

## 제주도 토양방선균의 수집과 항균물질 생산균의 선별

정완석 · 고영환\* · 김창진<sup>1</sup>

제주대학교 공과대학 식품공학과, <sup>1</sup>생명공학연구소

**초 록 :** 제주도내 25개 지점의 토양시료로부터 총 703 주의 방선균을 분리하였다. 네 종류의 배지 중 soil extract 를 함유한 arginine glycerol salts agar 가 다양한 방선균을 분리하는데 가장 적합하였으며, 목장초지 토양이 다른 지역의 토양에 비해서 방선균의 다양성과 밀도면에서 가장 좋은 분리원이었다. 순수분리된 526개의 균주를 대상으로 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* 및 *Pseudomonas solanacearum* 을 검정균으로 하여, 항균성 물질 생산여부를 검정한 결과, 생산균주의 발생빈도는 분리 및 배양에 사용한 배지의 종류에 따라서 0~32.8%로 많은 차이를 보였다. 세 종류의 검정균에 대하여 동시에 항균활성을 나타내는 10개 균주 중에서 pH 안정성과 열 안정성이 비교적 높은 물질을 생산하는 BL106Ba 균주를 선택하여 동정한 결과, *Streptomyces* 속에 속하며 *S. albosporeus* 와 가장 유사한 것으로 추정되었다. BL106Ba의 배양액을 양이온 교환수지(AG MP-50) 통과와 3차의 분자량 분획(Sephadex G-10)으로 정제하여 얻은 백색의 결정은 그람 음성균 및 양성균에 대해서는 강한 항균활성을 나타내었으나, 효모에 대해서는 약한 활성을 나타내었다. 이 결정 물질을 TLC와 HPLC로 분석한 결과 네 종류의 서로 다른 항균성 화합물이 혼합되어 있는 것으로 나타났다.(1999년 4월 2일 접수, 1999년 4월 28일 수리)

### 서 론

방선균은 분류학적으로 진정세균과 진균의 중간적 위치를 차지하고 있는 경계 미생물로 자연계에 널리 분포되어 있으며, 질병의 원인이 되기도 하지만 항생물질을 비롯한 각종 2차 대사산물의 생산자이자, 광범위한 기질의 분해자이기 때문에 오래 전부터 산업적으로 이용되었고, 천연유기 화합물의 보고로서 신물질 검색 및 생합성 기구를 대상으로 깊이 연구되어 왔다.<sup>1,2)</sup> 미생물의 대사산물로부터 발견된 10,000여 종의 항생물질 가운데 74% 이상이 방선균에 의해서 생산되며, 그 중 75%는 *Streptomyces* 속으로부터 생산된 것이다.<sup>3)</sup> 지금도 방선균으로부터 새로운 항생물질 등 다양한 생리활성물질을 탐색하기 위해 많은 연구가 부단히 이루어지고 있다.<sup>4,7)</sup>

토양방선균의 일반적인 분포는 *Streptomyces* 속이 69.4%로 가장 많이 존재하며, 그 다음으로 *Micromonospora* 속이 11.4%, *Nocardia* 속이 6.1%, *Streptosporangium* 속이 2.0%씩 분포하고, *Actinomadura*, *Nocardiopsis*, *Microbispora* 속이 각각 0.9%씩 분포한다고 보고되었다.<sup>8)</sup> 국내에서는 김<sup>9)</sup>이 중부 내륙지역의 방선균 속 다양성을 조사한 바에 따르면 *Streptomyces* 속이 68.4%로 가장 많이 존재하며, 그 다음으로 *Micromonospora* 속이 6.2%, *Nocardiaform* 균이 9.1%, *Microbispora* 속이 6.2%, *Nocardiopsis* 속이 2.7%, *Actinomadura* 속이 2.3%, *Streptosporangium* 속이 1.8%씩 분포하고 있는 것으로 나타났다. 권 등<sup>10)</sup>이 제주도내 토양 중의 전반적인 방선균의 분포를 조사한 결과, *Streptomyces* 속이 62.6%를 차지하고 있으며, *Micromonospora* 속이 16.4%,

*Nocardiaform* 균이 8.6%, *Actinomadura* 속이 2.2%, *Microbispora* 속이 1.7%, *Nocardiopsis* 속이 1.6%, *Streptosporangium* 속이 1.0%, 나머지 기타 속이 5.9%씩 분포하고 있는 것으로 보고하여, 제주도의 방선균 분포는 타지방과 큰 차이는 없으나 최소방선균인 *Micromonospora* 속이 산림토양에 많이 분포하고 있는 것으로 알려져 있다.

