

활성산소를 발생하는 항생물질을 생성하는 방선균 분리균주의 수리동정

이동선 · 하상철¹ · 신우창 · 김태호 · 김홍중¹ · 박용하¹ · 김종국 · 홍순덕*
경북대학교 미생물학과, ¹한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소

Numerical Identification of an Actinomycetes Strain Producing an Antibiotic that Generates Oxygen Radical

Dong-Sun Lee, Sang-Chul Ha¹, Woo-Chang Shin, Tae-Ho Kim, Hong-Joong Kim¹, Yong-Ha Park¹, Jong-Guk Kim and Soon-Duck Hong*

Department of Microbiology, College of Natural Science, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

¹Genetic Engineering Research Institute, KIST, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea

Abstract— Chemotaxonomy and numerical identification were carried out for an isolate strain No.8001 producing an antibiotic that generates oxygen radical. The genus of strain No.8001 was decided as *Streptomyces* sp. from chemotaxonomic data. Thirty-nine taxonomic unit characters were tested and the data were analyzed numerically using the TAXON program. The isolate was best matched to *Streptomyces citreofluorescens* in the major cluster 1B of *Streptomyces*. Therefore, it was concluded that the isolate was identified to be a member of *Streptomyces citreofluorescens*.

방선균으로부터 항생물질을 비롯한 생리활성물질의 탐색은 penicillin과 streptomycin이 발견되면서 그 중요성이 인식되어 현재까지 전 세계적으로 방선균에 대한 탐색이 계속되어 왔다(1-5). 한편, 근래에는 산업적으로 중요한 방선균을 형태적 차이와 배양학적 차이만으로는 정확하게 동정하기 어려우므로 방선균의 체계적인 분류방법이 제안되어 오고 있다.

방선균의 수리분류연구는 Silverstri 등(6)에 의한 *Streptomyces*속 동정이 효시가 되어 1983년 Williams 등(7, 8)에 의하여 분류데이터를 근거로 하는 수리동정방법이 제안되었다.

본 연구는 활성산소 발생능이 있는 항생물질을 생성하는 방선균 No.8001을 선별하여 Williams의 방법에 따라 시험한 결과를, Ward에 의해 개발된 TAXON program을 이용하여 그 균주를 동정하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

Key words: Antibiotic that generates oxygen radical, chemotaxonomy and numerical identification, *Streptomyces citreofluorescens*

*Corresponding author

방선균의 분리 및 배양조건

대구근교에서 채취한 토양에서 방선균 분리를 위하여 starch-nitrate agar 배지와 humic acid-Vitamin (HV) agar 배지(9)를 사용하였으며 선별균주의 배양은 modified Bennett's agar(MBA) 배지(10)와 starch-nitrate agar 배지 등을 사용하였다.

활성산소 발생능이 있는 항생물질생산 균주의 탐색

Bacillus subtilis(KCTC 3069, rec⁻)의 포자현탁액(10⁴ CFU/ml)을 포함한 검정용 평판배지(polypeptone 1.0%, NaCl 0.05%, agar 1.2%, pH 7.2) 위에 시료액을 묻힌 여지를 놓고, 그 위에 radical scavenger(querce-tin, 1 mg/ml)을 묻힌 여지를 교차하여 없고서 37°C에서 배양한 후 항균 zone의 변화를 관찰한 결과, 여지의 교차부위에서 항균 zone이 없어지는 시료균주를 선별하였다(11, 12).

화학적 동정(Chemotaxonomic identification)을 위한 특성 분석

Nutrient broth에서 증식된 균체를 동결건조시킨 후 DAP(diaminopimelic acid)와 지방산, menaquinone(MK), G+C 몰 함량을 분석하였다(13-16).

균의 수리동정을 위한 특성과 동정스코어(Identification score)

선별균주인 Streptomycetes의 수리동정에 사용하는 단위형질(unit character)을 Williams 등(7,8)의 방법에 따라 시험하였으며, TAXON program을 이용하여 시험항목의 결과로부터 분리주의 동정스코어를 결정하였다.

