

생리활성물질 탐색자원으로서의 미생물

이상화 · 김창진
생명공학연구소

많은 생리활성물질은 세균, 방선균, 곰팡이 등과 같은 미생물 균주로부터 분리되고 있으며, 근래 이들의 분리·동정 기술의 발달로 인하여 신규 발견은 다양한 새로운 미생물 균주의 확보에 크게 의존하는 것으로 인식되고 있다[1-3]. 따라서 각종 생리활성물질의 탐색 효율을 높이기 위해 자연계 미생물의 분포 특성과 이들의 선택 및 효과적 분리 방법, 그리고 미생물 분리주의 배양 방법 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 고에서는 최근에 규명된 신규 생리활성물질과 그 분리원인 미생물간의 상호관계를 살펴보고, 또한 다양한 균주의 확보 차원에서 토양 방선균의 분포 특성을 조사한 저자들의 연구 결과를 간략히 소개하고자 한다.

생리활성물질과 미생물간의 상호 관계

최근 15년간 학술지 *Journal of Antibiotics*에 게재되었던 논문을 토대로 각종 생리활성물질을 항균, 항진균, 항암, 기타 생리활성, 농업용으로 구분하고 년도별 screening target의 추

이를 조사하였다(Table 1). 1990년 이후에는 항암과 항균 분야에 비해 면역, 심혈관, 신경계 등 기타 의약생리활성 분야가 가장 중요한 목표로 나타났으며, 과거 가장 빈번히 탐색되었던 항세균 물질은 1980년대 후반부터 그 중요성이 상당히 감소하였으나 최근에는 내성균의 발생이 큰 사회적 문제로 대두됨에 따라 중요한 목표로 다시 부상하고 있다. 항암물질은 꾸준히 중요한 target이 되고 있으며 체초 또는 살충 효과를 나타내는 농업용 화합물도 지속적인 탐색 대상이 되고 있다.

또한 생리활성물질을 생산하는 미생물을 그 종류별로 조사해 본 결과(Table 2), 방선균류가 64.0%로 가장 많았으며, 그 다음으로는 *Aspergillus*와 *Penicillium* 속을 중심으로 하는 곰팡이류가 25.6% 정도였고, *Bacillus*와 *Pseudomonas* 속을 중심으로 하는 세균류가 10.0%를 차지하였다.

마지막으로 screening target과 그에 사용된 미생물 종류의 상관성을 분석해 본 결과 Table 3에 나타난 바와 같이 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다. 즉, 신규 생리활성물질 생산 균주 1,041주 중 방선균이 61.3%, 진균이 31.6%, 세균이 7.1

Table 1. Annual trends of screening targets used for the isolation of new compounds from microorganisms

Year	'84	'85	'86	'87	'88	'89	'90	'91	'92	'93	'94	'95	'96	'97	'98	Total(%)
Antibacterial	29	31	29	29	25	30	20	14	16	11	30	37	9	11	14	335(22.4)
Antifungal	13	9	11	13	18	13	17	8	13	20	11	22	17	14	14	213(14.3)
Antitumoral	10	25	23	19	23	26	17	19	20	22	13	16	27	28	20	308(20.6)
Bioactive	18	19	23	22	20	25	26	40	64	45	56	65	39	33	25	520(34.8)
Agrochemical	4	7	6	7	10	13	13	9	7	12	4	9	8	4	4	117(7.8)
Total	74	91	92	90	96	107	93	90	120	110	114	149	100	90	77	1,493

Data were based on papers published in *Journal of Antibiotics* from 1984 to 1998.

Table 2. Annual trends of microbial sources used for the isolation of new compounds

Year	'84	'85	'86	'87	'88	'89	'90	'91	'92	'93	'94	'95	'96	'97	'98	Total(%)
Actinomycetes	51	72	70	71	67	84	69	70	76	73	57	71	40	45	40	956(64.0)
Fungi	10	9	13	10	16	15	15	16	35	29	45	57	48	33	31	382(25.6)
Bacteria	13	10	9	9	13	8	8	3	8	7	12	21	11	12	6	150(10.0)
Others	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	5(0.3)
Total	74	91	92	90	96	107	93	90	120	110	114	149	100	90	77	1,493

Data were based on papers published in *Journal of Antibiotics* from 1984 to 1998.

