

Streptomyces sp. YJB-599가 생산하는 Genistein의 분리 및 정제

함병권 · 배동훈¹ · 유주현*

연세대학교 식품·생물공학과 및 생물산업소재연구센터
¹단국대학교 식품공학과

The Isolation and Purification of Genistein Produced by *Streptomyces* sp. YJB-599. Byoung-Kwon Hahm, Dong-Hoon Bai¹ and Ju-Hyun Yu*. *Bioproducts Research Center, Department of Food and Biotechnology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea.* ¹*Department of Food Engineering, Dankook University, Chunan 330-714, Korea* — A cytotoxic material was produced by strain No. 5-99 which was isolated from soil. Analyzing the cell wall components, LL-diaminopimelic acid was identified. From the existence of glycine in the cell wall, this strain was identified to *Streptomyces* sp. which has cell wall chemotype I and peptidoglycan type A3 connected by glycine. So, we named this strain to *Streptomyces* sp. YJB-599. The Active material was purified through solvent extraction, silica gel column chromatography and crystallized to needle-shaped white crystal. Analyzing the structure of this crystal by instrumental analysis and database, it was determined to genistein.

미생물은 다양한 생리대사기작을 지니므로써 많은 종류의 생리활성물질을 만들어 내고 있으며, 현재 사용되고 있는 생물공업제품의 대부분이 미생물의 대사산물로부터 개발된 생리활성물질들이다. 이런 관점에서 볼 때 탐색되지 않은 미생물을 대상으로 새로운 생리활성물질을 발견할 수 있는 가능성이 높기 때문에 미생물에 의한 생리활성물질의 탐색은 매우 중요한 의의를 갖는다. 특히, 방선균이 생산하는 여러가지 생리활성물질이 보고되면서(1) 방선균에 대한 탐색이 지속되어 왔다. 현재까지 알려진 생리활성물질의 80% 이상이 *Streptomyces* 속에서 분리되어 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

1950년대부터 시작된 항암활성물질의 체계적인 탐색으로 인하여 세계적으로 600여종 이상의 항암활성물질이 개발되었으며, 이를 이용한 화학요법은 암의 치료 및 암세포 자체의 생물학적 연구에도 많은 기여를 하였다. 특히 방선균은 항암활성물질을 생산하는 중요한 미생물자원으로 주목받고 있다. 예를 들어 doxorubicin (2) 및 bleomycin(3) 등의 항암물질이 토양으로부터 분리된 방선균이 생산하는 물질로 알려져 있다. 따라서 미생물자원이 풍부한 국내토양으로부터 분리한 방선균을 대상으로 항암활성물질을 탐색하는 것은 새로운 항암활성물질의 개발을 위하여 필요한 과정이라 할 수 있다. Screening 방법에는 종양 system과 미생물 및 생화학적인 방법을 이용한 *in vitro* system이 있다(4). 항암제 screening에서 *in vitro* 방법은 종양 system에 비해 적은 양으로 실험이 가능하고 짧은 시간과 싼

가격으로 초기선별작업이 가능하다. 특히 현재 이용되고 있는 항암활성물질의 가장 큰 단점인 side effect가 적은 항암활성물질의 탐색은 효과적인 항암제의 개발을 위하여 중요하다고 할 수 있다.

따라서 미생물로부터의 항암물질 개발을 목적으로 본 연구에서는 토양으로부터 미생물을 분리하여 항암활성을 조사하였고, 활성균주의 동정, 활성물질의 정제 및 구조결정을 행하였다. 그 결과 본 활성물질은 genistein으로 밝혀졌기에 그 실험방법 및 결과 등을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용세포주 및 배지

본 실험의 항암성 물질의 탐색 및 정제를 위한 피검세포는 HEp2(5), PC14(6), K562(7) 등을 사용하였다. 피검세포 배양배지로는 10% fetal calf serum이 함유된 RPMI-1640 배지를 사용하였다. 토양으로부터의 방선균 분리배지로는 yeast extract-malt extract 배지를 사용하였으며, screening 배지로는 2.0% sucrose, 0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.5% Na₂HPO₄·12H₂O, 0.5% KH₂PO₄, 2.0% V8 vegetable juice가 함유된 액체배지를 사용하였다. 활성물질 생산배지에는 2.0% soluble starch, 0.8% soybean meal을 사용하였다.

활성물질 생산균주의 분리, 탐색

1g의 토양을 시험관에 첨가하고 살균생리식염수(0.85% NaCl) 10 ml를 가하여 vortex mixer로 교반하여 2시간 동안 정치한 후, 상등액 0.1 ml를 yeast extract-malt extract 평판배지에 도말하여 7일간 배양하

*Corresponding author.

Key words: Cytotoxic material, *Streptomyces* sp., genistein

였다. 이 때 생성된 colony를 새로운 yeast extract-malt extract 사면배지에 이식하여 1차 균주분리를 행한 후, 분리된 균주를 screening용 액체배지 5 ml에 접종하여 30°C, 150 rpm에서 5일간 진탕배양하였다. 배양액에 동량의 acetone을 가하여 vortex mixer로 교반 후, 4°C에서 12시간 방치한 다음, 2000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 이를 감압농축하여 acetone을 제거하고, 이 농축액 10 μl를 5×10⁵/ml의 cell 농도로 미리 90 μl씩 96-microwell plate에 분주되어 37°C, 5% CO₂의 조건하에서 24시간 배양된 HEp2, PC 14, K562 등의 세포배양액에 가한 후, 24시간 뒤에 현미경으로 세포의 사멸여부를 관찰하였다.

