

국내토양에서 분리한 혐기성 세균 *Streptococcus* sp. An-21-1 이 생성하는 항생물질

I. 혐기성 세균의 선별과 동정

박승춘·윤효인·오태광*
충남대학교 수의과대학 동물의학연구소
한국과학기술원 유전공학연구소*
(1992년 8월 31일 접수)

Antibiotics produced by anaerobic fermentation of *Streptococcus* sp. An-21-1 isolated from domestic soil

I. Screening and identification of anaerobic bacteria

Seung-chun Park, Hyo-in Yun, Tae-kwang Oh*
Institute of Vet. Sci., College of Vet. Med., Chungnam National University
Genetic Engineering Research Institute, KAIST*
(Received Aug 31, 1992)

Abstract : Anaerobic bacteria are suggested to be potential source for new antibiotics. In order to search for antibiotics from domestic origin, we collected 800 soil samples across Korean locations and could isolate as many as 989 anaerobic strains. Among them 10 strains were found to have good producing capacity of antibiotics. An anaerobe was finally selected due to secreting antibiotics having high antimicrobial activity towards multiple resistant microorganism (*E coli* JM 83) transformed by genetic engineering technique. Its morphological, physiological and biochemical characteristics were investigated, together with antimicrobial spectrum therefrom. On antimicrobial spectrum study, substance secreted from this strain, had no activities to fungus and yeast. The selected strain showed G(+) and coccial shape, on Gram, staining and electron scanning microscopy, respectively. Biochemically this strain utilized glucose, fructose lactose, sucrose, but did not arabinose, cellulose, rhamnose, sorbitol, trehalose, mannitol. Catalase test showed negative property. Optimal growth temperature was 37°C. The results obtained above suggest this strain *Streptococcus faecium* subsp. and we named it *Streptococcus* sp. An-21-1.

Key words : anaerobes, antibiotics, *E coli* JM 83, domestic soil, *Streptococcus* sp. An-21-1.

서 론

공기중에 상재하는 일반 세균에 의해 탄저균의 증식이 억제됨을 관찰한 Pasteur와 Joubert는 미생물이 입상에 응용될 수 있는 가능성을 최초로 제시하였다.¹ Fleming이 푸른곰팡이(*Penicillium notatum*)가 분비하는 대사

산물인 penicillin이 황색포도상구균에 강력한 증식억제 효과를 나타냄을 보고²한 이래, 본격적인 항생물질에 관한 연구가 시작되었다. 국내에서도 신규 활성물질 개발이³⁻⁶ 물질특허 도입 등을 계기로 점차로 활성화되고 있는 실정이다. 새로운 항생물질을 개발하기 위해서

는 과거에 이용되지 않았던 새로운 기법의 창출과 균주의 획득이 필수적으로 요구된다. 따라서 그동안 항생물질 생산에 주로 이용되었던 방선균이나 곰팡이균 이외의 일반 세균을 이용한다면 신규물질이 획득될 가능성이 높다. 지금까지 알려진 항생물질 생산 균종은 대부분 배양이 용이한 호기성 세균이었으며 배양조건이 까다로운 혐기성 세균을 이용한 항생물질 생산에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 그러나 최근 혐기성 세균의 배양기술이 발달함에 따라⁷⁻¹³, 혐기성 세균을 이용한 항생물질 개발이 가능하게 되었고 이들 항생물질은 신규 물질일 가능성이 높다고 볼 수 있다.

본 실험에서는 혐기성 세균이 생성하는 항생물질의 분리 정제를 위한 기초자료를 제공코자 국내 야산의 토양으로부터 혐기적 조건에서 항생물질 생산능이 높은 균주를 분리하였고, 선별된 균주에 대해 증식능, 형태학적 및 생리학적 특성에 관하여 구명하였다.

