

항생물질을 생산하는 혐기성 세균의 탐색

정은영 · 김병홍*

한국과학기술연구원 환경연구센터

Screening of Anaerobes Producing Antimicrobial Substances. Eun-Young Chung and Byung-Hong Kim*.

Environmental Research Center, Korea Institute of Science and Technology, 39-1 Hawolgok-dong, Sungpook-ku, Seoul 136-791, Korea - To develop new biologically active compounds produced by anaerobes, 677 soil samples were collected and used to isolate 1,889 anaerobic bacteria. Among the isolates 427 strains were strict anaerobes and the remaining 1,462 strains were facultative anaerobes. From 427 strictly anaerobic isolates, 88 strains showed antibacterial activities, and 21 strains were selected for the further studies.

Penicillin이 처음 발견된 이후 항생물질은 매우 유용하게 사용되어 왔으며, 특히 의약품의 고부가가치 및 시장 규모의 급성장 등의 요인에 의하여 많은 나라에서 생체활성물질을 개발하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다(1). 지금까지 생체활성물질의 개발은 주로 방선균, 곰팡이, *Bacillus*, *Pseudomonas* 등과 같은 호기성 미생물을 대상으로 이루어졌으며, 알려진 대부분의 항생물질은 *Streptomyces*를 위주로 한 방선균에서 50% 이상, 진균류에서 16~19%, *Bacillus* 속을 주로한 세균에서 10% 내외가 생산되는 것으로 보고되고 있다(2).

Woodruff(3)는 토양에 서식하는 미생물군의 약 15%가 항생물질을 생산한다고 보고하였고, Berdy(4)와 Nisbet(5)는 방선균이 생산하는 항생물질의 95%가 *Streptomyces* 속에서 유래하며, 신규 항생물질의 25%가 회귀 방선균에서 발견되었다고 보고하였다. Berdy(6)는 지금까지 밝혀진 항생물질 생산균주는 세균의 경우 20~25%, 곰팡이에서 10~15% 정도만이 탐색된 것으로 보고하였고, Hamil(7)은 토양에서 발견되는 곰팡이, 방선균, 세균의 속과 종의 수와 활성대사산물의 생산에 이용하고 있는 속의 수에 대한 검토를 통해 아직까지 토양 속에 많은 미생물이 분리 연구되지 않았다고 보고하였다.

현재 알려진 대부분의 항생물질에 대한 내성균이 출현함에 따라 신규 항생물질을 개발해야 할 필요성이 크게 대두되었다. 혐기성 대사에서 발생하는 ATP의 수율이 호기성 대사에 비해 낮기 때문에 혐기성 미생물에 의한 이차 대사 산물의 생산성이 낮을 것이라는 점과 혐기성 미생물의 분리 배양이 까다롭기 때문에 항생물질 탐색에 혐기성 미생물이 많이 연구되지 않았다. Bull 등(8)은 생체활성물질에 대한 혐기성 미생물의 탐색이 제외되었기 때문에 혐기성 미생물을 대상으로 탐색할 경우보다 새로운 생체활성물질을 발견할 수 있

는 가능성이 높다고 밝혔다.

본 연구에서는 국내 여러 지역 토양을 채취하여 항균활성을 갖는 혐기성 미생물에 대한 탐색 연구를 수행하였다. Table 1과 같이 월악산, 소백산, 속리산, 오대산, 금학산, 치악산 등지에서 퇴비, 유기물이 많은 토양, 저수지의 밀바닥, 섬과 갯벌의 토양 등 총 677점을 채집하여 혐기성 세균의 분리원으로 사용하였다. Table 2 조성의 C-SPY 또는 brain heart infusion(BHI) 배지를 세균의 분리와 배양에 사용하였고, 배지를 혐기적으로 만들기 위해 끓인 다음 50°C 정도로 식혀서 환원제로서 cysteine·HCl를 0.5 g/l로 넣고 pH를 7.2로 맞춘다. 준비된 배지는 anaerobic pressure tube(Bellico Glass Co., NJ, USA)나 serum vial(Wheaton Co., NJ, USA)에 분주하여 산소 투과성이 낮은 butyl 고무마개로 입구를 막고 aluminium cap으로 밀봉을 한 다음 멸균하였다. 모든 조작을 질소 가스를 치환하면서 진행하였다. 고체 배지를 만들기 위해서는 이들 배지에 한천을 1.5% 첨가하여 멸균한 다음 anaerobic glove box(Coy Lab Co., MI, USA) 안에서 petri dish에 평판 배지를 만들어 사용하였다.

