

토양으로부터 분리한 *Pandoraea* sp. BCNU 315 에 관한 연구

김선아 · 최혜정¹ · 우승희¹ · 황민정 · 박미란¹ · 김동완² · 문자영³ · 주우홍*

창원대학교 생물학과, ¹생명공학협동과정, ²미생물학과, ³보건의과학과

Received February 4, 2008 / Accepted February 15, 2008

Study on *Pandoraea* sp. BCNU 315 Isolated from Soil. Seon-A Kim, Hye Jung Choi¹, Seung-Hee Woo¹, Min-Jung Hwang, Mi-Ran Park¹, Dong-Wan Kim², Ja-Young Moon³ and Woo Hong Joo*. Department of Biology, ¹Interdisciplinary Program in Biotechnology, ²Department of Microbiology, ³Department of Biochemistry and Health Sciences, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea - Bacteria that antagonize plant pathogenic fungi were isolated from the sediment soil at the Ansan industrial estate. One isolate of them showed growth inhibition of *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, and *Fusarium oxysporum*. This strain was identified as *Pandoraea* sp. based on phenotypic and phylogenetic characteristics and termed *Pandoraea* sp. BCNU 315. Tryptone as nitrogen source and sucrose as carbon source were found to be most effective for the microbial growth. In addition, the optimum temperature and pH for microbial growth were 30°C and pH 7.0, respectively. The substances generated from *Pandoraea* sp. BCNU 315 were purified and analyzed by column chromatography, HPLC, GC-MS and NMR. As a result, one compound was determined to be indole, another compound was predicted as cyclopentadecaheptene. Detailed structural clarification of the all of the rest six compounds from *Pandoraea* sp. BCNU 315 has to be accompanied in the further studies.

Key words : *Pandoraea* sp., antagonistic bacterium, antifungal activity

서 론

우리사회는 과거 수십년간 의식주의 충족을 위해 노력 해왔다. 70년대 산업화와 현대문물의 도입으로 사람들은 의식주의 해결에서 나아가 문화생활과 정신적 충족을 위해 일하고 소비하게 되었으며 자연스럽게 모든 생활 패턴이 변하게 되었다. 이러한 과정에서 산업화가 진행됨에 따라 심한 환경오염을 초래하게 되었으며, 비옥했던 토지는 황폐해져 갔고 계속되는 식물병으로 점점 더 많은 화학농약을 사용하는 악순환이 계속되고 있다. 식물병을 방제하기 위해 사용되는 유기화학농약은 농작물의 피해를 감소시키기는 하였지만 독성의 문제점이 한계에 도달해 간과할 수 없는 상황에 이르게 되었다. 최근에 환경 문제가 국제적인 문제로 대두되면서 여러 가지 유기화학농약들의 사용을 규제하기 시작했고 많은 관련 회사들이 환경 오염을 줄이는 방향으로 약제들을 개발하고 있다.

미생물을 이용하는 생물학적 방제는 자연생태계 내에서 서로 다른 이종간에 일어날 수 있는 경쟁, 기생, 포식 관계 또는 항생작용 등의 상호작용을 인위적으로 조절하며 이를 적극 활용하는 것으로서, 특히 토양전염성 식물병은 엽권병에 비하여 유기화학농약으로도 효과적으로 방제할 수 없는 문제가 있으나, 토양은 비교적 환경 요인이 단순하므로 토양

전염성 병원균에 대한 생물학적 방제가 성공 가능성이 높으므로 이 분야에 대하여 많은 연구자가 집중적으로 연구를 진행해 오고 있다. 길항미생물을 이용하는 생물학적 방제에 관한 연구와 함께 새로운 농업용 항생물질에 관한 연구는 1958년 일본에서 활발히 진행되어 벼도열병 약제로서 Blasticidin S가 개발되어 실용화된 이후 kasugamycin, polyoxin, validamycin 등이 개발되어 식물병의 방제에 이용되고 있다. 이와 같은 농업용 항생물질은 식물에 흡수, 침투되어 확산될 수 있을 뿐만 아니라 병원균에 대한 예방 및 치료 효과를 동시에 갖고 있기 때문에, 최근에는 새로운 농업용 항생물질의 개발에 관한 연구가 전 세계적으로 많은 연구자들에 의해 수행되고 있다.

식물근부병균 등 여러 가지 식물병원성 진균에 대한 길항균주를 이용한 생태학적 생물방제방법은 크게 세 가지 범주로 구분될 수 있다. 첫째는 진균 세포벽 가수분해효소인 chitinase [9,10], β -1,3-glucanase와 최근에 보고된 식물성 chitinase [18]를 이용하여 식물병원균의 세포벽을 분해시키는 방법, 둘째는 *Streptomyces griseus* [4], *Streptomyces blastmyces* [19], *Penicillium nigricans* [2], *Bacillus subtilis* [8,11], *Pseudomonas* sp. [1] 등이 생산하는 항진균성 항생물질에 의해 직접 식물병원균의 생육을 저해하는 항생작용(antibiosis)을 이용하는 방법, 셋째는 plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) 즉, 대부분 근권 *Pseudomonas* sp.가 분비하는 철(Fe^{3+}) 성분 특이 결합물질인 siderophore에 의해 식물병원균의 생육을 저해하는 경쟁적 길항작용(competitive antagonism)을 이용한 방제방법 등을 들 수 있다[17]. 현재 전 세계적으로 농업

*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3453, Fax : +82-55-213-3459

E-mail : whjoo@changwon.ac.kr

부문에서 식물병원균에 대해 길항적인 미생물을 이용하여 병을 방제하는 생물학적 방제 방법에 대한 연구가 널리 진행되고 있으며, 여러 종류의 미생물제제로 개발되어 판매되고 있다[6,12,15].

그러므로 본 연구에서는 생물학적 방제에 유효한, 식물병원성 진균에 대하여 길항작용을 가지는 신규 미생물을 분리하고자 하였으며 이들이 생성하는 신규 화합물에 대하여도 분리 보고하고자 한다.

