

## 토양에서 분리한 방선균의 항균력 및 암세포주 성장 억제능

한진호 · 김승철 · 장영수 · 염 곤

단국대학교 자연대학 미생물학과

(Received July 13, 1993)

### Antimicrobial activity and tumor cell growth inhibition of an Actinomycete isolated from Korean soil

Jin-Ho Han, Seung-Cheol Kim, Young-Soo Chang and Kon Ryeom

Department of Microbiology, College of Natural Science, Dankook University, Seoul, Korea

**Abstract**—An Actinomycetes strain JB isolated from Mt. Hanla had a strong antimicrobial activity against gram positive bacteria and tumor cell growth inhibition. Especially, it couldn't degrade starch and casein as organic compounds. It was resist on lincomycin and rifampicin. The spore mass of strain JB which was arethrospore was white. DAP of the cell wall was L,L-DAP. Antimicrobial material was heat stable, dissolved in ethyl acetate, and not dissolved in butanol. In the presence of 0.1% phenol and 4% sodium chloride, strain JB could grow, but it didn't growth at below 10°C. Strain JB didn't use dextran, sodium acetate and sodium citrate as sole carbon source and L-cystein and L-threonine as nitrogen source. The filtered broth of strain JB had the antimicrobial activity against gram positive bacteria, especially *Staphylococcus aureus* (ATCC 65389) and the growth inhibition of tumor cell line.

**Keywords** □ Actinomycete strain JB, *Staphylococcus aureus*, Tumor cell, L,L-DAP.

현대과학이 급속도로 발달된 요즘에도 여전히 해결되지 않은 문제중의 하나가 암이다. 암 발생은 지속적인 증가 추세에 있으며, 가장 높은 사망 원인으로 보고 되고 있다.<sup>1)</sup> 따라서 암 치료를 위한 다각적 연구가 진행되고 있으며, 보다 나은 항암 물질의 개발이 시급히 요망되고 있다.

항암 물질은 크게 합성 화합물과 천연화합물로 나눌 수 있는데 합성 화합물은 일반적으로 부작용이 강하며, 생체 방어에 중요한 역할을 하는 lymph세포등을 암세포 보다 강하게 파괴 시켜 다른 감염에 대한 저항성까지 약하게 한다. 상대적으로 천연화합물은 세포독성이 적은 반면에 종양세포에 대한 독성은 상대적으로 큰 것으로 보고 되고 있다.<sup>2)</sup> 종양세포 성장 억제 물질을 분비하는 가장 다양한 미생물은 주로

토양에 존재하며, 항암제로 사용 가능한 물질을 생산하는 미생물은 주로 방선균(*Streptomyces*)으로 보고 되고 있다.<sup>3)</sup> *Streptomyces*는 항암물질 뿐만 아니라 면역 상승물질과 같은 생리 활성 물질을 생산하며, *Streptomyces*를 이용한 종양 치료제의 개발은 1953년 일본에서 sarkomycin<sup>4)</sup>이 토양에서 분리된 *Streptomyces erythrochromogenes*의 배양액으로부터 분리 정제 되었으며, 최근 mitomycin<sup>5)</sup>, bleomycin, adriamycin 등이 각종 종양치료에 사용되고 있다.

방선균에서 유래된 종양세포 억제물질은 항균력이 있음이 보고되고 있으며, 그 중에서도 Gram 양성 세균에 매우 감수성이 있음이 보고되고 있다.<sup>6)</sup> 따라서 본 연구에서는 Gram 양성 세균에 대하여 항균력을 갖는 방선균을 분리하고 그 물질의 종양세포 증식억제능을 in vitro에서 측정하였으며, 선별된 균주의 특성을 밝히고자 하였다.

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

## 실험재료 및 방법

**방선균의 분리 및 시료의 채취**—충청남도 일대의 미경작지와 제주도 한라산 일대의 바위에서 시료를 채취하였다. 토양 시료는 지표로부터 약 10 cm 깊이에서, 바위시료는 긁어서 수집하였다.

채취한 시료 1 g을 건열 멸균기에서 100°C로 30분간 가열하고, 멸균된 증류수 10 ml에 현탁하여 교반한 후  $10^{-5}$ 까지 희석하였다. 그 중  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ 희석액을 yeast extract-malt extract(YEME)agar plate에 0.1 ml씩 도말한 후에 28°C가 유지되는 항온기에서 7.14 일 배양한 후 형태, 색소를 비교하였다. 그 중 동일하지 않은 것을 선정하여 사면 배지에 옮겨 일주일 배양한 후 냉장고(4°C)에 보관하면서 실험에 사용하였다.

