

***Pseudomonas aeruginosa* EL-KM에 의한 환경친화적 항균물질의 생산과 특성**

이 경 민 · 이 오 미 · 차 미 선 · 박 은 희* · 박 근 태 · 손 흥 주** · 이 상 준
부산대학교 미생물학과 · 부산광역시 보건환경연구원 · 밀양대학교 생물공학과
(2001년 7월 26일 접수; 2001년 12월 31일 채택)

Production and Characteristics of Environment-Friendly Antimicrobial Substance by *Pseudomonas aeruginosa* EL-KM

**Kyung-Min Lee, O-Mi Lee, Mi-Sun Cha, Eun-Hee Park*,
Geun-Tae Park, Hong-Joo Son** and Sang-Joon Lee**

Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

*Pusan Institute of Health and Environment, Busan 613-104, Korea

**Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea

(Manuscript received 26 July, 2001; accepted 31 December, 2001)

An antimicrobial substance-producing microorganism was isolated from soil samples. Based of the taxonomic characteristics of its morphological, cultural, physiological properties and 16s rRNA sequence alignment, this microorganism was identified as *Pseudomonas aeruginosa*, and we named *Pseudomonas aeruginosa* EL-KM. The optimal culture condition for production of antimicrobial substance was 1% mannitol, 0.4% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.2% K₂SO₄, 100 μM MgSO₄ · 7H₂O, 10 μM CaCl₂ · 2H₂O, 1 μM FeSO₄ · 7H₂O, 1 μM MnSO₄ · 4-5H₂O, initial pH 7 and 200 rpm at 30°C. The purification of the antimicrobial substance was performed by silica gel column chromatography, and fraction with TLC R_f 0.77 value represented good antimicrobial activity. The crude antimicrobial substance was stable within a pH range of 3-10 and temperature range of 4°C-121°C autoclaving. This crude antibacterial substance acted as bacteriolytic agent against *Vibrio cholerae* non-O1 ATCC 25872, and also exhibited excellent properties, when the substance was demonstrated against many other gram-positive, gram-negative bacteria, yeast and fungi.

Key words : Antimicrobial substance, *Pseudomonas aeruginosa* EL-KM, *Vibrio*

1. 서 론

최근 전세계적으로 사람들의 청결지향성 및 건강 지향성이 높아지는 추세에 부응하여 항균화가 성행 하면서, 제품을 보다 가공함으로써 부가가치를 높이고, 다른 제품과 차별화시키는 시대에 접어들고 있다. 항균화 지향은 섬유분야 뿐만 아니라 자동차, 전자제품, 기능성 포장재 등 인체와 밀접한 모든 분야에서 유행하고 있으며, 이러한 흐름에 따라 항균

처리에 사용되는 항균제도 동시에 큰 발전이 이루어지고 있다.¹⁾

항균제는 무기계와 유기계로 대별된다. 무기계 항균제에는 동계, 은계, 아연계, 산화티탄계 등이 있으며, 유기계는 합성품과 천연계가 있다. 유기합성한 항균제에는 이미타졸유도체, 설폰유도체, 페놀유도체 등이 있으며, 천연항균제로는 식물추출물, 특정 단백질 및 효소류, 유기산류, bacteriocin 등이 있다.¹⁾ 그 중 식물추출물, 곤충 및 미생물 유래의 천연 항균제가 활발하게 연구되고 있으나 사용되는 규모는 미미한 수준이다.²⁾ 천연항균제 중 질병의 치료나 예방을 위한 목적으로 사용되는 미생물 제제의

Corresponding Author; Sang-joon Lee, Dept. of Microbiology,
Pusan National University, Busan 609-735, Korea
Phone : +82-51-510-2268
E-mail : sangjoon@pusan.ac.kr

범주는 i) 미생물 자체를 이용하는 방법 ii) 미생물의 대사산물을 이용하는 방법 iii) 항균작용을 가진 새로운 유기화합물의 합성을 유도하는 방법 등이 알려져 있는데,³⁾ 미생물이 생성하는 항진균성 물질인 cyclic peptide, aromatic compound 유도체 등이 잘 알려져 있다.⁴⁾

Pseudomonas sp.가 다른 균종에 대해서 항균작용을 나타낸다는 것은 오래전부터 알려져 왔는데, Fluorescent *Pseudomonad*의 일부 균주가 생성하는 항진균성 물질이 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*가 유발하는 밀의 입고병을 예방할 수 있다는 보고가 대표적이다.⁵⁾ 또한 *Pseudomonad*가 생성하는 2,4-diacetylphoroglucocinal 성분이 식물병리 병원균의 예방과 유전자에 관한 연구 등이 잘 알려져 있다.^{6, 8)} 그리고 *Pseudomonas* sp.가 치매치료제 개발의 일환으로 acetylcholinesterase 억제제를 생산한다는 연구가 있으며,⁹⁾ *P. aureofaciens*이 생산하는 phenazine의 항진균 작용에 대해서도 알려져 있다.^{6, 10)} 현재 *Pseudomonas* spp. 중에서 특히 *P. aeruginosa*가 생산하는 대사산물에 의한 항균효과가 광범위하게 연구되고 있는데, 이들이 생산하는 pyocyanin은 푸른색의 phenazine 색소로 그 기능은 명백하지 않으나, 산소 라디칼을 증가시킴으로써 나타내는 항균작용 때문에 광범위하게 연구되고 있으며,^{11, 12)} 1-hydroxyphenazine의 항진균 효과도 알려져 있다.^{3, 13, 14)}

