Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 38, No. 3, 255–262 (2010)

항생물질을 생산하는 *Pseudomonas* sp. BCNU 2001 균주의 특성

양욱희 · 최혜정 · 안철수[1] · 정영기[2] · 김동완[3] · 주우홍*
창원대학교 생명공학협동과정 및 생물학과, [1]조아제약(주), [2]동아대학교 생명공학과, [3]창원대학교 미생물학과

Characterization of an Antimicrobial Substance-producing *Pseudomonas* sp. BCNU 2001. Yang, Uk Hee, Hye Jung Choi, Cheol Soo Ahn[1], Yong Kee Jeong[2], Dong Wan Kim[3], and Woo Hong Joo*. *Interdisciplinary Program in Biotechnology & Department of Biology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea, [1]Cho-A Pharm. Co. LTD., Haman-kun 637-810, Korea, [2]Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, [3]Department of Microbiology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea* – Strain BCNU 2001 was isolated from soil samples collected from Tea-baek Mountain area. The biochemical characteristics and 16S ribosomal RNA gene sequences of the isolate revealed that the strain belonged to the *Pseudomonas aeruginosa*. The supernatants had an antimicrobial effect on various kind of bacteria and fungi. Especially BCNU 2001 was able to greatly inhibit the growth of *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, and *Aspergillus niger*, and its inhibition zone was measured as 18.5 mm against *Micrococcus luteus*, 19.0mm against *Proteus mirabilis*, 17.0mm against *Proteus vulgaris*, and 13.5 mm against *Aspergillus niger*, respectively. Hexane and dichloromethane extracts of BCNU 2001 exhibited significant activity against bacteria, and dichloromethane and ethylacetate extracts showed significant activity against fungi. *Pseudomonas* strain BCNU 2001 was also determined to have antimicrobial peptide against various microorganisms including Gram positive bacteria, Gram negative bacteria and fungi. The obtained results may provide preliminary support for the usefulness of *Pseudomonas* strain BCNU 2001.

Key words: Tea-baek Mountain, antibacterial activity, antifungal activity, broad-spectrum antibiotics

서 론

우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 각종 항생제에 대한 다약제 내성균이 증가하는 추세이므로 세균 및 진균 감염증 치료에 많은 문제점이 대두되고 있다. 기존 항생제에 대한 내성의 증가로 인해 새로운 항생제의 개발이 절실히 요구되고 있으며, 새로운 항균물질이나 선도물질을 발굴하고자 하는 다양한 노력이 이루어지고 있다[20, 22]. 현재까지 상용화된 항생제는 대부분 미생물들로부터 분리된 물질을 토대로 개발 되었다[26]. 자연계에 존재하는 미생물은 생장과정에서 다른 미생물의 생장을 저해하거나 죽이는 2차대사 산물인 다양한 항생물질을 생산하므로[38], 이러한 2차대사산물을 기반으로 하여 유효성이 높은 항생물질과 천연약제들을 개발할 수 있었으며 이같은 성과로 인하여 20세기의 후반 인류의 건강과 복지는 급격하게 향상되었다[15]. 특히 다양한 미생물들에서 항생제와 같은 2차 대사산물을 발견함으로 제약 산업이 크게 발전하여, 약 50년 전 sulfonamide, penicillin, streptomycin의 발견과 개발 같은 상당한 성취가 이루어지면서 항생제의 황금기가 시작되었고, 이러한 성공으로 tetracycline, macrolider계, gylcopeptide계, cephalosporin계 그리고 nalidixic acid와 같은 항생물질들이 연이어 연구 · 개발되었다[6, 13, 36]. 현재까지 미생물로부터 분리된 항생물질로는 *Penicillium*속과 *Aspergillus*속에서 생산된 penicillin, *Acremonium*속, *Amycolatopsis lucamdurans*, *Streptomyces clavuligerus*, *Emericellopsis*속에서 생산된 cephalosporins, *Streptomyces cattleya*에서 생산된 thienamycin, *Saccharopolyspora erythraea*에서 생산된 erythromycin, *Fusidium griseumn*에서 생산된 fusidic acid, 그리고 *Streptomyces orientalis, Streptomyces fradiae, Streptomyces pristinaespiralis, Streptomyces roseosporus*에서 각각 vancomycin, fosfomycin, streptogramins, daptomycin이 생산되어 치료제로 사용되고 있다[2, 7, 10, 11, 16, 21, 28, 32]. 약 20년 전에 이미 50가지 이상의 항균성 약품들이 개발되어 상용화되었지만 현재 이런 성공적인 역사에도 불구하고 이미 알려진 항생제의 재발견이 99.9%의 비율로 나타날 만큼 토양으로부터 새로운 천연생산물의 탐색과 새로운 화합물의 발견은 20년 전에 비해 위축된 실정이다[5, 9, 21, 34, 39]. 무엇보다 최근 10년간 무분별한 항생제의 사용으로 인해 항생제 내성 균주들이 급속하게 발견되고 있고[3, 23], 또한 새로운 항생물질의 탐색이 주로 방선균을 대상으로 진행

*Corresponding author
Tel: 82-55-213-3453, Fax: 82-55-213-3459
E-mail: whjoo@changwon.ac.kr

되고 있어 방선균에 비해 곰팡이나 세균을 대상으로 한 연구가 매우 저조한 실정이다. 따라서 방선균뿐만 아니라 다양한 토양세균으로부터 새로운 항생물질의 개발이 시급하게 요구되는 실정이다.