종양세포증식 억제율의 측정

종양세포증식 억제율은 MTT assay법(8)으로 측정하였다. MTT 용액은 인산완충용액에 5 mg/ml의 MTT를 용해 후, 살균된 여과지로 여과하여 불용성 물질을 제거한 것을 사용하였다. 활성을 나타내는 sample을 RPMI-1640 배지로 각 농도별로 희석 후 96-microwell plate에 분주하고, 각 세포 배양액을 2~8×10⁴/ml로 조제하여 각 well에 50 μl씩 분주 후에, 37°C, 5% CO₂ incubator 내에서 4일간 배양하였다. 배양 후 조제한 MTT solution을 10 μl/well씩 첨가하여 4시간을 더 배양하고 배지를 흡인·제거한 다음, 0.04N HCl을 함유한 isopropyl alcohol을 100 μl/well씩 가하고 잘 교반하여 침전물을 완전히 용해하였다. 각 well의 흡광도는 660 nm를 reference wavelength로 하여 550 nm에서 2-wavelength microplate photometer(Thermomax microplate reader, Molecular devices)를 사용하여 측정하였다. 종양세포증식 억제율은 다음의 식에 대입하여 계산하였다.

$$*종양세포증식 억제율(\%) = [(A - B)/A] \times 100$$

A : sample 무첨가 well의 A₅₅₀

B : sample 첨가 well의 A₅₅₀

분리미생물의 동정

분리미생물을 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(9), Berd(10) 및 Williams(11) 등의 방법에 준하여 현미경 상에서의 포자사슬의 형태, 고체배지에서의 형태학적 특성, 생리적 특성 등을 비교 검토하였다.

활성물질의 구조분석

용매추출 및 silica gel column chromatography 등의 정제를 통해 얻어진 활성물질의 결정을 모아 Infra Red spectroscopy(Perkin-Elmer 1430), Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy(Varian FT Gemini 200) 등의 기기분석을 행하고, database를 통하여 구조를 결정하였다.

결과 및 고찰

활성물질 생산균주의 분리

토양으로부터 분리한 미생물을 이용하여 활성균주를 탐색하였다. 피검세포인 HEp2, PC14, K562 모두에 활성을 지닌 균주들을 1차적으로 선별하고, 다시 2차 screening을 통해 강한 활성을 나타내는 strain No. 5-99 균주를 선별하였다. Strain No. 5-99의 배양액 5 ml로부터 농축된 농축액 10 μl를 HEp2 cell line(5×10⁵ cell/ml)에 처리한 결과, 약 2시간 후에 Fig. 1에 나타난 것과 같이 세포의 형태가 변하고 부유되며 사멸되는 모습이 관찰되었다.

분리미생물의 동정

Diaminopimelic acid isomer의 동정 방선균의 세포벽에는 diaminopimelic acid(DAP)의 isomer 성분이 존재한다. 세포벽 구성성분으로 LL-type의 DAP가 존재하면 *Streptomyces* sp., meso-DAP가 존재하면 *Actinomodura* sp.로 분류된다(12). 토양에서 분리한 strain No. 5-99 균주의 동결건조 균체를 모아 6.0N HCl로 110°C에서 18시간 동안 가수분해한 후, 그 가수분해액을 cellulose thin layer chromatography를 행한 결과, LL-DAP를 나타내어 일단 *Streptomyces* sp.로 분류하였다(Fig. 2). 전자현미경으로 strain No. 5-99 균주의 형태를 살펴본 결과, 포자사슬의 형태는 연쇄형이었고, 단포자의 모습은 구형이었으며, 포자표면은 smooth한 형태였다(Fig. 3). 이 외에도 고체배지에서의 형태학적 특성, 생리적 특성 등을 비교 검토한 결과(data not shown) 분리미생물인 strain No. 5-99 균주는 전형적인 *Streptomyces* sp.인 것으로 밝혀졌다. 이로부터 본 균주를 *Streptomyces* sp. YJB-599라 명명하였다.

