

진균 세포벽 형성 저해물질 생성 *Streptomyces*속 세균의 분리 및 수리동정

서원나 · 박정희 · 이지영 · 김인섭¹ · 이계준¹ · 배 무*
이화여자대학교 자연과학대학 생물학과, ¹서울대학교 미생물학과

Isolation and Numerical Identification of *Streptomyces* Strains Producing Inhibitors of Fungal Cell Wall Synthesis. Won-Na Suh, Jung-Hee Park, Ji-Young Lee, In-Seop Kim¹, Kye-Joon Lee¹ and Moo Bae*. Department of Biological Science, College of Natural Science, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea, ¹Department of Microbiology and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea -

The aim of the present research program was to identify and develop strains of actinomycetes producing antifungal antibiotics which inhibit cell wall biosynthesis. 860 strains of Actinomycetes were isolated from various soil samples. Three isolates, EMS4, EMP22, and L234 were selected as the strains producing antifungal antibiotics inducing abnormal morphology against *Penicillium cyclopium*, *Cryptococcus laurentii*, and *Aspergillus flavus*, respectively. Taxonomic unit characters of the strains were tested and the data were analyzed numerically using TAXON program. EMS 4, EMP22, and L234 were identified to be a member of *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces willmorei*, and *Streptomyces aburaviensis*, respectively.

진균의 세포벽은 β -1,3-glucan, chitin, mannan 등의 polysaccharides로 구성되어 있다. 이 성분들은 진균 생장에 필수적인 요소인 반면, 동물세포에는 존재하지 않으므로 진균 세포벽 합성 저해물질은 진균 감염 치료시 숙주세포에 안전하고 효과적인 항진균 물질로 작용할 수 있을 것으로 기대된다. 이런 판단을 근거로 하여 *Streptomyces*속 세균에서 탐색된 chitin 합성 저해물질로는 polyoxin(1, 2), neopolyoxin A, B, C(3) 등이 있고, β -1,3-glucan 합성 저해물질로는 Lipopeptin A, B, C 등이 있으며, Lipopeptin B, C는 mannan 합성 저해활성도 있는 것으로 알려져 있다(4). 이러한 물질들은 진균 세포의 팽창 및 확장된 형태나 pseudospheroplast 등의 비정상적 형태를 유발하여 항진균 활성을 나타내게 된다. 이러한 항진균제는 특히 AIDS와 같은 면역 결핍증에 수반되는 진균에 의한 2차 감염의 효과적인 치료제로 이용될 수 있어 산업적, 의학적 이용가치가 매우 높다.

그 대사의 다양성으로 인해 많은 종류의 생리 활성 물질을 생산하는 균주로 알려진 방선균을 자연계로부터 분리하고자 할 때에는 i) 탐색하고자 하는 생리활성물질의 선정, ii) 탐색하고자 하는 생리활성물질의 활성을 지닌 기존의 방선균 존재 유무 검색, iii) 농화 배양(enrichment culture)과 탐색 protocol의 개발, iv) 새로운 방선균 여부를 확인할 수 있는 identification system의 구비, v) 탐색 방법의 개발 등의 선택전략을 따른다. 일차 탐색은 자연계로부터 주로 정성적으로 행하여지며 특정한 성질을 가진 많은 수의 방선균들을 분리하게 된다.

이차 탐색은 정성적, 정량적으로 행하여지며 분리된 각 방선균의 정확한 활성을 측정하고 생산성의 확인 및 동정이 행하여진다(5-7).

방선균을 분류하기 위한 표준화는 1960년대초 ISP(International *Streptomyces* Project) 설립과 더불어 시행되어 오고 있으며 주기적으로 기존의 분류체계를 수정 보완해 오고 있다. 방선균 속의 식별과 분류기준으로는 세포벽의 당과 아미노산 분석이 주로 이용되며(8-15), 방선균의 종동정 방법으로는 Silvestri에 의한 최초의 확률동정법(16)이 개발된 이래, ISP에서 개발된 15 species group을 동정할 수 있는 컴퓨터 동정행렬(17), Williams 등에 의한 컴퓨터 확률동정행렬(18)이 제시되어 왔으며, 최근에는 Alan Ward가 CHARSEP(18), DIA-CHAR(18), MATIDEN(19), MOSTTYP(20-21) 프로그램 등의 기능을 갖고 있는 TAXON 프로그램을 개발하였다(Alan Ward, unpublished).

본 연구에서는 전국 각지의 토양 시료로부터 분리한 방선균으로부터 진균의 세포벽에 작용하는 항생물질을 탐색하는 과정에서 *Penicillium cyclopium*, *Cryptococcus laurentii*, *Aspergillus flavus*의 균사 형태 이상을 일으켜 항진균 활성을 나타내는 균주 EMS4, EMP22, L234를 TAXON 프로그램을 이용하여 수리동정하였다.

재료 및 방법

토양 시료로부터 방선균의 분리 및 항진균물질 생성 균주의 탐색

우리나라 전국각지로부터 총 40여개의 토양시료를 채취하여 80°C dry oven에서 24시간동안 열처리한 후, 멸균 생리 식염수에 희석하여 방선균 선택 분리용 배지에

*Corresponding author.

Key words: Antifungal antibiotics, numerical identification, *Penicillium cyclopium*, *Cryptococcus laurentii*, *Aspergillus flavus*, *Streptomyces lavendulae*, *S. willmorei*, *S. aburaviensis*.

도말, 배양한 뒤 방선균 860여 균주를 분리하였다. 3일 이상 배양한 각 방선균의 배양액을 이용하여 영국 IMI에서 구입한 *Penicillium cyclopium*, *P. notatum*, *P. chrysogenum*, *Cryptococcus laurentii*, *Chaetomium globosum*, *Aspergillus oryzae*, *A. flavus*, *Pyricularia oryzae*의 8가지 시험균에 대해 항진균 활성을 측정하였다. 항진균 활성이 비교적 크고 현미경 관찰시 진균 세포의 swelling을 일으키는 방선균주들로부터 *Penicillium cyclopium*(IMI 19759), *Cryptococcus laurentii*(NCYC 139), *Aspergillus flavus*(IMI 91856)에 대해 가장 활성이 큰 균주 EMS4, EMP22, L234를 최종 선발하여 항균 물질 분리를 위한 배양 및 수리동정을 수행하였다.