본 연구팀은 새로운 항균물질을 개발하고자 하는 연구의 일환으로 다양한 미생물을 탐색하고 있으며 이들 연구를 기초로 하여 독성이 없으며 또한 항균 스펙트럼이 넓은 새로운 항생물질을 개발하고자 한다. 먼저 항균물질을 생산하는 균주를 탐색하기 위하여 태백산 일대의 토양을 수집하여 수집한 토양 시료에서 1차적으로 170여 균주를 분리하였다. 이들 균주를 사용하여 각각 그람양성 세균, 그람음성 세균, 효모 및 곰팡이에 대해 항균활성 검사를 시행하여 항균스펙트럼이 비교적 넓으며 항균활성이 큰 균주 1종을 선별하여 BCNU 2001이라 명명하였다. 본 논문에서는 이 분리균주의 hexane(HX) 분획물, dichloromethane(DCM) 분획물, ethlyacetate(EA) 분획물과 peptide 분획물을 이용하여 그람양성 세균, 그람음성 세균 및 진균에 대한 최소 저해농도(Minimum Inhibitory Concentration: MIC)를 조사하여 분리균주의 미생물학적 특성과 함께 보고하는 바이다.

재료 및 방법

항생물질을 생산하는 균주의 분리

항균활성물질을 생산하는 균주를 분리하기 위하여 태백산 일대에서 토양을 채취하였으며, 토양시료 1 g을 10 mL의 멸균수에 현탁 후, 현탁액 1 mL를 Luria-Bertani medium (LB, 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) 평판배지, Nutrient broth(NA, 0.1% beef extract, 0.2% yeast extract, 0.5% peptone, 0.5% NaCl) 평판배지 등 분리배지에 도말하였다. 이를 24시간에서 1주일 동안 25°C에서 배양하여 세균 및 곰팡이에 대하여 항균활성물질을 생산하는 균주를 분리하였다.

테스트 균주

분리균주 BCNU 2001의 항균활성을 측정하기 위하여 대표적인 그람양성 세균과 그람음성 세균 그리고 효모 및 곰팡이 균주들을 사용하였다. 이들은 그람양성 세균 *Bacillus subtilis* KCTC 10111(ATCC 465), *Micrococcus luteus* KACC 10488(ATCC 4698), *Staphylococcus aureus* IMSNU 11088(ATCC 6538) 3종, 그람음성 세균 *Escherichia coli* IMSNU 10080(ATCC 10798), *Proteus mirabilis* IMSNU 20367(ATCC 29906), *Proteus vulgaris* IMSNU 13025(ATCC 13315) 3종과 효모 *Candida albicans* KCTC 7270(ATCC 10231), *Filobasidium neoformans* KCTC 7902(IFO 0545), *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7968 등 3종 그리고 곰팡이 *Aspergillus niger* KACC 40280(ATCC 4695) 1종으로 총 10종이었으며, 각각 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC), 한국농업미생물자원센터(KACC) 및 서울대학교 미생물연구소(IMSNU)에서 분양받아 사용하였다.

분리균주의 생리 생화학적 특성조사

Bergey!s Manual of Determinative Bacteriology[31]의 방법에 준하여 분리균주인 BCNU 2001의 생리 생화학적 특성 및 온도, NaCl의 농도 및 pH에서의 생존력을 조사하였으며, 이때 사용된 배지로는 LB 배지를 사용하였고, 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. 또한 자화능 테스트는 최소 염배지(Minimal salt medium; MSM, 0.4% NH4Cl, 0.01% NaCl, 0.01% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.005% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.04% K_2HPO_4)를 사용하였으며 여기에 각각 14개의 다른 탄소원을 1% 첨가하여 48시간, 37°C에서 배양하여 생육여부로 자화능력을 조사하였다. 분리균주 BCNU 2001의 amylase, protease, gelatinase, urease 등의 효소 생산여부는 전분과 skim milk, 젤라틴 그리고 우레아가 첨가된 효소능 측정배지를 사용하여 조사하였다.

분리균주 16S 리보좀 DNA 조사

항생물질을 생산하는 분리균주 BCNU 2001의 정확한 동정을 위하여 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 DNA 중합효소 연쇄반응을 통하여 16S 리보좀 DNA를 증폭하여 염기서열을 분석하여 그 결과를 미국 국립보건원 생물공학정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)에 등록하였다. 그리고 이를 바탕으로 미국 국립보건원 생물공학정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI) 에 등록된 균주들의 16S 리보좀 유전자들과 비교하여 ClustalW를 사용하여 정렬하였으며, 1000 bootstrap neighbor-joining replications 법으로 계통수를 완성하였다[12, 29]. 그리고 상동성은 BLAST를 이용하여 결정하였다.

그람양성 세균, 그람음성 세균 및 진균에 대한 항균 활성 조사

본 실험의 항균활성은 paper diffusion(paper disc 직경 6 mm)[27] 방법을 이용하여 측정하였다. 테스트 균주의 탁도가 McFarland number 0.5가 되도록 배양하여 각 테스트 균주의 최적배지에 1 mL 도말한 후, BCNU 2001 균주의 배양액 10 μL를 테스트 균주가 도말된 평판배지에 분주하였다. 각 테스트 균주를 최적온도에서 24시간 배양 후 clear zone의 크기를 토대로 항균활성을 측정하였다. 곰팡이인 *A. niger* 의 경우는 25°C에서 2~3일간 배양하여 곰팡이가 충분히 배양될 수 있도록 한 후 세균과 같은 방법으로 항균활성을 측정하였다.

