

## *Pseudomonas aeruginosa*에 의해 생합성되는 항진균성물질 (PAFS)의 생산성 증가 및 생산균주의 배양 생리학적 특성 연구

박선옥 · 송성기 · 윤권상 · 정연호<sup>1</sup> · 이상종<sup>2</sup> · 정용섭<sup>3</sup> · 전계택\*

강원대학교 생명과학부, <sup>1</sup>강원대학교 식품생명공학부,  
<sup>2</sup>(주)에스티알바이오텍, <sup>3</sup>전북대학교 응용생물공학부

**Enhanced Production of Antifungal Substance (PAFS) Biosynthesized by *Pseudomonas aeruginosa* and Examination of Its Physiological Characteristics in Fermentation.** Park, Sun Ok, Sung-Ki Song, Kwon Shang Yoon, Yeon-Ho Jeong<sup>1</sup>, Sang Jong Lee<sup>2</sup>, Yong Seob Jeong<sup>3</sup>, and Gie-Taek Chun\*. Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea, <sup>1</sup>Division of Food science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea, <sup>2</sup>STR biotech. Co., Ltd., Chuncheon, 200-702, Korea, <sup>3</sup>Division of Biotechnology, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea – Selection of high producer strain, optimization of production medium and cultivation in bioreactor system were carried out in order to produce an antifungal substance, PAFS, in large amounts which was biosynthesized by *Pseudomonas aeruginosa* as secondary metabolite. By investigating 20 kinds of carbon sources and 41 kinds of nitrogen sources, a synthetic medium consisting of fructose (70 g/l) and ammonium sulfate (10 g/l) and a complex medium including galactose (30 g/l), fructose (20 g/l) and cottonseed flour (35 g/l) were determined as optimized media for PAFS production. In bioreactor studies examining physiological characteristics of the producer microorganism with the complex medium, typical pattern of diauxic growth was observed as demonstrated by the result that fructose was not used before almost exhaustion of readily utilizable carbon source, galactose. When galactose was supplemented additionally during the fermentation period, PAFS productivity did not increase any more, indicating that large portion of the added galactose was used for cell growth instead of biosynthesis of the secondary metabolite. It was deduced that PAFS production could be enhanced by employing fed-batch operation in order to overcome the apparent phenomenon of catabolite repression and/or inhibition.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, secondary metabolite, fed-batch operation, catabolite repression

균류는 농작물의 생산에 피해를 주는 식물 병원성 생물의 85%를 차지하여 문제가 되고 있다. *Phytophthora infestans*에 의한 감자역병[4]이나 *Gibberella zeae*에 의한 보리 붉은 곰팡이병[11]등과 같이 작물에 질병을 일으켜 식량난을 유발하기도 하며, *Cryphonectra parasitica*에 의한 밤나무 동고병[1]등으로 산림을 파괴하기도 한다. 따라서 식물병원성 균류의 방제는 시급한 현안 문제로 대두되고 있으며, 이를 위해 미생물의 이차대사물질을 대상으로한 새로운 항진균제의 발견 및 개발이 활발히 이루어지고 있다. 생물학적 방제 목적으로 연구된 미생물로는 *Streptomyces* sp., *Tohyocladium* sp., *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. cepacia*, *P. aeruginosa*[9]와 같은 세균들이 있다. 이 중 *Pseudomonas*는 자연계에 널리 분포하

며 많은 종류가 생물학적 활성을 보이는 이차대사물질을 생합성함으로써 토양에서 생태학적으로 중요한 기능을 수행한다[22]. *Pseudomonas*의 일부는 토양 중 식물 병원성 균류에 대한 강력한 생물학적 조절작용을 갖고 있다고 알려져 있으며[7,12,13], 특히 wheat take-all disease의 조절에 효과적이라고 보고되고 있다[18]. 현재는 fluorescent *Pseudomonas*가 생산하는 phenazines[17,21], pyroles[3,10,15] 및 phloroglucinols[14,16,20]과 같은 몇 가지 항진균성 물질에 대한 화학적 특성이 밝혀졌으며, 토양유래 병원균에 대한 항진균성 활성에 대해 보고되고 있다.

본 연구팀에서는 최근 출현 근교 목장의 가축분뇨 더미에서 분리한 *Pseudomonas aeruginosa*가 항진균성물질을 생합성함을 발견하고, 이 물질을 분리하여 PAFS(*Pseudomonas* Antifungal Substances)라고 명명하였다[9]. PAFS는 여러 가지 균류에 대해 항균 활성을 보이며, 특히 다른 여러 미생물 유래의 항진균제나 화학합성 항진균제가 균사 성장을 억제하는 데에 비해, PAFS는 무성 포자 형성(asexual

\*Corresponding author

Tel. 033-250-8547, Fax. 033-241-4627

E-mail: gtchun@kangwon.ac.kr

sporulation)을 특이하게 저해하는 효과를 가지는 것으로 확인되었다. 본 연구에서는 선별된 우량균주인 *Pseudomonas aeruginosa*가 분비하는 항균물질인 PAFS의 활성조사를 위해 agar piece와 disc assay 방법과 같은 bioassay법을 확립하였고, PAFS의 고생산을 위한 배지 최적화를 다양한 탄소원, 질소원 등의 조사를 통해 수행하였다. 또한 생물반응기 배양을 통해 PAFS의 생합성에 관한 배양 생리학적 특성을 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험균주

항생물질 분비 균주는 춘천근교 목장에서 분리하여 동정한 *Pseudomonas aeruginosa* KMCS1을 사용하였다[9]. 균주는 YPD(Yeast extract, 10 g/l; Peptone, 20 g/l; Dextrose, 20 g/l; Difco chemical)배지에서 1일간 배양한 후 10%의 glycerol이 포함된 liquid stock을 만들어 -20°C에서 보관하여 seed culture시마다 새로운 stock을 꺼내 사용했고, 2개월마다 계대배양하여 사용하였다.

