

## Actinomycin계열 항생물질 MT-497을 생산하는 방선균 분리주 No. 497의 동정

안종석\* · 이영선 · 안순철 · 이정형 · 이지행 · 윤병대 · 민태익

KIST, 유전공학연구소 미생물공학연구실

### Identification of the Actinomycetes Strain No. 497, Isolated from Soil, Producing Actinomycin Antibiotic MT-497

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

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

**Abstract** — Identification of the Actinomycetes isolate strain No. 497 producing an actinomycin antibiotic MT-497 was performed by ISP and chemotaxonomic methods. The strain No. 497 formed various shapes of sclerotia and smooth surface spore. Menaquinone MK-9 (H<sub>6</sub>, H<sub>8</sub>) and iso-, anteiso-branched C<sub>15</sub>-C<sub>17</sub> fatty acids were detected from whole cell extract. The wall chemotype of strain No. 497 was decided as wall chemotype I from the analysis of DAP isomer, peptidoglycan type and sugar pattern. From these morphological, chemotaxonomic characteristics and analysis of various physiological characteristics, the strain No. 497 was identified as *Streptomyces nigrifaciens*.

Waksman과 Woodruff(1)가 *Streptomyces antibioticus*에서 actinomycin을 분리하고, Schatz 등(2)이 *Streptomyces griseus*에서 streptomycin을 분리하여 페결핵의 치료약으로 사용하면서 *Streptomyces*속을 포함한 방선균류(Actinomycetes)는 항생물질의 생산균주로서 산업적으로나 의학적으로 중요한 미생물로 인식되었다. 그 후 방선균으로부터 항생물질 외에 여러가지 생리활성물질들이 계속 분리되면서(3) 전 세계적으로 방선균에 대한 새로운 항생물질의 탐색이 계속되어 왔다(4-6). 지금까지 알려진 약 10,000여종의 항생물질 중 45%가 방선균에서 분리되었으며, 이 중 대부분은 *Streptomyces*속에서 분리되었다(7).

저자들은 새로운 항생물질의 탐색을 목적으로 우리나라 전국 각지의 각각 다른 환경의 토양을 채취하여 이들로부터 방선균을 분리해 내고, 분리된 방선균이 생산하는 항생물질을 분리, 동정하는 연구를

수행하였다. 이 과정에서 actinomycin계열의 항생물질인 MT-497을 생산하는 방선균 분리주 No. 497을 선별할 수 있었다(8). 따라서 본 보에서는 ISP(International Streptomyces Project)법에 따라(9-13) 분리주 No. 497의 형태학적, 생리학적, 배양학적 특성 등을 조사하고, 또한 균체의 구성성분에 대한 화학적 분석을 통하여 분리주에 대한 동정을 실시하였기에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 사용배지 및 시약

방선균 분리배지로는 Actinomycetes isolation agar 배지(14)를 사용하였으며 보존배지로는 Bennett's agar 배지(15)를 사용하였다. 선별분리주의 동정을 위해서는 ISP 배지(9-13), Bennett's agar 배지, Czapeck solution agar 배지(14)를 사용하였다. 표준당과 표준아미노산은 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고, thin layer chromatography(TLC)

**Key words:** Identification, actinomycetes, actionomycin

\*Corresponding author

에서는 cellulose TLC plate(Cellulose F, Merck, Darmstadt, Germany)와 silica TLC plate(Kiesel gel 60 F<sub>254</sub>, Merck)를 사용하였으며, 황화수소 측정은 lead acetate paper(Advantec, Tokyo, Japan)를 구입하여 사용하였다.

### 방선균의 분리

멸균 생리 식염수 10 ml에 풍건한 토양시료 1g을 넣고 30분 동안 교반한 다음 멸균수로  $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$ 배로 희석하여 0.1 ml를 Actinomycetes isolation agar 배지에 도말한 후 28°C에서 7~10일간 배양하여 나타난 집락을 순수분리하였다(16).

### 방선균 분리주 No. 497의 배양학적 특성조사

분리주 No. 497을 ISP 배지, Bennett's agar 배지, Czapeck solution agar 배지에 배양하면서 7일, 14일, 21일 간격으로 생육정도, 기균사의 색깔, 배면색깔, 가용성색소 생성 유무 및 멜라닌 생성 유무를 관찰하였다.

### 분리주 No. 497의 형태학적 특성 관찰

Bennett's agar 배지에 도말하여 28°C에서 21일간 배양하여 생긴 집락을 OsO<sub>4</sub>로 고정하고 acetone으로 탈수하여 critical point drying을 한 후 gold coating을 실시하여 Hitachi S-450 주사 전자현미경으로 포자의 사슬형태, 포자 표면형태, 포자크기, sclerotia 형성 유무를 관찰하였다.

### 분리주 No. 497의 생리학적 특성 조사

당이용성과 멜라닌 생성은 Shirling과 Gottlieb 방법(9-13)으로 하였고, 젤라틴 액화력, 전분 분해력, 질산염 환원력은 Gordon과 Mihm 방법(17)을 사용하였으며, 황화수소 생성은 Kuster와 Williams 방법(18)에 따라 조사하였다.