그러나 이러한 끊임없는 새로운 항균제와 합성 치료제 발견에도 불구하고 매년 병원성 *Vibrios*에 의한 패혈증이나 병원성 대장균 O157에 의한 요독증 등 병원성 미생물에 대한 사회적 문제와 함께 우리 생활주변에 서식하는 각종 세균성 병원균과 식품부패균에 대한 주의가 요구되는 실정이다. 특히 삼면이 바다인 우리나라는 매년 생선회로 인한 식중독 사건들이 발생하고 있으며, 병원성 *Vibrios*가 주된 원인으로 알려져 있다. 따라서 생선회집으로 배달되는 생선은 반드시 질병으로부터 안전해야 하며, 양식장으로 공급되는 해수나 생선회집의 수족관은 병원성 세균으로 오염되어서는 안된다. 양식어의 경우, 질병 예방을 위하여 합성 항생물질을 많이 투여하고 있으나 지속적인 투여로 인하여 내성균 발생 및 인체로의 전달 등 많은 부작용이 있으므로 안전에 무해하고 환경친화적인 천연 항균물질의 개발이 시급한 실정이다.

따라서, 본 논문에서는 전 세계의 여러나라에서 사람들에게 질병을 유발하는 *Vibrio*에 항균활성을 갖는 균을 검색하여 분리한 후, 분리균이 생산하는 항균물질의 최적 생산조건, 안정성 및 항균활성에 대하여 조사함으로써 새로운 환경친화적 천연항균

물질을 개발하고자 한다.

2. 재료 및 실험 방법

2.1. 사용균주 및 공시균주의 선정

항균물질 생산균주의 선별을 위해서 부산 시내의 토양 및 하천에서 분리되어 부산대학교 미생물학에서 보관중인 *Pseudomonas* spp.들을 사용하였다. 균주를 nutrient broth에 접종하여 30°C에서 48시간 배양한 후, 배양액을 원심분리(12,000 rpm, 4°C, 20min)하여 그 상등액을 1/10로 농축한 후 항균활성 측정에 사용하였다. 항균활성이 확인된 *Pseudomonas* spp. 중 피검균인 *Vibrio cholerae* non-O1 ATCC 25872 과 다른 그람 음성균에 대한 항균활성을 검토하여 항균활성의 범위가 가장 넓은 균주를 공시균주로 선정하였다. 균주는 육즙한천사면배지를 보존용 배지로 하여 계대하여 냉암소에서 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

2.2. 항균활성 및 항균물질 생산능 측정

항균물질 생산성은 paper disc 확산법과 liquid culture method을 병행하여 실시하였다.^{15, 17)} 피검균은 미리 Muller-Hinton broth에서 37°C, 24시간 배양한 후, McFarland standard 0.5가 되도록 희석하여 항균활성 측정에 사용하였다. Paper disc 확산법은 피검균 배양액을 멸균 면봉을 사용하여 Muller-Hinton agar plate에 도말하고 멸균된 여과지(Paper disc, Toyo Aventck ϕ 8 mm)를 올려 놓고, 그 위에 항균물질 20 μ l을 분주하여 37°C에서 24시간 배양한 후, 투명환의 크기로 항균력을 비교하였다. Liquid culture method는 상기의 피검균 배양액을 10 ml Muller-Hinton broth에 2%(v/v) 접종하고, 공시균 배양액을 원심분리(12,000 rpm, 4°C, 20min)한 후, 제균한 배양상등액을 2%(v/v) 첨가하여 37°C에서 6시간 정지 배양하고 피검균의 생육도를 660 nm에서 측정 후, 항균물질의 피검균에 대한 저해율을 다음 식에 의하여 산출하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \frac{(C_0 - C)}{C_0} \times 100$$

(C: Control O.D., C: 항균물질 처리후 배양한 O.D.)

2.3. 공시균주의 분류 및 동정

공시균주의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 배양적, 생화학적 제반 특성을 검토하였으며, 도출된 결과는 “Bergey’s manual of systematic bacteriology”¹⁸⁾와 “Bergey’s manual of determinative bacteriology 제9판”¹⁹⁾을 참고로 하여 분류, 동정하였다. 또한 16S rRNA sequencing을 실시하였으며, PCR

Pseudomonas aeruginosa EL-KM에 의한 환경친화적 항균물질의 생산과 특성

product의 염기서열 분석은 Blast search program을 이용, 인터넷상의 database인 gene-bank, EMBL, DDBJ, PDB를 통하여 실시하였다.