토양 시료 약 1 g을 혐기적으로 만든 멸균수 10 ml에 넣고 교반한 다음, 10^{-2} ~ 10^{-4} 배로 희석하여 anaerobic glove box(Coy Lab Co.) 안에서 희석액 0.1 ml을 C-SPY 배지와 BHI 배지에 도말하고 35°C glove box 안에서 2~4일간 배양하여 나타난 혐기성 세균 colony를 분리하였다. 각 분리 colony를 다시 C-SPY 배지와 BHI 배지에 각각 도말하여 하나는 혐기성 조건하에, 다른 하나는 호기적 조건하에 1~2일 배양하였다. 호기적 조건과 혐기적 조건에서 모두 생육하면 통성 혐기성 균주(facultative anaerobes)로, 혐기적 조건에서만 생육하면 편성 혐기성 균주(strict anaerobes)로 분류하였다.

Table 3과 같이 그람 음성 세균으로 *Escherichia coli* KCTC 1923(AB 1157)과 다양한 종류의 항생물질에 고감수성 변이주인 *Escherichia coli* KCTC 1924(BE 1186),

*Corresponding author.

Key words: Anaerobic bacteria, antibacterial activity, strict anaerobes, facultative anaerobes

Salmonella typhimurium KCTC 1926(SL 1102)과 그람 양성 세균으로는 kanamycin, tetracyclin 등의 항생제에 대한 다제 내성 변이주인 *Staphylococcus aureus* KCTC 1928(R-209)과 *Bacillus subtilis* NIHJ-PCI 219를 검정

Table 1. Isolation of anaerobic bacteria from soils

Region	Collection	Number of anaerobes			
		Strict	Facultative	Total	
Kyunggido	Kwangreung	53	50	142	192
	Osan	5	1	9	10
	Bookhan Mt.	25	37	85	122
	Ansung	5	1	10	11
	Yongin	5	2	9	11
	Pyungtaek	102	13	20	33
	Ganghwado	22	48	198	241
	Inchon	10	9	45	54
	Kimpo	30	4	21	25
	Masong	27	16	67	83
	Sorae	8	5	22	27
	Yangpyung	11	1	20	21
	Seoul	22	1	31	32
	Munsan	8	12	61	73
Papyung	20	10	13	23	
Choongchungdo	Sintanri	58	13	61	74
	Cheonchun	31	47	120	167
	Chongju	46	25	62	87
	Danyang	32	35	99	134
	Jungsanri	13	26	78	104
Kangwondo	Sokri Mt.	6	1	16	17
	Keumhak Mt.	43	3	22	25
	Odaesan	17	22	42	64
	Chiarc Mt.	13	16	14	30
Jeonlado	Seolak Mt.	13	4	12	16
	Hongchun	18	0	15	15
	Naejang Mt.	19	11	73	84
	Jogye Mt.	9	12	87	99
	Yueosu	6	2	13	15
Total		677	427	1462	1889
			(22.6%)	(77.4%)	

균으로 사용하였다. 각각의 검정균을 5 ml Luria broth (LB) 배지(중류수 1l 중 tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g 함유)가 든 배양 시험관에 접종하여 37°C에서 14~18시간 진탕 배양하였다. 별도로 조제한 멸균된 LB 고체배지(한천 1.5% 함유)를 50°C 정도로 식힌 후 전 배양한 검정균 배양액을 660 nm에서의 흡광도 값이 0.5 정도가 되도록 접종하였다. 접종 후 배지가 굳질화되도록 잘 흔들어 준 다음 직경 87 mm petri dish에 15 ml씩 부어 수평으로 굳혀서 검정 plate로 사용하였다. 분리한 편성 혐기성 세균과 일부의 통성 혐기성 세균을 10 ml의 C-SPY 액체 배지가 들어있는 pressure tube에 한 백금이 접종하여 35°C에서 5일간 배양하였다. 배양 상등액은 주사기로 뽑아 paper disc