재료 및 방법

항진균 활성 미생물의 분리

진균 활성 물질을 생산하는 미생물을 분리하기 위하여 안산공단 내 하천의 토양을 채취하여 시료로 사용하였으며, 토양을 멸균수에 희석 도말하여 길항 미생물들을 분리하였다. 식물병원균인 *Rhizoctonia solani* AG-1, *Botrytis cinerea* KACC49574, *Fusarium oxysporum* KACC40053 (한국농용미생물보존센터)을 사용하여 항진균 테스트를 실시하였다.

선발균주의 생리 및 생화학적 동정

분리균주중 항균활성이 있는 균주를 선발하였으며, 선발균주의 생리 및 생화학적 성질은 API Kit (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France)를 사용하여 조사하였으며, 이들 성질을 토대로 균주의 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology [11]에 준하여 실시하였다.

선발균주의 16S rDNA 염기서열에 기초한 동정

항진균 활성을 토대로 하여 선발한 균주 중 활성이 가장 좋은 BCNU 315 균주의 정확한 동정을 위하여 16S rDNA 염기서열을 결정하였다. 염색체 DNA를 얻기 위하여 pre-culture한 균주를 Luria-Bertani (LB) 배지 3 ml에 접종하여 37°C shaking incubator에서 4~6시간 동안 배양하였다. 배양된 균주를 집균하여 1X TEN buffer (Tris-HCl, EDTA, NaCl)로 washing하였다. 100 µl 멸균수를 첨가하여 95°C 이상의 water bath에서 10분간 세포를 파괴하였다. 파괴된 세포를 2500×g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 염색체 DNA가 포함되어 있는 상등액을 얻었고, 이렇게 분리된 염색체 DNA를 주형으로 하여 Polymerase Chain Reaction (PCR: 95°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 2 min; 30 cycle) 반응을 수행하였으며, 이들 균주의 16S rDNA를 획득한 다음 16S rDNA의 염기서열을 결정하였다. 이때 PCR 반응에는 *E. coli* 16S rDNA의 upstream 9-27와 downstream 1,542-1,525 영역에 해당하는 염기서열을 이용하여 oligonucleotide을 작성하여 primer로서 사용하였다 (primer F: 5'-GAGTTTG ATCCTGGCTCA G-3', primer R: 5'-AGAAAGGAGGT GATCCAGCCAGCC-3'). 이들의 16S rDNA의 염기서열을 결정한 다음 GenBank

Database를 통하여 상동성을 비교하였다. 근연 속과 종들과 유전학적인 유연관계를 알아보기 위하여, ClustalX program을 이용하여 phylogenetic tree를 제작하였다.

최적 질소원 및 탄소원 조사

선발 균주의 최적 생육조건 검토를 위하여 최소배지 (KH₂PO₄ 1.0 g, K₂HPO₄ 2.0 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, NaCl 2.0 g, CaCl₂ 0.01 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g/l)를 기본배지로 각종 질소원과 탄소원을 첨가하여 조사하였다. 먼저 균주를 최소배지에 접종하여 적응시켜, 적응된 균주를 질소원 urea, casamino acid, beef extract, malt extract, peptone, tryptone, yeast extract가 각각 0.5%씩 첨가된 배지에 접종하여 배양하였다. 18~24시간 후에 spectrophotometer (UV-2100, Shimadzu, Japan)로 600 nm에서 탁도를 측정하여 균주에 알맞은 질소원을 선택하였다.

선발균주에 알맞은 질소원 0.5%를 고정으로 하여 탄소원 starch, sucrose, glucose, lactose, fructose, glycerol, mannitol을 각각 1.0%씩 첨가하여 균주를 접종한 뒤 최적 탄소원을 결정하였다.

최적 pH 및 온도 조사

선발 균주의 항진균 물질 대량 생산을 위하여 균주의 최적 pH 및 온도를 조사하였다. 기본배지에 최적 질소원(0.5% tryptone)과 탄소원(1.0% sucrose)을 첨가한 후, 산성부터 염기성까지 초기 pH를 조정된 후 배양하였다. 또한 온도의 영향을 알아보기 위해 적정 pH를 맞춘 다음 25°C, 30°C, 35°C, 40°C로 나누어 배양한 후 탁도를 측정하였다.

선발 균주의 생리 활성 물질의 추출 및 정제

균주를 최적배지에서 대량 (60 l)으로 30°C에서 5일간 진탕배양(180 rpm)하였으며, 배양액을 900×g, 15분간, 4°C에서 원심분리한 후 세포침전물은 버리고 상등액을 수거하였다. 배양 상등액에 ethylacetate 108 l를 첨가한 후 electronic stirrer (EURO-ST D, Germany)로 추출하였으며 용매를 evaporator (Ratavapor R-121, Buchi, Switzerland)로 감압 농축하여 얻은 물질은 충전제 silcagel 60 (70~230 mesh, Merck)을 사용한 column chromatography (∅3.5×25)를 사용하여 정제하였다. 이때 사용한 전개 용매는 hexane : ethyl acetate : dichloromethane (5:1:1)이었으며, fraction I, II, III로 나누어 물질을 받아내었다. 각각의 분획을 사용하여 연속적으로 column chromatography와 thin layer chromatography (Silica gel 60 F₂₅₄, Merck)를 이용하여 정제한 후 분석하였다.

선발균주의 생리활성물질의 구조동정

분리 정제된 물질의 단일성은 고성능 액체 크로마토그래

피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC, CBM-20A, Shimadzu, Japan)를 이용하여 확인하였다. Detector는 photodiode array (PDA) detector를 이용하여 205 nm, 254 nm 그리고 300 nm 파장대에서 확인하였다. 유속은 분당 1 ml로 하였으며, 전개용매는 40% acetonitrile를 사용하였고, C₁₈ column을 사용하여 분석하였다.

정확한 구조를 결정하기 위하여 핵자기 공명 분석 장치(Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)를 이용하여 ¹H NMR spectra를 얻었다. 핵자기 공명 분석을 위한 용매로는 CDCl₃를 이용하였다. 분리 정제한 균주의 대사산물의 대략적인 탄소의 수와 탄소의 종류를 관찰하기 위하여 carbon NMR spectrum을 조사하였으며 DEPT NMR spectrum을 관찰하여 CH, CH₂, CH₃의 수를 확인하였다. 또한 분리 정제한 물질의 구조 중 수소 원자가 어떤 탄소에 결합하고 있는지 알아보기 위하여 COSY NMR spectrum을 조사하였다.