### 배지 및 배양 조건

플라스크 배양을 위한 seed culture는 YPD 배지 100 ml을 500 ml 삼각플라스크에 첨가하여 28°C, 200rpm으로 24시간 배양 후 생산 배지에 1%(v/v)으로 접종하여 수행하였다. 생산배지의 성분은 배지 최적화를 위해 합성배지인 SM배지(Glucose, 30 g/l; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 g/l; CaCO<sub>3</sub>, 5 g/l; NaCl, 2 g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g/l; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05 g/l; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05 g/l; MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05 g/l; distill water, 1l)를 기본으로 하여 다양한 탄소원과 질소원이 PAFS 생산성에 미치는 영향을 종류별, 농도별로 조사해가며 결정하였다.

### PAFS의 항균활성 조사를 위한 감수성균주와 bioassay법

항균활성 조사를 위한 감수성 균주로는 식물 병원성 균주인 *Alternaria brassicicola*를 사용하였다[9]. Agar piece 방법에 의한 고생산성 균주 선별은 생산배지에서 1~2일 정도 미리 배양된 *P. aeruginosa*가 놓여진 agar cylinder(6 mm)를 감수성 균주인 *A. brassicicola*가 pour plating된 PDA(potato dextrose agar; Difco chemical)배지 위에 놓아 24시간 배양하여 확인했다. Agar piece 방법을 확립하기 위해 감수성 균주의 spore 농도와 배양 온도를 조절하는 실험을 수행하였다. Disc assay는 생산 배지에서 2일간 배양한 뒤 10 ml의 *P. aeruginosa* 배양액에 동량의 methanol을 첨가하여 완전히 혼합한 후에 1시간 동안 200rpm, 28°C의 진탕배양기에서 추출한 후 1 ml의 시료를 취했다. Disc assay를 위해 PDA 배지 위에 감수성 균주인 *A. brassicicola*를 pour plating 하고 준비한 disc(Antibiotic-assay disc, diam 6 mm, Adventec)에 배양액의 추출 시료를 적

당량 접종한 후 agar 배지 위에 올려놓고 disc 주변에 생성된 감수성 균주의 성장저해환의 크기를 측정하였다.

### 생물반응기 배양

생물반응기 접종을 위한 seed culture의 배양조건은 YPD 100 ml, 온도 28°C, 교반속도 200rpm으로 하여 24시간 배양하였으며, 1.5 liter 조업부피의 생물반응기로의 접종량은 1%(v/v)로 하였다. 배지는 배지 최적화에서 얻은 최종 배지 조성(Galactose, 30 g/l; Fructose, 20 g/l; Cottonseed flour, 35 g/l; CaCO<sub>3</sub>, 5 g/l; NaCl, 2 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g/l; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05 g/l; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05 g/l; MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05 g/l; distill water, 1l)을 사용하였다. 배지의 pH는 필요한 경우 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 2N NaOH를 사용하여 6.5로 조절하였고, 배양 온도는 28°C, 교반속도는 200~350rpm, 공기유량은 1.0~2.0vvm으로 적절히 조절하였다. 기포제거액의 경우에 배양액의 포화 용존산소량은 감소시켜 결과적으로 배양액 내로의 산소전달계수(oxygen transfer rate coefficient, kLa)에 악 영향을 미치므로 기포제거조절기에 의해 투입되는 기포제거액을 가능한 한 최소화하여 첨가했다.

### 당 분석

배양액 중에 잔류하는 galactose와 fructose의 농도를 측정하기 위해 HPLC를 이용하였으며 그 운전조건은 다음과 같다:

Column, 10 μm Waters Carbohydrate analysis column (3.9 × 300 mm) (Millipore, Milford, MA, USA); Precolumn, Bondapak precolumn for C<sub>18</sub>(4.6 × 20 mm); Mobile phase, Acetonitrile : Water=80 : 20; Column temperature, 25°C; Detector & Condition, Waters 401 refractive index (RI) detector; Data analysis, Waters 746 Data Module (Millipore Milford, MA, USA).