최소 저해농도(Minimum Inhibitory Concentration; MIC) 측정

한천배지 확산법을 이용하여 최소 저해농도를 측정 하였다[40]. 최적조건으로 배양된 균의 상등액을 원심분리 한 후 hexane, dichloromethane 그리고 ethylacetate로 차례로 추출하여 HX 분획물, DCM 분획물, EA 분획물을 얻었고, 각각의 분획물들을 농축하였다. 펩타이드 분획물의 경우 같은 조건으로 상등액을 취하여 6N의 HCl을 이용하여 상등액을 pH 2로 조정한 후, 4°C 이하의 온도에서 over night 하였다. 이후 원심분리(8000 rpm, 15분)하여 펠렛을 취하였다. 이렇게 모아진 각 용매에서의 분획물과 펩타이드 분획물을 그람양성 세균 3종, 그람음성 세균 3종, 진균류 4종의 테스트 균주의 각각 최적배지에 1 mL 도말하고 각각의 분획물들을 최고농도에서부터 2배수 희석시켜 paper disc(6 mm)에 10 μL 접종 후 테스트균주의 최적온도에서 24~72시간 배양하였다.

결과 및 고찰

항균활성균주의 분리

항균 활성 균주를 분리하기 위해 토양 샘플에서 토양 1 g을 멸균수에 현탁하고 이것을 NB, LB평판배지 등에 도말한 후 24~72시간 배양 후, 배양된 미생물을 1차적으로 분리하였고 이렇게 분리된 약 170여 개체의 미생물을 대상으로 다시 2차 분리를 하였다. 2차 분리에서는 테스트 균주인 그람양성 세균, 그람음성 세균, 효모와 곰팡이 각각 1종씩에 대해 항균활성을 나타내는 균주를 분리하였다. 이중 항균 스펙트럼이 넓으며 항균활성이 강한 균 1종을 최종 선별하여 이를 BCNU 2001이라 명명하였다.

분리균주의 생리생화학적 특성

분리균주 BCNU 2001은 형태학적으로 그람음성 세균, 간균임을 확인하였다. 또한 분리균주의 생리생화학적 특성 조사 결과 LB 배지에서 배양하였을 때 25°C에서 45°C까지 생육하였으며 NaCl 농도는 7%의 NaCl 농도까지 생장하였고 생육 pH범위는 pH 6에서 pH 9까지의 범위에서 생장하였다. 분리균주 BCNU 2001은 amylase, protease, gelatinase와 urease 효소를 생산하는 것으로 확인되었으며, MSM 배지에 14개의 탄소원을 각각 1% 첨가하여 25°C에서 이틀 간 배양한 결과 분리균주는 dextrose, maltose, mannose, trehalose, fructose 그리고 glycerol을 탄소원으로 사용하는 것을 확인할 수 있었다(Table 1).

분리균주의 동정

분리균주 BCNU의 정확한 동정을 위하여 16S 리보좀 DNA 염기서열을 분석한 결과 *Pseudomonas aeruginosa*와 97% 상동성이 있다고 확인되었다. 또한 16S 리보좀 DNA 염기서열과 NCBI에 등록된 균주들의 16S 리보좀 유전자 염

Table 1. Differential characteristics of strain BCNU 2001 in comparison with related *Pseudomonas aeruginosa.*

Growth characteristic	BCNU 2001	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145^T
Colony morphology		
Margin	Undulate	Lobate
Elevation	Flat	Flat
Surface	Smooth	Smooth
Pigment	brown	translucent
Gram!s reaction	-	-
Shape	Rods	Rods
Growth at temperature (°C)		
25	+	+
37	+	+
45	+	-
Growth at pH		
4	-	+
5	-	-
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	+	+
10	-	-
Growth on NaCl (%)		
2	+	-
5	+	+
6	+	-
7	+	-
8	-	-
Production of Amylase	+	-
Protease	+	+
Oxidase	+	+
Gelatinase	+	+
Catalase	-	+
Urease	+	+
Egg-yolk lecithinase	+	-
Nitrate reductase	+	-
H_2S production	-	-
Methyl red test	-	-
Growth on MacConkey agar	+	+
Utilization of Dextrose	+	+
Maltose	+	-
Mannose	-	-
Rhamnose	-	-
Lactose	-	-
Citrate	+	+
Mannitol	+	+
Raffinose	-	D
Sucrose	-	-
Trehalose	+	-
Xylose	-	-
Fructose	+	+

Table 1. Continued.

Growth characteristic	BCNU 2001	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145^{T}
Glycerol	+	+
Galactose	-	-
Starch	-	-
Reference	This study	This study, 19

+, enzyme or (metabolic) reaction present; -, enzyme or (metabolic) reaction not present; D, differs among species.

기서열들을 상호 비교하여 계통수를 작성하여 분리균주 BCNU 2001의 계통학적 위치를 확인한 결과 *P. aeruginosa* 의 subcluster에 속해있는 것을 확인할 수 있었다(Fig 1). 분리균주 BCNU 2001의 16S 리보좀 RNA 염기서열은 현재 생물공학정보센터(NCBI)에 등록되어있다.

