

장수풍뎅이 유충의 분변에 존재하는 방선균의 다양성 및 항균활성

이혜원^{1,2} · 안재형¹ · 김민욱³ · 원항연¹ · 송재경¹ · 이성재³ · 김병용^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과

²고려대학교 생명과학대학 생명과학부

³경희대학교 생물학과

Diversity and Antimicrobial Activity of Actinomycetes from Fecal Sample of Rhinoceros Beetle Larvae

Hye-Won Lee^{1,2}, Jae-Hyung Ahn¹, Minwook Kim³, Hang-Yeon Weon¹, Jaekyeong Song¹,
Sung-Jae Lee³, and Byung-Yong Kim^{1*}

¹Division of Agricultural Microbiology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Republic of Korea

²School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Republic of Korea

³Department of Biology, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Republic of Korea

(Received June 11, 2013 / Accepted June 25, 2013)

Actinomycetes produce diverse secondary metabolites which have the primary importance in medicine, agriculture and food production, and key to this is their ability to interact with other organisms in natural habitats. In this study, we have investigated the taxonomical and functional diversity of actinomycetes in fecal sample of rhinoceros beetle larvae (*Allomyrina dichotoma* L.) by using culture-dependent and -independent approaches. For the culture-independent approach, the community DNA was extracted from the sample and 16S rRNA genes of actinomycetes were amplified using actinomycetes-specific PCR primers. Thirty-seven clones were classified into 15 genera and 24 species of actinomycetes. For the culture-dependent approach, 53 strains were isolated from larval feces, of which 27 isolates were selected based on morphological characteristics. The isolates were classified into 4 genera and 14 species, and 24 isolates (89%) were identified as the genus *Streptomyces*. Many of the representative isolates had antimicrobial activities against plant pathogenic fungi and Gram-positive bacteria. In addition, most of the isolates (78%) showed biochemical properties to hydrolyze cellulose and casein. The results demonstrated that diverse and valuable actinomycetes could be isolated from insect fecal samples, indicating that insect guts can be rich sources for novel bioactive compounds.

Keywords: actinomycetes diversity, antimicrobial activity, Rhinoceros beetle larvae

방선균(actinomycetes)은 그람양성의 호기성 중속영양세균으로 토양 등의 자연 환경에 우점적으로 분포하고 있다. 방선균은 균사로 성장하고, 기저 균사체(substrate mycelium), 기중 균사체(aerial mycelium), 분절 포자(arthrospore), 포자낭(sporangia) 등의 독특한 구조를 형성한다는 점에서 다른 세균들과 형태적으로 구별된다(Goodfellow, 2010). 방선균은 유전체의 GC 함량이 높은 편이며 다양한 활성을 보유하는 세포의 효소와 대사물질을 생산하므로 유전적 다양성과 함께 기능적 다양성을 지니고 있다(Hopwood, 2006). 특히 방선균이 생산하는 이차 대사산물들은 구조와 기능이 매우 다양하고 풍부하여, 지금까지 알려진 항생물질 10,000여 종 중 75% 이상이 방선균에서 분리되었고, 항암제, 면역조절제, 유용효소 등 다양한 생리활성물질의 약 64%가

방선균에서 유래한다(Bérdy, 2005). 또한 식품, 환경 및 농축산업 분야에도 널리 활용되고 있는 유용한 생물소재이다(Morales et al., 2007; Jog et al., 2012).

방선균은 셀룰로오스, 리그닌 등을 포함하는 각종 유기물을 분해하여 생물연료를 생산하는 자원으로 활용할 수도 있고, 중금속, 농약 등의 오염물질을 분해하는 환경정화에 이용할 수도 있다(Mccarthy and Williams, 1992; Kinkel et al., 2012). 일반적으로 방선균이 서식하는 자연환경은 토양이기 때문에 지금까지 방선균은 주로 토양으로부터 분리된 경우가 많았다. 그러나 토양 뿐만 아니라 하천, 바다, 퇴비, 대기, 생활하수, 동식물의 체내 등 거의 모든 자연환경에서 방선균이 분포하고 있기 때문에 최근에는 다양한 환경시료에서 신규 방선균을 분리하고 있다(Hayakawa, 2008; Olano et al., 2009).

곤충은 지구상에서 다양성이 가장 높으며, 지상 환경의 대부분에 서식하며 주변과 상호작용하고 여러 생물과도 다양한 관계

*For correspondence. E-mail: bkim@korea.kr; Tel.: +82-31-290-8476; Fax: +82-31-290-8488

를 형성하여 도움을 주고받는 것으로 알려져 있다(Park *et al.*, 2011). 이들 곤충의 표피나 장에는 다양한 미생물이 공생하고 있어 곤충의 성장과 대사활동에 큰 영향을 주고 있다(Scott *et al.*, 2008; Kikuchi, 2009; Seipke *et al.*, 2012). 특히, 곤충들의 체내 혹은 체외에 서식하면서 다양한 생리활성 물질을 생산하는 방선균과 숙주와의 상호관계에 대해서 최근 활발하게 연구되고 있다(O'Brien and Wright, 2011; Seipke *et al.*, 2011).

곰팡이 균사체를 먹이로 키우는 개미(fungus-growing ant; *Apterostigma dentigerum*)는 자신의 표피에 서식하는 *Pseudonocardia* 들과 공생관계에 있다. Oh 등(2009)은 이 방선균이 항진균성 물질인 dentigerumycin을 생산하여, 먹이로 이용되는 곰팡이 균사체를 기생성 곰팡이로부터 보호한다는 사실을 밝힌 바 있다. 유사한 공생관계가 미국에서 수목 해충으로 알려진 남부딱정벌레(*Dendroctonus frontalis*)에서도 발견되었다. Scott 등(2008)은 이 곤충의 균낭(mycangium)에 서식하는 *Streptomyces*가 특수 항생물질인 mycangimycin을 생산하여, 유충의 먹이인 곰팡이 균사체(*Entomocorticium*)가 잘 자라도록 유해 곰팡이(*Ophiostoma minus*)만을 선택적으로 저해한다는 것을 밝혔다. 항생물질 이외에도 곤충으로부터 항암제와 같은 신규 의약품질을 보고한 사례도 있다. Kim 등(2013)은 쇠똥구리(*Copris tripartitus*)의 유충에서 분리한 방선균(*Streptomyces*)에서 HeLa 암세포의 histone demethylase를 억제하는 tripartin이란 신규물질을 분리하여 보고하였다. 이러한 연구 결과들은 곤충에서 유래한 방선균들이 매우 유용한 대사물질들을 생산한다는 사실을 증명하고 있다.

