

산업적으로 중요한 방선균 분리



서울대학교 자연과학대학 미생물학과 이 계 준

서 론

자연계로부터 미생물 특히 방선균을 분리한다는 것은 이차대사산물과 효소등과 같은 유용물질을 탐색하기위한 첫단계이다. 방선균의 분리와 탐색은 방선균으로부터 이전에 발견되지 않았던 유용물질을 찾고 발견하는데 있어 가장 시간을 요하는 단계이다 (Goodfellow 등, 1988). 현재까지 토양시료에 존재하는 모든 방선균을 단번에 분리할 수 있는 분리법은 확립되어 있지않은 실정이다. 따라서 농화배양 기술을 사용하여 다양한 종류의 방선균을 또는 선택 분리기술을 사용하여 특정한 종류의 방선균을 자연계로부터 분리한다. 현대적인 분리와 탐색기법을 사용한다해도 자연계에서 분리되는 유용물질 생성 방선균들은 호기성, 호중성, 중온성 그리고 영양요구 방선균에 대부분 국한되고 있으며 이들 방선균들은 전체 미생물군중에서 극히 작은 부분을 차지하고 있다. 따라서 근래에 이르러 비교적 잘 알려져 있으면서 소집단에 속하는 genus와 species중의 방선균들이 주목을 받고 연구되고 있다. 그러나 일반적인 탐색방법에 의해 분리되는 방선균으로부터 얻어지는 대사산물들은 대부분 이전에 발견되었던 물질들이 다시 발견되는 빈도가 매우높고 새로운 물질 발견에 많은 비용이 소요되는 문제점을 안게 되었다. 이에따라 산업적으로 중요한 새로운 물질을 찾기위하여 현재까지 사용되거나 새로이 개발된 방선균 탐색기법을 통하여 새롭고 희귀한 방선균을 자연계로부터 분리하고자하는 시도가 경주되고 있다

(Nolan and Cross, 1988).

이차대사 산물을 생성하는 미생물중에서도 방선균은 산업적으로 중요한 대사산물의 제공원으로 크게 각광을 받고 있다. 40-50여년에 걸쳐 방선균은 다양한 항생제의 제공원으로 잘 알려져 왔으며 근래에 이르러 다양한 효소와 효소저해물질 그리고 면역조절물질 및 여러가지 생리활성물질의 제공원으로(Peczynska-Czoch 등, 1988; Umezawa, 1988) 알려졌다. 방선균의 대사산물중 많은것들이 이미 산업적으로 발효생산되고 있으며 근래에 발견된 여러가지 생리활성물질들도 상업적 이용을 위하여 다각적으로 활용방안이 모색되고 있다.

본고에서는 현재 산업적으로 중요한 유용물질을 생성하는 방선균의 종류에 대하여 간략히 살펴보고 아울러 산업적으로 중요한 방선균을 자연계로부터 선별분리하는 방법에 대하여 간단히 설명하고자 한다.

1. 산업적으로 유용한 방선균 대사산물

1940년대초 Waksman이 *Streptomyces griseus*로부터 streptomycin을 발견한 이래 많은 문헌에서 방선균은 항생물질의 가장 큰 제공원으로 보고되고있다. 방선균은 미생물의 대사산물로부터 발견된 항생물질중 2/3이상인 5,500종 이상을 생성하며(Berdy, 1989) 이들중 aminoglycoside계, β -lactam계, macrolide계, anthracycline계, tetracycline계, glycopeptide계 항생물질은 의약품 시장에서 주요한 위치를 차지하고 있다. 방선균으로부터 항생제 개발 초기에는 주로 streptomycetes에 탐색이 집중되었

Table 1. Commercially important antibiotics produced by actinomycetes.

Antibiotics	Producing species	Reference
Cephameycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Nagarajan <i>et al.</i> (1971)
Clavulanic acid	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Redding and Cole (1977)
Nocardicins	<i>Nocardia uniformis</i>	Aoki <i>et al.</i> (1976)
Thienamycins	<i>Streptomyces catteleya</i>	Kahan <i>et al.</i> (1979)
Gentamicin	<i>Micromonospora purpurea</i>	Weinstein <i>et al.</i> (1963)
Kanamycin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Umezawa <i>et al.</i> (1957)
Sagamicin	<i>Micromonospora sagamiensis</i>	Okachi <i>et al.</i> (1974)
Tobramycin	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	Stark <i>et al.</i> (1967)
Erythromycin	<i>Streptomyces erythreus</i>	McGuire <i>et al.</i> (1952)
Tylosin	<i>Streptomyces fradiae</i>	McGuire <i>et al.</i> (1961)
Rifamycins	<i>Amycolactopsis mediterranei</i>	Sensi <i>et al.</i> (1959)
Vancomycins	<i>Amycolactopsis orientalis</i>	McCormick <i>et al.</i> (1956)

으나 *Micromonospora purpurea*와 다른 *Micromonospora* species로부터 gentamicin이, *Nocardia mediterranei*로부터 rifampicin이 발견되고나서부터 방선균의 또다른 genus에까지 탐색이 확대되어 산업적으로 유용한 많은 항생물질의 개발을 보게되었다.

산업적으로 유용하게 사용되고 있는 항생물질은 table 1에서 보듯이 1970년대 이전에 발견된 것이 대부분으로 1980년대 이후에 개발된 것은 아직 임상 시험중이거나 시판되더라도 시장규모가 그리 크지 않은 실정이다. 1970년대에 들어 발견된 항생물질들은 기존의 항생제와 구조적으로 많은 연관성이 있으며 보다 새로운 항생물질을 발견하기 위해서는 항생물질을 생성하는 신종의 방선균을 정교한 방법으로 자연계로부터 분리하는 것이 필요하게 되었다. 1974년까지 방선균에 의해 생성되는 항생물질은 거의가 *Streptomyces* 속에서 발견되었으나(2,000여 항생물질중 95%) 그후 1980년까지 방선균에서 새로이 발견된 1,100여가지 항생물질중 약 25%가 회귀방선균에서 발견되었다는 보고가 있다(Nisbet, 1982). 이에따라 1980년대부터 일반적으로 널리 사용하던 random screening기법 대신 회귀방선균을 표적으로하여 신항생물질을 찾기위한 새로운 탐색기법 개발에 많은 노력들이 경주되었다. 그 결과 회귀방선균의 서식처, 생리 및 생화학 그리고 항생물질 생성능력등에 관한 정보들이 축적되고 이같은 정보들이 이용하여 최근들어 회귀방선균을 분리하고 탐색하는

데 많은 연구가 진행되고 있다. 회귀방선균이란 통상적인 분리방법에 의해서는 *Streptomyces*속 방선균보다 낮은 비율로 분리되는 방선균을 가리키며 (Lechevalier and Lechevalier, 1967) 산업적으로 중요한 회귀방선균으로는 *Actinomadura*, *Aactinoplanes*, *Actinosynnema*, *Ampullariella*, *Amycolactopsis*, *Dactylosporangium*, *Kibdelosporangium*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Microtetraspora*, *Nocardia*, *Nocardioopsis*, *Pseudonocardia*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Streptoalloteichus*, *Streptosporangium*, *Streptoverticillium* 등이 있다. 회귀방선균은 종에따라 고유의 독특한 항생물질을 생성하며 자연계로부터 이들을 분리할 때 새로운 항생물질의 발견 가능성이 높아지게 된다(Okami and Hotta, 1988).