재료 및 방법

혐기성 세균의 분리과 배양 : 지리산, 계룡산, 주왕산, 충북 제천 등지에서 유기물이 풍부한 지표에서 약 5~10cm깊이의 혐기적 상태에 있는 토양을 채취하였다. 각 시료에는 채취장소, 일자, 기후, 주위환경과 토양의 특성을 기록하였으며 일련번호를 붙여 보관하였다. 혐기성 세균을 분리, 배양하는데 사용한 배지는 chopped meat carbohydrate(CMC ATCC1102) 배지의 조성을 변형한 C-SPY 배지를 사용하였으며(Table 1), 배지 제조는 Hungate의 방법에 준하였다.¹⁴

토양시료와 생리식염수가 든 pressure tube를 각각 혐기상태로 만든 다음 anaerobic glove box내에 넣고 시료 1~2g을 식염수에 희석시킨 후 상층액 0.1ml을 취하여 C-SPY 평판배지에 도말하여 2~4일간 glove box내에서 배양한 후 집락을 관찰하였다. 성상이 특이한 집락을 선택하여 집락당 2장의 C-SPY 평판배지에 도말하여 한장은 glove box(35℃) 내에서 다른 한장은 호기적 상태(37℃)에서 2일간 배양하여 양쪽에서 모두 집락이 형성되면 통성 혐기성 세균으로 분류하고 혐기적 조건에서만 증식되면 편성 혐기성세균으로 분류하였다. 혐기 배양에서 형성된 집락을 10ml의 C-SPY 액체배지가 든 pressuer tube에 한 백금이 접종하여 37℃에서 2~3일간 배양한 다음 5000rpm(Beckmann J2-21M/E Centrifuge)으로 원침하여 상층액을 채취하여 항균활성을 조사하는데 공시하였고, 침전된 균체에는 40% glycerol을 가한 다음 멸균된 증류수 0.5ml을 넣어 -70℃에 보관하였다. 시험중 환원제로는 titanium(III)citrate를 소량 넣어 환원시켰다.¹⁵⁻¹⁷

Table 1. Composition of the C-SPY medium (pH 7.0) used for the isolation and cultivation of anaerobic bacteria

Components	Quantities	Components	Quantities
Soil extract	100ml	K ₂ HPO ₄	1g
Bacto-peptone	15g	NH ₄ Cl	0.5g
Yeast extract	10g	0.2% rezazurin	0.4ml
Glucose	4g	Salt solution*	1ml
Soluble starch	1g	Vitamin solution**	1ml
Cellobiose	1g	Cysteine	0.5g
Maltose	1g		
q.s.d.w.1L			

* Salt solution was consisted of 1.5g nitrilotriacetic acid, 0.1g FeSO₄·7H₂O, 0.1g MnCl₂·6H₂O, 0.17g CoCl₂·6H₂O, 0.1g ZnCl₂, 0.1g CaCl₂·2H₂O, 0.01g Na₂MoO₄, 0.017g Na₂SeO₃, 0.026 g NiSO₄·6H₂O, and 1.0g NaCl per 1 liter distilled water.

** Vitamin solution was consisted of 0.002g biotin, 0.002g folic acid, 0.01g pyrimidine HCl, 0.005g thiamine HCl, 0.005g riboflavin, 0.005g nicotinic acid, 0.005g pantothenic acid, 0.0001g cyanocobalamin, 0.005g p-aminobenzoic acid and 0.005g lipoic acid per 1 liter distilled water.

Table 2. Microorganisms used to test the antimicrobial spectrum of the sample antibiotics

Test organisms	IFO number	Abbreviation
Gram negative bacteria		
<i>Escherichia coli</i> AB 1157		AB
<i>Escherichia coli</i> BE 1186		BE
<i>Escherichia coli</i> JM 83*		JM
<i>Salmonella typhimurium</i> TV 119		TV
<i>Salmonella typhimurium</i> SL 1102	13130	SL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		PA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> N-10		L
Gram positive bacteria		
<i>Bacillus subtilis</i>	3513	B. sub
<i>Staphylococcus aureus</i>	12732	209
<i>Staphylococcus aureus</i> R-209		R-209
<i>Mycobacterium phlei</i>	3518	Ph
Fung:		
<i>Alternaria mali</i>	8984	AM
<i>Botrytis cinerea</i>	5365	BC
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>	5277	CM
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	7531	CL
<i>Glomerella cingulate</i>	9767	GC
<i>Pyricularia oryzae</i>	5994	PO
<i>Fusarium oxysporum</i>	9761	FO
Yeast		
<i>Candida albicans</i>	1594	Can

* *Escherichia coli* JM 83 was transformed to harbor TC, KM and AMP resistant genes.