균분리원의 선택에 있어서는 토양 중의 유기물 성분, 토양의 형태, 계절 및 기후, 온도, 물과 공기의 순환, 그리고 pH 등의 환경조건도 고려되어야 하는데, 제주도의 기후는 전반적으로 온화하며, 한라산 정점으로부터 해안가까지 좁은 지역에 비교적 다양한 기후 및 토양 분포를 가지고 있어 다양한 방선균이 서식하고 있을 것으로 예상된다. 본 연구에서는 권 등<sup>10)</sup>의 연구 결과를 보완하고 새로운 항생물질을 생산하는 방선균을 선별할 목적으로 제주도 토양으로부터 방선균을 수집하여 지역별, 분리용 배지 종류별 분포상태와 항균성물질 생산균주의 발생빈도를 조사하였으며, 그 중 높은 항균활성을 나타내는 균주를 선택하여 동정하고 항생균 활성 물질을 부분정제하여 항균활성 범위를 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 방선균의 분리 수집

제주도 전지역을 대상으로 자연생태계를 고려하였고, 중복분리의 빈도를 줄이기 위해 사방 10 km 정도의 거리를 유지하면서 25개소의 지점을 설정하여 토양 시료를 채취하였다(Fig. 1). 시료는 지표면에서 10 cm 정도까지의 표층에서 채취하여 실험실 도착 즉시 일정량을 petri dish에 담아 70°C에서 건조한 후 막자사발로 분말화하여 방선균 분리원으로 사용하였다. 균 분리용 배지로는 arginine glycerol

찾는말 : 제주도, 토양방선균, 항생균활성  
\*연락처

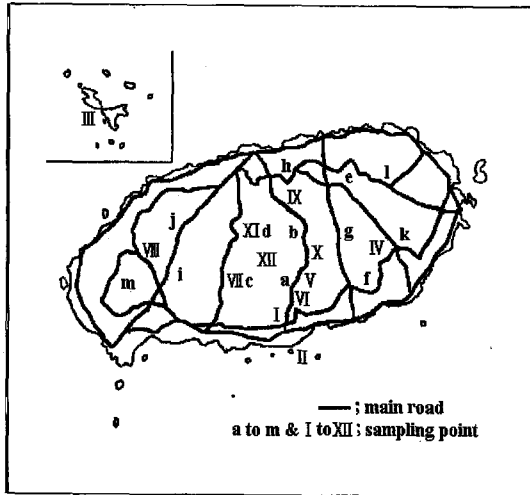


Fig. 1. Map of sampling points for the isolation of actinomycetes in Cheju Island.

salts agar(AGSA),<sup>11)</sup> starch-casein-nitrate agar(SCNA),<sup>22)</sup> AGSA 배지에 20%의 soil extract를 첨가한 arginine glycerol salts soil extract agar(AGSSEA)<sup>15)</sup> 및 Benedict agar(BA)<sup>16)</sup>를 사용하였다. 각각의 배지에는 곰팡이를 억제하기 위하여 cycloheximide와 nystatin을 50 µg/ml씩 첨가하였고,<sup>15)</sup> pH는 7.0으로 조절하였다. 방선균을 분리하기 위하여, 건조 시료를 면봉으로 가볍게 찍고 과잉의 분말을 털어 낸 후, 각각의 분리용 배지에 가볍게 찍어 접종하였다. 28°C에서 약 4주간 배양하면서 형성된 집락을 같은 종류의 배지로 옮겨 일정 기간 배양한 후 집락의 형태, 포자의 색깔, 색소 등을 비교하여 같은 종류라고 생각 되는 것들은 폐기하고 상이한 균주들을 순수분리하였다.

