

## 제초 항생물질 maculosin 생산균주 *Streptomyces rochei* 87015-3의 동정

조흥연\* · 최웅철\*\* · 서형주\*\*\* · 신광순\*\*\*\* · 이희봉 · 권형진 · 김수연

서울대학교 농화학과 및 농업생물신소재연구센터, \*고려대학교 식량공학과,

\*\*농촌진흥청 농약연구소, \*\*\*고려대학교 병설 보건전문대학 식품영양학과,

\*\*\*\*고려대학교 생물공학연구소

**초록** : 제초성항생물질인 maculosin과 phenylacetic acid를 생산하는 균주를 *Streptomyces rochei*로 동정하였다. 동정은 형태학적 및 생리학적 특성시험에 기초하였다. 이 균주는 진균류인 *Alternaria alternata* 외에 maculosin의 생성이 보고된 최초의 *Streptomyces* 속 균주이다(1993년 10월 7일 접수, 1993년 10월 26일 수리).

### 서 론

Maculosin은 미국 서북지방의 주요한 잡초인 *Centaurea maculosa* L.의 병원균인 *Alternaria alternata*에서 분리된 diketopiperazine계의 제초성 항생물질이다<sup>1)</sup>. 저자 등은 전보에서 제초활성을 가진 물질을 생산하는 *Streptomyces* 속으로 잠정적으로 동정된 균주(*Streptomyces* 87015-3)에서 제초활성물질의 분리를 시도하여 GC-MS, NMR 등의 방법으로 maculosin<sup>2)</sup>과 phenylacetic acid의 생산<sup>3)</sup>을 확인한 바 있다. 이는 진균류인 *Alternaria* 외에서 이 물질이 발견된 최초의 보고이다. 여기에서는 maculosin을 생산하는 이 흥미있는 균주의 동정을 보고하여 이 균주 연구의 기초자료로 삼고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 균주

균주는 농촌진흥청 농약연구소에서 분리한 *Streptomyces* 87015-3균주를 이용하였다.

#### 배양 및 형태적특성 조사

배지상의 특성은 colony의 형태, 성장도, 기균사색, 표면의 색 등의 배양상 특성을 International Streptomyces Project (ISP) system에 준하여 배양, 관찰<sup>4,5,6)</sup>하였다. 기균사 및 기생균사의 특징은 Giolitt와 Bentani의 셀로 판법<sup>5)</sup>에 따라 관찰하였고, 포자의 형태 및 연쇄 구조는 주사형 전자 현미경(Hitachi S-570)을 사용 검정하였다.

#### 생리적 특성

효소요구성 시험은 Wright<sup>7)</sup>의 시험관 배양법에 따라 실시하였고, 이외에도 Gram 염색시험,<sup>7)</sup> catalase 시험,<sup>8)</sup> 내염성 실험,<sup>9)</sup> cellulose 분해력 시험,<sup>8)</sup> esculin 분해력 시험,<sup>10)</sup> Tween 80 분해력 시험,<sup>11)</sup> melanine 색소생성 시험,<sup>6,12)</sup> H<sub>2</sub>S 생성시험,<sup>13)</sup> 탄수화물 이용성 시험,<sup>14)</sup> 탄수화물로부터 산생성시험,<sup>15)</sup> 전분분해력시험,<sup>8,16)</sup> gelatin 액화시험,<sup>8)</sup> 우유응고 peptone화 시험,<sup>8)</sup> casein 가수분해 시험,<sup>15)</sup> xanthine, hypoxanthine, tyrosine 분해시험,<sup>10)</sup> urease 생성 시험,<sup>11)</sup> lysozyme 내성 시험,<sup>10)</sup> 항생물질 감수성 시험<sup>17)</sup>은 문헌 방법에 따랐다.

