

항생물질 생산 토양 Actinomycetes 균주 선별과 항생물질 생산특성 조사

구양모 · 이윤영* · 정연숙 · 이영복 · 조영애 · 조희영 · 고영선 · 이창훈
서울대학교 약학과, *서울대학교 화학과

(Received May 29, 1991)

Selective Culture of Antibiotic Producing Soil Actinomycetes and Examination of Characteristics on Antibiotic Production

Yang Mo Goo, Youn Young Lee*, Youn Sook Chung, Young Bok Lee,
Young Ae Joe, Hee Yeong Cho, Young Sun Koh and Chang Hoon Lee
Department of Pharmacy Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
*Department of Chemistry Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—Selective culture of actinomycetes from soil microbes and their antibiotic producing characters by agar-disk method were examined. Some of the organisms which produced antibiotics on agar disk did not produce antibiotics in liquid culture. Further examination indicated that production of antibiotic was dependent on the composition of medium. Many streptomycetes produced antibacterial substances in tryptic soy broth but others produced antifungal antibiotics in V-8 broth. Production of antibacterial substances by *Streptomyces* sp. was also dependent on the medium composition.

Keywords □ Antibiotic screening, selective culture of actinomycetes, agar disk method, production of antibiotics.

항생물질은 미생물이 생성하는 2차대사물로서, 다른 미생물을 죽이거나 다른 미생물들의 성장을 억제하는 물질을 말한다. 지금까지 많은 종류의 항생물질들이 사용되어 왔는데 이들 항생물질에 내성을 갖는 병원성 미생물이 증가하고 있다. 따라서 기존 항생물질에 내성을 갖는 병원균에 의한 감염을 치료하기 위하여 새로운 구조의 항생물질의 개발이 요청되고 있다.

지금까지 보고된 항생물질의 대부분은 actinomycetes에 의하여 생성되었다. 토양으로부터 방선균을 선택적으로 선별하는 연구¹⁾들이 진행되어 왔는데 이들 중에 방선균만을 선택적으로 자라게 하는 배지에 대한 연구²⁾와 배지에 특정한 항생물질을 첨가하여 방선균을 선별해내는 연구³⁻⁵⁾ 등이 보고되었다. 또 nitrocellulose 여지를 사용하여 방선균을 분리하는 방법⁷⁾

등에 대한 연구보고가 있다.

방선균을 선별한 후에는 항생물질을 생성하는 균을 선택하는 과정과 특히 항생물질을 생성하는 능력이 뛰어난 균주를 찾는 과정이 뒤 따르게 된다. 선별된 토양균의 배양액에서 얻은 항생물질이 새로운 항생물질로서 항균스펙트럼이 넓은 물질이거나 또는 특정한 테스트 균주에 대해 탁월한 항균효력을 나타내면 항생물질의 대량생산이 중요하게 대두된다.

항생물질의 생성이 높은 배지선택은 항생물질을 생성하는 균주의 대량배양시 또는 항생물질의 대량생산시에 생산비용이 절감될 뿐만 아니라 초기에 새로 분리한 항생물질을 생성하는 균주에서 항생물질의 분리 및 구조연구 그리고 효능 또는 독성검사에 필요로 하는 항생물질을 쉽사리 확보할 수 있게 해준다.

본 연구에서는 토양에서 방선균을 선별하는 선별

배지에서 actinomycetes계 균주의 생장 및 선별특성과 본 연구원들이 개발한 V-8 아가 디스크 이용하여 검색한 항생물질 생산균주들의 검색 결과와 이들 균주를 상이한 배지에서 액체배양하여 얻은 배양액에 항생물질의 생성특성을 서로 비교하여 아가 디스크법⁸⁾에 의하여 항생물질을 생산하는 균주를 검색할 때 생겨나는 여러 문제점들에 대하여 조사하였다. 또한 항생물질 생산균주의 배지에 항생물질 생성특성의 변화를 조사하였다.

