보안과제( ), 일반과제(○) 과제번호 20080300

발 간 등 록 번 호
00-1541000-001044-01

고품질 감귤 생산을 위한 궤양병 방제용 천연항생제 개발

(Development of natural antibiotics against bacterial canker producing for high quality of Citrus)

고품질 감귤 생산을 위한 궤양병 방제용 천연항생제 개발

(Development of natural antibiotics against bacterial canker producing for high quality of Citrus)

전 남 대 학 교

농 림 수 산 식 품 부

발 간 등 록 번 호
11-1541000-001044-01

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “고품질 감귤생산을 위한 궤양병 방제용 천연 항생제 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011 년 12 월 5 일

주관연구기관명 : 전남대학교
주관연구책임자 : 지 연 태
세부연구책임자 : 지 연 태
연 구 원 : 최 고 우
연 구 원 : 장 민 철
연 구 원 : 박 가 인
협동연구기관명 : 농촌진흥청
난지농업연구소
협동연구책임자 : 현 재 욱
참 여 기 업 명 : 에이엠팜(주)
협동연구책임자 : 장 치 호

요 약 문

Ⅰ. 과제명

- 고품질 감귤 생산을 위한 궤양병 방제용 천연 항생제 개발

II. 연구 개발 목적 및 필요성

- 화학 합성 항생제의 토양 축적 및 잔류로 인하여 생태계의 파괴
- 화학 합성 항생제의 농업 사용 금지
- 고품질 감귤 생산을 위한 천연 항생제 개발이 절실히 요구됨
- 감귤 세균성 궤양병에 특이적인 천연 항생제의 개발
- 미생물 종균 개발

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 제 1 세부과제(전남대학교)

1) 항균물질을 생산하는 미생물의 선발
2) 선발한 미생물의 동정
3) 미생물 배양 조건의 확립
4) 항균 물질의 분리 및 정제
5) 항균 물질의 구조 분석

2. 제 1 협동과제(농촌진흥청 난지 농업연구소)

1) 궤양병 병원균 분리 및 동정
2) 노지실험을 통한 방제효과 검증
3) 궤양병 방제 체계 확립

3. 제 2 협동과제(에이엠팜(주))

1) Open fermenter 제작
2) 천연 항생제의 대량생산조건 확립
3) 천연 항생제의 제형화
4) 상품화

Ⅳ. 연구개발결과

1. 제 1 세부과제

1) 32종의 천연 항생물질 생산균주 분리 및 동정

2) 미생물 배양조건의 확립

- 탄소원 : Glucose(2 %)
- 질소원 : NH4Cl(1%)
- 최적 배양 온도 : 37 ℃
- 최적 pH : 7.0

3) 항균 물질 정제

4) 항균물질 구조 분석 - 5종류

- mono-rhamnodilipid(Rha-C10-C10)
- mono-rhamnodilipid methylated(Rha-C10-CH3)
- Dirhamnodilipid(Rha-Rha-C10-C10)
- Dirhamnodilipid methylated(Rha-Rha-C10-C10-CH3)
- 2-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide

5) Knock out mutant 선발

- Qurum sensing에 관련된 유전자에 돌연변이가 일어난 mutant 2주 선발
- Rhamnolipid및 pyocynin 생성 못함

2. 제 1 협동과제

1) 감귤 궤양병 균주 3주 분리 동정

2) 감귤 궤양병 감염 지역에서 신규 미생물 27주 선별

3) 방제 효과 검증

3. 제 2 협동과제

1) 대량 배양조건 확립(5,000L)

2) 궤양병 방제 상품 개발(큐피트 상표등록)

Ⅴ. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 천연 항균물질 분비 미생물 32종 확보
2. 항균 물질 분리 공정 확립
3. 5종의 항균 물질 구조 분석
4. 대량 배양 조건 확립
5. 필드 시험방법 확립
6. Rhamnolipid 대량 생산 기술 이전 예정
7. 본 연구 결과물에서 얻은 항균물질을 이용한 Vencher 기업 창업 준비중

SUMMARY
(영문요약문)

Ⅰ. Project Title

Development Of Natural Antibiotics for Bacterial Canker and Production for High Quality of Citurs

Ⅱ. Objective and Importance of the Project.

The purpose of this project is to development of natural antibiotics that is non-toxic and non-accumulate in soil because which is easyly degradable by microorganism in soil. On other hand chemical synthetic antibiotics are non-degradable and accumulated in soil and then distrupted ecological system in nature.

According to the existing studies to related to natural antibiotics production with various microorgamis, it is revealed that is very difficult to commercial production which is unstable and easily contaminatable. In addition, the development of natural antibiotics for citurs are a little studied.

To accomplish this goal, we are screened for antibiotic producing microorganisms and identified of the strains using sequence homolgy of 16s rRNA genes.

Also, we are analysis of molecular structure for antibiotic materials produced by screened bacteria.

Ⅲ. Scope and Contents of the Project

The goal of this project is to develop the microorganisms to antibiotic prodution for bacterial canker treatment and determination to structure of antibiotic materials.

To fullfill these goals, 35 microorganisms were screened from Gwang-ju city area and study the following step.

Firstly, sequenced of screened microorganism of 16s rRNA genes and BLAST using NCBI program and then identified.

Secondly, two strains among 35 microorganis, we are selected which are strong antagonism against *Xanthamonas* species which is casure pathogen on bacterial canker of the various plant.

Thirdly, the two selected strains are cultured on M9 minimal medium and purified to antibiotic compounds using HPLC, TLC, GC/MS, and then determined the structure of antibiotic compounds.

Ⅳ. Result of the Study

Selected two microorganisms have strong antagonism against Xanthomonas, identified strains were *Pseudomoans aeruginosa* and named N03 and N04.

Both strains are produced the mono-rhamnolipid(Rha-C10-C10) and Dirhamnodilipid (Rha-Rha-C10-C10) and methylated, respectively

Especially, *Pseudomonas aeruginosa* N04 produced 2-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide which is known to antibiotic qurum sensing material.

Finally, knock-out mutants are not produced the antibiotic compounds but also pyocyanin that is blue pigment which is another qurum sensing material of pseudomonas aeruginosa. And, this antibiotic compounds mixture are commerciallized by A&M farm that is 2nd cooperative Team in this project.

Ⅴ. Proposals for Application

Research results obtained from this project, such as *Pseudomonas areuginosa* N03, N04 and their culture product monorhamnolipid, dirhamnolipid and its modified methylated form and then 2-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide, are used to natural antibiotics and seed strains for agricultural antibiotics

Rhamnolipids are biosurfancts that are being used in a wide range of applications such as biosurfancts, emulsifier natural "Green" ingredient in cosmetics, detergents, shampoos, shoap, bioremediation and pecticide(antibiotics and fungcide)

제 1 장 연구개발과제의 개요

감귤 궤양병과 같이 세균성 궤양병을 일으키는 미생물들은 과수의 잎, 줄기, 열매 등 과수의 모든 부위에 가해하여 상품 가치를 떨어뜨리거나 또는 과수의 생육을 저해 할 뿐만 아니라 심지어 괴사 하게 만드는 세균성 궤양병(Bacterial cancer)이다. 이런 궤양병은 동남아시아에서 기원하여 세계 여러 지역의 감귤 제배지로 전파 되어졌다. 세균성 궤양병의 원인균은 주로 *Xanthomonas* 속과 *Pseudomonas* 속으로 알려져 있으며, 본 연구의 대상인 감귤은 *Xanthomonas axonotropodis pv. citri, Xanthomonas citri* 병원균이 주 원인균으로 알려져 있다. *Xanthomonas*에 의한 세균성 궤양병균의 종류는 식물의 종류에 따라 다양한데, Rice, pepper, peach, tomato등 모든 식물에 감염 될 수 있고, 그 피해가 상당히 크기 때문에 미국을 비롯한 많은 국가에서는 가장 중요한 검역 대상 병원균의 하나로 취급하고 있다. 이러한 Xanthomonas 궤양병의 원인균도 식물마다 각기 달라 현재 까지 약 38여 종이 알려져 있다. 기주 범위로는 감귤나무 및 탱자 속 식물이며, 품종으로 그레이프 후르트, 멕시칸라임, 탱자 등은 극도의 감수성, 네블 오렌지, 레몬, 하 귤은 감수성, 온주밀감, 청견, 부지화, 팔삭, 봉깡, 일향하 등은 저항성이며 유자, 금감은 극도의 저항성이다. 분포형은 아시안형(Canker A) 병원균은 아시아 대륙, 태평양 및 인도양 섬, 남미, 미국 등 30여 국가에서 발생하지만 미국, 호주, 뉴질랜드, 남아프리카에서는 거의 박멸되었다. 하지만 미국 플로리다 일부, 호주의 북부지역, 브라질과 우루과이의 일부 지역에서는 아직도 간간히 발생이 보고되고 있다.

지난 2002년 국산 감귤의 대미수출을 가로막은 감귤궤양병의 병원균이 국내에선 *Xanthomonas axonopodis* 단 한 종류만 있는 것으로 확인됐다. 이러한 결과는 향후 미국 본토에 우리나라의 감귤 수출 재개를 위한 검역협상 과정에서 유용한 근거로 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 감귤 궤양병균은 *Xanthomonas axonopodis* 내에 5개의 병원형 (A, B, C, D, E 형)으로 분화되어 있어서 A형은 *pathovars citri*, B, C, D형은 *pathovars aurantifolii*, E형은 *pathovars citrumelo*으로 명명되져 왔다. 하지만 2006년도부터 Schaad 등에 의해서 3개의 taxon으로 재분류 되어 A형 균주들은 *Xanthomonas smithii subsp. citri*, B, C, D 형 균주들은 *X. fuscans subsp. aurantifolii*, E 형 균주들은 *X. alfalfae subsp. citromelo* 로 재명명 되어졌다. 이들 중 우리나라에 발생하는 병원균은 아시안형(canker A)으로서 가장 널리 분포하며 그 피해도 가장 심하다. 이 균은 막대모양으로 크기는 1.0~2.0×0.5×0.7 ㎛이며 단극모이고 생육 적온은 28-30℃이다.

본 연구에서 연구하고자 하는 *Xanthomonas* 속 병원균들은 Qurum sensing signal 물질로 polysaccharide인 Xanthan gum을 분비 하며, *Xanthomonas* 속 세포수 균형(cell density)을 조절 하는 수단으로 이용한다. 또한 Xanthan gum은 점질성이 매우 높은 물질인 biofilm으로 세포벽을 감싸고 있어 항균물질의 침투를 방해 하는 역할을 수행하므로 항균물질 저항

성을 갖게 되어 *Xanthomonas*를 퇴치하는 것은 매우 어렵다. *Xanthomonas*속 균들은 식물에 감염할 때 TAL (Transeripition Activater-Like) effector molecules을 plant cell에 injection 하며, 이 TAL effecter molecule은 최종적으로 세포의 nucleus 로 들어가 TAL binding site region을 가지고 있는 유전자들의 promotor region에 binding하게 된다. TAL effecter molecule의 binding site를 가지고 있는 유전자들은 세균의 virulence 관련 유전자들로 이 유전자들의 발현이 증가하면 병원성 세균의 감염이 매우 빠르게 진행된다.

농촌진흥청은 전 세계 11개 지역에서 추출한 이들 3종의 병원균 중 28개 표준균주를 도입해 국내 감귤류(온주 밀감)와 자몽·레몬·스위트오렌지 등 4개 기주를 대상으로 병원성 반응 여부를 살폈다. 그 결과 자몽과 레몬·스위트오렌지는 3종의 병원균 모두에서 궤양이 나타난 반면, 국내 감귤류는 A형 한 종류에 대해서만 병원성 반응을 보였다. 또 국내에서 분리된 112개의 균주에 대해서도 유전적 다양성을 분석한 결과 모두 A형인 것으로 확인됐다. 이는 국내에는 A형의 감귤궤양병균만이 존재하고 있다는 증거이며 향후 미국 본토수출 재개를 위한 검역협상 과정에서 예찰방제작업 등을 설명할 때 유용한 근거로 활용될 수 있을 뿐더러 다른 나라의 감귤류를 들여올 때도 검역협상에서 우리나라가 유리한 고지를 점유할 수 있는 근거가 된다. 이 같은 내용은 지난해 유럽 식물 병리 학회지에 실리는 등 학계에서도 공인받았다. 현재 우리나라에서는 2002년 미국수출 선적분 1,600여t 중 1,200여t에서 궤양병균이 검출돼 8년 넘게 계속된 대미수출이 전면 중단됐다. 다만 2007년 미국 알래스카지역 수출이 재개됐지만 본토수출은 여전히 금지된 상태다.

이러한 실정에서 미국에 이어 유럽에서 감귤류가 수입될 것으로 예상되면서 제주 감귤산업의 위기론이 제기되고 있다. 이런 위기에 대한 역발상으로 제주감귤을 유럽에 수출하자는 논의가 시작되었다. 현재 한·EU FTA 협상이 타결 되었다. 아직까지 EU산 오렌지의 경우 수입량이 한해 1천여 톤에 불과하지만, 시장이 개발될 경우 크게 증가할 전망이다. 제주감귤은 타격을 입을 수밖에 없지만 이런 가운데 제주감귤을 역으로 EU로 수출하기 위한 방안을 모색하고 있다. 미국에 비해 수출기준이 덜 까다로워 가능성이 있지만 궤양병이 걸림돌이 되고 있다. EU가 아시아지역에서만 발생하는 궤양병에 걸린 과일의 수입을 금지하고 있기 때문이다. 이런 문제를 해결하기 위해서는 감귤거점산지유통센터를 활용해, 궤양병이 발생하지 않은 지역을 찾고 해당 지역을 수출단지로 조성해 집중 관리하는 방안이 제시되었다. 하지만 궤양병은 현재 제주 전역에서 발생하고 있는 병해충이고, 모든 농가에 대한 모니터링을 실시해야 한다는 점에서 실제 수출로 이어지기까지는 상당한 시일이 소요될 전망이며 이를 비롯해 저장성과 가격 등의 제반 여건 충족이 관건으로 대두되고 있어 현실적인 수출방안이 도출될지 관심을 모으고 있다. 제주 감귤의 EU 수출시 가장 큰 문제점으로는 미국 수출 조건과 동일한 감귤 궤양병에 대한 차단 대책이 제시되었다. 이는 현재 EU 국가 가운데 스페인과 이탈리아 등에서 재배하는 오렌지가 감귤 궤양병에 감염되면 치명적인 결과를 초래하기 때문에, EU 수출시 궤양병에 대한 차단 대책이 마련되지 않고서는 수출 자체가 불가능하기 때문이다. 결국 궤양병 차단을 위해서는 감귤 거점 산지유통센터를 중심으로 감귤 농가를 모니터링 해 수확기에 맞춰 궤양병 미 발생 지역에 대해서만 수출하는 방안이 대두되고 있다.

현재까지 궤양병을 치료할 수 있는 약품으로는 화학 합성 항생제만이 유일한 치유책이나, 항생제는 인체에 유해하기 때문에 사용 금지되어 있으므로 이에 대한 해결책이 절실하다.

항생제 오남용에 의한 여러 종류의 항생제로 치료 할 수 없는 항생제 내성 균주들이 출현하고 있어 이에 대한 대책이 절실히 요구되고 있다. 항생제 내성 병원성 균 중 특히 문제가 되는 것은 메티실린 내성 연쇄 포도상 구균 (Methicillin Resistant *Straphylococcus Aureus*, MRSA), 메티실린 내성 엔터로코커스균 (Methicillin Resistant *Enterococcus*, MRE), 반코마이신 내성 연쇄상 구균(Vancomycin Resistant *Staphylococcus Aures*, VRSA) 및 반코마이신 내성 엔테로코커스(Vancomycin Resistant *Enterococcus*, VRE)등이 심각하다. 담수나 해양 양식에서도 화학합성 항생제를 사용할 수 없기 때문에 친환경 무독성 항생제 필요성이 절실히 요구된다.

따라서 본 연구에서는 인체에 무독한 친환경 무독성 항생제 개발을 통해 여러 문제점들의 해결책을 제시하고자 한다.

제 2 장 국내·외 기술 개발 현황

제 1 절 국내 기술 개발 현황

1. 국내 미생물 제제 개발 및 상용화 현황

현재 국내 개발된 미생물 제제는 *Bacillus thuringiensis*를 이용한 살충제와 *Paenibacillus polymixa, Bacillus subtilisa* 및 *Ampelomyces quisqualis* 등을 이용한 미생물 제제가 개발되어 있으나, 이는 일부 병해충에 한정되어 감귤 궤양병에는 이용이 되지 못하고 있는 실정이다. *Bacillus polymyxa*는 1965년부터 Gram(+)와 Gram(-)에 대하여 항생물질을 내는 것이 알려져 있다. 또한 식물 추출물 등을 이용하나 이는 높은 항생력을 나타내기 못하고 있다. 이외의 미생물 제제로 광합성 미생물을 이용한 비료와 정화용 미생물이 개발 되고 있으나, 생산 공정의 어려움과 일반 농가에서 높은 비용을 해결해야 하는 어려움이 있다.

이러한 어려움에도 불구하고 천연 항균물질은 각광을 받고 있는데, 이는 천연항균물질은 자연 분해가 빠르고, 병해충에 높은 효과를 나타내기 때문이다. 그러나 농가에서 손쉽게 배양할 수 있는 개방형 배양(open fermenter) 기술이 필요 하다. 저비용의 미생물 제재를 농가에서 간편하게 배양하여 필요시 마다 살포함으로서 농가의 소득 증대 및 안정적인 고품질의 과채류의 생산에 기여 할 수 있을 것이다. 현재 국내의 미생물 생산 기업은 아주 영세하고 연구 업적도 미미하여 천연 항생제 개발에 선진국들에 비해 매우 낙후되어 있는 상태이다. 특히 최근의 중국의 생물학적 제재 개발은 매우 놀라울 정도로 많은 연구비와 연구 인력을 투자하여 그 발전 속도는 눈이 어지러울 정도로 최근 SCI 논문의 50% 이상이 중국과학자들에 의한 것이다.

현재 농가에서는 간이 발효기 및 천연 항생 균주의 종균에 많은 관심을 갖고 있으며, 종균 구매 및 배양의 어려움을 해결하기 위하여 많은 노력을 기하고 있지만 이에 대한 대책 마련이 시급한 실정이다.

현재 친환경 농업의 보급으로 인하여, 기존 병해충에 대한 화학 농약의 사용이 줄어들고 있다. 허나 감귤, 참다래, 고추 등의 궤양병에는 현재 개발된 미생물 제제의 사용으로 높은 길항력을 기대하기 힘들다. 이에 화학 합성 농약을 사용이 줄어들지 않고 있으며, 이는 생산되는 과채류의 품질에 커다란 영향을 미치게 된다. 또한 화학 농약의 사용으로 인하여 토양이 오염되며, 이는 환경오염과 밀접한 관계를 갖고 있다.

그러므로 자연에서 쉽게 분해되어 토양에 잔류 축적되지 않으며, 항생제 저항성 출현 빈도가 낮은 천연 항생제의 필요성이 절실히 요구된다.

2. 인체 무독성 천연 항생제

- 지금 까지 주로 화학합성 항생제인 스트렙토마이신, 벤조티아디아졸, 퀴논계 항생제, 카바메이트계와 무기동제 등이 사용되고 있음.
- 무독성 천연 항생제가 필요로 함.

개념정립 단계	0	기업화 단계		기술 안정화 단계	

제 2 절 해외 기술 개발 현황

1. 세계적 수준

가. 미생물제재

(1) *Bacillus thurenginsis*가 살충제로 사용됨

(2) 필름에 의한 멀칭을 사용함

(3) 무살균 발효법을 이용하여 특정 종균만을 순수 배양하는 무살균 배양 방법은 개발 되지 않았음.

개념정립 단계		기업화 단계	0	기술 안정화 단계	

나. 인체 무독성 천연 항생제

(1) 천연 항생제 개발은 없음.

(2) 주로 화학합성 항생제인 스트렙토마이신, 오시테트라사이클린, 벤조티아디아졸, 퀴논계, 카바메이트계 항생제와 무기동제등이 사용되고 있음.

개념정립 단계	0	기업화 단계		기술 안정화 단계	

제 3 절 국내·외의 연구 현황

1. 국내

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
농촌진흥청 난지 농업연구소 감귤시험장	감귤 병해충 분리 동정 및 방제	진단 및 경영진단

2. 해외

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
일본과수시험장	감귤류 병해충, 분리, 동정 및 검출 방법	병해충 진단
미국 Univesity of Florida Division of Agriculture and Natural resources 및 감귤연구소	- 감귤류 병해충, 분리, 동정 및 검출 방법 및 manegement - 궤양병균 genomic sequencing	병충해관리 및 consultant
미국 University of CaliforniaDivision of Agriculture and Natural resources	감귤류 병해충, 분리, 동정 및 검출 방법 및 manegement	병충해관리 및 consultant
브라질 감귤 연구소	감귤류 병해충, 분리, 동정 및 검출 방법 및 manegement	병충해관리 및 consultant

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 제 1 세부과제

1. 연구 방법

가. 항균 물질 생산 균주의 분리 및 배양

(1) 항균 물질 생산 균주의 분리

(가) 광주광역시 및 전라남도 일원의 토양을 중심으로 시료를 채취 한 다음 균주를 배양하여, 신 균주를 분리 동정 하였으며, 이중 신규 균주에 대하여 NCBI에 등록 하였다.

(나) 또한 항균물질의 생산 균주를 각각 배양하여 이를 감귤 궤양병 및 식물 병원성 균주에 대한 항균력 확인을 하였다.

(다) 본 연구에 사용된 *Pseudomonas aeruginosa*는 항균 물질을 생산 하지만 인체에 대한 유해성이 있으므로 배양 후 살균 하여 사용 하거나 또는 살균 후 pH 2.0으로 낮추어 항균 물질을 침전시킨 후 농축 하여 이용 하였다.

나. 항균물질 생산 균주의 배양

토양으로부터 분리한 균주들의 물질 추출 및 활성 확인을 위하여, 균주 배양용 배지로는 Luria-Bertani 액체배지(LB : Tryptone 10g/ℓ, Yeast extract 5g/ℓ, NaCl 5g/ℓ), LB 한천배지(LB broth, 15% agar), 항균물질 생산 배지로는 M9 액체배지(Na2HPO4 6g/ℓ, KH2PO4 3g/ℓ, NH4Cl 1g/ℓ, NaCl 0.5g/ℓ, 50% glucose 40 mℓ/ℓ, 1M MgSO4·7H2O 1mℓ/ℓ, 0.5M CaCl2 1mℓ/ℓ)를 사용하였다. 항균력 확인은 감귤 궤양병 균주와 식물 병원성 균주를 37℃와 30℃에서 16시간 배양 후 LB-agar 배지에 도말한 다음 분리된 균주의 추출물을 paper-disc(직경:6mm)에 10㎕씩 적신 후 건조 시켜 도말된 배지에 올려놓은 다음 16~18시간 배양 후 투명 환의 여부로 항균물질 생산 균주들에 대한 항균물질의 생산 여부를 확인 하였다.

다. 균주의 선발

3년 동안 총 38종의 항균물질 생성 대상 균주를 선발 하였다. 이 균주들의 colony 형태는 모두 녹색에 가까운 형태로, 전형적인 *Pseudomonas* 속으로 추정 되었다.

라. 길항력 시험

분리 선발된 38종의 미생물의 항균 물질 생성 유무를 확인하기 위하여 먼저 궤양병의 균과 선발된 균들의 colony를 LB agar 배지에서 교차(crossing over)시험으로 길항력이 있는 지 확인 하였다.

마. 항균물질 추출

(1) HCL 침전법

선발된 균주들을 항균물질 생산 배지에서 30℃~37℃, 48~7hrs 배양한 다음 원

심분리(8000×g, 20min) 하여 세포를 제거 하고 상등액을 2N HCl로 pH 2.0으로 맞춘다음 4℃에서 하룻밤 정치 한후, 8000×g, 4℃ 20min 간 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 후 침전물을 최소 부피의 methanol에 현탁 하였다.

(2) Diethyl ether 추출법

배양액을 원심분리 하여 세포를 제거 한후 2X volume의 diethyl ether 로 추출한 다음 감압 농축기로 유기용매를 제거 한후 methanol에 녹여 시료로 사용 하였다.

바. 항균력 실험(Disc paper difusion 법)

추출된 항균물질을 0.6mm 3M disc paper에 10㎕(10mg/ml)씩 적신 후 실온에서 유기용매를 날려 보냈다. 병원균이 도말된 LB agar 배지에 Disc paper를 올려 하룻밤 배양한 다음 생육이 저해된 지역의 직경을 측정하여 항균활성 유무를 판단하였다.

사. TLC(Thin layer chromatography)

Thin layer plate는 C18 또는 Silica plate(Merk Co. Germany)를 사용 하였고 유기용매 전개 시스템은 분석과정에 따라서 달리 사용 하였다.

아. HPLC(High Performance Liquid Chromatography)

항균물질을 정제하기 위하여 Agilent 1200 serise를 이용 하였으며, coloum으로는 ZORBAX 300SB-C18, 4.6 × 250mm 5-micro을 이용하였다. 시료에 따라 전개하는 용매로는 순수한 Water, acetonitrile, methanol을 이용 하였으며, 이러한 용매를 gradient 조건을 달리하여 분획을 획득 하였다.

자. 선발된 균주의 동정

(1) Gram staining

균의 특성을 알기 위해 그람 염색을 시행하였으며, 그람염색은 각 세균의 세포벽을 이루고 있는 성분과 구조에 따라 다르게 나타나는데 그람양성세균의 경우 세포벽이 두꺼운 peptidoglycan layer와 풍부한 teicoic acid로 이루어져 있어서 organic decolorizer(탈색제)로 탈색시 쉽게 탈색되지 않으며 염색액 crystal violet이 계속 세균 내에 남아있어 보라색으로 염색된다. 반면 그람음성세균은 peptodoglycan layer가 단일 층으로 되어 있으며 세포벽이 지방성분이 풍부한 lipopolysaccharide(LPS)로 이루어져 있어 organic decolorizer(탈색제)에 의해 crystal violet이 쉽게 탈색되며 따라서 대조 염색액인 safranin(사프라닌)으로 염색되어 붉은색을 나타내는 원리이다. 우리는 그람 염색 결과 현미경 하에서 막대형이며 그람염색 negative(음성)인 것을 확인하였다.

