

Pseudomonas aeruginosa KGM-100이 생산하는 항생물질의 특성 및 구조

김경석 · 홍수형 · 이은주 · 박용복 · 박용태¹ · 하지홍*

경북대학교 자연과학대학 유전공학과, ¹화학과

Characterization and Structural Determination of an Antifungal Compound Produced by *Pseudomonas aeruginosa* KGM-100

Kyung-Seok Kim, Su-Hyung Hong, Eun-Ju Lee, Yong-Bok Park,
Yong-Tae Park¹ and Ji-Hong Ha*

Department of Genetic Engineering and ¹Chemistry, College of Natural Sciences,
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Abstract — During the screening of antifungal antibiotics from microbial metabolites, we selected *Pseudomonas aeruginosa* KGM-100 showing powerful antagonistic activity against various phytopathogenic fungi. Antibiotics KGM-100A and KGM-100B were purified from the culture broth of *Pseudomonas aeruginosa* KGM-100 by diaion HP-20 column chromatography, ethyl acetate extraction, silica gel column chromatography, preparative TLC and recrystallization. KGM-100A which was recrystallized in MeOH showed antimicrobial activities against a broad spectrum of fungi and bacteria. Physico-chemical properties of KGM-100A were determined and identified to be phenazine-1-carboxylic acid by UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, mass spectrum, and elemental analyses.

항생물질 농약은 병해충에 대하여 선택적으로 강한 활성을 나타냄으로써, 인간이나 동식물에 대해서는 영향을 끼치지 않고, 사용 후에는 쉽게 분해되어 잔류독성의 문제가 없는 이점이 있다. 뿐만 아니라, 부존자원이 부족한 우리 나라에서 주로 석유자원으로부터 만들어지는 유기합성농약을 미생물에 의해 생성되는 항생물질농약으로 대체할 수 있다면 경제적인 측면에서도 중요한 분야가 아닐 수 없다.

본 연구실에서는 미생물 대사산물로부터 항 곰팡이성 항생물질 탐색연구를 수행하던 중, 광범위한 식물 병원성 곰팡이에 강한 억제활성을 보이는 항생물질 생산균주를 선별하여 *Pseudomonas aeruginosa* KGM-100으로 동정하였다. 본 연구에서는, 이 균주가 생산하는 항생물질의 정제, 생물학적, 이화학적 특성 및 구조분석을 수행하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

항생물질의 생산과 정제

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, phenazine-1-carboxylic acid, antifungal antibiotic

*Corresponding author

항생물질의 생산을 위한 대량배양은 Luria Bertani 배지(LB 배지, tryptone 1%, NaCl 1%, yeast extract 0.5% pH 7.0)를 사용하여 행하였다. 항생물질의 최적 생산온도와 pH, 최적 배양시간을 조사한 후, 종배양액을 600 ml 배지가 든 1 l flask에 1% 접종하고 37°C, 200 rpm에서 3일간 15 l를 배양하였다. 배양액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 Diaion HP-20(6×45 cm, Mitsubishi Kasei Co.) column에 통과시켜 50% acetone으로 활성물질을 용출시켰다. 활성분획의 acetone을 제거한 후 수용액을 ethyl acetate로 추출, 농축시켜 silica gel(Merck, 70~230 mesh, 230~400 mesh) column chromatography(1)와 preparative TLC(Merck, silicagel plate 60 F₂₅₄), 및 재결정 실험(2)을 반복하면서 순수분리하였다. 배양 중에 생성되는 항생물질의 bioassay는 *Saccharomyces cerevisiae*를 시험균으로 하고 Kirby-Bauer 법(3)으로 측정하였으며 항균 역가는 clear zone size (mm)로 나타내었다. 정제과정 중 항생물질의 이동은 bioassay, 및 bioautography 법(4)을 병행하여 추적하였다.

항생물질의 생물학적 특성

MIC 측정 정제된 항생물질을 512~0.125 µg/ml 농도범위로 dimethylsulphoxide-phosphate buffered saline, pH 7.4(5 : 95)에 희석한 후 agar dilution 방법 (5, 6)에 따라 생육저지 최소농도(MIC)를 결정하였다. 시험균으로는 7종의 곰팡이와 16종의 bacteria를 사용하였다.

Dose-response curve 작성 정제된 항생물질을 정량하여 paper disc 당 농도를 0.1 µg에서 1,000 µg 까지 대수적으로 변화를 주어 활성정도를 측정한 후, dose-response curve를 작성하였다(7).

구조분석 및 이화학적 특성 조사

용해도 항생물질의 용해도를 n-hexane, benzene, toluene, chloroform, ethyl acetate, acetone, methyl alcohol, ethyl alcohol 등에 대해 조사하였다.

TLC Rf Value 및 정색반응 여러 solvent system에서의 TLC Rf value를 측정하였다. 분리된 항생물질을 모세관으로 TLC 상에 점적한 후 용매로 포화상태를 이룬 용기내에서 전개시켰다. TLC 정색 반응은 정제된 항생물질을 TLC 상에 전개시키고 sprayer로 균일하게 뿌려 열처리한 후 나타난 색깔을 조사하였다(8).