항균 활성 측정 : 분리균에서 생산된 항생물질의 항균 spectrum 시험에 사용된 검정균으로 세균 11종, 효모 1종 및 곰팡이 7종, 총19종(Table 2)을 KCTC(Korean collection for type culture)에서 분양받아 검정균에 알맞

Table 3. The composition of media for the culture of test organisms

Test organisms	Ingredients	Weight(g/ℓ)
AB, BE, TV, SL, JM, 209, R-209, B. sub.	Beef extract	3
	Peptone	10
	NaCl	5
Pa	Brain heart infusion	37
	Casamino acid	1
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1
L	Brain heart infusion	37
	Casamino acid	1
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1
	NaCl	29
Ph	Glycerin	30
	Beef extract	5
	Peptone	10
	NaCl	3
Can	Glucose	20
	Peptone	10
Fungi	Sucrose	30
	Yeast extract	1
	Potato extract	20

Table 4. MIC determination of multi-antibiotics for *E. coli* JM83(PBR 325 and PRK 2501)

Antibiotics	MIC (μg)	Working concentration (μg)
Ampicillina	800	350
Chloramphenicol	400	150
Kanamycin	800	350
Tetracycline	80	30

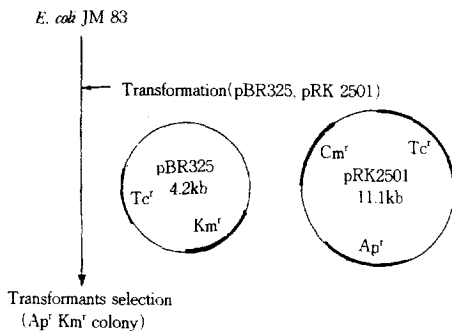


Fig 1. Development of new test organism harboring multiple antibiotic resistant markers.

는 배지에 배양하여 실험에 공시하였다(Table 3). 공시 균주중 *Escherichia coli* JM 83은 4개의 항생제 저항 gene 을 삽입한 균주이다(Fig 1, Table 4). *Escherichia coli* BE

1186은 고감수성 변이주이고, *Salmonella typhimurium* SL 1102는 *Salmonella typhimurium* TV 119의 고감수성 변이 주이며, *Pseudomonas aeruginosa* N-10은 *Pseudomonas aeruginosa* IFO 12130을 모균주로 하는 세포벽 결손 변이주 이다. 또한 *Staphylococcus aureus* R-209는 *Staphylococcus aureus* IFO 12732의 환자 유래성 내성 변이주로서 streptomycin, kanamycin, chloramphenicol, tetracycline과 macrolide, sulfonamide 등의 항균물질들에 대해 내성이 있다. 곰팡이로는 식물 병원성 균주들로서 사과나무 갈색점 무늬 병원균인 *Alternaria mali* IFO 8984, 오이 탄저 병원균인 *Colletotrichum lagennarium* IFO 7531, 과수의 잿빛 곰팡이병원균인 *Botrytis cinerea* IFO 7531, 벼 도열병원균인 *Cochliobolus miyabeanus* IFO 5277, 과수 탄저병원균인 *Glomerella cingulate* IFO 9767, 오이 시들음병원균인 *Fusarium oxysporum* 9761 등을 사용하였다.