실험방법

실험일반— 실험에 사용한 L-arginine, L-asparagine은 Sigma회사의 제품이었으며, nutrient agar, yeast extract, beef extract 등은 Difco회사의 제품이었으며 기타의 시약은 특급 혹은 일급시약을 사용하였다. 항균효력 조사에는 Schleicher & Schuell 회사의 12.7 mm 직경의 항생물질 조사용 종이 디스크를 사용하였다. 항균효력 검사에는 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* IFO 3167, *Escherichia coli* ATCC 25722, *Pseudomonas aeruginosa* IFO 13738의 세균과 *Alternaria longipes* ATCC 15052를 사용하였다.

배지—No. 1 배지⁹⁾: Casein hydrolysate 0.25% ; beef extract powder 0.1% ; soybean flour 1% ; distillers solubles 0.2% ; corn steep liquor 0.5% ; glucose 2% ; NaCl 0.5% ; K₂HPO₄ 0.2%, CaCO₃ 1% ; deionized water. No. 2 배지¹⁰⁾: oat meal 4% ; meat extract 0.3% ; NaCl 0.3% ; Fe₂[SO₄]₃ 0.04% ; MnCl₂ 0.04% ; CaCO₃ 0.3% ; pH 7.0. No. 3 배지¹¹⁾: soluble starch 2% ; dry yeast 0.5% ; KH₂PO₄ 0.05% ; MgSO₄ 7H₂O 0.05% ; trace metal dry mixture 0.0088% {Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 6H₂O 42.0 mg ; MnSO₄ H₂O 15.5 mg ; ZnSO₄ 7H₂O 22.0 mg ; (NH₄)₆Mo₇O₂ 5H₂O 3.6 mg ; CuSO₄ 1.0 mg ; NH₄VO₃ 0.46 mg ; CoSO₄ 7H₂O 0.48 mg ; H₃BO₃ 0.57 mg ; NiSO₄ 6H₂O 0.45 mg ; CrK(SO₄)₂ 12H₂O 0.96 mg ; distilled water 100 ml} No. 4 배지¹²⁾: Glucose 4% ; Soluble starch 1% ; fish meal 1% ; CaCO₃ 1% 증류수. No. 5 배지 : dextrin 5% ; dry yeast 1% ; NaNH₄HPO₄ 1% ; KH₂PO₄ 0.05% ; KCl 1% ; CaCO₃ 0.5% ; pH 7.0.

토양 시료의 준비— 서울대학교 내에 다양한 곳에서

토양을 채취하여 토양시료 1에서 8까지 그리고 a에서 i까지 16개를 얻었다. 이들 시료를 바람이 잘 통하는 그늘에서 1주일간 펼쳐 말렸다. 토양 시료 1g 또는 시료 1g에 탄산칼슘을 100 mg 섞어 준 후에 시험관에 넣고 적절한 습도가 유지된 배양실 (25°C)에 1주일간 보관하여 두었다.

방선균의 선별— 본 연구에서는 방선균을 선별하기 위하여 신 Bennett 배지,⁶⁾ glycerol-arginine 배지,¹³⁾ oat meal-soil extract 배지,¹⁴⁾ soluble starch-casein 배지,¹⁴⁾ glycerol-asparagine 배지,²⁾ 비타민을 첨가한 soluble starch-casein-KNO₃ 배지를 사용하였다. 이들 평판배지에는 여과 멸균한 nystatin과 cycloheximide를 각각 100 unit/ml, 100 μ의 농도가 되도록 첨가하여 주었다. 토양시료(1g)에 멸균증류수 1 ml를 가하여 섞은 후에 상등액을 10배 희석하여 100 μ를 취하여 방선균 선별배지에 도말하였다. 신 Bennett 배지에 배양한 토양시료들은 pore크기가 0.45 μm인 nitrocellulose 여지를 배지표면에 얹고 여지위에 토양액을 도말하여 주었다. 이들 플레이트는 28°C에서 4일간 배양한 후 nitrocellulose 여지를 걷어내고 6일간 더 배양하였다. 그외 플레이트는 28°C에서 10일간 배양하였다. 배양이 끝난 후에 외관상 방선균으로 생각되는 콜로니의 수를 세었다. 이들 플레이트는 상온에서 1주일 간 더 보관하여 둔 후에 얻어지는 포자를 새로운 배양에 이용하였다.

