

GOVP1200509960

과제번호 : M101HA020002-01H0102-00220

한 · 중 생명공학 협력센터 사업
KOREA-CHINA BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY
COOPERATION CENTER

유용물질 생산균주 개발, 검증 및 교류협력
Development, verification and facilitate exchange of strains which
produce useful compounds

명 지 대 학 교

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 " 유용물질 생산균주 개발, 검증 및 교류협력" 과제의 보고서로 제출합니다

2002. 8

주관연구기관명 : 명지대학교

주관연구책임자 : 서 주 원

연 구 원 : 김경록외 20명

보고서 초록

과제관리번호	M101HA020002-01H0102-00220	해당단계 연구기간	1999.9~2002.8	단계 구분	1단계 / 2단계
연구사업명	중 사업명	국책연구개발사업			
	세부사업명	한중생명공학협력사업			
연구과제명	중 과 제 명				
	세부(단위)과제명	유용물질 생산균주 개발, 검증 및 교류협력			
연구책임자	서 주 원	해당단계 참여연구원수	총 : 22 명 내부 : 5 명 외부 : 17 명	해당단계 연구비	정부: 190,000 천원 기업: 10,000 천원 계: 200,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	명 지 대 학 교		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 : 중국		상대국연구기관명 : Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry		
위 탁 연 구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
68					
<p>선진국들은 열대지역으로부터 극지방에 이르기까지 조직적으로 생물자원 탐색 작업을 수행하고 있는 상황으로 국내에서도 생물자원의 무기화, 전략화에 능동적이고 적극적으로 대비하기 위하여 보다 장기적이고 체계적인 계획 하에 생물자원의 확보 또는 생물자원을 분리·확보가 필요함. 중국은 복잡한 지형과 기후를 가진 광대한 국가로서, 북쪽에서 남쪽까지 냉대, 온대, 열대 지역이 분포해 있고 중국의 대부분 지역은 빙하작용에 영향을 받지 않았기 때문에 풍부한 생물자원을 보유하고 있어 브라질 등과 함께 세계적인 생물자원 부국 중 하나임. 이에 중국의 산업 유용 균주 및 산업적으로 필요한 균주를 조사하여 국내에 도입하고 동시에 국내에서 산업화된 균주의 중국수출 및 국내 도입한 균주의 유용성 확인하고 중국내 다양한 미생물 자원 분리하고 유용자원의 국내도입을 추진하였음.</p> <p>세부적으로 한중 생명공학 산업내에서 필요로 하는 유용균주를 조사하고 이를 물질별, 생산 균주별로 분류하고 이들을 검증할 수 있는 검증 시스템을 확립하여 가동. 유용 산업균주 도입 및 수출을 비롯한 교류 협력으로 유용 산업균주를 필요로 하는 한국과 중국내 수요처를 조사하고 이에 대한 정보를 한중생명공학협력센터 home page(http://kcbbcc.kribb.re.kr/korean/main.html)에 공개하고 생리활성이 검증된 균주의 국내 도입 및 수출을 포함하는 교류협력의 증진하고자 하였음. 또한, 중국토양을 기후, 식생별로 Sample을 채취하고 이들로부터 회귀방선균을 비롯한 토양 미생물을 분리하고 수집된 미생물로부터 유용물질 생산균주를 분리를 진행중임. 이러한 협력사업을 통하여 중국내 다양한 미생물자원 공동이용을 통한 국내생물산업발전을 도모하고 양국에 유익한 협력사업발굴을 통한 국익창출이 기대됨.</p>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	생명공학, 생물자원교류, 생물자원 탐색, 생리활성물질, 회귀방선균, 검증			
	영 어	Biotechnology, Bioresorce exchange, Bioresorce screening, Bioactive compounds, rare actinomycetes, Examination			

요 약 문

I. 제 목

미생물자원교류협력 사업

II. 연구개발의 목적 및 필요성

미국, 일본, 유럽 등 선진국들은 열대지역으로부터 극지방에 이르기까지 조직적으로 생물자원 탐색 작업을 수행하고 있는 상황으로 국내에서도 생물자원의 무기화, 전략화에 능동적이고 적극적으로 대비하기 위하여 보다 장기적이고 체계적인 계획 하에 생물자원의 확보 또는 생물자원을 분리할 수 있는 천연자원의 확보가 절실하다. 중국은 복합적인 지형과 기후를 가진 광대한 국가로서, 북쪽에서 남쪽까지 냉대, 온대, 열대 지역이 분포해 있고 중국의 대부분 지역은 빙하작용에 영향을 받지 않았기 때문에 풍부한 생물자원을 보유하고 있어 브라질 등과 함께 세계적인 생물자원 부국 중 하나이다.

이에 중국의 산업유용 균주 및 산업적으로 필요한 균주를 조사하여 국내에 도입하고 동시에 국내에서 산업화된 균주의 중국수출 및 국내 도입한 균주의 유용성 확인하고자 하였고 중국내 다양한 미생물 자원 분리하고 유용자원의 국내도입을 추진하였다.

중국으로부터 최대한 다양한 미생물자원을 분리/도입하기 위하여 중국내 여러 대학 및 연구기관과 지속적인 접촉을 유지하고 다양한 기후 및 식생을 가진 지역으로부터 토양 sample을 채취하여 국내로 도입하여 생물자원화를 꾀하였다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 한중 생명공학산업에서 유용미생물 균주조사 및 유용 균주검증 시스템 확립 및 가동
 - 한중 생명공학산업내에서 필요로 하는 유용균주를 조사하고 이를 물질별, 생산균주별로 분류하고 이들을 검증할 수 있는 검증 시스템을 확립하여 가동
- 유용 산업균주 도입 및 수출을 비롯한 교류 협력
 - 유용 산업균주를 필요로 하는 한국과 중국내 수요처를 조사하고 생리활성이 검증된 균주의 국내 도입 및 수출을 포함하는 교류협력의 증진
 - 중국내 다양한 미생물자원 수집 및 정보교류
- 중국내 특이 생태계에서 토양 세균 수집 및 균주분리
 - 중국토양을 기후, 식생별로 Sample을 채취하고 이들로부터 희귀방선균을 비롯한 토양미생물을 분리하고 수집된 미생물로부터 유용물질 생산균주를 분리
- 중국내 다양한 미생물자원 공동이용을 통한 국내생물산업발전을 도모하고 양국에 유익한 협력사업발굴을 통한 국익창출

IV. 연구개발 결과

○ 한중간 유용 산업균주교류를 위하여 한국생명공학연구원과 공동으로 중국내 생명공학기술보유 연구소, 대학, 기업에 대한 조사를 통하여 1,000개의 관련기관에 대한 정보를 database화 하여 한중생명공학협력센터 home page : <http://kcbbcc.kribb.re.kr/korean/main.html>에 정리하여 공개하였고 대중국 관련 유용 산업균주 보유 및 수요 조사를 통하여 항생제 Teichoplanin은 최근 내성세균의 증가로 시급히 필요한 항생제로서 본 사업을 통하여 중국으로부터 국내 모회사(기업 사업 비밀상 추후 공개)에 균주 및 기술이 도입되도록 주선하여 계약이 체결되는 성과를 거두었다. 이를 통하여 활성 검증 및 기술성 검토와 중국으로부터 이러한 유용균주 및 기술을 도입하는 교류시스템이 본격적으로 가동되었고 현재는 항생제중 Kanamycin과 고지혈증 치료제인 Pravastatin등 19개 품목에 대해 해당 생산균주 및 기술 도입에 대한 협의가 진행중이다.

○ 중국 내로부터 지역별, 기후별, 식생별로 각 90개 지역에서 토양 시료를 채취하여 국내로 도입하였다. 이들로부터 현재 인류가 사용하고 있는 대부분의 항생제를 비롯한 유용물질의 원천인 방선균을 집중적으로 분리하기 위하여 미리 토양미생물 protocol을 확립하였고 이 방법을 통하여 중국토양으로부터 1,000여균주의 방선균을 분리하였다. 우선 생물활성검증을 통하여 강력한 항미생물 및 항진균활성을 갖는 미생물10여종을 분리하여 자세한 연구중에 있다. 16S rRNA 분석을 통해 신종으로 사료되는 회귀방선균 *Kitasatospora* sp. 383 균주로부터 황색포도상구균등에 강력한 활성을 갖는 물질에 대한 연구가 진행 중에 있다.

V. 연구결과의 활용계획

중국은 최근 개방정책과 생명공학 집중육성이 정부 주도로 실시되고 있고 한국 또한 생명공학의 벤처회사와 연구소를 중심으로 많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 시점에서 두 나라간의 생명공학교류를 위한 정부차원의 교류는 두 나라간의 생명공학산업발전에 크게 이바지할 것으로 사료된다. 중국으로부터의 미생물자원과 토양으로부터 분리한 방선균으로부터 강력한 항생물질을 비롯한 부가가치를 창출할수 있는 유용물질을 분리할수있을것으로 사료되며 미확인된 신종의 회귀방선균도 분리되고 있어 학술적인 면에서도 많은 연구의 활성화가 기대된다.

SUMMARY

In order to survey and investigation of Korea and China industrial strains and exploiting diverse resources of microorganisms of two countries, Korea–China Microbial Resources Exchange project was carried out. In this work, we focused on isolation of rare actinomycetes because they are rich sources of a variety of bioactive natural products. Screening for novel actinomycetes in Chinese soil has been made to discover new bioactive compounds. Until now, we have isolated 670 bacteria and 350 actinomycetes strains. Paper disc bioassay method was used for testing their activity. 9 strains were selected and analyzed by their 16S rRNA genes to investigate the phylogenetic diversity of the screened actinomycetes. One strain named MJM3 was classified as a novel species of the genus *Kitasatospora* within the order *Actinomycetales* based on the 16S rRNA gene sequence analysis and the comparison of physiological characteristics. In addition, our bioassay system of antibiotics resistance strains showed that an antibacterial agent is produced by strain MJM3 and the structure of that compound and mechanism of action are under investigation.

C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction	1
Chapter 2. Domestic and foreign status of research and development	4
Chapter 3. Content and results of research	13
1. Establishment of the system for exchange of potent and useful industrial microorganism and examination	20
2. Gathering of soil from chinese ecosystem and Isolation of rare actinomycetes.	13
Chapter 4. Evaluation of performance and significance	41
Chapter 5. Application plan of results	43
Chapter 6. Information of foreign science and technology obtained from research and development process	65
Chapter 7. References	67

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	1
제 2 장	국내외 기술개발 현황	4
제 3 장	연구개발수행내용 및 결과	13
제 1 절	유용미생물자원 산업균주 교류 및 검증 시스템	13
제 2 절	중국 희귀생태계로부터 토양수집 및 희귀 방선균의 분리	20
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	53
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	54
	특정연구개발사업 연구결과 활용계획서	
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	65
제 7 장	참고문헌	67

제 1 장 서 론

산업적으로 유용한 균주의 개발에는 많은 시간과 노력 또한 재정적 지원이 필요하다. 그러나 이미 다른 나라에서 개발된 유용균주나 중간단계의 산업균주의 확보가 가능하다면 이는 국내 현실상 아주 효율적일 것이라 생각된다. 이러한 관점에서 중국은 거대한 인구로 인해 수많은 연구인력과 연구소가 존재하며 새로운 미생물분리와 유용 미생물에 대한 연구가 오래 전부터 꾸준히 활발하게 이어져 유용산업균주의 개발, 대량 생산을 위한 발효공정이나 활성물질 분리방법의 개발 등 풍부한 실용화 경험으로 인해 미생물산업이 상당 수준으로 발달되어 있다. 또 국제 특허제도의 가입이 늦었기 때문에 그동안 미국이나 일본 러시아 등 다른 외국에서 개발된 유용산업 균주의 모방개발이나 유용물질 생산공정의 모방 등으로 인해 우리나라보다는 훨씬 다양한 산업균주가 개발, 소장되어 있으며 유용균주에 대한 기술정보 또한 축적된 것이 많다. 따라서 산업적으로 유용한 균주개발에는 막대한 예산과 시간이 필요하므로 수많은 중국연구소 등에 이미 개발 완료되었거나 연구중간단계의 균주들에 대한 자료를 입수하여 국내 연구기관이나 회사 등에서 이용할 수 있다면 이는 상당한 경제적, 기술적 이익을 가져 올 수 있다고 생각된다. 따라서 중국 측 유용산업균주에 대한 정보를 조사 입수해 국내에 그 자료를 배포하고 수요처를 조사하여 필요한 국내의 기업이나 연구기관이 경제적으로 이용할 수 있도록 유도하고 활성검증 및 가격자문 등을 수행해 주고 또 반대로 국내의 연구기관이나 회사에서 중국에 진출하고자 하는 균주들을 조사하여 그 자료를 중국 측에 배포하여 요청이 있는 균주에 대한 진출활로도 개척해주는 역할을 할 수 있는 시스템이 필요하다고 생각된다.

이러한 일을 담당하는 기관으로서는 산업체나 정부출연 연구소보다는 영리추구 단체가 아니면서 정부의 통제를 받지 않는 대학연구소가 더 적당할 것으로 사료된다. 이는 만약 정부관련기관이 주도할 경우 행정적인 법규 등으로 기동성이 떨어질 수 있으며 또한 추후 어떤 분쟁의 소지가 있을 경우 국가 간의 문제로 발생되어 외교문제로까지 비약될 수도 있기 때문이다. 또 만약 민간기업에서 주도 할 경우 영리단체이므로 산업균주들을 안심하고 맡기기가 힘들고 신뢰도가 떨어질 수 있는 문제점이 있다. 따라서 대학부설 연구소 단위에서 이러한 한중 교류협력을 추진한다면 이미 학술적 기술적인 지식이 축적된 연구기관이므로 객관적이고 공신력 있게 유용산업균주에 대한 검증을 할 수 있을 것이며 이윤추구를 떠나서 공정하게 교류균주에 대한 가격자문 및 과학적 검증을 할 수 있을 것이다.

토양세균인 방선균(Actinomycetes)은 다양한 세포외 효소와 항생물질로 대표되는 생리활성 물질을 생산하는 유용균주로서 지금까지 사용되고 있는 항생물질의 70% 이상을 생산하고 있다. 그러나 새로운 감염질환의 발생과 현재 사용되고 있는 약제에 대해 병원균이 내성을 나타냄으로 실제 투약농도가 점점 증가하고 있으며 또 중요 약제들의 독성으로 인한 부작용 등으로 인해 신규 생리활성물질의 요구가 급증하고 있다. 따라서 방선균이나 다른 세균, 곰팡이로부터 탁월한 활성을 가진 새로운 생리활성물질을 얻기 위해 현재에도 토양으로부터 새로운 균을 분리하려는 노력을 하고 있다. 그러나 이미 분리된

물질이 다시 발견되는 비율이 증가하고 있기 때문에 새로운 종의 토양균을 분리한다는 것은 신규생리활성물질 탐색가능성이 높다는 것을 의미하며 이는 곧 극한 환경의 지역이나 해양 등지에서 신종의 세균을 탐색하려는 시도로 연결되고 있다.

중국은 국토면적이 약 960만 km²로 남북한 면적의 45배 남한의 약 100배나 되는 광활한 지역을 가지고 있으며 기후조건 역시 다양하여 아열대, 온대, 아한대 등이 분포되어 건조한 사막에서부터 우림지역 등으로 토양의 분포 또한 다양함과 동시에 그로 인해 다양한 생태계가 형성되어 새로운 토양세균을 분리할 가능성이 높은 종다양성을 가진 넓은 지역이다. 그러므로 미국과 일본은 이미 다양한 자연환경을 가지고 있는 중국과 교류 협력을 하여 중국 토양 내에서의 새로운 균 분리시도나 이미 개발된 많은 유용산업균주 자원의 확보를 위해 노력하고 있다. 그러나 우리 나라는 지리적으로는 가장 인접해 있으면서도 중국과의 구체적인 접촉창구가 없어 실질적인 교류가 활성화되지 못하고 있는 실정이다.

그러므로 한중생명공학 연구교류협력 사업을 활용하여 중국내 변방지역의 특이생태계로부터 특이한 미생물의 분리를 위하여 토양시료를 채취하고 분리하여 미생물 서식환경의 물리·화학적 특성의 변동 없이 특정 생태계의 특성(온도, 습도, 물 등)을 반영한 회귀 미생물의 분리효율을 획기적으로 높이는 것이 중요하다. 토양시료 채취 후 실험실로 이송하여 미생물 분리를 실시할 경우 분리 가능한 개체수가 평균 1/5 - 1/10 정도로 감소하는 경향이 있으며 특히 회귀 생태계, 극한 생태계의 경우 그 감소율이 1/20 - 1/50까지 이르기까지도 한다. 따라서 회귀 생태계로부터 유용미생물을 효율적으로 분리해 내기 위해서는 토양 채취 현장에서 그 생태계의 특성(기후, 영양, 물, 온도 등)을 반영시킨 분리방법을 적용하여 즉시 분리를 시도하여야 하므로 중국 현지를 직접 방문하여 분리를 시도하는 것이 중요하다.

따라서 한중교류 협력의 효과적인 성과를 위해 다양한 자연환경을 가진 중국과의 교류협력으로 국내에서 개발하지 못한 것이나 개발을 시도하려는 유용 미생물균주를 우선 확보할 수 있도록 하여 산업화를 시도함으로써 고부가가치의 상품화를 할 수 있는 유용 산업균주 자원을 조사 섭외 연결해줌으로서 생물산업의 선도화를 추구하는데 일조할 수 있을 것이다. 또 한편 광활한 지역으로 인해 다양한 생물환경을 가진 중국토양에서 균분리를 시도함으로써 새로운 구조와 탁월한 생리활성을 가진 유용물질 생산균주를 찾고자 한다.

