

Methanol 자화방선균 MO-16으로부터 항균성 물질의 정제 및 생산조건

김현수* · 이정수

계명대학교 자연과학대학 미생물학과

Purification and Production Conditions of Antimicrobial Compound from Methylo-trophic Actinomy-cetes MO-16. Kim, Hyun-Soo* and Jeong-Soo Lee. Department of Microbiology, College of Natural Sci-ence, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea - A methylo-trophic actinomy-cetes strain MO-16, which produce the antimicrobial compound, was isolated from soil and supposed as *Amycolatopsis* sp. based on taxonomic studies. The cell-free extract of methanol-grown strain MO-16 showed dehydrogenase activity for methanol and formaldehyde when various electron acceptors were added for oxidation. On the other hand, methanol did not affect the production of antimicrobial compounds, and organic nitrogen sources such as corn steep liquor and peptone were better than inorganic nitrogen sources. These compounds showed broad antimicrobial spectrum to the tested strains such as bacteria and yeast. The antimicrobial compounds were very stable under heat (121°C), acid (pH 2.0), alkali (pH 11.0) treatments. These compounds were isolated by ethylacetate extract, silica gel column chromatogra-phy and reverse phase HPLC. Two compounds(peak 1 and 2) were detected as antimicrobial compounds through the HPLC analysis. The peak 2 was purified as a single compound and revealed a 98% purity.

Key words: methylo-trophs, methanol dehydrogenase, actinomy-cetes, antimicrobial activity

Gram(+)세균인 방선균은 기균사, 포자 형성 등의 형태적 분화(morphological differentiation)와 항생물질, 효소, 색소, 저해제, 생리활성물질 등 다양한 2차 대사산물을 생산하는 생리적 분화(physiological differentiation)를 수행하며, 원핵 미생물 중 고도로 진화된 아주 유용한 토양 미생물이다. 따라서 *Streptomyces* sp. 방선균을 중심으로 수많은 항생물질을 비롯하여 각종 생리활성물질이 분리, 구조 결정되어 있으며 회귀 방선균의 분리법[12] 개발과 함께 새로운 생리적 특성을 가진 방선균을 분리하여 신규 항생물질을 비롯하여 각종 저해제, 생리활성물질 등의 분리, 응용에 수많은 연구가 수행중에 있다. 또한 methanol을 자화하는 생리적 특수성에서 새로운 물질생산을 위해 methanol을 탄소원으로 이용하는 미생물에 대한 연구가 계속적으로 수행되고 있으며, 지금까지 알려진 methanol 자화성균(methylo-trophs)은 세균, 효모 등에서 각종 SCP(single-cell protein)생산[15], L-serine[14], cytochrome C[22] 생산 등 수많은 연구가 이루어져 있다. 본 연구와 관련된 방선균 유래의 methylo-trophs는 Kato 등[7]이 *Streptomyces* No. 239를 분리한 후 *Nocardia* sp.[2, 6]으로 동정이 되었으나, 최근 *Amycolatopsis methanolica*로 동정이 되었으며 methanol 자화기구의 연구가 수행되고 있다[1, 17, 18]. 그러나 분리 방선균의 수 및 기능 연구는 아직 미흡하며, 특수한 생리적 기능으로부터 항생물질 등 새로운 물질의 생산이 예상되어 왔다[16].

최근 본 연구실에서는 종래의 방선균 분리 방법에 따른 신 기능 물질 탐색의 한계점과 방선균의 다양한 2차 대사산물 생산능 및 methylo-trophs의 특수한 생리적 기능을 고려하여 각종 토양으로부터 methylo-trophic actinomy-cetes를 분리하였으며, 새로운 2차 대사산물 생산에 관한 연구를 수행하여, 이들 분리균으로부터 항진균성 물질의 생산[10], aminogly-coside계 항생물질(특히 sisomicin) 내성 저해물질 생산[11]을 보고하였다.

본 연구에서는 각종 토양시료에서 분리한 methanol자화 방선균의 배양액 중 강력한 항균 효과를 갖는 균주를 선택하여 분리균의 배양학적, 형태학적, 생리적 특징으로부터 속의 동정과 항균성 물질의 생산조건 및 분리를 수행한 결과를 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

Methanol 자화 방선균의 분리 및 배양

Methanol 자화 방선균의 분리는 김 등[11]의 M배지(K_2HPO_4 0.3%, NH_4NO_3 0.3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, NaCl 0.1%, MeOH 1%, pH 7.0)를 사용하였으며, 분리원으로써 히말라야, 오키나와, 타이완, 지리산, 대구 계명대 주위의 토양시료를 사용하였다. 각종 토양시료 1g을 멸균수 10 ml에 현탁시켜 10^4 , 10^5 , 10^6 되게 희석한 후 M배지에 100 μ l씩 도말하여 28°C에서 5~7일간 배양하였다. 생성된 colony는 M배지에 순수분리하였으며, 활성유지를 위해 2주에 한번씩 계대배양하였다. 분리균은 25 ml의 M배지

*Corresponding author
Tel. 82-53-580-5284, Fax. 82-53-580-5164
E-mail: hskim@kmucc.keimyung.ac.kr

(100 ml Erlenmyer flask 사용)에 slant로부터 2백금이 접종한 후 28°C, 150 rpm에서 2일간 전배양한 후 -70°C에 보존하여 전배양균으로 사용하였다. 항균성물질의 생산은 M배지에 각종 유기, 무기 질소원이 함유된 배지 25 ml에 전배양균을 3%되게 접종하여 동일조건에서 3~5일 배양하였다.