(2) 16s rRNA 유전자 염기서열 분석

분리한 균주들을 동정하기 위하여 염색체 DNA를 분리한 다음 16s rRNA 유전자의 염기 서열을 분석 하였다. 그람 음성 universal primer를 사용하여 PCR 수행한 후 product를 T-vector와 연결하여 형질전환 하였다. 염기 서열 분석은 자동 DNA 염기 서열 분석기를 이용하였다. 염기서열을 분석한 후 NCBI BLAST에서 염기서열의 상동성을 분석 하였다.

차. 항균물질의 구조 분석

항균물질의 구조 분석을 하기 위하여 GC/MS, NMR, ESI-Mass 등을 실시하였다.

카. Antibiotic non-producing mutant 선발

Pseudomonas aeruginosa NO4(Kanamycin resistant, 50㎍/㎖) 균주가 생산하는 항균물질을 암호화 하는 유전자를 알기 위하여 mini-Tn5 transposon을 갖고 있는 *E. coli* λ pir(tetrasysline resistant 50㎍/㎖)을 double mating 한 다음 kan(50㎍/㎖)과 tet(50㎍/㎖)이 첨가된 LB agar배지에서 자란 colony들을 transconjugats로 선발 하고, 항균 물질 생산 유무로 mutant 인지 구별하였다.

타. MIC(Minimum inhibitory concentration), MBC(Minimum bactericidal concentration) test

항균물질의 최소 저해농도(MIC)와 살균 농도(MBC)를 알기 위하여 항균물질을 serial dilution 한 후 배양액에 첨가 하여 96 well plate에서 자란 병원균의 흡광도(OD : Optical Density)를 측정하여 최소 저해 농도를 결정 하였고(LD100), colony 개수(CFU, Colony Forming Unit)를 세어 측정 하였다.

2. 연구 결과

가. 항균물질 생산 균주의 선발

(1) 항균 물질 생산 균주의 분리

광주광역시일원의 토양을 중심으로 시료를 채취 한 다음 배지에 항균물질이 첨가된 배지에서 전 배양(pre-culture) 한 다음 선별 배지에서 미생물을 분리하였다.

(2) 균주의 선발

항균 활성물질을 생산하는 것으로 판단되어진 총 38종의 선발 균주들을 crossing over 방업으로 1차 선발을 하고 이들 균주를 항균물질 생산 배지인 M9 최소배지를 이용하여 30~37℃, 48~72 시간 150rpm으로 배양한 후 원심분리 하여 상등액으로부터 2 volume의 diethyl ether를 첨가 혼합 및 교반을 2~3시간 수행한 다음 유기 용매 층을 감압 농축기에서 농축한 다음 MeOH에 현탁시켜 이를 감귤 궤양병에 대한 항균 활성을 측정 하였다(표1). 표 1과 같이 항균 활성을 *Pseudomonas aeruginosa* NO3에서 가장 강력한 항균력을 보였으며, 다음으로 *Pseudomonas aeruginosa* NO4와 *Pseudomonas aeruginosa* NO6, *Pseudomonas aeruginosa* NO67에서 강한 항균력을 보였다.

그러므로 본 연구에서는 *Pseudomonas aeruginosa* NO3와 *Pseudomonas aeruginosa* NO4를 대표 균주로 선정하여 이 두 가지 균주들 분비하는 물질들의 특성과 물질 구조에 대하여 연구하기로 하였다.

(3) 감귤 궤양병에 대한 항균 물질을 생산하는 균주들의 동정

분리 선발된 균주들의 특성을 알기 위하여 먼저 형태적으로 colony color를 조사 하였고, 그다음 Gram negative(-) 균주들의 16s rRNA 유전자의 universal sequence(forward primer"5′-TGG CTC AGA ACG AAC GCT-3′" and Riverse primer "5′-CCC ACT GCT GCC TCC CGT-3′")를 Primer로 사용 하여 PCR Amplified sequencing을 수행하였으며(Solgent co. 의뢰), NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 BLAST의 database를 이용하여 염기서열을 비교 하였다. 분리된 균주들의 최종적인 분리 동정을 실시하였으며 분리된 균주들은 표준 균주와 16S rRNA 유전자와 98% 이상의 염기서열 상동성을 보여 각기 분리된 균주들의 최종 속명을 확정 하였다(표 1). 선발된 균주들은 감귤 궤양병을 비롯한 여러 식물 병원성 세균에 대하여 강력한 항균 작용을 나타냈다.

선발된 균주들의 16S rRNA gene의 염기서열에 의한 상동성 비교 결과 *Pseudomonas aeruginosa*에 가까운 미생물은 CJM, NO1, NO2, NO3, NO4, NO5,를 비롯하여 총 28

균주였으며, *Pseudomonas aeruginosa*가 대부분을 이루고 있었으나, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas reactans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas extremaustralis*, *Pseudomonas veronii*, *Pseudomonas nitroreducens*등이 각각 1균주씩 선발 되었고 *Pseudomonas veronii*가 2종 선발 되었다. 감귤 궤양병에 대한 항균력은 가장 많이 선별된 *Pseudomonas aeruginosa*에서 가장 우세하였으며(NO3, NO6, NO4, CJM), 특이하게 *Pseudomonas fluva* NO67은 이전에 *Psedomonas putida*로 분류 되었던 균으로 항균물질 고 분비균으로 알려졌다. 표 2는 분리된 균주들의 항균력과 항균물질의 TLC patterns을 비교 한 것이다. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1은 *Pseudomonas* 속 가운데 가장 먼저 genomic DNA sequenceing 이 미국 워싱턴대학(University of Washington)에 의해서 2001년에 완료 되었고, *Pseudomonas* 속 연구에서 model system으로 사용 되는 균주 이다. 표 2의 TLC patterns에서 보듯이 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1은 두 종류의 항균 물질을 생산 하는데 비하여 본 연구에서 분리된 균주들은 상대 적으로 여러 종류의 물질을 대량으로 생산하고 있고 또한 항균력도 높으며 보다 특이적인 반응이 연구 과정 중 관찰되었다. 본 연구에서 분리한 *Pseudomonas* NO1 ~ NO5, CJM, Bee, CaCl2 NO36, NO78~82 균주들은 표2의 TLC 전개 형태에서 보듯이 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1보다 3~4종류의 물질을 많이 분비함을 보여준다. 반면 *Pseudomonas oryzihabitans*를 비롯한 소수의 균들은 TLC상에서 나타난 spot이 없거나 1~2개로 적었고 항균 활성도 없었다. 다만 *Pseudomonas veronii* NO98은 다른 소수 균주들에 비해서 band spot도 많았고 항균 활성도 비교적 높았다(표2). 그림 1은 본 연구에서 분리한 항균물질을 생산하는 균주들의 16S rRNA gene의 sequence를 바탕으로 하여 phylogenic tree를 작성한 것이다. 표 2와 비교 하였을 때 TLC 상의 band patterns과 phylogenic tree상의 근연관계가 어느정도 존재함을 알수있었지만 큰 의미는 없었다. 그러나 *Pseudomonas aeruginosa*에 속하는 균주들은 phylogenic tree상 근연 관계에 있음을 확인 하였다.

Table 1. Identification and antibiotic activity of isolated strain against *Xanthomonas*

Isolated	Identification Strain(a)	inhibitin zone (mm)	growth inhibition(b)
1	*Pseudomonas aeruginosa* CJM	18	++
2	*Pseudomonas aeruginosa* N01	10	++
3	*Pseudomonas aeruginosa* N02	9	+
4	*Pseudomonas aeruginosa* N03	24	+++
5	*Pseudomonas aeruginosa* N04	22	++
6	*Pseudomonas aeruginosa* N05	19	++
7	*Pseudomonas aeruginosa* N06	20	+++
8	*Pseudomonas fluorescens* N07	7	++
9	*Pseudomonas reactans* N08	1	+
10	*Pseudomonas aeruginosa* C-1	15	++
11	*Pseudomonas aeruginosa* K2	8	++
12	*Pseudomonas aeruginosa* 57	16	++
13	*Pseudomonas fluva* 67	22	+++
14	*Pseudomonas aeruginosa* ga80	18	++
15	*Pseudomonas aeruginosa* ga78	16	++
16	*Pseudomonas aeruginosa* ga82	13	+
17	*Pseudomonas nitroreducens* h-b-2	13	+
18	*Pseudomonas oryzihabitans* ga52	15	++
19	*Pseudomonas putida* ga83	2	+
20	*Pseudomonas veronii* ga93	4	+
21	*Pseudomonas sp. SL 2*	N/D	N/D
22	*Pseudomonas sp. SL 3*	N/D	N/D
23	*Pseudomonas sp. HS 1-1*	N/D	N/D
24	*Pseudomonas sp. HS 1-2*	N/D	N/D
25	*Pseudomonas aeruginosa HS 6-3*	N/D	N/D
26	*Pseudomonas areuginosa HS 7*	N/D	N/D
27	*Pseudomonas areuginosa HS 8-2*	N/D	N/D
28	*Pseudomonas areuginosa HS 8-2-1*	N/D	N/D
29	*Pseudomonas syringae CJW 7*	N/D	N/D
30	*Pseudomonas areuginosa Bee*	14	++
31	*Pseudomonas areuginosa 36*	10	+
32	*Pseudomonas areuginosa 79*	8	++
33	*Pseudomonas areuginosa PA01*	14	+
34	*Pseudomonas areuginosa 99*	N/D	N/D

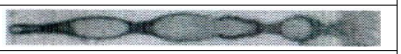
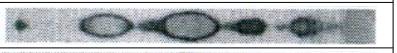
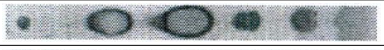
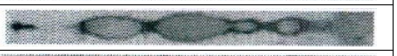
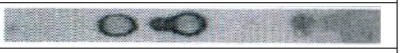
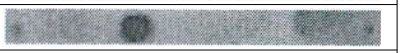
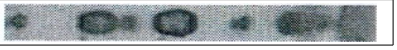
※ growth inhibition zone: +++ strong inhibition, ++ medium inhibition, + weak inhibition

a : Identufication of screended strains compare with NCBI BLAST

b : Compair with *Pseudomonas areuginosa PA01*

N/D : Not determined

Table 2 . Antibiotic activity and patterns of TLC of isolated strains

STRAIN INFO	Lab name	Inhibition(mm)	Thin Layer Chromatography
Pseudomonas sp.	SL2	N/D	N/D
	SL3	N/D	N/D
	HS 1-1	N/D	N/D
	HS 1-2	N/D	N/D
Pseudomonas aeruginosa	NO1	15	
	NO2	13	
	NO3	16	
	NO4	13	
	NO5	15	
	NO6	16	
	CJM 01	14	
	Bee	14	
	PA01	14	
	C-1	10	N/D
	K2	9	
	CaCl2	16	
	36	10	
	78	9	
	79	8	
	81	11	
	82	11	
	HS 6-3	N/D	N/D
	HS 7	N/D	N/D
	HS 8-2	N/D	N/D
	HS 8-2-1	N/D	N/D
Pseudomonas extremaustralis	84	0	
Pseudomonas fluorescens	NO7	0	
Pseudomonas nitroreducens	HB-S	0	
Pseudomonas oryzihabitans	52	0	
Pseudomonas putida	83	N/D	N/D
Pseudomonas reactans	NO8	0	
Pseudomonas syringae	CJW7	N/D	N/D
Pseudomonas veronii	93	0	
	98	12	

※ TLC : Stained With 50% H_2SO_4 solution.

N/D : Not determined

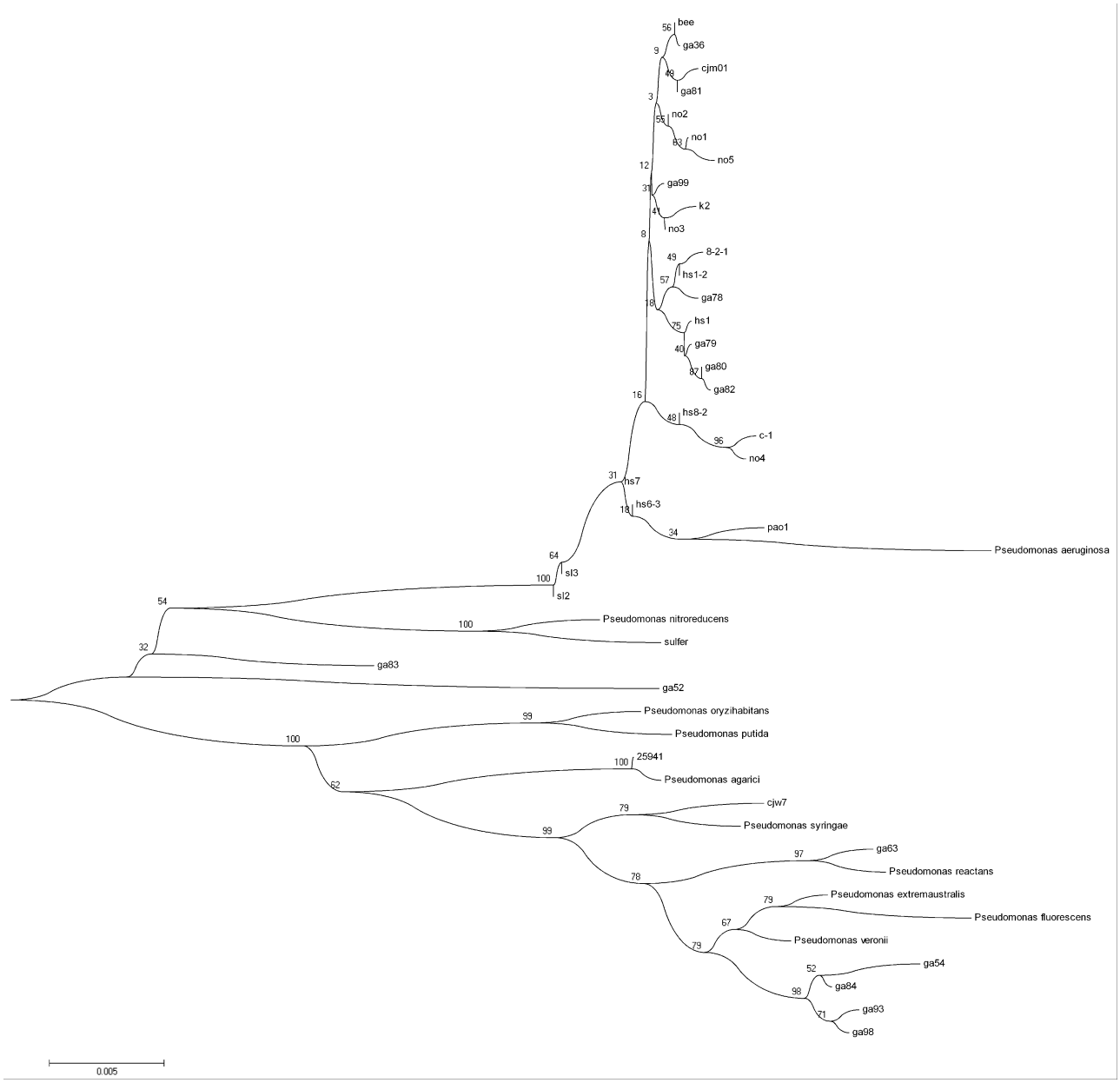


Fig 1. Phylogenic tree of isolated antibiotics producing *Pseudomonas sp.*

나. 항균 활성물질의 특성 규명

(1) *Pseudomonas aeruginosa* NO3 항균 물질 구조 분석

분리한 13균주 중 가장 활성이 우수한 균주인 *Pseudomonas aeruginosa* NO3를 선정하여 최적배양 조건을 확립하였다. 탄소원으로 glucose가, 질소원으로는 NH_4Cl가 가장 우수하였으며 최적온도는 37℃, 최적 pH는 7.0였다. 연구결과 glucose, $MgSO_4$ 및 $CaCl_2$가 항균물질 생산에 영향을 끼치는 것을 알고, 이들의 최적 농도를 조사하였다.

(가) glucose 농도에 따른 TLC상의 pattern 및 항균활성

M9 최소배지에 들어가는 glucose를 1L 당 0g, 1.25g, 2.0g, 4.0g, 8.0g, 20g을 각각 첨가 후 37℃에서 150rpm으로 32시간 배양한 다음 상등액을 ethyl ether로 추출한 후 TLC를 행하였다. TLC는 silica와 C18 plate를 각각 사용하였으며 전개용매조건은 silica plate의 경우 클로로포름 : 메탄올 : 물 = 65 : 25 : 4, C18 plate의 경우에는 메탄올 : 아세토나이트릴 : 물 = 50 : 40 : 10 이었으며 254nm, 365nm에서 spot를 확인한 후 anisaldehyde로 발색하였다. glucose 농도에 따른 활성 결과 2% 접종 시 가장 높은 항균 활성을 나타내었고 TLC에서 0.8%에서 가장 진한 spot을 확인하였다.

(나) $MgSO_4$ 농도에 따른 TLC상의 pattern 및 항균활성

$MgSO_4$ 농도에 따른 변화를 관찰하였다. M9배지 100mℓ에 1M $MgSO_4$를 0, 50, 100, 200, 500, 1000㎕를 첨가하여 A)에서와 같이 배양한 후 항균활성과 TLC를 수행하였다. TLC 조건은 glucose와 같았다. $MgSO_4$ 농도에 따른 활성은 MgSO4의 농도가 증가함에 따라 활성이 높았다(그림 4).

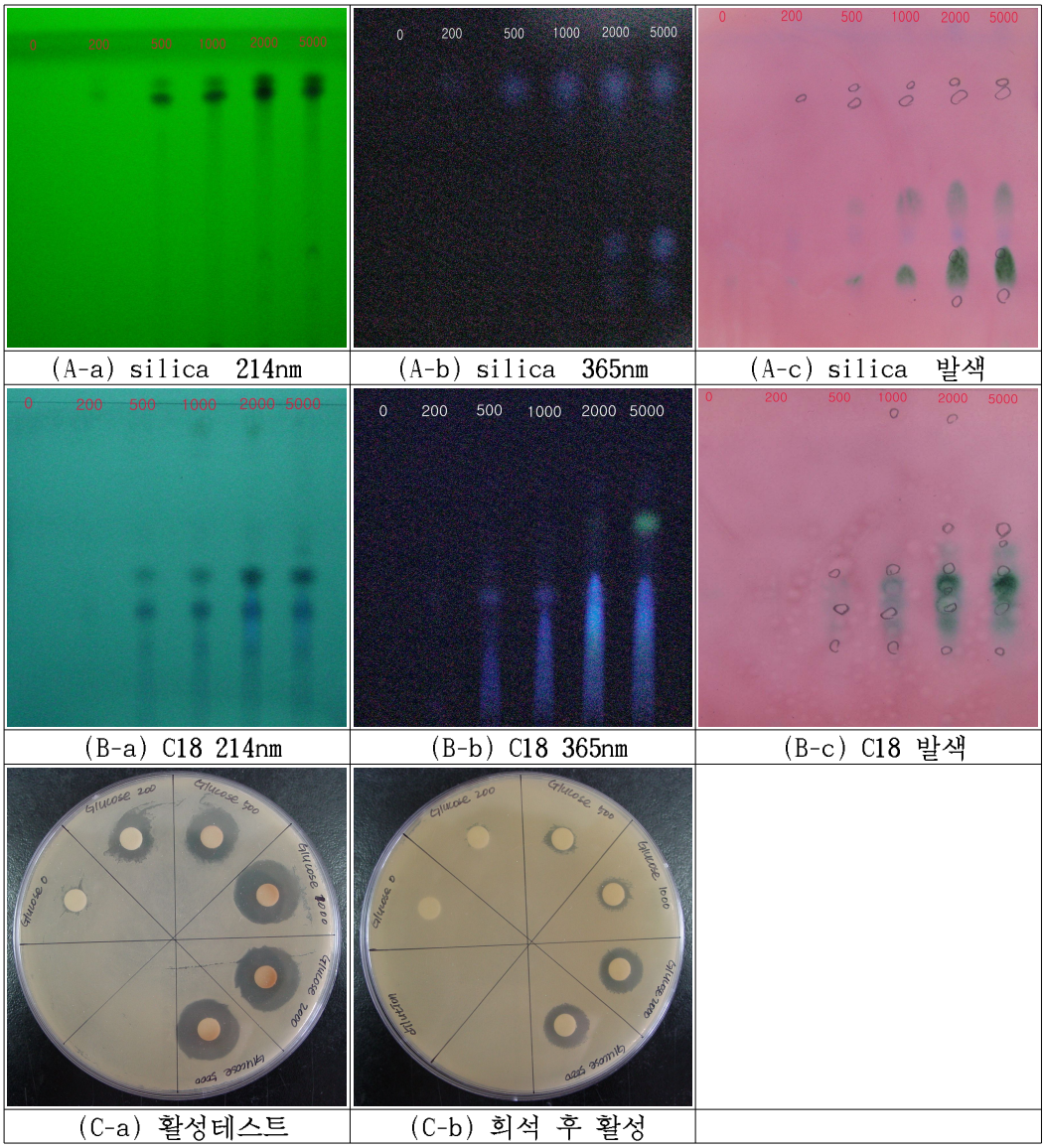


Fig 2. TLC patterns on the concentration of $MgSO_4$ and antibiotic activity

(다) $CaCl_2$ 농도에 따른 TLC상의 pattern 및 항균활성

$CaCl_2$ 농도에 따른 항균 활성 변화를 관찰하였다. M9배지 10㎖에 1M $CaCl_2$를 0, 50, 100, 200, 500, 1000㎕를 첨가 후 활성과 TLC를 확인하였다. TLC 조건은 glucose와 같았다. $CaCl_2$의 농도에 따른 활성 결과 $CaCl_2$를 넣지 않았을 때와 100㎕ 첨가 시 활성이 강함을 확인하였다(그림 3).

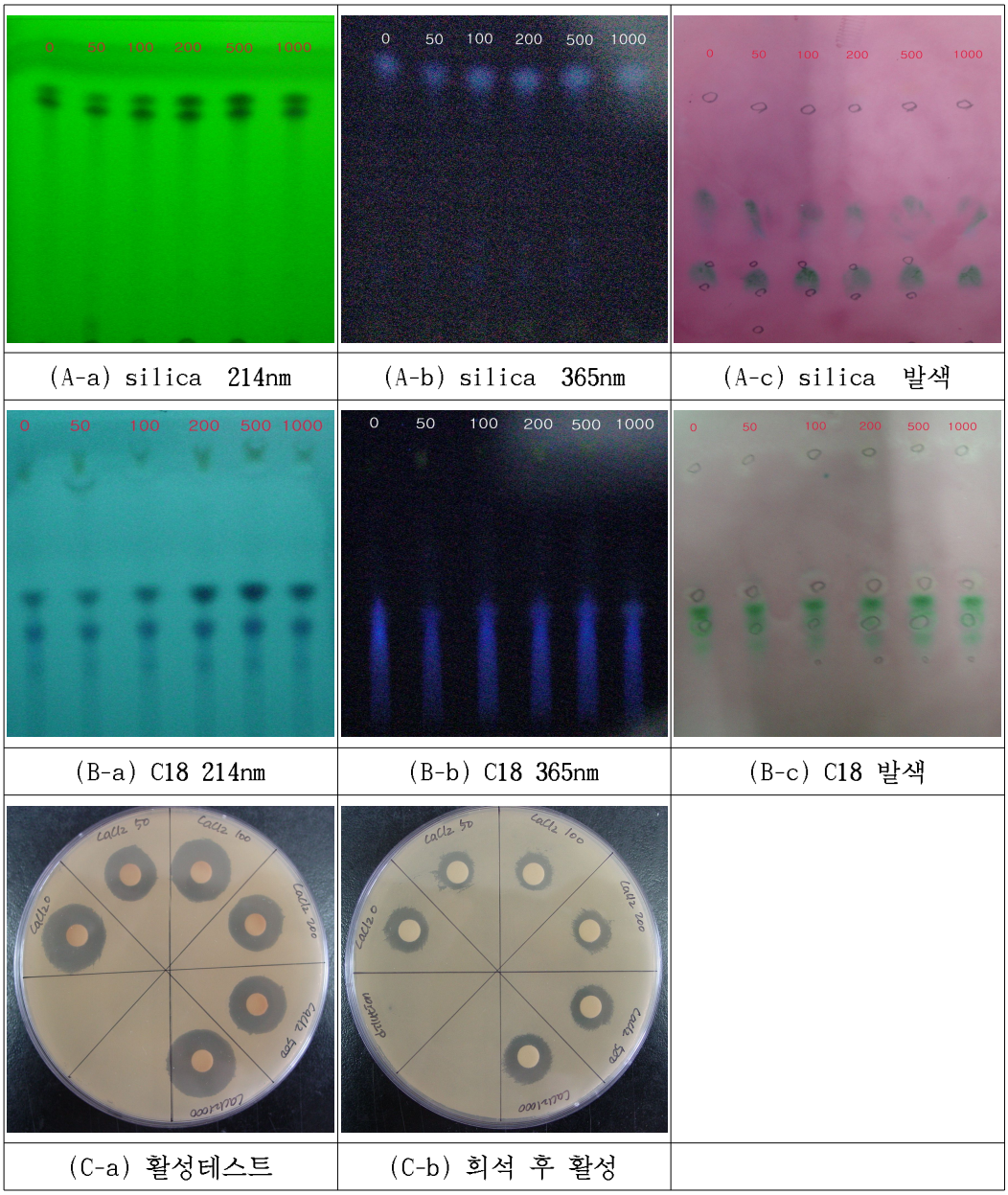
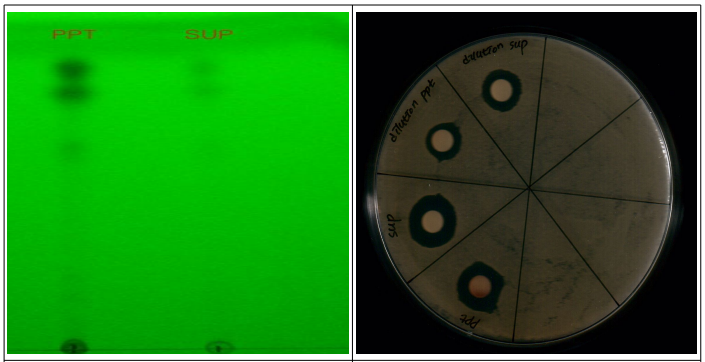


Fig 3. TLC patterns on the concentration of $CaCl_2$ and antibiotic activity

(라) 배양 후 원심분리 전·후 항균물질 활성도 비교

Pseudomonas aeruginosa NO3를 최소배지에 배양 후 세포(cell)를 제거하지 않은 것과 세포를 제거한 것을 각각 pH 2.0으로 맞춘 다음 활성과 spot의 변화를 측정하였다. 활성 테스트 결과 침전물을 제거하고 상등액만 pH 2.0으로 맞추었을 때 활성이 강함을 확인하였다(그림 4).



