

好酸性 放線菌과 耐中性 放線菌 (Acidophilic Actinomycetes and Neutrotolerant Actinomycetes)

柳韓洋行 中央研究所

姜 熙 日

Waksman과 Heinrich(1943)에 의해 *Streptomyces* 속이 기술되고 actinomycin, streptomycin 등의 많은 항생물질이 발견되면서 방선균(actinomycetes)은 산업적으로 중요한 미생물이 되어왔으며, 근래에는 항생물질 뿐만 아니라 효소, 효소저해제, 면역조절물질 등 소위 생리활성물질(bioactive compound)의 생산균으로서 주목을 받고 있다. 그러나 지금까지 대부분의 스크리닝이나 연구의 대상은 주로 중성 pH에서 잘 자라는 호중성 방선균(neutrophilic actinomycetes)이었지만 산성이나 알칼리성 토양, 고온, 고염, 고압 등과 같은 특수환경에서 분리된 균주나 희귀 방선균(rare actinomycetes)에 대한 관심도 점점 높아지고 있다.

산성 토양에서 분리된 방선균에 관한 연구는 Jensen(1928)의 연구로부터 시작하였지만 Lonsdale(1985)이 침엽수림, 산성탄광 등에서 분리된 방선균을 수리분류할 때까지 활발하게 이루어지지 못하였다.

본 고에서는 호산성 방선균의 분포, 생리적 특성, 수리분류학적 연구, 화학적 분류(chemotaxonomy), 산업적 응용가능성 등을 살펴보고자 한다.

1. 분 포

Jensen(1928)은 pH 3.4~4.1인 산성부식토를 시료로 acidified dextrose asparagine agar (pH 3.8~4.0)에서 방선균 4株를 분리하고 이를 *Actinomyces acidophilus* 라고 명명하면서 새로운 species-group 이라고 보고하였다.

그러나 이러한 결과에도 불구하고 방선균은 산

성에 대한 내성이 없기 때문에 중성 토양에서만 자랄 수 있다고 생각되기도 하였다(Alexander, 1977).

Williams(1971) 등은 *Pinus silvestris* 로 이루어진 토양에서 $1.1\sim 2.5\times 10^4$ CFU/g dry weight, 알칼리성 砂土위에 *Pinus nigra* subsp. *laricio* 의 落葉落枝로 덮인 토양에서 $3.0\sim 210\times 10^4$ CFU/g dry weight 의 방선균을 분리하고 형태적 특성으로 볼 때 이들은 *Streptomyces* 에 속한다고 하였다. 또 이들을 생장 pH 및 최적 생장 pH에 따라 호산성 방선균과 호중성 방선균, 또 산성 pH에 내성이 있는 것으로 나누었다.

Khan과 Williams(1975)는 낙엽낙지, 토탄(peat), spodzoi, 석탄광 폐기물, 납광산 폐기물 등에서 $1\sim 6,000\times 10^3$ CFU/g dry weight 의 호산성 방선균을 분리하였으며, Goodfellow와 Dawson(1978)은 *Picea sitchensis* 로 이루어진 영국의 Hamsterley 숲에서 $5.8\sim 200\times 10^3$ CFU/g dry weight 의 호산성 방선균을, Lonsdale(1985)은 Hamsterley 숲, 산성 탄광폐기물에서 비슷한 수의 방선균을 분리하였다고 보고하였다. 그러나 Lonsdale은 최적 pH가 6.0이면서 pH 4.5~7.0에서도 자랄 수 있는 것을 내중성 방선균(neutrotolerant actinomycetes)이라고 하였다.