유용산업 균주의 개발에는 사실 많은 시간과 돈, 연구인력이 필요하다. 그러나 이미 중국에서 개발되어 소장하고 있는 생물산업 유용 균주의 교류로 국내에서 개발하지 못한 것이나 개발을 시도하려는 유용 미생물균주를 확보할 수 있다면 많은 경제적 이익을 얻을 수 있을 것이다. 즉 중소기업 규모의 산업체는 연구지원자금부족, 인력의 부족, 의사소통의 문제 등으로 인해 외국의 유용균주와 같은 산업자원에 대한 정보를 입수하기가 쉽지 않다. 따라서 이러한 문제를 해결해 줄 수 있는 한중교류협력과 같은 채널을 통해 유용 산업균주 자원을 조사 섭외 연결해줌과 동시에 유용균주에 대한 신뢰성 있는 검증, 가격 자문 및 절충 등으로 국내 수요처 특히 산업체에 공급되어 고부가가치 생리활성물질 생

산으로 이어진다면 이는 국내 생물산업의 활성화 및 선도화를 추구하는데도 일조할 수 있을 것으로 사료된다. 또 한편 광활한 지역으로 인해 다양한 생물환경을 가진 중국토양으로부터 특이 미생물을 다수 확보함으로써 신규 생리활성물질 스크리닝의 가능성을 높이며 국외의 토양 미생물을 효율적으로 확보하여 새로운 구조와 탁월한 생물활성을 가진 유용물질 생산균주를 찾는다면 이는 막대한 경제적 산업적 효과가 기대된다고 하겠다. 중국의 체제·문화의 특성상 외국인의 활동에 제약이 있으므로, 중국측 연구자와 공동연구를 통한 교류협력사업으로 이를 극복하고자 하며 이러한 한중교류사업의 활동은 양국간의 사회와 문화를 알리고 이해하는데도 도움이 될 것이라 생각된다.

중국은 세계에서 가장 다양한 유용생물자원을 가지고 있는 나라이며 최근 세계적으로 바이오 산업의 급성장과 함께 유용생물자원에 대한 가치를 재인식하기에 이르렀다. 이에 따라 세계 유수의 기업들과 연구자들이 중국과 공동연구를 추진하거나 개발 사업에 참여하고자 접근하고 있다. 우리나라에서도 현재 많은 한중기술협력사업이 추진되고 있으나 본 협력 사업과 같이 중국에서 실제적으로 공동사업비를 대면서 적극적으로 맺어진 과제는 극히 희귀하다. 그러므로 본 사업은 앞으로 한중간 기술협력사업 중 아주 성공적인 협력사업으로 발전될 것이 확실하며 Biotech산업분야에서 양국의 국익에 많은 도움이 될 수 있는 성과가 도출될 것으로 기대된다.

제 2 장 국내외 연구개발동향

현재 사용되고 있는 의약품과 식품류의 약 70%는 미생물로 생산되는 것을 사용하고 있다. 우리나라도 이러한 상황에서 예외는 아니지만 우리나라의 미생물산업은 1980년대 말까지 Cephalosporin C, Rifamycin, 7-ACA 등의 고가 항생물질의 자체생산기술 확보로 괄목할만한 기술 수준의 발전을 가져오기는 하였으나 막대한 비용이 드는 신물질개발분야에는 투자를 게을리 하고 1980년대 말에 도입된 물질특허와 지적소유권으로 인하여 물질에 대한 모방생산조차도 불가능해짐에 따라 고가의 원료의약품을 포장 판매하거나 이미 외국에서 완료된 기술의 수입을 통한 제품화를 비롯한 눈앞의 영리만 추구한 나머지 현재 국내 미생물산업은 대부분 선진국의 기술을 따라잡기는커녕 중국을 비롯한 우리나라보다 기술후진국으로 생각하던 나라들에게 추월 당할 위기에 봉착해있다. 더군다나 각국이 미생물의 유용성에 대하여 국가자산이라는 인식이 확산되어 현재는 자원의 해외유출을 엄격히 통제하고 있는 실정이다.

다행스럽게도 최근 국내에서도 미생물자원에 대한 인식의 재고가 이루어져 국내 토양으로부터 생리활성물질을 생산하는 유용미생물을 분리하고 신물질을 탐색하려는 연구가 생명공학연구소 등을 비롯한 연구기관과 제약기업에서 활발한 연구가 진행되고 있으나 많은 미생물의 탐색이 신물질과 연결되고 신약개발로 이어지는 것은 아니기 때문에 미생물분리 및 신물질탐색에 대한 연구가 제한적인 것이 사실이다. 이러한 주요한 원인중 하나는 미생물탐색시 가장 문제가 되는 균주의 중복분리 문제이다. 이러한 점을 회피하기 위하여 서로 다른 배지를 사용하고 저해제를 첨가하는 등의 방법들이 제안되어 있으나 우리나라의 기후대와 토질이 비슷한 우리나라에서는 분리되는 미생물의 종에 한계가 있는 것도 주요한 원인중 하나이다. 이러한 문제에서 탈피하기 위해서는 중국, 동남아시아 등 아직 자원문제에 대한 인식이 덜한 나라들에서 미생물탐색을 실시하거나 해양미생물들의 탐색 source를 재고할 필요가 있다.

외국의 경우 Penicillin의 발견으로 토양 미생물에 대한 인식을 재고한 이후로 Waksman에 의해 Streptomycin을 비롯한 대부분의 항생물질을 탐색하였고 이를 신약으로 이끌어내었다. 최근에는 이러한 항생물질에만 국한하지 않고 고지혈증치료제, 혈관생성저해제 등의 신규 항암물질 등 새로운 생리활성을 갖는 물질을 미생물로부터 탐색하여 lead compound로 개발한 사례는 이루 열거하기 어려운 정도이다. 현 시점에서 외국의 연구동향은 크게 세 가지로 나누어서 언급할 수 있겠다. 첫째는 대량/고속화로 대변되는 High-Throughput screening이다. 즉, 토양시료의 채취에서 시료의 생리활성검증까지가 완전전자동 robot system에 의해 진행되어 현재 2,000 assay / day 이상일 정도로 고속화되고 있고 동시에 미생물과 발견물질의 Database화가 진행되었다. 현재 알려진 기지 물질은 약 100,000종 이상이고 미생물탐색후 발견되는 물질의 중복율은 target에 따라 다르겠지만 최고 40%에 까지 이른다. 그러나, 이러한 시행착오를 극복할 수 있는 방법으로 발견되는 미생물과 생산물질의 생리활성, 질량과 NMR 등의 구조, 화학적인 구조변경에 따른 구조-활성상관관계까지를 Database화하여 관리함으로써 중복분리에 따른 시간, 인력의 낭비를 최소화하고 있다.

마지막으로 희귀 방선균의 탐색을 들 수 있다. Penicillin의 발견 이래로 생리활성물질 분리의 원천은 여러 가지 미생물이 취급되어 왔으나 현재 인류가 사용하고 있는 생리활성물질의 70%가 토양미생물인 방선균(Actinomycetes)으로부터 획득하고 있다. Streptomycin의 발견 이래로 수많은 방선균중 Streptomyces 속에 국한되어 현재는 토양 Screening을 통한 Streptomyces 속으로부터 신규물질의 발견가능성은 매우 희박하다고 할 수 있으나 반대로 Streptomyces속을 제외한 방선균에서는 아직도 많은 신규 생리활성물질이 발견되고 있다. Nocardia속이나 Micromonospora속은 현재 두 번 째로 많이 분리되는 방선 균류로서 Cephalosporin, Gentamicin, Fortimicin등의 많은 신규 생리활성물질이 분리되었다. 따라서, Streptomyces속을 제외한 방선균들을 생리활성물질의 원천으로서 얼마나 많은 종을 확보하느냐가 향후의 생물산업의 성패를 좌우할 수 있는 열쇠가 될 수 있다. 이에 따라 선진국에서는 기존의 토양미생물뿐만 아니라 해양미생물과 심해저, 극지방, 화산주변등 극한 미생물의 탐색을 통해 다양한 환경조건에서의 미분리균주에 전력을 기울이고 있는 실정이다.

이러한 상황에서 볼 때, 본 과제를 통한 다양한 환경에서의 중국토양으로부터 희귀방선균을 탐색하는 일이나 단기간에 산업화할 수 있는 유용 미생물의 교류사업은 향후 한국 미생물산업에 매우 중요한 사업으로 판단된다.

제 3 장 연구수행내용 및 결과

제 1 절 유용미생물자원 산업균주 교류 및 검증 시스템

서론에서 언급한 것과 같이 우선 산업적으로 개발가능성이 크거나 바로 현장에 적용할 수 있는 유용 산업균주를 확보하고자 유용미생물 균주조사 및 유용 균주검증 시스템 확립하여 가동하였다. 이를 위하여 크게 세 가지로 나누어서 진행하였다.

1. 한·중간 유용 산업균주교류용 Data Base 구축

한국생명공학연구원과 공동으로 중국내 생명공학기술보유 연구소, 대학, 기업에 대한 조사를 통하여 1000개의 관련기관에 대한 정보를 Database화하였으며 home page : <http://kcbbcc.kribb.re.kr/korean/main.htm>에 정리하여 공개하였다 (그림 1). 또한, 국내의 대 중국 관련 유용 산업균주 보유 및 수요 조사를 통하여 항생제중 Kanamycin, 고지혈증 치료제중 Pravastatin등 19개 품목에 대해 해당 생산균주 및 기술 도입에 관심이 있음을 알 수 있었다. 이중 항생제 Teichoplanin은 최근 내성세균의 증가로 시급히 필요한 항생제로서 본 사업을 통하여 중국으로부터 국내 모회사(기업 사업 비밀상 추후 공개)에 균주 및 기술이 도입되도록 주선하여 계약이 체결되는 성과를 거두었다. 이는 유용 산업균주가 생산하는 항생물질의 typing, 항균 spectrum 및 역가 측정, 항생물질의 실용화를 위한 분리정제방법이 구축되었고 실제적으로 중국으로부터 Teichoplanin 생산균주 및 분리정제기술을 발굴하여 국제적 가격보다 월등히 싼 가격으로 도입한 것이고, 이를 통하여 활성 검증 및 기술성 검토와 중국으로부터 이러한 유용균주 및 기술을 도입하는 교류시스템이 본격적으로 가동하게 되었다 (그림 2).

- » **새소식**
- » 센터소개
- » 중국개황
- » 중국생명공학
- » 정보자료실
- » 특별기획
- » 중국 産·學·研·官
- » 중국생활정보

- SiteMap
- English

새소식 **공지사항**

- [국외] 중국내 최대 합자제약사 주하이에 설립 [07/09]
- [국외] 중국에서 처음으로 '간을 바꾼 소녀' 건강하게 성장 [07/09]
- [국외] 중국 줄기세포 이식으로 백혈병 치료 성공 [07/06]
- [국내] 中 에이즈감염자 급속 확산 [07/02]
- [국내] 바이오 대기업 '니하오 차이나' [06/14]
- [국내] 중관춘, 세계적 공업단지로 변화 [06/11]
- [국내] 푸둥(浦東)지역 유학생의 귀국이 새로운 추세가 되고 있다 [05/23]

[more](#)



This website is maintained by the KCBCC. TOTAL 07741 TODAY 00006
If you have any comments on this website, please e-mail KRIBB

그림 1. 한중생명공학교류센터 홈페이지 (http://kcbbcc.kribb.re.kr/main/main.html)
좌측메뉴에서 중국생명공학이나 정보자료실을 이용하면 중국내 학교, 연구기관 및 연구
정보에 대한 자료를 얻을 수 있다.

2. 수요균주에 대한 활성 검증 및 유용산업 균주교류 시스템 확립

수요균주에 대한 항생물질의 작용 spectrum 및 역가를 객관적으로 검증하여 유용 산업균주의 효율적인 교류에 도움을 주고자 다음과 같은 검증 시스템을 확립하였다.

가. 수요균주가 생산하는 항생물질의 typing

방선균이 생산 가능한 항생물질의 typing을 쉽고 빠르게 할 수 있는 방법을 고안 하였고, 18종의 방선균에 적용하여 이방법의 효용성을 검증하였다.

(1) Deoxy-, Dideoxyhexose를 포함하는 항생물질

마크로라이드, 아미노글라이코사이드, 폴리케타이드 등과 같은 많은 항암, 항생물 질들은 구조 내에 deoxy나 dideoxyhexose를 포함하고 있다. 6-deoxyhexose (6-DOH) 생합성의 첫 단계는 glucose-1-phosphate가 NDP-glucose synthase에 의해 NDP-D-glucose로 전환된다. Daunorubicin, streptomycin, rubradirin, chlorothricin, avilamycin, granaticin, mithramycin 생산에 관여하는 dTDP-D-glucose synthase는 서로 아미노산 상동성이 매우 높음을 알 수 있었 다. 따라서 이러한 아미노산 상동성을 기초로 PCR primer

AG4 (5' - R Y G T C S G T G A T C T C S A G C T C G C C S C G - 3') 와 AG5 (5' - G A C T T C R T S A T G T A T C T S G G C G A C A A - 3') 을 design 하고 18개의 방선 균을 대상으로 typing 하였다. 그 중 14개의 방선균에서 양성반응을 나타내었으며 (표2) streptomycin 생산균주인 *S. griseus*와 *S. glaucescens* 균주에서는 GenBank 에 보고된 것과 동일한 염기서열을 가진 증폭산물임을 확인할 수 있었다. Modular type polyketides 항생물질을 생산하는 유전자들의 domain 구성이 KS domain과 ACP domain이 반복된다는 사실에 각각의 domain에서 primer KS (5' - A G X G A X G A X G A G C A G G C G G T X T C X A C - 3') 와 ACP (5' - G C X T C C C G X G A C C T G G G C T T C G A C T C - 3') 를

제작하였다. 표 2에서 보듯이 10개의 방선균에서 증폭산물이 얻어졌고, DNA 염기서열 결 과 이 증폭산물이 modular type polyketide 생합성에 관여함을 최종 확인하였다.

Modular type polyketide 항생물질중 rifamycin, rubradirin을 포함하는 ansamycin 계열 의 항생물질과 항암제인 mitomycin은 mC₇N unit가 구조체 내에 존재하는데 이는 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA)에서 유래된다. AHBA synthase의 아미노 산 상동성을 기초로 AHBA-1 (5'-ACSGAGGTSATCGTSCCSGCGSTTCACSTTC-3')과 AHBA-2(5'-SGSCCGTGSGCGTGSGCGCGTCCCTG-3') PCR primer를 제작하여 18종의 방선균을 대상으로 typing한 결과 (표 1), 이제까지 ansamycin 계열이나 mitomycin 류의 항생물질 생산에 보고가 없는 *Actinoplanes teichomyceticus* KCTC9543과 *Micromonospora sagamiensis* ATCC21826 균주에서 예상크기 260-bp 증폭산물을 얻었 고 염기서열 결정으로 최종 확인하였다. 특이한 것은 *Actinoplanes teichomyceticus* KCTC9543인 경우 AHBA synthase의 존재는 확인되었으나 ansamycin 계열의 항생제이 면 증폭되어야 할 modular type polyketide용 primer로는 증폭되지 않았기 때문에 이종에 서의 AHBA moiety는 ansamycin 이외의 신규 항생물질, 예를 들면 mitomycin과 같은

항생물질의 생산가능성을 보여주는 결과라 생각되어진다.

(2) Polyketide 항생물질

Polyketide 항생물질은 modular type polyketides와 aromatic polyketides 항생물질로 나누어지는 데 본 연구에서는 modular type polyketides를 typing 할 수 있는 PCR primer를 design하였고 18개의 방선균을 대상으로 typing하였다.

이를 core 1-core 6라 명명되었는데 특히 core 1 과 core 2라고 명명된 부위는 아미노산 서열이 잘 보존되어 있는 것으로 나타났다. core 1과 core 2 지역에서 각각 PEP1 (5' - T T G A A G G C S G G S G G S G C S T W C G T S C C S A T C - 3'), PEP2(5'-SACSCCCTTSGGSTTTSWCSGTSGTSCC-3') primer를 제작한 후 18종의 방선균을 대상으로 typing한 결과 14개의 종에서 양성반응을 나타내었으며 몇몇 증폭 산물의 염기서열결정 결과, 기존의 peptide 생합성 효소들과 모두 높은 상동성을 지니고 있었다.

(3) Peptide 항생물질

모든 peptide 항생제 생합성 효소들은 반복적인 domain으로 구성되어 있고 이러한 domain에는 아미노산의 활성화와 ATP, phosphopantotheine 결합을 위한 지역등 6개 정도의 지역에서 높은 아미노산 보존율을 지니고 있음을 알 수 있다.

(4) Aminoglycoside 항생물질

Aminoglycoside계 항생제의 생합성과정에 stsA와 stsC가 첫 번째와 두 번째의 transamination에 관여하므로 stcA와 stsC 유전자를 이용하여 aminoglycoside계 항생제 typing을 효과적으로 이용할 수 있음을 확인하였다. 이상과 같이 각 항생물질의 특성을 이용한 PCR primer의 design과 적용으로 쉽고 빠르게 분리된 방선균이 생산 가능한 항생물질을 예측할 수 있게 되었다.

나. 항균 spectrum 및 역가 검증

항균 spectrum 결정을 위한 assay 균주를 확보하였고 배양조건 및 assay 조건을 확립하였다. 확보된 assay 균주로는 *Pseudomonas aerogenosa* (clinical isolate), *Proteus vulgaris* ATCC 13315, MRSA (methicillin resistant strain, clinical isolates) 5884, 5404, 5301, 5488, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10082, *Escherichia coli* containing β -lactamase, *Staphylococcus aureus* 209p, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* AS1140, *Candida albicans* ACCC2002 등이다. 100ul의 발효상등액을 8 mm stainless cylinder에 떨어트린 후 assay 균주의 성장저해를 측정하였다. 또한 기존의 항생제의 항균력과 비교 분석함으로써 경제적 가치를 비교할 수 있다.

다. 항생물질의 실용화 검증

항생물질의 실용화를 위하여서는 약리작용 test 외에도 물리화학적 성질 및 이화학적 성질이 규명되어야 하며 이를 위한 검증 체계는 다음과 같다.

외관성상 및 용해성, 흡수성, 분해점등의 물리학적 성질을 조사하고 안정성실험을 위

해 다음과 같은 실험을 수행한다.

- (1) 장기보존실험 : 다양한 온도에서 12개월 이상 보존한 후 약효의 보존여부를 확인한다.
- (2) 가혹실험
 - (가) 가온보존 - 40℃에서 수개월, 55℃에서 수개월 보존한 후 약효의 변화를 검사한다.
 - (나) 가습보존 - 25℃, 상대습도 95% 에 2개월 정도 보존한 후 형태와 역가의 변화를 관찰한다.
 - (다) 폭광보존 - 투명글라스 용기에 넣어서 태양광 아래 6개월 정도 보존한 후 약효의 보존여부를 확인한다.
- (3) 강제분해에 의한 생성물 확인
 - 산성 (pH 2) 및 알카리 (pH 10) 용액을 80℃에서 10일간 열분해 한후 주요 분해물을 조사한다.

라. 분리, 정제 및 구조결정

위에 열거한 실험을 위해서는 순수 분리 정제된 항생물질이 필요하다. 이를 위한 기초연구로 aminoglycoside계 항생제의 분리정제과정을 확립하였다.