결 과

균주의 항진균 활성능

분리 시 항진균 활성능이 뛰어난 균주를 중심으로 선별하였다. 항진균 활성 테스트는 18~24시간 동안 액체 배지에서 배양한 균주의 탁도를 0.7~0.8로 맞추고, Potato Dextrose Agar (PDA) 배지에 대치 배양하였다. 대상으로 한 식물병원균주 *Rhizoctonia solani* AG2-1, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*을 대치시켜 놓고 25°C에서 환이 생길 때까지 관찰하였다. BCNU 315균주는 식물병원균주에 대한 항진균 활성이 뛰어났으며 접종 균사체로부터 약 5 mm의 환을 보였다(Fig. 1).

분리 균주의 생리 및 생화학적 동정

선발된 균주의 생리 및 생화학적 성질은 Table 1에 정리하여 놓았다. 균주는 그람 음성이며, catalase 활성이 있으며, phenylacetate 자화능이 있고, alkaline phosphatase 활성도 양성

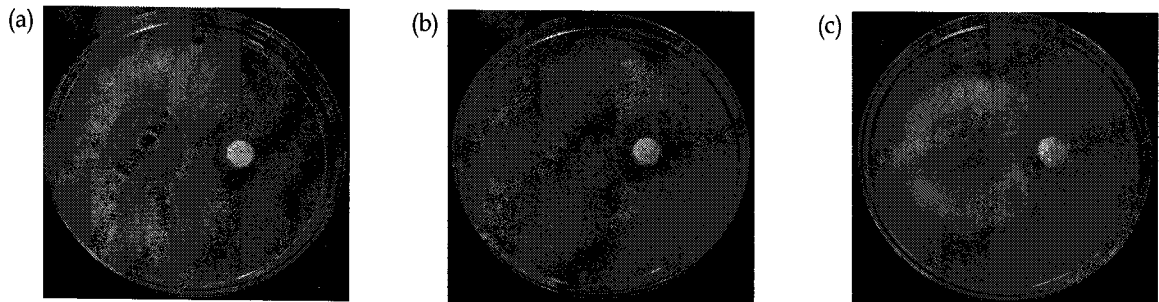


Fig. 1. Growth inhibition of phytopathogens by antagonistic bacterium BCNU 315. a. *Botrytis cinerea* KACC49574, b. *Rhizoctonia solani* AG-1, c. *Fusarium oxysporum* KACC40053

Table 1. Characteristics of *Pandoraea* sp. BCNU 315

Character	BCNU 315	<i>Pandoraea</i> species (n=32)	<i>Ralstonia pickettii</i> (n=23)	<i>R. paucula</i> (n=7)	<i>Burkholderia multivorans</i> (n=6)
Catalase activity	+	+	-	+	-
Hydrolysis of Tween 80	-	-	+	+	+
Lysine decarboxylase activity	-	-	-	-	-
Nitrite reduction	-	-	+	-	-
Denitrification	-	-	+	-	-
Gelatin liquefaction	-	-	-	-	-
Aesculin hydrolysis	-	-	-	-	-
β-Galactosidase activity	-	-	-	-	+
Assimilation of :					
Trehalose	-	-	-	-	+
L-Arginine	-	-	-	-	+
L-Arabinose	-	-	+	-	+
Phenylacetate	+	+	-	+	+
Alkaline phosphatase activity	+	+	-	+	+
N-Acetyl-β-glucosidase activity	-	-	-	-	-
β-Glucosidase activity	-	-	-	-	-

Data for *R. pickettii*, *R. paucula* and members of the *B. cepacia* complex were available from previous studies [20]

으로 나타나 기존에 발표된 논문[2]에서 보여주는 *Pandoraea* sp.의 생리·생화학적 성질과 유사한 특성을 가지고 있는 것을 알 수 있었다. 발표된 논문에 의하면 *Pandoraea norimbergensis*의 특징은 42°C에서 생육하지 않으며, King's B medium에서 형광을 띄지 않으며, 탈질 반응 음성이며, acetamide 또는 4.5% NaCl에서 생육하지 않는 점이다. 그리고 maltose, adipate 또는 sucrose 자화능 음성, cysteine arylamidase와 phosphoamidase 활성 음성이기이다[3]. 생리·생화학적 성질을 비교·분석 하였을 때 BCNU 315 균주는 *Pandoraea norimbergensis*와 매우 유사하므로 *Pandoraea* sp.으로 동정하였다.

선발균주의 16S rDNA 염기서열에 기초한 동정

분자유전학적으로 동정하기 위하여 분리 균주의 16S rDNA 염기서열을 NCBI BLAST를 통해 상동성을 조사하였고, ClustalX program을 이용하여 bootstrap consensus tree를 작성하였다. 그 결과, Fig. 2에 나타난 바와 같이, BCNU 315는 *Pandoraea norimbergensis*와 99% 상동성을 보였으며, 계통수에서도 같은 위치를 점하고 있음을 알 수 있었기에 *Pandoraea* sp. BCNU 315로 명명하였다.

최적 질소원과 탄소원

선발균주의 생육에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위하여 최소배지를 기본배지로 하여 각종 질소원을 0.5% 되도록 첨가하여 배양한 후 균체의 증식을 조사하였다(Table 2). 실험에 사용한 여러 가지 질소원 중에서 tryptone이 증식을

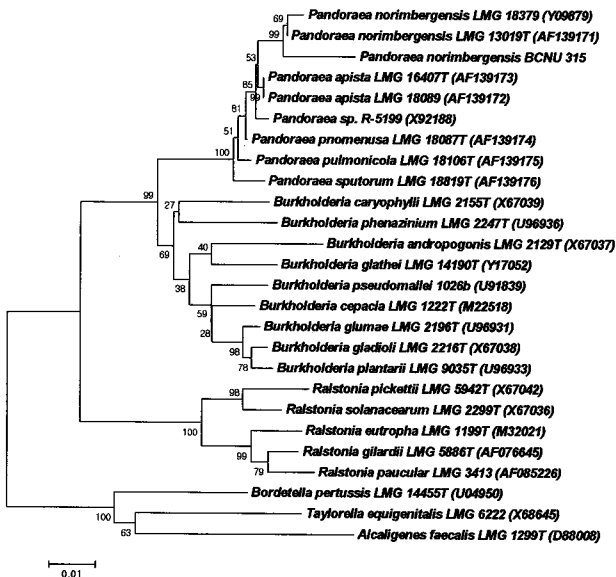


Fig. 2. Phylogenetic tree derived from 16S rDNA sequence data of *Pandoraea* sp. BCNU 315, members of *Pandoraea* sp., *Burkholderia* sp. other species belonging to the genus *Ralstonia* sp. and some related organisms. Bar, 0.01 Knu.

