

Pseudomonas aeruginosa 3120로부터 항생물질의 생산, 분리 및 특성

고학룡 · 전효곤 · 고영희 · 성낙계*

한국과학기술연구원 유전공학연구소, 경상대학교 식품공학과*

초록 : *Pellicularia sasakii*의 생육을 저해하는 한 균주를 토양으로부터 분리하였으며 *Pseudomonas aeruginosa* 3120으로 동정하였다. *P. aeruginosa* 3120의 배양액으로부터 분리 정제된 암갈색의 MRL3120 항생물질은 ethylacetate, chloroform 및 methanol에 용해되었으며 곰팡이 뿐만 아니라 gram 양성 및 음성세균에도 활성을 나타내었다. UV, IR, EI-MS spectra 및 다른 물리화학적 특성의 분석결과로부터 MRL3120은 2개의 *N*-methyl-*N*-thioformylhydroxylamine과 1개의 Cu 이온으로 구성된 chelate 화합물로서 fluopsin C와 유사한 구조를 가진 것으로 추정되었다. Soybean meal을 포함하는 발효배지에 CuSO_4 의 첨가는 항진균 활성을 증가시켰으나 EDTA(0.1%)의 존재하에서는 활성이 없었다. Soybean meal 대신 soytone을 포함하는 발효배지에서 MRL3120은 생산되지 않았지만 CuSO_4 의 첨가에 의해 빠르게 생산되었다(1993년 9월 1일 접수, 1993년 10월 14일 수리).

*Pseudomonads*는 각종 항생물질과 형광성 siderophores를 생산하여 식물 병원균의 antagonist로 작용하는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 1899년 Emmerich와 Löw가 *Pseudomonas aeruginosa*의 배양 농축액이 여러 가지 세균에 대해 항균작용을 가진다고 보고한 이래 약 50 여종 이상의 항생물질이 *pseudomonads*로부터 분리되었다.²⁾ 이들 대부분은 phenazines, pyrrolnitrins, pyo 화합물 및 indol 유도체 등이며, 방향족 아미노산 생합성 경로의 중간 대사산물 또는 최종산물로 여겨지는 N 함유 heterocycles에 속한다.²⁾ 이들 중 pyocyanine, pyrrolnitrin 및 pseudomonic acid가 상업적인 생산단계에 도달하였으며,³⁾ 이들 항생물질의 생산량 증대를 위해 생육조건 뿐만 아니라 analogue-resistant mutants⁴⁾ 및 nutritional factors⁵⁾ 등에 관한 연구도 행하여 졌다. Howell과 Stipanovic⁶⁾은 목화 묘목(cotton seedlings)의 병원균인 *Rhizoctonia solani*에 대한 *P. fluorescens* pf-5의 antagonistic activity가 pyrrolnitrin 및 pyoluterion의 항생물질 생산에 기인한다는 것을 밝혔으며, Weller 등⁷⁾도 밀 병원균의 생육을 저해하는 *P. fluorescens* 2-79가 항생물질인 phenazine carboxylic acid의 이중체를 생산한다고 보고하였다. 그 이후 *pseudomonads*는 biological control agent로서 관심의 대상이 되었으며 최근에도 몇몇 식물

체의 병원성 곰팡이의 생육을 억제하는 *Pseudomonas* 속 균주의 분리 및 그 항생물질에 관한 보고⁸⁻¹²⁾가 계속되고 있다.

본 연구에서는 토양으로부터 항진균성 항생물질 생산 균주를 탐색하는 과정에서 국내 벼 문고병원균인 *Pellicularia sasakii*에 강한 생육저해 활성을 나타내는 한 균주를 분리하여 균주의 동정 및 생산특성을 조사하고, 분리 균주의 배양 상등액으로부터 물질분리를 행한 후 각종 기기분석을 통한 물질동정 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양

항진균성 시험용 균주로는 국내 벼 문고병에서 분리된 *Pellicularia sasakii*를 사용하였으며 Potato-Dextrose Agar(PDA, pH 5.1) 배지로 28°C에서 7일간 배양하였다. 본 실험에 사용된 *Pseudomonas aeruginosa* 3120 균주는 토양으로부터 강력한 항진균성 물질 생산균주로 분리되었으며, 보존용 배지로는 Luria-Bertani(LB, pH 7.0) agar를 사용하였고 물질생산을 위하여 생산용 배지(GS, glucose 20, soybean meal 25, beef extract 1, yeast extract 4, K_2HPO_4 0.25, NaCl 2, g/l, pH 7.0)를 사용하여

Key words : *Pellicularia sasakii*, antifungal antibiotic, *Pseudomonas*

Corresponding author : Y. H. Kho

30°C 에서 약 7일간 배양하였다.