### 세포벽의 diaminopimelic acid(DAP) isomer와 아미노산 분석

배양된 균체를 회수하여 sonication한 후 차등원심분리를 통하여 세포벽을 분리하여 이를 DAP와 아미노산 성분분석의 시료로 사용하였다. 아미노산 분석을 위해 세포벽 20 mg을 6 N HCl 5 ml와 같이 시험관에 넣고 밀봉한 후 110°C에서 18시간 가수분해하여 여과,

탈염산, 농축하고 이 농축액을 cellulose TLC의 시료로 하여 methanol-water-5 N HCl-pyridine(80 : 15 : 5 : 10)으로 전개시킨 다음 acetic ninhydrine으로 발색시켜 확인하였다(19).

### 세포내의 당 분석

동결건조한 세포 50 mg을 시험관에 넣고 밀봉한 후 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 함께 2시간 동안 가수분해시키고 Ba(OH)<sub>2</sub>로 pH 5.0~5.2로 중화시킨 다음 원심분리하여 침전물을 제거하고 상등액을 농축한 후 이를 0.3 ml의 증류수에 녹여 TLC 시료로 사용하였다.

위의 시료를 cellulose TLC plate에서 n-butanol-water-pyridine-toluene(10 : 6 : 6 : 1)이 포함된 용매로 전개한 후 aniline phthalate로 발색시켜 세포내의 당을 확인하였다(20).

### 세포내의 지방산 분석

동결건조한 세포 30 mg과 무수 5% methanolic-HCl 2 ml을 시험관에 넣어 100°C에서 3시간 동안 가열하여 지방산을 fatty acid methyl ester(FAME)화시켰다. 그 후 실온에서 냉각시킨 후 증류수 1 ml을 가하고 FAME를 3 ml의 n-hexane으로 3번 반복 추출한 후 n-hexane 추출물에 동량의 증류수를 넣어 혼합한 후 가볍게 원심분리하여 n-hexane층만 분리하여 질소가스로 농축시켜 농축된 FAME의 n-hexane층을 microtube에 넣어 FAME 분석의 시료로 사용하였다. 지방산 분석은 위의 농축된 시료를 gas chromatography (Shimatzu GC-14A)로 분석, 확인하였다(21).

### 세포내 menaquinone(MK)의 분석

동결건조한 세포 약 200 mg을 20 ml의 chloroform-methanol(2 : 1)에 현탁시켜 차광시킨 후 12~18시간 동안 진탕시키면서 추출하였다. 진탕 후 여과하여 균체 잔사를 제거하고 추출액을 감압농축 후 건조시켰다. 건조된 시료를 소량의 아세톤에 녹여 상등액만 취해 질소가스로 농축하여 이를 TLC의 시료로 사용하였다. 시료를 silica gel plate에서 petroleum benzene : ethyl ether(85 : 15)로 전개하여 254 nm의 UV lamp로 MK의 위치를 확인하고 긁어내어 아세톤으로 추출한 후 여과하여 감압농축시켜 이를 갈색 유리 시험관에 넣어 이 시료를 HPLC로 분석하였다. 이때 표준 menaquinone으로는 *Actinomadura pelle-*

*tieri*에서 MK-9(H<sub>6</sub>)와 MK-9(H<sub>8</sub>)을 분리하여 비교하였다(22).

**결과 및 고찰**

**방선균 분리주 No. 497의 분리**

충청남도 계룡산 동학사 부근의 토양시료로부터 항생물질 MT-497을 생산하는 분리주를 최종 순수분리할 수 있었으며 이 균주를 방선균 분리주 No. 497로 표시하였다.