2.4. 항균물질생산 최적조건 검토

공시균주에 의한 항균물질생산 최적조건을 검토하기 위하여 배양온도, pH, 탄소원, 질소원, 무기염, 각종 금속염 및 통기량의 영향을 조사하였다. 항균물질 생산을 위한 전배양 및 본배양 배지로 peptone 1%, glycerol 1%, K₂SO₄ 0.14%, NaCl 0.5%, pH 7(King A 배지)²⁰⁾을 사용하였으며, 200 rpm, 30°C에서 5일간 배양한 후 균의 생육도 및 항균력을 측정하였다.

2.5. 항균물질의 추출 및 조정제^{21, 23)}

최적조건에서 배양된 배양액으로부터 chloroform을 이용한 유기용매 추출법으로 항균물질을 추출하였다. 먼저 배양액을 원심분리(12,000 rpm, 4°C, 20 min)하여 균체를 제거한 다음, 상등액과 동량의 chloroform을 넣어 추출·여과한 후 감압 농축하여 원 volume의 1/50로 mass up하였다. 농축시킨 chloroform층을 silica gel thin layer chromatography(TLC) plates(silica gel 60, F₂₅₄, Merck)에 점적하여 chloroform-methanol(1:1)로 전개한 후, 254 nm의 UV를 조사하여 확인하였다. 항균물질의 조정제를 위해 농축시킨 chloroform층을 3×30cm coulume chromatography(silica gel 60, 230~400 mesh, Merck)를 1drop/3sec, 0.5 ml/1fraction의 속도로 실시하였다. 용출용매는 chloroform-methanol(1:1)을 사용하였다. 각각의 fractions는 silica gel TLC로 확인하여 같은 R_f값을 보인 fractions는 모아 다시 감압농축시킨 후, 분리된 각각의 물질에 대한 항균활성을 *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872를 피검균으로 사용하여 확인하였다.

2.6. 항균물질의 특성 및 안정성 검토

본 공시균주가 생산하는 조정제된 항균물질의 물리화학적 특성을 조사하기 위하여 그 성상 및 TLC R_f value를 조사하고, 분광광도계 200~800 nm에서 scanning하여 용매 CHCl₃에서 최대흡수파장을 관찰하였다. 또한 항균물질의 열과 pH 안정성을 조사하기 위하여 조정제된 항균물질을 증류수에 2% 농도로 녹여 4°C에서 24시간 처리, 항온 수조의 온도를 25°C, 50°C, 75°C, 100°C로 맞춘 후 60분간 처리, 110°C에서 10분간 열처리 및 121°C에서 15분간 고압증기멸균하여 온도에 대한 안정성을 검토하였으며, 10 mM pH 3~10의 완충액을 조제한 후, 조정제된

항균물질을 2%(w/v) 첨가하여 상온에서 48시간 반응시킨 후, 항균활성을 측정하여 pH에 대한 항균물질의 안정성을 알아보았다.

2.7. 항균물질의 효과 검토

조정제된 항균물질의 minimal inhibitory concentration(MIC)를 산출하기 위하여 발병율이 높은 *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872, *V. parahemolyticus* ATCC 17802, *V. vulnificus* ATCC 27562을 피검균으로 하여 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards)의 기준에 따라 한천희석법을 실시하였다.^{24,25)}

또한, 항균물질의 작용기작을 검토하기 위하여 Muller-Hinton broth에 *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872를 접종한 후, 대수증식기(배양 18 시간)에 항균물질을 첨가하고 이후 배양시간 경과에 따른 생균수 변화 및 660nm에서의 탁도변화를 관찰하였으며, 항균물질을 첨가한 후 3시간 경과 후의 세포형태 변화를 전자현미경(TEM)으로 관찰하였다.

다양한 그람 양성, 그람 음성 세균, 효모 및 곰팡이를 피검균으로 하여 조정제된 항균물질에 대한 항균활성범위를 조사하였다. 세균은 Muller-Hinton agar, 효모 및 곰팡이는 PDA(potato dextrose agar) 배지를 이용하였으며, 40 µg/ml의 조정제된 항균물질 20µl를 적하한 paper disc 확산법으로 항균활성을 측정하여 억제환의 크기로 항균력을 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 공시균주의 선정

보관중인 10개의 *Pseudomonas* spp. 중에서 *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872에 대하여 항균활성이 인정된 2개의 균주를 *V. parahemolyticus* ATCC 17802, *V. vulnificus* ATCC 27562에 대해 항균활성 시험을 실시하여 항균활성이 인정된 1개의 균주를 공시균주로 선정하였다.