각 검정균에 알맞는 배지를 시험관에 5ml씩 넣고 검정균을 한 백금이씩 접종한 다음 세균은 37℃에서 24시간 진탕배양하였으며, *Pseudomonas aeruginosa* N-10은 25℃에서 3~7일간, 효모는 28℃에서 2일간, 곰팡이들 중 *Fyricularia oryzae*는 4~10일, *Collectotrichum lagennarium* 은 10~25일, 그 이외의 곰팡이들은 4~8일간 27℃에서 진탕배양하여 사용하였다. 검정 plate 제작은 한천배지를 멸균한 후 40~50℃로 식힌 후 전배양한 검정균을 증식상태에 따라 0.2~0.5%씩 접종하여 잘 혼합한 한천

배지를 petri dish(직경 90mm)에 20ml씩 분주하고 수평으로 굳힌 후 냉장보관하면서 사용하였다. 항균력 측정에는 배양 상층액을 1N NaOH를 사용하여 pH를 중성으로 조절한 다음 10배 감압농축한 후 paper disk(8mm, Toyo Seisakuso Co., Ltd.)에 흡수시켜 말려 검정 평판배지에 disk를 정치하고 냉장고에 두 시간 방치하여 상층액의 물질이 확산되게 한 후 일정기간 각각 적합한 온도에서 배양하였다. 배양 후 disk 주위에 생긴 증식 저지환의 직경을 항균력으로 표시하였다.

항생물질 생산균주의 선별 : 혐기성 세균의 배양에서 얻어진 상층액을 *E. coli* BE 대해 항균 활성을 지니고 있는 세균을 1차로 선정하였다. 선정된 균주를 호기적 조건과 혐기적 조건에서 동시배양하여 혐기적 조건에서만 항균활성을 나타내는 균주를 선별하여 *E. coli* JM 83에 항균활성을 나타내는 균주를 최종선별하였다.

선발된 균주의 동정 : 선발된 균주의 동정은 Bergey's manual of systemic bacteriology, Macfaddin의 Biochemical tests for identification of medical bacteria(2nd edition) 및 Cowan and Steel의 Manual for the identification of medical bacteria에 준하여 동정하였다.¹⁸⁻²⁰

결 과

항생물질 생산균주의 선별 : 800여 점의 토양시료에서 346주의 편성 혐기성 세균과 643주의 통성 혐기성 세균을 분리하여 *E. coli* BE에 대해 항균력을 갖는 물질을 생산하는 균주 59주를 1차로 선별하였다. 선별균주 중 혐기적 조건에서만 항생물질 생산능을 갖고 있는 혐기성 세균 10주를 선별하여 *E. coli* JM 83에 대해 항균력을 갖고 있으며 비교적 항균범위가 넓은 균주를 최종선별하여 이를 An-2-1균으로 명명하였다. 최종선별된 균주는 Table 5에서 나타난 것처럼 Gram 양성균과 Gram 음성균에 항균활성을 보여주었으며, 곰팡이균과 효모균에는 활성을 보여주지 않았다.

An-2-1 균의 동정 및 배양조건 : C-SPY agar 배지에 증식된 An-2-1균의 집락을 취하여 Gram염색을 수행한 결과 Gram 양성 연쇄상구균으로 아포를 형성하지 않으며 운동성이 없는 균으로 밝혀졌다(Table 6). 전자현미경학적 관찰에서는 직경이 0.9~1.1 μM 크기의 coccus로 구성된 비교적 짧은 연쇄상구균으로 2~25개 coccus로 구성된 것으로 나타났다(Figs 2, 3). 균주에 대한 생화학적 특성은 Table 7, 8과 같은 결과를 얻었다. 이 균은 gelatin에 대한 분해능이 없었고, catalase test는 음성이었으며 생육 최적온도는 37°C이고, 최적 pH는 7.0이었다. NaCl이 2~6% 첨가된 배지에서는 정상적으

Table 5. Antimicrobial spectrum of the culture broth obtained anaerobic fermentation

Test organisms	Activity
Gram negative bacteria	
<i>Escherichia coli</i> AB 1157	++
<i>Escherichia coli</i> BE 1186	++
<i>Escherichia coli</i> JM 83*	+
<i>Salmonella typhimurium</i> TV 119	+
<i>Salmonella typhimurium</i> SL 1102	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> N-10	-
Gram negative bacteria	
<i>Bacillus subtilis</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+
<i>Staphylococcus aureus</i> R-209	+
<i>Mycobacterium phlei</i>	-
Fungi	
<i>Alternaria mali</i>	-
<i>Botrytis cinerea</i>	-
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>	-
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	-
<i>Glomerella cingulate</i>	-
<i>Pyricularia oryzae</i>	-
<i>Fusarium acysporum</i>	-
Yeast	
<i>Candida albicans</i>	-

* *Escherichia coli* JM 83 was transformed to harbor TC, KM, and AMP resistant genes.

