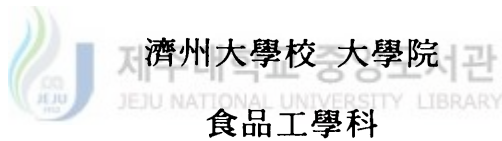


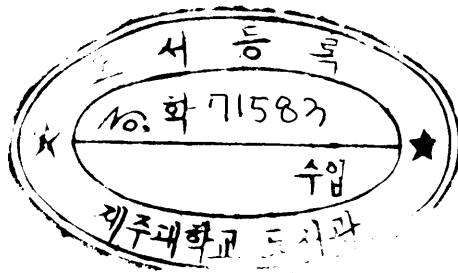
0
1999.022
199907

博士學位論文

제주도 토양방선균의 분리와
항균활성물질



鄭 完 錫



1999年 6月

제주도 토양방선균의 분리와 항균활성물질

指導教授 高 榮 煥

鄭 完 錫

이 論文을 工學博士學位 論文으로 提出함

1999年 6月

鄭完錫의 工學博士學位 論文을 認准함

審査委員長 金 洙 賢

委 員 高 正 三

委 員 河 璉 桓

委 員 金 正 浩

委 員 高 榮 煥

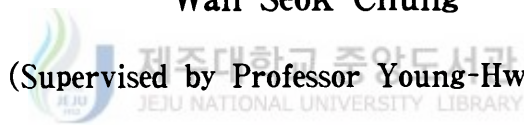
濟州大學校 大學院

1999年 6月

Isolation of soil actinomycetes in Cheju Island
and their antimicrobial substances

Wan-Seok Chung

(Supervised by Professor Young-Hwan Ko)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF ENGINEERING

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND ENGINEERING
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1999. 6.

목 차

SUMMARY	1
I. 서 론	4
II. 연 구 사	7
1. 방선균	7
1-1. 방선균의 특징 및 중요성	7
1-2. 방선균의 분류	8
1-3. 방선균의 분포	14
1-4. 방선균의 분리	15
2. 항생물질	16
2-1. 항생물질의 종류별 특성	16
2-2. 기존 항생물질의 문제점	19
2-3. 방선균을 이용한 항생물질의 생산	20
III. 재 료 및 방 법	24
1. 방선균의 분리	24
1-1. 방선균의 분리원	24
1-2. 방선균 분리용 배지	24
1-3. 방선균 분리 방법	26
2. 항균활성물질 생산균의 선발	26
2-1. 방선균의 배양	26
2-2. 항균활성의 측정	28

3. 선발균주의 동정	28
3-1. 배양학적 특성	30
3-2. 형태학적 특성	30
3-3. 생리학적 특성	32
3-4. 탄소원 이용성	33
4. 선발균주에 의한 항균활성물질의 생산 및 정제	33
4-1. 항균활성물질의 생산	33
4-2. 항균활성물질의 정제 특성	34
4-3. Cation exchange chromatography	34
4-4. Gel permeation chromatography	35
4-5. High performance liquid chromatography	35
5. 항균활성물질의 분석	36
5-1. 용해성 조사	36
5-2. 아미노산 조성 분석	36
5-3. 자외선 흡광 spectrum	38
5-4. 항균 spectrum	38
5-5. Thin layer chromatography	39
5-6. High performance liquid chromatography	41
5-7. Nuclear magnetic resonance spectroscopy	41
IV. 결과 및 고찰	43
1. 방선균의 분리 및 분포	43
1-1. 사용 배지별 분리	43
1-2. 지역별 분포	47
2. 항균활성물질 생산균의 선발	50
2-1. SCN Broth를 사용한 항균활성물질 생산균의 검색	50
2-2. AGS Broth를 사용한 항균활성물질 생산균의 검색	50

2-3. AGSSE Broth를 사용한 항균활성물질 생산균의 검색	52
3. 선발균주의 동정	55
3-1. 배양학적 특성	55
3-2. 형태학적 특성	56
3-3. 생리학적 특성	60
3-4. 탄소원 이용성	64
3-5. 동 정	64
4. 항균활성물질의 생산 및 정제	67
4-1. 항균활성물질의 생산	67
4-2. 항균활성물질의 정제 특성	67
4-3. Cation exchange chromatography	69
4-4. Gel permeation chromatography	69
5. 항균활성물질의 특성 및 구조의 분석	73
5-1. 용해성	73
5-2. 아미노산 조성 분석	73
5-3. 자외선 흡광 spectrum	73
5-4. 항균 spectrum	75
5-5. Thin layer chromatography에 의한 분석	75
5-6. High performance liquid chromatography에 의한 분석	78
5-7. Nuclear magnetic resonance spectroscopy에 의한 분석	78
V. 요 약	85
참 고 문 헌	88
감사의 말씀	105

SUMMARY

Actinomycetes are the main producers of antibiotics and found in any natural ecosystem. Cheju Island has been known to have biological diversity even its relatively small size. Soil samples were collected from 25 points in Cheju Island and used for isolation of actinomycetes.

Four kinds of isolation media were used for selective isolation of soil actinomycetes that total 703 strains. The greatest number 437 strains were isolated on arginine glycerol salts agar containing soil extract, 171 strains were on arginine glycerol salts agar, 75 strains were on starch-casein-nitrite agar, and 20 strains were on Benedict agar. Considering regional distribution, pasture land was the best sources of actinomyceyes in terms of diversity and population density, and then citrus field follows.

Only 526 strains out of these 703 collections were screened for antimicrobial activities. They were cultivated in a small scale using the isolation media and their cell-free culture filtrates were tested for their antimicrobial activities against three bacterial strains *Escherichia coli* 8749, *Staphylococcus aureus* 6538 and *Pseudomonas solanacearum* 10692. The frequency of bacterial strains producing antimicrobial substances was widely different from 0.0 to 32.8% depending upon the medium used for isolation and cultivation.

Ten actinomycete isolates that showed growth-inhibitory effect on the

above three test strains were selected after primary screening. Among those, an isolate 10-6B-a was found to produce antimicrobial substances that had strong stability in wide range of pH and at high temperature. The isolate 10-6B-a was chosen for identification and characterization of its antimicrobial substances.

Identification of the isolate was performed according to the methods and keys by International *Streptomyces* Project and Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. From its morphological, cultural, and various physiological characteristics, the isolate 10-6B-a was tentatively identified as *Streptomyces* sp. that has spirals with 80~100 spores.

Cell-free culture filtrate obtained after 9 days' aerobic cultivation was used as raw material for isolation and purification of antimicrobial compounds. Cation exchange chromatography on AG MP-50 and three times consecutive gel permeation chromatography on Sephadex G-10 were performed, and then the fractions with antimicrobial activities were dehydrated resulting in white crystals.

Such physical and chemical properties of the antimicrobial crystals as solubility, amino acid composition, UV absorption spectrum, antimicrobial spectrum and various coloring reactions were investigated. This biologically active substance was more soluble in water than in methanol or ethanol, suggesting its high polarity. Its hydrolysis by acid revealed no free amino acid, and its UV absorption spectrum showed maximum peak at 210nm and minor shoulder at 283nm. The antimicrobial substance inhibited growth of both gram positive and negative bacteria,

but showed species-selective inhibition against yeasts.

When the active substance was tested for its coloring reaction with ninhydrin, H_2SO_4 , Iodoplatinate(potassium) and orcinol ferric chloride (Bial's reagent), only ninhydrin made pink color development and the other three did not make any observable color reaction. This coloring reaction suggested the presence of amino group within the substance.

At least four different fractions with antimicrobial activity were revealed when the partially purified crystals were analyzed by thin layer chromatography(TLC). Analysis by high performance liquid chromatography(HPLC) also showed the similar fractionation pattern to that by TLC; four different fractions with antimicrobial activity were observed. Thus the antimicrobial crystals were finally further purified by HPLC and the resulting three different compounds were analyzed.

The partially purified antimicrobial crystals were analyzed by both ^{13}C and ^1H nuclear magnetic resonance(NMR), and the purified compounds were analyzed by ^1H NMR. Even though their identities were inferred, more analysis data are required for the determination of their structures.

I. 서 론

천연물질의 분리·동정에 대한 집중적인 연구와 기술의 발전에 힘입어 1,000,000개에 가까운 천연물질이 알려져 있다. 이들 중 절반 이상이 미생물을 포함한 식물계에 속해있는 생물체로부터 분리된 것들이다. 이들 천연물질 중에서 생리활성물질의 수는 100,000종에 가까우며, 그 중 미생물에서 분리된 항생물질이 약 10,000종으로 큰 부분을 차지하고 있다. 또한, 새로운 연구방법과 기술의 지속적인 발전, 새로운 분리원의 발견 그리고 미생물 대사산물의 수의학과 농업에의 적용 등은 미생물을 이용한 항생물질의 개발에 지속적으로 기여하여 왔다.

미생물은 그 종(species)이 다양할 뿐만 아니라, 같은 종 내에서도 서로 다른 생리대사능력을 보유하고 있다. 따라서, 많은 종류의 생리활성물질이 미생물의 대사산물로부터 개발되고 있으며, 농수산업(육종, 병충해 방제 등), 환경산업(폐기물 분해처리), 정밀화학산업(공업화학약품 등), 식품산업(원료, 첨가제 등), 반도체산업(biosensor) 그리고 의약업 등에서 활용될 수 있는 잠재력도 크다.

과학문명의 발달과 더불어 인간의 수명도 연장되어 왔다. 그러나 아직도 치료방법이 해결되지 않은 질병들, 특히 성인성 질환, 풍토병의 확산에 따른 새로운 전염병, 각종 항생제 내성질환 등이 아직도 인간의 생명을 위협하고 있다. 이와 같은 현실을 반영하여, 천연물을 각종 질병의 예방, 완화 또는 치료의 목적으로 이용하고자 하는 연구가 근래에 들어 적극적으로 이루어지고 있다. 이러한 목적에 접근하는 방법 중의 하나는 다양한 종류의 생물자원을 확보하는 것이다. 생물체 중에서도 생리적 다양성, 산업화 가능성 등을

고려할 때, 미생물의 활용분야가 매우 큰 부분을 차지하고 있다. 기존 미생물 균주를 유전공학적인 방법으로 개량하여 용도에 적합한 변이주를 얻을 수 있는 경우도 있으나, 그렇지 못할 경우에는 새로운 균주를 자연계로부터 분리하여야 한다.

“생물학적 다양성에 관한 국제협약”은 생물다양성의 보존과 지속 가능한 이용 그리고 유전자원을 이용하여 얻는 이익의 공정분배에 관한 것으로, 세계 각국이 생물자원 보존에 관심을 가지고 있다. 자연계의 생물 중에는 인간에 의한 자연환경의 오염 및 파괴로 인하여, 새로 생기는 생물 종보다 사라지는 생물 종의 수가 더 많아서, 동식물 종의 자연발생적 생성속도보다 50~100배 더 빠른 속도로 사라지고 있다. 현존하는 10~20%의 종이 30년 내에 멸종될 위기에 있고, 매일 10여 종이 지구상에서 사라지고 있는 것으로 추정되고 있다(Abramovitz, 1997). 동식물과 불가분의 관계에 있는 미생물의 종도 동식물과 마찬가지로 사라질 것으로 추정된다.

자연환경의 오염정도가 점차 심각해지고 있는 실정에서 국내의 미생물자원을 확보, 보존하는 작업이 시급함을 알 수 있다. 미생물자원의 수집, 보존 필요성을 더욱 강조하는 측면에서 본다면, 1980년도부터 미국은 미생물에 대한 특허권을 인정하고 있으며, 우리나라도 1987년도부터 미생물이 특허의 대상이 되고 있다.

제주도는 해발 1,950m의 한라산을 정점으로, 좁은 지역에 화산회토를 특색으로 하는 토양과 아열대와 아한대가 공존하는 기후 등으로 비교적 다양한 생물상을 보유하고 있다(제주도, 1997). 또한 제주도 연안에는 남조식물 11종, 녹조식물 52종, 갈조식물 80종, 홍조식물 282종 등 총 425종이 생육하고 있다(부, 1988). 제주도의 생물상이 특이하다는 것은 미생물상도 특이할 것임을 암시한다.

실제로 권 등(1996)이 제주도내 토양 중의 전반적인 방선균의 분포를 형태학적, 생리학적 특성을 기준으로 속(genus)의 단계까지 동정한 결과, *Streptomyces* 속이 62.6%를 차지하고 있으며, *Micromonospora* 속이 16.4%, *Nocardia form* 군이 8.6%, *Actinomadura* 속이 2.2%, *Microbispora* 속이 1.7%, *Nocardiopsis* 속이 1.6%, *Streptosporangium* 속이 1.0%, 나머지 기타 속이 5.9% 씩 분포하고 있는 것으로 보고하였다. 이는 제주도가 타지방과 비교하여 큰 차이는 없으나, 산림토양으로부터 *Micromonospora* 속과 같은 희소방선균의 분리도가 높으며, 신종의 방선균과 대사물질의 분리에 적합한 환경을 지니고 있음을 제시하고 있는 것으로 사료된다. 그러나 80년대 이후의 급격한 관광개발과 농촌에서의 과도한 농약, 비료 및 제초제의 사용으로 미생물의 고유 생태계가 파괴되어 가고 있다. 특히 골프장의 난립과 호텔 등 위락시설의 확충, 그리고 생활하수 및 산업폐수의 증가 등은 섬 자체 뿐만 아니라, 인근 해양까지도 오염시켜 연안의 생태계를 파괴시키고 있다(제주도, 1997). 그러나, 미생물의 생태분석은 그 중요성에 비추어 무시되어 왔다.

본 연구에서는 미생물자원의 확보 차원에서 제주도내 25개 지점의 토양으로부터 방선균을 분리·수집하여, 지역별 분포와 주요 분리용 배지의 비교, 항균활성물질 생산균주의 발생빈도 등을 조사하였고, 항균활성물질을 생산하는 특정 방선균을 선발하여 동정하고, 항균활성물질의 항균범위와 물리·화학적 성질을 밝히고자 하였다.

II. 연구사

1. 방선균

1-1. 방선균의 특징 및 중요성

1875년 Ferdinand Cohn은 사람의 눈물관 결석으로부터 실 모양의 미생물을 분리하여 *Streptothrix foersteri*라 불렀다. 2년 후, Harz는 소의 질병(Actinomyces)에서 관찰된 미생물을 *Actinomyces bovis*라 명명하였다. 그리스어에서 유래된 “actinomyces”는 “ray-fungus”를 의미하며 아직도 “ray-fungi”로 불려지고 있다(Lechevalier와 Lechevalier, 1981).

방선균은 초기에는 그 형태가 진균류와 유사하여 사상균에 속하는 것으로 분류되었으나, 그 후 1970년대에 이르러 세포 내 유전자를 구성하는 염기 중 G+C 함량이 높고(Woese, 1987; Yamada와 Komagata, 1970), 분화하는 성질을 가진 원핵세포형일 뿐만 아니라, 70S ribosome을 가지고 있는 점, 세포벽의 기본구조로 peptidoglycan을 가지고 있는 점 등으로부터 세균에 속하는 것으로 판명되었다(岩井와 高橋, 1995).

Actinomycetales order에 속하는 원핵생물로 균사상으로 생육하는 특성을 지닌 방선균은(岡見, 1987) 매우 다양한 형태적, 생리적 특성을 갖는다(Tanaka와 Omura 1990). 그람 양성 진정세균 군에 속하며, 그들 thallus의 일부는 그람 음성일 것이라는 보고도 있다(Lechevalier와 Lechevalier, 1981).

방선균은 일반 한천배지에서는 영양균사(substrate or primary mycelium)가 배지 속으로 성장하며, 공기 중에서는 기균사(aerial or secondary

mycelium)를 형성한다. Fig. 1에서 그 전형적인 성장 모형을 볼 수 있다. 어떤 경우에는 영양균사의 생존기간이 짧아 곧 편모를 가지는 막대상 또는 구상의 형태로 흩어진다. 이들 균사의 끝에는 포자(spore) 또는 포자낭(sporangium)을 착생한다. 또한 포자는 편모(flagellum)를 가지고 있어 운동성인 것도 있다(岩井와 高橋, 1995).

방선균은 원핵생물 중에서도 형태가 가장 분화된 세균이다(Woese, 1987). 이들은 일반배지에서 잘 자라지만 그 성장속도는 일반적인 세균보다 느리다. Division cycle은 *E. coli*가 약 20분인데 비해서 방선균은 2~3시간으로 비교적 길다. 이와같이 방선균은 세균의 특성을 나타내지만, 때로는 곰팡이와 비슷한 특성을 나타내어 분류학상 세균과 곰팡이의 경계면에 위치하는 미생물이다(岡見, 1987).

이러한 방선균은 질병의 원인이 되기도 하지만, 항생물질과 같은 유용한 2차 대사물질의 생산, 광범위한 종류의 기질 분해, 그리고 유전학적으로 유용한 물질을 공급해 주는 역할(Lechevalier와 Lechevalier, 1981)을 담당하기 때문에, 산업적으로 오래 전부터 이용되어 왔으며, 천연 유기화합물의 보고로서 신물질 screening의 대상이 되었고, 대사산물의 생합성 기구에 대한 연구가 많이 이루어졌다(Tanaka와 Omura, 1990).

1-2. 방선균의 분류

방선균은 생리학적 특성(fermentative, oxidative metabolism), 형태학적 특성(균사의 형태와 안전성, 포자의 형태와 수 및 배열, sclerotia, 포자낭, 분생자병의 형성), 물리적 특성(열저항성), 그리고 화학적 특성(세포벽과 전세포의 구성 성분, 지방산의 종류, iosprenoid, quinones 등)을 기준으로 여러 군(group)으로 분류된다.

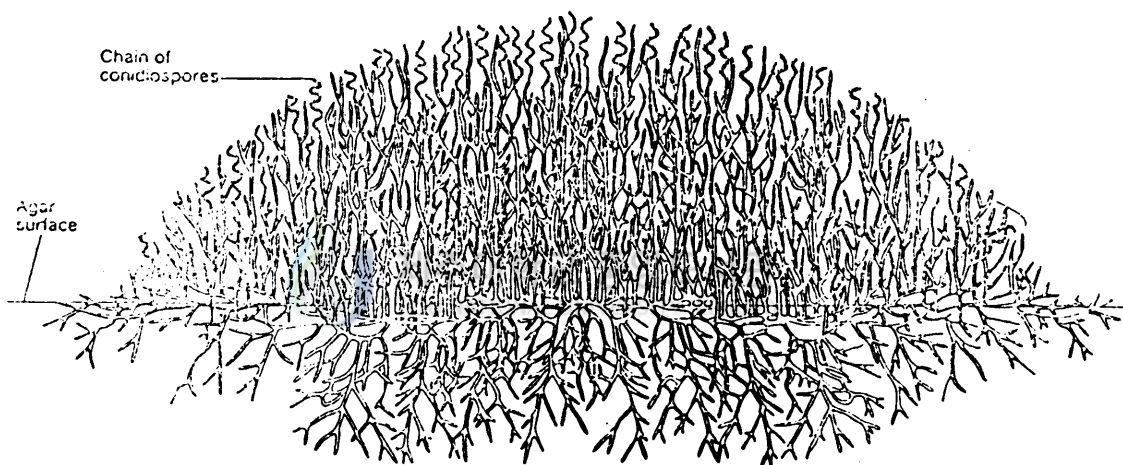
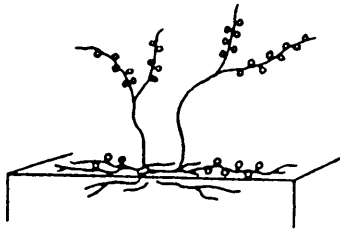


Fig. 1. The cross section of an actinomycete colony with hypae. The substrate mycelium and aerial mycelium with chain of conidiospores are shown.

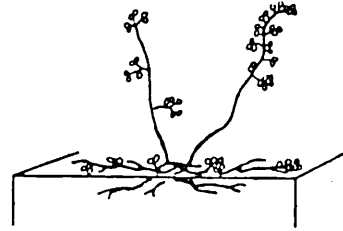
우선 방선균은 두 개의 큰 군으로 나누어진다. 그 하나는 수적으로 상당히 많으며 기본적으로 토양에 상주하는 호기성 형태(oxidative form)의 균이고, 다른 하나는 사람이나 동물의 강(腔) 속에서 최초로 발견된 혐기성 형태(fermentative type)의 균이다(Lechevalier와 Lechevalier, 1981). 혐기성 방선균은 형태학적으로 매우 간단하다. 이들은 기균사 뿐만 아니라 포자도 형성하지 않는다. 그리고 이들의 영양균사는 아주 잘 발달되어 있지 않으면 퇴화되어 있다. 한편, 방선균의 대부분은 산화성이고 호기성이다. 이들의 속(genus)은 형태학적, 물리학적 그리고 화학적 기준에 의해서 쉽게 분류가 가능하다(Lechevalier와 Lechevalier, 1981).

1957년에 발행된 “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”에는 9개 속의 방선균이 기록되어 있으며, 그 중 대부분은 *Streptomyces* 속에 속하는 균주였다. *Streptomyces* 속 이외의 속으로는 *Nocardia* 속과 *Micromonospora* 속 등이 드물게 보고되는 정도였다. 그 후 1960년대에 들어서면서 새로운 항생물질의 발견이 증가하고, 그와 함께 방선균의 다양한 속과 종이 보고됨에 따라 방선균의 분류상에 혼란이 발생하였다. 그 이유는 새로운 종들이 확고한 규정이 없이 제안되었기 때문이다. 이 혼란을 피하기 위해서 1964년에 ISP 사업(International *Streptomyces* Project)이 수립되었다. ISP에는 표준화된 방법에 따라 450종이 기술되었으며, 균주(strain)의 형태를 명시하였다. 여기서는 포자사슬의 형태(Fig. 2), 포자표면의 형태, 포자의 색깔, 배면의 색깔, 수용성 색소와 멜라닌 색소의 생성 여부, 그리고 탄소원 이용성을 기준으로 분류하였다(Miyadoh, 1990).