많은 항생제들은 그 자체가 미생물의 특정효소에 대하여 저해작용을 갖고있다. 예를들면 β -lactam계 항생제들은 세포벽합성효소 저해작용을 가지며 clavulanic acid, olivanic acid, thienamycin 등은 β -lactamase 저해작용을 가진다. 이와는 달리 방선균은 다른 미생물의 성장에 그리 큰 영향을 주지않는 다양한 효소저해물질을 생성한다(table 2). 이중 aminopeptidase B 저해제인 bestatin은 Ubenimex란 상품명으로 면역증강제로 시판되고있다. α -MAPI는 최근 HIV-protease 저해제로 최근 연구되고 있다 (Stella등, 1991). 효소저해물질과는 달리 방선균은 다양한 효소도 생성하는데(table 3) 이중 cholesterol

Table 2. Enzyme inhibitors produced by actinomycetes.

Inhibitor	Target Enzyme	Producing species	Reference
Bestatin	Aminopeptidase B	<i>St.olivoreticuli</i>	Umezawa <i>et al.</i> (1976)
Elastatinal	Elastase	<i>St.griceoruber</i>	Umezawa <i>et al.</i> (1973)
Esterastin	Esterase	<i>St.lavendulae</i>	Umezawa <i>et al.</i> (1978)
Leupeptin	Proteases	<i>Streptomyces</i> spp.	Aoyagi <i>et al.</i> (1969)
L-669,262	HMG-CoA reductase	<i>Nocardia autotrophica</i> <i>subsp. amenthystina</i>	Joshua <i>et al.</i> (1991)
Meopolyoxyn	Chitin synthetase	<i>St.cacaoi</i>	Kobinata <i>et al.</i> (1980)
Panosialin	Sialidase	<i>St.pseudoverticillus</i> <i>var. panosialinus</i>	Aoyagi <i>et al.</i> (1971)
Probestin	Aminopeptidase M.	<i>St.azureus</i>	Aoyagi <i>et al.</i> (1990)
Trestatin	α -glucosidase	<i>Streptomyces dimorphogenes</i>	Truscheit <i>et al.</i> (1981)

Table 3. Enzymes produced by actinomycetes.

Enzyme	Producing species	Reference
L-Asparaginase	<i>Streptomyces karnatakeusis</i>	Mostafa (1979)
Cellulase	<i>Streptomyces</i> spp.	Phelan <i>et al.</i> (1979)
Chitinase	<i>Streptomyces kurssanovii</i>	Chigaleichilc <i>et al.</i> (1978)
Cholesterol oxidase	<i>Rhodococcus</i> spp.	Cheetham <i>et al.</i> (1980)
Glucose isomerase	<i>Actinoplanes missouriensis</i>	Linko <i>et al.</i> (1979)
Levanase	<i>Streptomyces</i> spp.	Murakami <i>et al.</i> (1990)
Pullulanase	<i>Streptomyces flavochromogenes</i>	Ohba <i>et al.</i> (1978)
Thermitase	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	Benke <i>et al.</i> (1978)

oxidase, glucose isomerase 그리고 Thermitase 등은 상업화되어 이용되고 있다. 이외에도 방선균은 다양한 생리활성물질을 대사산물로 생성하며(table 4) 물질탐색 기술의 발달에 따라 산업적 중요성은 점점커지고 있다.

2. 방선균의 선택분리

산업적으로 유용한 방선균의 분리방법에 관하여 일반특허에서는 그 분리방법과 분리된 유용 방선균에 대한 정보를 얻기가 그리 쉽지않다. 오히려 방선균의 생태나 분류 및 명명을 다루고 있는 논문에서 방선균 선택분리에 유용한 정보들이 산재되어 있으며 이러한 정보를 종합하여 방선균의 선택분리법을 체계화하고자하는 노력들이 1980년대들어와 시작되었다(Cross, 1982; Williams 등, 1982; Goodfellow 등, 1989).

일반적으로 방선균의 분리는 방선균 분리원의 선정, 전처리, 선택배지의 선정, 접종 및 배양, 방선균

colony 선정과 순수분리 및 보존등의 과정을 거쳐게된다.

(1) 방선균 분리원의 선정

신종의 방선균을 분리하기위한 가장 바람직한 분리원의 채취는 이전에 탐색작업이 행하여 지지 않았던 새로운 환경에서 실시하는 것이다. 즉 어디에서나 흔히 발견되는 토양 또는 수층대신 특이 환경 - 온천, 빙하, 산업폐기물 처리장등에서 방선균을 분리하게 되면 물리적 화학적 pressure에 의해 이러한 환경에 적응되어 있는 특이한 종류의 방선균들을 분리할 수가 있고, 또한 특이한 식물, 동물의 서식지, 사막, 염호 또는 육지와 멀리 격리되어 있는 섬들에서 시료를 채취하여 방선균을 분리하여도 이들 환경에 적응되어 있는 독특한 방선균들을 분리할 수 있다. 이러한 환경으로부터 분리된 방선균들은 새로운 종일 가능성이 매우 높다. Cheetham(1987)은 지구상에 존재하는 미생물중에 약 1% 미만 만이

Table 4. Micellaneous metabolites or activities produced by actinomycetes.