을 사용하여 조사하였다.

균주의 동정

분리된 균주의 동정은 전자현미경(SEM S450, Hitachi)으로 형태를 관찰하였고, Api kit 20 NE(Api, France)를 이용하여 여러가지 배양학적 및 생리적 특성을 조사한 후 Api profile index 및 Bergey's manual of determinative bacteriology¹³⁾에 의하여 행하였다.

항진균 활성물질의 생산 및 분리

Pseudomonas aeruginosa 3120이 생산한 항진균성 물질은 GS 배지 100 ml을 함유한 500 ml-baffled 삼각 flask에 동일 배지에서 자란 seed를 2%(v/v) 첨가한 후 30°C 에서 150 rpm으로 7일간 배양된 배양액으로부터 분리하였다. 이 배양액을 약 5분간 열처리 한 후 원심 분리 및 celite 여과한 여액에 HCl을 첨가하여 pH를 2.0으로 조절한 다음 ethyl acetate(EtOAc)로 추출하였다. 추출된 EtOAc 층을 감압하에서 농축한 후 1차 silicagel(CHCl₃:MeOH, 70:1) 및 2차 silicagel(CHCl₃:MeOH, 20:1) column chromatography를 행하여 활성분획을 농축하고 소량의 CHCl₃와 MeOH(1:1)의 혼합용액에 녹여 Sephadex LH-20(Pharmacia) column에 loading 한 후 동일 용매로 용출시켰다. 재농축된 활성분획은 최종적으로 HPLC를 이용하여 단일물질로 분리하였으며, 이때 HPLC는 Tosoh TSK-6041 detector와 Tosoh TSK-6011 pump를, column은 Senshu Pak, Silica-2251-N(6×250 mm)을, 용매는 CHCl₃와 EtOAc(10:1)를 이용하여, 유속 1.5 ml/min, 파장 254 nm의 조건으로 행하였다.

항진균 활성물질의 검정

항진균 활성물질의 검정은 paper-disc plate 방법을 이용하였다. 즉, 7일간 배양된 *P. sasakii* 균사체를 약 3시간 동안 balling하여 균질화시킨 현탁액 5 ml을 PDA soft agar(0.6%) 100 ml에 첨가한 다음 동일배지의 agar(2.0%, v/v) plate에 균일하게 피복시켜 수평으로 굳힌 것을 검정 plate로 사용하였다. 항균력을 조사하고자 하는 시료용액 40 µl을 직경 8 mm paper-disc(Advantec, Toyo)에 흡수시키고 풍건한 후 검정 plate 위에 올려놓고 28°C 에서 2일간 배양한 다음 형성된 생육 저지환의 직경을 측정하여 항균력으로 나타내었다.

구조분석

UV/Vis spectrophotometer는 Shimadzu UV-260을, EI-MS는 Hewlett-Packard MS-Engine-5989A를, IR spectrum은 FT-IR(Laser precision Analytical, IFX-65S)