구조규명을 위한 기기분석 UV spectrum은 KGM-100A를 chloroform에 녹여 Shimazu UV-265(Japan) 기기로 측정하였으며, IR spectrum은 Bio-Rad Digilab FTS-40 IR 기기를 사용하여 KBr pellet 형태로 측정하였다. 분자량 결정은 Kantos MS 25 RFA Mass 기기를 사용하여 조사하였고, ¹H-NMR spectrum과

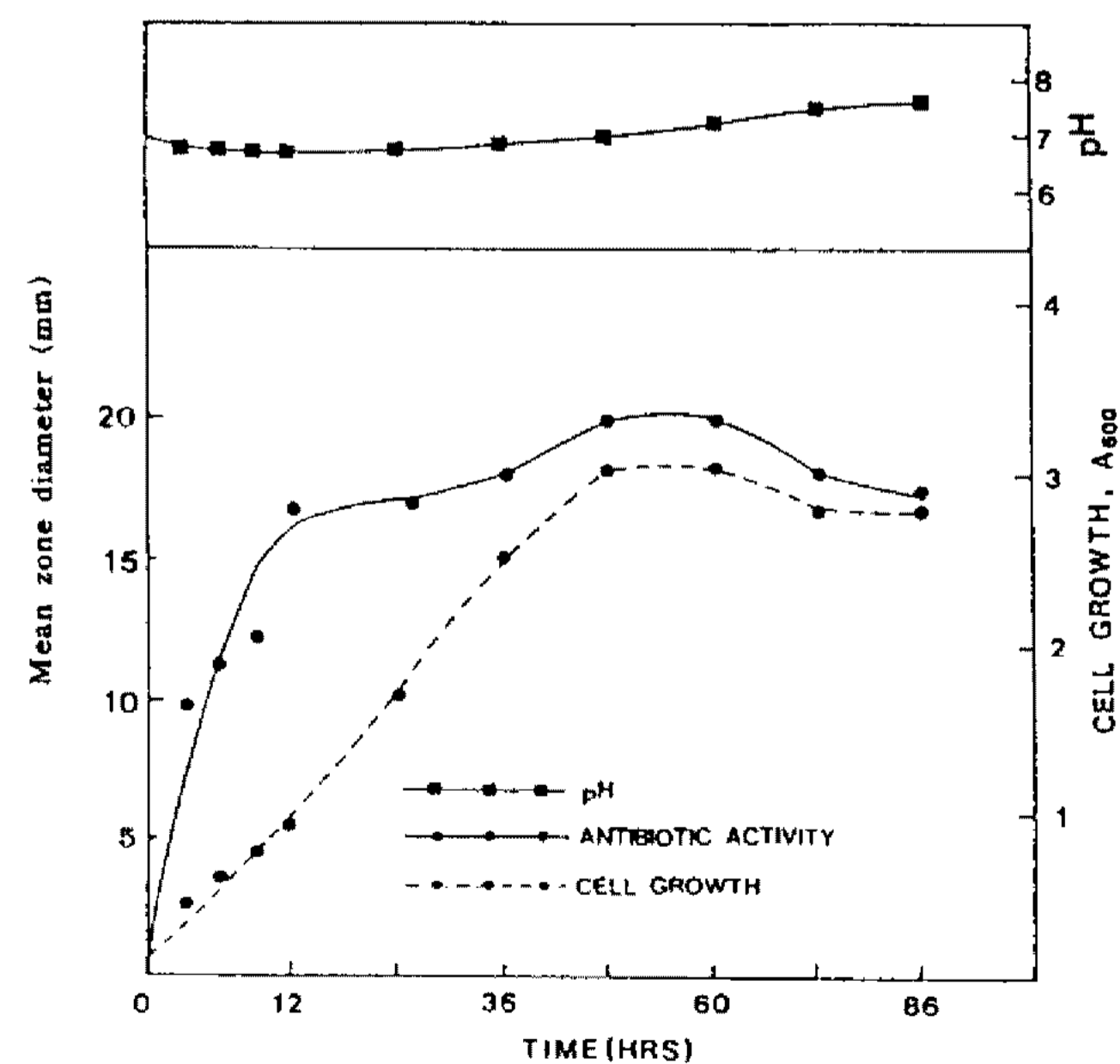


Fig. 1. Growth profile and time course of antibiotic production.

¹³C-NMR spectrum은 Bruker 300 MHz FT NMR 기기를 사용하였는데, 이때 표준물질로는 TMS(tetra-methylsilane)을 사용하였고 CDCl₃를 용매로 하여 측정하였다. 원소분석은 CARLO ERBA, DP200 Elemental Analyzer를 사용하여 행하였다.

결과 및 고찰

항생물질의 생산과 정제

배양시간에 따른 균의 생육, 항균활성 및 pH의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 항균활성은 균의 생육과 동시에 증가하는 양상을 보였으며 48시간 이후 최고에 달하였다. 배지의 pH는 배양기간 동안 거의 일정하게 증가하는 양상을 보였다. KGM-100 균주의 발효조건을 고려하여 배양한 15l의 균액으로부터, Fig. 2와 같은 정제과정을 거쳐 최종적으로 두 물질을 순수분리하였으며, 이중 methanol로 재결정 실험을 하여 정제한 것을 KGM-100A, preparative TLC에 의해 정제한 것을 KGM-100B라 명명하였다. KGM-100A는 노란색의 분말 결정이었으며, preparative TLC에 의해 정제한 KGM-100B는 dark brown gel이었으며 두 물질 모두 TLC 상에서 다양한 solvent system으로 전개시킨 결과 단일 spot을 보였다.