사용 배지

방선균 선택 분리용 배지로는 chitin agar medium (0.6%(v/v) colloidal chitin, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.03% KH_2PO_4 , 0.07% K_2HPO_4 , 0.001% $Fe_3O_4 \cdot 7H_2O$, 0.0001% $ZnSO_4$, 0.4% sodium propionate, 1.5% agar, pH 7.0), starch agar medium(1% soluble starch, 0.2% peptone, 0.1% K_2HPO_4 , 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.5% agar), Bennett's agar medium 등을 사용하였다. 균주 동정을 위한 배지는 ISP에서 제시한 배지를 사용하였다(22). 토양에서 분리한 방선균의 보존 및 계대배양에는 Bennett's agar medium 및 yeast-malt extract agar medium을 사용하였다. 항생물질 생산을 위한 배지로 각 분리균에 대하여 1% glucose, 0.5% tryptone, 0.3% yeast extract, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.03% KH_2PO_4 , 0.07% K_2HPO_4 , 0.001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0001% $ZnSO_4$ 로 구성된 배지와 yeast-malt extract broth(0.4% yeast extract, 1% malt extract, 0.4% glucose), 1% malt extract, 0.5% peptone, 0.5% soluble starch로 구성된 배지를 사용하였다.

발효액의 항생물질 활성 측정

항생물질 활성 검색을 위해 Sabouraud dextrose agar medium(3% Sabouraud dextrose broth, 1.5% agar)을 기층배지로 하고 그 위에 50°C로 식힌 semi-agar medium(3% Sabouraud dextrose broth, 0.8% agar)과 피시험 균주의 포자현탁액을 섞어 갈아 항생물질 활성 측정용 평판 배지를 만들었다. 내경 6.0 mm의 stainless steel cup을 준비한 배지에 얹은 후 방선균 배양액 250 μ l를 첨가한 다음 25°C에서 2일간 배양하여 균주의 성장이 억제된 영역의 직경을 측정하였다.

균주의 동정

분리균주의 수리 동정을 위해 사용된 형태학적, 생리 생화학적 50개의 단위 형질 분석은 Williams 등의 방법을 따랐다(18, 23). 탄소원 이용 이외의 모든 시험에서는 Bennett's 배지에서 7일간 배양한 후 배양액을 유리솜으로 균사체와 분리한 포자를 생리 식염수에 세척, glycerol에

현탁시킨 액을 접종원으로 사용하였다(24).

세포벽의 diaminopimelic acid(DAP) 이성체와 amino acid 분석 Starch-casein-nitrate 배지에서 3일간 배양한 균체를 회수하여 세포를 완전히 파쇄(French pressure, American Instrument Company)한 후 동결건조하였다. 동결건조한 균사 20 mg을 6N HCl 5 ml과 함께 넣고 밀봉한 후 100°C에서 18시간동안 가수분해하여 여과, 탈염산 농축하고 cellulose TLC plate(10×10 cm, Merck)에 점정하고 methanol-water-5N HCl-pyridine(80 : 15 : 5 : 10)으로 전개시킨 다음 acetonic ninhydrin으로 발색시켜 Sigma사의 표준제품과 비교하였다(25).

세포내 당분석 동결건조한 세포 50 mg을 시험관에 넣고 6N HCl을 가하여 밀봉한 후 2시간 동안 가수분해하였고 이어 $Ba(OH)_2$ 를 이용하여 pH 5.0~5.2로 중화시킨 후 원심분리(10,000 rpm, 10 min.)하고 상등액을 freeze dryer로 건조시켜 0.3 ml의 증류수에 녹였다. 이 시료를 cellulose TLC plate에 점정하고 butanol-water-pyridine-toluene(10 : 6 : 6 : 1, containing 1% acetic acid)으로 전개하고 diphenylamine 2 g-aniline 2 g-85% phosphoric acid 10 ml-methanol 90 ml의 용액으로 발색하여 Sigma사의 표준제품과 비교하였다(26).

형태학적 특성분석 분리주들을 각종 ISP 배지들과 Bennett's 배지에 배양하면서 7일, 14일, 21일 간격으로 생육정도, colony 배면형태, 포자 형성등을 관찰하였다. ISP4 배지에서 3일 내지 7일간 배양한 후, 포자 생성이 활발히 일어난 부위의 배지에 홈을 파고 8% glutaldehyde 용액으로 채워 10~12시간 동안 고정시켰다. 고정이 끝나면 원하는 부위를 잘라낸 후 P_2O_5 가 들어 있는 기밀용기에 넣고 -20°C에서 완전히 건조시켜 주사전자현미경(Nikon, Labophot, ×1500)을 이용하여 rectiflexible인지 spiral인지를 관찰하였다. 포자 색깔은 형태 관찰을 한 plate를 색환(color wheel)(27)과 비교하여 적색과 회색 여부를 결정하였다. Glycerol-asparagine agar medium(ISP 5)에서 기층균사의 색깔(적색/오렌지색), 수용성색소(황색/갈색) 생성 여부를 관찰하였으며, 멜라닌 색소 생성은 peptone yeast iron agar medium(ISP 6)와 tyrosine agar medium(ISP 7)에서 7일간 배양한 후 관찰하였다(28).

항균력 시험 Petri dish에 nutrient agar 15 ml을 붓고 접종원을 접종한 후 가급적 포자가 형성되지 않는 24~48시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 plate를 뒤집어 유리 뚜껑에 1 ml chloroform을 가한 후 40분간 방치하여 균을 죽인 다음, 남아 있는 chloroform을 증발시키기 위해 덮개를 열어놓은 채 laminar flow에서 15분간 방치하였다. 피시험 균주 현탁액 1 ml이 첨가된 사면 배지(nutrient agar)에 0.6%(w/v) agar를 가함)을 위 평판배지에 부어 굳히고 24시간 배양한 후 관찰하여 주위에 억제환을 생성시킨 균주를 양성으로 기록하였다. 배지상에 형성된 포자, 콜로니 등을 멸균 생리식염수 5 ml에 현탁시켜

피시험액으로 사용하였다.

펙틴 가수분해 Hankin 등의 배지를 사용하였다(29). 6일간 배양한 후 약간 데운 1%(w/v) hexadecyltrimethyl ammonium bromide(CTMB) 액을 배지 위에 붓고 1시간 동안 방치한 후 남은 액을 쏟아버리고 콜로니 주위에 가수분해로 인한 투명환이 생성되었는지를 관찰하였다.