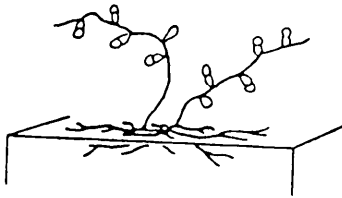
비록 ISP는 종의 관점이나, 유사종 사이의 결부성에 대해서는 시도되지 못했지만, 세포벽의 화학적 형태에 대한 제안으로 *Streptomyces*에서 속의 개념이 명확하게 규정되었다. *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*,



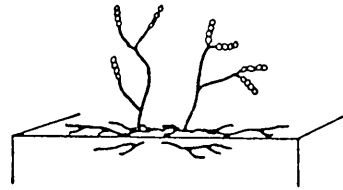
Thermoactinomyces



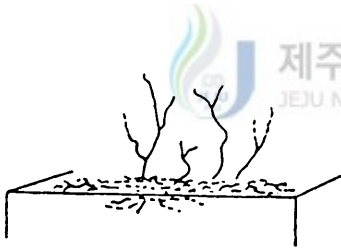
Thermomonospora



Microbispora



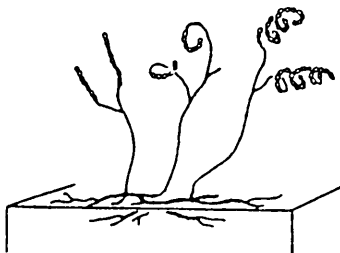
Microtetraspora



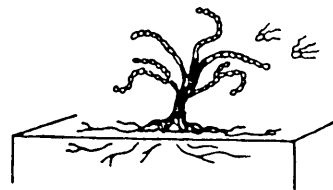
Nocardia



Actinomadura



Streptomyces



Actinosynnema

Fig. 2. Schematic diagrams of substrate and aerial growth of genera of actinomycetales.

Vol. 4(Williams 등, 1989)에는 분자의 유전적 특성과 화학적 특성을 분류의 기준으로 사용하여, 과거 6개의 속이 한 개의 *Streptomyces* 속으로 통합되었다. 그리고 종의 분류는 수리적 분류방법에 따라서 크게 변경되었다. 수리적 분류에 관한 자료는 총 139개의 특성 중에서 전통적으로 중요시 되어왔던 형태학적 그리고 색소생성과 관련된 35개의 특성과 효소활성, 분해활성, 탄소원 이용성 등에 따른 104개의 항목으로 이루어져 있다(Miyadoh, 1990).

화학적 분석은 균체를 가수분해한 후 paper chromatography에 의하여 세포벽 구성 성분인 diaminopimelic acid(DAP)의 조성을 분석, 판정하는 방법으로 meso-형을 *Nocardia*, L,L-형을 *Streptomyces*로 구분하게 되었다(Lechevalier 등, 1966). 이어 1970년에는 세포벽 성분 분석에 따라 다시 세포벽형(cell wall type)으로 나누어 방선균 속을 분류하게 됨으로써 새로운 속이 급속히 증가하게 되었다(Lechevalier와 Lechevalier, 1970). 이와 함께 희소방선균(rare actinomycetes)의 분리가 활발하게 되어 현재에 이르게 되었다.

기타 방선균 속의 분류기준으로는 세포벽 형태와 균체 가수분해물 중 당의 종류(Lechevalier와 Lechevalier, 1970), 지방산의 종류(Okami 등, 1970), menaquinone, 인지질의 종류, mycolic acid의 유무, DNA의 G+C 함량 등이 있다.

Lechevalier와 Lechevalier(1970)의 600여 균주에 상당하는 호기성 방선균의 세포벽 표본과 세포 가수분해물의 주요 구성성분과 관련된 보고에 의하면, 세포를 구성하는 당의 종류가 세포벽의 조성을 예측하는데 사용될 수 있으며, 당의 종류에 따라 분류학적으로 유용한 10개의 군으로 호기성 방선균을 분류하는 기준을 마련하였다.

Watanuki와 Aida(1972)는 *Bacillus* 속 세균의 분류에 있어서 세포 구성성

분 중, menaquinone의 종류를 분석한 결과, 그람 염색으로는 서로 다른 *Bacillus* 속에서 단지 menaquinone-7만이 검출되었다. 따라서 세균 분류의 효과적인 기준으로 menaquinone 분석을 이용하게 되었다. 또한 인지질의 종류는 호기성 방선균들의 다양한 속간 상호관계에서 중요한 양상을 보여준다. Lechevalier 등(1977)은 질소원자를 함유한 인지질의 함유량을 기준으로 방선균을 5개 군으로 분류하였다.

DNA의 G+C 함량은 열에 대한 내성이 있는 내생포자의 존재로 구분된다. 일반적으로 방선균의 G+C 함량은 높으나, 방선균 *nocardiae*와 *mycobacteria*의 G+C 함량은 비교적 낮은 범위(60~70mol%)에 속한다. *Streptomyces*의 G+C 함량은 비교적 높은 범위(70~75mol%)에 해당된다. 그리고 일부 내열성 방선균은 G+C 함량이 비교적 낮은(44~54mol%) DNA를 가지고 있는 것으로 보고되었다(Lechevalier 등, 1971).

그리고 분자생물학적 방법으로 5S rRNA(Fox와 Stackebrandt, 1987)와 16S rRNA(Embley 등, 1988)의 염기배열의 유사도에 따른 계통 발생적 연구가 분류에 응용되기 시작하였다. Park 등(1991)은 호산성 방선균과 호중성 *Streptomyces* 속 그리고 *Streptoverticillium baldaccii*의 한 균주에서 5S rRNA 염기서열을 해독하여, *Chainia*, *Elytrosporangium*, *Kitasatoa* 그리고 *Microellobosporia* 등이 *Streptomyces* 속과 동일한 속으로 간주해야 된다는 학설을 증명할 수 있었다.

방선균의 속과 종은 어떤 미생물보다도 다양하여 50여종의 방선균 속이 보고되었다. 그 중에서도 *Streptomyces* 속이 제일 다양하여, 1993년 기준으로 220여종이 보고되었다(Shimazu 등, 1993). 한편, 1994년에 발행된 "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology"에는 총 8개 군, 48개 속의 방선균이 보고되었다(Holt 등, 1994). 그러나 기록된 바 없는 새로운 방

선균으로 운동성 분절포자를 가지는 *Catenuloplanes*(Yokota 등, 1993)와 *Couchioplanes* 속(Tamura 등, 1994), 산호모양의 sporophore를 가지는 *Actinocorallia* 속(Iinuma 등, 1994), 중온성 방선균인 *Lentzea* 속(Yassin 등, 1995) 등이 최근에 발견되어, 속의 수가 계속 증가하고 있다.

1-3. 방선균의 분포

방선균은 토양을 비롯하여 하천, 바다, 조류와 식물의 근권, 부엽토 같은 식물재료, 동물의 내장, 배설물, 표피, 혈관 등의 동물재료, 대기, 생활하수, 폐수 등 거의 모든 자연환경에 분포하고 있으며(Takashi, 1987), 토양방선균의 일반적인 분포는 *Streptomyces* 속이 69.4%로 가장 많이 존재하며, 그 다음으로 *Micromonospora* 속이 11.4%, *Nocardia* 속이 6.1%, 그리고 *Streptosporangium* 속이 2.0%씩 분포하고, *Actinomadura*, *Nocardiopsis*, *Microbispora* 속이 각각 0.9%씩 분포한다고 보고되었다(Lechevalier, 1989).

국내에서는 김과 권(1995)이 중부 내륙지역의 방선균의 속 다양성을 조사한 결과에 의하면, *Streptomyces* 속이 68.4%로 가장 많이 존재하며, 다음으로 *Micromonospora* 속이 6.2%, *Nocardiaform* 군이 9.1%, *Microbispora* 속이 6.2%, *Nocardiopsis* 속이 2.7%, *Actinomadura* 속이 2.3%, 그리고 *Streptosporangium* 속이 1.8% 씩 분포하고 있는 것으로 보고하였다. 따라서 토양 중의 방선균 중 대다수가 *Streptomyces* 속이라 할 수 있다.

김 등(1997)은 토양 표면으로부터 깊이 50cm 이내에서 분리된 656개의 방선균 중, 223 균주가 표면시료로부터, 242 균주가 깊이 10cm 이내의 시료로부터 각각 분리되어, 표면에서 10cm 사이에서 총 분리 균주의 70% 이상이 분리되었다고 보고하였다. 그러나 Woodruff(1989)는 토양 방선균의 종류에 있어서 수평적인 변화보다는 토양 깊이에 따른 수직적 변화가 훨씬 크다고

보고하였다.

1-4. 방선균의 분리

일반적으로 토양에 존재하는 미생물 중 1% 미만이 분리, 이용되고 있다. 따라서 자연계에는 아직까지 이용되지 않은 미지의 방선균이 많이 존재하고 있으며, 이로부터 신물질이 계속 탐색될 것이다(김, 1997).

물질탐색 연구에 적합한 방선균을 선택적으로 분리하고자 할 때에는 균 분리원의 적절한 선택과 채취, 효과적인 시료의 전처리 방법과 선택배지의 사용, 적절한 배양조건과 배양기간의 선택, 육안 또는 현미경을 이용한 효율적인 균의 선별 등이 요구된다(김, 1992).

균분리원의 선택에 있어서는 토양 중의 유기물 성분, 토양의 형태, 계절 및 기후, 온도, 물과 공기의 순환, 그리고 pH 등의 환경조건도 고려되어야 한다(Rothrock와 Gottlieb, 1984). 그리고 방선균을 효과적으로 분리하기 위해 방선균에 영향을 주지 않는 범위 내에서 곰팡이나 세균의 성장을 억제하거나 제거하는 것이 필요하다. 이러한 효과를 얻기 위해서 여러가지의 물리·화학적 처리 방법이 개발되어 있다. 또한 방선균의 영양 요구성, 생리적 특성, 항생제에 대한 감수성, 물리적 특성(건조, 열, 염에 대한 내성) 등이 천연시료로부터 특정 분류군(taxa)을 간편하게 분리할 수 있도록 해주는 자료가 될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 또한 동정행렬(probabilistic identification matrix) 내의 각 군집이 갖고 있는 여러 형질 중에서 가장 효과적인 형질(diagnostic character)을 선별할 수 있는 DIACHAR 프로그램을 이용하면 선택분리용 배지를 효과적으로 개발할 수 있다(강, 1989).

2. 항생물질

항생물질은 저분자량의 화합물로 저농도로도 미생물을 죽이거나, 미생물의 생육을 억제하는 효과를 지닌다. 1955년에는 500여종의 항생물질이 알려져 있었으나, 1975년에는 5,000여종, 최근에는 13,000종 이상의 항생물질이 알려져 있다. 그리고 천연 항생물질로부터 출발하여 합성된 유도체의 총수는 상당히 많다. 오늘날 그 수는 β -lactam계 유도체 8,000종을 포함해서 100,000종에 가깝다. 그 중에는 반합성 macrolide, tetracycline, ansamycin aminoglycosides, 그리고 anthracycline 유도체도 상당수를 차지하고 있다.

2-1. 항생물질의 종류별 특성

항생물질은 화학적 구조의 차이에 따라 β -lactam계, aminoglycoside계, macrolide계, polyene계, tetracycline계, peptide계 등으로 구분되며, 의약품 시장에서 중요한 위치를 차지하고 있다. 산업적으로 유용하게 사용되고 있는 항생물질로는 다음과 같은 것들이 있다.

β -lactam계 화합물은 다음과 같다.

1) Cephamycin : Nagarajin 등(1971)에 의해 *Streptomyces lipmanii* NRRL 3584와 *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585로부터 분리된 것으로 그람 음성균과 양성균에 대해서 광범위 항균효과를 나타내며, 각종 β -lactamase에 대해서 penicillin보다 높은 안전성을 갖고 있다.

2) Clavulanic acid : Reading와 Cole(1977)에 의해 *Streptomyces clavuligerus*로부터 분리된 물질로 *E. coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus mirabilis*, 그리고 *Staphylococcus aureus*에서 발견되는 것들을 포함해서 많은 β -lactamase를 효과적으로 저해한다.

3) Nocardicin : Aoki 등(1976)에 의해 *Nocardia uniformis* subsp. *tsuyamanensis*에서 분리된 무색의 결정으로 *Proteus*, *Pseudomonas*를 포함하는 그람 음성 세균에 대해 광범위 활성을 나타내는 반면에 중간 정도의 항균활성을 가지고 있으며, 독성은 낮은 것으로 알려져 있다.

4) Thienamycins : Kahan 등(1979)에 의해서 *Streptomyces cattleya*로부터 분리된 것으로 안정성은 부족하지만, 그람 양성균과 *Pseudomonas aeruginosa* 균주를 포함한 그람 음성균 등에 대해 효력을 나타내는 광범위 항균활성을 갖고 있다.

이 외에도 penicillin, cephalosporin 등이 있다.

Aminoglycoside계 화합물은 다음과 같다.

1) Gentamycin : Weinstein 등(1963)에 의해서 *Micromonospora purpurea*에서 분리되었으며, 염기성, 수용성의 백색 결정으로 두 종류의 혼합물이다. 그람 음성균, 특히 *Pseudomonas aeruginosa* 균주에 대해서 강한 항균활성을 나타낸다.

2) Sagamycin : Okachi 등(1974)에 의해서 *Micromonospora sagamiensis* var. *nonreducans* nov. sp. MK 62에서 분리된 gentamycin C 혼합물과 물리적, 화학적, 그리고 항균활성 특성이 상당히 유사한 것으로 보고되고 있다. 단지 *Pseudomonas aeruginosa* 균주에서 보다 강한 활성을 나타내는 점이 다르다.

3) Nebramycin : Stark 등(1968)에 의해서 *Streptomyces* sp.에서 분리된 염기성, 수용성 항생물질이다.

이 외에도 streptomycin, neomycin, kanamycin 등이 있다.

Macrolide계 화합물은 다음과 같다.

1) Erythromycin : McGuire 등(1952)에 의해 *Saccharopolyspora erythraea*

에서 분리된 백색 또는 황백색의 결정이다. 그람 양성균, 그람 음성 구균, 랩토스피라 등에 강한 활성을 보인다.

이 외에도 oleandomycin, josamycin 등이 있으며, 이와 유사한 구조를 지닌 ansamacrolide계 항생물질로는 rifamycin이 알려져 있다. Rifamycin은 *Nocardia mediterranei*에서 발견한 등적색의 결정성 분말로 그람 양성, 음성균 및 항산성균에 강한 활성을 나타낸다. 현재 결핵 치료제로 가장 많이 사용되고 있다(大村와 田中, 1995)

Polyene계 항생물질은 cholesterol과 결합하여 진균류와 원충에 강력한 효과가 있으나, 인체나 동물에도 작용함으로 독성이 있다고 해야할 것이다. 대표적인 것으로는 nystatin이 알려져 있다.

Tetracycline계 항생물질로는 *Streptomyces aureofaciens*와 *S. rimosus*가 각각 생산하는 chlorotetracycline과 oxytetracycline을 시작으로 tetracycline이 발견되었다. 사료첨가제로 사용되기도 한다.

Peptide계 항생물질은 그 광범위한 분포와 중요성에 비해서 상대적으로 적은 수의 simple amino acid와 imino acid 중합체 정도만이 미생물, 식물, 동물로부터 분리되었다. 자연계에 존재하는 peptide 중에서 특수 희귀 아미노산으로 구성된 200~300개 이상의 항생물질이 발견되었다. 대부분의 이들 항생물질들은 *Bacillus*와 *Streptomyces* sp.로부터 분리된다. 이들 화합물들을 구성하는 아미노산은 보통의 아미노산과 화학적으로 아주 유사한 것으로 보고되고 있다(Berdy, 1980b).

또 다른 peptide계 활성물질 중에는 cyclopeptide와 depsipeptide가 있다. 이들 화합물도 특수 아미노산(non-proteinogenic)과 *N*-methyl amino acid, dehydroamino acid 또는 serine, threonine, cysteine을 포함하는 peptide의 결정화에 의해서 유도되는 heterocyclic 구조와 같은 proteinogenic 전구체의

화학적 modified version들과 결합된 것이다. 특히 이들 아미노산은 일반적인 산가수분해법으로는 분해되지 않는 것으로 알려져 있다. 단지 촉매로 수소를 첨가하여 가수분해함으로써 아미노산의 구조가 밝혀졌다(Fliri와 Wenger 1990). Bacitracin, gramicidin, vivomycin 등이 알려져 있다.

2-2. 기존 항생물질의 문제점

전술한 항생물질들은 1970년대 이전에 발견된 것이 대부분으로 1980년대 이후에 발견된 것들은 아직 임상시험 중이거나 시판되더라도 시장규모가 그리 크지 않은 실정이다(이, 1992). 또한 근래에 들어 각종 질병의 치료 및 농·축산물의 생산성 증대 목적으로 항생제의 남용이 빈번하며, 그에 따라 기존의 항생제에 대한 다양한 형태의 내성균주의 출현 특히, 임상균주의 다중 약제내성의 발현은 보건의료에 매우 심각한 문제로 대두되어 있고 (Ormerod 등, 1990; 반 등, 1996), 이미 쓰일 수 없는 항생제들이 많이 생기게 되었다.

이들 내성균들은 균체 자체의 효소로 약제를 불활성화시키는 방법, 항생물질 작용점의 약제에 대한 친화성을 감소시키는 방법, 능동적으로 약제를 세포 밖으로 배출하는 방법, 약제의 세포투과성을 저하시키는 방법, 그리고 약제에 저감수성인 대체효소를 생산하는 방법 등 여러 가지 기작으로 내성을 갖게 된다(Levy, 1992; Salyers와 Whitt, 1994; 澤井, 1995).

대장균의 multiple-antibiotic-resistance(*marOPAB*) operon이 각종 항균제에 대한 내재성 내성(intrinsic resistance) 즉, 구조가 다른 여러 종류의 항생제들과 독성물질에 대한 내성을 조절하는 것으로 알려져 있다(Seoane과 Levy, 1995; Martin 등, 1996). Ormerod 등(1990) 등은 백인과 인디안 결핵환자를 통한 임상실험에서 rifampin에 의해서 환자수가 감소하는 것으로

보고하고 있으나, 최근 Bae 등(1998)은 결핵균에서 rifampin 내성 돌연변이 균주를 검출하였다. 임상 *Pseudomonas*균(박 등, 1994)이나, *Neisseriae gonorrhoeae*(Knapp 등, 1987), 그리고 methicillin 내성 staphylococci(류 등, 1995; Chambers, 1988) 등의 약제내성 문제 또한 오랫동안 지적되어 왔다.

따라서 이들 내성균들에 대해 선별적으로 높은 항균력을 지니거나(Silver와 Bostian, 1993), 많은 종류의 병균을 죽이거나 성장을 억제할 수 있는 광범위 활성을 지닌 항생제의 개발이 요구되고 있다(Salyers와 Whitt, 1994).

2-3. 방선균을 이용한 항생물질의 생산

방선균을 이용한 항생물질의 생산은 1940년에 Waksman과 Woodruff가 *Streptomyces antibioticus*에서 actinomycin을 분리하고, 1944년에는 Schatz 등이 *Streptomyces griseus*로부터 streptomycin을 분리하여 폐결핵의 치료제로 사용하면서 *Streptomyces* 속을 포함한 방선균류(Actinomycetes)는 항생물질의 생산균주로서 산업적으로나 의학적으로 중요한 미생물로 인식되었다(안 등, 1991).

대부분의 항생물질은 미생물 특히, 방선균과 곰팡이에 의해서 생산된다(Salyers와 Whitt, 1994). 미생물의 대사산물로부터 발견된 10,000여종의 항생물질 가운데 74% 이상이 방선균에 의해서 생산되며, 그 중 75%는 *Streptomyces* 속으로부터 생산된 것이다(Lee 등, 1995). 특히 *Streptomyces* 속은 같은 종일지라도 화학적으로 다른 여러가지 항생물질을 생산하는가 하면, 한편으로는 분류학적으로 완전히 다른 종에서 같거나 유사한 항생물질을 생산하기도 하는 특성을 지니고 있다(김과 서, 1997).

방선균에 있어서 2차 대사산물이 생산되는 시기와 포자착생이 시작되는 세포분화의 시기는 모두 배양후기 중 거의 비슷한 시점에서 관찰될 뿐만 아

니라, 항생물질 생산능과 포자착색능을 동시에 잃어버리는 현상이 빈번히 관찰되어, 방선균의 2차 대사와 형태분화는 서로 밀접한 관련이 있는 것으로 사료되고 있다(홍, 1995).

일반적으로 미생물의 2차 대사산물은 미생물군 사이의 화학적인 상호작용의 결과로 생성된다(Berdy, 1989). 항생물질 또한 당, 아미노산, 핵산 등과 같은 1차 대사산물을 출발물질로 이용하여 2차 대사의 특유한 생합성 경로를 거쳐 생산되며, 생성된 항생물질은 다시 대사과정을 거쳐 활성이 없는 화합물로 전환된다. 이러한 생합성 과정을 통해 목적하는 항생물질을 대량으로 얻기 위해서는 생합성 기구의 제어가 필요하다(김과 김, 1998).

항생물질의 생합성이 어떻게 시작되어지고 조절되고 있는지에 대한 상세한 기작은 아직 명확하지 않으나 영양성분에 대한 요소(포도당, 암모니아 및 무기 인산염, 금속이온, 전구물질 등), 저해물질이나 생산물과 상호작용하는 포집제(인산마그네슘, zeolite, 탄산마그네슘 등)의 첨가, 세포내 유도물질, 물리·화학적요소(pH, 온도, 통기성, 삼투압 등) 등에 의해서 영향을 받는 것으로 알려지고 있다(김, 1992).

Malpartida와 Hopwood(1984)는 *S. coelicolor*에서 actinorhodin 생합성 유전자를 클로닝하여 항생물질을 생산하지 않는 변이종 *S. coelicolor*와 *S. parvulus*에 도입함으로써 항생물질 생산성을 증진시켰을 뿐만 아니라 새로운 항생물질의 생합성을 유도하였다. 이는 유전자 조작이 항생물질 생산을 위한 중요한 수단임을 제시하였다. 이 후 항생물질 생합성 유전자를 클로닝하여 항생물질의 생합성에 응용하는 연구가 활발하게 이루어졌다. Diez 등(1997)은 cephalosporin을 생산하는 균주인 *Cephalosporium acremonium*을 유전자 조작함으로써 생산성을 향상시킬 수 있었으며, 생합성 유전자의 수를 증가시키며 산소의 흡입량을 증대시키고, 나아가 7-aminodeacetoxy

cephalosporic acid(7-ACA)와 같은 새로운 생합성 능력 및 penicillium G의 생산 등을 이끌어 낼 수 있었다. Kim 등(1995)도 aclacinomycin A의 생산에 있어서 모균주보다 변이종 *Streptomyces lavendofoliae*에서 4배 정도 많은 량의 aclacinomycin A를 생성할 수 있었다. 이들 연구의 결과로 항생물질 생합성에 관련된 20개 이상의 유전자가 클로닝되었다(Chater, 1990). 이는 유전공학적 방법으로 항생물질의 생산성을 향상시킬 수 있는 가능성을 열어주는 계기가 되었다(Yu 등, 1992).