++ : 14~17mm, + : 9~13mm

Table 6. Morphological and cultural characteristics of strain An-2-1

Morphological characteristics
shape : coccus
gram stain : positive
motility : non-motile
spore : non-spore forming
Cultural characteristics
C-SPY agar plate : good growth
circular colony form
white
convex colony surface

로 증식하였으나 8% 이상 첨가하였을 때는 증식하지 않았다. 이 균주는 glucose, fructose, lactose, sucrose 등을 잘 분해하였고 xylose, maltose, cellobiose, raffinose, salicin, glycerol에 대한 이용능은 낮았으며 특히 arabinose, cellulose, rhamnose, sorbitol, trehalose, mannitol은 전혀 이용하지 않았다.

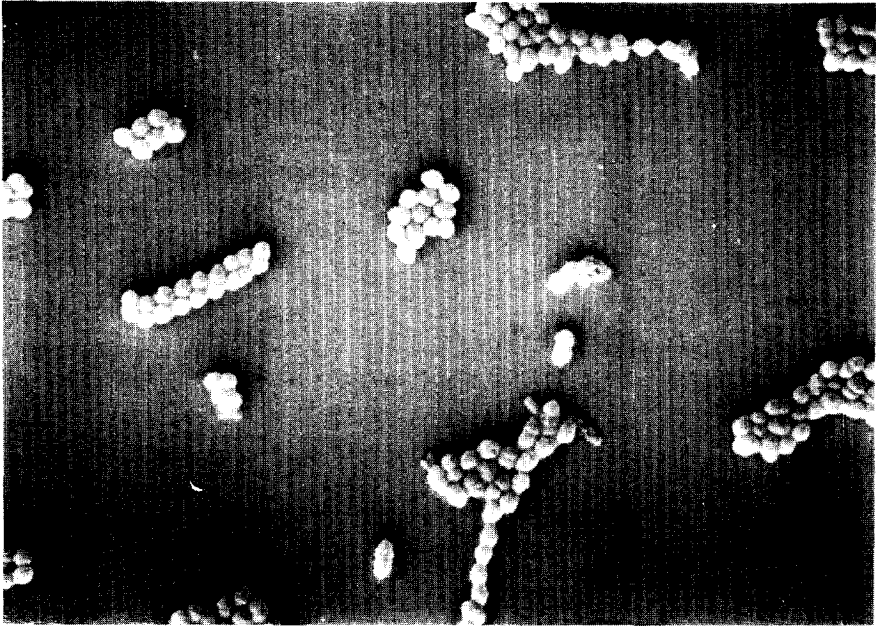


Fig 2. Electron microscopy of strain An-21-1 cultured on C-SPY agar for 2 days($\times 3000$).