Table 2. Effect of nitrogen sources on microbial growth

Nitrogen sources (0.5%)	Growth ^a (O.D. at 600 nm)
Urea	0.032(±0.004)
Casamino acid	0.894(±0.258)
Tryptone	1.188(±0.164)
Malt extract	0.055(±0.008)
Peptone	0.565(±0.065)
Yeast extract	1.3(±0.604)
Beef extract	0.188(±0.002)

a. Values were the means of the three determinations in three parallel experiments (±standard deviations)

위한 최적 질소원이었으며, urea나 malt extract에서는 균체의 증식이 거의 일어나지 않았다.

균주의 증식에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 최소배지에 최적 질소원인 0.5% tryptone을 고정하여 여러 가지 탄소원을 1% 되도록 첨가하여 배양한 후 탁도를 측정하였다(Table 3). 실험에 사용한 각종 탄소원 중에서 sucrose가 생육을 위한 최적 탄소원이었으며, lactose는 다른 탄소원들에 비해 생육도가 다소 떨어지는 현상을 나타내었다.

최적 pH 및 온도

초기 pH를 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10으로 조정된 후 *Pandoraea* sp. BCNU 315를 접종 배양하여 생육도를 검토한 결과 *Pandoraea* sp. BCNU 315 균주는 Fig. 3과 같이 초기 pH 7, pH 8에서의 생육이 크게 다를게 없이 좋았던 반면 초기 pH 3, 4, 5, 6, 9, 10에서는 생육도가 떨어졌다.

25°C, 30°C, 35°C, 40°C로 온도를 설정하여 온도에 따른 *Pandoraea* sp. BCNU 315 균주의 생육도를 검토한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 30°C에서 배양한 균주가 가장 왕성히 증식함을 알 수 있었다.

선발균주의 생리활성물질의 구조동정

Pandoraea sp. BCNU 315 균주를 최적 배지(pH 7.0)에 접종하여 30°C에서 10일 동안 대량 배양(60 l)하였다. 배양 후 얻은 상층액을 108 l ethylacetate로 추출하여, 얻은 시료를

Table 3. Effect of carbon sources on microbial growth

Carbon sources (1.0%)	Growth ^a (O.D. at 600 nm)
Starch	2.087(±0.241)
Sucrose	2.535(±0.098)
Glucose	2.365(±0.262)
Lactose	1.471(±0.370)
Fructose	2.359(±0.051)
Glycerol	1.798(±0.095)
Mannitol	1.786(±0.109)

a. Values were the means of the three determinations in three parallel experiments (±standard deviations)

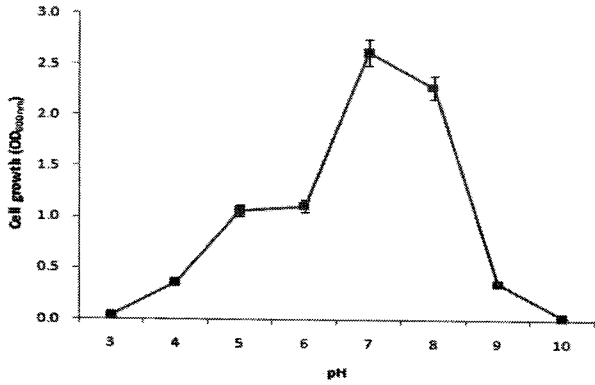


Fig. 3. Effect of initial pH on cell growth of *Pandoraea* sp. BCNU 315.

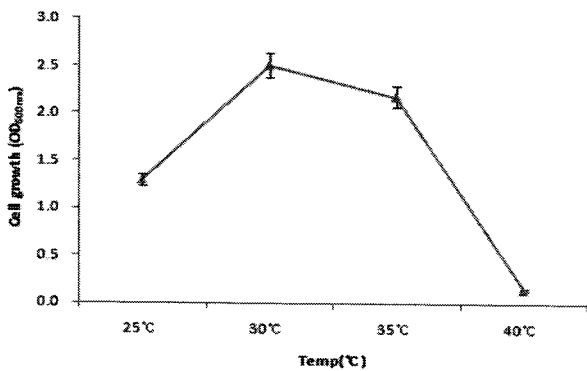


Fig. 4. Effect of temperature on cell growth of *Pandoraea* sp. BCNU 315.

hexane에 용해시킨 후 hexane으로 충전된 UV silica column chromatography (∅3.5×25)에 흡착시켰다. 그리고 hexane : ethylacetate : dichloromethane (5:1:1)을 전개용매로 하여 60 ml/h의 속도로 용출하여 20 ml씩 분획하였다. 1~25번 분획물(Frac I)에서 78.4 mg을 얻었고(Fig. 5), 나머지 26~50번 분획물(Frac II)에서 68.4 mg을 얻었다(Fig. 5). 이를 Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC)를 이용하여 다시 분리하였다. 그 결과 Frac I에서 CW I을 얻을 수 있었고, Frac II에서 CW II를 얻을 수 있었다(Fig. 6). 이후 정제된 화합물에 대하여 HPLC, GC/MS, NMR로 구조를 분석하였다.

Pandoraea sp. BCNU 315 균주가 생산하는 대사물질을 정제한 것을 감압건조기로 농축한 다음 소량의 methanol에 녹여 20 µl를 HPLC를 이용하여 254 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 분석한 결과 CW I와 CW II는 단일 peak가 확인되어 순수물질임이 추정되었다(Fig. 7).

