

Antifungal Activity of *Bacillus* sp. BCNU 2003 against the Human Pathogenic Fungi

Hye Jung Choi, Uk Hee Yang<sup>1</sup>, Ya Eil Kim<sup>1</sup>, Yeon-Hee Choi<sup>2</sup>, Cheol Soo Ahn<sup>2</sup>, Young-Kee Jeong<sup>3</sup>, Dong Wan Kim<sup>4</sup> and Woo Hong Joo<sup>1</sup>

Department of Biology and Interdisciplinary Program in Biotechnology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea

<sup>1</sup>Department of Biology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea

<sup>2</sup>Cho-A Pharm. Co, LTD., Haman-kun 637-810, <sup>3</sup>Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

<sup>4</sup>Department of Microbiology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea

Received January 4, 2010 / Accepted January 23, 2010

An antifungal antibiotic-producing strain, BCNU 2003, was isolated from forest soil in Korea. The morphological and physiological characters, and 16S rRNA sequences analysis of strain BCNU 2003 identified this strain as *Bacillus* genus. The *Bacillus* sp. BCNU 2003 showed strong antifungal activities against *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* with inhibition ranging from 62.05 to 63.49% by using dual culture technique. *Bacillus* sp. BCNU 2003 produced a maximum level of antifungal substances under aerobic incubation at 28°C and pH 6.5-7.2 for 6 days in LB broth. Ethyl acetate extract of the cultured broth showed strong antifungal activity and a broad antifungal spectrum against various pathogenic fungi. The minimum inhibitory concentration (MIC) values for its active extracts ranged between 0.0625 mg/ml and 1 mg/ml. In addition, *Bacillus* sp. BCNU 2003 was determined to have the ability to produce enzymes such as amylase, protease, gelatinase and catalase.

**Key words** : Antifungal activity, human pathogenic fungi, *Bacillus* sp. BCNU 2003, *Bacillus* sp., minimal inhibitory concentration

## 서 론

제약 및 의약분야에서 미생물유래 천연생리활성 물질의 연구가 가장 활발하게 이루어지는 분야는 인체에 여러가지 감염을 일으키는 감염증 치료를 포함하는 항생물질에 관한 연구이다[12]. 특히 진균류는 인체의 면역 기능이 약화되었거나, 항생물질, 호르몬류 또는 항암제 등의 과용으로 인하여 항생물질에 대한 내성이 생겼을 때 여러 가지 진균증을 일으키는데 [1,2], *Candida* sp.에 의한 칸디다증(candidiasis), *Aspergillus* sp.에 의한 국균증(aspergillosis), *Cryptococcus neoformans*에 의한 효모균증, *Mucor* sp.와 *Rhizopus* sp. 등에 의한 접합균류증(zygomycosis), *Epidermophyton floccosum*과 *Trichophyton* sp.에 의한 피부사상균증(dermatophytosis) 등이 대표적인 진균증이다[4,11,13,29].

현재 임상용으로 사용하고 있는 많은 의약품 항생제들이 미생물 유래 천연생리활성물질에서 그 선도물질이 분리되었으며, 그 외에도 다양한 유효성분에 대한 연구가 국내외 학계에서 꾸준히 진행되고 있다[24]. Polyene 계열은 다양한 *Streptomyces* 종에서 발견된 천연 항진균제로서 ergosterol과 복합체를 형성하여 곰팡이 세포막을 약화시키는 광범위 항진

균제이며, cispentacin은 *Bacillus cereus*에서 분리한 화합물이다[11]. 그밖에도 amphotericin B, flucytosine 및 griseofulvin 등이 천연항진균제로 널리 사용되고 있다. 또한 echinocandins와 echinocandin B와 같은 echinocandin계제(caspofungin, anidulafungin 및 micafungin) 등은 천연물질의 반합성품이며, pneumocandins는 곰팡이에서 분리된 천연물로 현재 caspofungin 등으로 반합성되어 활용되고 있다[15]. 특히 caspofungin과 micafungin과 같은 echinocandin 계열의 항진균제는 곰팡이 세포벽의 1,3-D-glucan 합성을 저해하는 것으로 알려져 있다[1-3,10].