8 L의 배양액을 300 ml의 Amberlite IRC-50 (NH₄⁺)에 흡착시킨 후 6L의 증류수로 세척하였다. 이후 1 N NH₄⁺OH⁻로 elution을 실시하였다. 7 ml 단위로 fraction을 수집하여 *Serratia marcescens* AG4410에 대한 활성을 검사하였다. 검사 결과 fraction 22~75에서 활성이 검출되었다. TLC (silica: isopropanol, methanol, 4 N NH₄⁺OH⁻; 1, 2, 2)를 통하여 활성 물질의 분석을 시도한 결과 R_f =0.28~0.42 사이 나타나는 Ninhydrin발색 반응에 민감한 물질과 *Serratia marcescens* AG4410에 대한 활성과 정량적인 상관관계를 보임을 알 수 있었다. 활성을 보이는 fraction을 모아 감압하에서 50 ml로 농축하였다. 이 경우 사전에 45℃ 에서의 감압 증류로 활성의 손실은 크지 않음을 확인하였다. 농축된 시료를 pH 7.0으로 조정한 후 120 ml의 Amberlite CG-50 resin (NH₄⁺)에 흡착시켰다. 500 ml의 증류수로 세척을 실시한 후 1L의 용량으로 증류수에서 0.5 N NH₄⁺OH⁻의 linear gradient로 용출을 실시하였다. 0.2 N NH₄⁺OH⁻에서 0.26 N NH₄⁺OH⁻까지 용출된 fraction을 감압 농축하여 TLC로 분석하였을 때 단일 spot으로 검출되었다.

Strains	TypeI PKS	6-DOH	AHBA	Peptide
<i>Actinoplanes teichomyceticus</i> KCTC9543		●	●	●
<i>Amycolata autotrophica</i> IFO12743		●		●
<i>Micromonospora inyoensis</i> ATCC27600	●			●
<i>Micromonospora olivasterospora</i> ATCC21819		●		●
<i>Micromonospora purpurea</i> ATCC15835				●
<i>Micromonospora sagamiensis</i> ATCC21826	●		●	●
<i>Streptoalloteichus hindustanus</i> ATCC31219		●		●
<i>Streptomyces bluensis</i> ATCC27420	●	●		●
<i>Streptomyces cinnamonensis</i> ATCC15413	●			
<i>Streptomyces flavopersicus</i> KCTC9221	●	●		
<i>Streptomyces glaucescens</i> GLA.O		●		●
<i>Streptomyces griseus</i> ATCC10137	●	●		●
<i>Streptomyces kanamyceticus</i> ATCC12853	●	●		●
<i>Streptomyces fradiae</i> NRRL2702	●	●		
<i>Streptomyces nogalater</i> IMSNU21069		●		●
<i>Streptomyces rimosus</i> ATCC14827	●	●		●
<i>Streptomyces spectabilis</i> ATCC27741	●	●		●
<i>Streptomyces tenebrarius</i> KCTC9047		●		●

표 1. 방선균을 대상으로 한 항생물질 생산의 typing

3. 유용산업균주 목록집발간

당초 1-2차년도에 발간하고자 하였던 유용산업균주 목록집과 수요조사보고서의 발간이 늦어지고 있다. 이는 산업화하려는 산업미생물의 종류가 워낙 다양하고 방대한 점도 있으나 많은 기업에서 이러한 유용산업균주를 보유하고 있다는 것 자체를 비밀로 하고있어 이들의 협조를 이끌어내는데 시간이 소요되고 있기 때문이다.

4. 중국내 희귀생태계를 목표로 공동으로 토양미생물을 분리하기 위한 research tour 수행

중국측 유용균주분리 수집 전문가인 Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry(SIPI) 부소장 Bao-Quan Zhu등을 비롯한 중국측 전문가들과 함께 중국내 토양을 공동으로 채취하여 희귀 방선균을 분리하자는 협약을 체결하는 등 차례의 research tour를 통해서 많은 중국측의 협력을 이끌어내었고 동시에 중국측이 추구하는 향후 생명공학산업방향이나 관심 있는 산업균주의 종류도 파악할 수 있었다. 향후 이러한 research tour가 중국내 다양한 미생물자원 수집 및 정보교류등에 더 큰 도움이 될 것으로 판단된다.

제 2 절 중국 희귀생태계로부터 토양수집 및 희귀 방선균의 분리

1. 토양미생물 분리 protocol 확립

중국 토양으로부터 희귀 방선균 분리를 위한 기초연구로 토양 미생물 분리 protocol 을 확립하고 밭에서 채취한 토양시료 20점을 대상으로 방선균 분리를 시도하였다.

가. 방선균의 새로운 선택 분리 배지 HV agar

토양은 자연계에 있어서 방선균의 최대 서식장소이지만, 동시에 세균이나 곰팡이 등도 공존하는 복잡한 미생물생태계로 구성되어 있다. 따라서 토양방선균은 희석평판 법으로 분리하고자한 경우, 배지의 기질로서 방선균에 가능한 선택적인 영양소를 이용하는 것이 중요하다. 지금까지 분리배지의 탄소 및 질소원으로서 starch, glycerine, casein, asparagine 등이 널리 이용되어 왔다. 방선균 분리에 관용되고 있는 대표적인 배지로서 Starch-casein agar, Glycerol-argine agar을 들 수 있다. 그러나 이들 배지를 이용하여도 방선균외에 다수의 세균 colony가 출현하며, 또 방선균 colony의 대부분은 *Streptomyces*에 한정된다는게 알려져 있다. 그러므로 다른 종류의 방선균을 유용 대사 산물의 screening system에 공여하기 위해서는 *Streptomyces*와 그 이외의 소수방선균을 동시에 선택적으로 분리 할 수 있는 배지의 설정이 필요하다.

방선균의 토양중에 있어서 특이한 생태적 역할, 즉 난분해성의 유기물을 서서히 이용한다는 것에 착안하여 부식산을 영양소로 한 HV agar를 개발하였다. HV agar를 사용하여 기존 배지에 비하여 2내지 수배 많은 방선균을 아주 선택적으로 분리할 수 있었다. 특히 기존의 배지로는 조금밖에 검출되지 않았던 희소방선균인 *Micromonospora*, *Microbispora*, *Streptosporangium*, *Microtetraspora*, *Dactylosporangium*, *Saccharomonospora* 및 *Thermomonospora*의 출현수가 HV agar상에서 현저하게 많았다. 또한 HV agar상에 출현한 방선균은 양호하게 발육하고 기균사와 포자를 풍부히 형성하며, 다른 한편 세균의 생육은 억제되는 특징도 볼 수 있었다.

나. SDS-Yeast extract 전처리법에 의한 일반 방선균의 선택 분리

토양 방선균의 생태학적 연구나 유용 균주의 효율적인 채취를 위해서는 분리 평판상에 가능한 한 방선균만을, 또 토양에 서식하는 가능한 모든 방선균 균주를 분리 생육시키는게 중요하다.

토양에 공존하는 Fungi의 생육은, 방선균에는 무효한 Cycloheximide등의 antifungal agent의 사용으로 용이하게 억제가능하지만, 평판상에서부터 방선균과 같은 원핵생물인 세균의 colony만을 분별하여 제거하는 것은, 방선균에 선택적인 영양소를 함유하는 분리 배지를 갖게 하여도 곤란하고, 더군다나 penicillin, polymixin 등과 같은 antibacterial agent의 사용은 방선균의 감소를 초래하는 난점이 있다. 그러므로 방선균의 특이한 내성을 이용하고 토양 시료를 미리 물리적 혹은 화학적으로 전처리를 하여 세균을 제거하려는 시도들이 행해지고 있다. 토양시료의 건조처리(40-50°C, 2-14시간)나 습열처리(55°C, 6분) 및 phenol등의 살균제

에 의한 처리가 지금까지 보고되어 왔다. 그렇지만 그들의 방법에 의해서도 박테리아 뿐만 아니라 방선균도 어느정도 사멸되어 버린다는 문제점이 남아있다.

토양 부식산 혹은 인공 부식산을 영양소로한 유효한 방선균도 분리 배지(HV agar)를 이용해서도 방선균의 완전한 분별 분리는 곤란하였다. 그래서 토양중의 방선균은 생태적으로 보아 포자로 존재하고 그 일부는 휴면 상태로 있다고 보고 시료를 포자활성화제나 또 방선균 포자에는 무해한 살균제로 처리하여 HV agar상에 가능하면 방선균만을 선택 분리하는 방법에 개발 연구를 하였다.

약한 heat-shock(40°C, 20분) 및 SDS-yeast extract 용액에 의한 토양 시료의 전처리법을 개발하였다. 이 방법은 방선균 포자에는 무해한 살균제로 밝혀진 SDS를 사용하여 HV 분리 평판상의 세균수를 무처리 대조구의 약 20%까지 감소시킬 수 있다는 것을 가능하게 할 뿐만 아니라, 포자 활성화제(heat shock 및 yeast extract)에 의한 처리를 병용함으로써 방선균의 출현수가 약 40%까지 증가하는 것을 가능하게 해준 것이다. 또한 nalidixic acid를 포함한 HV agar를 사용하여 세균만 무처리 대조구의 10%까지 감소시킬 수가 있었다.

다. Phenol 전처리법에 의한 *Micromonospora*속의 선택 분리

Micromonospora 및 *Microbispora*은 gram양성으로, 일부의 균주를 제외하면 호기성 방선균이다.

*Micromonospora*은 1960년대 후반부터 항생 물질, 유용 효소 또는 효소 저해제 등의 생산균으로서 연구되어 왔으며, 예를 들어 항생 물질로서 아미노산, aminoglycoside, peptide, 또는 macrohride 등 광범위한 대사 산물이 이 균군으로부터 얻어졌다. 한편 *Microbispora*가 생산하는 항생 물질로는 phenazini 알려져 있으며, 또 최근에 들어서 몇 개의 신규 항생 물질(예를 들면 antifungal agents, Sch 31828)이 이 속균주로부터 발견되어졌다.

이와같이 *Micromonospora* 및 *Microbispora*은 유용 대사 산물의 탐색원으로 중요한 균군이지만, 토양중의 분포 밀도는 streptomycetes에 비하여 매우 낮고, 그런 까닭에 관용적인 평판법으로는 분리가 곤란하며, 특히 *Microbispora*는 거의 우발적으로 밖에 평판상에 나타나지 않는다. 그래서 이들 소수균 방선균의 생태나 이용 연구를 효율적으로 하기 위해서는 특이한 선택 분리법을 적용하게 되었다. 지금까지 *Micromonospora*분리에는 습열 처리(55°C)나 알칼리 처리(0.01N NaOH)로 평판상에 있어서 세균 오염을 제거하는 방법, Novobiocin과 tunicamycin이라고 하는 선택적 항생물질을 배지에 첨가하여 타 방선균이나 세균을 제거하는 방법이 보고되어 왔다. 또 Nonomura 등은 토양을 건열 처리(120°C, 1시간) 및 선택배지(AV agar)를 사용하여 *Microbispora*를 수% 빈도(plate상에 출현한 total colony중의 비율)로 분리할 수 있었다고 보고하였다. 하지만 이들 균주의 효율적인 이용검색을 위해서는 시료에 존재하는 가능한 모든 균주를 분리할 수 있는 가능한 방법을 개발할 필요가 있다.

*Micromonospora*의 포자가 phenol에, 또 *Microbispora* 포자가 phenol 및 CG(chlorhexidznu gluconate)에 특이적인 내성을 갖고 있다는 것을 알아내었으므로, 이들 살균제에 의한 시료의 전처리와 AV agar를 조합하여 각 균을 대단히 고도로 선택

분리할 수 있는 방법을 개발하였다.

라. Benzedthonium chloride 전처리법에 의한 *Streptosporangium* 및 *Dactylosporangium*의 선택 분리

Streptosporangium 및 *Dactylosporangium* 방선균은 gram 양성이면서 호기성이고, 두 속은 형태적으로 포자낭을 형성하는 공통점이 있다. 그러나 *Streptosporangium*은 분지한 기균사의 선단에 구형에서 타원형 포자낭을 형성하며 그속에 나선형 모양으로 연태한 비운동성 포자를 형성하고 있는 것에 반하여, *Dactylosporangium*은 기균사를 만들지 않고, 일렬로 배열만 운동성포자(3~5개)를 갖는 rod type 의 포자낭, 또 위포자 (globose body)를 각각 기생균사로 부터 직접 형성하는 형태적인 차이점이 있다.

*Streptosporangium*은 maduromycetes group에 *Dactylosporangium*은 actinopanes group에 속한다. 두 방선균 모두 산업상 중요한 대사 산물을 생산하는 균주로서 그 중요성이 점차 인식되어지고 있으며, 예를 들면 chlormphenicol, sporviridin, victomycin, dactimycin 및 orthomycins등의 항생물질이 발견되었다. 그러나 Streptomycetes에 비하여 극소수의 균주만이 screening되고 있는 상태이며, 따라서 유용물질 생산자로서 가일층의 개척이 요망된다.

*Streptosporangium*은 토양을 최대의 분리원으로 하지만, 일반적인 회석 평판법으로는 극소수 밖에 분리되지 않는다. 따라서, 다수의 균주를 효율적으로 얻기 위해서는 특이한 선택분리법을 요한다. Nonomura등은 토양 시료의 건열처리(120℃, 1시간)와 선택 배지(AV agar)의 사용으로 이균주가 수%의 빈도로 분리 가능하다는 것을 보고하였다. 한편 *Dactylosporangium*도 분리가 곤란한 방선균이지만 이 속에 대해서는 유효한 선택 분리법은 개발되지 않았다. *Streptosporangium*의 포자낭 포자 및 *Dactylosporangium*의 위포자 (golbose body)가 건열 뿐만 아니라 살균제 benethonium chloide에도 내성을 갖는다는 것은 알았으므로 이 성질을 이용하여 고도선택 분리법을 개발하였다.

마. r-Collidine 유인법에 의한 *Actinoplanes*속 및 *Dactylosporangium* 속의 선택 분리

*Actinoplanes*속은 gram양성으로 호기성 방선균이다. 형태적으로는 기균사를 생성하지 않고, 기생균사에 생긴 짧은 포자낭병의 선단에 구형 혹은 부정형의 포자낭을 1개씩 만들며, 그 내부에는 직쇄상, coil모양 혹은 불규칙으로 배열된 균사가 있으며, 성숙하면 직경 1~1.5um의 편모 포자가 되는 특징이 있다.

*Actinoplanes*속에서 분리되는 신규 항생물질의 수는 꽤 많고, 대별하면 actinomycin group, amino acid group, nucleotide group, polyene group, quinone group, peptide group등 다종에 이르고 있다. 또 최근에는 *Actinoplanes*가 생산하는 유용 효소 저해제 등이 보고되고 있으며, 따라서 이 방선균은 항생 물질뿐만 아니라 다른 새로운 생리 활성 물질의 producer로서 가일층의 개척이 요망된다.

*Actinoplanes*는 기후조건이나 식생이 다른 각종 토양, 또 하천이나 호수, 그 주변에 퇴적된 낙엽등에서 분리되며, Nonomura & Takagi도 일본토양에 대하여 조사해본 결과, 산지 토양이나 수생 토양, 또 경지 토양을 포함한 여러종류의 토양중에 이 방선균이

널리 분포하고 있다는 것을 보고 하였다. 단, 이속은 Streptomyces에 비하여 토양중에 있어서 분포 밀도는 낮고, 일반적인 희석 평판법으로는 극히 소수밖에 분리되지 않는다. 따라서 다수의 균주를 효율적으로 분리하기 위해서는 유주자의 주성등을 이용한 특이한 분리법을 적용할 필요가 있다.

지금까지 사용되어온 Actinoplanetes의 선택 분리법중의 하나로서, Palleroni의 모세관 포집법이 있다. 이 방법은 *A. brasiliensis*가 chlorine 이온에 주성을 모임에 기초로 하여 설정되었으므로, 유인제, 염화칼륨(KCl)을 함유한 완충용액을 1 ul 들이의 모세관 내벽으로 하여, 이중에 토양 시료로부터 분리한 *Actinoplanes* 유주자를 포집하여 평판법으로 분리하는 것이다. 그러나 KCl에 대한 주성은 특정종의 *Actinoplanes*에 형성된다는 것이 알려져, 모든 species에 공통인 동시에 강력한 유인제를 찾아내어 적용하면, 보다 다수의 *Actinoplanes*를 효율 좋게 분리 할 수가 있다.

한편 *Actinoplanes*와 근연의 *Dactylosprangium*에 대해서도 토양중에 널리 분포하고 있다는 게 밝혀졌으므로 그 유주자의 화학주성을 조사하여 모세관 포집법에 응용가능하면 선택적 분리가 가능하다고 사료된다.

두 균주의 유주자에 대하여 amino acid, 방향족 화합물 및 당류등 각종 물질에 대한 주성을 시험해 본 결과, 두 균주에 공통이며, 강력한 유인제로서 r-collidine 과 D-xylose을 알아내었으므로 이것을 이용한 모세관 포집법과 분리배지(HV agar)의 사용을 조합함으로써, genus의 균주를 다수 토양에서 효율 좋게 분리 할 수 있는 방법을 설정하였다.

바. 화분(花粉)포집, 건조법에 의한 *Actinoplanes*속의 선택 분리

*Actinoplanes*속 방선균의 선택 분리에 종종 이용되어 온 방법중의 하나로서 화분 포집법이 있다. 이것은 수중 곰팡이를 분리하는데 널리 이용되고 있는 방법을 Couch이 개량한 것으로 토양 시료에 물을 가하고 그 수면에 화분등의 미끼를 띄우고 균을 낚시질하고, 그것을 평판 분리하는 집적법(enrichment technique)의 일종이다. 그 후 많은 연구자에 의하여 Couch의 화분 포집법을 약간 개량하여 여러 종류의 *Actinoplanes* sp.가 분리되고 있다. 다만, 토양 현탁액상에서 배양시킨 화분에는 *Actinoplanes*와 공히 다수의 세균도 분리되기 때문에, 미리 micromanipulator나 실체 현미경하에서의 조작으로 이 세균을 제거하는 작업이 필요하다는 곤란한 점이 있다. 이것을 개량하기 위하여, Makker & Cross은 화분을 풍건(28°C, 1주일)처리하는 방법을 개발하였지만, 이 전처리에 의한 세균의 제거는 완전하지 않고, 분리 배지로 사용한 Colloidal chitin agar상에는 *Actinoplanes*를 상회하는 수의 세균이나 다른 방선균이 출현한다는 것을 보고하였다.

*Actinoplanes*가 집적된 화분을 살균 토양중에서 신속하게 건조 처리하는 간단한 방법으로, 부수하는 대다수의 세균만을 제거하는 것이 가능하다. 또 송홧가루나 그 침출액에 *Actinoplanes* 유주자가 주성을 나타냄을 이용하여 선택적인 분리 방법을 개발하였다.

