

**Keywords** □ Assay of antibiotic producing organism, agar-disk method, antibiotic.

신 항생물질을 생산하는 균주를 찾아내기 위하여서는 먼저 적절한 토양을 채취하여야 하고 이 토양에서 특정한 미생물을 선별적으로 배양하는 기술이 필요하다. 이와 더불어 선별적으로 자란 토양균을 짧은 시일내에 많은 수를 순수배양한 후에 항생물질의 생산여부를 검색하는 것이 요청된다. 신 항생물질을 생산하는 토양균을 선별하여 낼 때 기존에 알려진 항생물질을 생성하는 토양균을 선별해 내어 장기간에 걸쳐 항생물질을 분리하는 연구를 수행한 후에 얻은 항생물질이 기존에 알려진 항생물질임을 발견하는 경우가 많이 생겨나고 있다. 이 뿐만 아니라 토양시료를 증류수에 희석한 후에 아가판위에 펼쳐 배양하면 상이하게 보이는 콜로니를 선별하여도 실제 동일한 종의 균주가 많이 얻어질 뿐만 아니라 최종 선별한 항생물질을 생성하는 균주들도 동일한 균주들일 수 있어 동일한 균주로 항생물질의 분리 및 구조연구를 수행할 수가 있다.

이런 문제를 극복하기 위하여서는 토양균주들 중에 특정한 종을 선택적으로 선별하거나 또는 특정한 항균활성을 가지고 있는 항생물질을 생산하는 토양균을

선별하는 것이 요청된다. 이를 위하여서는 기존에 알려진 항생물질들의 항균스펙트럼을 포함하는 항생물질 database의 구축이 요청된다. 항생물질을 생산하는 균주로 선별된 균주들 중에 동일한 균주가 다중으로 검색되기 때문에 동일한 균주가 동시에 선별되는 확률을 최소화하는 방법의 개발이 절실히 요구되고 있다. 또한 항생물질의 연구에서는 짧은 시일에 많은 수의 균주를 검색하여 신 항생물질을 생산하는 균주를 찾아낼 수 있는 새로운 protocol의 개발이 요청되고 있다. 이런 문제를 염두에 두고 신 항생물질을 생성하는 토양균주를 검색하는 새로운 방법인 아가 디스크법을 개발하여 사용하여 왔다. 이 방법을 사용하여 우리는 최근에 국내의 다양한 지방의 토양을 채취하여 항생물질을 생산하는 토양균을 대대적으로 검색하여 선별하여 왔다. 본 속보에서는 이 아가 디스크법을 보고하고자 한다.

아가 디스크법은 항생물질을 생산하는 토양균의 많은 수를 빠른 시일내에 검색할 수 있을 뿐만 아니라 토양균이 생성하는 항생물질의 항균스펙트럼을 선별하는 과정중에 얻을 수 있어 토양균이 생성하는 항

생물질의 항균효력의 강도 및 또한 어떤 종류의 균들에 항균효력이 있는지를 얻을 수 있고 또한 항생물질 생산균주의 검색단계에서 항생물질의 용도를 쉽게 짐작할 수 있어 기존에 사용하는 방법보다 월등히 나은 것으로 생각된다. 본 아가 디스크법은 쉽게 그리고 적은 노동으로 많은 토양균을 검색할 수 있다는 사실이 무엇보다 더욱 중요한 잇점일 것이다. 또한 기존에 보고된 항생물질 생산균주들의 항균스펙트럼을 아가 디스크법에 의하여 얻으면 이를 database화 하고 얻은 항균스펙트럼을 이들의 값과 비교하면 선별한 토양균이 생성하는 항생물질이 신 항생물질인지 쉽게 구분할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 항생물질을 생성하는 균주들을 선별할 때 동일한 균주가 선별될 가능성을 최소화하여 동일한 균주로 항생물질을 분리하고 구조를 연구하는 일을 반복하는 것을 피할 수 있다.