그러나 amphotericin B를 비롯한 몇몇 항생제들은 인체독성을 야기하며, griseofulvine은 항진균 스펙트럼이 좁으며, fluconazole은 장기투여 시 내성 균주 출현 등 문제점이 많으므로 기존의 항진균제의 부작용과 문제점을 극복할 수 있는 신규 천연 항진균 물질의 연구가 절실히 필요한 실정이다 [20,22,26,28].

이에 본 연구에서는 신규 미생물 유래 천연생리활성물질 개발 연구를 위하여 토양으로부터 항균 및 항진균 활성이 뛰어난 균주를 분리하던 중 인체 진균증의 원인이 되는 *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *E. floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes* 및 *Trichophyton rubrum* 등에 뛰어난 효과를 가진 *Bacillus* sp. BCNU 2003를 분리하였다. *Bacillus* sp. 균주의 항진균 활성에 관한 연구는 다양한 생물방제법에 대한 연구의 일환으로 수행되어 식물병원성 곰팡이의 생육억제에 관한 연

### \*Corresponding author

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

E-mail : whjoo@changwon.ac.kr

구가 주를 이루고 있으며, 인체 병원성 진균에 대한 보고는 거의 없는 실정이다[10,15,32].

본 연구에서는 *Bacillus* sp. BCNU 2003 균주를 대상으로 그람 양성균, 그람 음성균 및 인체 병원성 진균에 대한 1차 항균활성을 조사하였으며, 주요 항진균 물질 분리를 위한 과정으로 ethyl acetate (EA) 추출물과 펩타이드 추출물로 나누어 항균활성을 조사하였으며, 특히 인체 병원성 진균에 대한 활성을 중점적으로 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 분리 균주의 동정

선발된 BCNU 2003 균주는 태백산 일대에서 토양을 채취하여 그람양성 세균, 그람음성 세균, 인체병원성 효모와 곰팡이 각 1종에 대한 스크리닝을 통해 항균스펙트럼이 넓고 활성이 뛰어난 균주를 최종적으로 분리하여 사용하였다. 생리학적 및 생화학적 특성은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology를 참고하여 조사하였고, 16S rRNA 염기서열 분석을 실시하여 균주를 동정하였다. 16S rRNA의 PCR sequencing을 위하여 16F (5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-ACG GCTACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 염기서열을 분석하였다. Blast search를 통해 16S rRNA를 비교 분석하였으며 계통수는 neighbor joining 법과 bootstrap 분석을 기반으로 확인하였다[21,25].

### 테스트 균주

항균활성 측정을 위해 그람양성 세균 3종, 그람음성 세균 3종 및 인체병원성 진균 6종을 테스트 균주로서 사용하였다. 즉, *Bacillus subtilis* KACC 10111 (ATCC 465), *Micrococcus luteus* KACC 10488 (ATCC 4698), *Staphylococcus aureus* IMSNU 11088 (ATCC 6538)와 *Escherichia coli* IMSNU 10080 (ATCC 10798), *Pseudomonas aeruginosa* IMSNU 10191 (ATCC 10145), *Pseudomonas fluorescens* KACC 10071 (ATCC 13525), *Aspergillus niger* KACC 40280 (ATCC 4695), *Candida albicans* KACC 30062 (ATCC 10231), *Epidermophyton floccosum* KCTC 6921, *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7968, *Trichophyton mentagrophytes* KCTC 6077 (IFO 6202) 및 *Trichophyton rubrum* KCTC 6375를 사용하였다. 이들 균주들은 한국농업미생물자원센터, 한국생물자원센터, 서울대학교 미생물연구소로부터 분양받았다.

### 항균스펙트럼 조사

BCNU 2003 균주의 배양액을 이용하여 12종의 테스트 균주에 대해 평판배지확산법(agar diffusion method) 및 대치배양법으로 항균스펙트럼을 조사하였으며, 28°C에서 3-10일간 배양 한 후 저해 정도를 측정하였다. 사상균에 대한 저해능 측정

은 Whipps의 방법[30]에 준하여 측정하였으며, 저해능은 증식 저해율(growth inhibition: GI)로 나타내었다.

$$GI=(R1-R2)/R1 \times 100$$

GI: growth inhibition (%), R1: 배양 후 균 사이의 거리,

R2: 배양 전 접종 거리

### 항균활성 물질의 생산 조건 및 부분정제

항균 물질의 최적 생산 조건을 조사하기 위한 기본배지로 nutrient broth (NB), Luria-Bertani (LB) broth, tryptic soy broth (TSB) 등을 사용하였으며, 각종 pH 및 온도조건 등을 달리하여 8일 동안 배양하면서, 24시간 간격으로 배양액을 회수하여, 전처리 후 항균활성을 조사하였다. 따라서 최적배양 조건으로 각각 1 l를 진탕배양하였고, 배양 상등액을 회수 (7,500×g, 10분, 4°C)하여 ethyl acetate (EA) 추출과 6N HCl 침전을 통해 EA 추출물과 펩타이드 추출물을 얻어, 테스트 시료로 사용하였다.

