

토양에서 분리한 방선균의 세포 독성에 관한 연구

박준구 · 최병돈 · 김승철 · 엄 곤

단국대학교 자연과학대학 미생물학과

Study of Cytotoxicity of an *Actinomycete* Isolated in Korea

Joonkoo Park, Bounghdon Choi, Seungcheol Kim and Kon Ryeom

Department of Microbiology, College of Natural Science,
Dankook University

ABSTRACT

An Actinomycete strain isolated from Mt. Dea-Dun had a strong antifungal activity. The culture broth produced by isolated strain showed only antifungal activity against fungi with the exception of yeast and bacteria. It was heat stable, dissolved in ethylacetate. The concentrated antifungal agent showed cytotoxicity against HEP-2 and HeLa as tumor cell line, and showed weak cytotoxicity against VERO E6 as normal cell line. Morphological and physiological characteristics were tested with isolated strain. The spore color of isolated strain was gray. It had a short chain and produced brown colored lytic substance in yeast extract-malt agar. The cell wall of isolated strain was composed of meso-DAP, and we suggested it as genus *Actinomadura*. In the existing of chemical inhibitor, isolated strain grew on the condition of 0.0001% crystal violet, 0.1% phenol, 0.01% sodium azide and 10% sodium chloride. Carbon utilization of isolated strain was shown that glucose, sucrose, manitol and sodium citrate were well utilized.

서 론

미국의 미생물학자 Waksman¹⁾에 의해 미생물들 중 방선균이 항생물질을 가장 많이 생산한다는 사실이 밝혀진 이후로 항생물질을 얻고자 하는 연구가 활발히 이루어져 의학용, 농업용, 식품용에 걸쳐 개발이 활발히 이루어져 왔다.

특히, 의학분야에서는 방선균의 대사산물을 이용하여 악성종양을 치료하는데 모든 노력을 경주하고 있다. 이 경우, 국소요법의 보조약물로서 사용되는 항암화학물질들은 종양세포에만 선택적으로 작용하지 않고, 암의 종류에 따라 약물의 종양세포독성능의 정도도 매우 다르므로 이러한 문제점을 해결하기 위한 수단으로 세균의 대사산물에 그 기대를 걸고 있는 실정이다. 일반적으로 천연화학물들은

합성화합물에 비하여 정상세포에 대한 독성이 작으며 종양세포에 대한 독성은 상대적으로 크게 나타난다고 보고되어 왔고^{2,3,4)} 천연화합물 중 토양에서 분리된 방선균의 배양액은 매우 효과적이며 다양한 종양세포 성장억제능을 함유하고 있어서^{5,6)} 이들 중 일부는 현재 종양치료에 유용하게 사용하고 있다. 국내에서도 새로운 항생물질과 항암물질을 찾고자 하는 많은 연구⁷⁾가 활발히 진행되고 있으나 아직 미비한 상태이다. 따라서 본 논문은 국내에서 분리한 방선균 중 항진균활성을 갖는 균주를 선택하여 종양세포 독성능을 알아보려고 하였다.

실험재료 및 방법

균주의 분리—충청남도 일대의 장소와 대둔산의 바위 10여곳에서 시료를 수집하였다. 채취한 시료는 100°C에서 30분간 가열처리하였다. 처리한 시료는 멸균된 증류수로 진탕-교반 후에 상등액을 10⁶배까지 희석하여 Yeast extract-malt extract (YEME) agar와 YEME agar 조성을 1/2로 한 분리용 배지에 도말하였다. 배지를 28°C 항온기에서 약 7일간 배양하여 4°C 냉장고에 보관하면서 시료로 사용하였다⁸⁾.

항균활성 측정—미생물에 대한 배양액의 항균활성 측정은 Gram positive 4균주인 *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Staphylococcus aureus* (ATCC 65389)와 Gram negative 4균주인 *Proteus sp.* (MB 838), *E. coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 10490), *Bordetella bronchiseptica* (ATCC 4617), 그리고 fungi 7균주인 *Aspergillus niger* (ATCC 32656), *Penicillium chrysogenum* (ATCC 1002), *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus flavus*, *Neurospora crassa*, *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccaromyces cerevisiae*를 사용하였다.

항생물질의 활성 측정은 paper disk법을 사용하였는데 시료액 40 μ l를 직경 8mm paper disk

(Toyo Roshi Kaisha, Ltd.)에 흡수시켜 건조 후 각 배지에 올려놓고 관찰하였다. 세균은 37°C에서 1일 배양 후에, 진균과 효모는 2일 배양 후에 paper disk 주위에 억제환의 직경을 측정 (mm)하여 그 항균활성을 나타내었다.