Kang(1989)에 의하면 산성 토양에서의 호산성, 호중성, 호염기성 방선균의 분포는 호산성 방선균, 호중성 방선균, 호염기성 방선균의 순서였으며 특히 호염기성 방선균은 다른 방선균에 비해 그 수가 현저히 적었다(Table 1). 이것은 총체적인 토양의 pH가 산성일지라도 fungi 등에 의한 ammonification으로 pH가 알칼리인 microsite

Table 1. Distribution of acidophilic, neutrophilic and alkaliphilic actinomycetes in acidic Hamsterley soil

Soil horizon	pH	Actinomycetes ($\times 10^3/g$ dry weight)		
		Acidophilic ^a	Neutrophilic ^b	Alkaliphilic ^c
L	4.1	27.32 \pm 18.67	19.70 \pm 13.74	4.58 \pm 0.87
F	4.0	485.20 \pm 72.78	349.85 \pm 27.37	17.59 \pm 13.87
H	3.5	326.19 \pm 88.67	280.83 \pm 22.55	87.91 \pm 10.31
A ₁	3.6	35.91 \pm 14.46	22.99 \pm 5.53	17.71 \pm 12.31
A ₂	3.5	18.17 \pm 7.69	11.06 \pm 0.56	3.66 \pm 2.48

a; Starch-casein agar medium (pH 4.5) + actidione (50 μ g/ml) + nysatin (50 μ g/ml)

b; Starch-casein agar medium (pH 7.2) + actidione (50 μ g/ml) + nysatin (50 μ g/ml)

c; Starch-casein agar medium (pH 10.0) + actidione (50 μ g/ml) + nysatin (50 μ g/ml)

가 생기게 되며 이 microhabitat에 호중성 혹은 호염기성 방선균이 활성이 유지되는 포자의 형태로 자랄 수 있다는 주장을 뒷받침하고 있다 (Flowers and Williams, 1977).

국내의 연구로는 pH 5.3인 토양에서 약 60여종의 방선균을 분리하였다고 한 Kim(1987)의 보고가 있다.

2. 생리적 특징

호산성 방선균은 탄소원, 질소원 이용 및 포자나 균사체의 viability가 호중성 방선균과는 상이한 점이 많다는 것이 보고되었다.

Khan과 Williams(1975)의 결과에 의하면 호산성 방선균은 xylan, salicin, fucoidan과 같은 탄소원을 이용할 수 있지만 NaCl(3%, w/v)에 대한 내성은 호중성 방선균에 비해 떨어지며, 질산환원능과 H₂S 생성이 거의 없었다. 또한 glucose와 ammonium sulphate를 호산성 방선균이 잘 이용하는데 비해 호중성 방선균은 sodium citrate 이외의 탄소원을 또 질소원으로는 amino 질소를 선호한다는 것이 보고되었다 (Flowers and Williams, 1977). 이들은 또 pH가 방선균 생존(survival)과 생장에 미치는 영향을 specific growth rate로 조사한 결과 호산성 방선균의 균사체는 pH 3.0~3.5 뿐만 아니라 pH 8.0 이상에서도 viability를 유지하였지만 호중성 방선균은 낮은 pH에 매우 민감하여 pH 5.0 이하에서는 viability가 급히 감소하는 것을 관찰하였

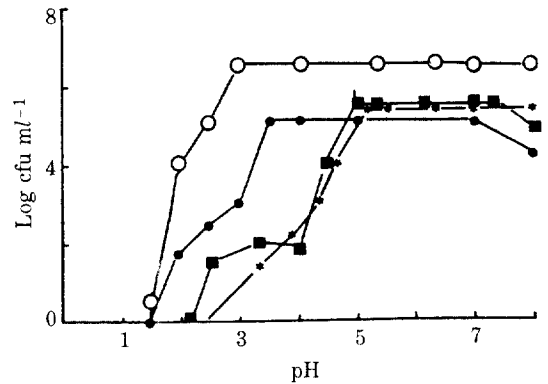


Fig. 1. The effect of pH on the viability of mycelium of acidophilic *Streptomyces* MR 12(○-○), SW 1(●-●) and neutrophilic *Streptomyces* F13(■-■) and F6(●-●)

다 (Fig. 1).