3.2. 공시균주의 분류 및 동정

공시균주는 그람음성의 간균으로 포자를 형성하지 않았고 편모(단극모)를 관찰할 수 있었다. 형성된 집락은 원형으로서 표면의 가장자리는 부정형이고, 편평한 flat형으로, 표면은 smooth하였다. 본 균주는 호기성 세균으로 대사양식은 oxidation이며, catalase, cytochrome oxidase, gelatin liquefaction, citrate utilization, lipase test는 양성을 나타내었으며, ornithine decarboxylase, nitrate reduction, VP-MR test는 음성을 나타내었다. Salmonella-Sigella agar에서 생육하였으며, 형광 색소로서 pyocyanine과

pyoverdine을 생산하였다. 또한 16s rRNA 염기서열 분석결과, *Pseudomonas aeruginosa*의 16s ribosomal RNA gene의 complete sequence와 98%의 상동성을 나타내었다. 따라서 상기의 형태학적, 배양적, 생화학적 특성과 16S rRNA sequencing 결과를 종합하여 “Bergey’s manual of systematic bacteriology Vol. I”¹⁸⁾과 “Bergey’s manual of determinative bacteriology 제9판”¹⁹⁾을 비교한 결과, 본 연구의 공시균주는 *Pseudomonas aeruginosa* strain으로 동정되었으며, 이를 *Pseudomonas aeruginosa* EL-KM로 명명하였다.

3.3. *Pseudomonas aeruginosa* EL-KM의 항균물질 생산 최적조건

항균물질생산 최적 탄소원으로 Table 1에서 보는 바와 같이 Mannitol 1%로 나타났으며, Table 2에서 보는 바와 같이 유기질소원을 첨가했을 경우가 무기질소원에 비해 생육도와 항균활성이 우수하였으며, 질소원으로 yeast extract를 첨가한 경우에 항균물질 생산이 가장 높은 것으로 나타났다. 그 외 pH, 균주의 배양온도, 무기염, 각종 금속염 및 통기량의 영향을 조사하여 본 공시균주의 항균물질 생산 최적조건을 검토한 결과는 Table 3과 같다. 최적배지조성에서 발효초 배양시 공시균주의 배양시간에 따른 생육도와 항균물질 생산능을 영향을 조사한 결과는 Fig. 1과 같이 배양 24시간째부터 정지기에 들어갔으며, 항균물질의 생산은 균의 생육과 함께 서서히 이루어지다가 배양 3일째부터 거의 이루어지지 않았다.

Table 1. Effect of carbon sources on the production of antimicrobial substance by *P. aeruginosa* EL-KM

Carbon source (1%)	Growth (OD _{600nm})	Inhibition rate (%)
Glucose	1.023	38.8
Fructose	0.892	38.9
Glycerol	1.026	38.2
Sucrose	0.766	31.8
Starch	0.719	35.3
Mannitol	0.975	41.7
Galactose	0.905	34.5
Lactose	0.814	35.2
Lanvan	0.833	33.0
Maltose	0.883	33.0
D-Mannose	0.815	24.9
D-Sorbitol	0.663	31.8
Inositol	0.941	29.3
Inuline	0.923	27.1
L-Arabinose	0.892	35.3
Soy bean oil	0.750	23.3
Control	0.686	34.7

Table 2. Effect of nitrogen sources on the production of antimicrobial substance by *P. aeruginosa* EL-KM

Nitrogen source (0.2%)	Growth (OD _{600nm})	Inhibition rate (%)
KNO ₃	0.148	25.3
NaNO ₂	0.066	21.2
NaNO ₃	0.118	19.3
NH ₄ NO ₃	0.170	23.4
NH ₄ Cl	0.156	4.0
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.297	-11.3
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.174	0.9
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.638	28.2
Urea	0.041	-15.6
Yeast extract	2.943	57.0
Malt extract	0.281	3.0
Beef extract	1.260	34.5
Tryptone	0.975	55.4
Bactopeptone	0.638	35.6
Polypeptone	1.278	52.9
Control	0.034	10.4

Table 3. The optimal medium composition and condition

Mannitol	1.0 %
Yeast extract	0.4 %
NaCl	0.5 %
K ₂ SO ₄	0.2 %
MgSO ₄ · 7H ₂ O	100 μM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	10 μM
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1 μM
MnSO ₄ · 4~5H ₂ O	1 μM
Initial pH	7.0±0.2
Temperature	30°C
Agitation	200 rpm

3.4. 항균물질의 추출 및 조정제

최적조건에서 공시균을 배양한 후, 상등액을 chloroform으로 추출 및 감압농축하고, silica gel TLC plate에 점적하여 chloroform-methanol(1:1)로 전개한 후, 254nm에서 확인한 결과 R_f 0.83, R_f 0.77, R_f 0.63, R_f 0.57, R_f 0.37에서 5개의 물질을 확인하였다. 5개의 물질을 분리하기 위하여 silica gel coulume chromatography를 실시하고, 각각의 fraction을 모아서 감압농축시킨 후, 각 fraction별로 *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872에 대한 항균활성을 확인한 결과 R_f 0.77에서 항균활성을 관찰할 수 있었으며, R_f 0.63에서도 미미한 항균활성을 볼 수 있었으나 깨끗한 억제환을 보이지는 않았다. 따라서 R_f 0.77 fraction의 물질이 *P. aeruginosa* EL-KM이 생산해 내는 주요한 천연항균물질로 판단하였다.

