

Pseudomonas cepacia 균주가 생산하는 항진균성 Cyclic Lipopeptide의 생물학적 및 물리 화학적 특성

김성호 · 이민웅*
동국대학교 응용생물학과

Biological and Physico-chemical Properties of Antifungal Cyclic Lipopeptides Produced by *Pseudomonas cepacia* Strains

Sung-Ho Kim and Min-Woong Lee*

*Dept. of Applied Biology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

ABSTRACT: Five strains AF027, AF069, AF2001, AF2011 and SD02 of *Pseudomonas cepacia* were isolated from soil, and the antifungal cyclic lipopeptides (CLP) i.e., CLP027A, CLP069A, Cepacidine A, CLP2011A and CLP02A were produced from each strains, respectively. Nitrogen and carbon sources in media were proved to be important factors for the production of CLP and among them, polypeptone-S, glucose and fructose were the most effective. It appeared that compounds CLP027A and CLP069A were identical with Cepacidine A and Xylocandine A, respectively. contain aspartic acid as amino acid component, are differentiated from Xylocandine A containing asparagine. Although molecular weight, amino acid composition and UV spectrum of CLP2011A and CLP02A are same with those of Cepacidine A, it is postulated that these compounds are not identical with Cepacidine A when the antifungal spectra and antifungal activity were compared to those of Cepacidine A.

KEYWORDS: Antifungal, Cyclic Lipopeptide, *Pseudomonas cepacia*

오늘날 널리 쓰이는 유기합성 농약은 안전성이나 환경보존의 측면에서 문제가 있으므로, 미생물 유래의 천연 항진균제 개발을 서둘러 최근 많은 성과가 있었으며, Blasticidin, Kasugamycin, Polyoxin, Validamycin 등이 발견되어 실용화된 바 있다. 특히 농작물에 피해를 주는 식물 병원성 진균을 방제하기 위하여 생물학적 방제법이 많이 연구되고 있다(장, 김, 1995; Anderson and Liberta, 1986; Gurusiddaian *et al.*, 1986; Hofte *et al.*, 1991; Homma and Suzui, 1989; Janisiewicz and Roitman, 1988; John, 1986; McLoughlin *et al.*, 1992; Parke, 1990; Thomashow *et al.*, 1990; Voisard *et al.*, 1989). 생물학적 방제 목적으로 연구된 미생물로는 *Pseudomonas fluorescens*, *P.*

putida, *P. cepacia* 그리고 *Bacillus subtilis*와 같은 세균류가 있다. 이 중에서 *Bacillus subtilis*가 I-turin계 물질(김 등, 1991; Isokai *et al.*, 1982; Winkelmann *et al.*, 1983) 또는 Bacillomycin D, F, L(Peypoux *et al.*, 1981; Besson and Michel, 1988; Peypoux *et al.*, 1984)을 생성하며 생물학적 방제 효과가 있는 것으로(장, 김, 1995) 보고되었다. *P. fluorescens*는 penazine-1-carboxylic acid (Gurusiddaian *et al.*, 1986; Leisinger and Margraff, 1979; Tomashow *et al.*, 1990), HCN (Voisard *et al.*, 1989)를 생성하거나 또는 siderophore(John, 1986; Seong *et al.*, 1991)를 생성함으로써 식물병원성 진균에 대한 생물학적 방제작용(Parke *et al.*, 1990; Sakthivel and Gnana-manickam, 1987)을 하며 *P. putida* 또한 siderophore를 생성함으로써 식물 병원성 진균에 대하여

*Corresponding author

길항작용을 하는 것으로(John, 1986) 알려지고 있다. 녹농균으로 불려지는 *P. aeruginosa*의 어떤 균주도 항진균 물질인 Penazine-1-carboxylic acid (김 등, 1995) 또는 siderophore(Hofte *et al.*, 1991; Seong *et al.*, 1991)를 생성한다.

최근, *Pseudomonas cepacia* 균주들에 대한 연구가 많이 진척된바 있는데, *P. cepacia*는 phenylpyrrole계 항진균 물질인 pyrrolnitrin, aminopyrrolnitrin, 2-chloro-aminopyrrolnitrin 등(Homma and Suzui, 1989; Homma *et al.*, 1989; Janisiewicz and Roitman, 1988; Roitman *et al.*, 1990; McLoughlin *et al.*, 1992)과 pseudanes(Homma and Suzui, 1989; Homma *et al.*, 1989)를 생성하는 것으로 보고되어 있다. Bisacchi *et al.*(1987), Meyers *et al.*(1987)은 *P. cepacia* ATCC39277로부터 Xylocandin A, B, C, D를 분리하였는데, 이는 *Pseudomonas spp.*로부터 분리된 최초의 cyclic lipopeptide계 항진균 물질이다. 이후 김 등(1993)과 서 등(1993)은 *P. cepacia* 균주 AF6008로부터 Xylocandin A로 보이는 AF011A를 분리하였고, Lee *et al.*(1994) 및 Lim *et al.*(1994)은 *P. cepacia* 균주 AF2001로부터 역시 cyclic lipopeptide인 Cepacidine A를 최초로 분리하여 생물학적 특성 및 분자구조를 규명한 바 있다. 특히 Lim *et al.*(1994)은 Cepacidine A의 cyclic peptide 부분의 아미노산 서열을 명확히 규명함으로써, Cepacidine A와 분자량 및 원소 구성이 동일하지만 아미노산 서열이 밝혀지지 않은 Xylocandin A의 cyclic Peptide 부분의 아미노산 서열도 이와 유사할 것임을 시사하고 있다. *P. cepacia*를 이용한 식물 병원성 진균에 대한 생물학적 방제의 한 예로는 Homma 와 Suzui(1989), Janisiewicz 와 Roitman(1988, Jayaswal *et al.* (1990), McLoughlin *et al.*(1992) 및 Parke(1990)의 연구보고가 있다.