**항균 물질 생산 균주 선별**—항균물질 생산균주의 선별을 위한 실험균으로는 세균 8종, 진균 3종을 사용하였으며, 세균 8종은 Gram 양성세균 4종 gram 음성세균 4종이었다.

Gram 양성세균으로는 *Bacillus subtilis*(ATCC 6633), *Bacillus cereus*(ATCC 11778), *Micrococcus luteus*(ATCC 9341), *Staphylococcus aureus*(ATCC 65389)이었으며, Gram 음성세균으로는 *Proteus* sp.(MB 838), *Escherichia coli*(ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa*(NCTC 10490), *Bordetella bronchiseptica*(ATCC 46176)와 진균으로 *Aspergillus niger*(ATCC 32656), *Candida albicans*(ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae*를 사용하였다.

토양시료로부터 분리된 방선균을 한 백금이 취해 100 ml 삼각 flask에 YEME broth 20 ml를 넣고 멸균한 후 접종하여 28°C가 유지되는 진탕 배양기에서 200 rpm으로 7일간 배양하였으며, 배양액을 원심분리하여 상등액을 취해 paper disk법으로 항균력을 조사하였다.

**항균물질 생산조건**—250 ml 삼각 flask에 YEME broth 50 ml를 넣고 선별균 spore( $10^5$ /ml)를 1%되게 접종하여 28°C, 200 rpm으로 7일간 진탕배양하였다. 하루에 하나씩 여과하여 균체의 무게와 배양여액의 *Staphylococcus aureus* ATCC 65389 (이하는 *Staphylococcus aureus*로 칭함)에 대한 항균력을 알아보았다. 균체무게는 80°C에서 18시간 건조 시킨 후 측정하였다.

생산균주의 항균물질 생산조건을 알아보기 위해 탄소원의 영향과 초기 pH의 영향을 알아보았다. 탄소원의 영향을 알기위해 YEME broth의 glucose 대신 sucrose, xylose, fructose, mannitol, lactose를 1%(v/v)되게 첨가하였다. 선별균 spore( $10^5$ /ml)를 1%(v/v)되게 접종한 후, 28°C 진탕 배양기에서 6일간 배양한 뒤 항균활성을 측정하였으며, 초기 pH는 YEME broth를 pH 2에서 pH 10까지 맞춘 다음 위와 같은 조건에서 7일간 배양한 후 항균 활성을 측정하였다.

**배양여액의 특성**—1차 선별된 방선균 배양여액의 특성을 알기 위하여 500 ml 삼각 flask에 YEME broth를 100 ml 넣고 멸균한 다음, spore solution( $10^5$ /ml)된 방선균을 1%(v/v)로 접종하고, 200 rpm으로 7일간 배양한 후, 항균물질의 균체외, 균체내 분포와 열에 대한 안정성, 유기용매 추출성 등을 조사하였다.

항균물질의 균체내, 균체외 존재의 확인은 배양액을 원심분리하여 상등액과 균체로 나누어서 조사하였다. 균체는 멸균된 증류수로 3번 세척한 후 70% acetone으로 18시간 교반 시킨뒤 감압 농축하여 균체 추출액을 얻었으며, 이렇게 하여 얻어진 배양액과 균체 추출액을 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균력을 조사하여 항균물질이 균체내에 존재하는지 균체외에 존재하는지 확인하였다.

열에 대한 안정성은 배양여액 5 ml를 시험관에 넣은 후 100°C에서 15분간 중탕하고 실온에서 식힌 후 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균력으로 조사하였으며, 배양여액 5 ml와 동량의 butanol, ethylacetate를 첨가하여 충분히 혼돈후 두층이 분리되도록 정지 시킨 다음 배양여액층과 유기용매층으로 분리시켜 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균력을 알아보았다.