이상과 같이 희소 방선균의 특성을 이용하고, 또 HV agar를 배지로 사용하여, 각 genus의 선택 분리법을 설정할 수가 있었다.

어느 방법도, 분리 평판상이 희소 방선균의 순수 분리를 방해하더라도 세균이나 streptomyces등으로 오염된 것을 제거할 수가 있다. 또, 기존 방법과 비교해도 확실히 높은 빈도로 방선균 각 속을 분리할 수 있는 동시에, 토양의 일정량으로부터 분리 가능한 각

genus의 절대수도 2~10배가 되었다. 각 선택 분리법의 개략 및 그것을 발토양 수점 내지 약 20점에 적용한 경우 회소방선균 각속의 분리 빈도(분리 평판상에 출현한 total colony의 비율)는 다음과 같았다.

(1) 포자 내성을 이용한 물리·화학적 처리법에 의한 system

- (가) *Micromonospora* : 시료의 1.5% phenol처리 및 tunicamycin (20mg/L)과 nalidixic acid(20mg/L)를 함유하는 HV agar를 사용한 방법에 의한 분리 빈도는 90% 이상
- (나) *Microbispora* : 시료의 건열(120℃, 1시간)처리와 거기에 계속하여 1.5% phenol-0.01% CG처리, 또 nalidixic acid를 함유하는 HV agar를 사용하는 방법에 의한 분리 빈도는 90% 이상
- (다) *Streptosporangium* : 시료의 건열처리(120℃, 1시간)와 거기에 계속하여 0.01% BC처리 및 leucomycin(1mg/L)과 nalidixic acid 함유하는 HV agar를 이용한 방법에 의한 분리 빈도는 20~90%
- (라) *Dactylosporangium* : 시료의 건열처리(120℃, 1시간)와 0.03% BC처리 및 tunicamycin(10mg/L)과 Nalidixic acid 함유 HV agar를 이용한 방법에 의하여 분리빈도는 20-70%
- (마) *Microtetraspora* : 시료의 건열(120℃, 1시간)과 0.05% BC처리 및 kanamycin(40mg/L)과 nalidixic acid 함유 HV agar를 이용한 방법으로 분리빈도는 5-30%

(2) 유주자의 화학 주성을 이용한 집적법에 의한 system

- (가) *Actinoplanes* 및 *Dactylosporangium* : γ -collidine (100mM) 용액을 채운 모세관내에 시료로부터 유리된 유주자를 포집하고, 그것을 HV agar에서 평판 분리하는 방법으로 분리 빈도는 55-95%
- (나) *Actinoplanes* : 송홧 가루를 미끼로 하여 균을 분리하고 그것을 살균 토양중에서 건조(30℃, 2시간), 점차로 물을 가하여 배양하는 것으로 유주자를 유리시켜 HV agar에서 분리하는 방법으로 분리 빈도는 75% 이상

2. 중국에서 채취한 토양으로부터 미생물 분리

중국내 내몽골자치구 Tuquan 지방을 비롯한 12개 지역에서 각기 다른 토양을 수집하였다 (그림, 표 2).

토양의 종류는 사막토로부터 광산토, 삼림토, 해안 및 강토양등 다양한 종류를 선택하였으며 각 선정지역별로 10g-20g 썩의 토양을 멸균된 용기내에 채취하였다. 이를 최대한 신속하게 국내로 옮겼으며 보관은 4℃ 냉장소에 보관하면서 실험하였다.

미생물의 분리에서 토양을 열처리하여 전처리과정을 거친 다음 Bennett's agar를 기본 배지로 하였다. 선택적으로 회귀방선균을 분리하기 위하여 Cyclohexamide, Nystatin등의 항진균제와 Nystatin, Novobiocin, Streptomycin, Lincomycin등의 항생제를 첨가하여 다종의 균주를 분리하고자 하였다. 또한 동시에 미리 확립해 둔 회귀 방선균 분리 protocol에 의한 특정 회귀 방선균의 분리도 시도하였다. 배양온도는 일반적인 28℃ 이

외에 산업화를 염두에 두고 고온 방선균의 분리를 위하여 50℃에서의 배양도 겸하였다. 이러한 1차적인 실험결과 방선균으로 추정되는 균주 약 300여종, bacteria로 추정되는 약 700여종을 포함하여 1000여 균주를 분리하였다. 현재 2차 배양이 진행중이다. 1차적으로 분리된 1000여균주를 모두 액체 배양하여 glycerol (일부 방선균은 Dimethylsulfoxide 사용)stock을 제조하는 중에 있으며 이 과정이 끝나는 즉시 한국 생명공학연구원에 균주를 기탁할 예정이다.

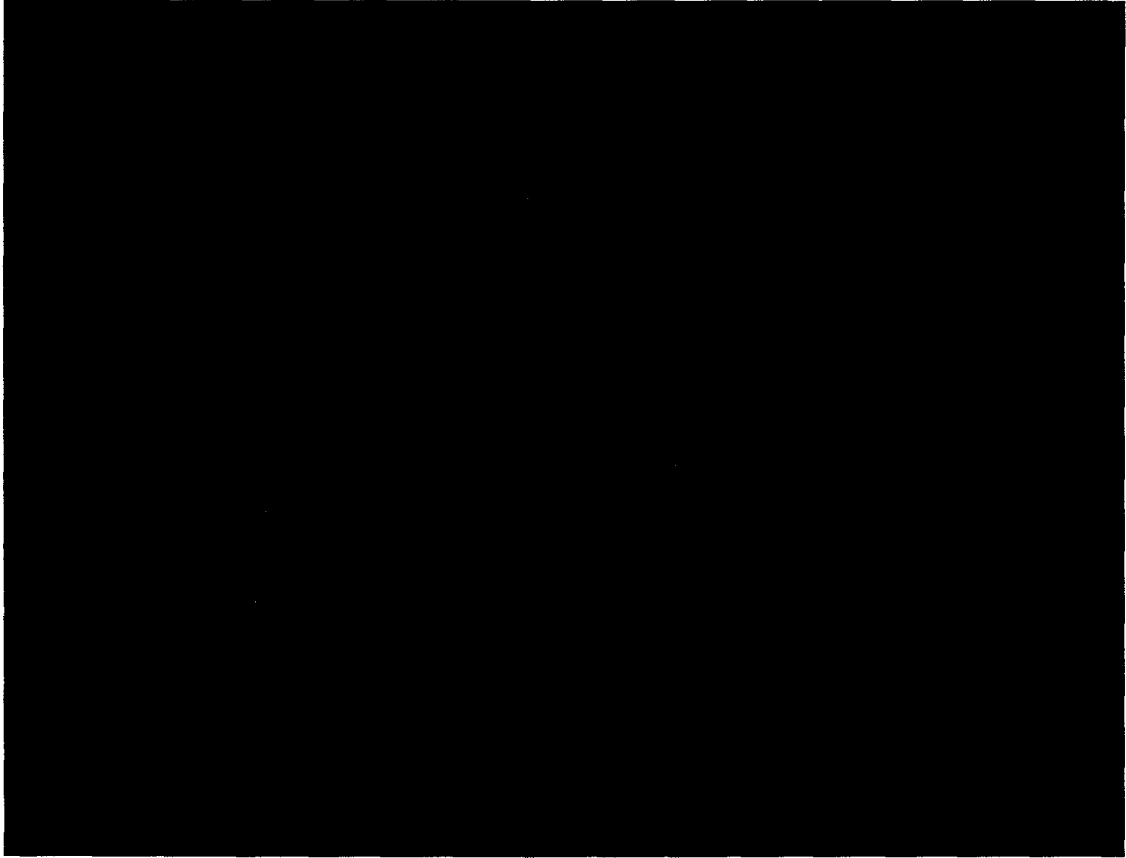


그림 1. 중국으로부터 토양 샘플을 채취한 장소의 지리 정보.
토양 샘플채취장소를 [★]로 표시하였다.

번호	채 취 장 소	채취일자
01	Lotus Hill 구리광산의 산기슭, 내몽골 자치구 Tuquan 지방	2001. 6. 11
02	Lotus Hill 구리광산의 산 중턱, 내몽골 자치구 Tuquan 지방	2001. 6. 11
03	Lotus Hill 구리광산의 산 정상지역, 내몽골 자치구 Tuquan 지방	2001. 6. 11
04	Lotus Hill 구리광산내 원광석 채취지역, 내몽골 자치구 Tuquan 지방	2001. 6. 11
05	내몽골 자치구 Tuquan 지방 제 4중학교 인근 숲	2001. 6. 12
06	내몽골 자치구 Tuquan 지방 제 4중학교 인근 숲	2001. 6. 12
07	내몽골 자치구 Tuquan 지방 제 4중학교 인근 숲	2001. 6. 12
08	내몽골 자치구 Jinlin 주, Tonghua 시, Yuhuna Hill 정상부 숲	2001. 6. 18
09	내몽골 자치구 Jinlin 주, Tonghua 시, Yuhuna Hill 정상부 숲	2001. 6. 18
10	내몽골 자치구 Jinlin 주, Tonghua 시, Yuhuna Hill 중턱 숲	2001. 6. 18
11	내몽골 자치구 Jinlin 주, Tonghua 시, Yuhuna Hill 중턱 숲	2001. 6. 18
12	내몽골 자치구 Jinlin 주, Tonghua 시, Yuhuna Hill 인근 평지	2001. 6. 18
13	내몽골 자치구 Jinlin 주, Tonghua 시, Yuhuna Hill 인근 평지	2001. 6. 18
14	내몽골 자치구 Jinlin 주, Tonghua 시, Tonghua 사범학교 인근평지	2001. 6. 18
15	내몽골 자치구 Jinlin 주, Tonghua 시, Tonghua 사범학교 인근 산	2001. 6. 18
16	Gansu 주, Pingliang 시	2001. 6. 21
17	Gansu 주, Pingliang 시	2001. 6. 21
18	Jilin 주, Yanbian 시	2001. 6. 19
19	Jilin 주, Yanbian 시	2001. 6. 19
20	Dalian 시, Dalian 개발구내, Nantuo 사과 숲	2001. 6. 22
21	Dalian 대학, Campus내 숲	2001. 6. 22
22	Dalian 시, Dalian 개발구내, Nantuo 해변	2001. 6. 21
23	Dalian 시, Dalian 개발구내, Nantuo 해변	2001. 6. 21
24	Dalian 시, Dalian 개발구내, Nantuo 해변	2001. 6. 21
25	Henan 주, Zhengzhou 시, Huayuan Kou	2001. 6. 21
26	Henan 주, Zhengzhou 시, Huayuan Kou	2001. 6. 21
27	Shan dong 주, Xiajin 지역, Zhengbao Tun village	2001. 6. 18
28	Shan dong 주, Xiajin 지역, Zhengbao Tun village	2001. 6. 18
29	Shan dong 주, Xiajin 지역, Zhengbao Tun village	2001. 6. 18
30	Shan dong 주, Jinan 시 교외지역 숲	2001. 6. 20
31	Shan dong 주, Jinan 시 교외지역 숲	2001. 6. 20
32	Shan dong 주, Jinan 시 황하강(yellow river) 인근	2001. 6. 20
33	Shan dong 주, Jinan 시 황하강(yellow river) 인근	2001. 6. 20
34	Shan dong 주, Jinan 시 황하강(yellow river) 인근	2001. 6. 20
35	Zhejiang 주, Ningbo 시	2001. 6. 23
36	Zhejiang 주, Ningbo 시	2001. 6. 23
37	Liaoning 주, Shen yang시 Northeastern 대학 campus 인근 숲	2001. 6. 27
38	Chongqing 시, Yuanjia강	2001. 6. 22
39	Chongqing 시, Yuanjia강	2001. 6. 22
40	Liaoning 주, Fusun시 Qingyuan 지역	2001. 6. 28
41	Liaoning 주, Fusun시 Qingyuan 지역	2001. 6. 28

42	Shenzhen city, 인공공원	2002.2.10
43	A site, Ximen Kou , Ningbo City. Zhejiang Province, 나무근권	2002.2.14
44	B site, Ximen Kou , Ningbo City. Zhejiang Province, 나무근권	2002.2.14
45	C site, Ximen Kou , Ningbo City. Zhejiang Province, 숲	2002.2.14
46	D site, Ximen Kou , Ningbo City. Zhejiang Province, 도로가	2002.2.14
47	Xiangshan , Ningbo City. Zhejiang Province, 산기슭	2002.2.14
48	Hualan Cheng , Ningbo City. Zhejiang Province, 공원내 점토	2002.2.14
49	Jiamu Si city, Heilong Jiang Province, 고추밭	2002.2.16
50	Linyi City , Shandong Province, 농토	2002.2.9
51	Linqing City , Shandong Province, 언덕	2002.2.12
52	Qingdao City, Shandong Province, 해변가	2002.2.13
53	Huqiu Mountain, Suzhou City, 언덕	2002.2.20
54	Xiyuan, Suzhou City, 숲	2002.2.20
55	Lin'an , Hangzhou City, 산지	2002.2.21
56	Anhui Province, 농토	2002.2.16
57	On the mountain of Ganzhou City , Jiangxi Province, 산지	2002.2.18
58	Ganzhou City , Jiangxi Province, 언덕	2002.2.18
59	Huamu Town, Pudong District, Shanghai City, 황무지	2002.2.19
60	Shenzhen city, 교외농토	2002.2.23

표 2. 중국 내에서 채취한 토양시료 정보

3. 중국토양으로부터 회귀방선균의 분리 및 생리활성물질 분리

국내로 도입한 60여 개 중국토양샘플의 종류는 사막토부터 광산토, 삼림토, 해안 및 강토양 등 다양한 종류를 선택하였으며 각 선정지역별로 10g-20g 썩의 토양을 멸균된 용기내에 채취하였다. 이를 최대한 신속하게 국내로 옮겼으며 보관은 4℃ 냉장소에 보관하면서 실험하였다.

여러 가지 미생물중 본 연구진은 특히 회귀방선균의 분리에 중점을 두고 실험에 임하였으며 미리 확립하여둔 protocol에 따라 진행하였다.

방선균의 토양으로부터 분리는 주로 열처리를 통하여 전처리과정을 거쳐 다른 균의 생장을 억제하고 포자를 형성하는 방선균이 우점종으로 성장할 수 있도록 하였다. 균분리의 배지는 Bennett's agar와 Humic acid-vitamin (HV) agar를 기본배지로 선정하였다. 또한 영양적, 생리적인 면을 고려하여서 적당한 저해제를 첨가한 선택적인 균 분리배지도 함께 사용하였다. 본 실험에서 사용한 배지의 종류와 성분 및 저해제는 표3에 기재하였다. 배지와 저해제 사용의 결과는 HV agar가 Bennet's보다 더 다양한 균을 얻을 수 있었다. 선택적으로 회귀방선균을 분리하기 위하여 Cyclohexamide, Nystatin등의 항진균제와 Nystatin, Novobiocin, Streptomycin, Lincomycin 등의 항생제를 첨가하여 다종의 균주를 분리하고자 하였다. 또한 동시에 미리 확립해 둔 회귀 방선균 분리 protocol에 의한 특정 회귀 방선균의 분리도 시도하였다. 배양온도는 일반적인 28℃ 이외에 산업화를 염두에 두고 저온 및 고온 방선균의 분리를 위하여 25~55℃까지 배양온도를 달리하여 배양하였다. 이러한 1차적인 실험결과 방선균으로 추정되는 균주 약 300여종, bacteria와 Fungi로 추정되는 약 700여종을 포함하여 1,000여 균주를 분리하는데 성공하였다. 1차적으로 분리된 균주들에 대해서는 모두 액체 배양하여 20% glycerol stock을 제조하여 -70℃에 보존하면서 활성검증을 실시하였다. 이들을 대상으로 생리활성 검증을 위하여 먼저 항 bacteria와 항곰팡이 활성을 disk paper 법으로 실시하였다. 1차적으로 선정한 검색균주는 Gram 양성균으로서 *Bacillus subtilis* KCTC1326와 *Bacillus cereus* KCTC1012를 사용하였고 Gram 음성균으로서 *Escherichia coli* KCTC1924 와 *Serratia marcescens*를 사용하였다. 그리고 Fungi검색을 위해서는 *Saccharomyces cerevisiae*.KCTC 9713를 사용하였다. 그 결과 3개의 항진균 균주, 9개 항균 세균 균주, 70여 개 항bacteria물질을 생산하는 방선균 균주를 분리하였다.