항생물질을 생산하는 토양균을 얻기 위하여 먼저 토양을 채취하여 잘 말린 후에 1g을 증류수 1 ml에 현탁하고 10배로 희석하였다. 희석액 100  $\mu$ 를 actinomycetes 선별 아가<sup>1)</sup>판에 도말하여 준다. 이 아가판을 29°C로 유지한 항온실에서 일주일간 배양한 후에 생장한 콜로니를 상온에서 일주일간 보관하여 두어 포자를 얻었다. 포자를 V-8 아가<sup>2)</sup>디스크에 옮겨 배양하였다. V-8 아가 디스크는 25 mm 직경의 punch로 V-8 아가판을 찍어 만들었고 아가 디스크 외에 나머지 아가는 페트리 디쉬에서 제거하였다. 25 mm 직경의 아가 디스크를 다시 punch로 찍어 주어 6.3 mm 직경의 아가 디스크 7개를 얻었다. 6.3 mm 직경의 아가 디스크는 25 mm 직경의 아가 디스크 내에 그대로 두고 아가 디스크 전체에 actinomycetes 선별배지에 배양한 후에 콜로니로 관찰된 균주를 옮겨주었다. 이 아가 디스크를 29°C의 항온실에 보관하여서 균주를 4일간 배양시켰다. 항균효력 검사균주가 함유되어 있는 아가판위에 항생물질의 생산여부를 검사하려는 균주가 생장해 있는 아가 디스크에서 직경이 6.3 mm인 아가 디스크를 떼어 옮겨주고 29°C에서 배양하여 주었다. 3일간 배양한 후에 아가 디스크 주위에 생성된 검색균주의 생장억제영역의 직경을 측정하였다. 이 전체 과정에 대한 사진이 Fig. 1에 보이고 있다. 항생물질 생산검사에 쓰이고 남은 아가 디스크는 일주일 이상 배양한 후에 콜로니 주위에 생성된 색소나 콜로니 표면의 색깔 또는 모양을 조사하여 기록하여

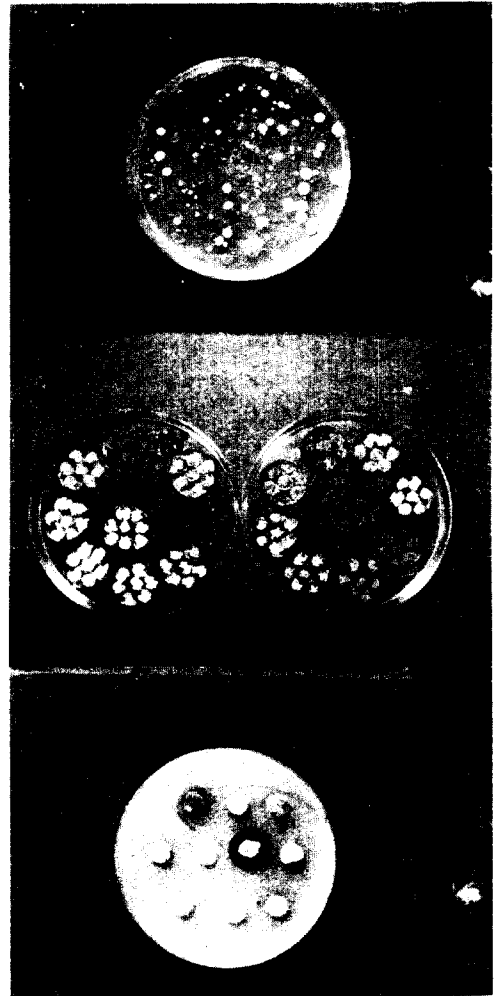


Fig. 1—The Agar disk method for the screening of antibiotic producing soil microbes. A: selective culture of actinomycetes, B: culture on agar disks, C: antibiotic activity assay

선별한 콜로니들이 동일 균주인지 구별하는데 사용하였다.

본 속보에 보고하는 아가 디스크법을 이용하면 적은 노동으로 한번에 한 사람이 수천개의 토양균주들이 항생물질을 생성하는지 검사할 수 있어 다른 방법에 비하여 짧은 시간에 훨씬 많은 균주를 검색하여 항생물질을 생성하는 균주를 찾을 수 있다. 또한 아가 디스크에 토양균의 콜로니를 순수배양할 수 있는 이 점도 있고 25 mm 직경의 아가 디스크내에 6.3 mm 직경의 아가 디스크를 7개를 얻어서 각각을 상이한

**Table I**—Examples of the antibacterial spectra and other characteristics of some selected soil microorganisms producing antibiotics.