Table 3. Screening targets and microbial sources used for the isolation of new compounds

Targets	Actinomycetes	Bacteria	Fungi	Total
Antitumor	253(82.1)	11(3.6)	44(14.3)	308(100)
Antifungal	106(49.8)	27(12.7)	80(37.6)	213(100)
Bioactive	279(53.7)	36(6.9)	205(39.4)	520(100)
Total	638(61.3)	74(7.1)	329(31.6)	1,041(100)

Data were based on papers published in *Journal of Antibiotics* from 1984 to 1998.

를 차지하였다. 그러나 screening target에 따라서는 상당히 특이한 양상을 보였다. 즉 항암 활성을 목표로 하여 탐색된 균주는 총 308주이었는데 이 가운데 방선균이 82.1%로서 절대 다수를 차지하였으며 곰팡이와 세균은 각각 14.3%와 3.6%로 대체로 낮은 경향이었다. 항진균 활성을 목표로 하여 탐색된 균주는 총 213주이었는데 방선균이 49.8%, 곰팡이가 37.6%, 세균이 12.7%를 차지함으로써 방선균뿐만 아니라 곰팡이가 상대적으로 중요한 탐색 재료임을 보여주고 있다. 그리고 기타 다른 생리활성을 목표로 하여 탐색된 균주는 총 520주이었는데 이 중 방선균이 53.7%, 곰팡이가 39.4%, 세균이 6.9%를 차지하여, 역시 곰팡이가 중요한 탐색 재료의 하나임을 보여주고 있다. 따라서 각종 생리활성물질을 탐색하고자 할 때에는 screening target에 따라 탐색원인 미생물의 종류를 신중히 선택하여야 할 것으로 보인다.

자연계 방선균의 분포 특성

토양 방선균의 분포 양상은 다양한 균주의 효과적 분리를 위해 선택적 분리법의 개발[4]과 더불어 활발히 연구되고 있으며, 이와 관련된 지금까지의 대표적인 연구로는 Horst[5], Kizuka 등[6], Okazaki 등[7]의 보고가 있다. 이들 중 humic acid-vitamin agar 배지[8]를 이용하여 토양 방선균의 분포 다양성을 조사한 Kizuka 등[6]의 연구 결과에 따르면 *Streptomyces* 속이 60.7%로써 가장 많으며 *Micromonospora*, *Nocardia* 속은 각각 5.9%, 10.4%씩 분포하며 나머지 방선균 속은 3% 이하인 것으로 나타났다. 1963년 *Micromonospora* 속으로부터 항생물질 gentamicin이 발견[9]된 후 회소방선균은 각종 생리

활성물질의 중요한 탐색원이 되고 있으며[10] 최근 산림, 밭, 초지, 논 토양에서 방선균의 속 다양성을 조사한 저자들의 연구 결과[11-13]에 따르면 *Streptomyces* 속을 제외한 모든 방선균 즉 회소방선균[7,14,15]의 분포 비율은 30-40%인 것으로 나타났다.

강변 방선균의 분포 특성

방선균 분리원으로서 널리 이용되고 있는 산림, 초지 등과 달리 일반적으로 부엽물이 매우 적고 모래, 자갈 등이 많은 강변 토양에서 방선균의 계절별 속 분리 다양성을 조사하였다. 즉, 충청북도 청원군 현도면 소재 금강 변의 특정 3 지점으로부터 1995년 4월(봄), 7월(여름) 10월(가을), 그리고 이듬해 1월(겨울)에 각각 표층 토양 시료를 채취하여 humic acid-vitamin agar 배지[2]를 이용하여 서로 다른 방선균주를 순수 분리하고 속 동정하였다.

그 결과(Table 4) *Streptomyces* 속 균주는 봄과 가을에 각각 21주와 23주가 분리된 반면 겨울에는 다소 적은 17주, 그리고 여름에는 봄과 가을의 절반 수준인 12주가 분리되었다. 회소방선균은 가을과 겨울에 각각 21주와 24주가 분리되었으며 봄과 여름에는 각각 절반 이하 수준인 5주와 12주가 분리되었다. *Streptomyces* 속과 회소방선균을 합한 전체 방선균은 가을과 겨울에 많이 분리되었으며 봄과 여름에는 그 절반 수준이었다. 또한 분리된 방선균들의 상대적 비율에서 *Streptomyces* 속 방선균은 여름(50.0%), 가을(52.3%), 겨울(41.5%)에 비해 봄(80.8%)에 높았으며 회소 방선균은 봄(19.2%)에 비해 여름(50.0%), 가을(47.7%), 겨울(58.5%)에 높았다.