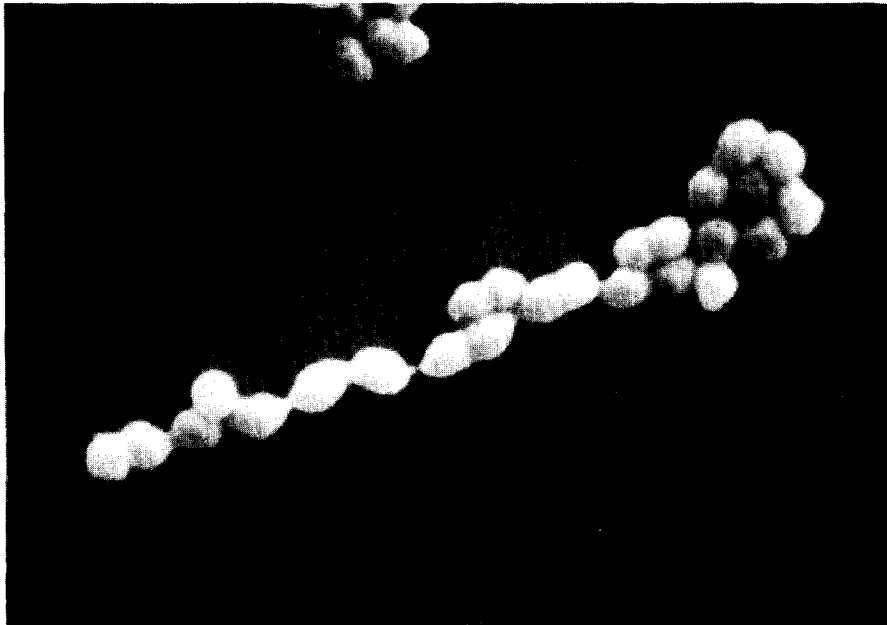


Fig 3. Electrom microscopy of strain An-21-1 cultured on C-SPY agar for 2 days ($\times 5000$).

고 찰

방선균류(*Actinomycetes*)에 속하는 *Streptomyces griseus*로부터 streptomycin을 분리한 것 등에 의하면 항생물질은

미생물에 의해 생성되는 물질로 다른 미생물의 증식을 억제하거나 살균작용을 가진 물질이라고 정의한 바 있다.

현재까지 밝혀진 항생물질은 10,000여종 이상에 이르

Table 7. Physiological characteristics of tested strain An-21-1

Factor	Characteristics
Optimum temperature	37°C
Optimum pH	7
Obligate anaerobe	-
NaCl tolerance 2%	+
4%	+
6%	+
8%	+
MacConkey agar	-
O/F test	F
Catalase test	-
Citrate utilization	-
Esculin hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	-

+ : Positive - : Negative

Table 8. Carbon utilization of strain An-21-1

Carbon source	Growth
D-Glucose	++
D-Fructose	++
L-Arabinose	-
Cellulose	-
D-Xylose	+
L-Rhamnose	-
Lactose	++
Sorbitol	-
Maltose	+
Cellobiose	+
Sucrose	++
Raffinose	+
Trehalose	-
Salicin	+
Mannitol	-
Glycerol	+
Acid production from	
Glycerol	+
Maltose	+
Lactose	+
Mannitol	-
Raffinose	+
Salicin	+
Sucrose	+
Trehalose	+
Arabinose	-
Sorbitol	-
Glucose	+

++ : utilized + : very slightly utilized - : not utilized

며 그 중 50% 이상이 방선균류(*Actinomycetes*)에 의해 생산되어지고 있는 것으로 알려져 있으며 이들 방선균류 중에서도 82% 이상이 *Streptomyces*속의 의한 것으로 밝

혀져 있다. 그러나 일반 세균에서는 지금까지 800여 종만이 발견되어 항생물질을 생산하는 미생물군은 극히 한정되어 있음을 알 수 있다. 일반적으로 항생물질을 생산하는 많은 미생물들은 spore를 형성하는 *Fungi*나 *Actinomycetes*, *Bacillus* 등으로 항생물질의 생산은 미생물 세포의 분열과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되어 있다. 그러나 spore를 형성하지 않는 *Pseudomonas*속으로부터 여러 항생물질이 개발됨에 따라 이러한 생각이 수정되고 있다.

즉, *Pseudomonas aeruginosa*에서 항균성 물질인 pyocyanase가 처음 분리되었으며 그 후 대략 50여 종의 항생물질이 보고되어 있다. 신규 항생물질에 대한 연구는 궁극적으로 인류의 질병퇴치라는 사명과 넓은 시장성 때문에 점점 활발해지고 있으며, 다양한 균에서 신규 항생물질이 보고되어 있다. 혐기성세균을 이용하여 항생물질을 탐색한다면 신규가능성이 매우 높을 것으로 사료되므로 본 실험에서는 토양시료 800여 점으로부터 989 주의 혐기성 세균을 분리하였다. 혐기성세균의 분리 배양기술은 Hungate에 의해 정립되었으며 현재에도 많은 연구자들은 이 방법에 근거를 두고 있다.