Pseudomonas aeruginosa EL-KM에 의한 환경친화적 항균물질의 생산과 특성

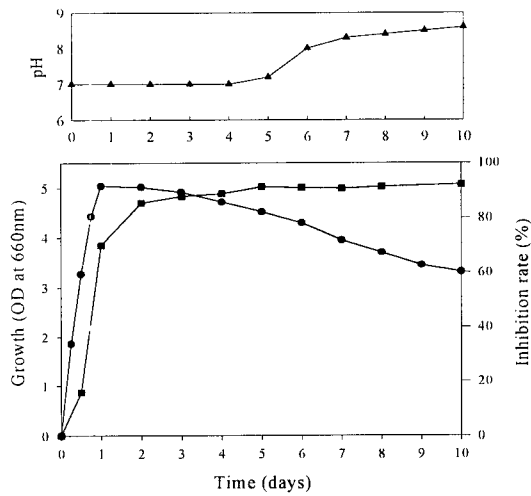


Fig. 1. Time course of cell growth and production of antimicrobial substance by *Pseudomonas aeruginosa* EL-KM at optimum culture condition.

Symbols ; -●-: Cell growth
 -■-: Inhibition rate
 -▲-: pH

3.5. 항균물질의 특성 및 안정성 검토

본 항균물질의 물리화학적 성상은 Table 4와 같으며, *P. aeruginosa*가 생산하는 항균물질로 알려진 pyocyanin과 1-hydroxyphenazine과는 다소 차이가 있는 것으로 조사되어 기존에 알려지지 않은 새로운 물질로 판단된다. 그러나 보다 정확한 물질 분석을 위해 IR, FAB-MS, NMR 등의 분석이 요구되었다.

Table 4. Physicochemical properties of crude antimicrobial substance from *P. aeruginosa* EL-KM

Nature	Yellow powder
TLC R _f value*	0.77
Absorption maxima(nm) in CHCl ₃	253, 368

* Silica gel plate(Merck)
 Solvent system : chloroform-methanol(1:1)

조정제된 항균물질은 4℃에서 24시간 처리, 25℃, 50℃, 75℃, 100℃에서 60분간 처리한 결과 Fig. 2에서와 같이 항균활성에는 아무런 영향을 미치지 않았으며 110℃ 10분, 121℃ 15분으로 autoclave하여도 활성을 유지하는 것으로 나타나 본 항균물질은 열에 매우 안정한 것으로 나타났다. 또한 Fig. 3에서 보듯이 광범위한 pH의 변화에도 항균활성은 유지됨을 볼 수 있다.

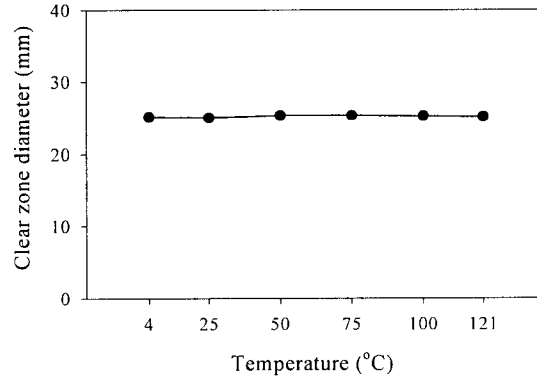


Fig. 2. Effect of temperature on the crude antimicrobial substance stability.

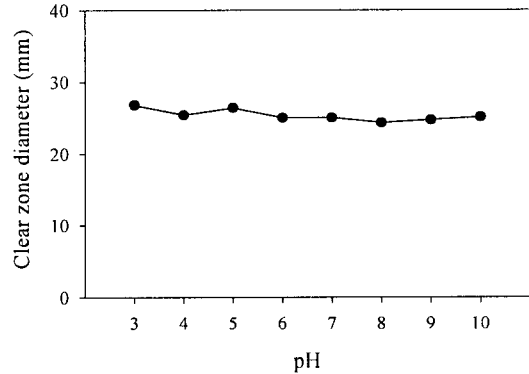


Fig. 3. Effect of pH on the crude antimicrobial substance stability.

3.6. 항균물질의 효과 검토

Vibrio spp. 3균주를 대상으로 하여 본 항균물질의 최소억제농도(MIC)를 구한 결과, *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872는 2μg/ml, *V. parahemolyticus* ATCC 17802는 2μg/ml, *V. vulnificus* ATCC 27562는 4μg/ml이었다.