이들에 대하여 좀더 구체적인 활성정도를 검증하고자 *Staphylococcus aureus* KCTC1916, *Streptococcus pyogenes* KCTC3208와 *Pseudomonas aeruginosa* KACCI0260을 사용한 2차 bioassay을 실시하였다. 그 결과 활성이 안정적이고 강력한 10여 균주를 선발하여 활성물질과 생산균주에 대한 자세한 연구를 진행하였다. 가장 활성이 뛰어나다고 판단되는 8개 균주의 genomic DNA를 분리하여 16S rRNA sequencing을 실시하였다(그림3). 실험에 사용한 균주는 본 연구를 통하여 중국토양으로 분리된 번호를 부여하여 표시한 276, 283, 291, 355, 375, 383, 401, 407 8개 균주이다. 이들의 염기서열을 결정한 결과를 가지고 genbank BLAST N server를 통하여 homology를 검색한 결과 모두 방선균속에 속하는 것으로 판정되었다. 276균주의 경우 *Streptomyces lavendulae*

IFO12343균주와 99%의 homology를 보였다. 이 균주는 streptothricin, complestatin을 비롯한 항생물질과 Mitomycinemddm 항암제 및 penicillin acylase와 같은 효소를 생산하는 유용균주로 알려져있다. 국내에서도 분리 보고된적이 있으며 KCTC에 3균주, KCCM에 7개균주를 보유하고 있다. 283 균주의 경우 *Streptomyces caviscabies* ATCC51928과 *Streptomyces setonii*와 99%의 homology를 보였다. *S. caviscabies*는 감자더멍이병을 일으키는 식물병원성균주로 알려져있어 더 이상의 연구는 진행하지 않았다. *Streptomyces setonii*는 5-Hydroxymethylblasticidin S와 blasticidin S를 생산한다고 알려져있으나 283 균주도 이러한 물질을 생산하는지를 확인하기 위하여 항 bacteria 활성이 어떤 물질에 의한 것인지를 확인하는 중에 있다. 291균주는 IM-7341과 IM-7256균주와 99%의 homology를 보였으나 상기균주가 생리활성물질을 생산하는지에 대한 연구결과는 나와있지 않다. 355균주는 cephalosporin생산균주인 *Streptomyces lipmanii* 와 98%의 homology를 보였다. 본 균주가 Cepha계 항생물질을 생산하는지는 분리정제에 의한 연구가 진행중이다. 375균주는 GenBank상의 *Streptomyces sp.* VTT E-99-1335 (B323)균주와 99%의 homology를 보였으나 상기균주가 생리활성물질을 생산하는지에 대한 보고가 없다. 383균주는 *Kitasatosporia azaticus* IFO13803과 98%의 homology를 보였다. *K. azaticus* IFO13803균주는 Alazopeptin이라는 항진균물질을 생산하는 것으로 알려져있으나 항 bacteria활성은 약한 것으로 알려져있다. 따라서, 383균주는 Azalopeptin과는 다른 물질을 생산할 것으로 사료되어 현재 활성물질의 분리, 정제 연구를 진행하고 있다. *Kitasatospora* 속(Genus)은 *Streptomyces*와 가장 가까운 균주로 이전에는 함께 쓰이다가 최근에는 완전히 분리되었다. ISBA2001(Vancouver)에서 독일의 경우 *Streptomyces phage*를 이용하여 *Kitasatospora*속만 분리할 수 있는 방법을 소개하였는데 이들은 향후 *Streptomyces*를 대체할 수 있는 생리활성물질의 새로운 원천이 될 수있을것이라고 하였고 일본의 경우에도 Kitsato institute를 비롯한 많은 연구기관에서 *Kitasatospora*속을 연구하고 있다. 국내의 경우에도 최근 생명연의 천종식박사가 지리산토양에서 Bafilomycin 계열의 항진균물질을 생산하는 신종의 *Kitasatospora cheerisanensis* nov.균주를 분리하는 등 관심을 끌고 있다. 전 세계적으로 25개균정도가 알려져있어 우리나라에서도 새로이 개척이 유망할 것으로 예상된다. 383균주가 알려진 균주인지 신종인지에 대한 확인과 생리활성을 보인 물질의 분리, 정제 연구는 다음 장에서 언급하였다.

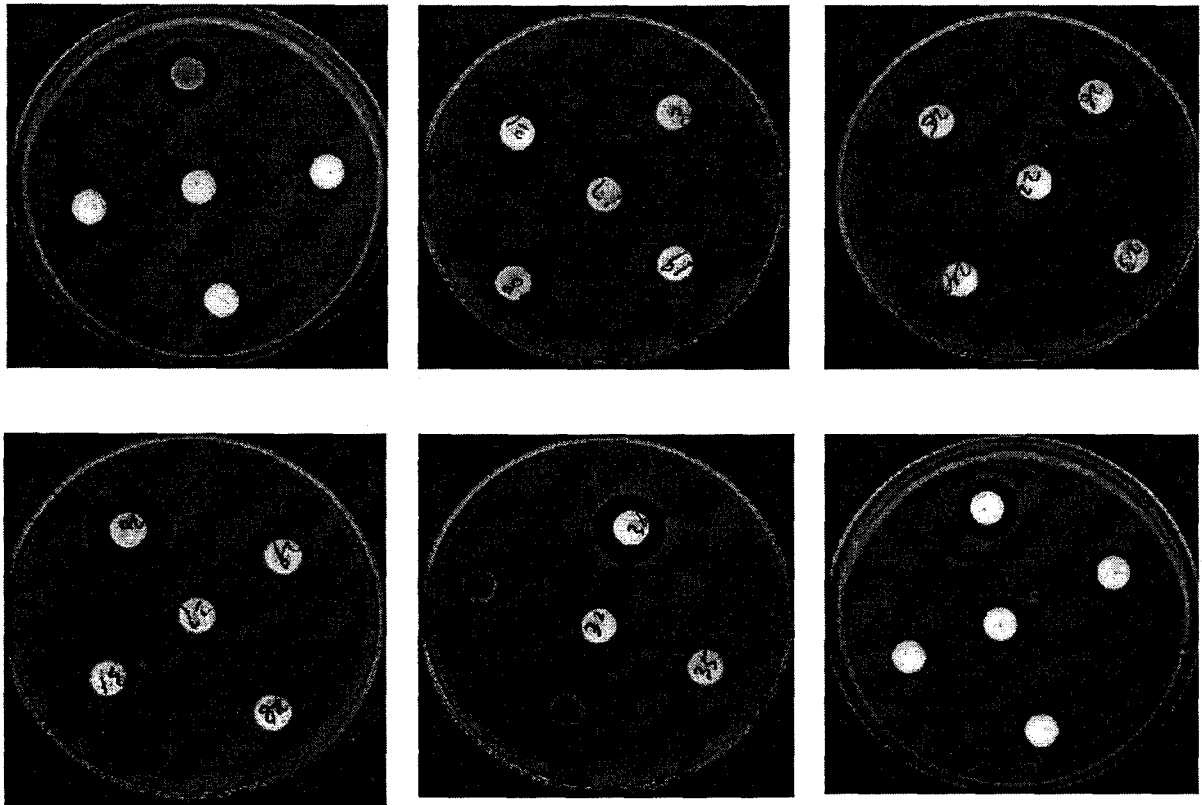
401균주는 *Streptomyces kasugaensis* 와 98%의 상동성을 보였다. 항 bacterial 활성보다는 항진균활성이 강하였다. *S. kasuganensis*는 kasugamycin을 생산한다고 알려져있으나 본 균주가 보인 활성물질과 동일한 물질인지를 확인하기 위하여 공시균주인 KCTC1078 균주와 비교하여 bioassay를 실시하고 활성물질을 분리 확인하는 연구가 진행중이다. 407균주는 *Streptomyces galbus*, *Streptomyces capoamus* 균주와 99%의 상동성을 보였다. *Streptomyces galbus*는 Actinomycin complex등을 생산하는 것으로 알려져있고 *Streptomyces capoamus*는 뚜렷하게 확인된 생리활성물질은 없다. 407균주가 생산하는 활성물질역시 분리, 정제과정을 거쳐야 활성물질을 확인할수있을것으로 판단된다.

Bennett's agar medium		Humic-acid vitamin agar medium	
		Humic acid	1.0g
		Na ₂ HPO ₄	0.5g
		KCl	1.71g
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05g
		FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01g
		CaCO ₃	0.02g
		Agar	15-20g
Glucose	10g	-----	
Yeast extract	1g	D.W	1L
Bacto-peptone	2g	Vitamine solution	10mL
Beef extract	1g	PH	7.2
Agar	15-20g		

Distilled water	1L	* Vitamine solution	
PH	7.2	Thimine-HCl	0.5mg
		Riboflavin	0.5mg
		Niacin	0.5mg
		Pyridoxin-HCl	0.5mg
		Inositol	0.5mg
		Ca-pantothenate	0.5mg
		Aminobenzoic acid	0.5mg
		Biotin	0.25mg
		0.2N NaOH	10ml

ISP-2		ISP-4		ISP-5	
				L-Asparagine	1.0 g
				Glycerol	10.0 g
		Soluble starch	10.0 g	K ₂ HPO ₄	1.0 g
		K ₂ HPO ₄	1.0 g	Trace salts solution	1.0 ml
Yeast extract (Difco)	4.0 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 g	Agar	15.0 g
Malt extract (Difco)	10.0 g	NaCl	1.0 g	-----	
Glucose	4.0 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0 g	Distilled water	1.0 L
Agar	20.0 g	CaCO ₃	2.0 g		
-----		Trace salts solution	1.0 ml	Trace salts solution	
Distilled water	1.0 L	-----		FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
		Agar	20.0 g	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1 g
		Distilled water	1.0 L	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
				Distilled water	100.0 ml

표 3. 중국토양으로부터 방선균분리에 사용된 배지들의 조성



Strain NO.	Bioassay strain		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	KCTC1916	KACC10762	KCTC 9713
A276	1.2	1.0	0
A283	1.2	0.65	0
A291	0.75	0.6	1.7
A355	1.05	1.1	0
A375	0	0.45	0.75
A383	1.3	0.55	0
A401	0	0	1.9
A407	1.1	1	0

※ Inhibitor Zone Size(배양액 60 μ l 에 대한 환의 반지름임)

표 4. 2차 bioassay 결과 분리된 항 bacterial 및 항진균 활성균주들의 역가

(7f) A276

```
GGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTC
ACTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATACCACTCCTGCCTGCATGGGCGGGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATG
AGCCCAGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGA
CTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACCGCGTGAGGGAT
GACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCACGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCCGGATGTGAAAGCCCG
AGGCTTAACCTCGGGTCTGCATTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGT
```

>gi|1945126|dbj|D85111.1|STM16RRNAF *Streptomyces lavendulae* DNA for 16S rRNA, strain IFO 12343 Length = 1514 Score = 1168 bits (589), Expect = 0.0

Identities = 595/597 (99%) Strand = Plus / Plus

```
Query: 1 ggcgtgcttaacacatgcaagtcgaacgatgaagcccttcgggggtgattagtgccgaac 60
      |||
Sbjct: 32 ggcgtgcttaacacatgcaagtcgaacgatgaagcccttcgggggtgattagtgccgaac 91

Query: 61 gggtagtaaacacgtgggcaatctgccctcactctgggacaagccctggaacggggtc 120
      |||
Sbjct: 92 gggtagtaaacacgtgggcaatctgccctcactctgggacaagccctggaacggggtc 151

Query: 121 taataccggataccactcctgcctgcatgggcggggttgaagctccggcggtaagga 180
      |||
Sbjct: 152 taataccggataccactcctgcccgcattgggcggggttgaagctccggcggtaagga 211

Query: 181 tgagcccgcggcctatcagcttgttggtgggtaatggcccaccaaggcgacgacgggta 240
      |||
Sbjct: 212 tgagcccgcggcctatcagcttgttggtgggtaatggcccaccaaggcgacgacgggta 271

Query: 241 gccggcctgagagggcgaccggccacactgggactgagacacggcccagactcctacggg 300
      |||
Sbjct: 272 gccggcctgagagggcgaccggccacactgggactgagacacggcccagactcctacggg 331

Query: 301 aggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgaaagcctgatgcagcgacgcccgctgag 360
      |||
Sbjct: 332 aggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgaaagcctgatgcagcgacgcccgctgag 391

Query: 361 ggatgacggccttcgggttgtaaacctctttcagcaggaagaagcgaagtgacggtac 420
      |||
Sbjct: 392 ggatgacggccttcgggttgtaaacctctttcagcaggaagaagcgaagtgacggtac 451

Query: 421 ctgcagaagaagcgccggctaactacgtgccagcagccacgtaatacgtagggcgcaag 480
      |||
Sbjct: 452 ctgcagaagaagcgccggctaactacgtgccagcagccacgtaatacgtagggcgcaag 511

Query: 481 cgttgccggaattattgggctaaagagctcgtagggcgttgacgctcgatgtgaa 540
      |||
Sbjct: 512 cgttgccggaattattgggctaaagagctcgtagggcgttgacgctcgatgtgaa 571
```

Query: 541 agcccgaggcttaacctcgggtctgcattcgatacgggctagctagagtgtggtagg 597
|||||
Sbjct: 572 agcccgaggcttaacctcgggtctgcattcgatacgggctagctagagtgtggtagg 628

(2) A283

CGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCGCTTCGGTGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCC
TTCACCTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAATACTCCTGCCTGCATGGGTGGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGG
ATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTG
GGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCCGGTGAGG
GATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGCGGGCTTGTCACGTCGGATGTGAAAGC
CCGGGGCTTAACCCCGG

>gi|7715013|gb|AF112160.1|AF112160 *Streptomyces caviscabies* strain ATCC51928 16S ribosomal
RNA gene,

partial sequence Length = 1523

Score = 1047 bits (528), Expect = 0.0

Identities = 555/564 (98%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 cggcgtgcttaacacatgcaagtcgaacgatgaagccgcttcggtggtgattagtggcg 60
|||||
Sbjct: 42 cggcgtgcttaacacatgcaagtcgaacgatgaagccgcttcggtggtgattagtggcg 101

Query: 61 aacgggtgagtaaacacgtgggcaatctgcccttactctgggacaagccctggaaacggg 120
|||||
Sbjct: 102 aacgggtgagtaaacacgtgggcaatctgcccttactctgggacaagccctggaaacggg 161

Query: 121 gtctaataccggataaactcctgcctgcatgggtgggggtgaaagctccggcggtgaa 180
|||||
Sbjct: 162 gtctaataccggataaactcctgtcccgatgggacggggtaaaagctccggcggtgaa 221

Query: 181 gtaggagcccggcctatcagcttggtgggtaatggcctaccaaggcgacgacgg 240
|||||
Sbjct: 222 gtaggagcccggcctatcagcttggtgggtaatggcctaccaaggcgacgacgg 281

Query: 241 gtagccggcctgagagggcgaccggccacactgggactgagacacggcccagactcctac 300

Sbjct: 282 gtagccggcctgagagggcgaccggccacactgggactgagacacggcccagactcctac 341

Query: 301 gggaggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgaaagcctgatgcagcgacgccgct 360
|||||

Sbjct: 342 gggaggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgaaagcctgatgcagcgacgccgct 401

Query: 361 gagggatgacggccttcgggttgtaaactctttcagcaggaagaagcgcaagtgcgg 420
|||||

Sbjct: 402 gagggatgacggccttcgggttgtaaactctttcagcaggaagaagcgaaagtgcgg 461

Query: 421 tacctgcagaagaagcgccggctaactacgtgccagcagccggtaatacgtagggcg 480
|||||

Sbjct: 462 tacctgcagaagaagcgccggctaactacgtgccagcagccggtaatacgtagggcg 521

Query: 481 aagcgttgccggaattattggcgtaaagagctcgtagcgcttgctcacgtcggatgt 540
|||||

Sbjct: 522 aagcgttgccggaattattggcgtaaagagctcgtagcgcttgctcacgtcggatgt 581

Query: 541 gaaagcccgggcttaaccccggg 564
|||||

Sbjct: 582 gaaagcccgggcttaaccccggg 605

>gi|971126|dbj|D63872.1|D63872 *Streptomyces setonii* 16S ribosomal RNA, complete sequence
Length = 1532

Score = 1047 bits (528), Expect = 0.0 Identities = 555/564 (98%) Strand = Plus / Plus

Query: 1 cgcgctgcttaacacatgcaagtcgaacgatgaagccgcttcggtggtggattagtgcg 60
|||||

Sbjct: 42 cgcgctgcttaacacatgcaagtcgaacgatgaagccgcttcggtggtggattagtgcg 101

Query: 61 aacgggtgagtaaacacgtgggcaatctgcccttactctgggacaagccctggaacggg 120
|||||

Sbjct: 102 aacgggtgagtaaacacgtgggcaatctgcccttactctgggacaagccctggaacggg 161

Query: 121 gtctaataccggataaactcctgcctgcatgggtgggggtgaaagctccggcggtgaa 180
|||||

Sbjct: 162 gtctaataccggataaactcctgtcccgcatgggacggggttaaagctccggcggtgaa 221

Query: 181 ggatgagccccggcctatcagcttggtggggtaatggcctaccaaggcgacgacgg 240
|||||

Sbjct: 222 ggatgagccccggcctatcagcttggtggggtaatggcctaccaaggcgacgacgg 281

Query: 241 gtagccggcctgagagggcgaccggccacactgggactgagacacggcccagactcctac 300
 |||
 Sbjct: 282 gtagccggcctgagagggcgaccggccacactgggactgagacacggcccagactcctac 341

Query: 301 gggaggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgaaagcctgatgcagcgacgcccgt 360
 |||
 Sbjct: 342 gggaggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgaaagcctgatgcagcgacgcccgt 401

Query: 361 gagggatgacggccttcgggttgtaaacctctttcagcaggaagaagcgcaagtgcagg 420
 |||
 Sbjct: 402 gagggatgacggccttcgggttgtaaacctctttcagcaggaagaagcgaaagtgcagg 461

Query: 421 tacctgcagaagaagcgccggctaactacgtgccagcagccggtaatacgtagggcgc 480
 |||
 Sbjct: 462 tacctgcagaagaagcgccggctaactacgtgccagcagccggtaatacgtagggcgc 521

Query: 481 aagcgttgccggaattattggcgtaaagagctcgtaggcggcttgccacgtcggatgt 540
 |||
 Sbjct: 522 aagcgttgccggaattattggcgtaaagagctcgtaggcggcttgccacgtcggatgt 581

Query: 541 gaaagcccggggcttaaccccggg 564
 |||
 Sbjct: 582 gaaagcccggggcttaaccccggg 605

(ㄷ) 291

CCCGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCC
 TTCACTCTGGGACAAGCCCTGAAACGGGGTCTAATACCGGATACGACTGCGGAAGGCATCTTCTGTGGTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGG
 ATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGTGGTGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGCCACACTG
 GGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGG
 GATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCA
 GCAGCCCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCTTGTACAGTCGGATGTGAAAGC
 CCGAGGCTTAACCTCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGT

>gi|7110020|gb|AF131586.1|AF131586 Streptomyces sp. IM-7341 16S ribosomal RNA gene, partial
 sequence Length = 836 Score = 1199 bits (605), Expect = 0.0
 Identities = 614/617 (99%) Strand = Plus / Plus

>gi|7110023|gb|AF131589.1|AF131589 Streptomyces sp. IM-7356 16S ribosomal RNA gene, partial
 sequence Length = 836

Score = 1191 bits (601), Expect = 0.0

Identities = 613/617 (99%) Strand = Plus / Plus

>gi|1945129|dbj|D85114.1|STM16RRNAI Streptomyces lavendulae DNA for 16S rRNA, strain IFO 14028

Length = 1514

Score = 1168 bits (589), Expect = 0.0

Identities = 609/617 (98%)

Strand = Plus / Plus

(라) 355

GGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTC
ACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGCCTAATACCGGATACGACCTGCCGAGGCATCTTGGCGGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATG
AGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCCGCCCACTGGGA
CTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACCCGCGTGAGGGAT
GACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTACGTCGGGTGTAAAGCCCG
GGGCTTAACCCCGGTCTGCATCCGATACGGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGT

>gi|10038669|dbj|AB045861.1|AB045861 Streptomyces lipmanii gene for 16S rRNA

Length = 1484

Score = 1172 bits (591), Expect = 0.0

Identities = 612/619 (98%)

Strand = Plus / Plus

>gi|7109992|gb|AF131558.1|AF131558 Streptomyces sp. IM-7159 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length = 837

Score = 1158 bits (584), Expect = 0.0

Identities = 612/620 (98%), Gaps = 1/620 (0%)