### 최소저해농도(Minimum inhibitory concentration: MIC) 측정

BCNU 2003 균주의 주요 항균활성 물질을 동정하기 위해 부분정제하여 EA 추출물과 펩타이드 추출물을 얻었으며, 각 추출물에 대하여 액체배지감수성실험 (broth microdilution susceptibility test) 방법[18,19]을 통하여 최소저해농도를 측정하였다. 즉, 테스트 균주를 최적배양조건에서 배양할 때 이에 대한 연속희석된 EA 추출물과 펩타이드 추출물의 저해능을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 균주의 분리 및 동정

태백산 일대의 토양시료를 채취하여 LB agar 배지에 단계 희석법으로 도말하여 26°C에서 2일간 배양한 후, 각종 세균을 순수 분리하였다. 그람양성 세균, 그람음성 세균 및 인체병원성 진균 각 1종에 대해 일차적으로 항균테스트를 실시하여 항균 및 항진균 활성이 우수하며, 항균스펙트럼이 넓은 BCNU 2003 균주를 선발하였다. 생리학적 및 생화학적 특성을 검토한 결과, BCNU 2003은 포자를 형성하는 호기성 세균으로 최적 배양온도는 35°C로, 20°C에서 60°C까지 생육이 가능하며, pH 범위는 5.6에서 9.2로 비교적 넓은 pH 영역에서 안정적으로 생육하였으며, 12%의 높은 염분 농도에서도 생육이 가능하였다. BCNU 2003은 다양한 탄소원을 이용하는 것으로 나타났으며, 특히 glucose, mannitol 및 starch를 첨가했을 때 생육이 좋은 것으로 나타났다. 또한 amylase, protease, gelatinase, catalase 및 urease를 생성하여 다양한 효소를 분비하는 것으로 나타났으며, Voges-Proskauer test는 음성, nitrate reductase는 양성으로 조사되었다(Table 1). 16S rRNA 염기서열 분

Table 1. Biochemical and physiological characteristics of *Bacillus* sp. BCNU 2003

Characteristics	BCNU 2003
Growth under anaerobic conditions	-
Gram staining	+
Motility	-
Endospores produced	+
Growth temperature range	20°C-60°C
Optimum growth temperature	35°C
Growth pH range	5.6-9.2
Growth in the presence of NaCl	
3 %	+
5 %	+
7 %	+
9 %	+
12 %	+
15 %	-
Assimilation of	
Arabinose	+
Fructose	+
Galactose	+
Glucose	++
Glycerol	+
Lactose	-
Maltose	+
Mannitol	++
Mannose	+
Raffinose	-
Starch	++
Sucrose	+
Xylose	+
Production of Amylase	+
Protease	+
Lipase	-
Lectinase	-
Gelatinase	+
Catalase	+
Oxidase	-
Urease	+
Voges-Proskauer reation	-
H <sub>2</sub> S production	-
Nitrate reductase	+

석을 실시하여 Blast search를 통해 비교 분석한 결과, *Bacillus amyloliquefaciens*, 및 *B. subtilis*와 99% 상동성을 갖는 것으로 나타났으며, 계통적으로는 *B. amyloliquefaciens*와 *Bacillus vallismortis*의 subcluster에 속하는 균주로 확인되었다(Fig. 1).

