

## Actinomycin X<sub>2</sub>를 생산하는 방선균 분리주 No.1372의 동정

하상철<sup>1</sup> · 홍순덕\*

<sup>1</sup>KIST, 유전공학 연구소 생물공학 연구실, 경북대학교 자연과학대학 미생물학과

### Identification of the *Actinomycetes* Strain No.1372, A Producer of Actinomycin X<sub>2</sub>

Ha, Sang-Chul<sup>1</sup> and Soon-Duck Hong\*

<sup>1</sup>Laboratory of Biotechnology, Genetic Engineering Research Institute, KIST,  
P.O. Box 17, Daeduk Science Town, Daejeon 305-606, Korea  
Department of Microbiology, College of Natural Sciences,  
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

**Abstract** — Identification of the Actinomycetes isolate strain No.1372, a producer of Actinomycin X<sub>2</sub> was performed by using ISP method. The strain, designated as No.1372, was identified as *Streptomyces floridae* based on its morphological, physiological and biochemical characteristics. The highest production of the antibiotics by the strain was achieved in a fermentation medium containing soluble starch, yeast extract, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl, CaCO<sub>3</sub>, and trace element.

현재까지 수많은 천연 항생물질이 발견되었는데 그 중에서 약 70%가 방선균, 20%가 곰팡이, 10%가 *Bacillus*와 *Pseudomonas* 등의 세균으로부터 생성되었으며, 그 중의 소수가 의약품으로서의 가치가 인정되어 임상적으로 사용되고 있다. 한편, 항생물질의 연구는 세균이나 곰팡이 병원균에 유효한 물질로부터 암 또는 바이러스병에 유효한 물질의 탐색으로 발전되었으며, 계속해서 기존 항생물질 내성균, 그람음성세균에 유효한 신규 항생물질 혹은 기존 항생물질의 보다 효과적인 유도체 개발에 관한 확대된 연구로 나아가고 있다(1).

저자들은 항암항생물질을 탐색하기 위한 미생물 스크리닝을 진행하여, 전국 각지의 토양을 채취하여 이들로부터 방선균을 분리해 내고, 분리된 방선균을 동정하는 연구를 수행하였다. 이 과정에서 actinomycin X<sub>2</sub>를 생산하는 방선균 분리주 No.1372를 선별할 수 있었다. 따라서 본보에서는 ISP(International Streptomyces Project)법(2-6)에 따라 분리주 No.1372의 형태학적, 생리학적, 배양학적 특성등을 조사하여 분리주에 대한 동정을 하였다.

**Key words:** Identification, *Streptomyces floridae*, actinomycin X<sub>2</sub>

\*Corresponding author

## 재료 및 방법

### 방선균의 분리

멸균 생리 식염수 10 ml에 토양시료 1g을 넣고 20분 동안 교반한 다음 멸균수로 10<sup>-4</sup>~10<sup>-5</sup>배로 희석하여 0.1 ml를 분리용 배지(modified starch-nitrate agar와 HV agar)에 도달한 후 28°C에서 2-4주간 배양하여 나타난 집락을 순수분리하였다(7).

### 방선균 분리주 No.1372의 배양학적 특성 조사

분리주 No.1372를 oatmeal agar, yeast extract-malt extract agar, inorganic salts-starch agar, glycerol asparagine agar, tyrosine agar, glucose asparagine agar 등의 배지에 균주를 동시에 접종하고, 14일간 배양하면서 성장의 정도와 집락의 색깔 및 상면, 저면의 색깔, 가용성 색소 생산 여부등을 관찰하였다(2).

### 분리주 No.1372의 형태학적 특성 관찰

Yeast extract-malt extract agar, oatmeal agar, inorganic salts-starch agar 배지에 도달하여 28°C에서 7일간 배양 후 위상차 현미경 관찰을, 14일간 배양 후 주사형 전자현미경 관찰을 통해 균사의 분리 형태와 포자의 모양, 크기 및 배열 상태를 검정하였

다(8, 9).

**분리주 No.1372의 생리학적 특성 조사**

탄소원 이용성은 Pridham과 Gottlieb 방법(10)으로 하였고 세포벽 성분인 diaminopimelic acid(DAP) isomer의 동정 방법은 Lechevalier방법(11)으로 하였다.