Willcox probability(17) 분류군(Taxon J)에 대한 분리주(U)의 유사정도(likelihood)는 모든 분류군에 대한 분리주의 유사정도의 합으로 나눈 값을 말한다(7). 스코어 값이 1.0에 가까울수록 그 matrix내 group과 잘 맞는다는 것을 의미한다.

분류학적 거리(Taxonomic distance) 분리주와 비교되는 group의 중심(centroid)으로부터 분리주의 거리를 나타낸다. 낮은 값일수록 그 group과 높은 상관관계를 나타내며 이 값을 다음의 식으로 계산할 수 있다.

$$[\sum (U_i - P_{ij})^2 / m]^{1/2}$$

이때 m은 형질의 수이고, U_i 는 형질 i에서 나온 U의 점수(positive일 때 1이거나 negative일 때 0)이며, P_{ij} 는 Taxon J의 형질 i에 대한 positive의 비율을 의미한다.

95% 분류군 반경(95% Taxon radius) 이는 분류군 J의 95%의 구성군이 포함되는 분류군의 반경을 나타낸다.

% Probability of Strain Further Away cluster 전체균주에 대해 동정된 미지의 시험균주 밖에 존재하는 균주가 확률적으로 몇 %에 해당하는 가를 나타낸다.

결과 및 고찰

활성산소 발생능이 있는 항생물질 활성

Streptonigrin(18), anthracycline(19, 20) 등과 같은 여러 항암제는 superoxide anion(O_2^-), singlet oxygen, peroxide와 hydroxyl radical 등과 같은 oxygen radical을 생성한다. 한편, 대부분의 암세포는 정상세포보다 superoxide dismutase의 함량이 낮으므로 암세포에서는 이러한 toxic한 활성산소를 충분히 제거하지 못하게 되며, 이들 free radical은 DNA 가닥을 절단하여 항암효과를 나타내는 것으로 알려졌다(21, 22), 이러한 활성산소를 생성하는 항암제의 탐색은 새로운 항암제의 개발에 유효하리라 생각되고 있다. 활성산소 발생하는 항생제를 탐색하기 위해서는 시험균은 rec^+ 보다 rec^- 이 더 유효하므로(11) rec^- 균주