Activities or metabolites	Producing species	Reference
Anticocccidial	<i>Streptomyces auranticolor</i>	Ikushima <i>et al.</i> (1980)
Anti-complement compound		
Complestatin	<i>Streptomyces lavendulae</i>	Kaneko <i>et al.</i> (1989)
Antifungal compounds		
FR-900848	<i>Streptoverticillium fervens</i>	Yoshida <i>et al.</i> (1990)
Pramidicins	<i>Actinomadura hibisca</i>	Tomita <i>et al.</i> (1990)
Antitumor compounds		
Resorathiomycin	<i>Streptomyces collinus</i>	Suzuki <i>et al.</i> (1990)
Maduropeptin	<i>Actinomadura madurae</i>	Hanada <i>et al.</i> (1991)
Feed supplements		
Apramycin	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	Andreotis (1980)
Herbicides		
Herbicidin	<i>Streptomyces saganonesis</i>	Arai <i>et al.</i> (1976)
Herbimycin	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Omura <i>et al.</i> (1979)
Immune suppressor		
FK-506	<i>Streptomyces tsukubaensis</i>	Kino <i>et al.</i> (1987)
Insecticides		
Aphicin	<i>Streptomyces griceolus</i>	Chen <i>et al.</i> (1980)
Milbemycin	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Tagiguchi <i>et al.</i> (1980)
Microbial regulators		
A-factor	<i>Streptomyces griceus</i>	Khoklov <i>et al.</i> (1967)
Butanolides	<i>Streptomyces virginiae</i>	Kondo <i>et al.</i> (1989)
Rice germination	<i>Streptomyces microflavus</i>	Chung-Lian (1975)

동정되고 그 특성이 밝혀졌으리라 추정하고 있다. 따라서 많은 신종의 방선균들이 탐색방법에 따라 잠재적으로 발견될 가능성이 매우 높을 것으로 기대된다.

(2) 시료의 전처리

분리하고자하는 방선균군의 선택성은 선택분리배지에 시료를 희석하여 도말하기전에 물리적 또는 화학적인 처리를 통하여 증가하게 된다(Cross, 1982). Table 5는 이제까지 발표된 시료의 전처리방법에 대하여 대표적인 예만을 수록한것이다. 전처리 과정에 따른 방선균의 선택성 증가에 관하여 아직 과학적인 규명이 되어있지 않지만 특정한 종의 방선균 분리에 뚜렷한 선택성을 부여함으로 방선균 분리시 필수적인 과정으로 채택되고있다(Goodfellow 등 1989).

Williams와 Vickers(1988)는 방선균 분리용 한천

평판에서 streptomycetes의 성장을 감소시키기 위하여 polyvalent streptomycetes phage와 토양현탁액을 혼합하여 도말하는 독특한 방법을 사용하였는데 이는 phage가 동일한 세포벽 chemotype을 갖는 방선균군에 특이적으로 작용함을 이용한 것이다 (Prauser, 1984).

방선균의 균괴는 비교적 인공적 건조에 저항성을 보임으로 시료를 간단히 풍건시킴으로서 spore를 형성하는 방선균의 분리율을 증가시킨다. 건조에 대한 저항성은 열저항성도 수반하므로 토양시료를 100-120°C 로 가열함으로써 원하지않는 세균의 수효를 감소시키고 열에 강한 내성을 보이는 회귀방선균의 분리빈도를 높일 수 있다(Nonomura & Ohara, 1969; Hayakwa 등, 1991a). 하지만 토양시료의 열처리하는 bacteria의 수효도 감소시키지만 동시에 분리하고자 하는 방선균수도 감소시킨다는 점을 시료의

Table 5. Pretreatments which can be used to select particular actinomycetes genera.

pretreatment	Genera Selected	Reference
Enrichment		
n-Alkanes	<i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i>	Nesterenko <i>et al.</i> (1978)
Paraffin wax	<i>Nocardia asteroides</i>	Gordon and Hagan (1936)
Thermal enrichment (55°C, 10d)	<i>Thermoactinomyces</i>	Hussein <i>et al.</i> (1976)
Chemotaxis (KCl)	<i>Acinoplanes</i>	Palleroni (1980)
Physical		
Dry heat (soil) 120°C, 1 h	<i>Microbispora</i> <i>Streptosporangium</i>	Nonomura and Ohara (1969)
Wet heat (soil suspension)	<i>Rhodococcus</i> <i>Streptomyces</i> <i>Micromonospora</i>	Rowbotham and Cross (1977)
Differential centrifugation	<i>Streptomyces</i> <i>Frankia</i>	Rahacek (1956) Baker <i>et al.</i> (1979)
Filtration (water)	<i>Streptomyces</i> <i>Thermoactinomyces</i>	Burman <i>et al.</i> (1969) Al-Diwany <i>et al.</i> (1978)
Flotation (water)	<i>Streptomyces</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Thermoactinomyces</i>	Al-Diwany and Cross (1978)
Flotation (litter) drying and rehydration	<i>Actinoplanes</i>	Makkar and Cross (1981)
Chemical		
Benzethonium chloride	<i>Streptosporangium</i> <i>Dactylosporangium</i>	Hayakawa <i>et al.</i> (1991)
Chlorine	<i>Streptomyces</i>	Burman <i>et al.</i> (1976)
γ-Collidine	<i>Actinoplanes</i> <i>Dactylosporangium</i>	Hayakawa <i>etal</i> (1991)
Phenol	<i>Streptomyces</i> <i>Micromonospora</i> <i>Microbispora</i>	Speer and Lynch (1969) Hayakawa <i>et al.</i> (1991)
Quaternary ammonium compounds	<i>Mycobacterium</i> <i>Rhodococcus</i>	Philips and Kaplan (1976) Du Moulin and Stottmeier (1978)

전처리시 고려하여 적절한 수준으로 처리하여야 한다. 습윤열처리시 방선균의 spore들은 열에 대한 감수성이 높아져 전열처리때보다 훨씬 낮은 온도에서 처리하여야 한다. 습윤열처리시 *Micromonospora* 등의 spore는 60-70°C 에서 30분간 열처리를 하여도 견디어내는 반면 일반 방선균이나 bacteria는 대부분 사멸하게 된다. 다만 *Bacillus*의 내생포자가 이같은 열처리에서 살아남는데 선택분리 배지에 내생포자의

발아에 필요한 peptone이나 amino acids를 제한 시킴으로서 방선균 분리평판에서의 *Bacillus colony* 수효를 줄일 수 있다.

도양시료로부터 특정한 group의 방선균을 분리할 때 흔히 농화배양 기술이 사용되는데 이는 분리하고자하는 방선균만 자라고 번식할 수 있는 적당한 환경을 제공하고 다른 미생물들은 성장의지해 또는 치사효과를 받게하는 것이다. 저분자량의 alcohol

Table 6. Some media used for selective isolation of actinomycetes.