(A-a) silica 254nm	활성측정

Fig 4. Compair of TLC pattern and antibiotic activity
TLC pattern lane 1 : before centrifugation, lane 2 : after centrifugation
Antibiotic activity ppt before centrifugation, sup after centrifugation

(마) 항균물질의 최적 용매

Pseudomonas aeruginosa N03 균주가 생산하는 항균물질을 농축 후 용매에 따른 항균 효과를 조사하였다. 여러 가지 용매를 사용하여 항균물질을 녹인 다음 TLC 및 항균활성을 측정하여 최적 용매를 결정하였다. 사용한 용매는 물, 에탄올, 메탄올, 핵산, 에틸아세테이트, 클로로포름이었으며 항균물질은 메탄올에서 항균 활성이 가장 뛰어났다(그림 5).

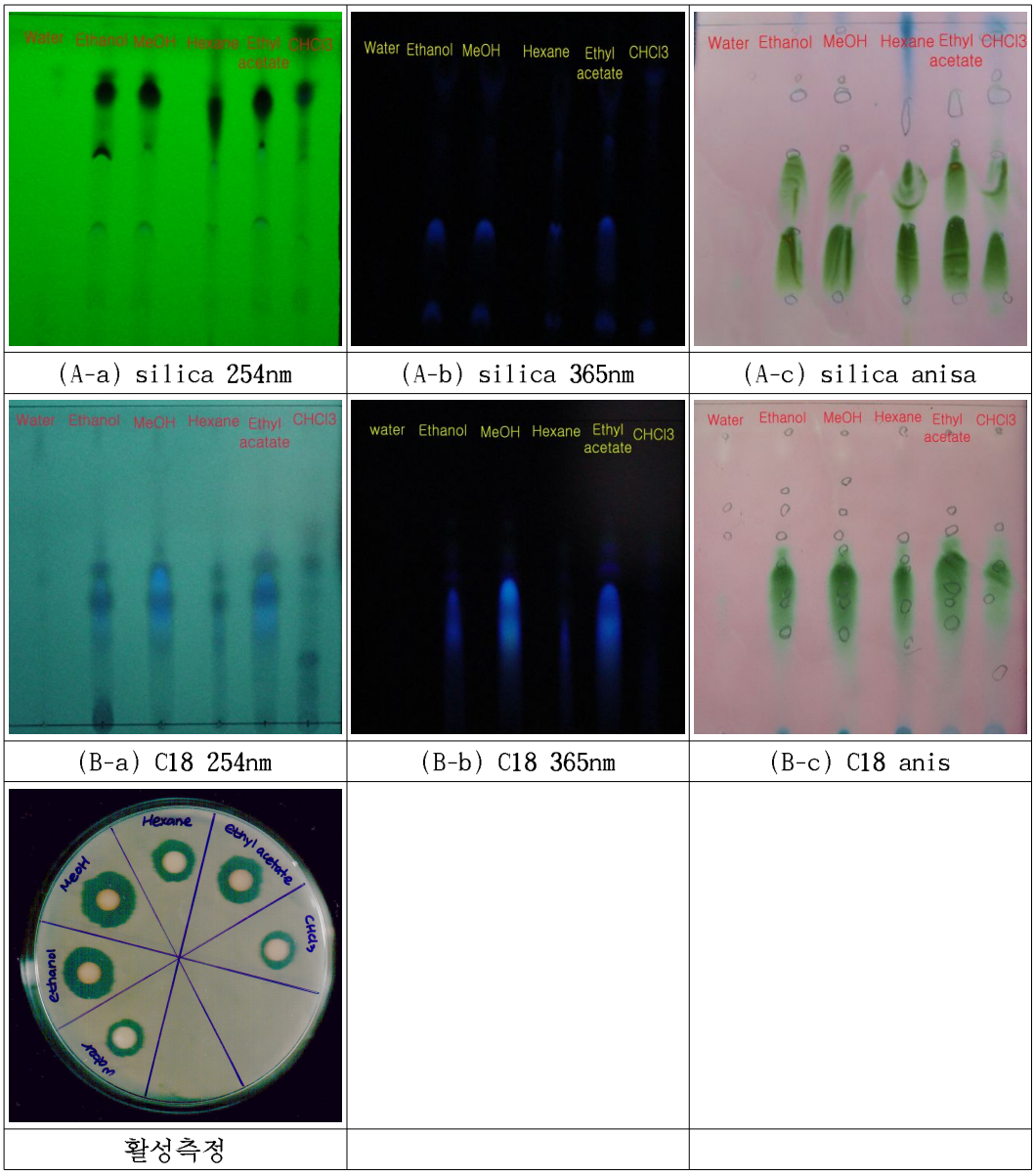


Fig 5. effect of various solvent on the antibiotic activity against *Xanthomonas sp.*

(바) 항균물질의 pH에 따른 효과

항균물질을 추출하여 pH에 따른 TLC및 생리활성을 측정한 결과 pH2에서 pH12까지 특별한 차이점을 찾을 수 없었다. 이 실험으로 *Pseudomonas aeruginosa* NO3가 생산하는 항균물질은 pH에 영향을 받지 않음을 알 수 있다 (그림 6).

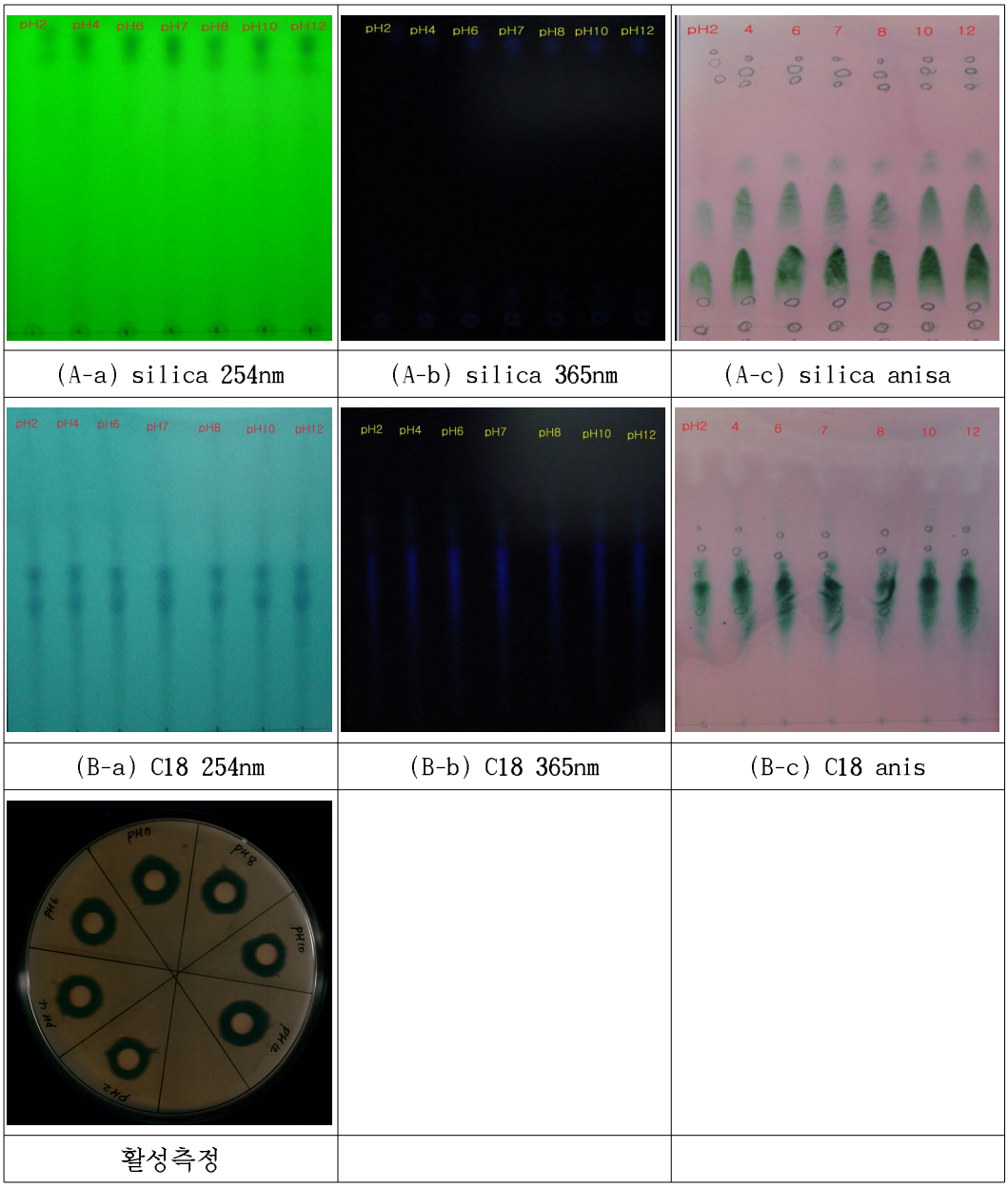


Fig 6. Effect of pH on the antibiotic activity against *Xanthomonas sp.*

(사) 항균 물질 분리 및 정제

① Medium pressure liquid chromatography

㉮ MPLC 1st liquid chromatography

에틸에테르로 추출한 NO3 항균물질을 MPLC를 통하여 분리 정제하였다. 첫 번째로 silica 40B colume을 이용하여 클로로포름 : 메탄올 : 물을 4000:20:0.8의 비율로 혼합 한 다음 실험을 수행하였다. 용매는 분당 6ml씩 흘려주었으며 3분마다 분획을 받았다. 흘려준 용매는 메탄올 양을 기울기(0~100%)를 주었고 TLC를 통하여 spot의 변화를 관찰하였다. TLC 조건은 클로로포름:메탄올:물=65:25:4 이며 silica TLC를 사용해 214nm 에서 spot을 확인하였다(그림 7).

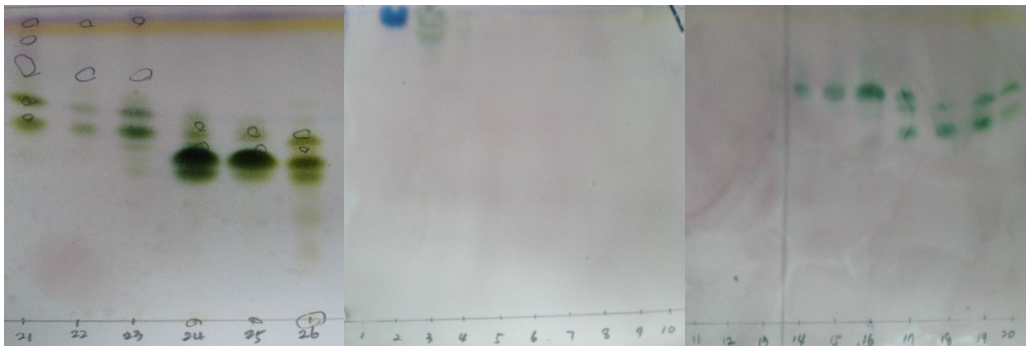


Fig 7. Effect of MPLC 1st liquid chromatography on the TLC patterns

TLC 결과 어느 정도의 분리가 되었지만 한 개의 분획에서 여러 spot이 나타났다. 이렇게 모은 분획을 활성테스트 한 결과 3, 4, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 분획에서 활성이 강하게 나타남을 확인하였다(그림 8).

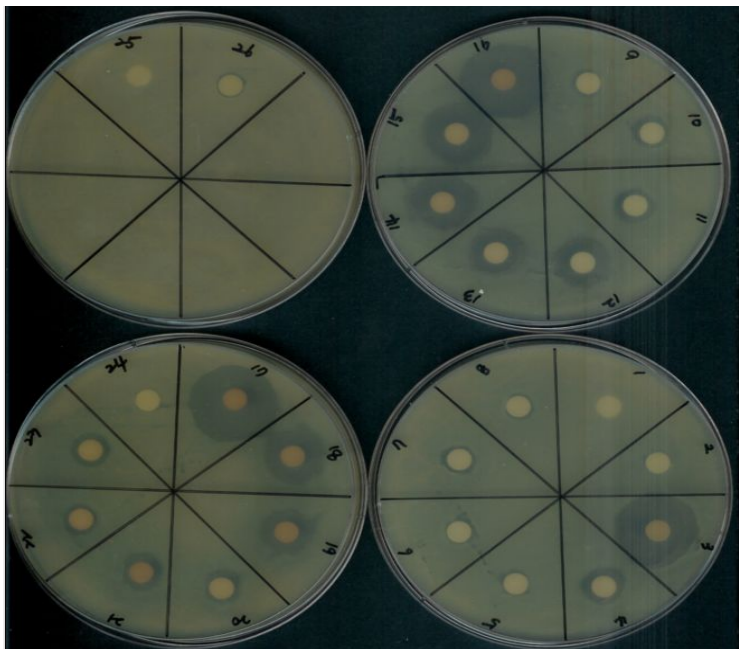


Fig 8. Effect of MPLC 1st liquid chromatography on the antibiotic activity against *Xanthomonas sp.*

㉡ MPLC 2nd liquid chromatography

앞서 첫 번째 MPLC를 수행하여 가장 활성이 강한 17,18 분획만을 모아 다시 MPLC를 수행하였다. 두 번째로는 C18 40B column을 사용하여 17,18 분획을 분리 정제하였다. 용매조건은 아세토나이트릴 : 물 : 메탄올 = 1000 : 600 : 5 이며 메탄올을 gradient주었으며 이 용매를 분당 4ml씩 흘려주었다. 분획을 받을 후 TLC를 통하여 spot을 확인하였으며 조건은 C18 plate에 메탄올 : 아세토나이트릴 : 물 = 50 : 40 : 10을 전개시켰다. 그 후 분획을 농축하여 활성테스트를 수행하였다(그림 9).

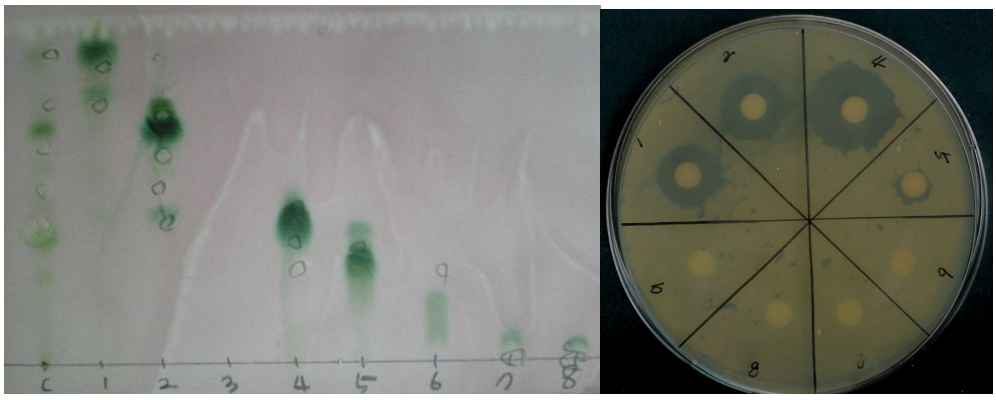


Fig 9. Effect of MPLC 1st liquid chromatography on the and patterns of TLC and antibiotic activity

C18 40B coulmn을 사용하여 분리한 결과 1,2,4 분획의 활성이 나타남을 확인 하였다.이 중 활성이 가장 큰 4번 분획을 다시 MPLC를 수행하였다. 세 번째 MPLC는 C18 40A coulmn을 사용하였으며 용매조건은 아세토나이트릴 : 물 : 메탄올 = 45 : 10 : 5로 gradient를 주지않고 분당 2ml씩 일정하게 흘려주며 spot의 변화를 관찰하였다(그림 10).

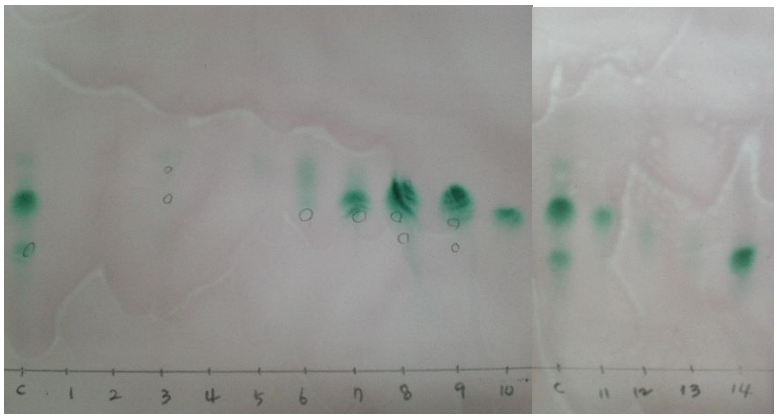


Fig 10. Effect of MPLC 2nd liquid chromatography on the and patterns of TLC and antibiotic activity

② High Performance Liquid Chromatography

MPLC 후 TLC를 MeOH : ACN : water = 50:40:10(C18) 조건으로 전개하여 spot, 활성테스트를 통하여 3,6,7,8,9,10,11 분획에 활성이 있음을 확인하였다. 이 중 단일 spot으로 보이는 10번 분획을 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 통하여 분리하였다. 10번 분획 HPLC 분리조건은 메탄올 : 아세토나이트릴 : 물 = 9 : 1 : 1을 분당 1ml씩 흘려주었으며 peak의 변화는 214nm에서 관찰하였다(그림 11).

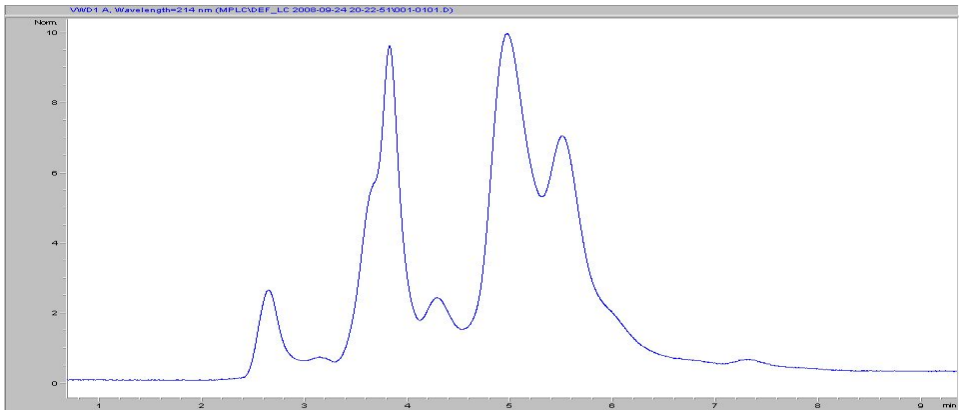


Fig 11. Patterns of HPLC of fraction number 10.

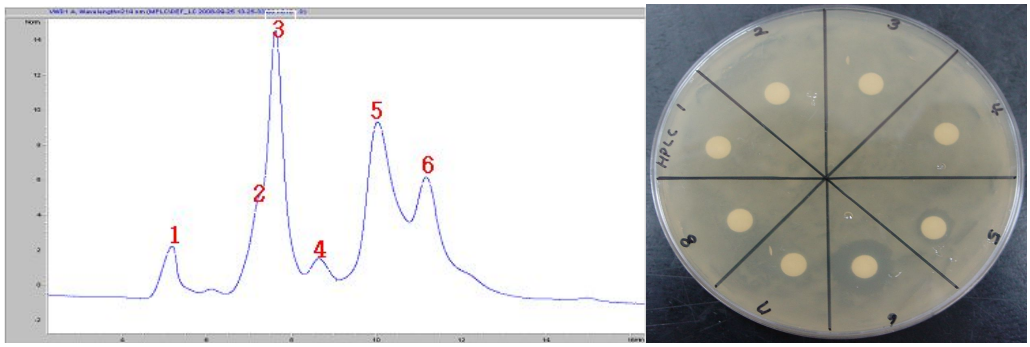


Fig 12. Patterns of HPLC of fraction number 10 and antibiotic activity against *Xanthomonas sp.*

HPLC 결과 peak의 간격이 좁아 용매를 분당 0.5ml씩 흘려주며 다시 peak의 pattern을 확인한 결과 5,6번 peak에서 활성이 있음을 확인하여(그림 14) 5, 6번 peak를 모아 다른 조건에서 HPLC를 수행하였다. 활성이 있는 peak를 메탄올 : 아세토나이트릴 : 물 = 65 : 25 : 4로 분당 0.5ml씩 흘려주었으며 peak의 변화는 214nm에서 확인하였다. 그 결과 4개의 peak가 나타났으며 1번과 4번 peak 에서 활성을 확인하였다(그림 13).

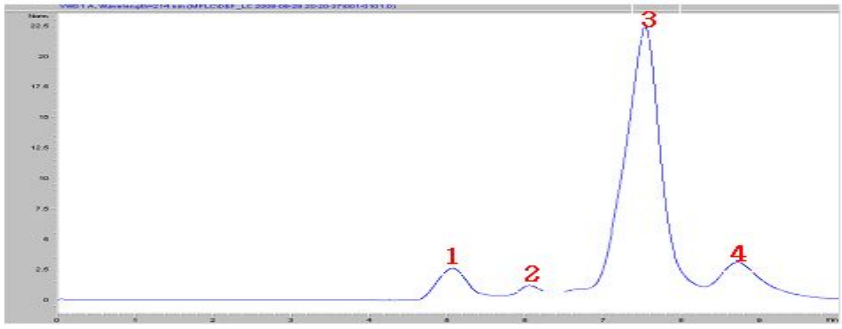


Fig 13. Re-HPLC of peak number 5 and 6
(elution condition : 70%~95% acetonitrile gradient).

현재 그림 12에서 얻은 분획 1번과 4번을 `HNMR과 `13C NMR, `H-`H COSY, HMQC, HMBC 및 ESI-mass 의 분석 중에 있다.

(아) *Pseudomonas aeruginosa* NO3 가 생산하는 항균물질의 최소저해농도

① 항균 물질의 최소 저해 농도(MIC : Minimum Inhibitory Concentration)를 결정하기 위하여 *Pseudomonas aeruginosa* NO3에서 추출한 항균물질과 기존의 감귤궤양병 치료제로 사용하고 있는 streptomycin과 비교하여 실험을 실시하였다.

두 sample의 농도는 10㎍/ml로 동일하며 각각의 sample을 일정 농도별로 희석하여 세균의 성장여부를 살펴보았다. spectrophotometer로 600nm O.D값을 측정하여 희석 농도에 따른 변화를 확인하였다.

㉮ MIC측정 방법

10ug/ml 농도의 streptomycin과 NO3 항균물질을 stepwise 2-fold dilution 방법으로 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512까지 희석하였다.

YNA 액체 배지에 희석한 sample 100㎕와 감귤궤양병 균주인 *Xanthomonas* 100㎕를 넣고 24시간 배양 후 96well plate에 옮긴 후 spectrophotometer로 600nm에서 O.D값을 측정하였다.

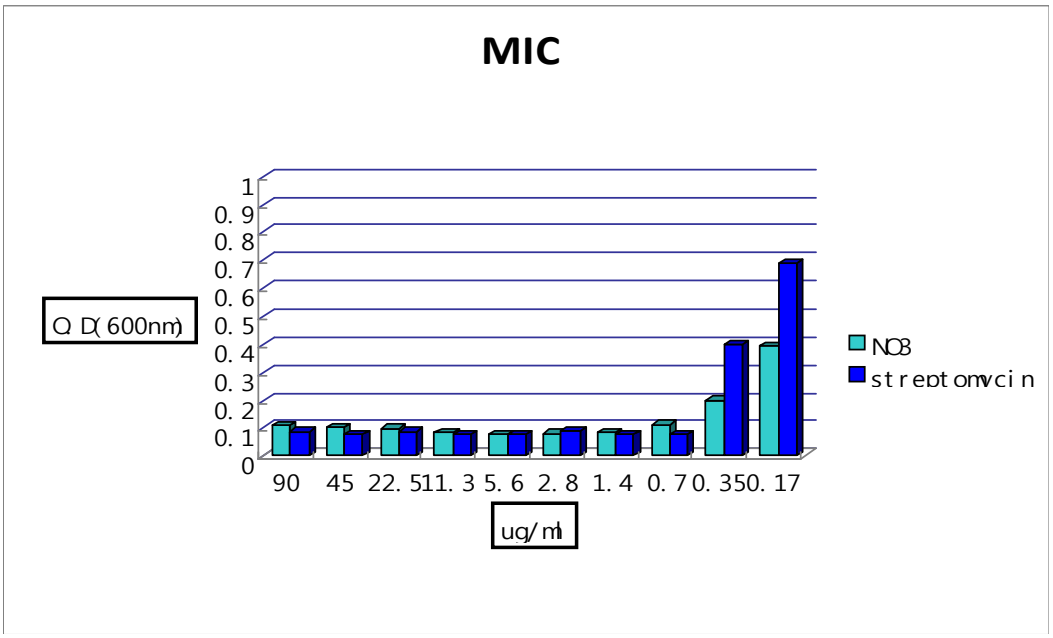


Fig14. Minimum inhibitory concentration of NO3 extracted antibiotics and streptomycin.

MIC 측정 결과 *Pseudomonas aeruginosa* NO3에서 추출한 Antibiotics 물질의 MIC값은 0.17ug/ml 이며 streptomycin의 MIC값은 0.35㎍/ml로 *Pseudomonas aeruginosa* NO3에서 추출한 Antibiotics 물질이 2배 정도 강한 생리 활성을 보였다(그림 14).

나. *Pseudomonas aeruginosa* N04의 항균 물질 구조 분석

Pseudomonas aeruginosa 속 미생물은 항균 작용을 갖는 Rhamnolipid를 생산 하는 것으로 잘 알려져 있다. *Pseudomonas aeruginosa*는 연구자와 미생물의 종류에 따라서 약 58여종의 rhamnolipid를 생산하는 것으로 보고고 되었다. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 균주는 본 연구 결과 TLC 상에서 두 종류의 Rhamnolipid를 생산하는 것으로 관찰되었다. 본 연구에서 선별된 *Pseudomonas aeruginosa* N04의 항균 물질을 분석하고자 하였다.