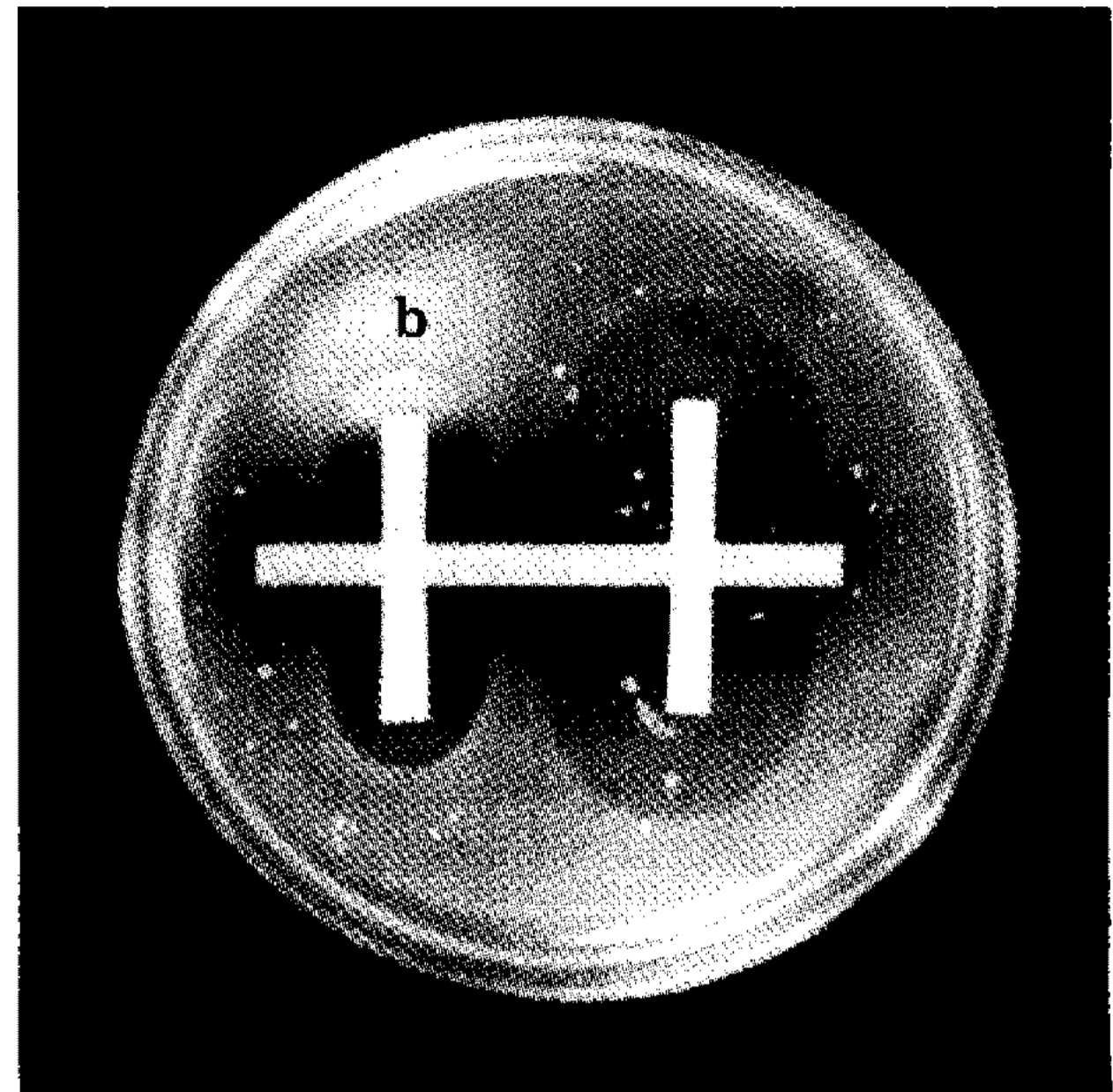


Fig. 1. Assay of antibiotic that generates oxygen radicals.

- a. Radical scavenger (Quercetin, 1 mg/ml)
- b. Ampicillin (0.5 μ g/ml)
- c. Sample (0.1 μ g/ml) that purified from the isolated strain No.8001

인 *Bacillus subtilis*(KCTC 3069)을 사용하였다. 분리균에서 생산하는 항생물질의 활성산소 발생능 시험결과, 분리주 No.8001으로부터 정제한 항생물질 sample구는 ampicillin에 의해 나타나는 항균 zone과는 달리 radical scavenger 부근에서는 항균 zone이 길항되므로 이 항생물질은 활성산소를 생성한다(Fig. 1).

형태적 특성과 화학적 분류학적 특성

분리주 No.8001은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(23)와 Actinomycetes Taxonomy(24)의 방법에 따라 International Streptomyces Project(ISP) 배지(9, 25-28), Czapeck 배지(9) 등에서 배양하면서 7, 14, 21일 후에 생육, 기균사 색깔, 배면색깔, 수용성 색소생성 등의 배양학적 특성을 관찰하였으며, 그 결과는 Table 1와 같다. Inorganic salts-starch agar (ISP medium 4)와 Tyrosine agar(ISP medium 7) 배지를 제외하고는 전반적으로 생육이 양호하였으며, 기균사의 색깔은 대개 white 계통이며 수용성 색소는 보라색으로 나타났다. Inorganic salts-starch agar(ISP medium 4) 배지에서 21일간 배양한 분리주 No.8001의 포자를 전자현미경으로 관찰한 결과, 기균사에서 포자사슬의 형태는 rectiflexible하며, 포자의 표면은 smooth이며 포자사슬은 분절된 상태였다(Fig. 2).