#### 2,6-diaminopimelic acid 이성체, 아미노산 및 당 분석

시험균을 Bennet 배지에서 30°C, 4일간 배양하고 최종농도가 1%가 되도록 formalin을 첨가, 24시간 방치하고 원심분리(3000 rpm, 20분)하여 얻은 균체를 증류수와 95% ethanol로 각각 1회씩 수세한 뒤 45°C 항온기에서 건조하였다. 건조균체 3 mg을 문헌방법에 따라 가수분해하고 여지크로마토그래피로 당을 분리하여 동정하였다.<sup>18,19)</sup> 세포벽중의 아미노산인 diaminopimelic acid의 이성질체는 Bennet 배지에서 대수기 중반까지 배양된(30°C, 84시간) 습균체 10 g을 문헌 방법으로 정제한 후 세포벽을 얻어 분석하였다.<sup>20,21)</sup>

#### 분리균의 동정

본 균은 주로 Bergey's manual of determinative bac-

teriology,<sup>22)</sup> Bergy's manual of systematic bacteriology,<sup>23)</sup> I. S. P. strain key,<sup>4)</sup> Berd의 방법<sup>10)</sup>과 Lechevalier의 방법<sup>24)</sup> 및 방선균의 동정실험법<sup>9)</sup>을 참고하여 동정하였다.

### 일반시약

본 실험에 사용한 각종 아미노산, 당류, 염기 및 vitamin은 Sigma 및 Fluka사 제품을 사용하였고, pepsin(digestive power 1:10,000) 및 trypsin(2,000 units/g protein)은 Difco사의 제품을 사용하였다. 박층 크로마토그라피용 sheet는 일본 東京化成 제품을, 그밖의 기타 시약은 시판 1급 이상의 시약을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 배지상 형태적 특성

7일간 배양한 분리균을 각 배양기에 접종, 배양하면서 colony의 성장, 성장도, 기균사의 색, 표면의 색 및 가용성 색소 등을 조사한 결과 Table 1과 같았다.

Colony는 배지에 따라 다양한 형태 였으나 특히 Bennet, yeast extract, yeast-malt extract, 및 oat meal agar의 경우 심하게 주름진 형상을 나타냈다. 성장도의 경우는 대부분 양호한 성장을 보였으나 일반적으로 nutrient agar와 방선균 및 곰팡이 등이 양호한 성장을 보이는 sucrose-nitrate agar상에서는 오히려 생육이 상당히

제한된 특성을 보여주었다.

기균사의 색은 주로 회색과 흰색이었으며, 표면의 색은 적색과 노란색을 보이나 sucrose-nitrate agar상에서는 흰색이었다. 한편 가용성 색소 생산이 관찰되지 않았음이 특징이었다.

### 균사의 형태적 특성

분리 균주의 형태적 특성을 cellophane법<sup>5)</sup>으로 검정한 결과 기생균사는 포자 접종 후 약 12시간 경과했을 때 발달하기 시작하였고, 기균사는 56시간 경과 후 기생균사 상부에 발달하기 시작하여 72시간 이후에는 looped(Retinauliaperti) 또는 spiral(Spirales)한 형태를 보였으며 기균사 끝은 20 여개의 포자연쇄구조로 이루어져 있음이 관찰되었다. 방선균 분류상 매우 중요한 포자표면의 포자연쇄의 구조에 있어서는 타원형 내지 원통형의 포자연쇄가 관찰되었고 포자표면의 구조는 smooth type으로 분류되었으며 포자연쇄도 輪生型이 아님이 확인되었다 (Fig. 1). 이상의 형태적 관찰에서 Bergy's manual의 Pridham과 Tresner의 분류체계상 GY(Grey); S(Spiral); C(Nonchromogenic); SM(Glabrous) group으로 분류되었다.<sup>22)</sup>

### 생리적 특성

본 균주는 gram 양성, catalase 양성이며 생육 pH는

Table 1. Cultural characteristics of the strain grown on agar media

Medium	Colony	Growth	Aerial Mass Color	Reverse Side Color	Soluble Pigment
Tyrosine Agar	Elevated	+	White	Orange	None
Nutrient Agar	Elevated	+	White	Orange	"
Salts Starch Agar	Elevated	+++	White→Grey (at 7th days)	Yellow→Orange (at 14th days)	"
Glycerol Asn Agar	Flat	++	White→Grey (at 14th days)	Orange	"
Bennet Agar	Winkled	++	Yellow→Grey (at 21th days)	Yellow	"
Sucrose Nitrate Agar	Restricted	+	Grey	White	"
Glycerol Nitrate Agar	Flat	+	White	White→Yellow (at 7th days)	"
Yeast Ex. Agar	Winkled Folded	+++	White	Orange→Yellow (at 21th days)	"
Yeast-Malt Ex Agar	Winkled Folded	+++	Orange→Grey (at 7th days)	Yellow	"
Glucose Asn Agar	Flat	+	White→Grey (at 14th days)	Yellow	"
Oatmeal Agar	Winkled Folded	+++	Grey	Orange→Yellow (at 21th days)	"

