구강상재균을 중심으로 항균력을 나타내는 메탄올 자화방선균의 분리 및 변이주 생산

대구보건대학 치기공과 · 수원여자대학 치위생과*

박명호 , 이화식 , 배봉진 , 김정 *

=*Abstract*=

Isolation of Methylotrophic Actionmycetes Capable of Producing Antagonistic Activity Against Oral Resident Bacteria and Screening of Mutants

Myoung-Ho Park, Hwa Sik Lee, Bong-Jin Bae, Joung Kim

Dept. of Dental Technology, Taegu Health College
Dept. of Dental Hygiene, Suwon Women's College

In order to select an effective antibiotic substance against oral resident bacteria, we were isolated from soil and texonomically analyzed. Seven hundred and eighteen strains were isolated on humic acid- vitamin agar(HV agar) and 220 strains were on methanol medium from three each paddy forest, field and riverside soil samples. So, during the screening of antibiotics from soil, we isolated microorganisms showing powerful antagonistic activity against oral resident bacteria. Microorganism was tested against 25 strains of bacteria, yeast and fungi. Among them, No. 248 strain exhibited the most strongly growth inhibition. So, the taxonomical analysis the isolated strain was found to be unknown Actinomyces sp. and was named No 248. A production of the antibiotics from No. 248 begins at the early exponential phase developed at the 72th hour under the optinum conditions. The property of No. 248 antimicrobial compound was very stable under acid(pH 3.0) and alkali(pH 10.0) treatment, but it was instable in heat treatment at 120℃.

For the improvement of antibiotic activity, two mutants were isolated from strain No. 248 by the treatment of mutagenic agents, NTG and hydroxylamine. As a result, the mutant strains excreted the potent antibiotics to inhibit the growth of Candida albicans.

Ⅰ. 서 론

항생물질, 효소, 색소, 저해제, 생리활성물질 등 다양한 2차 대사산물을 생산하는 아주 유용한 토양미생물이 방선균이다. streptomycin의 발견자인 Waksman은 항생물질의 정의를 "미생물에 의하여 만들어지는 화학물질로서 다른 미생물의 생육이나 대사를 저해하는 것"이라고 내리고 있지만 항생물질의 진보와 함께 그 정의는 확대되어 미생물이 생산하는 물질로서 항바이러스, 효소정해 등 각종 생리활성(biological activity)을 나타내는 물질까지 항생물질의 범주에 넣고 있다. 1960년대 이후 자연계로부터 새로운 항생물질을 개발하려는 연구가 체계적이고 광범위하게 이루어져 많은 신항생물질들이 발견되었고 연구범위를 미생물에서 고등식물, 동물조직, 행양생물까지 확대하고 있다. 또한 항세균성 물질을 개발하려는 연구 외에도 항암제, 항바이러스제, 항파아지제 등의 화학요법제로서의 가치를 가지는 다양한 항생물질에 대한 연구 및 효소저해제, 살충제, 식물성장 조절물질 등의 비임상적 목적으로 사용하는 항생물질에 대한 연구, 그리고 항염증작용, 혈중지방 저하작용, 경련치료제드의 비화학요법적인 항생물질을 찾아내려는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

이러한 항생물질의 예방적 측면으로서의 구강의 이용은 치주병의 숙주요인제거법으로서 항생제나 항체 또는 항효소제 같은 물질을 신체에 투여하면 타액으로 분비되어 치석의 형성을 저하시키고 치은 감염을 억제하거나 항생제가 치은열구분비액에 포함되어 분비되어서 국부자극에 대한 치주조직의 저항성을 강화시킨다고 보고되고 있다.

