

생리활성물질을 생성하는 해양미생물의 동정

I. 항미생물 물질을 생산하는 해양방선균 분리균주 No. 101의 분리 및 배양조건

최종덕 · 박옥연*

통영수산전문대학 수산가공과 · *부산수산대학교 식품공학과

Identification of the Marine Microorganisms Producing Bioactives

I. Isolation and Cultural Conditions of the Marine *Actinomycetes* No. 101 Producing Antimicrobial compounds

Jong-Duck CHOI and Uk-Yeon PARK

Department of Marine Food Science and Technology Tong-Yeong Fisheries College, ChungMu 650-160, Korea

*Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

Marine organisms were investigated to identify the marine *actinomycetes* that produced noble bioactive compounds. Microorganism counts range from 2.1×10^3 to 1.2×10^4 CFU/g of marine organisms. *Actinomycetes* constituted 0.01 to 0.5% of culturable microbial community. We identified the marine *actinomycetes* that produced novel bioactive compounds.

During the course of screening for bioactives from the marine microorganisms, we found that the strain in sponge had antimicrobial activities. From the morphological, cultural and various physiological characteristics, this strain was identified for *Actinomycetes* No. 101. The optimal compositions of culture medium for *Actinomycetes* No. 101 were starch 30g/l as carbon source, casamino acid 10g/l as nitrogen source. The optimal pH of medium and fermentation temperature were 6.5~7.0 and 30°C, respectively.

Fermentation has been conducted in the marine broth at 30°C for 72 hour. The yield of fermentation got about 3g as dry weight(per liter of broth).

The distribution of antimicrobial activity of *Actinomycetes* No. 101 was screened by paper disc. The extract of cultured cell and broth inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, but the inhibition action was week against yeast and mold.

서 론

방선균은 육상의 토양에 풍부하게 존재하며 상업적으로 부가가치가 높은 생리활성물질의 공급과 새로운 생리활성물질의 공급원으로서 검토되고 있

다. 그런데 육상미생물에 관련된 방선균에 대한 연구는 많으나, 생리활성물질을 생산하는 해양미생물에 대한 연구는 부족한 실정이다. 해양미생물과 관련된 연구에서 미생물의 분포와 분리에는 Weyland (1969, 1981)가 해양 저질 중에 방선균의 분포,

Walker와 Cowell(1975)이 해양 방선균의 분리와 측정에 미치는 영향요소, Pisano 등(1986, 1989)은 해양 저질로부터 생리활성물질을 생산하는 방선균의 분리, Jensen 등(1991)은 연근해 저질 중의 방선균의 분포, Takizawa 등(1993)은 Chesapeake만에서 방선균의 분리와 다양성에 대하여 보고한 바 있다. 새로운 항생물질의 탐색과 발견에서는 Okami 등(1976, 1979, 1991)이 천해수로부터 분리된 방선균 1주가 항생물질을, SS-939균주가 아미노배당체 istamycin B 항생물질을, Nakamura 등(1979)은 SS-20 균주가 aplasmomycin을, Kameyama 등(1987)은 SB-1123 균주가 bisucaberin을, Takahashi 등(1989)은 SA-1758 균주가 altemicidin을, Aoyagi 등(1990)은 활성물질 probestin을 생산하였다고 보고하였다. 그 밖에 Okami와 Hotta(1988), Nolan과 Cross(1988)가 많은 항생물질이 방선균으로부터 공급되고, 의학적으로 중요한 물질들이 방선균으로부터 분리되고 있다고 보고하였다.

해양미생물은 육상미생물과 여러가지 면에서 생육환경이 다르며 이들이 가지고 있는 화학성분들도 특이한 구조와 독특한 생리활성을 나타내는 것이 많아 이들의 이용이 기대된다. 그러나 국내에서는 생리활성물질을 생산하는 해양미생물의 연구가 미약하여 이에 대한 연구가 요구되고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 생리활성물질을 생산하는 방선균을 해면(sponge)에서 분리하고, 분리된 균의 배양 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

사용배지 및 시약

해양 방선균 분리용 배지는 Actinomycetes isolation agar 배지를, 선별 분리주의 동정을 위해서는 ISP 배지 및 Bennet's agar 배지(Difco제)를, 보존 배지로는 Nutrient agar에 2% NaCl을 가한 배지를 사용하였다.