선별균주의 배양—선별균주가 생산하는 항진균물질의 최대 생산 시기를 위한 배양을 하였다. 여기에 사용한 배지는 yeast extract 2g, malt extract 5g, glucose 2g, D.W 1L (pH 7.0)을 사용하였다.

대사산물의 특성—대사산물의 용해성을 알아보기 위해 ethyl acetate, butanol에 녹여 항진균 활성을 측정하여 보았다.

탄소원의 영향을 알아보기 위해 YEME broth에서 carbon source인 glucose 대신 동일한 양으로 5탄당인 arabinose와 xylose, 6탄당인 glucose와 mannitol, 다당류인 cellobiose와 raffinose를 각각 0.4%씩 첨가하여 7일간 배양 후에 항진균 활성을 측정하였다. 대조군은 당을 첨가하지 않은 배양액을 사용하였다.

세포 독성능 측정 세포주—실험에 사용한 세포는 국립보건원에서 분양받은 human epidermoid carcinoma인 HEP-2, african green monkey kidney인 VERO E6와 건국대학교 부설 동물자원연구소에서 분양받은 epitheroïd carcinoma인 HeLa를 사용하였다. HEP-2와 HeLa는 종양 세포주로서 사용하였고 VERO E6는 양성대조 세포주로서 사용하였다.

시료의 준비—선별된 방선균의 배양액을 butanol로 추출, 농축하여 butanol을 완전히 제거한 후 Tween 80 (40%)에 녹여 (1mg/ml) 시료를 준비하였다.

세포배양—실험에 사용된 세포인 HEP-2, HeLa, VERO E6은 10% FBS (fetal bovine serum)와 penicillin G 100IU/ml, streptomycin 100mg/ml이 들어 있는 Eagle's minimal essential medium (EMEM) 배양액을 사용하여 37°C, 5% CO₂가 유지되는 항온기에서 대수기인 monolayer로 배양시키다가 0.25% trypsin-EDTA solution으로 세포를 부유시켰다. 그리고 5분 동안 원심분리시키고

phosphate buffered saline(PBS)로 1번 세척한 후에 새로운 배양액으로 부유시켜 사용하였다.

MTT assay를 이용한 세포 독성능 측정—세포 독성능 측정은 Carmichael 등^{9,10}의 MTT (methyl tetrazolium bromide) 측정법을 modification하여 실험하였다.

IC₅₀의 측정—Butanol로 추출한 농축액의 세포독성능은 각 세포의 증식을 50% 억제할 수 있는 농도 (50% Inhibitory concentration : IC₅₀ (μg/ml)) 값으로 나타내었으며, 본 실험에서 사용한 MTT 측정법에서는 흡광도가 대조 well에 비해 50% 감소한 값으로 결정하였다¹¹).

선별균주의 특성—특성은 Williams 등과 Goodfello 등¹²의 numerical taxonomy (수직학적 분류동정법)에 기초한 “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”의 방선균 동정법과 International Streptomyces Project (ISP)¹³에 의하여 특성을 조사하였다.

결 과

균주의 분리—시료를 채취하여 항진균활성을 갖는 균주를 분리하고 그 중 가장 항진균활성이 강한 균을 선택하였다. 이 균의 항진균활성을 측정한 결과 Gram positive, Gram negative 그리고 효모형 진균에는 항진균성이 없었고 균사를 형성하는 진균에만 항진균성을 보였다 (Table 1).

선별균주가 생산하는 항진균 물질의 생산 시기를 알아보기 위한 배양에서 7일째 균체량이 최대가 되었고 항진균 물질은 5일째부터 생산되어 7일째 최대의 활성을 보였다.

대사산물의 특성—대사산물은 ethylacetate에는 전혀 녹지 않았고 butanol에 녹는 것으로 보아 지용성과 수용성의 중간적인 성질을 띠고 있음을 알 수 있었다 (Table 2). 온도 및 pH에 대한 안정성은 Table 3에 나타난 것으로 보아 중성부근에서 가장 활성이 높았고 열에는 안정한 것으로 나타났다. 대사산물의 생산에 있어서 탄소원으로는 glucose가 활성이 가장 높았고 다른 것과 비교해서 6탄당인 탄

소원을 이용한 배양에서 항진균 활성이 높게 나타났다 (Table 4).

