

碩士學位論文

Avian Myeloblast Virus Reverse Transcriptase

활성 저해 세균의 분리



濟州大學校 大學院

食品工學科

姜好貞

2008年 2月

# Avian Myeloblast Virus Reverse Transcriptase

## 활성 저해 세균의 분리

指導教授 高 榮 煥

姜 好 貞

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

2008年 2月

姜好貞의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 金 洙 賢 (印)

---

委 員 任 尙 彬 (印)

---

委 員 高 榮 煥 (印)

---

濟州大學校 大學院

2008年 2月

Isolation of Bacteria Producing Inhibitors  
against Avian Myeloblast Virus Reverse Transcriptase

Ho-Jung Kang  
(Supervised by Professor Young-Hwan Ko)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the  
degree of Master of Engineering

2008. 2.

This thesis has been examined and approved.

Thesis director, Soo-Hyun Kim, Prof. of Food Science and Engineering

Thesis director, Sang-Bin Lim, Prof. of Food Science and Engineering

Thesis director, Young-Hwan Ko, Prof. of Food Science and Engineering

February 2008

Department of Food Science and Engineering  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

# 목 차

Summary .....	1
I. 서론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	10
1. 재료 .....	10
1) 사용균주 .....	10
2) Reverse transcriptase assay .....	10
3) 사용배지 .....	10
2. 실험방법 .....	12
1) 토양 미생물의 분리 .....	12
2) 항바이러스성 물질 생산균주 검색 .....	12
(1) 미생물 세포의 배양 .....	12
(2) Reverse transcriptase 활성 저해제 검색 .....	12
3) 항바이러스성 물질 생산균주의 동정 .....	13
(1) 16S rDNA의 염기서열 분석 .....	13
(2) 미생물의 형태 관찰 .....	14

III. 결과 및 고찰 .....	15
1. 토양 미생물의 분리 및 Reverse transcriptase 저해 활성 측정 .....	15
1) Reverse transcriptase 활성 저해물질 생산 균주 선별 .....	17
2) 미생물 대사산물의 농도별 reverse transcriptase 활성 저해율 .....	19
3) 온도에 대한 안정성 .....	20
2. 항바이러스성 물질 생산균주의 동정 .....	21
1) 16S rDNA의 염기서열 분석 및 비교 .....	21
2) 미생물의 형태 관찰 .....	29
IV. 요약 .....	31
V. 참고문헌 .....	33

## Summary

To screen antiretroviral compounds from microbial metabolites, 300 soil microorganism strains focusing Actinomycete family were collected and purified in Jeju. Those microbial isolates were cultivated and their culture filtrates were used as the samples for screening antiretroviral compounds. Inhibitory activity of microbial culture filtrate against avian myeloblast virus (AMV) reverse transcriptase (RT) was determined.

About 87% of the 300 isolates showed AMV RT inhibitory activity in the primary screening test. Those isolates that showed higher than 60% inhibition of RT activity were chosen and their inhibitory activities were confirmed repeatedly using their cell-free culture filtrate. The inhibition rates of BLK268, BLK115, BLK418 and BLK338 were  $98.7 \pm 0.3\%$ ,  $97.9 \pm 0.2\%$ ,  $97.9 \pm 2.7\%$ , and  $95.9 \pm 1.6\%$ , respectively. The isolates BLK311, BLK90, BLK462-2, BLK248-2, CB249-2, and BLK107 showed more than 80% inhibition, and BLK4, BLK86, BLK123, and BLK39 higher than 70% inhibition of AMV RT activity. Among those isolates, six strains including BLK39, BLK90, BLK107, BLK115, BLK268 and BLK418 were chosen for further study.

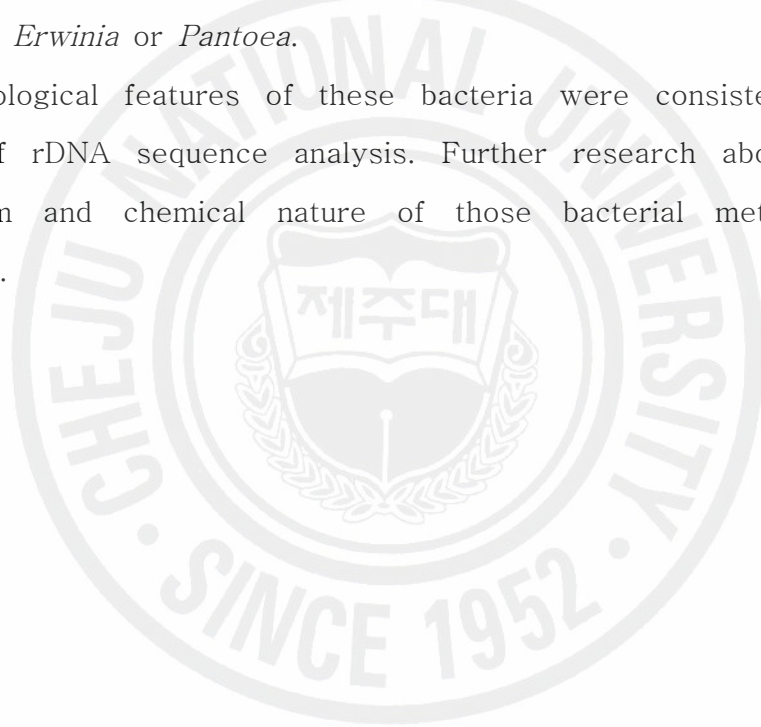
In order to confirm the dependence of the inhibitory activity on microbial metabolite concentration, the cell-free culture filtrates were diluted several folds and added to the RT activity assay system. The results demonstrated that RT inhibition rate increased in general as the dilution rate decreased.

The heat stability of active microbial metabolites were also investigated. When the culture filtrates were preincubated for 1 hour at 30°C or less, no decrease in the inhibitory activity was observed. But most of the isolates lost the inhibitory activity rapidly at temperatures

higher than 50°C, whereas the isolate BLK90 maintained relatively high inhibitory activity at above 50°C.

The unknown isolates were identified through 16S rRNA gene analysis. The nucleotide sequences of 16S rDNA from BLK39, BLK90, BLK107, BLK115, BLK268 and BLK418 were determined and compared with those of other known microbial species. The isolates BLK 39, BLK115, BLK268 and BLK418 showed more than 96% sequence homology with *Streptomyces* species. Meanwhile, the 16S rDNAs of isolate BLK90 and BLK107 were similar to those of gram negative bacteria which belong to the genus *Erwinia* or *Pantoea*.

Morphological features of these bacteria were consistent with the results of rDNA sequence analysis. Further research about inhibition mechanism and chemical nature of those bacterial metabolites are suggested.



## I. 서 론

우리가 살고 있는 지구상에는 수많은 종의 생물체들이 서로 공존공영하며 자신의 개체를 번식시키기 위하여 다양한 방법으로 생존하고 진화하였으며, 인간은 이러한 생물체간의 상호작용을 이해하고 이용하려는 노력을 지속해왔다. 바이러스도 그와 같은 생물체 중에 하나이며, 인간에게 바이러스 존재가 알려진 것은 그리 오래되지 않았다. 20세기에 들어 동식물뿐만 아니라 인간에게 치명적인 질병을 유발하면서부터 바이러스에 대한 관심이 높아졌다.

바이러스(virus)는 그 스스로 완전한 생명체 단위를 가지는 세균세포와는 달리, 바이러스 개체를 번식하기 위해서 숙주세포(host cell)를 이용하며, 핵산과 이를 싸고 있는 단백질 및 경우에 따라 소수의 효소로 이루어진 생물학적 활성을 가진 작은 입자이다. 바이러스는 숙주세포에 부착하여 바이러스의 핵산을 세포 내부로 유입시키고 숙주세포의 복제기관을 이용하여 증식하면서 질병을 일으킨다. 가축이나 식물에 병을 유발하는 것뿐만 아니라 많은 종류의 바이러스가 인간의 질병을 일으키는 것으로 알려졌다(1).

바이러스 감염 제어(control)란 숙주세포에 침입한 바이러스의 작용을 약하게 하거나 소멸시키기 위한 예방 또는 치료조치를 말한다. 백신을 이용한 제어방법이 예방적 차원에서 괄목할만한 성과를 거두고 있으나, 치료에 있어서는 그것만으로 부족하다. 바이러스는 살아있는 숙주세포에 기생하면서 복제 증식하기 때문에, 숙주세포에 부작용을 유발하지 않으면서 직접적으로 바이러스 입자를 공격하거나 바이러스 복제를 제어하는 것이 어려운 실정이다. 그럼에도 불구하고, 바이러스 특유의 효소나 바이러스 증식과정에 관여하는 고유의 단백질을 목표물로 하여 항바이러스성 물질을 탐색하고 있다(1, 2).

레트로바이러스(retrovirus)는 *Retroviridae* 과에 속하는 바이러스들로, 이들의 유전물질은 DNA가 아니라 RNA이다. 유전물질 RNA가 복제 증식되기 위해서는 RNA 분자를 본 뜬 DNA 분자가 주형 매체로 사용되어 그로부터 다수의 RNA 분자가 합성된다.



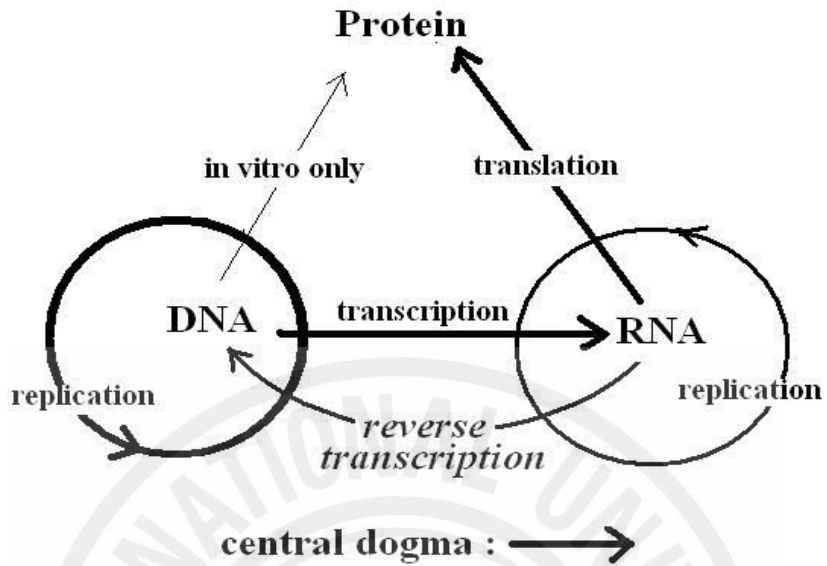


Fig. 1. Central dogma and reverse transcription

RNA 분자를 주형(template)으로 DNA 분자가 합성되는 반응을 역전사(reverse transcription)라 하며, 역전사효소(reverse transcriptase)에 의해서 촉진된다. 이는 유전정보의 흐름에 대한 일반론인 central dogma에서 DNA를 주형으로 RNA가 합성되는 반응인 전사(transcription)의 역방향 반응으로 'retro'의 의미는 여기서 유래하였다(Fig. 1).

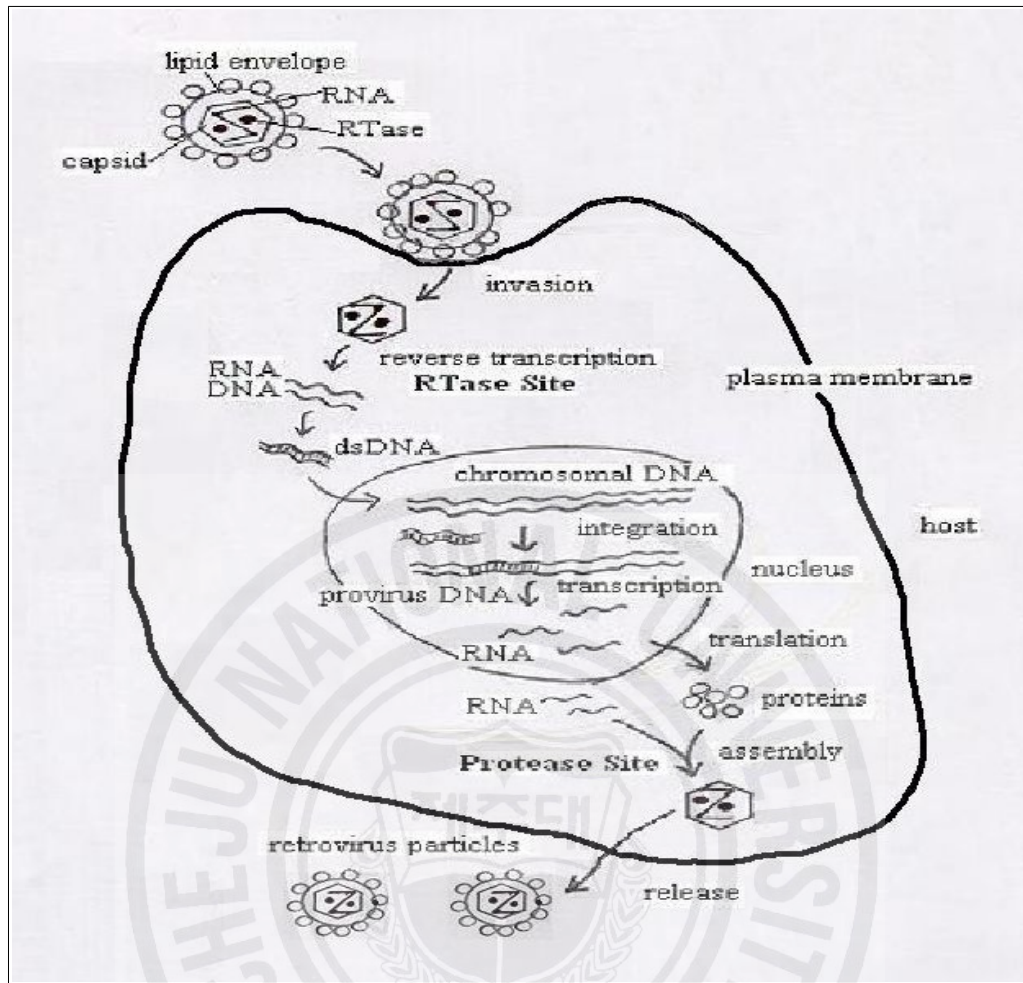


Fig. 2. Replication scheme of retrovirus.