분리균주의 동정

분리 방선균의 속의 동정을 위하여 방선균의 동정 실험법[5] 및 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [20]에 따라 배양학적, 형태학적, 생리적 특성을 조사하였다. 분리균주의 배양학적 특성은 ISP No. 1(Tryptone-yeast extract agar), No. 2(Yeast-malt extract agar), No. 4(Inorganic salt-starch agar), No. 5(Glycerol-asparagine agar), No. 7(Tyrosine agar)배지에 접종한 후 28°C에서 7일, 14일, 21일 간격으로 기균사의 색깔, 배면 색깔, 배지 색깔, 생육 정도, 가용성 색소 생성유무를 관찰하였다. 분리균주의 기균사의 형태, 포자의 형태 및 표면상태는 평판배지에 접종하여 포자가 충분히 형성된 후에 동결건조 후 gold coating하여 주사현미경인 SEM JSM 5410(GEOL Co.)을 통하여 관찰하였다. 생리적 특성 중 당 이용성은 carbon utilization 배지에 arabinose, fructose, glucose, inositol, mannitol, raffinose, rhamnose, sucrose, xylose를 첨가하여 2주일간 배양하여 생육상태를 조사하였으며, gelatin 액화력, milk 응고력, 전분 분해력, cellulose 분해력, 펠라닌 색소 생성유무는 방선균의 동정실험법[5]에 따라 실험하였다.

조효소액 조제

본 공시균주의 methanol 산화에 관여하는 methanol dehydrogenase(MDH), aldehyde dehydrogenase(ALDH)의 활성을 측정하기 위해 M배지에서 배양한 배양액을 filter paper(Whatman No.2)로 여과하여 균체를 모은 후 20 mM potassium phosphate buffer로 2회 washing한 다음 초음파 파쇄기(LAB-LINE instruments Inc.)를 이용하여 1분 간격으로 10회 파쇄하였다. 파쇄액을 12,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

효소 활성 측정

Dye linked-alcohol dehydrogenase(DL-ADH)및 aldehyde dehydrogenase (DL-ALDH)의 역가 측정은 Yamaka 등 [21]의 방법에 따라 전자 수용체로 phenazine methosulfate (PMS)존재하에 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP)을 첨가하여 측정하였다. 즉, 1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0) 0.55 ml, 50 mM substrate(methanol, formaldehyde) 0.1 ml, 100 mM PMS 0.01 ml, 1 mM DCPIP 0.07 ml를 혼합한 후 효소용액 0.27 ml를 첨가하여 UV spectrophotometer(Biochrom 4060, Pharmacia Biotech Co.)

를 사용하여 30°C, 600 nm에서 45초간 흡광도 감소량을 측정하였다. ADH 및 ALDH의 활성은 분당 1 nmol DCPIP의 환원을 촉매하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

Tetrazolium-dye-linked(TD)-ADH 및 TD-ALDH의 역가 측정은 Bystrykh 등[1]의 방법에 따라 0.05 mM 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)를 포함한 1 M potassium phosphate buffer(pH 7.6) 0.9 ml에 효소용액 0.1 ml를 첨가하여 10분간 반응시킨 후, 최종 농도가 50 mM 되게 기질(methanol, formaldehyde)을 첨가하여 10분간 반응시키면서 30°C, 550 nm에서 MTT-formazan의 증가량을 측정하였다. TD-ADH 및 TD-ALDH의 활성은 분당 1 nmol MTT의 환원을 촉매시키는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

NAD-ADH 및 NAD-ALDH의 역가 측정은 Duine 등 [4]의 방법에 따라 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 0.75 ml, 60 mM β -NAD 0.1 ml, 50 mM substrate(methanol, formaldehyde)을 혼합한 후 효소용액 0.1 ml를 첨가하여 25°C, 340 nm에서 5분간 측정하였다. NAD-ADH 및 NAD-ALDH의 활성은 분당 1 nmol NAD의 산화를 촉매하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

시험균주 및 배양조건

본 실험의 항균활성 검색에 사용한 시험균 중 곰팡이로서는 *Aspergillus fumigatus* IFO 5840과 *Aspergillus niger* KCTC 6985, 효모는 *Candida albicans* KCTC 1940, *Saccharomyces cerevisiae*를 사용하였다.

곰팡이의 생육배지로는 malt extract(Difco Co.) 2%, peptone(Difco CO.) 0.1%, glucose 2%, pH 6.0을 사용하였으며, 각 균주를 평판배지 위에 접종하여 28°C에서 5~7일간 배양한 다음, spore용액을 제조하여 4°C에서 보존하여 사용하였다. 효모류는 yeast extract 1%, glucose 2%, peptone 2%, pH 7.0을 사용하여 28°C에서 2~3일간 배양한 다음 4°C에서 보존하면서 사용전에 24시간 계대배양하여 시험균으로 사용하였다. 세균류는 Gram(+)세균 10주, Gram(-)세균 9주를 사용하였으며, 각 균주는 LB배지(peptone 1%, NaCl 0.5%, yeast extract 0.5%, pH 7.0)에서 1~2일 배양하여 4°C에 보존하여 사용하였다.