이러한 결과로 볼 때, 방선균은 강변의 토양 시료 당 평균 9.5주가 분리되었으며 이는 본 연구와 동일한 조건에서 수행되었던 산림, 밭, 초지, 논 토양의 시료 당 10.8주[11-13]와 큰 차이가 없는 것으로 생각된다. 강변에서 분리된 전체 방선균 중 *Streptomyces* 속과 회소방선균은 각각 55.0%(126주)와 45.0%(103주)이었는데 앞서 언급한 이들의 전형적 분포 비율에 비해 회소방선균의 비율이 높은 것으로 판단된다. 또한 본 연구에서는 Kizuka 등[6]의 연구 결과와 달리 회소방선균 중 특히 *Micromonospora* 속은 평균 18.3%의 높은 분리 비율을 나타내었는데 이는 Okazaki 등[7]이 지적한 것처럼 수분이 많

Table 4. Seasonal influence on the isolation of different actinomycetes from soils of river side

Season	Stm	Rare actinomycetes				Subtotal	Total
		Mim	Noc	Oth			
Spring	21(80.8)*	4(15.4)	0(0)	1(3.8)	5(19.2)	26	
Summer	12(50.0)	1(4.2)	1(4.2)	10(41.7)	12(50.0)	24	
Autumn	23(52.3)	11(25.0)	3(6.8)	7(15.9)	21(47.7)	44	
Winter	17(41.5)	6(14.6)	13(31.7)	5(12.2)	24(58.5)	41	

*Number (%) of different strains. Stm: *Streptomyces*, Mim: *Micromonospora*, Noc: Nocardioform, Oth: other genera including *Actinomadura*, *Kineosporia*, *Microbispora*, *Nocardioopsis*, *Saccharopolyspora*, *Streptosporangium*, and unidentified genera.

은 강변의 환경적 특성에 기인한 것으로 보여진다.

한편 방선균의 계절별 분포 변화를 조사한 전 연구[16]에 따르면 산림, 밭, 초지, 논 토양에서 전반적으로 *Streptomyces* 속의 다양성은 봄에 높고 여름에는 낮았으며 희소방선균의 경우 겨울에 높고 봄에는 낮았다. 그러나 강변 토양에서 *Streptomyces* 속은 항상 가을에 높고 여름에는 낮은 특징을 보였으며 희소방선균도 항상 가을에 높고 봄과 여름에는 낮은 다양성을 나타내었다. 따라서 강변 방선균의 계절별 분포 변화는 전 연구 결과[16]와 다소 차이가 있는 것으로 보여지나, 여름에 방선균의 분포 다양성이 항상 높지 않은 점은 일치하는 것으로 판단된다. 결론적으로 강변 토양은 산림, 초지 등과 충분히 비교할 수 있는 방선균의 분포 다양성을 나타내며 전반적으로 희소방선균의 비율이 높은 것으로 생각된다. 또한 강변 토양 방선균의 분포는 계절 변화에 의해 크게 좌우되며 가을에는 항상 높은 다양성을 나타내는 것으로 생각된다.

호수 퇴적층 방선균의 분포 특성

대청호수 내 수심 10m 이상의 추동(site 1, 정체수역)과 회남(site 2, 본류수역) 지점으로부터 장마 전(1998년 5월)과 후(1998년 8월)에 각각 퇴적층 토양 시료를 채집하여 서로 다른 방선균주를 분리하고 속 동정하였으며 이를 호수 주변 초지, 호숫가, 호수내 수심이 얇은(5-10 cm) 곳의 대조구와 비교하였다.

그 결과(Table 5) 장마 전 정체수역 site 1에서는 총 50주 중 *Streptomyces* 속은 27주(54.0%)였으며 희소방선균은 23주(46.0%)였다. 이는 대조구 평균에 비해 *Streptomyces* 속은 10주(58.8%)가 많으며 희소방선균은 15.7주(215.1%)가 더 많다. 또한 본류수역 site 2에서는 총 58주 중 *Streptomyces* 속 방선균은 41주(70.7%)였으며 희소방선균은 17주(29.3%)였는데 이는 대조구 평균에 비해 *Streptomyces* 속은 24주(141.2%) 많으며 희소방선균은 9.7주(132.9%)가 더 많다. 각 수역에서 방선균의 분리 빈도를 서로 비교해 볼 때 *Streptomyces* 속은 정체수역 보다 본류수역에서 14주(51.9%) 더 많았으며 희소방선균은 반대로 본류수역 보다 정체수역에서 6주(35.3%) 더 많았다. 따라서 장마 전 호수 퇴적층에서 방선균의 속 다양성은 대조구 등의 일반 토양에 비해 평균 2.4배 정도 높으며, 또한

Streptomyces 속과 희소방선균은 각각 정체 및 본류수역에서 더 높은 속 다양성을 나타내는 것으로 판단된다.