#### 항균활성 검증

항생물질을 생성하는 방선균을 검색하기 위하여 순수분리된 방선균의 포자 1 백균이를 5 ml의 액체배지(분리시에 사용되었던 배지의 성분중에서 한천을 뺀 것)에 접종하여 28°C에서 약 15일간 150 rpm으로 진탕배양하였다. 배양액을 원심분리(5,000×g, 15 min)한 후, 상등액을 0.25 µm microfilter로 여과하여 항균활성 탐색 시료로 사용하였다. 배양액의 항균활성은 *Escherichia coli* ATCC 8749, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas solanacearum* ATCC 10692를 검정균으로 사용하여 paper disc법<sup>10)</sup>으로 측정하였다. 시료 40 µl를 직경 8 mm의 paper disc(Toyo)에 흡수시킨 후 검정균을 도말한 평판배지에 올려 놓고 *E. coli* ATCC 8749와 *S. aureus* ATCC 6538은 nutrient agar를 사용하여 37°C에서, *P. solanacearum* ATCC 10692는 PSA(peptone 10.0 g, casein hydrolysate 1.0 g, glucose 5.0 g, agar 17 g/l)배지를 사용하여 32°C에서 1일간 배양한 후 생육저지환의 크기를 측정하였으며, 생육저지환이 큰 균주에 대해서는 시험관 회석 배양법<sup>17)</sup>으로 다시 항균활성을 확인하였다. 검정균 배양용 액체배지 5 ml에 10~100 µl의 방선균 배양액을 첨가하고 1일간 배양 후 검정균의 생육정도를 600 nm에서의 흡광도로 비교하였다.

#### 항균성물질 생산균주의 동정

균주는 기본적으로 Shirling과 Gottlieb<sup>18)</sup>에 의한 International Streptomyces Project(ISP)의 방법과 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology<sup>19)</sup>에 수록된 방법 그리고 Williams 등<sup>20,21)</sup>의 방법에 따라 배양학적, 형태학적, 생리학적 특성 및 탄소원 이용성을 조사하여 동정하였다. 그리고 멜라닌 색소는 peptone-yeast extract-iron agar 배지에서 4일간 배양한 후, 수용성 색소는 glycerol-asparagine agar에서 14일간 배양한 후에 생성여부를 관찰하였다.<sup>20)</sup> 세포벽의 diaminopimelic acid(DAP)는 평판배지 상의 균체를 취하여 6 N HCl 1 ml와 같이 ampoule에 넣고 질소가스를 충전시킨 후 밀봉하여 121°C에서 15분간 가수분해한 후,<sup>22)</sup> cellulose 박층상에서 methanol-H<sub>2</sub>O-6 N HCl-pyridine(80:15:5:10)으로 전개시키고 0.2% ninhydrin을 이용하여 발색시켜 표준품과 비교하였다.<sup>23)</sup>

#### 항균성물질의 생산 및 부분정제

용량 300 ml 삼각플라스크에 AGSSE<sup>15)</sup> 액체배지 100 ml를 주입하고 균주를 접종하여 28°C에서 160 rpm으로 7일간 전배양한 것을 동일한 배지 10 l가 들은 20 l 발효조에 접종하고 28°C에서 9일간 본배양을 실시하였다. 배양액을 5,000×g에서 15분간 원심분리하고 0.25 µm filter로 여과한 후 여액을 회전감압농축기로 50°C에서 10배로 농축한 후 분리 정제용 시료로 사용하였다. Ion exchange 및 gel permeation chromatography를 이용하여 배양 농축액으로부터 항균성물질을 부분 정제하였다. 10배 농축된 배양액 50 ml를 양이온교환수지(AG MP-50)가 채워진 column(2.8×20 cm)에 흡착시킨 후 5 M NH<sub>4</sub>Cl 용액으로 분당 1.0 ml의 유속으로 용출시키면서 3.0 ml씩 분획하여 항균활성을 측정하였다. 활성을 나타내는 분획을 모아 50°C에서 재농축하여 5 ml를 Sephadex G-10이 채워진 column(2.8×35 cm)에 주입한 후 증류수로 분당 1.0 ml의 유속으로 용출시켜 2.0 ml씩 분획하고 항균활성이 있는 부분을 모아 재농축하여 2차 gel permeation chromatography를 실시하였다. 같은 방법으로 3차 gel permeation chromatography를 실시한 후 활성분획을 모아서 건조시켰다. 부분정제된 시료를 thin layer chromatography(TLC)와 high performance liquid chromatography(HPLC)로 정제 정도를 조사하였다. TLC는 silicagel 60의 박층에 buthanol:acetic acid:H<sub>2</sub>O(4:1:2)을 전개용매로 사용하여 실시하였고, 전개후 화합물은 자외선(254 nm, 366 nm)과 ninhydrin 시약(Sigma-Aldrich)으로 탐색하였다. HPLC는 Hypersil ODS column과 9.5% methanol을 사용하여 유속 0.25 ml/min로 실시하였으며, 화합물을 UV detector(210 nm)로 감지하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 방선균의 분리 및 분포