항균성 물질의 활성 측정

배양액중에 생산된 항균성 물질의 확인은 agar diffusion 방법을 사용하였으며, 시험균이 함유된 평판배지 위에 paper disc(ϕ 6 mm, Whatman Co.)를 얹고 배양액 20 μ l를 첨가한 후 37°C에서 1~2일간 배양하여 생성된 clear zone의 유무 및 크기로서 판단하였다.

Methanol의 농도에 따른 항균성 물질의 생산

항균성 물질 생산을 위해 분리배지인 M배지(agar 미첨가)

를 사용하여 탄소원인 methanol을 각각 0.5, 1, 2, 3, 4, 5% 첨가한 배지에 전배양균을 3% 접종하여 28°C, 150 rpm에서 6일간 배양하였다. 배양시간에 따른 항균성 물질의 생산능은 paper disc를 이용한 agar diffusion법을 사용하여 확인하였다.

질소원에 따른 항균성 물질의 생산

항균성 물질 생산에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위해 methanol이 1% 함유된 M배지에 각 질소원을 0.1% 첨가하여 항균성 물질의 생산능을 검토하였다. 사용한 질소원은 유기질소원으로 asparagine, casamino acid, corn steep liquor, leucine, meat extract, peptone, soybean meal, tryptone, yeast extract, urea를, 무기질소원으로 NaNO₃, (NH₄)₂SO₄를 사용하였다.

항균 spectrum 검토

공시균이 생산하는 물질의 세균 및 진균에 대한 항균효과를 검토하기 위하여, 전배양배지인 M배지에 slant로부터 2백금이 접종하여 28°C, 150 rpm에서 2일간 전배양한 후, peptone 0.1%, methanol 1%가 첨가된 25 ml의 M배지에 전배양균을 3%로 접종하여 동일조건에서 5일간 배양하였다. 생산된 항균성 물질은 Gram(+)세균 10균주, Gram(-)세균 9균주, 곰팡이 2균주, 효모 2균주를 대상으로 항균 spectrum을 검토하였으며, 항균효과는 각 시험균이 함유된 평판배지 위에 배양액(20 µl) 그리고 배양액의 ethylacetate 추출물(2 µg/20 µl)을 각각 paper disc에 얹고 용매를 건조시킨 후 28°C(곰팡이, 효모) 및 37°C(세균)에서 1~2일간 배양한 다음, clear zone의 유무로서 확인하였다.

항균성 물질의 특성

본 공시균주가 생산하는 항균성 물질의 특성을 검토하기 위해 위의 배양액을 1N HCl, 1N NaOH를 사용하여 pH 2.0 및 pH 11.0로 조정하여 실온에서 4~5시간 처리한 다음, 중성(pH 7.0)으로 조정하여 시험균인 *E. coli* K-12 및 *B. subtilis* PCI 219를 대상으로 하여 항균효과를 검토하였다. 열처리의 경우 배양액을 121°C, 1기압에서 30분간 처리한 다음 잔존활성을 검토하였다.

항균성 물질의 분리

항균성 물질의 분리를 위해 배양액 100 ml를 2배량의 ethylacetate로 추출하여 Na₂SO₄로 건조한 다음 진공농축하였다. 농축액을 소량의 methanol에 용해시킨 다음 ethylacetate로 평형화시킨 silica gel column(φ 26×100 mm)에 흡착시켜 ethylacetate에 methanol을 조금씩 첨가하면서 용출시켜 활성획분을 분리하였다. 활성획분을 진공 농축한 후 소량의 methanol로 용해한 다음, 역상계 HPLC(Shimadzu Co. LC-10AD)를 사용하여 분석하였다. 즉, 시료 5 µl를

Table 1. Morphological characteristics of strain MO-16

Characteristics	MO-16
Colony morphology on ISP 2 and 4	
Periphery	Localization, localization
Surface	Elevated, wrinkle
Aerial mycelium	Abundant, abundant
Spore mass color	Gray
Spore chains on ISP 2	Rectiflexible, spiral
Color of colony on ISP 5	
Substrate mycelium	Cream
Soluble pigment	Yellow

ODS column(Shimadzu Shimpak, φ 46×300 mm)에 주입하여 methanol:THF:H₂O(3:3:5)의 용매를 사용하여 1 ml/min의 속도로 용출시켜 254 nm에서 각 peak를 검출하였다. 항균성 물질의 확인은 각 peak를 수회 분취하여 농축한 다음, 항균효과를 검토하였다.

결과 및 고찰

Methanol 자화 방선균의 분리

Methanol 자화 방선균의 분리는 methanol배지(M)를 사용하였으며, 각종 토양시료로부터 M배지에서 생육하는 18종의 방선균을 분리하였다. 각 분리균주를 M배지(액체배양)에서 3~7일간 배양한 결과, 배양 5일째 항균성 물질 생산능이 가장 우수한 MO-16균주를 공시균으로 사용하였다.