Medium (agar)	Predominant isolates	References
Arginine-vitamin GAC, MGA-SE agar	<i>Actinomadura</i> <i>Micromonospora</i> <i>Microtetraspora</i> <i>Streptosporangium</i>	Nonomura and Ohara (1969,1971a,b,c,d)
Colloidal chitin agar	<i>Streptomyces</i> spp. <i>Micromonospora</i> spp.	Lingappa and Lockwood (1962) Hsu and Lockwood (1975)
Diagnostic sensitivity test agar	<i>Nocardia</i> spp.	Orchard and Goodfellow (1974) Orchard <i>et al.</i> (1977)
Humic acid-vitamin agar	Overall number of <i>actinomycetes</i>	Hayakawa and Nonomura (1987)
Starch casein nitrate agar	<i>Streptomyces</i> <i>Micromonospora</i>	Kuster and Williams (1964)
CYC (Czapek-Dox, Yeast ext., Cosamino acids)	<i>Thermoactinomyces</i>	Cross and Atwell (1974)
M ₃ agar	<i>Rhodococcus</i> spp. <i>Micromonospora</i>	Rowbotham and Cross (1977)

또는 n-alkane을 이용한 농화배양법에 의해 쉽게 분리되는 방선균으로 *Nocardia*, *Rhodococcus* 등과 화분을 이용한 bating에 의해 *Actinoplanes*(Hayakawa 등, 1991)를 토양시료로부터 쉽게 분리할 수가 있다.

화학물질에 의한 전처리 예는 그다지 많지 않으나 방선균의 포자 또는 균사체가 phenol, chlorine 또는 benzethonium chloride 등과 같은 항균물질에 일반세균보다 좀더 저항이 강하는 점을 이용한다.

(3) 방선균 선택배지의 선정

방선균 분리 배지의 선택성은 배지성분, pH, 여러가지 선택적 저해물질과 배양조건등에 의해 조절된다. 일반적 또는 특정 genus의 방선균을 분리하기 위하여 다양한 배지가 개발되었다(Table 6). 각 배지의 성분들은 대개 경험적으로 선택되었으며 이들 성분이 방선균에 대하여 왜 선택성을 갖는가에 대하여는 아직 완전히 규명이 이루어 지지않고 있다. 아직까지 특정 방선균에 대하여 절대적인 선택성을 갖는 배지는 개발되어 있지않은 실정이다.

항생제는 효과적으로 배지의 선택성을 증가시킨다. Table 7은 특정 방선균 분리에 효과적인 항생제의 종류를 나타낸것이다. 일반적으로 선택배지에는 배지의 선택성을 증가시키기 위하여 일반세균의

성장을 제한하는 항생제와 fungi와 yeast의 오염을 방지하기 위하여 cycloheximide와 nystatin등을 포함시킨다. 하지만 항생제의 사용은 일반세균뿐만 아니라 분리하고자 하는 방선균에게도 많은 영향을 끼치기 때문에 신중히 사용하여야 한다.

방선균 수리 분류학의 발달로 인하여 상당한 수준까지 다양한 방선균에 대한 생화학, 생리, 영양 요구성 및 항생제 감수성에 대한 정보가 축적되었다. 이러한 수리 분류학적인 자료는 산업적으로 중요한 방선균의 분리를 위한 선택배지 조성 조합에 효율적으로 이용되기도 한다. 한예로 streptovercillia는 호중성 streptomycetes에 비해 neomycin과 oxytetracycline에 강한 내성을 보인다.(Williams 등, 1985) 이같은 사실은 streptomycetes와 다른 세균의 수효를 감소시키고 일반 방선균 분리배지에서 잘분리되지 않으며 산업적으로 중요한 group인 streptovercillia를 분리할 수 있다는 가능성을 잘 제시해주고 있다. 실제로 Hanka 등 (1985)은 neomycin과 oxytetracycline을 첨가시킨 배지와 Hirsch와 Christenson (1983)에 의해 개발된 membrane-fiter stripping법-mycelia로 자라지 않는 세균은 여과막공을 통과하여 자라지 못하므로 분리용 배지 표면까지 도달하지 못함-을 병용하여 방선균 분리평판에서 *Streptover-*

Table 7. Antibacterial compounds used in selective media for the isolation of actinomycetes.

Selective agent	Actinomycetes selected	Reference
Benzoate	<i>Micromonospora</i>	Sandrak (1977)
Bruneomycin	<i>Actinomadura</i>	Preobrazhenskaya <i>et al.</i> (1975)
Dihydroxymethylfuratriazine	<i>Microtetraspora</i>	Tomita <i>et al.</i> (1980)
Gentamicin	<i>Micromonospora</i>	Ivanitskaya <i>et al.</i> (1978) Bibikova <i>et al.</i> (1981)
Kanamycin (25°C)	<i>Actinomadura</i>	Chormonova (1978)
Kanamycin (50°C)	<i>Thermomonospora chromogena</i>	McCarthy and Cross (1981)
Lincomycin	<i>Micromonospora</i>	Iyanitskaya <i>et al.</i> (1981)
Nalidixic acid + penicillin + tellurite	<i>Rhodococcus equi</i>	Barton and Hughes (1981)
Nalidixic acid + Leucomycin	<i>Streptosporangium</i>	Hayalcawa <i>et al.</i> (1991a)
Nitrofurazone	<i>Streptomyces</i>	Yoshioka (1952)
Novobiocin (25°C) <i>et al.</i> (1975)	<i>Micromonospora</i>	Sveshnikova Orchard (1980)
Novobiocin (50°C)	<i>Thermoactinomyces</i>	Cross (1968)
Oxytetracycline	<i>Streptoverticillium</i>	Hanka <i>et al.</i> (1985)
Penicillin + NaCl	<i>Streptomyces</i>	Mackay (1977)
Penicillin + polymyxin	<i>Actinomycetes</i>	Williams and Davies (1965)
Polymyxin	<i>Actinomycetes</i>	Dulaney <i>et al.</i> (1955)
Rifampicin (25°C)	<i>Streptomyces atroolivaceus</i> and <i>S.diastaticus</i>	Vickers <i>et al.</i> (1984)
Rifampicin (30°C)	<i>Actinomadura</i>	Chormonova (1978) Athalye <i>et al.</i> (1981)
Rifampicin (50°C)	<i>Saccharomonospora</i> and <i>Thermomonospora</i>	Athalye <i>et al.</i> (1981)
Rubomycin	<i>Actinomadura</i>	Lavrova <i>et al.</i> (1972)
Streptomycin	<i>Actinomadura</i>	Lavrova (1971)
Tellurite	<i>Actinoplanes</i>	Willoughby (1971)
Tetracyclines	<i>Nocardia</i>	Orchard and Goodfellow (1974) Orchard <i>et al.</i> (1977)
Tunicamycin	<i>Micromonospora</i>	Wakisaka <i>et al.</i> (1982)

cillium colony 수를 크게 증가시킬 수 있었다고 보고하였다.

Williams 등(1984, 1988)은 분리하고자 하는 방선균의 영양요구성을 이용하여 탄수화물과 아미노산의 독특한 조합과 선택성을 증가시키기 위하여 항생제를 넣어주거나 또는 제외시킨 선택배지를 이용하였다. 항생물질들을 생성하는 것으로 알려진

회귀한 streptomycetes를 보다 쉽게 분리하거나 토양에서 흔히 분리되는 *Streptomyces albidoflavus*를 배제시킨 각 배지의 성분들은 각각 DIACHAR program(Sneath, 1980)을 이용하여 호중성 streptomycete database(Williams 등 1983)를 검토하여 선정하였다.