분리주 No.8001의 세포벽의 peptidoglycan층에 존재하는 diaminopimelic acid(DAP) 이성질체는 LL-

Table 1. Cultural characteristics of the isolated strain No.8001

Medium	Growth	Aerial mass color	Substrate mycelium	Diffusible pigment
Yeast extract-malt extract (ISP No.2)	Good	Abundant; Gray	Yellow	None
Oatmeal agar (ISP No.3)	Good	Abundant; White	Yellow	None
Inorganic salts-starch agar (ISP No.4)	Moderate	Abundant; White	Yellow	Yellow
Glycerol-asparagine agar (ISP No.5)	Moderate	Moderate; White	White	Brown
Peptone-yeast extract-iron agar (ISP No.6)	Good	Poor; Yellow	Yellow	None
Tyrosine agar (ISP No.7)	Poor	Poor; White	Black	None
Arginine-glycerin agar	Good	Abundant; White	White	None
Starch agar	Good	Abundant; White	Yellow	None
Emersion agar	Good	Abundant; Gray	Yellow	Yellow
Peptone-beef extract agar	Moderate	Poor; Yellow	White	None
Dulaney's medium agar	Good	Abundant; White	Yellow	Yellow
Glucose-asparagine agar	Moderate	Moderate; White	White	None
Glucose-peptone agar	Good	Abundant; White	Yellow	None
Czapek's sucrose agar	Moderate	Moderate; White	White	None
Bennett medium (modified)	Good	Abundant; Gray	Yellow	Yellow

The strain was cultured on various kinds of media at 28°C for 14 days.