건강한 구강이란 상병에 이완되어 있지 않고 허약하지 않으며 정신작용과 사회생활에 장애가 되지 않는 치아와 악안면구강조직기관의 상태라 말할 수 있다. 이러한 구강건강의 관리가 필요한 것은 구강병에 기인하는 원인을 방지하여 생존현상과 더불어 생활상의 장애를 제거하기 위함이다. 그러나 구강은 공기, 물, 음식, 손가락 등을 통하여 잡다한 세균에 노출되어 있고 온도 또한 세균이 증식하기에 적합하여 다양한 미생물이 상재균총(bacterial flora)을 형성하고 있다. 또한 수분도 풍부하고 영양분이 끊임없이 공급될 뿐만 아니라 산소분압도 다양하고 세균이 잔류하기에 용이한 조건이 되도록 치간이 갖추어져 있어 호기성세균과 혐기성세균 및 통성혐기성 세균이 많이 증식하고 있다.

특히, 구강 내의 협점막 표면, 혀의 표면, 치아표면, 치은열구, 타액 등의 각 부위마다 환경에 따라 정착하여 증식한 상재균(resident bacteria)에 의해 상재균총을 형성하고 있다. 실제적으로는 구강내에서는 22속 56종 이상의 세균이 분리되는데 구강상재균총은 항상 일정하지 않으며 사람에 따라서 또한 같은 사람이라도 연령과 건강상태, 식사의 내용이나 구강의 위생상태에 따라서 구강 세균의 종류와 비율이 달라진다. 상재균 중 구강질환의 대표적인 질환인 치아우식증과 치주질환을 유발하는 균주로는 *Streptococcus mutans, S. mitis, S. salivarious, Actinomyces* sp., *Rothia* sp., *Norcardia* sp., *Bacterionema* sp., *Leptotrichia* sp., *Coryne-bacterium* sp., *Bacteroides* sp., *Neisserria* sp., *Veillonella* sp., *Fusobacterium* sp., *Sporillum* sp., *Hemophillus* sp. 등이 함께 관여하여 구강병 발생 원인 중 미생물적 요인을 형성하고 있는 것으로 알려져 있다. 특히, 치아상실의 87.67%를 차지하고 있는 치아우식증을 유발하는 것으로 알려져 있는 S. *mutans*는 치면세균막에 존재하고 산 생성능력을 갖고 있을 뿐만 아니라 우식병소내의 강한 산성의 환경에서 생존할 수 있는 내산성을 가졌다는 것에 의해

통상적으로 원인균으로 알려져 있다. 저자들은 구강상재균에 대해 특이적으로 작용하며 뛰어난 항균력을 나타내는 methylotrophic actinomyces를 분리한 결과를 보고 하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 사용시약

Biotin, $CaCo_3$, Na_2HPO_4, KCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, K_2HPO_4, NH_4NO_3, methanol, $NaHPO_4$, thiamine - HCl , niacin, pyridoxine-HCl, ρ-aminobebzoate, riboflavin, glycerol은 Sigma Co.(U.S.A>) 제품을 사용하였으며, bacto-soytone, peptone, yeast extract , malt extract은 Difco Co(U.S.A.)를 사용하였다. 그리고 NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, KCl, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $Ca(No_3)_2$, $FeCl_2$, $MnCl_2$, $FeSO_4$, HCl, $MgCl_2$, H_3PO_4, NaOH, $CaCl_2$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $HgCl_2$, glucose는 시판 특급품을 사용하였으며, 기타 시약 및 재료들은 구입가능한 최상의 제품을 사용하였다.

2. 토양으로부터 희귀 방선균의 분리

항생물질을 생산하는 미생물을 분리하기 위하여 부식질이 많은 산흙이나 밭흙, 퇴비 등을 10g씩 무작위 채취하였다.