장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma* L.)는 딱정벌레목(*Coleoptera*) 풍뎅이과(*Scarabaeidae*) 장수풍뎅이아과(*Dynastinae*)에 속하는 곤충으로 한국, 일본, 중국, 대만 등지에 분포한다(Kim, 1998). 알에서 번데기까지 8-9개월을 지내고, 성충은 3-4개월 생존한다. 부식토나 부후목에 서식하며 교육 및 애완용으로 널리 사육하고 있으며 다른 곤충들에 비해서 생태 및 생활사가 비교적 잘 알려져 있는 곤충이다(Kim and Kang, 2005). 최근에는 장수풍뎅이 유충이 성인병 치료 및 예방에도 효능을 지닌다고 하여, 한약재로나 식품소재로 활용하려는 연구가 시도되고 있다(Chung *et al.*, 2013). 이러한 이유들로 장수풍뎅이는 유용한 신규 물질이나 미생물을 탐색할 수 있는 생물소재로서의 가치가 충분하다고 판단된다.

본 연구에서는 장수풍뎅이 유충의 분변을 비배양적 방법으로 방선균의 다양성을 분석하였고, 배양적 방법으로 직접 방선균을 분리 배양하였다. 배양된 방선균의 항균활성능 및 생화학적 특성을 분석하여 생물소재로서의 가치를 평가하였다.

재료 및 방법

장수풍뎅이 유충의 사육 및 시료 채취

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과에서 사육중인 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma* L.)의 3령 유충 3마리를 본 실험에 사용하였다. 사육은 온도 25°C, 장일조건(16 h Light: 8 h Dark), 상대습도 70% 내외로 하여, 참나무의 발효톱밥으로 채워진 플라스틱 통(18×12×14 cm)에서 한 마리씩 사육하였다. 시료

채취시에는 유충을 사육통 외부로 꺼내어 배출하는 신선한 분변을 각 개체로부터 수집한 후에 혼합하여 분석에 사용하였다.

Community DNA 추출 및 방선균 특이 PCR 반응

비배양적으로 방선균을 검출하기 위해서 16S rRNA 유전자에 특이적으로 결합하는 두 쌍의 다른 PCR primer를 사용하였다(Stach *et al.*, 2003; Schäfer *et al.*, 2010). 냉동(-80°C) 상태로 보관된 장수풍뎅이 유충 분변시료에서 FastDNA® Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, USA)를 이용하여 community DNA를 추출하여 PCR의 주형으로 사용하였다. 첫 번째 primer set은 Stach 등(2003)이 보고한 것으로서 SC-Act-235aS20 (5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTG-3')와 SC-Act-878aA19 (5'-CCGTACTCCCCAGCGGGG-3') primer를 사용하여 대략 640 bp의 PCR 산물을 생성한다. 두 번째 primer set은 Schäfer 등(2010)이 보고한 것으로서 Com2xf (5'-AAACTCAAAGGAATTACGG-3')와 Ac1186r (5'-CTTCCTCCGAGTTGACCC-3') primer를 사용하여 대략 270 bp 크기의 PCR 산물을 생성한다. PCR 반응의 조성은 2X Top premix (Enzymomics Inc., Korea) 10 µl, 10 µM의 forward / reverse primer 각 1 µl, H₂O 7 µl, DNA 시료(20 ng/µl)를 PCR tube에 넣고 잘 혼합하였다. PCR 반응은 95°C에서 2분간 initial denaturation 후에, 30 cycle 반복수행으로 denaturation 95°C에서 30초, annealing 45초, extension 72°C 1분 동안 수행한 후 72°C에서 5분간 final extension하는 조건으로 실시하였다. 이때 annealing 온도는 첫 번째 primer (S primer) set는 69°C에서, 두 번째 primer (C primer) set는 59°C에서 수행하였다. PCR 증폭 산물은 전기영동으로 확인한 후에 QIAquick® PCR Purification kit (QIAGEN Inc., Germany)를 이용하여 정제하였다.

PCR 산물의 클로닝 및 염기서열 결정

정제한 시료는 TOPO® TA cloning kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 ligation 후 One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen)에 열충격 방법으로 클로닝하였다. 클로닝 산물 200 µl를 ampicillin (Wako, Japan)이 100 ng/µl의 농도로 포함된 LB agar에 도말한 후 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 배지상의 콜로니들은 ampicillin이 포함된 LB broth 3 ml에 접종한 후 배양하여 AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 Plasmid를 분리하였다. 분리된 Plasmid는 Genotech 사(Korea)에 의뢰하여 insert의 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>; Kim *et al.*, 2012)에서 표준균주들과 염기서열의 상동성을 비교하였다.

방선균의 분리, 배양, 대표균주 선발

수집한 장수풍뎅이 유충 3마리의 혼합 분변 시료 1 g을 starch casein agar (SCA) 배지에 희석 평판하였다. 28°C에서 14일간 배양하면서 SCA 배지 상에 형성된 방선균 콜로니를 선택하여 oatmeal agar (ISP3) 배지에 계대하여 14일간 배양하여 순수 분리하였다. 순수 분리된 방선균들은 Antony-Babu 등(2010)의 방법에 따라 color grouping을 수행하여 대표균주들을 형태적으로

선발하였다. 즉, 개별 균주들을 aerial spore mass color, reverse color, diffusible pigment color에 기반하여 형태적으로 분류하였다.

분리 균주의 DNA 추출 및 16S rRNA 유전자 서열 결정

Color grouping을 통해 선발한 대표 방선균들을 각각 tryptic soy broth (TSB) 3 ml에 3일간 배양하여 PureHelix™ Genomic DNA Prep Kit (NanoHelix, Korea)로 genomic DNA를 추출하였다. 이 genomic DNA를 주형으로 Kim 등(2012)의 조건으로 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGC-3') primer를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 정제 후 Genotech 사(Korea)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였고, EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>; Kim et al., 2012)에서 표준균주들과 염기서열의 상동성을 비교하였다.

염기서열 분석 및 계통수 작성

비배양법으로 분석한 시료내 방선균의 16S rRNA 유전자 염기서열과 배양법으로 순수 분리한 방선균의 16S rRNA 유전자 염기서열은 GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록하였다 (KF194292~KF194355). EzBioCloud에서 상동성이 높았던 표준균주들과 결정된 염기서열의 alignment에는 CLASTAL X (Thompson et al., 1997)를 사용하였고 MEGA program version 4.0 (Tamura et al., 2007)의 neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) 방법에 의해 계통수를 작성하였다. 1,000회 반복 bootstrap 분석(Felsenstein, 1985)을 통해 계통수의 안정성을 평가하였다.