5~10이고 최적 pH는 7.0인 호기성 방선균으로 생육온도 20~40°C, 최적온도 30°C 인 중온성균이며 열저항성 실험에서도 양성으로 나타났다. 또 본 시험균은 4% 이상의 염농도에서도 생육하였으나 7% 이상에서는 완전한 생육저해를 나타내었다. 한편 cellulose 분해력은 1% carboxymethyl cellulose 첨가 합성배지에서 잘 성장하였고 esculin 분해력 실험에 있어서도 배양 3일차에 옅은 흑색을 나타냈으며 14일째에는 진한 흑색을 나타내는 것으로 보아  $\beta$ -glucosidase의 활성이 높은 것으로 판단되었다. Tween 80 분해실험에서는 본균주의 경우 투명대를 형성함으로써 Tween 80 분해능이 있음을 확인할 수 있었다. 이상의 결과 및 기타 생리적 검사 결과는 Table 2에 요약하였다.

**영양이용성**

Pridham과 Gottlieb<sup>10)</sup>의 기초배지를 사용하여 당의 이용성을 검토한 결과 glucose, mannose, rhamnose, maltose, galactose, fructose, xylose, cellulose, arabinose, ribose, lactose, salicin 및 dextrin을 잘 이용하는 반면 sucrose, inulin, trehalose, pullulan, sorbitol 등은 전혀 이용하지 못하였다. 특히 본 균주는 그 형태가 *Nocardia* 속의 균주들과 유사하나 일반적으로 *Nocardia* 속 균이 자화한다고 하는 paraffin을 전혀 이용하지 못하였다. 이

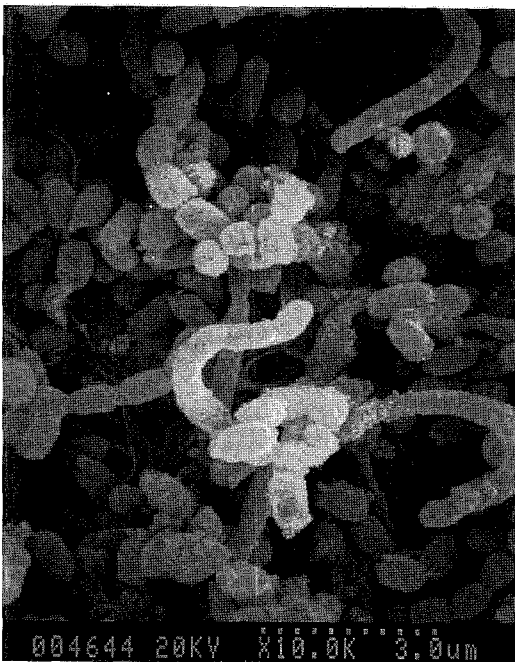


Fig. 1. Electron photomicrograph of spore chains of the strain (The strain was grown on ISP4 medium<sup>4-6)</sup> at 30°C for 5 days;  $\times 10,000$ ).

결과는 산 생성능력과 함께 Table 3에 나타내었다.

**세포벽 구조성분분석**

여지크로마토그래피에 의한 당성분 분석 결과 R<sub>f</sub>치 0.23 부근에 미지의 점적이 관찰되었을 뿐 다른 어느 특정 당도 확인 할 수 없었다. 세포벽중의 아미노산 및 DAP의 이성체 분석은 전체세포벽을 가수분해 후 박층크로마토그래피에 의해 분리하였던 바 alanine(R<sub>f</sub>: 0.64), glycine(R<sub>f</sub>: 0.43), LL-DAP(R<sub>f</sub>: 0.25)의 점적이 검출됨으로써 Lechevalier와 Lechevalier의 세포벽 구성성분표<sup>23)</sup>에서 type I으로 분류되었다.