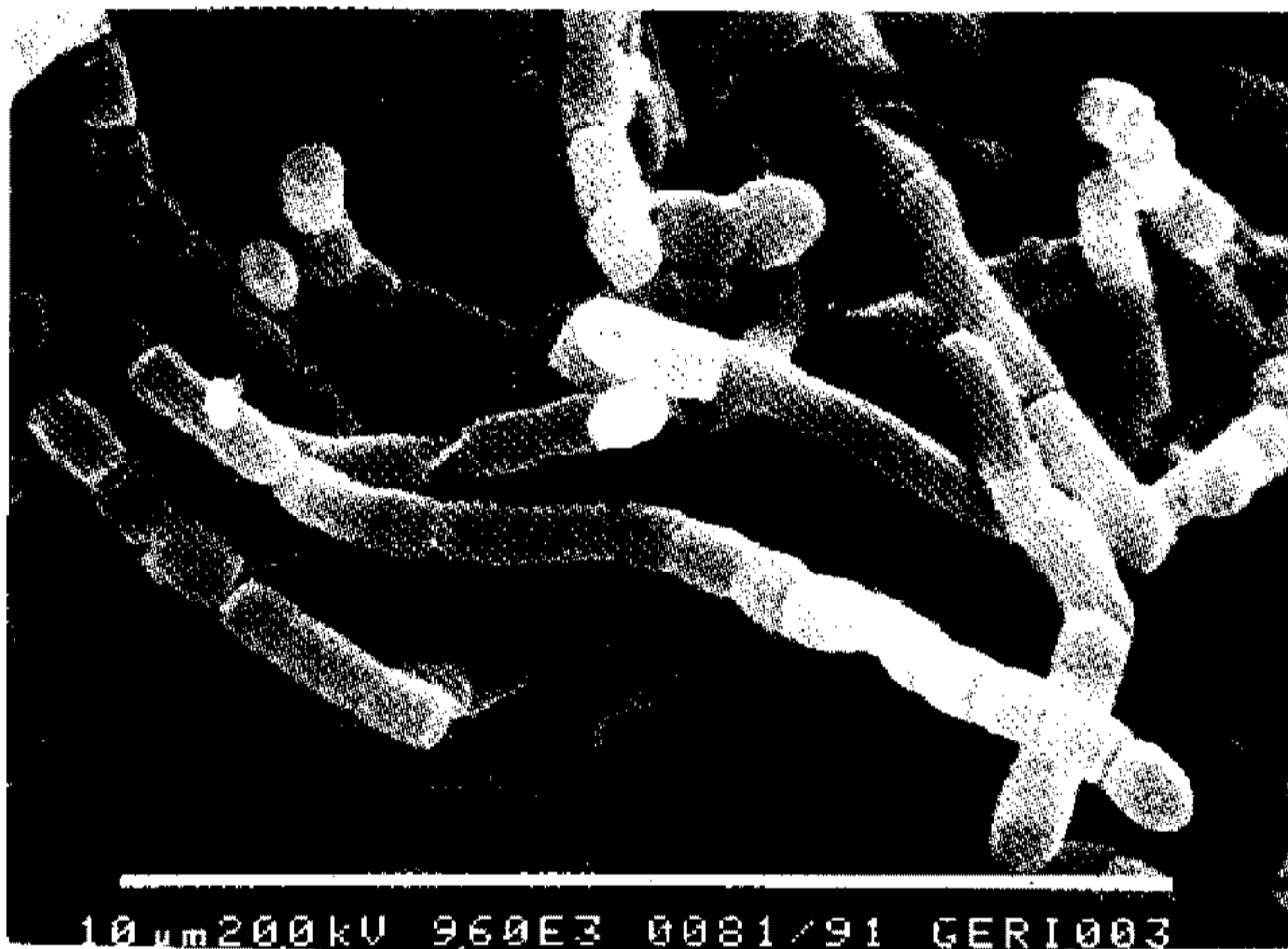


Fig. 2. Scanning electron micrograph of spore chains (×9,600) of the isolated strain No.8001 cultured for 2 weeks on inorganic salts-starch agar (ISP No.4) at 30°C.

DAP를 함유하였으며, 아미노산은 glycine, glutamic acid, alanine이 검출되는 chemotype I에 해당된다 (Fig. 3). chromosomal DNA의 G+C 함량은 78.486%로 나타났으며(data not shown), 지방산 분석에서는 Fig. 4와 같이 iso-branched fatty acid C₁₆와 anteiso-branched fatty acid C₁₅, C₁₇로 구성되는 2C type이며 (29, 30), 호흡연쇄의 전자전달에 관계하는 quinone type의 분석에서는 isoprenoid chain이 9(H₆, H₈, H₄)개로 연결된 menaquinone(MK-9)를(31, 32) 나타나는 전형적인 Streptomyces속이었다(Fig. 5). 이상과 같은 배양특성, 형태적 특성과 화학적 분석결과 No.8001은

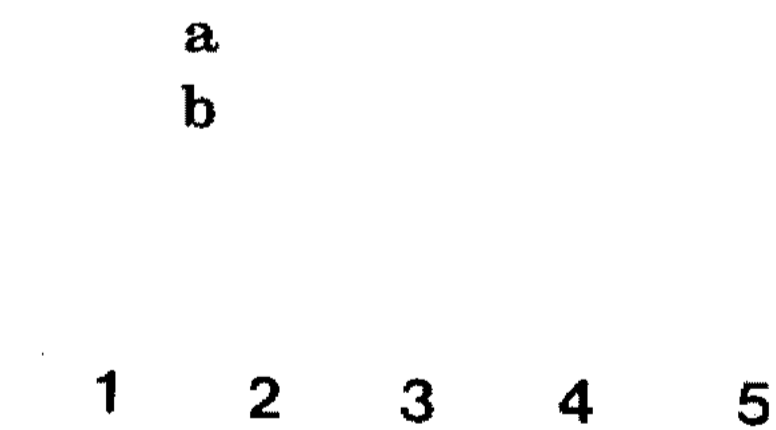


Fig. 3. Cellulose thin layer chromatogram of cell wall diaminopimelic acid (DAP) isomers and amino acids of the isolated strain No.8001. Identification of the DAP isomers is achieved single-dimensional TLC in a solvent system containing methanol-water-6N HCl-pyridine (80:20:4:10, v/v). 1. Cell wall hydrolysate, 2. DAP isomers (a; LL-DAP, b; meso-DAP), 3. Glycine, 4. Glutamic acid, 5. Alanine