Williams와 Flowers(1978)는 starch가 방선균에 의해 분해될 때 pH가 미치는 영향을 amylase의 activity로 조사한 결과 호중성 방선균의 amylase는 pH 5.0 이하에서는 전혀 활성이 없었지만 호산성 방선균의 amylase는 최적 pH가 4.0~5.0이면서 pH 2.5~3.0에서도 활성을 유지할 수 있다는 것을 밝혔다.

위에서 살펴본 바와 같이 호산성 방선균이 호중성 방선균과 생리적 특성이 차이가 난다는 것이 몇몇 연구에서 보고되었지만 다른 세균에 비해 많이 연구되지 못했다.

따라서 이러한 분야에 대한 연구에도 많은 관심이 기울여 지리라 생각된다.

Table 2. Numerical taxonomic studies including acidophilic actinomycetes

Taxa	Number of		Statistics used	S-level	Clusters	Reference
	strains	characters				
1. Acidophilic streptomycetes neutrophilic streptomycetes	14 6	128 ^a	Ssm, single linkage	85%	1 (acidophiles) 1 (neutrophiles)	Khan and Williams (1975)
2. Acidophilic actinomycetes Neutrophilic streptomycetes and related strains	8 467	139 ^b	Ssm and S _J , UPGMA	77.5%	2 (acidophiles) 71 (streptomycetes, related strains)	Williams <i>et al.</i> (1983 a)
3. Acidophilic and neutrotolerant actinomycetes	194	150 ^c	Ssm, S _J , Dp, UPGMA	86%	11 major (<5 strains), 20 minor (2 to 4 strains) 20 SMC	Lonsdale (1985)

a; Tests performed at pH 4.5 and 7.0 for acidophilic and neutrophilic streptomycetes, respectively.

b; Tests performed at pH 5.5 and 7.0 for acidophilic and neutrophilic streptomycetes, respectively.

c; Tests performed at pH 4.5

3. 수리분류학적 연구

한 가지 특성이나 몇 종류의 특성에 기준을 둔 單元的 分類(monothetic classification)는 정보량이 적고 돌연변이나 시험오차에 의한 균주변화(strain variation)를 쉽게 수용(accommodation)하지 못하므로 좋은 분류방법이 될 수 없다(Sneath, 1962). 이에 비해 많은 균주들을 동등한 중요도(weight)를 갖는 여러 특성에 대해 조사하여 유사성(similarity)을 서로 비교하는 수리분류(numerical taxonomy)는 多元的(polythetic)이며 안정성(stability)을 갖고 있다. 따라서 수리분류는 화학적 분류와 함께 세균의 분류학적 위치나 계통(phylogeny)을 연구하는데 좋은 방법이 되고 있다.

Silvestri 등(1962)의 genus *Streptomyces*에 관한 수리분석 결과 *Streptomyces*는 너무 무분별하게 많은 種으로 나누어져 있어 소위 over-specification 현상을 나타내고 있는 것이 밝혀졌다(Gyllenberg 등, 1967; Kurylowicz 등, 1975; Szulga, 1978; Konev and Nitniskii, 1980; Williams 등, 1983a). 특히 Williams 등(1983b)은 수리분류에서 얻어진 데이터를 DIA-CHAR, CHARSEP 컴퓨터 프로그램으로 분석하여 동정(同定)에 사용할 수 있는 확률동정행렬(probabilistic identification matrix)을 발표하

였는데 이러한 분류동정방법은 최근 발간된 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 4)에서 인용되고 있다. 호산성 방선균이 포함된 방선균의 수리분류 연구에는 Table 2와 같다.

Khan과 Williams(1975), Williams 등(1983 a)은 호산성 방선균의 형질분석은 산성 pH, 호중성 방선균의 형질분석은 중성 pH에서 실시하여 이들 두 그룹은 서로 독립된 군집이라고 하였다. 그러나 수리분류를 할 때는 대상이 되는 모든 균주를 동일한 조건에서 비교해야 되기 때문에 최적 생장 pH가 틀린 호산성 방선균과 호중성 방선균을 동시에 비교하는 것은 문제가 있다. 또 Lonsdale(1985)은 호산성 방선균과 내중성 방선균을 대상으로 수리분류를 하였지만 호산성 방선균이 분류학적으로 어떤 위치에 있으냐를 밝히지는 못하였다.