**균주동정**

본 균주는 형태적 성질, 특히 smooth type의 포자형성, 기균사의 나선형태, 균사가 단열되지 않았다는 점 등을 미루어 *Streptomyces*임을 알 수 있었다.<sup>22,8,11)</sup> 또한 전술한 여러 생리적 특성을 근거로 할때에도 본균이 *Streptomyces*속임을 알 수 있었다.

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of the strain

Factor	Characteristics
Oxygen requirement	+
Gram staining	+
Catalase production	+
Optimum temperature	30°C
Optimum pH	7.0
NaCl tolerance	$\geq 4\%$ , but $< 7\%$
Decomposition of cellulose	+
Hydrolysis of esculin	+
Tween 80	+
starch	+
gelatin	+
casein	+
Acid from carbohydrate	+
Coagulation of milk	-
Decomposition of	-
xanthine, hypoxanthine,	
tyrosine	+
Urease production	+
Lysozyme resistance	-
Streptomycin susceptibility	+
Penicillin susceptibility	-
DNase production	-
Indol production	-
Melanine pigment	-
Nitrate reduction	+
H <sub>2</sub> S production	-

Table 3. Utilization of carbon sources

Carbone compound	Utilization	Acid formation
No carbon	—	N
Glucose	+	F
Fructose	+	F
Salicin	±	N
Mannose	+	F
Innulin	—	N
Sorbitol	—	N
Galactose	+	F
Trehalose	—	N
Lactose	+	F
Dextrin	+	N
Paraffin	—	.
Rhamnose	+	N
Sucrose	—	R
Maltose	+	N
Xylose	+	N
Ribose	+	N
Arabinose	+	.

+, Utilized; ±, Slightly utilized; —, Not utilized; F, Formed; N, Not formed; ., Not tested.

한편, 세포벽 구성성분의 분석 결과에 따르면 본 균주가 방선균 세포벽 구성성분표<sup>23)</sup>에서 LL-DAP와 glycine을 함유한 세포벽 type I으로 분류되고 당성분에 있어서는 NC(no characteristic)로 분류되었다. 이와 같은 세포벽 구성성분을 나타내는 균속으로는 Actinobacteria과의 *Arachina*, *Pimelobacter*속과 Nocardioideae과의 *Nocardioides*속 및 Streptomycetes과의 *Intrasporangium*, *Kinersporia*, *Sporichthya*, *Streptomyces*, *Streptovercillium* 등이 있는 것으로 알려져 있으나 *Arachina*, *Intrasporangium*, *Kinersporia*속들은 aerial mycelium이 존재치 않으며 *Nocardioides* 속은 성장 중 기균사의 단열이 이루어지는 특징을 가지고 있어서 본 균주의 특성과는 큰 차이가 있었다. 한편 *Streptovercillium*의 경우 기균사가 윤생형이고 대부분의 탄소원을 자화하지 못한다고 보고되고 있으며 *Sporichthya* 속의 경우도 기균사가 존재치 않고 기균사가 단열하여 편모를 형성해서 운동성을 갖는다는 점 등이 *Streptomyces*속과는 형태적, 생리적으로 뚜렷한 차이를 나타냄으로써 본 균주가 *Streptomyces*임을 재확인할 수 있었다.

본 균주의 종 판별에 있어서 형태적 특성상 Bergey's manual의 Pridham과 Trensner의 분류체계상 GY : S : C- : SM group으로 분류되고 배양기상 특성에서도 aerial mass color가 회색인점, 배변색이 yellow 내지는 red-orange, red-brown색을 나타내고 있었다. 또한 생리학적

특성중2 탄소원 이용성 실험에서 salicin, glucose, xylose, arabinose, rhamnose, fructose 등의 대부분의 탄소원을 이용한 반면 sucrose를 전혀 이용할 수 없다는 점, 그리고 streptomycin감수성, melanin 색소 생산능의 부재 등 주요 생리적 및 생화학적 특성이 *Streptomyces rochei*와 일치하였다. 따라서 상기 결과에 따라 본 균주는 *Streptomyces rochei* 또는 그 유연군으로 추정할 수 있었다.