생물학적 특성

식물 병원성 곰팡이를 비롯한 여러 시험균에 대한

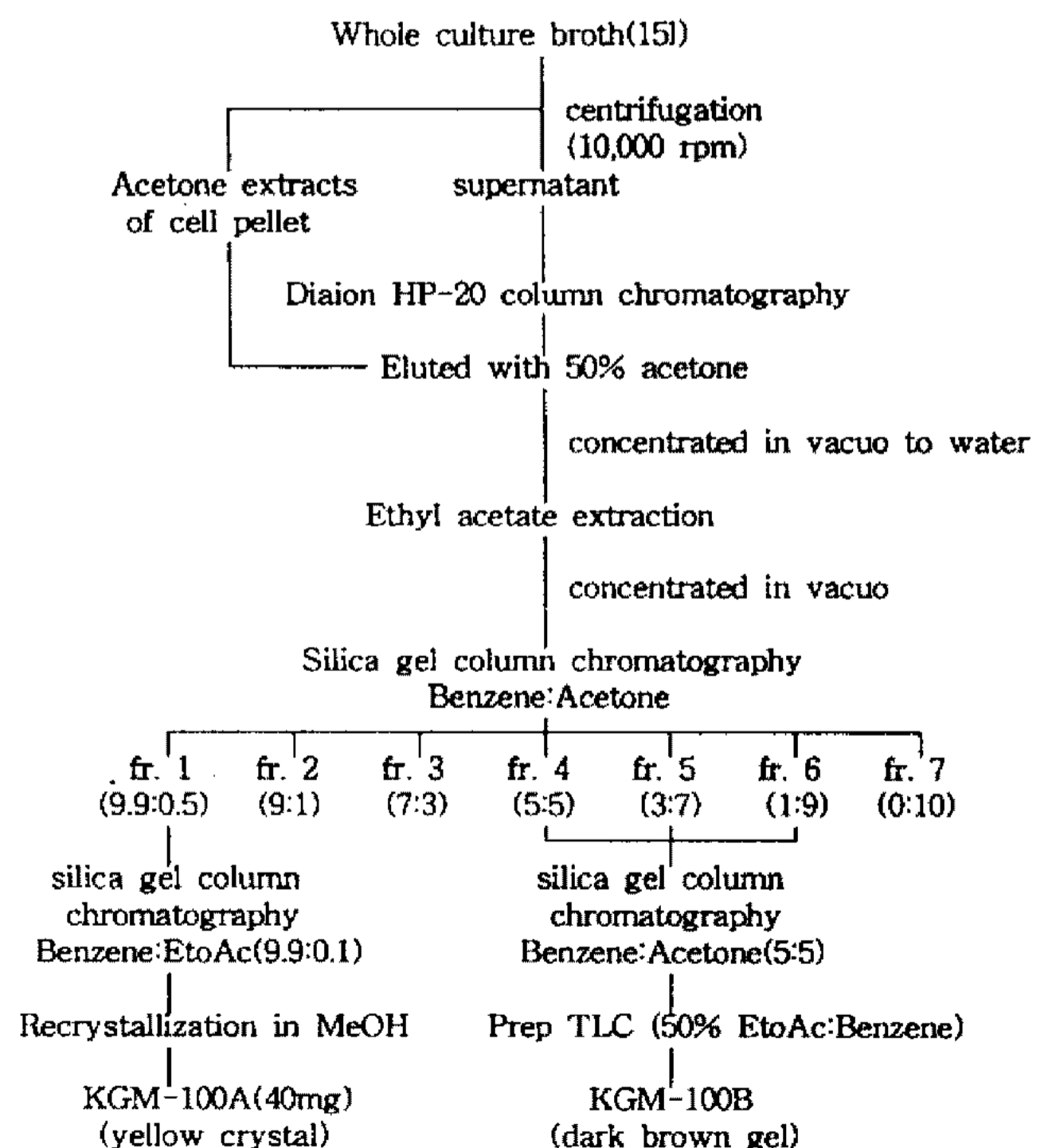


Fig. 2. Purification procedures of the antibiotics KGM-100A and KGM-100B.

Table 1. MIC values of the antibiotics KGM-100A and KGM-100B

	Test microorganisms	ATCC	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
			KGM-A	KGM-B	
Bacteria	Gram(+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	6538P	16	16
		<i>Bacillus subtilis</i>	6633	4	32
		<i>Micrococcus luteus</i>	9341	16	16
		<i>Micrococcus luteus</i>	10240	16	16
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	16	64
		<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	16	128
		<i>Bacillus cereus</i>	27348	16	64
	Gram(-)	<i>Providencia rettgeri</i>	9919	16	>512
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	16	32
		<i>Salmonella typhimurium</i>	14028	16	>512
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	15473	16	64
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25619	16	>512
		<i>Escherichia coli</i>	25922	32	64
		<i>Proteus mirabilis</i>	25933	16	>512
		<i>Serratia marcescens</i>	27117	16	>512
Fungi	<i>Enterobacter aerogenes</i>	29751	16	>512	
	<i>Fusarium solani</i>		4	16	
	<i>Pyricularia oryzae</i>		4	16	
	<i>Botrytis cinerea</i>		8	>512	
	<i>Collectotrichum lagenarium</i>		8	>512	
	<i>Collectotrichum dermatium</i>		8	>512	
	<i>Valsa ceratosperma</i>		4	>512	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		8	64	

MIC values were investigated by the agar dilution method on Mueller-Hinton agar medium for bacteria and Sabouraud-glucose agar medium for fungi.

정제된 항생물질의 MIC 값을 Table 1에 나타내었다. 그 결과 각 항생물질은 bacteria에 대해서도 항균활성을 보였으며 특히 곰팡이의 경우 인삼 뿌리썩음병을 일으키는 *Fusarium solani*와 벼 도열병을 유발하는 *Pyricularia oryzae*에 대해 강한 억제활성을 가짐을 알 수 있었다. Dose-response curve를 Fig. 3에 나타내었으며, MIC 값에서도 알 수 있는 바와 같이 KGM-100A가 KGM-100B보다 강한 활성을 보였다.