이상에서 특정 방선균을 분리하는데 사용되는 균

Table 8. Newly discovered and classified actinomycetes genus.

New genus	reference
<i>Actinoalloteichus</i>	Liu <i>et al.</i> (1984)
<i>Catellatospora</i>	Asano and Kawamoto (1986)
<i>Glycomyces</i>	Labeda <i>et al.</i> (1985)
<i>Kibdelosporangium</i>	Shearer <i>et al.</i> (1986)
<i>Microtetraspora</i>	Thiemann <i>et al.</i> (1968)
<i>Parvopolyspora</i>	Liu and Lian (1986)
<i>Planobispora</i>	Thiemann and Baretta (1968)
<i>Planomonospora</i>	Thiemann <i>et al.</i> (1967)
<i>Saccharotrix</i>	Labeda <i>et al.</i> (1984)
<i>Streptomycooides</i>	Zhang <i>et al.</i> (1984)
<i>Trichotomonospora</i>	Lian <i>et al.</i> (1985)

래에 개발된 배지는 방선균의 수리 분류학적인 연구를 통하여 얻은 조성 영양원의 조합과 선택성을 증가시키기 위해 배지에 첨가시키는 항생제의 종류와 양에 따라 큰 다양성을 가질 수 있음을 알수있다.

(4) 배양

방선균 분리를 위해 전처리가 끝난 시료를 회석하여 집중한 한천평판은 보통 25-30°C 에서 배양한다. 이는 대다수의 방선균들이 호중온성이기 때문이다. 호열성 방선균은 45-55°C 에서 분리되나 이들로부터 분리되는 유용한 대사산물은 극히 적어 그다지 주목을 받고 있지 못하고 있다. 항생물질 생성 방선균중에서 30-35°C 사이에 잘자라는 것들도 가끔 분리되며 그 수효는 아주 작으며 이들은 항생제 생산시 냉각수의 비용절감등과 같은 경제적인 측면에서 관심을 끌고있다.

분리할 방선균 colony를 선정하기에 앞서 배양에 있어 가장 중요한 변수는 온도보다는 배양기간이다. 배양기간은 통상 7-14일이며 대부분의 streptomycetes와 micromonosporae는 맨눈으로 관찰할 수 있는 colony를 형성한다. 호열성 방선균인 *Thermoactinomyces*는 1-2일 안에 colony를 형성하기도 한다. 2주보다 긴 배양기간을 통하여 colony를 생성하는 방선균은 경제적인 발효에 부적합하므로 특별한 경우가 아니면 장시간 배양을 하지 않는다. 장시간 배양을 요하는 경우는 분리용 배지에 다른 미생물이 먼저 자라면서 성장인자를 생성하거나 독성물질의 농도를 감소시킴으로서 분리시 정상적인 성장 속도를

를 보이지만 초기에 자라지 못했던 방선균을 자라게 할 때이다. 통상적으로 저온성, 혐기성 또는 자가영양성 방선균의 선택분리는 거의 관심조차 주어지지 않는 실정이다.

(5) 방선균 colony의 선별

방선균 분리 과정에서 가장 시간이 걸리는 과정이며 기술과 경험을 요구하는 중요한 단계이다. 선택배지상에 형성된 colony는 보통 고배율의 장초점 현미경으로 형태를 관찰하여 선별하나 한 평판위에서 동일한 genus의 서로 다른 종들도 제각기 모양이 다르므로 여러모양의 colony 선별시 결과적으로 동일한 방선균군이 중복분리를 초래할 수 있으며 이에 따라 산업적으로 많은 시간과 경비의 소비를 보게 된다. 따라서 colony의 분리는 잘 훈련된 방선균 분류 전문가들이 담당하는 것이 노력의 낭비를 줄이는 첩경이 된다.

선택배지와 함께 genus에 특이성을 갖는 효소의 발색 또는 형광기질을 사용함으로써 특정한 방선균의 분리빈도를 높이기도 한다(Steel, 1981). 이 방법은 특정한 효소에 반응하는 발색 또는 형광기질이 개발되어 있을 경우에만 가능한 단점이 있다. 전통적인 방법과 새로운 방법을 사용하여 자연계로부터 분리한 희귀방선균을 Table 8에 나타내었다.

3 분리방선균의 동정

현재까지 많은 종류의 방선균이 자연계로부터 분리되었다고 보고되고 있으나 대개 산물이나 형태적 특성, 색소형성등의 극히 일부 특징만 갖고 분류된 것이 많아 과학적인 의미에서 정확히 분류되었다고 할 수 없다. 따라서 자연계로부터 분리된 방선균을 분류하기 위한 표준화가 1960년대초 International Streptomyces Project (ISP) 설립과 더불어 시행되어 오고 있으며 주기적으로 기존의 분류체계를 수정보완해 오고있다.

새로운 분리주는 기존의 taxa에 포함시킬 수 없다. 따라서 새로 발견된 방선균을 인지하기 위한 taxa에 할당하는 유용한 분류체계의 필요성이 대두된다. 새로운 taxa의 성립은 많은 분류체계가 고전적인 농화배양기술을 이용하여 비슷한 ecosystem으로부터 분리된 type strain을 바탕으로 성립한다는 사실에 의해 복잡하게 된다. 이결과 대부분의 분리주들은 낮은 기질 특이성을 보이며 그들의 최대성장속도에 따라 선택된다. 이와 마찬가지로 시료의

전처리하는 가끔 포자 또는 cyst 등의 resistant stage를 갖는 방선균만을 선별하게한다. 이런 과정에서 얻어진 분리주만을 가지고 분류를 하게 되면 자연계의 다양성을 반영하지 못하게 된다. 따라서 다양한 자연환경에서 분리된 일련의 방선균 분리주를 분류할 수 있는 분류의 key를 정하는 것이 분류학자들의 숙제로 남아있다

결 론

이미 많은 연구가 진행된 대표적인 방선균들로부터 신항생물질을 발견하기가 점점 어려워지고 있다. 반면 streptomycetes에 속하지 않는 새로운 방선균군으로부터 매우 높은 비율로 신항생물질과 신생리활성물질이 발견되기 때문에 산업 미생물학자들은 이러한 방선균들을 분리하고 탐색하는데 많은 노력을 기울이고 있다. 또한 이들 방선균을 키우기위한 새로운 배양방법과 낮은 농도로 배양액내에 존재할지도 모르는 신항생물질과 다른 2차 대사산물을 검색할수 있는 민감한 분석방법이 산업미생물학계에서 다양하게 개발되고 있다.