통성 혐기성세균과 편성 혐기성세균의 분리는 anaerobic glove box를 이용하여 346 주의 편성 혐기성세균과 643 주의 통성 혐기성세균을 분리하여 *E. coli* BE에 대해 항균력을 갖는 균주를 1차 선별하였다. 혐기성세균은 2차 대사산물이 적으므로 고감수성 균주를 1차 선별균주로 이용하였다. 선별된 균주의 항균 spectrum을 조사한 결과 fungi와 yeast에는 항균활성을 보이지 않으므로 병원성세균을 대상으로 한 신규항균제 개발 가능성을 시사하여 주고 있다. 혐기성세균을 배양하는 데 있어서 중요한 것 중 하나는 산소의 제거이다. 그 중 많이 이용되는 방법이 Hungate technique으로 알려진 배양방법으로 여러 환원제를 이용하는데 본 실험에서는 cysteine을 사용하였으며 배지 조작 과정 중 산소의 유무 감별을 위해 resazurin을 효과적으로 사용하였다.

본 실험 결과 이 균은 gelatin에 대한 분해능이 없었고, catalase test에서 음성으로 나타났다. 생육 최적온도는 37°C이고 최적 pH는 7.0이었다. NaCl이 2~6% 첨가된 배지에서는 정상적으로 증식하였으나 8% 이상 첨가하였을 때는 증식하지 않았다. 이 균주는 glucose, fructose, lactose, sucrose 등을 잘 분해하였고 xylose, maltose, cellobiose, raffinose, salicin, glycerol에 대한 이용능은 낮았으며 특히 arabinose, cellulose, rhamnose, sorbitol, trehalose, mannitol은 전혀 이용하지 않았다.

그러므로 본 균주는 Genus *Streptococcus*중 *Enterococci*에 속하는 *Streptococcus faecium* subspecies에 속하

는 균주라고 사료되나 더 명확한 분류를 위해서는 혈청학적 및 핵산분류학적 시험이 요구된다. 본 실험에서는 이 균주를 *Streptococcus* sp. An-21-1로 명명하였다. 이 균주에서 개발된 항생제의 보고는 아직 없으며 또한 혐기성 발효로 항생물질 탐색은 전세계적으로 시작 단계에 있다는 점을 감안할 때 신규가능성은 높다고 할 수 있다.

따라서 앞으로 수행되어야 할 실험은 지금까지의 기초 실험을 근거로 이 균주의 항생물질 생산을 최대로 유도할 수 있는 조건을 설정하고 기기분석을 위해 항균물질의 순수분리정제가 수행되어야 한다.

결 론

국내 토양시료 800여 점으로부터 혐기성 세균 989 균주를 분리하여 혐기적 조건에서 항생물질 생산능이 우수한 10 균주를 선별하였다. 선별균주 가운데 다제내성 균주인 *E. coli* JM 83에 항균력이 있는 균주를 최종균주로 선별하여 항균 spectrum 및 균주의 형태학적 특성, 생화학적 특성 및 생리학적 특성을 구명한 바 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 항균 spectrum 결과 다제내성균주에 항균활성을 보여주는 혐기성세균을 선별하였다. 그러나 곰팡이와 효모에는 항균활성을 보여주지 않으므로 세균에만 항균활성이 있는 것으로 나타났다.

2. 선별균주는 Grma 양성 균주이며 전자현미경 사진에서 coccus 형태임을 알 수가 있었다. Gelatin에 대한 분해능이 없었고, catalase test는 음성이었으며 생육 최적온도는 37°C이고 최적 pH는 7.0이었다. NaCl이 2~6% 첨가된 배지에서는 정상적으로 증식하였으나 8% 이상 첨가하였을 때는 증식하지 않았다. 이 균주는 glucose, fructose, lactose, sucrose 등을 잘 분해하였고 xylose, maltose, cellobiose, raffinose, salicin, glycerol에 대한 이용능은 낮았으며 특히 arabinose, cellulose, rhamnose, sorbitol, trehalose, mannitol은 전혀 이용하지 않았다. 이상의 결과로 이 균주는 *Streptococcus faecium* sub spp.로 추정되며 이 균주를 *Streptococcus* sp. An-21-1이라 명명하였다.