항생물질을 생성하는 토양균의 선별— V-8 agar 배지¹⁵⁾를 borer로 뚫어 만든 아가 디스크에 선별배지에 자란 미생물 콜로니를 streaking하였다. 시료 1에서 시료 8까지 그리고 시료 11에서 18까지에서 선택한 콜로니는 12.5 mm 직경의 아가 디스크 5개에 시료 a에서 시료 i까지에서 선별한 콜로니는 6.3 mm 직경의 아가 디스크 5개에 streaking하여 28°C에서 10일간 배양하였다. 토양균을 배양한 아가 디스크를 검색균주가 함유되어 있는 영양아가(nutrient agar) 플레이트위에 또는 *A. longipes*가 함유되어 있는 TSB 한천 플레이트위에 얹어 16시간 배양한 후에 테스트 균주의 생장억제 영역의 직경을 측정하여 항생물질의 생산 여부를 확인하였다.

배지에 따른 항생물질 생성변화 조사— V-8 한천 디스크 방법으로 조사하였을 때 항생물질을 생성하는 균주로 확인된 균주들은 YSB, V-8 broth, No. 1 배지에서부터 No. 5 배지까지에 배양하여 항생물질의

Table I—The number of actinomycetes colonies grown on various selective agar media from various soil sources.

Soil no.	Media						Average
	Gl-Arg	O-S	S-C	Gl-Asp	SCN	VSCN	
1	319(192)	41(49)	772(529)	396(23)	640(707)	715(76)	481(263)
2	108(2)	249(3)	507(9)	208(12)	162(16)	138(14)	228(9)
3	13(6)	158(47)	205(45)	200(16)	120(37)	167(35)	144(31)
4	99(33)	149(13)	147(8)	339(39)	168(14)	206(29)	185(23)
5	17(8)	202(10)	166(10)	219(7)	307(33)	255(48)	194(22)
6	205(619)	37(110)	46(531)	21(213)	126(782)	133(736)	103(499)
7	33(125)	303(170)	271(328)	144(325)	169(241)	90(227)	169(236)
8	8(1)	274(39)	205(31)	334(35)	162(61)	180(23)	194(32)
Subtotal	1833	1869	3810	2531	3745	3072	
a	22	77	89	89	53	46	55
b	45	74	91	90	58	62	60
c	56	155	100	110	127	120	100
d	19	116	143	142	135	130	114
e	29	181	490	387	588	731	349
f	52	124	64	92	81	56	70
g	58	326	87	128	150	132	130
m	110	514	324	676	288	413	347
i	38	375	634	234	49	57	202
Subtotal	429	1942	2022	1948	1379	1747	
Total	2262	3811	5832	4479	5274	4819	

Gl-Arg: glycerol-arginine agar; O-S: oatmeal-soil extract agar; S-C: soluble starch-casein agar; SCN: soluble starch-casein-KNO₃ agar; VSCN: SCN supplemented with vitamin. The numbers in parenthesis are the colonies grown when the soils are treated with CaCO₃.

생성여부를 조사하였다.

실험결과 및 고찰

토양으로부터 방선균의 선별—7 종류의 선별배지에 25가지 토양시료를 도말하여 토양균을 배양한 후에 성장한 방선균의 콜로니 수를 센 후에 각 토양시료 별로 선별된 방선균 수를 비교한 결과 soluble-starch-casein 배지와 soluble starch-casein-KNO₃ 배지에서 방선균이 선별되는 비율이 높은 것으로 나타났다(Table I). 이들은 탄소원으로는 용해성 전분을, 질소원으로는 casein을 공통적으로 함유하고 있고 있다. 비타민을 첨가한 soluble starch-casein-KNO₃ 배지도 동일한 탄소원과 질소원을 가지며 이 성분이 방선균을 선별하는데 중요한 역할을 담당하리라 생각된다. 탄산칼슘을 처리하지 않은 시료 1에서 시료 8과 탄산칼슘을 처리한 시료 11에서 시료 18 사이에 방선균이 성장한 율을 비교하여 보면 두엄밀의 흙을 처리한

시료 16을 제외하고는 탄산칼슘을 처리한 나머지 시료에서 선별된 방선균 콜로니 수가 감소하는 경향이 보였다. 그러나 탄산칼슘을 처리한 시료에서는 수는 적지만 특정한 방선균이 선별되어 자라는 것이 관찰되었다.