Table 2. Identification of the isolate *Streptomyces* sp. 8001 to the major clusters of *Streptomyces* by using TAXON program

Taxon major cluster (Centrotpe member)	Tax distance	95% Taxon radius	% Prob of strain futher away	Willcox probability
1B (<i>Streptomyces albidoflavus</i>)	0.3929	0.3801	2.3022	0.985143
3 (<i>Streptomyces atroolivaceus</i>)	0.4266	0.3528	0.0065	0.013732
5 (<i>Streptomyces exfoliatus</i>)	0.4540	0.4018	0.1361	0.000189

Table 3. Identification of the isolate *Streptomyces* sp. 8001 to the major clusters of *Streptomyces* by using TAXON program

Member of cluster 1B	Tax distance	95% Taxon radius	% Prob of strain futher away	Willcox probability
HMO (Hypothetical median organism)	0.2038	0.3801	99.9285	0.948261
Centrotpe (<i>S. griseinus</i>)	0.2375	0.3801	98.8287	0.993101
Best match strain (<i>S. citreofluorescens</i>)	0.2816	0.3801	85.4287	0.999763
Outer-most member (<i>S. cremeus</i>)	0.4390	0.3801	0.0563	0.532262
Isolate (<i>Streptomyces</i> sp. 8001)	0.3929	0.3801	2.3022	0.985143

Table 4. Comparison of taxonomic unit characters between member organisms in cluster 1B of *Streptomyces* and the Willcox probability calculated by TAXON program

Taxonomic unit characters	% value in cluster 1B	HMO in cluster 1B	Centrotpe in cluster 1B	Best matched strain	Isolate	Outer-most member
RFS	89	+	+	+	+	-
RAS	3	-	-	-	-	+
SPI	8	-	-	-	-	+
BIV	1	-	-	-	-	+
SMO	97	+	+	+	+	+
RUG	1	-	-	-	-	-
RED	5	-	-	-	-	-
GRY	3	-	-	-	-	-
GRN	1	-	-	-	-	-
ROP	1	-	-	-	-	-
YBP	11	-	-	+	+	-
MPI	13	-	-	-	-	-
FRG	1	-	-	-	-	-
BUT	42	-	-	-	-	+
HIS	74	+	-	+	-	+
HYD	37	-	-	-	+	+
PEC	55	+	+	+	+	-
NO3	82	+	+	+	+	-
H2S	92	+	+	+	+	+
SUB	50	+	+	+	+	+
NIG	32	-	-	-	-	+
XAN	95	+	+	+	+	+
ALL	89	+	+	+	-	-
ARB	99	+	+	+	-	+
NEO	1	-	-	-	-	-
RIF	66	+	+	-	-	+

Table 4. Continued

Taxonomic unit characters	% value in cluster 1B	HMO in cluster 1B	Centrotype in cluster 1B	Best matched strain	Isolate	Outer-most member
45C	5	-	-	-	-	-
7NA	74	+	+	+	+	+
01Z	32	-	-	+	-	-
PHN	89	+	+	+	-	+
XYL	92	+	+	+	+	+
INO	32	-	-	-	-	-
MAN	99	+	+	+	+	+
FRU	95	+	+	+	+	+
RHA	82	+	+	+	+	+
RAF	18	-	-	-	-	+
INU	8	-	-	-	-	-
ADO	68	+	+	+	+	-
CEL	99	+	+	+	+	+
MATCHED		32	32	33	39	25
MISMATCHED		7	7	6	0	14
SSM VALUE (%)		82	82	85	100	64
STRAIN	Hypothetical median Org.	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	<i>Streptomyces citreofluorescens</i>	No.8001	<i>Streptomyces cremeus</i>	
Willcox probability	0.948261	0.993101	0.999763	0.985143	0.532262	