## 결과 및 고찰

### Agar piece (plug)방법의 확립을 통한 고생산성 균주 선별 방법 확립

감수성 균주인 *A. brassicicola*의 포자수를 각각 1 × 10<sup>5</sup>, 1 × 10<sup>6</sup>, 1 × 10<sup>7</sup> spores/ml로 하고 배양온도를 23°C, 28°C로 하여 감수성 균주의 성장을 조절해 보았다. 감수성 균주의 포자수가 많을수록 PAFS에 의한 성장저해환의 크기가 작은 것으로 관찰되었다. 또한 배양 온도 조절에서는 28°C에서는 *P. aeruginosa*의 성장 속도가 감수성균주의 성장 속도보다 빠르게 진행되어 성장저해환의 크기가 너무 크게 나왔고, 23°C에서는 *P. aeruginosa*의 성장 속도가 다소 느려서 감수성 균주와 자라는 속도가 적절히 이루어져 성장저해환의 크기가 각각의 agar cylinder에 대해 뚜렷이 측정될 수 있었다. *A. brassicicola*의 spore수는 1 × 10<sup>7</sup> spores/ml

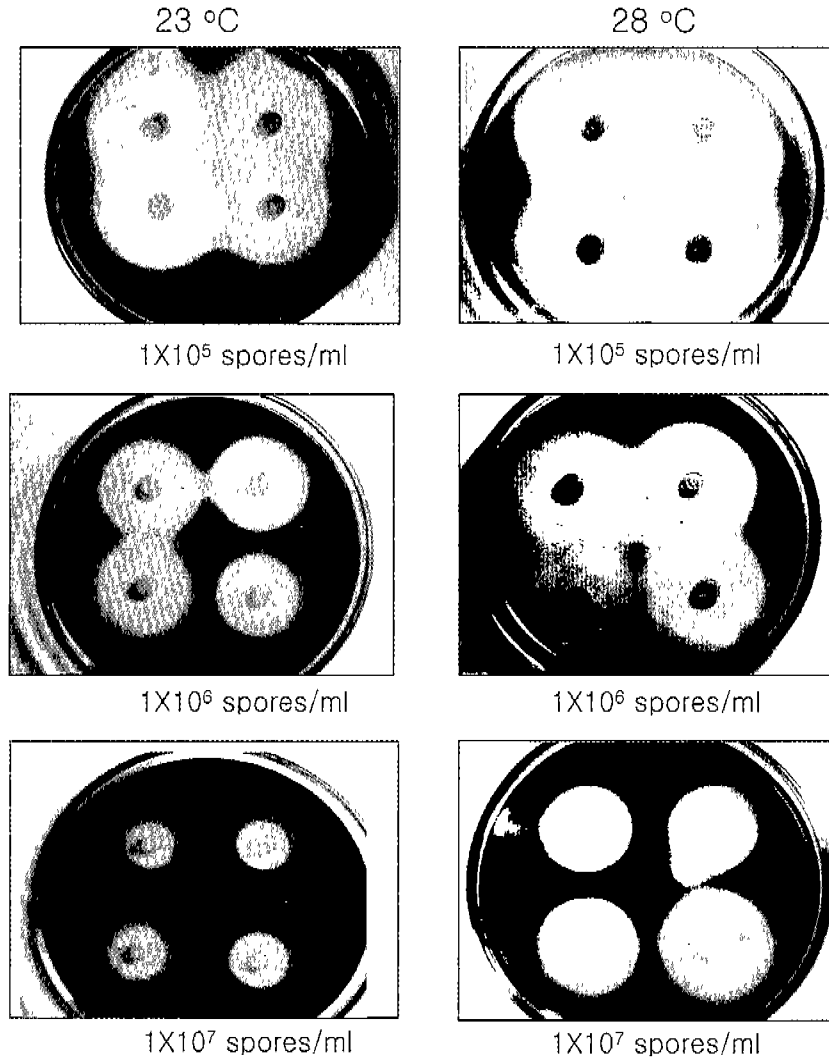


Fig. 1. Effect of incubation temperature and inoculum amount of sensitive microorganism, *A. brassicicola* on the diffusion of PAFS in agar piece assay method.

가 적절하였으나, 이 정도 농도의 spore 수를 얻기가 어려워서  $1 \times 10^6$  spores/ml로 확정되었다(Fig. 1).

Disc assay 방법의 확립을 통한 PAFS의 상대적 농도 측정

Agar piece 방법과 동일하게, 접종하는 감수성 균주의 spore 농도와 배양 온도 조절 실험을 수행하였다. 그 결과 감수성 균주의 접종량은 agar piece 방법과 마찬가지로  $1 \times 10^6$  spores/ml로 결정되었고, 배양온도는 감수성 균주가 빠르게 자랄 수 있는 28°C로 확정되었다(data 제시하지 않음). 배양액 추출시료의 접종량은 초기에는 20  $\mu$ l로 수행하다가 배지최적화에 의한 PAFS의 생산성이 증가함에 따라 10  $\mu$ l로 조정하여 사용하였다.

탄소원 성분 및 농도가 PAFS 생산성에 미치는 영향 조사

배지최적화를 위해 20여 가지의 탄소원으로 PAFS의 생산성을 조사하였다. 기본 배지로 SM배지를 사용하고 각각의 탄소원을 30 g/l 농도로 첨가하여 배양조건을 37°C, 120rpm으로 48시간 수행한 플라스크 배양에서 탄소원이 PAFS 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 실험 결과 fructose에서 유일하게 PAFS의 생산성(성장저해환 크기: 16.1 mm)을 확인하였다. Disc assay로 PAFS의 생산성을 확인하였으며, 배양액 추출물을 disc에 20  $\mu$ l 접종하였다.