항생물질의 구조분석 및 이화학적 특성

KGM-100 균주가 생산하는 두 종류의 항생물질 중 비교적 정제된 양이 많고 항균활성이 강한 KGM-100 A에 대해서만 구조분석을 시도하였다. KGM-100A의 이화학적 특성은 Table 2에 나타난 바와 같이 노란색 분말로 melting point는 238°C 였으며, UV 371 nm에서 흡수과장을 보였다. Fig. 4의 mass spectrum으로부터 base peak는 180, molecular ion peak는 224임을 확인하였다. KGM-100A의 IR spectrum은 Fig. 5

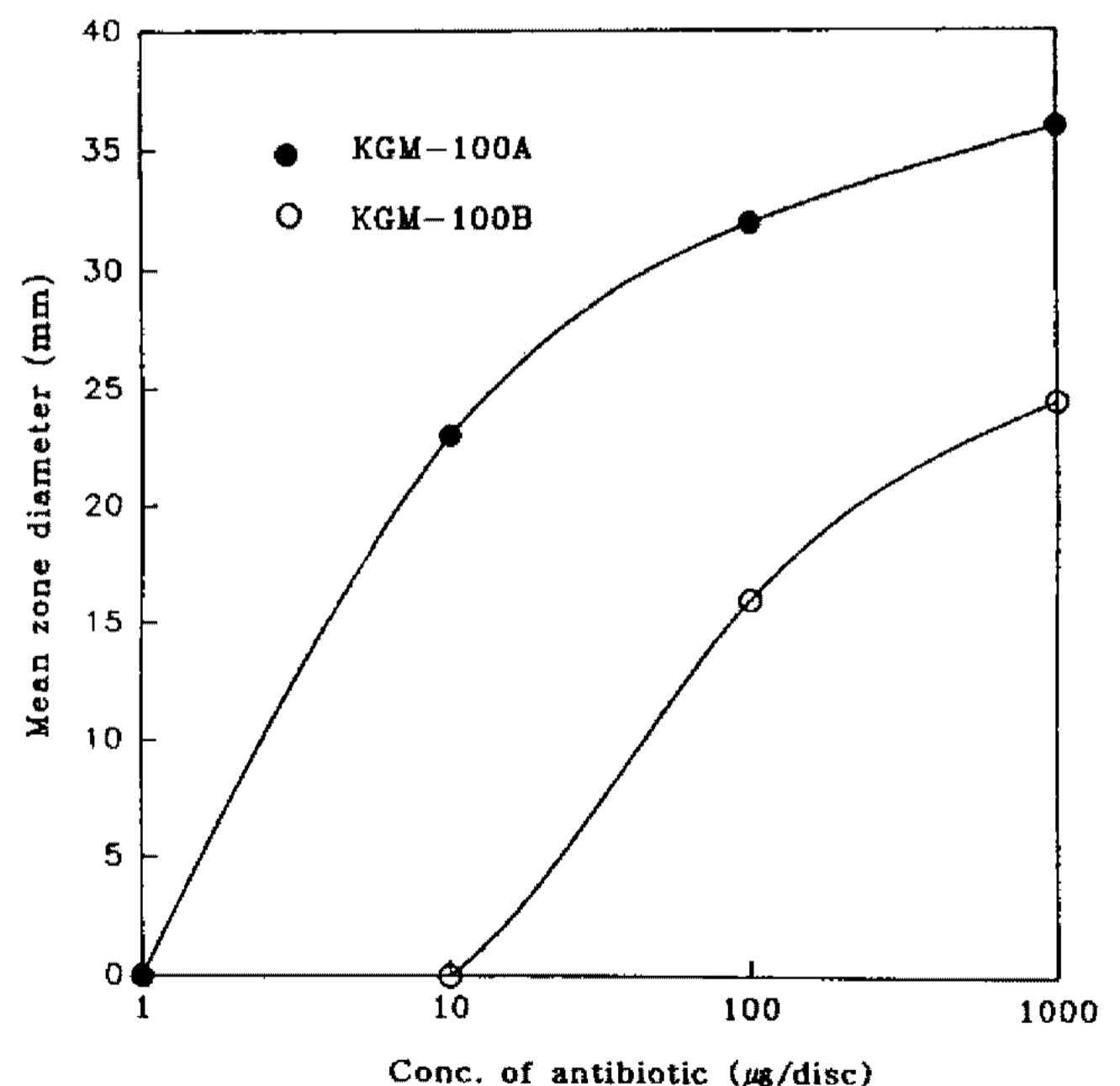


Fig. 3. Dose-response curves of the antibiotics KGM-100A and KGM-100B against *Saccharomyces cerevisiae* as test organism on assay plate.