그리고 토양으로부터 방선균주를 분리하기 위하여 채취한 토양 시료를 멸균수(121℃, 15min, 1kg/㎠) 10ml에 넣고 현탁시킨 후, 105배까지 희석하여 0.05% 비타민 용액(Thiamine-HCl 0.5mg, riboflavin 0.5mg, niacin 0.5mg, pyridoxine-HCl 0.5mg, inositol 0.5mg, Ca-pantothanate 0.5mg, p-aminobezoate 0.5mg, biotin 0.25mg)을 함유한 HV agar medium (HAyakawa, 1987)과 methanol medium(Table 1B)에 토양 희석액 0.1ml씩 도말하여 28℃에서 4~6일간 배양하였다. 생성된 colony 중 서로 상이하다고 생각되는 수백종의 방선균 집락을 채취하고 보관용 배지(Glucose 1.0%, Asparagine 0.05%, K_2HPO_4 0.05%, Agar 1.75%, pH 6.8)에 1백금이 접종하여 28℃에서 4~6일간 사면배양하였다. 이 균들을 4℃에서 보관하여 사용하였다.

3. 항생물질 생산균의 선별

100ml 삼각플라스크에 항생물질 생산배지(Bacto-soytone 1.0%, Glucose 1.0%, Nacl 0.5%, CaCo3 0.1%, pH 7.0) 20ml를 넣고 가압 증기로 멸균하고 냉각한 후, 분리균을 1백금이 접종하여 28℃, 100spm(strokes per min)에서 7일간 진탕배양하였다. 그리고 균 배양액으로부터 항생물질을 분리하기 위하여 배양액을 원심분리(4℃, 10,000rpm, 10min)하여 상등액으로부터 항생물질 생산유무를 관찰하였다. 항생물질의 생산유무는 시험균 S. *mutans* 등의 구강상재균을 이용하여 paper disc법으로 측정하였다. 항생물질 생성으로 시험균의 생육이 억제되어 생성되는 clear zone으로써 확인하였으며, 시험균의 생육배지는 LB배지(peptone 1.0%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, pH 7.0)을 사용하였다.

4. 변이주의 분리

유전자 조작에 의한 변이주의 분리는 Hopwood등(1985)의 방법을 준하였다.

1) 온도처리

포자현탁액 100μℓ를 멸균수 900μℓ 혼합하는 희석법에 의해 101, 102, 103, 104, 105배 희석한 다음, 희석한 포자현탁액을 각각 A6 배지에 도말한 후 37℃에서 3일간 배양하였다.

2) AO(acridine orange) 처리

분리방선균의 생육배지 100ml 에 acridine orange 30μg/ml를 첨가하여 28°C에 2일간 지탕 배양한다. 배양 후 균체를 homogenizer로 현탁하여 원심분리기(5,000rpm, 20min, 20°C)하여 상층액을 제거한 후 0.05M TM buffer (0.05MTris, 0.25M maleic acid, pH 8.0) 1ml를 첨가하여 현탁 후 30°C에서 1~2시간 처리하였으며 이것을 또 다시 원심분리후 상층액을 제거하고 멸균수 1ml를 넣어 현탁시킨다. 이 AO 처리 원액을 100배 희석한 후 최소배지에에 100μℓ씩 도말하여 28°C에서 2일간 배양하였다.

3) Ethidium bromide(EB) 처리

방선균의 생육배지 100ml에 EB 15μg/ml를 첨가하여 28°C에서 2일간 진탕배양하였다. 배양후 균체를 homogenizer로 현탁하여 AO와 같이 여러 단계를 거쳐 원심분리후 EB 처리한 균을 100배 희석한 후 최소배지에 100μℓ씩 도말하여 28°C에서 2일간 배양하였다.

4) N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine(NTG) 처리

분리 방선균의 spore 용액 1ml를 원심분리한 후 침전물에 0.05M Tris-malate buffer(pH 9.0) 1ml를 첨가하여 현탁한 용액에 NTG 5mg을 첨가하여 용해시켜 실온에서 1시간 처리하였다. 이것을 다시 원심분리한 후 상등액을 제거하고 20% glycerol 1ml를 첨가하여 105배까지 희석한 후 최소배지에 10μℓ씩 도말하여 28°C에서 5일간 배양하였다. 생성된 colony를 임의로 선발하여 항생물질 생산용배지에 배양하여 검정균을 가지고 항생물질 생산능을 검토하였다.