항진균 cyclic lipopeptide로는 Iturin, Bacillomycin 외에도 *Aspergillus sydowi*에 의해 생성되는 Mulundocandin(Mukhopadhyay and Ganguli, 1987; Roy *et al.*, 1987)과 *P. paucimobilis*로부터 분리된 Plusbacins(Shoji *et al.*, 1992)가 있다.

본 연구자들은 항진균 활성을 갖는 다수의 토양 세균을 분리하고 동정한 한 결과, 5종류의 *P. cepacia* 균주들을 얻었고, 이들 균주는 AF027, AF069, AF2001, AF2011, SD02로서 이들의 생리적 특성 및 항진균 물질 생산에 미치는 질소원과 탄소원의 영향을 비교하였으며, 또한 이들 균주들이 생산하는 항진균성 cyclic lipopeptide의 분자량, UV spectrum, IR spectrum, 아미노산 조성 등 물리 화학적 특성을 조사하고 각각의 항진균 활성과 항진균 스펙트럼을 밝힘으로써 새로운 cyclic lipopeptide가 존재하는지를 규명하고자 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

항진균 활성 미생물의 분리

단양, 제천, 이천, 장호원 지역에서 채취한 토양으로부터 미생물을 분리하기 위하여, 멸균수 50 ml이 담긴 250 ml 삼각플라스크에 토양 1g을 가하고 shaker를 이용하여 200 rpm으로 1시간 동안 잘 흔들었다. 토양 현탁액은 희석하여(Kim and Lee, 1994) Sabouraud Dextrose Agar 배지에 0.2 ml 씩 도말하였으며 25°C에서 3일간 배양하였다. 그 위에 Potato Dextrose Agar 배지에서 배양한 *Aspergillus niger*의 포자 현탁액을 분사하여 30°C에 1일간 놓아둔 다음, 저지환을 형성하는 집락들을 분리하여 2차 선별에 사용하였다. *A. niger*의 포자 현탁액은 포자 밀도가 10⁶cfu/ml이 되도록 조정하였다. 1차 선별된 미생물들은, 김 등(1993)의 배지를 변형하여 glucose 30 g/l, polypeptone-S 10 g/l, yeast extract 5 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/l, CaSO₄ 1 g/l, CaCO₃ 6 g/l (pH 7.0)를 함유하는 액체배지에 28°C에서 3일간 배양한 후 항진균 활성이 강한 후보균주를 선발하였다.

후보균주의 동정 및 선발

항진균 활성을 보이는 후보균주들은 McFaddin (1980)과 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(Palleroni, 1989)의 방법에 따라서 형태적, 생리적 특성을 조사하여 동정하였으며 이들 중 *Pseudomonas*로 동정된 균주들만을 선발하여 연구에 사용하였다.

배양조건

P. cepacia 균주들의 배양조건에 따른 항진균 물질의 생산특성을 조사하기 위하여 배지 중의 질소원과 탄소원의 종류를 변화시켰다. 질소원의 영향을 조사하기 위해서는 김 등(1993)의 배지를 변형하여 glucose 30 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/l, CaSO₄ 1 g/l, CaCO₃ 6 g/l (pH 7.0)로 조성된 기본배지에 각 질소원을 15 g/l 농도로 첨가하였다. 질소원으로서 bacto-peptone, beef extract, casitone, tryptone, yeast extract는 Difco 제품을, polypeptone, polypeptone-S, polypeptone-Y는 Wako 제품을 사용하였다. 그리고 bacto-peptone 15 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/l, CaSO₄ 1 g/l, CaCO₃ 6 g/l (pH 7.0)로 조성된 기본배지에 각종 탄소원을 30 g/l 농도가 되도록 첨가하여 탄소원의 영향을 조사하였다. 제조된 배양액 50 ml이 담긴 250 ml 삼각플라스크에 균주를 접종하고 28°C에서 250 rpm으로 3일간 배양하였다. 이렇게 얻은 각 배양액의 항진균 활성 (McGinnis and Rinaldi, 1986)을 측정함으로써 각 균주별로 배양액 중 질소원과 탄소원이 cyclic lipopeptide계 항진균 물질 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

P. cepacia 균주들이 생산하는 cyclic lipopeptide계 항진균 물질을 대량으로 분리 정제하기 위해서, 김 등(1993)의 배지를 변형하여 polypeptone-S 15 g/l, glucose 30 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/l, CaSO₄ 1 g/l, CaCO₃ 6 g/l (pH 7.0)를 함유하는 배지 5 l에 접종하여 28°C에서 3일간 배양하였다.

Cyclic lipopeptide계 항진균 물질의 정제

상기의 방법으로 얻은 배양액 5 l와 isopropyl alcohol(IPA) 5 l를 혼합하여 1시간 동안 잘 교반하고 1시간 경과한 다음 규조토로 여과해서 여과액을 취하였다. 여과액은 감압농축기를 사용하여 60°C에서 IPA를 회수하였으며 잔류액 약 5 l에 isobutanol, methanol 혼합용매(8:2) 2 l를 가하여 잘 교반함으로써 잔류액으로부터 cyclic lipopeptide계 항진균 물질을 추출하였다. isobutanol 층을 취하여 200 ml로 농축하고 영하 10°C에 12시간 보존하여 침전물을 형성시켰으며, 원심분리하여 침전물을 얻