Lecithinase 생성 및 lipolysis 멸균된 배지(1% peptone, 0.5% yeast extract, 0.1% glucose, 1% NaCl, 1.2% agar, pH 7.0)를 45°C로 식힌 후 egg-yolk emulsion (Oxoid)을 최종 농도가 5%(v/v)가 되도록 첨가하고 petri dish에 부은 다음 시험균을 접종하고 6일간 배양한 후 plate를 강한 불빛 아래에서 관찰하여 콜로니 주위에 불투명하면서 크림색이나 황색 침전이 생겼으면 lecithinase 양성으로 기록하였다. 또 불규칙한 margin 주위에 조금 덜 불투명한 침전물이 생기면 lipolysis로 판단하였다(30).

Hippurate 가수분해 Thirk 배지(31)를 변형시킨 Hippurate agar 배지(32)를 사용하여 6, 12, 18일 배양한 후 가수분해 여부를 관찰하였다.

질산염 환원 및 황화수소 생성 시험 3 ml semi-solid agar(ISP 8 medium)를 시험관 두개에 따로 분주한 후 첨자 접종하고 7~14일간 배양한 후 3 방울의 시약 A (100 ml 5N acetic acid에 0.8 g sulphanilic acid를 녹인 것)와 시약 B(100 ml 5N acetic acid에 dimethyl- α -naphthylamine을 녹인 것)를 떨어뜨렸을 때 장미빛/적색이 생기면 양성으로 기록하였다. 또 시약 B를 적하한 수초 후 색변화가 없으며 Zn^{2+} 분말을 소량 첨가하여도 색변화가 없으면 양성으로 기록하였다. 다른 시험관 하나에는 균을 접종한 후 시험관 끝부분에 lead acetate가 함유된 시험지(BDH)를 끼워 넣은 채 7~14일간 배양하고 갈색이나 흑색으로 시험지색이 바뀌었으면 H_2S 양성으로 기록하였다(33).

분해능 시험 Xanthine(0.4%, w/v), elastin(0.3%)이 첨가된 변형된 Bennett's medium에 균주를 접종하고 7, 14, 21일 후 관찰하여 성장한 균체 주위와 아래의 배지가 투명하게 된 경우 양성으로 판단하였다. 변형된 Kutzner 배지를 사용하여 시험관에서 21일간 배양한 후 흑갈색 색소가 생기면 arbutin 분해는 양성으로 기록하였다(34). 이 때 멜라닌 생성과 구별하기 위하여 arbutin이 첨가되지 않은 대조구를 준비하였다. Urea 분해능은 phenol red가 포함된 Gordon's 액체 배지에 여과 멸균한 urea (15%, w/v)를 가하고(75 ml/L 기본배지) 30°C에서 28일간 배양하여 오렌지색이나 황색에서 핑크빛이나 적색 혹은 자주색으로 변하면 양성으로 기록하였다(35).

항생물질 내성 시험 여과멸균(0.45 μ m, Millipore Co.)된 rifampicin(50 μ g/ml), neomycin(50 μ g/ml), oleandomycin(100 μ g/ml), penicillin G(10 IU/ml) 용액에 직경 5 mm의 여과지(Whatman No.1)를 2분간 담가 두었다가 꺼내어 90 분간 동결건조시킨 후, glycerol 현탁된 시험

균주 0.1 ml이 도달된 MBA medium에 올려놓고 1, 2, 3, 7일째 관찰하여 제일 먼저 읽을 수 있는 결과(내성이 있으면 양성)를 기록하였다.

생장 시험 변형된 Bennett's agar(MBA) medium에 시험균주를 접종하고 45°C humid chamber에서 14일간 배양한 후 생장 여부를 관찰하였다(36). 멸균한 MBA medium에는 각각 sodium azide(0.01%, w/v), NaCl(7%), phenol(0.1%), potassium tellurite(0.001%), thallos acetate(0.001%)를 첨가하였다.

질소원 이용 시험 여과멸균(0.2 μ m, Millipore Co.)된 질소원(0.1%, w/v)을 기본배지(ISP 10)에 첨가하고 시험균주를 접종하여 15일간 배양한 후 positive control(0.1% L-asparagine 첨가)과 negative control(L-asparagine 비첨가)에서의 생장 정도를 비교하여 negative control보다 더 자랐을 때를 양성으로 기록하였다.

탄소원 이용 시험 여과멸균된 탄소원(1%, w/v)을 기본배지(ISP 9)에 첨가하고 시험균주를 접종하였다. 탄소원이 첨가되지 않은 negative control과 glucose(1%)가 첨가된 positive control의 생장과 비교하여 negative control보다 더 잘 자랐을 때를 양성으로 기록하였다.

중동정을 위한 특성분석 및 TAXON 프로그램에 의한 수리분석 Williams등의 방법에 따라 주군집(major cluster) 동정을 위한 50 단위형질(unit characters)을 조사하였으며, 부군집(minor cluster) 동정을 위하여서는 34가지의 단위형질을 조사하였다. TAXON 프로그램은 영국의 Newcastle upon Tyne 대학 미생물학과의 A.C. Ward 박사에 의해 개발된 프로그램으로써 단위형질의 특성을 + 혹은 -로 간단하게 입력하고, 입력된 자료를 CLUSTAN으로 분석하여 수리분류할 수 있으며 수리분류 데이터를 기본으로 하여 작성된 동정확률행렬(probabilistic identification matrix)의 특성과 미지균의 특성을 비교 분석하여 수리동정할 수 있다(37, 38).