(1) 항균 물질 분리 정제

Pseudomonas aeruginosa N04의 항균물질을 분석하기 위하여 M9최소배지에서 항균 물질을 생산 하였다. M9 최소배지에서 48시간 배양한 후 원심분리 하여 상등액을 2N HCL로 pH 2.0으로 조정한 다음 원심분리 하여 침전물을 얻고 이를 Methanol에 녹인후 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하였다. 용출용매로는 methanol을 이용하였고, 항균활성을 나타내는 활성분획은 RP-TLC (90% methanol)로 monitoring 하였다(그림 15). 이때 TLC는 cellium molybdate spray reagent (10 g cerium sulfate, 25 g ammonium hepamolybdate, 100 ml sulfuric acid, 900 ml water)를 이용하여 관찰하였다.

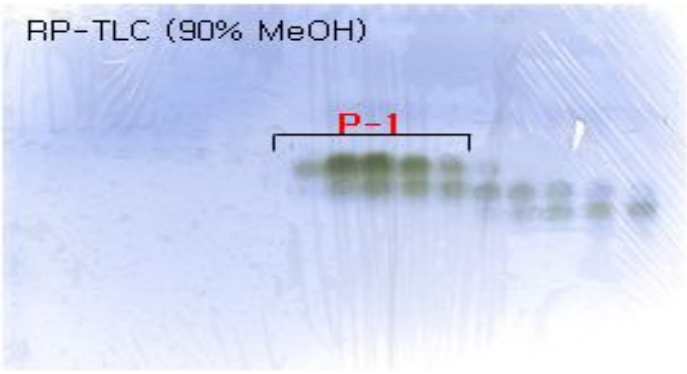
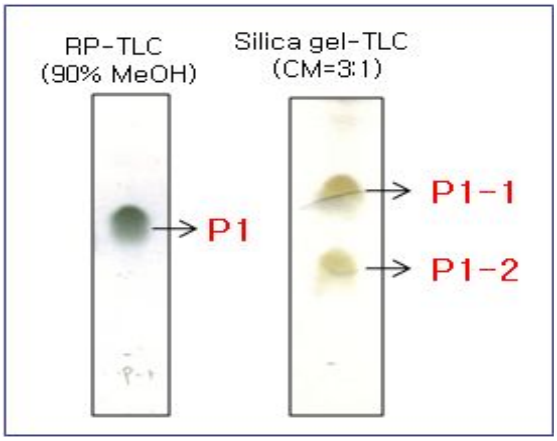


Fig 15. Patterns of Rf-TLC of fractions of the sephadex LH-20 column chromatography.

그림 15에서 표시된 P-1분획을 농축한 후, 60~80% 메탄올을 용출 용매로 C-18 Sep-pak cartridge를 이용하여 solid phase extraction을 수행하였다(그림 2).

그림 16에서 보이는 바와 같이 RP-TLC 상에서는 단일 물질인 것으로 나타났으나 silica gel TLC (chloroform-methanol = 3:1) 분석에서는 두 화합물의 혼합물로 나타났다. 따라서 chloroform-methanol = 3:1을 전개용매로 이용하여 preparative silica gel TLC를 수행하였으며, 그 결과 P1-1 (13 mg)과 P1-2 (17 mg)를 정제할 수 있었다. 분리 정제 과정을 그림 17에 도시하였다.



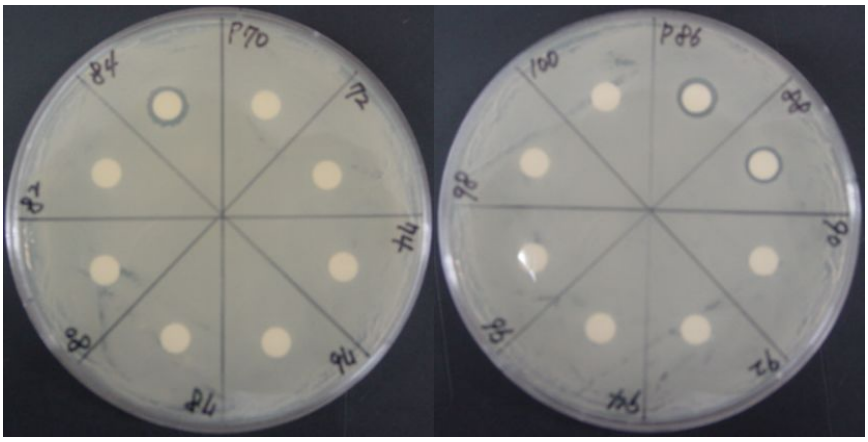


Fig 16. Patterns of TLC of fractions of the C-18 sep-pak and Antibiotic test (left : no 84 is p1-1, right : no 86-88 is p1-2)

Acidified pellet of calture broth

↓

LH-20 column chromatography

↓ Eluted with MeOH

C-18 Soild phase extraction

↓ Eluted with 60~80% MeOH

Silica gel TLC

↓ CHCl3:MeOH(3:1)

P1-1(13mg), P1-2(17mg)

Fig 17. Purification procedure of Antibiotic compounds from culture broth

배양액을 pH 2.0 으로 맞춘 다음 원심분리 하여 얻은 상등액으로부터 다음의 정제 과정을 통하여 1종의 활성성분을 분리, 정제하였다. 상등액을 를 methanol에 녹인 후, methanol을 용매로 사용하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하였다. 그 결과 두 개의 분획 Fr. I과 Fr. II을 얻었다. Fr. I은 강한 항균활성을 나타내었고, TLC 분석 결과 앞의 pellet으로부터 분리한 두 화합물과 동일한 것으로 규명되었다. Fr. II는 Fr. I과는 다른 양상을 나타내었으며, 항균활성은 다소 약한 활성을 나타내었다. Fr. II로부터 항균활성성분을 분리하기 위하여 preparative HPLC (column, ODS column 10 x 150 mm; solvent, 60 → 80% methanol gradient; flow rate, 3 ml/min)를 수행하였다(그림 18). 그 결과 화합물 sup 4 (2 mg)를 정제하였다. 화합물 sup 4는 230과 325 nm에서 UV최대흡수치를 나타내어 앞의 P1-1과 P1-2와는 다른 계열의 화합물임을 알 수 있었다(그림 19). 화합물 sup 4의 분리 정제 과정을 그림 20에 나타내었다.

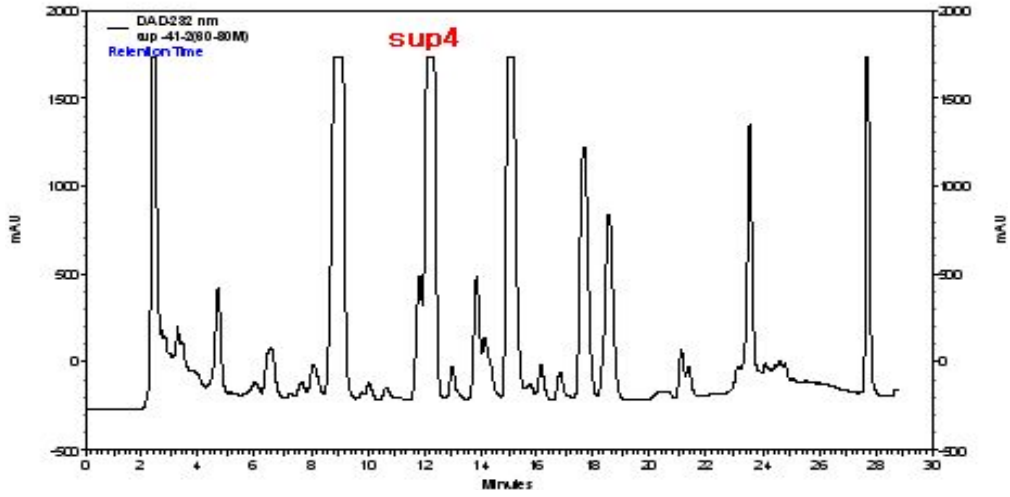


Fig 18. Profile of HPLC of compound sup4 fraction.

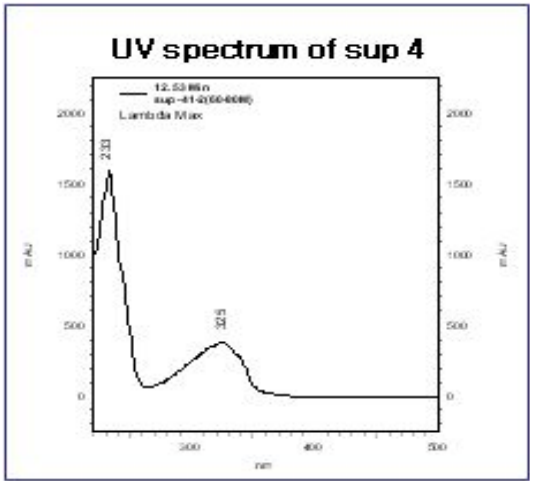


Fig 19. UV spectrum of compound sup 4

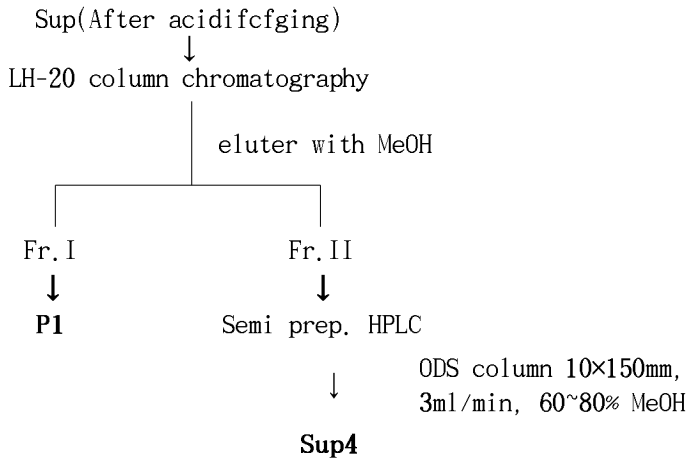


Fig 20. Purification procedure for antibiotic compounds.

(2) 활성성분의 화학구조 해석

(가) 화합물 P1-1의 화학구조 해석

① NMR spectrum의 측정 및 해석

활성성분 P1-1의 화학구조를 규명하기 위하여 DMSO-d_6에 녹여 ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, ^{1}H-^{1}H COSY, HMQC 및 HMBC를 측정, 해석하였다.

^{1}H NMR spectrum의 측정 및 해석: ^{1}H NMR spectrum (그림 21)을 측정한 결과, 5.2 ~ 3.1 ppm 사이에 7개의 oxygenated methine proton이 관찰되었으며, 이들 중에 4.61 ppm의 수소는 α-anomeric proton이었다. 또한, 2.39 및 2.26 ppm에서 두 개의 methylene proton, 1.50, 1.45, 1.24 ppm에서 12개의 methylene proton, 1.08 ppm에서 doublet methyl 및 0.85 ppm에서 두 개의 triplet methyl proton이 관찰되었다.

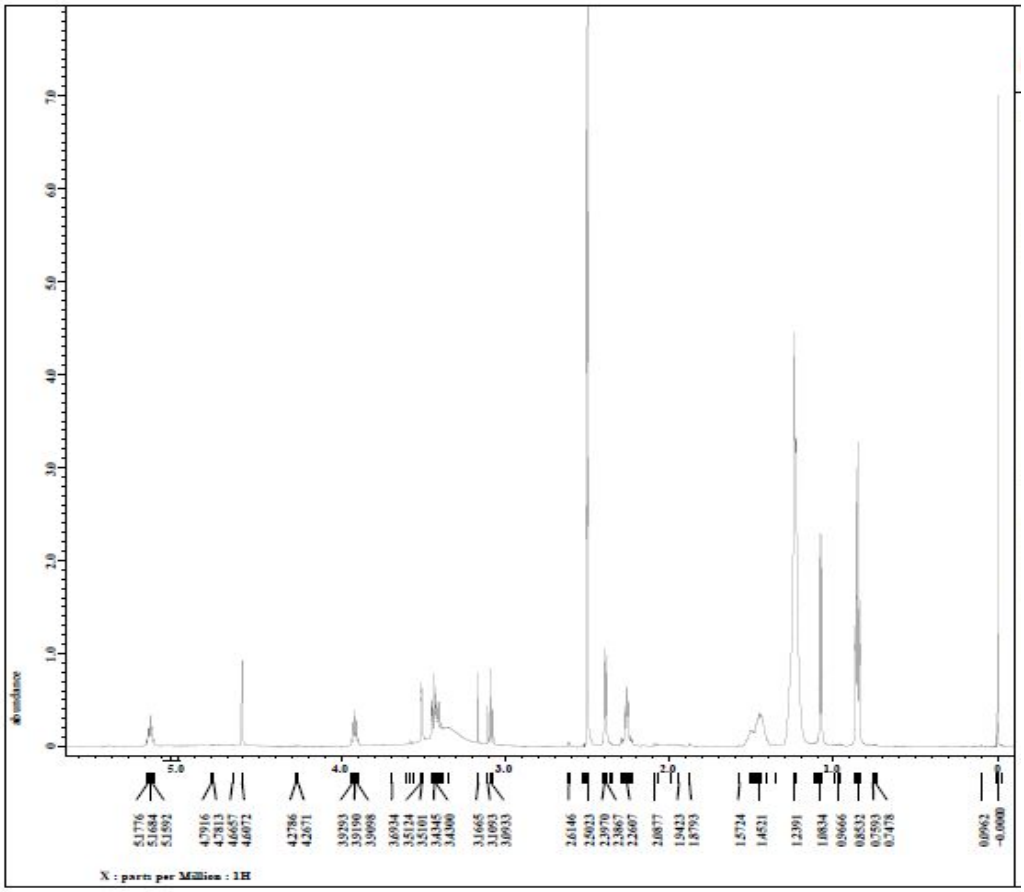


Fig 21. ^{1}H NMR spectrum of Compound P1-1

<u>^{13}C NMR spectrum의 측정 및 해석</u>: ^{13}C NMR spectrum (그림 22)을 측정한 결과, 173.2 및 171.0 ppm에서 두 개의 carbonyl carbon, 98.5 ppm에서 anomeric carbon, 72.8 ~ 69.6 ppm 사이에 6개의 oxygenated methine carbon, 40 ~ 42 ppm 사이에서 두 개의 methylene carbon, 34.3 ~ 22.6 ppm 사이에서 12개의 methylene carbon (9개의 피크가 관찰되었으나 31.8, 29.2, 22.6 ppm의 탄소는 그들의 intensity로부터 두 개의 피크가 겹쳐짐), 18.4 ppm에서 한 개의 methyl carbon, 14.5 ppm에서 두 개의 methyl carbon이 겹쳐서 관찰되었다.

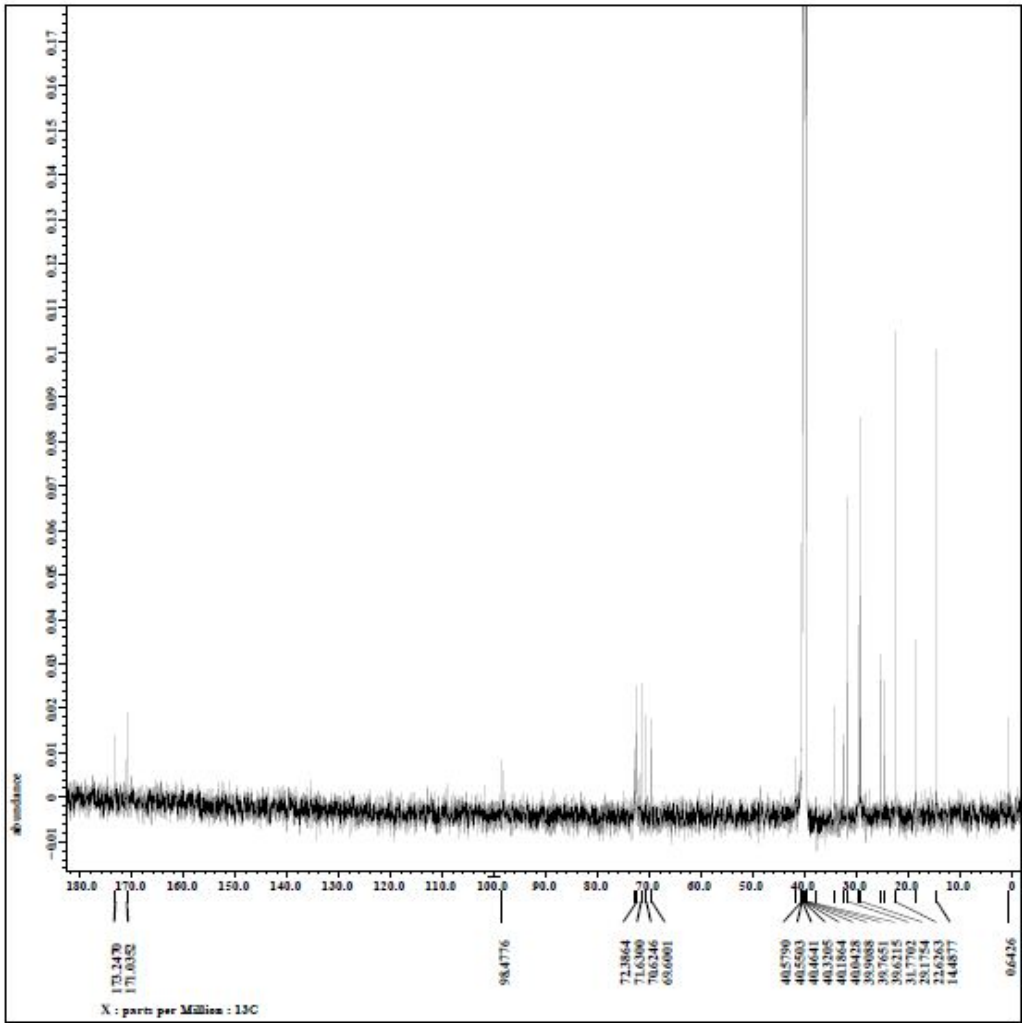


Fig 22. ^{13}C NMR spectrum of compound P1-1

^{1}H-^{1}H COSY spectrum의 측정 및 해석: 화합물 P1-1의 부분구조를 규명하기 위하여 ^{1}H-^{1}H COSY spectrum (그림 23)을 측정하여 해석하였다. 그 결과 두 개의 acyl chain에서 유래하는 부분구조를 규명할 수 있었으며, oxygenated methine proton들의 correlation과 coupling constant를 계산한 결과 α-rhamnose의 존재를 밝혔다(그림 26 참조).

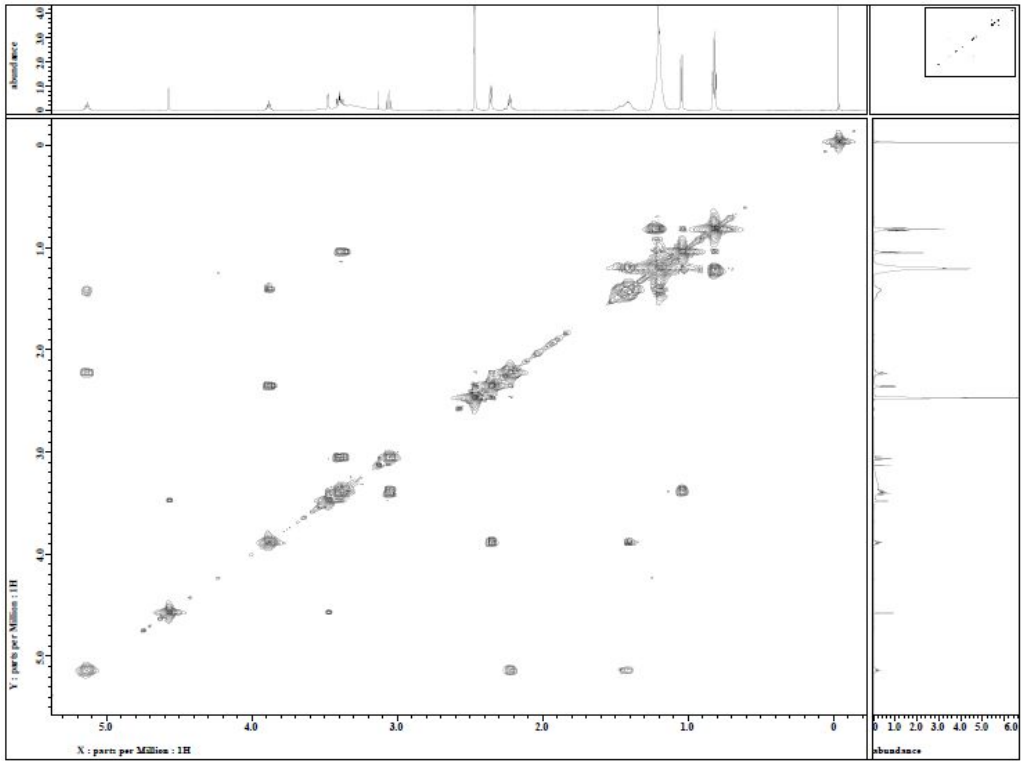


Fig 23. 1H-1H COSY spectrum of compound P1-1

HMQC spectrum 및 HMBC spectrum의 측정 및 해석: HMQC spectrum (그림 10)을 측정하여 해석한 결과, 모든 proton-bearing carbon ($^{1}J_{C-H}$)을 규명할 수 있었다. 또한 HMBC spectrum (그림 25)을 측정하여 해석한 결과, 5.17 ppm의 methine proton으로부터 두 개의 acyl group의 carbonyl carbon인 173.2 및 171.0 ppm의 carbon에, 또한 3.92 ppm의 methine proton으로부터 171.0 ppm의 carbonyl carbon과 rhamnose의 anomeric carbon에 long-range correlation이 관찰되었다. 이들 결과로부터 ^{1}H-^{1}H COSY spectrum에 의하여 규명된 부분구조를 연결할 수 있었으며, 그 결과 화합물 P1-1의 화학구조를 그림 26와 같이 결정할 수 있었다.

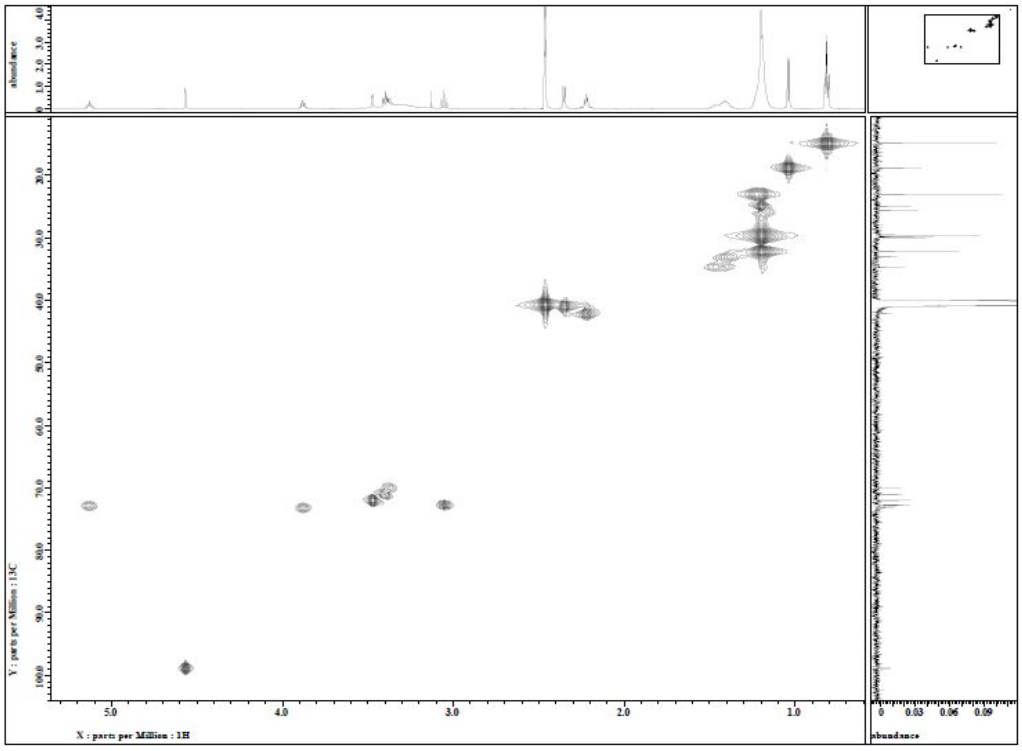


Fig 24. HMQC spectrum of compound P1-1

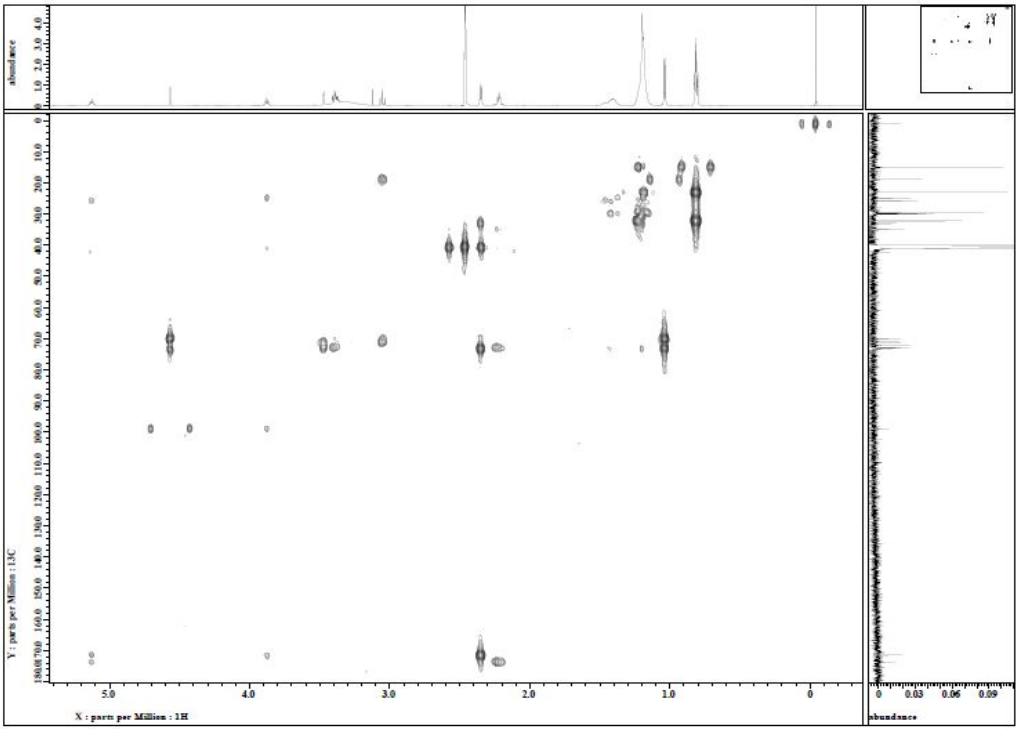


Fig 25. HMBC spectrum of compound P1-1

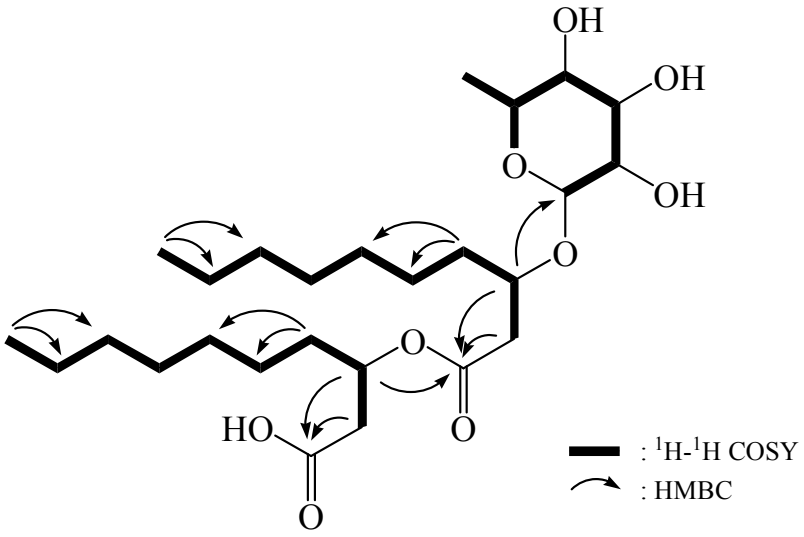


Fig 26. Major 2D-NMR correlation of compound P1-1

② Mass spectrum의 측정 및 해석

NMR 분광분석으로부터 본 활성화합물이 그림 26에 나타낸 바와 같이 rhamnolipid 계열의 화합물로 추정되었다. 따라서 이의 확인을 위하여 mass 분석을 수행하였으며 그 결과는 다음과 같다. ESI-mass spectrum (그림 13)을 positive mode에서 측정한 결과 $[M+NH_4]^+$가 m/z 522.3에서 관찰되어 분자량이 504임을 알 수 있었다. 이로서 본 화합물의 화학구조를 그림 14에 도시한 바와 같이 rhamnolipid R1으로 결정하였다.