활성물질의 정제, 결정화 및 구조분석

배양액을 4000×g로 10분간 원심분리하여 균체를

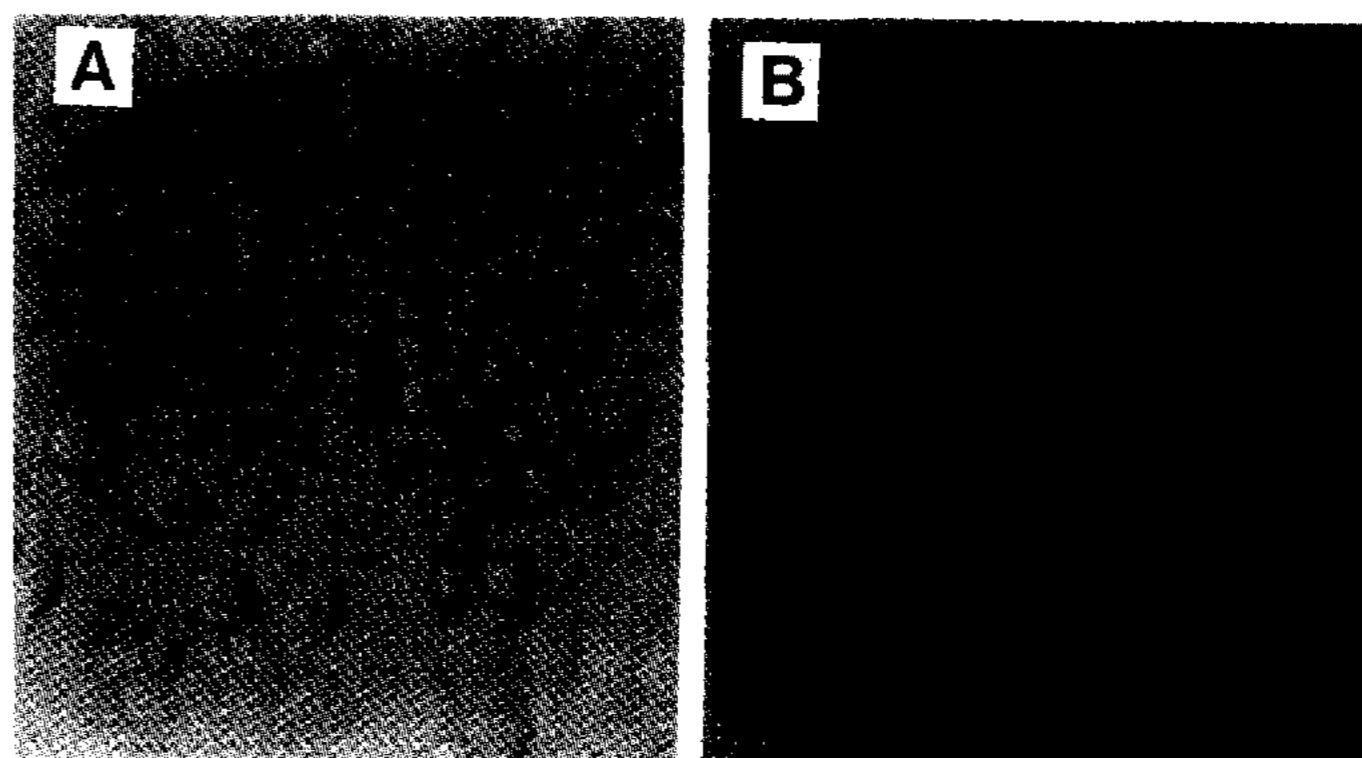


Fig. 1. Microscopic measurement of morphological change of HEp2 cell (×200).

A, before addition of the sample; B, after addition of the sample.