앞으로 다양한 방선균 genera에 대한 수리분류학적인 database가 갖춰지면 이를 이용하여 새로운 2차대사 산물을 생성하는 특정 방선균군을 선택적으로 분리할수 있는 선택배지가 고안되고 아울러 독특한 시료처리 방법이 강구되고 또한 선택분리한천평판에 형성된 방선균 colony로부터 효율적으로 새로운 종의 방선균을 선별할수 있는 시기가 머지않은 장래에 도래할 것으로 사료되는 바이다.

참고문헌

1. Al-Diwany, L. J., B. A. Unsworth and T. Cross (1978) *J. Appl. Bacteriol.* **45**, 249-258.
2. Al-Diwany, L.J., and T. Cross (1978) *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.* (Abt.I) Suppl. 6, 153-160.
3. Andreotis, J.S., B. Guilloteau, and P.G. Harlech-Jones (1980) *Vet. Res. Commun.* **4**, 131-138.
4. Aoki, H., H.T. Sakai, M. Kohsaka, T. Konimi, J. Hosoda, Y. Kuboci, E. Lguchi, and H. Ima-

- naka (1976) *J. Antibiotics* **29**, 492-500.
5. Aoyagi, T., M. Yagisawa, M. Kumagai, M. Hamada, Y. Okami, T. Takeuchi and M. Umezawa (1971) *J. Antibiotics* **24**, 860-869.
6. Aoyagi, T., S. Yoshida, Y. Makamura, Y. Shigihara, M. Hamada and T. Takeuchi (1990) *J. Antibiotics* **43**, 143-148.
7. Aoyagi, T., T. Takeuchi, A. Matsuzaki, K. Kawamura, S. Kondo, M. Hamada, K. Maeda and H. Umezawa (1969) *J. Antibiotics* **22**, 283-286.
8. Arai, M., T. Hanchishi, N. Kitahara, T. Enokita, K. Kawakubo and Y. Kondo (1976) *J. Antibiotics* **29**, 863-869.
9. Athalye, M., J. Lacey and M. Goodfellow (1981) *J. Appl. Bacteriol.* **51**, 289-297.
10. Barton, M. D., and K. L. Hughes (1981) *J. Clin. Microbiol.* **13**, 219-221.
11. Benke, M.D. E.Schalinatus, H.Ruttloff and W.E. Hoehne (1978) *Acta Biol.Med.Ger.* **37**, 1185-1192.
12. Berdy, J. (1989) in "Bioactive metabolites from microorganisms " Bushell, M.E. and U.Gräfe. eds. *Progress in Industrial Microbiology* **27**, 3-25.
13. Bibikova, M.V., L.P. Ivanitskaya and S. M. Singal (1981) *Antibiotiki* **26**, 488-492.
14. Burman, N.P., C.W. Oliver and J. K. Stevens (1969) in D. A. Shapton and G. W. Gould, eds: *Isolation Methods for Microbiologists* Academic Press, London. 127-134.
15. Cheetham, P.S.J., P. Dunnill, and M.D. Lilly (1980) *Enzyme Microb. Technol.* **2**: 201-206.
16. Cheetham, P.S.J. (1987) *Enzyme Microb. Technol.* **9**, 194-213.
17. Chen, C-Y, Q-X Lin, K-J. Lin and M-B. Zhang (1980) *Acta Microbiol. Sinica.* **20**, 113-115.
18. Chigaleichik, A.G., A.N. Shidchenko, and D.A. Pirieva (1978) *Prikl. Biokhim Mikrobiol.* **14**, 412-416.
19. Chormonova, N.V. (1978) *Antibiotiki* **23**, 22-26.
20. Chung-Lian Production Brigade Sci. Technol Group (1975) *Acta Microbiol. Sinica.* **15**, 42-45.
21. Cross, T. (1968) *J. Appl. Bacteriol.* **31**, 36-53.
22. Cross, T., and R.W. Atwell (1974) in "Spore research" Barker, A.N. and G.W. Goule eds, Academic Press, London, 11-20.