**최적 배지 성분 결정**

최적 탄소원을 결정하기 위하여 기본 배지 A(0.2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% NaCl, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2% CaCO<sub>3</sub>, pH 7.0)에 최종 농도가 1% 되도록 각종 탄소원을 첨가하여 배양하였다. 질소원의 경우 기본배지 B(1% soluble starch, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% NaCl, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2% CaCO<sub>3</sub>, pH 7.0)에 유기 질소원과 무기 질소원의 최종 농도가 각각 0.5%, 0.2% 되도록 첨가하여 배양하였다. 무기염의 영향을 알아보기 위해서 각종 무기염을 기본배지 C(1% soluble starch, 0.5% yeast extract, 0.2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% NaCl, 0.2% CaCO<sub>3</sub>, pH 7.0)에 최종 농도가 0.1 mM되도록 첨가하여 항생물질의 생산에 미치는 영향을 알아보았다.

**최적 배양 조건 결정**

배지 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 앞의 실험에서 결정된 최적 배지의 pH를 3.0~10.0의 범위로 각각 조절하여 균을 배양한 후 항생물질의 생산정도를 조사하였다. 한편 20~50°C 온도범위에서 최적 배양 온도를 조사하였다. 최적 배양시간을 조사하기 위하여

time course를 조사하였는데 24시간마다 배양액을 채취하여 균의 증식, pH 변화 및 항균 활성을 조사하였다.

**결과 및 고찰**

**방선균 분리주 No.1372의 분리**

토양은 전국 각지의 토양을 대상으로 500여 곳에서 수집하였다. 수집된 토양은 방선균 분리용 배지에서 집락의 형태와 크기, 기균사의 착색 상태, 균사의 형태 등 형태적인 특성이 다르게 나타나는 2500 균주를 분리하여 항균 활성을 나타내는 균주를 10개 분리하였다. 그 10여 균주 가운데 항생물질의 생산 능력이 뛰어나고 열과 산, 알칼리 pH에서 안정한 항생물질을 생산하는 균주를 방선균 분리주 No.1372로 표시하였다.

**배양학적 특성**

여러가지 고체 배지에서 분리주 No.1372 균주를 동시에 28°C 에서 14일간 배양하면서 생육, 기균사의 색깔, 배면 색깔, 수용성 색소등 배양학적 특성을 관찰하였으며, 그 결과는 Table 1과 같다. 대부분의 배지에서 균의 생육은 양호하였으며 특히 yeast extract-malt extract agar, oatmeal agar, inorganic salts-starch agar에서 기균사의 생육 및 포자 형성이 좋았다. 기균사의 색깔은 대개 노란색 계통이었으며, 배면 색깔은 갈색 계통이었다.