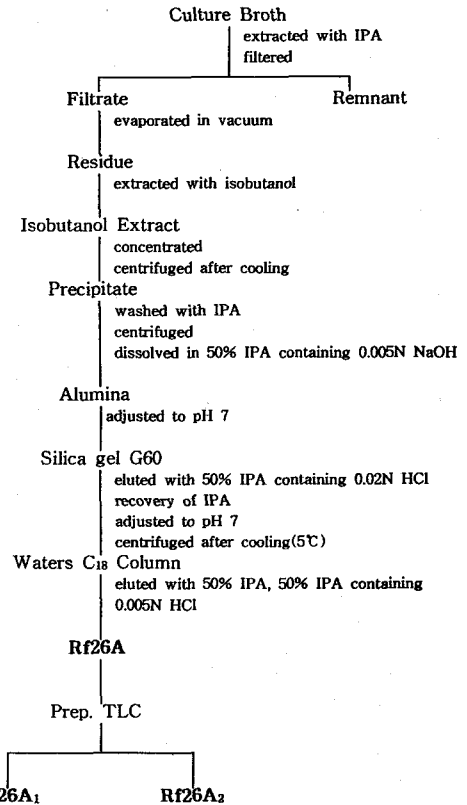


Fig. 1. Purification procedure of antifungal cyclic lipopeptides produced by *P. cepacia* strains.

었다. 획득한 침전물에 IPA 200 ml을 가하여 잘 분산시키고 영하 10°C에 3시간 동안 보존한 다음 원심분리하여 침전물을 분리해 냈다. 이 침전물을 0.005N NaOH 함유 50% IPA 1 l에 용해하여 Alumina column(bed volume: 50 ml, pH 4)을 통과시켰다(김 등, 1993). Alumina 통과액은 pH 7로 조정하여 Silica gel G60 column을 통과시키고 50% IPA로 수세함으로써 cyclic lipopeptide를 흡착시켰다. Silica gel G60에 흡착된 cyclic lipopeptide계 항진균 물질은 0.02N HCl 함유 50% IPA 500 ml로 용리해 냈다. 용리된 회수액을 pH 7로 조정하고 IPA를 제거한 다음, 잔류액을 5°C로 냉각하여 침전물을 얻었다. 회수된 침전물을 0.005N NaOH 함유 50% IPA 100 ml에 용해하고 증류수 500 ml을 가하여 Waters C₁₈ Column에 흡착시켰다. 그다음, 50% IPA와 0.005N HCl 함유 50% IPA로 항진균 물질을 분리하였다. 이렇게 분리된 cyclic lipo-

peptide계 항진균 물질로부터, isopropanol, 물과 포화 암모니아수를 4:1:2의 비율로 혼합한 전개용매를 이용하여 분취 박층크로마토그래피로 2종류의 물질을 단리시켰다.

항진균 물질의 물리 화학적 특성

Silica gel plate(Merck cat. No. 1.05628)를 사용하여 isobutanol, 물과 acetic acid를 4:1:1의 비율로 혼합한 전개용매로 박층크로마토그래피(TLC)를 실시하였다. 전개된 TLC plate는 60°C에서 건조하였으며, 5% ammonium molybdate, 0.1% ceric ammonium sulfate를 함유하는 10% 황산 수용액을 분무한 다음 100°C에서 10분간 발색시켰다.

UV spectrum은 항진균 물질을 DMSO(Dimethyl sulfoxide) 및 물에 용해하여 Beckman DU-70 기기를 사용 측정하였다. 분자를 구성하는 아미노산 분석을 위하여 시료를 6N HCl로 105°C에서 18시간 가수분해하였으며, 구성 당의 분석을 위해서는 시료를 10% 황산으로 105°C에서 1시간 가수분해하고 가수분해 산물을 Ba(OH)₂ 포화용액으로 중화시켜서 그 여과액을 사용하였다. 가수분해물은 농축한 후 각각 Waters사의 carbohydrate analysis system과 amino acid analysis system을 사용하여 당과 아미노산을 분석하였다.

가수분해 산물중에 함유된 aspartic acid가 본래의 구성요소인지 asparagine이 전환되어 생성된 것인지 확인하기 위해서 Pyrolyzer gas chromatography를 실시하였다. Pyrolyzer GC는 JHP-35 Pyrolyzer/Schimidzu GC15A와 칼럼 CBP-5를 사용하였으며, 열분해 온도 590°C(3초), 칼럼 주입 온도 230°C, 검지기 온도 300°C의 조건하에서 수행하였다.

항균력 조사

P. cepacia 각 균주들이 생산한 항진균성 cyclic lipopeptides의 항진균 스펙트럼을 조사하기 위해서는 Sabouraud Dextrose Broth를 사용한 broth dilution method(McGinnis and Rinaldi, 1986)에 의하여 최소저지농도(MIC)를 측정하였다. 시험균의 최종 밀도는 효모형 세포 또는 포자를 사

용하여 10⁶CFU/ml로 하였으며, 처리 72시간 후의 결과를 기준으로 하였다. 배지중의 질소원과 탄소원이 항진균성 cyclic lipopeptides의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해서는 3일간 배양한 배양액을 isopropyl alcohol(IPA)과 1:1로 혼합하여 원심분리한 상등액을 사용하였다. 배양액 중의 cyclic lipopeptides 함량 측정은 상기와 동일한 broth dilution method를 사용하였는데, 시험균 *Candida albicans* KCTC1940의 생육을 저지할 수 있는 배양액의 최소 희석배수에 이 시험균의 MIC 값을 곱하여 산출하였다. 즉, AF069 균주를 bacto-peptone 함유배지에 배양하였을 때 *Candida albicans* KCTC1940의 생육을 저지할 수 있는 배양액의 최소 희석배수는 800이며, AF069 균주가 생성한 항진균물질 CLP069A의 MIC값이 0.3125 µg/ml이므로 배양액 중에 함유된 CLP069A의 농도는 800 × 0.3125 µg/ml = 250 µg/ml(mg/ml)로 산출하였다.