결과 및 고찰

항진균 활성물질 생산균주의 특성

토양으로부터 *P. sasakii*의 생육을 강하게 저해하는 한 균주를 분리하였다. 이 균주는 gram 음성의 간균으로서 크기는 0.5×1.2 µm이고(Fig. 1), nutrient agar 및 LB agar plate에서 둥근 모양의 smooth colony를 형성하며 형광색소를 생성하지는 않았다. 이 균주의 자세한 특성을 알기 위해 Api kit를 이용하여 각종 생리적 특성 및 탄소원 이용성 등을 조사해본 결과 (Table 1), 이 균주는 질산환원 및 indol 생성능이 없었으며 urease, arginine dihydrolase 및 β-glucosidase 활성은 지닌 반면 β-galactosidase 활성은 없었다. 탄소원 이용성에 있어서 5탄당인 arabinose를 이용하였으나 mannose, maltose 및 starch 등은 이용하지 못하였다. 한편, 이 균주는 *Pseudomonas* 속에서 glucose의 첫번째 대사산물인 gluconate와 2-ketogluconate¹⁴⁾ 뿐만 아니라 TCA cycle 관련 유기산 및 3-hydroxybenzoate, 3-hydroxy-butyrate, caprate 및 valerate 등 거의 대부분의 유기산이 이용 가능한 것으로 나타났다. Api kit의 결과와 기타 특성을 Bergey's manual of determinative bacteriology와 비교해 본 결과 *P. aeruginosa*와 거의 유사하였으며 따라서 이 균주를 *P. aeruginosa* 3120으로 명명하였다.

P. aeruginosa 3120의 항진균 활성물질의 분리 및 구조분석

P. aeruginosa 3120이 생산하는 항진균 활성물질은 용매조건을 달리한 두번의 silicagel column과 sephadex LH-20 column chromatography를 거친 후 최종적으로 HPLC에서 단일물질로 정제되었으며 이를 MRL3120으로

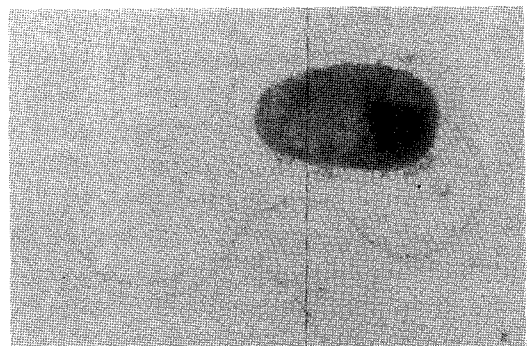


Fig. 1. Electronmicrograph of *P. aeruginosa* 3120.

로 명명하였다. MRL3120은 암갈색의 분말로 얻어졌으며 chloroform, ethylacetate 및 methanol에 용해되었고 물에는 녹지 않았다. UV(Fig. 2) 및 IR(Fig. 3) spectrum을 조사해 본 결과, C-N, N-C-S(λ^{MeOH} 266 μ , ν_{max} 1581 cm^{-1})의 구조와 N-O(ν_{max} 877, 891, 912 cm^{-1}) 등의 구

조가 존재하는 것으로 추정되었다.¹⁵⁾ MRL3120의 NMR spectrum data는 얻을 수 없었으며 이는 Cu나 Fe와 같은 금속이온을 함유하고 있기 때문인 것으로 추정되었다.¹⁶⁻¹⁷⁾ EI-MS에 의한 fragmentation pattern(Fig. 4)에서 MRL3120의 분자량으로 생각되는 243의 이온 peak 외에 198, 153, 104, 91, 75, 45의 주요 이온 peak를 나타내었다. 한편, MRL3120은 TLC plate(Merck, silicagel 60 F254) 상에서 $CHCl_3$ 와 MeOH 1:2의 용매조건으로 전개시켰을 때 Rf치가 0.32였고 sulfuric acid와 ninhydrin에 발색되지 않았으며 iodine vapour에 갈색 spot으로 발색되었다(Table 2). 또한 MRL3120은 곰팡이 뿐만 아니라 gram 양성 및 음성 세균에도 강한 항균활성을 나타내었다(Table 2).^{16,18)} 이상의 결과로부터 MRL3120의 특성을 비교 검토한 결과(Table 2), MRL3120은 Egawa 등(18)이 *Pseudomonas* MCRL 10107 균주로부터 분리한 YC73 및 Itoh 등¹⁶⁾이 *P. fluorescens* KY 4032 균주로부터 분리한 fluopsin C와 거의 유사한 물질로 판단되었으며 그 구조는 Fig. 5와 같다.