본 항균물질의 작용기작을 알아보하고자 *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872의 대수증식기(18hrs)에서 항균물질을 첨가한 후의 배양 시간에 따른 항균물질의 영향을 알아본 결과 뚜렷한 탁도 감소(Fig. 4)와 생균수 감소(Fig. 5)가 관찰되었다. 또한 항균물질이 *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872 세포의 형태변화에 미치는 영향을 전자현미경(TEM)으로 관찰한 결과, 항균물질을 처리 약 3시간 후 피검균의 세포막 기능이 파괴되어 세포내용물이 균체 외부로 유출되어 균체 내부가 빈 ghost 형태의 균체수가 증대되어 거의 사멸하는 것으로 나타났다(Fig. 6). 따라서 본 항균물질은 *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872에 대

해 완전한 용균제(bacteriolytic agent)로 작용하는 것으로 조사되었다.

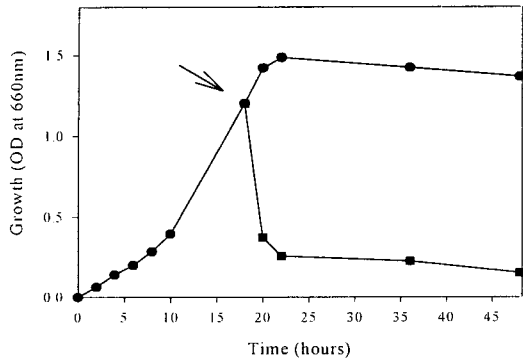


Fig. 4. Cell growth of *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872 with and without antimicrobial substance. Arrow indicates the point of treatment with antimicrobial substance. Symbols : -●-; no antimicrobial substance treatment ; -■-; antimicrobial substance treatment.

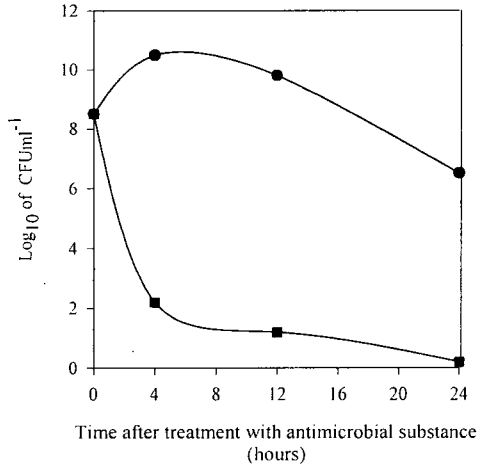


Fig. 5. Effect of antimicrobial substance on growth and viability of *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872. Symbols : -●-; no antimicrobial substance treatment -■-; antimicrobial substance treatment. CFU; colony-forming units.

여러 가지 균주를 피검균으로 하여 본 항균물질에 대한 항균활성범위를 조사한 결과, 다양한 그람 양성, 음성 세균에 항균활성을 보였으며, 효모 및 곰팡이에 대해서도 항균활성을 나타내어 광범위한 항

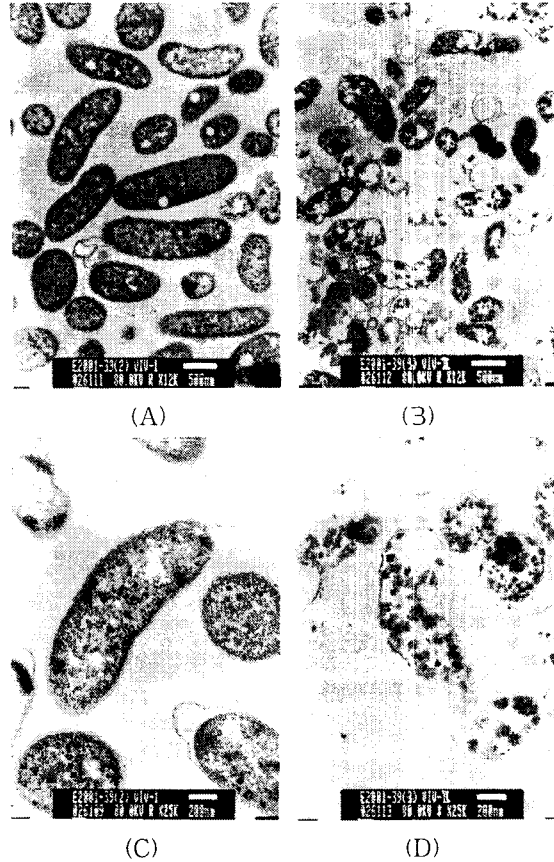


Fig. 6. Electromicrographs of *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872 untreated(A,C) and treated(B,D) with antimicrobial substance.

미생물작용을 하는 것으로 나타났다. 그러나 본 항균물질 생산균주인 *P. aeruginosa* EL-KM과 *P. aeruginosa* ATCC 15442에는 항균활성을 보이지 않았다(Table 5, Fig. 7).