그람양성 세균, 그람음성 세균 및 진균에 대한 항균활성

분리균주 BCNU 2001를 사용하여 그람양성 세균 3종, 그람음성 세균 3종과 진균 4종에 대하여 항균활성을 조사 하였으며 그 결과 그람양성 세균에 대한 항균활성은 생육억제대로 보면 *M. luteus*에서 18.5 mm로 측정되어 가장 항균활성이 컸으며, *S. aureus*에서 13 mm로 측정되었으며, *B. subtilis*에서 10 mm로 측정되었다. 테스트 균주에 따라 차이는 있었으나 3종의 그람양성 세균 모두에 대하여 항균력이 있음이 확인되었다. 그람음성 세균에 대한 결과는 *P. miravilis*에 대하여 생육억제대가 19.0 mm로 측정되어 가장 큰 항균활성을 나타내었으며 또한 *P. vulgaris*에서 17.0 mm로 측정되어 큰 항균활성을 나타내었다. *E. coli*에 대하여는 8.0 mm로 측정되어 다른 음성 세균에서보다 낮은 항균활성을 나타내었지만 역시 3가지 그람음성 세균에서 모두 항균활성을 나타내었다(Table 2). 모두 6개의 그람양성 및 그람음성 세균에 대한 항균활성 검사에서 분리균주 BCNU 2001은 정도의 차이는 있었으나 모두에 대하여 항균활성을 나타내는 것을 확인되었으며 특히 그람음성 세균에 대하여도 좋은 항균활성을 나타내었다. 3종의 효모균에 대한 분리균주의 항균활성검사 결과 생육억제대가 모두 6.4 mm로 상대적으로 다소 낮게 나타났다. Fig. 2에서 확인할 수 있는 바와

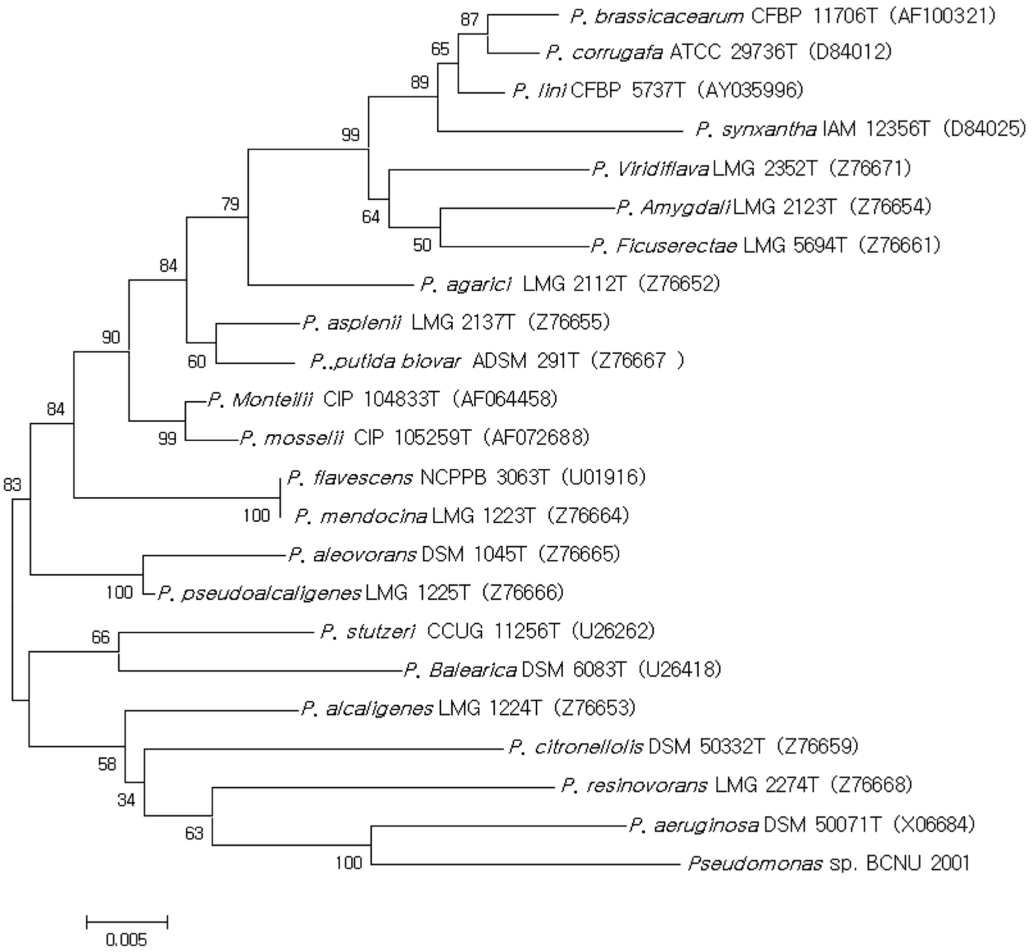

Fig. 1. A phylogenetic tree, showing the position of *Pseudomonas* sp. BCNU 2001 among the *Pseudomonas* species.

Table 2. Antimicrobial activity of *Pseudomonas* sp. BCNU 2001 against test bacteria.