5) 균의 생육도 측정 및 미생물의 보존

공시균의 생육도는 분광광도계(Shimadzu Model UV-120-02, Japen)를 사용하여 600nm에서의 흡광도를 측정하여 생육도로 표시하였다. 그리고 미생물의 보존은 증식용 배지에서 배양한 균체를 20% glycerol 용액에 현탁하여 deep freezer(-80°C)에 넣어 보관하였다.

6. 항균성 물질의 안정도 조사

항균력이 가장 광범위하고 뛰어난 248번 균주가 분비하는 항균성 물질의 안정성을 검토하기 위하여 산성(pH 3.0, 1N HCl로 조정) 및 알칼리성(pH 10, 1N NAOH로 조정)하에서 1시간 방치 후 중성(pH 7.0)으로 조절하여 항균력을 검토하였으며, 열처리는 동일 시료를 121°C, 1기압에서 20분간 가열 처리한 다음 항균활성을 검토하였다. 처리 시료의 항균력은 시험균 S.mutans 균주를 대상으로 측정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 항생물질 생선균의 분리 및 선별

항생물질 생성균의 분리는 우리나라 전역에서보다는 경상남도와 경상북도를 대상으로 하여 약 100지역의 sampling site와 제주도를 대상으로 10지역의 sample site를 정하고 토양을 채취하였다. 즉, 대구의 와룡산을 중심으로 하는 신당동 20지역과 구미의 금오산을 중심으로 하는 20지역, 밀양시에서 10지역, 청송 주왕산을 중심으로 하는 10지역, 경주의 토함산을 중심으로 하는 5지역, 김천의 직지사를 중심으로 하여 10지역, 상주군에서 10지역, 울진군에서 10지역, 봉화군에서 8지역, 안동군에서 15지역과 제주도의 한라산에서 고도에 따라 10지역의 토양을 분리원으로 하여 약 1,000균주를 분리하였고, 그 중 15개 균주에서 항생물질의

활성을 나타내었다. 이들 15개 균주에서 S. mutans를 시험균주로 하여 clear zone을 재실험한 결과 79번, 84번, 248번 균주가 가장 높은 활성를 나타내었다. 그리하여 비교적 높은 활성을 나타내는 79, 84, 248번 균주를 선별하여 다음 실험에 임하였다.

Table 1. Number of antibiotics-producing microorgani는 isolated from sampling districts

Sampling districts	Seperation medium	
	HV agar	Methanol
Taegu, Shindang Dong	49	10
Kŭmosan Province Park	38	12
Miryang Shi	44	19
Chuwangsan National Park	81	23
Kyongju National Park	42	40
Kimchon Shi	48	30
Sangju Gun	81	50
Ulchin Gun	40	45
Ponghwa Gun	48	51
Andong Shi	83	45
Hallasan National Park	102	7
Total	662	332

2. 항균(spectrum)

토양으로부터 순수하게 분리한 방선균중 가장 항균력이 높은 79번, 84번, 248번 균주에 대한 항균력 측정 결과는 <Table 2>에 명기했다. 즉, 그람음성세균, 그람양성세균, 효모, 사상균을 대상으로 하여 항균 spectrum을 disc법에 의한 MIC(minimal inhibitory concentration, 시험균의 생육이 저해되는 최저 농도)으로 비교하였다.