배지위에 pore 크기가 0.45 μm인 nitrocellulose 여지를 얹고 그 위에 토양시료를 도말하여 배양하면, 방선균은 자라면서 hyphae가 되고 여지의 pore를 통과하여 배지에 뿌리를 내리게 되지만 일반 세균은 통과하지 못하므로 nitrocellulose 여지를 제거하고 배양하면 뿌리를 내린 방선균만이 선택되어 콜로니를 형성하므로 방선균을 선별하였다는 보고가 있었다. 본 연구에서 이 방법을 재현하려고 시도하였다. nitrocellulose 여지를 사용한 방선균의 선별은 성공하지 못했다. 이 방법에는 신 Bennett 배지를 사용하였는데 이 배지는 방선균을 선별하는데 부적합한 것으로 생각되었다. 이 배지에 nitrocellulose 여지를 얹지 않고 토양추출액을 도말하였을 때는 배양한 a에서 i까지의

Table II—The number of colonies producing antibiotics assayed by V-8 agar disk method.

Total no. of colonies	Antibiotic producing colonies (total 798 colonies)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. longipes</i>
1436	740	228	218	1	409

시료에서도 다른 배지에서 선별된 방선균 콜로니 수보다 신 Bennett 배지에서 선별된 방선균 콜로니 수가 현저하게 작았다.

*Actinomycetes*는 두엄(시료 6)이나 두엄을 쌓아둔 곳의 토양(시료 1)에서 많이 발견되었다. Table I의 팔호내의 값이 동일한 토양을 탄산칼슘으로 처리한 토양에서 분리된 *actinomycetes*의 콜로니 수를 나타내는데 두엄이나 두엄밑의 토양을 탄산칼슘을 처리하여 주었을 때 특히 많은 *actinomycetes*가 생장하는 것이 관찰되었다. 나무 밑이나 나무가 서있는 야산, 언덕 등의 건조한 토양인 시료 e와 h에서 많은 수의 *actinomycetes*의 콜로니가 관찰되고 있다. 토양에 따라 상이한 선별배지에서 *actinomycetes*가 많이 분리되는 것이 관찰되고 있는데 이는 아마 토양의 성분과 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다.

항생물질을 생성하는 토양균의 선별—항생물질을 선별하는 토양균의 스크리닝을 위하여 순수배양과 항균효력 조사를 동시에 수행할 수 있는 아가 디스크 방법을 이용하였다. 시료 1에서 시료 8, 그리고 시료 11에서 시료 18을 키운 선별배지에서는 910개의 콜로니를 시료 a에서 시료 i를 키운 선별배지에서는 526개의 콜로니를 선택하여 아가 디스크에 streaking하여 배양한 후에 각 테스트 균주에 대한 항균효력을 조사하였다.

조사한 1436개의 콜로니 중에서 다섯 테스트 균주의 어느 한 균주에라도 항균효력을 나타낸 것은 모두 798개였다(Table II). 항균효력이 박테리아류에는 결여되어 있으면서도 강한 항진균성 활성을 소유한 항생물질을 생성하는 다수의 토양균들이 분리되었다. 이 중 *B. subtilis*에 대한 항균효력을 나타내는 균주는 *B. subtilis*에만 항균효력을 나타내거나 다른 G(-) 또는 fungi에도 항균효력을 보였고 *B. subtilis*에 항균효력이 없으면서 다른 검색균주에 항균활성을 보이는 균주는 거의 없었다. 1436개의 검색한 토양균주를 아가 디스크로 *antipseudomonas* 활성을 조사하였을 때 1개의 균주만이 *antipseudomonas* 활성을 보였는데 항생물질을 생성하는 균주를 액체 배양하

Table III—Class of the antibiotic producing soil isolates

Eubacteria	Actinomycetes	Fungi
68	669	3

였을 때 훨씬 많은 수의 균주들이 배양액에 *antipseudomonas* 활성을 갖는 항생물질을 생성하는 것이 관찰되었다. 아가 디스크법에 의한 항생물질 생성균주가 생성하는 항생물질이 *antipseudomonas* 활성을 갖는 항생물질인지 여부를 판별하는 것을 부적절하다고 생각되었다. 항생물질을 생성하는 균주들 중에 G(-) 균주인 *E. coli*나 *P. vulgaris*에 항균효력을 보이는 항생물질을 생성하는 균주는 전체의 약 30%이었고 거의 50%가 항진균 활성을 보였다.