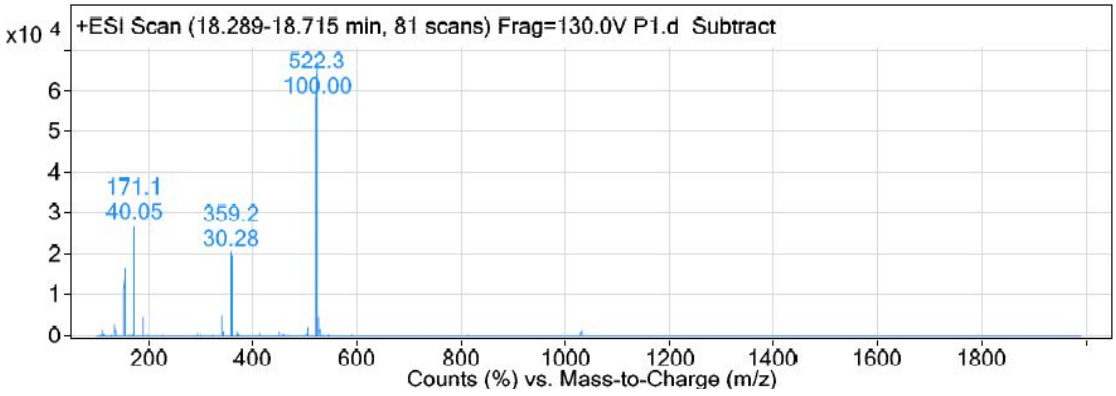


Fig 27. ESI-mass spectrum of compound P1-1

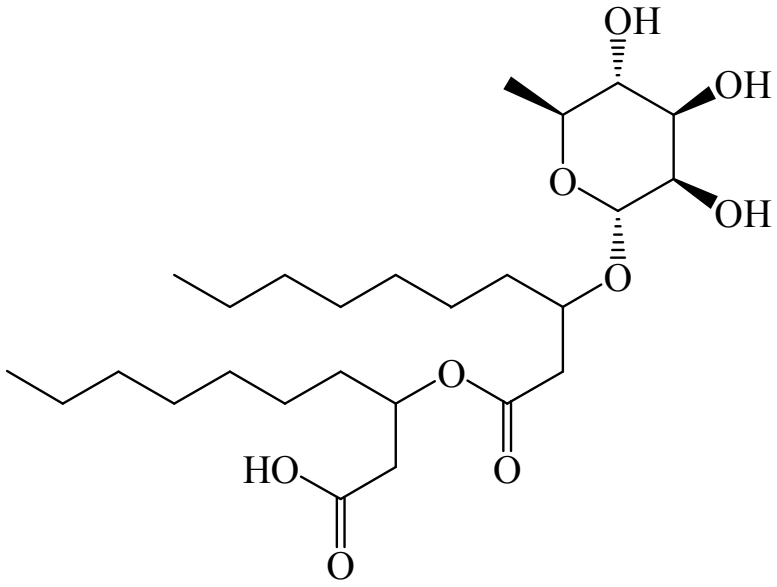


Fig 28. Chemical structure of compound P1-1(Mono-rhamnolipid, Rha C10-C10)

(나) 화합물 P1-2의 화학구조 해석

① NMR spectrum의 측정 및 해석

활성화합물 P1-2의 화학구조를 규명하기 위하여 DMSO-d_6에 녹인 후 ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, ^{1}H-^{1}H COSY, HMQC 및 HMBC spectrum을 측정하여 해석하였다.

^{1}H NMR spectrum의 측정 및 해석: ^{1}H NMR spectrum (그림 29)을 측정한 결과, 5.2 ~ 3.0 ppm 사이에 12개의 oxygenated methine proton이 관찰되었으며, 이들 중에 4.78과 4.67 ppm의 두 수소는 α-anomeric proton에 기인한 수소였다. 또한, 2.41 및 2.31 ppm에서 두 개의 methylene proton, 1.50, 1.45, 1.24 ppm에서 12개의 methylene proton, 1.10 ppm에서 두 개의 doublet methyl proton 및 0.85 ppm 부근에서 두 개의 triplet methyl proton이 관찰되었다.

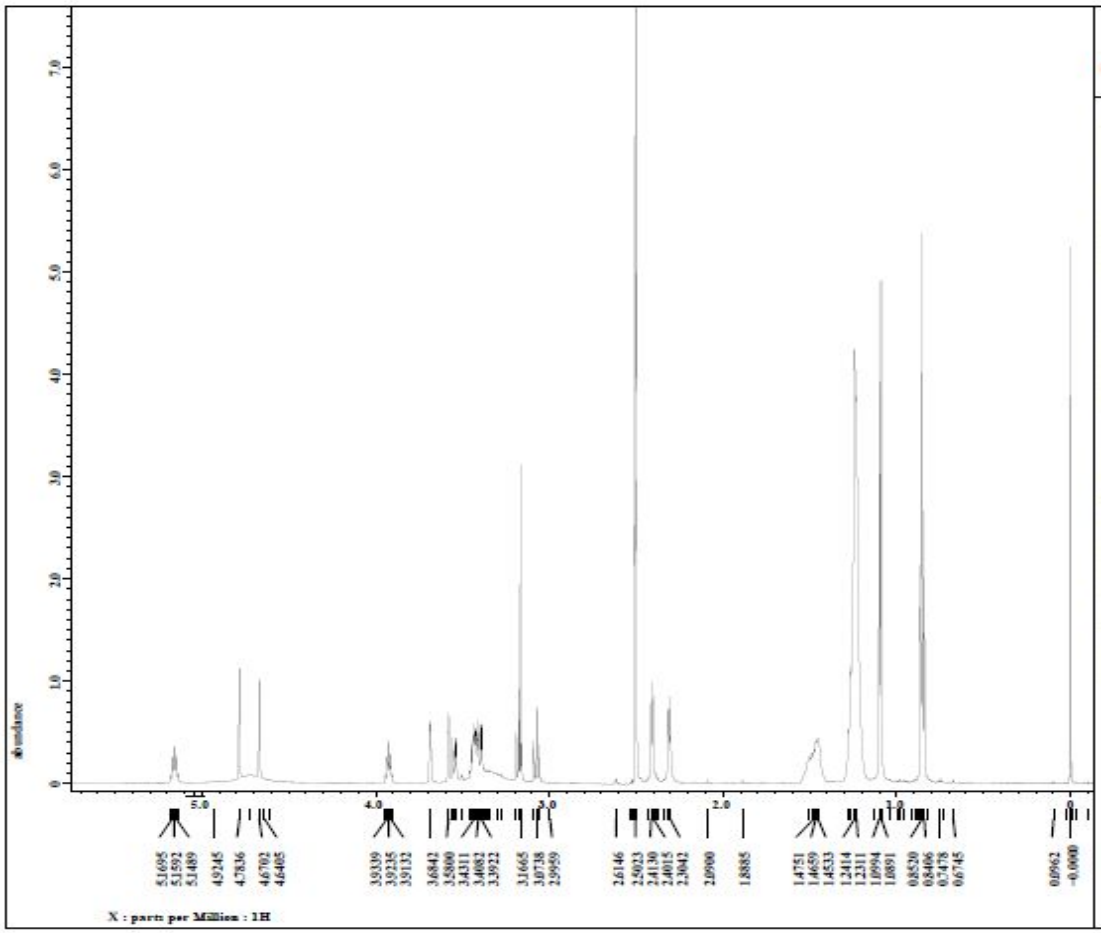


Fig 29. ^{1}H NMR spectrum of compound P1-2

^{13}C NMR spectrum의 측정 및 해석: ^{13}C NMR spectrum (그림 30)을 측정한 결과, 173.1 및 170.8 ppm에서 두 개의 carbonyl carbon, 102.4 및 97.4 ppm에서 두 개의 anomeric carbon, 77.8 ~ 69.2 ppm 사이에 10개의 oxygenated methine carbon, 40 ~ 42 ppm 사이에서 두 개의 methylene carbon, 34.5 ~ 22.6 ppm 사이에서 12개의 methylene carbon (9개의 피크가 관찰되었으나 31.8, 29.2, 22.6 ppm의 탄소는 그들의 intensity로부터 두 개의 피크가 겹쳐짐), 18.4과 18.3 ppm에서 두 개의 methyl carbon, 14.5 ppm에서 겹쳐진 두 개의 methyl carbon이 관찰되었다.

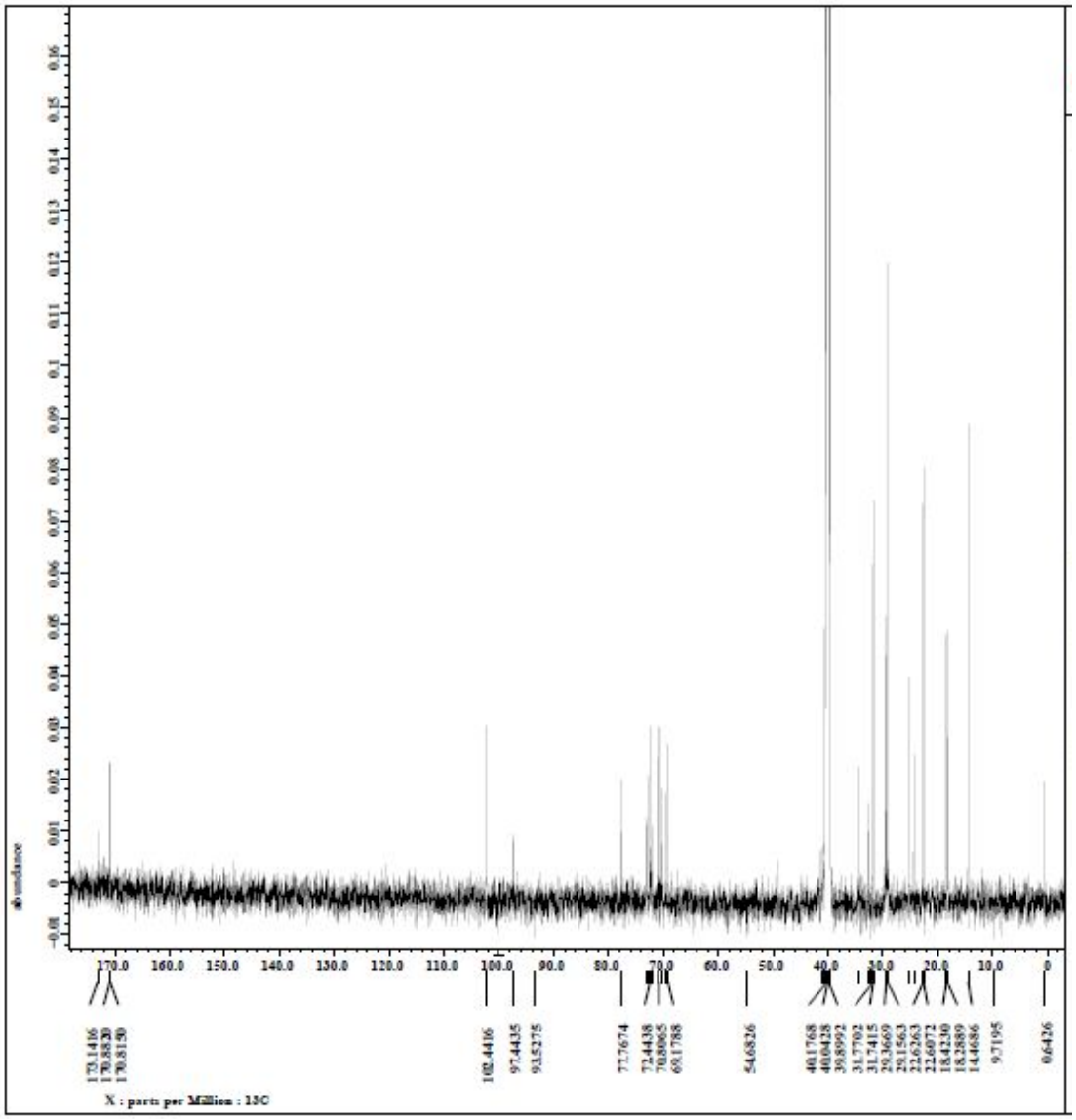


Fig 30. ^{13}C NMR spectrum. of compound P1-2

^{1}H-^{1}H COSY spectrum의 측정 및 해석: 화합물 P1-2의 부분구조를 규명하기 위하여 ^{1}H-^{1}H COSY spectrum (그림 31)을 측정하여 해석하였으며, 그 결과 두 개의 acyl chain에서 유래하는 부분구조를 규명하였고 oxygenated methine proton들의 correlation과 coupling constant를 계산한 결과 두 개의 α-rhamnose의 존재를 밝혔다 (그림 34 참조).

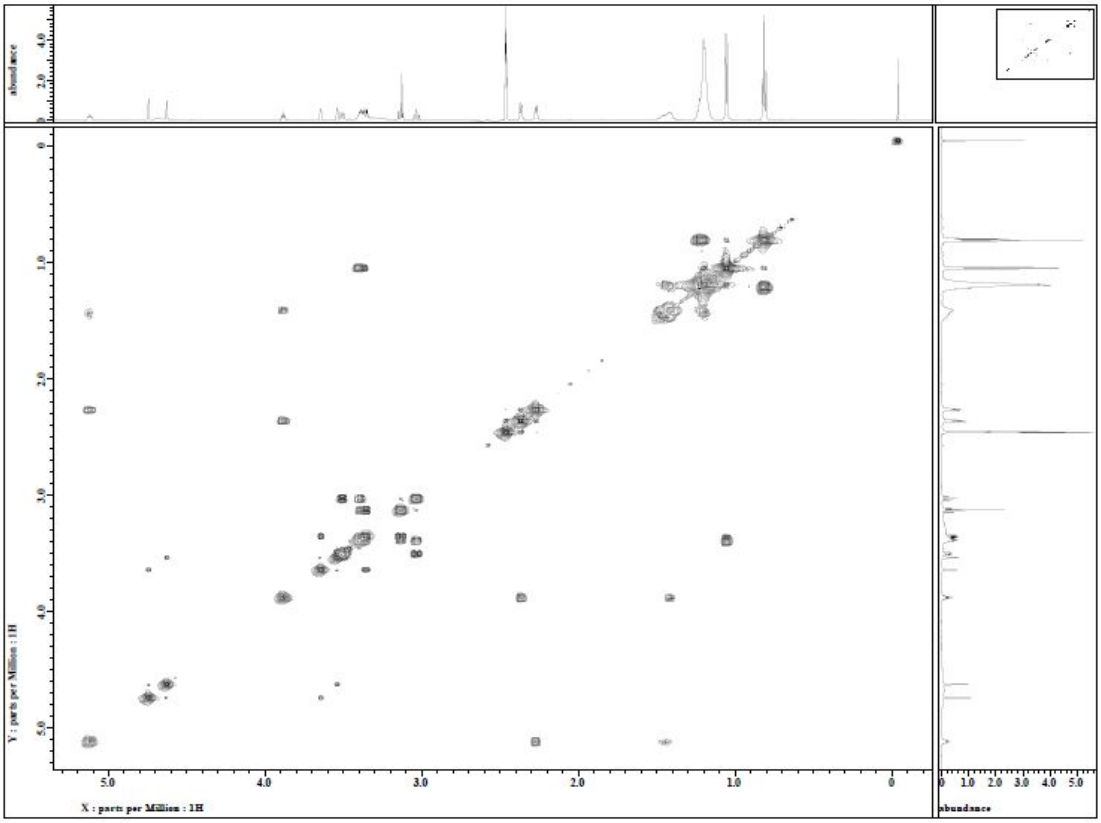


Fig 31. ^{1}H-^{1}H COSY spectrum of compound P1-2

HMQC spectrum 및 HMBC spectrum의 측정 및 해석: HMQC spectrum (그림 32)을 측정하여 해석한 결과, 모든 proton-bearing carbon ($^{1}J_{C-H}$)을 규명할 수 있었다. 또한 HMBC spectrum (그림 33)을 측정하여 해석한 결과, 5.16 ppm의 methine proton으로부터 173.1 및 170.8 ppm의 acyl group의 carbonyl carbon에, 3.92 ppm의 methine proton으로부터 170.8 ppm의 carbonyl carbon과 97.4 ppm의 rhamnose의 anomeric carbon에, 또한 1번 rhamnose의 2번 proton인 3.58 ppm의 methine proton으로부터 102.4 ppm의 anomeric carbon에 long-range correlation이 관찰되었다. 이들 결과로부터 ^{1}H-^{1}H COSY spectrum에 의하여 규명된 부분구조를 연결할 수 있었으며, 그 결과 화합물 P1-2의 화학구조를 그림 34과 같이 결정할 수 있었다.

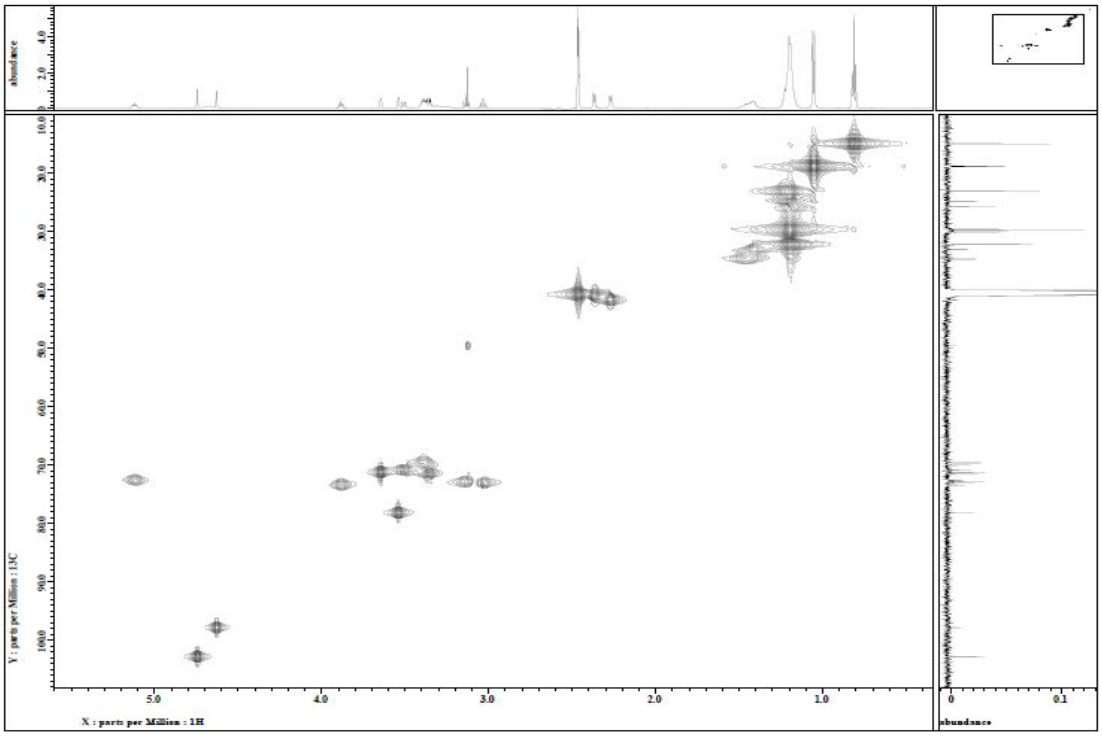


Fig 32. HMQC spectrum of compound P1-2

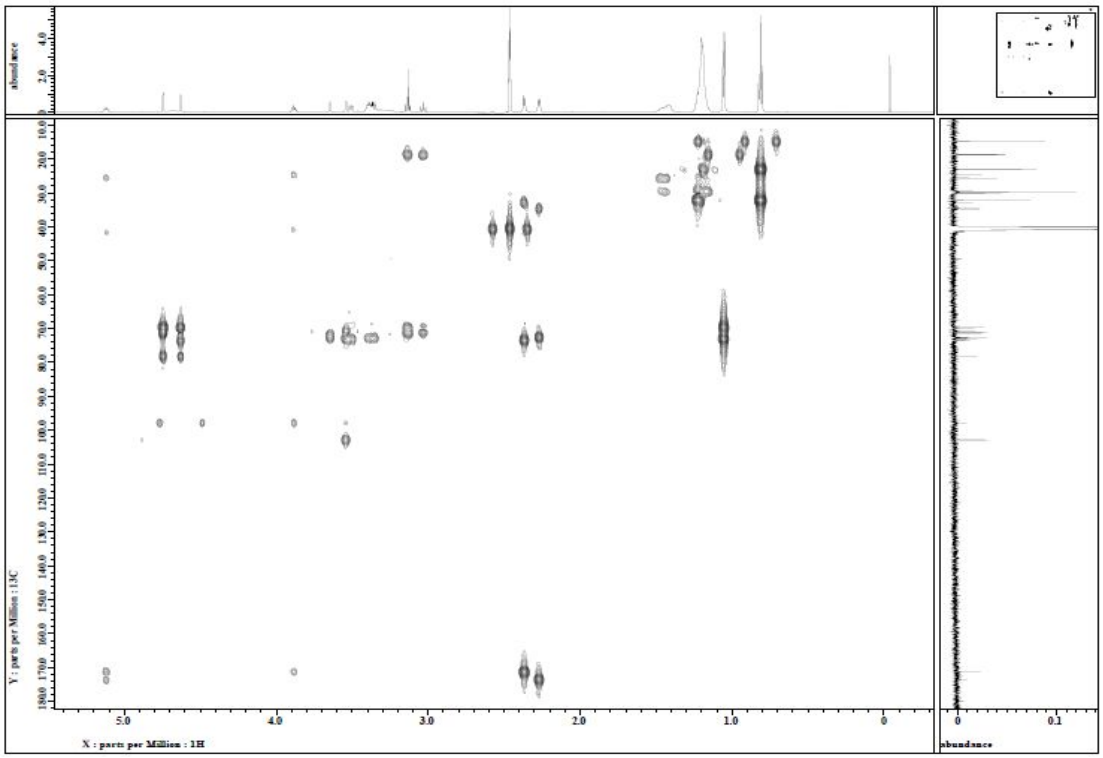


Fig 33. HMBC spectrum of compound P1-2

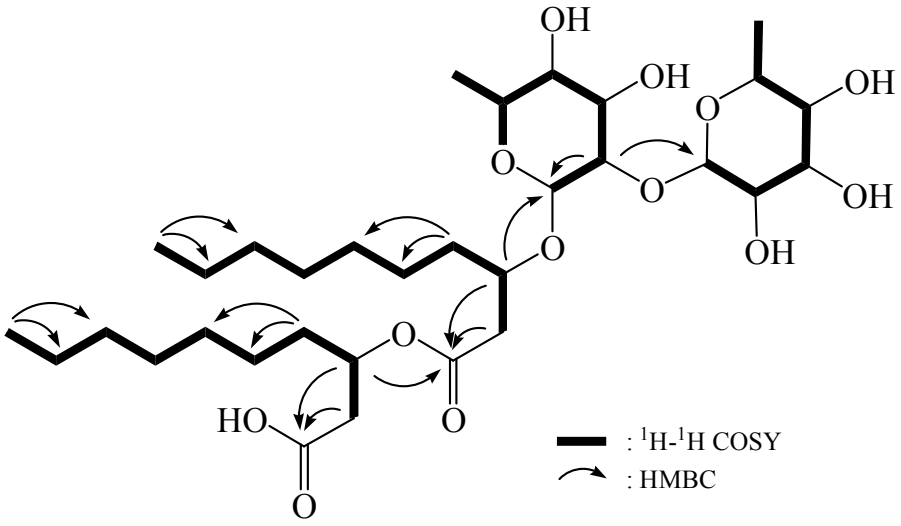


Fig 34. Major 2D-NMR correlation of compound P1-2

② Mass spectrum의 측정 및 해석

NMR 분광분석으로부터 본 활성화합물이 그림 34에 나타낸 바와 같이 dirhamnolipid 계열의 화합물로 추정되었다. 따라서 이의 확인을 위하여 mass 분석을 수행하였으며 그 결과는 다음과 같다. ESI-mass spectrum (그림 21)을 positive mode에서 측정한 결과 $[M+NH_4]^+$가 *m/z* 668.3에서 관찰되어 분자량이 650임을 알 수 있었다. 이로서 본 화합물의 화학구조를 그림 35에 도시한 바와 같이 rhamnolipid R2로 결정하였다.