그 외에 새로운 항생제를 얻으려는 연구는 크게 두 방향으로 나뉘는데 기존 항생제의 구조를 변화시켜 항균력을 높이거나, 내성균주에 대하여 유효한 물질을 얻으려는 시도와 자연생태계의 미생물자원을 활용하여 새로운 항생물질을 탐색하는 것이다. 그러나 기존 항생물질의 구조를 변경하기에는 기술적 애로 등 여러 가지 문제점이 있기 때문에 자연생태계에 서식하는 신종의 미생물들을 찾아내고, 이러한 미생물자원의 대사산물 중에서 항균활성을 지닌 물질을 탐색하려는 연구가 부단히 이루어지고 있다(Lee 등, 1997; Kawauchi 등, 1997; Kajimura 등, 1995; Esnard 등, 1995; Kim과 Hwang, 1993; Park과 Park, 1994; Yun과 Lee, 1994; Kim 등, 1998).

새로운 항생물질을 발견하기 위한 기술적 요소로는 ① 새로운 생산균의 발견, ② 새로운 검출방법의 설정, ③ 생산·배양방법의 개량, ④ 분리·정제 및 구조결정 기술의 향상, ⑤ 유기합성화학과의 연계, ⑥ 생산균주의 육종 등을 들 수 있다. 이러한 것들이 서로 밀접하게 관련되기 때문에 이들을 효율적으로 운용을 하여야 한다(岩井와 高橋, 1995). 특히 새로운 미생물을 성공적으로 분리하고, 분리된 균주가 특정한 생리활성물질을 생합성할 수 있는 능력을 가지고 있다 하더라도, 요구되는 제반 조건이 충족되지 못하면 미생물이 가지고 있는 생합성 기능이 제대로 발현되지 못하여 결과적으로

연구자가 원하는 균주를 효과적으로 탐색할 수 없게 된다. 그러므로 다양하고 새로운 미생물자원의 탐색과 더불어 새로운 배양기술의 개발에 관한 연구도 아주 중요하다(김 등, 1996). 또한, 개개인의 독창적인 사고 및 기술이 도입되어 적용되면 새로운 항생물질이 발견될 확률이 높다고 할 수 있다(岩井와 高橋, 1995). 1970년대에 들어 발견된 항생물질들은 기존의 항생제와 구조적으로 많은 연관성이 있어서 보다 새로운 항생물질을 발견하기 위해서는 항생물질을 생산하는 신종의 방선균을 특이한 방법으로 자연계로부터 분리하는 것이 필요하다(이, 1992).



Ⅲ. 재 료 및 방 법

1. 방선균의 분리

1-1. 방선균의 분리원

방선균을 분리하기 위하여 제주도 전지역을 대상으로 토양시료를 채취하였다(Fig. 3). 1차로 12개 지점에서 무작위로 시료를 채취하였으며(random sampling), 2차로는 13개 지점에서 체계적으로(systematic sampling)(Crepin 과 Johnson, 1993), 그리고 중복분리의 빈도를 줄이기 위해 사방 10km 정도의 거리를 유지하여 채취하였다(김, 1997).

각 지역은 반경 20m 정도 범위 내의 토양을 골고루 채취하였으며, 시료 채취의 깊이는 지표면에서 10cm 정도(김 등, 1997; Takahasi 등, 1990)까지의 표층에서 채취하였다.

1-2. 방선균 분리용 배지

방선균 분리용 배지로 1차 분리에서는 arginine glycerol salts agar (AGSA) 배지(El-Nakeeb와 Lechevalier, 1963), starch-casein-nitrate agar (SCNA) 배지(Kuster와 Williams, 1964), 그리고 Benedict agar(BA) 배지(Benedict 등, 1955)를 사용하였다. 2차 분리에서는 AGSA 분리배지에 20%의 soil extract(Nonomura와 Ohara, 1971a)를 첨가한 arginine glycerol salts soil extract agar(AGSSEA) 배지를 사용하였다. 각각의 분리용 배지에는 곰팡이의 생육을 억제하기 위하여 cycloheximide와 nystatin을 50 μ g씩 첨가하였고(Williams과 Davies, 1965), pH는 7.0으로 조절하였다. 방선균의 분리에

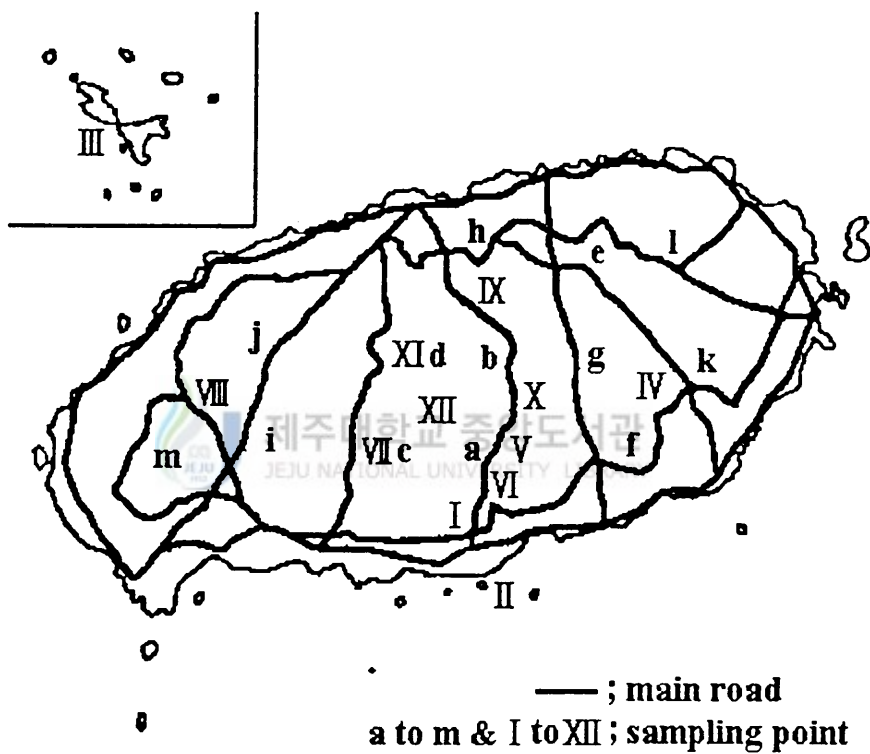


Fig. 3. Map of sampling area for isolation of actinomycetes in Cheju Island.

사용된 각 배지의 조성은 Table 1과 같다.

1-3. 방선균 분리 방법

채취된 토양시료는 실험실 도착 즉시, 일정량을 petri dish에 담아 70℃의 건조기에서 60분 정도 건조하였다. 건조된 시료를 막자사발로 분말화하였다. 분말화된 시료를 멸균된 면봉에 가볍게 묻히고 나서, 과잉의 분말을 털어낸 후, 분리용 배지에 가볍게 찍는 방법으로 1개의 배지에 13회씩 실시하였다. 한 개의 시료 당 3개의 분리용 배지를 사용하였으며, 접종된 배지를 28℃에서 약 4주간 배양하면서 새로이 형성되는 집락의 형태, 포자의 색깔, 색소 등을 육안으로 구별하여 같은 종류의 배지로 옮기고, 다시 일정기간 배양한 후 형태적인 특성들을 상호 비교하여 상이한 균주들을 순수분리하였다 (Hunter-Cevera 등, 1986).



2. 항균활성물질 생산균의 선발

2-1. 방선균의 배양

항균활성물질을 생성하는 방선균을 검색·선발하기 위하여 토양으로부터 순수분리된 방선균을 액체배지(broth)에 배양하였다. 분리용 배지 조성성분 중에서 agar와 cycloheximide, nystatin을 첨가하지 않고 만든 액체배지를 5 ml씩 15ml들이 시험관에 분주하고, 121℃에서 15분간 가압멸균한 후, 분리된 방선균의 포자 1백금이를 접종하여 160rpm(Kahan 등, 1979), 28℃에서 약 15일간 진탕배양하였다. 배양액을 5,000g에서 15분간 원심분리한 후, microfilter(0.25 μ m)로 여과하여 균체를 제거하고 상정액을 얻었다. 이렇게 해서 얻어진 각 균주의 무세포 배양액을 항균활성 검색시료로 사용하였다.

Table 1. Composition of media used for isolation of actinomycetes

Composition	AGSA	SCNA	AGSSEA	BA
Arginine monohydrochloride	1.0g	-	1.0g	2.5g
Glycerol	12.5g	-	12.5g	20.0g
KH ₂ PO ₄	1.0g	-	1.0g	
NaCl	1.0g	-	1.0g	1.0g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g	0.05g	0.5g	0.1g
Fe ₂ (SO ₄) · 6H ₂ O	0.01g	-	0.01g	
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.001g	-	0.001g	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.001g	-	0.001g	
MnSO ₄ · H ₂ O	0.001g	-	0.001g	
Starch	-	10.0g	-	
Casein	-	0.3g	-	
KNO ₃	-	2.0g	-	
K ₂ HPO ₄	-	2.0g	-	
CaCO ₃	-	0.02g	-	0.1g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	-	0.01g	-	0.1g
Soil extracts*	-	-	200ml	
Cycloheximide	50μg	50μg	50μg	
Nystatin	50μg	50μg	50μg	
Agar	15g	15g	15g	20.0g
Distilled water	1,000ml	1,000ml	800ml	1000ml
pH	7.0	7.0	7.0	7.0

* Autoclaved 1,000g of soil with 1 liter of tap water for 30 min, decanted, and filtered.

AGSA ; Arginine glycerol salts agar, SCNA ; Starch-casein-nitrate agar

AGSSEA ; Arginine glycerol salts soil extract agar. BA ; Benedict agar

2-2. 항균활성의 측정

항균활성은 paper disc법(Jacques와 Acar, 1980)으로 측정하였으며, 피검균으로는 그람(gram) 음성 세균인 *E. coli* ATCC 8749와 그람 양성 세균인 *S. aureus* ATCC 6538을 사용하였다.

피검균의 배양액을 도말한 nutrient agar(NA) 평판배지 위에 paper disc (Toyo, 직경 8mm)를 올려놓고, 방선균의 배양액을 40 μ l씩 흡수시킨 다음, 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양했을 때의 피검균의 생육저지영역의 직경을 측정함으로써 항균활성 여부를 검색하였다.

*E. coli*와 *S. aureus* 두 종류의 피검균에 대하여 동시에 항균활성을 나타내는 균주에 대해서는 *P. solanacearium* ATCC 10692의 생육저해 여부도 검색하였다. 피검균 *P. solanacearium*의 배양액을 PS배지에 도말하고, 그 위에 paper disc를 올려놓은 후에 방선균의 배양액을 40 μ l씩 흡수시켜 32 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양했을 때의 생육저지영역의 직경을 측정하였다. 위와 같은 과정을 거쳐서 상기 3종의 피검균에 대하여 동시에 항균활성을 나타내는 균주를 선발하였다(Table 2).

3. 선발균주의 동정

선발균주의 동정은 Shirling과 Gottlieb(1966)의 방법(ISP, International *Streptomyces* Project)과 “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (Williams 등, 1989)에 수록된 방법에 따라 실시하였다.

Table 2. Test microorganisms for the screening of antimicrobial activities and their growth media

Test organism	Medium
<i>Escherichia coli</i> ATCC ¹⁾ 8749	Nutrient agar(Difco)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Nutrient agar(Difco)
<i>Pseudomonas solanacearum</i> ATCC 10692	PS ²⁾

1) ATCC : American Type Culture Collection

2) PS : peptone 10.0g, casein hydrolysate 1.0g, glucose 5.0g,
distilled water 1.0L

방선균을 육안, 광학현미경 그리고 전자현미경으로 형태학적 특성을 조사하였으며, 배양학적 특성을 조사하기 위해서 수종의 ISP 배지 등을 사용하여 배양하였고, 생리학적 특성에 대해서는 diaminopimelic acid(DAP) 이성체의 분석을 통한 세포벽 성분(Lechevalier와 Lechevalier, 1970), 탄소원 이용성, 멜라닌 색소의 생성 유무 그리고 수용성 색소의 생성 유무를 조사하였다(Shirling과 Gottlieb, 1968).

3-1. 배양학적 특성

선발균주를 6종류의 ISP 배지(yeast extract malt extract agar, oatmeal agar, inorganic salts starch agar, glycerol asparagine agar, peptone yeast extract iron agar, tyrosine agar)(Table 3), glucose asparagine agar 배지, Bennet's agar 배지 그리고 nutrient agar 배지에서 14일간 배양한 후 생육의 정도, 기균사(aerial mycelium)의 색깔, 집락 배면(substrate mycelium)의 색깔 및 수용성 색소의 생성 유무를 확인하였다.

기균사의 색깔은 blue, gray, green, red, violet, white, yellow의 7가지 색으로 구분하여 관찰하였고, 배면의 색깔은 yellow-brown(no distinctive pigment), blue, green, red-orange, violet 등으로 구분하여 관찰하였다(Williams 등, 1989).

3-2. 형태학적 특성

선발된 균주를 inorganic salts starch agar 배지(Shirling과 Gottlieb, 1966)에 도말하고 28℃에서 2주간 배양한 후, 광학현미경과 주사 전자현미경을 이용하여 포자의 크기, 포자 표면 형태, 포자 사슬 형태, 사슬 당 포자의 수, 포자의 운동성을 관찰하였다.

Table 3. Composition of media by International *Streptomyces* Project(ISP)

Medium ¹⁾ Component	YEMEA (ISP 2)	OA (ISP 3)	ISSA (ISP 4)	GAA (ISP 5)	PYEIA (ISP 6)	TA (ISP 7)
Yeast extract	4.0g				1.0g	
Malt extract	10.0g					
Glucose	4.0g					
Oatmeal		20.0g				
Soluble starch			10.0g			
K ₂ HPO ₄			1.0g	1.0g	1.0g	0.5g
MgSO ₄ · 7H ₂ O			1.0g			0.5g
(NH ₄) ₂ SO ₄			2.0g			
CaCO ₃			2.0g			
Glycerol				10.0g		15.0g
L-Asparagine				1.0g		1.0g
Peptone					15.0g	
Proteose peptone					5.0g	
Ferric ammonium citrate					0.5g	
Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O					0.08g	
L-Tyrosine						0.5g
NaCl			1.0g			0.5g
FeSO ₄ · 7H ₂ O			1.0mg			0.01g
MnCl ₂ · 7H ₂ O			1.0mg			
ZnSO ₄ · 7H ₂ O			1.0mg			
Agar	20.0g	18.0g	20.0g	20.0g	15.0g	20.0g
Trace salts solution ²⁾		1.0ml		1.0ml		
Trace elements solution HO-LE ³⁾						1.0ml
pH	7.3		7.2	7.2	7.0	7.3
Distilled water	1 ℓ	1 ℓ	1 ℓ	1 ℓ	1 ℓ	1 ℓ

1) YEMEA ; Yeast extract malt extract agar, OA ; Oatmeal agar, ISSA : Inorganic salts starch agar, GAA ; Glycerol asparagine agar, PYEIA ; Peptone yeast extract iron agar, TA ; Tyrosin agar

2) Trace salts solution(composition per 100ml) : FeSO₄ · 7H₂O ; 0.1g, MnCl₂ · 4H₂O ; 0.1g, ZnSO₄ · 7H₂O ; 0.1g

3) Trace elements solution HO-LE(composition per liter) : H₃BO₃ ; 2.85g, MnCl₂ · 4H₂O ; 1.8g, Sodium tartrate ; 1.77g, FeSO₄ · 7H₂O ; 1.36g, CoCl₂ · 6H₂O ; 0.04g, CuCl₂ · 2H₂O ; 0.027g, Na₂MoO₄ · 2H₂O ; 0.025g, ZnCl₂ ; 0.02g

포자의 연결상태(spore chain) 및 균사의 형태는 광학현미경으로 판단하였다. 전자현미경의 표본은 inorganic salt-starch agar 배지에서 배양된 집락을 5% glutaraldehyde로 90분간 고정시켜 제작하였다. 고정된 시료를 50%, 75%, 90%, 95%, 100%의 ethanol에서 각각 40분씩 순차적으로 탈수처리한 후, 50%, 85%, 100%의 isoamyl acetate로 치환하고 최종적으로 critical point dryer로 건조하였다. 건조된 시료를 ion coater로 4분간 gold coating한 후, 주사 전자현미경(Hitachi S-2460N, Japan)으로 관찰하였다. 포자 표면의 형태는 smooth, warty, spiny, hairy, rugose로 구분하였으며, 포자의 사슬형태는 rectiflexibiles, retinaculiaperti, spirales로 구분하여 관찰하였다(Williams 등, 1983a,b).

3-3. 생리학적 특성

균주의 동정에 기준이 되는 생리학적 특성 중에서 멜라닌 색소의 생성 여부는 peptone yeast extract iron agar 배지에서 4일간 배양한 후 관찰하였으며, 수용성 색소의 생성 유무는 glycerol asparagine agar 배지에서 14일간 배양한 후에 관찰하였다.

세포벽의 구성 성분인 diaminopimelic acid(DAP) 이성체의 분석은 다음과 같이 실시하였다. 평판배지에 자란 균체의 집락을 취하여 6N HCl 1ml와 함께 앰플병에 넣고, 질소가스를 충전한 후 밀봉하여 121℃에서 15분간 가수분해시켰다. 가수분해액을 cellulose-thin layer chromatography로 분석하였으며, 전개용매로는 methanol-water-6N HCl-pyridine 혼합용액(80 : 15 : 5 : 10)을 사용하였고, 0.2% ninhydrin용액으로 발색시켜 표준제품과 비교하였다(Hasegawa 등, 1983). 표준제품으로는 LL-DAP와 meso-DAP의 혼합제품(Sigma)을 사용하였다.

3-4. 탄소원 이용성

Carbon utilization agar 기본배지(ionagar 10.0g, NH_4Cl 1.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, ferric ammonium citrate 0.05g, CaCl_2 0.5mg, sodium potassium phosphate buffer 0.33M solution, pH 6.8)에 총 11종의 탄소원(D-glucose, L-arabinose, D-xylose, inositol, D-mannitol, D-fructose, L-rhamnose, sucrose, raffinose, cellulose, maltose)을 각각 2%씩 첨가한 배지를 사용하였다. 이때 양성(positive) 대조구로는 탄소원으로 D-glucose를 첨가한 배지를 사용하였고, 탄소원을 첨가하지 않은 배지를 음성(negative) 대조구로 사용하여 배양 중 7일, 14일, 21일 간격으로 대조구와 비교하였다(Williams 등, 1989).

4. 선발균주에 의한 항균활성물질의 생산 및 정제

4-1. 항균활성물질의 생산

항균활성물질을 대량으로 얻기 위해서 최종 선발된 균주를 분리용으로 사용했던 AGSSE broth에 배양하였다. 300ml 들이 삼각플라스크에 AGSSE broth 100ml를 주입하고 선발균주를 접종하여 28℃에서 160rpm으로 7일간 전배양하였다. 본배양은 자체 제작한 20ℓ 용량의 발효조에 전배양시와 동일한 배지 10ℓ를 넣어 멸균한 후, 전배양액 100ml를 섞어서 접종하였고, 28℃에서 9일간 통기배양하였다. 배양 중에 24시간 간격으로 pH의 변화 및 항균활성을 조사하였다.

배양이 끝난 후, 균주 배양액을 5,000g에서 15분간 원심분리하였다. 상정액을 취하여 0.25 μm filter로 감압여과하여 균체를 제거하였다. 균체가 제거

된 무균 배양액을 회전감압농축기(rotary vacuum evaporator)로 50℃에서 10배 농축하여 항생물질의 분리·정제용 시료로 사용하였다.

4-2. 항균활성물질의 정제 특성

항균활성물질의 특성을 조사하기 위하여 먼저 유기용매에 대한 분배성을 조사하였다. 분배성 조사는 산(pH 3), 알칼리(pH 9), 중성(pH 7)의 조건에서 배양농축액 2ml에 물과 섞이지 않는 유기용매(n-hexane, benzene, n-butanol, ethyl acetate, petroleum ether, chloroform, methyl ethyl ketone) 동량을 혼합하여 20분 동안 진탕한 후, 물층과 용매층이 분리되도록 충분히 방치하였다. 용매층에서 40 μ l를 취하여 paper disc에 흡착시키고 용매는 건조시켜 제거하였다. 동량의 멸균증류수를 paper disc에 재흡수시켜 *E. coli*에 대한 항균활성을 paper disc법으로 측정하였다.

활성탄에 대한 흡착성은 다음과 같이 측정하였다. 배양농축액 2ml를 활성탄 0.1g과 혼합하여 30분간 방치시킨 후, 활성탄과 배양액을 분리하고, 배양액 중의 잔존 항균활성과 활성탄을 acetone으로 탈착시킨 시료 중의 항균활성을 같은 방법으로 측정하였다.

Ion exchange chromatography의 조건을 찾기 위해서 다음과 같은 실험을 실시하였다. 배양농축액 2ml를 음이온 교환 수지(AG MP-1 resin, Cl⁻ form)와 양이온 교환 수지(AG MP-50 resin, Na⁺ form) 0.1g과 각각 혼합하여 10분간 진탕한 후, 원심분리하여 얻은 상징액 중의 항균활성을 측정하여, 배양농축액의 항균활성과 비교하였다.

4-3. Cation exchange chromatography

선발된 균주의 배양농축액으로부터 항균활성물질을 분리·정제하기 위하

여 우선 cation exchange chromatography를 실시하였다. Terry와 Simon (1982)의 방법에 따라 10배로 농축된 배양액 50ml를 양이온교환수지(AG MP-50, Na⁺ form)가 채워진 column(2.8×20cm)에 흡착시킨 후 5M NH₄Cl 용액으로 분당 1ml의 유속으로 용출시키면서 3.0ml씩 분획하였다. 각 분획 중의 항균활성을 *E. coli*를 대상으로 paper disc법으로 측정하였다. 활성을 나타내는 분획을 모아서 포화상태에 이를 때까지 50℃에서 회전감압농축기로 농축한 시료를 다음 단계의 정제 과정에 사용하였다.