자연환경을 고려하여 선정된 25개소(Fig. 1)에서 채취한 토양 시료로부터 4 종류의 분리배지를 사용하여 총 703 주

**Table 1. Number of actinomycetes isolated from various regions of Cheju Island using different media**

Sampling point <sup>1)</sup>	Medium			Sampling point <sup>1)</sup>	Medium AGSSEA <sup>2)</sup>
	AGSA <sup>2)</sup>	SCNA <sup>2)</sup>	BA <sup>2)</sup>		
I	10	-	1	a	36
II	14	-	2	b	40
III	16	-	2	c	31
IV	17	-	1	d	23
V	11	8	2	e	42
VI	13	12	2	f	38
VII	10	10	1	g	33
VIII	35	14	3	h	30
IX	21	9	3	i	32
X	7	9	1	j	18
XI	8	6	1	k	37
XII	9	7	1	l	40
				m	37
Total	171	75	20	Total	437

<sup>1)</sup>Refer to Fig. 1.

<sup>2)</sup>AGSA, arginine glycerol salts agar; SCNA, starch-casein-nitrate agar; BA, Benedict agar; AGSSEA, AGSA containing 20% soil extract.

의 방선균을 분리하였다(Table 1).

AGSA 배지를 사용해서 12개 지점에서 171주, SCNA 배지로 8개 지점에서 75주, BA 배지로 12개 지점에서 20주를 분리하였는데, AGSA 배지를 사용했을 때에는 SCNA 배지를 사용했을 때보다 많은 방선균을 분리할 수 있었을 뿐 아니라 집락의 형태 또한 다양하였다. AGSSEA 배지를 사용했을 때에는 13개 지점의 토양 시료로부터 437 주의 방선균을 분리하였는데, 위치와 고도 등에 관계없이 대부분의 지점에서 30개 이상의 균주를 분리할 수 있었으며, 다른 배지를 사용했을 때보다 집락의 형태가 다양하였다. AGSSEA 배지는 AGSA 배지에 20%의 soil extract를 첨가한 것으로, soil extract 중의 유기물과 미량원소 등이 다양한 속의 방선균 생육에 좋은 효과를 주는 것으로 생각된다. Martin 등<sup>24)</sup>은 streptomycetes 분리 배지에 soil을 첨가함으로써 성장, 포자 형성 및 색소생성에 주목할 만한 효과가 있었다고 보고하였다. Nonomura와 Ohara<sup>13,25)</sup>는 희귀 방선균의 분리에 soil-extract를 첨가한 magnesium glucose asparagine-soil extract 한천배지를 사용했을 때가, AV agar와 vitamin B가 첨가된

**Table 2. Relative density of actinomycetes in soils sampled from various regions of Cheju Island<sup>1)</sup>**

Citrus field	Pasture land	Forest	Island	Hill	Valley	Top of Mt. Halla	Farm land
22 <sup>1)</sup>	41	10	9	13	13	9	17

<sup>1)</sup>Numbers indicate the average number of actinomycetes isolates/soil sample.

salts-starch agar를 사용했을 때보다 *Microbispora*속, *Microtetraspra*속, *Thermomonospora peptonophilus* 및 *Actinomadura*속의 균주들을 효과적으로 분리할 수 있었으며, 다른 방선균의 균락도 다 배지에 비해 많이 발생하였다고 보고하였다.

시료 채취 지점의 자연환경 특성을 반영하여 가축의 분변이 많은 중산간의 목장지대로부터 비교적 많은 방선균이 분리되었는데, 감귤과수원, 섬, 숲, 계곡, 오름, 농경지보다도 목장초지가 방선균의 다양성과 밀도면에서 제일 높은 수치를 보였으며, 고도가 높아짐에 따라 분리된 균주의 수가 감소하는 경향을 보였다(Table 2). Flaig 등<sup>26)</sup>은 경작지, 목초지 및 산림지역에서 방선균을 분리한 결과 목초지에서 가장 많은 수의 방선균을 분리할 수 있었으며, 그리고 무기물을 시비한 밭 토양이나 유기물질이 풍부한 토양에서 많은 수의 방선균을 분리할 수 있었다. Küster<sup>27)</sup>은 여러 종류의 토양시료 중에서 목초지로부터 가장 다양한 *Streptomyces* sp.를 분리할 수 있었고, 산림토양에서 가장 적은 수의 방선균이 분리되었다고 하였다. 본 실험의 결과도 이들의 보고와 유사한 경향을 보여주고 있다.