와 같으며 3422 cm^{-1} 의 peak는 carboxyl 산의 OH bond를 보여주며, 3056 cm^{-1} 의 peak는 aromatic C-H

Table 2. Physico-chemical properties of KGM-100A

Appearance	Yellow powder
Melting point	238°C
UV λ_{max} nm	247.2 nm, 361.6 nm (in chloroform)
Molecular weight	224
Molecular formular	$\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$
R_f Value	
EtoAc:Benzen(20:80)	0.43
Acetone:Benzen(10:90)	0.46
EtoAc:Benzen(50:50)	0.69
Acetone:Benzen(50:50)	0.8
Color reaction	
Phenol- H_2SO_4	Positive
10% H_2SO_4	Positive
Ninhydrin	Negative
FeCl_3	Negative
Solubility	
Soluble	Benzen, CHCl_3 , EtoAc
Insoluble	n-Hexane, MeOH, H_2O

bond를, 1736.3 cm^{-1} 의 peak는 C=O group을 각각 나타낸다. 또한 $1601.7, 1562.3, 1519.8, 1457.1\text{ cm}^{-1}$ 의 peak로부터 aromatic C-C, C-N bond의 존재를 알 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum은 Fig. 6과 같으며, $\delta 15.51\text{ ppm}$ 은 COOH group을, $\delta 8.98\sim 8.797\text{ ppm}$ 부근에서 7개의 CH signal을 각각 관측할 수 있었다. Fig. 7에 나타난 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum 상에서는 165 ppm 에서 C=O group 탄소의 signal이, $145\sim 125\text{ ppm}$ 에서 aromatic ring group 탄소의 signal이 관측되었다.

KGM-100의 원소분석결과 C 69.26%; H 3.88%; N 11.88%; O 14.98%로 나타났으며, 이상에서 열거한 이화학적 특성 및 기기분석 결과들을 종합하여 볼 때,

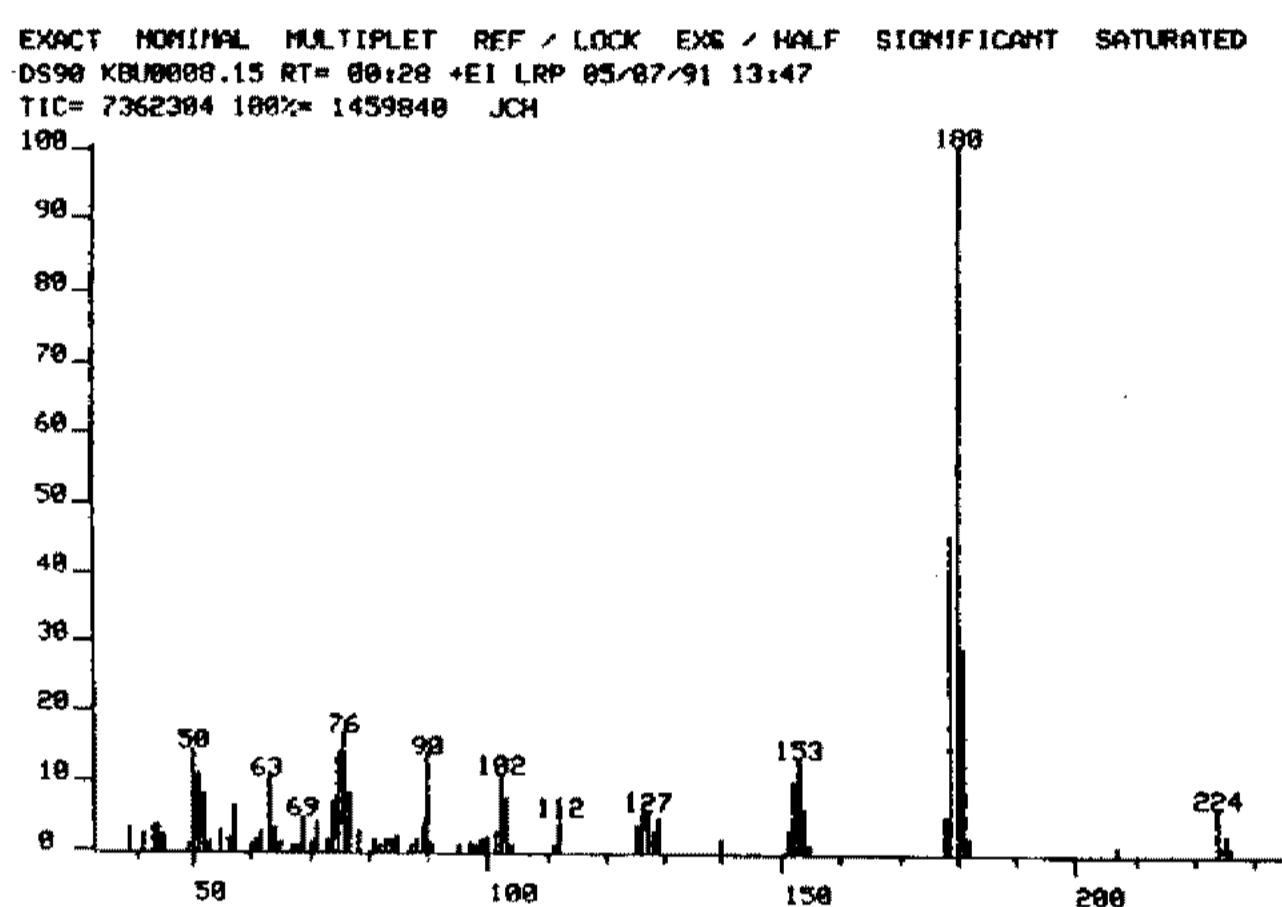


Fig. 4. Mass spectrum of the antibiotic KGM-100A.