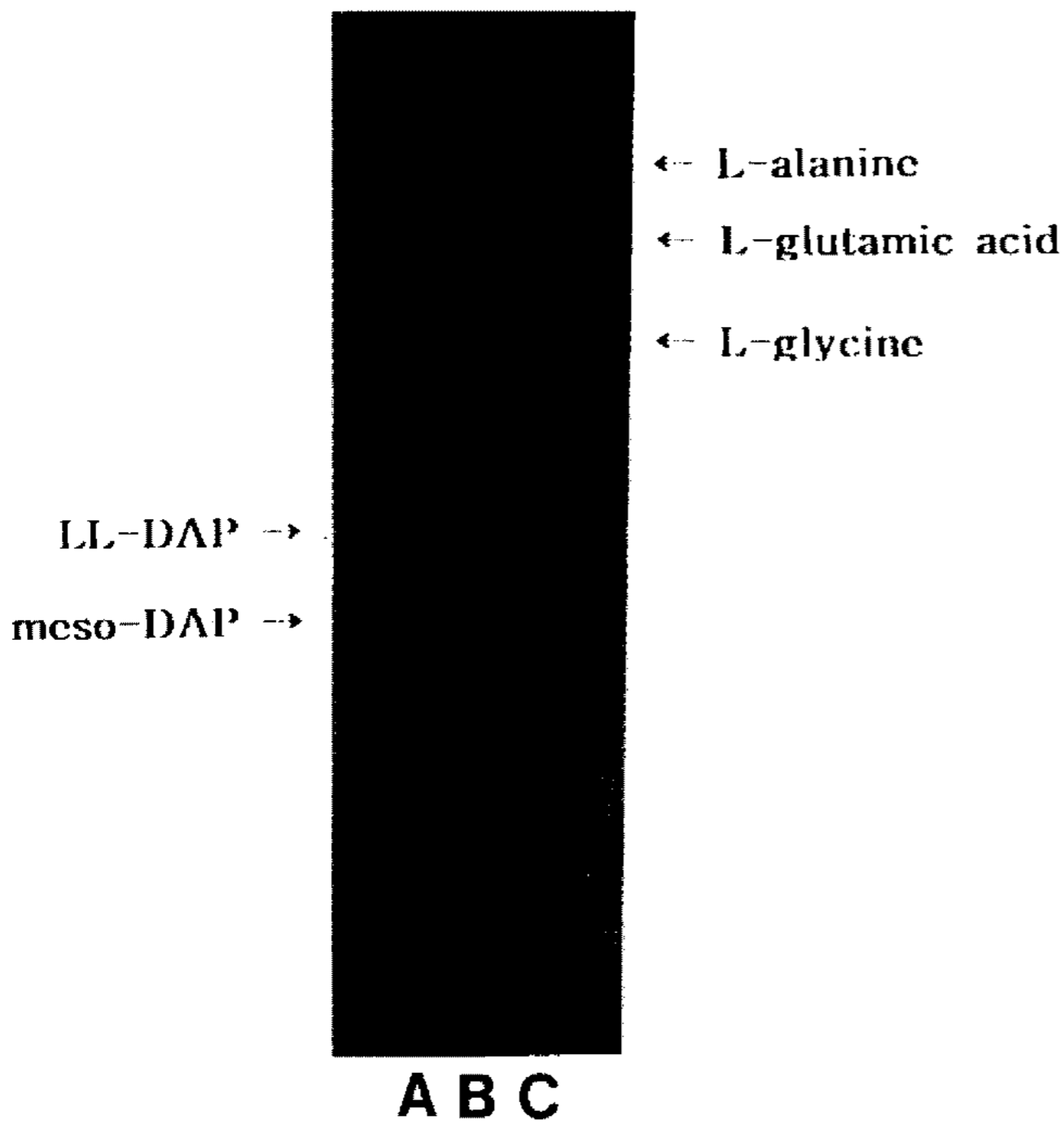


Fig. 2. Cellulose thin layer chromatography of cell wall diaminopimelic acid isomer and amino acids.

Solvent system was methanol:water:10N HCl:pyridine (80:17.5:2.5:10). Detection was done with spraying 0.2% acetic ninhydrin and standing at 100°C for 2 min. A, standard DAP isomer; B, cell wall hydrolyzate of *Streptomyces* sp. YJB-599; C, standard amino acids.

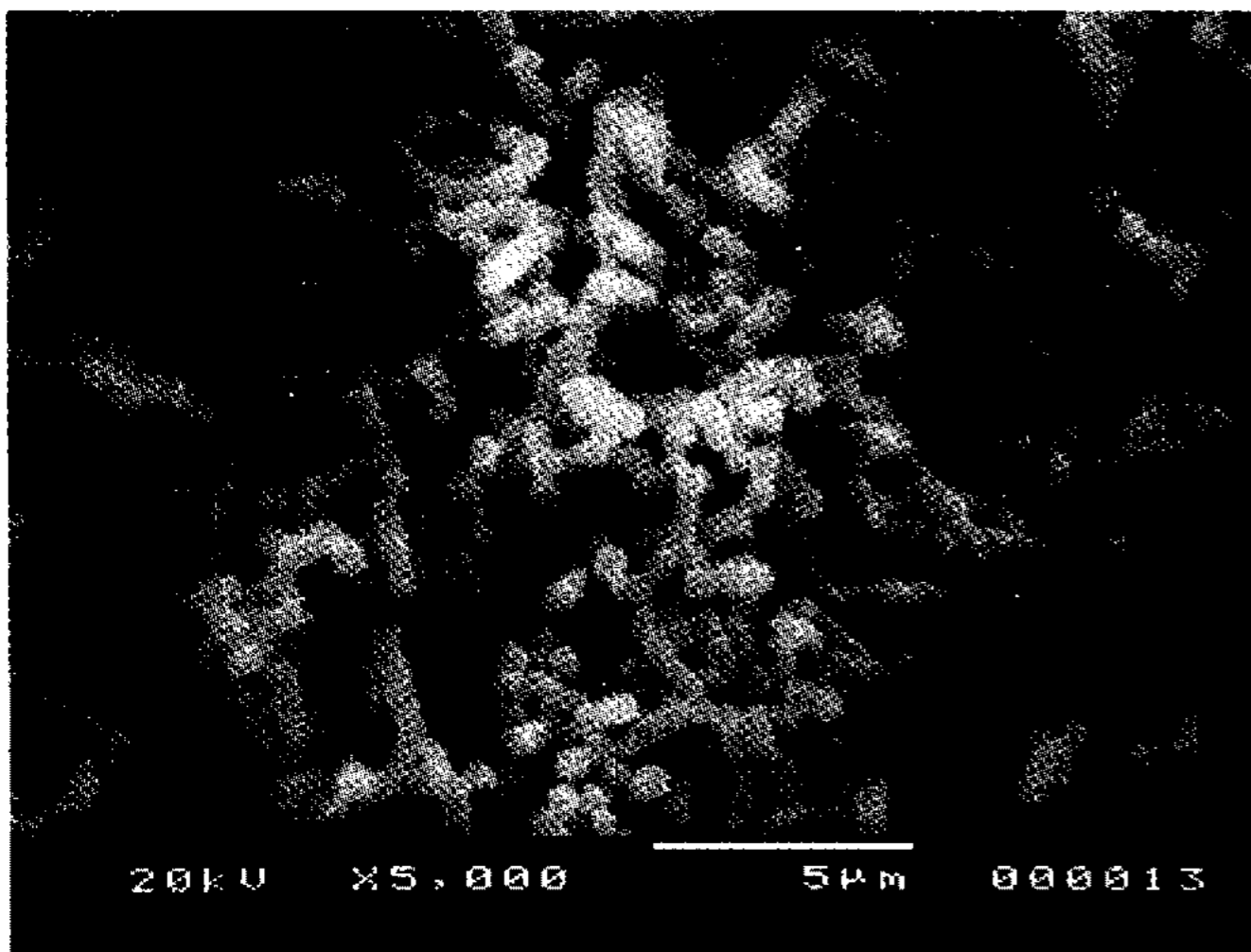


Fig. 3. Scanning electron microscopy of *Streptomyces* sp. YJB-599 (×5,000).