SNUS <sup>1</sup>	G <sup>2</sup>	토양원 <sup>3</sup>	<i>B. sub.</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>P. vulg.</i>	<i>A. logi.</i>	Am <sup>4</sup>	R <sup>4</sup>	Sp <sup>5</sup>
8810-1	+	1-2	22	13.5	—	16	13	PGY	BO	S
-2	○	1-2	21	—	—	—	—	GY	BO	E
-3	○	1-2	19	20.0	—	—	27	GnB	GnB	S
-4	○	1-2	17	15.0	—	—	—	PY	BO	D
-5	○	1-7	20	18.5	—	17	—	PY	BO	D
-6	○	1-7	16	16.5	—	17	—	PGY	OB	S
-7	○	1-7	21	18.0	—	17	—	Wh	BO	S
-8	○	1-5	17	15	—	26	13	T	BO	E
-9	○	1-5	—	19	—	25	14	T	BO	E
-10	○	1-5	—	20	—	21	17	T	BO	NG
-11	+	1-6	15	14	—	—	11	PY	BO	E
-12	○	1-5	25	14.5	—	—	16	PY	BO	E, I-11
-13	○	1-6	15	18	—	21	15	T	BO	S
-14	○	1-6	—	—	—	17	—	PGY	BO	S, D
-15	○	1-7	15	16.5	—	14	16	PGY	OB	S, I-1
-16	×	1-7	15	—	—	18	15	PGY	OB	E
-17	○	1-4	17	13	—	14	11	PY	BO	S

The table includes part of the list of soil microbes selected and examined by us recently by employing the agar disk method. <sup>1</sup>SNU-8810-: Seoul National University-October-1988. <sup>2</sup>Growth on a V-8 agar slant(○: well grown; +: moderately grown; ×: not grown or not survived during the antibacterial activity screening; blank: not chosen for stock because it is identified to be the same one with the selected. Identity of the microbes were obtained by examining their antibacterial activity spectrum and the growth characteristics as described in the columns Am or R in the table. <sup>3</sup>soil source-selection medium<sup>1)</sup>. <sup>4</sup>Am: aerial mycellium; R: the color of the agar around or of the backside (Y: yellow; PGY: pale greenish yellow; GY: gray; GnB: greenish brown; PP: pale pink; PO: pale orange; BO: brownish orange; OB: orangish brown; Gn: green; Wh: white; T: transparent; PGr: pale gray; PWh: pinkish white; PIP: pale indian pink; BIGy: gray with a little blue color; GnBk: greenish black; PGNy: pale greenish gray; Sc: scarlet; Ol: olive color; Pu: purple; RB: reddish brown; PY: pale yellow; Am: aerial mycelium; Sp: diffusible pigment; <sup>5</sup>S: Streptomyces sp; E: eubacteria, D: no antibiotic production in liquid culture; NG: not grown; I-number: identical with the number)

검색균주가 들어있는 아가판 위에 옮길 수 있어 여러 종의 검색균주에 대하여 항균스펙트럼을 얻을 수 있다. 이 항균스펙트럼과 아가 디스크 위에서 조사 균주의 성장특성 및 용해성 색소의 생성여부와 콜로니가 자란 아가플라그의 전면색과 배후색에서부터 항생물질을 생산하는 균주들이 서로 동일하거나 상이하다는 것을 식별할 수 있다. 또한 이 아가 디스크를 균주의 임시 보관처로 활용할 수 있어 편리하다. 즉 토양균주의 항균스펙트럼의 조사가 끝날 때까지 그리고 항생물질을 생산하는 균주들이 서로 상이하다는 결론을 얻을 때까지 이 아가 디스크 조각을 균주의 임시보관 장소로 이용할 수 있다.

우리는 이 아가 디스크법을 이용하여 2주내에 1,500 종 이상의 토양균을 검색하여 항생물질을 생산하는 토양균을 780종 이상 선별하여 낼 수 있었고 이들의 균주가 생성하는 항생물질의 항균스펙트럼을 확립하여 신 항생물질을 생성하는 토양균의 선별을 용이하게 수행할 수 있었다. 이 자료의 일부가 Table I에 보이고 있다. 기존에 알려진 항생물질을 생산하는 균주들도 매우 흔하게 다양한 곳의 토양에서 발견되고 있는데 이들 균주들에 대하여 이 아가 디스크법에 의하여 항균스펙트럼을 확립하여 이들의 자료를 database로 보관한다면 토양에서 분리한 균주가 생성하는 항생물질이 신 항생물질인지 쉽게 판별할 수 있을 것이다.

**감사의 말씀**

본 연구는 KOSEF-RCNDD 91-24에 의하여 지원 되었으며 이에 감사를 표한다.

**문 헌**

1) 구양모, 이윤영, 정연숙, 이영복, 조영애, 조희영, 고

영선, 이창훈 : 항생물질 생산 토양 actinomycetes 균주 선별과 생산특성 조사, 약학회지 **35**, 244(1991).

2) Hara, O. and Beppu, T.: Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus*: the role of A-factor. *J. Antibiot.* **35**, 349(1982).