한편, 장마 후 정체수역(수심 11 m) site 1에서는 총 45주 중 *Streptomyces* 속은 29주(64.4%)였으며 희소방선균은 16주(35.6%)였다. 이는 대조구 평균에 비해 *Streptomyces* 속은 12주(70.6%) 많으며 희소방선균은 8.7주(119.2%)가 더 많다. 또한 본류수역(수심 26 m) site 2에서는 총 48주 중 *Streptomyces* 속 방선균은 36주(75.0%)였으며 희소방선균은 12주(25.0%)였는데 이는 대조구 평균에 비해 *Streptomyces* 속은 19주(111.8%) 많으며 희소방선균은 4.7주(64.4%) 더 많다. 장마 후 각 수역에서 방선균의 분리 빈도를 서로 비교해 볼 때 *Streptomyces* 속은 정체수역 보다 본류수역에서 7주(24.1%) 더 많았으며 희소방선균은 반대로 본류수역 보다 정체수역에서 4주(33.3%) 더 많았다. 또한 각 수역에서 장마 전과 후에 분리된 방선균의 빈도를 서로 비교해 볼 때 *Streptomyces* 속은 최고 13.9%의 작은 차이를 나타내었으나 희소방선균은 두 수역 모두에서 장마 후 보다 장마 전이 평균적으로 6주(42.8%) 더 많았다.

따라서 장마 후 호수 퇴적층에서 방선균의 속 다양성은 대조구 등의 일반 토양에 비해 평균 1.9배정도 높으며 *Streptomyces* 속과 희소방선균은 각각 정체 및 본류수역에서 더 높은 속 다양성을 나타내는 것으로 판단된다. 각 수역에서 장마 전후 *Streptomyces* 속 방선균의 속 다양성은 큰 차이가 없으나 각 수역 희소방선균의 속 다양성은 장마 전에 더 높은 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합적으로 살펴볼 때 호수 퇴적층에서 분리된 *Streptomyces* 속의 빈도는 장마 전 본류수역에서 가장(41주) 높았으며 장마 전 정체수역에서는 가장(27주) 낮았는데 이는 대조구 평균 17주에 비해 각각 2.4배와 1.6배 더 높았다. 또한 호수 퇴적층 희소방선균의 분리 빈도는 장마 전 정체수역에서 가장(23주) 높았으며 장마 본류수역에서는 가장(12주) 낮았는데 이는 대조구 평균 7.3주에 비해 각각 3.2배와 1.6배 더 높았다. 따라서 호수 퇴적층은 일반 토양에 비해 *Streptomyces* 속뿐 아니라 희소방선균의 높은 분포 다양성을 나타내는 것으로 판단되며 앞으로 다양한 방선균주의 유용한 분리원으로서 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

Table 5. Genus diversity of actinomycetes isolated from sediments of Lake Daechung

Region	Sampling date	Stm	Rare actinomycetes				Total
			Mim	Noc	Oth	Subtotal	
Control	May 18, 98	17	2.3	2	3	7.3	24.3
Site 1	May 18, 98	27	3	8	12	23	50
	Aug. 24, 98	29	7	4	5	16	45
LakeSite 2	May, 18, 98	41	5	5	7	17	58
	Aug. 24, 98	36	3	1	8	12	48
Mean		33.3	4.5	4.5	8	17	50.3

Table 6. Duplicity of different actinomycetes isolated from each zones of plant roots

Plant	Root zone						Total	Root-free zone(R ₃)		
	Rhizosphere(R ₁)			Rhizoplane(R ₂)				R ₃	R ₁ *	R ₂ *
	R ₁	R ₂ *	R ₃ *	R ₂	R ₁ *	R ₃ *				
Bamboo	17	5	3	16	5	7	23	7	3	7
Chestnut	12	6	2	20	6	5	20	5	2	5
Acacia	21	3	3	19	3	2	34	4	3	2
Pine	15	3	4	12	3	3	21	5	3	3
Maple	18	5	0	16	5	2	24	3	0	2
Total	83	22	12	83	22	19	122	24	13	19