분리한 CW I은 녹는점이 52-53°C (lit. 51-54°C)이고 질량 스펙트럼(Mass spectroscopy)에서 분자이온(M⁺)이 117로 주어졌다. 그리고 적외선 스펙트럼으로 3,120 cm⁻¹ 부근에서 이차아민(-NH-) 피크가 나타났다. ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD)

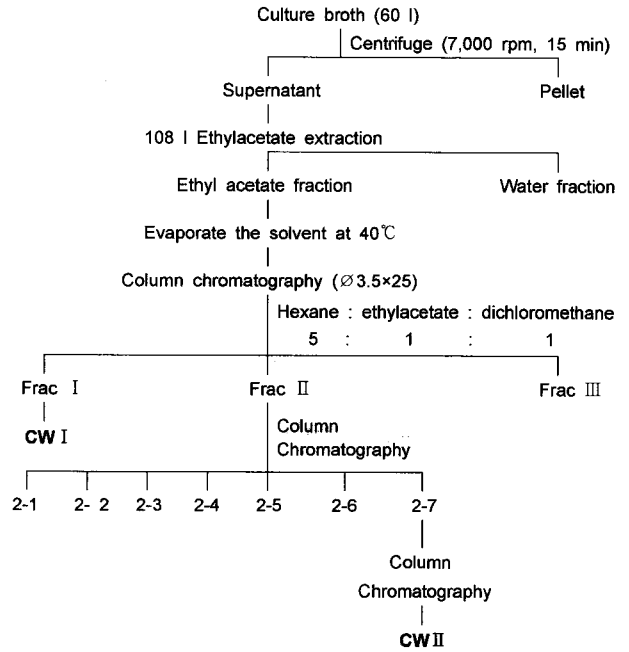


Fig. 5. Isolation and purification strategy of the active substances produced by *Pandoraea norimbergensis* BCNU 315.

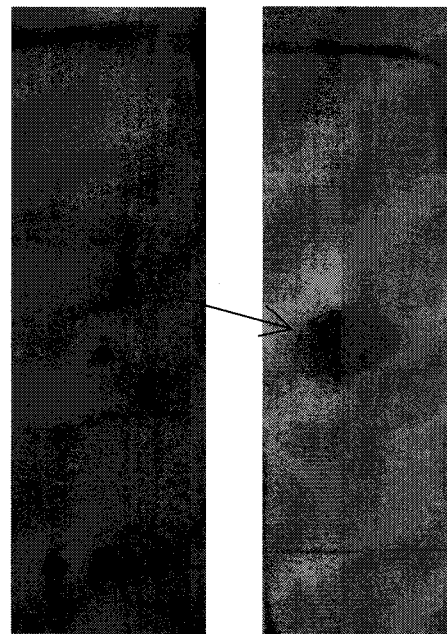


Fig. 6. Thin layer chromatography of CW II generated by purification procedure. a. Ethylacetate extract, b. CW II

스펙트럼으로 짝지음 상수 값(J) 8.8 Hz인 7.43 ppm 부근에서 4번 위치의 proton이 5번 proton과의 작용으로 스핀-스핀 갈라짐으로 이중선으로, 7번 proton은 6번의 proton에 의해 7.25 ppm에서 이중선으로, 5번 위치의 proton은 6.97 ppm에서 4번, 6번의 proton에 의해 겹쳐진 삼중선이 나타났고, 6번

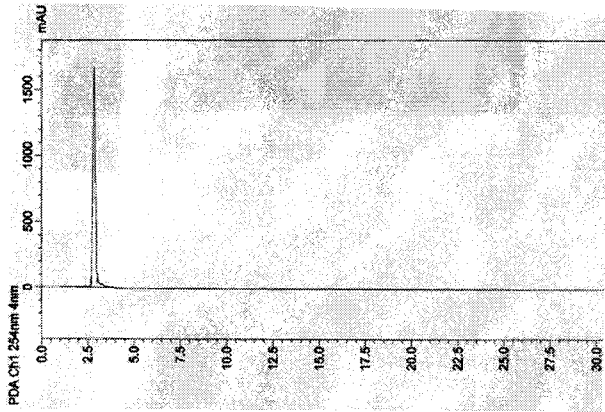


Fig. 7. HPLC profile of the CW II.

위치의 proton은 6.88 ppm에서 5번과 7번의 proton에 의해 삼중선으로 나타났다. 그리고 2번과 3번 위치의 proton은 각각 7.09 ppm, 6.31 ppm에서 짝지음 상수 값(J)이 각각 3.14, 3.21 Hz로 나타남으로 고리로 이루어진 cis-type의 결합으로 이루어져 있다. 또한 이차아민의 proton은 ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 주어진 각 위치의 탄소는 137.7, 129.4, 125.4, 122.1, 121.1, 119.9, 112.1, 102.2 ppm에서 주어졌다(unpublished data). 이러한 결과로 이 성분은 1H-indole임을 확인할 수 있었다. 이 성분은 보고된 문헌의 자료와 일치함이 확인되었다[7].

CW II 화합물의 ^1H -NMR spectrum 분석 결과는 Fig. 8과 같으며, ^{13}C -NMR spectrum 분석 결과는 Fig. 9와 같았다. 더 정확한 구조를 알기위해 DEPT 분석을 하였고 그 결과는

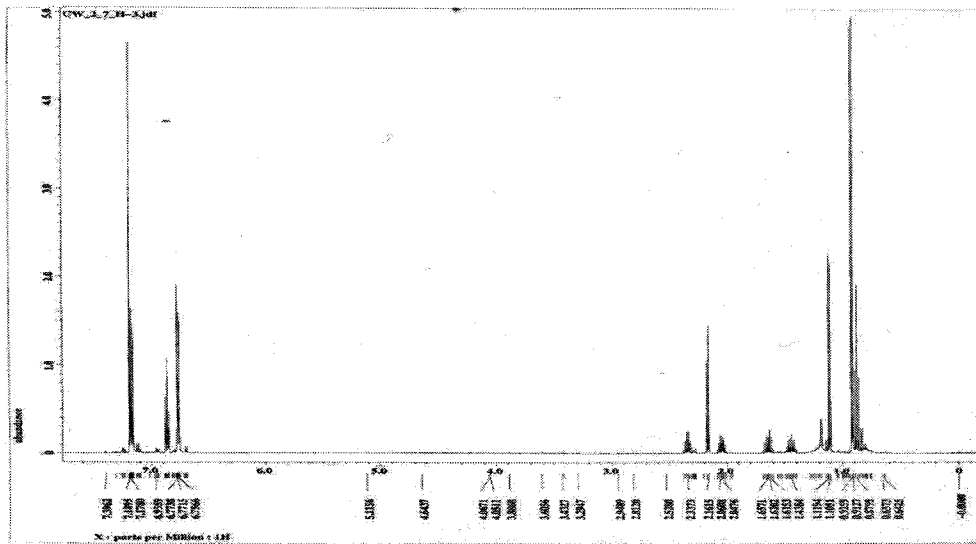


Fig. 8. ^1H -NMR spectrum of CW II.