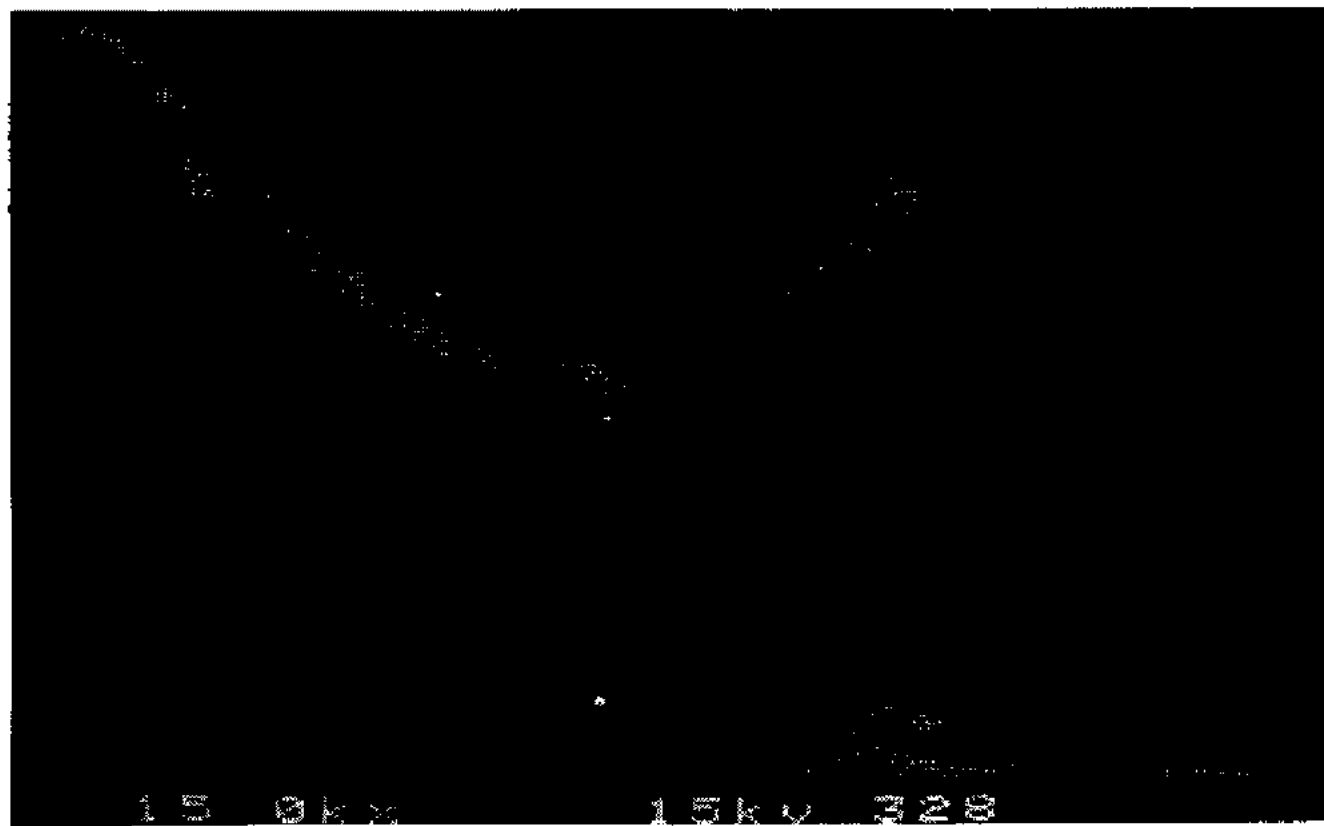
**Table 1. Cultural characteristics of streptomyces sp.1372**

Medium	Growth	Sporulation (colony surface)	Aerial mycelium (aerial mass color)	Substrate mycelium (reverse color)	Soluble pigment
Yeast extract-malt extract agar (ISP NO.2)	Good	Abundant	Graysh yellow	Red brown	None
Oatmeal agar (ISP NO.3)	Good	Abundant	Graysh yellow	Strong yellowsh brown	None
Inorganic salts-starch agar (ISP NO.4)	Good	Abundant	Whitish yellow	Yellow	Yellow
Glycerol-asparagine agar (ISP NO.5)	Moderate	Fair	Whitish yellow	Pale yellow	None
Peptone-yeast extract agar (ISP NO.6)	Poor	Poor	Yellow	Red brown	None
Tyrosine agar (ISP NO.7)	Poor	Poor	Graysh black	Black	Black
Sucrose-nitrate agar (Czapek-Dox agar)	Poor	Poor	Pale yellow	Yellow	None
Glucose-asparagine agar	Moderate	Fair	Graysh yellow	Yellow	None

\*Good>Moderate>Poor, \*\*Abundant>Fair>Poor, \*\*\*cultured at 28°C for 2 weeks.



A



B

**Fig. 1. Morphology of *Streptomyces* sp. 1372.**

A: Phase-contrast photomicroscope. Cultured for 1 week on yeast extract–malt extract agar(ISP NO.2) at 30°C.

B: Scanning electron microscope of spores. Cultured for 2 weeks on yeast extract–malt extract agar(ISP NO.2) at 30°C.

### 형태학적 특성

분리주 No.1372 균주를 yeast extract–malt extract agar(ISP2), oatmeal agar(ISP3), inorganic salt–starch agar(ISP4) 3가지 배지에서 배양한 후 위상차 현미경과 주사형 전자 현미경 관찰을 통해 균사의 분지 형태와 포자의 모양, 크기, 배열 상태를 검정하였다. 그 결과는 Fig. 1과 Table 2와 같다. 포자 배열은 포자가 10~50개가 연결된 rectus flexible이었고, 포자의 형태는 타원형이었으며, 그 크기는  $0.4 \sim 0.5 \times 1.1 \sim 1.2 \mu\text{m}$ 이었고 표면은 smooth type이었다.