Microorganisms	Zone of inhibition (mm)
B. subtilis	10.0±0.71
M. luteus	18.5±0.46
S. aureus	13.0±0.42
E. coli	8.0±0.36
P. mirabilis	19.0±0.31
P. vulgaris	17.0±0.45

Table 3. Antifungal activity of *Pseudomonas* sp. BCNU 2001 against test fungi.

Microorganisms	Zone of inhibition (mm)
A. niger	13.5±0.46
C. albicans	6.4±0.40
F. neoformans	6.4±0.71
Sa. cerevisiea	6.4±2.47

같이 3종의 효모균에 대하여는 분리균주 BCNU 2001의 clear zone이 명확하게 나타나지 않아 뚜렷하게 보이는 부분만 측정하여 결과로 기록하였다. 이 결과로써 분리균주 BCNU 2001은 3종의 효모균에 대하여 큰 수치는 아니지만 항균활성이 있다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 *A. niger*에 대한 항균활성 검사결과 13.5 mm의 생육억제대를 생성하였다(Table 3). 테스트를 실행한 4개의 진균은 모두 인체에 질환을 일으킬 수 있는 인체 병원성 진균이며, 또한 6개의 그람양성 세균과 음성 세균에 대해 항균활성을 모두 나타내므로 항균스펙트럼이 광범위한 것으로 판단된다.

최소 저해농도의 측정

분리균주가 테스트 균주에 대해 가장 항균활성이 좋은 조건을 확인하기 위해 NB, LB 그리고 Tryptic Soy Broth(TSB, 1.7% casein, 0.3% soybean meal, 0.25% dextrose, 5% NaCl, 0.25% K_2HPO_4) 배지를 두 개의 그룹으로 나누었고 한 그룹은 25°C에서 나머지 한 그룹은 37°C에서 배양하면서 24시간마다 한번 상등액을 취하는 방법으로 7일간 반복하였다. 그 결과 분리균주 BCNU 2001의 상등액이 테스트 균주에 대해 항균활성을 가장 크게 나타난 최적조건은 LB 배지에서 6일에서 7일간 37°C의 온도로 배양하는 것으로 확인되었다. 이에 따라 분리 균주를 최적배양조건으로 배양하여 상등액을 취하였으며 다시 유기용매로 분획하였다. 그리하여 분획물인 HX fraction, DCM fraction, EA fraction을 얻었다. 또한 펩타이드 분획물은 상등액에 6N의 HCl을 첨가하여 펠렛을 얻었으며 이들 분획물들을 최고농도의 2배수로 희석하여 최소저해농도 실험을 실시하였다.

그람양성 세균에 대한 실험 결과 항균활성검사결과와 유사하게 상대적으로 항균활성이 크게 측정되었던 테스트 균주에 대해서 최소저해농도 역시 낮게 측정되었다. *M. luteus*에 대해서 BCNU 2001의 헥산분획물은 15 μg/mL의 농도까지 저해하였으며 *B. subtilis*와 *S. aureus*에 대해서는 62 μg/mL 이상의 농도에서 테스트 균주를 저해한 것으로 확인되었다. 그람음성 세균 역시 헥산 분획물에서 항균활성검사결과와 유사한 결과를 확인할 수 있었다. 높은 항균활성을 보였던 *P. mirabilis*와 *P. vulgaris*에 대하여 각각 62 μg/mL , 31 μg/mL의 농도에서 테스트 균을 저해하였으며, 상대적으로 낮은 수치로 항균활성을 나타내었던 *E. coli*에 대하여 헥산 분획물의 농도가 238 μg/mL 이상이 되어야 테스트 균을 저해하였다. 펩타이드 침전물이나 디클로로메탄 분획물은 헥산 분획물 보다 고농도에서 테스트 균주를 저해하였으나 전체적인 결과는 균주의 배양액으로 항균활성으로 실험하였던 결과를 크게 벗어나지 않았으며 항균활성이 큰 수치로 나타났던 균주에 대하여 각 분획물과 침전물에서 낮은 농도에서도 테스트 균주를 저해한다는 것을 확인할 수 있었다(Table 4).

효모와 진균의 경우 세균에 비해 항균활성이 큰 수치로 나타나지 않았으며 최소 저해농도 실험에서도 같은 결과가 확인되었다(Table 5). 디클로로메탄 분획물과 에틸아세테이

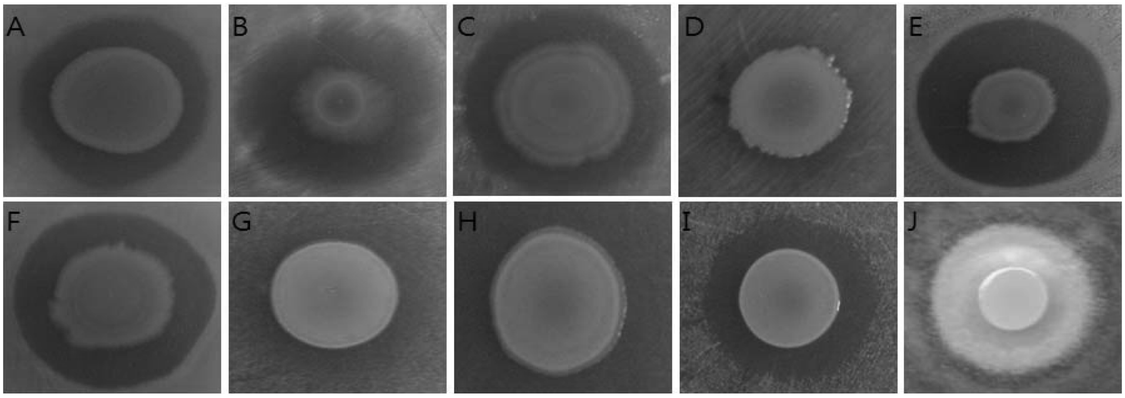

Fig. 2. Antimicrobial activity of *Pseudomonas* sp. BCNU 2001 against test bacteria. A, *B. subtilis*; B, *M. luteus*; C, *S. aureus*; D, *E. coli*; E, *P. milabilis*; F, *P. vulgaris*; G, *C. albicans*; H, *F. neoformans*; I, *Sa. cerevisiae*; J, *A. niger*.