4-4. Gel permeation chromatography

Cation exchange chromatography에서 얻어진 활성분획의 농축액을 gel permeation chromatography로 정제하였다(Cooper, 1977). 포화용액 5ml를 sephadex G-10이 채워진 column(2.8×35cm)에 주입한 후, 증류수를 이용하여 분당 1.0ml의 유속으로 용출시키면서 2.0ml씩 분획하였다. 분획 중의 항균활성을 *E. coli*를 대상으로 paper disc법으로 측정하였다. 활성을 나타내는 분획을 모아서 회전감압농축기로 50℃에서 농축하여 포화용액을 만들었다. 이 포화농축액을 gel permeation chromatography로 재차 정제하고, 이어서 같은 방법으로 3차에 걸친 gel permeation chromatography를 실시하였다.

4-5. High performance liquid chromatography

Gel permeation chromatography를 통하여 얻어진 화합물을 건조시켜 항균활성이 있는 결정을 얻었다. 이 결정을 HPLC로 최종 정제하였다.

활성물질을 25mg/ml의 농도로 9.5% methanol 용액에 용해시키고 0.25 μ m microfilter로 여과한 후, Waters Spherisorb S5 ODS2 column에 주입하였

다. 9.5% methanol 용액을 사용하여 분당 0.25ml의 속도로 용출시켰다. UV detector(210nm)로 검출된 분획들을 모아서 사용하였다.

이상과 같은 항균활성물질의 분리·정제에 대한 전반적인 과정을 Fig. 4에 알기 쉽도록 간단히 도식화하였다.

5. 항균활성물질의 분석

Cation exchange chromatography와 gel permeation chromatography를 통하여 분리·정제된 화합물의 물리·화학적 특성을 분석하기 위하여 용해성 조사와 아미노산 조성의 분석을 실시하였으며, 자외선 흡광 spectrum과 항균 spectrum을 조사하였고, thin layer chromatography(TLC)와 high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용하여 분석·정제하였다. 또한, nuclear magnetic resonance(NMR) spectrum을 조사하였다.

5-1. 용해성 조사

활성물질의 용매에 대한 용해성을 측정하기 위하여 증류수와 각종 유기용매 methanol, ethanol, n-hexane, benzene, n-butanol, ethyl acetate, petroleum ether, chloroform, methyl ethyl ketone 등에 용해시켜 정제시료의 용해성을 조사하였다.

5-2. 아미노산 조성 분석

활성물질의 아미노산 조성을 분석하기 위하여 정제된 시료 5mg을 유리 앰플병에 넣고 6N HCl 2ml를 가하고 질소가스로 충전시킨 후 밀봉하여 건조

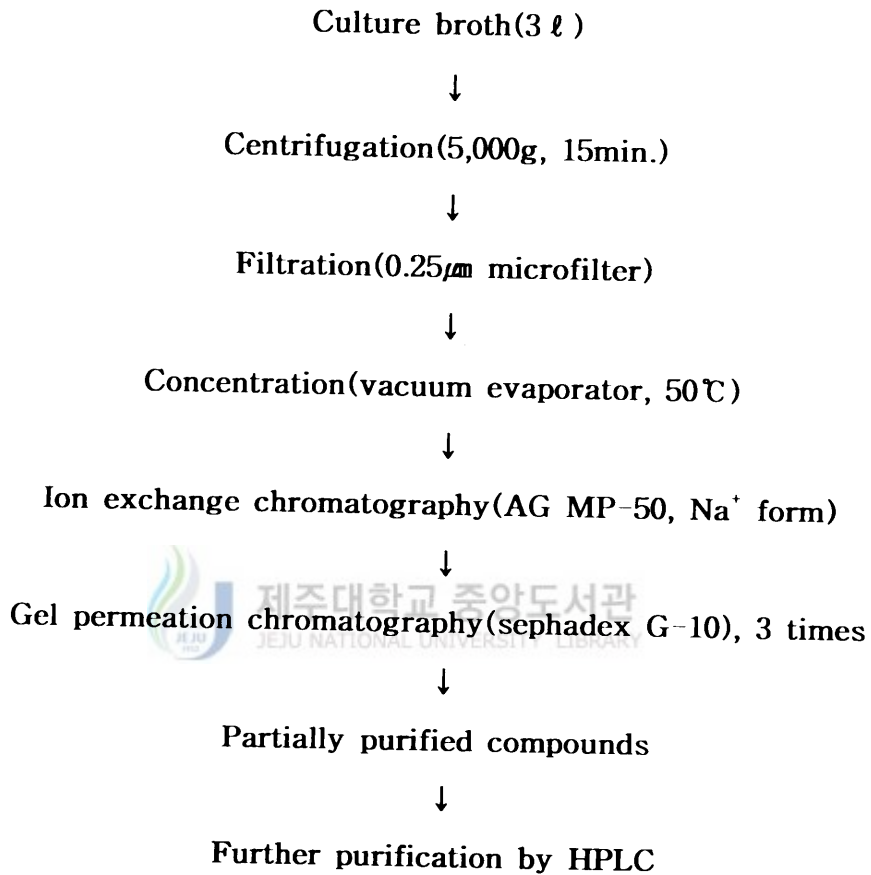


Fig. 4. Procedures for purification of antibacterial compounds from culture broth.

기를 이용하여 110℃에서 24시간 분해시켰다. 그 후 상온에서 냉각시킨 후, microfilter(0.25 μ m)로 여과하였다. 이어서 50℃에서 감압농축하고, NaOH를 넣은 데시케이터에서 2일간 건조하여 염산을 제거하였다. 염산이 완전히 제거된 후, 시료에 증류수 1ml를 가하여 용해시키고 silica gel TLC를 이용하여 분석하였다. TLC용 용매로는 methanol : acetic acid : water의 3 : 1 : 1 혼합액을 사용하였다(Brenner 등, 1969).

5-3. 자외선 흡광 spectrum

활성물질을 25mg/ml 수용액으로 만들어, 파장 190~500nm 사이에서 자외선 흡광 spectrum(Shimadzu UV-1601 PC, Japan)을 조사하였다.

5-4. 항균 spectrum

활성물질의 각종 병원성 그람 양성 및 음성 세균과 효모의 생육에 미치는 효과를 조사하기 위하여 그람 음성균 4종, 그람 양성균 6종, 효모 4종을 피검균으로 사용하여 생육저지영역을 측정하였다.

그람 양성균으로는 *Escherchia coli* 8749, *Escherchia coli* O 157 : H7, *Alcaligenes feacalis* 8750, *Flavobacterium aquatile* 11947을 피검균으로 사용하였으며, 그람 양성균으로는 *Pseudomonas solanacearum* ATCC 10692, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* KCTC 1023, *Bacillus cereus* KCTC 1024, *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111을 사용하였다.

Pseudomonas solanacearum ATCC 10692와 *Listeria monocytogenes* ATCC 19111을 제외한 모든 피검균은 15ml 시험관에서 NB(nutrient broth)를 이용하여 37℃에서 24시간 전배양하였으며, NA(nutrient agar) 배지를

petri dish에 25ml씩 분주하고, 피검균의 전배양액을 50 μ l씩 도말하였다. 피검균이 도말된 배지 위에 paper disc를 올려 놓고, 부분정제된 활성물질 용액(25mg/ml)을 40 μ l씩 paper disc에 흡수시켜 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양한 후, 생육저지영역의 직경을 측정하였다. 피검균 *Pseudomonas solanacearum* ATCC 10692는 PS 배지를 이용 32 $^{\circ}$ C에서 24시간, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111는 BHIA(brain heart infusion agar, BBL) 배지를 이용, 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양한 후, 같은 방법으로 생육저지영역의 직경을 측정하였다.

효모로는 *Saccharomyces cerevisiae* IAM 4512, *Saccharomyces rocei* IAM 4991, *Tollulopsis colliculosa* IAM 4426, *Candida albicans* KCCM 11282를 피검균으로, YM(yeast-malt extract)배지를 이용하여 28 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후, 같은 방법으로 생육저지영역의 직경을 측정하였다.



5-5. Thin layer chromatography

활성물질을 정상(normal)과 역상(reverse) TLC로 나누어 분석하였으며, 조건에 따른 전개용매는 Table 4와 같다. Silica gel 60 및 silica gel 60 silanized(RP-2) plate에 활성물질 용액(25mg/ml)을 10 μ l씩 흡착시킨 후 각각의 용매로 전개시켰다. 전개시킨 후 화합물은 자외선(254nm, 366nm)과 0.2% ninhydrin(Sigma-Aldrich)용액, 5% H₂SO₄ ethanol용액, iodoplatinate (potassium) 용액 그리고 orcinol ferric chloride 용액 등을 이용하여 탐색하였다. 탐색된 분획을 끓여낸 후 멸균 증류수로 용출시키고, *E. coli*에 대한 항균활성을 paper disc법으로 조사하였다.

Table 4. Analysis condition by thin layer chromatography

Method	Thin layer	Developing solvent
Normal phase	Silica gel 60	
①		Butanol : methanol : H ₂ O = 4 : 1 : 2
②		Butanol : acetic acid : H ₂ O = 4 : 1 : 2
③		Propanol : 1N-NH ₄ OH = 7 : 3
Reverse phase	Silica gel 60 silanized(RP-2)	
④		10% Methanol
⑤		30% Methanol

5-6. High performance liquid chromatography

활성물질을 HPLC(Hewlett Packard 1090, USA)를 이용하여 분석하였다. HPLC의 운용조건은 Table 5와 같다. 검출된 분획에 대해서는 *E. coli*에 대한 항균활성을 검색하였다.

5-7. Nuclear magnetic resonance spectroscopy

부분정제된 화합물을 ^{13}C 과 ^1H NMR(JNM-LA400, JEOL, JAPAN)로 분석하였으며, TLC와 HPLC를 통하여 정제된 4개의 분획 중, 농도가 높은 3개의 분획에 대해서는 ^1H NMR(Inova, VARIAN, USA)로 분석하였다.



Table 5. Analysis condition by high performance liquid chromatography

Column	Hypersil ODS column
Eluent	9.5% Methanol
Flow rate	0.25ml/min
Detection	UV(210nm)

IV. 결과 및 고찰

1. 방선균의 분리 및 분포

제주도내 25개 지점(Fig. 3 참조)에서 채취된 토양으로부터 생육 가능한 모든 방선균을 분리한 후, 각 지점에서 분리된 방선균을 육안으로 상호 비교하여 같은 종류라고 생각되는 것은 폐기하였다. 이와 같은 방법으로 네 종류의 방선균 분리용 배지를 이용하여 총 703주의 방선균을 분리하였다.

1-1. 사용 배지별 분리

SCNA 배지를 사용한 방선균의 분리에서는 총 8개 지역에서 75개의 방선균을 분리하였다(Table 6). BA 배지를 제외한 다른 두 종류의 방선균 분리용 배지에 비해 분리된 방선균의 수가 적었으며, 집락의 색깔은 다양하였으나 집락의 형태는 한 종류로 관찰되었다. 습기가 많은 계곡과 가축의 분변이 많은 중산간의 목장지대와 이시들 목장지대에서 비교적 많은 방선균이 분리되었다.

Starch와 nitrate, casein은 대부분의 Streptomycetes에 의해 분해되는 좋은 탄소원과 질소원으로 Streptomycetes의 분리용 배지성분으로 자주 이용된다(Flaig와 Kutzner, 1960). Kuster와 Williams(1964)는 탄소원으로 starch와 glycerol, 질소원으로 casein, arginine 또는 nitrate를 첨가함으로써 Streptomycetes의 분리에 좋은 효과를 거둔 것으로 보고하였다. 따라서 본 실험의 결과, SCNA 배지에서 분리된 방선균은 집락의 형태로 보아, 주로 *Streptomyces* 속일 가능성이 높다.

Table 6. Number of isolated actinomycetes from specific regions of Cheju Island

Region ¹⁾	Name	AGSA	SCNA	BA
I	Seoguipo			
	tangerine orchard	10	-	1
II	Seop island	14	-	2
III	Chuja island	16	-	2
IV	Tosan	17	-	1
V	Suak valley	11	8	2
VI	Donnaecho valley	13	12	2
VII	Yungsil valley	10	10	1
VIII	Isidor ranch	35	14	3
IX	Ara ranch	21	9	3
X	Seongpanak	7	9	1
XI	Wissaeorm	8	6	1
XII	Baekrokdam	9	7	1
Total		171	75	20

1) Refer to Fig. 3.

AGSA 배지를 사용한 방선균의 분리에서는 총 12개 지역에서 171개의 방선균을 분리하였다(Table 6). SCNA 배지에 비해 비교적 많은 수의 방선균을 분리할 수 있었으며, 집락의 형태도 SCNA 배지보다는 다양하였다. 집락의 형태가 다양한 것으로 보아 SCNA 배지보다는 *Streptomyces* 속 이외의 방선균 속도 어느 정도 분리된 것으로 추정하였다.

SCNA 배지를 사용했을 때와 마찬가지로 목장지대에서 비교적 많은 수의 방선균이 분리되었으며, 섬 지역에서도 많은 수의 방선균이 분리되었다. 아울러 고도가 높아짐에 따라 분리균주의 수가 감소하는 경향을 보였다.

BA 배지를 사용한 방선균의 분리에서는 총 12개 지점의 토양시료로부터 20개의 방선균을 분리하였다(Table 6). 토양시료 당 오직 1~3종의 방선균만이 관찰되었다. 그러나 다양한 종류의 일반세균들이 BA 배지에 생육하였다. BA 배지와 AGSA 배지를 비교해 보면, 탄소원과 질소원은 동일하나, 인산염 등 수종의 무기염류 구성에 차이가 있다. 따라서, 무기염류 조성의 차이가 방선균의 생육에 지대한 영향을 끼쳤으며, BA 배지는 AGSA 배지의 약 12%에 해당하는 분리효율을 나타내었다.

농약 등으로 오염되지 않은 해발 200m 이상의 지역에서 사방 10km로 나눈 결과 13개 지역으로 구분되었다(Fig. 3, a에서 m까지). 이 지역들의 토양시료를 채취하여 2차 방선균 분리에 사용하였다.

2차 방선균 분리에서는 AGSA 배지에 soil extract를 20% 가하여 변형시킨 AGSSEA 배지를 사용한 결과, 위치와 고도 등에 관계없이 많은 수의 방선균을 분리하였으며, 집락의 색깔과 집락의 형태도 AGSA 배지를 사용했을 때보다 다양하였다. AGSSEA 배지에서는 437개의 방선균을 분리하였으며, 대부분의 지역에서 30개 이상의 균을 분리할 수 있었으며, 40개 이상 분리된 곳도 있었다(Table 7).

Table 7. Number of isolated actinomycetes from specific region of Cheju Island

Region¹⁾	Name	AGSSEA
a	Ipseok-dong	36
b	Seongpanak rest area	40
c	Seoguipo natural forest resort	31
d	Cheonwang temple	23
e	Seonhul-ri	42
f	Hannam-ri	38
g	Mt. Suryoung	33
h	Yonggang-dong	30
i	Youngari-orum	32
j	Sogil-ri	18
k	Mt. Youngju	37
l	Pijarim	40
m	Kumak-ri	37
Total	13	437

1) Refer to Fig. 3.

Nonomura와 Ohara(1971a,b,c)는 soil-extract를 첨가한 MGA(magnesium glucose asparagine)-SE(soil extract) 한천배지를 사용하였을 때 AV agar 배지와 vitamin B가 첨가된 salts-starch agar 배지를 사용했을 때에 비해 *Microbispora* 속, *Microtetraspra* 속, *Thermomonospora peptonophilus*, 그리고 *Actinomadura* 속의 균주들을 효과적으로 분리할 수 있었으며, 아울러 다른 방선균의 집락도 다른 배지에 비해 많이 발생하였다고 보고하였다. 또한, 소량의 soil extract를 첨가하여도 토양 중의 미량원소에 의해서 Streptomycetes의 성장에 좋은 결과를 준다고 보고하였다. 본 실험에서도 soil extract의 첨가로 분리된 방선균의 숫적인 증가는 물론, 집락의 형태와 색깔이 다른 세 종류의 배지에 비해 훨씬 다양한 것으로 보아 토양 중의 성분이 Streptomycetes는 물론, 희소방선균 속의 생육에 좋은 효과를 주는 것으로 사료된다.

분리용 배지별로 수집된 균주의 수를 Table 8에 요약하였다. 토양 방선균의 분리선발과 관련하여 흔히 사용되는 4종의 방선균 분리용 배지를 시험한 결과, arginine glycerol salts(AGS) 배지에 soil extract(20%)를 첨가한 배지가 가장 좋았으며, 같은 배지일지라도 soil extract 첨가 여부에 따라 약 3배 정도의 차이가 있었다. 또한 BA 배지가 가장 비효율적이었다. 이는 토양방선균의 분리 및 보존에 있어서 합성배지의 사용이 비효율적임을 제시한다.

1-2. 지역별 분포

방선균의 분리 빈도를 지역 특성별로 비교해 보면 감귤원, 섬, 숲, 계곡, 오름, 농경지 등보다도 목장초지가 방선균의 다양성과 밀도면에서 제일 높은 수치를 보였다(Table 9).

Flaig와 Kutzner(1960)의 보고에 의하면 경작지, 목초지 및 산림지역에서

Table 8. Comparison of media for soil actinomycete screening

Medium¹⁾	AGSA	BA	SCNA	AGSSEA
Number of isolates	171	20	75	437

1) Refer to Table 1 for medium composition

Table 9. Distribution of soil actinomycetes in Cheju Island.

	Citrus Pasture		Forest Island Hill Valley				Top area of Farm	
	area	field	land				Mt. Halla	land
Number ¹⁾ of isolates	22	41	10	9	13	13	9	17

1) Numbers indicate the average number of actinomycetes isolated per soil sample.

방선균을 분리한 결과, 목초지에서 가장 많은 수의 방선균을 분리할 수 있었으며, 그리고 무기물을 시비한 밭 토양이나 시비하지 않은 토양에서보다도 유기물질이 풍부한 토양에서 많은 수의 방선균을 분리하였다. Kuster (1976)는 목초지에서 가장 다양한 *Streptomyces* sp.를 분리하였으며, 또한 여러 종류의 토양시료 중 산림토양에서 가장 적은 수의 방선균을 분리하였다. 본 실험에서도 이들 보고와 거의 유사한 결과를 보여주었다.

2. 항균활성물질 생산균의 선발

분리·수집된 703주 중에서 526주를 대상으로 3종의 검정균 *E. coli*, *S. aureus*, 그리고 *P. solanacearum*에 대한 항균활성물질 생산여부를 검색한 결과는 Table 10과 같다.

2-1. SCN Broth를 사용한 항균활성물질 생산균의 검색

SCNA 배지를 사용해서 분리된 방선균 중 64개의 균주가 검색되었다. 그 중에서 15개의 균주가 *E. coli*에 대하여 항균활성을 나타내었다. 그리고 6개의 균주가 약하나마 *S. aureus*에서 항균활성을 나타내었으나, 두 종류의 검정균에서 동시에 항균활성을 나타내는 균주는 발견되지 않았다.

2-2. AGS Broth를 사용한 항균활성물질 생산균의 검색

AGSA 배지를 사용해서 분리된 방선균 중 135개의 균주가 검색되었다. 그 중에서 25개의 균주가 *E. coli*에 대하여 활성을 나타내었다. *S. aureus*에 대해서 항균활성을 나타내는 균주 13개가 발견되었다. 그리고 *E. coli*와 *S.*

Table 10. Number of actinomycete isolates with antimicrobial activity

Test organism	Medium ¹⁾			
	AGSA	BA	SCNA	AGSSEA
<i>E. coli</i>	25/135 ²⁾ (18.5) ³⁾	0/20 (0)	15/64 (23.4)	20/307 (6.5)
<i>S. aureus</i>	13/135 (9.6)	0/20 (0)	6/64 (9.4)	20/307 (6.5)
<i>E. coli</i> + <i>S. aureus</i>	2/135 (1.5)	0/20 (0)	0/64 (0)	17/307 (5.5)
<i>E. coli</i> + <i>S. aureus</i> + <i>P. solanacearum</i>	0/135 (0)	0/20 (0)	0/64 (0)	10/307 (3.3)
Subtotal ⁴⁾	36/135 (26.7)	0/20 (0)	21/64 (32.8)	23/307 (7.5)

1) Refer to Table 1 for medium composition

2) No. of active isolates/no. of isolates tested

3) Percentage of active isolates

4) Indicate the number of active isolates against any one of the test organisms

*aureus*에 대해 동시에 항균활성을 나타내는 균주는 2개가 발견되었으나, 이 2종의 균주도 *P. solanacearum*에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았다.

2-3. AGSSE Broth를 사용한 항균활성물질 생산균의 검색

AGSSEA 배지를 사용하여 분리된 방선균 중 307개의 균주가 검색되었다. 각각 20개 이상의 균주가 *E. coli*와 *S. aureus*에 대해서 항균활성을 나타내었다. 특히 이들 활성물질 생산균은 해발 200m 정도의 채취지역에서 주로 발견되는 현상을 보였다. 그리고 이 중 17개의 균주가 *E. coli*와 *S. aureus*에 대해 동시에 항균활성을 나타내었으며, 이들을 이용한 *P. solanacearum*에 대한 항균활성 시험 결과, 10개의 균주가 *E. coli*와 *S. aureus* 및 *P. solanacearum*에 대해 동시에 항균활성을 나타내었다(Table 11).

김 등(1996)은 제주지역에서 분리된 방선균 중에서 항균활성물질 생성균주가 차지하는 비율이 12.6%로 다른 지역의 16.3% 보다 낮으며, *E. coli*보다 *S. aureus*에 대해서 보다 많은 균주가 항균활성을 나타낸 것으로 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 BA 배지를 사용했을 때는 항균활성이 전혀 나타나지 않았으며, AGSSEA, AGSA 그리고 SCNA 배지를 사용했을 때는 각각 7.5%, 26.6% 그리고 32.8%였다. 이는 배지의 종류에 따라 항균활성물질 생산균주의 발생빈도가 차이를 보여주었다. 그리고 *S. aureus*보다도 *E. coli*에 대해서 항균활성을 나타내는 균주가 2배 이상 많은 것으로 나타났다. 또한 18개의 균주가 *P. solanacearum*에 대해서 항균활성을 나타내었다.