숙주세포가 레트로바이러스에 감염될 때, RNA 분자와 역전사효소를 포함한 capsid는 세포질로 들어가고, 거기에서 역전사 반응이 일어난다. 역전사반응으로 합성된 바이러스의 DNA 분자는 숙주(host)의 염색체 DNA 속으로 삽입(integration)되어, provirus DNA 형태로 존재하며, 마치 숙주의 유전자 DNA인 것처럼 전사된다. 전사결과 생겨난 RNA 분자들은 해독(translation) 과정에 쓰이거나, 바이러스의 유전물질로 이용되어, 바이러스의 복제 증식에 쓰인다.

레트로바이러스는 특징적으로 고유의 reverse transcription, integrase, protease 등의 효소단백질을 생산하는데 필요한 유전자와 껍질 단백질을 만드는

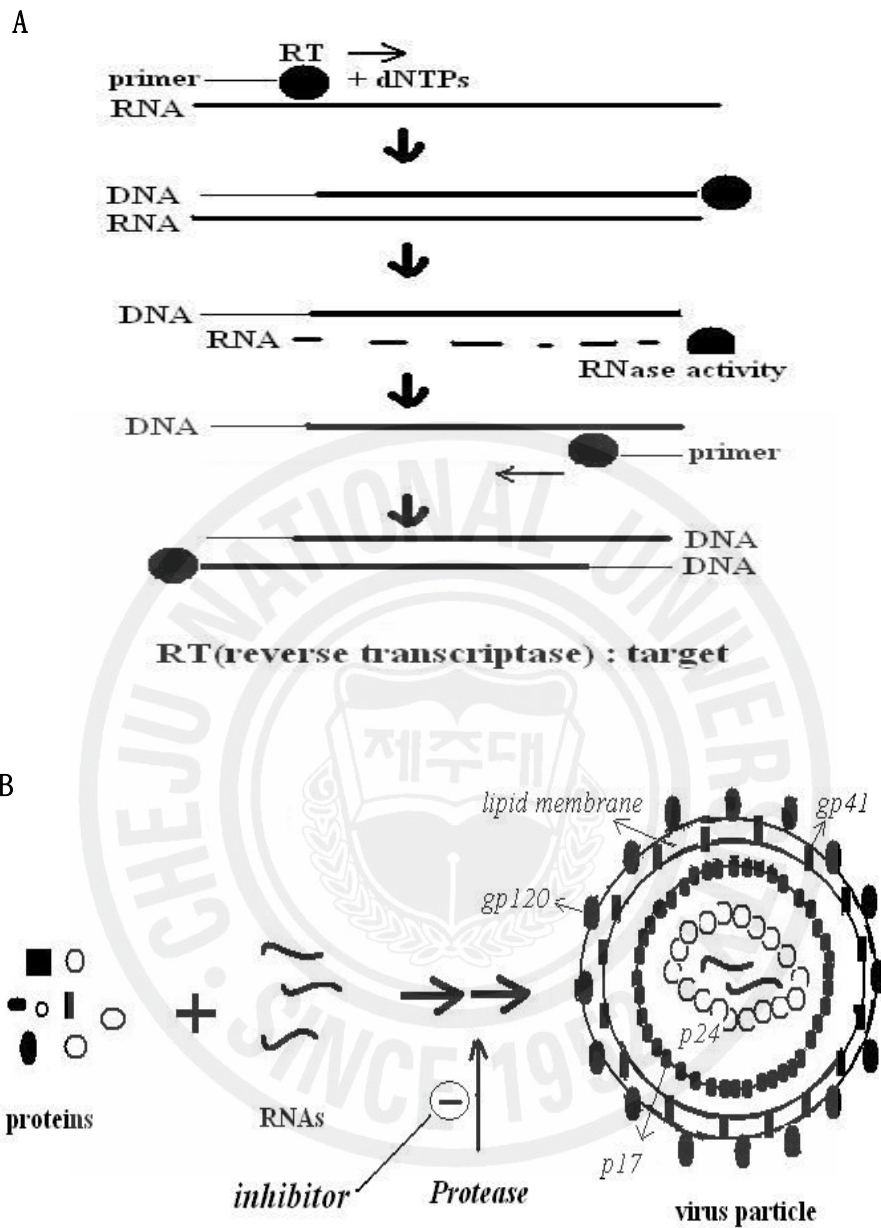
데 필요한 유전자를 지니고 있는데, 이들 유전자는 모두 숙주세포의 도움으로 전사되고, 단백질로 해독된다(Fig. 2).

*Retroviridae* 과에 속하는 레트로바이러스로는 avian leucosis virus(조류백혈병), mouse mammary tumour virus(유방종양), murine leukemia virus(쥐백혈병), feline(고양이) leukemia virus, bovine(소) leukemia virus, human T-lymphotropic virus(oncovirus, 종양), walleye dermal sarcoma virus(피부종양), human immunodeficiency(면역결핍증) virus 1, simian(원숭이) immunodeficiency virus, feline(고양이) immunodeficiency virus, 그리고 avian myeloblast virus(조류 골수아구증 바이러스) 등이 있다. 조류독감 바이러스 H5N1는 RNA 바이러스이나 역전사효소를 갖고 있지 않으며, *Orthomyxoviridae* 과로 분류된다. Hepatitis B 간염바이러스는 레트로바이러스가 아니지만, 역전사과정을 거쳐서 증식한다.

특히, 레트로바이러스는 숙주세포의 유전자 변형(transformation)을 일으켜 심각한 질병을 유발시키는 바이러스로서, 여러 가지 종양을 유도하는 것으로 확인되었다. 1980년대 AIDS가 human immunodeficiency virus(HIV)라는 레트로바이러스에 의해 유발된다는 것이 알려지면서 이 바이러스에 대한 관심이 높아졌다(1).

레트로바이러스는 복제에 중요한 역할을 하는 reverse transcriptase와 바이러스 성숙과정에 필수적인 효소인 protease를 내포하고 있으며, 이는 항바이러스성 물질을 탐색하기 위한 주요 목표물질로서 많이 이용되고 있다(1,2)(Fig. 3).

reverse transcriptase는 바이러스의 RNA genome을 주형으로 DNA를 합성하는 필수 효소(RNA-dependent DNA polymerase)로, 모든 레트로바이러스는 reverse transcriptase를 갖고 있다. reverse transcriptase는 Moloney murine leukemia virus처럼 하나의 폴리펩티드(monomer)로, 또는 avian myeloblastosis virus처럼 두 개의 폴리펩티드(heterodimer)로 이루어진다.



**Fig. 3. Screening of antivirus inhibitor.**

A : Screening of reverse transcriptase inhibitor.

B : Screening of protease inhibitor.

현재까지 다양한 바이러스감염의 치료법과 항바이러스제제의 개발을 위한 연구가 지속적으로 진행되고 있으며, reverse transcriptase inhibitor 또는 nucleoside analogue 계통의 zidovudine, didanosine, zalcitabine, stavudine, lamivudine, abacavir, emtricitabine 과 nucleotide analogue인 tenofovir, adefovir, 그리고 efavirenz, nevirapine, delavirdine 등의 non-nucleoside inhibitor가 있다(1).

한편, viral protease inhibitor 로는 레트로바이러스의 복제를 저해하는 saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir 등이 알려져 있으며, 이와 별도로 hepatitis(간염) C virus 의 protease inhibitor에 대한 연구도 진행되고 있다.

이와 같은 연구업적에도 불구하고, 레트로바이러스의 극복을 위한 노력은 이들 화합물에 대한 내성을 나타내는 변이주의 출현과 이들 화합물의 숙주세포에 대한 독성으로 여전히 한계를 지니고 있다. 또한, 이들 화학요법(chemotherapy)은 장기투여할 경우 심각한 부작용이 보고되고 있어, 동·식물 및 미생물과 같은 천연물을 이용한 다양한 항바이러스제제의 연구개발이 활성화되고 있다(3-22).

reverse transcriptase의 촉매 반응특성과 반응에 사용되는 기질의 종류를 감안할 때, 특정 레트로바이러스에 대한 저해효과는 비슷한 다른 레트로바이러스에서도 재현될 가망성이 높다.

protease는 active site(활성부위) 및 작용기전에 따라 serine proteases, cysteine (thiol) proteases, aspartyl proteases 그리고 metalloproteases의 4 종류로 분류되는데, HIV-1 바이러스의 protease는 aspartyl protease 계통이다. 효소의 촉매작용을 저해하는 방법은 활성부위에 회복불가능한 타격을 입히거나, 효소와 기질의 결합을 방해하는 것이 보편적이다. 따라서, 특정의 protease 활성 저해제가 다수의 다른 바이러스에 대해서도 저해활성을 나타낼 수 있는 가능성이 풍부하다(6, 7)

옛날부터 인간은 각종 천연 생물의 다양한 기능을 이용하여 유용물질을 생산하고 활용하여 왔다. 항생제, 항산화제, 항암제, 효소저해제, 면역조절제 등 다양한 생리활성물질은 천연 생물자원이 가지고 있는 특수한 기능을 유용하게 활용한 것이다(22-27). 이러한 천연 생물자원으로부터 새로운 항바이러스 소재를 탐색하기 위한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다. *H. virginiana*로부터 추출된 폴리

페놀인 프로안토시아니딘과 tannin 화합물(shephagenins A와 B) 및 *S. argentea*의 잎으로부터 추출한 strictinin은 HIV-1 reverse transcriptase에 대하여 억제 활성을 나타냈다(8). *S. baicalensis* Georgi로부터 분리된 플라보노이드인 Baicalein은 항HIV-1활성을 나타냈으며, 이는 Baicalein이 HIV-1 envelop proteins과 숙주세포와의 상호작용을 방해하는 것으로 보고되었다(9, 10). 식물 유래의 flavonoid 화합물의 AMV reverse transcriptase 저해활성에 대한 보고(11)를 비롯하여, 이 밖에도 flavonoids, terpenoids, lignans, alkaloids 등 많은 phytochemicals들이 동정되어져 있다(12-18).

한편 자연계에서 가장 기본적인 생물체인 미생물에 대한 다양한 생리활성이 보고되어 왔으며, 이 중에서도 64% 이상은 방선균에 의한 것이다. 방선균은 하등 미생물 중에서 가장 형태분화가 잘 이루어진 세균이며, 항균항생제, 항암제, 효소저해제, 항바이러스제 등 방선균으로부터 다양한 생리활성물질을 탐색하기 위한 많은 연구가 이루어지고 있다(28-41). 일반적으로 토양 중에 존재하는 미생물의 10% 미만정도 분리 이용되고 있다고 한다. 따라서 자연계에는 아직까지 이용되지 않은 미지의 방선균이 많이 존재하고 있어 앞으로 새로운 생리활성물질을 탐색하는데 중요한 생물자원이 아닐 수 없다(28, 29). 그러나 방선균의 항바이러스 활성물질에 관한 보고는 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 레트로바이러스로 인한 동물 질병의 심각성을 인식하여, reverse transcriptase 활성을 저해하는 항바이러스성 대사산물을 탐색하고자 하였다. 그러기 위해서 제주지역의 토양으로부터 다수의 방선균 등을 순수분리 하였고, 이들을 배양하여 얻은 무균배양액을 시료로 사용하였다. 그 중 reverse transcriptase 저해 활성이 높은 균주를 선별 동정하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 사용균주

제주도 산간지역에서 채취한 토양으로부터 분리된 300여 균주의 미생물을 항바이러스 활성검색에 사용하였다. 그 중에서 항바이러스 활성이 우수한 균주를 선별 동정하였다.

#### 2) reverse transcriptase assay

Reverse transcriptase(RT) 활성 저해제(inhibitor) 검색 실험에 필요한 EnzChek™ Reverse Transcriptase Assay Kit E-22064(USA)는 Molecular사(USA)로 부터 구입하였고, 효소는 Promega사로부터 구입한 AMV(avian myeloblastosis virus) Reverse Transcriptase(M5101, USA)를 사용하였다.

#### 3) 사용배지

##### (1) 미생물 분리용 배지

토양시료로부터 미생물을 순수분리하기 위하여 Arginine-glycerol salts(AGS) agar를 사용하였고, 배지 조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Medium AGS composition for isolation of microorganisms

Arginine monohydrochloride	1.0 g
Glycerol	12.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
NaCl	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.01 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.001 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.001 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.001 g
Agar	15.0 g
Cyclohexamide	50 mg
Nystatin	50 mg
Soil extract	200 mL
Distilled water	800 mL

(2) 미생물 계대배양 배지

순수분리된 균주를 계대배양하기 위한 배지는 Table 2와 같은 조성의 Bennet's agar를 사용하였다.

Table 2. Medium Bennet's agar composition for subculture of microorganisms

Glucose	10 g
Peptone	2 g
Yeast extract	1 g
Beef extract	1 g
Agar	16 g
Distilled water	1000 mL



## 2. 실험방법

### 1) 토양 미생물의 분리

채취된 토양시료를 Petri dish에 넣고, 60-70°C의 건조기에 3시간 정도 건조하였다. 건조된 시료는 막자사발로 분말화시킨 다음, 멸균된 면봉에 소량씩 가볍게 묻혀 분리용 고체배지에 골고루 도포하였다. 접종된 배지를 27°C 항온배양기에 넣고 약 4주간 배양하는 동안에 형성되는 균락의 형태, 포자의 색깔, 색소 등을 기준으로 육안 선별하여 새로운 배지로 옮겼다. 다시 일정기간 배양한 후 형태적인 특성들을 상호 비교하여 상이한 균주들을 순수분리하였다.