분리하였다. 모아진 균체를 동량의 acetone으로 추출 후 acetone층을 감압건조하고, 이 때 형성된 pellet을 모아 ethyl acetate로 다시 추출하였다. 배양상등액은 1.0N HCl을 사용하여 pH 3.0으로 조정 한 후, 이 때 생성된 침전물을 모아 ethyl acetate로 추출하였다. 이 추출액을 균체추출액과 혼합 후 정제시료로 사용하였다. 추출된 정제시료를 *n*-hexane : ethyl acetate=10 : 3으

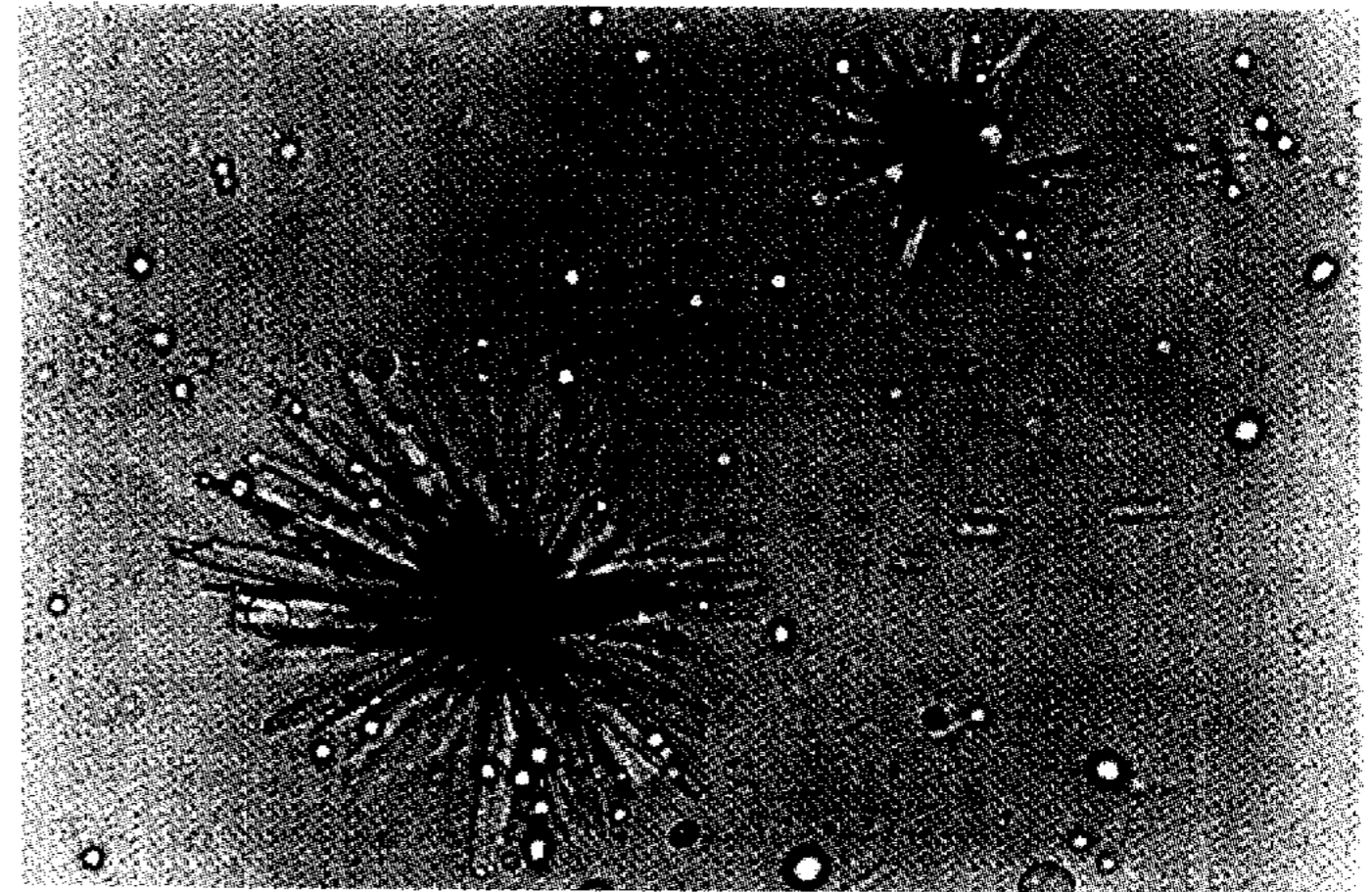


Fig. 4. Microscopic measurement of crystal produced by *Streptomyces* sp. YJB-599 (×400).