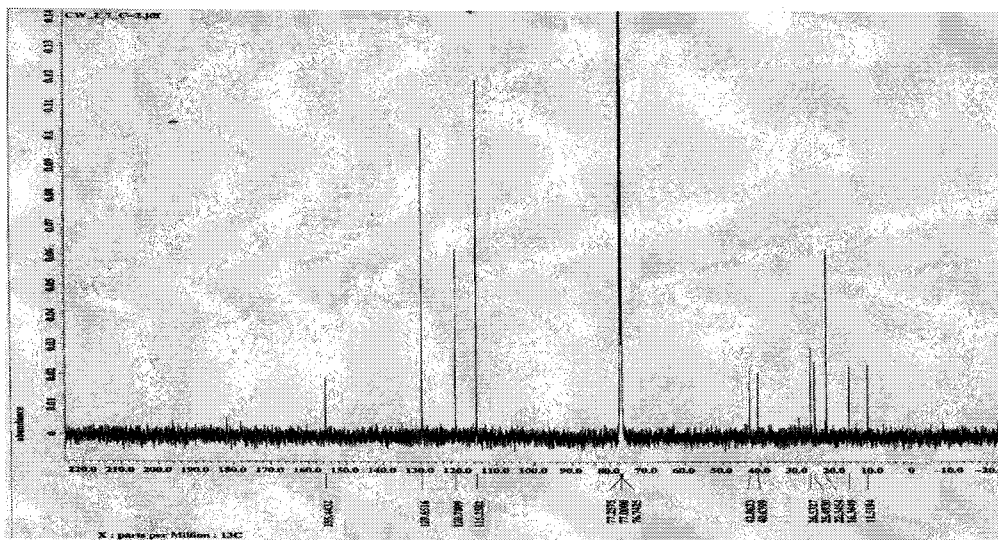


Fig. 9. ^{13}C -NMR spectrum of CW II.

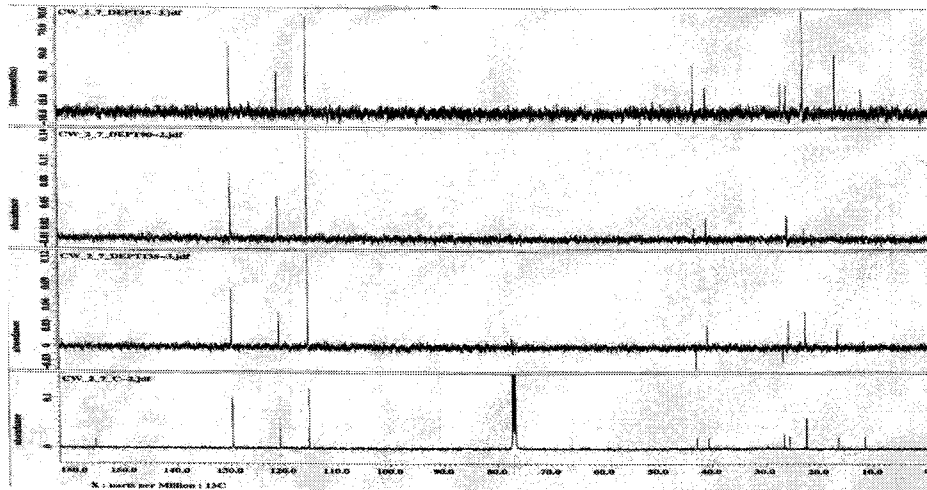


Fig. 10. DEPT NMR spectrum of CW II.

Fig. 10에 나타내었다. 분리 정제한 물질의 구조 중 수소 원자가 어떤 탄소에 결합하고 있는지 알아보기 위하여 COSY NMR spectrum을 조사하였으며 그 결과는 Fig. 11과 Fig. 12에 나타내었다. 분리된 CW II는 액체의 성분이고 1H-NMR 스펙트럼에서 6.76-7.19 ppm에 proton이 15개의 수소가 나타났고, 0.86-2.34 ppm에 saturated alkane계열의 수소들이 주어졌다. ¹³C-NMR 스펙트럼으로 110-160 ppm 사이에 주어졌던 탄소의 수를 확인한 결과, 155 ppm에서 amide carbonyl 탄소가 주어지고 나머지는 130, 121, 115 ppm에서 주어졌다 (Fig. 9). 그리고 saturated alkane계열의 탄소들은 42.9, 40.6, 26.5, 25.5, 22.3, 16.3, 11.5 ppm에서 나타났다(Fig. 9). 이들에 해당하는 탄소의 차수를 확인하기 위하여 DEPT (45, 90, 135) 스펙트럼을 분석한 결과 130, 121, 115 ppm의 탄소

들은 3차 탄소로 주어졌고, 155.4 ppm의 탄소는 4차탄소임을 확인하였다(Fig. 10). Saturated alkane계열의 탄소의 차수는 각각 42.9(2차), 40.6(3차), 26.5(2차), 25.5(3차), 22.3(1차), 16.3(1차), 11.5(1차) ppm에서 나타났다(Fig. 10). HMQC 스펙트럼으로 수소와 탄소의 배열을 확인하였고, HMBC 스펙트럼으로 먼 거리의 coupling관계를 확인한 결과 두 개의 입체배열을 가지는 즉 (1E,3Z,5E,7Z,9E,11Z,13E)-cyclopentadeca-1,3,5,7,9,11,13-heptene 계열의 화합물로 추정되었다(Fig. 13).