배지에 따른 항생물질 생성변화—아가 디스크 방법으로 조사하였을 때 항균효력을 보이는 798개의 균주를 TSB에 배양하여 종이 디스크법으로 다섯 검색균주에 대하여 항균효력을 조사하였을 때 배양액에 항생물질을 생성하는 균주는 141개에 불과하였다. 또한 배양액에 항생물질을 생성하는 141개의 균주들 중에 V-8 아가 디스크 방법으로 조사하였을 때는 *antifungus* 활성을 소유한 항생물질을 생성하는 많은 수의 항생물질 생성균주들이 TSB에 배양하였을 때 항진균 활성을 소유한 항생물질을 생성하지 않아 배양액으로 항균효력을 조사하였을 때 항생물질이 생성되지 않은 것으로 나타났다. 이 원인을 규명하기 위하여 40개의 대표적인 균주를 선택하여 항생물질의 생성에 미치는 여러 요인을 조사하여 보았다.

40개의 토양균주를 TSB와 V-8 broth에 접종하여 배양한 후에 각 배양액에 생성된 항생물질의 항균효력을 종이 디스크 확산법으로 조사하여 Table III에 보인 결과를 얻었다. TSB 배지에서는 방선균으로 보이는 토양균들이 *Ps. aeruginosa*에 활성을 갖는 항생물질을 주로 생성하며 V-8 broth에서는 방선균이 아닌 토양세균들이 *A. longipes*에 항진균활성을 소유한 항생물질을 생성함을 관찰할 수 있었다(Table IV). TSB에서 항균효력을 나타낸 토양균들 중에 방선균

Table IV—Comparison of antibiotic activities obtained by agar disk method with those obtained from the broth cultures (TSB or V-8)*

Soil isolates	V-8 agar (broth)					Tryptic Soy Broth				
	B	E	P	Pr	A	B	E	P	Pr	A
8810-1(S)	22(16)	14(15)	-(-)	16(15)	13(-)	16	18	13	15	-
8810-3(B)	19(26)	20(15)	-(-)	-(15)	27(7)	-	-	-	-	-
8810-5(S)	20(15)	17(-)	-(-)	18(-)	-(-)	-	-	-	-	-
8810-6(S)	16(15)	17(16)	-(-)	17(16)	-(-)	16	18	13	16	-
8810-7(B)	21(-)	18(-)	-(-)	17(-)	-(-)	14	15	-	13	-
8810-8(B)	17(19)	15(-)	-(-)	26(1-)	13(9)	-	-	-	-	-
8810-9(B)	19(18)	-(-)	-(-)	25(-)	14(7)	-	-	-	-	-
8810-11(B)	15(18)	14(-)	-(-)	-(-)	11(8)	-	-	-	-	6
8810-17(B)	17(-)	13(-)	-(-)	14(-)	11(-)	15	16	13	14	-
8810-19(S)	15(18)	15(-)	-(-)	24(-)	16(8)	-	-	-	-	-
8810-29(S)	16(15)	-(-)	-(1-)	-(-)	12(-)	-	-	-	-	-
8810-31(S)	23(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	16	17	13	15	-
8810-32(S)	21(-)	17(-)	-(-)	-(-)	-(-)	15	16	13	14	-
8810-33(S)	21(16)	17(15)	-(-)	-(-)	18(-)	-	-	-	-	-
8810-36(S)	22(18)	-(16)	-(-)	15(-)	12(-)	-	-	-	-	-
8810-43(S)	21(17)	12(15)	-(-)	15(-)	12(-)	16	17	13	15	-
8810-50(S)	30(28)	13(-)	-(-)	-(-)	21(-)	-	-	-	-	-
8810-52(B)	17(27)	-(-)	-(-)	-(-)	20(-)	-	-	-	-	-
8810-56(S)	20(15)	14(-)	-(-)	16(-)	12(-)	16	17	13	15	-
8810-57(B)	31(28)	15(-)	-(-)	-(-)	25(7)	-	-	-	-	-
8810-66(S)	21(16)	17(14)	-(-)	17(-)	13(-)	16	18	14	16	-
8810-68(S)	24(16)	18(16)	-(-)	17(16)	-(-)	16	18	14	16	-
8810-73(B)	35(26)	11(-)	-(-)	17(-)	21(8)	-	-	-	-	-
8810-76(B)	24(17)	12(14)	-(-)	15(-)	11(-)	16	17	13	16	-
8810-79(S)	20(16)	-(14)	-(-)	15(-)	-(-)	16	18	14	16	-
8810-81(B)	14(26)	-(-)	-(-)	-(-)	20(-)	-	-	-	-	-
8810-84(B)	22(23)	20(-)	-(-)	-(-)	16(9)	-	-	-	-	-
8810-86(B)	16(23)	-(-)	-(-)	-(-)	18(-)	-	-	-	-	-
8810-97(S)	14(15)	14(-)	-(-)	-(-)	-(-)	16	16	16	16	-
8810-99(S)	17(26)	17(-)	-(-)	20(-)	17(7)	-	-	-	-	-
8810-103(B)	25(20)	-(-)	-(-)	20(-)	15(7)	-	-	-	-	-
8810-104(B)	31(27)	12(-)	-(-)	16(-)	20(8)	-	-	-	-	-