<Table>의 결과에서 보는 바와 같이 79번 균주는 특이적으로 불용성 glucan과 산을 형성하여 치아우식을 유발하는 S.mutans와 대장균에 대하여 항균력을 나타내었으나 84번 균주와 248번 균주는 대다수의 그람 양성균과 그람 음성균에 대하여 우수한 효과를 보였다. 특히 248번 균주는 호모와 곰팡이에 대해서도 항균활성을 나타내었다. 이상의 결과로 볼 때 본 공시균주는 그람 양성균과 그람 음성균에 유효한 βlactam 계 항생물질과는 달리 광범위한 항균 spectrum을 갖고 있었다. 그러나 구강, 호흡기계, 질 및 장관 내에 소수로 존재하는 상재균이며, 숙주의 저항력이 감소될 때 구강 내 아구창(thrush)을 유발하는 균주인 Candida albicans에 대해서는 항균력을 소유하지 목하였다.

3. 변이주위 분리 및 항균력

Candida albicans는 구강, 호흡기계, 질 및 장관 내에 소수로 존재하는 상재균이며 숙주의 저항력이 감소될 대 구강 내 아구창, 특히 백혈병을 비롯한 암, 부신피질 호르몬 치료환자, 후천성 면역결핍증 환자에서는 매우 발병률이 높을 뿐만 아니라 당뇨병과 항세균제 치료에서도 중요한 소인이 된다.

본 연구에서는 pH 9.0에서 NTG와 0.5% hydroxylamine의 처리를 토하여 생성된 colony 중 C. albicans에 대하여 항균력을 나타내는 균주를 선별하여 계대배양을 통해 미복귀 상태임을 확인하고 항균 spectrum을 조사하였다. 그 결과 각각의 변이주는 parent 균주와는 달리 진균에 대하여 아주 높은 항균력을 나타내었다(결과 미기재). 즉 parent 균주는 진균에 대하여 전혀 항균효과를 나타내지 않았지만 두 개의 실험 진균 모두에 대해 항균력을 나타내었으며 특히 C. albicans에 대해 높은 항균력을 소유하였다.

Table 2. MIC of the extracts against various strains

Strains	No. 79	No. 84	No. 248
	Inhibition zone (ψ, mm)		
Streptococcus mutans	10	11	27
Staphylococcus aureus	-	12	22
Streptococcus mitis	-	11	24
Streptococcus equi	-	16	24
Streptococcus lactis	-	15	26
Streptococcus sanguis	-	13	15
Streptococcus salivarious	-	14	36
Lactobacillus casei	18	17	25
Actinomyces viscosus	-	14	23
Actinomyces naeslundii	-	9	20
Enterobacter aerogenes	-	15	20
Salmonella typhi	-	12	20
Salmonella paratyphi	-	15	18
Salmonella typhimurium	-	10	17
Hansenula anomala	-	-	-
Candida albicans	-	-	-
Cryptococcus neoformans	-	10	34
Aspergillus fumigatus	-	-	10

4. 항생물질의 안정성

분리한 방선균 중 항균력이 가장 뛰어난 248번 균주가 분비하는 항균성 물질의 분리 정제를 특성을 검토하기 위하여 항균성 물질의 간단한 성질을 조사하였다. <Table 1>과 같은 배지에 5일간 배양하여 얻은 항균성 물질을 사용하여 고온가압(121°C, 20min, 1atm), 산(pH 3.0) 및 알칼리(pH 10.0) 처리하여 1시간 방치한 후 중성으로 조절하여 MIC를 기준으로 하여 항균효과를 측정하였다. <Table 3>에서와 같이 고온가압 처리시에는 미처리 시료에 비해 항균효과가 90%이상 실활을 보였으나 산처리의 경우와 알칼리 처리시에는 항균력의 변화가 없었다.

이상의 결과로 볼 때 본 항균성 물질은 열에는 매우 불안정하다고 판단되었으나 산성과 알칼리에서는 매우 안정하다고 사료되었다.