Table 4. Minimum Inhibitory Concentration of *Pseudomonas* sp. BCNU 2001 solvent extracts against bacteria.

Microorganisms	Ampicillin (ng/mL)	Minimum Inhibitory Concentration(MIC) (μg/mL)			
		HX fraction	DCM fraction	EA fraction	peptide fraction
B. subtilis	1.5	62<	238	-	130
M. luteus	24.4	15	118.8	-	1000<
S. aureus	24.4	62<	59	-	260
E. coli	3125	62<	238<	-	1000<
P. mirabilis	48.9	62	59	-	130
P. vulgaris	48.9	31	59	-	130

Abbreviation: HX: hexane, DCM: dichloromethane, EA: ethylacetate.

Table 5. Minimum Inhibitory Concentration of *Pseudomonas* sp. BCNU 2001 solvent extracts against fungi.

Microorganisms	Itraconazole (ng/mL)	Minimum Inhibitory Concentration(MIC) (mg/mL)			
		HX fraction	DCM fraction	EA fraction	peptide fraction
A. niger	7	-	1<	1<	1<
C. albicans		-	1	1<	1
F. neoformans	1.75	-	1	1	1
Sa. cerevisiea	60	-	1	1	1

Abbreviation: HX: hexane, DCM: dichloromethane, EA: ethylacetate.

트 분획물, 그리고 펩타이드 분획물의 *C. albicans* 균에 대한 최소 저해농도는 각각 1 mg/mL, 1 mg/mL 이상, 그리고 1 mg/mL으로 균 배양액을 이용한 항균활성실험의 결과와 유사하게 상대적으로 높은 농도에서 테스트 균주를 저해한다는 것을 확인할 수 있었고, *F. neoformans*와 *Sa. cerevisiae* 역시 디클로로메탄 분획물, 에틸아세테이트 분획물과 펩타이드 분획물에서 1 mg/mL 농도에서 테스트 균주를 저해한다는 것을 확인할 수 있었다. 곰팡이인 *A. niger*에 대하여는 각종 분획물과 펩타이드 분획물에서 1 mg/mL 이상의 농도를 요구함을 확인할 수 있었다.

해양에서 분리한 미생물인 *Pseudomonas bromoutilis* 균주는 항생물질인 pyrrole을 생산하며 이 pyrrole은 *S. aureus*, *Diploccus pneumoniae*, 그리고 *Streptococcus pyogenes*와 같은 그람 양성균에 대해 0.0063 μg/mL의 농도에서 저해활성이 보였으나, 그람음성 세균과 *C. albicans* 같은 진균에 대해서는 항균활성이 없었다는 보고가 있었다[18]. 본 연구팀이 분리한 BCNU 2001 균주는 정도의 차이는 있었으나 그람양성 세균과 그람음성 세균 그리고 진균에 대해 모두 항균활성을 보여 비교적 넓은 항균스펙트럼을 가지고 있다고 사료된다. 또한 2009년 발표된 *Streptomyces* 속 균주의 항균활성에 관한 논문에는 분리된 *Streptomyces* 세균의 분획물의 최소 저해농도 실험 결과 진균에 대해서는 본 연구팀의 결과와 비슷한 결과를 도출하였으나 그람양성 세균인 *B. subtilis* 1종과 *S. aureus* 2종에 대한 최소 저해농도가 각각 0.25 mg/mL, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL으로 발표되었다[35]. 이러한 결과는 본 연구팀의 분리균주인 BCNU 2001의 그람양성 세균에 대한 최소 저해농도에 대한 결과보다 더 높은 농도에서 항균효과를 나타내는 것으로 BCNU 2001은 이 균주보다는 낮은 농도에서도 좋은 항균활성을 보이는 것으로 판단된다. *Pseudomonas* 계통의 균은 이미 19세기 말부터 다른 세균에 대해 억제능이 있다고 알려졌다. 하지만 *Pseudomonas fluorescens* 계통의 균이 생산하는 항생물질인 pseudomonic acid 만이 1986년 mupirocin으로 인간의 질병치료를 위해 판매되었다[14, 33]. 2005년까지 *Pseudomonas* 속은 795가지의 생리활성물질을 생산한다고 발표되었으며[4], 이 막대한 수의 생물활성 물질들 중 몇 가지는 식물병원성 세균과 진균에 대해 생물학적 방제제와 생물치료에 아주 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 현재까지 *P. fluorescens, P. aeruginosa, P. aureofaciens, P. pulida, P. pyrrocinia*와 같은 *Pseudomonas* 속의 미생물에서 항진균 활성이 있다는 것이 증명되었으며 이들 종에서 생산하는 항생물질에는 pyocyanin[37], 2-acetamidophenol[30], pyrrolnitrin[1], pyoluteorin[17], viscosinamide[24], tensin[25]이 보고되고 있다[8]. 그러나 현재 상용화된 항생물질은 *Pseudomonas fluorescens* 계통의 균주가 생산하는 pseudomonic acid 뿐이다. 그러므로 BCNU 2001 균주가 생산하는 항균물질에 대한 보다 자세한 연구가 요구되며, 이들 결과에 기초하여 신규성, 경제성과 유용성을 검토하여야 할 것으로 사료된다. 본 연구팀이 분리한 BCNU 2001 균주는 현재 대부분의 항생물질의 탐색이 주로 방선균에 집중되는 문제점과 다양한 천연 항생물질의 연구와 개발이 시급하다는 필요성에 부응할 수 있는 좋은 생물소재로써 지속적인 추후 분리·정제, 구조해석 및 대량생산을 통하여 산업화를 위한 기초 및 응용연구가 필요하다.