선발 균주의 항균활성능 및 생화학적 특성 분석

최종 선발된 방선균의 항균활성능을 조사하기 위하여 식물병원성 곰팡이(*Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40804, *Fusarium oxysporum* KACC 40037), 효모(*Candida albicans* Tu 164, *Saccharomyces cerevisiae* 6A), 세균(*Escherichia coli* DSM 5698, *Staphylococcus aureus* DSM 20231, *Bacillus subtilis* DSM 10)을 검정균주로 사용하였다. *C. gloeosporioides*와 *F. oxysporum*에 대한 항균활성 검정은 *in vitro* 항균활성 확인법에 따라 potato dextrose agar (PDA; Difco Co., USA) 배지에 검정균주를 각각 접종한 후 시험균주를 대치배양하여 균체 주위에 형성된 생육저지대(clear zone)의 크기에 따라 항균활성을 측정하였다. 효모(*C. albicans*, *S. cerevisiae*)와 세균(*E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*)에 대한 항균활성 시험을 위해 각각 YM broth (Difco Co.), LB broth (Difco Co.)에 검정균주 1 ml을 각각 접종하여 분주한 후에 시험 균주와 대치 배양하여 균체 주위의 생육저지대의 크기에 따라 항균활성 수준을 결정했다. 아울러 이들 균주의 이차 대사물질 생합성 유전자를 검출하기 위해서 Kim 등(2011)의 방법에 따라 NRPS (Non-ribosomal peptide synthetase)와 PKS-I (Type I polyketide synthase) 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다.

분리 균주의 생화학적 특성을 분석하기 위해서 셀룰로오스, 카제인, 키틴을 첨가한 배지를 각각 만들어 균주를 접종한 후

28°C에서 7일간 배양한 후 투명환의 크기에 따라 활성 수준을 결정하였다. 셀룰로오스 배지는 CMC (carboxymethyl cellulose) 2% stock 용액을 R2A agar 배지에 혼합하여 제조하였다. 균주 배양 후 0.1% congo red을 평판 위로 주입하였고, 30분 후에 1 M NaCl solution으로 15분간 탈색하여 투명환의 크기를 측정하였다. 카제인 배지는 skim milk 25 g/250 ml을 115°C에 13분, modified Bennett's agar 250 ml을 121°C에 15분간 각각 가압멸균하고 45°C로 식힌 후 혼합하여 제조하였다. 키틴 배지는 modified Bennett's agar 500 ml을 먼저 분주한 후 60°C로 온도를 높인 후 Bacto casitone 0.2 g, chitin 0.25 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, CaCl₂·2H₂O 0.1 g, agar 1.2 g/100 ml을 상층으로 분주하여 제조하였다.

결과 및 고찰

비배양법에 의한 다양성 분석

장수풍뎡이 유충의 분변 시료로부터 추출한 community DNA를 주형으로 방선균의 16S rRNA 유전자만 특이적으로 검출하는 primer를 사용하여 PCR한 결과, SC-Act-235aS20/SC-Act-878aA19 primer (S-primer) set으로부터 clone 16개, Com2xf/Ac1186r primer (C-primer) set으로부터 clone 21개를 얻었다. 각 clone의 16S rRNA 유전자 염기서열은 EzBioCloud 데이터 베이스를 이용하여 primer set별로 2개의 계통수를 작성하고 장수풍뎡이 유충 분변 속 방선균의 다양성을 분석하였다(Figs. 1 and 2).

S-primer set을 통해 얻은 16개의 염기서열은 표준균주 염기서열과 93.3%에서 99.9%의 상동성을 보였으며, 각 염기서열과 가장 높은 상동성을 나타내는 12개의 표준균주가 검색되었고 각 균주는 방선균 10개 속으로 분류되었다(Fig. 1). 즉 *Streptomyces* 속과 *Leifsonia* 속에 속하는 염기서열이 3개로 가장 많았고, 그 외에 *Actinomadura*, *Cellulomonas*, *Ilumatobacter*, *Microbispora*, *Mycobacterium*, *Saccharopolyspora*, *Thermobispora*, *Thermopolyspora*의 속에 해당하는 염기서열이 1-2개씩 있었다. 대부분의 염기서열이 표준균주와 97.0% 이상의 상동성을 보였으나 *Ilumatobacter* 속에 속한 clone S05는 93.3%, *Mycobacterium* 속에 속한 clone S10은 95.5%로 상동성이 비교적 낮았다. 16개의 염기서열 중 clone S02는 *Cellulomonas chitinilytica*의 표준균주와 99.5%의 상동성을 보였는데, 이 균주는 셀룰로오스, 자일란, 키틴을 분해하는 능력이 있는 것으로 보고되었다(Yoon et al., 2008). Clone S07, S08와 99.4%의 상동성을 보인 *Actinomadura keratinilytica*의 표준균주는 케라틴을 분해하여 탄소 및 질소원으로 이용할 수 있다(Puhl et al., 2009). Clone S02, S07, S08과 상동성이 높은 표준균주들은 모두 퇴비에서 분리된 것들이다. 즉, 이들 clone들이 검출된 것은 발효톱밥 내의 방선균이 소화되지 않고 잔존했기 때문인 것으로 추정된다. 또한 clone들과 높은 상동성을 보이는 비교 균주들 *Thermopolyspora flexuosa* DSM 43186^T, *Actinomadura keratinilytica* WCC-2265^T, *Thermobispora bispora* DSM 43833^T, *Streptomyces thermoalcalitolerans* NBRC 16322^T 등은 모두 생육 최적 온도가 45-60°C에 해당하는

호열성 균주로 보고되었다(Wang *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1999; Goodfellow *et al.*, 2005; Puhl *et al.*, 2009), 그 외에 clone S04와 유사한 *Saccharopolyspora hordei* DSM 44065^T는 60°C, clone S11과 유사한 *Microbispora hainanensis* 211020^T는 50°C 까지 생육이 가능한 것으로 보고되었다(Goodfellow *et al.*, 1989; Xu *et al.*, 2012).

C-primer set을 사용하여 얻은 21개의 clone 염기서열은 표준 균주 염기서열과 89.0%에서 99.6%의 상동성을 나타내는 것으로 확인되었으며, 각 염기서열과 가장 높은 상동성을 나타내는 10개 방선균 속에 해당하는 14개의 표준균주가 검색되었다(Fig. 2). *Streptomyces* 속에 속하는 clone이 7개로 가장 많았고, *Xylanimicrobium* 속과 *Leifsonia* 속에 속하는 clone이 각각 3개이었다. 그 외에 *Nocardioidea* 속 2개, *Actinomadura*, *Caloribacterium*, *Mycobacterium*, *Microbispora*, *Phytohabitans*, *Xylanimonas* 속에 각각 1개씩의 clone이 포함되었다. 대부분의 clone들이 계통학적으로 가장 가까운 표준 균주와 97.0% 이상의 상동성을 나타냈으나 *Caloribacterium* 속에 속한 clone C18은 91.3%, *Nocardioidea* 속에 속한 clone C11은 93.8%, *Phytohabitans* 속에 속한 clone C10은 89.0%로 상동성이 낮았다(Fig. 2). 검색된 비교 균주 중