김(1992)에 의하면 액체배양 중, zeolite, kaoline, celite와 다른 천연의 무기물들이 pellet의 형성을 억제하기 위하여 미생물세포와 상호작용하며, 산소와 영양분의 섭취를 증가시키고, 2차 대사산물의 생합성을 촉진하게 되면 항균활성물질의 생산성이 높아진다고 보고하였다. 실제로 의약용으로 사용

Table 11. Growth inhibition of test strains by cell-free culture filtrates of the actinomycetes isolated in this study

Isolate	<i>E. coli</i> 8749	<i>S. aureus</i> 6538	<i>P. solanacearum</i>
			10692
5-3	+++	+++	++
5-20	+++	+++	+++
5-22A	+++	+++	++
5-22B	+++	++	+++
6-11A	++	+++	++
8-23A	++	++	++
9-3	+++	+++	++
9-18	++	++	++
10-6B-a	+++	++	++
10-6B-b	++	++	+

Diameter of growth inhibition(mm) : + ; over 11, ++ ; over 13, +++ ; over 15

되는 항생물질을 생산하는 방선균의 대부분은 토양으로부터 분리된 것이다. 이는 항생물질의 생산이 토양 중의 다른 미생물과 경쟁이 되고, 토양 microflora의 수적인 균형의 규칙을 유지하는 데에서 토양이 항생물질의 생산에 이점을 주는 것으로 추정하고 있으나 아직 직접적인 증거는 제시되지 않고 있다(Williams, 1982). 그 원인으로는 1) 어떤 토양조건에서의 균주의 불안정성, 2) 토양 콜로이드에 대한 균주의 흡착성, 3) 활성 측정방법의 부적합, 4) 영양성분의 부족에서 기인되는 항생물질 생산균주의 짧은 성장 등으로 추정하고 있다. 그러나 Rothrock과 Gottlieb(1984)은 배지의 구성성분으로 멸균된 토양의 첨가는 항생물질의 생산에 도움을 준다고 보고하고 있으며, 곰팡이에 대해 길항작용을 가지는 Streptomycetes를 접종하여 질병을 감소시킬 수 있었다. 이 결과는 토양 중의 chitin이나 토양에서 유래하는 질병 곰팡이의 세포벽 성분 등이 길항작용을 촉진하여 항생물질의 생산에 도움을 주는 것으로 생각된다.

본 실험에서는 AGSSEA 배지를 사용했을 때 액체배양에서의 항균활성물질 생산균주의 발생비율이 SCNA 또는 AGSA 배지를 사용했을 때에 비해서 오히려 감소하는 경향을 보여주고 있으나, *E. coli*와 *S. aureus*에 대해서 동시에 항균활성을 나타내는 균주가 많이 검색되었으며, 특히 이 균주들의 *P. solanacearum*에 대한 항균활성시험의 결과, 10개의 균주가 *E. coli*, *S. aureus* 및 *P. solanacearum*에 대해서 동시에 항균활성을 나타내었다(Table 11). 이는 soil extract의 첨가로 유기물과 미량원소의 증가와 토양에서 유래하는 질병 곰팡이의 세포벽 성분 등의 길항작용에 기인한 것으로 생각된다. 특히 식물 병원성균인 *P. solanacearum*에 대한 항균성 균주의 수가 10개로 증가한 것은 토양성분 중에 함유된 병원성균의 어떤 성분이 그 병원성균에 대한 항균활성물질의 생합성 대사과정에 관여했기 때문인 것으로 생각된다.

세 가지 피검균에 대해서 동시에 항균활성을 나타내는 10개의 균주 중에서 다음과 같이 열안정성 및 pH 안정성을 지닌 10-6B-a 균주를 선발하여 이하의 실험에 사용하였다. 항균활성이 큰 5-3, 5-20, 5-22A, 5-22B, 9-3 및 10-6B-a 균주의 무균배양액을 pH 3~pH 12 범위 내에서 각 단계별로 조절하고 실온에서 48시간 방치하였을 때의 잔존 항균활성과 100℃에서 30분간 가열처리한 후의 잔존 항균활성을 각각 측정하였다. 그 결과, 5-3, 5-20, 5-22A 그리고 5-22B 균주들에 의해 합성된 항균활성물질들은 pH 3과 9의 범위에서 안정성을 보였으나, 100℃에서 30분간 가열처리 한 후에는 항균활성을 거의 상실하였다. 9-3 균주의 항균활성물질도 pH의 변화에 대해서는 안정성을 보였으나, 100℃에서 30분간 가열한 후에는 항균활성이 다소 감소하였다. 그러나 10-6B-a 균주의 항균활성물질은 100℃에서 30분간 가열에도 항균활성의 감소가 없었으며, pH 3에서 9의 범위 내에서도 활성을 잃지 않았다.

3. 선발균주의 동정

3-1. 배양학적 특성

본 실험에서 항균활성물질 생산균으로 최종 선발된 방선균 10-6B-a의 배양학적 특성을 관찰하였다. 그 결과, yeast extract-malt extract agar, oatmeal agar, inorganic salt-starch agar, glycerol-asparagine agar, tyrosine agar, glucose-asparagine agar, Bennett's agar, nutrients agar 등 대부분의 배지에서 성장이 좋은 것으로 나타났으며, peptone-yeast extract-iron agar 배지에서만 중간 정도의 성장을 나타냈다. Aerial mycelium은 거

의 모든 배지에서 잘 형성되었으나 glycerol-asparagine agar 배지에서는 중간 정도의 성장을 보였으며, peptone-yeast extract-iron agar 배지에서는 빈약한 성장을 보였다. Aerial mycelium의 색도 성장이 좋은 대부분의 배지에서는 pinkish red로 나타났으나, 단지 tyrosine agar 배지에서는 gray를 나타내었고, glycerol-asparagine agar 배지에서는 whitish gray를 나타내었다. Substrate mycelium의 색은 pale yellow에서 redish brown, light brown, dark brown 등으로 다양한 변화를 보였다.

수용성 색소의 생성은 peptone-yeast extract-iron agar 배지에서는 purplish brown을 tyrosine agar 배지에서는 dark brown을 나타내었으나, 나머지 배지에서는 생성하지 않았다(Table 12). 따라서 Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 4의 분류방법에 따라 집락 표면의 색(aerial mycelium color)은 red로, 집락 뒷면의 색(substrate mycelium color)은 yellow로 판정하였다(Fig. 5).

3-2. 형태학적 특성

방선균을 동정할 때에는 균사의 모양, 포자의 연결상태(spore chain) 및 포자의 표면 모양(spore surface)이 방선균 분류의 중요한 기준이 된다(Williams, 1983b). 특히 방선균 중 *Streptomyces*는 영양균사와 기균사의 발달이 양호하고 포자의 형성 또한 양호하다. 항균활성물질 생산균주로 선발된 방선균 10-6B-a의 형태학적 특성을 관찰한 결과는 Table 13과 같다.

Streptomyces 속은 포자의 연결 상태를 rectiflexibiles, retinaculiaperti, spirales형으로 나누고, 포자의 표면 형태를 smooth, warty, spiny, hairy, 또는 rugose형으로 구분하나 가장 대표적인 형태는 rectiflexibiles형과 smooth형이다. *Streptomyces* 속은 포자가 비교적 잘 발달되어 있어, 보통 50개 정

Table 12. Cultural characteristics of an isolate 10-6B-a on
International *Streptomyces* Project(ISP) media

Medium	Growth	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble pigment
Yeast extract-malt extract agar(ISP No. 2)	Good	Abn ¹⁾ (pinkish red)	Reddish brown	None
Oatmeal agar(ISP No. 3)	Good	Abn (pinkish red)	Pale yellow	None
Inorganic salt-starch agar (ISP No. 4)	Good	Abn (pinkish red)	Pale yellow	None
Glycerol-asparagine agar (ISP No. 5)	Good	Mod ²⁾ (whitish gray)	Dark brown	None
Peptone-yeast extract-iron agar(ISP No.6)	Mod	Poor	Dark brown	Purplish brown
Tyrosine agar(ISP No. 7)	Good	Abn(gray)	Light brown	Dark brown
Glucose-asparagine agar	Good	Abn (pinkish red)	Pale yellow	None
Bennet's agar	Good	Abn (pinkish red)	Pale yellow	None
Nutrient agar	Good	Abn (pinkish red)	Light brown	None

1) Abundant,

2) Moderate

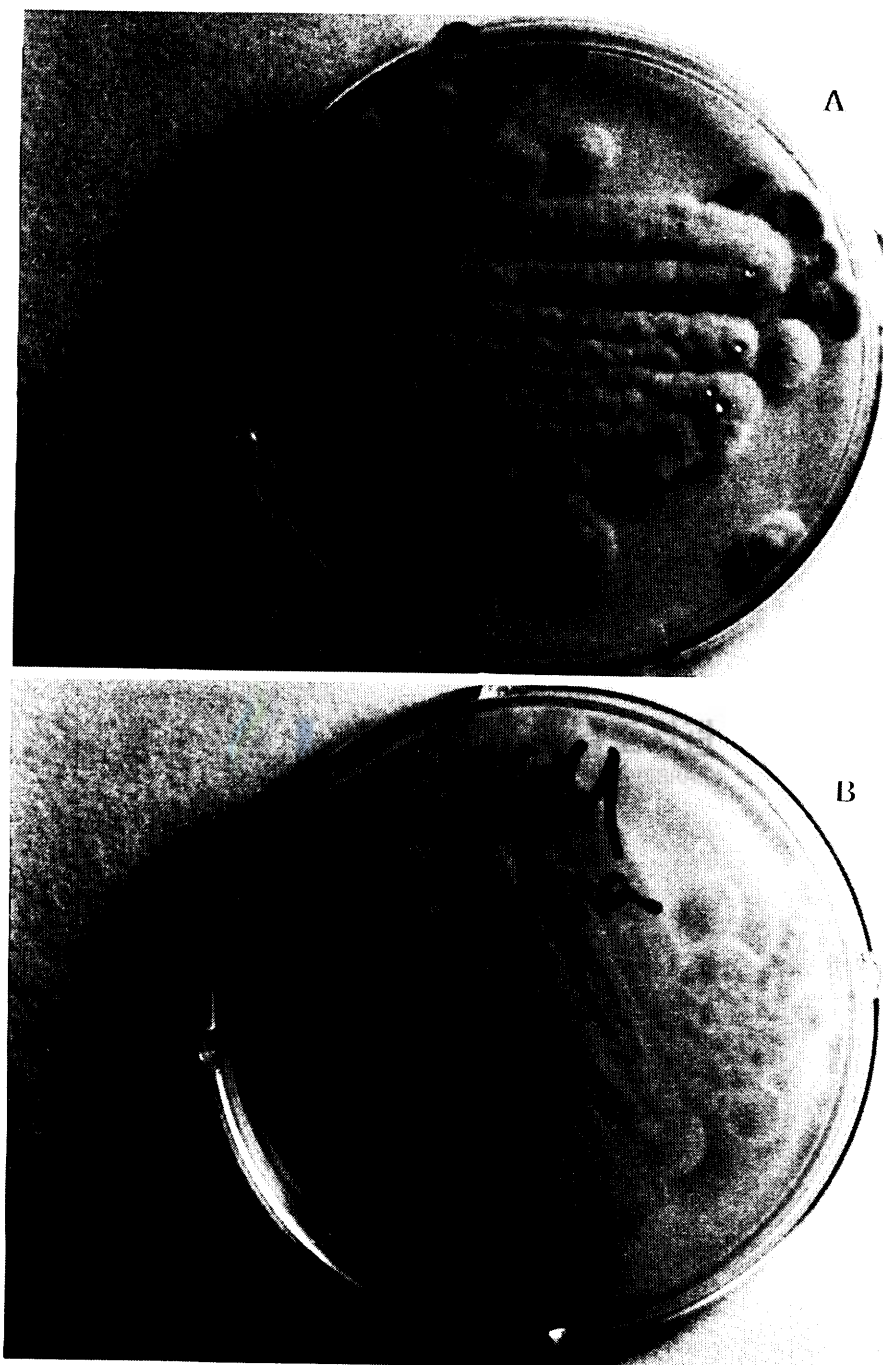


Fig. 5. Growth pattern of the isolate on inorganic salt-starch agar.

A ; Aerial mycelium, B ; Substrate mycelium

Table 13. Morphological characteristics of an isolate 10-6B-a

Unit character	Characteristics
Morphology	Presence of spore and aerial mycelium
Spore size	0.85 μ m \times 0.65 μ m
Spore chain ornamentation	Smooth, aerial spore mass
Spore chain morphology	Spirales
Spore numbers per chain	More than 80~100
Spore motility	None

도의 포자가 긴 사슬을 이루고 있다.

항균활성물질 생산균 10-6B-a를 광학현미경으로 관찰한 결과, 일반적인 *Streptomyces*와 같이 풍부하게 기균사를 형성하였다. 그리고 주사 전자현미경으로 관찰한 결과, 포자의 발달이 양호하였고, 포자의 연결모양은 나선형 (spirales)이었으며, 포자의 표면상태는 smooth하였다. 분리주 10-6B-a는 *Streptomyces* 속 세균과 같이 포자의 발달이 비교적 양호하였으며, 80~100개의 포자가 나선형의 사슬을 이루고 있었으며, 포자의 운동성은 관찰되지 않았다(Fig. 6).

3-3. 생리학적 특성

멜라닌 색소의 생성여부는 peptone-yeast extract-iron agar 배지에서 4일간 배양한 후 판정하였으며, 수용성 색소의 생성 유무는 14일간 glycerol-asparagine agar 배지에서 배양한 후 관찰하였다. 그 결과, 멜라닌 색소는 생성하는 것으로 판정되었으나, 수용성 색소의 생성은 관찰되지 않았다 (Table 14).

세포벽 구성성분인 diaminopimelic acid(DAP) 이성체는 방선균 분류상 중요한 지표로 이용된다. 10-6B-a 균주의 세포벽 성분 중에서 DAP의 형태를 조사한 결과 세포벽 type I 인 LL-DAP로 판명되었다(Fig. 7).

LL-DAP type을 갖는 방선균으로 *Streptomyces* 속과 *Streptoverticillium* 속이 있으며, 그 외에 *Sporichthya* 속, *Nocardiodes* 속 및 *Kineosporia* 속과 *Kitasatosporis* 속의 일부 균종들이 있고 나머지는 meso-DAP type의 세포벽을 가진다고 알려져 있다(Ballow 등, 1992).

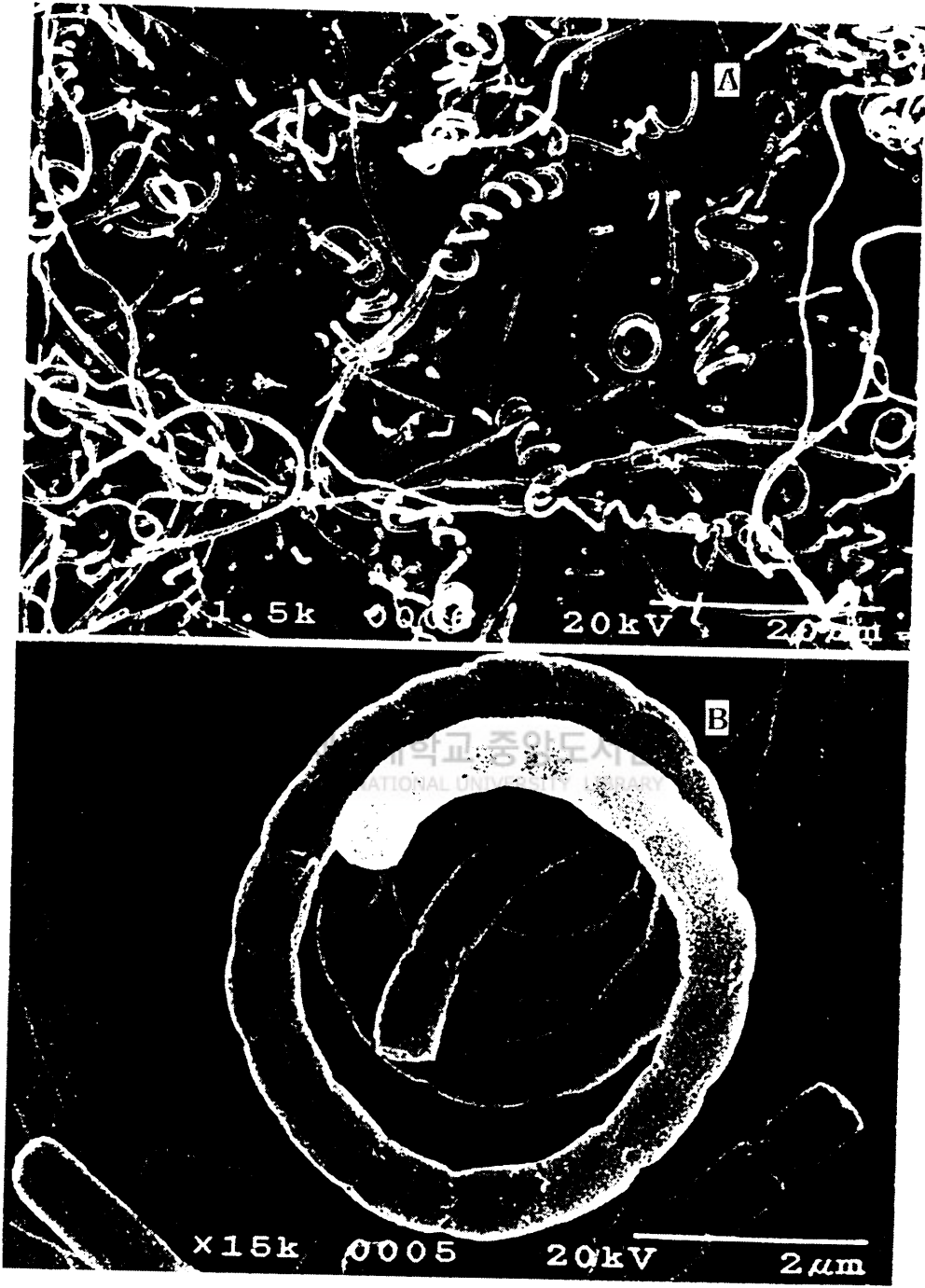


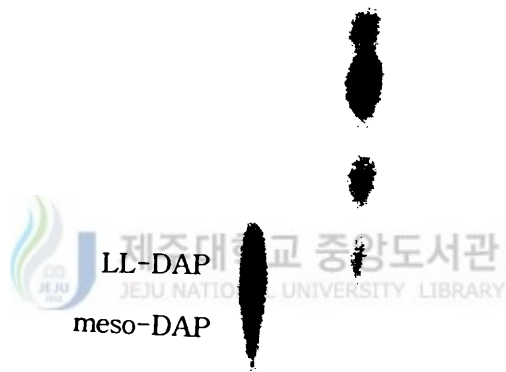
Fig. 6. Electronmicroscopic morphology of the isolate 10-6B-a.

A: Spore chain, spirales(Scanning electron microscope, 1,500×)

B: Spore surface, smooth(Scanning electron microscope, 15,000×)

Table 14. Physiological characteristics of an isolate 10-6B-a

Unit character	Characteristics
Melanoid pigment	Produced
Soluble pigment	Not produced
Diaminopimelic acid	<i>LL</i> -type



A B

Fig. 7. Cellulose thin layer chromatogram of cell wall diaminopimelic acid of the isolate 10-6B-a.

A ; Standard, B ; Hydrolysate of cell wall

3-4. 탄소원 이용성

탄소원 이용성 여부는 미생물의 분류·동정에 중요한 요소이며, 특히 세균의 분류·동정에는 탄소원 이용성 등의 생화학적 특성이 주로 이용된다. 따라서 방선균의 분류·동정에는 배양학적 특성과 형태학적 특성 뿐만이 아니라 탄소원 이용성도 분류의 지표가 된다. 실험 결과, 10-6B-a 균주는 cellulose를 이용하지 못하였으나, D-glucose, L-arabinose, D-xylose, inositol, D-mannitol, D-fructose, L-rhamnose, sucrose, raffinose 그리고 maltose 등 대부분의 당을 탄소원으로 이용할 수 있었다(Table 15).

3-5. 동 정

선발균주를 동정하기 위하여 배양학적 특성과, 형태학적 특성 그리고 생리학적 특성을 조사한 결과, *Streptomyces* 속 균주로 판단되었다.

분리주 10-6B-a의 특성들을 다른 방선균과 비교해 본 결과 melanoid 색소의 생성에서 큰 차이를 보였으나, 그 외의 형태학적, 배양학적 및 탄소원 이용성에서는 *S. albosporeus*와 가장 유사하였다(Table 16).

*S. albosporeus*는 1948년 Waksman과 Henrici에 의해 발견된 균주로 melanoid 색소는 생성하지 않으며, 배면의 색깔 또한 yellow, red, red-brown 또는 orange 등 다양하게 나타난다. 그리고 향생물질의 생산에 관해서는 보고된 바 없다(Williams 등, 1989).

Table 15. Carbon source utilization by an isolate 10-6B-a

Carbon source	Utilization
D-Glucose	+
L-Arabinose	+
D-Xylose	+
Inositol	+
D-Mannitol	+
D-Fructose	+
L-Rhamnose	+
Sucrose	+
Raffinose	+
Cellulose	-
Maltose	+

+ ; Utilized, - ; Not utilized

Table 16. Comparison of strain 10-6B-a with *Sreptomycetes albosporeus*

Characteristic	Strain	
	<i>S. albosporeus</i>	10-6B-a
Spore chain	Spirales	Spirales
Spore surface	Smooth	Smooth
Aerial mass color	Red	Pinkish red
Reverse color	Yellow, red	Pale yellow
Melanoid pigment	Not produced	Produced
Soluble pigment	NA	Not produced
Carbon source utilization		
D-glucose		+
L-Arabinose	+	+
D-Xylose	+	+
Inositol	+	+
D-Mannitol	+	+
D-Fructose	+	+
L-Rhamnose	+	+
Sucrose	NA	+
Raffinose	+	+
Cellulose	NA	-
Maltose	NA	+

NA ; Not available, + ; Utilized, - ; Not utilized

4. 항균활성물질의 생산 및 정제

4-1. 항균활성물질의 생산

항생물질을 생산하기 위하여 선발 균주 10-6B-a를 대량 배양하였다. 배양 중, 배양기간에 따른 변화를 알아보기 위하여 9일간 배양하면서 24시간 간격으로 배양액의 pH변화와 항균활성물질 생산성을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 8과 같다.

배양 초기에는 pH가 균이 생육함에 따라 서서히 감소하였으나, 4일째부터는 급속한 감소를 보였으며 9일째는 pH 4.4에 도달하였다. 항균활성물질의 생산은 배양 3일만에 급속히 증가하였고, 4일 후부터는 완만한 증가를 보였으며, 8일 후에는 더 이상 증가하지 않았다.