결과 및 고찰

토양에서 분리된 방선균의 항균활성 검색

우리나라 전국각지로부터 총 40여개의 토양시료를 채취하여 80°C dry oven에서 24시간동안 열처리한 후, 멸균 생리 식염수에 희석하여 방선균 선택 분리용 배지에 도달, 배양한 뒤 방선균 860여 균주를 분리하였다. 3일 이상 배양한 각 방선균의 배양액을 이용하여 각 진균에 대한 항균활성을 검색한 결과 항균활성이 큰 20여 균주를 선별할 수 있었다. 이들 중 *Penicillium cyclopium*, *Cryptococcus laurentii*, *Aspergillus flavus*의 균사형태 이상을 일으켜 항균활성을 나타내는 균주를 선별한 결과 EMS4, EMP22, L234 균주를 최종 선발하였다(Fig. 1). 균주 EMS4의 배양액이 *P. cyclopium*에 대해 나타내는 영향을 광학 현미경을 이용하여 형태학적으로 관찰하여 본 결과, *P. cyclopium*은 균사형태 이상으로 생장이 저

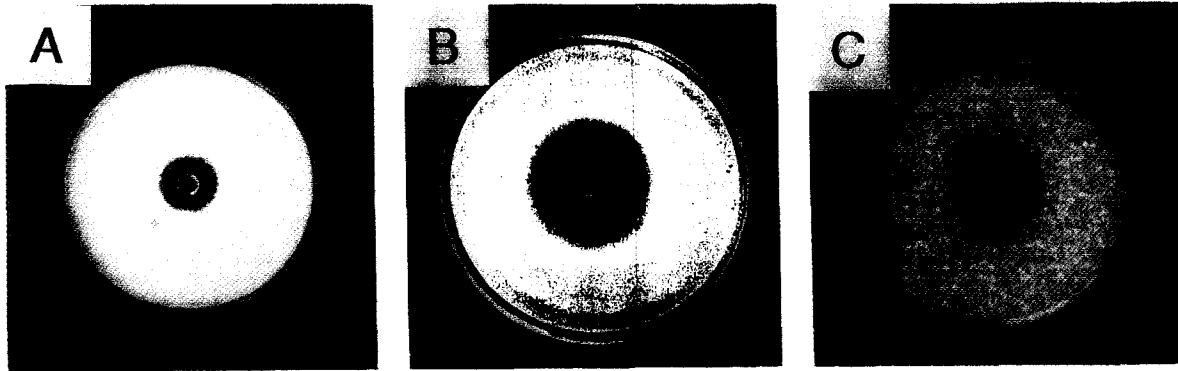


Fig. 1. Antifungal activities produced by three isolates, EMS4, EMP22, and L234.
 A: Growth inhibition zone of *P. cyclopium* by antifungal activity produced by EMS4.
 B: Growth inhibition zone of *C. laurentii* by antifungal activity produced by EMP22.
 C: Growth inhibition zone of *A. flavus* by antifungal activity produced by L234.

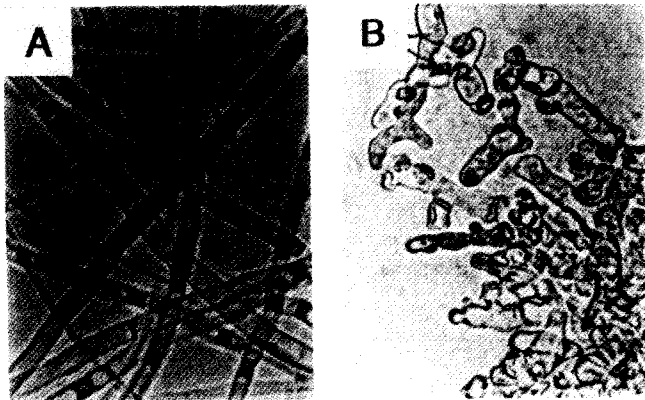


Fig. 2. Abnormality in the cell wall of *P. cyclopium* induced by antifungal antibiotics produced by isolate EMS4.
 A: normal form (×1000), B: swelling form (×1000) induced by the addition of antifungal activity produced by isolate EMS4.

해됨을 알 수 있었다(Fig. 2). EMP22 균주 배양액은 *C. laurentii* 균사의 형태 이상을 유발하였으며, L234 균주 배양액은 *Aspergillus flavus*의 균사 형태 이상을 유발하였다(자료 미제출).

분리 균주들의 속(genus) 동정

분리 방선균 EMS4, EMP22, L234는 각종 ISP배지와 Bennett's agar 배지에서 균마다 기균사 및 포자의 형태, 색상에서 다소 차이가 있었으나 모두 성장이 활발히 일어났으며 포자를 생산하였고 주사현미경 관찰 결과, 포자는 표면이 smooth하고 원통형이었으며 포자사슬 형태는 rectiflexible이었다(Fig. 3). 또한 액체배지에서의 성장은 전형적인 방선균의 mycelium 형성을 보였으며 성장이 활발히 진행되면 분절이 일어나는 것으로 관찰되었다. Starch-casein-nitrate 배지에서 3일간 배양한 균

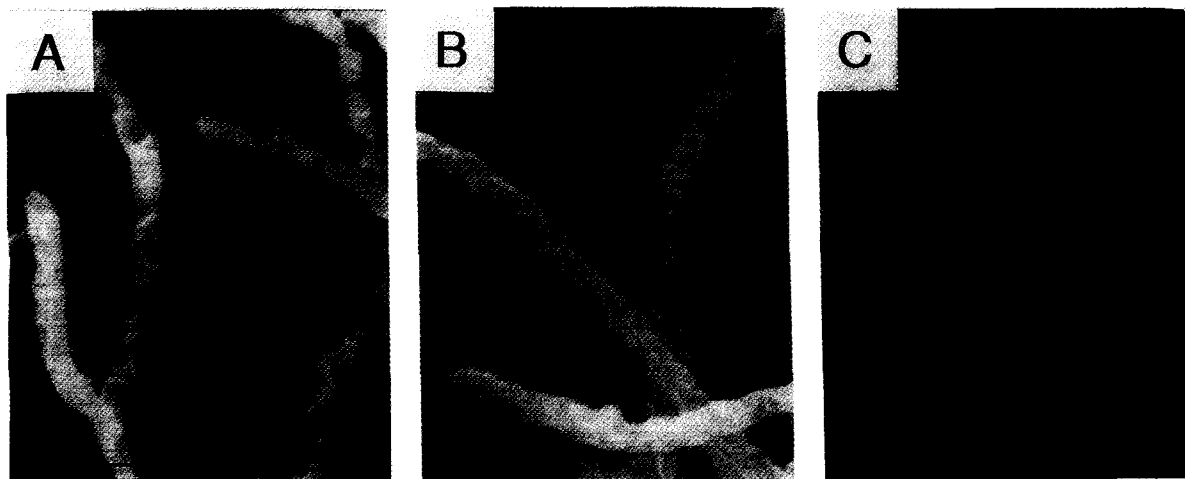


Fig. 3. Scanning electron micrographs of spore chains of three isolates cultured on Bennett's agar plate for 4 days at 30°C
 Bar means 1 μm.
 A: EMS4. B: EMP22. C: L234.