### 2) 항바이러스성 물질 생산균주 검색

#### (1) 미생물 세포의 배양

항바이러스성 물질을 생산하는 균주를 검색, 선별하기 위하여 토양으로부터 순수분리된 균주를 Bennet's agar 배지에 접종하고 27°C에서 7일간 배양하였다. 생육상태가 좋은 세포를 Bennet's broth 배지에 옮겨서 27°C에서 7-10일간 진탕배양하였다. 배양액을 microfilter(0.45µm)로 여과하여 균체를 제거하여 무세포배양여액(cell-free culture filtrate)을 얻고, 이들을 4°C에 냉장보관하면서 활성 검사용 시료로 사용하였다.

#### (2) reverse transcriptase 활성 저해제 검색

300여종의 세균 및 방선균 배양액의 AMV reverse transcriptase(RT) 활성 저해(inhibition) 정도를 측정하기 위하여, Reverse Transcriptase Assay Kit를 사용하였다. 1mg/mL poly(A) ribonucleotide template와 50µg/mL oligo d(T)16 primer를 같은 용량비율로 섞고 실온에서 1시간 동안 annealing 시켰다. 이것을 polymerization buffer(60 mM Tris-HCl, 60 mM KCl, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 13 mM DTT, 100 µM dTTP, pH 8.1)로 200배 희석하여 역전사반응용 annealing mixture로 사용하였다. annealing mixture 20µL, 무세포배양여액 시료 2µL, AMV RT 0.5µL, 그리고 enzyme dilution buffer(50 mM Tris-HCl, 20% glycerol, 2 mM DTT, pH 7.6) 2.5µL를 모두 microtube(500µL)에 넣고,

25℃에서 30분 동안 배양한 후, 200 mM EDTA를 2μL 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응액을 전부 96-well microplate에 옮기고, 1 X TE(Tris-EDTA) buffer로 345배 희석된 PicoGreen 시약을 173 μL씩 첨가하였다. DNA 이중가닥 또는 RNA-DNA 혼성가닥은 PicoGreen 시약에 의해 구분된다. 3분 정도 실온에서 반응시킨 후 Fluorometer(excitation 485nm, emission 520nm)로 형광도를 측정하였다. 그로부터 RT 활성 저해율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\% \text{ Inhibition} = \left( 1 - \frac{B - C}{A} \right) \times 100$$

A : fluorescence without sample(normal RT reaction)

B : fluorescence with cell-free culture filtrate sample

C : fluorescence without enzyme(negative control, back ground)

### 3) 항바이러스성 물질 생산균주의 동정

#### (1) 16S rDNA의 염기서열 분석

16S rDNA의 염기서열을 분석하기 위해서, 먼저 분리주의 세포를 Bennet' agar배지에 접종하여 27℃에서 7일간 배양하였다. 배양균체를 취하여 염색체(chromosomal) DNA 분리용 시료로 사용하였다. DNA 분리에는 Ausubel 등(1993)의 방법을 변형하여 사용하였으며, 분리된 염색체 DNA를 template로 사용하여, polymerase chain reaction(PCR)방법으로 16S rDNA를 증폭시켰다. 16S rDNA sequencing에 사용할 forward primer로는 27F: 5'-AGAGTTTGATCA TGGCTC AG-3', reverse primer는 1522r : 5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3'이다. PCR 반응액은 5 μL template(50 ng/μL), 5 μL 10× reaction buffer (100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 500 μg/mL BSA, pH 8.3), 5 μL deoxynucleoside triphosphates(2.5 mM each), primer 각 1 μL (10 pmol/μL)씩, 그리고 멸균된 3차 증류수를 섞어서 총량 50 μL로 만들었다. 이 혼합액을 thermocycler (MJ RESEARCH, USA)에 넣고 16s ribosomal DNA를 증폭시켰다. PCR 반응은 94℃에서 1분간 denaturation,

55℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 1분 30초 동안 polymerization시키는 조건으로 30 cycle을 반복 실시하였으며 최종적으로 72℃에서 10분간 증폭시켰다. PCR 반응생성물 DNA는 1.0% agarose gel 상에서 1.5kb의 크기를 확인하였다. PCR로 증폭된 DNA를 PCR product 정제용 kit (QIAGEN)로 정제한 후, sequencing하였다. 이와같은 방법으로 얻어진 DNA의 염기서열을 National Center for Biotechnology Information (NCBI) Genbank(U.S. National Library of Medicine, Bethesda, Maryland)의 BLAST nucleotide search를 통하여, 16s ribosomal DNA를 확인하였고, nucleotide homology similarity를 비교하여 미지의 미생물 균주를 동정하였다.

## (2) 미생물의 형태 관찰

항바이러스성 물질을 생산하는 균주를 Bennet's agar 배지에 접종하고 27℃에서 7~21일간 배양한 후 생육정도, 기균사 및 균락표면의 형태 및 색깔 등을 관찰하였다. 형태적 특성을 관찰하기 위하여 21일간 배양하여 생긴 균락의 균체를 채취하여 그람(Gram) 염색하고 광학 현미경으로 검경하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 토양 미생물의 분리 및 reverse transcriptase의 저해 활성 측정

제주도 산간 지역에서 채취한 토양으로부터 미생물을 분리하기 위하여 미생물 분리 배지인 AGS agar배지에 토양 분말을 도말하고 약 4주간 배양하였다. 이때 형성되는 균주들의 형태적인 특성들을 상호 비교하여 300여종의 미생물을 순수분리하였다. 순수분리된 미생물 300여종의 배양액을 시료로 사용하여 AMV reverse transcriptase(RT)의 저해 활성을 조사하였다. 1차 검색 실험 결과, 300여종의 균주 중 87%가 AMV RT 저해 활성이 있는 것으로 나타났으며, 그 중 활성 저해율이 50% 이상으로 나타난 균주는 20%에相当하였다(Table 3).

Table 3. Inhibitory effects of microorganisms isolates against AMV reverse transcriptase.

Microbial isolate	Reverse transcriptase inhibition rate(%)
BLK4	72.6
BLK5	59.8
<b>BLK39</b>	<b>68.6</b>
BLK79	67.5
BLK82	69.9
BLK84	60.9
BLK85	55.3
BLK86	79.5
BLK89	54.9
<b>BLK90</b>	<b>90.9</b>
BLK107	78.3
<b>BLK115</b>	<b>97.2</b>

Table 3. Continued

Microbial isolate	Reverse transcriptase inhibition rate(%)
BLK122	60.6
BLK123	71.4
BLK126	51.2
BLK150	61.2
BLK240	54.3
BLK247	63.4
<b>BLK268</b>	<b>95.3</b>
BLK311	86.8
BLK333	59.4
BLK334	50.5
BLK338	90.1
BLK344	70.3
BLK383	54.5
<b>BLK418</b>	<b>96.5</b>
BLK490	64.1
BLK499	61.0
BLK205-1	64.1
BLK230-1	76.2
BLK248-2	82.5
BLK249-2	86.5
BLK31-1	74.8
BLK462-2	79.1
BLK498-1	70.0
BLK9-1	53.8
BLKRIIMK3-8	65.0

### 1) reverse transcriptase 활성 저해물질 생산 균주 선별

reverse transcriptase(RT)의 활성을 저해하는 대사산물 생산 균주를 선별하기 위하여 1차적으로 60% 이상의 저해율을 보인 균주를 선택하였고, 이들 균주의 배양액을 사용하여 RT 활성 저해실험을 3반복 실시하였으며, 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

AMV RT 저해 활성은 BLK268이  $98.7 \pm 0.3\%$ , BLK115가  $97.9 \pm 0.2\%$ , BLK418이  $97.9 \pm 2.7\%$ , BLK338이  $95.9 \pm 1.6\%$ 의 순으로 높은 저해 활성을 나타냈다. BLK311, BLK90, BLK462-2, BLK248-2, CB249-2, BLK107은 80% 이상의 저해 활성을 보였으며, BLK4, BLK86, BLK123, BLK39은 70% 이상의 저해 활성을 나타냈다. 그 중에서도 저해 활성이 비교적 높은 BLK39, BLK90, BLK107, BLK115, BLK268 그리고 BLK418 등 균주 6종을 2차적으로 선별하였다. 이들 균주들은 주로 방선균류에 속하는 것으로, 서로 비슷하거나 또는 동일한 대사산물을 생산할 수도 있다.

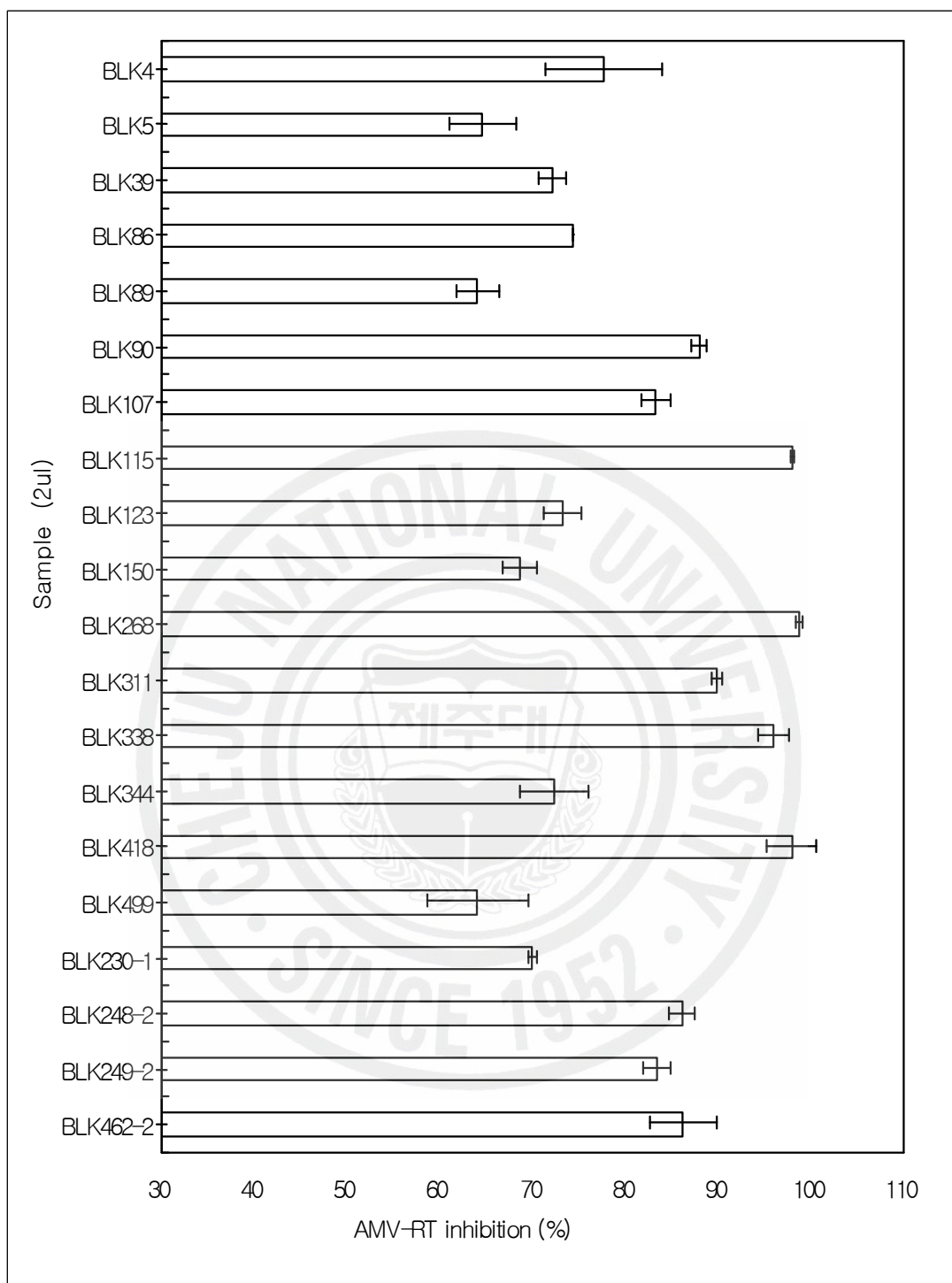


Fig. 4. Inhibition of AMV reverse transcriptase activity by cell-free culture filtrate of microbial isolates. The results are the mean  $\pm$  S.D. from three replications.

## 2) 미생물 대사산물의 농도별 reverse transcriptase 활성 저해율

AMV RT에 대한 85% 이상 저해 활성을 나타낸 BLK268, BLK115, BLK418, BLK90, BLK39 등의 균주를 선별하였다. 선별된 균주의 무세포 배양 여액을 희석하여, 희석배율에 따른 저해 활성을 조사하였는데, 그 결과, 희석 배율이 감소함에 따라 AMV RT 저해 활성이 증가함을 보였다(Fig. 5). 즉, 미생물 대사산물의 농도가 증가함에 따라, RT 저해활성이 또한 증가하여, 저해활성의 변화는 미생물 대사산물에 기인하였다고 해석할 수 있다.