**시료 부분정제**—선별 균주 배양여액 2 L를 동량의 ethylacetate로 추출 후 증류기에서 60°C로 감압 농축시켰다. 얻어진 농축액을 TLC plate(silica gel)에 ethylacetate : chloroform 2 : 1(v/v)전개 용매로 반복 작업을 실시하였다. 자외선 조명하에서 나타난 각 부위를 표시한 후, 이 부위를 각각 긁어 ethylacetate에 녹인후 재감압 농축하여 노란색 물질인 분획 I·II·III를 얻었다. 각 분획별로 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균력 측정을 실시하여 분획 I·II가 항균력이 있는 것으로 판정하였다.

**선별 분획의 MIC측정**—선별 분획 1 mg을 멸균된 D.W 1ml에 녹인 후 2배씩 연속 희석하여 각각의 희석액 40  $\mu$ l를 취하여 paper disk에 적신 후 건조시켜 *Staphylococcus aureus*에 대한 억제환의 유무를 알아 보았다.

**세포배양**—실험에 사용된 HEP 2와 HeLa, VERO E6 세포의 배양은 Eagle's Minimal Essential Medium(EMEM)에 fetal bovine serum(FBS)를 medium양의 10% 첨가하고 penicillin G(100 IU/ml), streptomycin(100  $\mu$ g/ml)를 넣어 37°C 에서 5% CO<sub>2</sub>가 유지되도록 하여 monolayer가 형성될 때까지 배양시킨 후 0.25% trypsin-EDTA solution를 처리하여 단일 세포로 부유 시키고, 1500 rpm으로 5분동안 원심분리한 후 phosphate buffer solution(PBS)으로 일회 세척한 후 새로운 배지로 부유시켜 사용하였다.

**암세포주 성장 억제능 측정**—배양여액 및 선별 분획의 암세포 성장 억제능 측정은 Camichael등의 methyltetrazolium bromide(MTT)검정법<sup>21,22)</sup>을 응용하여 사용하였다.

**선별 균주의 동정**—선별 균주의 동정을 위하여 형태학적 특성, 배양 및 생리학적 특성을 알아보았다. 동정 방법은 International Streptomyces Project(I.S.P)방법<sup>23)</sup>에 따랐다.

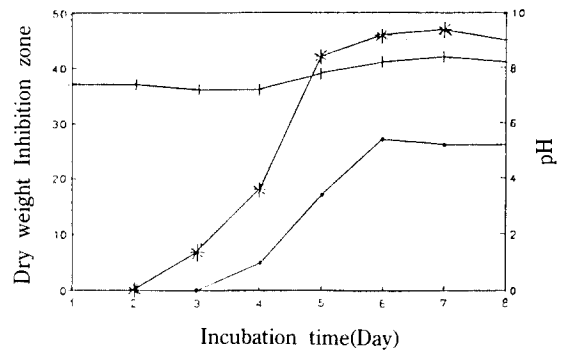
**결 과**

**항균물질 생산균주 선별**—충청남도 일대의 토양과 한라산 일대의 바위에서 약 300여점의 시료를 채취하였다. YEME를 1/2, 1/4, 1/8, 1/16까지 희석하여 medium을 만든 후 시료를 멸균된 증류수에 10<sup>-5</sup>까지 희석하여 도달하고 1주일 동안 배양하여 균사의 모양, 색깔, 용해색소 등을 비교하였다. 서로 다르다고 판단되는 것을 사면 배지에 옮기고 4°C 냉장고에 보관하여 사용하였다. 이렇게 하여 총 100여종의 방선균을 분리하였다. 항균물질 생산균주를 선별하기 위한 항균력 조사로 세균과 효모, 곰팡이에 항균력이 있는 17개 균주를 선별하였다. 그 중 Gram 양성 세균에 강한 항균력을 갖는 방선균인 JB균주를 최종 선별하였다. JB균주는 제주도 한라산 백록담에서 수집된 방선균으로서 특히 *Staphylococcus aureus*에 강한 항균력을 보였다(Table 1).