Strand = Plus / Plus

>gi|509104|emb|X79851.1|SB16SRRN S.bikiniensis gene for 16S ribosomal RNA

Length = 1517

Score = 1156 bits (583), Expect = 0.0

Identities = 610/619 (98%)

Streptomyces lipmanii / *Streptomyces bikiniensis*

(□) 375

```
GTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACT
CTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAACTCTGTCTGCATGGGACGGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGC
CCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGAC
GGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTACGACAGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACAGTCGGATGTGAAAGCCCGGG
CTTAACCCCGGGTCTGCATTGATACGGACTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGC
```

>gi|16611977|gb|AF429390.1|AF429390 *Streptomyces* sp. VTT E-99-1326 (A4) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length = 1518

Score = 1201 bits (606), Expect = 0.0 Identities = 615/618 (99%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 1  gtgcttaacacatgcaagtcgaacgatgaagcccttcgggggtggattagtgccgaacggg 60
          |||
Sbjct: 37  gtgcttaacacatgcaagtcgaacgatgaagcccttcgggggtggattagtgccgaacggg 96

Query: 61  tgagtaacacgtgggcaatctgcccttactctgggacaagccctggaaacggggctaa 120
          |||
Sbjct: 97  tgagtaacacgtgggcaatctgcccttactctgggacaagccctggaaacggggctaa 156

Query: 121 taccggataaactctgtcctgcctgcatgggacgggggtgaaagctccggcgggtaaggatga 180
          |||
Sbjct: 157 taccggataaactctgtcccgcctgcatgggacgggggtgaaagctccggcgggtaaggatga 216

Query: 181 gcccgcggcctatcagcttggtggggtaatggcctaccaagggcagcagcgggtagcc 240
          |||
Sbjct: 217 gcccgcggcctatcagcttggtggggtaatggcctaccaagggcagcagcgggtagcc 276

Query: 241 ggcctgagagggcgaccggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggagg 300
          |||
Sbjct: 277 ggcctgagagggcgaccggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggagg 336

Query: 301 cagcagtggggaatattgcacaatgggCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGAC 360
```

Sbjct: 337 cagcagtggggaatattgcacaatgggcgaaagcctgatgcagcgacgccgctgagggga 396

Query: 361 tgacggccttcgggttgtaaacctctttcagcaggaagaagcgcaagtgacggtacctg 420
|||||

Sbjct: 397 tgacggccttcgggttgtaaacctctttcagcaggaagaagcgaaagtgacggtacctg 456

Query: 421 cagaagaagcggcgtaactacgtgccagcagccggtaatacgtagggcgcaagcgt 480
|||||

Sbjct: 457 cagaagaagcggcgtaactacgtgccagcagccggtaatacgtagggcgcaagcgt 516

Query: 481 tgtccggaattattggcgtaaagagctcgtaggcggcttgtcacgtcggatgtgaaagc 540
|||||

Sbjct: 517 tgtccggaattattggcgtaaagagctcgtaggcggcttgtcacgtcggatgtgaaagc 576

Query: 541 ccggggcttaacccgggtctgcattcgatacggactagctagagtgtggtaggggagat 600
|||||

Sbjct: 577 ccggggcttaacccgggtctgcattcgatacgggctagctagagtgtggtaggggagat 636

Query: 601 cggaaattcctggtgtagc 618
|||||

Sbjct: 637 cggaaattcctggtgtagc 654

>gi|16611990|gb|AF429399.1|AF429399 Streptomyces sp. VTT E-99-1335 (B323) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length = 1518

Score = 1193 bits (602), Expect = 0.0 Identities = 614/618 (99%)
Strand = Plus / Plus

>gi|16611989|gb|AF429398.1|AF429398 Streptomyces sp. VTT E-99-1334

>gi|16611986|gb|AF429396.1|AF429396 Streptomyces sp. VTT E-99-1332

>gi|16611984|gb|AF429395.1|AF429395 Streptomyces sp. VTT E-99-1331

>gi|16611980|gb|AF429392.1|AF429392 Streptomyces sp. VTT E-99-1328

>gi|16611978|gb|AF429391.1|AF429391 Streptomyces sp. VTT E-99-1327

Score = 1193 bits (602), Expect = 0.0
Identities = 614/618 (99%)

(H) 383

```
GTGCTTAACACATGCAAGTCNAACGGTGAAGCCCTTCGGGGTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACT
CTGGGACAAGCCCTGGAAACNGGGTCTAATACCGGATATGACCCGGGAGCGCATGCTCTCGGGTGTAAAGTCCGGCGGTGCAGGATGAGC
CCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCCGGTGAGGGATGAC
GGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCCTGTCCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGG
CTTAACCCCGGGTCTGCATTGCATACGGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCCGAGATATC
AGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCC GCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTTGCCGACATCCCCTCGTCG
```

>gi|2290498|gb|U93312.1|U93312 *Kitasatosporia azaticus* strain IF013803 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length = 1481

Score = 1445 bits (729), Expect = 0.0 Identities = 771/783 (98%), Gaps = 2/783 (0%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 1  gtgcttaacacatgcaagtcaaacgggtaagcccttcgggggtggatcagtgccgaacggg 60
          |||
Sbjct: 37  gtgcttaacacatgcaagtcgaacgggtaagcccttcgggggtggatcagtgccgaacggg 96

Query: 61  tgagtaacacgtgggcaatctgccctgactctgggacaagccctggaaacngggctaa 120
          |||
Sbjct: 97  tgagtaacacgtgggcaatctgccctgactctgggacaagccctggaaacngggctaa 156

Query: 121 taccggatatgacccgggagcgcatgctctcgggtgtaaagctccggcgggtgcaggatga 180
          |||
Sbjct: 157 taccggatatgacctgggaccgcatggttctcgggtgtaaagctccggcgggtgcaggatga 216

Query: 181 gcccgggcctatcagcttggtggggtaatggcctaccaaggcgacgacgggtagcc 240
          |||
Sbjct: 217 gcccgggcctatcagcttggtggggtaatggcctaccaaggcgacgacgggtagcc 276

Query: 241  ggctgagagggcgaccggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggagg 300
          |||
Sbjct: 277  ggctgagagggcgaccggccacactgggactgagacacagcccagactcctacgggagg 336

Query: 301  cagcagtggggaatattgcacaatgggCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCCGGTGAGGGGA 360
          |||
Sbjct: 337  cagcagtggggaatattgcacaatgggCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCCGGTGAGGGGA 396
```


>gi|5821274|dbj|AB024442.1|AB024442 *Streptomyces kasugaensis* DNA for 16S ribosomal RNA strain

MB273-C4, partial sequece
Length = 1488

Score = 1174 bits (592), Expect = 0.0
Identities = 613/620 (98%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 gcgtgcttaacacatgcaagtcgaacgatgaaccggtttcggccggggattagtgccgaa 60
|||||
Sbjct: 21 gcgtgcttaacacatgcaagtcgaacgatgaaccggtttcggccggggattagtgccgaa 80

Query: 61 cgggtgagtaacacgtgggcaatctgcccttcaactctgggacaagccctggaaacggggt 120
|||||
Sbjct: 81 cgggtgagtaacacgtgggcaatctgcccttcaactctgggacaagccctggaaacggggt 140

Query: 121 ctaataccggatatgacacacggaggcatctcctgtgtgtgaaagctccggcgggtgaag 180
|||||
Sbjct: 141 ctaataccggatatgacgcacgaccgcatggtctgtgtgtgaaagctccggcgggtgaag 200

Query: 181 gatgagcccggcctatcagcttgttggtggggtgatggcctaccaaggcgcgacgagg 240
|||||
Sbjct: 201 gatgagcccggcctatcagcttgttggtggggtgatggcctaccaaggcgcgacgagg 260

Query: 241 tagccggcctgagagggcgaccggccacactgggactgagacacggcccagactcctacg 300
|||||
Sbjct: 261 tagccggcctgagagggcgaccggccacactgggactgagacacggcccagactcctacg 320

Query: 301 ggaggcagcagtggggaatattgcacaaatgggcgaaagcctgatgcagcgcgcccggctg 360
|||||
Sbjct: 321 ggaggcagcagtggggaatattgcacaaatgggcgaaagcctgatgcagcgcgcccggctg 380

Query: 361 agggatgacggccttcgggttgtaaacctctttcagcaggaagaagcgagagtgcgggt 420
|||||
Sbjct: 381 agggatgacggccttcgggttgtaaacctctttcagcaggaagaagcgagagtgcgggt 440

Query: 421 acctgcagaagaagcgccggctaactacgtgccagcagccgggtaatacgtagggcgca 480
|||||
Sbjct: 441 acctgcagaagaagcgccggctaactacgtgccagcagccgggtaatacgtagggcgca 500

Query: 481 agcgttggtccggaattattgggcgtaaagagctcgtaggcggttgtcgcgctcggatgtg 540
|
Sbjct: 501 agcgttggtccggaattattgggcgtaaagagctcgtaggcggttgtcgcgctcggatgtg 560

Query: 541 aaagcccggtttaaaccggtctgcattcgatacgggcaggctagagttcggtaggg 600
|
Sbjct: 561 aaagcccggtttaaaccggtctgcattcgatacgggcaggctagagttcggtaggg 620

Query: 601 gagatcgggaattcctggtgt 620
|
Sbjct: 621 gagatcgggaattcctggtgt 640

>gi|5821273|dbj|AB024441.1|AB024441 *Streptomyces kasugaensis* DNA for 16S ribosomal RNA,
strain M338-M1, partial sequence Length = 1488

Score = 1174 bits (592), Expect = 0.0 Identities = 613/620 (98%)
Strand = Plus / Plus

(0|) 407

GGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTC
ACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGTCTAATACCGGATATCACTCTTGCAGGCATCTGTGAGGGTCGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATG
AGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACNCGCCCACTGGG
ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCCGGTGAGGGA
TGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTACAGTCGGGTGTGAAAGCCC
GGGGCTTAACCCCGGTCTGCATTGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGT

>gi|509208|emb|X79852.1|SG16SRR *S. galbus* gene for 16S ribosomal RNA
Length = 1517

Score = 1197 bits (604), Expect = 0.0
Identities = 616/619 (99%), Gaps = 1/619 (0%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 ggcgtgcttaacacatgcaagtcaacgatgaaccacttcggtggggattagtgccgaac 60
|
Sbjct: 34 ggcgtgcttaacacatgcaagtcaacgatgaaccacttcggtggggattagtgccgaac 93

Query: 61 gggtagtaacacgtgggcaatctgcccttcaactctgggacaagccctggaaacggggtc 120
|

Sbjct: 94 gggtgagtaaacagtgggcaatctgcccttactctgggacaagccctggaacggggtc 153

Query: 121 taataccggatatacactcttgaggcatctgtgagggtcgaagctccggcggtgaagga 180
|||||

Sbjct: 154 taataccggatatacactcttgaggcatctgtgagggtcgaagctccggcggtgaagga 213

Query: 181 tgagcccggcctatcagcttgttggtgaggtaacggctcaccaaggcgacgacgggta 240
|||||

Sbjct: 214 tgagcccggcctatcagcttgttggtgaggtaatggctcaccaaggcgacgacgggta 273

Query: 241 gccggcctgagagggcgacncngccacactgggactgagacacggcccagactcctacgg 300
|||||

Sbjct: 274 gccggcctgagagggcgac~cggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgg 332

Query: 301 gaggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgaaagcctgatgcagcgacgcccggtga 360
|||||

Sbjct: 333 gaggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgaaagcctgatgcagcgacgcccggtga 392

Query: 361 gggatgacggccttcgggttgtaaacctctttcagcaggaagaagcgaagtgacggta 420
|||||

Sbjct: 393 gggatgacggccttcgggttgtaaacctctttcagcaggaagaagcgaagtgacggta 452

Query: 421 cctgcagaagaagcgccggctaactacgtgccagcagccggtaatacgtagggcgcaa 480
|||||

Sbjct: 453 cctgcagaagaagcgccggctaactacgtgccagcagccggtaatacgtagggcgcaa 512

Query: 481 gcgttgtccggaattattggcgtaaagagctcgtaggcggctgtcacgtcgggtgtga 540
|||||

Sbjct: 513 gcgttgtccggaattattggcgtaaagagctcgtaggcggctgtcacgtcgggtgtga 572

Query: 541 aagcccgggcttaaccccgggtctgcattcgatacgggctagctagagtgtgtagggg 600
|||||

Sbjct: 573 aagcccgggcttaaccccgggtctgcattcgatacgggctagctagagtgtgtagggg 632

Query: 601 agatcggaaattcctggtgt 619
|||||

Sbjct: 633 agatcggaaattcctggtgt 651

>gi|10038679|dbj|AB045877.1|AB045877 *Streptomyces capoamus* gene for 16S rRNA

Length = 1484

Score = 1181 bits (596), Expect = 0.0 Identities = 614/619 (99%), Gaps = 1/619 (0%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 ggcgtgcttaacacatgcaagtcgaacgatgaaccacttcggtggggattagtgccgaac 60
|||||

Sbjct: 20 ggcgtgcttaacacatgcaagtcgaacgatgaaccacttcggtggggattagtgccgaac 79

Query: 61 gggtgagtaaacacgtgggcaatctgcccttactctgggacaagccctggaaacggggtc 120
|||||

Sbjct: 80 gggtgagtaaacacgtgggcaatctgcccttactctgggacaagccctggaaacggggtc 139

Query: 121 taataccggatatcactcttcagcagcatctgtgagggtcgaaagctccggcgggtaagga 180
|||||

Sbjct: 140 taataccggataaccactcttcagcagcagcatctgtgagggtgaaagctccggcgggtaagga 199

Query: 181 tgagcccggcctatcagcttgttggtgaggaacggctcaccaaggcagcagcgggta 240
|||||

Sbjct: 200 tgagcccggcctatcagcttgttggtgaggaacggctcaccaaggcagcagcgggta 259

Query: 241 gccggcctgagagggcgacncngccacactgggactgagacacggcccagactcctacgg 300
|||||

Sbjct: 260 gccggcctgagagggcgac-cggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgg 318

Query: 301 gaggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgaaagcctgatgcagcagcggcgggta 360
|||||

Sbjct: 319 gaggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgaaagcctgatgcagcagcggcgggta 378

Query: 361 gggatgacggccttcgggttgtaaacctcttcagcagggagaagcgaagtgacggta 420
|||||

Sbjct: 379 gggatgacggccttcgggttgtaaacctcttcagcagggagaagcgaagtgacggta 438

Query: 421 cctgcagaagaagcggcctaactacgtgccagcagcggcggtaatacgtagggcga 480
|||||

Sbjct: 439 cctgcagaagaagcggcctaactacgtgccagcagcggcggtaatacgtagggcga 498

Query: 481 gcggtgtccggaattattgggcgtaaagagctcgtagggcggctgtcacgtcgggtgta 540
|||||

Sbjct: 499 gcggtgtccggaattattgggcgtaaagagctcgtagggcggctgtcacgtcgggtgta 558

Query: 541 aagcccgggcttaaccccgggtctgcattcgatcgggctagctagagtgtggtaggg 600
|||||

Sbjct: 559 aagcccgggcttaaccccgggtctgcattcgatcgggctagctagagtgtggtaggg 618

Query: 601 agatcggaattcctggtgt 619
 |||||
Sbjct: 619 agatcggaattcctggtgt 637

>gi|7110025|gb|AF131591.1|AF131591 *Streptomyces* sp. IM-7362 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence Length = 836

Score = 1174 bits (592), Expect = 0.0 Identities = 613/619 (99%), Gaps = 1/619 (0%)
Strand = Plus / Plus

>gi|509121|emb|X79853.1|SH16SRR *S. hygroscopicus* gene for 16S ribosomal RNA
 Length = 1517

Score = 1174 bits (592), Expect = 0.0
Identities = 613/619 (99%), Gaps = 1/619 (0%)

>gi|10038676|dbj|AB045868.1|AB045868 *Streptomyces fimbriatus* gene for 16S rRNA
 Length = 1484

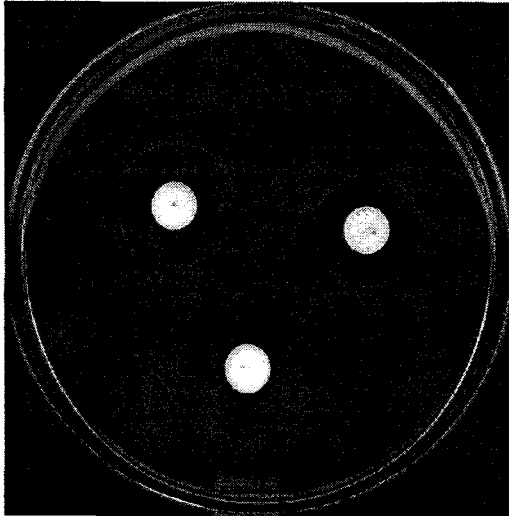
Score = 1174 bits (592), Expect = 0.0
Identities = 613/619 (99%), Gaps = 1/619 (0%)

그림 2. 16S rRNA sequencing을 통한 활성균주의 동정 결과

방선균류 특이적인 16S rRNA 증폭을 위해 Volker등(Microbiology (1996) ; 142, 3-16)의 방법을 이용하였고 염기서열분석은 농업생명과학균주센터(KACC)에서 실시하였다. 10개균주 동일하게 500-600 base pair의 염기서열을 읽은 다음 homology search 결과 특이종으로 판명되면 전체 염기서열을 결정하였다.

이들중 383균주는 16S rRNA 염기서열분석결과 희귀방선균 *Kitasatospora*속에 속하는 균주로 판명되었으며 16S rRNA 염기서열의 homology에 근거한 계통분석으로 볼 때 신종일 가능성이 큰 균주로 사료되었다. 본 연구진에서는 383 균주를 *Kitasatospora* MJM3로 명명하고 균주로부터 포도상구균 등에 강력한 활성을 나타내는 활성물질에 대한 분리, 정제 연구가 진행중에 있다. MJM3균주가 생산하는 물질은 용매추출 특성상 배지를 중성으로 조절한 Ethylacetate층에서 가장 활성이 크게 나타났으며 포도상구균에 가장 활성을 보이는 유기층(중성 EtOAc) 활성물질을 분리하고자 하였다 (그림 4, 5). 또한, 내성균주에 대한 활성을 갖는 미생물을 분리하고자 다재내성균주인 *Serratia marcescens* 를 비롯한 내성균주에 대한 활성검색도 아울러 진행하고 있다.