Table 1. Cultural and physiological properties of *P. aeruginosa* 3120

Physiological properties			
NO_3	+	Indol	-
Acidification	-	Arginine dihydrolase	+
Urease	+	β -Glucosidase	+
Gelatin	+	β -Galactosidase	-
Assimilation			
Glucose	+	Arabinose	+
Mannose	-	Mannitol	+
N-Acetyl-glucosamine	+	Maltose	-
Gluconate	+	Caprate	+
Adipate	+	Malate	+
Citrate	+	Phenyl-acetate	-
Salicin	-	D-Melibiose	-
L-Fucose	-	D-Sorbitol	-
Propionate	+	Valerate	+
Starch	-	Histidine	+
2-Ketogluconate	+	3-Hydroxy-butyrate	+
4-Hydroxy-benzoate	+	3-Hydroxy-benzoate	-
Rhamnose	-	D-Ribose	-
Inositol	-	D-Saccharose	-
Itaconate	+	Malonate	-
Acetate	+	Suberate	-
DL-Lactate	+	L-Alanine	+
5-Ketogluconate	+	Glycogen	-
L-Proline	+	L-Serine	+

MRL3120의 발효생산에서 $CuSO_4$ 의 첨가효과

구조분석 결과로부터 MRL3120은 두 분자의 N-me-

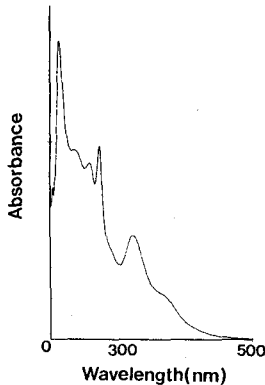


Fig. 2. UV absorption spectrum of MRL3120 in methanol.

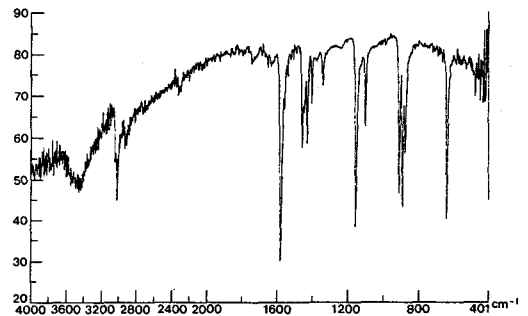


Fig. 3. IR-spectrum of MRL3120 in KBr.

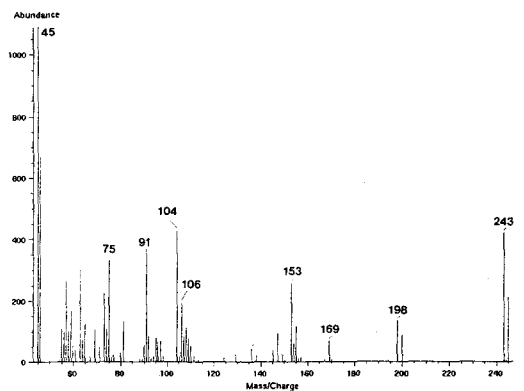


Fig. 4. EI-mass spectrum of MRL3120.

Table 2. Comparison of MRL3120 with fluopsin C (YC 73)

Characteristics	MRL3120	Fluopsin C or YC 73
Color	Dark brown	Dark brown
Soluble in	Chloroform, Ethylacetate Methanol	Chloroform, Ethylacetate Alcohols
UV _{max} in MeOH	203, 227, 266, 318, 360	231, 253, 267, 320, 365
Molecular weight	243	243.3
ν _{max} in KBr (cm ⁻¹)	640, 877, 891, 912, 1103, 1157, 1344, 1406, 1431, 1458, 1581, 3020, 3456	878, 892, 910, 1100, 1152, 1340, 1406, 1428, 1453, 1575, 2980, 3500
Color reactions		
Sulfuric acid	Negative	Negative
Ninhydrin	Negative	Negative
Iodine vapour	Positive	
Antimicrobial activity		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Inhibitory	Inhibitory
<i>Escherichia coli</i>	Inhibitory	Inhibitory
<i>Candida albicans</i>	Inhibitory	Inhibitory

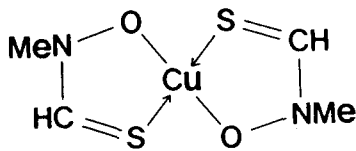


Fig. 5. Proposed structure of MRL3120.