### 감사의 글

본연구는 '91년도 농업산학협동기금에 의한 용역연구의 일부이기에 농촌진흥청에 감사드립니다. 조홍연, 서형주, 신광순은 고려대학교 생물공학연구소의 지원에, 이희봉, 권형진은 농업생물신소재연구센터의 지원에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. Strobel, G., Stierle, A., Park, S. H., and Cardellina, J.: In 'Microbes and Microbial Products as Herbicides', Hoagland, R. E.(ed) ACS Symposium Series 439, Chap. 2, ACS, Washington, DC(1990)
2. 이 희봉: 서울대학교 석사학위논문(1993)
3. 이 희봉, 김 수연: 농시논문집(농업산학협동편) 34 : 241(1991)
4. Shirling, E. B. and Gottlieb, D.: Intern. J. System. Bacteriol., 16 : 313(1966)
5. Giolitti, G. and Bentani, M.: J. Bacteriol., 65 : 281 (1952)
6. Tresner, H. D. and Backus, E. J.: Appl. Microbiol., 11 : 335(1963)
7. Cappuccino, J. G. and Sherman, N.: In 'Microbiology - A Laboratory Manual', Addison-Wesley Publishing Co. New York.(1983)
8. 清野昭雄, 放線菌の同定實驗法, 日本放線菌研究會編 (1985)
9. Tresner, H. D., Hayes, J. A. and Backus, E. J.: Appl. Microbiol., 16 : 1134(1968)
10. Berd, D.: Appl. Microbiol., 25 : 665(1973)
11. 長谷川武治, 微生物の分類と同定(下), 學會出版センター, 東京(1984)
12. Arai, T. and Mikami, Y.: Appl. Microbiol., 23 : 402 (1972)
13. Tresner, H. D. and Danga, F.: J. Bacteriol., 76 : 239 (1958)
14. Pridham, T. G. and Gottlieb, D.: J. Bacteriol., 56 : 107(1948)
15. Gordon, R. E. and Smith, M. M.: J. Bacteriol., 69 : 147(1955)

16. Gordon, R. E. and Mihn, J. M.: J. Bacteriol., 73 : 15 (1957)
17. 도재호, 김상달: 한국산업미생물학회지, 10 : 237 (1982)
18. Staneck, J. L. and Roberts, G. D.: Appl. Microbiol., 28 : 226(1974)
19. Becker, B., Lechevalier, M. P., Gordon, R. E. and Lechevalier, H. A.: Appl. Microbiol., 12 : 421(1964)
20. Yamaguchi, T.: J. Bacteriol., 89 : 444(1965)
21. Becker, B., Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H. A.: Appl. Microbiol., 13 : 236(1965)
22. Buchaman, R. E. and Gibbons, N. E. : In 'Bergey's Manual of Determinative Bacteriology', 8th Ed., Williams & Wilkins, Baltimore.(1974)
23. Locci, R.: In 'Bergy's Manual of Systematic Bacteriology', Vol. 4, Williams & Wilkins, Baltimore (1989)
24. Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H.: Int. J. Syst. Bacteriol., 20 : 435(1970)

### Identification of herbicidal antibiotic maculosins-producing *Streptomyces rochei* 87015-3

Hong-Yon Cho\*, Yong-Chul Choi\*\*, Hyung-Joo Suh\*\*\*, Kwang-Soon Shin\*\*\*\*, Heui-Bong Lee, Hyung-Jin Kwon, and Soo-Un Kim (Department of Agricultural Chemistry and The Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Suwon 441-744, \*\*Agricultural Chemicals Research Institute, Rural Development Agency, \*Department of Food Science and Industry, \*\*\*Department of Food and Nutrition, Junior College of Allied Health Sciences, Korea University and \*\*\*\*Institute of Biotechnology, Korea University)

**Abstract** : A bacterial strain, which has been shown to produce herbicidal antibiotics maculosins and phenylacetic acid, was identified as a member of *Streptomyces rochei*. The identification was based on morphological and physiological characteristics. This is the first bacterial strain that produces maculosins other than a fungus, *Alternaria alternata*.