**항생물질 생산균의 발생 빈도**

분리 수집된 703주 중에서 526개 주를 대상으로 액체배양시 항균성물질을 생산하는 균주의 발생빈도를 조사한 결과 0~32.8%로 사용한 배지의 종류 및 검정균의 종류에 따라 상당한 차이가 있는 것으로 나타났다(Table 3). 배지의 종류에 따라 항생물질 생산균주의 발생빈도가 다른 것은 특정 토양 조건하에서의 균주의 불안정성, 토양 colloid에 대한 균주의 흡착성 및 특정 영양성분의 부족에 기인하는 균주의 생육 부진 등으로 추정되는데,<sup>28)</sup> 배지용 영양성분의

**Table 3. Occurrence of actinomycete isolates with antibacterial activity**

Test organism	Medium <sup>1)</sup>			
	AGSA	BA	SCNA	AGSSEA
<i>E. coli</i>	25/135 <sup>2)</sup> (18.5) <sup>3)</sup>	0/20 (0)	15/64 (23.4)	20/307 (6.5)
<i>S. aureus</i>	13/135 (9.6)	0/20 (0)	6/64 (9.4)	20/307 (6.5)
<i>E. coli</i> + <i>S. aureus</i>	2/135 (1.5)	0/20 (0)	0/64 (0)	17/307 (5.5)
<i>E. coli</i> + <i>S. aureus</i> + <i>P. solanacearum</i>	0/135 (0)	0/20 (0)	0/64 (0)	10/307 (3.3)
Subtotal <sup>4)</sup>	36/135 (26.7)	0/20 (0)	21/64 (32.8)	23/307 (7.5)

<sup>1)</sup>Refer to Table 1.

<sup>2)</sup>No. of active isolates/No. of isolates tested.

<sup>3)</sup>Percentage of active isolates.

<sup>4)</sup>Indicate the number of active isolates against any one of the test organisms.

적절한 선정은 항생물질 생산을 증진시키며,<sup>29,30</sup> 토양 중의 chitin이나 토양에서 유래하는 병원성 곰팡이의 세포벽 성분 등이 항생물질의 생산에 도움을 준다고 보고<sup>31</sup>된 바 있다. 본 연구에서 분리된 방선균 중에서는 *S. aureus*보다도 *E. coli*에 대해서 항균활성을 나타내는 균주가 많은 것으로 나타났다. 김 등<sup>30</sup>은 제주 지역에서 분리한 방선균 중 항균활성을 나타낸 균주는 12.6%로 다른 지역의 16.3% 보다 낮은 것으로, *E. coli*보다 *S. aureus*에 대해서 보다 많은 균주가 항균활성을 나타낸 것으로 보고한 바 있으나, 시료 채취 지점 및 사용 배지 등이 일치하지 않아 본 연구의 결과와 직접적인 비교는 할 수 없었다.

AGSSEA에서 분리된 방선균 307 균주의 항균활성을 조사한 결과 17개의 균주가 *E. coli*와 *S. aureus*에서 동시에 항균활성을 나타내었는데, 이 중 10개 균주는 *P. solanacearum*에 대해서도 항균활성을 나타내었다(Table 3). *E. coli*, *S. aureus*, *P. solanacearum* 세 종류 검정균에 대해서 동시에 항균활성을 나타내는 10개의 균주 중에서 비교적 강한 항균활성을 보이면서, 항균활성성분이 열안정성(100°C에서 30분 가열) 및 pH 안정성을 나타낸 BL106Ba를(자료제시 생략) 항생물질 생산균주로 선발하여 다음 실험에 사용하였다.

**항생물질 생산균주의 동정**

선발된 항생물질 생산균주 BL106Ba의 배양학적, 형태학적 및 생리학적 특성과 탄소원 이용성을 조사한 결과

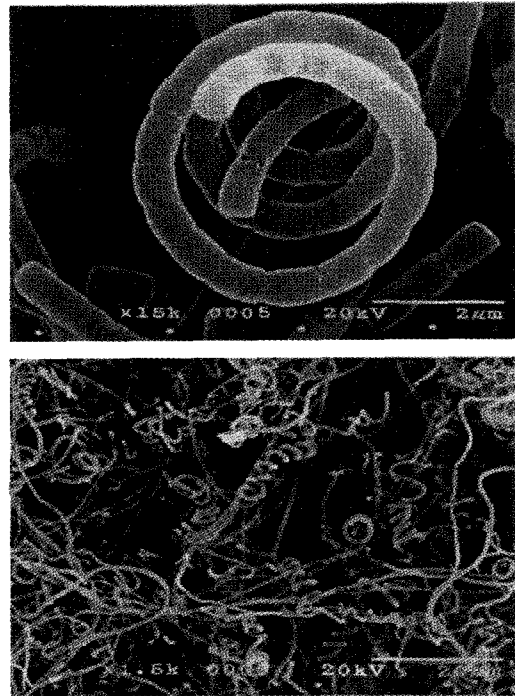


Fig. 2. Electron microscopic morphology of the isolate BL106Ba.