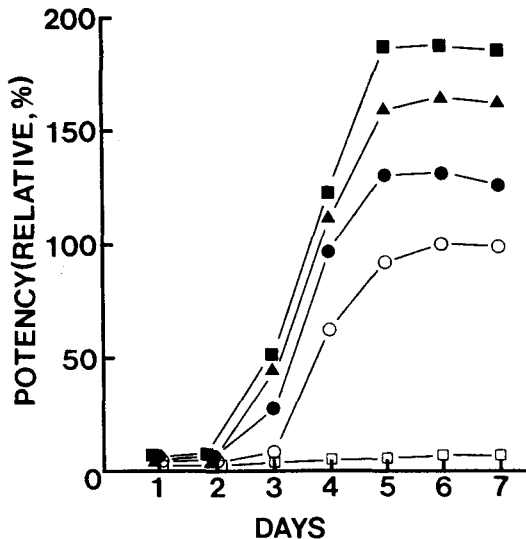


Fig. 6. Effect of CuSO₄ on the formation of MRL 3120 in the fermentation medium containing soybean meal.

○, no addition; ▲, 0.5 mg/ml; ■, 2 mg/ml; ●, 5 mg/ml; □, addition of EDTA (0.1%, w/v).

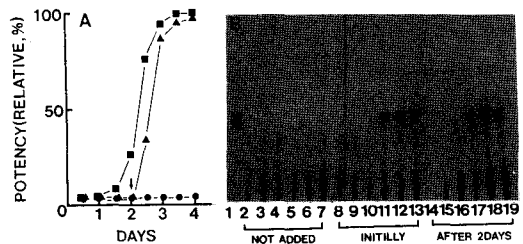


Fig. 7. Effect of CuSO₄ (2 mg/m) on the formation of MRL3120 in the fermentation medium containing soytone instead of soybean meal. A: ●, not added; ■, added initially; ▲, added after 2 days incubation. B: TLC analysis of ethylacetate extracts of the same samples in the A. TLC plate (Silica gel 60 F-254, Merck) was developed in the solvent chloroform: methanol (2 : 1) and stained with iodine vapour. Lanes 2~7, ● in the A; Lanes 8~13, ■ in the A, Lanes 14~19, ▲ in the A; Lane 1; purified MRL3120; Lanes 2, 8, ▲ after 1 day incubation; Lanes 3, 9, 15, after 1.5 days; Lanes 4, 10, 16, after 2 days; Lanes 5, 11, 17, after 2.5 days; Lanes 6, 12, 18, after 3 days; Lanes 7, 13, 19, after 4 days.

thyl-N-thioformyl hydroxylamine에 한개의 Cu 이온이 결합된 형태의 구조이며 따라서 세포의 MRL 생합성시 Cu가 중요한 인자로 작용할 것으로 추측되어 *P.aeruginosa* 3120의 배양액에 CuSO₄를 첨가하여 그 효과를 조사하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 soybean meal을 함유하는 GS 배지에서 초기 첨가된 CuSO₄ 2 mg/ml의

농도까지 저해활성은 무침가시에 비해 농도에 비례하여 증가한 반면 초기 배양액에 강한 금속이온 chelator인 EDTA(0.1%, v/v)를 첨가한 경우 저해활성이 나타나지 않았다. 한편, soybean meal 대신 soytone(Difco)을 함유하는 GS 배지에서는 MRL3120이 생성되지 않았으나, CuSO₄를 첨가함으로써 강한 저해활성을 나타내었고(Fig. 7A) TLC로 MRL3120이 합성되었음이 확인되었다(Fig. 7B). 따라서 Cu 이온은 MRL3120의 생산에 있어서 필수적이며 soybean meal은 상업적으로 조제된 soytone에 비해 보다 많은 양의 Cu 이온을 함유하는 것으로 추정되었다. 위와 같은 결과는 YC73 및 fluopsin C와 동일한 것으로 밝힌 B1 항생제가 *P. reptilivora*에 의해 Cu-dependent하게 생산된다고 한 Martinez-Molina 등의 보고²⁰⁾와 일치하였다.