방선균의 분리 및 동정

방선균의 분리는 멸균 생리식염수 90ml에 해양에서 채취한 해면 10g을 넣고 30분간 교반한 다음 멸균 생리식염수로 10^{-2} ~ 10^{-3} 배로 희석하여 0.1 ml를 Actinomycetes isolation agar 배지에 도말한 후 30℃에서 5~7일간 배양하여 나타는 집락을 순수 분리하였다. 활성균의 동정은 paper disc법을 이용하였다.

방선균의 배양

동정된 균의 종균배양은 먼저 Marine agar 사면 배지에 방선균 분리균주의 포자를 충분히 형성시킨 후 멸균 생리식염수 10ml를 가하여 포자현탁액을 만들었다. 이 현탁액을 Marine broth 2216 배지(Difco제) 100ml를 분주한 300ml 삼각 플라스크에 3ml씩 넣어 30℃에서 150 rpm으로 3일간 진탕배양하였다. 본 배양은 3% 종균 배양액을 접종하여 배양온도는 30℃, 초기 pH는 6.8, 진탕속도는 150 rpm에서 3일간 배양한 후, 균체와 배양액을 분리하여 균체는 동결 건조하고, 배양액은 농축한 후에 냉장고에 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

분리균주의 배양학적 특성조사

분리균주는 pH, 온도 및 NaCl의 농도에 따른 적정 조건을 조사하였다. 배양학적 특성 조사는 분리균을 2% NaCl이 함유된 Modified Bennet's agar 및 Czapek solution agar, ISP 1, ISP 2, ISP 6 등의 배지(Difco제)에 각각 도말한 다음, 30℃에서 배양하면서 균의 생육정도, 기균사의 색깔, 배면 색깔 등을 관찰하였다.

형태학적 특성관찰

분리균주를 Bennet's agar 배지에 도말하여 30℃에서 7일간 배양하여 생긴 집락을 광학현미경으로 관찰하였다.

생리학적 특성조사

분리균주의 전분 분해력과 gelatin액화능, 당이용성 및 멜라닌 색소의 생성은 Harrigan과 McCance(1976)의 방법에 따랐다.

영양원에 따른 특성조사

분리균주의 최적 배지조성을 확인하기 위하여 Basal mineral medium(Difco사)에 yeast extract, casamino acid 등의 질소원과 dextrose, sucrose 등의 탄소원을 일정한 농도로 가한 배지에 종균 배양액이 배지의 약 3%가 되도록 접종하여 30℃에서 150 rpm으로 7일간 진탕배양한 후 건조 균체량을 측정하였다. 건조 균체량은 배양액을 TOYO filter paper(No. 2)로 여과한 후 105℃에서 건조하여 건조 무게로 나타내었다.

분리주의 항균 및 항진균 활성검사

항균 및 항진균 활성검사는 Nutrient Agar(NA)와 YM agar, Potato Dextrose Agar(PDA)를 121℃

에서 15분간 멸균한 후 45℃로 냉각시킨 다음 세균은 NA 배지, 효모는 YM agar에 각각 검색 균주 배양액 2~3백급이를 첨가하여 혼합한 후, petri dish에 20ml씩 부어 굳혔고, 곰팡이는 PDA 배지를 굳힌 후 포자를 떨어뜨려 활성배지로 사용하였다. 한천이 굳은 후 충분히 말려서 paper disc(지름 8 mm TOYO No. 2)에 균체 및 균배양액 추출물을 각각 50 μl를 loading하여 30℃에서 배양하면서 plate상에서 생육 촉진환이나 억제환을 검사하였다.

결과 및 고찰

방선균의 분리

해양방선균은 충무지역 일대에서 채취한 해면(sponge)에 분리용 배지를 사용하여 방선균을 분리하였다. 분리된 방선균들은 항균물질 생산물질 배지에 접종하여 7일간 배양한 후 동량의 아세톤을 가하여 추출하고 원심분리하여 상등액에서 아세톤을 제거한 후 디크로로메탄, 부탄올 및 물층으로 나누어서 항균 및 항곰팡이성 활성을 조사하였다. 이렇게 하여 강한 항균 및 항진균성을 나타내는 분리균주 No. 101을 해면(Sponge)에서 최종 분리하였다.