### 생리학적 특성

분리주 No.1372의 당이용성을 살펴 본 결과 xylose, mannitol, fructose는 잘 이용하며, 그외 L-arabinose, sucrose, inositol, L-rhamnose, raffinose는 이용하지 못하였다. 또한, 분리주 No.1372는 비교적 넓은 배양 온도와 산성 pH에서도 잘 생육하는 것으로 나타났

**Table 2. Morphological characteristics of *Streptomyces* sp.1372**

Colony surface	velvety, powdery
Spore chain	rectus flexible
(spore number)	(10-50)
Spore size	1.0-2.0 $\mu\text{m}$
Spore surface	smooth

\*on yeast extract–malt extract agar, oatmeal agar

**Table 3. Comparison of taxonomic characteristics of strain 1372 with *Streptomyces floridae***

	No.1372	<i>S. floridae</i>
Spore chain	rectiflexibiles	rectiflexibiles
Spore surface	smooth	smooth
Aerial mass color	yellow	yellow
Reverside color	red-brown	dull violet, red-brown
Cell wall constituent	L-DAP	L-DAP
Melanine pigment production	+	-
Tolerance of NaCl (7%)	-	-
Carbon utilization		
L-arabinose	-	-
D-xylose	+	+
Meso-inositol	-	-
D-mannitol	+	+
D-fructose	+	+
L-rhamnose	-	-
Sucrose	-	-
Raffinose	-	-

+: positive, -: negative

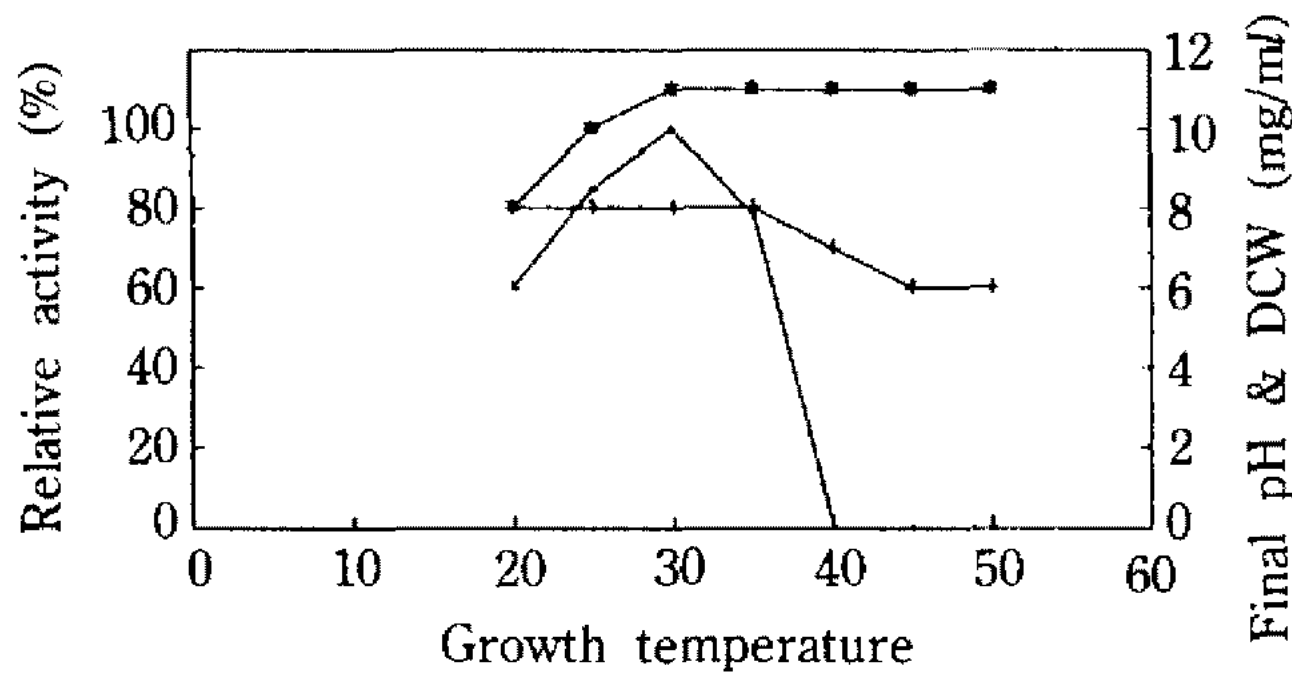
으며, 세포벽의 DAP-isomer형은 LL-형으로 나타났다 (Table 3).