*Streptomyces* 속의 균주로 판명되었으며, 그 중에서도 *S. albosporus*<sup>®</sup>와 가장 유사한 것으로 나타났다(Fig. 2, Table 4).

Table 4. Characteristics of an isolate BL106Ba

Cultural characteristics				
Medium	Growth	Aerial mycelium (color)	Substrate mycelium	Soluble pigment
Yeast extract-malt extract agar	Good	Abundant (pinkish red)	Reddish brown	None
Oatmeal agar	Good	Abundant (pinkish red)	Pale yellow	None
Inorganic salt-starch agar	Good	Abundant (pinkish red)	Pale yellow	None
Glycerol-asparagine agar	Good	Moderate (whitish gray)	Dark brown	None
Peptone-yeast extract iron agar	Moderate	Poor	Dark brown	Purplish brown
Tyrosine agar	Good	Abundant (gray)	Light brown	Dark brown
Glucose-asparagine agar	Good	Abundant (pinkish red)	Pale yellow	None
Bennet's agar	Good	Abundant (pinkish red)	Pale yellow	None
Nutrient agar	Good	Abundant (pinkish red)	Light brown	None
Morphological characteristics				
Unit character	Description	Unit character	Description	
Morphology	Presence of spore and aerial mycelium	Spore chain morphology	Spirales	
Spore size	0.85×0.65 μm	Spore numbers per chain	More than 80~100	
Spore chain ornamentation	Smooth, aerial spore mass	Spore motility	None	
Physiological characteristics				
Unit character	Description	Unit character	Description	
Melanoid pigment	Produced	Utilization of carbon source		
Diaminopimelic acid	LL-type			
Soluble pigment	Not produced	D-Mannitol	Utilized	
Utilization of carbon source		D-Fructose	Utilized	
		L-Rhamnose	Utilized	
D-Glucose	Utilized	Sucrose	Utilized	
L-arabinose	Utilized	Raffinose	Utilized	
D-Xylose	Utilized	Cellulose	Not utilized	
Inositol	Utilized	Maltose	Utilized	

**부분 정제된 항균성 물질의 항균 범위**

항생물질 생산균으로 선발된 BL106Ba 균주의 배양액을 회전감압농축기를 이용하여 50°C에서 10배로 농축한 후 양이온 교환수지(AG MP-50)통과와 3차에 걸친 분자량 분획(Sephadex G-10)을 실시하여 배양여액 3 l당 약 950 mg 정도의 항균활성을 지닌 백색의 결정을 얻었다.

이 결정 물질의 항균 범위를 수종의 그람 양성 및 음성 세균과 효모를 피검균으로 하여 paper disc법으로 조사한 결과, 대부분의 그람 양성균과 음성균에서는 뚜렷한 항균활성을 나타내었다. 효모 *Saccharomyces rocei* IAM 4991와 *Tollulopsis colliculosa* IAM 4426에 대해서는 비교적 높은 활성을 보였으나, *Saccharomyces cerevisiae* IAM 4512에 대해서는 낮은 활성을 보였으며 *Candida albicans* KCCM 11282에 대해서는 전혀 활성을 나타내지 못하였다(Table 5).

이 결정 물질을 TLC로 분석한 결과 화합물의 결정은 순수분리가 되지 않은 상태였으며, 4개의 서로 다른 항균활성 분획이 얻어졌다(자료제시 생략). 뿐만 아니라, HPLC로 분

석한 결과도 TLC로 분석한 결과와 비슷하게, 4개의 항균활성 분획과 기타 미량의 혼합물이 섞여있음을 나타내었다(Fig. 3). 이러한 결과로 보아 BL106Ba 균주의 배양액으로부터 부분정제된 항균활성물질은 4개 이상의 서로 다른 종류의 화합물을 포함하고 있는 것으로 판단되며, 이에 대한 연구를 계속 진행 중이다.