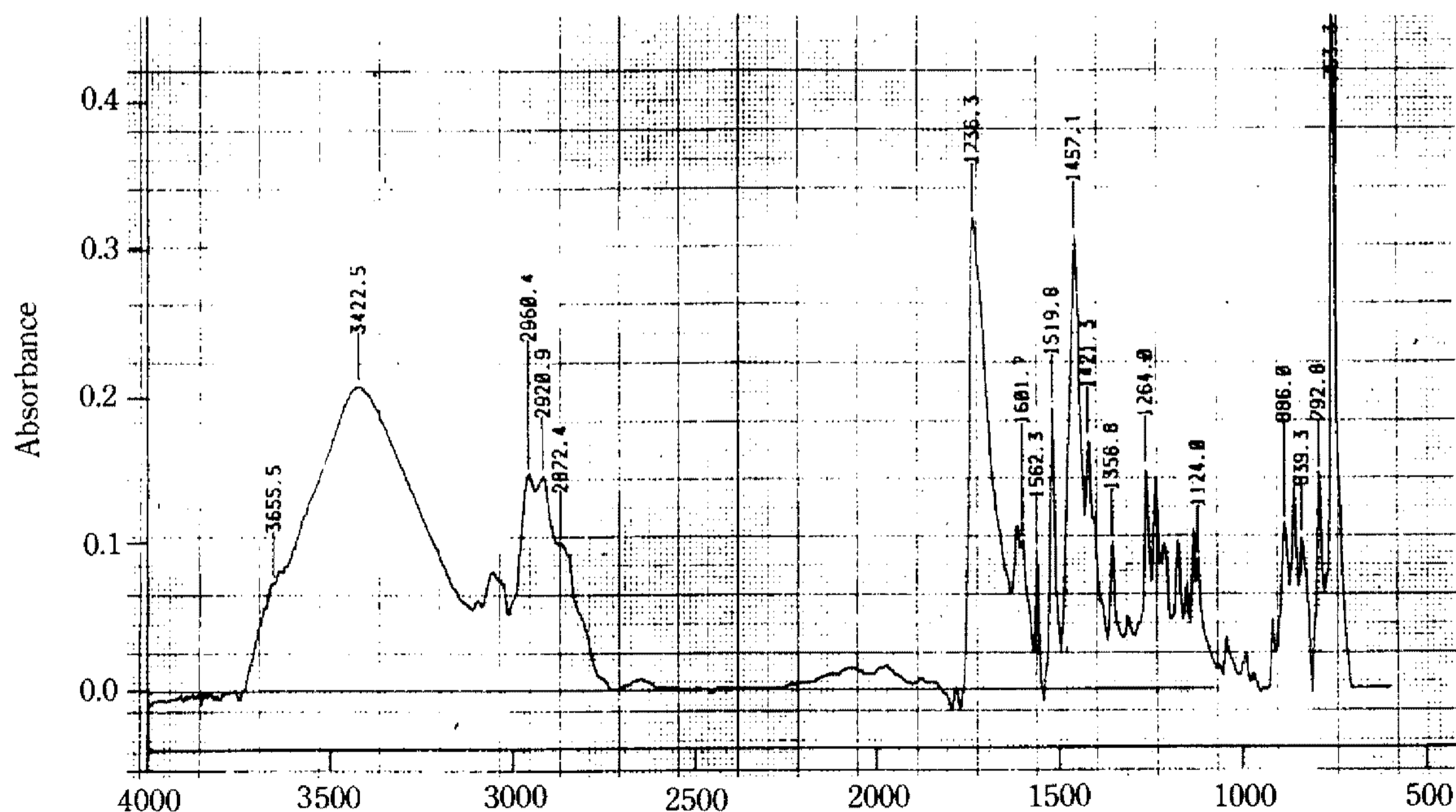


Fig. 5. IR spectrum of the antibiotic KGM-100A.