고찰

항진균제의 개발은 천연물과 화학 합성물로 부터 이루어지고 있으며 식품첨가제, 농약 및 의약품으로서 이용가능하

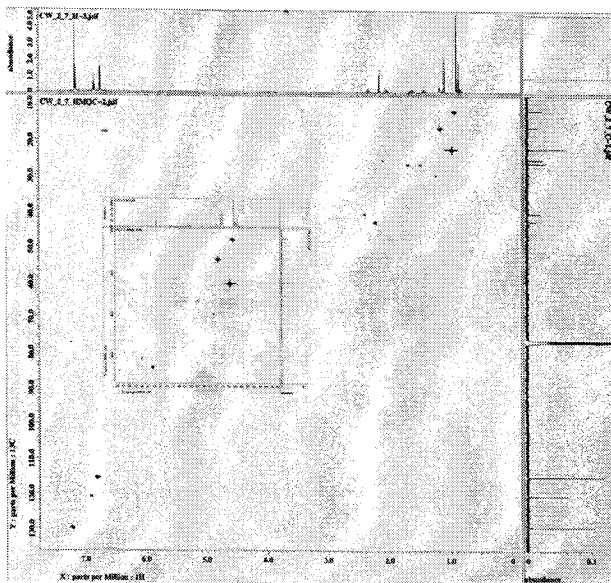


Fig. 11. HMQC NMR spectrum of CW II.

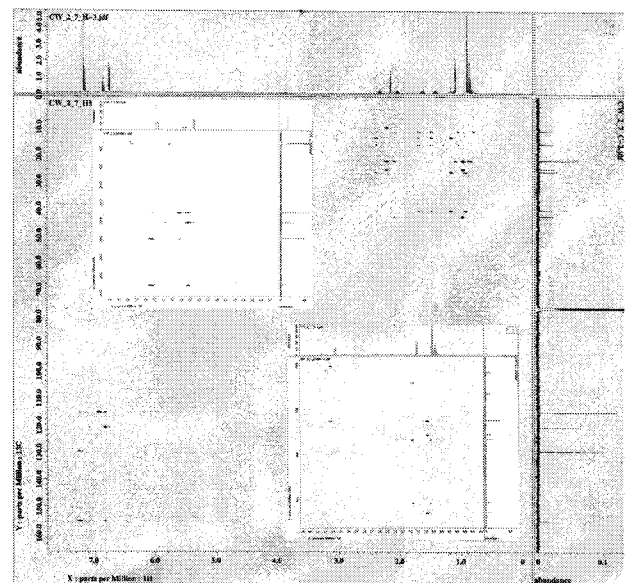


Fig. 12. HMBC NMR spectrum of CW II.

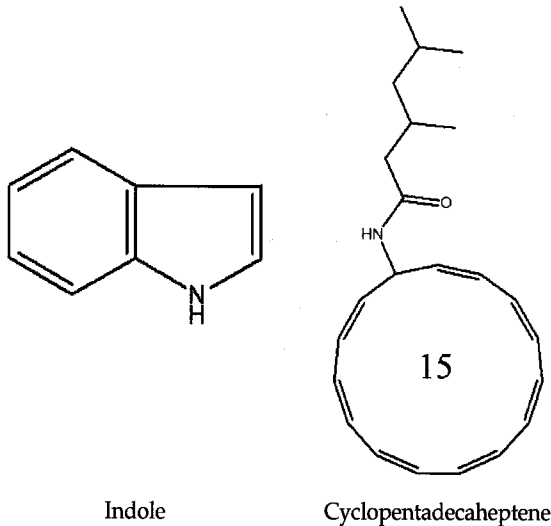


Fig. 13. The predicted structures of compound CW I and CW II.

기 때문에 주목을 받고 있다. 일부 진균류는 식물 및 동물, 나아가 인체에 질병을 유발하기도 한다. 그리하여 곡물의 저장, 식품의 보존, 식물 병원균의 방제 및 진균 감염병의 치료를 위하여 항진균 물질이 필요하고 많은 물질들이 이러한 목적으로 사용되고 있다. 본 실험에서는 항진균 활성을 나타내는 신규 미생물을 분리하고자 하는 목적으로 다양한 환경에서 미생물을 탐색하였다. 그 일환으로 안산공단에서 항진균 활성이 매우 높은 균주를 탐색할 수 있었다. 안산공단 하천가에 있는 토양과 침전물을 채취하여 연속희석과 도말법으로 여러 가지 선별배지에서 길항 미생물들을 분리하였다. 그 중 식물병원균 *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*의 세 가지 진균을 이용하여 항진균 테스트를 시행한 결과 clear zone을 가장 크게 형성하는 BCNU 315 균주를 선별하였다.

선별 균주의 동정을 위하여 균주의 생화학적 특징을 조사하였고, 16S rDNA 염기서열을 토대로 계통수를 작성하였다. 생리·생화학적 성질에 기초한 동정 결과에서 BCNU 315 균주는 *Pandoraea norimbergensis*와 생리·생화학적 특징과 유사하였다. 보다 정확한 동정을 위하여 *Pandoraea* sp. BCNU 315의 16S rDNA 염기서열을 ClustalX program을 이용하여 유사한 *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Pandoraea* 속의 종과의 상동성과 계통학적 유연관계를 조사한 결과 *Pandoraea norimbergensis*와 99% 상동성을 보였고 계통학적으로도 가장 근연관계임을 알 수 있었다.

Pandoraea 균주는 처음 2000년 Coenye 등[3]에 의해 보고된 신속으로 병원성이 있는 균주로 처음 보고되었으나, 식품에서도 Moore 등[14]에 의하여 보고되고 있다. 이후 *Pandoraea* 균주에서 유용효소에 대한 보고가 있으며[5,13], 특히 환경오염물질인 γ -hexachlorocyclohexane을 분해하는 보고도 있어[16] 병원미생물학 분야에서만 아니라 환경미생물

학 분야에서도 활용성이 높은 균주로서 기대되고 있다.

Pandoraea sp. BCNU 315 균주의 생리활성물질 중의 하나가 indole 이었고 또 다른 한 물질은 amide가 결합한 cyclopentadecaheptene의 부분입체 이성질체로 예상할 수 있었다. 이 화합물들은 항진균 활성은 없는 것으로 밝혀져, 항진균 활성을 가지고 있는 물질의 정제도 추후 남겨진 과제이다. 현재 실험에 사용된 균주가 생산하는 물질 중 정제되지 않은 나머지 물질이 항진균 활성의 실체로서 추정되며 분리정제를 통하여 보다 명확하게 이들의 구조와 기능이 밝혀질 것으로 사료되어 진다. 특히 *Pandoraea* sp.에서 항진균 활성 물질의 보고는 전혀 되어 있지 않으므로 학문적으로나 실용적으로 매우 의미가 있는 성과가 기대되어진다.