참 고 문 헌

1. Davison, J.: Bio/Technology, 6 : 282(1988)
2. Leisinger, T. and Margraff, R.: Microbiol. Rev., 43 (3) : 422(1979)
3. Bérdy, J.: Adv. Appl. Microbiol., 18 : 309(1974)
4. Elander, R. P., Mabe, J. A., Hamil, R. L. and Gorman, M.: Folia Microbiol., 16 : 156(1971)
5. Ingram, J. M. and Blackwood, A. C.: Adv. Appl. Microbiol., 13 : 267(1970)
6. Howell, C. R. and Stipanovic, R. D.: Phytopathol., 69 : 480(1979)
7. Weller, D. M. and Cook, R. J.: Phytopathol., 73 : 463 (1983)
8. Xu, G.-W. and Gross, D. C.: Phytopathol., 76 : 414 (1986)
9. Janisiewicz, W. J. and Roitman, J.: Phytopathol., 78 : 1697(1988)
10. Jayaswal, R. K., Fernandez, M. A. and Schroeder, R. G. III.: Appl. Environ. Microbiol., 56(4) : 1053 (1990)
11. Lee, Y. H., Shim, G. Y., Lee, E. J. and Mew, T. W.: Kor. J. Plant Pathol., 6(1) : 73(1990)
12. Kim, B. S. and Hwang, B. K.: J. Microbiol. Biotechnol. (Korea), 3(1) : 12 (1993)
13. Doudoroff, M. and Palleron, N. J.: In 'Pseudomonas: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology', 8th ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA, p. 217(1974)
14. Whiting, P. H., Midgley, M. and Dawes, E. A.: Biochem. J., 154 : 659(1976)
15. Leong, J. and Bell, S. J.: Inorg. Chem., 17(7) : 1886 (1978)
16. Shirahata, K., Deguchi, T., Hayashi, T., Matsubara, I. and Suzuki, T.: J. Antibiot., 23(11) : 546(1970)
17. Itoh, J., Amano, S., Ogawa, Y., Kodama, Y., Ezaki, N. and Yamada, Y.: J. Antibiot., 33(4) : 377(1980)
18. Egawa, Y., Umino, K., Awayaguchi, S., Kawaguchi, Y. and Okuda, T.: J. Antibiot., 23 : 267(1970)
19. Itoh, S., Inuzuka, K. and Suzuki, T.: J. Antibiot., 23 : 542(1970)
20. Martinez-Molina, E., Del Rio, L. A. and Oivares, J.: J. Appl. Bacteriol., 41 : 69(1976)

Production, isolation and characterization of the antibiotic from *Pseudomonas aeruginosa* 3120

Hack-Ryong Ko, Hyo-Kon Chun, Yung-Hee Kho and Nack-Kie Sung* (Genetic Engineering Research Institute, Korea Institute of Science and Technology, P.O.Box 17, Taedok Science Town, Taejon 305-606, Korea and *Department of Food Science & Technology, Gyeong Sang National University, Chinju 660-701, Korea)

Abstract : A strain that inhibited the growth of *Pellicularia sasakii* was isolated from the soil and identified as *Pseudomonas aeruginosa* 3120. A dark brownish antibiotic, MRL3120 isolated and purified from the culture broth of *P. aeruginosa* 3120 was soluble in ethylacetate, chloroform and methanol, and it was active against gram-positive and negative bacteria as well as fungi. The structure of MRL3120 was identified as a chelate compound consisting of two N-methyl-N-thioformyl-hydroxylamine and a copper ion by the analysis of UV, IR, and EI-MS spectra and other physico-chemical properties and supposed to have a structure of fluopsin C related compound. Addition of CuSO_4 into the fermentation medium containing soybean meal increased antifungal activity but no activity was found in the presence of EDTA (0.1%, v/v). However antibiotic MRL3120 was not produced in the fermentation medium containing soytone instead of soybean meal but it was rapidly produced by the addition of CuSO_4 .