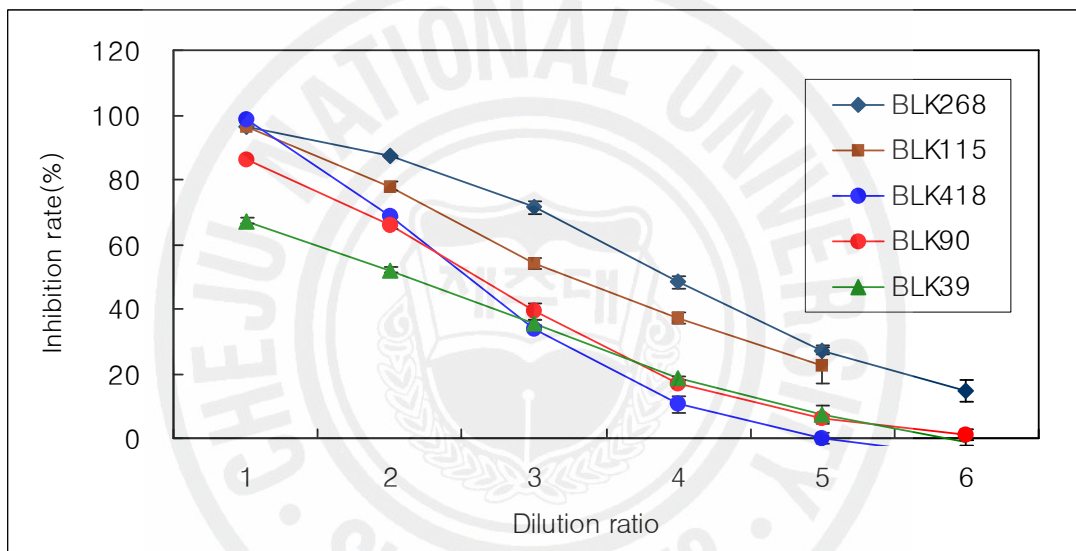


Fig. 5. Dependence of AMV reverse transcriptase inhibition activity on dilution rate of cell-free culture filtrates from selected microbial isolates. The results are the mean  $\pm$  S.D. from three replications.



## 2) 온도에 대한 안정성

선별된 균주가 생산하는 대사산물의 온도에 대한 안정성을 조사하기 위하여 선별 균주 BLK39, BLK90, BLK115, BLK268, 그리고 BLK418의 무세포 배양 여액을 0℃, 10℃, 20℃, 30℃, 40℃, 50℃, 75℃, 100℃ 온도에서 각각 1시간 동안 가열처리한 후, 시료 중에 남아있는 AMV RT 저해 활성을 측정하였다.

그 결과, Fig. 6에 나타낸 바와 같이, 전체 시료 모두 30℃에서는 RT 저해활성이 소실되지 않았다. 그러나 가열온도가 50℃ 이상일 때는, BLK90 시료를 제외한 시료 모두 RT 저해활성이 급격히 감소되었으며, BLK90인 경우 높은 온도에서도 비교적 안정된 저해 활성을 유지하고 있었다. 시료의 예비 가열온도에 따라 저해활성의 변화를 나타내는 것은, RT 저해 활성이 시료의 영향 때문임을 재확인해할 수 있었다.

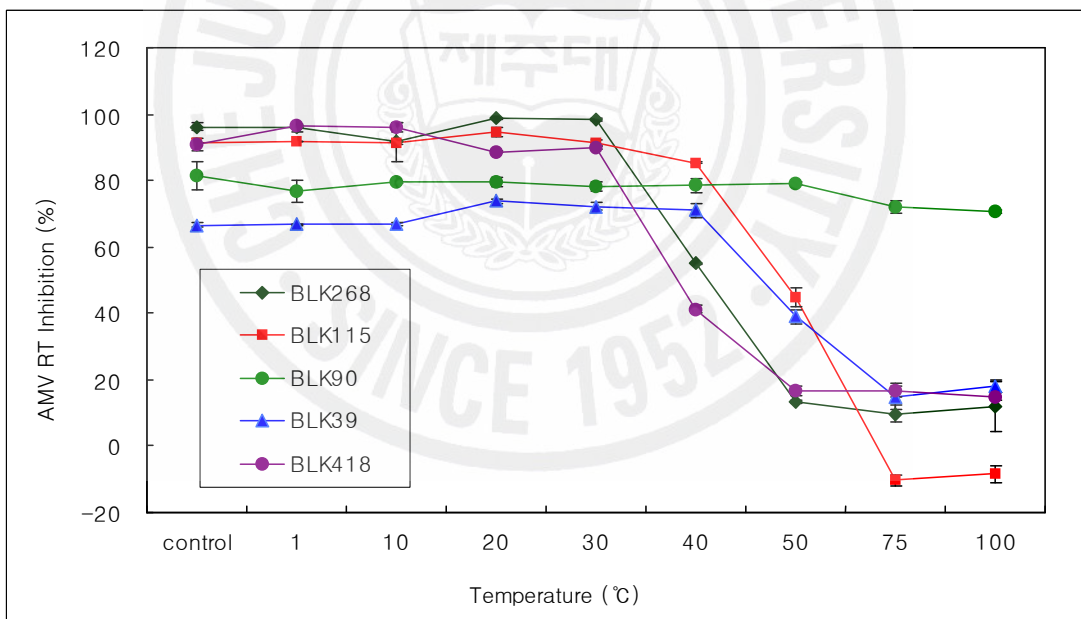


Fig. 6. Effect of preheating on AMV reverse transcriptase inhibition activity of cell-free culture filtrates from selected microbial isolates. The cell-free culture filtrates were incubated for 1 hour respectively at 0℃ through 100℃. The results are the mean  $\pm$  S.D. from three replications.

## 2. 항바이러스성 물질 생산균주의 동정

### 1) 16S rDNA의 염기서열 분석 및 비교

AMV RT의 저해 활성이 높은 분리주들의 16S ribosomal DNA 염기서열을 결정하고, NCBI Genbank의 BLAST nucleotide search를 통하여, 16s rDNA를 확인하였고, nucleotide homology similarity를 비교하여 미지의 미생물 2개 균주를 동정하였다. 그리고, nucleotide homology similarity 비교 결과를 Gendoc 프로그램을 이용하여 나타내었다(Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10, Fig. 11, Fig. 12).

순수분리된 BLK39 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석한 결과 (Fig. 7), BLK39는 *Streptomyces* sp. MP47-91 (EU263063), *Streptomyces* sp. HBUM 172143 (EU158342)와 99%, *Streptomyces flavofungini* (EF571003), *Streptomyces griseus* strain 45H (EF571002)와 99%의 높은 상동성을 보였다. 또한, 순수분리된 BLK 90 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석한 결과 (Fig. 8)에 따르면, *Pantoea ananas* (AB004758)의 16S ribosomal RNA와 99%, *Pantoea ananatis* strain LMG 20106 (AF364844)과 *Erwinia ananas* (U80196), *Erwinia uredovora* (U80209)의 16S rRNA 유전자 염기서열과 99%의 높은 상동성을 보였다. BLK107(Fig. 9)은 *Pantoea ananatis* strain ESS29 (EF602556), *Pantoea ananatis* strain ESS12 (EF602555), *Pantoea ananatis* strain S32 (AY741161), *Pantoea ananatis* (DQ517335)와 100%의 상동성을 보였다. BLK 115(Fig. 10) strain의 16s ribosomal RNA gene을 분석한 결과 *Streptomyces* sp. SX-4 (AM889497), *Streptomyces* sp. HB-4(AM889475), *Streptomyces* sp. BD-121 (AM889471)의 ribosomal RNA와 99%의 높은 상동성을 보였다. BLK268(Fig. 11)은 Uncultured *actinobacterium* clone GASP-MB3S2 E11(EF665687) 16S ribosomal RNA gene과 93%, Uncultured bacterium clone FFCH13525(EU134989) 과 92%, Uncultured *actinobacterium* clone GASP-MA3W2 E11(EF663788)과 93%, Uncultured *actinobacterium* clone AUVE-04D03(EF651133) 16S ribosomal RNA gene과 92%의 상동성을 보였으며, 이는 아직까지 보고되지 않은 신종일

가능성이 높음을 시사한다. BLK418(Fig. 12)은 *Streptomyces flaveolus* strain NRRL B-1334 (EF654098) 16S ribosomal RNA gene과 97%, *Streptomyces cinnamocastaneus* (AB184588)과 97%, *Streptomyces graminearus* (EF371437) strain 14318 과 96%, *Streptomyces coelicoflavus* (EF063496) strain 4683의 16S ribosomal RNA gene과 96%의 상동성을 보였다.

*Streptomyces* 속은 토양 속에서 흔히 발견되는 우점종이다. *Erwinia* 와 *Pantoea* 속은 Enterobacteriaceae 과에 속하는 그람 음성 세균류로, 식물체에 병원성이 있는 경우가 많다.



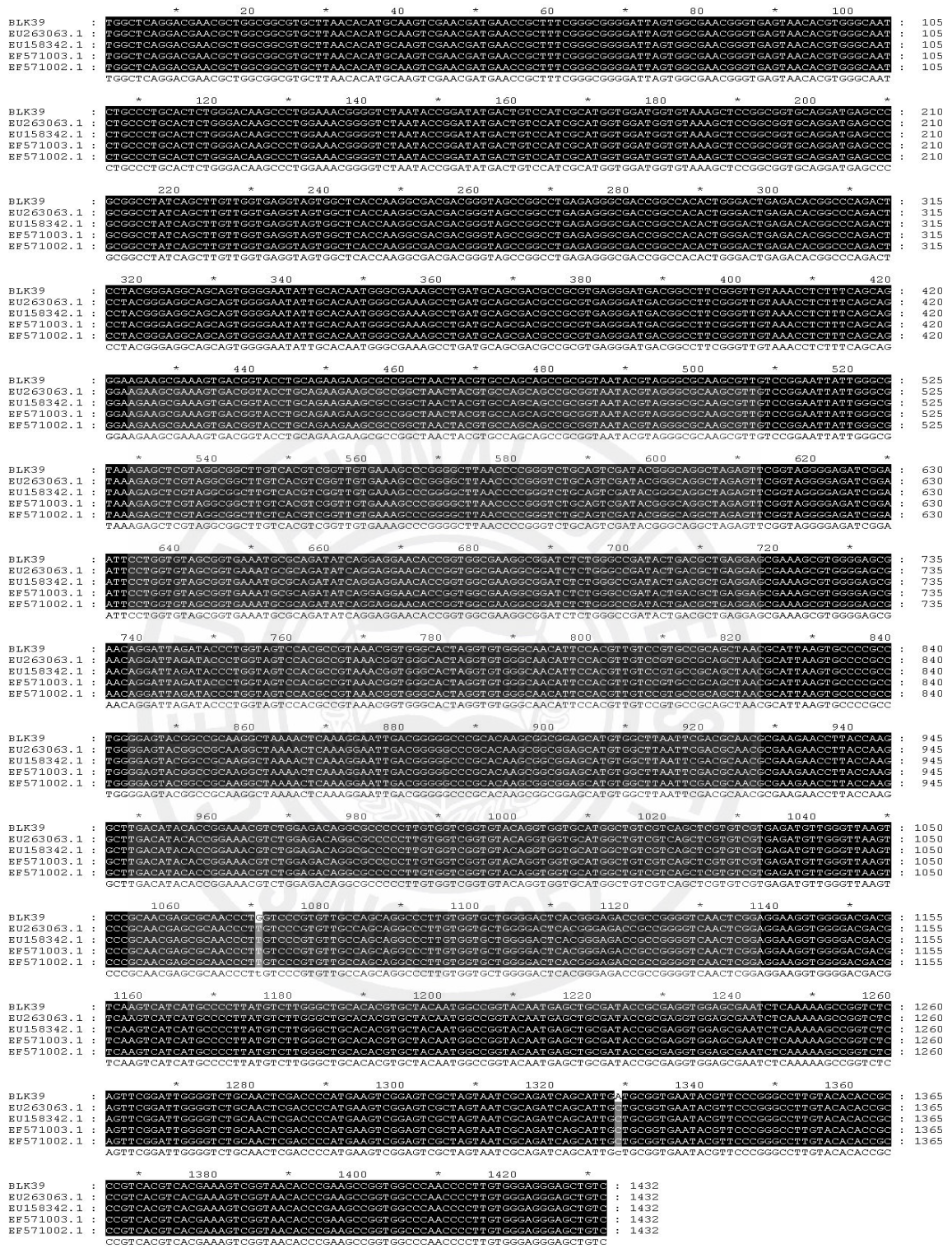


Fig. 7. Nucleotide sequence alignment of 16S ribosomal RNA genes from isolate BLK39 and other known species.