(A)



(B)

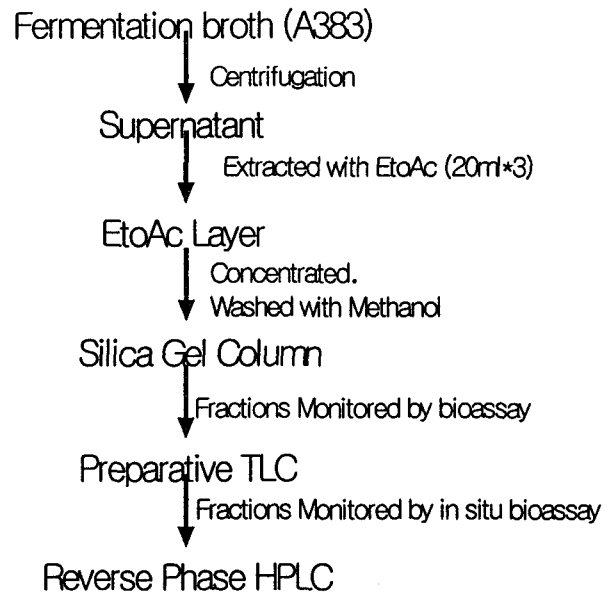
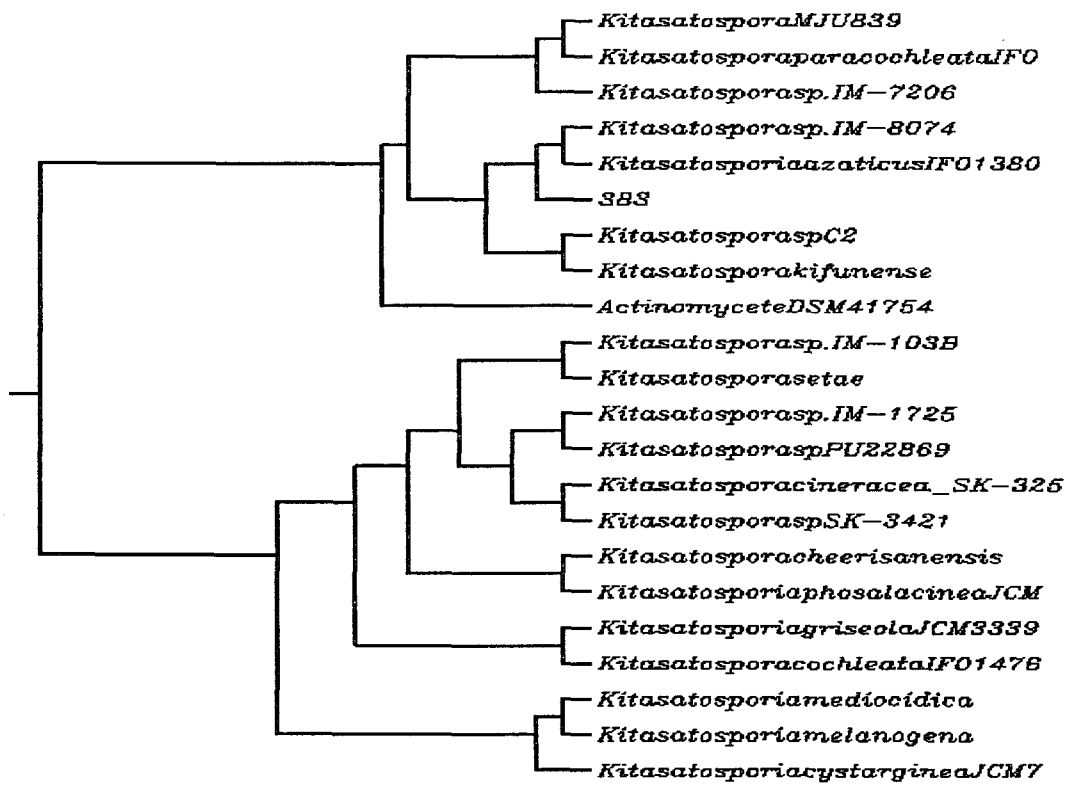


그림 3. 황색포도상구균(*S. aureus*)에 활성물질을 생산하는 *Kitasatospora* MJM3균주의 bioassay (A) 결과와 분리.정제 방법 (B).

(A) MJM3 균주의 broth (Benett's) 60 μ l와 EtOAc 3회 추출후 60 μ l를 disk paper diffusion 방법으로 실시한 결과로 배지상에서와 동일한 활성이 유기층에서만 확인되면 추출한 aqueous 층에서는 활성을 보이지 않고 있다.

(B) 이 활성물질을 분리. 정제하기 위하여 Silica gel column chromatography와 Preparative TLC를 통한 분리정제를 거쳐 활성물질을 HPLC system을 이용하여 분리가 진행중이다.

(A)



(B)

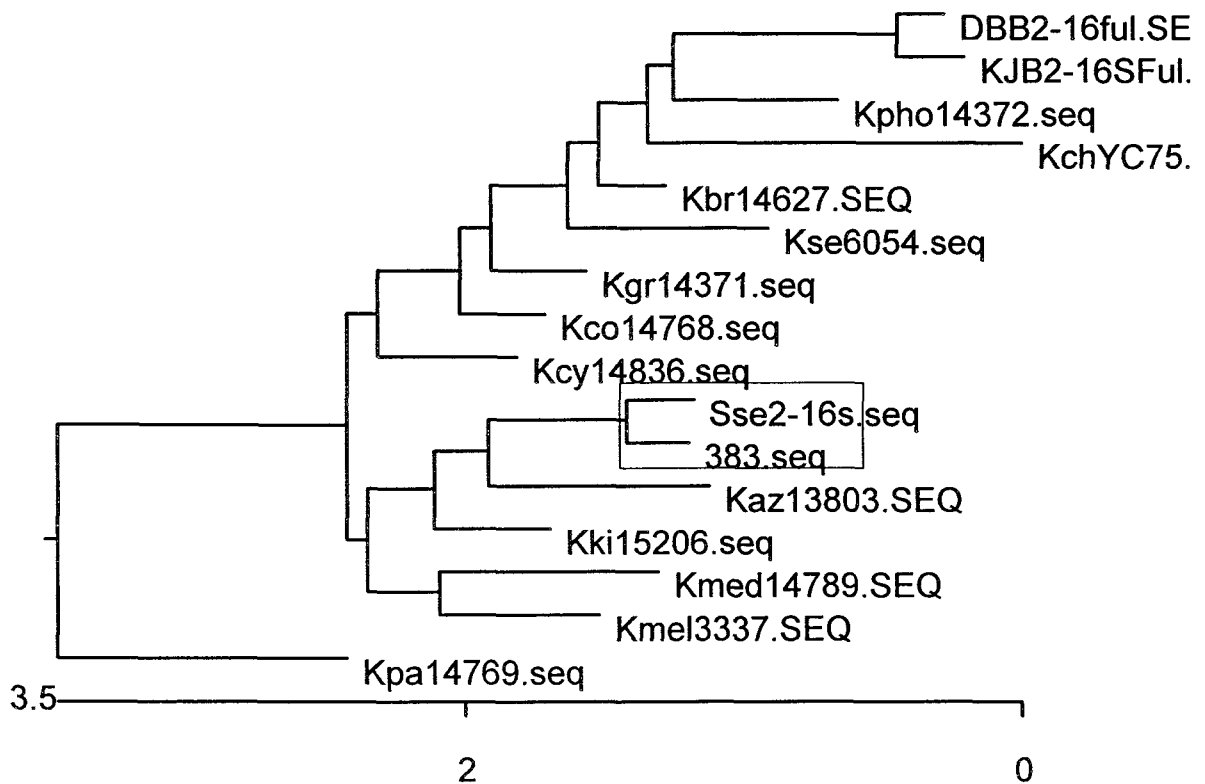


그림 4. 16S rRNA 염기서열에 근거한 *Kitasatospora* MJM3 균주의 계통분석도

- (A) Genbank에 등재된 20개 *Kitasatospora* 균주의 16S rRNA 염기서열을 대상으로 Clustal W programe을 이용하여 Multiple Alignment를 실시한 다음 계통분석을 실시하였다. 383 (*Kitasatospora* MJM3)균주는 *K. azaticus* IF01380 균주와 근연종이나 다른 계통인 신종일 가능성을 나타내었다.
- (B) 농업미생물보존센터(KACC)에서 국내에서 분리하여 보유하고 있는 *Kitasatospora*균주들의 16S rRNA sequence를 KACC의 협조를 얻어 분석한 계통도이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 과제에의 궁극적인 목표는 한국과 중국 두 나라간의 유용 산업용 균주를 비롯한 미생물자원의 교류에 있다. 중국은 세계에서 가장 다양한 유용생물자원을 가지고 있는 나라로 유용한 균주교류용 database 구축을 통하여 한중 양국간의 유용생물자원에 대한 교류는 세계적으로 각국이 자국 생물자원확보 및 국외 유출을 엄격히 막고 있는 실정에서 포화상태에 이른 국내 생물자원 탐색에 있어 새로운 돌파구를 마련해줄것으로 기대된다. 사전 조사된 중국 내 생명공학기술 보유 연구소, 대학, 기업에 대하여 한국생명공학연구원 한중생명공학협력센터와 공동으로 조사한 결과와 관련기관에 대한 정보를 한중 생명공학 협력센터(KCBBCC) homepage [<http://kcbbcc.kribb.re.kr/>]에 정리하여 공개하였고 계속 추가되는 자료는 수시로 보완하여 data를 증가시키고 있다. 국내 유용균주를 보유하고 있는 기업 및 연구실에 대한 조사도 지속적으로 진행중이므로 이러한 database 구축을 통한 정보교류는 새로운 생물자원확보와 활용 및 고부가가치 생명공학제품으로의 산업화를 가속화시키는데 도움을 줄 것으로 판단된다. 또한, 중국의 산업유용 균주를 조사하여 국내로 도입하고자 생명공학연구원과 공동으로 중국내 생명공학기술보유 연구소, 대학, 기업에 대한 조사를 통하여 1,000여 개의 관련기관에 대한 정보를 data base화하였으며 home page에 목록집 대신 공개하였다. 현재 이러한 정보를 필요로 하는 연구자들로부터 많은 관심을 보이고 있는점으로 보아 이러한 교류사업이 한중양국간의 공식적인 생명공학산업발전의 창구역할을 할 수 있을 전망이다. 그러하여 국내의 대중국 관련 유용 산업균주 보유 및 수요 조사를 위한 설문작성을 실시하고 국내 기업의 수요조사를 통하여 확인한 결과 항생제, 고지혈증 치료제등 19개 품목에 대해 해당 생산균주 및 기술을 도입하고자 하였다. 이중에 X항생제는(기업 사업 비밀상 추후 공개) 최근 내성세균의 증가와 함께 시급히 필요한 항생제로서 본 사업을 통하여 중국으로부터 국내 모회사에 균주 및 기술이 도입되도록 주선하여 계약이 체결되는 성과를 거두었다. 또한, 상기에서 조사 선택된 균주 중 최근 큰 문제가 되고 있는 methicillin등의 항생제 내성병원균치료제로서 제 4세대 항생제로 높이 평가되고 있는 Teichoplanin 고 생산 산업균주를 도입하여 균주 생산능력 및 분리, 정제방법 등을 검색 확인한 결과 세계시장에서 세계수준에 이르는 것을 알아내었다. 이 유용균주를 국내 산업계에 도입할수 있도록 알선하여 현재 대량 생산공정시험 말기에 이르고 있으며 조만간 국내는 물론이고 세계시장에 그 생산품을 선보일 수 있을 것으로 판단되며 이러한 성과를 시작으로 더욱 국내 산업계에 도움이 될수있는 유용자원을 다량 확보할 수 있을 것으로 사료된다. 특히, 본 연구에서 체결된 Teichoplanin 고생산 산업균주 기술이전실적 등은 본 교류사업에 있어 좋은 본보기가 될수있을것으로 사료된다.

중국토양에서 회귀 방선균 분리를 위하여 중국의 각 지역을 기후, 식생, 토질별로 나누는 다음 채취지역을 선정하여 우선 60 지역으로부터 각기 다른 토양을 채취하여 국내로 도입하였다. 이들로부터 미리 확립시켜둔 미생물 protocol대로 미생물을 분리하여 현재

1,000여 균주를 분리를 완료하고 생물학적 활성을 확인하는 중이며 이러한 토양 채취와 미생물분리작업을 계속 진행할 예정이다. 또한, 이러한 토양 샘플과 미생물들은 1차적으로 생명공학연구소에 기탁하여 영구 보존케 하고 아울러 이들 자원을 필요로 하는 국내업체에 분양하여 활용토록 할 계획이다.

그러나 중국측의 비협조나 중국 행정상의 문제점으로 인한 사업진행의 차질은 앞으로 개선해나가야 할 점으로 판단된다. 또한, 급속한 생물산업 발전속도로 볼 때 앞으로 3-4년 후에는 우리나라가 들어갈 자리가 없을 것으로 판단되므로 이러한 현실에서 중국내 생물 자원의 확보와 연구정보교류는 국익과 직결되는 중요사업으로 앞으로 지속적으로 사업이 진행되도록 해야할것으로 판단된다.

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	한·중 생명공학 협력센터 사업			
	세부사업명	유용물질 생산균주 개발, 검증 및 교류협력			
과제명		유용물질 생산균주 개발, 검증 및 교류협력			
연구기관		명지대학교	연구책임자	서주원	
총연구기간		1999년. 9월. 1일. ~ 2002년. 8월. 31일. (36개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)		정부출연금	민간부담금	합계	
		19,000	1,000	20,000	
기술분야					
참여기업					
공동연구기관		한국 생명공학연구원 (한중 생명공학 협력 센터)			
위탁연구기관					
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)		1. 기업화 ()	2. 기술이전 ()	3. 후속연구추진 ()	4. 타사업에 활용 ()
		5. 선행 및 기초연구 ()	6. 기타목적활용 (교육연구)()	7. 활용중단(미활용)()	8. 기타 (√)
<p style="text-align: center;">특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.</p> <p>첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부. 2. 기술요약서 1부</p> <p style="text-align: right;">2002 년 8 월 일</p> <p style="text-align: right;">연구책임자 : 서 주 원 (인) 연구기관장 : 선 우 중 호 (직인)</p> <p style="text-align: left;">과학기술부장관 귀하</p>					

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

- 가. 한·중 생명공학산업에서 유용미생물 균주조사 및 유용 균주검증 시스템 확립 및 가동
- (1) 한·중 생명공학산업내에서 필요로 하는 유용균주를 조사하고 이를 물질별, 생산균주별로 분류하고 이들을 검증할 수 있는 검증 시스템을 확립하여 가동
- 나. 유용 산업균주 도입 및 수출을 비롯한 교류 협력
- (1) 유용 산업균주를 필요로 하는 한국과 중국내 수요처를 조사하고 생리활성이 검증된 균주의 국내 도입 및 수출을 포함하는 교류협력의 증진
- (2) 중국내 다양한 미생물자원 수집 및 정보교류
- 다. 중국내 특이 생태계에서 토양 세균 수집 및 균주분리
- (1) 중국토양을 기후, 식생별로 Sample을 채취하고 이들로부터 회귀방선균을 비롯한 토양미생물을 분리하고 수집된 미생물로부터 유용물질 생산균주를 분리
- 라. 중국내 다양한 미생물자원 공동이용을 통한 국내생물산업발전을 도모하고 양국에 유익한 협력사업발굴을 통한 국익창출

2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록)일자	발명자 (출원인)	출원국	비고

나. 프로그램 등록목록

프로그램 명칭	등록번호	등록일자	개발자	비고

다. 노하우 내역

- (1) 토양으로부터 방선균(Actinomycetes)의 분리, 수집 및 분류 방법.
- (2) 토양으로부터 희귀방선균류를 각 종류별로 분리할 수 있는 배지, 분리방법 및 기술.
- (3) 분리된 미생물로부터 생리활성을 측정하여 탐색하고 그 물질들을 분리, 정제할 수 있는 기술
- (4) 유용한 산업미생물이 생산하는 활성물질에 대한 기능, 활성, 품질등에 대하여 평가하고 확인할 수 있는 기술.

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI게재 여부
		년 월 일				
계: 건수						

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명
		년 월 일			
계: 건수					

3. 연구성과

국내의 대중국 관련 유용 산업균주 보유 및 수요 조사를 위한 설문작성을 실시하고 국내 기업의 수요조사를 통하여 확인한 결과 항생제, 고지혈증 치료제등 19개 품목에 대해 해당 생산균주 및 기술을 도입하고자 하였다. 이중 항생제 Teichoplanin은 최근 내성세균의 증가와 함께 시급히 필요한 항생제로서 본 사업을 통하여 중국으로부터 국내 모기업에 균주 및 기술이 도입되도록 주선하여 계약이 체결되는 성과를 거두었다. 이 균주는 최근 큰 문제가 되고 있는 methicillin등의 항생제 내성병원균치료제로서 제 4세대 항생제로 높이 평가되고 있는 Teichoplanin의 고 생산 산업균주로 이 균주의 국내개발 산업균주보다 10배 이상의 고생

산균주임을 균주 생산능력 및 분리, 정제방법 등을 통하여 확인하였고 그 결과 세계시장에서 세계수준에 이르는 것을 알아내었다. 이 균주의 배양에서부터 상품화까지 이미 기술 이전 및 개발공정이 완료되어 시장에 출시되고 있다.

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

한국내에 존재하지 않는 토양으로부터 새로운 미생물자원을 확보할 수 있다면 이를 산업화하여 부가가치를 창출하는등의 국익을 도모할 수 있다. 그러한 사업의 하나로 중국 내 생태계로부터 희귀 토양세균들을 분리하고 있어 이미 분리가 완료된 균주들과 함께 앞으로 이러한 토양 균을 분리함으로써 신규 항생, 항암물질을 비롯한 신규 생리활성물질 탐색에도 많은 도움이 될 것으로 사료된다. 현재 이러한 균주들의 배양액으로부터 항생, 항암물질 탐색을 실시하고 있고 국내에 연구기관 및 제약회사에서 확립되어 있는 HTS (High-Throughput Screening System)를 활용하여 희귀 생태계로부터 분리된 유용 미생물들을 대상으로 신규의 면역 억제제, anti-HCV agent 및 Angiogenesis inhibitor등을 탐색에 활용할수 있을 것으로 사료된다. 특히, 당해연도에는 특히 이러한 신규물질 탐색에 적극활용하기 위하여 분리된 미생물의 배양액으로부터 유기용매를 이용한 추출액 library를 제작하여 생리활성물질 탐색에 적용할 수 있는 인프라를 구축하려 한다. 미생물은 다양한 구조를 가진 생리활성을 생산하므로 이러한 구조, 화학적 특성에 근거하여 분리할 수 있는 기반을 구축하는데 활용하려 한다.