The inhibition diameter against B(*B. subtilis*), E(*E. coli*), P(*Pseudomonas aeruginosa*) and Pr(*Proteus vulgaris*) was obtained with 1.25 mm paper disks by applying 100 μl of the broth. But the data given in A(*Aspergillus longipes*, column was obtained with 6.12 mm diameter paper disks by applying 30 μl of the sample.

으로 보이는 20종의 토양균을 선택하여 조성을 달리 하는 임의로 선택한 6개의 조사배지에 접종하여 배양하였을 때 Table V에 보이고 있는 결과를 얻었다.

이 결과를 살펴보면 TSB에서는 거의 모든 균이 항생물질을 생성하였으나 No. 1배지와 No. 5 배지를 제외한 조사 배지에서는 일부 토양균들이 항생물질을 생성하지 않았다. No. 1 배지의 탄소원을 glucose였고

No. 5의 탄소원은 dextrin이었다. TSB에서 배양하였을 때 보다 항생물질을 생성하는 균주의 수가 줄어든 No. 3 배지에 탄소원을 soluble starch이고 질소원은 yeast인데 이 배지는 방선균이 항생물질의 생성이 낮은 것으로 나타났다. 항생물질 생산균주의 선별적인 분리와 함께 적절한 배지의 선별이 항생물질의 생산에 중요하다는 것이 본 연구 결과에서 보이고 있다. 항

Table V—Bacterial group producing antibiotics in TSB and V-8 broths

	B	E	P	Pr	A
(total)	13	13	12	13	1
TSB (streptomycetes)	12	12	12	12	0
(eubacteria)	1	1	0	1	1
(Total)	28	10	0	4	12
V-8B (streptomycetes)	14	10	0	4	3
(eubacteria)	11	0	0	0	9

생물질을 생성하는 균주에서 항생물질의 생성특성은 배양방법에 따라, 그리고 배지조성에 따라 크게 변화되는 형질임이 관찰되고 있고 아가 표면에 배양할 때 더 많은 균주들이 항생물질을 생성하는 것으로 관찰되고 있는데 이의 원인은 현재 밝혀지지 않고 있다. 균주가 자라지 않은 아가 자체는 항균효력이 전혀 없었고 아가에서 항생성분을 추출할 수 있는 것을 밝혀졌다.