4-2. 항균활성물질의 정제 특성

균주의 배양액으로부터 항균활성물질을 분리·정제하기 위하여 배양액을 회전진공농축기로 50℃에서 10배로 농축한 후, 여러 가지 물과 섞이지 않는 유기용매(n-hexane, benzene, n-butanol, ethyl acetate, petroleum ether, chloroform, methyl ethyl ketone)를 사용하여 산성(pH 4), 중성(pH 7), 알칼리성(pH 9)에서 항균활성물질의 분배성을 조사하였으나, 어느 용매에도 뚜렷한 분배성을 나타내지 않았다. 또한, 활성탄에 대한 흡착성은 좋았으나 acetone을 이용한 용출액에서는 항균활성이 나타나지 않았다.

양이온과 음이온 교환 수지를 사용한 이온성 조사에서는 항균활성물질이 양이온 교환 수지에 결합함을 알 수 있었다. 따라서 항균활성물질은 극성이 강한 양이온 화합물인 것으로 판단되었다.

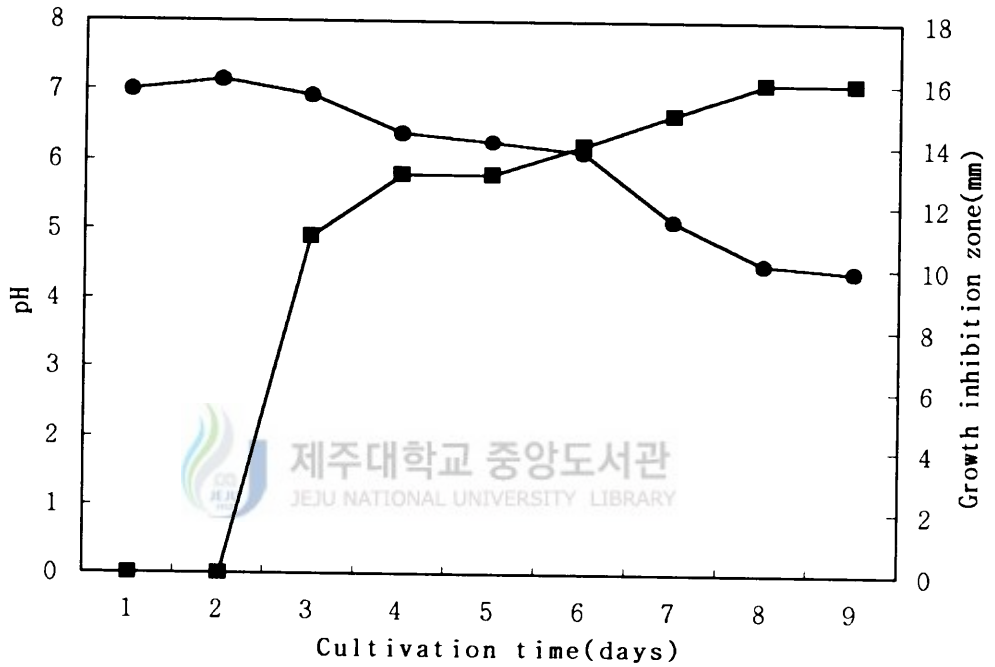


Fig. 8. Time-course growth curve of an isolate 10-6B-a in 20 liter jar fermenter containing 10 liter medium.

—●— ; pH, —■— ; Antimicrobial activity

4-3. Cation exchange chromatography

방선균 10-6B-a의 배양액으로부터 항균활성물질을 분리하기 위하여 조사된 여러 방법 중에서 양이온 교환수지에 대한 흡착성을 이용하여 cation exchange chromatography를 행하였다. 배양 농축액을 50ml씩 AG MP-50 수지가 채워진 column(2.8×20cm)에 흡착시킨 후 5M NH₄Cl 용액으로 분당 1ml의 유속으로 용출시키면서 약 3ml씩 분획한 결과, 대략 37~46(111~138 ml) fraction에서 항균활성물질이 얻어졌다(Fig. 9). 배양액 3 l에서 약 160 ml의 활성물질이 분획되었으며, 이 분획을 모아 염의 결정이 생성될 때까지 회전진공농축기로 농축하여 90ml의 포화용액을 얻고, 다음 단계의 정제과정을 시행하였다.

4-4. Gel permeation chromatography

Cation exchange chromatography에서 얻어진 시료를 5ml씩 sephadex G-10 수지가 채워진 column(2.8×35cm)에 주입한 후 증류수를 이용하여 분당 1.0ml의 유속으로 용출시켜 2.0ml씩 분획한 결과, 대략 50~63(100~126 ml) fraction에서 항균활성물질이 얻어졌다(Fig. 10). 이 활성분획을 모아 회전진공농축기로 농축하여 포화용액 16ml를 얻었다. 2차 gel permeation chromatography를 실시하고, 같은 방법으로 포화용액 7ml를 얻었으며, 최종적으로 3차에 걸친 gel permeation chromatography를 반복 실시하여 활성물질 분획을 모으고, 회전진공농축기로 50℃에서 수분을 완전히 제거한 후, 데시케이터에서 1주일간 건조하였다. 이와같은 방법으로 배양액 3 l 당 약 950mg의 백색결정의 항균활성물질을 얻을 수 있었다(Fig. 11).

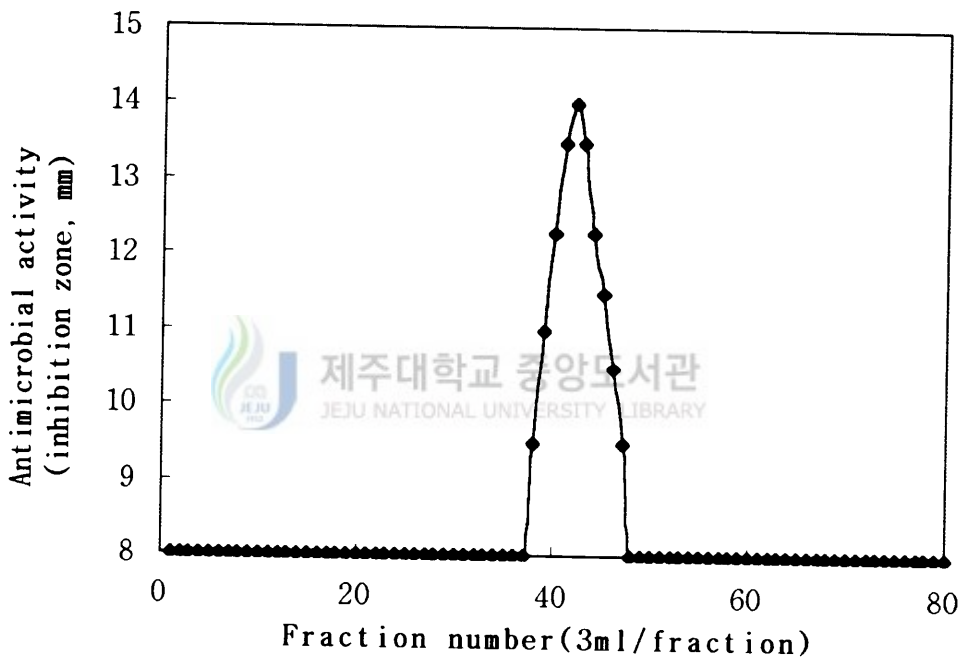


Fig. 9. Cation exchange chromatography of the cell-free culture filtrate of the isolate 10-6B-a on AG MP-50 column.

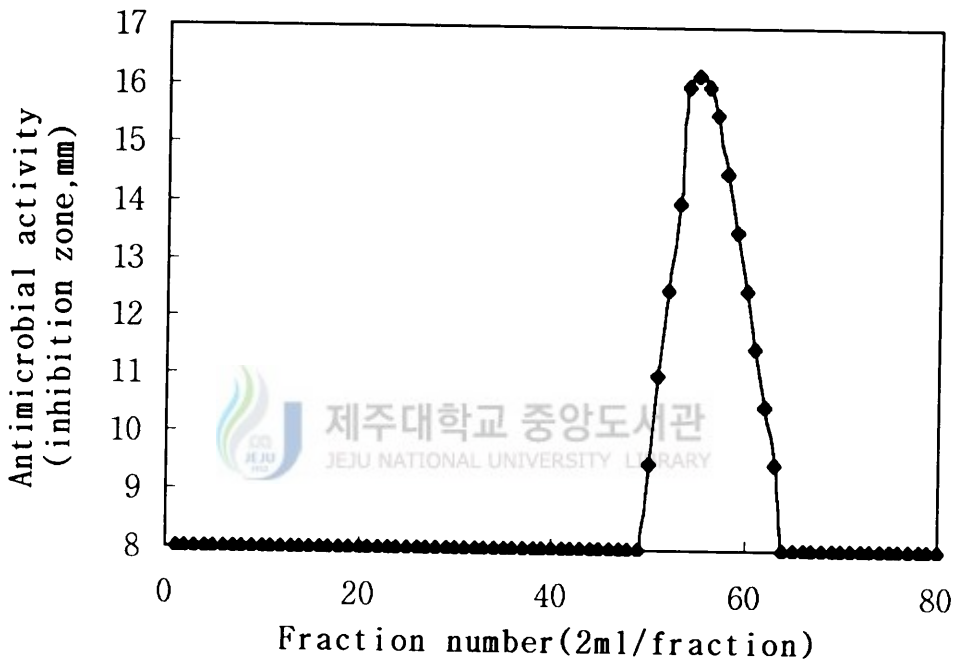


Fig. 10. Gel permeation chromatography of the antimicrobial substance from the isolate 10-6B-a on sephadex G-10 column.

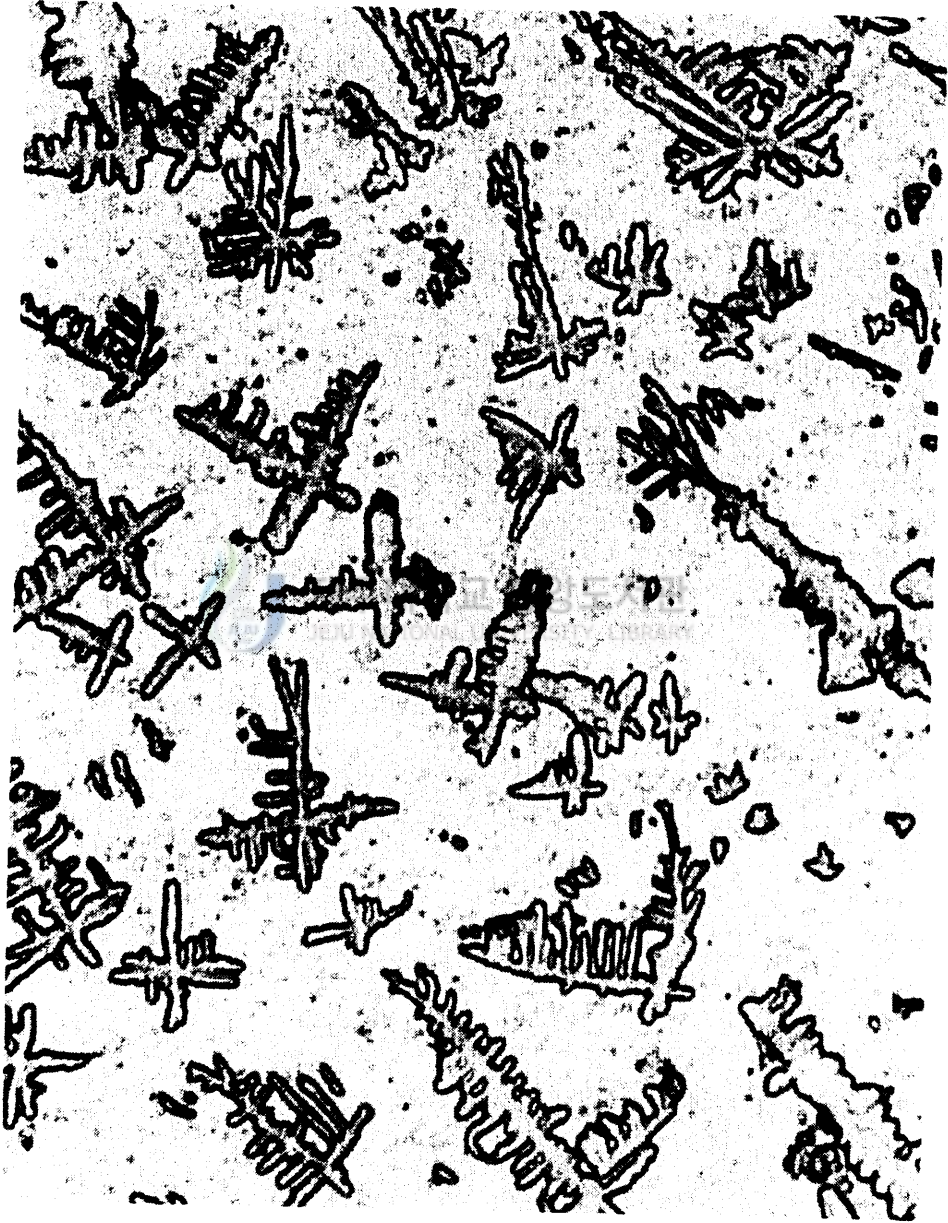


Fig. 11. Microscopic observation of the antimicrobial crystal produced by the isolate 10-6B-a ($\times 400$).

5. 항균활성물질의 특성 및 구조의 분석

5-1. 용해성

항균활성물질은 물에 대한 용해도가 상당히 높았으나, methanol과 ethanol에는 비교적 낮은 용해도를 보였다. 그외의 n-hexane, benzene, n-butanol, ethyl acetate, petroleum ether, chloroform, methyl ethyl ketone 등의 유기용매에는 전혀 용해되지 않았다.

모든 aminoglycoside계 항생물질은 적어도 한 개의 amino function을 가지고 있어 methanol에서 낮은 용해도를 나타내는 것을 제외하고 대부분의 유기용매에 불용성이나 물에는 잘 용해되는 강염기(strong base)로 알려져 있다(Berdy, 1980a). 본 실험의 결과, 활성물질은 aminoglycoside계 항생물질과 비슷한 용해성을 가지고 있는 것으로 조사되었다.

5-2. 아미노산 조성 분석

항균활성물질의 아미노산 조성을 silica gel TLC (methanol 3 : acetic acid 1 : water 1)로 분석한 결과, 산에 의해서 가수분해되어 생긴 아미노산은 찾을 수 없었다. 가수분해 전의 시료가 가수분해 후의 시료보다 진하게 나타난 것은 시료양 때문으로 생각된다(Fig. 12). 따라서 시료 중에는 산에 의해서 가수분해되는 peptide 결합은 존재하지 않으나, ninhydrin 시약과 반응하는 amino group은 존재하는 것으로 추정되었다. 하지만, 산에 의해서 가수분해되지 않는 peptide 결합이 존재할 가능성은 배제할 수 없었다.

5-3. 자외선 흡광 spectrum

분리된 항균활성물질의 자외선 흡광대를 측정된 결과 210nm에서 최대 흡

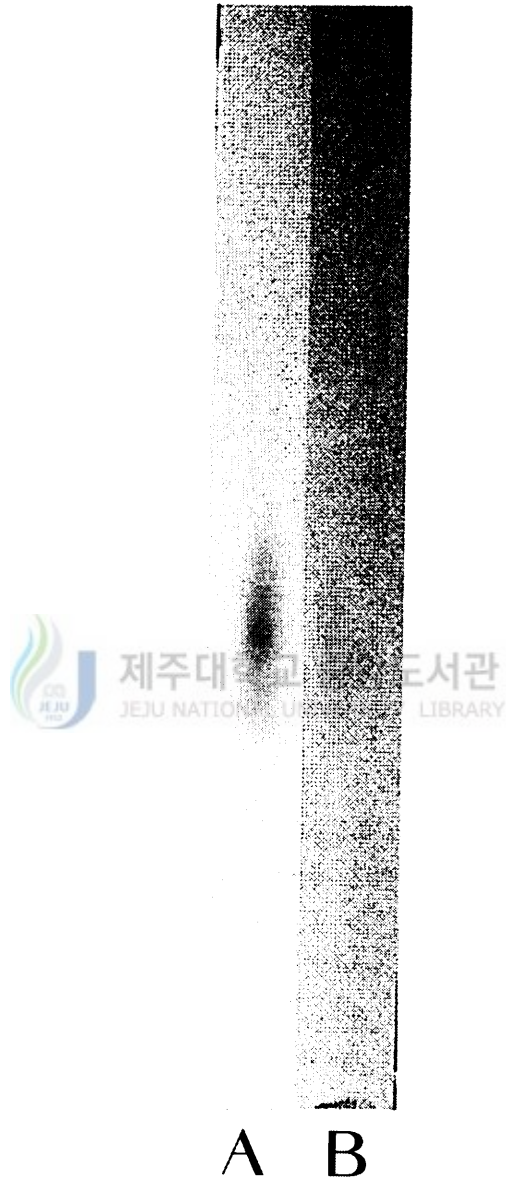


Fig. 12. Thin layer chromatogram for amino acid analysis of the antimicrobial compound produced by *Streptomyces* sp. 10-6B-a.

A ; Before Hydrolysis B ; After hydrolysis

광도를 보였으며, 283nm에서 약한 흡광도를 보였다(Fig. 13).

5-4. 항균 spectrum

항균활성물질의 항균 spectrum을 조사하기 위하여 수종의 그람 양성 및 그람 음성 세균과 효모를 피검균으로 하여 조사한 결과를 Table 17에 나타내었다.

공시된 모든 그람 양성균과 음성균에 대해서는 뚜렷한 항균활성을 나타냈으나, 효모의 경우에는 *Saccharomyces rozei* IAM 4991과 *Tollulopsis colliculosa* IAM 4426에 대해서는 비교적 큰 활성을 보였으나, *Saccharomyces cerevisiae* IAM 4512에 대해서는 낮은 활성을 보였으며, *Candida albicans* KCCM 11282에 대해서는 전혀 활성을 나타내지 않았다.

5-5. Thin layer chromatography에 의한 분석

항균활성물질을 전개시킨 후, 0.2% ninhydrin 용액, 5% H₂SO₄ ethanol 용액, iodoplatinate(potassium) 용액, orcinol ferric chloride 용액(Bial's reagent) 등으로 발색반응을 유도하였더니, 0.2% ninhydrin 용액을 사용했을 때만 분홍색으로 발색되고 나머지 세 종류 시약으로는 전혀 발색되지 않았다. 그리고 자외선(254nm, 366nm)으로는 비교적 잘 탐색되었다.

항균활성물질을 TLC로 분석한 결과, reverse phase의 경우, 전개용매로 10%의 methanol을 사용했을 때는 화합물이 전혀 분리되지 않았으며, 전개용매로 30%의 methanol을 사용했을 때는 ninhydrin 양성 반응을 나타내는 1개의 항균활성 분획만이 나타났다.

Normal phase로 전개한 경우에는 reverse phase보다는 분리도가 좋은 것으로 나타났다. 전개용매로 butanol : methanol : H₂O의 4 : 1 : 2의 혼합액

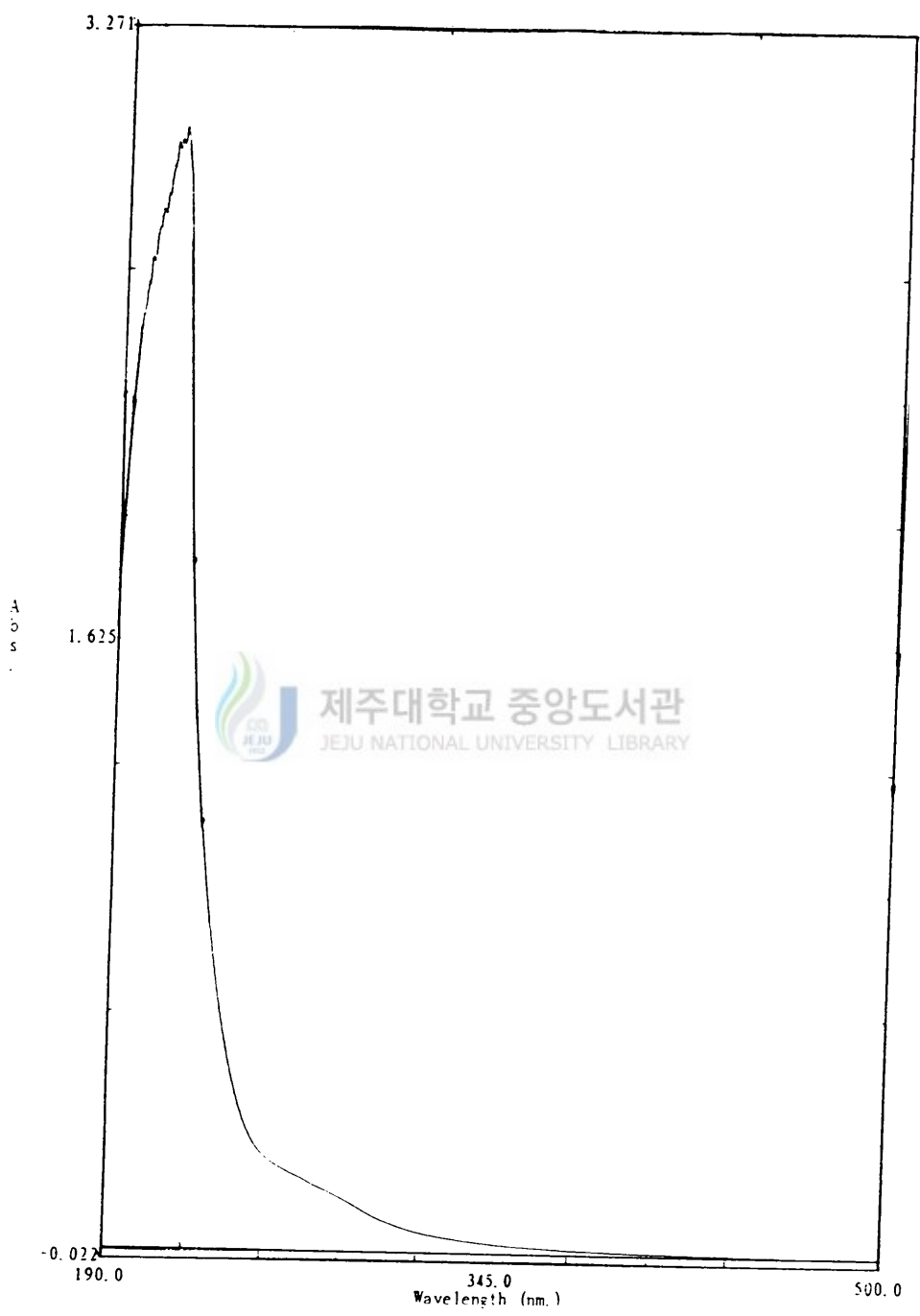


Fig. 13. UV absorption spectrum of the antimicrobial compound produced by *Streptomyces* sp. 10-6B-a.