**배양학적 특성**

분리주 No. 497은 7가지의 ISP 배지, Bennett's 배

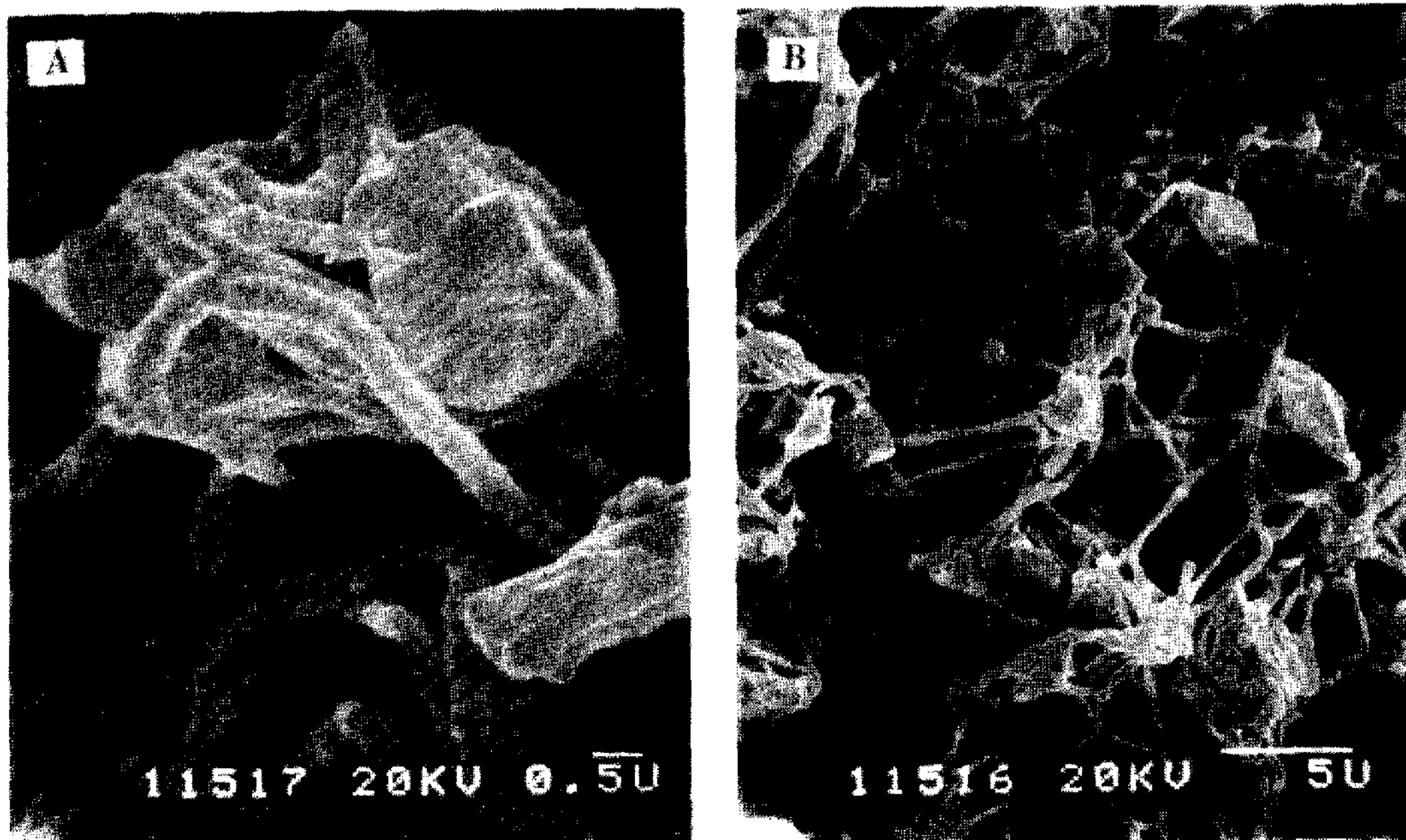
지 및 Czapeck 배지에 배양하면서 7, 14, 21일 후에 생육, 기균사 색깔, 배면색깔, 수용성색소 생성 등 배양학적 특성을 관찰하였으며, 그 결과는 Table 1과 같다. Czapeck 배지를 제외하고는 전반적으로 생육이 양호하였으며, 기균사 색깔은 대체적으로 노란색 계통이나 oatmeal과 inorganic salts starch 배지에서는 약한 회색을 나타냈으며, 수용성 색소는 노란색으로 나타났다.

**형태학적 특성**

Yeast extract-malt extract 배지에서 21일간 배양한 분리주 No. 497의 균사체와 포자를 전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 전자현미경상에서 나타

**Table 1. Cultural characteristics of the isolated strain No. 497 on various agar media**

Media	Growth	Aerial mycelium color	Reverse color	Soluble pigment
Trypton-yeast extract agar (ISP1)	Moderate	Yellow	Yellow	None
Yeast extract-malt extract agar (ISP2)	Good	Yellow	Dark yellow	Yellow
Oat meal agar (ISP3)	Good	Whitish gray	Dark yellow	None
Inorganic salts-starch agar (ISP4)	Moderate	Yellowish gray	Dark yellow	None
Glycerol-asparagine agar (ISP5)	Good	Pale yellow	Yellow	Yellow
Peptone-yeast extract iron agar (ISP6)	Moderate	Yellow	Yellow	None
Tyrosine agar (ISP7)	Good	Pale yellow	Dark yellow	None
Bennett's agar	Good	Yellow	Yellow	Yellow
Czapeck solution agar	Poor	None	None	None



**Fig. 1. Scanning electron micrograph of the isolated strain No. 497 cultured on yeast extract-malt extract agar medium for 21 days.**

난 분리주 No. 497의 형태는 전반적으로 sclerotia 형태를 하고 있으며, 이들 sclerotia의 크기나 형태도 아주 다양하였다. Sclerotia의 크기는 대체적으로 2.2-5  $\mu\text{m} \times 2.5-5.5 \mu\text{m}$ 이며 형태상으로는 꽃봉오리모양, 원통모양, 망사모양 등을 하고 있다. 포자표면은 smooth, 포자사슬은 분절되지 않은 형태로 나타나고 있다.

### 생리학적 특성

분리주 No. 497의 당이용성을 살펴 본 결과 xylose, mannitol은 잘 이용하며 fructose는 다소 이용하고, 그외 L-arabinose, sucrose, myo-inositol, L-rhamnose, raffinose, cellulose는 이용하지 못하였다. 또한 분리주 No. 497은 젤라틴 액화능과 전분 분해능에서는 양성으로 나타났으며, 질산염 환원력은 있으나 황화수소와 멜라닌은 생성하지 않았다(Table 2).

### 세포벽 DAP와 아미노산 및 세포내 당 분석

분리주 No. 497의 세포벽의 DAP isomer는 LL-DAP이며 아미노산은 alanine, glutamic acid, gly-

cine이 검출되었으며(Fig. 2), 세포내의 당은 없는 것으로 나타났다(Fig. 3).