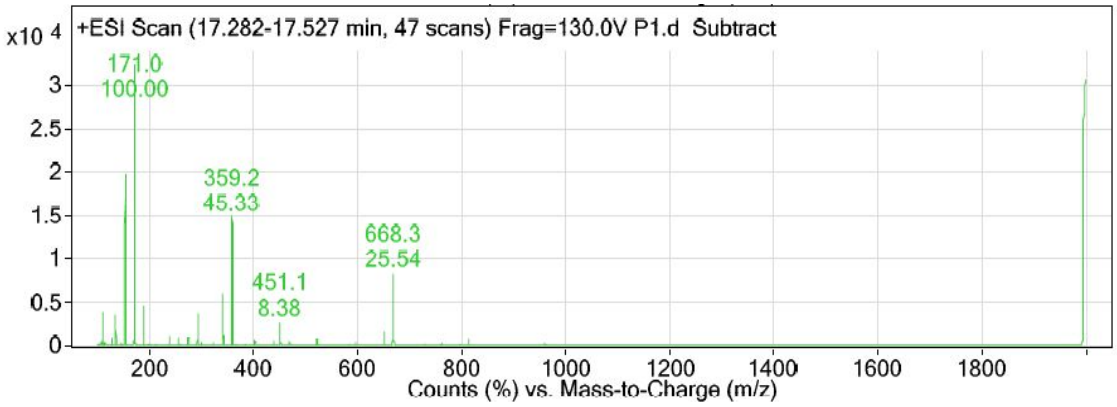


Fig 35. ESI-mass spectrum of compound P1-2

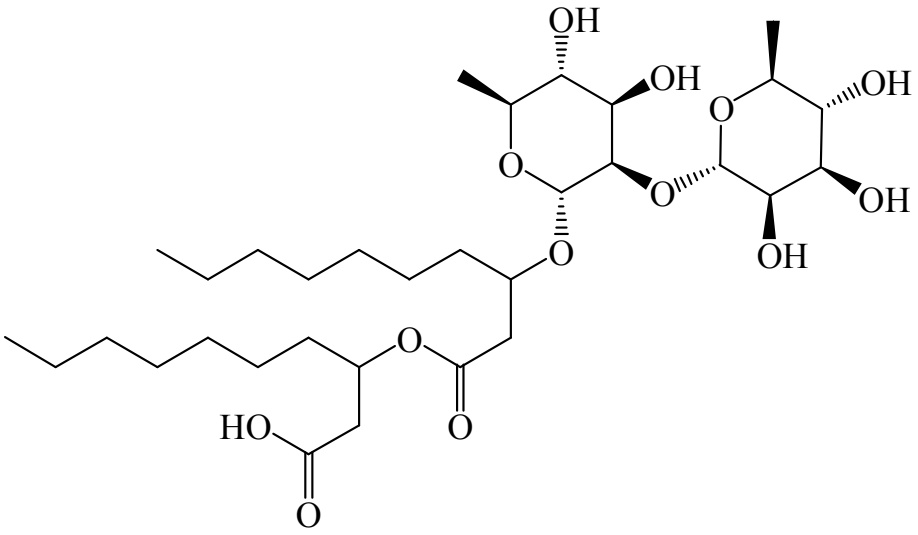


Fig 36. Chemical structure of compound P1-2(Di-rhamnolipid, Rha-Rha-C10-C10)

한편 *Pseudomonas aeruginosa* NO4 균주는 Rha-C_{10}-C_{10}-CH_3 와 Rha-Rha-C_{10}-C_{10}-CH_3 와 같은 methylated 유도체도 생산 하였다(Data not shown).

이러한 rhamnolipid는 세균에 대한 항균력 뿐만아니라 fungi, yeast, algae 및 virus 에도 효능이 있는 것이 알려져 있다. Rhamnolipids는 단일 물질로 또는 혼합물질로 작용하는 것으로 알려져 있다.

(다) 화합물 sup 4의 화학구조 해석

① NMR spectrum의 측정 및 해석

항균 활성 화합물 sup 4는 미량으로 분리되었으며, 이의 화학구조를 규명하기 위하여 CD_3OD에 녹인 후 ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^1H-^1H COSY, HMQC 및 HMBC를 측정하여 해석하였다.

^1H NMR spectrum의 측정 및 해석: ^1H NMR spectrum (그림 37)을 측정한 결과, 8.24, 8.11, 7.85, 7.55 ppm에서 4개의 aromatic methine proton이 관찰되었으며 이들은 coupling constant로부터 1,2-disubstituted benzene으로 규명되었다. 또한 6.52 ppm에서 methine proton, 2.94, 1.72, 1.39, 1.31, 1.24 (x2) ppm에서 6개의 methylene proton, 0.82 ppm에서 triplet methyl proton이 관찰되었다.

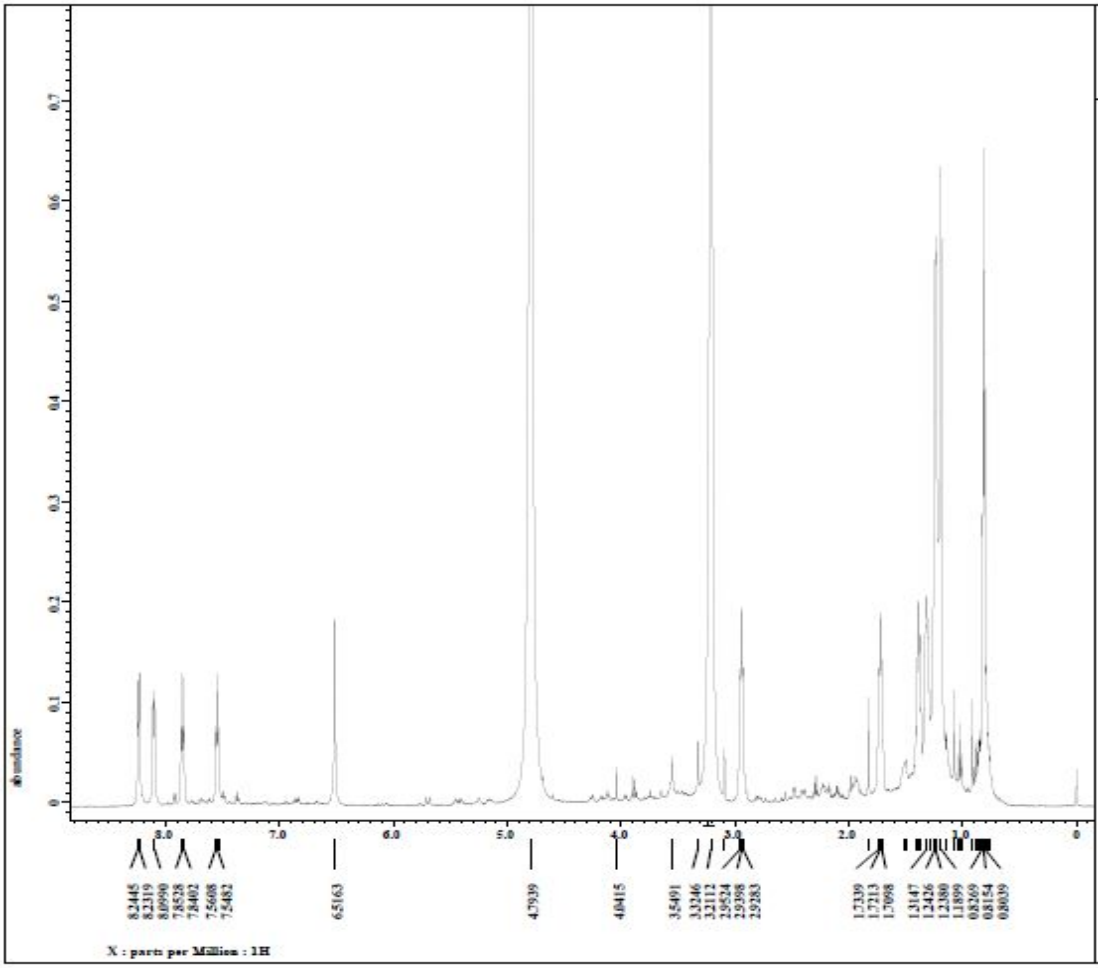


Fig 37. ^{1}H NMR spectrum of compound sup4

^{13}C NMR spectrum의 측정 및 해석: ^{13}C NMR spectrum (그림 38)을 측정한 결과, 본 화합물은 매우 미량으로 분리되어 모든 탄소를 관찰할 수는 없었다. 그러나 ^{1}H NMR spectrum에서 적분치가 다소 모호하여 alkyl chain의 사슬길이를 정확히 알 수 없었으나 ^{13}C NMR spectrum을 측정한 결과 31.5, 31.3, 29.4, 29.1, 28.7, 27.5 ppm에서 6개의 methylene기와 22.3 ppm에서 한 개의 methyl기가 관찰되어 alkyl chain의 사슬길이를 규명할 수 있었다. 그 외에 133.2, 125.6, 124.4, 115.6 ppm에서 aromatic methine carbon이 관찰되었다.

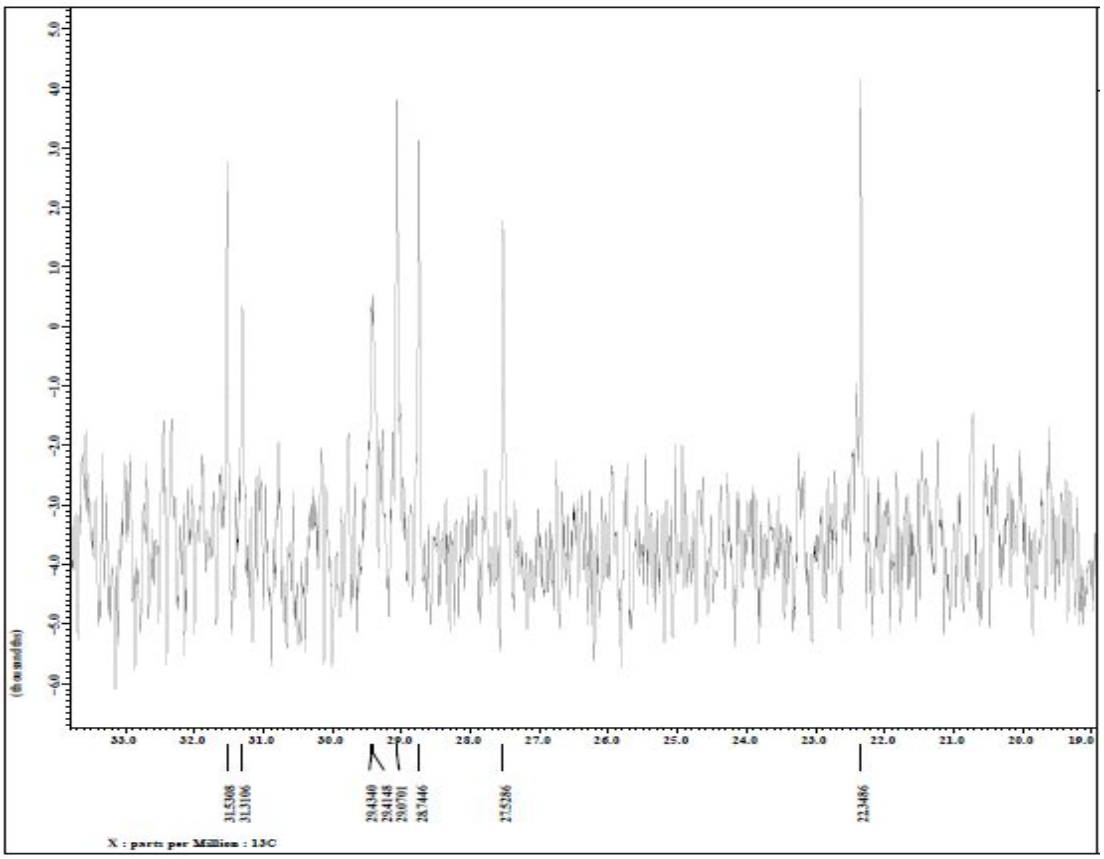


Fig 38. ^{13}C NMR spectrum of compound sup4

<u>^{1}H-^{1}H COSY spectrum의 측정 및 해석</u>: ^{1}H-^{1}H COSY spectrum (그림 39)을 측정하여 해석한 결과, 8.24, 8.11, 7.85, 7.55 ppm에서 관찰된 4개의 aromatic methine proton이 1,2-disubstituted benzene을 형성하고, 2.94, 1.72, 1.39, 1.31, 1.24 (x2) ppm에서 관찰된 6개의 methylene proton과 0.82 ppm에서 관찰된 methyl proton이 alkyl chain을 형성함을 규명하였다.

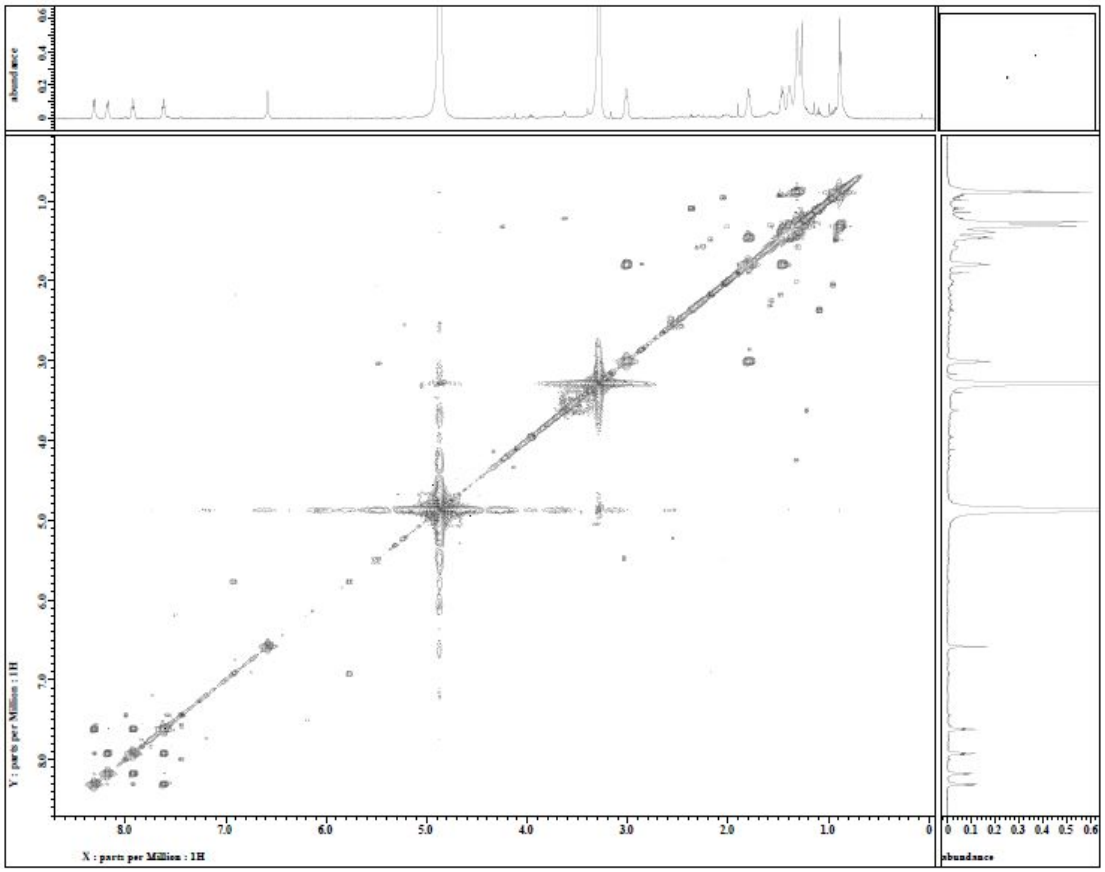


Fig 39. ^{1}H-^{1}H COSY spectrum of compound sup4

HMBC spectrum의 측정 및 해석: HMBC spectrum (그림 40)을 측정하여 해석한 결과, 8.24 ppm의 methine proton으로부터 140.8 및 133.2 ppm의 aromatic carbon에, 8.11 ppm의 methine proton으로부터 125.6 ppm의 aromatic carbon에, 7.85 ppm의 methine proton으로부터 140.8 및 124.4 ppm의 aromatic carbon에, 7.55 ppm의 methine proton으로부터 123.6 및 115.6 ppm의 aromatic carbon에 long-range correlation이 관찰되었다. 또한 6.52 ppm의 methine proton으로부터 123.6 ppm의 carbon에, 2.94 ppm의 methylene proton으로부터 157.3 ppm의 carbon에 long-range correlation이 관찰되었다. 이들 2D NMR data로부터 추정되는 구조(그림 41)를 근거로 데이터베이스 및 문헌검색을 수행하였으며, 그 결과 본 화합물은 Pseudomonas aeruginosa로부터 분리된 바 있는 2-heptyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxide와 매우 유사함을 알 수 있었다 ([Ref]Machan, Z. A.; Taylor, G. W.; Pitt, T. L.; Cole, P. J.; Wilson, R. 2-Heptyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxide, an antistaphylococcal agent produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrobial Chemotherapy*, 30: 615-623, 1992)

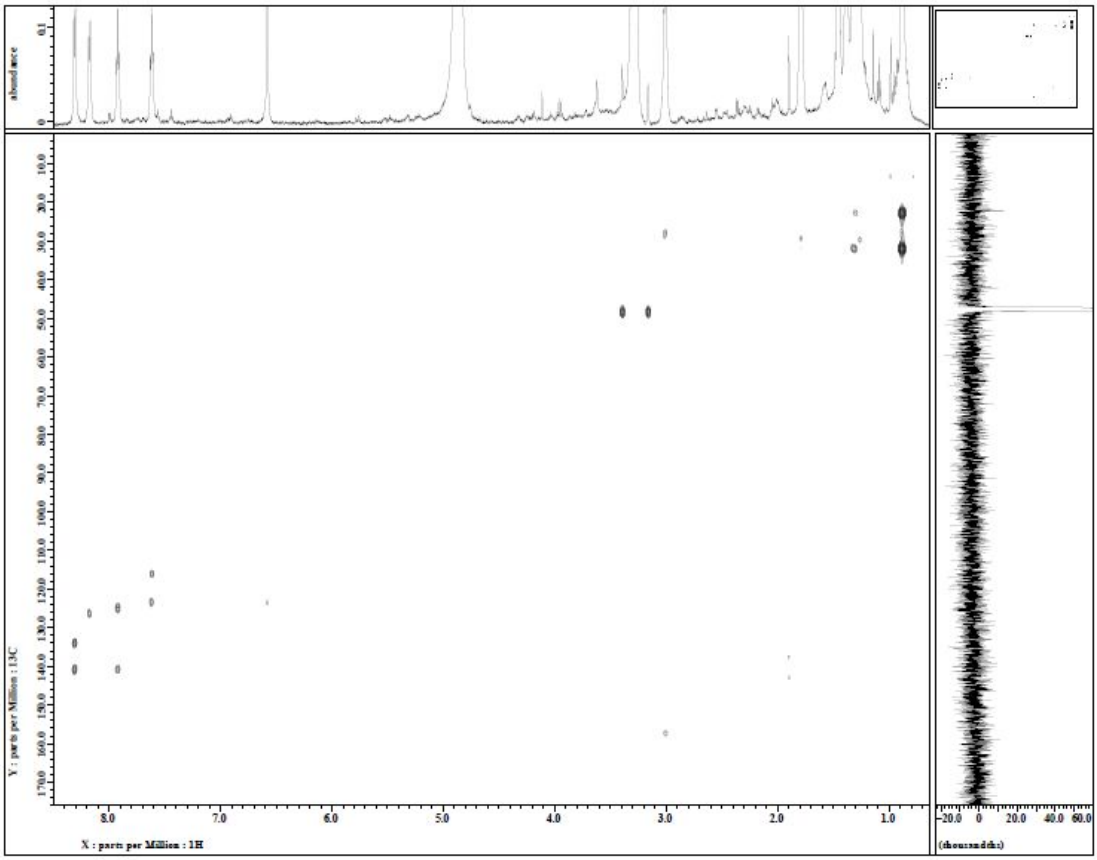


Fig 40. HMBC spectrum of compound sup4

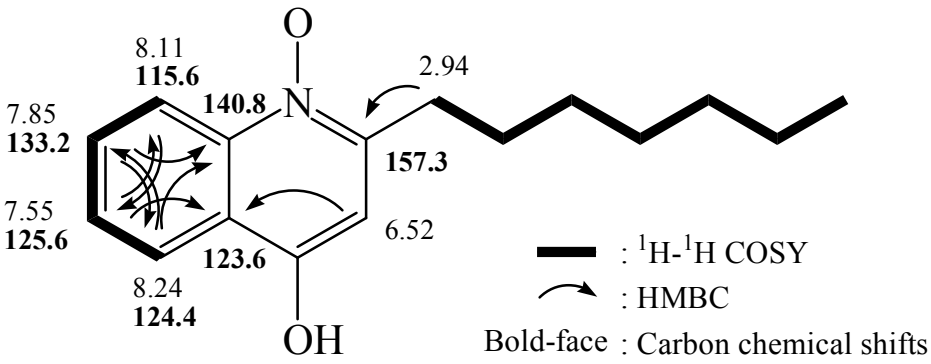


fig 41. Major 2D-NMR correlation of compound sup4.

② Mass spectrum의 측정 및 해석

NMR 분광분석으로부터 본 활성화합물은 1,2-disubstituted benzene과 heptyl chain으로 구성되어 있음을 알 수 있었으며, 이를 근거로 *Pseudomonas aeruginosa*로부터 분리된 바 있는 2-heptyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxide와 동일한 화합물로 유추되었다. 따라서 이의 확인을 위하여 2차에 걸친 mass 분석을 수행하였으며 그 결과는 다음과 같다. ESI-mass (그림 42)를 positive mode에서 측정한 결과, $[M+H]^{+}$가 *m/z* 260.1에서 관찰되어 분자량이 259임을 알 수 있었다. 또한 API-mass 분석(그림 43)에서도 동일

한 결과를 얻어 본 화합물의 분자량이 259임을 확인하였다. 이는 앞의 NMR spectrum의 측정 및 해석으로부터 유추한 화학구조와 일치하는 것으로 본 화합물이 *Pseudomonas aeruginosa*로부터 분리된 바 있는 2-heptyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxide임을 확인할 수 있었다. 본 화합물의 화학구조를 그림 44에 도시하였다.

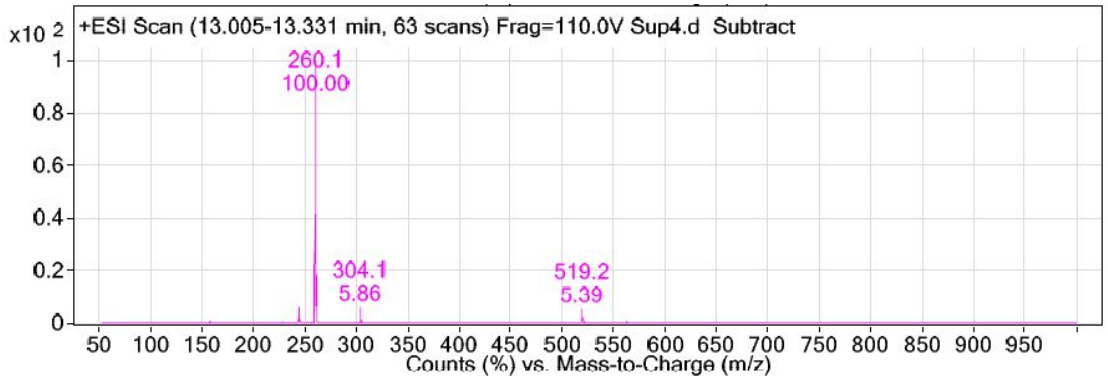


Fig 42. ESI-mass spectrum of compound sup4

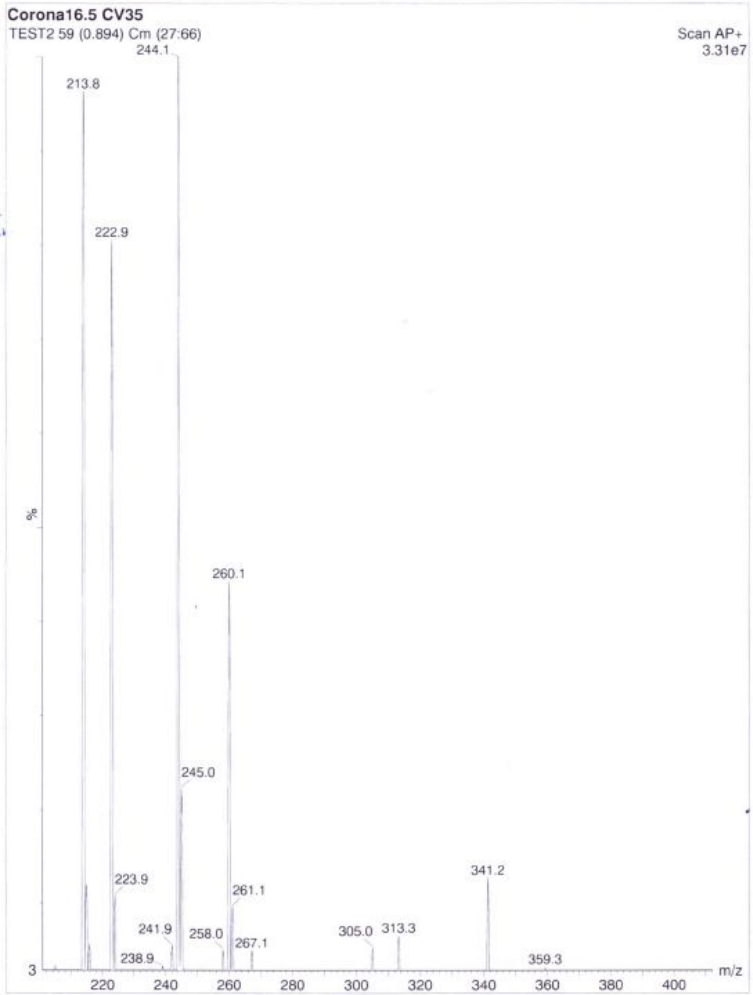


Fig 43. API-mass spectrum of compound.