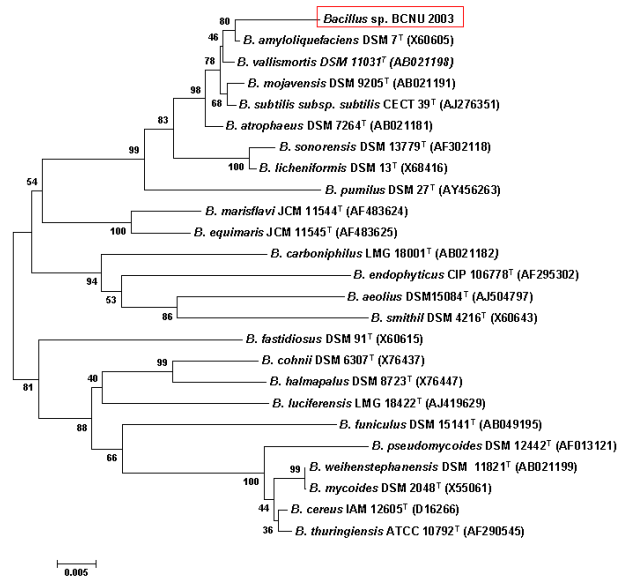


Fig. 1. Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequences of the *Bacillus* sp. BCNU 2003 and closely related species. Bootstrap values expressed as a percentage of 1000 replications were given at the branching points.

그람양성 세균, 그람음성 세균 및 인체병원성 진균에 대한 항균활성 측정

그람양성 세균 3종, 그람음성 세균 3종 및 인체병원성 진균 6종을 대상으로 BCNU 2003의 항균 및 항진균 활성을 조사한 결과, 그람양성 세균인 *M. luteus*에 대해서 14.7 mm의 넓은 억제환을 나타냈으며, 그람음성 세균에 대해서는 활성이 나타나지 않았다. 그리고 병원성 효모인 *C. albicans*와 *Sa. cerevisiae*에 대해서 각각 16.2 mm와 15.7 mm의 넓은 억제환을 관찰할 수 있었다(Table 2, Fig. 2). 또한 Whipps의 방법에 준한 인체병원성 진균에 대한 활성테스트 결과 *A. niger*에 대해 63.49%가 가장 높은 저해율을 보였으며, *T. mentagrophytes*와 *T. rubrum*에 대해서도 각각 62.20%, 62.05%의 높은 저해효과를 나타내었다(Table 3, Fig. 3). 또한 *Ep. floccosum*에 대해서도 다소 약하지만 16.33%의 활성을 나타내어 BCNU 2003이 인체병원성 진균에 대해 넓은 항균스펙트럼을 가진 것으로 확인되었다.

최적 생산 조건 및 최소저해농도 조사

BCNU 2003 균주를 각종 배양조건을 달리하여 항균 및 항진균 물질의 최적 생산 조건을 검토한 결과, 활성이 가장 좋은 것은 LB broth 배지로 나타났으며, pH 7.2, 28°C에서 6일간 배양시 가장 많은 항균물질이 생산되는 것으로 나타났다.

Table 2. Effect of *Bacillus* sp. BCNU 2003 on *in vitro* growth of bacteria and human pathogenic yeasts

Species	Diameter of inhibition zones (mm)							
	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Sa. cerevisiae</i>
BCNU 2003	8.18±0.023	14.7±0.42	-	-	-	-	16.2±0.28	15.7±0.99

Table 3. Effect of *Bacillus* sp. BCNU 2003 on *in vitro* growth of human pathogenic fungi

Species	<i>A. niger</i>		<i>Ep. floccosum</i>		<i>T. rubrum</i>		<i>T. mentagrophytes</i>	
	GI(%)	GI category	GI(%)	GI category	GI(%)	GI category	GI(%)	GI category
BCNU 2003	63.49±0.47	3	16.33±1.87	1	62.05±0.64	3	62.20±2.04	3

<sup>a</sup>Percent growth inhibition (GI) was determined after 7days of incubation. Values were categorized on a scale from 0 to 4, where 0=no growth inhibition, 1=1 to 25%, 2=26 to 50%, 3=51% to 75% and 4 76 to 100%. The tests are in duplicate.

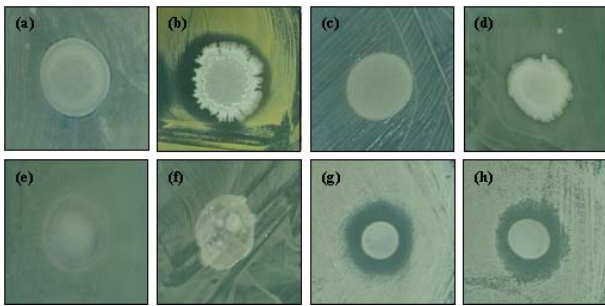


Fig. 2. Antagonistic effect of *Bacillus* sp. BCNU 2003 on the growth of (a) *B. subtilis*, (b) *M. luteus*, (c) *S. aureus*, (d) *E. coli*, (e) *P. aeruginosa*, (f) *P. fluorescens*, (g) *C. albicans*, (h) *Sa. cerevisiae* after 24 hr of incubation.