### 세포내 지방산 및 menaquinone 분석

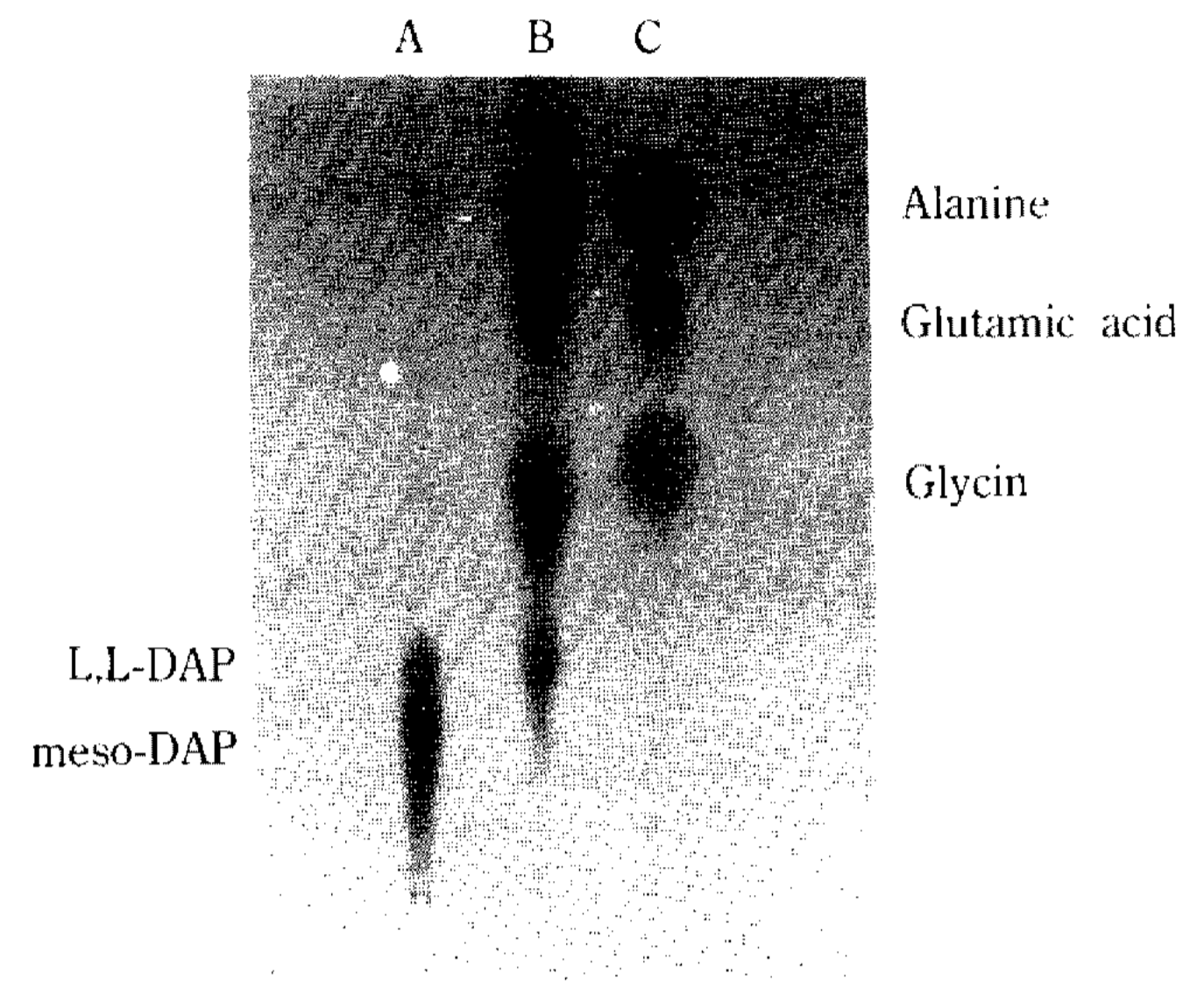


Fig. 2. Cellulose thin layer chromatogram of cell wall diaminopimelic acid (DAP) isomers and amino acids of the isolated strain No. 497 (B) and standard acids (A, C).

Table 2. Comparison of the isolated strain No. 497 with other known Streptomyces strains

Characteristics	Isolated No. 497	<i>S. toxifertilis</i> (27)	<i>S. tendae</i> ISP 5101 (28)	<i>S. nigrifaciens</i> ISP 5071 (29)	<i>S. flavovirens</i> ISP 5076 (30)
Spore chain		Rectinaculiapreerti or spirals	Rectus-flexibilis	Rectiflexibilis	Rectiflexibilis or spiral
Spore surface	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth
Color of growth	Yellow	Yellowish brown	Pale yellow	Yellowish brown	Yellowish brown
Color of aerial mycelium	Yellow-gray	Brownish gray	Grayish brown	Light gray	Brownish gray
Soluble pigments	Yellow	Pale yellow	Pale yellow	Pale yellow	Pale yellow
Nitrate reduction	+	+	-	+	-
Hydrolysis of starch	+	+	+	+	+
Liquefaction of gelatin	+	+	+	+	+
Melanine pigment production	-	+	-	-	-
Carbon utilization					
Cellulose	-	+	+	-	
D-Glucose	+	+	+	+	+
L-Arabinose	-	+	+	-	+
Sucrose	-	-	+	-	-
D-Xylose	+	+	+	+	+
myo-Inositol	-	-	+	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	-	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-	-
Antibiotic	MT-497	Toxifertilin	Nikkomycin	-	Pillaromycin