분리균주의 동정

분리 방선균 MO-16균주의 배양 및 형태적 특성을 조사한 결과, Table 1에서 보인 바와 같이 본 균주의 형태적 특징으로 ISP No. 2배지에서 생육한 colony의 주변부는 국소적이며, 중심부는 용기된 형태를 보였고, No. 4배지에서도 colony 주변부는 국소적이었으며, 중심부는 주름이 있는 용기된 형태를 보였다. 기균사의 착색상태는 아주 두텁게 형성되었으며 포자의 색은 회색을 나타내었다. No. 5배지에서 생육한 영양균사는 크림색을 띄었으며, 노란색의 가용성색소를 생성하였다. 생리적 특징으로는 Table 2에서와 같이 No. 7과 No. 1배지 모두에서 노란색의 melanin색소를 생성하였고, 탄소원의 이용성은 raffinose의 이용성이 다소 미약하지만 그의 모든 탄소원을 이용하였다. ISP No. 2배지에 접종하여 생육온도를 조사한 결과 배양 27°C와 30°C가 생육이 양호하였으며, 포자형성도 양호하였다. 10°C 및 37°C(11일 배양)에서도 생육은 하였으나 포자는 생성하지 않았으며, 45°C에서는 생육하지 않았다. 또한 약간의 우유 응고력과 gelatin 액화력은 보였으나, 전분 분해력과 cellulose 분해력은 나타나지 않았다. NaCl 내성은 4, 7, 10, 13%까지 첨가시 7%까지 생육하였다. 형태적 특징으로

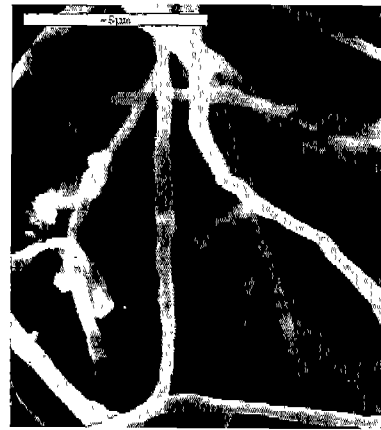
Table 2. Physiological characteristics of strain MO-16

Characteristics	MO-16
Optimal growth temperature	27 ~ 30°C
Liquefaction of gelatin	+
Coagulation of skim milk	⊥
Hydrolysis of starch	-
Hydrolysis of cellulose	-
Tolerance to NaCl	7%
Melanin pigment on ISP 7 and 1	Yellow, yellow
Carbon utilization	
D-Fructose	+
D-Glucose	+
Inositol	+
D-Mannitol	+
Raffinose	±
L-Rhamnose	+
Sucrose	+
D-Xylose	+

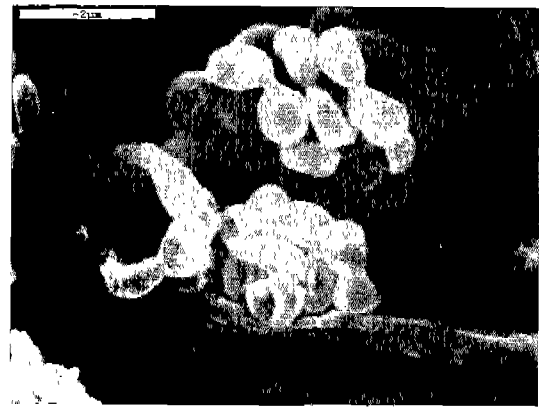
No. 2배지에서 2주일간 배양한 후 주사 현미경으로 관찰한 결과 기균사의 형태는 Fig. 1(A)와 같이 잘 발달되어 길며 적절히 분지되어 있는 rectiflexible형을 나타내었다. 또한 3주일 배양 후 관찰한 결과 Fig. 1(B)와 같이 포자의 형태는 smooth type이고 길이는 1.5 μm 이었으며 일부 나선형의 spore chain을 형성하였다. 이들 결과로는 일부 생리적 특성과 배양학적 특성[3]에서 *Amycolatopsis methanolica*와 다소 차이를 보이나, 형태적 특징[3, 13]에서 *Amycolatopsis* sp.과 유사한 점에서 본 분리균주는 *Amycolatopsis* sp.으로 추정되었으며, 종의 동정을 통하여 지속적인 연구가 필요하다고 사료되며, methanol 이외 탄소원의 이용성이 다양한 점에서 facultative methylotrophic actinomycetes로 판단되었다.

Methanol 자화능 검토

Methanol 자화 방선균의 methanol 산화기구는 Gram(-)세균에 비해 복잡한 점에서 methanol dehydrogenase(MDH), aldehyde dehydrogenase(ALDH)에 대한 연구가 *Amycolatopsis methanolica*를 중심으로 연구가 수행되어 왔다[1-3, 6, 18]. 이들 효소의 기능에 전자수용체로서 PMS/DCPIP [8], MTT[1, 17], NAD[4] 등이 관여한다는 보고에 따라 공시균의 methanol 산화효소 생산을 검토하였다. 1% methanol을 첨가한 배지에서 분리 균주를 배양하여 균체내 생산된 MDH 및 ALDH의 활성을 측정하기 위하여 전자 수용체로 PMS/DCPIP[8], MTT[1], NAD[4]를 사용하여 효소활성을 검토하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 본 공시균주가 생산하는 MDH는 전자수용체로 PMS/DCPIP 및 MTT를 이용하는 것으로 추정되며 ALDH의 경우 PMS/DCPIP, MTT, NAD가 특이적으로 전자수용체로 이용된다고 사료되었다. 이들 결과는 *Amycolatopsis methanolica*의



A.