*Streptomyces citreofluorescens*와 outer-most strain인 *Streptomyces cremeus*의 TAXON 단위특성과 Willcox probability를 비교분석한 결과는 Table 2와 같다. 본 분리균주 *Streptomyces* sp. 8001는 주군집 1B에서 Taxon distance(0.3929)가 95% Taxon radius(0.3481)보다 약간 높으나 outer-most member strain인 *Streptomyces cremeus*의 Taxon distance(0.4390)보다 약간 적고 Willcox probability가 상당히 높으며, 군집의 중심에 있다는 확률(% probability of strain further away)이 centrotype(98.8287)이나 best match strain(85.4287)보다 낮은 2.3022의 수치를 나타내는 것으로 보아 분리균주는 주군집 1B의 중심에서는 다소 떨어진 영역내부에 위치하는 것으로 판단된다(Table 5).

분리주 *Streptomyces* sp. 8001와 best match strain인 *S. citreofluorescens*는 주군집을 동정하는데 필요한 39개의 단위형질중 포자형태, 색소생성능, 탄소원 및 질소원 이용성 등 33개의 단위형질에서 동일한 결과를 나타내었으며 그 SSM 값은 가장 높은 85.00이었다.

이상의 수리동정 결과 분리균 *Streptomyces* sp. 8001를 주군집 1B의 *Streptomyces citreofluorescens*로 동

정하였다.

요 약

활성산소 발생능이 있는 항생물질을 생산하는 방선균을 토양으로부터 분리하여 형태학적, 화학적 분석 및 수리동정을 실시하였다. 39개의 분류 단위형질을 TAXON program에 적용하여 종의 수리동정을 실시한 결과 분리균 8001는 *Streptomyces*의 제 1B 주군집에 속하는 *Streptomyces citreofluorescens*와 가장 높은 유사성을 나타냈다. 따라서 분리주는 *Streptomyces citreofluorescens*의 한균주로 동정하였다.

감사의 글

본 연구는 1992년도 과학재단 일반기초 연구비 지원(과제번호 921-1600-004-2)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Reading, C. and M. Cole. 1977. Clavulanic acid;