Table 3. Heat, acid and alkali stabilities of antibiotic substance of strain No. 248 culture

Strains	Treatment			
	None	Heat[a]	Acid[b]	Alkalic
	Inhibition zone(ψ, mm)			
S. mutans	25	9	25	25

[a]Autoclaved for 20 minutes, [b]pH 3.0, [c]pH 10.0

IV. 결 론

항생물질 생산균의 분리는 경상남도와 경상북도, 제주도를 대상으로 토양을 채취하고 분리용 배지인 HV agar 배지와 methanol 배지에 도말하여 방선균을 검색하였다. 분리한 1,000균주의 방선균 중에서 치아우식원인균인 *S. mutans*에 대하여 항균력이 가장 뛰어날 뿐만 아니라 그람 음성, 그람 양성 그리고 진균류에도 항균성을 나타내는 248번을 선별하였다. 그리고 배양시간에 따른 균주의 증식도와 항생물질 생성능을 측정한 결과, 24시간의 유도기를 거쳐 배양 48시간 이후에 최대 증식도를 나타내어 72시간째 항생물질 생산의 최대값을 나타내었다. 항균성 물질의 안전성을 실험하기 위하여 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액을 열처리(120℃, 20 min, 1 atm), 산(pH 3.0) 및 알칼리(pH 10.0) 처리를 한 결과 열에 대하여서는 매우 불안정한 반면 산과 알칼리 처리시에는 매우 안정하였다.

또한 변이주의 생산시 구강, 호흡기계, 질 및 장관내에 소수로 존재하는 상재균(normal flora)이며 숙주의 저항력이 감소시 나타나는 아구창의 원인균주인 *Candida albicans*에 대해 높은 항균력을 소유하였다.

참 고 문 헌

1. Schoen MH. Dental education's responsibility for oral health status in the United States. J Dent Ed., 40 : 519~523, 1976.
2. Arnim SS. Microcosm of the human mouth. J Tenn State Dent Assoc, 39 : 3~28, 1959.
3. Bowden GH, Ellwood DC, Hamilton IR. Microbial ecology of the oral cavity. In : Advances in microbial ecology(M. Alexander, ed.,), Plenum press, New York. Vol. Ⅲ, 135-217, 1979.
4. Bowden GH, Hardie JM. Gram-positive pleomorphic(coryneform) organism from the mouth. In : Coryne-form bacteria(Bousefield, I. J. and Calley, A. G. eds.), Academic Press, London, 235-263, 1978.
5. Holmberg K, Nord CE. Numerical taxonomy and laboratory identification of Actinomyces and Arachnia and some related bacteria. J Gen Microbiol, 91 : 1744-1751, 1975.
6. Slack JM, Gerencser MA. Actinomyces, filamentous bacteria, biology and pathogenicity, Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota, 1975.
7. Gibbons RJ. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. J Dent Res, 63 : 378-385, 1984.
8. Gibbons RJ, Fitzgerald RJ. Dextran-induced agglutination of *Streptococcus mutans*, and its potential role in the formation of microbial dental plagues. J Bacterial, 98 : 341-346, 1969.
9. Jordan HV, Krasse B, Miller A. A method of sampling human dental plague for certain cariesinducing Streptococci. Arch Oral Biol, 13 : 919-927, 1968.
10. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbial Rev, 44 : 331-384, 1980.
11. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbial Rev, 50 : 353-380, 1986.

12. Kim HS. Isolation and production of antifungal compound from methylotrophic actinomycetes. J Inst Nat Sci, 15 : 225～234, 1996.
13. Chang SB, Abdelkader MM, Wick LE, Wogon. Science, 142 : 1191～1198, 1963.
14. Demain AL, Solomon NA. Antibiotics containing the β-lactam structure, Vol I and Ⅱ, Springer-Verlag, Berlin, 1983.
15. 고춘명, 박진환. 임상검사물에서 분리한 Candida sp.의 항진균제 ketoconazole, 5-fluorocytosine 및 amphotericine B의 단독 혹은 복합처리에 의한 항진균력에 대한 연구. 대한미생물학회지, 21 : 63～70, 1986.