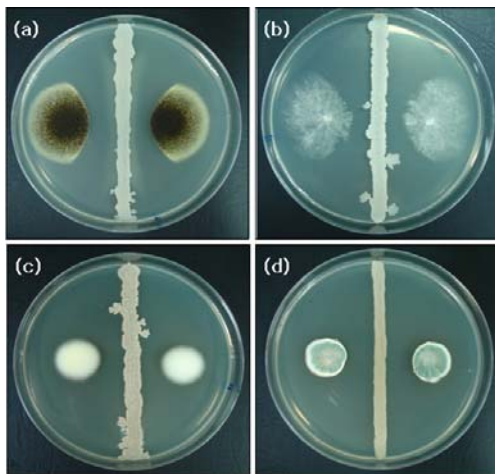


Fig. 3. Antagonistic effect of *Bacillus* sp. BCNU 2003 on the mycelial growth of the dermatophyte, (a) *A. niger*, (b) *Ep. floccosum*, (c) *T. mentagrophytes*, (d) *T. rubrum* after two weeks of incubation on PDA at 28°C.

BCNU 2003 균주의 펩타이드 추출물은 그람양성균에 대해 상대적으로 넓은 항균스펙트럼을 나타내었다. *M. luteus*에 대해서 0.125 mg/ml의 저농도에서 생육을 저해하였으며, *S. aureus*와 *B. subtilis*에 대해서도 각각 0.25 mg/ml과 0.5 mg/ml의 농도에서 생육을 저해하였다. EA 추출물은 0.25 mg/ml과 1 mg/ml 농도에서 각각 *M. luteus*와 *B. subtilis*의 생육을 저해하는 것으로 나타났다. 그리고 인체병원성 진균에 대한 활성은 EA 추출물이 펩타이드 추출물보다 상대적으로 항균스펙트럼도 넓었으며, 저농도에서 진균의 생육을 억제하는 것으로 나

타났다. *Sa. cerevisiae*에 대해 0.0625 mg/ml의 저농도에서 생육을 억제하였으며, *A. niger*와 *C. albicans*에 대해서는 0.125 mg/ml, *Ep. floccosum*과 *T. mentagrophytes*에 대해서는 0.25 mg/ml의 저농도에서 생육을 저해하는 것으로 나타났다. 또한 *T. rubrum*에 대해서도 1 mg/ml 농도에서 생육이 저해되었다. *Ep. floccosum*과 *T. mentagrophytes*는 펩타이드 추출물에서도 0.5 mg/ml 농도에서 생육이 저해되는 것을 관찰할 수 있었다(Table 4, 5). BCNU 2003 균주의 배양액 추출을 통해서 최소 저해농도를 측정된 결과, 주요 인체병원성 진균증을 유발하는 *C. albicans*, *Ep. floccosum*, *T. rubrum* 및 *T. mentagrophytes*에 대해 높은 항진균 활성을 보였으며, 특히 기회성 감염을 유발하는 *A. niger*와 *Sa. cerevisiae*에 대해서 뛰어난 항진균 활성을 나타내었다.

*Bacillus* sp.의 항진균 활성에 관한 연구는 다양한 생물방제법에 응용되고 있는 식물병원성 진균의 생육 저해에 관한 연구가 주를 이루고 있으며[10,15,32], 인체 병원성 진균에 대한

Table 4. Antibacterial susceptibility test of *Bacillus* sp. BCNU 2003

Microorganism	Streptomycin (µg/disc)	Minimum inhibitory concentration (MIC) (mg/disc)	
		EA extract	Peptide preparation
<i>B. subtilis</i>	1.25	1	0.5
<i>M. luteus</i>	0.625	0.25	0.125
<i>S. aureus</i>	0.625	—	0.25
<i>E. coli</i>	0.625	—	—
<i>P. aeruginosa</i>	5	—	—
<i>P. fluorescens</i>	1.25	—	—