결과 및 고찰

생리적 특성 및 배양 특성

선발된 *P. cepacia* 균주들은 생리적 특성(Table 1., Table 2.)에 있어서 서로 상이하였으나, 각 균주들은 모두 강력한 항진균 물질인 cyclic lipopeptide들을 생산하였다. 또한 배지 중에 함유된 질소원과 탄소원의 종류는 각 균주들의 cyclic lipopeptide 생산 특성에 영향을 주어 이 물질 생산에 현저한 차이를 나타냈다. 조사된 모든 균주들은 단일 질소원으로 polypeptone-S를 15 g/l로 공급할 때 생산성이 가장 높았으며, yeast extract는 4 mg/l를 생산한 SD02 균주를 제외하고 모든 균주에게 매우 효과적이었다. 이러한 결과는 손 등(1991)이 *Bacillus subtilis* subsp. *kri-tiensis*을 대상으로 한 연구에서 yeast extract가 항진균물질 KRF-001의 생산에 효과적이지 못하다고 보고한 것과는 상이하다. 집락의 색이 황녹색인 SD02 균주는 polypeptone-S를 이용하여 항진균 물질을 125 mg/l로서 잘 생산하였으나, beef extract, casitone, polypeptone, tryptone, yeast extract를 이용해서는 항진균 물질을 4 mg/l

Table 1. Morphological and physiological characteristics of *Pseudomonas cepacia* strains isolated from soil

Test	<i>P. cepacia</i>					
	ATCC 39277	AG027	AF069	AF2001	AF2011	SD02
Gram stain	-	-	-	-	-	-
Cell type	short rod	short rod	short rod	short rod	short rod	short rod
Motility	+	+	+	+	+	+
Colony color	milky	milky	milky	milky	milky	milky
Growth						
4°C	NG	NG	NG	NG	NG	NG
37°C	G	G	G	G	G	G
41°C	NG	NG	NG	NG	NG	NG
3% NaCl	G	G	G	G	G	G
10% NaCl	NG	NG	NG	NG	NG	NG
pH 3	NG	NG	NG	NG	NG	NG
pH 7	G	G	G	G	G	G
pH 9	NG	NG	NG	NG	NG	NG
O/F test	O	O	O	O	O	O
Catalase	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+
Urease	-	-	-	-	-	-
β-Galactosidase	+	+	+	+	+	+
DNase	-	-	-	-	-	-
Decarboxylase						
lysine	-	-	-	-	-	-
arginine	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	+	+	-	-	+
Indole production	-	-	-	-	-	-
VP test	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of						
gelatin	+	-	+	+	+	+
starch	-	-	-	-	-	-
esculin	+	-	-	+	+	-
Cimmon's Citrate	+	+	+	+	+	+
Levan formation	+	-	+	+	+	+

G: Growth, NG: No Growth, O: Oxidative, +: positive, -: negative

1밖에 생산하지 못하였다. 또한, tryptone은 ATCC39277 균주의 경우에도 16 mg/l로서 생산성에 효과가 매우 적었다(Table 3.). 단일 탄소원으로서, glucose 또는 fructose가 30 g/l 농도로 함유될 때 조사된 모든 균주들이 항진균물질을 63-250 mg/l 생산함으로써 가장 효과적이었다(Table 4.). 산업적 활용을 위하여 돌연변이 균주를 유기시키면, 각 변이 균주들 간에 질소원의 이용성 또는 생산성에 현저한 차이가 나타나는 현상이 빈번하게 발견되지만, 야생형 균주들 간에도 이와같은 질

소원 이용 특성이 다양하게 나타난 것은 흥미로웠다. 이와같이 질소원이 *P. cepacia* 균주의 항진균 물질 생산성에 중요한 영향을 미친다는 점을 고려하여 미생물 탐색시에 사용하는 배지 조성에 주의를 기울여야 할 것으로 사료된다. 손 등(1991)이 질소원과 탄소원이 Iturin계 항진균 물질인 KRF-001의 생산성에 다소의 영향을 미친다고 보고하고 있으나, 이제까지 cyclic lipopeptide의 생산성에 있어서 균주들간에 큰 영향을 미친다는 보고는 없었다.

Table 2. Utilization of carbohydrates and acid production by *P cepacia* strains

Test	<i>P. cepacia</i>					
	ATCC 39277	AG027	AF069	AF2001	AF2011	SD02
Utilization of						
D-glucose	+	+	+	+	+	+
D-fructose	+	+	+	+	+	+
D-galactose	+	+	+	+	+	+
D-lactose	-	-	-	-	+	-
D-maltose	-	-	-	+	-	-
D-xylose	+	+	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+
L-raffinose	-	-	-	-	-	-
D-melibiose	-	-	+	-	-	+
D-cellobiose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	-	-	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	+
Dulcitol	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	-	-	+	+	+
Acid from						
D-glucose	+	+	+	+	+	+
D-fructose	+	+	+	+	+	+
D-galactose	+	+	+	+	+	+
D-lactose	-	-	-	-	+	-
D-maltose	-	-	-	+	-	-
D-xylose	+	+	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	-
L-raffinose	-	-	+	+	-	-
D-melibiose	-	-	+	+	-	-
D-cellobiose	+	+	+	+	+	-
Sucrose	+	+	-	-	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-
Inositol	+	+	-	+	+	-
Inulin	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	+	+	+	+	+	-
Salicin	+	-	-	+	+	-