23. Cross, T. (1982) *Develop. Ind. Microbiol.* **23**, 1-18.
24. Du Moulin, G.C. and K.D. Stottmeier (1978) *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 771-773.
25. Dulaney, E.L., A.H. Larsen and E. O. Stapley (1955) *Mycologia* **47**, 420-422.
26. Gordon, R. E., and W. A. Hagan (1936) *J. Infect. Dis.* **59**, 200-206.
27. Goodfellow, M. and A.G. O'donnell (1989) in "Microbial Products: New approaches" Baumberg, I. Hunter and M. Rhodes eds. Cambridge University Press, Cambridge, 343-383.
28. Hanada, M., H. Ohkuma, T. Yonemoto, K. Tomita, M. Ohbayashi, H. Kamei, T. Miyaki, M. Konishi and H. Kawaguchi (1991) *J. Antibiotics* **44**, 403-414.
29. Hanka, L. J., P. W.Rueckert and T. Cross (1985) *FEMS Microbiol. Letters* **30**, 365-368.
30. Hayakawa, M. and H. Nonomura (1987) *J. Ferment. Technol.* 501-509.
31. Hayakawa, M., T. Sadakata, T. Kajiura and H. Nonomura (1991a) *J. Ferment Technol.* **72**, 320-326.
32. Hayakawa, M., T. Kajiura and H. Nonomura (1991b) *J. Ferment Technol.* **72**, 327-333.
33. Hayakawa, M., T. Tamura and H. Nonomura (1991c) *J. Ferment. Technol.* **72**, 426-432.
34. Hirsh, C.F. and D.L. Christensen (1983) *App. Microbiol.* **46**, 925-929.
35. Hsu, S.C., and J.L. Lockwood (1975) *Appl. Microbiol.* **29**, 422-426.
36. Hussein, A.M., A.M. Allam and A. M. Ragah (1976) *Egypt. J. Bot.* **19**, 195-197.
37. Ikushima, H., E. Iguchi, M. Kohsaka, H. Aoki and H. Imanaka (1980) *J. Antibiotics*. **33**, 1103-1106.
38. Ivanitskaya, L.P., M.V. Bibikova and M. N. Gromova (1981) *Antibiotiki* **26**, 83-86.
39. Joshua, H., M.S. Schwartz and K.E. Wilson (1991) *J. Antibiotics* **44**, 366-370.
40. Kahan, J.S., F.M. Kahan, R. Goegelman, S.A. Currie, M. Jackson, E.O. Stapley, T.W. Miller, A.K. Müller, D. Hendlin, S. Mochales, S. Hernandez, H.B. Woodruff and J. Birnbaum (1979) *J. Antibiotics* **32**, 1-12.
41. Kaneko, I., K. Kamoshida and S. Takahashi (1989) *J. Antibiotics* **42**, 236-241.
42. Khokhlov, A. S., I. I. Tovarova, L. N. Borisova, S. A. Pliner, L. N. Shevchenko, E. Ya.
43. Kornitskaya, N. S. Ivkina and I. A. Rapoport (1967) *Doki, Biochem.* (Eng. trans) 177, 302.
44. Kino, T., H. Hatanaka, M. Hashimoto, M. Nishiyama, T. Goto, M. Okuhara, M. Kohsaka, H. Aoki and H. Imanaka (1987) *J. Antibiotics* **40**, 1249-1255.
45. Kobinata, K., M. Uramoto, M. Nishii, and H. Kusakable (1980) *Agric. Biol. Chem.* **44**, 1709-1712.
46. Kondo, K., Y. Higuchi, S. Sakuda, T. Nihira and Y. Yamada (1989) *J. Antibiotics* **42**, 1873-1876.
47. Kuster, E. and S.T. Williams (1964) *Nature* **202**, 928-929.
48. Labeda, D.P, R.T. Testa, M. P. Lechevalier and H. A. Lechevalier (1984) *Int. J. Syst. Bactriol.* **34**, 426-431.
49. Labeda, D.P., R.T. Testa, M.P. Lechevalier and H. A. Lechevalier (1985) *Int. J. Syst. Bactriol.* **35**, 417-421.
50. Lavrova, N.V. (1971) *Antibiotiki* **16**, 781-786.
51. Lavrova, N.V., T.P. Preobrazhenskaya and M. A. Sveshnikova (1972) *Antibiotiki* **17**: 965-970.
52. Lechevalier, H.A. and M.P. Lechevalier (1967) *Annu. Rev. Microbiol.* **21**, 71-100.
53. Lian, Y., X. Liu and X. Zhang (1985) *Acta Microbiol. Sinica* **25**, 194-196.
54. Lingappa, Y., and J. L. Lockwood (1962) *Phytopathology* **52**, 317-323.
55. Linko, Yu-Y, K. Poutanen, L. Weckstrom, and P. Linko (1979) *Enzyme Microb. Technol.* **1**, 26-30.
56. Liu, Z., Y. Zhang and X. Yan (1984) *Acta Microbiol. Sinica* **24**, 295-298 Asano, K and I, Kawamoto (1986) *Int. J. Syst. Bactriol.* **36**, 512-517.
57. Mackay, S.J. (1977) *Appl. Env. Microbiol.* **33**, 227-230.
58. Makkar, N.S., and T. Cross (1981) *J. Appl. Bacteriol.* **51**.
59. McCarthy, A.J. and T. Cross (1981) *J. Appl. Bacteriol.* **51**, 299-301.
60. McGuire, J.M., Bunch, R.L., Anderson, R.C., Boatz, H.E., Flynn, E.H., Powell, H.M., and

- Smith, J.W.(1952) *Antibiot. Chemother.* Washington D.C. **2**, 281-283.
61. McGuire, J.M., W.S. Boniece, C.E. Higgins, M. M. Hoehn, W.M. Stark, J. Westhead and R.N. Wolfe (1961) *Antibiot. Chemother.* **11**, 320-327.
62. Mostafa, S. A. (1979) *Zentralbt. Bakteriolog. Abt. Microbiol.* **134**, 429-436.
63. Murakami, H., H. Muroi, T. Kuramoto, Y. Tamura, K. Mitutani, H. Nakano and S. Kitahata (1990) *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2247-2255.
64. Nagarajan, R., L.D. Bolck, M. Gorman, R.L. Hamill, M.M. Hoehn, W.M. Stark, and J.G. Whitney (1971) *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2308-2310.
65. Nesterenko, O. A., S. A. Kasumova and E. I. Kvasnikov (1978) *Microbiol.* **47**, 699-703.
66. Nisbet, L.J.(1982) *J.Chemical Technology and Biotechnology* **32**, 251-270.
67. Nolan, R.D. and T. Cross (1988) in "Actinomycetes in Biotechnology" Goodfellow, M, S.T. Williams and M.Modarski eds A.P. London, 1-32.
68. Nonomura, H. and Y. Ohara (1969) *J. Ferment. Technol.* **47**, 463-469.
69. Nonomura, H. and Y. Ohara (1971a) *J. Ferment. Technol.* **49**, 1-7.
70. Nonomura, H. and Y. Ohara (1971b) *J. Ferment. Technol.* **49**, 887-894.
71. Nonomura, H. and Y. Ohara (1971c) *J. Ferment. Technol.* **49**, 895-903.
72. Nonomura, H. and Y. Ohara (1971d) *J. Ferment. Technol.* **49**, 904-912.
73. Ohba, R., H. Chaen, S. Hayashi and S. Ueda (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20**, 665-676.
74. Okachi, R., Kawamoto, I., Takasawa, S., Yamamoto, M., Sato, S., Sato, T., and Nara, T. (1974) *J. Antibiotics* **27**, 793-800.
75. Okami, Y. and K.Hotta (1988) in "Actinomycetes in Biotechnology" 33-67.
76. Omura, S., Y. Iwai, Y. Takahashi, N. Sadakane and A. Nakagawa (1979) *J. Antibiotics* **32**, 255-261.
77. Orchard, V.A. (1980) *Soil Biol. Biochem.* **12**, 477-481.
78. Orchard, V.A. and M. Goodfellow (1974) *J. Gene. Microbiol.* **85**, 160-162.
79. Orchard, V.A., M. Goodfellow and S.T. Williams (1977) *Soil Biol. Biochem.* **9**, 233-238.
80. Orchard, V.A., and M. Goodfellow (1974) *J. Gen. Microbiol.* **85**, 160-162.
81. Palleroni, N.J. (1980) *Arch. Microbiol.* **128**, 53-58.
82. Panthier, J.J., H.G. Diem and Y. Dommergues (1979) *Soil Biol. Biochem.* **11**, 443-445.
83. Parent, F., G. Beretta, M. Berti and V. Ariol (1978) *J. Antibiotics* **31**, 276-283.
84. Peczn'yńska-Czoch, W. and M. Modarski (1988) in "Actinomycetes in Biotechnology" Goodfellow, M, S.T. Williams and M. Modarski eds A.P. London, 219-283.
85. Phelan, M.B., D.L. Crawford and A. L. Pometto (1979) *Can. J. Microbiol.* **25**, 1270-1276.
86. Prauser, H. (1984) *Antibiotics and Chemotherapy.* **6**, 642-647.
87. Phillips, B. J. and W. Kaplan (1976) *J. Clin. Microbiol.* **3**, 272-276.
88. Preobrazhenskaya, T.P., Lavrova, N.V., Ukholina, R.S., and Nechaeva, N. (1975).
89. Rahacek, Z (1956) *Cs. Mikrobiol.* **1**, 129-134.
90. Reading, C., and M. Cole (1977) *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**, 852-857.
91. Rowbotham, T. J. and T. Cross (1977) *J. Gen. Microbiol.* **100**, 231-240.
92. Sandrak, N.A. (1977) *Microbiol.* **46**, 478-481.
93. Shearer, M.C., P. Actor, B.A. Bowie, S.F. Grappel, C.H. Nash, D.J. Newman, Y.K. Oh, C.H. Pan and L.J. Nisbet (1985) *J. Antibiotics* **38**, 555-560.
94. Sneath, P.H.A.(1980) *Computers and Geosciences.* **6**, 21-26.
95. Speer, J.R., and D. L. Lynch (1969) *Trans. III. State Acad. Sci.* **62**, 265-272.
96. Steel, D.B. (1991) *Annu.Rev.Microbiol.* **45**, 89-106.
97. Stella, S, G.Saddler, E.Sarubbi, L. Colombo, S. Stefanelli, M.Denaro and E.Selva (1991) *J. Antibiotics* **44**, 1019-1991.
98. Stark, W.M., Hoehn, M.M., and Knox. N.G. (1968) *Antimicrob. Agents Chemother.* 1967: 314-323.
99. Suzuki, H., M. Tahara, M. Takahashi, F. Matsumura, T. Okabe, A. Shimazu, A. Hirata, H.