근권 방선균의 분포 특성

대나무, 밤나무, 아카시아, 소나무, 단풍나무 등 5개 수종을 대상으로 근권과 비근권(R₃)을 구분하고 근권은 다시 rhizosphere(R₁), rhizoplane(R₂)으로 세분하여 서로 다른 방선균주를 분리한 다음 속(genus) 동정하였다. 그 결과 대나무(23주), 밤나무(20주), 아카시아(34주), 소나무(21주), 단풍나무(24주)의 근권으로부터 총 122주가 분리되었으며 이들의 비근권에서는 총 24주가 분리되었다. 또한 근권의 부위별로 볼 때 R₁에서는 총 83주가 분리되었으며 이들 중 R₂ 또는 R₃에서 분리된 균주와 중복하는 수는 각각 22주와 12주였으며, R₂에서는 총 83주가 분리되었으며 이들 중 R₁ 또는 R₃에서 분리된 균주와 중복하는 수는 각각 22주와 19주였다. 따라서 근권(R₁, R₂) 토양은 비근권(R₃)에 비해 방선균의 다양성이 매우 풍부하며, 근권내에서도 세부적으로 방선균의 분포 다양성이 큰 차이가 있는 것으로 판단된다.

결론 및 전망

유용 생리활성물질의 탐색은 21세기 생물산업을 선도할 것이며 그 경쟁성 확보는 국가적으로 매우 중요할 것으로 생각된다. 따라서 해당 분야의 원천적 핵심 요건인 다양한 균주의 확보가 필수적이며 이를 위해 다양한 분리원의 지속적인 개발이 필요한 것으로 생각된다. 또한 이러한 결과들은 현재 매우 초보 단계에 있는 미생물 생태학적 지식을 혁신할 수 있는 중요한 초석이 될 것이다. 최근 저자들은 PCR법을 이용하여 미생물 균주의 중복분리 배제기술을 개발하고 있는데 생리활성물질질의 탐색 효율을 크게 높일 것으로 평가된다.

참고문헌

1. Zahner, H. 1985. The secondary metabolism of microorganisms: an inexhaustible source for new products. *Pestic. Sci.* **16**: 424-425.
 2. Porter, N. and F.M. Fox. 1993. Diversity of microbial products-discovery and application. *Pestic. Sci.* **39**: 161-

168.
 3. Goodfellow, M. and A.G. O'Donnell. 1989. Search and discovery of industrially -significant actinomycetes. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **44**: 343-383.
 4. Steele, D.B. and M.D. Stowers. 1991. Techiques for selection of industrially important microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 89-106.
 5. Horst, W. 1981. Characteristics of actinomycetes isolated from marine sediments, pp. 309-314. In K. P. Schaal and G. Pulverer (ed.), *Actinomycetes*, suppl. 11, Gustav Fisher Verlag · Stuttergart, New York.
 6. Kizuka, M., R. Enokita, K. Takahashi, and T. Okazaki. 1997. Distribution of the actinomycetes in the Republic of South Africa investigated using a newly developed isolation method. *Actinomycetol.* **11**: 54-58.
 7. Okazaki, T. 1987. Rare actinomycetes: new breed of actinomycetes. *The bimonthly J. Microorganism* **3**: 453-461.
 8. Hayakawa, M. and H. Nonomura. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* **65**: 501-509.
 9. Weinstein, M.J., G.M. Luedmann, E.M. Oden, and G.H. Wagnm. 1963. Gentamicin, a new broad-spectrum antibiotic complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1-7.
 10. Nisbet, L.J. 1982. Current strategies in the search for bioactive microbial metabolites. *J. Chemmm. Technol. Biotechnol.* **32**: 251-270.
 11. Kim, C.-J., K.-H. Lee, A. Shimazu, and I.-D. Yoo. 1994. Reisolation frequency of soil actinomycetes on multiple isolation media. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 329-331.
 12. Kim, C.-J., K.-H. Lee, A. Shimazu, O.-S. Kwon, and D.-J. Park. 1995. Isolation of rare actinomycetes on various types of soil. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 36-42.
 13. Kim, P.-K., O.-S. Kwon, C.-Y. Lim, D.-J. Park, and C.-J. Kim. 1997. Genus distribution of soil actinomycetes on different depth. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 534-536.

14. Iwai, Y. and Y. Takahashi. 1992. Selection of microbial sources of bioactive compounds, pp. 281-302. In S. Omura (ed.), *The search for bioactive compounds from microorganisms*, Springer-Verlag, New York.
15. Okami, Y. and K. Hotta. 1988. Search and discovery of new antibiotics, pp. 33-67. In M. Goodfellow (ed.), *Actinomycetes in biotechnology*, Academic Press, London.
16. Park, D.-J., S.-H. Lee, S. H. Park, and C.-J. Kim. 1998. Distributin pattern of soil actinomycetes on the seasonal change. *Kor. J. Microbiol.* **34**: 149-153.