에는 자일란을 분해하는 활성을 보유하고 있는 균주들이 다수 있었다. Clone C22와 99.6%의 상동성을 보인 *Xylanimonas cellulositytica* XIL07^T는 부후목에서 분리된 균주로서 풍부한 cellulase와 xylanase의 활성이 높다(Rivas *et al.*, 2003). Clone C07, C08, C20와 99.6%의 상동성을 보인 *Streptomyces thermovulgaris*의 경우 호열성 균주 TISTR1948으로부터 xylanase를 분리하여 산업적으로 이용하기 위한 연구가 수행되었다(Chaiyasong *et al.*, 2011). Clone C19, C23과 높은 상동성을 보인 *Xylanimicrobium pachnoda* VPCX2^T는 풍뎡이(*Pachnoda marginata*) 유충의 후장에서 분리되었고 xylanase와 endoglucanase 활성을 가지고 있다(Stackebrandt and Schumann, 2004). Cazemier 등(2003)은 풍뎡이 유충의 장내 미생물 분포를 조사하였고, 목질 또는 섬유질의 분해를 돕는 미생물 군집을 분석하였으며, 그로부터 이 균주를 선택적으로 분리하였다. C primer set를 사용하여 얻어진 clone들의 근연 표준균주들도 S-primer set에서 얻어진 clone들과 마찬가지로 호열성의 특징을 보이는 것이 많았다.

S-primer set을 통해 얻어진 16개의 clone들은 10개의 속, 12개의 종들과 높은 상동성을 보였고, C-primer set을 통해 얻어진 21개의 clone들은 10개의 속, 14개의 종들과 높은 상동성을 보

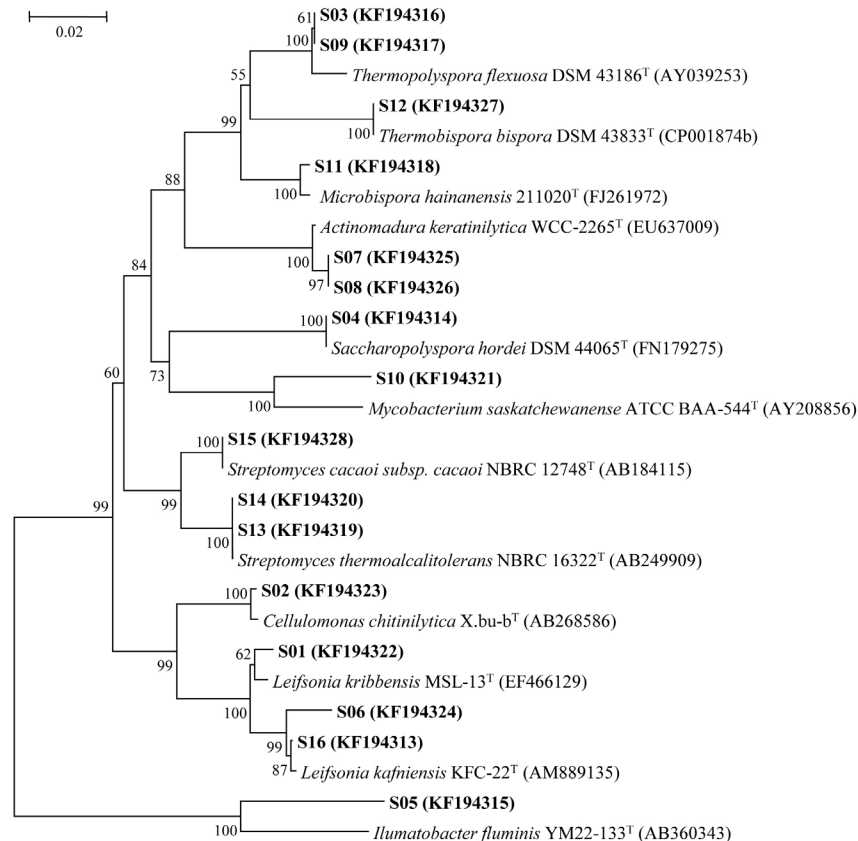


Fig. 1. Phylogenetic tree of uncultured actinomycetes and related actinobacterial type strains based on partial 16S rRNA gene sequences. The sequences were amplified by using SC-Act-235aS20/SC-Act-878aA19 primer set. Numbers above branches indicate bootstrap values of neighbor-joining analysis from 1,000 replicates. Scale bar corresponds to 0.02 substitutions per nucleotide position. *Rhodothermalassium salexigens* ATCC 35888^T (D14431) was used as outgroup in this tree.

였다. 두 쌍의 primer set으로 얻어진 clone들이 공통적으로 5개의 방선균 속(*Actinomadura*, *Leifsonia*, *Microbispora*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*)에 속하는 것으로 나타났으며 특히, 2개의 표준균주(*Leifsonia kribbensis* MSL-13^T, *Microbispora hainanensis* 211020^T)가 공통적으로 높은 상동성을 보였다. 결과적으로, 비배양적으로 시료내의 미생물 다양성을 평가하는 것에 있어서 두 primer set의 탐지능력은 유사한 것으로 판단된다. 다만, C-primer set을 통해 얻어진 clone의 염기서열들이 270 bp 정도로 작아 상대적으로 유전 정보량이 적었고, 기존 비교 균주와의 상동성에 있어서도 다소 낮게 나타난 한계점을 보였다. Schäfer 등(2010)은 본 연구에서 사용한 두 primer set의 탐지능력을 비교한 바 있다. 즉, 전체 방선균 219속 중 S-primer set은 191속, C-primer set은 198속을 탐지하였으며, 공통적으로 나타난 방선균 속은 180속이었다. 두 primer set을 같이 사용할 경우 탐지되는 방선균 속은 209속이며, 이는 전체 중 95%에 해당하는 수치이다. 따라서 두 primer set을 동시에 사용하는 것이 보다 효과적인 다양성 분석

방법이라고 볼 수 있다.

장수풍뎡이 유충은 야생에서는 부엽토를 먹이로 하고, 사육 환경에서는 참나무 톱밥류 등을 발효시켜 만든 발효 톱밥을 먹이로 한다(Kim and Kang, 2005). 비배양적 접근을 통해 확인된 방선균의 풍부한 다양성을 고려하면, 목질 및 섬유질이 풍부한 먹이를 소화하는데 이들 방선균들이 특별한 기능을 수행할 것이라고 예측된다. 또한 먹이로 사용되는 톱밥이 고온에서 발효가 진행되기 때문에, 생육온도가 비교적 높은 방선균들이 다수 존재하였던 것으로도 추정된다.