분리주 No.1372의 세포벽 DAP를 방선균 wall chemotype과 비교하여 볼 때 wall chemotype I에 해당되었고, 형태학적 특성이 여러개의 spore chain을 가진 기균사가 존재하는 것은 *Streptomyces*속 뿐이었다. 따라서 분리주 No.1372는 *Streptomyces*속으로 분류되었다.

항생물질 actinomycin X<sub>2</sub>(12)와 UV 및 NMR spectrum이 같은 항생물질 HS-1을 생산하는 분리주 No. 1372를 포자의 형태, 각종 배지에서의 생육 상태 및 색깔과 생리적 특성등의 관점에서 ISP에 수록된 *Streptomyces*속의 균주들과 비교할 때 *Streptomyces floridae*(13)와 유사함을 알 수 있었다. 이 균주와 No.1372의 ISP 배지에서의 기균사 색깔, 배지배면의 색깔,

**Table 4. Optimum composition of the medium for antibiotic production**

Components	Concentrations
Soluble starch	1.5%
Yeast extract	0.5%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1%
NaCl	0.1%
CaCO <sub>3</sub>	0.2%
FeSO <sub>4</sub>	0.1 mM



**Fig. 2. Effect of culture temperature on the antibiotic production.**

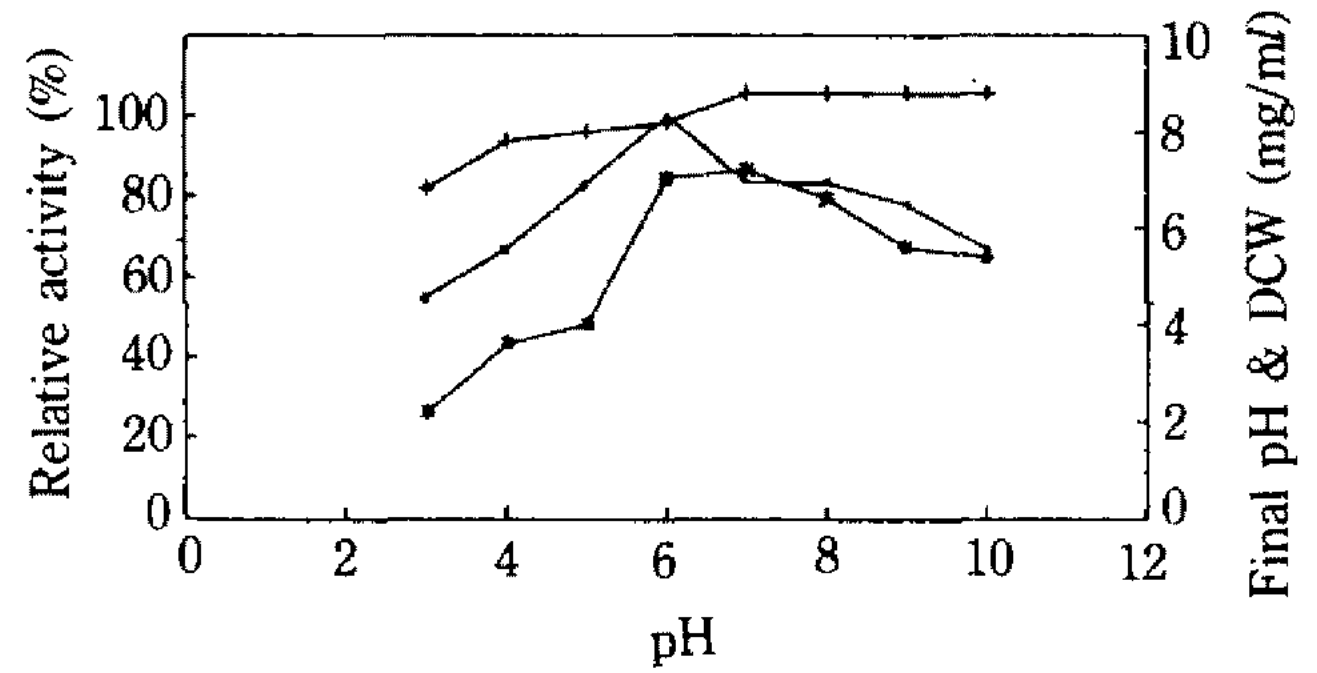
The activity was a relative inhibition zone to *B. subtilis*.  
 --- Activity (%) -|- Final pH - \* - DCW (mg/ml)