+: positive, -: negative

항진균 물질의 생물활성 및 물리 화학적 특성

본 연구에 사용한 모든 *P. cepacia* 균주들은 iso-butanol, 물과 acetic acid를 4:1:1의 비율로 혼합한 전개용매를 사용한 Silica gel TLC에서 R_f 값 0.26을 나타내는 항진균 물질을 생산하였는데, 이들의 동질성 여부를 가리기 전에 모두 동일한 R_f 값을 나타내므로 집합적인 compound group으로서 R_f

26A로 명명하였다. 또한, R_f26A는 이 전개용매를 사용했을 경우에는 단일 물질로 보였지만, isopropanol, 물과 포화 암모니아수를 4:1:2의 비율로 혼합한 전개용매를 사용하면 R_f 0.53, R_f 0.58인 2종의 물질로 분리되었으며, 이 두 물질을 각각 compound group R_f26A₁, R_f26A₂로 명명하였다. 각 균주들로부터 분리된 cyclic lipopeptide(CLP)들

Table 3. The effect of nitrogen sources on the production of cyclic lipopeptide group Rf26A by *P. cepacia* strains

Nitrogen Sources	<i>P. cepacia</i> strains					
	ATCC 39277	AG027	AF069	AF2001	AF2011	SD02
Bacto-peptone	63	250	250	250	63	63
Beef Extract	16	250	125	125	63	4
Casitone	125	250	500	500	125	4
Polypeptone	65	125	125	125	63	31
Polypeptone-S	250	500	500	500	125	125
Polypeptone-Y	125	250	125	63	63	63
Tryptone	16	250	125	500	125	4
Yeast Extract	250	500	1500	500	250	4
None	0.5	0.5	0.5	5	0.25	0.25

Table 4. The effect of carbon sources on the production of cyclic lipopeptide group Rf26A by *P. cepacia* strains

Carbon Sources	<i>P. cepacia</i> strains					
	ATCC 39277	AG027	AF069	AF2001	AF2011	SD02
Glucose	63	250	250	250	250	63
Fructose	125	250	250	250	250	63
Lactose	0.5	31	4	16	8	4
Maltose	0.5	8	250	125	4	4
Sucrose	0.5	31	8	31	63	63
Starch	1	8	4	16	2	4
None	0.5	8	2	16	2	0.25

Table 5. Cyclic lipopeptide group Rf26A produced by *P. cepacia* strains

Producer	ATCC39277	AF027	AF069	AF2001	AF2011	SD02
Rf26A	Xylocandin A	CLP027A	CLP069A	Cepacidine A	CLP2011A	SD02
Rf26A ₁	Xylocandin A ₁	CLP027A ₁	CLP069A ₁	Cepacidine A ₁	CLP2011A ₁	CLP02A ₁
Rf26A ₂	Xylocandin A ₁	CLP027A ₂	CLP069A ₂	Cepacidine A ₂	CLP2011A ₂	CLP02A ₂

CLP027A, CLP069A, CLP2011A, CLP02A는 모두 compound group Rf26A에 속하며 이들 각각은 Rf26A₁과 Rf26A₂의 혼합물이었다(Table 5.). 즉 CLP027A는 CLP027A₁과 CLP027A₂의 혼합물이며 이미 보고된 Xylocandin A₁, A₂는 각각 Rf26A₁, Rf26A₂에 속하였다. Rf26A₁과 Rf26A₂은 HPLC로는 분리되지 않았으므로 Silica gel 분취 박층크로마토그래피로 분리하였다. 그러나, TLC로 얻은 Rf26A₁과 Rf26A₂는 그 양이 매우 적었으므로

아미노산 조성 및 FAB/MS에 의한 분자량측정 실험에만 사용하고, 항진균 활성 시험에는 혼합물인 Rf26A를 사용하였다. 항진균물질 Rf26A₁, A₂는 대량으로 얻을 수 없었으나, 분취 박층크로마토그래피를 이용하여 Rf26A₁과 Rf26A₂로 분리하여 정량분석한 결과, Rf26A₁과 Rf26A₂는 약 9:1의 비율로 생성되었다.

Rf26A₁에 속하는 CLP027A₁, CLP069A₁, CLP2011A₁, CLP02A₁, Cepacidine A₁, Xylocandin

Table 6. Physico-chemical properties of Rf26A₁ and Rf26A₂

	Rf26A ₁	Rf26A ₂
Appearance	White powder	White powder
MP	210-214°C	210-214°C
UV λ _{max} nm (log ε)		
in H ₂ O	232(2.8), 274(1.7)	232(2.8), 274(1.7)
in DMSO	278(1.2)	278(1.2)
IR(KBr) ν _{max} cm ⁻¹	3352, 2924, 2854, 1666, 1539 1412, 1252, 1069, 557	3352, 2924, 2854, 1666, 1539 1412, 1252, 1069, 557
TLC Rf value		
solvent system-I	0.26	0.26
solvent system-II	0.53	0.58
Molecular weight	1,215	1,199

Table 7. Molecular composition of Rf26a₁ and Rf26A₂

Components	compound group Rf26A ₁					
	Xylocandin A ₁	CLP069A ₁	Cepacidine A ₁	CLP027A ₁	CLP2011A ₁	CLP02A ₁
Glycine	1	1	1	1	1	1
Serine	2	2	2	2	2	2
Aspartic acid	0	0	1	1	1	1
Asparagine	1	1	0	0	0	0
β-Hydroxyasparagine	1	1	1	1	1	1
2,4-Diaminobutyric acid	1	1	1	1	1	1
β-Hydroxytyrosine	1	1	1	1	1	1
Aliphatic chain	1	1	1	1	1	1
Xylose	1	1	1	1	1	1