**Table 1**—Antimicrobial activity of culture filtrate of strain JB

Microorganism	Inhibition activity
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 65389)	+
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	+
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	+
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9341)	+
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i> (ATCC 4617)	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10490)	-
Proteus spp.(MB 838)	-
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 32656)	-
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-

+ : active - : inactive



**Fig. 1**—Production of antimicrobial agent and pH values of strain JB.

Inhibition zone(mm) pH Dry weight(mg)  
 ● HeLa, + HEP2, \* VERO E6

**항균물질 생산조건**—항균물질은 접종 후 약 4일째 부터 생산되기 시작하여 6일째 최고치인 27 mm의 억제환을 보였다. 균체 무게는 3일째 약 7 mg, 7일째 47 mg으로 최고치를 보였으며, 배양액의 pH 변화는 거의 없었다(Fig. 1).

항균물질 생산조건을 알아보기 위하여 탄소원을 다르게 첨가하였다. Hexose인 glucose에서 27 mm의 억제환을, pentose인 xylose에서 25 mm, disaccharides인 surcose에서 28 mm로 최대를 나타냈으며, pol-

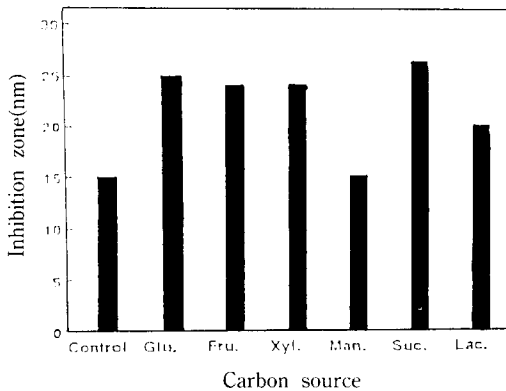


Fig. 2—Effect of carbon source(0.4%) on the production of antimicrobial agent from strain JB.

Glu. : Glucose Fru. : Fructose Xyl. : Xylose  
Man. : Mannose  
Suc. : Sucrose Lac. : Lactose

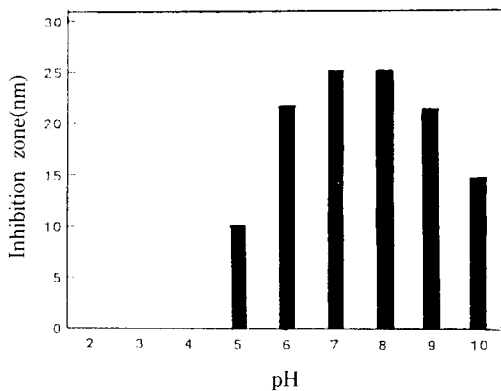


Fig. 3—Effect of initial pH on the production of antimicrobial agent from strain JB.

hydric alcohol인 mannitol에서 17 mm로 대조군과 유사하게 나타났다(Fig. 2).

초기 pH가 항균물질 생산에 미치는 영향을 알기 위해 YEME broth의 pH를 2에서 10까지 맞춘 후 배양한 결과 중성인 pH 7과 pH 8에서 27 mm로 가장 높게 나타났으며, pH 9에서 23 mm, pH 10에서 16 mm, pH 5에서 12 mm로 나타났으며, pH 2, 3, 4에서는 나타나지 않았다(Fig. 3).

**항균물질의 분리 및 MIC.**—JB균주 배양여액의 특징을 알기 위하여 항균물질의 균체외, 균체내 분포와 열에대한 안정성을 알아보았다. 항균물질은 균체외에서 27 mm로 나타났으며, 균체내에 20 mm로 나타났다(Table 2). JB균주가 생산하는 항균물질의 유기용매 추출성은 ethylacetate에 매우 잘 용해되었으며(25 mm), butanol에는 전혀 용해되지 않았다.(Table 3) Ethylacetate : chloroform(2 : 1)전개 용매상에서 항균물질은 Rf값이 0.63, 0.82에서 검출되었으며, 검출된 분획 I·II 1 mg씩을 1 ml의 증류수에 녹인 후 항균력을 본 결과 *Staphylococcus aureus*에서 15 mm(분획 I)와 10 mm(분획 II)의 억제환을 보였다. *Staphylococcus aureus*를 대상으로 MIC를 해본 결과 32  $\mu\text{g/ml}$ 의 값을 나타냈다(Table 4).