세포 독성능 측정—세포수에 따른 최적 MTT 흡광도를 조사하여 각 세포에 따라 흡광도가 비례적으로 증가함을 확인하고, 최적농도인 5×10⁴cells/ml로 조정하였다. Ethanol 추출액 세포 독성능은 1 mg/ml로 조제한 항진균 물질의 세포 독성능을 조사한 결과 HeLa는 0.204 μg/ml였고, Hep-2는 0.0016 μg/ml, Vero E6cell은 5 μg/ml를 나타낸 것으로 보아 정상세포보다는 암세포주에 훨씬 큰 독성능을 보여주었다 (Fig. 1).

Table 1. Antimicrobial activity of antibiotics produced by isolated strain.

Test microorganism	isolated strain
Gram positive bacteria	
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	—
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	—
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9341)	—
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 65389)	—
Gram negative bacteria	
<i>Proteus sp.</i> (MB 838)	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NCTC 10490)	—
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	—
<i>Bordetella bronchiseptica</i> (ATCC 4617)	—
Fungi	
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 32656)	28
<i>Aspergillus flavus</i>	30
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	26
<i>Penicillium chrysogenum</i> (ATCC 1002)	37
<i>Neurospora crassa</i>	33
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	—

Table 2. Solubility of antibiotics produced by isolated strain.

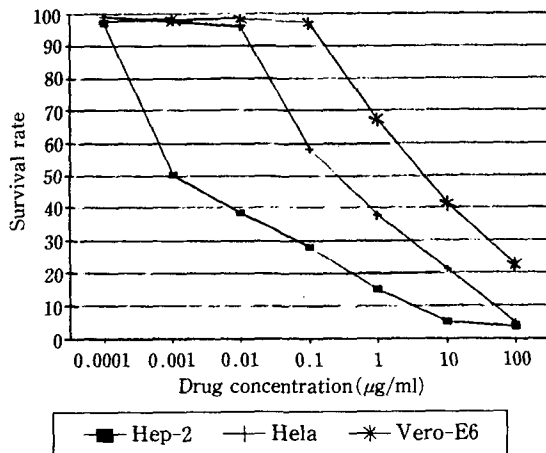
Test organism	Broth filtrate	Mycellium extract
<i>A. niger</i>		
Diameter of inhibition zone (mm)	Butanol Ethyl acetate	Butanol Ethyl acetate
	42	— 12 —

Table 3. Properties for antifungal agent produced by isolated strain.

Test organism	pH		
	<i>A. niger</i>	3	7
Diameter of inhibition zone (mm)	14	38	11

Table 4. Effect of carbon source on the production of antifungal agent from isolated strain.

Carbon source	Inhibition zone (mm)
Control	12
Arabinose	13
Xylose	11
Glucose	30
Mannitol	22
Cellobiose	15
Raffinose	18

**Fig. 1.** The survival rate of HEP-2, HeLa and VERO E6 cells following continuous exposure to butanol extracts of cultured broth of strain, measured by MTT assay.

선별균주의 특성—배양적 특징은 각 ISP 배지 상에서 strain을 30°C에서 3주간 배양했을 때 spore 색깔은 모든 배지에서 gray 계통의 색을 나타냈고, ISP No. 5와 nutrient agar에서만 white 또는 cream색을 나타냈다.

Substrate mycelium의 색은 ISP No. 2, ISP No. 7, Benett's agar 배지에서는 brown, 나머지 배지에서는 yellow색을 띄었다. Souble pigment는 ISP No. 2와 ISP No. 7에서만 brown색을 나타냈고, 나머지 배지에서는 관찰되지 않았다.

각종 유기물의 분해력은 tyrosin, starch, gelatin, hypoxanthine을 분해하였고 casein은 분해를 못하였다.

화학 저해제 첨가에 따른 성장은 crystal violet 0.0001% w/v, phenol 0.1% v/w, sodium azide 0.001%, 0.01% w/v, sodium chloride 4%, 7%, 10% w/v에서는 모두 성장하였고 sodium chloride 13% w/v에서는 성장하지 못하였다.

탄소원과 질소원의 이용성은 sucrose, mannitol, sodium citrate(0.1% w/v)은 양성 대조군인 glucose를 첨가하였을 때와 같이 성장을 잘 하였고, raffinose와 D-lactose는 대조군보다 못하지만 약한 성장을 보였다. 나머지 탄소원에서는 전혀 성장하지 못하였다.