아래의 질소원 최적화 1차 실험 결과 후 탄소원을 제외한 나머지 생산 배지의 조성은 동일하게 하고, 질소원은 아래의 실험에서 높은 생산성을 보인 cottonseed flour(10 g/l)와 skim milk(10 g/l)를 각각 사용하여 탄소원 최적화에 대한 2차 실험을 수행하였다. 본 실험에서는 배양조건 중 배양온도 최적화를 위해 37°C와 28°C의 배양 조건을 비교하여 PAFS 생산성이 보다 좋았던 28°C의 배양 조건을 최

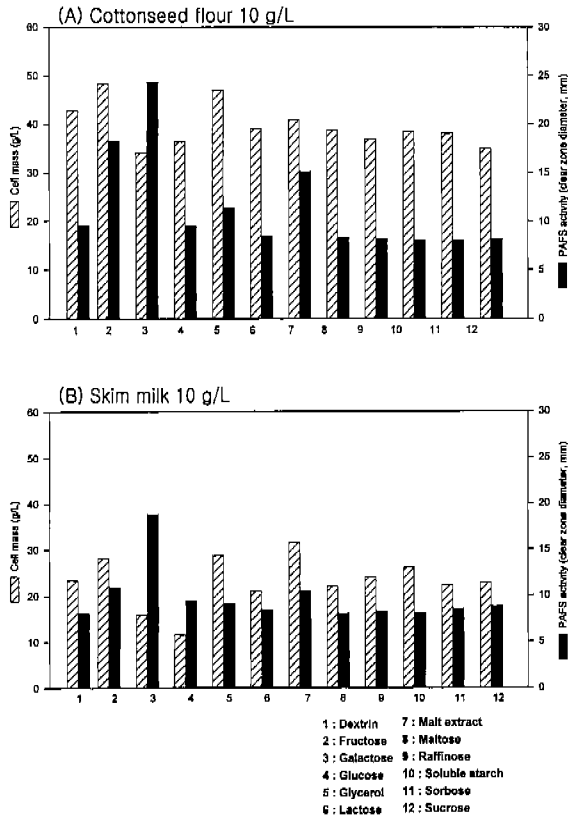


Fig. 2. Effect of various carbon source (30 g/l) with (A) cottonseed flour (10 g/l) and (B) skim milk (10 g/l) as a respective nitrogen source on cell growth and PAFS production in shake flask culture preformed at 28°C and 200 rpm for 2 days.

적 온도로 결정하였다. 결과는 fructose, galactose 그리고 malt extract를 탄소원으로 사용했을 때 두 질소원 모두에서 PAFS 생산성이 동일하게 높게 나타났다(Fig. 2). 특히 질소원으로 cottonseed flour(10 g/l)를 사용하고 탄소원이 galactose인 경우, 성장저해환이 약 24.5 mm로서 PAFS 생산성이 타 조건에 비해 2배 정도 향상된 것으로 관찰되었다(Fig. 2(A)). 한편 10 g/l의 cottonseed flour가 질소원일 때의 적정 탄소원 농도를 조사한 실험에서는(Fig. 3), 80 g/l의 fructose, 또는 30 g/l의 galactose를 사용한 경우가 PAFS 생산성이 가장 높게 나타났다 (성장저해환 크기: 각각 20 mm 정도). 본 실험에서는 생산된 PAFS의 농도가 충분히 높아서 배양액의 추출물을 20 ml에서 10 ml로 줄여서 사용하였다.

질소원 성분 및 농도가 PAFS 생산성에 미치는 영향 조사  
 다양한 질소원(41종류)이 PAFS 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 질소원을 제외한 나머지 생산 배지의 조성은 상기와 동일하며, 탄소원으로는 높은 생산성을 보인 fructose(30 g/l)를 이용하였다. Disc assay 결과 ammonium sulfate(성장저해환 크기: 15.2 mm), cottonseed flour(10 mm),

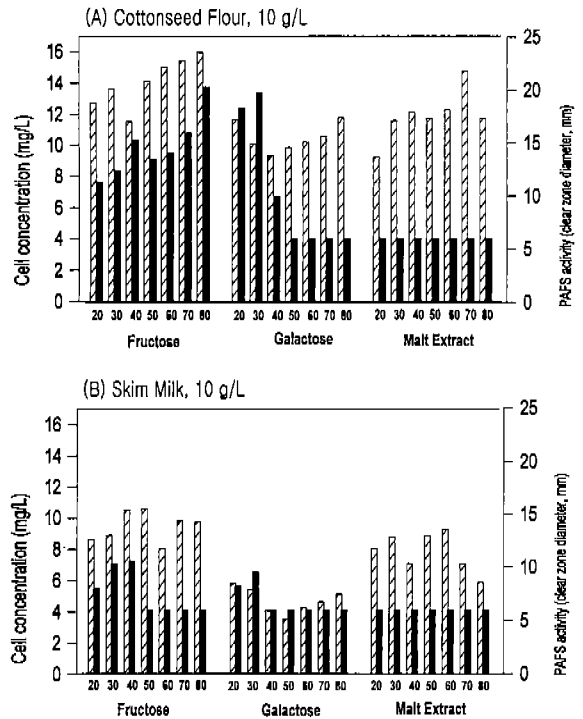


Fig. 3. Effect of various concentration of production carbon source (fructose, galactose and malt extract) with (A) cottonseed flour (10 g/l) and (B) skim milk (10 g/l) as a respective nitrogen source on cell growth and PAFS production in shake flask cultures performed at 28°C and 200 rpm for 2 days.

skim milk(9.8 mm) 그리고 skim milk powder(8.3 mm)에서 PAFS 생산성이 높게 나타났다. 배양은 37°C, 120 rpm으로 2일간 수행하였으며, PAFS의 disc assay를 위해 배양액 추출물 20 ml를 접종하였다.