배양학적 특성

분리된 방선균 No. 101 균주의 pH, 온도 및 NaCl의 농도에 따른 균체증식도는 Fig. 1, Fig. 2 및 Fig. 3에 각각 나타내었다. 균주의 증식최적온도는 약 30℃ 부근이었고, pH는 6.5~7.0에서 최적조건을, NaCl은 2~3%에서 가장 높은 증식도를 나타내고 있었다.

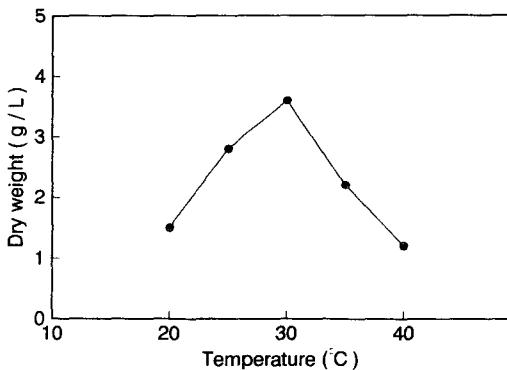


Fig. 1. The effect of temperature on the growth of *Actinomycetes* No. 101.

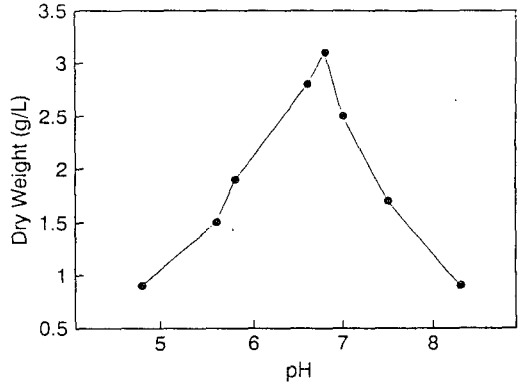


Fig. 2. The effect of pH on the growth of *Actinomycetes* No. 101.

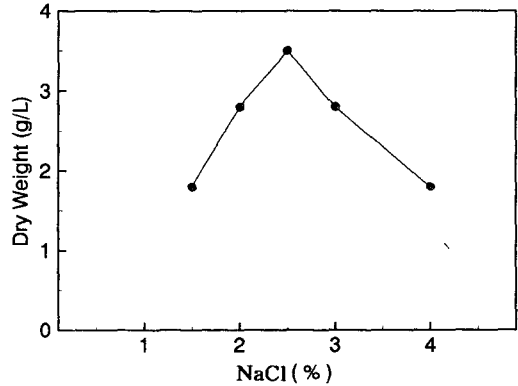


Fig. 3. The effect of NaCl on the growth of *Actinomycetes* No. 101.

분리주를 Modified Bennet's agar, Czapek solution agar, ISP 1, ISP 2, ISP 6 등의 배지에 배양하면서 생육정도, 기균사의 색깔 등의 배양학적 특성을 관찰하여 Table 1에 나타내었다. 실험에 사용된 모든 배지에서는 분리균주의 생육이 가능하였으며, 기균사의 색깔은 대부분 회백색이었고, 배면의 색깔은 주로 회백색에서부터 갈색을 나타내었다.

형태학적 특성

Modified Bennet's agar 배지에서 7일간 배양한 분리균주 No. 101의 균사체를 광학현미경으로 관찰한 결과는 사진 1과 같다. 광학현미경 상에서 나타난 분리주의 형태는 전반적으로 sclerotia 형태를 하고 있으며, 이들 sclerotia의 크기나 형태도 아주 다양하였다.