B.

Fig. 1. Scanning electron micrograph of strain MO-16.

Cultivation was performed with ISP medium No. 2 at 28°C for 14 days(A, $\times 7,500$) and 21 days(B, $\times 15,000$)

Table 3. Specific activities of dehydrogenases of methanol and formaldehyde in cell-free extracts of strain MO-16

Enzyme	Substrate	Electron acceptor	Specific activity (munit/mg)
DL-ADH	Methanol	PMS/DCPIP	18.0
DL-ALDH	Formaldehyde	PMS/DCPIP	20.0
TD-ADH	Methanol	MTT	5.0
TD-ALDH	Formaldehyde	MTT	4.3
NAD-ADH	Methanol	NAD	-
NAD-ALDH	Formaldehyde	NAD	55.0

PMS: phenazine methosulfate, DCPIP: 2,6-dichlorophenol-indophenol, MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, NAD: nicotinamide-adenine dinucleotide.

경우 ADH가 3종류의 subunit으로 구성되어 각각 N, N'-dimethyl-4-nitrosoaniline, MTT 및 5'-diazafavin이 전자수용체로서 methanol산화에 관여한다는 보고[1]와 ALDH의 경우 전자수용체로 DCPIP, Mo protein[19]이 이용되며 3종류의 subunit을 소유한 molybdoprotein dehydrogenase [9]라는 보고와 비교할 때 본 공시균도 산화에 다양한 전자

Table 4. Effect of methanol concentration on the antimicrobial compound production

Methanol concentration(%)	Inhibitory zone(mm) to the incubation time(days)									
	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6
	<i>E. coli</i> K-12					<i>B. subtilis</i> PCI 219				
0.5	++	++	+++	++	++	+	++	++	+	+
1	++	++	+++	++	++	+	++	++	+	+
2	++	+++	+++	++	++	+	+	++	+	+
3	++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+
4	++	++	+++	++	++	+	+	+	+	+
5	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+

Cultivation was performed with a 25 ml portion of each medium in a 100 ml Erlenmyer flask for 2 ~ 6 days at 28°C. Plate assay with *Bacillus subtilis* PCI 219 and *Escherichia coli* K-12 IFO 03301 were used to monitor antibiotic production. +, - : diameter of inhibitory zone (- : no inhibition, + : under 12 mm, ++ : 13 ~ 16 mm, +++ : above 17 mm)

수용체를 가지는 multi-enzyme의 생산이 추정되며 계속적인 연구를 통하여 그 기능이 규명되어야 한다고 사료된다.

Methanol의 농도에 따른 항균성물질의 생산성 검토

본 공시균주 MO-16이 M배지에서 항균성 물질을 생산하는 점에서 탄소원인 methanol의 농도(0.5%~5%)에 따른 영향을 검토하였다. Table 4에서 보인 바와 같이 methanol 농도에 따라 2일에서 6일까지 배양하여 시험균 *E. coli* K-12와 *B. subtilis* PCI 219를 대상으로 항균력을 조사한 결과 항균성 물질의 생산은 methanol의 농도에 크게 영향을 받지 않았으나 배양 5일째부터는 감소하는 경향을 나타내었으며 항균력은 G(+)세균보다 G(-)세균에 강한 결과를 보였다. 이 결과로 볼 때 M배지에서 항균성 물질의 생산은 배지 성분중 탄소원인 methanol보다 사용한 질소원의 영향 때문이라고 추정되었다.

질소원에 따른 항균성 물질의 생산

Table 4의 결과에서 보인 바와 같이 공시균의 항균성 물질 생산에 methanol의 농도에 따른 영향이 크지 않은 점에서 질소원의 종류에 따른 항균성 물질의 생산성을 검토하였다. 공시균의 생육배지인 methanol이 함유된 M배지에 각각의 유기 혹은 무기질소원을 0.1% 첨가하여 5일간 배양하였다. 배양액중 생산된 항균성 물질은 Table 4에서와 같이 시험균 *E. coli* K-12 및 *B. subtilis* PCI 219를 대상으로 하여 항균효과를 검토하였다. Table 5에서 보는 바와 같이 항균성물질의 생산은 유기 질소원인 corn steep liquor, peptone이 우수하다고 판단되었으며, 무기질소원의 경우 항균성 물질은 거의 생산하지 않은 결과를 보였다.