다음은 탄소원을 확인한 후 질소원의 농도를 조사한 실험으로 탄소원은 각각 fructose 80 g/l와 galactose 30 g/l로 고정하고 질소원으로 결정된 cottonseed flour의 농도를 각각 5~40 g/l 범위의 다양한 농도에 대해 실험을 수행하였다(Fig. 4). 두 가지 탄소원 중에서는 fructose 80 g/l 보다는 galactose 30 g/l를 공급하였을 때 생산성이 1.2배정도 향상되었으며, 질소원으로 사용한 cottonseed flour의 농도는 가장 높은 농도인 35 g/l와 40 g/l에서 생산성이 더욱 높게 관찰되었다. Galactose의 경우, cottonseed flour, 30 g/l(성장저해환 크기: 26.2 mm), 35 g/l(26.4 mm), 40 g/l (26.1 mm)에서 모두 비슷한 결과를 얻었다. 이차대사산물의 생산은 배지의 첨가량에 따라 급변할 수 있으므로 35 g/l cottonseed flour를 첨가하는 것이 가장 적절하다고 판단하여, 이후부터는 질소원으로 cottonseed flour를 35 g/l 첨가하여 실험을 수행하였다. 지금까지의 배지조성 실험 결과에 근거해서, 탄소원과 질소원으로 fructose(70 g/l)와 ammonium sulfate(10 g/l)를 사용한 합성배지와, galactose (30 g/l), fructose(20 g/l)와 cottonseed flour(35 g/l)를 사용

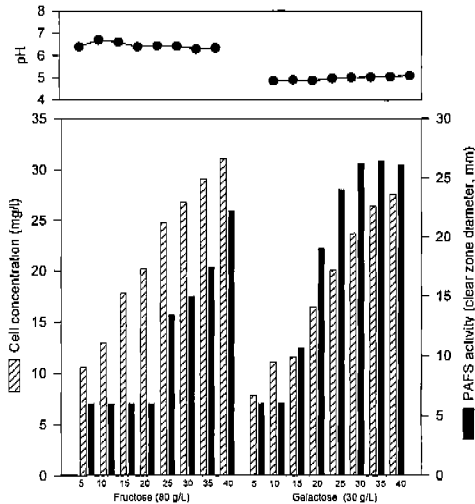


Fig. 4. Effect of various cottonseed flour concentrations on cell growth and PAFS production with fructose 80 g/l and galactose 30 g/l as a carbon source.

한 복합배지를 최적 배지로 결정하였고, 이후의 실험은 경제성을 고려해서 복합 배지를 사용하였다.

PAFS activity에 대한 bioassay에서 성장저해환의 직경을 unit 단위로 전환

PAFS activity를 정량적으로 분석하기 위해 bioassay 방법을 사용하는 경우에 감수성 균주의 성장저해환의 크기는 고농도일수록 즉, 직경이 커질수록 직경의 차이는 미미해도 실제 농도는 큰 차이를 보이는 경향이 있다. 그러므로 감수성 균주의 성장저해환에 대한 항생물질의 활성을 semi-log 좌표로 표현할 경우 일반적으로 직선화되는 것으로 알려져 있다.

본 실험의 경우에는 배지 최적화 실험에서 가장 높은 PAFS 생산성을 보였던 배지 조성에서 얻은 배양 상등액으로 disc assay 방법을 실시하여 관찰된 감수성 균주의 성장저해환의 크기를 이용하여 표준 저해곡선을 얻고자 하였다. Fig. 5에 1000 unit의 PAFS 활성의 정의 조건과 1000 unit의 시료를 1/5 배씩 증류수로 희석한 후 bioassay 결과 얻은 표준 저해곡선을 나타내었으며, 이 때 직선식은 다음과 같이 표현되는 것으로 밝혀졌다:  $\log_{10}Y=a+bX$ ,  $Y=10^{(a+bX)}$  (여기서  $a=1.637$ ,  $b=0.056$ ,  $X$ 는 저해환의 직경). 이상의 결과에 근거해서, 이후 부터는 상기와 동일한 실험조건에서 bioassay를 수행한 후, PAFS 생산성을 나타내는 성장저해환의 크기를 이 직선식에 의해 unit의 단위로 전환하여 표현했다.