Components	compound group Rf26A ₂					
	Xylocandin A ₂	CLP069A ₂	Cepacidine A ₂	CLP027A ₂	CLP2011A ₂	CLP02A ₂
Glycine	1	1	1	1	1	1
Serine	2	2	2	2	2	2
Aspartic acid	0	0	1	1	1	1
Asparagine	2	2	1	1	1	1
β-Hydroxyasparagine	0	0	0	0	0	0
2,4-Diaminobutyric acid	1	1	1	1	1	1
β-Hydroxytyrosine	1	1	1	1	1	1
Aliphatic chain	1	1	1	1	1	1
Xylose	1	1	1	1	1	1

A₁은 모두 isopropanol, 물과 포화 암모니아수를 4 : 1 : 2의 비율로 혼합한 전개용매를 사용할 때 TLC에서 R_f값 0.53을 나타내고, 분자량이 1215이였으며(Table 6.), Rf26A₂에 속하는 CLP027A₂, CLP069A₂, CLP2011A₂, CLP02A₂, Cepacidine A₂, Xylocandin A₂은 모두 R_f값 0.58을 나타내고, 분자량이 1199(Table 6.)이였다. 아미노산 조성에 있어서는, CLP027A₁, CLP2011A₁, CLP02A₁,

Cepacidine A₁이 모두 aspartic acid 1분자를 함유함으로써 동일하였으나 asparagine 1분자를 함유하는 CLP069A₁, Xylocandin A₁과는 달랐다. 또한 CLP027A₂, CLP2011A₂, CLP02A₂, Cepacidine A₂는 구성 아미노산으로서 aspartic acid와 asparagine을 각각 1분자씩 함유함으로써 동일하였으나 asparagine 2분자를 함유하는 CLP069A₂, Xylocandin A₂와는 상이하였다(Table 7.).

Table 8. Antifungal spectrums of cyclic lipopeptide group Rf26A produced by *P. cepacia* strains

Test organisms	producer Rf26A	(MIC : µg/ml)					
		ACTC39277 Xylocandin A	AF069 CLP069A	AF2001 Cepacidine A	AF027 CLP027A	AF2011 CLP2011A	SD02 CLP02A
<i>Candida albicans</i> KCTC1940		0.31	0.31	0.16	0.16	0.08	0.08
<i>Cryptococcus neoformans</i> KCTC1197		0.16	0.16	0.08	0.08	0.02	0.02
<i>Aspergillus niger</i> KCTC2119		0.16	0.16	0.08	0.08	0.02	0.02
<i>Aspergillus flavus</i> KCC1375		0.63	0.63	0.31	0.31	0.08	0.08
<i>Microsporium gypseum</i> KCTC1252		0.16	0.16	0.31	0.31	0.08	0.08
<i>Epidermophyton floccosum</i> KCTC1246		0.31	0.31	0.31	0.31	0.08	0.08
<i>Trichophyton ment.</i> KCTC6085		0.31	0.31	0.31	0.31	0.08	0.08
<i>Penicillium pinophilum</i> KCTC2124		0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63

이들 cyclic lipopeptides는 조사된 물리화학적 특성이 동일하였으나 항진균 스펙트럼은 다르게 나타났다(Table 8.). 이미 보고된 바와 같이 Cepacidine A₁과 Cepacidine A₂는 각각 분자량이 1215와 1199이며, UV spectrum, IR spectrum 등 물리화학적 특성이 Xylocandin A와 동일하였으나, 항진균 스펙트럼에서 명확한 차이가 있어 상이한 물질로 추정되었으며 실제로 분자구조가 다른 물질임이 밝혀졌다. 항진균 물질들은 지문과 마찬가지로 자신의 고유한 항진균 스펙트럼을 가지는 것으로 알려져 있으므로, 동일한 연구자가 동일한 방법으로 동시에 실험을 수행하여 2가지 물질에 대하여 상이한 항진균 스펙트럼을 얻었다면 이 두 물질은 상이한 물질이라고 생각할 수 있다. 만약 두 물질의 항진균 스펙트럼이 완전히 일치한다면 이들은 동일 물질일 가능성이 매우 높다고 할 수 있다.

분리된 항진균물질 CLP069A₁, A₂는 분자량, 아미노산 조성, UV spectrum, IR spectrum 등 물리화학적 특성(Table 5., 6., 7.)이 Xylocandin A₁, A₂와 동일하였고 항진균 스펙트럼(Table 8.)도 일치하였으므로 Xylocandin A₁, A₂와 동일 물질인 것으로 추론된다. 또한 CLP027A는 Table 5., 6., 7.에 나타난 물리화학적 특성 및 Table 8.에 나타난 항진균 스펙트럼이 Cepacidine A와 완전히 일치하므로 동일 물질로 추정된다. 그리고 CLP2011A와 CLP02A는 동일 물질로 생각되며, 이들은 Xylocandin A 및 Cepacidine A보다 항진균력이 4-8배 강하고 항진균 스펙트럼이 현저하게 다르므로, 지금까지 보고되지 않은 새로운 Cyclic lipopeptide계 항진균 물질로

생각된다. 분자량, 원소구성, 아미노산 조성, UV spectrum, IR spectrum이 동일하나 분자구조가 다른 것은 aliphatic side chain인 β-amino acid의 구조적 차이에 기인된 것으로 사료된다. 이와 같은 예는 Iturin A가 aliphatic side chain의 구조적 다양성에 따라서 8종류의 유도체로 존재하는 예에서 볼 수 있다. Iturin A의 유도체들은 각각 분자량이 다른 경우이지만, 분자량, 원소구성 및 아미노산 조성이 동일하면서 분자구조가 다르고 항진균 스펙트럼이 상이한 예로 Plusbacin(Shoji *et al.*, 1992)를 들 수 있다. Plusbasin A₃와 A₄는 분자량과 원소구성이 동일하나 Plusbasin A₃의 aliphatic side chain이 CH₃-CH(CH₃)-(CH₂)₁₀이고 Plusbasin A₄의 경우는 CH₃-(CH₂)₁₂로서 원소구성이 모두 C₁₃H₂₇인 반면 구조는 상이하다. Plusbasin B₃와 B₄도 이와 동일하다. CLP2011A와 CLP02A에 대한 자세한 구조규명 연구는 현재 진행중에 있다.