체의 가수분해물 중 세포벽의 DAP 이성질체는 LL-DAP (LL-2,6-diaminopimelic acid)이며(Fig. 4), 표준당(arabi-

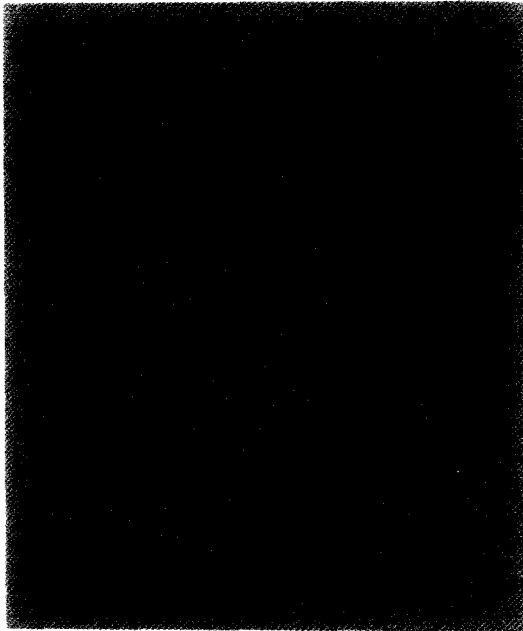


Fig. 4. Cellulose thin layer chromatogram of diaminopimelic acid (DAP) isomers and aminoacids from the isolate cell wall and of standard amino acids, developed with methanol-water-5N HCl-pyridine (80:15:5:10) and detected by acetic ninhydrin.

Lane 1; cell wall hydrolysate from EMS4, Lane 2; cell wall hydrolysate from EMP22, Lane 3; cell wall hydrolysate from L234, Lane 4; DAP isomers (A; LL-DAP, B; meso-DAP, C; 3-OH DAP), Lane 5; Glycine, Lane 6; Glutamic acid, Lane 7; Alanine.

nose, galactose, glucose, mannose, 0.1M)과 TLC를 통해 비교한 결과 세포내의 특징적인 당은 관찰되지 않았다 (Fig. 5). 세 분리주의 세포벽 DAP isomer와 아미노산은 방선균의 세포벽 chemotype과 peptidoglycan type에 비

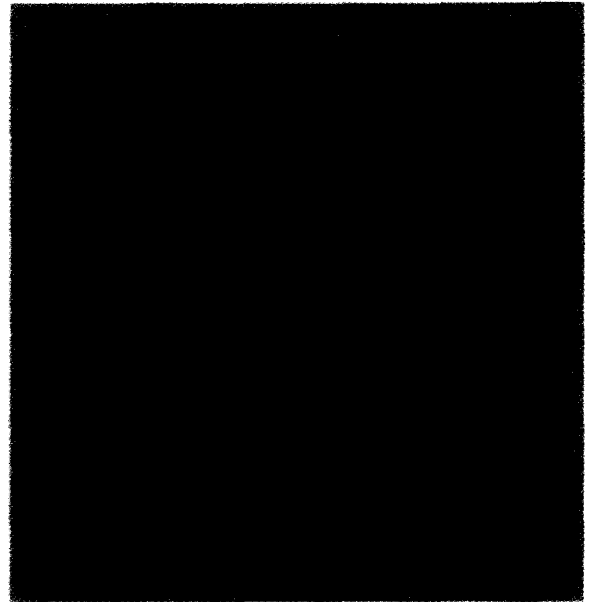


Fig. 5. Cellulose thin layer chromatogram of whole cell sugar extract from three isolates and standard sugars, developed with butanol-water-pyridine-toluene (10:6:6:1, containing 1% acetic acid) and detected by diphenylamine 2 g-aniline 2 g-85% phosphoric acid 10 ml-methanol 90 ml.

Lane 1; whole cell extract from EMS4, Lane 2; whole cell extract from EMP22, Lane 3; whole cell extract from L234, Lane 4; Arabinose, Lane 5; Galactose, Lane 6; Glucose, Lane 7; Mannose.

Table 1. Comparison of diagnostic characteristics among *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, and isolate EMS4, EMP22, L234.

Characteristics	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptoverticillium</i>	EMS4	EMP22	L234
Colony size	Discrete	Discrete	Discrete	Discrete	Discrete
Substrate mycelium	+	+	+	+	+
Spore	+	-	+	+	+
Sporangia	-	-	-	-	-
Motile spore	-	-	-	-	-
Aerial mycelium	+	+	+	+	+
Chains of arthrospores	+	+	+	+	+
Arthrospore in verticils	-	+	-	-	-
Spore surface smooth	+	+	+	+	+
Spore surface hairy, spiny, or warty	+	-	-	-	-
Motile spores	-	-	-	-	-
Sugar in hydrolysates					
Arabinose, galactose, xylise	-	-	-	-	-
DAP isomer in cell wall					
LL-DAP	+	+	+	+	+
meso-DAP	-	-	-	-	-

Symbol: +, 90% or more of strains are positive; -, 10% or less of strains are positive.

Table 2. Major unit characters for the identification of *Streptomyces* sp. EMS4, EMP22, L234.