Table 17. Microbial growth inhibition by antimicrobial compounds¹⁾
 produced by *Streptomyces* sp. 10-6B-a

Microorganisms tested	Inhibitory zone(mm)
Gram negative	
<i>Escherchia coli</i> ATCC 8749	25
<i>Escherchia coli</i> O 157 : H7	25
<i>Alcaligenes feacalis</i> ATCC 8750	27
<i>Flavobacterium aquatile</i> ATCC 11947	17
Gram positive	
<i>Pseudomonas solanacearum</i> ATCC 10692	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	22
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1023	23
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1024	24
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 9945a	24
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	18
Yeast	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IAM 4512	12
<i>Saccharomyces rocei</i> IAM 4991	19
<i>Tollulopsis colliculosa</i> IAM 4426	18
<i>Candida albicans</i> KCCM 11282	0

1) Concentration applied ; 25mg/ml

을 사용했을 때, ninhydrin 양성 반응을 나타내는 2개의 분획이 얻어졌다. 한편, 전개용매로 propanol : 1N-NH₄OH의 7 : 3의 혼합액을 사용했을 때는 2개의 분획이 얻어졌으며, 그 중 1개의 분획이 ninhydrin 양성 반응과 항균 활성을 나타내었다. 특히, normal phase로 전개용매 butanol : acetic acid : H₂O의 4 : 1 : 2의 혼합액을 사용했을 때, 4개의 항균활성 분획으로 분리되었고, 그 중에서 1개 분획만이 ninhydrin으로 발색되었다(Table 18).

따라서 화합물의 결정은 완전히 순수분리가 이루어지지 않은 상태로, 최소한 네 종류의 서로 다른 항균화합물이 섞여 있는 혼합물인 것으로 나타났다.

5-6. High performance liquid chromatography에 의한 분석

항균활성 화합물을 HPLC로 분석하였더니, TLC로 분석한 결과와 비슷하게 4개의 항균활성 분획과 기타 혼합물이 검출되었다(Fig. 14). 즉, 항균활성 화합물은 서로 다른 4개 이상의 화합물을 포함하고 있는 것으로 판단되었다.

이들 항균활성 분획은 10.5분(S1), 12분(S4), 13.5분(S2), 14.5분(S3)에서 분리되었으며, S4 분획이 가장 낮은 peak로 나타났다. 이 중에서 S4 분획을 제외한 나머지 3개의 S1, S2, S3 분획을 분획 별로 모아서 분리하였다.

5-7. Nuclear magnetic resonance spectroscopy에 의한 분석

부분정제된 항균활성 화합물을 ¹³C NMR과 ¹H NMR로 분석하였고, HPLC를 이용하여 정제된 세 종류의 항균활성 화합물 S1, S2, S3를 ¹H NMR로 분석하였다.

Table 18. Analysis of the antimicrobial compounds from *Streptomyces* sp. 10-6B-a by thin layer chromatography

Method of analysis	Direction of development	Developing patterns and antibacterial activity
		●○
	↓	■
	↓	■
Normal phase TLC	↓	●○■◆
	↓	●○◆
	↓	●○◆
	↓	●○◆

Developing solvent; butanol : acetic acid : H₂O = 4 : 1 : 2

Detection; ●, 254nm

○, 366nm

■, staining by ninhydrin reagent

◆, antimicrobial activity

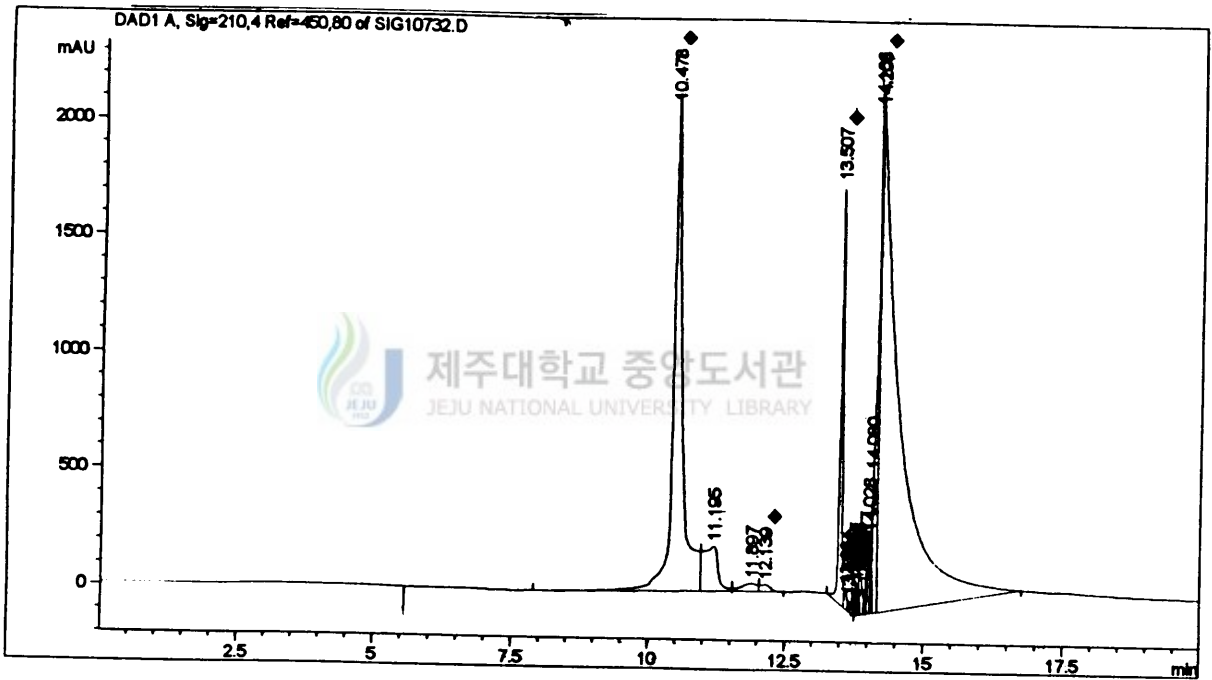


Fig. 14. Analysis of antimicrobial compounds by high performance liquid chromatography.

'S' means the fraction with antimicrobial activity.

Fig. 15의 ^{13}C NMR을 분석한 결과, 모두 13개의 peak가 관찰되었으며, 150~190ppm 사이의 peak는 C 이중결합($\text{C}=\text{X}$, $\text{C}=\text{CX}$, $\text{C}=\text{CC}$, $\text{C}=\text{CH}$)으로 추정된다. 60~150ppm 사이에서는 peak가 발견되지 않았다. 따라서 당의 혼한 구조인 $-\text{OH}$ group이 붙은 탄소는 발견되지 않았으며, 50~60ppm 사이의 2개의 peak는 포화 탄소의 peak로 추정되며, 40~50ppm 사이의 peak는 CH로, 24~30ppm 사이의 peak는 CH_2 로, 0~15 ppm사이의 peak는 CH_3 의 peak로 추정된다. 이 결과를 통하여 볼 때, 이 화합물은 배당체는 아닌 것으로 추정된다.

부분정제된 항균활성 혼합물 결정의 ^1H NMR(Fig. 16)에서는 0~2ppm 사이에서 관찰된 peak는 CH_2 , CH_3 에 의한 peak로 추정되었으며, 3.1~3.9ppm 사이에서는 CH의 peak로 추정된다.

HPLC로 정제된 항균활성 화합물 S1, S2, S3의 ^1H NMR(Fig. 17)로부터 1~1.4ppm의 peak는 CH_3 의 peak로, 그리고 1.4~2.0ppm은 CH_2 로, methylene group 사슬이 존재하는 것으로 추정되며, 2.0ppm 이상에서는 CH가 존재하는 것으로 추정된다. 1.0~2.7ppm에서 관찰되는 peak의 양상에서 화합물간에 다소의 차이는 관찰되나, 세 종류의 항균활성 화합물은 서로 비슷한 구조를 지닐 가능성이 높은 것으로 추정된다. 이들 세 종류의 항균활성 화합물은 합성대사경로 상에 서로 밀접한 관련이 있을 것이다.

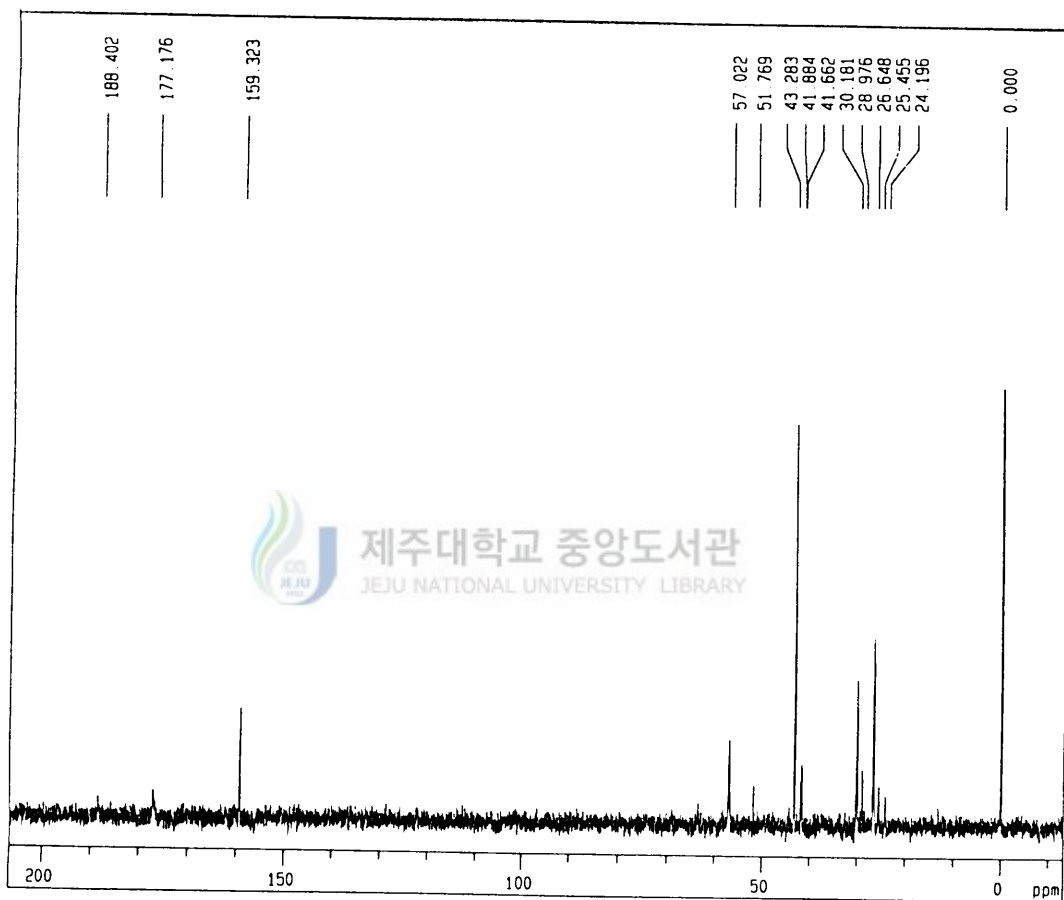


Fig. 15. ^{13}C -NMR spectrum of antimicrobial compounds produced by *Streptomyces* sp. 10-6B-a.

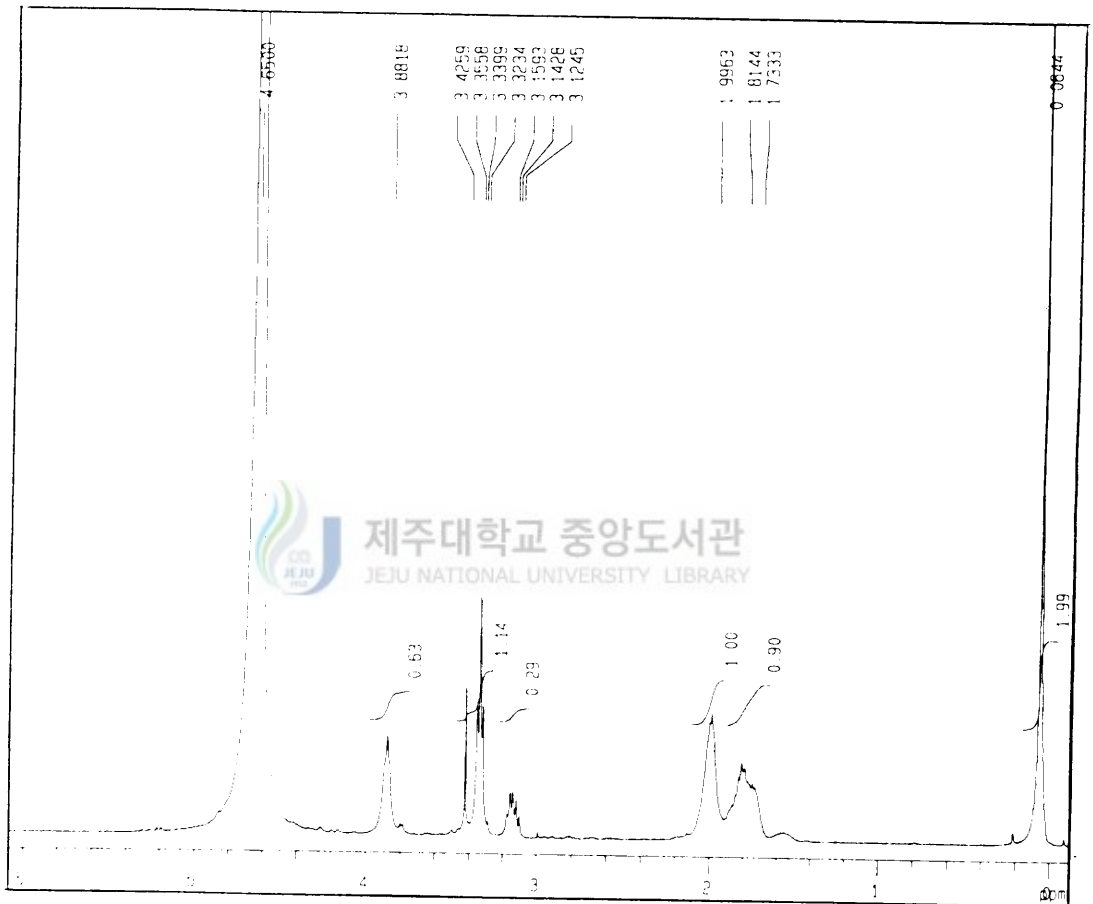


Fig. 16. ¹H-NMR spectrum of antimicrobial compounds produced by *Streptomyces* sp. 10-6B-a.

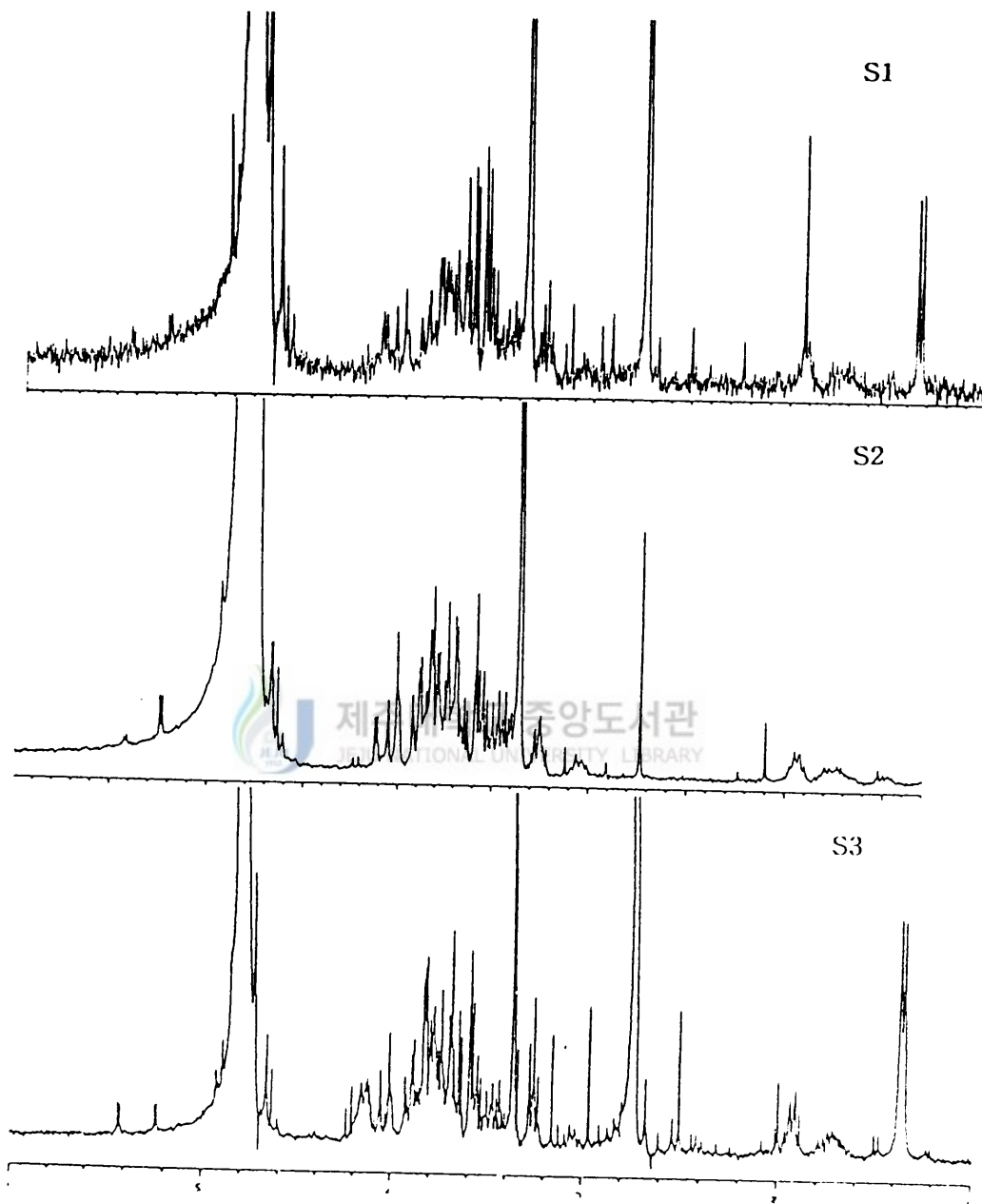


Fig. 17. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of purified antimicrobial compounds produced by *Streptomyces* sp. 10-6B-a.

S1, S2 and S3 are compounds from the fractions shown in Fig. 14.

V. 요약

방선균은 항생물질의 주요 생산균으로 자연생태계에 널리 분포하며, 제주도의 생물상은 비교적 다양한 것으로 알려져 있다. 제주도내 25개 지점으로 부터 토양을 채취하여 방선균의 분리·수집용 시료로 사용하였다.

네 종류의 분리용 배지를 사용하여 총 703주의 방선균을 분리하였다. Soil extract를 함유한 arginine glycerol salts agar 배지를 사용했을 때, 가장 많은 수인 437주의 방선균이 분리되었고, arginine glycerol salts agar 배지를 사용했을 때, 171주, starch-casein-nitrate agar 배지를 사용했을 때, 75주, 그리고 Benedict agar 배지를 사용했을 때 20주가 각각 분리되었다. 제주도내 지역별로는 목장초지가 방선균의 다양성과 밀도 면에서 다른 지역에 비해서 제일 높은 수치를 보였으며, 그 다음이 감귤원이었다.

분리 수집된 총 703주의 방선균 중에서 526개의 균주에 대하여 항균활성물질 생산여부를 검정하였다. 검정균으로는 그람 음성세균인 *E. coli* ATCC 8749와 그람 양성세균인 *S. aureus* ATCC 6538 그리고 식물 병원균 *P. solanacearum* ATCC 10692를 사용하였다. 항균활성물질 생산균주의 발생빈도는 분리 및 배양에 사용한 배지의 종류에 따라 0.0~32.8%로 커다란 차이가 있었다.

공시된 3종의 검정균에 대해서 동시에 항균활성을 나타내는 균주를 1차로 선별하였다. 1차로 선별된 균주 10개 중에서 pH 안정성과 열안정성이 높은 항균활성물질을 생산하는 10-6B-a 균주를 최종 선발·동정하고, 항균활성물질의 성격을 규명하고자 하였다.

International *Streptomyces* Project의 방법과 Bergey's Manual of

Systematic Bacteriology에 수록된 방법을 이용하여 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성을 조사한 결과, 10-6B-a는 포자 80~100개 정도가 나선형으로 연결되어 있는 *Streptomyces* sp.로 추정되었다.

Streptomyces sp. 10-6B-a 균주를 9일 동안 폭기배양하여 얻은 무세포배양액을 항균활성물질의 분리·정제용 시료로 사용하였다. 항균활성물질을 분리·정제하기 위하여 cation exchange chromatography(AG MP-50)와 3차에 걸친 gel permeation chromatography(Sephadex G-10)를 실시하였다. 활성분획을 건조시켜 백색결정의 활성물질을 얻을 수 있었다.

항균활성물질의 물리적, 화학적 특성을 분석하기 위하여 용해도, 아미노산 조성, 자외선 흡광 spectrum, 항균 spectrum, 각종 화학적 발색반응 등을 조사하였다. 이 활성물질은 methanol이나 ethanol보다도 물에 더 잘 용해되는 극성이 강한 화합물로 추정되었다. 산가수분해법으로 활성물질의 구성 아미노산을 분석했을 때, 유리되는 아미노산은 없었다. 활성물질의 자외선 흡광대는 210nm에서 최대 흡수치를 보였으며, 283nm에서 약한 흡수대를 보였다. 항균범위를 조사한 결과 그람 음성균, 양성균 모두에 대해서 활성을 보였으나, 효모에 대해서는 균주에 따라 선택적인 활성을 나타내었다. 항균활성물질을 0.2% ninhydrin 용액, 5% H₂SO₄-ethanol 용액, iodoplatinate (potassium) 용액, orcinol ferric chloride 용액(Bial's reagent) 등을 사용하여 발색을 유도하였으나, 0.2% ninhydrin 용액으로만 분홍색으로 나타났고, 나머지 세 종류의 시약으로는 전혀 발색되지 않았다. 이는 항균화합물내에 amino group이 존재함을 제시한다.

활성물질을 thin layer chromatography(TLC)로 분석했을 때, 화합물의 결정은 순수분리가 되지 않은 부분정제된 상태였고, 최소한 4종 이상의 항균 화합물이 혼합되어 있는 것으로 나타났다. 활성물질의 high performance

liquid chromatography(HPLC)를 이용한 분석에서도, TLC로 분석한 결과와 비슷하게 4개의 항균활성 분획과 기타 미량의 혼합물이 감지되었다. 따라서 항균활성물질을 HPLC로 최종 정제하였으며, 그로부터 얻어진 3개의 화합물에 대해서 분석하였다.