- Yamaki, H. Yamaguchi, N. Tanaka and T. Nishimura (1990) *J. Antibiotics* **43**, 129-134.
100. Sveshnikova, M.A., N.T.Chormonova, N.V.Lavrova, L.P.Terekhova and T.P.Preobrazhenskaya, (1976) *Antibiotiki* **21**, 784-787.
101. Takiguchi, T., H. Mishima, M. Okuda, M. Terarao, A. Aoki and R. Fukuda (1981) *J. Antibiotics* **33**, 1120-1127.
102. Thiemann, J. E. and G. Baretta (1968) *Arch. Microbiol.* **62**, 157-166.
103. Thiemann, J. E., H. Pagani and G. Baretta (1967) *G. Microbiol.* **58**, 42-52.
104. Thiemann, J. E., H. Pagani and G. Baretta (1968) *J. Gen. Microbiol.* **50**, 295-304 Liu, Z. and Y. Lian (1986) *Acta Microbiol. Sinica* **26**, 7-10.
105. Tomita, K., M. Nishio, K. Saitoh, H. Yamamoto, Y. Hoshino, H. Ohkuma, M. Konishi, T. Miyaki and T. Oki (1990) *J. Antibiotics* **43**, 755-762.
106. Tomita, K., Y. Hoshino, T. Sasahira, K. Hasegawa, M. Akiyama, H. Tsukiura and H. Kawaguchi, (1980) *J. Antibiotics* **35**, 822-836.
107. Truscheit, E., W. Frommer, B. Junge, L. Muller, D.D. Schimit and W. Wingender (1981) *Angewandte chemie*, International Edition in English **20**, 744-761.
108. Tunac, J. B., B. D. Graham, W. E. Dobson and M. D. Lenzini (1985) *J. Antibiotics* **38**, 460-465.
109. Umezawa, H., T. Aoyagi, A. Okura, H. Morishima, T. Takeuchi and Y. Okmi (1973) *J. Antibiotics* **26**, 787-789.
110. Umezawa, H., T. Aoyagi, H. Suda, M. Hamada and T. Takeuchi (1976) *J. Antibiotics* **29**, 97-99.
111. Umezawa, H., T. Aoygi, T. Hazato, K. Uotani and F. Kojima (1978) *J. Antibiotics*. **31**, 639-641.
112. Umezawa, H., Ueda, K., Maeda, K., Yagishita, K., Kondo, S., Okami, Y., Utahara, R., Osato, Y., Nitta, K., and Takeuchi, T. (1957) *J. Antibiotics* **A10**: 181-189.
113. Umezawa, H (1988) in "Actinomycetes in Biotechnology" Goodfellow, M., S.T. Williams and M. Modarski eds A.P. London, 285-325.
114. Vickers, J.C., S.T. Williams and G.W. Gross (1984) in "Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes" Ortiz-Ortiz, L., L.F. Bojalil and V. Yakoleff, Academic Press, Orlando 553-561.
115. Vining, L.C. and S. Chatterjee (1982) in "Overproduction of microbial products" Krumphanzl, V., B. Sikyta and Z. Vanek eds., Academic Press, London, 35-46.
116. Wakisaka, Y., Y. Kawamura, Y. Yasuda, K. Kozuma and Y. Nishimoto (1982) *J. Antibiotics* **35**, 822-836.
117. Weinstein, M.J., Leudeman, G.M., Oden, E.M., Wagman, G.H., Rosselet, J.P., Marquez, J.A., Coniglio, C.T., Charney, W., Herzog, H.L., and Black, J. (1963) *J. Med. Chem.* **6**, 463-464.
118. Williams, S.T. and F. L. Davies (1965) *J. Gen. Microbiol.* **38**, 251-262.
119. Williams, S.T. and E.M.H. Wellington (1982) in "Bioactive microbial products: Search and discovery" Bu'lock, J.D., L.J. Nisbet and D.J. Winstonley eds Academic Press. London, 9-26.
120. Williams, S.T., M. Goodfellow, E.M.N. Wellington, J.C. Vickers, G. Alderson, P. H. A. Sneath, M. J. Sackin and A.M. Mortimer (1983) *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1815-1830.
121. Williams, S.T., S. Lanning and E.M.N. Wellington (1984) in "Biology of the actinomycetes" Goodfellow, M., M. Mordrski and S.T. Williams. eds A.P. London. 481-528.
122. Williams, S.T., R. Locci, R.C. Vicker, G.M. Schofield, P. H. A. Sneath and A. M. Mortimer (1985) *J. Gen. Microbiol.* **131**, 1681-1689.
123. Williams, S.T. and J.C. Vickers (1988) in "Biology of Actinomycetes '88" Okami, Y., T. Beppu and K. Okaware eds Japen Scientific Press, Tokyo 265-270.
124. Willoughby, L. G. (1971) *Freshwater Biology* **1**, 23-27.
125. Yoshida, M., M. Ezaki, M. Hashimoto, M. Yamashita, N. Shigematsu, M. Okuhara, M. Kohsaka and K. Horikoshi (1990) *J. Antibiotics* **43**, 748-754.
126. Yoshioka, H. (1952) *J. Antibiotics* **5**, 559-561.
127. Zhang, G., G. Xing and X. Yan (1984) *Acta Microbiol. Sinica* **24**, 189-194.