Nitrogen source(0.1% w/v)의 이용성은 L-proline과 L-asparagine를 양성대조군으로 하고, 질소원을 첨가하지 않은 음성대조군과 함께 배양한 결과 L-cysteine, L-arginine과 L-threonine은 양성대조군과 같이 성장을 잘하였고, 다른 질소원을 첨가한 배지에서는 성장하지 못하였다.

고 찰

항생물질은 화학적 구조에 따라 여러 종류로 분류되는데 이 물질은 항진균 활성을 나타내는 결과로 보아 polyene계 항생물질일 것으로 추정된다²⁵⁾. 항진균 물질의 세포독성능은 Carmichael^{9,10)} 등의 MTT 측정법을 modification하여 실험하였다. 이 방법은 간접적으로 살아있는 세포수를 측정하는 방법으로 정확하고 신속하여 미국의 암 연구소에서 항암 선별방법으로 채택되고 있다²⁶⁾. MTT 측정시 formazan형성물은 각 세포주마다 다르기 때문에 각 세포주에 따라 적절한 표적세포의 결정이 매우 중요한 것으로 보고되어 있다²⁷⁾. 그러므로 본 실험

에서 측정된 HEP-2와 VERO E6세포의 적절한 세포수의 범위인 10^3 에서 5×10^4 사이에서 사용하여야 한다는 보고에 일치하는 결과를 보여주고 있다²⁸⁾. Butanol 추출물의 세포독성능은 HeLa의 경우 Teruaki Ozasa 등이 *Streptomyces hygrosopicus*에서 분리한 phospholine의 세포독성능은 $3.37 \mu\text{g}/\text{ml}$ 인 것과 비교하면 약 15배 정도 더 강한 독성능을 보이고 있다²⁹⁾. 지금까지 보고된 흑색종 세포주에 대하여 IC_{50} 값이 가장 낮은 약물은 Kiyoto (1985)가 보고한 FR-900405의 IC_{50} 값인 $0.00005 \mu\text{g}/\text{ml}$ 가 가장 낮은 것으로 보고되어 있다³⁰⁾. HEP-2의 경우 이 값에 비교하면 30배 정도 약한 것이지만 세포주의 상태에 따라서 이 값은 매우 유동적일 수 있다.

앞으로 생화학적 방법을 통한 방선균의 동정이 필요하며, 배양여액 성분 중 유효한 세포독성능의 부분만을 순수분리하여 *in vivo* 실험을 통하여 생체 내 항암활성을 알아보는 연구가 요구된다.

결 론

대둔산에서 항진균력 활성이 가장 많은 방선균을 분리하여 특성과 배양여액의 특성 및 세포독성능을 알아보았다.

실험에 대한 결과는 다음과 같다.

1. 선별 균주의 배양여액은 진균에 항균력을 보였으나 효모와 세균에는 항균력이 없었다. 이 물질은 열에 안정하였으며, butanol에 용해되고 ethyl acetate에 용해되지 않았다.

2. Butanol 추출물은 정상세포인 VERO E6에서는 독성능이 미약했고, 종양세포인 HEP-2와 HeLa에는 독성능이 강했다.

3. 선별 균주는 포자색이 gray이며, 짧은 사슬을 가지고 있고 Yeast-malt extract agar에서 짙은 갈색계열의 용해색소를 냈다. 세포벽은 meso-DAP로 구성되어 있었다. 따라서 이 균주를 *Actinomadura*속으로 추정하였다.

4. 화학저해제 실험에서 0.1% phenol, 0.0001% crystal violet, 0.01% sodium azide와 10% NaCl

에서 성장하였다. 탄소원의 이용성은 sucrose, mannitol, sodium citrate를 잘 이용하였다.

