

환경일반-P10

## *Pseudomonas* sp.에 의한 *Vibrio* sp. 항균활성 물질의 생산과 특성에 관한 연구

이경민\*, 이오미, 김유선<sup>1</sup>, 박은희<sup>2</sup>, 손홍주<sup>3</sup>, 이상준  
부산대학교 미생물학과, <sup>1</sup>부산대학교 의과학연구소,  
<sup>2</sup>부산광역시 보건환경연구원, <sup>3</sup>밀양대학교 생물공학과

### 1. 서론

*Vibrio*는 통성 혐기성 그람음성 간균으로서 바다와 하구에 존재하며 담수, 강, 연못, 호수에서도 분리된다. *Vibrio*속에는 30균종 이상이 속해있으며 이 중 12균종이 사람에게 감염을 일으킨다. *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* 등이 가장 흔한 원인 균이며, 특히 우리나라는 생선을 날로 먹는 습관 때문에 여름에 자주 걸릴 수 있으며 *Vibrio*균의 대부분은 소장에 침범하여 장염을 유발한다.

따라서 본 논문에서는 토양, 하천 등의 자연환경에서 *Vibrio* sp.에 항균활성을 갖는 균을 검색하여 분리하고, 분리한 균의 항균성 물질의 최적 생산조건을 검토하며, 항균성 물질을 정제하여 그 안정성과 항균활성 특성에 대해 조사함으로써 새로운 천연항균물질을 탐색하고자 한다.

### 2. 재료 및 실험 방법

본 실험에서는 *Vibrio* sp.에서 가장 흔한 발병 원인균인 *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*에 항균활성을 갖는 균을 검색하여 분리하고, 분리한 균의 항균성 물질의 최적 생산조건을 검토하기 위하여 *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872를 피검균으로 하여 온도, pH, 통기량, 탄소원, 질소원 및 각종 무기염 및 금속염의 영향을 조사하였다.

항균력 측정은 피검균인 *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872을 도말한 고체배지(Muller Hinton agar)위에 멸균된 여과지(paperdisk, Toyo Aventck  $\phi$ 8mm)를 올려 놓고 그 위에 항균물질(배양상등액) 30 $\mu$ l을 얹고 24~48시간 배양하여 투명한 크기로 항균력을 비교하는 Paperdisk를 사용하는 확산법과, Muller Hinton broth에 미리 탁도가 McFarland standard 0.5가 되도록 배양하여 맞춘 *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872를 0.2% 접종하고 항균물질(배양상등액) 0.2%를 넣고 6시간 배양한 후 피검균의 생육도를 660nm에서 측정 후 항균물질의 피검균에 대한 저해율을 구하는 Liquid culture method를 병행하여 실시하였다.

항균물질의 추출 및 정제는 최적조건에서 분리균을 배양한 후 Chloroform을 이용한 유기용매 추출법을 통하여 배양액으로부터 항균물질을 추출하고, Couleme 및 Thin layer chromatography(chloroform-Methanol(1:1))를 이용하여 항균물질을 정제하였다. 또한 정제된 항균물질의 온도 및 pH에 대한 안정성을 조사하고, 항균물질의 작용기작을 알아보기 위하여 항균물질이 *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872 세포의 형태에 미치는 영향을 전자현미경(TEM)으로 관찰하였다.

### 3. 결과 및 고찰

자연계로부터 *Vibrio* sp.에 항균활성을 갖는 균을 검색하여 분리하였으며, 분리균의 동정결과 *Pseudomonas aeruginosa*로 동정되었다. 분리한 균의 항균물질의 최적 생산조건은 1% Manitol, 0.4% Yeast extract, 0.5% NaCl, 0.2% K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 μM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 10 μM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1 μM FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1 μM MnSO<sub>4</sub> · 4~5H<sub>2</sub>O, Initial pH 7, 30°C, 200rpm Agitation, 5일간 배양하였을 때 항균물질 생산이 최대가 되었다.

최적조건에서의 분리균 배양액으로부터 추출한 Chloroform층을 Column 및 TLC를 이용하여 전개한 후 각 분리물질의 항균능을 검토한 결과 TLC, Rf 0.77, Rf 0.63에서 확인되는 물질에서 항균능이 보였다.

정제된 항균물질은 4°C, 100에서 60분간의 열처리에도 안정하였으며 121°C, 15분간 autoclave하여도 안정하여 열과 pH에 대한 광범위한 안정성을 보였으며, 항균물질이 *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872 세포의 형태변화에 미치는 영향을 전자현미경(TEM)으로 관찰한 결과, 세포의 뚜렷한 용균현상이 관찰되었으며, *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872의 대수증식기에서의 항균물질 투입이후의 뚜렷한 탁도감소와 생균수 감소로 볼 때 이 항균물질은 피검균에 대해 완전한 용균작용을 하는 것으로 조사되었다.

### 4. 요약

자연계로부터 *Vibrio* sp.에 항균활성을 갖는 균을 검색하여 분리하고 분리균의 동정결과 *Pseudomonas aeruginosa*로 동정되었으며, 분리한 균의 항균성 물질의 최적 생산조건을 검토하며, 항균성 물질을 정제하여 그 안정성과 항균작용기작에 대해 조사한 결과 pH와 열에 대한 광범위한 안정성을 보였으며, 항균물질이 *V. cholerae* non-O1 ATCC 25872 세포에 대해 뚜렷한 용균작용을 하는 것을 관찰하였다.

### 참고문헌

- Min, B. Y., J. Y. Shim, K. W. Kim, J. K. Lee, H. T. Choi, K. S. Yoon. 1996. Fungal-sporulation suppressing substances produced by *Pseudomonas aeruginosa* KMCS-1. *J. Microbiol.* 34, 284-288.
- Cho, K. W., Y. W. Seo, T. M. Yoon, and J. H. Shin, 1999. Purification and structure determination of antifungal phospholipids from a marine *Streptomyces*, *J. Microbiol. Biotechnol.* 9. 709-715.
- 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.
- 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.
- 전동효, 1982, 항생물질개론, 교학연구소