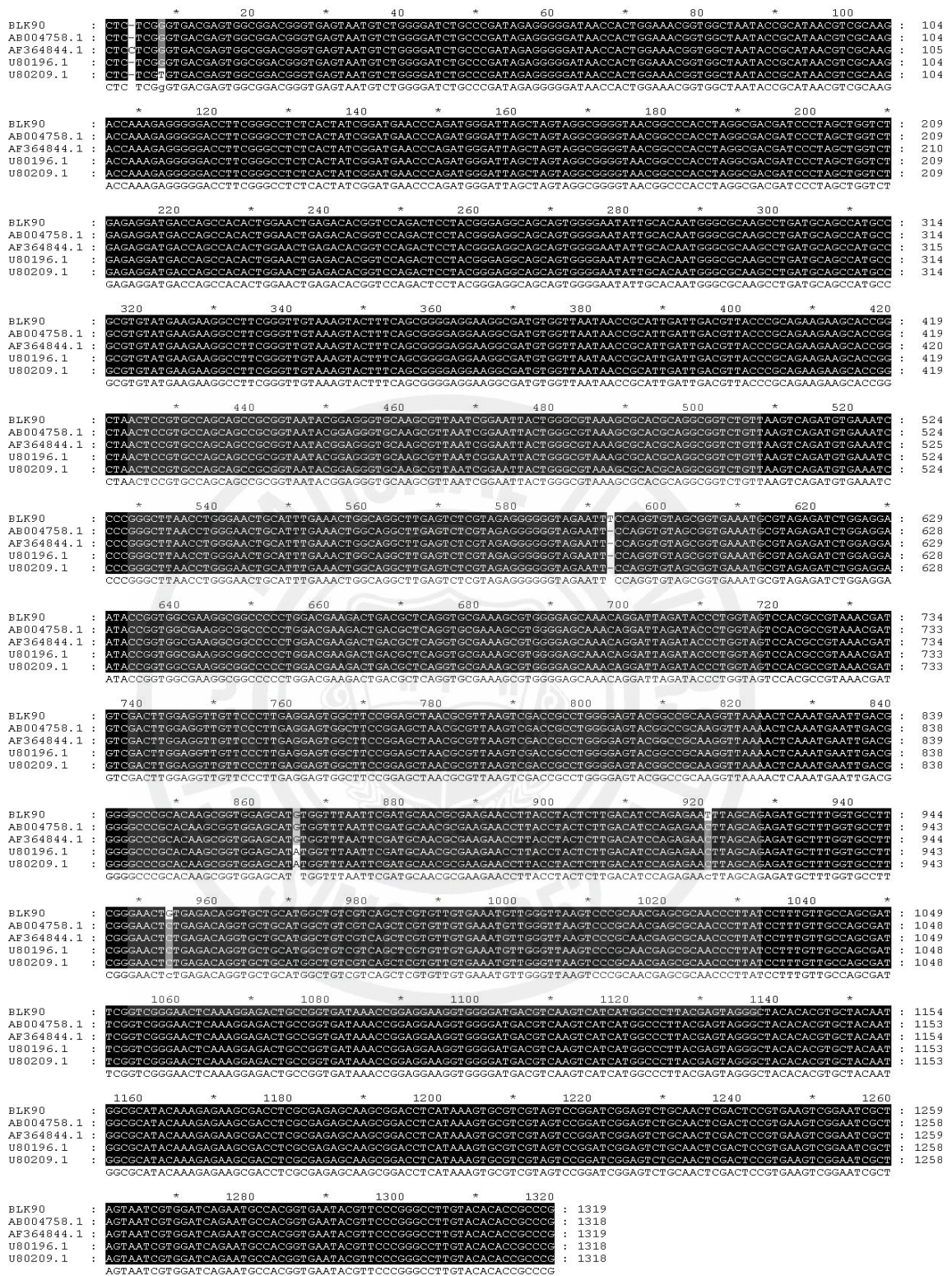


Fig. 8. Nucleotide sequence alignment of 16S ribosomal RNA genes from isolate BLK90 and other known species.

```

      *          20          *          40          *          60          *          80          *          100
BLK107 : CTTCTCTCTCGGGTACAGAGTGGCGGACGGGTGACTAATGTCCTGGGGATCTGCCCATAGAGGGGGATAACCACTGGAACCGGTGGCTAATACCGGATAACGTCGG : 105
EF602556.1 : CTTCTCTCTCGGGTACAGAGTGGCGGACGGGTGACTAATGTCCTGGGGATCTGCCCATAGAGGGGGATAACCACTGGAACCGGTGGCTAATACCGGATAACGTCGG : 105
EF602555.1 : CTTCTCTCTCGGGTACAGAGTGGCGGACGGGTGACTAATGTCCTGGGGATCTGCCCATAGAGGGGGATAACCACTGGAACCGGTGGCTAATACCGGATAACGTCGG : 105
AY741161.1 : -----TCTCGGGTACAGAGTGGCGGACGGGTGACTAATGTCCTGGGGATCTGCCCATAGAGGGGGATAACCACTGGAACCGGTGGCTAATACCGGATAACGTCGG : 100
DQ517335.1 : CTTCTCTCTCGGGTACAGAGTGGCGGACGGGTGACTAATGTCCTGGGGATCTGCCCATAGAGGGGGATAACCACTGGAACCGGTGGCTAATACCGGATAACGTCGG : 105
ct g TCTCGGGTACAGAGTGGCGGACGGGTGACTAATGTCCTGGGGATCTGCCCATAGAGGGGGATAACCACTGGAACCGGTGGCTAATACCGGATAACGTCGG

      *          120          *          140          *          160          *          180          *          200          *
BLK107 : AAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTCACTATCGGATGAACCCAGATGGGATAGCTAGTAGGCGGGGTAAACGGCCCACTAGGCGACGATCCCTAGCTGG : 210
EF602556.1 : AAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTCACTATCGGATGAACCCAGATGGGATAGCTAGTAGGCGGGGTAAACGGCCCACTAGGCGACGATCCCTAGCTGG : 210
EF602555.1 : AAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTCACTATCGGATGAACCCAGATGGGATAGCTAGTAGGCGGGGTAAACGGCCCACTAGGCGACGATCCCTAGCTGG : 210
AY741161.1 : AAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTCACTATCGGATGAACCCAGATGGGATAGCTAGTAGGCGGGGTAAACGGCCCACTAGGCGACGATCCCTAGCTGG : 205
DQ517335.1 : AAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTCACTATCGGATGAACCCAGATGGGATAGCTAGTAGGCGGGGTAAACGGCCCACTAGGCGACGATCCCTAGCTGG : 210
AAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTCACTATCGGATGAACCCAGATGGGATAGCTAGTAGGCGGGGTAAACGGCCCACTAGGCGACGATCCCTAGCTGG

      *          220          *          240          *          260          *          280          *          300          *
BLK107 : TCTGAGAGGATGACCAGCCACTGGAAGTGAACACCGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCAT : 315
EF602556.1 : TCTGAGAGGATGACCAGCCACTGGAAGTGAACACCGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCAT : 315
EF602555.1 : TCTGAGAGGATGACCAGCCACTGGAAGTGAACACCGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCAT : 315
AY741161.1 : TCTGAGAGGATGACCAGCCACTGGAAGTGAACACCGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCAT : 310
DQ517335.1 : TCTGAGAGGATGACCAGCCACTGGAAGTGAACACCGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCAT : 315
TCTGAGAGGATGACCAGCCACTGGAAGTGAACACCGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCAT

      *          320          *          340          *          360          *          380          *          400          *          420
BLK107 : GCCCGCTGATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGCGATGTGGTTAATAACCCGATTGATTGACGTTACCCGCAAGAAGACAC : 420
EF602556.1 : GCCCGCTGATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGCGATGTGGTTAATAACCCGATTGATTGACGTTACCCGCAAGAAGACAC : 420
EF602555.1 : GCCCGCTGATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGCGATGTGGTTAATAACCCGATTGATTGACGTTACCCGCAAGAAGACAC : 420
AY741161.1 : GCCCGCTGATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGCGATGTGGTTAATAACCCGATTGATTGACGTTACCCGCAAGAAGACAC : 415
DQ517335.1 : GCCCGCTGATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGCGATGTGGTTAATAACCCGATTGATTGACGTTACCCGCAAGAAGACAC : 420
GCCCGCTGATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGGCGATGTGGTTAATAACCCGATTGATTGACGTTACCCGCAAGAAGACAC

      *          440          *          460          *          480          *          500          *          520
BLK107 : CGGCTAACCCGTCGCCAGCAGCCGGTAAATACGGAGGGTGAAGCGTAAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCGAGGCGGCTGTTAAGTCAGATGTGAA : 525
EF602556.1 : CGGCTAACCCGTCGCCAGCAGCCGGTAAATACGGAGGGTGAAGCGTAAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCGAGGCGGCTGTTAAGTCAGATGTGAA : 525
EF602555.1 : CGGCTAACCCGTCGCCAGCAGCCGGTAAATACGGAGGGTGAAGCGTAAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCGAGGCGGCTGTTAAGTCAGATGTGAA : 525
AY741161.1 : CGGCTAACCCGTCGCCAGCAGCCGGTAAATACGGAGGGTGAAGCGTAAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCGAGGCGGCTGTTAAGTCAGATGTGAA : 520
DQ517335.1 : CGGCTAACCCGTCGCCAGCAGCCGGTAAATACGGAGGGTGAAGCGTAAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCGAGGCGGCTGTTAAGTCAGATGTGAA : 525
CGGCTAACCCGTCGCCAGCAGCCGGTAAATACGGAGGGTGAAGCGTAAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCGAGGCGGCTGTTAAGTCAGATGTGAA

      *          540          *          560          *          580          *          600          *          620          *
BLK107 : ATCCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTGACTCTCCTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAG : 630
EF602556.1 : ATCCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTGACTCTCCTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAG : 630
EF602555.1 : ATCCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTGACTCTCCTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAG : 630
AY741161.1 : ATCCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTGACTCTCCTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAG : 625
DQ517335.1 : ATCCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTGACTCTCCTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAG : 630
ATCCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAGGCTGACTCTCCTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAG

      *          640          *          660          *          680          *          700          *          720          *
BLK107 : GAATACCGGTGGCGAAGCGGGCCCTTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG : 735
EF602556.1 : GAATACCGGTGGCGAAGCGGGCCCTTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG : 735
EF602555.1 : GAATACCGGTGGCGAAGCGGGCCCTTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG : 735
AY741161.1 : GAATACCGGTGGCGAAGCGGGCCCTTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG : 730
DQ517335.1 : GAATACCGGTGGCGAAGCGGGCCCTTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG : 735
GAATACCGGTGGCGAAGCGGGCCCTTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG

      *          740          *          760          *          780          *          800          *          820          *          840
BLK107 : ATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAATGAATTGA : 840
EF602556.1 : ATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAATGAATTGA : 840
EF602555.1 : ATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAATGAATTGA : 840
AY741161.1 : ATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAATGAATTGA : 835
DQ517335.1 : ATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAATGAATTGA : 831
ATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAAATgaattga

      *
BLK107 : CGGGGGCCCGCACAAGCG : 858
EF602556.1 : CGGGGGCCCGCACAAGCG : 858
EF602555.1 : CGGGGGCCCGCACAAGCG : 858
AY741161.1 : CGGGGGCCCGCACAAGCG : 853
DQ517335.1 : ----- : -
cgggggcccgcacaagcg

```

Fig. 9. Nucleotide sequence alignment of 16S ribosomal RNA genes from isolate BLK107 and other known species.

```

BLK115      : 20      40      60      80      100
AM889497.1 : CTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGGGAACGGGTGAGTAAACAGCTGGGCAATC : 105
AM889475.1 : CTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGGGAACGGGTGAGTAAACAGCTGGGCAATC : 105
AB045878.1 : ---BCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGGGAACGGGTGAGTAAACAGCTGGGCAATC : 102
AM889471.1 : CTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGGGAACGGGTGAGTAAACAGCTGGGCAATC : 105
          *          *          *          *          *
BLK115      : 120      140      160      180      200
AM889497.1 : TGCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAcCACTCTGCTCgCATGGGcAGGGGTTgAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCG : 210
AM889475.1 : TGCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAcCACTCTGCTCgCATGGGcAGGGGTTgAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCG : 210
AB045878.1 : TGCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAcCACTCTGCTCgCATGGGcAGGGGTTgAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCG : 207
AM889471.1 : TGCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAcCACTCTGCTCgCATGGGcAGGGGTTgAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCG : 210
          *          *          *          *          *
BLK115      : 220      240      260      280      300
AM889497.1 : CGGCCATCAGCTTGTTGGTGAAGTAAATGGCTCACCAGGCGACACGGGTAGCCCGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC : 315
AM889475.1 : CGGCCATCAGCTTGTTGGTGAAGTAAATGGCTCACCAGGCGACACGGGTAGCCCGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC : 315
AB045878.1 : CGGCCATCAGCTTGTTGGTGAAGTAAATGGCTCACCAGGCGACACGGGTAGCCCGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC : 312
AM889471.1 : CGGCCATCAGCTTGTTGGTGAAGTAAATGGCTCACCAGGCGACACGGGTAGCCCGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC : 315
          *          *          *          *          *
BLK115      : 320      340      360      380      400      420
AM889497.1 : CTACGGGAGGACAGCTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAGCAGCCCGGTGAGGGATGACGGCCCTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGG : 420
AM889475.1 : CTACGGGAGGACAGCTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAGCAGCCCGGTGAGGGATGACGGCCCTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGG : 420
AB045878.1 : CTACGGGAGGACAGCTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAGCAGCCCGGTGAGGGATGACGGCCCTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGG : 417
AM889471.1 : CTACGGGAGGACAGCTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAGCAGCCCGGTGAGGGATGACGGCCCTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGG : 420
          *          *          *          *          *          *
BLK115      : 440      460      480      500      520
AM889497.1 : GAAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCGCGG--AACTACGTGCCAGAGCCCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTGTCCCGGAATTAATGGG : 522
AM889475.1 : GAAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCGCGG--AACTACGTGCCAGAGCCCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTGTCCCGGAATTAATGGG : 522
AB045878.1 : GAAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCGCGG--AACTACGTGCCAGAGCCCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTGTCCCGGAATTAATGGG : 519
AM889471.1 : GAAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCGCGG--AACTACGTGCCAGAGCCCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTGTCCCGGAATTAATGGG : 522
          *          *          *          *          *
BLK115      : 540      560      580      600      620
AM889497.1 : CGTAAAGAGCTCGTAGCCGGCTTGTCAAGTGGGTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTTCGCATTGATACGGGGTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATC : 626
AM889475.1 : CGTAAAGAGCTCGTAGCCGGCTTGTCAAGTGGGTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTTCGCATTGATACGGGGTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATC : 626
AB045878.1 : CGTAAAGAGCTCGTAGCCGGCTTGTCAAGTGGGTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTTCGCATTGATACGGGGTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATC : 623
AM889471.1 : CGTAAAGAGCTCGTAGCCGGCTTGTCAAGTGGGTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTTCGCATTGATACGGGGTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATC : 626
          *          *          *          *          *
BLK115      : 640      660      680      700      720
AM889497.1 : GGAATTCCTGCTTACCGGTCAAATGGCCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCCAGCCGATCTCTGGGCCATTACTGACCTGAGGACGGAAGCCGTGGGGA : 731
AM889475.1 : GGAATTCCTGCTTACCGGTCAAATGGCCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCCAGCCGATCTCTGGGCCATTACTGACCTGAGGACGGAAGCCGTGGGGA : 731
AB045878.1 : GGAATTCCTGCTTACCGGTCAAATGGCCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCCAGCCGATCTCTGGGCCATTACTGACCTGAGGACGGAAGCCGTGGGGA : 728
AM889471.1 : GGAATTCCTGCTTACCGGTCAAATGGCCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCCAGCCGATCTCTGGGCCATTACTGACCTGAGGACGGAAGCCGTGGGGA : 731
          *          *          *          *          *
BLK115      : 740      760      780      800      820      840
AM889497.1 : GCGAACAGGATTAGATACCTTGGTGTGTCACCGCTTAAACCGTGGGAAGTGGTGTGGCGACATTCACGTCGTCGGTGGCCGAGCTAACGGATTAAAGTCCCC : 836
AM889475.1 : GCGAACAGGATTAGATACCTTGGTGTGTCACCGCTTAAACCGTGGGAAGTGGTGTGGCGACATTCACGTCGTCGGTGGCCGAGCTAACGGATTAAAGTCCCC : 836
AB045878.1 : GCGAACAGGATTAGATACCTTGGTGTGTCACCGCTTAAACCGTGGGAAGTGGTGTGGCGACATTCACGTCGTCGGTGGCCGAGCTAACGGATTAAAGTCCCC : 836
AM889471.1 : GCGAACAGGATTAGATACCTTGGTGTGTCACCGCTTAAACCGTGGGAAGTGGTGTGGCGACATTCACGTCGTCGGTGGCCGAGCTAACGGATTAAAGTCCCC : 836
          *          *          *          *          *
BLK115      : 860      880      900
AM889497.1 : GCGTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGG : 899
AM889475.1 : GCGTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGG : 890
AB045878.1 : GCGTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGG : 896
AM889471.1 : GCGTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGG : 899
          *          *          *
          GCGTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGG

```

Fig. 10. Nucleotide sequence alignment of 16S ribosomal RNA genes from isolate BLK115 and other known species.

```

BLK268 : CCGCTCGG*GTGGGACTGAGACACGG*CCAC*CACCTACGGGTGGCAGCG*TTGGGAATCTTGCACAATGGGGGAAACCCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGAGGATGA : 107
EF665687 : CCGCTCGG*GTGGGACTGAGACACGG*CCAC*CACCTACGGGTGGCAGCG*TTGGGAATCTTGCACAATGGGGGAAACCCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGAGGATGA : 107
EUI134989 : CCGCTCGG*GTGGGACTGAGACACGG*CCAC*CACCTACGGGTGGCAGCG*TTGGGAATCTTGCACAATGGGGGAAACCCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGAGGATGA : 107
EF663788 : CCGCTCGG*GTGGGACTGAGACACGG*CCAC*CACCTACGGGTGGCAGCG*TTGGGAATCTTGCACAATGGGGGAAACCCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGAGGATGA : 107
EF651133 : CCGCTCGG*GTGGGACTGAGACACGG*CCAC*CACCTACGGGTGGCAGCG*TTGGGAATCTTGCACAATGGGGGAAACCCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGAGGATGA : 107
CCGCTCGG*GTGGGACTGAGACACGG*CCAC*CACCTACGGGTGGCAGCG*TTGGGAATCTTGCACAATGGGGGAAACCCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGAGGATGA

BLK268 : * 120 * 140 * 160 * 180 * 200 *
AGGATCTAGG*CTGTA*AACTCCTTTT*ATCG*GAAAGAT*TTAGGACGG*GACCGAT*GAATAAG*CC*GGCTAACT*CGTGCC*GCAGCCGCGGT*GAGACGTAGGGT*GC : 214
EF665687 : AGGATCTAGG*CTGTA*AACTCCTTTT*ATCG*GAAAGAT*TTAGGACGG*GACCGAT*GAATAAG*CC*GGCTAACT*CGTGCC*GCAGCCGCGGT*GAGACGTAGGGT*GC : 214
EUI134989 : AGGATCTAGG*CTGTA*AACTCCTTTT*ATCG*GAAAGAT*TTAGGACGG*GACCGAT*GAATAAG*CC*GGCTAACT*CGTGCC*GCAGCCGCGGT*GAGACGTAGGGT*GC : 214
EF663788 : AGGATCTAGG*CTGTA*AACTCCTTTT*ATCG*GAAAGAT*TTAGGACGG*GACCGAT*GAATAAG*CC*GGCTAACT*CGTGCC*GCAGCCGCGGT*GAGACGTAGGGT*GC : 214
EF651133 : AGGATCTAGG*CTGTA*AACTCCTTTT*ATCG*GAAAGAT*TTAGGACGG*GACCGAT*GAATAAG*CC*GGCTAACT*CGTGCC*GCAGCCGCGGT*GAGACGTAGGGT*GC : 214
GGATCTAGG CTGTA*AACTCCTTTT GAAAGATTTAGGACGGTACC GAATAAG aCCGGCTAACTaCGTGCCaGCAGCCGCGGTaGACGTAGGGT C

BLK268 : 220 * 240 * 260 * 280 * 300 * 320
AAGCGTTGTC*GGATT*TA*CTGGGCGTAAAGAGCGCGTAGGCCGT*TGTTAAGT*G*GAGTGA*AA*CTCC*GGGCTCA*ACC*GGAA*ACT*GCTT*GC*AT*ACT*GGCAG*AGC : 320
EF665687 : AAGCGTTGTC*GGATT*TA*CTGGGCGTAAAGAGCGCGTAGGCCGT*TGTTAAGT*G*GAGTGA*AA*CTCC*GGGCTCA*ACC*GGAA*ACT*GCTT*GC*AT*ACT*GGCAG*AGC : 320
EUI134989 : AAGCGTTGTC*GGATT*TA*CTGGGCGTAAAGAGCGCGTAGGCCGT*TGTTAAGT*G*GAGTGA*AA*CTCC*GGGCTCA*ACC*GGAA*ACT*GCTT*GC*AT*ACT*GGCAG*AGC : 320
EF663788 : AAGCGTTGTC*GGATT*TA*CTGGGCGTAAAGAGCGCGTAGGCCGT*TGTTAAGT*G*GAGTGA*AA*CTCC*GGGCTCA*ACC*GGAA*ACT*GCTT*GC*AT*ACT*GGCAG*AGC : 320
EF651133 : AAGCGTTGTC*GGATT*TA*CTGGGCGTAAAGAGCGCGTAGGCCGT*TGTTAAGT*G*GAGTGA*AA*CTCC*GGGCTCA*ACC*GGAA*ACT*GCTT*GC*AT*ACT*GGCAG*AGC : 320
aAGCGTTGTC*GGATT*TA*CTGGGCGTAAAGAGCGCGTAGGCCGT TGTTAAGT*G*GAGTGA*AA*CTCC*GGGCTCA*ACC*GGAA*ACT*GCTT GC*AT*ACT*GGCAG*AGC

BLK268 : * 340 * 360 * 380 * 400 * 420
TTGAGG*AA*G*CGAGAGG*TT*GTGGA*ATT*CC*GGT*G*TA*CGGT*GAA*AT*G*G*AT*AT*CA*GGAG*GA*AC*CC*AT*GG*CG*AA*GG*CA*G*CA*AA*CT*GG*CA*TT*AT*CT*G*AC*G*CT*G : 427
EF665687 : TTGAGG*AA*G*CGAGAGG*TT*GTGGA*ATT*CC*GGT*G*TA*CGGT*GAA*AT*G*G*AT*AT*CA*GGAG*GA*AC*CC*AT*GG*CG*AA*GG*CA*G*CA*AA*CT*GG*CA*TT*AT*CT*G*AC*G*CT*G : 428
EUI134989 : TTGAGG*AA*G*CGAGAGG*TT*GTGGA*ATT*CC*GGT*G*TA*CGGT*GAA*AT*G*G*AT*AT*CA*GGAG*GA*AC*CC*AT*GG*CG*AA*GG*CA*G*CA*AA*CT*GG*CA*TT*AT*CT*G*AC*G*CT*G : 428
EF663788 : TTGAGG*AA*G*CGAGAGG*TT*GTGGA*ATT*CC*GGT*G*TA*CGGT*GAA*AT*G*G*AT*AT*CA*GGAG*GA*AC*CC*AT*GG*CG*AA*GG*CA*G*CA*AA*CT*GG*CA*TT*AT*CT*G*AC*G*CT*G : 428
EF651133 : TTGAGG*AA*G*CGAGAGG*TT*GTGGA*ATT*CC*GGT*G*TA*CGGT*GAA*AT*G*G*AT*AT*CA*GGAG*GA*AC*CC*AT*GG*CG*AA*GG*CA*G*CA*AA*CT*GG*CA*TT*AT*CT*G*AC*G*CT*G : 428
TtGAGG*AA*G*CGAGAGG*TT*GTGGA*ATT*CC GGT*G*TA CGGT*GAA*AT*G TtGAT*AT*CA*GGAG*GA*AC*CC*AT*GG*CG*AA*GG*CA*G*CA*AA*CT*GG*CA*TT*AT*CT*G*AC*G*CT*G

BLK268 : * 440 * 460 * 480 * 500 * 520 *
AGGCGCGAAAGCGTGGG*AGCAAACAGGAT*TAGAT*ACCCTGGT*AGT*CC*CGCCCTAAAC*ATGGATACTAG*CGTAAGAGGTATCGACCCCTCTTGT*GC*GCAGCTA : 534
EF665687 : AGGCGCGAAAGCGTGGG*AGCAAACAGGAT*TAGAT*ACCCTGGT*AGT*CC*CGCCCTAAAC*ATGGATACTAG*CGTAAGAGGTATCGACCCCTCTTGT*GC*GCAGCTA : 535
EUI134989 : AGGCGCGAAAGCGTGGG*AGCAAACAGGAT*TAGAT*ACCCTGGT*AGT*CC*CGCCCTAAAC*ATGGATACTAG*CGTAAGAGGTATCGACCCCTCTTGT*GC*GCAGCTA : 535
EF663788 : AGGCGCGAAAGCGTGGG*AGCAAACAGGAT*TAGAT*ACCCTGGT*AGT*CC*CGCCCTAAAC*ATGGATACTAG*CGTAAGAGGTATCGACCCCTCTTGT*GC*GCAGCTA : 535
EF651133 : AGGCGCGAAAGCGTGGG*AGCAAACAGGAT*TAGAT*ACCCTGGT*AGT*CC*CGCCCTAAAC*ATGGATACTAG*CGTAAGAGGTATCGACCCCTCTTGT*GC*GCAGCTA : 535
AGGCGCGAAAGCGTGGG*AGCAAACAGGAT*TAGAT*ACCCTGGT*AGT*CC*CGCCCTAAAC ATGGATACTAG*CGTAAGAGGTATCGACCCCTCTTGT*GC*GCAGCTA

BLK268 : 540 * 560 * 580
ACGCAT*TAAGT*AT*CCCGCT*GGG*AGT*ACGGCCG*CAAGG*TT*GAA*ACTC : 582
EF665687 : ACGCAT*TAAGT*AT*CCCGCT*GGG*AGT*ACGGCCG*CAAGG*TT*GAA*ACTC : 583
EUI134989 : ACGCAT*TAAGT*AT*CCCGCT*GGG*AGT*ACGGCCG*CAAGG*TT*GAA*ACTC : 583
EF663788 : ACGCAT*TAAGT*AT*CCCGCT*GGG*AGT*ACGGCCG*CAAGG*TT*GAA*ACTC : 580
EF651133 : ACGCAT*TAAGT*AT*CCCGCT*GGG*AGT*ACGGCCG*CAAGG*TT*GAA*ACTC : 579
ACGCAT*taagT*AT*CCCGCT*GGG*AGT*ACGGCCG*CAAGG*TT*GAA*ACTC