Table 1. Cultural characteristics of the isolated strain on various agar media

Media	Growth	Aerial mycelium color	Reverse color
Modified Bennet's agar	+	Whitish gray	Gray
Czapek solution agar	+	Whitish gray	Whitish gray
Tryptone-yeast extract agar(ISP1)	+	Whitish	Brown
Yeast extract-malt extract agar(ISP2)	+	Whitish gray	Dark brown
Peptone-yeast extract iron agar(ISP6)	+	Whitish gray	Dark brown
Potato-dextrose agar	+	Whitish gray	Light brown

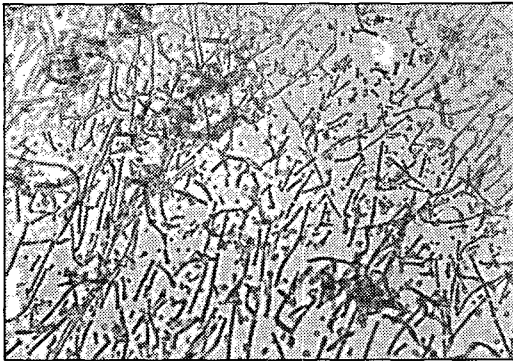


Photo. 1. Morphology of *Actinomycetes* No. 101. (×1500)

생리학적 특성

분리균주 No. 101의 생리학적 특성은 Table 2와 같다. 젤라틴 액화능과 전분분해능은 양성반응으로 나타났으며, 당 이용성의 경우에 myo-Inositol은 이용하지 못했으나, 나머지 arabinose, xylose, fructose 등은 이용하는 것으로 나타났다. Ahn 등(1992)이 토양에서 분리한 방선균 No. 497과는 색소생성과 당 이용성에서 다소의 차이가 있었다.

탄소원에 따른 균의 생육정도

탄소원의 종류와 농도에 따른 분리균주 No. 101의 생육정도를 측정하기 위하여 starch, maltose, sucrose, glucose를 기초배지에 각각 1~5%가 되게 가한 다음 진탕배양한 결과는 Fig. 4와 같다. 본 실험에서 sucrose의 이용은 다소 저조하였으나, dextrose 및 maltose의 경우에는 다소 높은 이용성을 나타내었다. 실험에 사용된 탄소원 중에서 3% starch를 첨가한 배지에서 높은 증식도를 나타내었다. 따라서 분리균주 No. 101의 탄소원으로는 3% starch가 가장 적합하다고 생각되었다.

Table 2. Physiological characteristics of the isolated strain

Characteristics	Strain No. 101	No. 497*
Aerial mycelium morphology	Rectus	-
Color of aerial mycelium	Whitish gray	Yellow gray
Pigmentation of substrate mycelium	Dark brown	Yellow
Melanin pigment production	+	-
Hydrolysis of starch	+	+
Liquefaction of gelatin	+	+
Carbon utilization of		
L-Arabinose	+	-
D-Xylose	+	+
D-Glucose	+	+
D-Fructose	+	+
Sucrose	+	-
L-Rhamnose	+	-
Raffinose	+	-
myo-Inositol	-	-
Mannitol	+	+

* Ahn *et al.*(1991)

질소원에 따른 균의 생육정도

질소원의 종류와 농도에 따른 분리균주 No. 101의 생육정도를 측정하기 위하여 기초배지에 yeast extract, malt extract, tryptone, casitone, peptone, casamino acid, ammonium sulfate 등의 질소원을 각각 0.5~4%가 되게 가한 다음 진탕 배양한 결과는 Fig. 5와 같다. Malt extract 및 ammonium sulfate의 경우는 생육이 저조하였으나, tryptone, peptone, yeast extract의 경우는 농도가 증가할수록 건조균체량도 증가하였다. 실험에 사용된 질소원 중

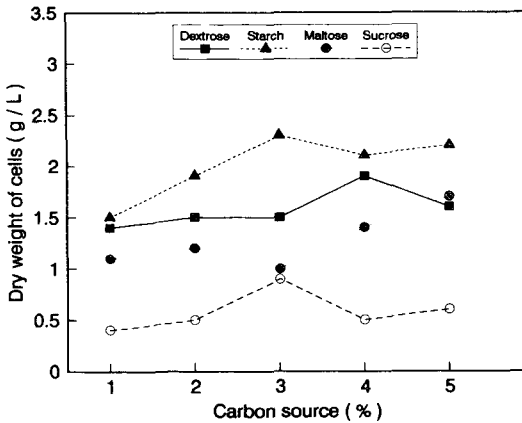


Fig. 4. The effect of carbon source on the growth of *Actinomycetes* No. 101.