감사의 말씀

이 논문은 1990년도 문교부지원 한국학술진흥재단

의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구됨

문헌

- 1) Williams, S.T. and Vickers, J.C.: Detection of actinomycetes in the natural environment-problems and perspectives, in *Biology of Actinomycetes* '88 eds Y. Okami, T. Beppu, H. Ogawara, Japan Scientific Societies Press Tokyo, Tokyo pp. 265-270 (1988).
- 2) Kuster, E. and Williams, S.T.: Selection of media for isolation of Streptomycetes. *Nature* **202**, 928 (1964).
- 3) Corke, C.T. and Chase, F.E.: The selective enumeration of actinomycetes in the presence of large numbers of fungi. *Can. J. Microbiol.*, **1**, 12(1956).
- 4) Crook, P., Carpenter, C.C. and Klens, P.F.: The use of sodium propionate in isolating actinomycetes from soil. *Science* **112**, 656(1950).
- 5) Nonomura, H. and Hayakawa, M.: New methods for the selective isolation of soil actinomycetes, in *Biology of Actinomycetes* '88 eds Y. Okami, T.

Table VI—Production of antibiotics by *Streptomyces* sp in different broth (tested against *B. subtilis*)

	TBS	V-8	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
8810-1	17	16	27	20	—	15	16
8810-6	17	15	17	20	19	15	22
8810-7	15	—	14	—	17	15	—
8810-17	16	—	14	15	—	—	14
8810-22	15	—	13	—	13	—	13
8810-31	17	—	18	21	—	17	15
8810-32	16	16	12	13	—	13	13
8810-43	17	18	28	22	15	14	16
8810-56	17	15	23	26	22	19	22
8810-66	17	16	16	24	14	19	14
8810-68	17	—	28	24	14	—	16
8810-76	17	16	17	22	19	16	15
8810-79	17	16	25	14	—	16	13
8810-97	17	16	26	16	—	16	16
8810-195	18	17	13	—	—	14	20
8810-199	22	17	18	—	13	18	18
8810-201	23	16	14	—	—	16	18
8810-205	20	16	17	—	—	—	21
8810-227	17	14	17	—	—	—	30
8810-237	—	—	—	—	—	—	—
Total	19	15	19	12	9	15	18

- Beppu, H. Ogawara, Japan Scientific Societies Press Tokyo, Tokyo, pp. 288-293(1988).
- 6) Hirsch, C.F. and Christensen, D.L.: Novel Method for selective isolation of actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 925(1983).
 - 7) El-Nakeeb, M.A. and Lechevalier, H.A.: Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.* **11**, 75(1963).
 - 8) 구양모, 이윤영, 조영애, 이영복, 정원윤, 이창훈, 고영선, 조희영, 정연숙: 항생물질을 생산하는 토양균의 대량검색을 위한 새로운 방법. *약학회지* **35**, (1991).
 - 9) Elson, A.L., Box, S.J. and Gilpin, M.L.: New quinone antibiotics of the granaticin type, isolated from *Streptomyces lateritus*. *J. Antibiot.* **41**, 570 (1988).
 - 10) Kawashima, A., Yoshimura, Y., Gota, J., Nakaike, S., Mizutani, T., Hanada, K. and Omura, S.: PI-083, a new platelet aggregation inhibitor. *J. Antibiot.* **41**, 1913(1988).
 - 11) Takahashi, I., Takahashi, K.I., M. Ichimura, Morimoto, M., Asano, K., Kawamoto, I., Tomita, F. and H. Nakano: Duocarmycin A, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces*. *J. Antibiot.* **41**, 1915(1988).
 - 12) Larsen, S.H., Boeck, L.D., Mertz, F.P., Paschal, J.W. and Occolowitz, J.L.: 16-Deethylindanomycin (A 83094A), a novel pyrrole-ether antibiotic produced by a strain of *Streptomyces setoni*, Taxonomy Fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.* **41**, 1170(1988).
 - 13) Benedict, R.G., Pridham, T.G., Lindenfelser, L.A., Hall, H.H. and Jackson, R.W.: Further studies in the evaluation of carbohydrate utilization tests as aids in the differentiation of species of *streptomyces*. *Appl. Microbiol.* **3**, 1(1955).
 - 14) Waksman, S.A.: *The Actinomycetes* II, Williams and Wilkins, Baltimore (1961).
 - 15) Hara, O. and Beppu, T.: Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus*: the role of A-factor. *J. Antibiotics* **35**, 34(1982).