생물반응기에서 PAFS 생산균주의 배양생리학적 특성

2.5 리터의 생물반응기(조업부피 1.5 리터)배양에서 pH를 6.5로 조절한 경우와 조절하지 않은 경우, 그리고 sugar를 배양 중반에 공급한 경우에 대해 각각의 PAFS 생산량과

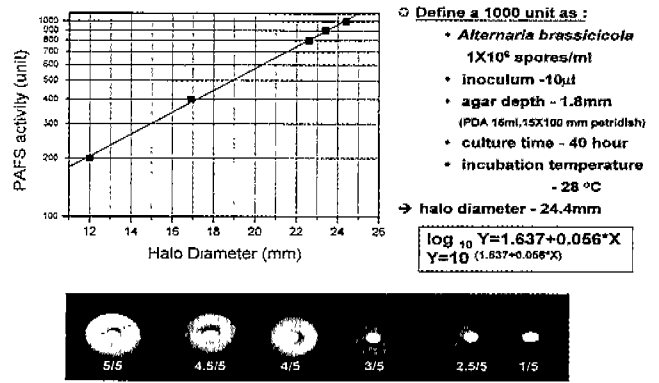


Fig. 5. Construction of the standard inhibition curve of *A. brassicicola* by PAFS.

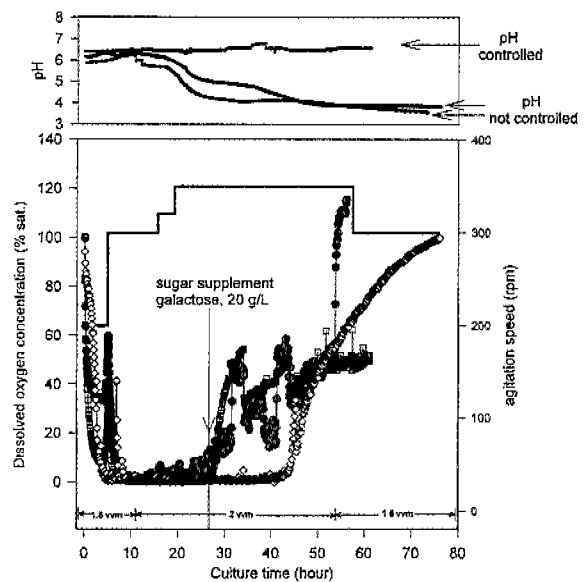
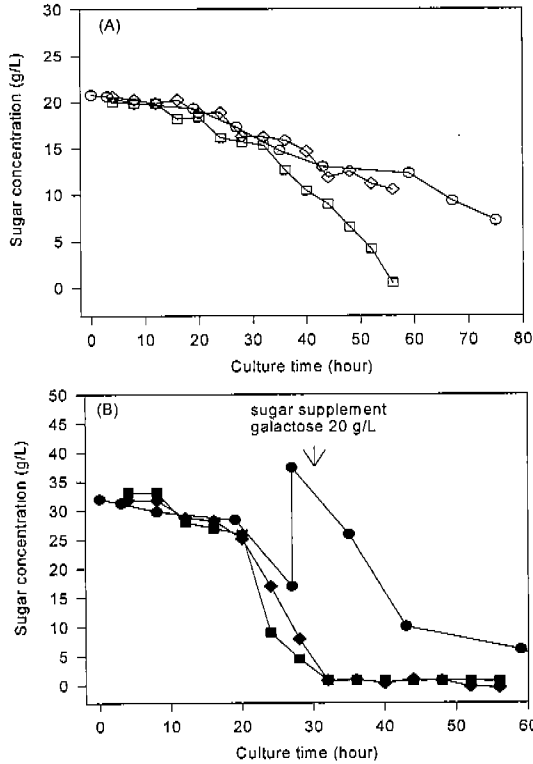


Fig. 6. Comparison of dissolved oxygen profiles as a function of fermentation time between pH controlled, pH not controlled and sugar supplement culture system in a 1.5 L stirred tank bioreactor.

(●) : pH controlled, (□) : pH not controlled, (◇) : sugar supplement

용존산소량, pH 변화 경향 및 sugar의 소비량을 비교하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 pH를 조절하지 않은 경우, pH가 배양 초기에 6.5 근처에서 시작하여 배양말기에 4.0 정도까지 감소하는 것으로 보아 배양 초반에 유기산과 같은 대사산물이 생성되는 것으로 보인다. 용존산소량은 두 조건 모두 초반에 세포 성장과 함께 세포의 산소요구량이 증가되어 약 4시간 만에 용존산소가 10% 이하로 급격히 저하되었다. 배양 말기에 pH를 6.5로 조절한 경우에는 빠른 성장속도로 인한 탄소원의 조기 고갈로 인해 세포생장이 저해된 결과, 산소요구량도 감소하여 용존산소량이 거의 포화상태인 100% 까지 급격히 증가되지만 pH를 조절하지

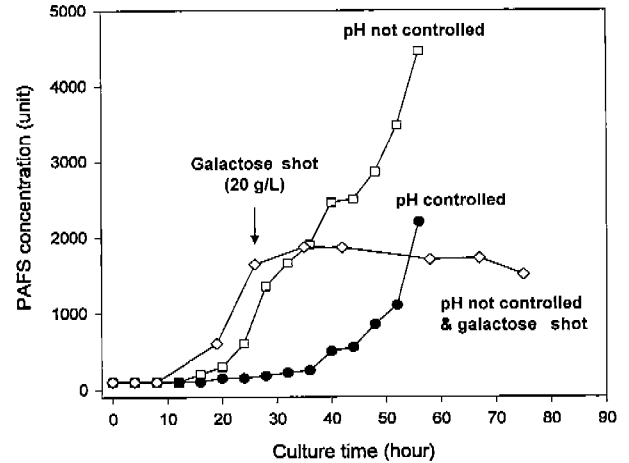


**Fig. 7.** Comparison of fructose and galactose concentration as a function of fermentation time between pH controlled, pH not controlled and sugar supplement culture system in a 2.5 L stirred tank bioreactor ((A) fructose, (B) galactose). diamond symbol ( $\diamond$ ,  $\blacklozenge$ ): pH controlled, square symbol ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ): pH not controlled, circle symbol ( $\circ$ ,  $\bullet$ ): sugar supplement

않은 경우에는 포화용존산소 농도의 50% 정도로 유지되는 것으로 나타났다.