요 약

본 연구팀은 태백산 지역에서 토양 시료들을 채취하여 다양한 균주들을 분리 탐색하는 과정에서 BCNU 2001 균주를 분리하였다. 분리균주의 생화학적 특징과 16S 리보좀 RNA 유전자 염기서열 분석 결과, 분리균주가 *Pseudomonas aeruginosa*에 속함이 확인되었다. 분리균주 BCNU 2001의 상등액은 다양한 세균과 진균에 대해 항균활성이 있었으며 특히 분리균주 BCNU 2001는 *Micrococcus luteus, Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, 그리고 *Aspergillus niger*의 생육을 크게 저해할 수 있었으며, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, 그리고 *Aspergillus niger*에 대하여 각각 18.5 mm, 19.0 mm, 17.0 mm 그리고 13.5 mm 크기의 저해환을 나타내었다. 분리균주 BCNU 2001의 핵산 분획물과 디클로로메탄 분획물은 세균에 대해 높은 항균력을 보였으며 디클로로메탄 분획물과 에틸아세테이트 분획물은 진균에 대해 높은 항균력을 보였다. 또한 *Pseudomonas* sp. BCNU 2001 균주는 그람양성 세균, 그람음성 세균 그리고 진균을 포함한 다양한 미생물들에 대하여 항균력이 있는 항균 펩타이드를 가지고 있음이 확인되었다. 실험을 통하여 얻은 결과는 *Pseudomonas* sp. BCNU 2001 균주의 유용성에 대한 예비적인 기초를 제공한다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술진흥원의 지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구 결과임.

REFERENCES

1. Arima, K., H. Imanaka, M. Kousaka, A. Fukuda, and G. Tamura. 1964. Pyrrolnitrin a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agric. Bio. Chem*. **28**: 575-576.
2. Baltz, R. H. 1997. Lipopeptide antibiotics produced by *Streptomyces roseosporus* and *Streptomyces fradiae*. pp. 415-435. In W. R. Strohl. (eds.), *Biotechnology of Antibiotics*, Marcel Dekker, New York.
3. Bax, R. P., R. Anderson, J. Crew, P. Fletcher, T. Johnson, E. Kaplan, B. Knaus, K. Kristinsson, M. Malek, and L. Strandberg. 1998. Antibiotic resistance-what can we do? *Nature Med*. **4**: 545-546.
4. Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58: 1-26.
5. Bonfiglio, G., G. Russo, and G. Nicoletti. 2002. Recent developments in carbapenems. *Expert. Opin. Investig. Drugs*. **11**: 529-544.
6. Chopra, I., L. Hesee, and A. J. O!Neill. 2002. Exploiting current understanding of antibiotic action for the discovery of new drugs. *J. Appl. Microbiol*. **92**: 4S-15S.
7. Debono, M., B. J Abbott, R. M. Molloy, D. S. Fukuda, A. H. Hunt, V. M. Daupert, F. T. Counter, J. L. Ott, C. B. Carrell, and L. C. Howard. 1988. Enzymatic and chemical modifications of lipopeptide antibiotic A21978C: the synthesis and evaluation of daptomycin (LY146032). *J. Antibiot*. **41**: 1093-1105.
8. de Weger, L. A., R. van Boxtel, B. der Burg, R. A. Gruters, F. P. Geels, B. Schippers, and B. Lugtenberg. 1986. Siderophores and outer membrane proteins of antagonistic, plant-growth-stimulating, root-colonizing *Pseudomonas* spp. *J. Bacteriol*. **165**: 585-594.
9. Douthwaite, S. 2001. Structure-activity relationships of ketolides versus macrolides. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**: 11-17.
10. Dunstan, G. H., C. Avignone-Rossa, D. Langley, and M. E. Bushell. 2000. The Vancomycin biosynthetic pathway is induced in oxygen-limited *Amycolatopsis orientalis* (ATCC 19795) cultures that do not produce antibiotic. *Enzym. Microbial Technol.* **27**: 502-510.
11. El-Enshasy, H. A., N. A. Mohamed, M. A. Farid, and A. I. El-Diwany. 2008. Improvement of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* in molasses based medium through cultivation medium optimization. *Bioresour. Technol.* **99**: 4263-4268.
12. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. **39**: 783-791.
13. Finch, R. 2002. Bacterial resistance-the clinical challenge. *Clin. Microbiol. Infect*. **8**: 21-32.
14. Fritza, E., A. Fekete, J. Lintelmann, P. Schmitt-Kopplin, and R. U. Meckenstock. 2009. Isolation of two *Pseudomonas* strains producing pseudomonic acid A. *Syst. Appl. Microbiol*. **32**: 56-64.
15. Gillespie, D. E., S. F. Brady, A. D. Bettermann, N. P. Cianciotto, M. R. Liles, M. R. Rondon, J. Clardy, and R. M. Goodman. 2002. Isolation of Antibiotics Turbomycin A and B from a Metagenomic Library of Soil Microbial DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4301-4306.
16. Hendlin, D., E. O. Stapley, M. Jackson, H. Wallick, A. K. Miller, F. J. Wolf, T. W. Miller, L. Chaiet, F. M. Kahan, E. L. Foltz, H. B. Woodruff, J. M. Mata, S. Hernandez, and S. Mochales. 1969. Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*. *Science* **166**: 122-123.
17. Howell, C. R. and R. D. Stipanovic. 1980. Suppression of Pythium ultimum-induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathol*. **70**: 712-715.
18. Isnansetyo, A. and Y. Kamei. 2009. Bioactive substrances produced by marine isolates of *Pseudomonas*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. **36**: 1239-1248.
19. Kreig, N. R. 1984. Gram-negative *Aerobic rods* and *cocci*. pp. 141-198. In Kreig, N. R. and J. G. Holt. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore.
20. Kunin, C. M. 1993. Resistance to antimicrobial drugs-a worldwide calamity. *Ann. Intern. Med*. **118**: 557-561.
21. Lakaye, B., A. Dubus, S. Lepase, S. Groslambert, and J. M.