수용성 색소의 생성, 전자현미경에 의한 포자 및 포자사슬의 형태학적 특성, 당 이용성을 비교하여 Table 3에 정리하여 비교하였다. 분리주 No.1372와 *S. floridae*는 대체로 유사하였으며 melanin 색소의 생성만이 다를 뿐 그 이외의 특징은 일치하였다. 따라서 분리주 No.1372는 *S. floridae*로 동정할수 있었으며 *S. floridae* SHS-1372로 명명하였다. 기존의 actinomycin X<sub>2</sub> 항생물질을 생산하는 방선균 중에는 *S. floridae*가 보고된 바가 없었으며 저자들이 분리한 *S. floridae* SHS-1372가 처음이다(14, 15).

**항생물질의 최적 발효 조건**

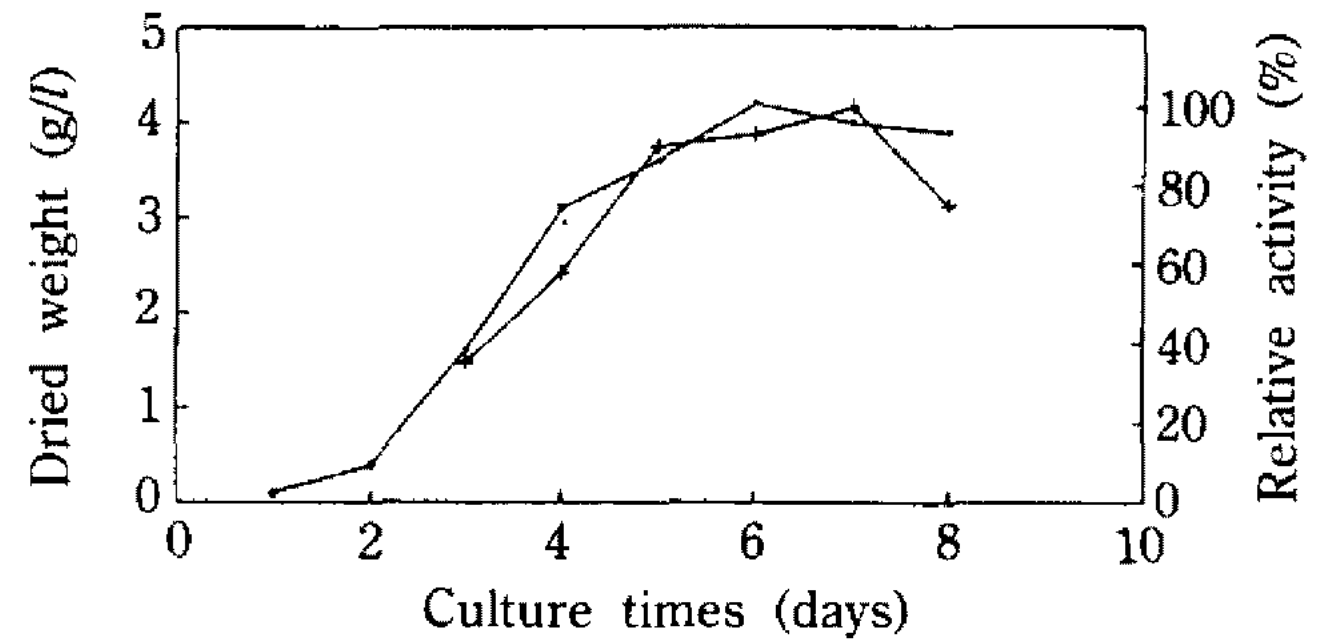
배지 성분의 종류와 그 농도에 대한 활성의 변화를 조사한 결과 No.1372 균주가 항생물질을 생산하는데 있어서의 최적 배지 성분은 다음과 같이 나타났다.