```

Fig. 11. Nucleotide sequence alignment of 16S ribosomal RNA genes from isolate BLK268 and other known species.



```

BLK418      : 66CGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCAAC TTC GGTGGGGATTAGTGGGGAACGGGTGAGTAACA GTGGGCAATGTCGCCCTTCACCTCTGGGACAA : 103
EF654098.1 : 66CGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCAAC TTC GGTGGGGATTAGTGGGGAACGGGTGAGTAACA GTGGGCAATGTCGCCCTTCACCTCTGGGACAA : 103
AB184588.1 : 66CGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCAAC TTC GGTGGGGATTAGTGGGGAACGGGTGAGTAACA GTGGGCAATGTCGCCCTTCACCTCTGGGACAA : 103
EF371437.1 : 66CGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCAAC TTC GGTGGGGATTAGTGGGGAACGGGTGAGTAACA GTGGGCAATGTCGCCCTTCACCTCTGGGACAA : 105
EF063496.1 : 66CGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCAAC TTC GGTGGGGATTAGTGGGGAACGGGTGAGTAACA GTGGGCAATGTCGCCCTTCACCTCTGGGACAA : 105
          GGCCTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCAAC TTC GGTGGGGATTAGTGGGGAACGGGTGAGTAACA GTGGGCAATGTCGCCCTTCACCTCTGGGACAA

BLK418      : 66CCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAC ACCGCGCTGAGGCATCAGGGGTGAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGTGG : 208
EF654098.1 : 66CCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAC ACCGCGCTGAGGCATCAGGGGTGAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGTGG : 208
AB184588.1 : 66CCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAC ACCGCGCTGAGGCATCAGGGGTGAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGTGG : 207
EF371437.1 : 66CCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAC ACCGCGCTGAGGCATCAGGGGTGAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGTGG : 210
EF063496.1 : 66CCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAC ACCGCGCTGAGGCATCAGGGGTGAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGTGG : 210
          GGCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAC ACCGCGCTGAGGCATCAGGGGTGAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGTGG
          GGCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAC ACCGCGCTGAGGCATCAGGGGTGAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGTGG
          GGCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAC ACCGCGCTGAGGCATCAGGGGTGAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGTGG

BLK418      : 220 240 260 280 300
EF654098.1 : TGAGGTAAGGGCTCACCAAAGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAATGG : 313
AB184588.1 : TGAGGTAAGGGCTCACCAAAGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAATGG : 312
EF371437.1 : TGAGGTAAGGGCTCACCAAAGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAATGG : 315
EF063496.1 : TGAGGTAAGGGCTCACCAAAGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAATGG : 315
          TGAGGTAAGGGCTCACCAAAGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAATGG
          TGAGGTAAGGGCTCACCAAAGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAATGG

BLK418      : 320 340 360 380 400 420
EF654098.1 : GGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCTGATGCAACCGACGCCCGGTGAGGGATGAGGGGATTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAGCGAAAGTGACGG : 418
AB184588.1 : GGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCTGATGCAACCGACGCCCGGTGAGGGATGAGGGGATTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAGCGAAAGTGACGG : 417
EF371437.1 : GGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCTGATGCAACCGACGCCCGGTGAGGGATGAGGGGATTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAGCGAAAGTGACGG : 420
EF063496.1 : GGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCTGATGCAACCGACGCCCGGTGAGGGATGAGGGGATTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAGCGAAAGTGACGG : 420
          GGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCTGATGCAACCGACGCCCGGTGAGGGATGAGGGGATTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAGCGAAAGTGACGG

BLK418      : 440 460 480 500 520
EF654098.1 : TACCTGCAGAAGAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGGACGCCGGTAACTACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCGGGAATTAATGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGGCT : 523
AB184588.1 : TACCTGCAGAAGAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGGACGCCGGTAACTACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCGGGAATTAATGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGGCT : 522
EF371437.1 : TACCTGCAGAAGAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGGACGCCGGTAACTACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCGGGAATTAATGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGGCT : 525
EF063496.1 : TACCTGCAGAAGAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGGACGCCGGTAACTACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCGGGAATTAATGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGGCT : 525
          TACCTGCAGAAGAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGGACGCCGGTAACTACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCGGGAATTAATGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGGCT

BLK418      : 540 560 580 600 620
EF654098.1 : TGTCACTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATAGGGGAGGATAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTATAGCCGTTGAA : 628
AB184588.1 : TGTCACTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATAGGGGAGGATAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTATAGCCGTTGAA : 627
EF371437.1 : TGTCACTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATAGGGGAGGATAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTATAGCCGTTGAA : 630
EF063496.1 : TGTCACTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATAGGGGAGGATAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTATAGCCGTTGAA : 630
          TGTCACTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATAGGGGAGGATAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTATAGCCGTTGAA

BLK418      : 640 660 680 700 720
EF654098.1 : ATGCCAGATATACAGGAAACACCGGTGGCGAAGCGGATCTCTGGGCGGATGACCTGAGAGGCAAGCGTGGGGAGCGAAGCAGATAGATACCCCTGG : 733
AB184588.1 : ATGCCAGATATACAGGAAACACCGGTGGCGAAGCGGATCTCTGGGCGGATGACCTGAGAGGCAAGCGTGGGGAGCGAAGCAGATAGATACCCCTGG : 732
EF371437.1 : ATGCCAGATATACAGGAAACACCGGTGGCGAAGCGGATCTCTGGGCGGATGACCTGAGAGGCAAGCGTGGGGAGCGAAGCAGATAGATACCCCTGG : 735
EF063496.1 : ATGCCAGATATACAGGAAACACCGGTGGCGAAGCGGATCTCTGGGCGGATGACCTGAGAGGCAAGCGTGGGGAGCGAAGCAGATAGATACCCCTGG : 735
          ATGCCAGATATACAGGAAACACCGGTGGCGAAGCGGATCTCTGGGCGGATGACCTGAGAGGCAAGCGTGGGGAGCGAAGCAGATAGATACCCCTGG

BLK418      : 740 760 780 800 820 840
EF654098.1 : TACCTACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACCTTGTCCGTGCGCCAGCTAACGCATTAAGTGCACCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG : 838
AB184588.1 : TACCTACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACCTTGTCCGTGCGCCAGCTAACGCATTAAGTGCACCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG : 837
EF371437.1 : TACCTACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACCTTGTCCGTGCGCCAGCTAACGCATTAAGTGCACCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG : 840
EF063496.1 : TACCTACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACCTTGTCCGTGCGCCAGCTAACGCATTAAGTGCACCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG : 840
          TACCTACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCACCTTGTCCGTGCGCCAGCTAACGCATTAAGTGCACCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG

BLK418      : 855
EF654098.1 : CTAAAACCTCAAAGGAAT : 855
AB184588.1 : CTAAAACCTCAAAGGAAT : 854
EF371437.1 : CTAAAACCTCAAAGGAAT : 857
EF063496.1 : CTAAAACCTCAAAGGAAT : 857
          CTAAAACCTCAAAGGAAT

```

Fig. 12. Nucleotide sequence alignment of 16S ribosomal RNA genes from isolate BLK418 and other known species.

## 2) 미생물의 형태 관찰

선별균주 BLK39, BLK90, BLK107, BLK115, BLK268 그리고 BLK418를 Bennet's agar 배지에 접종하고 27℃에서 7~21일간 배양한 후 생육정도, 기균사 및 균락표면의 형태 및 색깔 등을 관찰하였으며, 21일간 배양하여 생긴 균락의 균체를 그람(Gram) 염색하여 광학 현미경으로 검경하였다(Fig. 11, Fig. 12).

선택된 시료로 사용된 6개 균주는 형태적으로 서로 다름을 알 수 있었으며, 그람염색 후에 광학현미경으로 관찰하여 얻은 형태 모습은 부수적인 연구가 필요함을 보여준다. 그람염색에서 BLK39, BLK115, BLK268 그리고 BLK418은 방선균으로 양성 반응을 보였으며, BLK90과 BLK107은 그람음성 세균의 형태를 나타냈었다. 이는 16S rDNA 염기서열분석 결과와 일치한다.

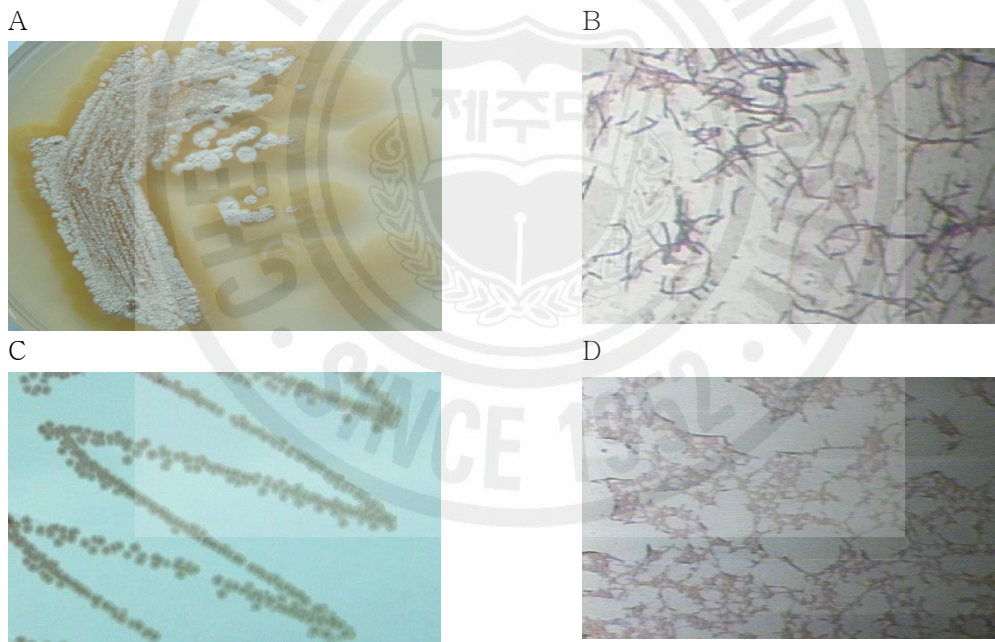


Fig. 11. Colony morphology and light-microscope image of the microbial isolates BLK39 and BLK90 on the Bennet's agar.

A : BLK39 on the Bennet's agar. B : BLK39 after Gram's stain.

C : BLK90 on the Bennet's agar. D : BLK90 after Gram's stain.

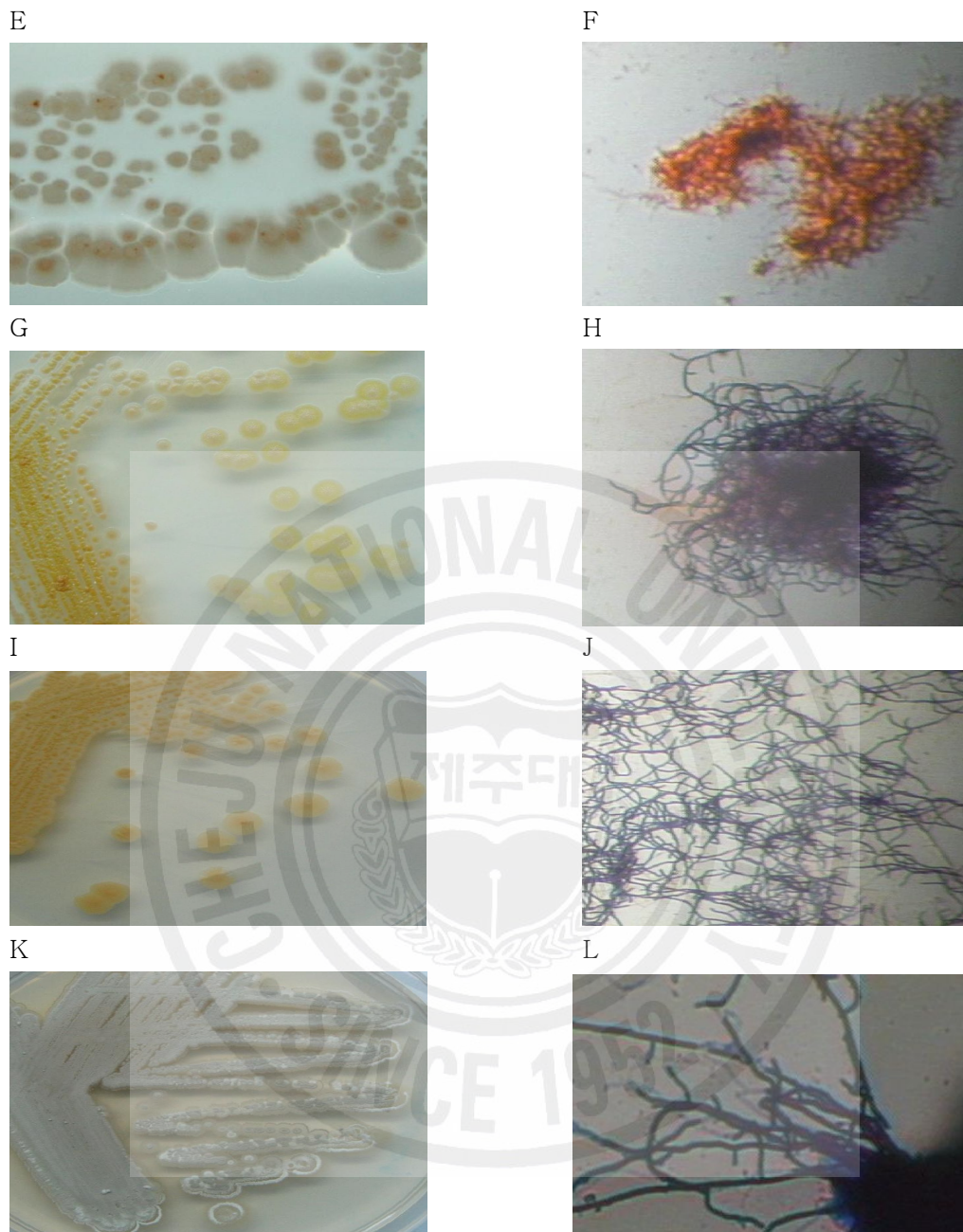


Fig. 12. Colony morphology and light-microscope image of the microbial isolates BLK 107, BLK115, BLK268 and BLK418 on the Bennet's agar.

E : BLK107 on the Bennet's agar. F : BLK107 after Gram's stain.

G : BLK115 on the Bennet's agar. H : BLK115 after Gram's stain.

I : BLK268 on the Bennet's agar. J : BLK268 after Gram's stain.

K : BLK418 on the Bennet's agar. L : BLK418 after Gram's stain.

#### IV. 요약

항레트로바이러스성 물질을 탐색하기 위하여 제주 산간지역 토양으로부터 300여 균주의 미생물을 순수 분리하였다. 순수 분리된 미생물 300여 주의 무세포배양액을 시료로 사용하여, avian myeloblast virus(AMV)의 증식에 필수적 효소인 reverse transcriptase(RT) 저해 활성을 측정하였다.

검색에 사용된 300여종의 균주 중 87%가 AMV RT 저해 활성이 있는 것으로 나타났다. RT 활성을 저해하는 대사산물을 생산하는 균주를 선별하기 위하여 1차적으로 60% 이상의 RT 저해율을 나타낸 균주를 선택하였고, 이들 균주의 무세포배양액을 사용하여, RT 활성 저해 실험을 반복 검증하였다. AMV RT 저해 활성은 BLK268이  $98.7 \pm 0.3\%$ , BLK115가  $97.9 \pm 0.2\%$ , BLK418이  $97.9 \pm 2.7\%$ , BLK338이  $95.9 \pm 1.6\%$ 의 순으로 높은 저해 활성을 나타냈다. BLK311, BLK90, BLK462-2, BLK248-2, CB249-2, BLK107은 80% 이상의 저해 활성을 보였으며, BLK4, BLK86, BLK123, BLK39은 70% 이상의 저해 활성을 나타냈다. 그 중에서도 85% 이상 저해 활성을 나타낸 BLK39, BLK90, BLK107, BLK115, BLK268 그리고 BLK418 등 6종의 균주를 2차적으로 선별하였다.