**암세포주 성장억제능**—배양여액의 암세포주 성장능은 배양여액 10<sup>1</sup>에서 HeLa는 2%의 생존율을 보였으며, HEP 2는 47%의 생존율을, VERO E6 cell 80%의 생존율을 보였다. 10<sup>2</sup> 희석액에서는 HeLa는 24%의 생존율을 HEP2와 VERO E6 cell은 각각 88%와 86%를 보여 거의 성장 저해를 받지 않았으며, HeLa cell line의 경우 배양여액 10<sup>-3</sup>까지 성장에

Table II—Test of properties for antimicrobial agent produced by JB

Microorganism	Broth filter	Mycelium extract	Thermostability (100°C, 15 min)
<i>Staphylococcus aureus</i>			
Inhibition zone(mm)	27	20	27

Table III—Solubility of extracted antimicrobial agent by JB

Microorganism	Butanol extraction		Ethylacetate	extraction
<i>Staphylococcus aureus</i>				
Inhibition zone	Butanol	Filtrate	Ethylacetate	Filtrate
	—	26	25	slight

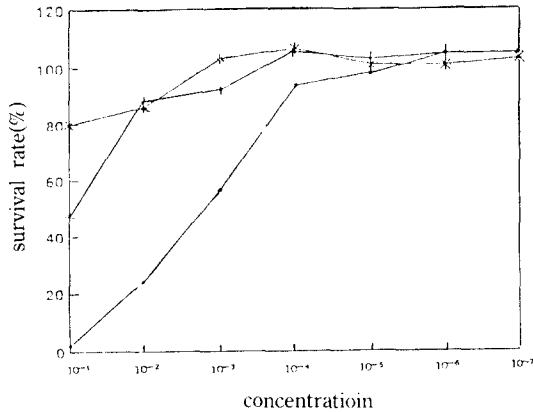


Fig. 4—The survival rate of HEP2, HeLa and VERO E6 cell in various culture medium concentration.

● HeLa, + HEP2, ← VERO E6

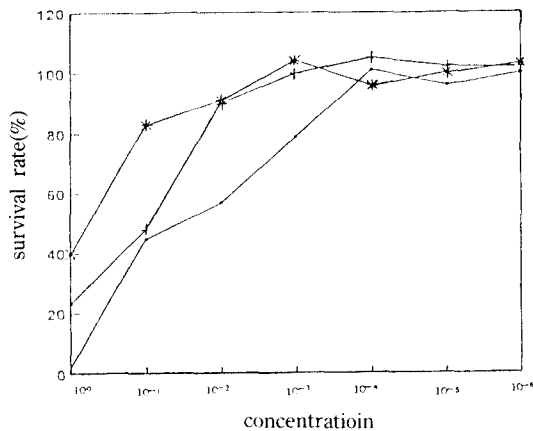


Fig. 5—The survival rate of HEP2, HeLa and VERO E6 cell in various concentration of partial-purified fraction.

● HeLa, + HEP2, ← VERO E6

억제를 받는 것으로 나타났다(Fig. 4). 선별분획의 암세포주 성장 억제능을 알아본 결과 4 µg일때 HeLa cell line에서는 2%의 생존율을 보였으며, HEP 2에서는 23%를 HeLa에서는 40%의 생존율을 보였다. 0.4 µg의 농도에서는 VERO E6는 83%의 생존율을 HEP 2에서는 48%, HeLa에서는 45%를 나타냈으며, 0.04 µg부터는 HEP 2와 VERO E6 cell은 각각 90%, 91%로 거의 정상적인 성장을 보였으며, HeLa는 0.004 µg까지도(77%)영향을 주는 것으로 나타났다(Fig. 5).

Table IV—MIC data of partial-purified fraction

Concentration(µg/ml)	1000	500	250	125	64	32	16	8	4	2
Microorganism										
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
- : non-inhibition + : inhibition zone										

Table V—IC<sub>50</sub> of the partial-purified fraction by the MTT assay

cell line	IC <sub>50</sub>
HEP 2	0.3583 µg
HeLa	0.1532 µg
VERO E6	2.3415 µg

선별분획의 Tumor cell line에 대한 IC<sub>50</sub>값은 HeLa는 0.1532 µg, HEP 2는 0.3585 µg, VERO E6는 2.3415 µg으로 나타났다(Table 5).