unit characters	EMS4	EMP22	L234
1. Morphology and pigmentation.			
Spore chain morphology : rectiflexible (RFS)	+	+	+
spiral (SPI)	-	-	-
Color of spore mass : red (RED)	-	-	-
grey (GRY)	-	-	+
Mycelial pigment : red/orange (ROS)	-	-	-
Diffusible pigment : production (PIG)	-	-	-
yellow/brown (YBP)	-	-	-
Melanin production on : PYI medium (MPI)	+	+	-
tyrosine medium (MTY)	-	-	--
2. Antimicrobial activity.			
<i>Bacillus subtilis</i> (SUB)	+	+	-
<i>Micrococcus luteus</i> (LUT)	+	+	-
<i>Candida albicans</i> (ALB)	+	+	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CER)	+	+	+
<i>Streptomyces murinus</i> (MUR)	+	-	-
<i>Aspergillus niger</i> (NIG)	+	+	+
3. Biochemical tests.			
Lecithinase (LEC)	+	+	+
Lipolysis (LIP)	+	+	+
Pectin hydrolysis (PEC)	-	-	-
Nitrate reduction (N03)	+	+	+
H ₂ S production(H2S)	-	-	-
Hippurate reduction (HIP)	-	-	-
4. Degradation tests.			
Elastin (ELA)	+	+	+
Xantine (XAN)	-	+	+
Arbutin (ARB)	+	+	+
5. Antibiotic resistance.			
Neomycin (NEO)	+	-	-
Rifampicin (RIF)	-	+	+
Oleandomycin (OLE)	-	+	+
Penicillin G (PEN)	-	+	+
6. Growth test.			
45°C (45C)	-	-	-
NaCl (7NA)	-	-	-
Sodium azide (01Z)	-	-	-
Phenol (PHN)	-	-	-
Potassium tellurite (01T)	-	-	-
Thallus acetate (T01)	-	-	-
7. Compound as sole source of nitrogen (0.1%, W/V).			
DL- α -amino-n-butyric acid (BUT)	+	+	+
L-Cysteine (CYS)	+	+	+
L-Valine (VAL)	+	+	+
L-Phenylalanine (PHE)	+	+	+
L-Histidine (HIS)	+	+	+
L-Hydroxyproline (HYD)	+	+	-
8. Organic compounds as sole source of carbon (1%, W/V)			
Sucrose (SUC)	-	-	+
meso-Inositol (INO)	+	-	+
Mannitol (MAN)	+	+	+
L-Rhamnose (RHA)	+	+	+
Raffinose (RAF)	-	-	+
D-Melzitose (MEZ)	+	+	+
Adonitol (ADO)	-	-	-
Dextran (DEX)	+	+	+
D-Melibiose (MEB)	-	-	+
Xylitol (XYT)	-	-	+

교해 볼 때 세포벽 chemotype I에 해당되고 세포내에 특징적인 당이 나타나지 않는 sugar pattern C에 해당되는 것을 알 수 있었다. 배양특성, 형태적 특성, 세포벽이 DAP와 아미노산 및 당분석등의 결과로 분리주 EMS4, EMP22, L234를 *Streptomyces*속으로 분류할 수 있었다 (Table 1).

TAXON program을 이용한 종(species) 동정

종 수준의 동정을 위하여 실시한 세 분리군의 단위 특성을 기본으로 하여 현재까지 분류가 완성된 균주들의 특징을 database화하여 이를 수리 분류하도록 작성한 TAXON program을 이용, 수리 동정을 실시하였다. TAXON program에서는 Willcox probability, 분류학적 거리(taxonomic distance), 95% 분류군 반경(95% taxon distance), % probability of strain further away 등의 동정 스코어로 동정 결과를 알 수 있다. 95% 분류군 반경(95% taxon radius)은 상기 4 동정 스코어 결과 동정 분류군의 95%가 포함되는 구의 반경을 나타내고 % probability of strain further away는 동정된 미지의 시험 균주 밖에 존재하는 균주가 확률적으로 그 분류군의 영역의 몇 %에 해당하는 가를 나타내고 있다. 분류학적 거리(taxonomic distance)는 분리주와 비교되는 group의 중심(centroid)으로부터의 거리를 나타내며 값이 낮을수록 그 group과 높은 상관 관계를 뜻한다. 그러므로 정확한 동정이 되기 위해서는 Willcox probability가 높고 (>0.85), 분류학적 거리가 95% 분류군 반경 내에 들며 짧을수록, 그리고 % probability of strain further away 값이 클수록 좋다고 할 수 있다.

분리주 EMS4를 *Streptomyces* 주군집(major cluster)을 대상으로 TAXON program을 사용하여 50가지 character에 대해 수리동정한 결과 주군집 61, 즉 *Streptomyces lavendulae* group에 대해 높은 Willcox probability(0.999664)를 나타내었다(Table 3). 분리군 EMS4의 주군집 61에 대한 TAXON distance(0.4770)가 95% taxon radius(0.4118)보다 크고 주군집 61에 속하는 구성 균종들이 본군주보다 cluster centroid에서 더 멀리 있을 확률(%

of probability of strain further away)이 낮으며(0.0249), 최외각 균주인 *S. lavendulocolor*의 taxon distance(0.4258)보다 큰 것으로 보아, 분리주 EMS4는 주군집 61의 외각에 존재하는 것으로 판단된다. *Streptomyces*의 major cluster 61은 12균종으로 구성된 집단으로 분리주 EMS4와 이 구성 균종과의 분류단위 특성을 비교하고, simple matching coefficient(SSM)를 이용하여 가장 유사한 균주를 찾아본 결과, 주군집 61의 대표균주인 *S. lavendulae*와 중심 균주인 *S. colombiensis*에 대해 66%인 반면, *S. katrae*에 대해 가장 높은 76%를 나타냈고 분류 형질에 있어서도 가장 많이 일치하였으므로 분리주 EMS4는 *S. katrae*와 가장 유사한(best match) 것으로 판단되었다. 그러나 *S. katrae*는 cluster 61의 대표균주인 *S. lavendulae*에 귀속되므로 분리주 EMS4는 *S. lavendulae*의 한 균주로 동정하였다.

분리균주 EMP22을 *Streptomyces* 주군집을 대상으로 수리동정을 수행한 결과, 주군집 1B, 즉 *Streptomyces anulatus* group에 대해 높은 Willcox probability(0.999073)를 나타내었다(Table 4). 분리균주 EMP22의 probability of further away(%)가 1.3765로서 비교적 낮은 조건이나 주군집 1B의 최외각 균주(OMS)의 probability of further away(0.4404)보다 높은 조건이어서 분리균주 EMP22는 주군집 1B에 귀속됨을 알 수 있었다. S_{SM} 값은 중심균주인 *S. willmorei*와 74%, *S. albidus*와 82%를 나타내어 본 분리균주의 S_{SM} 분석 결과로는 *S. albidus*와 유사한 것으로 판단되었다. 그러나, *S. albidus*는 cluster 1B의 중심균주인 *S. willmorei*에 귀속되므로 분리균주 EMP22는 *S. willmorei*의 한 균주로 동정하였다.