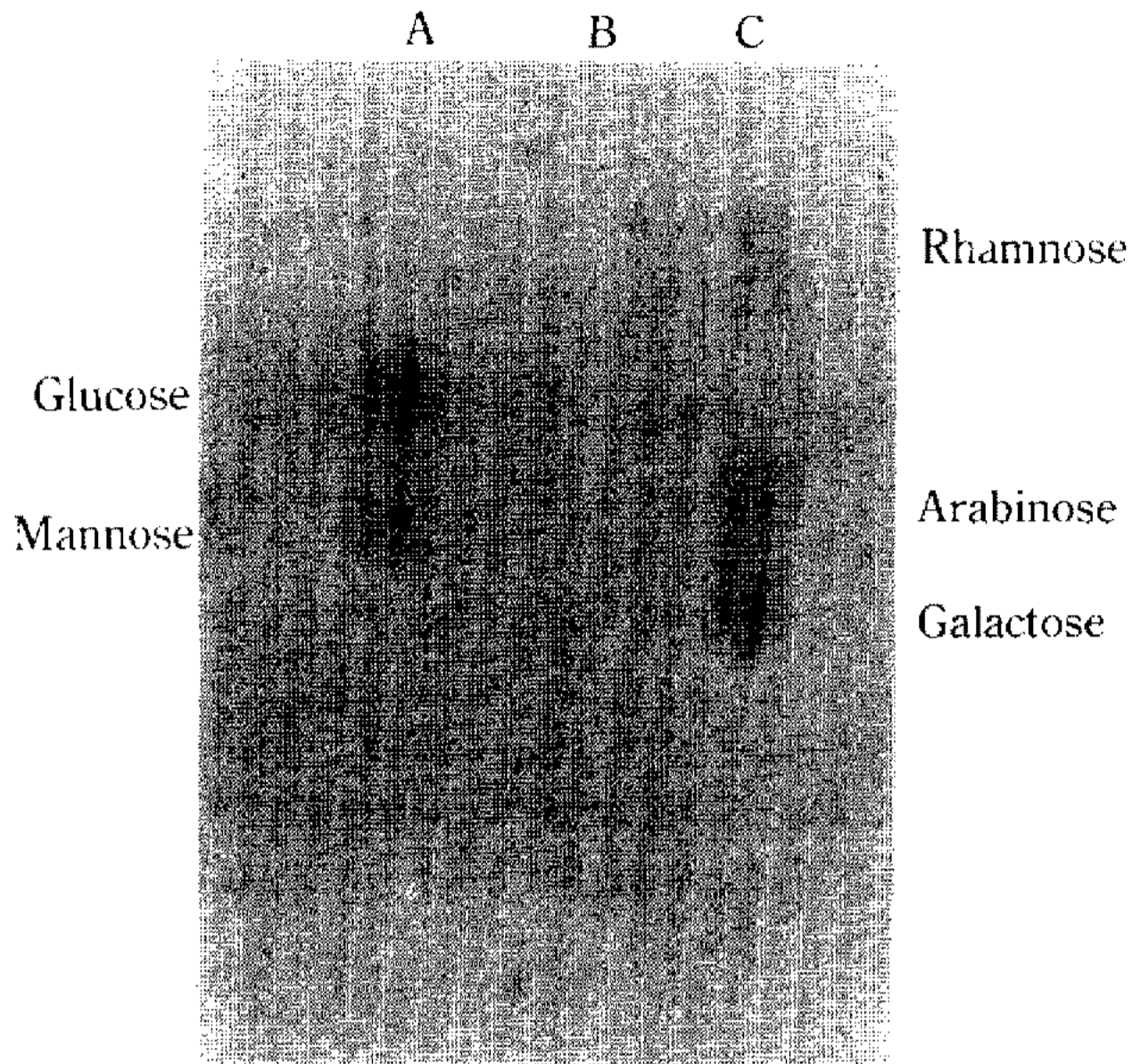


Fig. 3. Cellulose thin layer chromatogram of whole cell sugar extract of the isolated strain No. 497 (B) and standard sugars (A, C).