선별 균주의 형태학적 및 생화학적 특성—JB균주의 포자는 분실포자이고, 이들이 spore chain을 형성하며, spore mass의 색깔은 흰색이었고, substrate mycelium 색깔은 갈색 계열이었다.

Soluble pigment는 YEME medium에서 갈색계열이었으며, melanine은 형성하지 않았다. cell wall에는 L,L-DAP가 존재하며, phospholipid로는 phosphatidlytanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidylglycerol을 함유하고 있다. 성장최적 온도는 26~35°C이며, pH는 7~8로 중성으로 나타났다.

I.S.P. medium상에서 spore mass 색깔은 흰색 계열로 substrate mycelium은 갈색, 노란색 계열로 나타났다으며, soluble pigment는 YEME agar상에서 갈색 계열로 나타났다. JB균주의 organic compound 분해능을 조사한 결과 starch와 casein을 분해하지 못하였으며, adenine, guanine, tyrosin, gelatin, hypoxantin은 잘 분해하였다. JB균주의 항생제 내성 검사는 rifampicin과 lincomycin에는 내성을 가지며, pencillin, gentamycin, cephalordine, meomycin, streptomycin는 내성이 없었다. JB균주의 항균활성은 배양여액을 시료로 검사한 결과와 마찬가지로 Gram 양성 세균인 *Bacillus subtilis*와 *Micrococcus luteus*에만 억제력을 보였다. 온도와 pH 4, 3에서의 성장은 비교적 고온인 37°C와 47°C에서 성장하였으나 4°C, 10°C에서는 성장하지 못하였으며 pH 4, 3에서는 매우 잘

성장 하였다.

화학 저해제 첨가가 의한 JB균주의 성장은 phenol (0.1%)과 sodium chloride(4%)에서 성장하였으며, 다른 물질의 첨가시 성장하지 못하였다.

JB균주의 탄소원 이용성은 sorbose, dextran, sodium citrate는 negative control과 유사한 성장을 보였으며, D-mannose, D-galactose, D-xylose, D-fructose, cellobiose, trehalose는 positive control인 glucose와 유사한 성장을 보였으며, sucrose, L-rhamnose, L-arabinose, maltose, mannitol, raffinose, D-lactose, meso-inositol은 positive control과 negative control의 중간 정도의 성장을 보였다.

JB균주의 질소원 이용성은 L-phenylalanine, L-valine, potassium nitrate, L-arginine은 positive control인 L-proline, L-asparagine과 같은 성장을 L-serine, L-histidine, L-methionine은 positive control과 negative control의 중간 정도의 성장을 보였다.

## 고 찰

Streptomyces에서 생산되는 종양세포 성장 억제 물질로는 doxorubicin, daunorubicin 등이 있으며, 배양액으로부터 분리되어 임상에 사용되고 있다. 최근 Streptomyces외에 Actinomadura species에서도 새로운 항암 물질을 screening하였다라는 보고가 있다.<sup>9,10)</sup> 따라서 방선균으로 부터 새로운 종양세포 성장 억제 물질을 연구하는 것은 매우 유용하다. 기존에 개발된 항암 물질들은 대부분 핵산과 핵산 합성계에 작용하는 물질로 mitomycin, actinomycin등과 같이 DNA에 직접 작용을 하여 주형 활성을 잃게 하는 항생물질과 novobiocin과 같이 DNA 또는 RNA polymerase의 활성을 저해하는 항생물질 등이 있다. 이런 물질들은 종양 세포에 작용할 뿐만 아니라, 항균력도 함께 갖는 것으로 나타났다.<sup>11,12)</sup> 따라서 종양세포 성장억제 인자를 찾기 위한 전작업으로서 항균력을 갖는 방선균을 선별하는 것은 매우 유용하다. 본 실험에서도 Gram 양성 세균에 항균력을 갖는 JB균주를 선택하였다. 실험에서 분양받은 tumor cell line adherent cell line인 것을 착안하여 MTT assay방법을 사용하였다. 약제 노출시간<sup>14)</sup>은 종양세포 사멸 정도를 고려하여 최소 4일부터 최대 7일까지 노출시키며, 본 실험에서는 6일 동안 연속노출 시켰다. MTT assay방법에