항균 spectrum

공시 균주 MO-16이 생산하는 항생물질의 항세균 및 항진균효과를 검토하기 위하여, 전배양배지인 M배지에 slant로부터 2백금이 접종하여 28°C, 150 rpm에서 2일간 전배양한 후, methanol이 1% 첨가된 M배지에 질소원으로 pe-

Table 5. Effect of nitrogen sources on the antimicrobial compound production

Nitrogen source	Inhibitory zone(mm) to the incubation time(days)							
	2	3	4	5	2	3	4	5
	<i>E. coli</i> K-12				<i>B. subtilis</i> PCI 219			
Asparagine	-	-	-	-	-	-	-	-
Casamino acid	+	++	++	++	+	+	+	+
Corn steep liquor	++	++	+++	+++	+	+	+	+
Leucine	-	-	-	-	-	-	-	-
Meat extract	+	+	+	+	+	+	+	+
Peptone	+	+++	+++	++	+	+	+	+
Soybean meal	++	++	++	++	+	+	+	+
Tryptone	++	++	++	++	-	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-
Yeast extract	++	++	++	+	-	+	+	+
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	--	-	-	+	+	+	-
NaNO ₃	-	-	-	-	-	-	-	-

Antimicrobial activity was detected as described in Table 4

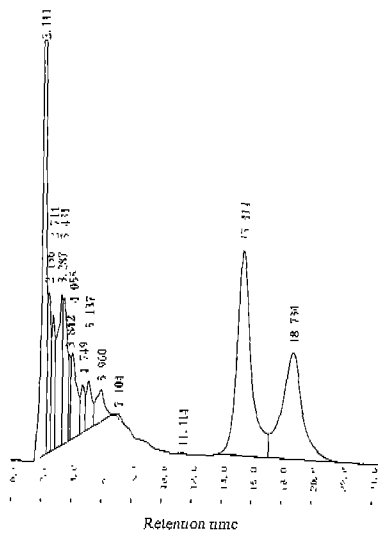


Fig. 2. HPLC elution pattern of the antimicrobial compounds. The elution was done on ODS column (Shimadzu Shimpak) with methanol:THF:H₂O (3:3:5) as solvent at flow rate of 1.0 ml/min and detected at 254 nm. THF, Tetrahydrofuran.

ptone 0.1%를 첨가하여 전배양균을 3% 접종한 후 5일간 배양하였다. 배양상등액(20 μ l)와 배양액의 ethylacetate 추출물(2 μ g/20 μ l)을 사용하여 Gram(+)*세균* 10균주, Gram(-)*세균* 9균주, 곰팡이 2균주, 효모 2균주를 대상으로 항균효과를 검토한 결과 Table 6에서 보인 바와 같이 Gram(+)*세균*에는 배양액 및 ethylacetate 추출물 모두 강한 항균활성을 나타내었으며, Gram(-)*세균*에는 *Salmonella typhi* KCTC 2424를 제외한 모든 균에 항균활성을 나타내었다. 또한 ethylacetate 추출물의 경우 *Saccharomyces cerevisiae*에도 항균활성을 나타내었다. 따라서 본 실험의 결과로서 MO-16균이 생산하는 항균성 물질은 항균범위가 넓은 물질로 추정되었다.

항균성 물질의 특성

본 공시균이 생산하는 항균성 물질의 특성을 조사하기 위해 항균성 물질 생산 배지인 M배지(탄소원:methanol 1% 첨가) 25 ml에 전배양균을 3% 되게 접종하여 5일간 배양한 후 배양 상등액을 산처리(pH 2.0), 알칼리처리(pH 11.0), 열처리(121°C, 1기압, 30분)한 다음, 잔존활성을 측정하였다

Table 7에서 보인 바와 같이 처리전과 비교할 때 활성의 변화가 없는 점으로 보아 본 항균성물질은 산 및 알칼리에 안정하며, protein성 물질이 아닌 것으로 추정되었다.

항균성 물질의 정제

항균성 물질의 분리를 위해 Table 6의 배지에서 5일간 배양한 배양액 100 ml를 2배량의 ethylacetate로 추출하여 Na₂SO₄로 건조한 다음 진공농축하였다. 농축액을 소량의 methanol에 용해시킨 다음 silica gel column(ϕ 26 \times 100

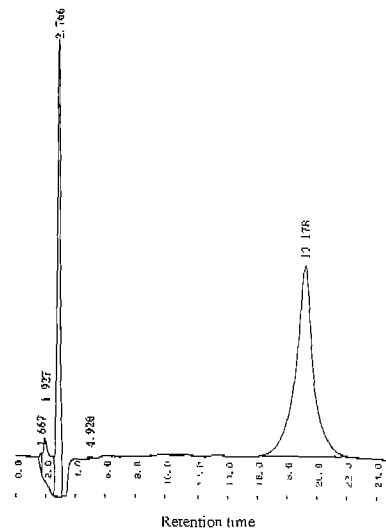


Fig. 3. HPLC elution pattern of the purified antimicrobial compound 1.

The elution conditions were identified as described in Fig. 2

mm)에 흡착시켜 ethylacetate에 methanol을 조금씩 첨가하면서 활성획분을 용출하였다. 그 결과 3% methanol/ethylacetate 용출에서 활성획분을 얻었으며, 이 활성획분을 다시 농축한 후 소량의 methanol로 용해하여 HPLC 시료로서 사용하였다. HPLC는 역상계 ODS column(Shimadzu Shimpak, ϕ 46 \times 300 mm)에 분리시료 5 μ l를 주입하여 Methanol:THF:H₂O(3:3:5)의 용매를 사용하여 항균성 물질을 용출하였다. 용출 pattern은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 15.414분(peak 1)과 18.734분(peak 2)에서 2개의 main peak가 검출되었다. 각 peak의 항균활성을 조사하기 이들 peak를 3회 분취하여 *E. coli* K-12 및 *B. subtilis* PCI 219를 시험균으로 하여 항균력을 검토하였다. Table 8에서 보는 바와 같이 peak 1 및 2 모두 항균활성을 나타내었으며, 2가 1에 비해 항균활성이 다소 강력한 결과를 나타내었다. 따라서 본 연구에서는 활성이 강한 peak 2를 대상으로 수회 분취하여 HPLC로 확인한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 retention time 19.178분의 단일 peak가 검출되었다. 정제된 항균성 물질 peak 2는 chromatopak(Shim-adzu Co.)으로 분석한 결과(결과 미공개) 98%의 정제도를 나타내었다.