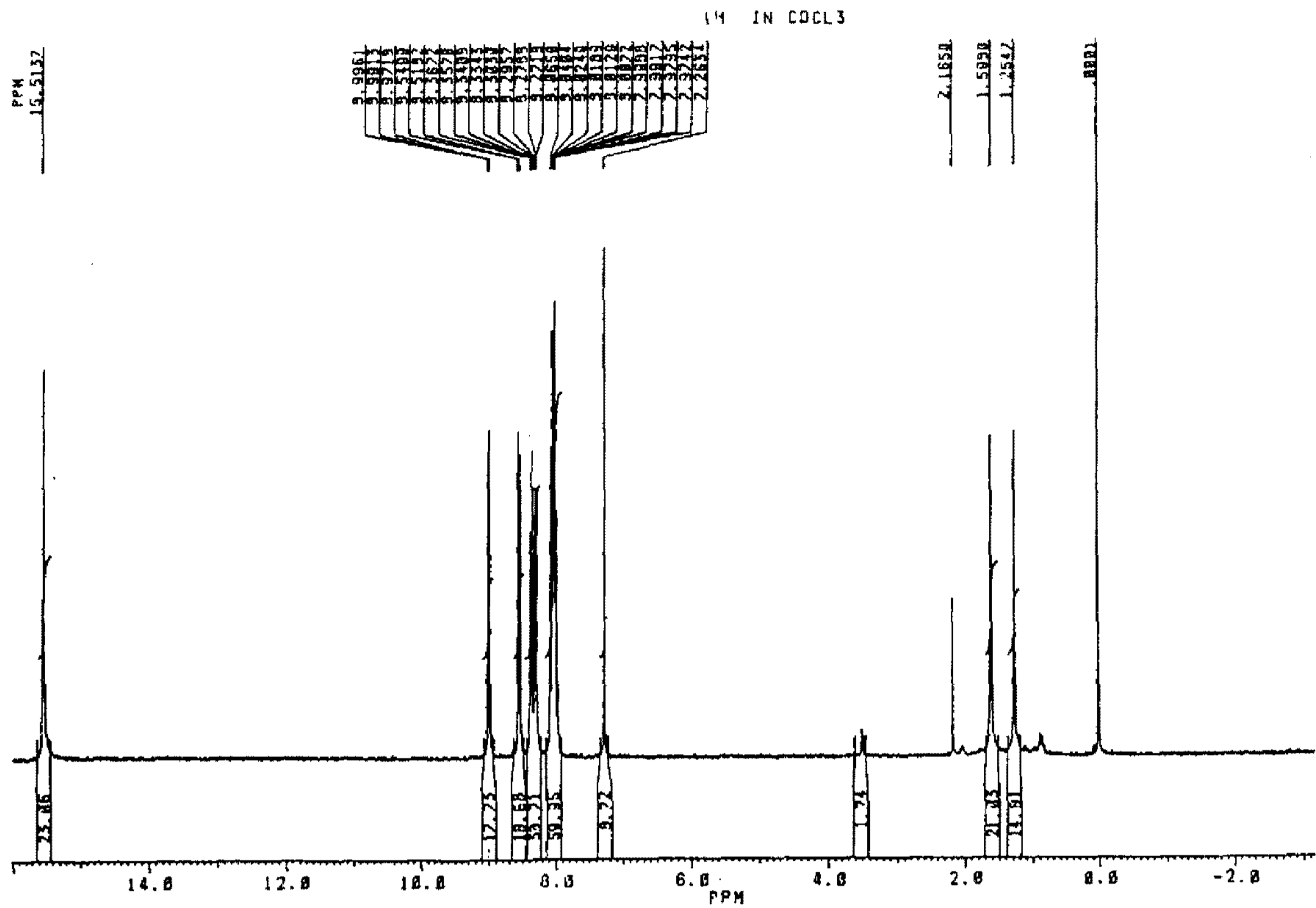


Fig. 6. ¹H-NMR spectrum of the antibiotic KGM-100A.