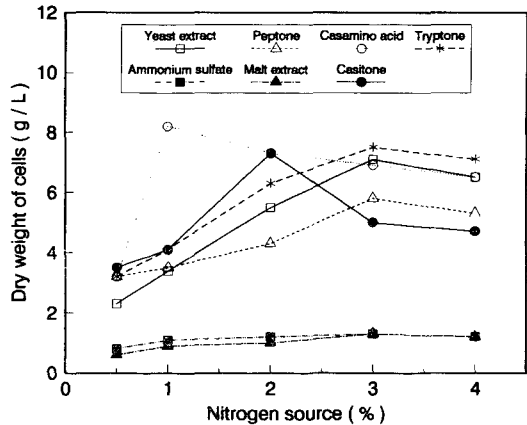


Fig. 5. The effect of nitrogen source on the growth of *Actinomycetes* No. 101.

1%의 casamino acid를 첨가한 경우에 건조균체량이 가장 많았다. 따라서 분리균주 No. 101의 질소 원료로서는 1% casamino acid가 적합하다고 판단되었다.

항균 및 항진균 활성

No. 101 배양 균체와 균 배양액에서 추출한 용액을 paper disc($\phi 8mm$)에 적신 다음 최소 검정배

지에 놓고, 각종 시험균에 대한 발육저지환을 측정 한 결과는 Table 3과 같다. 용매별 항균성은 BuOH fraction에서 배양액 추출물이 균체추출물보다 최소 배지에서 항균성이 높았다. 균 배양액 추출물에서 균종별 항균성은 *Staphylococcus*속과 *Bacillus*속에서 강한 항균성을 나타내었으나, 효모 및 곰팡이에서 는 약하거나 항균성을 나타내지 않았다.

Table 3. Distribution on antimicrobial activity of each fraction extracted from *Actinomycetes* No. 101 screened by paper disc plate($\phi 8mm$) method.

Microorganisms	Cultured cell			Cultured broth		
	CH ₂ Cl ₂	BuOH	H ₂ O	CH ₂ Cl ₂	BuOH	H ₂ O
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	-	++	++	-
<i>Bacillus subtilis</i>	++	++	-	++	++	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-	-	+	-
<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	+	+	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	+	+	-
<i>Pichia pastoris</i>	-	-	-	+	+	-
<i>Saccharomyces diastaticus</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	+	-	-	+	-
<i>Mucor. sp.</i>	-	+	-	-	+	-

* Diameter of clear zone formed around the colony

-: not formed, +: below 10mm, ++: 11~20mm, +++: 21~30mm

요 약

본 연구에서는 생리활성물질을 생성하는 해양미

생물을 분리하기 위하여 연근해역의 해면을 조사 하였다. 해면 중의 미생물은 $1.2 \times 10^6 \sim 2.1 \times 10^8/g$ 범 위에 있었고, 이들 중 방선균은 0.01~0.5% (data

생략)로 나타났다.

분리된 미생물은 각각 배양하여 항균물질을 검토했으며, 검토하던 중에 비교적 강한 항균물질을 생산하는 균주 No. 101을 분리, 선발하였다.

선발된 균의 특징은 sclerotia로 형태가 다양하였고, 다양한 배지에서 생육이 가능하였고, 기균사의 색깔은 회백색, 배면의 색깔은 주로 회백색에서 갈색으로 나타났으며, 젤라틴 액화능과 전분 분해능을 가지나 myo-inositol은 이용하지 못하였다.

이 균의 배양학적 특성은 최적 pH 및 온도가 6.5~7.0 및 30℃였으며, 탄소원으로는 starch가 30g/l, 질소원으로는 casamino acid 10g/l가 적합한 것으로 나타났다.

방선균 No. 101의 균체 및 균배양액의 추출물에 대한 항균 및 항진균성에서는 *Staphylococcus aureus*와 *Bacillus subtilis*에서 강한 항균력을, 효모와 곰팡이에 대하여는 낮은 항진균성을 나타내었다.