4. 결 론

V. cholerae non-O1 ATCC25872에 대하여 항균활성을 갖는 균을 선정하여 형태학적, 배양적, 생화학적 특성 및 16s rRNA sequencing에 의하여 동정한 결과 *Pseudomonas aeruginosa*도 동정되었다. 항균물질 최적 생산조건은 1% mannitol, 0.4% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.2% K_2SO_4 , $100 \mu M$ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $10 \mu M$ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $1 \mu M$ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $1 \mu M$ $MnSO_4 \cdot 4 \sim 5H_2O$, initial pH 7, $30^\circ C$, 200 rpm이었다. 조정제된 항균물질은 yellow powder의 형태로 최대흡수파장은 용매, $CHCl_3$ 에서 253nm와 368nm로 조사되었다. 조정제된 항균물질은 열과 pH에 광범위한 안정성을 보였으며, 작용기작을

Pseudomonas aeruginosa EL-KM에 의한 환경친화적 항균물질의 생산과 특성

Table 5. Antimicrobial activity of crude antimicrobial substance* from *P. aeruginosa* EL-KM

Organisms	Inhibitory activity**
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1 ATCC 25872	+++
<i>Vibrio mimicus</i> ATCC 33653	+++
<i>Vibrio fluvialis</i> KCTC 2473	+++
<i>Vibrio furnissii</i>	++
<i>Vibrio alginolyticus</i>	+++
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	++
<i>Vibrio vulnificus</i> ATCC 27562	+++
<i>Vibrio harveyi</i> KCTC 2717	+++
<i>Vibrio ordalii</i> KCTC 2724	++
<i>Vibrio campbellii</i> KCTC 2716	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EL-KM	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> IAM 12001	+++
<i>Pseudomonas cepacia</i>	+++
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+++
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	++
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	+++
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	+++
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	+++
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	++
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642	++
<i>Rhizopus oryzae</i>	+
<i>Trichoderma harzianum</i> KCTC 6504	

* Paper disc contains 20 μ l of crude antimicrobial substance (40 μ g/ml).

** -: no visible inhibition(0mm), +: weak(0~15mm)
 ++: strong(15~25mm), +++: very strong(25mm~)

검토한 결과, *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872에 대해 용균제로 작용하였다. 여러 가지 균주를 피검균으로 하여 본 항균물질에 대한 항균활성범위를 조사한 결과 다양한 그람 양성, 음성 세균, 효모 및 곰팡이에 대해서도 항균활성을 나타내어 광범위한 항미생물작용을 하는 것으로 나타났다. 이상과 같은 결과로 보아 본 항균물질은 열과 pH에 대해 우수한 안정성을 가지며, 세균, 효모 및 곰팡이 등 광범위한 항미생물작용을 하는 것으로 나타나 새로운 천연항균물질 개발을 위한 기초자료로 쓸 수 있을 것으로 여겨진다. 또한 최근의 항세균, 항곰팡이성 소재의 다양한 추세에 따라 그 활용도가 크게 활성화되어 가고 있는 바, 본 항균물질도 실제로 *Vibrio*가 서식할 수 있는 수족관 등의 인공수계에 적용할 수 있으리라 생각되며, 항진균작용 역시 나타나 농약류 등 산업적 이용 가능성도 있으리라 사료된다. 그러나 보다 안전한 산업적 이용을 위해서는 항후 생물 안전성 시험 및 정확한 구조분석이 요구된다.

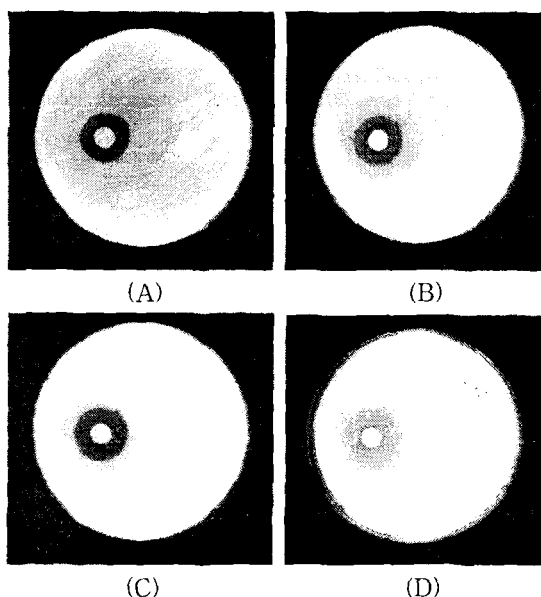


Fig. 7. Photographs of paper disc antimicrobial test of crude antimicrobial substance against *E. coli* ATCC 25922(A), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538(B), *Sacharomyces cerevisiae*(C) and *Aspergillus niger* ATCC 9642(D).