의해 측정된 각각의 tumor cell line의 IC<sub>50</sub>값은 0.1532 µg, HEP 2는 0.3585 µg으로 나타났으며, 다른 보고서<sup>20)</sup>에 의하면 Human 유래 leukemia cell인 KI562 (ATCC CCL243)의 기존 항암 물질에 대한 IC<sub>50</sub>값은 oxorubicin에서 0.003 µg, bleomycin에서 0.1 µg, 5-FU에서 0.02 µg, mitomycin에 대해서는 0.03 µg으로 나타났으며, 일반적으로 tumor cell에 doxorubicin의 IC<sub>50</sub>값은 0.001~1 µg사이에 있는 것으로 보고되었다.<sup>15)</sup>

이는 본 실험의 부분 정제된 분획에서 보인 IC<sub>50</sub>값보다 낮게 나타났으나, 실험에 사용된 종양 세포주의 유래가 다르고, 활성을 갖는 분획이 완벽하게 정제 되지 않았으며, 측정 방법에서 다소의 차이가 있으므로 정확한 비교는 어렵다고 사료된다. 그러나 양성 대조 세포주의 사용된 VERO E6 cell에서의 IC<sub>50</sub>값보다는 tumor cell line인 HeLa, HEP 2에서 IC<sub>50</sub>값이 낮게 나타난 것으로 보아, normal cell line보다 tumor cell line에 큰 세포 독성을 보인 것으로 나타났다.

선별균주의 동정은 I.S.P<sup>23)</sup> 동정법과 Bergy's manual<sup>24)</sup>에 따라서 동정하였다. 분리된 JB균주는 cell wall의 DAP가 L,L-DAP로 구성되고, phospholipid에 phosphatidylethanolamine이 함유되어 Streptomyces와 유사하다. 항균활성과 chemical inhibitor의 첨가시 growth되는 성상, carbon source로 dextran을 이용하지 못하는 점과 형태학적 특성이 *Streptomyces exfoliatus*와 유사하나 mannitol을 전혀 이용하지 못하는 점과 melanin색소의 형성등이 다소 차이점을 보인다.

따라서 정확한 균의 동정을 위한 실험과 배양여액 성분중 활성성분만을 순수 분리한 후 in vivo실험을 통하여 생체내 활성을 알아보는 실험이 요구된다.

## 결 론

한라산 백록담으로부터 Gram양성 세균에 강한 항균력을 갖는 방선균을 분리하였다. 그중 가장 항균력이 좋은 JB균주를 선별한 후, 배양 여액의 항균활성 및 암 세포주 성장 억제능을 알아보았으며, 균주의 특성을 밝혔다.

1. JB균주의 배양여액을 Gram 양성세균에 항균력을 보이며, 특히 *Staphylococcus aureus*에 강한 항균

력을 갖았고, tumor cell line인 HEP 2와 HeLa의 성장을 저해시키며, normal cell line인 VERO E6에서는 보다 적은 성장저해 효과를 나타내었다.

2. JB균주는 spore mass가 white이고, 분절 포자를 가지며, yeast extract-malt extract agar에서 brown 계열의 색소를 내었으며, cell wall의 DAP는 L,L-form이었다.

3. Organic compounds의 분해에서는 starch와 casein을 분해하지 못했으며, antibiotic resistant test에서는 lincomycin과 rifampicin에 내성을 가졌으며, chemical inhibitor의 존재하에서 성장은 phenol(0.1%)과 sodium chloride(4%)존재하에서 성장하였으며, 온도가 4°C와 10°C의 지온에서는 성장하지 못했다.

4. 탄소원 이용 시험에서 dextran, sodium acetate, sodium citrate는 전혀 이용하지 못하였으며, 다른 탄원소들은 잘 이용하였다. 질소원 이용 시험에서는 L-cystein과 L-threonine만을 이용하지 못하였다.