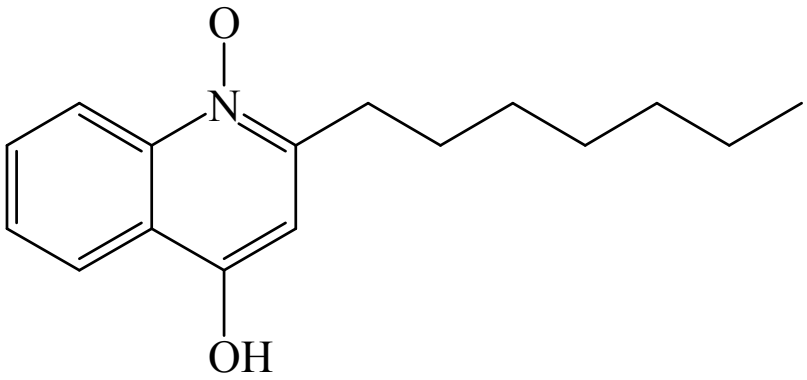


Fig 44. Chemical structure of Compoind sup4(= 2-heptyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxide)

2-heptyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxidesms G(+)에 대한 항균물질로 작용할 뿐만 아니라 Quinoline family의 일종으로 *Pseudomonas aeruginosa* 종의 Qurum sensing signal 로써 autoinducer 역할을 수행한다. 즉 동일종의 *Pseudomonas* 세포 밀도가 낮을 때는 전혀 분비하지 않다가 세포 밀도가 포화 상태가 되면(즉 stationary phase_생성되기 시작하여 *Pseudomonas* 속의 virulence관련 유전자들ㅇ의 발현을 유도하는 autoinduser 이다.

(다) Antibiotic non-producing mutant 선발

항균물질을 생산하는 균주인 *Pseudomonas aeruginosa* N04는 감귤궤양병, 그람양성균, MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*)에 강력한 항균 활성을 갖고 있다. 본 연구에서는 항균물질을 암호 하는 유전자를 검색하기 위하여 double mating에 의한 transconjugant를 선발하였다.

Peudomonas aeruginosa N04 균주는 항생제 ampicillin, kanamycin, sufonamide, chloramphenicol 및 erythromycin 등에 강력한 저항성을 갖고 있음이 본 연구 결과 확인되었다.

E. coli cc118 λ pir 균주는 mini Tn5 tet^R(tetracyclin resistance) 균주로 transposable element인 Tn5 -kan^R(kanamycin resistance)의 kanamycin 저항성 유전자 대신 tetracyclin resistance 유전자로 대체된 것이다. mini Tn5는 conjugative plasmid로 conjugation ratio가 매우 높아 gram 음성균의 knock-out mutant 선발에 많이 이용되고 있다.

본 연구에서는 수용주 *Peudomonas aeruginosa* N04를 선발하였으며 selection marker로 kanamycin (50㎍/ml), 공여주로 *E. coli* cc118 λ pir selection marker로 tetracyclin를 사용하였다. Mating 방법은 LB broth에서 각기 자란 수용주 1ml과 공여주 100㎕를 혼합한 후 membrane filtration 하였다. membrane filter를 LB agar plate에 정치시킨 후 37℃에서 하룻밤 배양하였다. membrane filter를 5ml $MgSO_4$에 현탁시킨 후 serial dilution하여 kanamycin과 tetracyclin이 첨가된 LB agar plate에서 자란 colony들을 1차 선별 한 후에 최소배지에서 항균물질 생성 여부로 knock-out mutant를 선발하였다. 1차 colony 중에서 8개의 complete knock-out mutant를 확인하였다. transconjugant의 대부분은 항균활성이 있었으며 어떤 conjugant는 오히려 항균물질 활성이 증가되었다(그림 45).

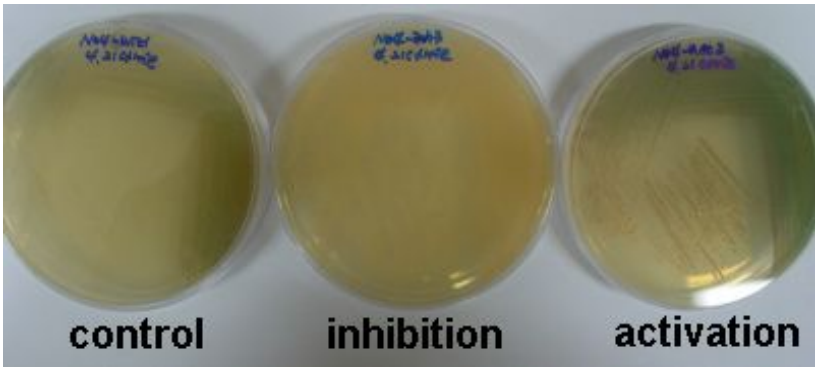
Fig 45. Knock-out and enhanced mutant of N04 strain.

① Knock-out mutant의 pigment 및 항균활성

Mini-Tn5 tet^R에 의한 mutation의 효과는 항균물질의 생성을 억제하거나 때로는 향상시키기도 한다. 그러므로 inhibition 또는 activation mutant를 선별할 때 자주 이용되고 있다.

N04 균주는 *Pseudomonas* 속 균주들이 생산하는 deep blue pigment를 생성하였으나, knock-out mutant인 inh3는 pigment를 생산하지 않았고 궤양병균에 대하여 길항력도 없었다. 그에 반해 enhanced mutant는 대조군에 비해 더 많은 pigment를 생산하였고 항균력도 높았다. Wild type과 pigment producing enhanced mutant는 27 days가 지남에 따라 blight green에서 dark brown으로 변화 하는데 반하여 *Pseudomonas aeruginosa* N04 inh3과 inh7은 시간 경과에 따라서도 무색으로 *Pseudomonas* 속 고유의 pigment를 생산하지 않았다. 한편 *Pseudomonas aeruginosa* N04와 돌연변이주들의 pH 2.0 추출물의 항균 활성은 항균물질 생산이 activation된 muntant Ac2는 제일 강한 항균효과를 보였으나, inhibiition 3과 7번 mutant는 전혀 항균 활성을 가지지 않았다 (그림 45).

Pseudomonas aeruginosa 균주는 two component signal system에 의해서 형광물질인 pyroverdin, blue color의 pyocyanin및 yellow color의 phenazine pigment와 rhamnolipid 항균물질을 분비하고 polysaccharide alginate인 biofilm을 생성하는 것으로 알려졌다. 즉, cell수가 적을때는 N-Acyl Homoserine Lactones (AHLs) 낮은 수즌으로 분비하지만 cell수가 stationary phase에 도달하게되면 ALHs level이 올라가고 이에따라 또다른 qurum sensing 물질들인 pyoverdine, phenazine, pyocynin 과 rhamnolipid 및 biofilm 생성 level이 상승한다. 본 연구에서 얻어진 Inh3와 Inh7는 pyocynin pigment와 rhamnolipid를 생산하지 않았는데 이에 대한 연구가 추가로 진행 중에 있다.



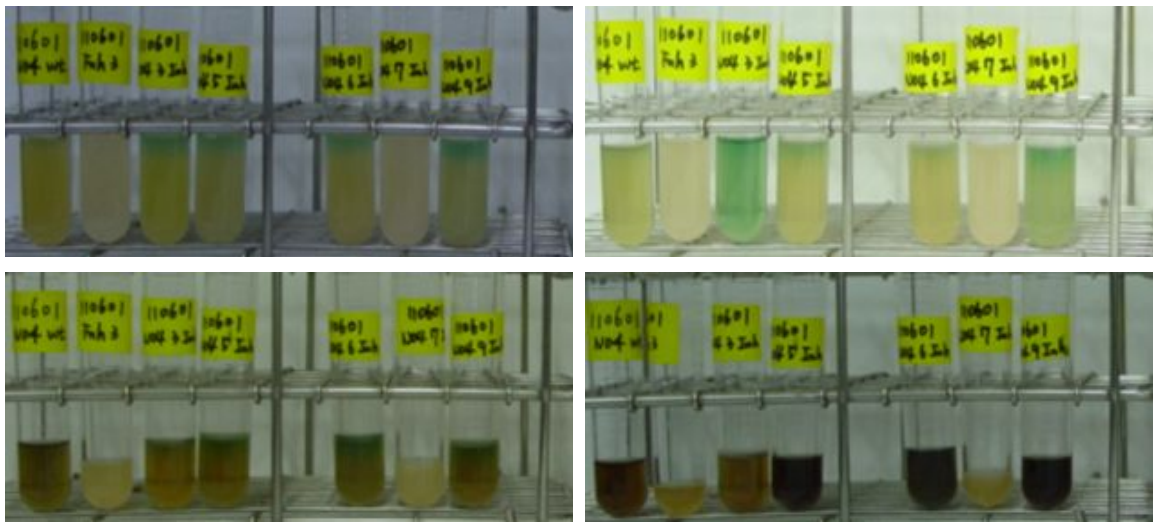


Fig 46. Morphological change of transconjugants.

P. aeruginosa NO4와 위에서 얻어진 mutant들의 특성을 조사하기 위하여 항균 생산배지에서 배양한 후 추출물의 TLC patern을 조사하였다.

그림 47의 lane A-a에서 보는 바와 같이 UV 365nm 에서는 NO4 wild type과 knock out mutant 침전 추출물(lane A-c)에서 band를 관찰 할 수 있었고, wild type 보다는 knock out mutant 추출물에서 Rf 값이 다른 3개 이상의 band가 출현 하였다. 또한 wild type에서 보였던 band도 Rf값이 변하였고 그 량도 매우 증가 하였다. 그림 47의 lane B-a, b에서 보는바와 같이 wild type(lane B-a) 상단에 1개의 band가 보였지만, knock out mutant의 침전 추출물에서는 전혀 band가 없었다. 그러나 wild type 상등액 추출

물은 4개 이상의 band가 보였다. 또한 knock out mutant 상등액 추출물에서는 Rf값이 다른 4개의 band가 관찰 되었다. 염색 시약에 따른 band 관찰은 40%황산, ninhydrin solution , anisaldehyde solution에서 wild type의 침전 추출물과 상등액 추출물에서 두 개의 뚜렸한 band를 보였으며 상대적인 량은 침전 추출물에서 많았다. 이러한 결과는 두 band를 elution하여 항균물질 활성 실험에서도 비례 하였다.

반면 knock out mutant 의 침전 추출물에서는 위에서 사용한 염색 시약과 어떠한 반응도 하지 않았고, 실제 항균물질 활성도 없었다. 그러나 knock out mutant 상등액 추출물은 phosphomolybdic acid에서 4개의 band가, anisaldehyde solution에서 한 개의 band가 약하게 나타났다. knock out mutant 의 상등액 추출물은 약하지만 항균물질 활성을 나타냈다. 즉 이 band들이 항균물질과 관련이 있을 것으로 생각 된다.

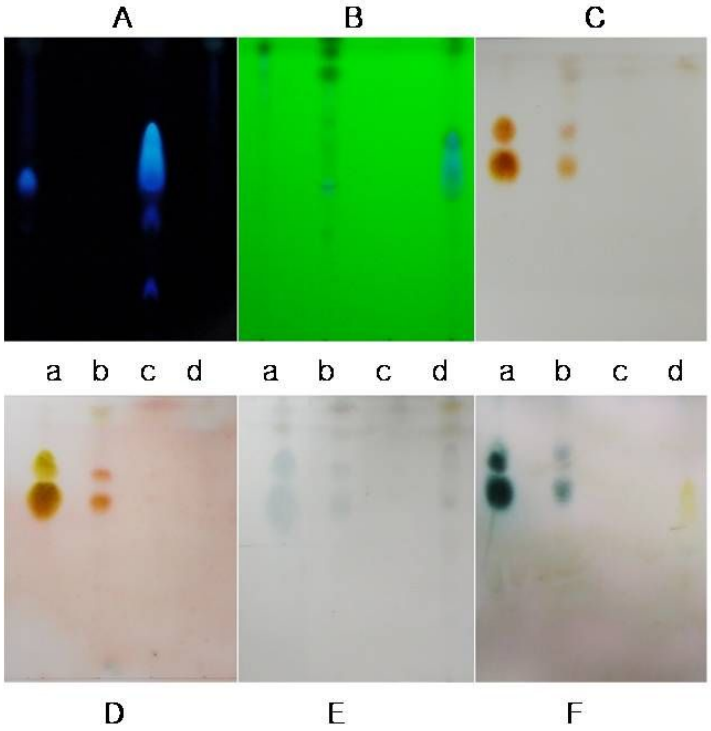


Fig 47. Thinlayer chromatography analysis of crude extracts from *P. aeruginosa* NO4

Matrix	:	C18 silica glass plate
Solvent system	:	Chloroform : Methanol : Water = 50 : 30 : 5
Detection method	A :	UV light 365nm
	B :	UV light 254nm
	C :	40% sulfuric acid
	D :	Ninhydrin solution
	E :	Phosphomolybdic acid,
	F :	Anisaldehyde solution

a :	NO4 wild type pH2.0 precipitate extract
b :	NO4 wild type supernatant antibiotics
c :	NO4 knock out mutant pH 2.0 precipitate extract
d :	NO4 knock out mutant supernataut antibiotics

② Knock-out mutant의 HPLC patterns

Knock-out, enhanced mutant의 HPLC pattern을 비교하기 위하여 M9 최소배지에 배양한 다음 상등액을 diethly ether로 추출한 다음 methnol에 녹였다. membrane filtration 후 HPLC를 수행하였다.

그림 48, 49, 50 및 51에서 보듯이 대조군에서 보였던 활성 peak(화살표)가 knock-out mutant에서는 사라졌지만 enhanced mutant에서는 peak 면적이 약 2배 증가되었다.

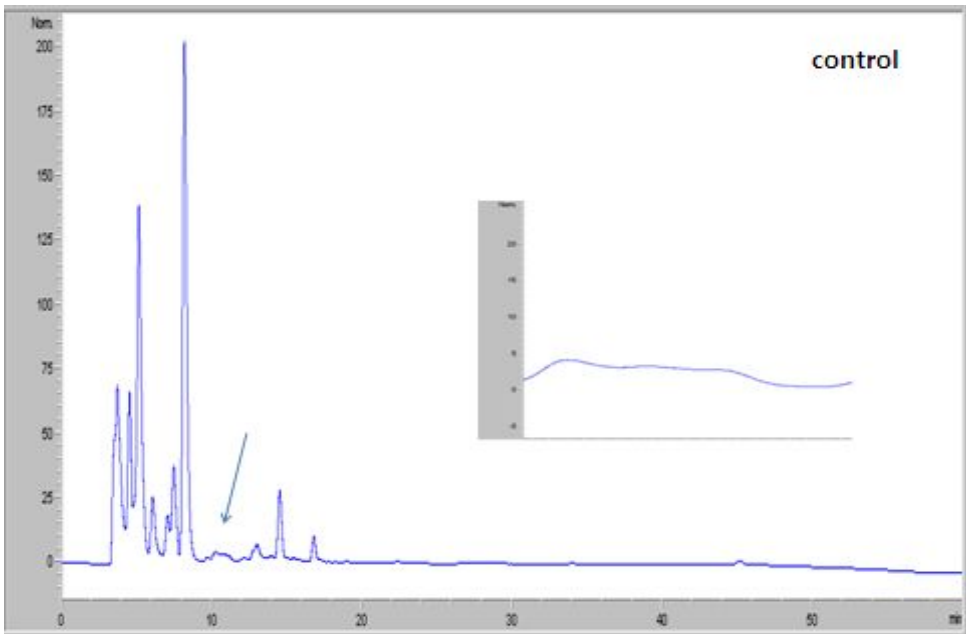


Fig 48. Patterns of HPLC N04 wild type strain.

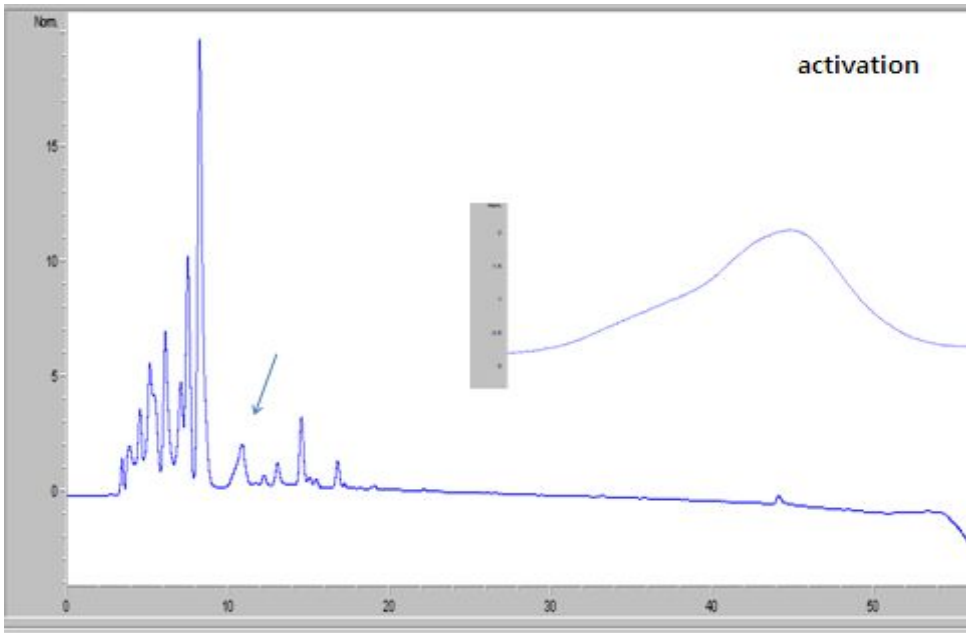


Fig 49. Patterns of HPLC N04 enhanced mutant strain.

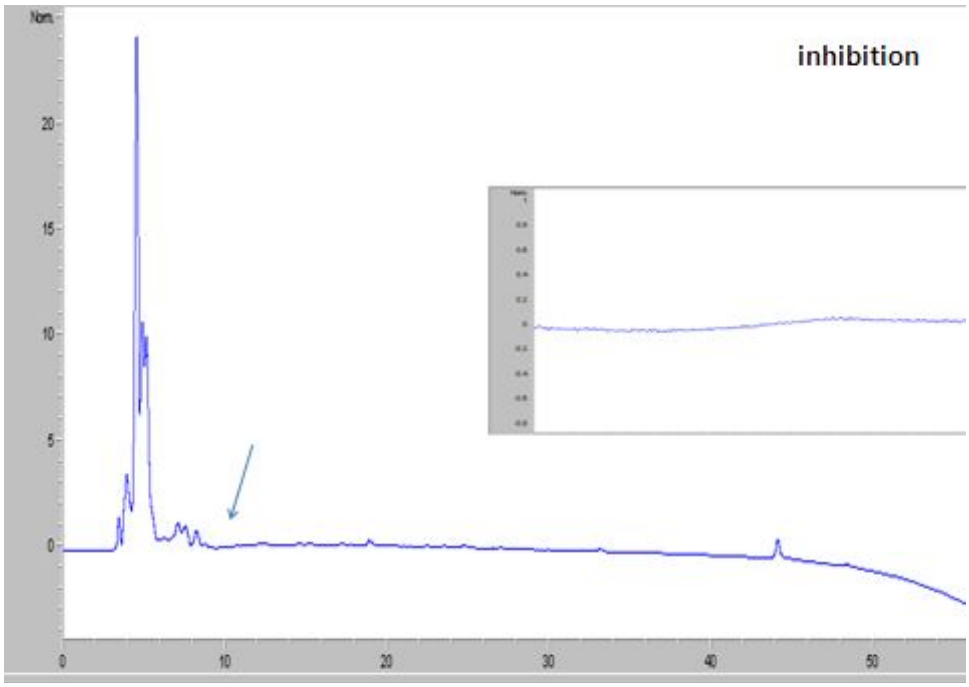


Fig 50. Patterns of HPLC N04 completed knock-out mutant strain.

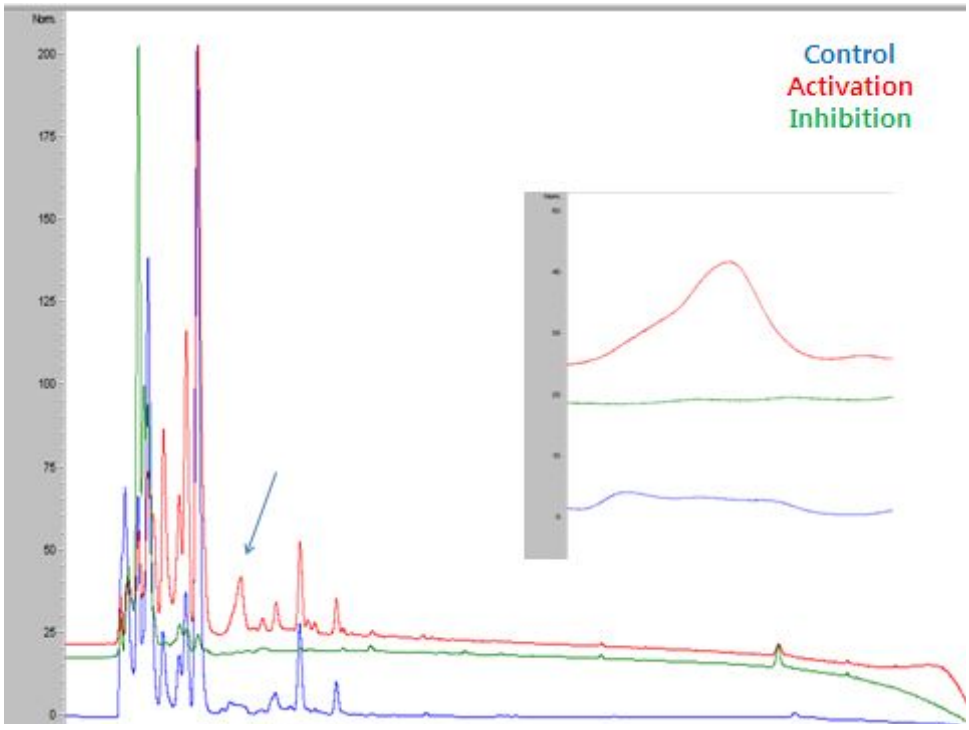


Fig. 51. Patterns of HPLC N04 wild type, enhanced, completed knock-out mutant strains.

③ Knock-out mutant의 target gene 확인

항균물질 생산을 하지 못하는 knock-out mutant INh3의 target gene을 연구하기 위하여 inverse PCR (IPCR)을 수행하였다. mutant 균주의 염색체 DNA를 분리 정제한 다음 제한효소 NarI, SacI 및 SphI으로 절단한 다음 self-ligation하여 IPCR을 수행하였다. agarose gel electrophoresis 후 single band를 추출하여 pGEM-T easy vector에 ligation 하였다. 이 재조합 DNA를 *E.coli* DH5α에 도입하였다. X-gal + ampicillin agar plate에서 자란 형질 전환체를 선별한 후 재조합 plasmid DNA를 확인하였다. 확인된 재조합 insert DNA 염기서열은 제한효소 primer를 이용하여 자동 DNA 염기서열 분석기에서 분석하였다. 얻어진 염기서열로 NCBI BLAST에서 염기상동성을 비교하여 확인하였다. Inserted DNA는 1134 nucleotide로 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 균주의 probable hydrolase 유전자와 100%의 상동성을 보였다. 이러한 결과는 hydrolase gene이 NO4 균주의 항균물질 생산에 중요한 역할을 담당할 것으로 사료된다.(표 3, 그림 52, 53)

Table 3. Primer sequences used for inverse PCR reactions.

NarI-digestedgDNA	Primer sequence 5' - 3'
IPCRprimer1(Tn*5*-*Nar*I) IPCRprimer2(Tn*5*-out2)	CATTCAGGTCGAGGTGGCCCG CAGAACATATCCATCGCGTCCGCC
SstII-digestedgDNA	
IPCRprimer1(Tn*5*-*Sst*II) IPCRprimer2(Tn*5*-out)	GTCAAAAGGACGATTTCGGTTTGG GATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTC
SphI-digestedgDNA	
IPCRprimer1(Tn*5*-*Sph*I) IPCRprimer2(Tn*5*-out)	GACATGCGGATGTTATTGTCGCTTGGG GATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTC

ATGACCCACGACCTGGCCGCCAGCGGCCTTCGCTTCGGCATCGAGGAAGAATTCTTCCTGCTCGATGCCTCCGACCTGGAC
ATCGTCCGCTCCGCCCCCGCCGGATTCGTCGCGGCCTGCCGTGACACGCTCGGCGAGCATTTCGCCGAGGAGATGTTCGAA
TGCCAGGTCGAGGTGGCCAGCCCGGTGTTCTCCACCCTGGCCGAGGCCGCGCGCTTCCACGGTCAGGCCCGGCAACGCCTG
GCGCATCTGGCCATGGACTTCGGCCTGCGCTCGCTCTGCGTCGGCACCCATCCCTTCGCCGACTGGCGGCGGGCGCGAAGC
AACCCGGCGGCGCACTTCGCCCGCCTGTTCGAGGACCAGGGGCGGGTGGCCCGGCGCAGCCTGGTCTGCGGCCTGCACGTG
CATGTGGAGATACCGCCGAGCCACGACCGCATGGCTGTGCTCCAGCGCGTGTTGCCGTGGCTGCCGCTGCTGCTGGCGTTG
AGCGCATCCTCGCCGTTCCGCGGCGGCCGGCGCAGCGGCCTGGCGAGCTATCGACGGGCACTCTGCGGCGAGTGGCCGAGG
ATGAACATTCCTCCTGCCTTGCCCGACGAGGACGCCTATCGCCGCCACCTGGCGCTGCTGCGCGAGACCGGCTGCATCCGC
GAGGATGGCCAGGTCTGGTGGATGATCCGGCCGTCATCCCATGTGCCGACCCCGGAGCTGCGTATCTGCGACGCCTGCCCG
CGCCTGGCCGACGCGCTGAGCCTGGCCGGGCTGTTCAGGGCGCTGGTGGGCGAAGCGCTGGGCGCGGACCCGCGTGCGTTG
CCGGTCGCGCGCGACGCCTGCCTGGAGGAAAACTACTGGCAGGCGCTGCGTTACGGTTGCGCCGGCCGCTATCTCGTCGAA
GGCCGCTGCGTAGGTGCCGGGGACTGGCTGGAAATGGCCTGGCGACAGTGCCGGCCGCAGGCCCGCCAGGGCAACGAATGG
GCCTACCAGCATGCCTGCGGGTTACTCGAAGAGACCTCCGCCGCCCGCCAGTTGCGGCGTTACCGGAGGTTGCGCGAAGCG
GGCCAGGAGCGCCATCCGGCACTGCGCCGGCTGGTGGAGGAGCTGCTGGAGGAAAATCTCCAGCCGGCCTTGGCCGGCGGA

Fig 52. Nucleotide sequence of target gene N04 knock-out mutant strain.