사 사

본 연구는 1992년 문교부 자유공모과제로 선정되어 수행되었으며 연구지원을 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Aoyagi, T., S. Yoshida, Y. Nakamura, Y. Shigihara, M. Hamada and T. Takeuchi. 1990. Probestin, a new inhibitor of aminopeptidase M, produced by *Streptomyces azureus* MH663-2F6. I. Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. Antibiot.* 43(2), 143~148.
- Ahn, J. S., S. C. Ahn, H. S. Lee, M. S. Park, W. K. Oh, B. Y. Kim and T. I. Mheen. 1992. Purification and chemical identification of the inhibitor and bleb formation of K 562 cell induced by phorbol ester from Actinomycetes isolated No. 1882-5. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20 (5), 565~573.
- Difco Laboratory. 1984. Difco manual. Dehydrated culture media and reagent for microbiology(10th ed.) Detroit, "in press"
- Harrigan, W. F. and M. E. McCance. 1976. Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press Inc.(London) LTD. 66~73.
- Jensen, P. R., R. Dwight and W. Fenical. 1991. Distribution of actinomycetes in nere-shore tropical marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1102~1108.
- Kameyama, T., A. Takahashi, S. Kurasawa, M. Ishizuka, Y. Okami, T. Takeuchi and H. Umezawa. 1987. Bisucaberin, a new siderophore, sensitizing tumor cells to macrophage-mediated cytotoxicity. I. Taxonomy of the producing organism, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* 40, 1664~1670.
- Nakamura, H., Y. Itaka, T. Kitahara, T. Okazaki and Y. Okami. 1979. Structure of aplasmomycin. *J. Antibiot.* 30, 714~719.
- Nalan, R. D. and T. Cross. 1988. Isolation and screening of actinomycetes. In M. Goodfellow, S. T. Williams and M. Mordarski(ed.), *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press, Inc., San Diego, Calif. pp. 1~32.
- Okami, Y., T. Okazaki, T. Kitahara and H. Umezawa. 1976. Studies on marine microorganisms V, A new antibiotic, aplasmomycine, produced by a streptomycete isolated from shallow sea mud. *J. Antibiot.* 29, 1019~1025.
- Okami, Y., K. Hotta, M. Yoshida, D. Ikeda, S. Kondo and H. Umezawa. 1979. New aminoglycoside antibiotics, Istamycin A and B. *J. Antibiot.* 32, 964~966.
- Okami, Y. and K. Hotta. 1988. Search and discovery of new antibiotics, in M. Goodfellow, S. T. Williams and M. Mordarski(ed.), *Actinomycetes in biotechnology*. Academic press, Inc., San Diego, Calif. pp. 33~67.
- Okami, Y. 1991. Marine microorganisms producing bioactives. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* 65(9), 1321~1329.
- Pisano, M. A., M. J. Sommer and L. Braccaccio. 1989. Isolation of bioactive actinomycetes from marine sediments using rifampicin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 609~612.
- Pisano, M. A., M. J. Sommer and M. M. Lopez. 1986. Application of pretreatments for the isolation of bioactive actinomycetes from marine sediments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 285~288.

- Takahashi, A., D. Ikeda, H. Nakamura, H. Nakawana, S. Kurasawa, Y. Okami and T. Takeuchi. 1989. Altemicidin, a new acaricidal and antitumor substance. II. Structure determination. *J. Antibiot.* 42(11), 1562~1566.
- Takizawa, M., R. R. Colwell and R. T. Hill. 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (4), 997~1002.
- Walker, J. D. and R. R. Cowell. 1975. Factors affecting enumeration and isolation of actinomycetes from Chesapeake Bay and Southeastern Atlantic Ocean. *Mar. Biol.* 30, 193~201.
- Weyland, H. 1969. Actinomycetes in North Sea and Atlantic ocean sediments. *Nature(London)*, 223, 858.
- Weyland, H. 1981. Distribution of actinomycetes on the sea floor. *Zentralbl. Bakteriologie. Suppl.* 11, 185~193.
-
- 1993년 6월 15일 접수
1993년 7월 8일 수리