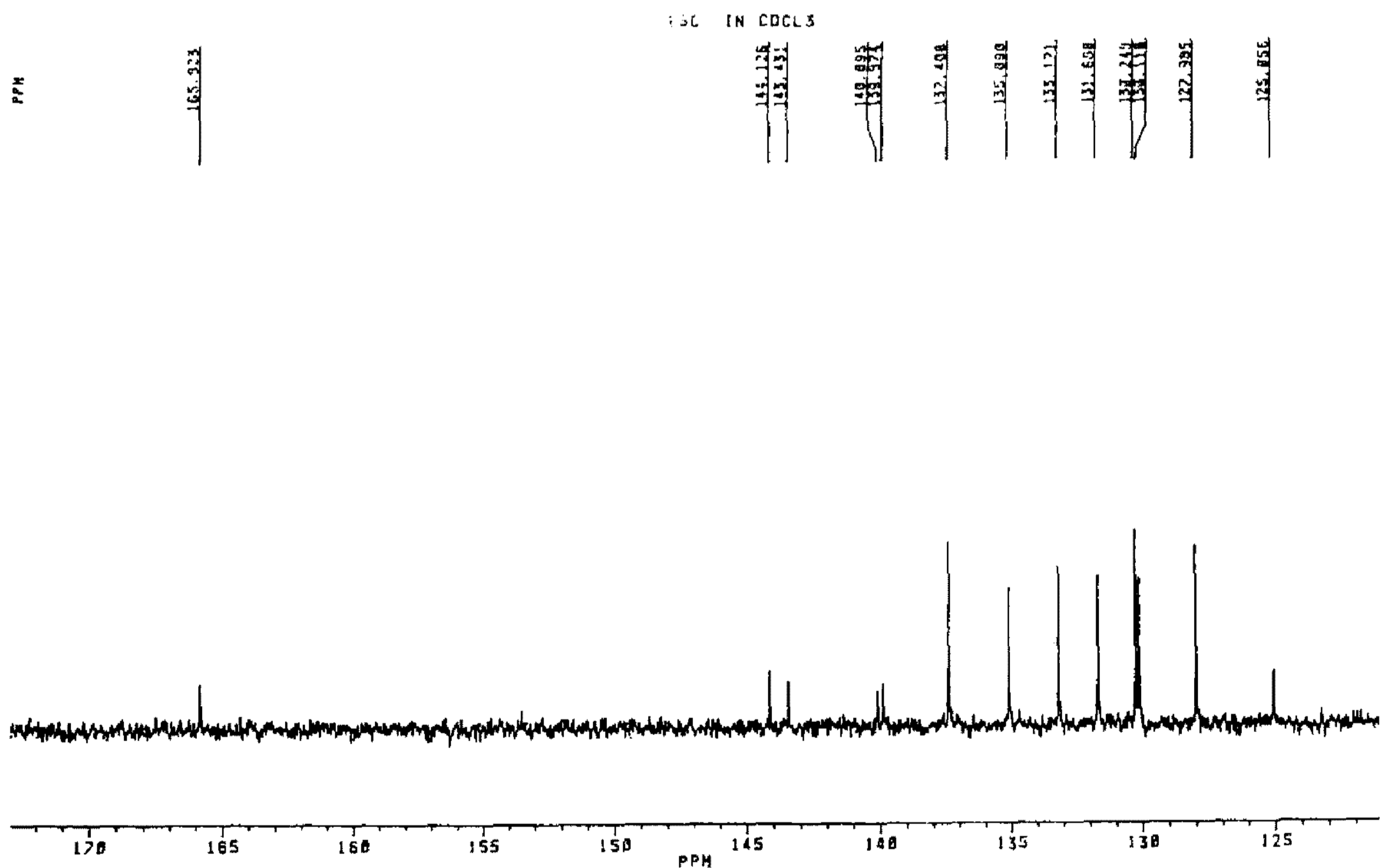


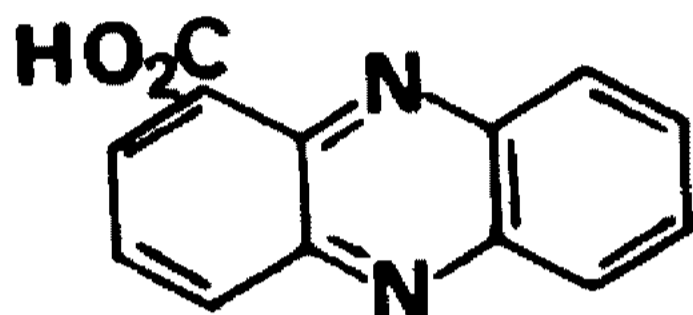
Fig. 7. ¹³C-NMR spectrum of the antibiotic KGM-100A.

KGM-100A는 C₁₃H₈N₂O₂의 화학식을 가지는 phenazine-1-carboxylic acid(PCA)로 추정되었다. KGM-100A와 PCA의 원소분석결과를 Table 3에서 비교한 결과

거의 일치하였다. 또한 melting point 및 “Aldrich IR Data Book”과 “Handbook of ¹H NMR Spectra and Data” 등에 수록된 PCA의 여러 spectrum data와

Table 3. The results of elemental analysis of KGM-100A

Element	% of composition	
	KGM-100A	PCA
Carbon	69.26	69.64
Nitrogen	11.88	12.5
Hydrogen	3.88	3.57
Oxygen	14.98	14.29

**Fig. 8. Proposed structure of the antibiotic KGM-100A.**

비교해 본 결과 모두 일치하였으므로, KGM-100A를 PCA로 동정하였으며 Fig. 8에 그 구조를 나타내었다(9, 10).

PCA는 현재까지도 U.S. Department of Agriculture(USDA) 등에서 활발히 연구되고 있는 분야 중의 하나로 밀의 뿌리에 병을 유발하는 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*의 생육을 억제하는 중요한 항생물질로 알려져 왔다(11). 현재 USDA에서는 PCA 합성유전자의 cloning까지 이미 마친 단계이며 이에 따른 후속 연구를 진행 중인 것으로 알려져 있다(10). 이런 점들을 고려하여 볼 때, PCA를 생산하는 *P. aeruginosa*를 인삼 뿌리썩음병의 방제를 위한 미생물 농약으로의 사용가능성 여부에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 본다.

요 약

미생물 대사산물로부터 항 곰팡이성 항생물질 탐색 연구를 수행하던 중 광범위한 식물 병원성 곰팡이에 강한 억제활성을 보이는 *Pseudomonas aeruginosa* KGM-100을 선발하였으며, 이 균주가 생산하는 항생물질의 분리, 정제 및 생물학적, 이화학적 특성 및 구조분석을 행하였다. 균 배양액으로부터 HP-20 column chromatography, ethyl acetate extraction, silica gel column chromatography, preparative TLC, recrystallization 등을 통해 KGM-100A와 KGM-100B의 두 종류의 항생물질을 순수분리하였으며, 항균 spectrum을 조사한 결과 methanol로 재결정된 KGM-100A가 다양한 종류의 bacteria와 곰팡이에 강한 활

성을 보였다. 이중 KGM-100A를 UV, IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, Mass spectrum, 원소분석 등의 기기분석을 한 결과 phenazine-1-carboxylic acid로 동정되었다.

감사의 말

본 연구는 1994년도 교육부 학술연구 조성비(지역 개발연구)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Bobbitt, J.M., A.E. Schwarting, and R.J. Gritter. 1986. Column chromatography. In *Introduction to Chromatography*, Pp. 84-105. D. Van. Nostrand Co.
2. Roberts, R.M., J.C. Gilbert, L.B. Rodewald, and A.S. Wingrove. 1985. Recrystallization and melting points. In *Modern Experimental Organic Chemistry*, Pp. 65-91.
3. Cappuccino, J.G. and N. Sherman. 1987. Microbiology, A Lab Manual, 2nd ed., Pp. 248. The Benjamin/Cummings Publishing Co, Inc.
4. Issaq, H.J., E.W. Barr, and A. Aszalos. 1977. Thin layer chromatographic classification of antibiotics exhibiting antitumor properties. *J. Chromatogr.* **133**: 291-301.
5. Acar, J.F., F.W. Goldstein, and P. Lagrange. 1978. Human infections caused by thiamine or menadione requiring *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **8**: 142-147.
6. Wegner, D.L., C.R. Mathis, and T.R. Neblett. 1976. Direct method to determine the antibiotic susceptibility of rapidly growing blood pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **9**: 861-862.
7. Hewitt, W. and S. Vincent. 1987. Dose-response relationship. In *Theory and Application of Microbiological Assay*, Pp. 42-44. Academic Press.
8. Krebs, K.G., D. Heusser, and H. Wimmer. 1969. Spray reagents. In *Thin Layer Chromatography* (E. Stahl, ed.), Pp. 854-905. Springer-Verlag.
9. Flood, M.E., R.B. Herbert, and F.G. Holliman. 1970. Preliminary communication. *Chem. Comm.* 1514.
10. Hollstein, U., and L.G. Marshall. 1972. Biosynthesis of Phenazines. *J. Org. Chem.* **37**: 3510-3514.
11. Linda, S.T., M.W. David, F.B. Robert, and S.P. Leland. 1990. Production of the antibiotic Phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(4): 908-912.

(Received 2 November 1994)