>AE004091 *Pseudomonas aeruginosa* PA01, complete genome
Length = 6264404 E-value = 0, Score = 1128, Bitscore = 2084.14, Identities = 1130/1131 (99%), Positives = 1130/1131 (99%), Gaps = 0/1131 (0%) Frame = +0

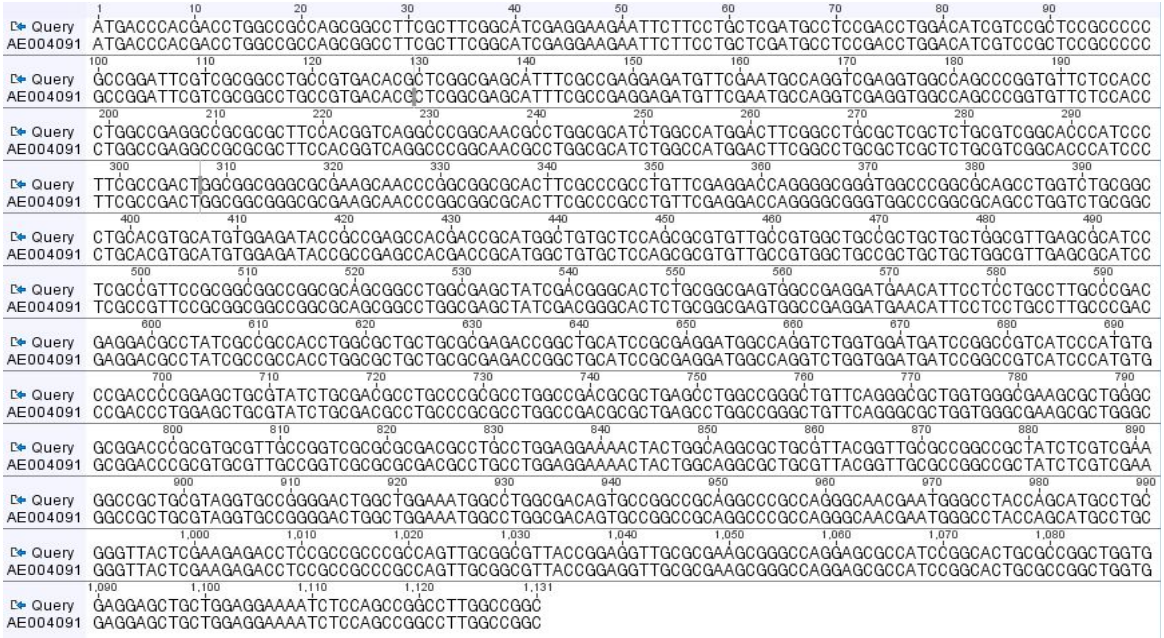


Fig 53. Alignment of nucleotide sequence of target gene N04 knock-out mutant strain.

④ enhanced mutant의 target gene

항균물질 생성능이 약 2배 증가한 mutant의 target gene 염기서열을 알기 위하여 IPCR한 결과 염기서열의 길이는 930 nucleotide로 이루어져 있으며 이 유전자는 *Pseudomonas sp.* XP-M2 catechol 1,2-dioxygenase gene와 100%의 상동성을 보였다. 이러한 결과는 catechol 1,2-dioxygenase gene이 항균물질 생산에 중요한 기능을 수행함을 알 수 있다(그림 54, 55)

ATGACCGTGAAGATTTCCCAGACTGCCGATGTCCAGCGCTTCTTCGAAGAGGCCAGCGGCCAGCTCAACGAACGCGGCGATCCGC
GCACCAAGGCCCTGGTGCGGCGCATCCTCGACGACACGGCGAAGCTGATCGAAGAGATGCAGGTCACGCCCGACGAATTCTGGAA
AGCGGTGGACTACCTGAACCGCCTGGGCAGCCGCCAGGAAGCCGGCCTGCTGGCCGCCGGGCTGGGCCTGGAGCATTACCTGGAC
CTGCTGCTCGACGCCCAGGACGCCGAGGCCGGCCTCACCGGCGGCACGCCGCGCACCATCGAAGGGCCGCTGTACGTCGCCGGCG
CGCCGCTGAGCGATGGCGAGGCACGGATGGACGACGGCCGCGACGCCGGCACCGTGATGTTCCTCCAGGGCCGCGTCAGCGGTCC
CGACGGCCAGCCGCTGGCCGGGGCCATCGTCGATGTCTGGCACGCCAATACCCAAGGCACCTATTCCTACTTCGACAGCAGCCAG
TCCGAATACAACCTGCGCCGGCGCATCCGCACCGACGCCGACGGCCGCTACCGTGCGCGCAGCATCGTGCCGTCCGGCTACGGTT
GCCCGAGCGACGGCCCGACCCAGGAACTGCTCGACCGCCTCGGCTGCCACGGCCAGCGGCCGGCGCACATTCACTTCTTCGTCTC
GGCGCCCGGCCATCGCCACCTGACCACCCAGATCAACCTGGCGGGCGACCGCTACCTGTGGGACGACTTCGCCTACGCCACCCGC
GATGGGCTGATCGGCGACCTGCGCTTCAACGACGACCCCGCCGCGGCCCGCGACCGCGGCGTGGAGGGCGGACGCTTCGCCGAAC
TGGATTTCGACTTCCAGCTCCAGGCCAGCCCGGCACCCGCCGCCGAGCGCCGCAGCCAGCGGCCGCGGGCATTGCAGGGGGGA

Fig 54. Nucleotide sequence of inserted DNA of enhanced mutant target gene.

>EU503129 *Pseudomonas sp.* XP-M2 catechol 1,2-dioxygenase gene, complete CDs

Length = 933 E-value = 0, Score = 915, Bitscore = 1690.8, Identities = 925/930 (99%), Positives = 925/930 (99%), Gaps = 0/930 (0%) Frame = +0

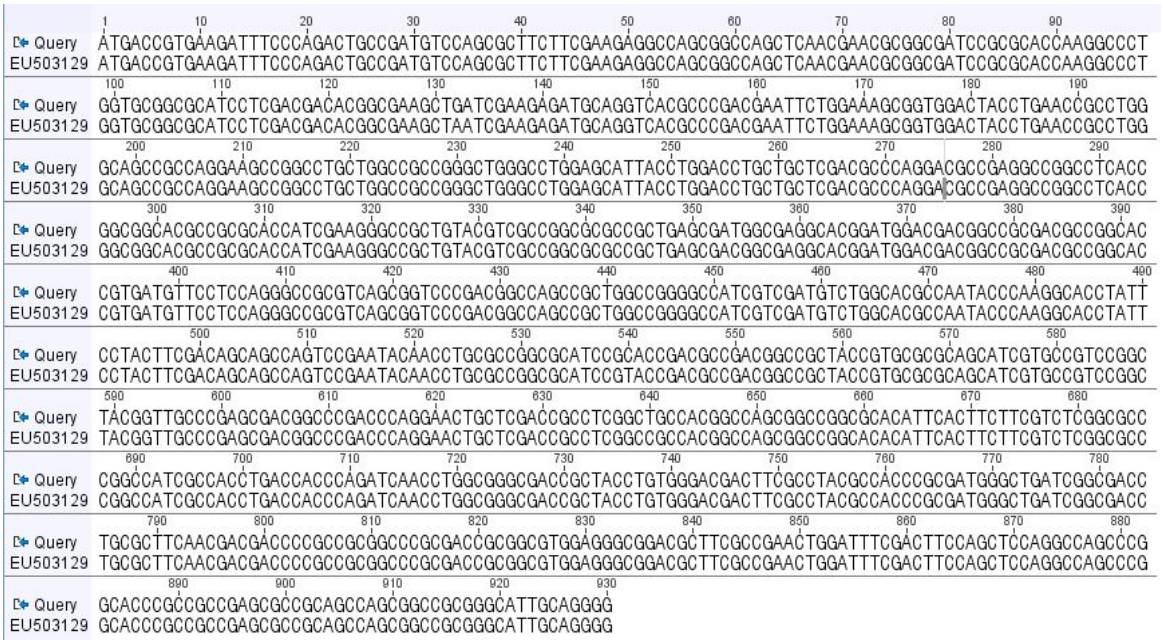


Fig 55. Alignment of nucleotide sequence of inserted DNA of enhanced mutant target gene.

제 2 절 제 1 협동

1.. 감귤 궤양병 균주 *Xanthomonas smithii subsp. citri* 동정

감귤 궤양병에 대한 병원성 미생물인 *Xanthomonas smithii subsp. citri*를 제외한 12종을 분리 동정 하였으며 항균물질의 효과를 검증하고 있다.

본 연구팀은 2년차부터 본 연구에 참여하고 있으며, 감귤 궤양병은 20Co 이상에서 발생하므로 시기적으로 5월에 발생하기 시작한다. 현재 포장 실험을 진행하고 있어 가을철에 효과를 확인 할 수 있다.

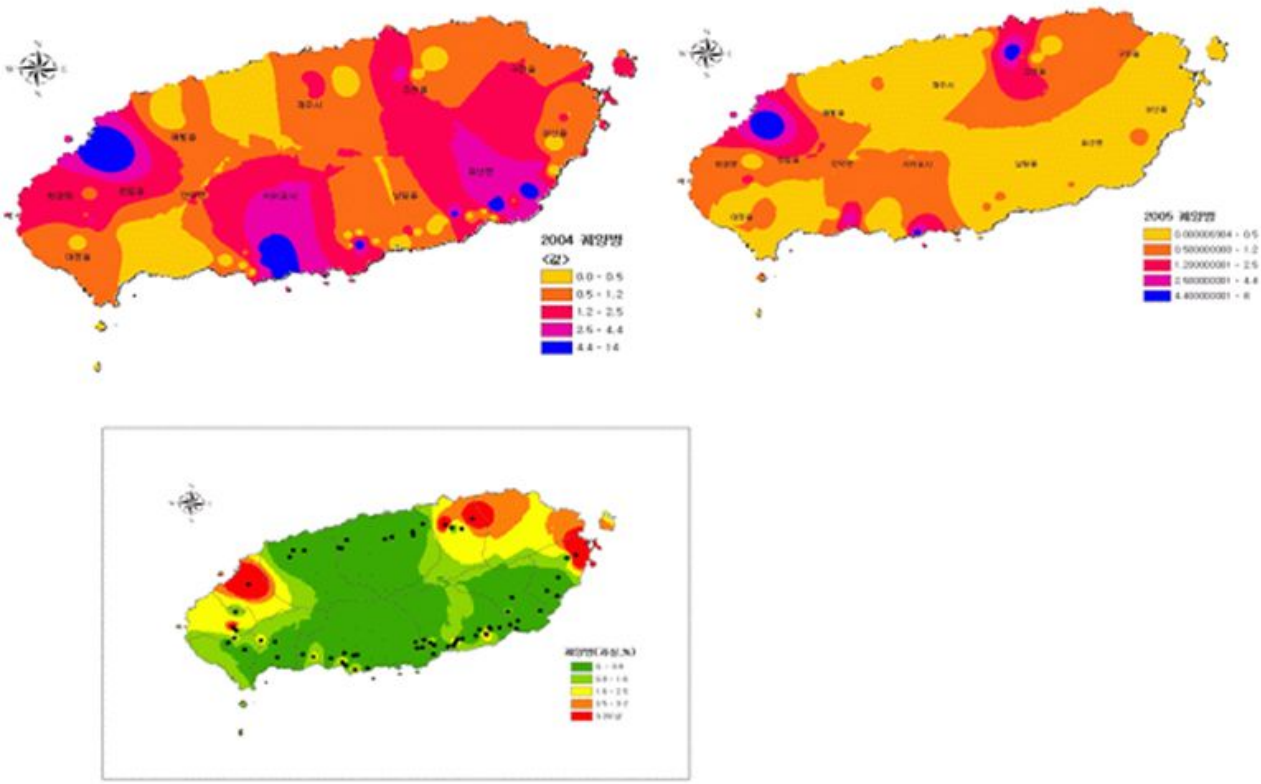


Fig 60. 제주 특별 자치구 지역별 감귤 궤양병 발병정도

2. 감귤 궤양병에 대한 약효 검정

제 1 협동과제에서는 2010년 6월부터 참가하여 현재 1년차 연구를 수행하고 있으며 궤양병 감수성 품종(레몬 등)에서 검정을 위하여 5월 말부터 2주 간격으로 항균제를 처리 하고 있으며 8월말까지 처리하여 그 결과를 확인하고자 하고 있습니다(그림 2). 이는 항균물질을 생산하는 여러 종류의 균주에서 추출된 항균 물질로 제형화 된 제품을 이용하여 농도별 종류별 확인을 위한 실험을 실시하고 있으며 3년차 과제에서 방제 체계 시기와 횟수 등을 결정 하는 방제체계 확립과 궤양병 방제 효과 검정 및 궤양병 방제 체계의 농가 실증 시험을 위화여 제주도내 4개 지역의 감귤 재배 포장에서 실증 실험 및 방제 체계 평가 및 보완을 준비 하고 있습니다.

Fig 61. 감귤궤양병 병증의 모습

3. 감귤 궤양병 병원균 분리 및 동정

제주 내 10여 곳의 궤양병 발병지역의 시료에서 총 29종의 미생물을 분리 및 순수 배양 하였으며, 현재 24종을 16s rRNA 유전자 분석을 완료 하였다. 이중 *Enterobacter sp.* 13종, *Pseudomonas sp.* 3종, *Pantoea sp.* 5종, *Staphylococcus sp.* 2종, *Xanthomonas sp.* 4종, 총 27종을 분리 동정하였다. 동정 결과는 아래 표와 같다.

Table 4 . 감귤 궤양병 지역 16s rRNA 유전자 분석 결과

Name	분류	동정
Y 01	낟군 8-17	*Enterobacteriaceae bacterium*
Y 02	낟군 82-20	*Pseudomonas putida*
Y 03	낟군 82-29	*Pantoea agglomerans*
Y 04	낟군 82-40	*Pseudomonas geniculata*
Y 05	낟군 82-47	*Enterobacter endosymbiont*
Y 06	낟군 82-49	*Enterobacteriaceae bacterium*
Y 07	낟군 82-63	*Pantoea agglomerans*
Y 08	낟군 82-86	*Enterobacteriaceae bacterium*
Y 09	낟군 87-7	*Escherichia coli*
Y 10	낟군 87-30	*Staphylococcus saprophyticus*
Y 11	낟군 87-37	*Pantoea agglomerans*
Y 12	낟군 87-46	*Enterobacter endosymbiont*
Y 13	낟군 87-54	*Enterobacter endosymbiont*
Y 14	낟군 87-58	*Enterobacter endosymbiont*
Y 15	낟군 구억리-17	*Staphylococcus hominis*
Y 16	부열 13-2-3-2	*Enterobacter endosymbiont*
Y 17	부열 13-3-2	*Enterobacter endosymbiont*
Y 18	부열 B-2-1	*Pantoea agglomerans*
Y 19	부열 B-2-4	*Pantoea agglomerans*
Y 20	상가 G-33	*Enterobacter cloacae*
Y 21	상호 30	*Pseudomonas geniculata*
Y 22	태총리 20-1	*Enterobacter endosymbiont*
Y 23	효돈 5-1	*Enterobacter cloacae*
Y 24	효돈 11	*Xanthomonas arboricola*
Y 25	효돈 1-2	*Xanthomonas axonopodis*
Y 26	효돈 10-1	*Xanthomonas sp.*
Y 27	효돈 12-3	*Xanthomonas sp.*

4. 노지 실험 결과

전남대학교의 길항 미생물을 대량 배양 하여 제2 협동인 (주)에이엠팜에서 생산한 시제품을 노지 실험 하였다. 감귤 궤양병에 대한 약효 검정을 위하여 농촌진흥청 국립 원예 특작 과학원 제주 난지 감귤시험장에서는 궤양병 감수성 품종인 레몬과 감귤에 2010년 5월말부터 2주 간격으로 노지 감귤나무에 5회 처리 하였으며 8월 그 결과를 확인 하였으며, 2011년 5월부터 2차 실험으로 방제 체계시기와 횟수에 대한 실험을 실시하였다. 이러한 농가 실증실험을 위하여 제주도내 4개 지역의 감귤 재배 포장에서 실증 실험 및 방제 체계 평가 및 보안을 준비 하고 있으며, 현재 2011년 6월부터 3차 방제를 하여 이를 검증 하고 있는 상황이다. 아래 표는 2010년부터 방제 실험을 실시한 결과이다. 8월경 제품의 안정성과 품질 및 방제 체계의 확립이 될 것으로 보인다.

Table 5. 감귤 궤양병에 대한 방제 효과 (노지 결과)

처리	이병엽율 (%)	이병과율(%)
녹용신(Streptomycin)	24.3±7.2a	12.1±1.9a
보르도액 CM 150	5.9±2.8cd	3.4±1.8b
시료 A	10.4±6.1cd	10.4±7.6ab
시료 B	14.3±2.9bcd	4.6±1.4b
무처리	22.1±8.5ab	16.9±12.0a
	C.V=41.7	C.V=66.4

(약제 처리일 (2010년 5/26, 6/12, 6/26, 7/14, 7/31) 총 5회 처리. 조사일 : 2010년 8월 20일)

제 3 절 제 2 협동

1. 대량 생산

가. fermentation

(1) 제품 생산

고품질 감귤 생산을 위한 항균물질을 생산하기 위하여 전남 곡성의 생물방제센터의 fermenter을 이용하여 발효를 하고자 하였다. 이는 대량 생산 및 제품의 제형화가 농가 보급에 기여 할 수 있으며, 대량 생산에 대한 조건 확립이 필요하기에 시제품의 생산 및 노지 실험을 위한 제품의 생산을 하였다. 항생물질을 생산 하는 균주인 *Pseudomonas aeruginosa* NO3는 인체에 대한 유해성이 있으므로 대량 생산 및 제형화를 위하여 대량 배양 후 살균 하여 사용 하거나, 또는 살균 후 pH 2.0 으로 낮추어 항균물질을 침전 시키고 이를 농축 하여 분제나 수화제로의 제형을 시행 하고자 한다.

(2) 대량 배양 조건 확립

대량 배양의 조건을 확립하기 위하여 소규모의 실험실 내의 방법을 변형 및 제형화를 위한 제품 생산 방법 확립을 위하여 소규모 배양을 실시하였으며, 이를 제형화 하기 위하여 농축과 건조 등의 방법을 실시하였다.

fig 62. 대량 배양 과정

(1. seed culture(5L) 2. 50L fermenter 3. 중앙 제어실 4.균체 제거)

(3) 제형화

항균 활성이 뛰어난 천연 항생제를 추출하여 3종류의 제형화를 실시 하고자 하였으며, 나무에 직접 주사 하는 수관주사용, 물에 풀어서 사용 하는 분말형, 액상으로 희석 하여 사용 할 수 있는 액상 희석제의 3종류의 제품을 만들고자 하였으며, 각각의 특성과 보관상의 용의 점등을 고려하여 시제품을 제작 하였다.

(궤양병 수관 주사용) (궤양병 억제제 분말 제재) (액상 희석제)

Fig 63. 제형화 시제품 사진

(4) 시제품 제작 및 등록

현재 액상의 궤양병 치료용 제품을 출시 및 시판을 위하여 제품 등록 및 상품화를 준비 하고 있으며, 대량 생산의 준비를 실시하고 있다. 이러한 궤양병 억제제는 감귤뿐만 아니라 참다래 궤양병과 참다래 오갈병, 저온성 병원균에 대한 길항력을 확인 하였으며, 대부분의 그람 양성균에 대한 길항력이 나타나며 비브리오와 P. agarici에 대한 길항력이 나타나는 것을 확인 하였으며, 이는 다른 품종의 궤양병뿐 아니라 오갈병 등에 사용이 가능함을 확인 하였다.

Fig 64. 시제품

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 제 1 주관(전남대학교)

년도	항목	달성도
1차년도	항균물질 생산균주 선발	100%
	미생물 동정	100%
	항균 물질 정제	100%
	대량 배양 조건 확립	100%
2차년도	항균물질 구조 분석	100%
	항균 물질 기작 규명	100%
	(Rhamnolipids : 세포막 파괴)	
	신규 항균물질 분리	100%
	(2-heptyl-4-hydroxy guinoline N-oxide)	
3차년도	항균 물질 기작 규명	100%
	항균 물질 독성검사	100%
	(Rhamnolipid는 독성이 없는 천연 항생제로 알려져 있음)	

제 2 절 제 1 협동(농촌진흥청 난지 농업연구소)

년도	항목	달성도
1차년도	해당사항 없음	
2차년도	궤양병 병원균 분리	100%
	현장 노지 실험	100%
	(약효 검증)	
	약해 검정	100%
	(약해 없음)	
3차년도	감귤 궤양병 방제 체계 확립	100%
	(액상 상포시 최적)	
	신규 궤양병 병원균 분리	100%
	(총 25종 분리)	

제 3 절 제 2 협동(에이엠팜(주))

년도	항목	달성도
1차년도	대량 대양 실험 (5톤 까지 배양성공) 항균물질 제형화 (액상, 분말 제품 제형화 성공)	100% 100%
2차년도	간이 Open fermenter 개발 (15만원 소요) 항생제 제형화 연구 (액상, 분말 제품의 포장법 및 디자인 연구)	100% 100%
3차년도	항생제 제형화 및 시제품 생산 (액상, 분말) 간이 Open fermenter 개발 (보급형 제작)	100% 100%

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

※실용화·상용화 계획

1. Rhamnolipid 생산 미생물을 이용한 생물학적 방제제로 이용

2. 무독성 Rhamnolipid의 대량 생산으로 농업, 의학, 화장품, 식품의 응용 가능

3. Rhamnolipid 분말제제 판매계획

4. Rhamnolipids 종류별 생산 비법 기술 이전 준비

5. Rhamnolipid를 이용한 화장품 개발 회사 설립 예정

6. 제 2 협력과제 담당 회사는 농업용 rhamnolipids 사용 일환으로 이미 농민들에게 교육 및 홍보 중.

7. 이미 1건의 특허와 3건의 연구 발표가 있었으며, 현재 2건의 특허 출원준비 중이고, 2012년 1월까지 특허 출월 예정임.

8. Rhamnolipids를 이용한 석유류 오염지역에서 기름(oil) 제거 방법 개발

9. Rhamnolipids를 이용한 어류, 축사, 양계장, 돈사 등 청결 유지 등에 활용 가능

10. Gram(+)와 Gram(-) 병원성 균주들에 대하여 항균 물질을 내는 *Bacillus sp.* 균주의 screening 하여 인체 유해성이 없는 감귤 궤양병에 관한 연구를 계속 수행 중.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 중국은 *Pseudomonas* 속으로부터 rhamnolipids 생산 방법을 대대적으로 연구 하고 있으며, 이미 세계시장의 90% 이상을 점유하고 있음.

2. *Pseudomonas* 속을 이용하여 튀김용 폐기름, 폐식용유 등을 기질로서 이용하여 rhamnolipids를 생산 하므로 인하여 폐자원의 재활용 및 환경오염을 줄이고 있음.

제 7 장 참고문헌

Mohamad. A and Abdel-mawgoud, Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles, *Appl Microbiol Biotechnol* (2010) 86:1323-1336

Parul Vatsa, Lisa Sanchez, Christophe Clement, Fabienne Baillieul and Stephan Dorey. Rhamnolipid Biosurfactants as New Players in Animal and Plant Defense against Microbes. *Int. J. Mol. Sci.* 2010, 11, 5095-5108

Kyung Mi Lee, Sun-Hee Hwang, Soon Duck Ha, Jae-Hyuk Jang, Dong-Jung Lim and Jai-Yul Kong. Rhamnolipid production in batch and fed-batch fermentation using *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P. *Biotechnology and bioprocess engineering.* 2004. 9. 267-273

Muller, MM. and R. Hausman. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis; Traditional and advanced engineering toeards biotechnological production. *App Microbiol. Biotechnol.* 2011. 91. 251-264

Markus Michael Müller & Barbara Hörmann & Christoph Syldatk & Rudolf Hausmann. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. *Appl Microbiol Biotechnol* (2010) 87:167-174

Marcia Nitschke & Siddhartha G. V. A. O. Costa & Jonas Contiero. Structure and Applications of a Rhamnolipid Surfactant Produced in Soybean Oil Waste. *Appl Biochem Biotechnol*(2010). 160:2066-2074

Stephan Heeb, Matthew P. Fletcher, Siri Ram Chhabra, Stephen P. Diggle, Paul Williams & Miguel C´amara. Quinolones: fromantibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiol* Rev 35 (2011) 247-274

Chawala Chayabutra, Jian Wu, Lu-Kwang Ju. Rhamnolipid Production by *Pseudomonas aeruginosa* Under Denitrification: Effects of Limiting Nutrients and Carbon Substrates. *Biotechnol bioeng* 72:25-33

Choi MH, Xu J, Gutierrez M, Yoo T, Cho Y-H, Yoon SC (2011) Metabolic relationship between polyhydroxyalkanoic acid and rhamnolipid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: comparative 13C NMR analysis of the products in wild-type and mutants. *J Biotechnol* 151:30-42

Hörmann B, Müller MM, Syldatk C, Hausmann R (2010) Rhamnolipid production by Burkholderia plantarii DSM9509T. *Eur J Lipid Sci Technol* 112:674-680

Lee SY, Lee DY, Kim TY (2005) Systems biotechnology for strain improvement. *Trends Biotechnol* 23:349-358

Müller MM, Hörmann B, Syldatk C, Hausmann R (2011b) Microbial rhamnolipids. In: Grunwald P (ed) Carbohydrate-modifying biocatalysts. PanStanford Publishing Pte. *Ltd., Singapore*

Wu JY, Yeh KL, Lu WB, Lin CL, Chang JS (2008) Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *Bioresour Technol* 99:1157-1164

Abdel-Mawgoud AM, Aboulwafa MM, Hassouna NAH (2009) Characterization of rhamnolipid produced by Pseudomonas aeruginosa isolate Bs20. Appl Biochem Biotechnol 157:329-345

Al-Tahhan RA, Sandrin TR, Bodour AA, Maier RM(2000) Rhamnolipidinduced removal of lipopolysaccharide from Pseudomonas aeruginosa: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. Appl Environ Microbiol 66:3262-3268

Boles BR, Thoendel M, Singh PK (2005) Rhamnolipids mediate detachment of Pseudomonas aeruginosa from biofilms. Mol Microbiol 57:1210-1223

Guerra-Santos L, Kappeli O, Fiechter A (1984) Pseudomonas aeruginosa biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. Appl Environ Microbiol 48:301 - 305

Pamp SJ, Tolker-Nielsen T (2007) Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol 189:2531 - 2539

Rooney AP, Price NP, Ray KJ, Kuo TM (2009) Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. FEMS Microbiol Lett 295:82-87

Sotirova AV, Spasova DI, Galabova DN, Karpenko E, Shulga A (2008) Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. Curr Microbiol 56:639 - 644