적 요

토양으로부터 항진균 활성을 나타내는 5종류의 *Pseudomonas cepacia* 균주 AF027, AF069, AF2001, AF2011, SD02가 분리되었으며 이들은 각각 cyclic lipopeptide계 항진균 물질 CLP027A, CLP069A, Cepacidine A, CLP2011A, CLP02A를 생산하였다. 조사된 *P. cepacia* 균주들은 배지중에 함유된 질소원 및 탄소원의 종류에 따라 항진균 물질 생산성에 현저한 차이가 있었는데, 질소원으로는 polypeptone-S, 탄소원으로는 glucose와

fructose가 생산성 증대에 가장 효과적이었다. 항진균물질 CLP069A₁과 CLP069A₂는 각각 분자량이 1215와 1199이며, 아미노산 조성, UV spectrum, IR spectrum 및 항진균 스펙트럼에 있어서, Xylocandin A₁, A₂와 일치하였으며, CLP027 A₁과 A₂ 또한 이러한 물리 화학적 특성이 Cepacidine A와 완전히 일치함으로써 동일 물질로 생각된다. CLP 2011A₁, A₂와 CLP02A₁, A₂는 아미노산 조성 및 항진균 스펙트럼이 Xylocandin A₁, A₂와 다르고, Cepacidine A₁, A₂와는 항진균 스펙트럼에서 현저하게 차이가 났다. CLP2011A, CLP02A가 분자량, 아미노산 조성, UV spectrum, IR spectrum에서 Cepacidine A와 동일하지만 항진균 스펙트럼이 상이한 것은 이들이 다른 물질임을 시사하며, 이는 aliphatic side chain이 Cepacidine A의 그것과 다른 데에서 비롯된 분자구조의 상이함에서 기인된 것으로 추론된다.

참고문헌

- 김경석, 홍수형, 이은주, 박용복, 박용태, 하지홍. 1995. *Pseudomonas aeruginosa* KGM-100이 생산하는 항생물질의 특성 및 구조. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 98-103.
- 김성호, 현봉철, 서정우, 김창완, 연창석, 이덕근, 김광표, 정재경, 임응호, 이철훈. 1993. 신규 항진균 물질 AF-011A의 동정, 정제 및 물리 화학적 특성. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 556-563.
- 서정우, 임응호, 김성호, 현봉철, 김창완, 연창석, 이덕근, 김광표, 정재경, 이철훈. 1993. 신규 항진균 물질 AF-011A의 생물학적 활성 및 구조분석. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 564-569.
- 손광희, 권혜경, 이항우, 복성해. 1991. *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis*로부터 항진균물질 KRF-001의 생산을 위한 발효조건 및 돌연변이 연구. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 614-618.
- 이은주, 김경석, 홍수형, 하지홍. 1995. 식물 뿌리썩음병을 유발하는 *Fusarium solani*에 대한 *Pseudomonas* 속의 생물학적 방제기작. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 91-97.
- 장중원, 김상달. 1995. 항진균성 길항세균 *Bacillus subtilis* YBL-7의 종자피막용 포자체의 생산과 발아조건. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 236-242.
- 장중원, 김상달. 1995. 길항세균 *Bacillus subtilis* YBL-7의 건조포자체의 종자피막화에 의한 생물학적 방제. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 243-248.
- Anderson, R.C. and Liberta, A.E. 1986. Occurrence of fungal-inhibiting *Pseudomonas* on caryopses of *Tripsacum dactyloides* L. and its implications for seed survival and agricultural application. *J. Appl. Bacteriol.* **61**: 195-199.
- Besson, F. and Michel, G. 1988. Bacillomycins Fb and Fc: Isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics* **41**: 282-287.
- Bisacchi, G.S., Hockstein, D.R., Koster, W.H., Parker, W.L., Rathnum, M.L. and Unger, S.E. 1987. Xylocandin: a new complex of antifungal Peptides. II. Structural studies and chemical modifications. *The Journal of Antibiotics* **40**: 1520-1529.
- Gurusiddaian, S., Weller, D.M., Sarkar, A. and Cook, R.J. 1986. Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**: 488-495.
- Hofte, M., Seong, K.Y., Jurkevitch, E. and Verstraete, W. 1991. Pyoverdin production by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strain 7NSK₂: Economic significance in soil. pp. 289-297. In: Chen, Y. and Hadar, Y. Eds. Iron nutrition and interactions in plants. Kluwer Academic Publishers.
- Homma, H. and Suzui, T. 1989. Role of antibiotic production in suppression of radish damping-off by seed bacterization. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* **55**: 643-652.
- Homma, Y., Sato, Z., Hirayama, F., Konno, K., Shiarhama, H. and Suzui, T. 1989. Production of antibiotics by *Pseudomonas cepa-*