참 고 문 헌

1. Gilman AG, Goodman LS, Murad F. In : Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Macmillan Publishing Co., Inc. New York. 1990 ; 1018~1019.
2. Fleming A. On the antibacterial actions of cultures of a *Penicillium* sp. with special reference to their use

- in the isolation of *B. influenzae*. *Brit J Exp Pathol* 1929 ; 10 : 226.
3. 김홍진 등. 인삼토양병해의 방제연구. 한국연초연 연구보고서(인삼재배) 1987 ; 43~46.
4. 유익동, 김신덕, 김창진. 미생물 대사산물을 이용한 생물제초제 개발 현황과 전망. *농약과 식물보호* 1987 ; 8 : 17~21.
5. 민태익 등. 한국과학원 부설 유전공학연구소 미생물에 의한 신규 생체 항생물질탐색연구보고서 1987 ; 3~27.
6. 오태광 등. 한국과학원 부설 유전공학연구소 혐기성 세균에 의한 신규 생체 항생물질탐색연구보고서 1991 ; 4 : 1~81.
7. Adler HI, Crow WD. A novel approach to the growth of anaerobic microorganisms. *Biotechnol Bioeng Symp* 1981 ; 11 : 553~540.
8. Aranki A, Freter R. Use of anaerobic glove boxes for the cultivation of strictly anaerobic bacteria. *Am J Clin Nutr* 1972 ; 25 : 1329~1334.
9. Balch WE, Wolfe RS. New approach to the cultivation of methanogenic bacteria. 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-CoM)-dependent growth atmosphere. *Appl Environ Microbiol* 1976 ; 32 : 781~791.
10. Bhatnagar L, Henriquet M, Longin R. Development of an battle-system for cultivation of strict anaerobes (methanogens). 1983 *Bio Technol Lett* 1983 ; 5 : 39~42.
11. Dean AC, Ellwood DC, Melling (ed). The action of antibacterial agents on bacteria grown in continuous culture. Continuous cultures : applications and new fields. Society of Chemical Industry London. Ellis Horwood Ltd. *Chichester*. 1976.
12. Drew SW. Liquid culture. In P. Gerhardt(ed.), Manual of methods for general bacteriology. *American Society For Microbiology*, Washington, D.C. 1981 ; 151~178.
13. Miller TL, Wolin MJ. A serum bottle modification of the Hungate technique for the cultivating obligate anaerobes. *Appl Microbiol*. 1974 ; 27 : 985~987.
14. Moensch TT, Zeikus JG. An improved preparation method for a titanium(III) media reductant. *J Microbiol Methods* 1983 ; 1 : 193~202.
15. Hungate RE. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacterio Rev* 1950 ; 14 : 1~49.
16. Hungate RE. A roll tube method for cultivation of

- strict anaerobes. In J. R. Norris and D.W. Ribbons (ed), *Methods in Microbiology, Vol. 3B. Academic Press.* New York. 1969 ; 117~132.
17. Plotz H, Gelooso J. Relations entre la croissance des microorganismes anaerobies et le potentiel du milieu de culture. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1979 ; 45 : 613~640.
 18. Barun M, Schoberth S, Gottschalk G. Enumeration of bacteria forming acetate from H₂ and CO₂ in anaerobic habitats. *Arch Microbiol* 1979 ; 120 : 201~204.
 19. Wiegel J, Braun M, Gottsalk G. *Clostridium thermocautotrophicum* species novum, a thermophile producing acetate from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Curr Microbiol* 1981 ; 5 : 225~260.
 20. Macfadin JF. Biochemical tests for identification of medical bacteria (2nd edition), Williams and Wilkins Press Baltimore. 1984.
 21. Schatz A, Bugie E, Waksman SA. Streptomycin a substance exhibiting antibiotic against Gram positive and Gram negative bacteria. *Proc Soc Exp Biol Med* 1944 ; 55 : 669.
 22. Demain AL. Industrial microbiology. *Science* 1981 ; 214 : 987~995.
 23. Bycroft BW. *Dictionary of antibiotics and related substances.* Chapman and Hall. London 1988 ; 751~944.
 24. Martin JF, Demain AL. The filamentous fungi, *Developmental Biology.* 1974 ; 3.
-