분리주 L234를 *Streptomyces* 주군집을 대상으로 수리동정을 수행한 결과, cluster 1B에 해당되었으나 Willcox probability(0.540749)가 너무 낮고, taxon distance(0.4989)가 95% taxon radius(0.4404)보다 상당히 크며, % of probability of strain further away(0.0724)가 낮게 나와 분리주 L234를 정확히 동정할 수 없었다. 따라서 이 균주를 부군집(minor cluster)으로 재동정하였다(Table 5). 그 결과 Willcox probability가 부군집 2, 즉 *S. aburavensis* group에서 0.999792로 다음 부군집 14의 0.000128

Table 3. Identification score of the isolate *Streptomyces* sp. EMS4 to the major clusters of *Streptomyces* by TAXON program.

TAXON Major clusters	TAXON distance	95% TAXON radius	% Prob. of strain further away	Willcox probability
61	0.4770	0.4118	0.0249	0.999664
1B	0.5222	0.4404	0.0073	0.000331
10	0.5253	0.4036	0.0000	0.000004
5	0.5390	0.4455	0.0023	0.000000
31	0.5426	0.4131	0.0000	0.000000

Table 4. Identification score of the *Streptomyces* sp. EMP22 to the major clusters of *Streptomyces* by TAXON program.

Cluster	Taxon distance	95% Taxon radius	probability of EMP22 further away (%)	Willcox probability
1B	0.4616	0.4404	1.3765	0.999073
61	0.4971	0.4118	0.0026	0.000899
5	0.5028	0.4455	0.0860	0.000020
3	0.5048	0.3631	0.0000	0.000001
10	0.5215	0.4036	0.0000	0.000007

Table 5. Minor unit characters for the identification of *Streptomyces* sp. L234.

1. Morphology and pigmentation.				
Spore chain morphology	:	rectiflexible (RFS)	+	spiral (SPI) -
Color of spore mass	:	grey (GRY)	+	
Diffusible pigment	:	production (PIG)	-	
2. Antimicrobial activity.				
<i>Bacillus subtilis</i> (SUB)		-		
<i>Mirococcus leuteus</i> (LUT)		-		
<i>Streptomyces murinus</i> (MUR)		-		
3. Biochemical tests.				
Pectin hydrolysis (PEC)		-		
4. Degradation tests.				
Guanine (GUA)	-	Xylan (XYN)	+	Elastin (ELA) +
Urea (URE)	+	Xanthine (XAN)	+	Allantoine (ALL) +
5. Antibiotic resistance.				
Rifampicin (RIF)	+	Penicillin G (PEN)	+	
6. Growth tests.				
45°C (45C)	-	Phenol (PHN)	-	NaCl (7NA) -
Potassium tellurite (01T)	-			Sodium azide (01Z) -
7. Compound as a sole source of nitrogen (0.1%, W/V)				
Potassium nitrate (POT)	-			L-Phenylalanine (PHE) +
L-Histidine (HIS)	+			
8. Organic compounds as sole source of carbon (1%, W/V).				
L-Arabinose (ARA)	+	Raffinose (RAF)	+	Sucrose (SUC) +
D-Lactose (LAC)	+	D-Xylose (XYL)	+	Salicilin (SAL) +
myo-Inositol (INO)	+	D-Melibiose (MEB)	+	Mannitol (MAN) +
Sodium acetate (ACE)	+	D-Fructose (FRU)	+	L-Rhamnose (RHA) +
Sodium citrate (CIT)	+	Sodium propionate (RPO)	+	Sodiumpyruvate (PYR) +

Table 6. Identification score of the *Streptomyces* sp. L234 to the minor clusters of *Streptomyces* by TAXON program.

Cluster	Taxon distance	95% Taxon radius	probability of strain further away (%)	identification score
2	0.4346	0.3972	0.4315	0.999792
14	0.4767	0.2869	0.0000	0.000128
11	0.4834	0.3015	0.0000	0.000065
24	0.5201	0.3570	0.0000	0.000016
34	0.5411	0.4066	0.0000	0.000000

에 비해 월등히 높았으나, taxon distance가 0.4346으로 95% taxon radius(0.3972)보다 크고, % of probability of strain further away(0.4315)가 매우 작으므로 분리주 L234는 부군집 2의 외각에 존재함을 알 수 있다(Table 6). 부군집 2의 구성군주와 SSM 값을 비교하였을 때, 중심군주인 *Streptomyces aburaviensis*와 79.49%로 가장 높은 값을 나타내었고, 부군집 2의 모든 군주는 중심군주인 *Streptomyces aburaviensis*에 귀속되므로 분리주 L234는 *Streptomyces aburaviensis*의 한 군주로 동정하였다.

요 약

본 연구의 목적은 진균의 세포벽 합성을 저해하는 항진균 물질생성 방선균을 개발하는 데 있다. 다양한 환경으로부터 채취한 토양 시료로부터 방선균 선택 배지를 이용하여 860여 방선균을 선택적으로 분리하였다. 분리 군주 중 *Penicillium cyclopium*, *Cryptococcus laurentii*, *Aspergillus flavus*에 특이적 항균 활성 물질을 생산하는 군주 EMS4, EMP22, L234를 각각 선별하였다. 화학적 동정과 형태학적 동정을 통해 분리 군주들이 *Streptomyces*속 세균임을 알 수 있었다. 총 50개의 주군집, 34개의 부군집 형질을 분석하고, 이 실험 결과를 TAXON program에 적용하여 종의 수리동정을 실시하였다. 그 결과 분리군 EMS4는 *Streptomyces*의 제 61 주군집에 속하는 *Streptomyces lavendulae*의 한 군주로 동정되었고, EMP22는 제 1B 주군집에 속하는 *S. willmorei*의 한 군주로 동정되었으며, L234는 제 3 부군집의 *S. aburaviensis*의 한 군주로 동정되었다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(서울대학교 분

자미생물학 연구센터)의 지원을 받아 수행되었으며 영국의 Ward 박사와 Goodfellow 박사에 의해 개발된 TA-XON program을 이용하였으므로 이에 감사드리며, TA-XON program 조작에 도움을 주신 서울대학교 미생물학과 김형태씨에게도 감사를 드립니다.