방선균의 선택적 배양 및 다양성 분석

장수풍뎡이 유충의 분변 시료에서 총 53균주의 방선균을 순수 분리하였다. 일차적으로 분리된 방선균을 대상으로 color grouping을 통해 형태적으로 유사한 그룹을 분류하였다. 그 결과 53개의 균주는 10개의 multi-membered group과 6개의 single-membered group 등 모두 16개의 그룹으로 분류되었다

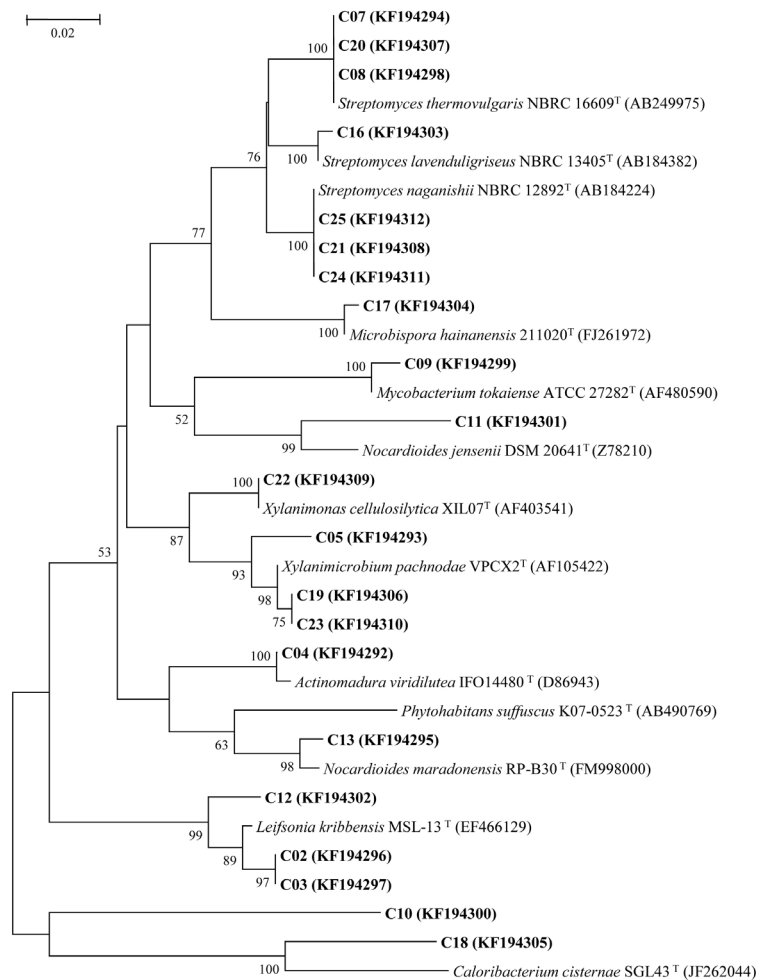


Fig. 2. Phylogenetic tree of uncultured actinomycetes and related actinobacterial type strains based on partial 16S rRNA gene sequences. The sequences were amplified by using Com2xf/Ac1186r primer set. Numbers above branches indicate bootstrap values of neighbor-joining analysis (>50%) from 1,000 replicates. The Scale bar corresponds to 0.02 substitutions per nucleotide position. *Rhodothermus salalexigens* ATCC 35888^T (D14431) was used as outgroup in this tree.

(자료 미제시). 그 중에서 aerial spore mass color가 light brown 이며 reverse color가 yellow, soluble pigment를 형성하지 않는 group이 14개 균주로 가장 많았다. 형태적 분류기준에 따라 53 균주 중 중복된 균주를 배제하고 27균주를 최종 선발하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하고 항균활성 및 생화학적 특성을 조사하였다.

선발된 27균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 EzBioCloud 데이터베이스에서 검색된 유사 균주들과 계통수를 작성하여 계통학적 다양성을 분석하였다(Fig. 3). 결정된 염기서열과 유사 표준균주간의 상동성은 98.7-100.0%의 범위에 있었으며, HW23 균주만 예외적으로 근연종인 *Microbacterium esteraromaticum*

DSM 8609^T와 95.8%의 낮은 상동성을 보여 새로운 종일 것으로 판단되었다. 분리 균주 중 89%에 해당하는 24균주가 *Streptomyces* 속으로 대부분을 차지하였고, *Amycolatopsis*, *Microbacterium*, *Nocardia* 속이 각각 1균주이었다. *Streptomyces* 속 균주들은 총 11개의 종과 유연관계가 높았으며, 특히 *S. deserti* C63^T, *S. costaricanus* NBRC 100773^T와 높은 상동성을 보이는 균주들이 각각 6개, 5개로 가장 많았다.

앞서 community DNA 유래의 clone library와 비교할 때, 배양적 접근 방법은 한계가 있었다. 가령, 모든 다양성 분석 결과에서 *Streptomyces* 속이 다른 속에 비해 우점하였으나, 비배양적 접근보다 배양적 접근에서 *Streptomyces* 속에 해당하는 균주들