Kang(1989)은 호산성 방선균과 호중성 방선균의 관계를 알아보기 위해 45株의 내중성 방선균을 Langham(1987)의 *Streptomyces* 주군집(major cluster)과 부군집(minor cluster) 동정에 필요한 단위 형질분석 결과를 TAXON 프로그램(A. Ward, personal communication)으로 처리하여 computer-assisted numerical identification을 하였다(Table 3). 이 중 Willcox probability가 0.85 이상인 것이 80%에 달하는 37株로 이 중 *Streptomyces diastaticus*로 동정된 것이 25주였

Table 3. Summary of the identification of neutrotolerant streptomycetes using the TAXON and probabilistic identification matrix of *Streptomyces* major cluster

Identification state	Cluster Identification	Number of isolates placed in cluster	Willcox probability			
			0.995 - 0.999	0.990 - 0.994	0.850 - 0.989	< 0.85
Identification	<i>S. diastaticus</i>	23	10	1	12	
	<i>S. cyaneus</i>	1			1	
	<i>S. chromofuscus</i>	1			1	
	<i>S. albidoflavus</i>	1			1	
Intermediate (neighborhood)	<i>S. microflavus</i>	2			2	
	<i>S. chromofuscus</i>	2			2	
	<i>S. halstedii</i>	3			3	
	<i>S. exofoliatus</i>	1	1			
	<i>S. phaeochromogenes</i>	3		1	2	
Outlier		8				8
		45	11	2	24	8

다. 또 주군집 동정행렬로 동정되지 않는 것도 *Streptomyces xanthochromogenes* 등의 부군집에 속하는 균주로 동정할 수 있었다.

이 결과로 볼 때 호산성 방선균은 호중성 방선균과 계통적으로나 분류학적으로 크게 차이가 나는 독립된 그룹이 아니라, 호중성 방선균이 산성조건에 적응하거나 변화함으로써 생긴 variant 라는 것을 알 수 있었다. 또 다른 결론은 Lonsdale (1985)의 수리분류에서 독립된 군집에 속하거나 single member cluster에 속하는 내중성 방선균이 모두 *Streptomyces diastaticus*로 동정되는 것으로 보아 *Streptomyces diastaticus*는 군집 자체가 밀집되어 있지 못하거나(loose) 균질성(homogeneity)이 떨어지는 cluster로 under-classification 되었다는 것이다. 이러한 결과는 다른 군집과의 중첩도(overlap), 낮은 HMO (Hypothetical Median Organism) 동정 스코어 등 다른 연구결과에서도 암시되었던 것이다 (Williams 등, 1983a; Langham, 1987).

4. 화학적 분류

Chemotaxonomy 혹은 chemosystematics라

고 불리는 화학적 분류법은 whole cell이나 세포 분획물을 화학적으로 분석하여 얻은 정보를 분류, 동정 및 진화의 흐름을 밝히는데 사용하는 것이다. 특히 세포벽의 sugar와 아미노산 분석결과를 actinomycetes systematics를 재평가하는 계기를 마련하였을 뿐 아니라 (Schleifer, 1985), 최근에는 지방산(fatty acid), isoprenoid quinone 및 polar lipid 분석에서 얻어진 chemical marker들이 actinomycete genera의 diagnosis 및 definition을 명확하게 하기 위한 보조자료로 쓰이고 있다. 또한 G+C 함량, DNA:DNA 재결합, rRNA:DNA 재결합, 16s rRNA 혹은 5s rRNA와 같은 핵산분석 데이터들도 분류 뿐만 아니라 진화관계를 밝히는데 중요한 자료를 제공하고 있다 (Stackerbrandt and Woese, 1981; Fox and Stackerbrandt, 1987).