부분정제된 항균활성혼합물의 ^{13}C 와 ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum과 정제된 항균활성화합물의 ^1H NMR spectrum으로부터 그 성격을 추정하였다. 그러나, 이들 항균활성화합물의 구조를 밝히기 위해서는 보다 많은 분석 자료가 필요하다고 하겠다.



참 고 문 헌

- Abramovitz, J. N., 1997. Valuing Nature's Services in State of the World. pp. 326~388. In "A Worldwatch Institute Report on Progress toward a Sustainable Society." (ed. by Brown, L. R., F. Christopher, H. F. French, J. Abramovitz, C. Bright, G. Gardner, A. P. McGinn, M. Renner, D. M. Roodman, L. Starke).
- 안종석, 이영선, 안순철, 이정형, 이지행, 윤병대, 민태익, 1991. Actinomycin 계열 항생물질 MT-497을 생산하는 방선균 분리주 No. 497의 동정. 산업 미생물학회지, 19(6), 561~567.
- Aoki, H., H. Sakai, M. Kohsaka, T. Konimi, J. Hosoda, Y. Kuboci, E. Iguchi and H. Imanaka, 1976. Nocardicin A, a new monocyclic β -lactam antibiotic. I. Discovery, isolation and characterization. *J. Antibiotics.*, 29(5), 492~500.
- Bae, H. J., J. N. Lee, and J. W. Ju, 1998. Detection of rifampin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Korean Soc. Microbiol.*, 33(2), 111~117.
- Ballows, A., H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schlerifer, 1992. The prokaryotes, Vol. 1, 2nd ed. Springer-Verlag.

- 반오현, 강복식, 이영남, 1996. *Streptomyces* CM001의 대사산물의 항균활성. *The Microbiological Society of Korea*, 22(4), 322~328.
- Benedict, R. G., T. G. Pridham, L. A. Lindenfelser, H. H. Hall, and R. W. Jackson, 1955. Further studies in the evaluation of carbohydrate utilization tests as aids in the differentiation of species of *streptomycetes*. *Appl. Microbiol.*, 3, 1~6.
- Berdy, J., 1980a. Aminoglycoside antibiotics. PP. 85~89, In "Handbook of antibiotic compounds." Vol. 1. CRC Press.
- Berdy, J., 1980b. Handbook. Amino acid and peptide antibiotics. PP. 39~214, In "Handbook of antibiotic compounds." Vol. 4, No. 1. CRC Press.
- Berdy, J., 1989. The discovery of new bioactive microbial metabolites : screening and identification, pp. 3~25. In "Bioactive metabolites from microorganisms." (ed. Bushell, M. E. and U. Grafe). Progress in Industrial Microbiology.
- Brenner, M., A. Niederwieser, and G. Pataki, 1969. Amino acid and derivatives. pp. 730~786. In "Thin-layer chromatography." (ed. Stahl, E.). Springer-Verlag Berlin · Heidelberg · New York.
- 부성민, 1988. 제주도 해역 해조류의 분포론적 고찰. 제주도 연구, 제5집, 97

~114.

- Chambers, H. F., 1988. Methicillin-resistant *Staphylococci*, *Clin. Microbiol. Rev.*, 1(2), 173~186.
- Chater, K. F., 1990. The improving prospects for yield increase by genetic engineering in antibiotic-producing *Streptomyces* *Bio/Technology*, 8, 115~121.
- Cooper, T. G., 1977. Gel permeation chromatography, pp.169~193. In "The Tools of Biochemistry." John Wiley & Sons. A Wiley-Interscience publication.
- Crepin, J., R. L. Johnson, 1993. Soil sampling for environmental assessment. pp. 5~18. In "Soil sampling and method of analysis."(ed. Carter, M. R.) Canadian society of soil science. Lewis Publishers.
- Diez, B., E. Mellado, M. Rodriguez, R. Fouces, and J. L. Barvedo, 1997. Recombinant microorganisms for industrial production of antibiotics. *Biotech. Bioengin.*, 55(1), 216~225.
- El-Nakeeb, M. A., and H. A. Lechevalier, 1963. Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.*, 11, 75~77.

- Embley, M., J. Smida, and E. Stakebrandt, 1988. Reverse transcriptase sequencing 16S rRNA from *Faenie rektivirgula*, *Pseudomonas thermophila* and *Saccharopolyspora hirsuta*, three wall type IV actinomycetes which lack mycolic acid. *J. Gen. Microbiol.*, 134, 961~966.
- Esnard, J., T. L. Potter, and B. M. Zukerman, 1995. *Streptomyces costaricanus* sp. nov., isolated from nematode-suppressive soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 775~779.
- Flaig, W., and H. J. Kutzner, 1960. Beitrag zur okologie der gattung *Streptomyces* Waksman et Henrici. *Arch. Mikrobiol.*, 35, 207~228.
- Fliri, H. G., and R. M. Wenger, 1990. Cyclosporine: synthetic studies, structure-active relationships, biosynthesis and mode of action. pp. 245~287, In "Biochemistry of peptide antibiotics."(ed. Kleinkauf, H., H. Dohren). Walter de Gruyter Berlin · New York.
- Fox, G. E., and E. Stackebrandt, 1987. The application of 16S rRNA cataloguing and 5S rRNA sequencing in bacterial systematics, pp. 405~458. In "Method in microbiology, vol 19."(ed. R. R. Colwell and R. Grigorova) Academic Press, Orlando, Fl.
- 권오성, 박동진, 이찬용, 김창진, 1996. 제주도 토양 방선균 속 다양성 분포.

산업미생물학회지, 21(4), 399~430.

Hasegawa, T., M. Takizawa, and S. Tanida, 1983. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 29, 319~322.

Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams, 1994. The Actinomycetes, pp. 605~703. In "Bergey's manual of determinative Bacteriology. 9th" Williams & Wilkins.

홍순광, 1995. 방선균의 2차대사 및 형태분화. 미생물과 산업, 21(1), 34~42.

Hunter-Cevera, J. C., M. E. Fonda, and A. Belt, 1986. Isolation of culture. pp. 3~23. In "Manual of industrial microbiology and biotechnology." (ed. Demain A. L., and N. A Solomon). American Society for Microbiology, Washington, D. C.

제주도, 1997. 제주도 친환경개발을 위한 환경지표설정, pp. 21-103.

Iinuma, S., A. Yokota, T. Hasegawa, and T. Kanamaru, 1994. *Actinocorallia* gen. nov., a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44(2), 230~234.

岩井 讓, 高橋洋子, 1995. 微生物の分類, pp. 3~13. "微生物薬品化学"(上野芳

夫, 大村 智 編集, 3版). 南江堂.

Jacques F., M. D. Acar, 1980. The disk susceptibility test. pp. 24~54. In "Antibiotics in Laboratory Medicine." Williams and Wilkins. Baltimore/London.

Kahan, J. S., F. M. Kahan, R. Geogelman, S. A. Crurrie, M. Jacson, E. O. Stapley, T. W. Miller, A. K. Miller, D. Hendlin, S. Mochales, S. Hernandez, H. B. Woodruff, and J. Birnbaum, 1979. Thienamycin. A new β -lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and property, *J. Antibiotics*, 32(1), 1~12.

Kajimura, Y., M. Sugiyama and M. Kaneda, 1995. Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2. *J. Antibiotics*, 48(10), 1095~1103.

岡見吉郎, 1987. 放線菌-環境微生物, 微生物 3, 3~55.

강희일, 1989. 생리활성 물질 생산 미생물의 선택적 분리법 -호기성 균을 중심으로- 미생물과 산업, 15(2), 33~39.

Kawauchi, T., T. Sasaki, K. I. Yoshida, H. Matsumoto, R. X. Chen, M. U. Huang and T. Otani, 1997. A new anthracyclin antibiotic, IT-62-B, converts the morphology of *ras*-transformed cells back to normal :

taxonomy, fermentation, isolation. structure elucidation and biological characterization. *J. Antibiotics*, 50(4), 297~303.

Kim, B. S., and B. K. Hwang, 1993. Production, purification and antifungal activity of antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain B5. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 3, 12~18.

김창진, 1992. 자연계로부터 방선균의 선택적인 분리 및 탐색. *미생물과 산업*, 18, 35~40.

김창진, 1997. 산업적으로 유용한 방선균의 분리 및 분류. *생물산업*, 10(2), 34~43.



김창진, 권오성, 1995. 토양 특성에 따른 다양한 희소방선균의 분리. *산업미생물학회지*, 23(1), 36~42.

김일출, 김승욱, 1998. Clavulanic acid의 생산과 특성. *생물산업*, 11(2), 22~27.

Kim, J. B., D. H. Yi, W. S. Shin, C. M. Koh, 1998. Antibacterial activity of antibiotic(K-681) from *Streptomyces* sp. 681 against *Staphylococcus aureus*. *J. Korean Soc. Microbiol.*, 33(1), 69~75.

김판경, 권오성, 임채영, 박동진, 김창진, 1997. 깊이에 따른 토양 방선균의

속 다양성. 산업미생물학회지, 25(5), 534~536.

김성욱, 1992. 새로운 항생물질 탐색시 방선균의 발효과정 . 미생물과 산업, 18(3), 53~62.

김소연, 박동진, 권오성, 임채영, 김판경, 이상화, 김창진, 1996. 국내 분리 방선균의 항균활성 특성. 산업미생물학회지, 24(2), 166~172.

김순옥, 서주원, 1997. *Streptomyces lividans*에서 secE 유전자의 클로닝과 염기서열 결정. 산업미생물학회지, 25(3), 253~257.

Kim, W. S., D. J. Youn, W. T. Cho, M. K. Kim, H. R. Kim, S. K. Rhee and E. S. Choi, 1995. Improved production, and purification of aclacinomycin A from *Streptomyces lavendofoliae* DKRS. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 5(5), 297~301.

Knapp, J. S., J. M. Zenilman, J. W. Biddle, G. H. Perkins, W. E. DeWitt, M. L. Thomas, S. R. Johnson, and S. A. Morse, 1987. Frequency and distribution in the United States of strains of *Neisseriae gonorrhoeae* with plasmid mediate, high level resistance to tetracyclin. *J. Infect. Dis.*, 155, 819~822.

Kuster, E., 1976. Ecology and predominance of soil streptomycetes. pp. 109~121. In "Actinomycetes-the boundary microorganisms."(ed. Arai,

T.). Toppan Co. Ltd., Tokyo.

Kuster, E., and S. T. Williams, 1964. Selection of media for isolation of *Streptomyces*. *Nature*(London), 202, 928~929.

Lechevalier, H. A., 1989. A practical guide to generic identification. pp. 2344~2347. In "Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4." (ed. Williams, S., T. M. E. Sharpe and J. G. Holt) Williams and Wilkins. Baltimore.

Lechevalier, H. A., and M. P. Lechevalier, 1981. Introduction to the order actinomycetales, pp. 1915~1950. In "The prokaryotes."(ed. Starr, I. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, and H. G. Schlegel). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York.

Lechevalier, H. A., M. P. Lechevalier and B. Becker, 1966. Comparison of chemical composition of cell walls of nocardia with that of other aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 16, 151~160.

Lechevalier, M. P., C. de Bievre and H. A. Lechevalier, 1977. Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes : Phospholipid composition. *Bioche. Syst. Ecol.*, 5, 249~260.

Lechevalier, M. P. and H. A. Lechevalier, 1970. Chemical composition as

a criterion in the classification of other aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 20, 435~443.

Lechevalier, M. P., H. A. Lechevalier, N. N. Gerber, 1971. Chemical composition as a criterion in the classification of actinomycetes. *Advance, Appl. Microbiol.*, 14, 47~71.

이계준, 1992. 산업적으로 중요한 방선균의 분리. *미생물과 산업*, 18(3), 41~52.

Lee, J. Y., B. S. Kim and B. K. Hwang, 1995. Numerical identification of *Streptomyces flaveus* producing antibiotic substances inhibitory to pathogenic fungi. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 5(6), 324~334.

Lee, M. J., D. S. Lim, M. S. Lee, W. H. Yoon, and C. H. Kim, 1997. Characterization of *Sterptomyces* sp. AMLK-135 producing anti-MRSA antibiotics. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 7(6), 397~401.

Levy, S. B., 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36, 695~703.

Malpartida, F. and D. A. Hopwood, 1984. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature*, 309, 462~464.

- Martin, R. G., K. W. Jair, R. E. Wolf, Jr., and J. L. Rosner, 1996. Autoactivation of the *marRAB* multiple antibiotic resistance operon by the MarA transcriptional activator in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 178(8), 2216~2223.
- McGuire, J. M., R. I. Bunch, R. C. Anderson, H. E. Boatz, E. H. Flynn, H. M. Powell, and J. W. Smith, 1952. "Ilotycin," a new antibiotic. *Antibio. Chemother.*, 11(6), 281~283.
- Miyadoh S., 1990. A history of systematic and concept of in Streptomycetes. *Actinomycetol.*, 4(1), 41~48.
- 大村 智, 田中晴雄, 1995. 化学療法薬(感染症治療薬)各論, pp. 179~227. "微生物薬品化学"(上野芳夫, 大村 智 編集, 3版). 南江堂,
- Nagarajin, R., L. D. Block, M. Gorman, R. L. Hamill, M. M. Hoehn, W. M. Stark and J. G. Whitney, 1971. β -Lactam antibiotics from *Streptomyces*. *J. Am. Chem. Soc.*, 93(9), 2308~2310.
- Nonomura, H., and Y. Ohara, 1971a. Distribution of actinomycetes in soil. IX. New species of genera *Microbispora* and *Microtetrastroma* and their isolation method. *J. Ferment. Technol.*, 49(11), 887~894.
- Nonomura, H., and Y. Ohara, 1971b. Distribution of actinomycetes in soil.

X. New genus and species of Monosporic Actinomycetes. *J. Ferment. Technol.*, 49(11), 894~903.

Nonomura, H., and Y. Ohara, 1971c. Distribution of actinomycetes in soil.

IX. New species of genera *Microbispora* and *Microtetraspora* and their isolation method. *J. Ferment. Technol.*, 49(11), 904~912.

Okachi, R., I. Kawamoto, S. Takasawa, M. Yamamoto, S. Sato, T. Sato, and T. Nara, 1974. A new antibiotic XK-62-2(sagamicin). I. Isolation, physicochemical and antibacterial properties. *J. Antibiotics*, 27(10), 793~800.

Okami, Y., M. Hamada and N. Ueda, 1970. Relationship between genera of actinomycetes with reference to gas chromatographic analysis. pp. 425~457. In "Proceeding of 1st international conference on culture collection." Univ. of Tokyo Press. Tokyo.

Ormerod, L. P., J. M. Harrison, and P. A. Wright, 1990. Drug resistance trend in *Mycobacterium tuberculosis* : Blackburn 1985~89. *Tubercle.*, 71, 283~285.

Park, H. Y., and D. S. Park, 1994. Bacteria-induced antibiotic peptide, proteacin from the white-spotted flower chafer, *Protaetia brevitarsis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 52~58.

박종욱, 백성덕, 백원기, 서성일, 최병길, 서민호, 1994. 임상 가검물에서 분리한 녹농균의 항생제 내성의 추이. 대한미생물학회지, 29, 449~457.

Park. Y. H., D. G. Yim, E. J. Kim, Y. H. Kho, T. I. Mheen, J. Lonsdale and M. Goodfellow, 1991. Classification of acidophilic, neutrotolerant and neutrophilic *Streptomyces* by nucleotide sequencing of 5S ribosomal RNA. *J. Gen. Microbiol.*, 137, 2265~2269.

Reading, C. and M. Cole, 1977. Clavulanic acid : A Beta-lactamase inhibiting Beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemother.*, 11(5), 852~857.

Rothrock, C. S., and D. Gottlieb, 1984. Roles of antibiotics in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* Var. *geldanus* to *Rhizobium solani* in soil. *Can. J. Microbiol.*, 30, 1440~1447.

류판렬, 신완수, 정선식, 양동욱, 1995. 최근 광주지역에서 분리된 황색포도상구균의 파아지형과 항균제 내성 양상. 대한미생물학회지, 30, 375~390.

Salyers, A. A. and D. D. Whitt, 1994. Antibiotics: Mechanisms of action and mechanisms of bacterial resistance. pp. 97~110. In "Bacterial pathogenesis: a molecular approach." ASM Press, Washington D. C. .

Seoane, A. S. and S. B. Levy, 1995. Identification of new genes regulated

- by *marRAB* operon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 177(3), 530~535.
- Shimazu, A., C. J. Kim, and I. D. Yoo, 1993. Diversity of Actinomycetes -Species, morphology and life cycle-. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21(1), 88~94.
- Shirling, E. B., and D. Gottlieb, 1966. Methods for Characterization of *Streptomyces* Species. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 16, 313~340.
- Shirling, E. B., and D. Gottlieb, 1968. Cooperative description of type culture of *Streptomyces*. III. Species description from first study. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 18, 279~392.
- Silver, L. L., and K. A. Bostian, 1993. Discovery and development of new antibiotics : the problem of antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37, 377~383.
- Stark, W. M., M. M. Hoehn, and N. G. Knox, 1968. Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex. I. Detection and biosynthesis. *Antimicrob. Agent Chemother.*, 1967, 314-323.
- Takahasi, T., Y. Seki, Y. Tanaka, R. Oiwa, Y. Iwai, and S. Omura, 1990. Vertical distribution of microorganisms in soil. *J. Actinomycetol.*, 3, 79~88.

- Takashi, S., 1987. Cosmopolitan actinomycetes. *J. Microorganism*, 3(5), 482~492.
- Tamura, T., Y. Nakagaito, T. Nishii, T. Hasegawa, E. Stackebrandt, and A. Yokoda, 1994. A new genus of the order *Actinomycetales*, *Couchioplanes* gen. nov., with descriptions of *Couchioplanes caeruleus*(Horan and Brodsky 1986) comb. nov. and *Couchioplanes caeruleus* subsp. *azureus* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44(2) 193~203.
- Tanaka, Y. and S. Omura, 1990. Metabolism and products of actinomycetes - an introduction. *Actinomycetol.*, 4(1), 13~14.
- Terry, R. C., S. Simon, 1982. Determination of niacin metabolites 1-methyl-5-carboxylamide-2-pyridone and n-1-methylnicotinamide in urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromato.*, 232, 261~274.
- Watanuki, M. and K. Aida, 1972. Significance of quinones in classification of bacteria. *J. Gen. Appl. Microbial.*, 18, 469~472.
- Weinstein, M. J., G. M. Leudeman, E. M. Oden, G. H. Wagman, J. P. Rosselet, J. A. Marquez, C. T. Coniglio, W. Charney, H. L. Herzog, and J. Black, 1963. Gentamicin, a new antibiotic complex

- from *Micromonospora*. *J. Med. Chem.*, 6, 463~464.
- Williams, S. T., 1982. Are antibiotics produced in soil? *Pedobiologia*, 23, 427~435.
- Williams, S. T., and F. L. Davies, 1965. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J. Gen. Microbiol.*, 38, 251~261.
- Williams, S. T., M. Goodfellow, E. M. H. Wellington, J. C. Vickers, G. Anderson, P. H. A. Sneath, M. J. Sackin and A. M. Mortimer, 1983a. A probability matrix for identification of some *Streptomyces*. *J. Gen. Microbiol.*, 129, 1815~1830.
- Williams, S. T., M. Goodfellow, G. Anderson, E. M. H. Wellington, P. H. A. Sneath, and M. Sackin, 1983b. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.*, 129, 1743~1813.
- Williams, S. T., M. E. Sharpe and J. G. Holt, 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4, Williams & Wilkins. 2299~2648.
- Woese, C. R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51(2), 221~271.
- Woodruff, H. B., 1989. Fifty year's experience with actinomycete ecology.

J. Actinomycetol., 3. 79~88.

Yamada K. and K. Komagata, 1970. Taxonomic studies on coryneform bacteria. III. DNA base composition of coryneform bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 16, 215~224.

Yassin, A. F., F. A. Rainey, H. Brzezinka, K. D. Jahnke, H. Weissbrodt, H. Budzikiewicz, E. Stackebrandt, and K. P. Schaal, 1995. *Lentzea* gen. nov., a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45(2), 357~363.

Yokota, A., T. Tamura, T. Hasegawa, and L. H. Huang, 1993. *Catenuloplanes japonicus* gen. nov., sp. nov., nom. rev., a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43(4), 794~798.

Yu, J. H., M. H. Jung, H. K. Park, and D. H. Bai, 1992. Cloning and expression in *E. coli* of a bacteriolytic enzyme gene from Alkalophilic *Bacillus* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2(3), 161~165.

Yun, N. L., and Y. N. Lee, 1994. Identification of a soil *Streptomyces* spp. producing antifungal substances. *Kor. J. Microbiol.*, 32, 449~454.

澤井哲夫, 1995. 化學療法薬に對する耐性化機構, pp. 148~160. “微生物藥品化學”(上野芳夫, 大村 智 編集, 3版). 南江堂.

감사의 말씀

먼저 10여 년의 긴 세월 동안 부족한 저를 사랑과 정성으로 지도해 주시어 오늘이 있게 해주신 고영환 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 그리고 바쁘신 가운데 논문심사를 기꺼이 맡아 주시어 세심하게 논문을 다듬어 주신 김수현 교수님, 고정삼 교수님, 하진환 교수님, 먼 곳에서 논문의 흐름을 정리해주신 순천대학교 농화학과 김정호 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 항상 격려와 조언을 아끼지 않으신 송대진 교수님, 김재하 교수님, 강영주 교수님, 임상빈 교수님께도 감사드립니다.

멀리서 미생물의 동정과 활성물질의 분석에 지도와 도움을 주신 KIST 생명공학연구소 김창진 박사님과 경희대학교 생명과학부 백남인 교수님의 넓은 배려에도 깊은 감사를 드립니다.

그 동안 곁은 일들을 함께 해준 허윤희 선생, 함께 연구하며 도움을 준 오현정 선생, 많은 시간을 함께 하며 격려해 준 오창경 박사, 김효선 박사, 오명철 박사 그리고 석·박사과정 대학원생 여러분께도 감사드립니다.

끝으로 오늘의 제가 있기까지 기도를 이끼지 않으신 아버님, 어머님, 형님들 그리고 누님께 감사드리며, 기쁜 마음으로 이 작은 결실을 드립니다.