로 충전된 silica gel column에서 불순물이 모두 나올 때까지 용리시킨 후, 용매를 *n*-hexane : ethyl acetate=10 : 5로 극성을 높여주어 활성분획을 용리시켰다. 활성분획을 모아 감압건조 후 *n*-hexane을 가하여 불순색소를 제거하고, 이를 소량의 methanol에 용해시킨 다음, 동량의 3차증류수를 서서히 가하고 4°C에 방치하여, 침상의 백색결정을 얻었다(Fig. 4). 얻어진 결정에 대해 IR, NMR 등의 기기분석을 행하였다. IR spectrum상의 3000 cm⁻¹ 왼쪽의 peak로부터 aromatic기 혹은 이중결합이, 2800~3600 cm⁻¹ 부근의 넓은 peak로부터 OH기가, 1650 cm⁻¹ 부근의 커다란 peak로부터 carbonyl기가 존재함을 알 수 있었다(data not shown). ¹H-NMR data로부터는, 본 활성물질이 서로 다른 5가지 환경의 수소를 가지고 있으며, 그 비는 1 : 2 : 2 : 1 : 1임을 알 수 있었다. 또한 δ6.21과 6.36, 6.84, 7.38, 8.01의 peak는 isoflavone 계열의 genistein의 ¹H-NMR의 peak와 일치하였다(Fig. 5). 이상의 결과와 database를 통한 분석으로부터 본 물질은 genistein으로 판명되었다(Fig. 6). Genistein은 isoflavone의 일종으로서(13), cell cycle에 관계없이(14) DNA 복제시 DNA topoisomerase II의 inhibitor로서 작용함으로 인해 항암활성을 나타내는 물질로 알려져 있다(15). 이외에도 DOPA decarboxylase(13), tyrosine kinase(15) 등의 inhibitor로도 작용한다고 보고되어 있다.

활성물질의 성질

본 활성물질의 NIH3T3, HEP2, A549 등의 세포에 대한 IC₅₀을 Table 1에 나타내었다. Contact-inhibited cell line인 NIH3T3에 대한 IC₅₀ 값은 33.7 µg/ml인 반면, 암세포인 A549, HEP2 등에 대한 IC₅₀ 값은 각각 10.9, 23.4 µg/ml이었다. 이 결과로부터 *in vitro* 상에서는, 정상세포와 성질이 비슷한 contact-inhibited cell line보다는 암세포에 보다 더 활성을 나타내는 것을 알

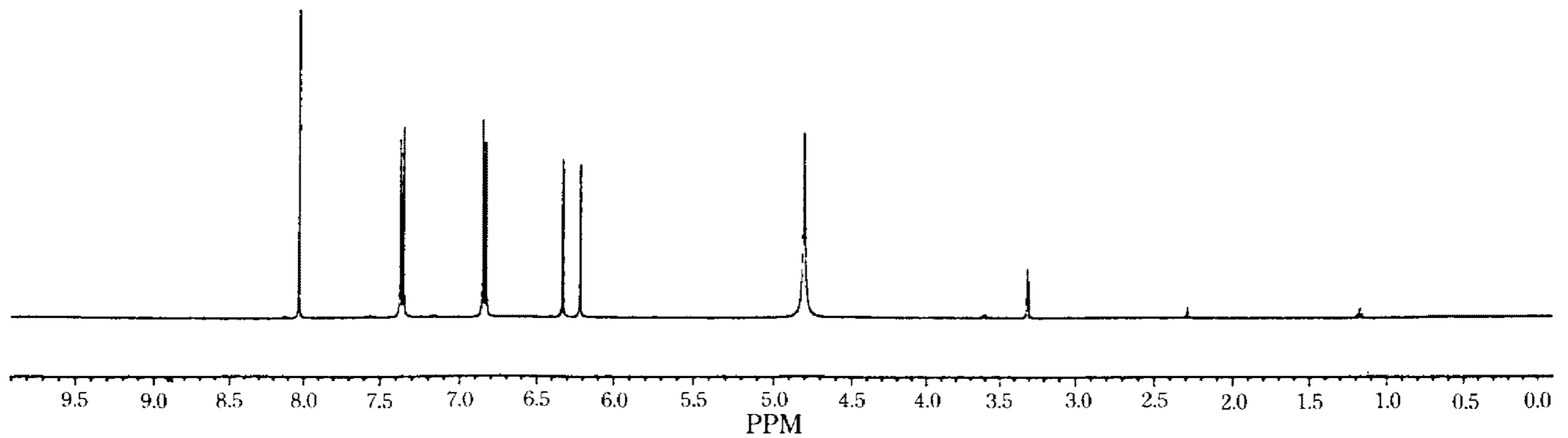


Fig. 5. ^1H NMR of active material produced by *Streptomyces* sp. YJB-599.