참 고 문 헌

1. Waksman S.A., *Chron. Bot.*, 6, 145 (1940)
2. Buick R.N., Messner H.A., Tili J.E. and McCulloch E.A. Cytotoxicity of adriamycin and leukemia progenitor cell of men, *J. Ncl.*, 62, 249-256 (1979)
3. Suffness M. and Douros J.D. Discovery of antitumor agent from natural sources. *Trend Pharm. Sci.*, 2, 307-310 (1980)
4. Zubrod C.G. The drug development program of the National Cancer Institute, its history, result and impact on marketing. In Karch F, ed, Orphan Drugs New York, Marcel Dekker, pp. 4-43 (1982)
5. Catini J.J., Francher D.M., Edinger K.J. and Stringfellow D.A. Microtitre cytotoxicity assay useful for the discovery of fermentation derived antitumor agents, *Cancer Chemother Pharmacol.*, 15, 240-243 (1985)
6. Hanka L.J., Martin D.G. and Neil G.L. In vitro methods used in detection and quantitation of antitumor drugs produced by microbial fermentations, *J. Nat. Prod.*, 41, 85-90 (1978)
7. 김수기. *Streptomyces* 배양 여과액 내의 종양세포 성장억제 인자의 분리 및 특성, 연세의대 학위논문집, pp. 28-48 (1991)
8. Steven, R.B. *Micology guidebook*. Univ. Washington Pr., pp. 703 (1974)
9. Carmichael J., DeGraff W.G., Gazdar A.F. and Mitchell J.B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay, Assesment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, 47, 936-942 (1987)
10. Carmichael J., DeGraff W.G., Gazdar A.F. and Mitchell J.B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay, Assesment of

- radiosensitivity. *Cancer Res.*, 47, 943-946 (1987)
11. Jae-Gahb park, Barnett S. Kramer, Seth M. Steinberg, James Carmichael, Jerry M., Collins John K., Minna and Adi F. Gazdar Chemosensitivity Testing of Human Colorectal Carcinoma Cell lines using a Tetrazolium-based colorimetric Assay. *Cancer Res.* 47, 5875-5879 (1987)
 12. William S, S.T., M. Goodfellow, E.M.H. Wellington, J.C. Vickers, G. Anderson, P.H.S. Sneath, M.H. Sackin, and A.M. Mortimer. *J. General Microbiol.*, 129 (1985, 1983)
 13. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. Methods for the characterization of *Streptomyces species*. *Int. J. syst. bacteriol.*, 16, 313-340 (1966)
 14. Manual of Methods for General Bacteriology. American Soc. for Microbio, pp. 10-19 (1986)
 15. Omura, S. Philosophy of new drug discovery. *Microbiol. Rev.*, 50, 259-279 (1986)
 16. Williams and Wilkins. Bergey's Manual of Systemic Bacteriology (1989)
 17. Shirling, E.B., and K. Gottlieb. *Int. J. Systematic Bacteriology*, 18(2), 69 (1968)
 18. Shirling, E.B., and D. Gottlieb. *Int. J. Systematic Bacteriology*, 22(4), 265 (1972)
 19. Hisch C.F. and Cristemson B.L. Novel method for selective isolation of *Actinomyces*. *Applied Environ. Microbiol.*, 46, 925-929 (1983)
 20. Shirling E.B. and Gottlieb D. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. 2 Species descriptions from first study, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 18, 69-189 (1968)
 21. Williams S.T. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.*, 129, 1743-1813 (1983)
 22. Waksman S.A. The *Actinomycetes*, Vol. 2, Classification, identification and description of genera and species. 1st ed. Baltimore, pp. 1-50 (1961)
 23. Kohsaka M. Isolation of immunomodulators from microbial sources. In Okami Y., Beppu T., eds. *Biology of Actinomycetes'88*. Tokyo, Japan, Scientific societies press, pp. 26-31 (1988)
 24. Hutchison CR. Drug discovery and development through the genetic engineering of antibiotic producing microorganisms. *J. Med. Chem.*, 32, 936-937 (1990)
 25. 惣田承二(編集). 生物活性天然物質, 醫齒出版(株), pp. 343(1988)
 26. Hida T., Ueda R., Takahashi T., Watanabe H., Suyama M. and Sugiura T. Chemosensitivity and radiosensitivity of small cell lung cancer cell lines studied by a newly developed 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) hybrid assay. *Cancer Res.*, 49, 4785-4790 (1989)
 27. Ruben R.L., and Neubauer R.h. Semiautomated colorimetric assay for in vitro screening of anticancer compounds. *Cancer Treat. Rep.*, 71, 1141-1149 (1987)
 28. Patricia Price and Trevor J. McMillan. Use of the Tetrazolium Assay in Measuring the Response of Human Tumor cells to Ionizing Radiation. *Cancer Res.*, 50, 1392-1396 (1990)
 29. Teruaki Ozasa. Novel antitumor antibiotic phospholine. *J. Antibiotics Vol. XLII*, 9, 1331-1337 (1989)
 30. Kiyoto S. New antitumor antibiotics, FR-900405 and FR-900406 II. Production, isolation, characterization and antitumor activity. *J. Antibiotics*, 38, 840-848 (1985)
 31. Omura S. Philosophy of new drug discovery. *Microbiol. Rev.*, 50, 259-279 (1986)