이상의 연구 결과로부터 methanol자화 방선균의 특수한 생리적기능을 이용하여 항생물질 등 다양한 생리활성물질의 생산이 예상되며 현재 정제된 물질에 대한 구조결정을 수행중에 있으며, 정제물질의 항암효과, 항변이원성효과 등 다양한 생리기능을 검토중에 있으며 예비실험을 통해 우수한 항암효과가 예상되고 있다.

요 약

토양시료로부터 항균성 물질을 생산하는 methanol 자화

Table 6. Antimicrobial spectra of antibiotics produced by MO-16

Strains	Samples	
	Culture broth (20 µl)	Ethylacetate extract (2 µg/20 µl)
Gram(+) bacteria		
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	13	12
<i>Bacillus megaterium</i>	16	14
<i>Bacillus thermoglucosidius</i>	19	17
<i>Bacillus licheniformis</i> IFO 12197	18	17.5
<i>Mycobacterium smegmatis</i> KCTC 1057	16	13
<i>Mycobacterium phlei</i> KCTC 1932	15	12
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1927	15	12.5
<i>Serratia marcescens</i>	18.5	14.5
<i>Streptococcus equii</i>	16	16
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	16	15.5
Gram(-) bacteria		
<i>Escherichia coli</i> K-12	16	15.5
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1923	16	15.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1930	16	16.5
<i>Pseudomonas fluorescens</i> KCTC 1645	16	15.5
<i>Salmonella typhi</i> KCTC 2424	-	12
<i>Salmonella paratyphi</i>	13	14
<i>Salmonella typhimurium</i>	13	13.5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	16	13.5
<i>Proteus vulgaris</i>	12	11.5
Yeast		
<i>Candida albicans</i> KCTC 1940	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	13
Fungi		
<i>Aspergillus fumigatus</i> IFO5840	-	-
<i>Aspergillus niger</i> KCTC 6985	-	-

Cultivation was performed with a 100 ml portion of each medium in a 500 ml Erlenmyer flask for 5 days at 28°C. Antimicrobial activity was tested by agar diffusion method (paper disc) using culture broth (20 µl) and ethylacetate extract (2 µg/20 µl).

Table 7. Residual activity of the antimicrobial compound by acid, alkali and heat treatments

Strain	Inhibitory zone(mm) with each treatment			
	None	Acid	Alkali	Heat
<i>E. coli</i> K-12	16	16.5	16	15.5
<i>B. subtilis</i> PCI 219	13	13	13	12.5

Culture broth was treated at pH 2.0, pH 11.0 and 121°C, respectively. Residual activity of antimicrobial compound was detected as described in Table 4.

Table 8. Antimicrobial activity of eluted peaks^a

Peak ^b	Inhibitory zone(mm)	
	<i>E. coli</i> K-12	<i>B. subtilis</i> PCI 219
1	15	13
2	20	16

a: The peak come from peak 1 and peak 2 from HPLC elution pattern of Fig. 3. b: Each peak was prepared from the three runs of HPLC in Fig. 2.

방선균인 MO-16 균주를 분리하여 속의 동정, 항균성 물질의 정제 및 생산 조건을 검토하였다. 분리균주 MO-16은

배양학적, 형태학적, 생리적 특성 및 현미경 검정을 통하여 *Amycolatopsis* sp.으로 추정되었다. 또한 분리균주의 methanol 산화효소 생산을 검토한 결과 산화에 다양한 전자수용체를 가지는 multi-enzyme의 생산이 예상되었다. 항균성 물질 생산에 methanol의 농도는 큰 영향이 없었으며, 질소원으로는 유기질소원인 corn steep liquor와 peptone이 우수하였다. MO-16 균주에 의해 생산된 항균성 물질의 항균 spectrum은 Gram(+) 및 Gram(-)세균에 강한 항균력을 보였으며, ethylacetate 추출물의 경우 효모에도 항균력을 나타내었다. 항균성 물질의 성질을 조사한 결과 산처리(pH 2.0), 알칼리처리(pH 11.0), 열처리(121°C, 1기압, 30분)한 경우 처리전과 동일한 저해효과를 보인 점에서 분리균주 MO-16이 생산하는 항균성 물질은 protein성 물질이 아니며 상당히 안정한 물질인 것으로 추정되었다. 항균성 물질의 분리는 배양액을 ethylacetate로 추출하여 농축한 후 silica gel column chromatography를 수행한 다음 reverse phase HPLC로써 분석하였다. 두 개의 peak를 분리하여 항균활성을 검토한 결과 peak 2가 강한 항균력을 보였으며, peak 2를 정제한 결과 retention time 19.178분에 단일 peak로써 확인되었으며 정제도는 98%였다.