- cia* as an agent for biological control of soil borne plant pathogens. *Soil Biol. Biochem.* **21**: 723-728.
- Isokai, A., Takayama, S., Murakoshi, S. and Suzuki, A. 1982. Structures of β -amino acids in antibiotics Iturin A. *Tetrahedron Letters* **23**: 3065-3068.
- Janisiewicz, W.J. and Roitman, J. 1988. Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Amer. Phytopathol. Soc.* **78**: 1697-1700.
- Jayaswal, R.K., Fernandez, M.A. and Schroeder III, R.G. 1990. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* strain that restricts growth of various phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1053-1058.
- John Leong 1986. Siderophores: Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**: 187-209.
- Kim, S.I. and Lee, M.W. 1994. Establishment of rhizosphere microbes for plant protection on soil-borne diseases. *Kor. J. of Mycol.* **22**: 50-61.
- Klopper, J.W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M.N. 1980. *Pseudomonas* siderophores: A Mechanism explaining disease-suppressive soils. *Cur. Microbiol.* **4**: 317-320.
- Lee, C.H., Kim, S.H., Hyun, B.C., Suh, J.W., Yon, C.S., Kim, C.O., Lim, Y.H., & Kim, C. S. 1994. Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. I. Taxonomy, production, isolation and biological activity. *The Journal of Antibiotics* **47**: 1402-1405.
- Leisinger, T. and Margraff, R. 1979. Secondary metabolites of the fluorescent *Pseudomonas*. *Microbiol. Rev.* **43**: 422-442.
- Lim, Y.H., Suh, J.W., Kim, S.H., Hyun, B.C., Kim, C.S. and Lee, C.H. 1994. Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. II. Physico-chemical properties and structure elucidation. *The Journal of Antibiotics* **47**: 1402-1405.
- McFaddin, J.F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams & Wilkins. Baltimore and London.
- McGinnis, M.R. and M.G. Rinaldi. 1986. Antifungal drugs. pp. 223-281. In: Lorian, V. Ed. Antibiotics in laboratory medicine. Williams & Wilkins.
- McLoughlin, T.J., Quinn, J.P., Bettermann, A. and Bookland, R. 1992. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1760-1763.
- Meyers, E., Bisacchi, G.S., Dean, L., Liu, W. C., Minassian, B., Shlusarchyk, D.S., Sykes, R.B., Tanaka, S.K. & Trejo, W. 1987. Xylolcandin: A new complex of antifungal peptides. I. Taxonomy, isolation and biological activity. *The Journal of Antibiotics* **40**: 1515-1519.
- Mukhopadhyay, T. and Ganguli, B.N. 1987. Mulundocandin, a new lipopeptide antibiotic. II. Structure elucidation. *The Journal of Antibiotics* **40**: 281-289.
- Palleroni, N.J. 1989. Pseudomonadaceae. pp. 141-218. In: Krieg, N.R. and Holt, J.G. Eds. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Williams & Wilkins. Baltimore and London.
- Parke J.L. 1990. Population Dynamics of *Pseudomonas cepacia* in the Pea Spherosphere in Relation to Biocontrol *Pythium*. *Amer. Phytopathol. Soc.* **80**: 1307-1311.
- Parke, J. L., Liddell, C.M. and Clayton, M.K. 1990. Relation between soil mass adhering to pea taproots and recovery of *Pseudomonas fluorescens* from the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* **22**: 495-499.
- Peter, A., Bakker, H.M., Bakker, A.W., Murrug, J.D., Weisbeek, P.J. and Schippers, B. 1987. Bioassay for studying the role of siderophores in potato growth stimulation by *Pseudomonas* spp. in short potato ro-

- tations. *Soil Biol. Biochem.* **19**: 443-449.
- Peypoux, F., Besson, Michel, E.G. and Delcambe, L. 1981. Structure of Bacillomycin D, a new antibiotic of Iturin group. *Eur. J. Biochem.* **118**: 323-327.
- Peypoux, F., Pommier, M. T., Das, B.C., Besson, Delcambe, F.L. and Michel, G. 1984. Structure of Bacillomycin D and Bacillomycin L peptidolipid antibiotics from *Bacillus subtilis*. *The Journal of Antibiotics* **37**: 1600-1604.
- Roitman, J.N., Mahoney, N.E., Janisiwicz, W.J. 1990. Production and composition of phenylpyrrole metabolites produced by *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 381-386.
- Roitman, J.N., Mahoney, N.E., Janisiwicz, W. J. and Benson, M. 1990. A new chlorinated phenylpyrrole antibiotic produced by the antifungal bacterium *Pseudomonas cepacia*. *J. Agric. Food Chem.* **38**: 538-541.
- Sakthivel, N. and Gnanamanickam, S.S. 1987. Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for suppression of sheath rot disease and for enhancement of grain yields in rice (*Oryza sativa* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2056-2059.
- Seong, K.Y., Hofte, M., J. Boelens and Verstraete, W. 1991. Growth, survival, and root colonization of plant growth beneficial *Pseudomonas fluorescens* ANP15 and *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 at different temperatures. *Soil Biol. Biochem.* **23**: 423-428.
- Shoji, J., Hinoo, H., Katayama, T., Matsumoto, K., Tanimoto, T., Hattori, T., Higashiyama, I., Miwa, H., Motokawa, K. and Yoshida, T. 1992. Isolation and characterization of new peptide antibiotics, Plusbacins A₁-A₄ and B₁-B₄. *The Journal of Antibiotics* **45**: 817-823.
- Shoji, J., Hinoo, H., Katayama, T., Nakagawa, Y., Ikenishi, Y., Iwatani, K. and Yoshida, T. 1992. Structures of new peptide antibiotics, Plusbacins A₁-A₄ and B₁-B₄. *The Journal of Antibiotics* **45**: 824-831.
- Thomashow, L.S., Weller, D.M., Bomsall, R.F., and Pierson III, L.S. 1990. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 908-911.
- Voisard, C., Keel, C., Haas, D. and Defago, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root of tobacco under gnotobiotic conditions. *The EMBO Journal* **8**: 351-358.
- Winkelmann, G., Allgaier, H., Lupp, R. and Jung, G. 1983. Iturin A₁-a long chain Iturin A possessing an unusual high content of C10-β-amino acids. *The Journal of Antibiotics* **36**: 1451-1457.