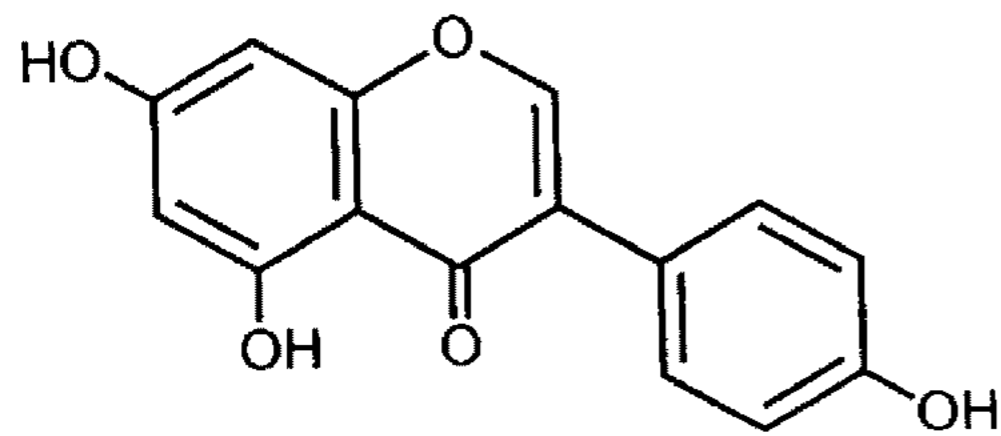


Fig. 6. The structure of genistein.

Table 1. IC_{50} of active material produced by *Streptomyces* sp. YJB-599.

Cell lines	Cell No./ml	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
NIH3T3	5×10^4	33.7
A549	5×10^4	10.9
HEp2	5×10^4	23.4

수 있었다.

Soybean meal 유래의 genistein과의 비교

Sariaslani 등(16)은 soybean meal이 함유된 배지에서 *Streptomyces griseus*를 배양하였을 때 genistein이 생산되었다고 보고하였으나, Messina 등(17)은 soybean 자체가 weak estrogen인 genistein을 함유하고 있다고 보고하였다. 이에 의해 본 균주가 발효산물로서 genistein을 생산하는 것인지, 아니면 배지성분 중의 soybean meal 유래의 genistein이 정제된 것인지를 확인하기 위해, 0.8%(w/v) soybean meal 함유배지를 autoclave한 후, 본 균주를 접종하지 않은 배지자체와 균주접종액, 그리고 soybean meal 대신 0.5%(w/v) yeast extract와 0.5%(w/v) polypeptone을 함유한 배지에서의 접종액을 같은 조건에서 배양하여, 그 추출물을 silica TLC 상에서 비교하였다(Fig. 7). 그 결과 본 균주가 생산하는 genistein과 동일한 Rf 값을 나타내는 spot이 배지자체의 추출물에서는 뚜렷하게 확인되지 않았으나, 배양액의 추출물에서는 soybean meal 첨가배지와 무첨가 배지 모두 동일 Rf 값 위치의 spot을 확인할 수 있었다.