Table 2. Media used for the isolation of anaerobic microorganisms

Components	C-SPY	BHI
Peptone	15.0 g	
Yeast extract	10.0 g	5.0 g
Glucose	4.0 g	4.0 g
Soluble starch	1.0 g	1.0 g
Cellobiose	1.0 g	1.0 g
Maltose	1.0 g	1.0 g
K ₂ HPO ₄	5.0 g	5.0 g
NH ₄ Cl	0.5 g	0.5 g
Resazurin, 0.2%	0.4 ml	0.4 ml
Tween 80	1.0 ml	1.0 ml
Salt solution II*	1.0 ml	1.0 ml
Vitamin solution**	1.0 ml	1.0 ml
Cysteine-HCl	0.5 g	0.5 g
Brain heart infusion		37.0 g
Distilled water	to 1 liter	

*Salt solution II: nitrilotriacetic acid 1.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.1 g, MnCl₂·H₂O 0.1 g, CoCl₂·6H₂O 0.17 g, ZnCl₂ 0.1 g, CaCl₂·2H₂O 0.1 g, H₃BO₃ 0.01 g, Na₂MoO₄ 0.01 g, Na₂SeO₃ 0.017 g, NiSO₄·6H₂O 0.026 g and NaCl 1.0 g per 1 liter distilled water.

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

Table 3. Test microorganisms used to measure antimicrobial activities

Test organisms	Characteristics	Abbreviations
<i>Escherichia coli</i> AB 1157	Mother strain of BE	AB
<i>Escherichia coli</i> BE 1186	Hypersensitive mutant of AB (Lm ^s , Jm ^s , Om ^s , Em ^s)	BE
<i>Salmonella typhimurium</i> TV 119	Mother strain of SL	TV
<i>Salmonella typhimurium</i> SL 1102	Hypersensitive mutant of TV (Lm ^s , Cs ^s , Km ^s , Tm ^s)	SL
<i>Staphylococcus aureus</i> R-209	Antibiotic multiresistant of ATCC 6538P (Km ^r , Tc ^r , Cm ^r)	R-209
<i>Bacillus subtilis</i> NIHJ-PCI 21 9		BS

Table 4. Frequencies of antibacterial activities in anaerobic isolates against different test organisms

Test organisms	Number of isolates/ total active isolates (%)	
	Strict	Facul- tative
<i>Escherichia coli</i> BE 1186	28/88 (31.8)	5/40 (12.5)
<i>Salmonella typhimurium</i> SL 1102	10/88 (11.4)	11/40 (27.5)
<i>Bacillus subtilis</i> NIHJ-PCI 219	6/88 (6.8)	14/40 (35)
<i>Staphylococcus aureus</i> R-209	3/88 (3.4)	6/40 (15)

법으로 항균 활성을 측정하여 나타나는 생육저지환의 지름에 의하여 항생물질 생산 여부와 그 활성의 정도를 확인하였고, 균체는 동결건조하여 균주를 보존하였다. 시험균에 대한 항균활성을 조사하여, 항균 활성을 지니고 있는 혐기성 세균을 1차 선정 균주로 선발하였고, 항균력이 있는 균주는 다시 항균활성을 검색하여 선발된 균주의 항균성을 재확인하였다. Table 1에서 보인 바와 같이 25개 지역 677점의 토양시료로부터 분리한 1,889주의 혐기성 세균 중에서 22.6%인 427주가 편성 혐기성이었으며, 나머지 77.4%인 1,462주는 통성 혐기성으로 나타났다. 분리균 중에서 편성 혐기성 세균 전부와 colony 형태가 특이하거나 호기적 조건보다 혐기적 조건에서 생육이 왕성한 통성 혐기성 세균을 선별하여 항생균 활성을 측정하기 위해 보존하였다.

편성 혐기성 세균 427주와 1,462주의 통성 혐기성 세균 중에서 선별한 균주의 항생균 활성을 조사하여 활성이 있는 편성 혐기성 세균 88주와 통성 혐기성 세균 40주를 1차로 선발하였다. 편성 혐기성 균주인 경우 그 중 20.6%의 균주가 항생물질 생산 능력이 있는 균주임을 알 수 있었다. 이는 Woodruff(3)가 보고한 토양에서 식하는 미생물군의 15%가 항생물질을 생산한다는 연구 결과보다 높은 결과로 나타났는데, 이는 본 연구에서 항생제에 감수성이 높은 *Escherichia coli* BE 1186을 검정균으로 사용한 때문으로 생각된다. 활성이 있는 분리균 중에서 재현성 있게 활성을 나타내는 균주를 재차 검정균에 따라 분류하면 이러한 사실은 쉽게 알 수 있다(Table 4). 활성이 있는 편성 혐기성 세균 88주 중 31.8%인 28주가 *E. coli* BE 1186에 활성을 나타낸 반면 항생물질에 대한 내성이 있는 검정균인 *Staphylococcus aureus* R-209의 경우 3.4%인 3주만이 활성을 보였다. 항균 활성이 있는 통성 혐기성 세균 40주 중에서 그람 양성 세균인 *Bacillus subtilis*에 대해서 비교적 높은 빈도의 활성을 보인 것은 활성 물질의 대