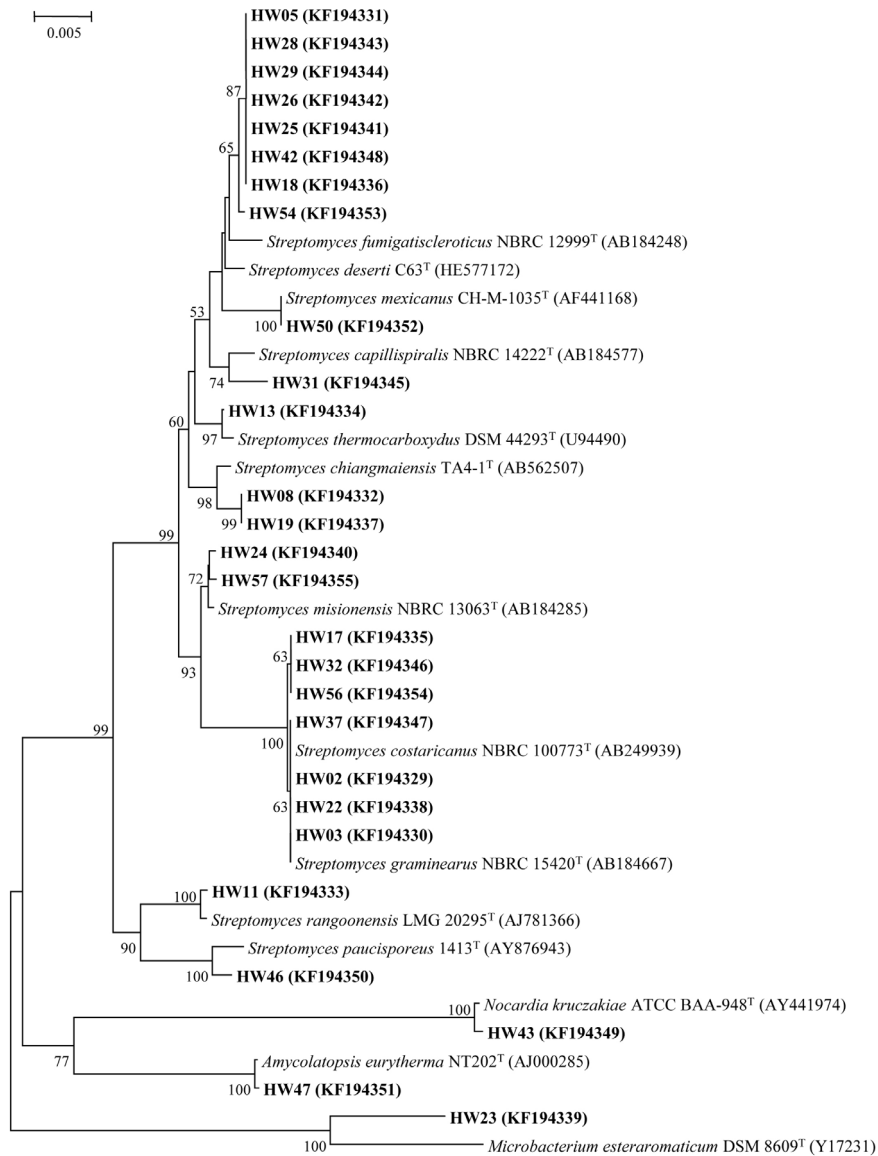


Fig. 3. Phylogenetic tree of representative isolates and related actinobacterial type strains based on almost full length of 16S rRNA gene sequences. Numbers above branches indicate bootstrap values of neighbor-joining analysis (>50%) from 1,000 replicates. The scale bar represents 0.005 substitutions per nucleotide position. *Rhodothalassium salexigens* ATCC 35888^T (D14431) was used as outgroup in this tree.

Table 1. Antimicrobial and biochemical properties of representative isolates.

+, positive; -, negative; the results of antimicrobial activities and hydrolysis test were determined by measuring the width of clear zone. +++, over 7 mm; ++, 3 mm-7 mm; +, 1 mm-3 mm; w, under 1 mm. FO=*Fusarium oxysporum* KACC 40037; CG=*Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40804; CA=*Candida albicans* Tu 164; SC=*Saccharomyces cerevisiae* 6A; EC=*Escherichia coli* DSM 5698; SA=*Staphylococcus aureus* DSM 20231; BS=*Bacillus subtilis* DSM 10.

| Isolates (HW-) | Detection of gene for secondary metabolites | | Antimicrobial activities | | | | | | Hydrolysis test | | | |
|-------------------|--|--------|--------------------------|-----|-------|-----|----------|-----|-----------------|--------|-----------|--------|
| | NRPS | PKS- I | Fungi | | Yeast | | Bacteria | | | Casein | Cellulose | Chitin |
| | | | FO | CG | CA | SC | EC | SA | BS | | | |
| 2 | + | + | +++ | +++ | ++ | +++ | - | +++ | +++ | + | +++ | - |
| 3 | + | - | ++ | +++ | ++ | +++ | - | +++ | +++ | + | +++ | - |
| 5 | + | + | - | - | - | - | - | - | w | + | +++ | - |
| 8 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | ++ | - |
| 11 | + | + | - | - | - | - | - | - | + | ++ | - | - |
| 13 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | +++ | - |
| 17 | + | + | ++ | +++ | ++ | +++ | - | +++ | +++ | + | +++ | - |
| 18 | + | + | - | - | - | - | - | w | + | + | +++ | - |
| 19 | + | - | + | + | - | - | - | - | +++ | - | ++ | - |
| 22 | + | + | +++ | +++ | ++ | ++ | - | +++ | +++ | + | +++ | - |
| 23 | + | - | - | - | w | - | - | - | w | +++ | +++ | - |
| 24 | + | + | ++ | +++ | ++ | - | w | w | ++ | - | - | - |
| 25 | + | + | - | - | - | - | - | w | w | ++ | +++ | - |
| 26 | + | + | - | - | - | - | - | w | w | + | +++ | - |
| 28 | + | - | - | - | - | - | - | w | w | + | +++ | - |
| 29 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | +++ | - |
| 31 | + | + | ++ | ++ | - | - | w | ++ | ++ | + | - | - |
| 32 | + | + | +++ | +++ | ++ | +++ | - | +++ | +++ | + | +++ | - |
| 37 | + | - | ++ | +++ | ++ | ++ | - | +++ | +++ | + | +++ | - |
| 42 | + | + | - | - | - | - | - | w | w | ++ | +++ | - |
| 43 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 46 | + | + | +++ | + | w | - | - | - | - | + | - | - |
| 47 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | ++ | - | - |
| 50 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | +++ | - |
| 54 | + | + | - | - | - | - | - | w | + | ++ | +++ | - |
| 56 | + | + | + | +++ | ++ | +++ | - | +++ | +++ | + | +++ | - |
| 57 | + | - | - | + | - | - | - | - | - | + | ++ | - |

의 우점도가 확연히 컸다. 이러한 결과가 나타난 것은 방선균을 분리하기 위해 사용한 starch- casein agar (SCA)가 다른 방선균 분류군에 비해 *Streptomyces*의 생육조건에 더 적합하여 생육속도가 빠르기 때문에 나타난 결과로 추정된다(Mackay, 1977).

분리 균주들의 항균활성 및 생화학적 특성

최종 선발된 27균주를 대상으로 항균활성능과 생화학적 특성에 대한 실험 결과를 Table 1에 나타내었다. 전체적으로 진균과 그람양성 세균에 대한 항균활성이 높았고, 그람음성 세균의 경우에는 낮았다. 사상균인 *Colletotrichum gloeosporioides* KACC 40804와 *Fusarium oxysporum* KACC 40037는 각각 11개의 균주에 의해 저해되었고, 효모인 *Candida albicans* Tu164는 8개, *Saccharomyces cerevisiae* 6A는 7개 균주에 의해 저해되었다. 그람양성 세균인 *Bacillus subtilis* DSM 10, *Staphylococcus aureus* DSM 20231에 대해서는, 각각 8개와 13개 균주에서 항균활성을 관찰할 수 있었다. 반면, 그람음성 세균인 *Escherichia coli* DSM 5698에는 단지 2균주(HW24, HW31)만이 낮은 항균활성을 보였다.