Table 5. Antifungal susceptibility test of *Bacillus* sp. BCNU 2003

Microorganism	Itraconazol (µg/disc)	Minimum inhibitory concentration (MIC) (mg/disc)	
		EA extract	Peptide preparation
<i>A. niger</i>	0.0199	0.125	—
<i>C. albicans</i>	0.0796	0.125	—
<i>Ep. floccosum</i>	1.274	0.25	0.5
<i>Sa. cerevisiae</i>	0.159	0.0625	—
<i>T. mentagrophytes</i>	2.548	0.25	0.5
<i>T. rubrum</i>	2.548	1	—

보고는 미비한 실정이다. 현재 인체에 감염증을 일으키는 진균에 대한 연구는 *Streptomyces* sp.에서 분리된 phenatic acids A와 B가 *Candida albicans*, *Bacillus subtilis* 및 *Staphylococcus aureus*에 대해 항진균 및 항균활성이 있음이 보고되어 있다[6]. 한편 *Bacillus* sp.에서 분리된 항균물질은 *Rhodotorula acuta*와 *Pichia angusta*에 대해 뛰어난 항진균 활성을 보였으며, *Candida albicans*와 *Cryptococcus neoformans*에 대해서도 약한 활성을 가진 것이 보고되어 있으며[23], *B. subtilis*의 펩타이드 추출물의 *Microsporium fulvum*와 *Trichophyton* sp.에 대한 항진균 활성이 보고되어 있다[5,17]. BCNU 2003 균주와 함께 sub-cluster를 구성하는 *B. vallismortis*에서 분리된 bacillomycin D는 식물병원성 진균에 활성이 있는 것으로 보고되어 있으며[33], *B. amyloliquefaciens*에서 분리된 baciamin은 식물병원성 진균에 대한 활성이 보고되고 있으며, HIV-1 역전사 효소에 대한 저해, 유방암 및 대장암 등에 대한 효과도 있다고 보고되어 있다[31]. 또한 *B. amyloliquefaciens*와 *B. subtilis*에서 분리된 iturin A와 *B. subtilis*에서 분리된 surfactin은 lipopeptide 구조로 식물병원성 진균에 활성이 있는 것으로 보고되어 있다[9,27]. 국내에서는 *Streptomyces* sp.의 butanol 추출물의 *Candida*, *Saccharomyces* 및 *Trichophyton* 속 균주에 대한 항진균 활성이 보고되어 있으며[14], *C. albicans*에 대한 *B. subtilis*의 항진균 활성이 보고되어 있다[16]. BCNU 2003 균주는 *B. amyloliquefaciens*와 *B. vallismortis*의 subcluster에 속하는 균주로 이들 균종들에서는 인체에 감염증을 유발하는 진균에 관한 항균활성과 그 주체인 항균 물질에 대한 연구 보고는 전무한 실정이다. 따라서 인체 병원성 진균에 대해 넓은 항진균 스펙트럼을 가지며 활성이 뛰어난 *Bacillus* sp. BCNU 2003의 항진균 활성 물질을 분리하기 위해 더욱 구체적인 연구가 필요한 것으로 사료된다. 이들 기초 연구를 통하여 새로운 항진균 물질이 개발될 수 있으며, 나아가 다양한 제제화 연구와 용도 개발 연구를 통하여 새로운 제제로서의 기능성을 확인하여야 할 것으로 판단된다.

### 감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술진흥원의 지역 혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과임.