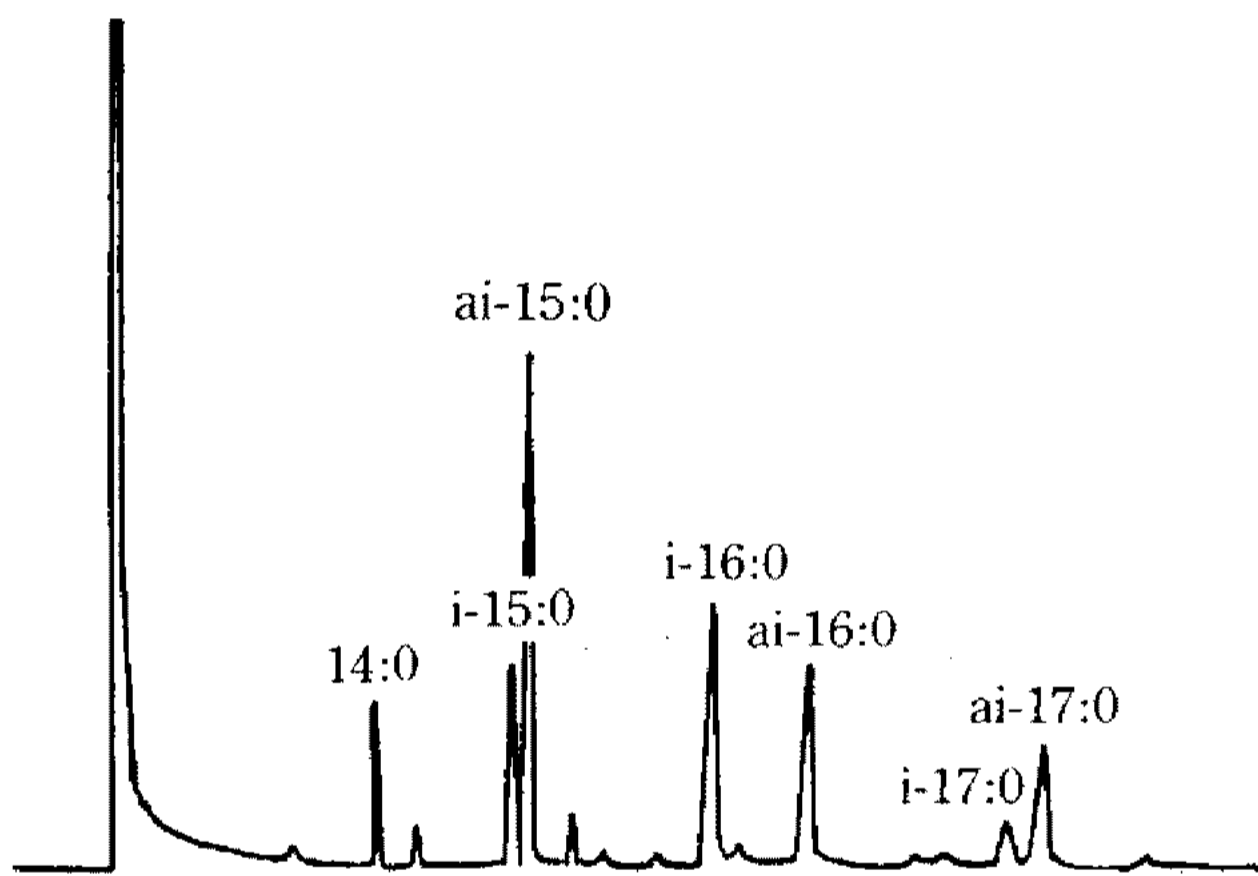


Fig. 4. Gas chromatogram of cellular fatty acids of the isolated strain No. 497.

Column: capillary column, detector: flame ionization detector, injection temperature: 250°C, detector temperature: 250°C, column temperature: 180°C, carrier gas: N<sub>2</sub> (30 ml/min)

지방산 분석에서는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 주로 iso-와 anteiso-branched fatty acids C<sub>15</sub>-C<sub>17</sub>로 구성되어 있으며, 그외 saturated fatty acid C<sub>14</sub>로 구성되어 있음을 알 수 있다. Menaquinone 분석에서는 MK-9(H<sub>6</sub>)와 MK-9(H<sub>8</sub>)이 주요성분으로 나타났다 (Fig. 5).