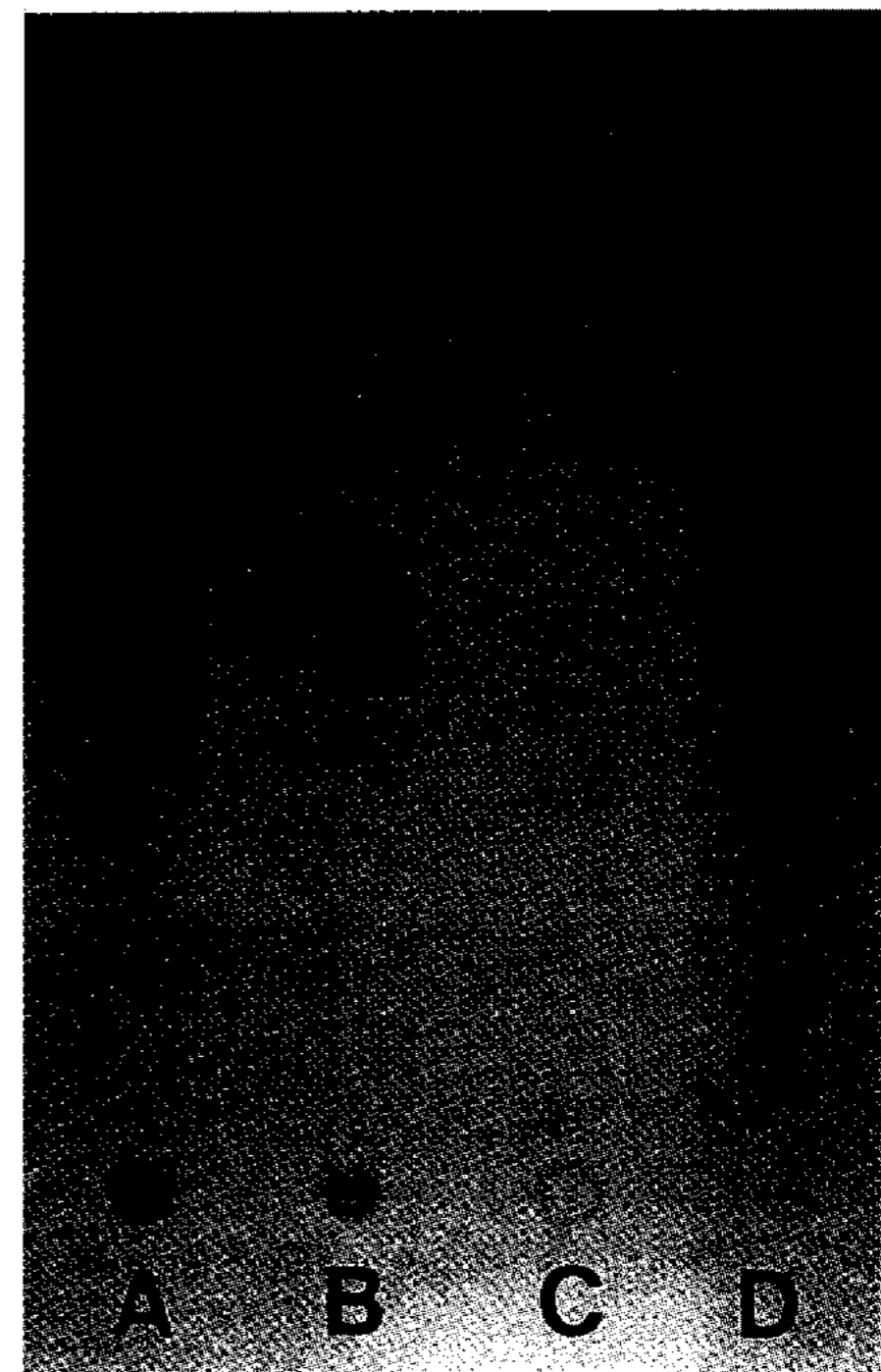


Fig. 7. Comparison of the extracts of cultural broth and medium itself on silica thin layer chromatography.

Solvent system was *n*-hexane:ethyl acetate (1:1) and detection was done with illumination at 254 nm. A, cultural broth of *Streptomyces* sp. YJB-599 on 0.8% (w/v) of soybean meal-containing medium; B, cultural broth of *Streptomyces* sp. YJB-599 on 0.5% (w/v) of yeast extract and 0.5% (w/v) of polypeptone-containing medium, instead of 0.8% (w/v) of soybean meal; C, 0.8% (w/v) of soybean meal-containing medium itself; D, purified genistein.

이 결과로부터, 본 균주는 발효산물로서 genistein을 생산하고 있음을 확인하였다.

요 약

토양으로부터 세포독성물질을 생산하는 strain No. 5-99 균주를 분리하였다. 본 균주의 세포벽 성분의 diaminopimelic acid(DAP)와 아미노산을 분석하여 본 결

과, LL-DAP만을 함유하고 있었고, glycine이 검출된 것으로 보아 glycine으로 연결된 peptide를 가지는 peptidoglycan type A3이고 cell wall chemotype I의 방선균인 *Streptomyces* sp.로 확인되었다. 따라서 본 균주를 *Streptomyces* sp. YJB-599라 명명하였다. 본 균주가 생산하는 활성물질은 용매추출 및 silica gel column chromatography를 이용하여 정제되었으며, 최종적으로 침상의 백색결정으로 분리하였다. 기기분석과 database로 구조분석을 행한 결과, 본 물질은 genistein으로 밝혀졌다.

감사의 말

본 연구는 한국과학기술처 주관 G7 Project 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

참고문헌

1. Reading, C. and M. Cole. 1977. Clavulanic acid: a β -lactamase inhibiting from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial agents and chemother.* **11**: 852-857.
2. Arcamone, Y., G. Cassinelli, G. Fantini, A. Grein, P. Orezzi, C. Pol and C. Spalla. 1969. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.* **11**: 1101-1110.
3. Umezawa, H., K. Maeda, Y. Takeuchi and Y. Okami. 1966. New antibiotics, bleomycin A and B. *J. Antibiot.* **26**: 117-119.
4. 이정욱. 1990. 신규항암제의 약효평가. 1990년도 한국생화학회 산학연심포지움: 신물질창출을 위한 생물활성연구법. Pp. 19-33.
5. Moore, A.E., L. Sabachewsky and H.W. Toolan. 1955. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res.* **15**: 598-602.
6. Greene, L. and A. Tischler. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 2424-2428.
7. Steven, J.C., R.C. Gallo and R.E. Gallagher. 1977. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* **270**: 347-349.
8. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63.
9. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edn., Williams & Wilkins.
10. Berd, D. 1973. Laboratory identification of clinically important aerobic Actinomycetes. *Appl. Microbiol.* **25**: 665-681.
11. Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Alderson, E.M.H. Wellington, P.H.A. Sneath and M.J. Sackin. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. General Microbiol.* **129**: 1743-1813.
12. Lechevalier, H.A. and M.P. Lechevalier. 1970. *The Actinomycetes*, Gustav Fisher Verlag, Jena.
13. Umezawa, H., H. Tobe, N. Shibamoto, F. Nakamura and K. Nakamura. 1975. Isolation of isoflavones inhibiting DOPA decarboxylase from fungi and *Streptomyces*. *J. Antibiotics* **28**: 947-952.
14. Gorczyca, W., J. Gong, B. Ardel, F. Traganos and Z. Darzynkiewicz. 1993. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res.* **53**: 3186-3192.
15. Markovits, J., C. Linassier, P. Fosse, J. Couprie, J. Pierre, A. Jacquemin-Sablon, J.M. Saucier, J.B. Le Pecq and A.K. Larsen. 1989. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res.* **49**: 5111-5117.
16. Sariaslani, F.S. and D.A. Kunz. 1986. Induction of cytochrome P-450 in *Streptomyces griseus*. *Biochemical and Biophysical research communication* **141**: 405-410.
17. Messina, M.J., V. Persky, K.D. Setchell and S. Barnes. 1994. Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutrition & Cancer* **21**: 113-131.

(Received 24 August 1995)