이러한 현상은 sugar의 소비 양상을 살펴봄으로서 확인 될 수 있다(Fig. 7). pH 조절 유무에 상관없이 두 경우 모두 galactose와 fructose 두 가지의 sugar중 galactose를 먼저 소비하고 galactose가 거의 다 소비된 후 fructose를 사용하는 전형적인 “diauxic growth” 현상을 보였다. pH를 조절한 경우에는 세포성장이 왕성하여 galactose를 모두 사용하자마자 fructose를 소비하며, 배양 말기에는 fructose도 완전히 고갈되므로 용존산소량이 급격히 포화상태로 증가하였다. 반면에 pH를 조절하지 않은 경우에는 낮은 pH로 인해 세포 성장이 저해를 받으므로 탄소원의 흡수량도 감소하여 잔류 영양분의 이용에 의한 세포 성장의 진행으로 인해 용존산소량이 배양 말기에도 50%로 유지된다고 볼 수 있다. PAFS 생산성 면에서는 두 경우 모두 galactose를 소비하고 fructose를 소비하기 시작하는 시점부터 생산성이 증가하였고, pH를 조절하지 않은 경우(4412 unit)가 pH를 조절한 경우(2157 unit)보다 약 2배 정도 높은 생산성을 보였다(Fig. 8).

또한 배양 기간 중 galactose가 다 소모되는 시점에서



**Fig. 8.** Comparison of PAFS production as a function of fermentation time between pH controlled, pH not controlled and sugar supplement culture system in a 2.5 L stirred tank bioreactor. ( $\bullet$ ): pH controlled, ( $\square$ ): pH not controlled, ( $\diamond$ ): sugar supplement

galactose(20 g/l)를 추가로 공급한 생물반응기 배양에서의 PAFS 생산성을 조사하였다. 위의 발효조 실험에서 배양 시작 후 30시간 쯤에 galactose가 모두 소비되므로 이 시점에서 20 g/l의 galactose를 연동펌프를 사용하여 첨가하였으며 배양 중 pH는 조절하지 않았다. 이 경우 쉽게 이용되는 galactose가 추가로 첨가되므로 세포는 계속해서 빠르게 성장하였고, 이로 인해 산소전달 제한현상이 발생해서 배지 내의 산소농도가 지속적으로 매우 낮게 유지되는 것으로 나타났다(Fig. 6). Sugar의 소비 양상을 살펴보면 galactose를 추가로 공급한 후부터 또 다시 galactose를 빠르게 소비하는 경향을 보였으며, fructose는 pH를 조절하지 않은 배양에서와 마찬가지로 대략 10 g/l 농도가 사용되지 않고 잔존하였다(Fig. 7). PAFS 생산성은 galactose를 추가로 공급하기 전까지는, pH를 조절하지 않고 galactose의 추가 첨가가 없었던 단순 회분식배양 결과와 비슷한 경향을 보였다. 그러나 Sugar를 공급한 이후에는 PAFS 생산성이 거의 증가하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 8).

위의 결과를 종합해 볼 때 fructose와 galactose를 배지에 동시에 사용하였을 때 Catabolite repression 또한 inhibition 현상에 의해 fructose가 천천히 소비되며 또한 이용하기 쉬운 galactose를 추가로 공급했을 때 PAFS 생산성이 더 이상 증가하지 않는 점으로 보아, 공급된 galactose는 이차대사산물 생산을 위해 사용되기보다는 세포성장을 위해 먼저 사용된 것으로 추론할 수 있다. 이와 같은 catabolite repression 또한 inhibition에 의한 PAFS 생산성 저해현상을 극복하기 위해서는 한법에 sugar를 공급하는 방법보다는 배양 중간에 유가식 방법으로 galactose를 공급하거나, 또는 배양 초반부터 galactose를 천천히 공급해주는 유가식배양 방법을 사