나. 활용방법

최근 밝혀진 *Streptomyces coelicolor*의 전체 유전체정보에 따르면 *S. coelicolor* 10여개 이상의 항생물질을 생합성하는 유전자군을 가지고 있으며 현재 확인된것만 6개 이상의 생리활성물질을 생산하는 것으로 알려져있다. 이와 같이 방선균류들은 현재 사용되거나 알려진 생리활성물질의 70%를 차지하는 중요한 자원이다. 따라서, 국내에서 이미 여러 연구소와 제약회사에서 포화상태에 이른 국내에서의 생리활성물질 탐색의 원천을 우리와는 토양과 기후등이 다른 중국으로 확대함으로써 희귀 방선균과 같은 새로운 미생물을 분리하여 생리활성물질 탐색에 활용할수 있을것으로 판단된다. 따라서 분리된 균주나 배양액을 관심있는 연구소, 기업등에 제공하여 이러한 생리활성물질 탐색을 통하여 신규의 활성이나 구조를 가진 신물질 탐색의 원천을 제공하기 위한 인프라의 구축에 활용하려 한다.

다. 차년도이후 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

1차년도에 분리된 방선균류로부터 계획한 추출액 library가 제작되면 1,000여 균주에 5,000개 이상의 유기용매 library를 확보할 수 있다. 2-3차년도에도 이러한 미생물의

분리와 추출액 library를 제작하는 일을 계속 진행할 계획이지만 우선 이러한 library가 실제로 생리활성물질 탐색에 잘 활용될 수 있는지 확인하기 위하여 몇 가지 생리활성물질 탐색방법을 통하여 확인할 예정이다. 또한, 원하는 기업이나 연구소등에는 언제든지 제공할 계획이다.

5. 기대효과

먼저 기술적 측면에서 한·중간의 유용균주의 교류협력으로 유용산업 균주개발에 대한 정보수집, 균주의 활성검증으로 인한 유용물질의 대량발효, 활성물질의 분리기술에 대한 자세한 정보입수 및 국내 생태계만으로는 screening source의 다양화에 한계가 있는 취약점을 극복하여 극한환경 및 희귀 생태계로부터 미생물 자원을 확보할 수 있는 기술적 진보를 얻을 수 있다. 이렇게 하여 새로운 유용산업 균주와 유전자원을 확보하여 산업화로 연결된다면 이는 곧 기업의 활성화와 많은 기술적 효과도 얻을 수 있다. 미생물 유래 생리활성물질의 신속한 분리, 정제법 수립, 약효 탐색법 개발 등과 신규의약품 디자인 분야 활성화, 유용 생리활성 물질의 고생산 공정 개발에 의한 발효산업 발전등의 파급효과를 기대 할 수 있다.

경제·산업적 측면에서 유용산업 균주개발에는 사실 많은 시간과 돈, 연구인력이 필요하다. 그러나 이미 중국에서 개발되어 소장하고 있는 생물산업 유용 균주의 교류로 국내에서 개발하지 못한 것이나 개발을 시도하려는 유용 미생물균주를 확보할 수 있다면 많은 경제적 이익을 얻을 수 있을 것이다. 한중교류협력과 같은 채널을 통해 유용산업 균주 자원을 조사, 섭외, 연결해줌과 동시에 유용균주에 대한 신뢰성 있는 검증, 가격자문 및 절충 등으로 국내 수요처 특히 산업체에 공급되어 국내 생물산업의 활성화 및 생물산업의 선도화를 추구하는데도 일조할 수 있을 것으로 사료된다.

또한, 국내에서 이미 포화상태에 이른 신규 생리활성 물질을 찾을 수 있는 source를 다변화할 수 있으므로 중국과 같은 다양한 환경생태계로부터 획득한 토양과 미생물은 다양한 유용 미생물을 다수 확보할 수 있을뿐만 아니라 이러한 미생물을 대상으로 다양한 생리활성물질을 탐색하여 유용균주 개발로 산업적 응용 가능성 제공해줄수있을것으로 판단된다.

이러한 일들은 매출, 수출효과, 원가절감, 인력양성등에서 수조원의 가치가 있는 일들이지만 이들을 정량적으로 평가하려한다면 매우 힘든 일이될 것이다. 예를 들면, 앞서 성과항목에서 언급하였던 Teicoplanin의 경우 올해 매출이 시작되었으므로 매출액을 판단하기 힘들고 고생산균주를 통하여 산업적으로 생산한 물질에 대하여 순수, 분리정제 기술을 개발하여 순도를 높임으로써 품질을 향상하였으므로 수출, 수입효과 및 원가절감, 생산성 향상은 자명한 일이나 이를 정확하게 파악하기는 힘들기 때문이다. 그러나, 이러한 일을 통하여 생물분야에서의 대중국 전문인력양성과 연구개발확대를 통한 고용창출효과, 투자유치, 유용산업미생물의 교류 및 생리활성물질 탐색에 대한 인프라구축 효과등을 충분히 기대할 수 있다.

6. 문제점 및 건의사항(연구성과의 제고를 위한 제도·규정 및 연구관리 등의 개선점을 기재)

앞서 언급한대로 정량적인 연구성과를 도출하기 힘든 과제임에도 불구하고 본 과제가 장기적 안목에서 한국의 생물산업에 크게 기여할수 있는 과제임을 믿고 연구비를 지원해주시는 과기부 관계자 여러분께 감사 드리며 이러한 연구자원 교류나 인프라 구축사업은 1-2년의 짧은 기간 내에서는 크게 경제적인 효과가 나타나는 것은 힘든 일이므로 이를 장기적 안목에서 평가할 필요성이 있을것으로 사료된다.

[첨부2]

기술 요약서

■ 기술의 명칭

※기술이란? 과제 수행결과 확보된 신기술, 산업재산권, 기술적 노하우 등 개발된 성과중 수요자에게 공급할 수 있는 형태의 기술을 의미함

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호			
과제명			
사업명			
세부사업명			
연구기관		기관유형	
참여기관(기업)			
총연구기간			
총연구비	정부()천원	민간()천원	합계()천원
연구책임자 1	성명		주민번호
	근무기관 부서		E-mail
	직위/직급		전화번호
연구책임자 2	성명		주민번호
	근무기관 부서		E-mail
	직위/직급		전화번호
실무연락책임자	성명		소속/부서
	직위/직급		E-mail
	전화번호		FAX
	주소	(-)	

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요]

<기술적 특징>

(1)

(2)

(3)

[용도·이용분야]

(1)

(2)

(3)

■ 기술이전 조건

이전형태	<input type="checkbox"/> 유상 <input type="checkbox"/> 무상	최저기술료	천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전 소요기간	년 개월	실용화예상시기	년도
기술이전시 선행요건			

- * 기술이전시 선행요건 : 기술이전을 위한 사전준비사항(필수 설비 및 장비, 전문가 확보 등)을 기술
- * 실용화예상시기 : 기술을 활용한 대표적인 제품이 최초로 생산이 시작되는 시기를 기재

■ 기술의 개발단계 및 수준

[기술의 완성도] (1개씩 선택(√로 표시)하여 주십시오)

<input type="checkbox"/>	① 기초, 탐색연구단계 : 특정용도를 위해 필요한 신 지식을 얻거나 기술적 가능성을 탐색하는 단계
<input type="checkbox"/>	② 응용연구단계 : 기술적 가능성의 실증, 잠재적 실용화 가능성의 입증 등 실험실적 확인 단계
<input type="checkbox"/>	③ 개발연구단계 : Prototype의 제작, Pilot Plant Test 등을 행하는 단계
<input type="checkbox"/>	④ 기업화 준비단계 : 기업화에 필요한 양산화 기술 및 주변 기술까지도 확보하는 단계
<input type="checkbox"/>	⑤ 상품화 완료단계

[기술의 수명주기] (1개씩 선택(√로 표시)하여 주십시오)

<input type="checkbox"/>	① 기술개념 정립기 : 기술의 잠재적 가능성만 있는 단계
<input type="checkbox"/>	② 기술실험기 : 기술개발에 성공했으나 아직 실용성, 경제성 등이 확실치 않은 단계
<input type="checkbox"/>	③ 기술적용 시작기: 최초의 기술개발국에서만 활용되고 있는 단계
<input type="checkbox"/>	④ 기술적용 성장기: 기술개발국 및 일부 선진국에서 활용되고 있는단계
<input type="checkbox"/>	⑤ 기술적용 성숙기: 선진국사이에서 활발한 기술이전이 일어나며, 기술의 표준화가 되어가는 단계
<input type="checkbox"/>	⑥ 기술적용 쇠퇴기: 선진국에서 개도국으로 기술이전이 활발하게 일어나고, 선진국에서는 기술의 가치가 저하되나, 개도국에서는 아직 시장의 가치가 높은 기술

[기술발전 과정상의 기술수준] (1개씩 선택(√로 표시)하여 주십시오)

<input type="checkbox"/>	① 외국기술의 모방단계 : 이미 외국에서 개발된 기술의 복제, reverse Eng.
<input type="checkbox"/>	② 외국기술의 소화·흡수단계 : 국내시장구조나 특성에 적합하게 적응시킴
<input type="checkbox"/>	③ 외국기술의 개선·개량단계 : 성능이나 기능을 개선시킴
<input type="checkbox"/>	④ 신기술의 혁신·발명단계 : 국내 최초로 개발

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술

[기술개요]

기술명	
개발단계	<input type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	

[기술을 도출한 과제현황]

과제관리번호			
과제명			
사업명			
세부사업명			
연구기관		기관유형	
참여기관(기업)			
총연구기간			
총연구비	합계 : ()백만원 - 정부 : ()백만원 민간 : ()백만원		
연구책임자	소속		성명
	전화번호		E-mail
연구개발 주요내용			

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

치료용의약품과 같은 많은 생리활성물질들은 세균, 방선균, 곰팡이와 같은 미생물들로부터 분리되고 있으며 이들의 분리. 동정기술의 발달로 인해 신규물질의 발견은 다양한 새로운 미생물균주의 확보에 크게 의존하고 있다 (Goodfellow, 1989). 현재까지 미생물로부터 탐색된 10,000여종의 생리활성물질 가운데 약 2/3에 달하는 물질이 방선균(Actinomycetes)으로부터 분리된 것으로 알려져 있다 (김, 1997). 그러므로, 부가가치가 높은 의약, 농업, 식품소재 등 각종 생물소재산업에 있어 가장 중요한 미생물로 인식되고 있다. 생리활성물질은 필요성에 따라 매우 다양하게 분류할 수 있으나 특히, 의약품 생리활성물질은 부가가치가 높아 각 선진국에서는 관련된 신물질의 개발에 주력하고 있다 (조, 2001).

1993년 발효된 국제 생물다양성 협약에 따라 미생물의 다양성과 보존의 중요성이 크게 대두되고 있고 최근 각국이 이러한 자국의 미생물자원에 대하여 유출을 금지하고 자원화하고 있는 상황으로 선진국에서는 많은 장비와 투자 등 모든 가능한 방법을 동원하여 세계각지의 토양시료를 수집하고 있으며 개발도상국에서도 우루구와이 라운드 또는 생물다양성 협약 등을 통하여 자국의 생물자원을 보호하는 등 세계적인 자원전쟁에 대비하고 있다. 이에 따라 국내에서도 신규 미생물탐색과 신물질개발에의 활로를 모색하기 위하여 해양미생물의 연구나 중국, 동남아 등으로 탐색원의 다양화를 추진하고 있다.

생리활성물질탐색분야의 권위있는 논문중 하나인 Journal of Antibiotics에 게재된 최근 15년간의 조사(김, 1999)에 따르면 이전부터 꾸준히 진행되어 오던 항균, 항진균, 항암제 및 농업용생리활성물질의 탐색이 1990년 이후에는 면역, 심혈관치료, 신경계질환 예방 및 치료물질 및 항바이러스제 등으로 매우 다양한 목표를 대상으로 실시되고 있는 것으로 나타났다. 이러한 것은 기존의 생리활성물질의 탐색방법이 매우 다양해지고 사람과 같은 동물, 식물, 미생물등에서 이전에는 밝혀내지 못했던 기작들이 분자생물학의 발달과 최근 대두된 유전체(Genome) 및 proteomics 기법을 근간으로 한 최신 기술들의 발달에 힘입어 새로이 밝혀지면서 계속 새로운 탐색목표점이 발견되고 있다는 것을 시사하고 있다. 그러나 이러한 새로운 탐색원이 나타날 때마다 새로운 미생물을 탐색하려 한다면 이는 인력이나 연구비면에서도 곤란하지만 매우 번거로운 일이 아닐 수 없다. 그래서, 선진국의 제약회사들에서는 미생물들이 분리될 때마다 이들의 배양액을 각 유기용매로 추출한 후 배양액 함께 보존하면서 새로운 탐색목표가 생길 때마다 고성능 탐색기를 이용하여 신규생리활성물질탐색에 활용하고 있다.

앞서 언급한대로 신규의 생리활성물질탐색은 새로운 미생물의 확보에 크게 의존하고 있는데 예를 들면, 이전에는 박테리아, 진균등에서 수집하던 것을 조류등과 같은 해양미생물이나 Mixobacteria, 고세균등으로 확대되고 있고 필요에 따라 고온에서도 성장할 수 있는 고열성 미생물이나 반대로 저온미생물등을 꾸준히 탐색하고 있다. 이러한 경향은 필요에 의한 것도 있으나 기존의 미생물을 탐색하면 이미 알려진 물질을 생산하는 미생물이 중복되어 분리되는 문제점을 타계해보려는 의도로 풀이된다. 기온대와 강수율 및 토양성질이 비교적 동일한 우리나라에서는 이미 미생물의 탐색원이 포화상태에 이르렀다고 판단되며 이러한 상황에서는 기존에 알려진 미생물중에서도 아직 탐색이 이루어지지 않은 미생물을 대상으로 목표지향적인 스크리닝 (target directed

screening)을 실시하여야 할것으로 사료된다. 예를들면, 중요한 생리활성물질의 보고인 방선균류에서도 기존의 *Streptomyces*속이 주류를 이루던 것이 *Micromonospora*속으로부터 gentamycin이 발견되면서 현재는 희소방선균이 새로운 생리활성물질의 탐색원으로 주목을 받고 있다 (Nisbet, 1982).

최근 전체 유전체 염기서열이 밝혀진 *Streptomyce coelicolor* A3(2)의 경우 이미 5가지 종류의 항생물질이 알려져있었으나 추가로 10가지 이상의 2차대사산물들이 생합성될것으로 예상되었다 (Bentley, 2002). 물론 이들이 직접 생산되는지까지는 확인되지 않았으나 이러한 경우와 마찬가지로 다른 방선균들에서도 이미 알려진 생리활성물질 이외에 추가적으로 여러 생리활성물질을 만들어낼것으로 예상하고 있으며 이러한것과 함께 아직 탐색되지 않은 희귀방선균에서는 더 많은 신규구조나 활성을 가지는 신물질이 분리될것으로 예상되고 있다 (Lazarini, 2001).

지구 상에는 아직까지 우리가 밝혀 내지 못한 많은 생리활성물질들이 존재한다. 이런 천연물질들 중 생리활성이 있는 신규물질을 탐색하고 그 화학적 성질을 규명하는 것은 새로운 세기에는 이전보다 더 큰 부가가치를 창출할수 있을것으로 기대되며 최신의 세포, 분자생물학의 정보 및 기법에 입각한 효율적이고 신속한 cell based assay system을 통한 신물질탐색 경쟁은 더 치열해질 전망이다.

제 7 장 참고문헌

- ◆ Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). 2002, *Nature*. **417**(6885) : 141-7.

- ◆ Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G, Marinelli F. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2001 **79**(3-4):399-405.

- ◆ Higgs RE, Zahn JA, Gygi JD, Hilton MD. Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001. **67**(1) : 371-6.

- ◆ Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces* ? *Archives of Microbiology*. 2001. **176**(5):386-90.

- ◆ Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G, Marinelli F. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2000. **78**(3-4):399-405. Review.

- ◆ Pfefferte C, Theobald U, Gurtler H, Fiedler H. Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *Journal of Biotechnol*. 2000, **80**(2):135-42.

- ◆ Volker Gurter and Vilma A. stanisich. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*. 1996. **142** : 3-16

- ◆ Sanglier JJ, Wellington EM, Behal V, Fiedler HP, Ellouz Ghorbel R, Finance C, Hacene M, Kamoun A, Kelly C, Mercer DK., Novel bioactive compounds from actinomycetes. 1993, *Research in Microbiology*. **144**(8) : 661-3

- ◆ Beretta G, Le Monnier F, Selva E, Marinelli F. A novel producer of the antibiotic kirromycin belonging to the genus Actinoplanes. *J Antibiot (Tokyo)*. 1993 **46**(7):1175-7.

- ◆ Franco, C. M., and Coutinho, L. E., (1991), Detection of Novel Secondary Metabolites, *Critical Reviews in Biotechnology*, **11** : 193-276.

- ◆ Huck TA, Porter N, Bushell ME. Positive selection of antibiotic-producing soil isolates. *J Gen Microbiol*. 1991. **137**(Pt10):2321-9

- ◆ Berdy, J. 1989. in "Bioactive metabolites from microorganisms" Bushell, M. E. and U. Grafe. *Progress in Industrial Microbiology*. 27. 3-25.

- ◆ Goodfellow, M. and A. G. O'donnell. 1989. in " Microbial product : New approaches" Baumberg, I and M rhodes eds. Cambridge University Press., Cambridge, 343-383.

- ◆ Hayakawa, M and H. Nonomura., 1987. *Journal of Ferment. Technol*. 501-509.

- ◆ Nisbet, L. J. 1982. Current strategies the search for bioactive microbial metabolites. *J. Chemmm. Technol. Biotechnol*. **32**:251-270

- ◆ Nara T, Kawamoto I, Okachi R, Oka T. Source of antibiotics other than Streptomyces. *Jpn J Antibiot*. 1977. **30** :174-89. Review

- ◆ Lechevalier HA, Lechevalier MP. Biology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol*. 1967 **21** : 71-100.

- ◆ 조완규, 2001. 바이오산업과 정밀화학산업. *생물산업동향*.
(http://bric.postech.ac.kr/bbs/biostat/2001/20010703_1.html)

- ◆ 이상화,김창진. 1999. 생리활성물질 탐색자원으로서의 미생물. *생물산업*. 12 ; 36-40

- ◆ 김창진. 1997. 산업적 유용 방선균의 분리 및 분류. *생물산업*. 10 ; 34-43