**감사의 글**

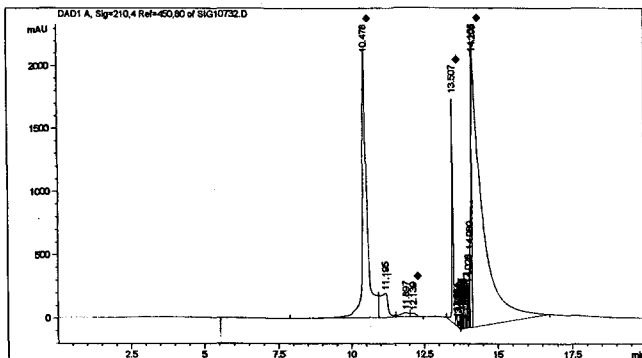
이 연구의 수행과정에서 균주의 관리 및 항균활성 검색에 많은 도움을 주신 제주대학교 오현정씨에게 감사드립니다.

**참고문헌**

1. Tanaka, Y. and Omura, S. (1990) Metabolism and products of actinomycetes-an introduction. *Actinomycetol.* **4**(1), 13-14.
2. Lechevalier, H. A. and Lechevalier, M. P. (1981) Introduction to the order actinomycetales, pp. 1915-1950. In "The prokaryotes" (ed. Starr, I. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, and H. G. Schlegel). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
3. Miyadoh, S. (1993) Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: A producing microorganism approach. *Actinomycetol.* **7**, 100-106.
4. Berdy, J. (1989) The discovery of new bioactive microbial metabolites : screening and identification, pp.3-25(27) in "Bioactive metabolites from microorganisms" (ed. Bushell, M. E. and U. Grafe) Progress in Industrial Microbiology.
5. Iwai, Y. and Takahashi, Y. (1992) Selection of microbial sources of bioactive compounds. pp.281-302. in "The Search for Bioactive Compounds from Microorganisms" (ed. Omura, S.). Springer Verlag, New York.
6. Lee, M. J., Lim, D. S., Lee, M. S., Yoon, W. H. and Kim, C. H. (1997) Characterization of *Streptomyces* sp. AMLK-135 producing anti-MRSA antibiotics. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**(6), 397-401.
7. Kim, J. B., Yi, D. H., Shin, W. S. and Koh, C. M. (1998) Antibacterial activity of antibiotic(K-681) from *Streptomyces* sp. 681 against *Staphylococcus aureus*. *J. Korean Soc. Microbiol.* **33**(1), 69-75.
8. Lechevalier, H. A. (1989) A practical guide to generic identification. pp.2344-2347. "In Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4" (ed. Williams, S., T. M. E. Sharpe and J. G. Holt) Williams and Wilkins. Baltimore.
9. Kim, C. J. (1997) Isolation and classification of actinomycetes useful for industry. *Bioindustry News* **10**(2), 34-43.
10. Kwon, O. S., Park, D. J., Lee, C. Y. and Kim, C. J. (1996) Distribution pattern of soil actinomycetes at Cheju Island. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**(4), 399-430.
11. El-Nakeeb, M. A. and Lechevalier, H. A. (1963) Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.* **11**, 75-77.
12. Küster, E. and Williams, S. T. (1964) Selection of media for isolation of streptomyces. *Nature(London)* **202**, 928-929.
13. Nonomura, H., and Ohara, Y. (1971) Distribution of actinomycetes in soil. IX. New species of genera *Microbispora*

**Table 5. Antimicrobial spectrum of the active compound produced by *Streptomyces* sp. BL106Ba**

Microorganisms tested	Zone of growth inhibition (mm)
<b>Gram negative bacteria</b>	
<i>Escherchia coli</i> ATCC 8749	25
<i>Escherchia coli</i> O 157:H7	25
<i>Alcaligenes feacalis</i> ATCC 8750	27
<i>Flavobacterium aquatile</i> ATCC 11947	17
<i>Pseudomonas solanacearum</i> ATCC 10692	20
<b>Gram positive bacteria</b>	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	22
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1023	23
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1024	24
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 9945a	24
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	18
<b>Yeast</b>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IAM 4512	12
<i>Saccharomyces rocei</i> IAM 4991	19
<i>Tollulopsis colliculosa</i> IAM 4426	18
<i>Candida albicans</i> KCCM 11282	0