참고 문헌

- 1) Kosaka, Y., 1997, 항균화에 의한 차별화, 染色工業.
- 2) Conner, D. E. and L. R. Beuchat, 1984, Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts, *J. Food Sci.*, 49, 429.
- 3) Min, B. Y., J. Y. Shim, K. W. Kim, J. K. Lee, H. T. Choi, and K. S. Yoon, 1996, Fungal-sporulation suppressing substances produced by *Pseudomonas aeruginosa* KMCS-1, *J. Microbiol.*, 34, 284-288.
- 4) Shanahan, P., D. J. O'sullivan, P. Simpson, J. D. Glennon, and F. O'Gara, 1992, Isolation of 2,4-diacetyl phloroglucinol from a fluorescent *Pseudomonas* and investigation of physiological parameters influencing its production, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 353-358.
- 5) Thomashow, L. S. and D. M. Weller, 1988, Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *J. Bacteriol.*, 170, 3499-3508.
- 6) Vincent, M. N., L. A. Harrison, J. M. Brackin, P. A. Kovacevich, P. M. ukerji, D. M. Williler, and E. A. Pierson, 1991, Genetic analysis of the

- antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2928-2934.
- 7) Wood, D. W. and L. S. Pierson III, 1996, The *phz* I gene *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is responsible for the production of diffusible signal required for phenazine antibiotic production, *Gene*, 168, 49-53.
 - 8) Fenton, A. M., P. M. Stephens, J. Crowley, H. O'Callaghan, and F. O'Gara, 1992, Explocitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain, *App. Environ. Microbiol.*, 58, 3873-3878.
 - 9) 김경자, 2000, *Pseudomonas* sp. 960903에 의한 acetylcholinesterase 억제제의 생산 및 정제, *Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol.*, 28(6), 322-328.
 - 10) PiersonIII, L. S. and E. A. Pierson, 1996, Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens* : role in rhizosphere ecology and pathogen suppression, *FEMS Microbiology Letters*, 136, 101-108.
 - 11) 권영식, 김미경, 김민정, 윤소겸, 김영부, 오양효, 1993, 녹농균의 Pyocyanine의 포도구균 항균 활성, *부산의대학술지*, 33(2), 31-37.
 - 12) Duncan, S. H., C. J. Doherty, J. R. W. Govan, S. Neogrady, P. Galfi, and C. S. Stewart, 1999, Characteristics of sheep-rumen isolates of *Pseudomonas aeruginosa* inhibitory to the growth of *Escherichia coli* O157, *FEMS Microbiology Letters*, 180, 305-310.
 - 13) Kerr, J. R., G. W. Taylor, A. Rutman, N. Hoiby, P. J. Cole, and R. Wilson, 1999, *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth, *J. Clin. Pathol.*, 52, 385-387.
 - 14) Wang, S.L., T.C.Yieh, I.L.Shih, 1999. Production of antifungal compounds by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 using shrimp and crab shell powder as a carbon source, *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 142-148.
 - 15) Masten, J. M. and A. L. Barry, 1974, Susceptibility test : diffusion test procedures 418-427. In E.H. Spanlding, and J.P. Truant(ed.), *Manual of clinical microbiology*. 2nd ed, *American society for Microbiology*, USA.
 - 16) 한국미생물학회, 1998, *대학미생물학 실험서*, (주)을유문화사.
 - 17) 박선옥, 송성기, 윤권상, 정연호, 이상종, 정용섭, 전계택, 2000, *Pseudomonas aeruginosa*에 의 해 생합성되는 항진균성물질(PAFS)의 생산성 증가 및 생산균주의 배양 생리학적 특성 연구, *Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol.*, 28(6), 341-348.
 - 18) Bergey' *Manual of Systematic Bacteriology*, 1984, The William and Wilkins Co., U.S.A.
 - 19) Bergey' *Manual of Determinative Bacteriology*, 1994, The William and Wilkins Co., U.S.A., 9.
 - 20) Fernandez, R. O. and R. A. Pizarro, 1997, High-performance liquid chromatographic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* phenazines, *J. Chromatography A*, 771, 99-104.
 - 21) Lampis, G., D. Deidda, C. Maullu, S. Petruzzelli, R. Pompei, F. D. Monache, and G. Satta, 1996, Kanalicin, a new biologically active compound from *Pseudomonas fluorescens/putida*. II. Biological properties, *J. Antibiotics.*, 49, 263-266.
 - 22) Khoo, S. H., H. W. Shin, and Y. W. Lee, 1993, Determination of partial structures of antibiotic substance, 3266-KI compound, isolated from *Pseudomonas* 3-6 isolate, *Annal of Research Center for New Biomaterials in Agric*, 2, 88-92.
 - 23) Kim, J.S., Y.W. Lee, S.H. Ohh, Y.K. Yi, Y.H. Yu, Y.H. Kim, and K.J. Park, 1991, Isolation and identification of antibiotic substances produced by *Pseudomonas fluorescens*, *Kor. J. Plant Pathol.*, 7, 94-101.
 - 24) National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999 Performance standards for antimicrobial susceptibility tests, 9th informational supplement. Approved standard M2-A6. Villanova: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
 - 25) Dilution Susceptibility Test Procedure of the National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1989, *J. Clin. Microbiol.*, 27, 192-195.