용하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

요 약

*Pseudomonas aeruginosa*가 생산하며 진균류의 무성포자 형성을 특이하게 저해하는 항진균성물질(PAFS)의 대량 생산을 위해 우량균주 선별 및 생산배지 최적화를 수행하였으며, 발효조에서의 PAFS의 생합성 특성을 조사하였다. 20 종류의 탄소원과 41종류의 질소원을 이용한 배지조성 실험 결과 탄소원과 질소원으로 각각 fructose(70 g/l)와 ammonium sulfate(10 g/l)를 사용한 합성배지와, galactose(30 g/l), fructose (20 g/l)와 cottonseed flour(35 g/l)를 사용한 복합배지가 최적배지로 결정되었다. 한편 복합배지에 의한 발효조 배양을 통해 생산균주의 배양생리학적 특성을 조사한 결과, galactose를 거의 다 소비한 후 fructose를 사용하는 전형적인 diauxic growth 현상이 관찰되었다. 또한 이용하기 쉬운 galactose를 추가로 공급했을 때 PAFS의 생산성이 더 이상 증가하지 않는 점으로 보아 공급된 galactose는 이차대사산물을 생산을 위해 사용되기보다는 세포성장을 위해 먼저 사용된 것으로 판단되었다. 이와 같이 PAFS를 생산하는 균주가 catabolite repression 또는 inhibition 현상을 보이므로 이를 극복할 수 있는 유가식배양 방법이 적용된다면 PAFS 생산성이 더욱 증가될 것으로 예상되었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청에서 지원한 연구비 (Grant 81510-655)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Anagnostis, S. L. and B. Hillman. 1992. Evolution of the chestnut tree its blight. *Arnoldia*. **52**: 3-10.
2. Brisbane, P. G. and A. D. Rovira. 1988. Mechanism of inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by fluorescent *Pseudomonads*. *Plant Pathol.* **37**: 104-111.
3. Dowling, D. N. and F. O'Gara. 1992. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends in Biotechnol.* **12**: 133-141.
4. Fry W. E. and S. B. Goodwin. 1977. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United State. *Plant. Dis.* **81**: 1349-1357.
5. Gill, P. R. and G. H. Warren. 1988. An iron-antagonized fungistatic agent that is not required for iron assimilation from a fluorescent *rhizosphere Pseudomonad*. *J. Bacteriol.* **170**: 163-170.
6. Gutterson, N. 1990. Microbiol fungicides : Recent approaches to elucidating mechanisms. *Crit. Rev. Biotechnol.* **10**: 69-91.
7. Jee, H. H., C. K. Nam, and C. H. Kim. 1988. Studies on the

- biological control of *Phytophthora* blight of red-pepper. I. Isolation of antagonistics and evaluation of antagonistic activity in vitro and green house. *Kor. J. Pl. Pathol.* **4**: 305-312.
8. Keel, C., U. Schnider, M. Maurhofer, C. Voisard, J. Laville, U. Burger, P. Wirthncr, D. Haas, and G. Defago. 1992. Suppression of root disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 : Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Pl-Microb Interaction.* **5**: 4-13.
9. Kim, S. H and M. W. Lee. 1996. Biological and Physico-chemical properties of antifungal cyclic lipopeptides produced by *Pseudomonas cepacia* strains. *Kor. J. Mycology.* **24**: 310-321.
10. McLoughlin, T. J., J. P. Quinn, A. Betterman, and R. Bookland. 1992. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1760-1763.
11. McMullen, M. and Gallenberg, D. 1977. Scab of wheat and Barley : A re-emerging disease of devastating impact. *Plant. Dis.* **81**: 1340-1348.
12. Moon, B. J., S. H. Roh, and C. T. Cho. 1990. Biological control of *Fusarium* wilt of strawberry by antagonistic bacterium, *Pseudomonas gladioli*, in greenhouse. *Kor. J. Pl. Pathol.* **6**: 461-466.
13. O'sullivan, D. J. and F. O'Gara. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* **56**: 662-676.
14. Russo, A., Y. Moenne-Loccoz, S. Fedi, P. Higgins, A. Fenton, D. N. Dowling, M. O'Regan, and F. O'Gara. 1996. Improved delivery of biocontrol *Pseudomanas* and their antifungal metabolites using alginate polymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 740-745.
15. Schnider, U., C. Keel, C. Blumer, J. troxler, G. Defago, and D. Haas. 1995. Amplification of the housekeeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities. *J. Bacteriol.* **177**: 5387-5392.
16. Shanahan, P.,<sup>†</sup> D. J. O'sullivan, P. Simpson, J. D. Glennon, and F. O'Gara. 1992. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent *Pseudomonas* and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 353-358.
17. Shoji, J., H. Hino, T. Kato, T. Hattori, K. Harooka, K. Tawara, O. Shiratori, and T. Konishi. 1990. Isolation of cepafungins I, II, and III from *Pseudomonas species*. *J. Antibiotics.* **43**: 783-787.
18. Thomashow, L. and D. M. Weller. 1998. Role of phenazine antibiotics from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.* **170**: 3499-3508.
19. Uramoto, M., C. J. Kim, K. Shin-ya, H. Kusakabe, and K. Isono. 1990. Isolation and characterization of phosmidosine, a new antifungal nucleotide antibiotic. *J. Antibiotics.* **44**: 375-381.
20. Vincent, M. M., L. A. Harrison, J. M. Brackin, P. A. Kovace-

- vich, P. Mukerji, D. M. Weller, and E. A. Pierson. 1991. Genetic analysis of the antifungal activity of soil-born *Pseudomonas aurofaciens* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 2928–2934.
21. Wood, D. W. and L. S. Pierson III. 1996. The *phzI* gene of *Pseudomonas aurofaciens* 30-84 is responsible for the production of diffusible signal required for phenazine antibiotic production. *Gene.* **168**: 49–53.
22. Yoon, K. S, B. Y. Min, H. T. Choi, J. K. Lee, and K. W. Kim. 1990. Microscopic examination of the suppressive action of antifungal substances from *Pseudomonas aeruginosa* on asexual sporulation of fungi. *J. Microbiol.* **37**: 27–34.

**(Received September 16, 2000)**