**Fig. 3. Analysis of antibacterial compounds by HPLC. Mark (◆) indicates the fraction with antibacterial activity.**

- and *Microtetraspora* and their isolation method. *J. Ferment. Technol.* **49**(11), 904-912.
14. Benedict, R. G., Pridham, T. G., Lindenfelser, L. A., Hall, H. H. and Jackson, R. W. (1955) Further studies in the evaluation of carbohydrate utilization tests as aids in the differentiation of *species of streptomycetes*. *Appl. Microbiol.* **3**, 1-6.
  15. Williams, S. T. and Davies, F. L. (1965) Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J. Gen. Microbiol.* **38**, 251-261.
  16. Jacques F. and Acar, M. D. (1980) The disk susceptibility test. pp. 24-54. In "Antibiotics in Laboratory Medicine." Williams and Wilkins. Baltimore/London.
  17. Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C. and Winn Jr, W. C. (1992) Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 4th ed., pp. 628-630, J. B. Lippincott Company, Philadelphia.
  18. Shirling, E. B. and Gottlieb, D. (1966) Methods for Characterization of *Streptomyces* Species. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **16**, 313-340.
  19. Williams, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (1989) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4, Williams & Wilkins. 2299-2648.
  20. Williams, S. T., Goodfellow, M., Wellington, E. M. H., Vickers, J. C., Anderson, G., Sneath, P. H. A., Sackin, M. J. and Mortimer, A. M. (1983) A probability matrix for identification of some *Streptomyces*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1815-1830.
  21. Williams, S. T., Goodfellow, M., Anderson, G., Wellington, E. M. H., Sneath, P. H. A. and Sackin, M. (1983) Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1743-1813.
  22. Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H. A. (1970) Chemical composition as a criterion in the classification of other aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**, 435-443.
  23. Hasegawa, T., Takizawa, M. and Tanida, S. (1983) A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **29**, 319-322.
  24. Martin, J. P., Filip, Z. and Haider, K. (1976) Effect of montmorillonite and humate on growth and metabolic activity of some actinomycetes. *Soil Biol. Biochem.* **8**, 409-413.
  25. Nonomura, H., and Ohara, Y. (1971) Distribution of actinomycetes in soil. New genus and species of monosporic actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* **49**(11), 894-903.
  26. Flaig, W. and Kutzner, H. J. (1960) Beitrag zur okologie der gattung *Streptomyces* Waksman et Henrici. *Arch. Mikrobiol.* **35**, 207-228.
  27. Küster, E. (1976) Ecology and predominance of soil streptomycetes. pp.109-121. In "Actinomycetes-the boundary microorganisms"(ed. Arai, T.). Toppan Co. Ltd., Tokyo.
  28. Williams, S. T. (1982) Are antibiotics produced in soil? *Pedobiologia* **23**, 427-435.
  29. Kim, S. U. (1992) Fermentation processes of actinomycetes for screening new antibiotics. *The Microorganisms and Industry* **18**(3), 53-62.
  30. Kim, S. Y., Park, D. J., Kwon, O. S., Lim, C. Y., Kim, P. K., Lee, S. W. and Kim, C. J. (1996) Evaluation of antimicrobial activities of domestic actinomycete strains. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**(2), 166-172.
  31. Rothrock, C. S. and Gottlieb, D. (1984) Roles of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* Var. *geldanus* to *Rhizobium solani* in soil. *Can. J. Microbiol.* **30**, 1440-1447.

### Collection of Soil Actinomycetes from Cheju Island and Screening for their Antibacterial Activities

Wan-Seok Chung, Young Hwan Ko\* and Chang-Jin Kim<sup>1</sup>(*Department of Food Science and Engineering, College of Engineering, Cheju National University, Cheju, Chejudo 690-756, Korea; <sup>1</sup>Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P. O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea*)

**Abstract** : Soil actinomycetes of 703 strains were isolated from 25 sampling points in Cheju Island using 4 different media. Arginine glycerol salts agar containing soil extract was found to be the best medium for the isolation of soil actinomycetes. Soil samples from pasture land showed higher population and diversity of the actinomycetes than those from citrus field, forest, island, hill or valley. When the antibacterial activity of the 526 isolates was tested against three bacterial strains, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas solanacearum*, the frequency of the isolates with antibacterial activity varied much depending upon the media used for isolation and cultivation. BL106Ba, one of the 10 isolates that showed antibacterial activity against all the above 3 test strains, was chosen based upon the pH and heat stability of its antibacterial metabolites, and was identified as *Streptomyces* sp. based upon its cultural, morphological and physiological characteristics. The partially purified white crystalline substance obtained from the culture supernatant of BL106Ba through cation exchange chromatography(AG MP-50) and three times consecutive gel filtration(Sephadex G-10) showed high antimicrobial activity against gram positive and negative bacteria, but low activity against yeasts. The partially purified substance was found to contain at least four different compounds with antibacterial activity by both thin layer chromatography and high performance liquid chromatography.

Key words : Cheju Island, soil actinomycetes, antibacterial activity

\*Corresponding author