Lonsdale (1985)은 호산성 방선균 중 major cluster에 속하는 60株를 대상으로 지방산, menaquinone, polar lipid를 분석하고 centrotypic의 GC 함량을 구한 결과 수리분류에 의한 군집들이 화학적으로도 구분될 수 있음을 보여주었으며, Simpson (1987)은 Lonsdale (1985)의 minor cluster와 single member cluster에

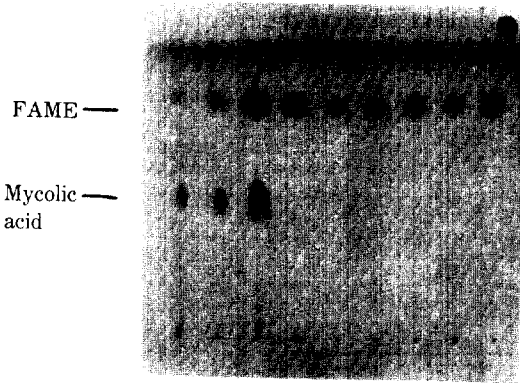


Fig. 2. Analytical TLC for the extraction of fatty acid methyl ester (FAME). Tracks from left to right: Group A (KHS28, KHS14, KHS51), Group B (KHS61, KHC5, KHC7, KHC9, KHC10) and standard

속하는 방선균들의 화학적 특성을 조사하였다.

Kang(1989)은 氣菌絲(aerial mycelium) 유무, 基層菌絲(substrate mycelium)의 색, pH 요구성 등이 상이한 두 그룹의 호산성 방선균을 대상으로 세포벽의 diaminopimelic acid(DAP) 및 fatty acid를 분석하였다. 시험대상인 23주의 호산성 방선균 중 포자체의 색이 흰색이며 기층균사가 크림색인 그룹(Group A)은 모두 meso-DAP를 갖고 있는 반면에, 氣菌絲가 없으면서 콜로니가 자주색을 띠는 그룹(Group B)은 모두 OH-DAP와 meso-DAP를 동시에 갖고 있어 이들이 LL-DAP를 갖고 있는 *Streptomyces*와는 화학적으로 구분됨을 알 수 있었다. 또 fatty acid의 추출과정인 analytical TLC(Fig. 2)에서도 Group A는 fatty acid methyl ester(FAME) spot 이외에 Rf 치가 0.2~0.3 더 작은 또다른 spot(mycolic acid)가 있어 nocardiform으로 추정할 수 있는 반면, Group B는 FAME spot만을 나타내어 이들 두 그룹은 세포벽의 DAP 뿐만 아니라 fatty acid의 profile도 뚜렷한 차이가 있다는 것을 알 수 있었다.

내중성 방선균을 산성(pH 4.5)과 중성(pH 7.0) 두 배지에서 배양한 뒤 이들 세포의 지방산 조성을 분석한 결과 배양온도나 배지조성만큼 큰 영향을 받지 않는 않지만 일부 지방산의 양적인 변화가 있었다(Kang 1989).

5. 산업적 응용

항생물질, 효소, 효소저해제 등의 생리활성물질 생산균으로 지금까지 많은 연구가 이루어진 방선균은 주로 우리가 자주 접할 수 있는 일반적인 생태계에서 많이 분리되었다. 그러나 본 고에서 살펴본 바와 같이 호산성 방선균과 내중성 방선균은 그 자체에 대한 연구역사가 그다지 길지 않기 때문에 산업적 응용을 위한 연구 또한 많이 이루어지지 않은 것으로 생각된다.

그러나 산성 토양에서 분리된 방선균의 항균력에 관한 연구결과, acidoduric streptomyces가 neutrophilic streptomyces보다 Gram-negative에 더 강한 항균력을 갖고 있다는 보고가 있다(Nkanga and Hagedorn, 1978). 또 산성 토양에서 많이 분리되고 있는 fungi와의 관계를 고려할 때 호산성 방선균으로부터 새로운 혹은 활성이 강한 antifungal agent를 얻을 가능성도 무시할 수 없으리라 생각되며, 유럽의 식품회사와 일부 제약회사에서는 호산성, 내중성 방선균에서 산에 안정한 단백분해 효소나 항생물질 등을 얻으려는 노력이 진행되고 있다고 한다.