대부분의 검정균주에 대하여 항균활성을 보인 균주는 HW02, HW03, HW17, HW32, HW37, HW56인데, 이들 그룹은

Streptomyces costaricanus NBRC 100773^T와 *Streptomyces graminearus* NBRC 15420^T와 가장 높은 상동성을 나타낸 균주들로 계통도상에서도 유사한 그룹으로 분류되었다. 이것은 높은 항균활성을 나타낸 균주들이 계통학적으로도 분명한 유연관계가 있음을 시사한다. 근연 표준균주인 *S. costaricanus* NBRC 100773^T의 경우, Costa Rica 지역에서 선충에 대한 생장억제 효과가 있는 토양(nematode-suppressive soil)으로부터 최초로 발견된 균주로서 선충과 곰팡이에 길항작용을 나타내는 특성을 보유하고 있다(Esnard et al., 1995). 이 균주는 자유생활성 선충 *Caenorhabditis elegans*의 번식을 특이적으로 저해하여 선충 생물방제제로서 특허가 등록되어있다(Chen et al., 2000). 따라서 본 연구를 통해 분리한 선발 균주들도 유사한 항선충 및 항균 활성을 나타낼 것으로 예상된다.

이차 대사산물 생산에 관여하는 유전자인 NRPS (Non-ribosomal peptide synthetase)와 PKS-I (Type-I Polyketide synthase) 유전자를 검출하기 위하여 PCR 실험을 수행한 결과, 모든 분리 균주에서 NRPS 유전자에 대한 검출 반응이 확인되었다. PKS-I 유전자의 경우, 27균주 중 15균주(56%)가 검출반응을 나타내었다. 항균활성이 우수한 것으로 판별된 균주들은 대부분 PKS-I 유전자 검출 실험에서 양성반응을 나타냈으나 HW03 균주와 HW37

균주에서는 유전자가 검출되지 않았다. 따라서 대부분의 균주가 이차 대사산물 생산에 관여하는 생합성 유전자를 보유하고 있다는 것을 입증한다.

선발 균주들의 생화학적 특성을 규명하기 위해 카제인, 셀룰로오스, 키틴에 대한 가수 분해능을 분석하였다(Table 1). 카제인 분해능에 양성반응을 나타낸 것은 27균주 중 21균주로 대부분의 균주가 단백질 분해능력을 보였다. 특히 HW23 균주가 특징적으로 매우 신속하고 높은 활성을 보였는데, 이 균주는 *Microbacterium esteraromaticum*의 표준균주와 낮은 상동성(95.8%)을 보인 신종 후보 균주이다. 셀룰로오스 가수분해능 실험에서 양성반응을 나타낸 것은 27균주 중 21균주(78%)로, 전반적으로 매우 강한 양성반응을 나타냈다. 이를 통해 분리된 균주들 대부분이 cellulase를 생산하는 것으로 나타났다. 이는 장수풍뎡이 유충의 먹이 및 생태적 특징을 고려할 때 섬유질을 분해하는 활성을 갖는 방선균들이 중요한 역할을 하고 있다는 것을 의미한다. 키틴 가수분해능 실험에서는 모든 균주에서 양성반응이 관찰되지 않았다.

결론적으로 장수풍뎡이 유충 분변에는 다양한 방선균이 서식하고 있으며, 이들 방선균은 높은 항균 활성능과 대사능을 보유하고 있어 향후 유용한 생물소재로 활용될 수 있음이 본 연구를 통해서 확인되었다.

적요

방선균은 의약, 농업 및 식품 생산 등에 유용하게 사용되는 이차대사물질을 생산하는 미생물 자원으로 자연환경 내에서 많은 생물들과 긴밀한 상호작용을 유지하고 있다. 본 연구에서는 장수풍뎡이 유충의 분변에 존재하는 방선균의 다양성과 기능성을 조사하기 위해서 비배양적 접근과 배양적 방법으로 실험을 수행하였다. 먼저 시료로부터 직접 추출한 community DNA에서 방선균-특이 primer를 이용하여 방선균의 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭, 클로닝한 후에 각 clone에 삽입된 염기서열을 분석하였다. 총 37개의 염기서열을 얻었으며 계통분류학적 분석을 수행한 결과, 15속 24종으로 분류되었다. 아울러 53개의 방선균 균주를 장수풍뎡이 유충 분변으로부터 분리하였다. 형태학적 특징을 비교하여 최종적으로 27개의 균주를 선발하여 다양성, 항균활성 및 생화학적 특징을 검정하였다. 분리된 균주들은 4속 14종으로 분류되었으며, 24균주(89%)는 *Streptomyces* 속으로 분류되었다. 대다수의 균주들이 식물병원성 곰팡이와 그람양성 세균에 대해 길항 효과를 보였다. 또한 많은 균주들이 셀룰로오스와 카제인을 분해하는 생화학적 특징을 보였다. 본 연구를 통해, 장수풍뎡이 유충의 분변 시료로부터 다양한 방선균이 분리될 수 있으며, 분리된 균주들은 다양한 항균효과 및 효소활성을 지니고 있다는 것을 확인하였다. 결론적으로 본 연구는 장수풍뎡이와 같은 곤충의 장과 분변은 다양한 방선균의 서식처이며, 이곳에서 유용한 생리활성 물질을 발견할 수 있다는 것을 제시한다.

감사의 말

이 논문은 농촌진흥청 국립농업과학원 공동연구사업(과제번호:

PJ00898701)과 2012년 교과부 지원 경희대학교 Study in Field 프로그램의 재원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Antony-Babu, S., Stach, J., and Goodfellow, M. 2010. Computer-assisted numerical analysis of colour-group data for dereplication of streptomycetes for bioprospecting and ecological purposes. *Antonie van Leeuwenhoek* **97**, 231-239.
- Bérty, J. 2005. Bioactive microbial metabolites: A personal view. *J. Antibiot.* (Tokyo). **58**, 1-26.
- Cazemier, A.E., Verdoes, J.C., Reubsaet, F.A., Hackstein, J.H., van der Drift, C., and Op den Camp, H.J. 2003. *Promicromonospora pachnodae* sp. nov., a member of the (hemi)cellulolytic hindgut flora of larvae of the scarab beetle *pachnoda marginata*. *Antonie van Leeuwenhoek* **83**, 135-148.
- Chaiyaso, T., Kuntiya, A., Techapun, C., Leksawadi, N., Seesuriyachan, P., and Hanmoungjai, P. 2011. Optimization of cellulase-free xylanase production by thermophilic *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948 through plackett-burman and response surface methodological approaches. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 531-537.
- Chen, J., Abawi, G.S., and Zuckerman, B.M. 2000. Efficacy of *Bacillus thuringiensis*, *Paecilomyces marquandii*, and *Streptomyces costaricanus* with and without organic amendments against *Meloidogyne hapla* infecting lettuce. *J. Nematol.* **32**, 70-77.
- Chung, M.Y., Kwon, E.Y., Hwang, J.S., Goo, T.W., and Yun, E.Y. 2013. Establishment of food processing methods for larvae of *Allomyrina dichotoma*, Korean horn beetle. *J. Life Sci.* **23**, 426-431.
- Esnard, J., Potter, T.L., and Zuckerman, B.M. 1995. *Streptomyces costaricanus* sp. nov., isolated from nematode-suppressive soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 775-779.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Goodfellow, M. 2010. Selective isolation of *Actinobacteria*, pp. 13-27. In Baltz, R.H., Demain, A.L., and Davies, J.E. (eds.), *Manual of industrial microbiology and biotechnology* ASM Press, Washington, D.C., USA.
- Goodfellow, M., Lacey, J., Athalye, M., Embley, T.M., and Bowen, T. 1989. *Saccharopolyspora gregorii* and *Saccharopolyspora hordei*: Two new actinomycete species from fodder. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 2125-2139.
- Goodfellow, M., Maldonado, L.A., and Quintana, E.T. 2005. Reclassification of *Nonomuraea flexuosa* (meyer 1989) Zhang et al. 1998 as *Thermopolyspora flexuosa* gen. nov., comb. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1979-1983.
- Hayakawa, M. 2008. Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. *Actinomycetol.* **22**, 12-19.
- Hopwood, D.A. 2006. Soil to genomics: The *Streptomyces* chromosome. *Annu. Rev. Genet.* **40**, 1-23.
- Jog, R., Nareshkumar, G., and Rajkumar, S. 2012. Plant growth promoting potential and soil enzyme production of the most abundant *Streptomyces* spp. from wheat rhizosphere. *J. Appl. Microbiol.* **113**, 1154-1164.
- Kikuchi, Y. 2009. Endosymbiotic bacteria in insects: Their diversity and culturability. *Microbes Environ.* **24**, 195-204.
- Kim, J.I. 1998. Insect's life in Korea (III) Coleoptera., p. 55. Korea University, Seoul, Korea.
- Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C.,

- Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S., and Chun, J. 2012. Introducing eztaxon-e: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 716–721.
- Kim, H.G. and Kang, K.H. 2005. Bionomical characteristic of *Allomyrina dichotoma*. *Korean J. Appl. Entomol.* **44**, 207–212.
- Kim, B.Y., Kshetrimayum, J.D., and Goodfellow, M. 2011. Detection, selective isolation and characterisation of *Dactylosporangium* strains from diverse environmental samples. *Syst. Appl. Microbiol.* **34**, 606–616.
- Kim, S.H., Kwon, S.H., Park, S.H., Lee, J.K., Bang, H.S., Nam, S.J., Kwon, H.C., Shin, J., and Oh, D.C. 2013. Tripartin, a histone demethylase inhibitor from a bacterium associated with a dung beetle larva. *Org. Lett.* **15**, 1834–1837.
- Kim, B., Sahin, N., Minnikin, D.E., Zakrzewska-Czerwinska, J., Mordarski, M., and Goodfellow, M. 1999. Classification of thermophilic streptomycetes, including the description of *Streptomyces thermoalcalitolerans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49** Pt 1, 7–17.
- Kim, B.Y., Zucchi, T.D., Fiedler, H.-P., and Goodfellow, M. 2012. *Streptomyces staurosporininus* sp. nov., a staurosporine-producing actinomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 966–970.
- Kinkel, L.L., Schlatter, D.C., Bakker, M.G., and Arenz, B.E. 2012. *Streptomyces* competition and co-evolution in relation to plant disease suppression. *Res. Microbiol.* **163**, 490–499.
- Mackay, S.J. 1977. Improved enumeration of *Streptomyces* spp. On a starch casein salt medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 227–230.
- Mccarthy, A.J. and Williams, S.T. 1992. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment - a review. *Gene* **115**, 189–192.
- Morales, D.K., Ocampo, W., and Zambrano, M.M. 2007. Efficient removal of hexavalent chromium by a tolerant *Streptomyces* sp. affected by the toxic effect of metal exposure. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 2704–2712.
- O'Brien, J. and Wright, G.D. 2011. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 552–558.
- Oh, D.C., Poulsen, M., Currie, C.R., and Clardy, J. 2009. Dentigerumycin: A bacterial mediator of an anti-fungus symbiosis. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 391–393.
- Olano, C., Méndez, C., and Salas, J.A. 2009. Antitumor compounds from marine actinomycetes. *Mar. Drugs* **7**, 210–248.
- Park, D.S., Footitt, R., Maw, E., and Hebert, P.D. 2011. Barcoding bugs: DNA-based identification of the true bugs (*insecta: Hemiptera: Heteroptera*). *PLoS ONE* **6**, e18749.
- Puhl, A.A., Selinger, L.B., McAllister, T.A., and Inglis, G.D. 2009. *Actinomadura keratinilytica* sp. nov., a keratin-degrading actinobacterium isolated from bovine manure compost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 828–834.
- Rivas, R., Sanchez, M., Trujillo, M.E., Zurdo-Pineiro, J.L., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., and Velazquez, E. 2003. *Xylanimonas cellulositytica* gen. nov., sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from a decayed tree (*Ulmus nigra*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 99–103.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
- Schäfer, J., Jäckel, U., and Kämpfer, P. 2010. Development of a new per primer system for selective amplification of actinobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **311**, 103–112.
- Scott, J.J., Oh, D.C., Yuceer, M.C., Klepzig, K.D., Clardy, J., and Currie, C.R. 2008. Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. *Science* **322**, 63.
- Seipke, R.F., Barke, J., Brearley, C., Hill, L., Yu, D.W., Goss, R.J., and Hutchings, M.I. 2011. A single *Streptomyces* symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *PLoS ONE* **6**, e22028.
- Seipke, R.F., Kaltenpoth, M., and Hutchings, M.I. 2012. *Streptomyces* as symbionts: An emerging and widespread theme? *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 862–876.
- Stach, J.E.M., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Goodfellow, M., and Bull, A.T. 2003. New primers for the class *Actinobacteria*: Application to marine and terrestrial environments. *Environ. Microbiol.* **5**, 828–841.
- Stackebrandt, E. and Schumann, P. 2004. Reclassification of *Promicromonospora pachnodae* Cazemier *et al.* 2004 as *Xylanimicrobium pachnodae* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1383–1386.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. Mega4: Molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596–1599.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. 1997. The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876–4882.
- Wang, Y., Zhang, Z., and Ruan, J. 1996. A proposal to transfer *Microbispora bispora* (lechevalier 1965) to a new genus, *Thermobispora* gen. nov., as *Thermobispora bispora* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 933–938.
- Xu, X.X., Wang, H.L., Lin, H.P., Wang, C., Qu, Z., Xie, Q.Y., Ruan, J.S., and Hong, K. 2012. *Microbispora hainanensis* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Excoecaria agallocha* in a mangrove. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 2430–2434.
- Yoon, M.H., Ten, L.N., Im, W.T., and Lee, S.T. 2008. *Cellulomonas chitinilytica* sp. nov., a chitinolytic bacterium isolated from cattle-farm compost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 1878–1884.