Frere. 1999. When drug inactivation renders the target irrelevant to antibiotic resistance: a case story with beta-lactams. *Mol. Microbiol.* **31**: 89-101.

22. Lim, T. H., J. M. Lee, T. H. Chang, and B. J. Cha. 2000. Antifungal activity and identification of an *actinomycetes* strain isolates from mummified peaches. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 161-166.23. Moise, P. and J. Schentag. 2000. Vancomycin treatment failures in *Staphylococcus aureus* lower respiratory tract infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **16**: S31-S34.
24. Nielsen, T. H., C. Christophersen, U. Anthoni, and J Sorensen. 1999. Viscosinamide a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 80-90.
25. Nielsen, T. H., C. Thrane, C. Christophersen, U. Anthoni, and J. Sorensen. 2000. Structure, production, characteristics and fungal antagonism of tensin -a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *J. Appl. Microbiol.* **89**: 992-1001.
26. Pelaez, F. 2006. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products-Can history repeat?. *Biochem. Pharmacol.* **71**: 981-990.
27. Perez, C., M. Pauli, and P. Bazerque. 1990. An antibiotics assay by agar well diffusion method. *Acta Biol. Med. Exp.* **15**: 113-115.
28. Rodríguez, M., L. E. Núñez, A. F. Braña, C. Méndez, J. A. Salas, and G. Blanco. 2008. Identification of transcriptional activators for thienamycin and cephamycin C biosynthetic genes within the thienamycin gene cluster from *Streptomyces cattleya*. *Mol. Microbiol.* **69**: 633-645.
29. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
30. Slininger, P. J., K. D. Burkhead, D. A. Schisler, and R. J. Bothast. 2000. Isolation, identification, and accumulation of 2-acetamidophenol in liquid cultures of the wheat take all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-9. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 376-381.
31. Sneath, P. H. A. 1986. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. pp. 1104-1139. In Sneath, P. H. A., N. S. Mair., M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
32. Stapley, E. O., D. Hendlin, J. M. Mata, M. Jackson, H. Wallick, S. Hernandez, S. Mochales, S. A. Currie, and R. M. Miller. 1969. Phosphonomycin. I. Discovery and in vitro biological characterization. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **9**: 284-290.
33. Sutherland, R., R. J. Boon, K. E. Griffin, P. J. Masters, B. Slocombe, and A. R. White. 1985. Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**: 495-498.
34. Therrien, C. and R. C Levesque. 2000. Molecular basis of antibiotic resistance and beta-lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 251-262.
35. Valan Arasu, M., V. Duraipandiyan, P. Agastian, and S. Ignacimuthu. 2009. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *J. Myc. Méd.* **19**: 22-28.
36. Walsh, C. 2003. Where will the new antibiotics come from? *Nat. Rev. Microbiol.* **1**: 65-70.
37. Watson, D., J. MacDermot, R. Wilson, P. J. Cole, and G. W. Taylor. 1986. Purification and structural analysis of pyocyanin and 1-hydroxyphenazine. *Eur. J. Biochem.* **159**: 309-313.
38. Waksman, S. A. and A. T. Heinrich. 1943. The nomenclature and classification of the *Actinomycetes*. *J. Bacteriol.* **46**: 337-341.
39. Xiong, Y. Q., M. R. Yeaman, and A. S. Bayer. 2000. Linezolid: a new antibiotic. *Drugs Today.* **36**: 631-639.
40. Zgoda, J. R. and J. R. Porter. 2001. A convenient microdilutionmethod for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharmaceut. Biol.* **39**: 221-225.

(Received April 27, 2010/Accepted September 8, 2010)