### 참고문헌

- 1) 보건사회부, 1989. 한국인 암 등록 조사 자료 분석 보고서 (1982.7.1-1987. 6. 30). 대한 암 학회지. **21**(1) : 151-216.
- 2) Suffness, M.D., 1981. Discovery of antitumor agents from natural source. Trends. Pharm. Sci. **2** : 307-310.
- 3) Hanka, L.J., D.G. Martin, and G.L. Neil, 1978. In vitro methods used in detection and quantitation of antitumor drug produced by microbial fermentations. J. Nat. Prod. **41** : 85-90.
- 4) Umezawa, H., 1953. Sarkcomysin, an antitumor antibiotics factors produced by Streptomyces. J. Antibiotics A-6 : 101-105.
- 5) Hada, T. and Y. Sano, 1956. Mitomycin a new antibiotic from Streptomyces. J. Antibiotics **9** : 141-146.
- 6) Suffness, M. and J.D. douros, 1981. Discovery of antitumor agent from natural sources. Treds. Rharm. Sci. **2** : 307-310.
- 7) Lancini, G. and F. Parenti, 1982. Antibiotics. Spring-Verlag, pp. 3-4.
- 8) Hutchison, C.R., 1989. Drug discovery and development through the genetic engineering of antibiotic producing microorganisms. J. Med. **32** : 936-937.
- 9) Sumio, K., 1985. New antitumor antibiotic FR-10 0405 and FR-900406. J. Antibiotics **38** : 840-848.
- 10) Bunge, R.H., 1984. PD 114759 and PD 115028, novel antitumor antibiotics with phenomenal potency. Isolation and characterization. J. Antibiotics **37** : 1566-1571.
- 11) Hara, M., Yoshida, and H. Nakano, 1990. Covalent modification and single-strand scission of a new antitumor antibiotic Kapurimycin A3. Biochemistry **29** : 10449-10455.
- 12) 정동효, 항생물질. 고려의학, pp. 169-193.
- 13) Wright, J.C., 1957. Investigation of the relation between clinical and tissue response to chemotherapeutic agent human cancer. J. Med. **257** : 1207-1209.
- 14) Fass, L. and A. Fefer, 1972. The application of an in vitro cytotoxicity test to studies of the effects of drugs on the cellular immune response in mice. J. Immunol. **109** : 749-752.
- 15) Carmichael, J., W.G. degraft, A.F. Gazar, J.D. Minna, and J.B. Mitchell, 1987. evaluation of a tetrazolium-base semiautomated colorimetric assay. Cancer Res. **47** : 939-942.
- 16) Edward, B.C., James, S. John, J. Donna, and M. Robert, 1981. Association between human tumor colony-forming assay results and response of an individual patients tumor to chemotherapy. J. Med. **70** : 1027-1032.
- 17) Alley, M.C. and M.M. Lieber, 1984. Imporved optical detection of colony enlargement and drug cytotoxicity in primary soft agar cultures of human solid tumor cells, Br. J. Cancer **49** : 225-233.
- 18) Bertoncetto, I., T.R. Bradley, J.J. Campbell. A.J. Day, T.A. Macdonald, G.R. Mcleish, M.A. Quinn, R. Rome, and G.S. Hodgson, 1982, Limitation of the clonal agar assay for the assessment of primary human ovarian tumor biopsies. Br. J. Cancer **45** : 803-811.
- 19) Vonhoff, D.D., J. Casper. E. Bradley, J.M. Trent, A. Hodach, C. Reichert, R. Makuch, and A. Altman. 1980. Direct cloning of human neuroblastma cell in soft agar culture. Cancer Res. **40** : 3591-3597.
- 20) Regina, L. R. and N.H. Russell, 1987. Semiautomated colorimetric assay for in vitro screening of an-

- ticancer compounds. *Cancer Trent. Reports* **12** : 1141-1149.
- 21) Carmichael, J., J.G. Park, B.S. Kramer, S.M. Steinberg, J.D. Minna, and A.F. Gazdar, 1987. Chemose-nsitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium based colorimetric assay. *Cancer Res.* **47** : 5875-5879.
- 22) Memillan, T.J. and P. patricia, 1990. Use of the tetrazolium assay in measuring the response of human tumor cells to ionzing radiation. *Cacer Res.* **50** : 1392-1396.
- 23) Shirling, E.B. and D. Gottlieb, 1966. Method for characterization of Streptomyces. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16** : 313-340.
- 24) Williams, S.T., J.G. Holt, and M. Elisabeth Sharpe, 1989. *Bergey's manual of systematic Bacteriology* **4** : 2351-2492.