- a β -lactamase inhibiting-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial agents and chemother* **11**: 852-857.
2. Cross, T. 1982. *Devel. Indust. Microbil.*, Society for Industrial Microbiology, New York. **23**: 1-8.
 3. 大野雅二, 大村智. 1984. 抗生物質 研究の 最先端, 東京化学同人.
 4. Kusaca, T. 1985. 微生物 探索 分離 育種. CMC. Tokyo.
 5. Umezawa, H. 1982. Trends in Antibiotic Research Japan Antibiotics Research Association, Tokyo.
 6. Silvestri, L.G., M. Turi, L.R. Hill, and E. Gilardi. 1962. A quantitative approach to the systematics of actinomycetes based on overall similarity. *Symposium of the Society of General Microbiology* **12**: 333-360.
 7. Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Anderson, E. M.H. Welligton, P.H.A. Sneath, and M. Sackin. 1983 A. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1743-1813.
 8. Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Anderson, E. M.H. Welligton, J.C. Vickers, P.H.A. Sneath, M. Sackin, and A.M. Mortimer. 1983 B. Application of new theoretical concepts to the identification of *Streptomyces*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1815-1830.
 9. Difco manual. 1984. Dehydrated culture media and reagents for microbiology, 10th ed. Difco Lab. Detroit. U.S.A.
 10. Waksman, S.A. 1961. The actinomycetes. The Williams and Willkins Co., Baltimore. Vol.2.
 11. Yuzuru Matsuda, Mikio Kitahara, Kenji Maeda and Hamao Umezawa. 1982. A method of screening for antibiotics producing oxygen radicals. *J. Antibiotics* **35**: 928-930.
 12. S. Rafat Husain, Josiane Cillard and Pierre Cillard. 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* **26(9)**: 2489-2491.
 13. Yamada, K. and K. Komagata. 1970. Taxonomic studies on Coryneform Bacteria II. Principal Amino Acids in the Cell Wall and Their Taxonomic Significance. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **16**: 103-113.
 14. Komagata, K. and K.I. Suzuki. 1987. Lipid and cell wall analysis in bacterial systematics. Pp. 161-207. In Colwell, R.R. and Grigorova, R., eds. *Method in Microbiology* Vol.19. Academic Press.
 15. Tamaoka, J., Y. Katayama, H. Kuraish. 1983. Analysis of bacterial menaquinone mixtures by high performance liquid chromatography. *J. Appl. Bacteriol.* **54**: 31-36.
 16. Tamaoka, J. and K. Komagata, 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase HPLC. *FEMS Microbiol. Letters.* **25**: 125-128.
 17. Willcox, W.B., S.P. Lapage, S. Bascomb, and M. A. Curtis. 1973. Identification of bacteria by computer: theory and programming. *J. Gen. Microbiol.* **77**: 317-330.
 18. Cone, R., S.K. Hasan, J.W. Lown, and A.R. Morgan. 1976. The mechanism of the degradation of DNA by streptonigrin. *Can. J. Biochem.* **54**: 219-223.
 19. Someya, A. and N. Tanaka. 1979. DNA strand scission induced by adriamycin and aclacinomycin A. *J. Antibiotics* **32**: 839-845.
 20. Lown, J.W., S.K. Sim, K.C. Majumdar, and R.Y. Chang. 1977. Strand scission of DNA by bound adriamycin and daunomycin in the presence of reducing agents. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **76**: 705-710.
 21. Bozzi, A., Mavelli, I., Agro, A.F., et al. 1976. Enzyme defence against reactive oxygen derivatives II. Erythromyces and tumor cells. *Mol. & Cell Biochem.* **10**: 11-16.
 22. Motoharu Kondo and Toshikazu Yoshikawa. 1989. Role of free radicals in the treatment of cancer. *Jpn. J. Cancer Chemother.* **16(12)**: 3655-3661.
 23. Peter, H.A.S., S.M. Nicholas, M.E. Sharp, and J. G. Holt. 1986. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* **11**: 1104-1139. Williams and Willkin Co. Baltimore.
 24. Dietz, A. and D.W. Thayer. 1980. "Actinomycetes taxonomy" SIM special publication No.6. Society for Industrial Microbiology.
 25. Shiring, E.B. and D. Gottlieb. 1968. Cooperative descriptions of type cultures of *Streptomyces* II. species descriptions from first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **18**: 172-174.
 26. Shiring, E.B. and D. Gottlieb. 1968. Cooperative descriptions of type cultures of *Streptomyces* III. species descriptions from first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **18**: 150-152.
 27. Shiring, E.B. and D. Gottlieb. 1969. Cooperative descriptions of type cultures of *Streptomyces* IV. species descriptions from second, third and fourth studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **19**: 391-512.
 28. Shiring, E.B. and D. Gottlieb. 1972. Cooperative descriptions of type cultures of *Streptomyces* V. additional descriptions. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **22**: 265-394.
 29. Saddler, G.S., A.G. O'Donnell, M. Goodfellow, and D.E. Minnikin. 1987. SIMCA pattern recognition in the analysis of *Streptomyces* fatty acids. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1137-1147.
 30. Goodfellow, M. and D.E. Minnikin. 1985. Chemical method in bacterial systematics. Society for Applied Bacteriology Technical Series No.20. Academic Press, London.

31. Kroppenstedt, R.M. 1985. Fatty acid and menaquinone analysis of *Actinomycetes* and related organisms, Pp. 173-199. In Goodfellow and Minnikin (eds.). *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, Society for Applied Bacteriology Technical Series No.20. Academic Press, London.
32. Alderson, G., M. Goodfellow, and D.E. Minnikin. 1985. Menaquinone composition in the classification of *Streptomyces* and other *Sporoactinomyces*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1671-1679.

(Received 23 January 1995)