탄소원의 경우 균의 생육은 glucose와 soluble starch를 사용하였을 때 가장 왕성하였으나 활성은 soluble starch와 galactose를 사용하였을 때 최대로 나타났다. 질소원으로는 유기질소원이 무기질소원보다 균의 생육 및 항생물질 생산에 더 적합한 것으로 나타났다. 특히 yeast extract가 가장 좋은 활성을 보였다. 무기염에 있어서는 FeSO<sub>4</sub>를 첨가하였을 때가



**Fig. 3. Effect of initial medium pH on the antibiotic production.**

The activity was a relative inhibition zone to *B. subtilis*.  
 --- Activity (%) -|- Final pH - \* - DCW (mg/ml)



**Fig. 4. Time course on the antibiotics production at optimal culture condition.**

The activity was a relative inhibition zone to *B. subtilis*.  
 --- Growth -|- Activity (%)

가장 좋은 활성을 보였다. 이상의 결과를 종합하면 Table 4에 나타내었다.

배양온도 및 배지의 초기 pH 변화에 따른 균의 생육 및 항생물질 생산성을 조사한 결과 Fig. 2 및 Fig. 3과 같이 나타났다. 배양온도에 있어서 30°C에서 최고로 나타났으며 35°C에서의 활성은 감소하기 시작하였다.

배지 초기 pH의 경우는 pH 6.0일 때가 활성이 최대로 나타났다. No.1372 균주는 비교적 넓은 범위의 pH에서 활성이 양호한 것으로 사료되었다. 배양시간에 따른 균의 증식과 활성의 변화는 Fig. 4와 같이 나타났다. 그 결과 균의 증식은 배양 2일째부터 크게 증가하기 시작하여 4일째까지 급속도로 증가하였으며, 활성은 3일째에서 시작하여 6일째까지 증가하였다.

**요 약**

토양 시료로부터 순수분리한 2500여 방선균주중에 항암 활성을 나타내는 균주 No.1372를 선별하였으며, 이 균주 No.1372를 ISP법과 화학적 방법에 의해 동정하였다. 분리주 No.1372의 포자 배열은 rectus fle-

xible이었으며 포자 표면은 smooth로써 DAP isomer 분석에 의해 세포벽 유형은 wall chemotype I으로 결정되었으며, 형태학적 특성, 생리학적 특성등을 종합하여 볼 때 분리주 No.1372는 *Streptomyces floridae*로 동정되었다. 이 균주로부터 항생물질 생산의 최적 조건으로는 탄소원에 soluble starch, 질소원에 yeast extract와  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 무기염에는  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  순으로 나타났으며 초기 배양 pH와 온도 각각 pH 6.0, 28~30°C 조건이 가장 좋았다.

### 감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 일반연구 학술조성비 지원(1992년)에 의하여 이루어진 것이며, 지원에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Lancini, G. and F. Parenti. 1982. *Antibiotics, An Intergrated View*, Springer-Verlag.
2. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
3. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1968. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. II. species descriptions from first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **18**: 69-189.
4. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1968. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. III. additional species descriptions from first and second studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **18**: 279-392.
5. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1969. Cooperative description of type strains of *Streptomyces*. IV. additional descriptions from the second, third and fourth studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **19**: 391-512.
6. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1972. Cooperative description of type strains of *Streptomyces*. V. additional descriptions. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **22**: 265-394.
7. Masayuki, H. and H. Nonomura. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil *Actinomycetes*. *J. Ferment. Technol.* **65**: 501-509.
8. Harrigan, W.F. and M.E. McCance. 1966. *Laboratory Method in Microbiology*. Academic Press, New York and London.
9. Booth C. 1971. *Method in Microbiology*. Vol. 4, Pp. 320. Academic press, Inc.
10. Gottlieb, D. and Pridham, T.G. 1948. The utilization of carbon compounds by some *Actinomycetes* as an aid for species determination. *J. Bacteriol.* **56**: 107-114.
11. Lechevalier, M.P. and H. Lechevalier. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic *Actinomycetes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**: 435-443.
12. Ha, S.C and S.D. Hong. 1994. Characteristics of antitumor antibiotics HS-1 from a *Streptomyces floridae* SHS-1372. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 2.
13. Bartz, Q., J. Ehrlich, J.D. Mold, M.A. Penner, and R.M. Smith. 1951. Viomycin, a new tuberculostatic antibiotic. *Am. Rev. Tuberc. Pul. Dis.* **63**: 4-6.
14. Umezawa, H. 1978. *Index of Antibiotics from Actinomycetes*. Vol I. II, Japan Scientific Societies Press. Tokyo.
15. Bycroft, B.W. 1988. *Dictionary of Antibiotics and Related Substances*, Chapman and Hall Ltd., N.Y.

(Received October 10, 1993)