Table 5. Antibacterial spectra of selected anaerobic isolates

Strain number	Test organisms				
	<i>E. coli</i> BE	<i>S. typhi-</i> <i>murium</i> SL	<i>B. su-</i> <i>btilis</i> BS	<i>E. coli</i> AB	<i>S. aureus</i> R-209
2-5	+	+			
5-22-2	++	+			
6- 4-1	+				
10- a-1	+				
19-45-2	+				
19-46-4	++	++	++	+	+
19-54-2	+	+			
19-59-3		+			
19-74-2	++	+	+		
19-77-1	++				
19-88-1	+				
19-91-2	+				
19-93-2	+		+		
19-93-3	+	+			
19-95-2	+				
20- 2-3	++	+	+		+
20-17-1	++	++	++		+
20-36-3	++		++		
20-43-1	+				
20-55-1	+				
21- 1-4	+	+			

+: positively active, ++: strongly active

부분이 bacteriocin일 가능성이 높을 것이라는 것을 알 수 있었다. 이는 bacteriocin이 생성 미생물과 가깝게 연관되는 세균 종에 대한 항 미생물성을 나타내기 때문이다.

본 연구에서 분리한 세균이 항생물질 감수성이 높은 *E. coli* BE 1186에 대해 주로 항균 활성을 보이는 것은 혐기성 대사에서 생장과 대사 산물 생산에 필요한 에너지 수율이 낮기 때문으로 생각된다. 이러한 관점에서 혐기성 세균에서 항생물질 생산 균주를 탐색하기 위해서는 항생물질에 대한 감수성이 높은 검정균을 사용하는 것이 중요하다고 판단되었다.

본 연구에서 20.6%의 편성 혐기성 세균이 항생균 활성을 갖는다는 사실을 처음으로 밝혔으며, 이러한 결과는 새로운 생리활성 물질을 찾기 위한 연구에서 혐기성 미생물을 이용하면 지금까지 알려지지 않은 신규 물질의 발견도 가능할 것으로 판단된다.

이차 검정에서 선별된 28주의 혐기성 세균 중에서 비교적 활성이 강한 분리균 21주를 선별하였다(Table 5). 이 중에서 분리균 19-46-4가 비교적 활성이 강하고 항균 spectrum이 넓었기 때문에 이 균주를 동정을 수행하고, 항균물질을 분리정제하는 일련의 실험을 수행

하고자 한다(9).

참고문헌

1. Brock, T.D. and M.T. Madigan. 1988. *Biology of Microorganisms*, 5th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. Pp. 361-379.
2. Brown, C.M. 1985. Isolation methods for microorganisms. *Compreh. Biotechnol.* **1**: 21-35.
3. Woodruff, H.B. 1980. Natural product from microorganisms. *Science* **208**: 1225-1229.
4. Berdy, J. 1974. Recent development of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Adv. Appl. Microbiol.* **18**: 309.
5. Nisbet, L.J. 1982. Current strategies in the search for bioactive microbial metabolites. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **32**: 251-270.
6. Berdy, J. 1984. New ways to obtain new antibiotics. *Chin. J. Antibiot.* **7**: 278-290.
7. Hamill, R.A. 1977. General approaches to fermentation screening. *Japanese J. Antibiot.* **30**: 164-173.
8. Bull, A.T., D.C. Ellwood and C. Ratledge. 1979. The changing scene in microbial technology. In A.T. Bull, D.C. Ellwood and C. Ratledge (eds.), *Microbial Technology: Current state, future prospects*. Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 1-28.
9. 정은영, 김명수, 이철훈, 김병홍. 1996. *Enterococcus faecium* 19-46-4에 의한 Cholic acid의 생산. 한국산업미생물학회지 **24**: 540-545.

(Received 5 September 1996)