**방선균 분리주 No. 497의 동정**

분리주 No. 497의 세포벽 DAP와 아미노산을 방선균 wall chemotype과 peptidoglycan type(23, 24)과

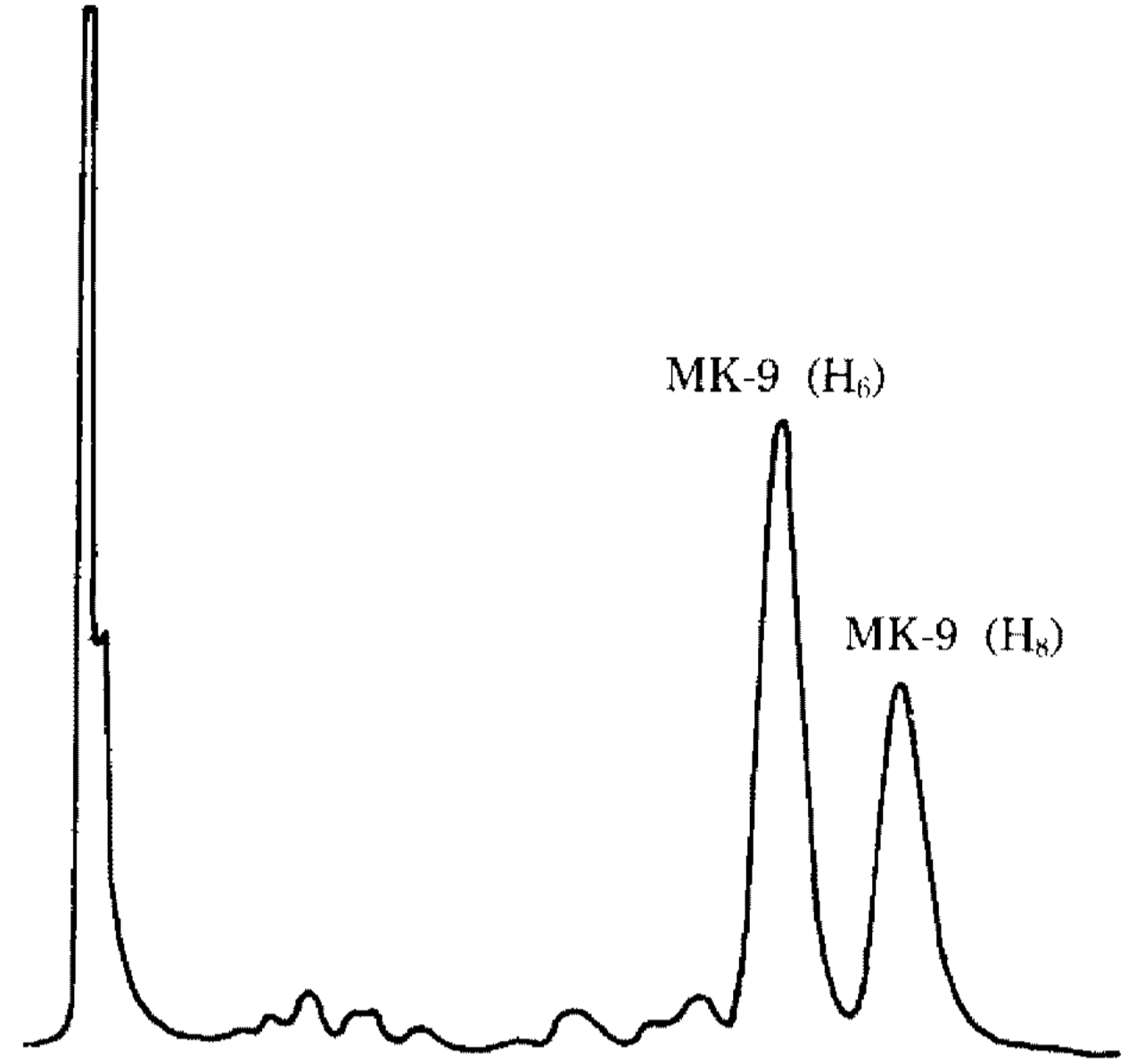


Fig. 5. High performance liquid chromatogram of menaquinones (MK) prepared from the isolated strain No. 497

Column: RP-C<sub>18</sub>, mobile phase: methanol:isopropanol (2:1), detector: UV 270 nm, flow rate: 1 ml/min

비교하여 볼 때 세포벽의 peptide는 glycine으로 연결되어 있는 peptidoglycan type A32이며, wall chemotype I에 해당되고, 세포내의 당은 어떤 특징적인 당이 나타나지 않는 sugar pattern C에 해당하는 것을 알 수 있었다(25). 지방산은 iso-와 anteiso-branched fatty acids가, menaquinone은 MK-9(H<sub>6</sub>)와 MK-9(H<sub>8</sub>)이 주요성분임을 알 수 있었다. 따라서 분리주 No. 497은 *Streptomyces*속으로 최종적으로 분류되었다. 분리주 No. 497이 생산하는 항생물질 MT-497과 UV 및 IR spectrum(8)이 유사한 항생물질인 toxifertilin을 생산하는 *S. toxifertilis*(27)와 ISP에 수록된 *Streptomyces*속의 균주들 중 분리주 No. 497과 포자의 형태, 각종 배지에서의 생육상태 및 색깔과 생리적 특성을 비교하여 유사한 균주로서 *S. tendae* ISP 5101 (28), *S. nigrifaciens* ISP 5071(29), *S. flavovirens* ISP 5076(30)이 있음을 알았다. 이들 균주와 분리주 No. 497의 ISP 배지에서의 기균사 색깔, 배지 배면의 색깔, 수용성 색소의 생성, 전자현미경에 의한 포자 및 포자사슬의 형태학적 특성, 당 이용성, 생산하는 항생물질 등의 특성(31)을 비교하여 Table 2에 정리하여 비교하였다. *S. toxifertilis*는 배양상의 색깔은 유사하나 포자사슬이 rectinaculiapreerti이고 melanine 색소를 생성하며 당 이용성에서도 arabinose, inositol, rhamnose를 이용하는 것이 분리주 No. 497과는 다르게

나타났다. 또한 ISP에 수록된 균주들 중 *S. nigrifaciens*를 제외한 *S. tendae*, *S. flavovirens*는 포자사슬이 나선형이고 질산염 환원력이 없고 당 이용성에서는 arabinose, sucrose, inositol, rhamnose 등의 당 이용성이 분리주 No. 497과는 다름을 확인하였다. 분리주 No. 497과 *S. nigrifaciens*와는 포자사슬의 형태가 약간의 차이점을 보이거나 대체로 유사하며 rhamnose의 이용성에서 차이가 날 뿐 그외의 특징은 일치하였다.

따라서 분리주 No. 497를 *S. nigrifaciens*로 동정할 수 있었으며, *S. nigrifaciens* GMT-497로 명명하였다. 기존에 actinomycin 계열의 항생물질을 생산하는 방선균 중에는 *S. nigrifaciens*가 보고된 바가 없었으며 저자들이 분리한 *S. nigrifaciens* GMT-497이 처음이다 (32, 33).