REFERENCES

1. Bystrykh, L. V., N. I. Govoruchina, L. Dijkhuizen, and J. A. Duine. 1997. Tetrazolium-dye-linked alcohol dehydrogenase of the methylotrophic actinomycete *Amycolatopsis methanolica* is a three-component complex. *Eur. J. Biochem.* **247**: 280–287.
2. De boer, L., G. J. Euverink, J. van der Vlag, and L. Dijkhuizen. 1990. Regulation of methanol metabolism in the facultative methylotroph sp. 239 during growth on mixed substrates in batch and continuous cultures. *Arch. Microbiol.* **153**: 337–343.
3. De Boer, L., L. Dijkhuizen, G. Grobben, M. Goodfellow, E. Stackebrandt, J. H. Parlett, D. Whitehead, and D. Witt. 1990. *Amycolatopsis methanolica* sp. nov., a facultatively methylotrophic actinomycete. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**: 194–204.
4. Duine, J. A., J. Frank, and M. P. J. Berkhout. 1984. NAD-dependent PQQ-containing methanol dehydrogenase: A bacterial dehydrogenase in a multi-enzyme complex. *FEBS Lett.* **168**: 217–221.
5. Hamada, M. and M. Manabe. 1988. *Experimental Methods of Identification of Actinomycetes*, pp. 35–57. The society for Actinomycetes Japan, Tokyo (in Japanese).
6. Hazeu, W., J. C. de Bruyn, and J. P. van Dijken. 1983. *Nocardia* sp. No. 239, a facultative methanol utilizer with the ribulose monophosphate pathway of formaldehyde fixation. *Arch. Microbiol.* **135**: 205–210.
7. Kato, N., K. Tsuji, Y. Tani, and K. Ogata. 1974. A methanol-utilizing actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* **52**: 917–920.
8. Kato, N., K. Tsuji, Y. Tani, and K. Ogata. 1975. *Microbial C1-compounds*, pp. 91–98. The Society of Fermentation Technology.
9. Kim, S. W., D. M. A. M. Luykx, S. de Vries, and J. A. Duine. 1996. A second molybdoprotein aldehyde dehydrogenase from *Amycolatopsis methanolica* NCIB 11946. *Arch. Biochem. Biophys.* **325**: 1–7.
10. Kim, H. S. 1996. Isolation and production of antifungal compound from methylotrophic actinomycetes. *J. Inst. Nat. Sci.* **15**: 225–234.
11. Kim, H. S., J. O. Shin, and T. S. Yu. 1997. Production of aminoglycoside-resistant inhibitor from methylotrophic actinomycetes. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **12**: 96–102.
12. Masayuki H. and H. Nomomura. 1989. A new method for intensive isolation of actinomycetes from soil. *Actinomycol.* **3**: 95–104.
13. Miyadoh, S., M. Hamada, K. Hotta, T. Kudo, A. Seino, G. Vobis, and A. Yokota. 1997. *Atlas of Actinomycetes*, pp. 44–45. The Society for Actinomycetes Japan.
14. Miyazak, S. S., I. Toki, Y. Izumi, and H. Yamada. 1987. Purification and characterization of methanol dehydrogenase of a serine producing methylotroph, *Hyphomicrobium methylovorum*. *J. Ferment. Technol.* **65**: 371–377.
15. Sahm, H. 1979. Production of scp by methanol utilizing microorganisms. *Int. Microbiol. and Food Ind. Congr. Paris.*
16. Tani, Y., N. Kato, Y. Izumi, S. Shimizu, K. Ogata, and H. Yamada. 1978. Microbial utilization of methanol. *Hakkokogaku Kaishi* **56**: 527–537.
17. Van Ophem, P. W., G. J. Euverink, L. Dijkhuizen, and J. A. Duine. 1991. A novel dye-linked alcohol dehydrogenase activity present in some Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **80**: 57–64.
18. Van Ophem, P. W., J. Van Beeumen, and J. A. Duine. 1993. Nicotinoprotein [NAD(P)-containing] alcohol/ aldehyde oxidoreductases purification and characterization of a novel type from *Amycolatopsis methanolica*. *Eur. J. Biochem.* **212**: 819–826.
19. Van Ophem, P. W., L. V. Bystrych, and J. A. Duine. 1992. Dye-linked dehydrogenase activities for formate and formate esters in *Amycolatopsis methanolica*. Characterization of molybdoprotein enzyme active with formate esters and aldehyde. *Eur. J. Biochem.* **206**: 519–525.
20. Williams, S. T., M. E. Sharpe, and J. G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
21. Yamaka, K. and K. Matsumoto. 1977. Purification, crystallization and properties of primary alcohol dehydrogenase from a methanol-oxidizing *Pseudomonas* sp. No. 2941. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 467–475.
22. Yoon, B. D., M. Ueno, and Y. Tani. 1987. Improvement of cytochrome c production by glycyl and glycyl analog resistant mutants of *Methylomonas* sp. *J. Ferment. Technol.* **65**: 629–634.

(Received June 14, 1999)