참고문헌

- Isono, K. and S. Suzuki. 1979. The polyoxins, pyrimidine nucleoside peptide antibiotics inhibiting fungal cellwall biosynthesis. *Heterocycles*. **13**: 333-351.
- Endo, A., K. Kakita, and T. Misato. 1970. Mechanism of action of the antifungal agent polyoxin D. *Journal of Bacteriology*. **104**: 189-196.
- Kobinata, K., M. Uramoto, M. Nishii, H. Kusakabe, G. Nakamura, and K. Isono. 1980. Neopolyoxins A, B and C, new chitin synthetase inhibitors. *Agricultural and Biological Chemistry*. **44**: 1709-1711.
- Ubukata, M., M. Uramoto, J. Uzawa, and K. Isono. 1986. Structure and biological activity of neopeptins A, B, and C, inhibitors of cell wall glycan synthesis. *Agricultural and Biological Chemistry*. **50**: 357-365.
- Cross, T. 1982. Actinomycetes: A continuous source of new metabolites. *Develop. Ind. Microbiol.* **23**: 1-18.
- Williams, S.T. and E.M.H. Wellington. 1982. Principle and problems of selective isolation of microbes. Pp. 9-26. In J.D. Bullock, L.J. Nisbet and D.J. Winstonley (ed.), *Bioactive microbial products: Search and discovery*. Academic Press, London.
- Goodfellow, M. and A.G. O'donnell. 1989. Pp. 343-383. In I.H. Baumberg and M. Rhodes (ed.), *Microbial products: New approaches*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Cummnis, C.S. and H. Harris. 1956. The chemical composition of the cell wall in some Gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character. *J. Gen. Microbiol.* **14**: 583-600.
- Lechevalier, M.P., C. De Bieyre and H.A. Lechevalier. 1977. Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.* **5**: 249-260.
- Keddie, R.M. and I.J. Bousfield. 1980. Cell wall composition in the classification and identification of coryneform bacteria. Pp. 167-188. In M. Goodfellow and R.G. Board (ed.), *Microbiological classification and identification*. Academic Press, London.
- Schleifer, K.H. and P.H. Seidle. 1985. Chemical composition and structure of murein. Pp. 201-219. In M. Goodfellow and D.E. Minnikin (ed.), *Chemical methods in bacterial systematics*. Academic Press, London.
- Schleifer, K.H. 1985. Analysis of the chemical composition and primary structure of murein. *Methods in Microbiology*. **18**: 123-156.
- Lechevalier, H.A. and M.P. Lechevalier. 1980. The chemotaxonomy of actinomycetes, Pp. 227-291. In A. Dietz and D.W. Thater (ed.), *Actinomycete taxonomy special publication 6. Society for Industrial Microbiology*, Arlington, VA.
- Lechevalier, H.A. and M.P. Lechevalier. 1970. A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes. Pp. 393-405. In H. Prauser (ed.), *The Actinomycetales*, Gustav Fisher Verlag.
- Lechevalier, M.P. and H.A. Lechevalier. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**: 435-443.
- Hill, L.R. and L.G. Silvestri. 1962. Quantitative methods in systematics and Actinomycetes, III. The taxonomic significance of physiological-biochemical characters and constructions of diagnostic key. *Giorn. Microbiol.* **10**: 1-28.
- Gyllenberg, H.G. 1976. Application of automation to the identification of *Streptomyces*. Pp. 299-321. In T. Arai (ed.), *Actinomycetes: the boundary microorganisms*, Toppan Co., Tokyo.
- Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Anderson, E.M.H. Wellington, J.C. Vickers, G. Alderson, P.H.A. Sneath, M. Sackin and A.M. Mortimer. 1983B. A probability matrix for the identification of some *Streptomyces*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1815-1830.
- Sneath, P.H.A. 1979A. Basic program for identification of unknown with presence-absence data against an identification matrix of percent positive characters. *Computer and Geosciences*. **5**: 195-213.
- Sneath, P.H.A. 1980A. Basic program for the most diagnostic properties of groups from an identification matrix of percent positive characters. *Computers and Geosciences*. **6**: 21-26.
- Sneath, P.H.A. 1980B. Basic program for the detection of the best identification scores possible from the most typical examples when compared with an identification matrix of percent positive characters. *Computers and Geosciences*. **6**: 27-34.
- Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for the characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
- Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Alderson, E.M.H. Wellington, P.H.A. Sneath, and M. Sackin. 1983A. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1743-1813.
- Wellington, E.M.H. and S.T. Williams. 1978. Preservation of actinomycete inoculum in frozen glycerol. *Microbios Letters*. **6**: 151-157.
- Yamada, K. and K. Kamagata. 1970. Taxonomical studies on Coryneform Bacteria. II. Principle amino acids in the cell wall and their taxonomic significance. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **16**: 103-113.
- Chaplin, M.F. and J.F. Kennedy. 1986. TLC analysis of Carbohydrates, Pp. 12. In *Carbohydrate Analysis*, Oirl Press. Oxford.
- Tresner, H.D. and E.J. Backus. 1963. Systems of colors wheels for *Streptomyces* taxonomy. *Appl. Microbiol.* **11**: 335-338.
- Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for the characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
- Hankin, L., M. Zucker and D.C. Sands. 1971. Improved

- solid medium for the detection and enumeration of pectinolytic bacteria. *Appl. Microbiol.* **22**: 205-209.
30. Nitsch, B. and H.J. Kutzer. 1969. Egg-yolk agar as a diagnostic medium for *Streptomyces*. *Experimentia.* **25**: 113.
 31. Thirk, H.L. 1957. Hippurate hydrolysis in *Klebsiella cloaca* classification. *J. Gen. Microbiol.* **17**: 390-395.
 32. Ziegler, P. and H.J. Hutzner. 1973. Hippurate hydrolysis as a taxonomic criterion in the genus *Streptomyces* (order Actinomycetales). *Z. Allg. Mikrobiol.* **13**: 265-272.
 33. Skerman, V.B.D. 1967. In A guide to the identification of the genera of bacteria. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
 34. Kutzner, H.J. 1976. Methoden zur untersuchung von Streptomyceten an deinigen anderen Actinomyceten. Darmstadt; Teilsammlung Darmstadt am Institut fur Microbiologie der Technishen Hoshschule.
 35. Gordon, R.E. 1968. The taxonomy of the soil bacteria. In The Ecology of Soil Bacteria, T.R.G. Gray and D. Parkinson (ed.), Liverpool Univ. Press, Liverpool.
 36. Jones, K.L. 1949. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *J. Bacteriol.* **57**: 141-145.
 37. 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.
 38. Rho, Y.T. 1993. Studies on the characteristics and the formation of submerged spores in *Streptomyces alvidoflavulus* SMF301. *Ph. D. Thesis*, Seoul National Univ.

(Received 16 September 1995)