## 요 약

Actinomycin 계열의 항생물질 MT-497을 생산하는 방선균 분리주 No. 497을 ISP 분류법과 화학적 방법에 의해 동정하였다. 분리주 No. 497은 다양한 모양의 sclerotia 형태이며 표면이 매끈한 포자를 형성하였다. DAP isomer, peptidoglycan 유형과 구성당 유형의 분석에 의해 분리주 No. 497의 세포벽 유형은 wall chemotype I으로 결정되었으며, 분리주 No. 497은 iso-branch와 anteiso-branch의 C<sub>15</sub>-C<sub>17</sub> fatty acids와 menaquinone MK-9(H<sub>6</sub>, H<sub>8</sub>)을 가지고 있었다. 이상의 형태학적, 화학적 분석 결과들과 여러가지 생리적 특성들을 조사한 결과 분리주 No. 497을 *Streptomyces nigrifaciens*로 동정할 수 있었다.

## 감사의 말

분리주 No. 497의 균사체와 포자의 전자현미경 촬영에 도움을 주신 연세대학교 의과대학 전자현미경실 관계자 여러분에게 감사드립니다. 또한 본 연구는 과학기술처의 국책연구개발사업비의 지원을 받아 수행되었으며 관계자 여러분에게 감사를 드립니다.

## 참고문헌

1. Waksman, S.A. and H.B. Woodruff: *Proc. Soc. Ex-*

- ptl. Biol. Med., **45**, 609 (1940)
2. Schatz, A., E. Bugie and S.A. Waksman: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **55**, 56 (1944)
3. Reading, C. and M. Cole: *Antimicrobial Agents and Chemother.*, **11**, 852 (1977)
4. Cross, T.: *Devel. Indust. Microbil.*, Society for Industrial Microbiology, New York, Vol. 23 (1982)
5. 大野雅二, 大村智: 抗生物質 研究の最先端, 東京化學同人 (1984)
6. Kusaka, T.: 微生物 探索分離育種, CMC, Tokyo, 26 (1985)
7. Umezawa, H.: *Trends in Antibiotic Research* (Umezawa, H., A.L. Demain, H. Hata, C.R. Hutchinson, eds.), Japan Antibiotics Research Association, Tokyo (1982)
8. Lee, Y.S., S.C. Ahn, J.H. Lee, B.D. Yoon, J.S. Ahn and T.I. Mheen: *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, submitted (1991)
9. Shirling, E.B. and D. Gottlieb: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **16**, 313 (1966)
10. Shirling, E.B. and D. Gottlieb: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **18**, 69 (1968)
11. Shirling, E.B. and D. Gottlieb: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **18**, 279 (1968)
12. Shirling, E.B. and D. Gottlieb: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **19**, 391 (1969)
13. Shirling, E.B. and D. Gottlieb: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **22**, 265 (1972)
14. Difco Laboratory: *Difco Manual, dehydrated culture media and reagents for microbiology* (10th ed.), Detroit (1984).
15. Waksman, S.A.: *The Actinomycetes*, the Williams and Willkins Co., Baltimore, Vol. 2, 328 (1961).
16. 민태익, 안종석, 이영선, 이정형, 안순철, 이지행: 방선균류의 신규생체활성물질탐색, KIST 유전공학센터, 과학기술처 연구보고서 (1989)
17. Gordon, R.E. and J.M. Mihm: *J. Bacteriol.*, **73**, 15 (1957)
18. Kuster, E. and S.T. Williams: *Appl. Microbiol.*, **12**, 46 (1964)
19. Yamada, K. and K. Kamagata: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **16**, 103 (1970)
20. Stanek, J.L. and G.D. Roberts: *Appl. Microbiol.*, **120**, 281 (1974)
21. Komagata, K. and K.I. Suzuki: *Methods in Microbiology* (Colwell, R.R. and R. Grigorova, eds.), Academic Press, New York, Vol. 19, 161 (1987)
22. Tamaoka, J., Y. Katayama, H. Kuraishi: *J. Appl. Bacteriol.*, **54**, 31 (1983)
23. Lechevalier, H.A. and M.P. Lechevalier: *The Actinomycetes*, Gustav Fisher Verlag, Jena, 393 (1970)
24. Schleifer, K.H. and O. Kandler: *Bacteriol. Rev.*, **36**,

- 407 (1972)
25. Lechevalier, M.P.: *J. Lab. Clin. Med.*, **71**, 934 (1968)
26. Kroppenstedt, R.M.: *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Society for Applied Bacteriology, Technical Series No. 20, Academic Press, London (1985)
27. Yagishita, K., H. Jinnouchi, H. Yamamoto: *Bull. Coll. Agr. & Vet. Med.*, Nippon Univ., No. 35, 21 (1978)
28. Shirling, E.B. and D. Gottlieb: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **18**, 172 (1968)
29. Shirling, E.B. and D. Gottlieb: *Inst. J. Syst. Bacteriol.*, **18**, 150 (1968)
30. Shirling, E.B. and D. Gottlieb: *Inst. J. Syst. Bacteriol.*, **18**, 114 (1968)
31. Nonomura, H.: *J. Ferm. Technol.*, **52**, 78 (1974)
32. Umezawa, H.: *Index of Antibiotics from Actinomycetes*, Vol. I, II, Japan Scientific Societies Press, Tokyo (1978)
33. Bycroft, B.W.: *Dictionary of Antibiotics and Related Substances*, Chapman and Hall Ltd., N.Y. (1988)

**(Received October 17, 1991)**