요 약

안산지역의 하천 침전 토양에서 식물병원성진균에 대한 길항능력이 좋은 세균을 분리하였다. 이들 중 한 균주가 *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*와 *Fusarium oxysporum*의 성장을 저해하는 활성을 보였다. 이 균주는 표현 형질과 분자계통학적인 특징에 의거하여 *Pandoraea* sp.로 동정되었다. 그리고 생육 최적 조건을 검토한 결과 tryptone과 sucrose가 각각 최적 질소원과 탄소원임을 확인할 수 있었으며, 최적 pH와 온도는 각각 pH 7.0 와 30°C임이 확인되었다. *Pandoraea* sp. BCNU 315가 생성하는 물질들은 column chromatography로 정제하였고 고속액체크로마토그래피(HPLC), GC-MS 그리고 핵자기공명(NMR) 장치로 구조를 분석하였다. 그 결과 한 화합물은 indole이었으며 또 다른 화합물은 cyclopentadecaheptene임이 추정되었다. 한편 *Pandoraea* sp. BCNU 315가 생성하는 6개의 화합물 중 나머지 4개 화합물의 자세한 구조 해석은 추후 연구를 통하여 밝혀져야 할 것이다.

감사의 글

이 연구는 한국학술진흥재단 연구비(KRF2003-005-I00061)에 의하여 연구되었으므로 이에 감사드립니다.

References

1. Arima, K., H. Imanaka, M. Kousaka, A. Kousaka, A. Fukuta and G. Tamura. 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.* **28**, 575-576.
2. Brian, P. W., J. M. Wright, J. Stubbs and A. M. Way. 1951. Uptake of antibiotic metabolites of soil microorganisms by plant. *Nature* **167**, 347-349.
3. Coenye, T., E. Falsen, B. Hoste, M. Ohlen, J. Goris, J. R. W. Govan, M. Gillis and P. Vandamme. 2000. Description

- of *Pandoraea* gen. nov. with *Pandoraea apista* sp. nov., *Pandoraea pulmonicola* sp. nov., *Pandoraea pnomenus* sp. nov., *Pandoraea sputorum* sp. nov. and *Pandoraea norimbergensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **50**, 887-899.
4. Gomez-Gil, L., P. Kumar and D. Barriault. 2007. Characterization of biphenyl dioxygenase of *Pandoraea pnomenus* B-356 as a potent polychlorinated biphenyl-degrading enzyme. *J. Bacteriol.* **189**, 5705-5715.
 5. Gregory, K. F., O. N. Allen, A. J. Riker and W. H. Peterson. 1952. Antibiotics as agents for the control of certain damping-off fungi. *Am. J. Botany* **9**, 405-415.
 6. Hector, R. F. and D. Pappagianis. 1983. Inhibition of chitin synthesis in the cell wall of *Coccidioides immitis* by polyoxin D. *J. Bacteriol.* **154**, 488-498.
 7. Kasahara, A., T. Izumi, T. Kikuchi and L. Xiao-Ping. 1987. 5-Nitroindole. *J. Heterocycl. Chem.* **24**, 1555 - 1556.
 8. Kim, Y. S. and S. D. Kim. 1994. Antifungal mechanism and properties of antibiotic substances produced by *Bacillus subtilis* YB-70 as a biocontrol agent. *J. Microbiol. Biotech.* **4**, 296-304.
 9. Lee, E. T. and S. D. Kim. 1999. Isolation and antifungal activity of the chitinase producing bacterium *Serratia* sp. 3059 as antagonistic bacterium against *Fusarium* sp. *Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 181-187.
 10. Lee, E. T. and S. D. Kim. 1999. Purification and characterization of antifungal chitinase from indigenous antagonistic microorganism *Serratia* sp. 3059. *Agri. Chem. Biotechnol.* **42**, 7-11.
 11. Loeffler, W., J. S. M. Tschen, N. Vanittanakom, M. Kugler, E. Knorpp, T. F. Hsieh and T. G. Wu. 1986. Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3: a comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *J. Phytopathol.* **115**, 204-213.
 12. Levitan, A. 1967. *In vitro* antibacterial activity of kasugamycin. *Appl. Microbiol.* **15**, 750-753.
 13. Matsui, T., T. Yoshida, T. Yoshimura and T. Nagasawa. 2006. Regioselective carboxylation of 1,3-dihydroxybenzene by 2,6-dihydroxybenzoate decarboxylase of *Pandoraea* sp. 12B-2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 95-102.
 14. Moore, J. E., T. Coenye, P. Vandamme and J. Stuart Elborn. 2001. First report of *Pandoraea norimbergensis* isolated from food - potential clinical significance. *Food Microbiol.* **18**, 113-114.
 15. Nomoto, S. and A. Shimoyama. 2001. First synthesis of blastidic acid, a component amino acid in an antibiotic, blastidicin S. *Tetrahedron. Lett.* **42**, 1753-1755.
 16. Okeke, B. C., T. Siddique, M. C. Arbestain and W. T. Frankenberger. 2002. Biodegradation of γ -hexachlorocyclohexane (lindane) and α -hexachlorocyclohexane in water and a soil slurry by a *Pandoraea* Species. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2548 -2555.
 17. Paulitz, T. C. and J. E. Loper. 1991. Lack of a role for fluorescent siderophore production in the biological control of Phythium damping-off of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathol.* **81**, 930-935.
 18. Schlumbaum, A., F. Mauch, U. Vogeli and T. Boker. 1986. Plant chitinase are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* **324**, 365-367.
 19. Takeuchi, S., K. Hirayama, K. Ueda, H. Sasaki and H. Yonehara. 1958. Blastidicin S, a new antibiotic. *J. Antibiot.* **11**, 1-5.
 20. Vandamme, P., J. Goris, T. Coenye, B. Hoste, D. Janssens, K. Kersters, P. DeVos and E. Falsen. 1999. Assignment of centers for disease control group IVc-2 to the genus *Ralstonia* as *Ralstonia paucula* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 663-669.