선별된 균주의 무세포 배양액에 희석하여, 희석배율에 따른 저해 활성을 조사하였는데, 그 결과, 희석 배율이 감소함에 따라 AMV RT 저해 활성이 증가함을 보였다. 그리고 이 균주들이 생산하는 배양액 중 대사산물의 온도에 대한 안정성을 조사하였다. 0°C에서 30°C의 온도에서는 RT 저해 활성이 변함없이 유지되었으나, 50°C 이상의 온도에서는 급격히 감소하는 경향을 보였다. 반면, BLK90 균주는 높은 온도에서도 비교적 안정된 저해 활성을 나타냈다.

AMV RT의 저해 활성이 높은 균주 BLK39, BLK90, BLK107, BLK115, BLK268과 BLK418 등을 동정하기 위하여 각각 16S rDNA 염기서열을 분석하여 비교하였다. 그 결과, 분리주 BLK39, BLK115, BLK268과 BLK418은 *Streptomyces* species와 96% 이상의 상동성을 보였으며, 한편, BLK90과 BLK107은 *Erwinia* 또는 *Pantoea* 속으로 그람음성 세균류였다.

이들 세균의 형태적 특성은 16S rDNA 염기서열분석과 일치하였다.

위와 같이 retrovirus 증식에 필수적인 reverse transcriptase의 활성을 저해하는 대사산물을 생산하는 세균을 분리 동정하였다. 앞으로, 미생물 대사산물의 reverse transcriptase 저해기전과 대사산물의 화학적 분석에 대한 연구가 요구된다.



## V. 참고문헌

1. The Korean Society of Virology. Virology. 정문각. (2004)
2. 권순배. 식물기원의 천연물 항바이러스 소재 탐색의 연구 동향. BioWave. 7(23) (2005)
3. Yu YB, Park JC, Lee JH, Kim GE, Jo SR, Byun MW, Hirotsuku M and Masao H. Screening of some plant extracts for inhibitory effects on HIV-1 and its essential enzymes. Korean J. Pharm. 29(4): 338-346 (1998)
4. Yu YB. The extracts of *Solanum nigrum* L. for inhibitory effects on HIV-1 and its essential enzymes. Korean J. Oriental Med. 10(1): 119-126 (2004)
5. Hur JM, Park JG, Park JC, Hyun KH, Lee KY, Hirotsugu M and Masao H. Inhibitory effects of ninety nine korean plants on human immunodeficiency virus type 1 protease activity. Nutraceuticals and Food. 7: 123-127 (2002)
6. Dunn LA, Andrews KT, McCarthy JS, Wright JM, Skinner-Adams TS, Upcroft P, Upcroft JA. The activity of protease inhibitors against *Giardia duodenalis* and metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. Int. J. Antimicrob. Agents 29(1): 98-102 (2007)
7. Andrews KT, Fairlie DP, Madala PK, Ray J, Wyatt DM, Hilton PM, Melville LA, Beattie L, Gardiner DL, Reid RC, Stoermer MJ,

- Skinner-Adams T, Berry C, McCarthy JS. Potencies of human immunodeficiency virus protease inhibitors in vitro against Plasmodium falciparum and in vivo against murine malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(2): 639-48 (2006)
8. Takashi Y, Hideyuki I, Tsutomu H, Mari K, Tsutomu N, Akira I, Hiroko M, Yuka I, Nobuyasu M, Katsuhiko O, Hideo N, Miho N, Frank A. L and Jin M. New hydrolyzable tannins, shephagenins A and B, from *Shepherdia argentea* as HIV-1 reverse transecriptase inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* 44(8): 1436-1439 (1996)
- 9 Katsuhiko K, Mitsuo H, Hitomi Y, Shinji Y, Hideo N, Masanori F, Katsuhiko O, Tohru T. Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production in vitro. *Antiviral Res.* 37: 131-140 (1998)
10. Bao Qun Li, Tao Fu, Yao Dongyan, Judy A. Mikovits, Francis W. Ruscetti and Ji Ming Wang. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochem Biophys Res Commun.* 276: 534-538 (2000)
11. Spedding G, Ratty A, and Middleton Jr. E. Inhibition of reverse transcriptase by flavonoids. *Antiviral Res.* 12: 99-110 (1989)
12. Erik De Clercq. Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus(HIV) infection. *Rega Institute for Medical Res.* 323-349 (2000)
13. K. Asres, F. Bucar, T. Kartnig, M. Witvrouw, C. Pannecouque and E. De Clercq. Antiviral activity against human immunodeficiency virus

- type 1(HIV-1) and type 2(HIV-2) of ethnobotanically selected ethiopian medicinal plants. *Phytother Res.* 16: 62-69 (2001)
14. Kim YH, Lee SW, Kim HS, Lee SH, Song MK, Sung YC and Lee JJ. Inhibitory activities of tannins against reverse transcriptase and HIV-1 replication. *J. Pharm Soc. Korea.* 39(5): 560-564 (1995)
  15. Yasmina A. Lim, Ma Chao Mei, Ines T. Kusumoto, Hirotsugu M and Masao H, Mahabir P. Gupta and Mireye Correa. HIV-1 reverse transcriptase inhibitory principles from *Chamaesyce hyssopofolia*. *Phytother Res.* 11: 22-27 (1997)
  16. Ahn MJ, Yoon KD, Min SY, Lee JS, Kim JH, Kim TG, Kim SH, Kim NG, Huh H and Kim JW. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and protease by phlorotannins from the brown alga *Ecklonia cava*. *Biol. Pharm. Bull.* 27(4): 544-547 (2004)
  17. Patrick S. Moore and Cosimo Pizza. Observations on the inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by catechins. *Biochem. J.* 288: 717-719 (1992)
  18. Park JC, Hirotsugu M and Masao H. Inhibitory effects of methanol extracts from korean medicinal plants against HIV-1 protease activity. *Korean J. Med. Crop Sci.* 11(4): 264-267 (2003)
  19. Park JC, Kim SN, Chang KJ and Choi JW. Anti-HIV-1 protease activity and in vivo anti-lipid peroxidative effect on *Rosa davurica*. *Korean. J. Pharm.* 31(3): 264-267 (2000)



20. Marijan Gerencer, Peter L. Turecek, Otfried Kistner, Artur Mitterer, Helga Savidis-Dacho and Noel P. Barrett. In vitro and in vivo anti-retroviral activity of the substance purified from the aqueous extract of *Chelidonium majus* L. *Antiviral Res.* 72: 153-156 (2006)
21. Min BS, Bae KH, Kim YH, Kunitada S, Hirotaugu M and Masso H. Inhibitory activities of korean plants on HIV-1 protease. *Nat Prod Sci.* 4(4): 241-244 (1998)
22. Ko JS, Ko YH, Oh NS, Kim JH, In MJ and Chea HJ. *Biotechnology and Biochemical Engineering.* 유한문화사. pp. 1-14 (2003)
23. Kim JS, Choi YH, Seo JH, Lee JW, Kim SK, Choi SU, Kang JS, Kim YK, Kim YS and Ryu SY. Anti-proliferative activity of naturally occurring flavonoids on cultured human tumor cell lines. *Korean J. Pharm.* 35(2): 167-170 (2004)
24. Im HG, Yu MH, Chung DW and Lee IS. Inhibitory effect of fungal metabolites isolated from foodstuffs on the growth of human cancer cell lines. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38(2): 262-267 (2006)
25. Lee SY, Kang TS, Moon SO, Lew ID and Lee MY. Fractionation and antitumor activity of water soluble exo-polysaccharide by submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* mycelium. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24(5) 459-464 (1996)
26. Ahn JS, Park MS, Ahn SC, Park CS, Oh WK, Yun BD, Lee HS and Mheen TI. MT-2007, protein kinase C inhibitor from actinomycetes isolate No. 2007-18. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21(2):

54-58 (1993)

27. Kwon DH, Kim MB, Yoon DY, Lee YH, Kim JW, Lee HG, Choi IS, Lim JS and Chose YK. Screening of plant resources of anti-viral activity. Korean J. Med Crop Sci. 11(1): 24-30 (2003)
28. 신물질탐색연구회·생명공학연구소. 신물질탐색. 자유아카데미. pp. 1-9 (1996)
29. Kim CJ. 산업적 유용 방선균의 분리 및 분류. 생물산업. 10(2): 34-43 (1997)
30. Kim SU, Lee SH, Jeong TS, Moon SS, Lee CK, Lee HW, Lee WY and Bok SH. Screening of microorganisms having antiviral activity against HIV virus from soil. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21(5): 399-405 (1993)
31. Park NH, Hong YK and Cho JY. Screening anti-inflammatory actinomycetes isolated from seaweeds and marine sediments. Korean J. Fish. Soc. 39(4): 333-337 (2006)
32. Ahn JS, Lee YS, Ahn SC, Lee JH, Lee JH, Yoon BD and Mheen TI. Identification of the actinomycetes strain No.497, isolated from soil, producing actinomycin antibiotic MT-497. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19(6): 561-567 (1991)
33. Lim TH, Lee JM, Chang TH and Cha BJ. Antifungal activity and identification of an actinomycetes strain isolated from mummified peaches. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28(3): 161-166 (2000)

34. Kim SI, Kim IC and Chang HC. Isolation and identification of antimicrobial agent producing microorganisms and sensitive strain from soil. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28(3): 526-533 (1999)
35. Lee SK and Yoon YJ. Development of bioactive polyketides in *Streptomyces*. *Prospectives of Industrial Chem.* 8(5): 18-32 (2005)
36. I. Sanchez, F. Gomez-Garibay, J. Taboada and B. H. Ruiz. Antiviral effect of flavonoids on the dengue virus. *Phytother Res.* 14: 89-92 (2000)
37. Kim JB. Purification and properties of protease inhibitor from *Streptomyces* sp. SK-862. *Korean J. Food and Nutr.* 11(6): 678-682 (1998)
38. Kim SY, Park DJ, Kwon OS, Lim CY, Kim PK, Lee SW and Kim CJ. Evaluation of antimicrobial activities of domestic actinomycetes strains. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24(2): 166-172 (1996)
39. Hiromasa O, Yoshio I and Shoshiro N. Kinetic analysis of inhibition of reverse transcriptase by streptonigrin. *J. Antibiotics.* 40(2): 230-232 (1987)
40. Ikeda R, Haraguchi Y, Ikeda Y, Kondo S, Takeuchi T, Hoshino H. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by a new amine bellenamine. *Antiviral Res.* 29(2-3): 163-173 (1996)
41. Yokomizo K, Miyamoto Y, Nagao K, Kumagae E, Habib ES, Suzuki K, Harada S, Uyeda M. Fattiviracin A1, a novel antiviral agent produced

by *Streptomyces microflavus* strain No. 2445 II. Biological properties. *Antibiot(Tokyo)*. 51(11): 1035-1039 (1998)

42. Ausubel, F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G, Struhl K. *Current protocols in molecular biology*. section 2.4, John Wiley and Sons. New York (1993)



## 감사의 글

지난 2년의 대학원 생활을 돌아보니 한밤의 꿈을 꾸 것처럼 순식간에 흘러 버렸지만, 그 어떤 때보다도 제 자신이 열정적이었던 때는 없었던 것 같습니다. 그래서 제가 감사드려야 할 분들이 더욱 많습니다.

먼저, 저에게 항상 문제를 제시해 주시고 스스로 해답을 얻을 수도록 지켜봐 주시는 고영환교수님, 어떠한 훌륭한 표현으로 감사의 말씀을 전한다해도 부족하다는 생각이 듭니다. 교수님! 마음 깊이 감사드립니다.

소심한 제게 작은 일에도 항상 칭찬과 격려로 자신감을 주시는 김수현교수님, 사소한 일에도 호기심과 생각을 갖게해주시는 열정적인 임상빈교수님, 논문을 마감하기까지 애써주셔서 진심으로 감사드립니다. 그리고 안일한 생각에 빠져들 때면 따끔한 충고로 저를 다시 잡아주시는 강영주교수님, 대학원 생활과 같이 하면서 다소 소홀했을 조교업무에도 너그러이 이해해주신 하진환교수님, 항상 저의 건강을 걱정해주시며 마음의 여유를 갖게 해주신 송대진교수님께도 깊은 감사의 말씀을 드립니다.

저의 모든 일들을 같이 고민해주고, 미처 보지 못한 부분을 일깨워 준, 실험하는 모습이 가장 아름다운 현정언니, 그리고 주저하는 제게 거침없이 도전할 수 있는 용기를 준 정신적 지주 미경언니 너무나 감사드립니다. 열심히 실험할 수 있게 도와준 생물공학실험실의 선희, 그리고 희망을 얘기하며 격려해 준 대학원 선배 선희에게 고마움을 전합니다. 같이 공부하며 서로를 격려했던 대학원 선배님들께도 감사드립니다.

제가 해야 할 여러 가지 일들 중에 직장 생활에만 전념할 수 있도록 해주신 너무나도 사랑하는 부모님 그리고 어머님께 죄송하고 진심으로 감사드립니다. 하나밖에 없는 누나라고 귀찮은 부탁도 마다하지 않고 들어준 경백, 경보에게 고마움을 전합니다. 바쁘다고 집안일에 신경도 못쓰고 힘들 때면 짜증내고 툭툭대도 털털한 웃음으로 따뜻하게 안아주는 속 깊은 우리 남편 이정호씨, 이런 아빠를 꼭 빼닮은 사랑스런 우리 지수 사랑하고 또 사랑합니다.

마지막으로 이 연구의 수행을 위해 지원해 주신 (재)제주하이테크산업진흥원에 감사드립니다.