참고문헌

- Alexander, M. 1977. Introduction to Soil Microbiology, 2nd ed. Wiley; New York.
- Flowers, T.H. and S.T. Williams. 1977. *Microbiosis* 18, 223-228.
- Fox, G.E. and E. Stackerbrandt, 1987. In "Methods in Microbiology" Vol. 19, pp.405-418, Academic Press; London.
- Goodfellow, M. and D. Dawson. 1987. *Soil Biol. Biochem.* 10, 303-307.
- Gyllenberg, H.G., W. Woznicka and W. Kurylowicz. 1967. *Anales Academiae Scientiarum Fennicae Series, A. IV. Biologica* 114, 3-15.
- Hagedorn, C. 1976. *Appl. Env. Microbiol.* 32, 368-375.
- Jensen, H.L. 1928. *Soil Sciences*, 25, 225-236.
- Kang, H.I. 1989. Taxonomic study of

- acidophilic and neutrotolerant actinomycetes. Ph.D. Thesis. Seoul National University.
9. Khan, M.R. and S.T. Williams. 1975. *Soil Biol. Biochem.* **7**, 345-348.
 10. Kim, J.H. and D.H. Song. 1987. *Kor. J. Microbiol.* **25**, 238-243.
 11. Konev, Yu.E. and A.B. Mitnishikii. 1980. *Microbiology*, **49**, 110-116.
 12. Kurylowicz, W.A., A. Paszjiewicz, W. Woznicka, W. Kurzatkwski and T. Szulga. 1975. In "Numerical taxonomy of *Streptomyces*" pp.8-81. Polish Medical Publisher; Warsaw.
 13. Langham, C.D. 1987. Ph.D. Thesis. University of Liverpool.
 14. Lonsdale, J.T. 1985. Ph.D. Thesis. University of Newcastle upon Tyne.
 15. Nkanga, E.-J. and C. Hagedorn. 1978. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**, 51-59.
 16. Schleier, K.H. 1985. In "Methods in Microbiology" Vol. 18. pp.123-156. Academic Press; London.
 17. Siverstri, L.G., M. Turii, L.R. Hill and E. Gilaridi. 1962. In "Microbial classification" Ed. G.C. Ainsworth and P.H.A. Sneath, pp.333-360. Cambridge Univ. Press; Cambridge.
 18. Simpson, K.E. 1987. Ph.D. Thesis. University of Newcastle upon Tyne.
 19. Sneath, P.H.A. 1962. Symposia of the Society for General Microbiology. **12**, 289-297.
 20. Stackerbrandt, E. and C.R. Woese. 1981. *Current Microbiol.* **5**, 197-201.
 21. Szulga, T. 1981. *Zentrabl. Bacteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. I. Abt. Suppl.* **6**, 31-42.
 22. Waksman, S.A. and A.T. Heinrich. 1943. *J. Bact.* **46**, 337-341.
 23. Williams, S.T. and T.H. Flowers. 1978. *Microbiosis*, **20**, 99-106.
 24. Williams, S.T. and C.S. Robinson. 1981. *J. Gen. Microbiol.* **127**, 55-63.
 25. Williams, S.T. and F.L. Davies, C.I. Mayfield and M.R. Khan. 1971. *Soil Biol. Biochem.* **3**, 187-195.
 26. Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Alderson, E.M.H. Wellington, P.H.A. Sneath and M. Sackin. 1983a. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1743-1813.
 27. Williams, S.T., M. Goodfellow, E.M.H. Wellington, J.C. Vickers, G. Alderson, P.H.A. Sneath, M. Sackin and M. Mortier. 1983b. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1815-1830.