### References

- Butler, M. S. 2004. The role of natural product chemistry on drug discovery. *J. Nat. Prod.* **67**, 2131-2153.
- Butler, M. S. 2005. Natural products to drugs: natural product derived compounds on clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* **22**, 162-195.
- Butler, M. S. and A. D. Buss. 2006. Natural products-the future scaffolds for novel antibiotics? *Biochem. Pharmacol.* **71**, 919-929.
- Chomnawang, W. T., S. Surassmo, V. S. Nukoolkarn, and W. Gritasnapan. 2005. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *J. Ethnopharmacol.* **101**, 330-333.
- Favre, B., B. Hofbauer, K. S. Hildering, and N. S. Ryder. 2003. Comparison of *in vitro* activities of 17 antifungal drugs against a panel of 20 dermatophytes by using a microdilution assay. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4817-4819.
- Fukuda, T., A. Matsumoto, Y. Takahashi, H. Tomoda, and S. Omura. 2005. Phenatic acids A and B, new potentiators of antifungal miconazole activity produced by *Streptomyces* sp. K03-0132. *J. Antibiot.* **58**, 252-259.
- Joo, W. H., S. J. Han, Y. L. Choi, and Y. K. Jeong. 2004. Antifungal compound produced by *Bacillus* sp. TMB 912. *J. Life Sci.* **14**, 193-197.
- Kane, J. and R. C. Summerbel. 1999. *Trichophyton*, *Microsporm*, *Epidermophyton*, and agents of superficial mycosis, In Murray, P. R. E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover, (eds.), pp. 1275-1294, *Manual of clinical microbiology*. 7th eds., Washington D.C. ASM Press, USA.
- Kim, P. I. and K. C. Chung. 2004. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET 0908. *FEMS Microbiol. Lett.* **234**, 177-183.
- Koehn, F. E. and G. T. Carter. 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 206-220.
- Konishi, M., M. Nishio, K. Saitoh, T. Miyaki, T. Oki, and H. Kawaguchi. 1989. Cispentacin, a new antifungal antibiotic. I. Production, isolation, physico-chemical properties and structure. *J. Antibiotics* **42**, 1749-1755.
- Kumar, A., P. Saini, and J. N. Shrivastava. 2009. Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. *Indian J. Exp. Biol.* **47**, 57-62.
- Larone, D. H. 1995. Medically important fungi. 3rd eds., pp. 9, AMP Press, Washington, D.C. USA.
- Lee, D. H., S. R. Park, T. C. Kwon, and H. K. Jung. 1991. A water-soluble antifungal antibiotic from *Streptomyces* sp. LAM-593. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **34**, 180-186.
- Lee, H. J., K. H. Park, J. H. Shim, R. D. Park, Y. W. Kim, H. Hwangbo, J. Y. Cho, Y. C. Kim, and K. Y. Kim. 2005. Isolation and identification of low molecular weight compounds produced by *Bacillus subtilis* HJ927 and their biocontrol effect on the late blight of pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Soil Sci. Fert.* **38**, 25-31.
- Lee, N. W., C. S. Kim, J. H. Do, I. C. Jung, H. W. Lee, and D. H. Yi. 1998. Isolation and identification of *Bacillus* sp. LAM 97-44 producing antifungal antibiotics. *Agric. Chem. Biotech.* **41**, 208-212.
- Lee, S. G. 2003. Antimicrobial effect of Bamboo (*Phyllosrachys bambusoides*) essential oil on *Trichophyton* and *Pityrosporum*. *J. Food Hyg. Safety* **18**, 113-117.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Methods for antimicrobial susceptibility testing of

- anaerobic acteria: Approved Standard. 6th eds., Vol. 24, NCCLS Document M11-A6. Pennsylvania, USA.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved Standard. 2nd eds., Vol. 22, NCCLS Document M27-A2. Pennsylvania, USA.
  20. Ruhne, M., A. Schmidt-Westhausen, E. Engelmann, and M. Trautmann. 1996. Comparative evaluation of three antifungal susceptibility test methods for *Candida albicans* isolates and correlation with response to fluconazole therapy. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 3208-3211.
  21. Saito, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method, a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **79**, 426-434.
  22. Shadomy, S., H. J. Shadomy, and G. E. Wagmer. 1977. Antifungal compounds, In Siegel, M. R. and D. S. Hughl (eds.), pp. 437, Dekker, New York, USA.
  23. Shibasaki, M., T. Sugawara, Y. Shimizu, H. Yamaguchi, and K. Suzuki. 1996. YM-47522, a novel antifungal antibiotic produced by *Bacillus* sp. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* **49**, 340-344.
  24. Tawara, S., S. Matsumoto, T. Hirose, Y. Matsumoto, S. Nakamoto, and M. Mitsuno. 1989. *In vitro* antifungal synergism between pyrrolnitrin and clotrimazole. *Med. Mycol.* **30**, 202-210.
  25. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
  26. Tortorano, A. M., M. A. Viviani, F. Barchiesi, D. Arzeni, A. L. Rigoni, and M. Coglian. 1998. Comparison of three methods for testing azole susceptibilities of *Candida albicans* strains isolated sequentially from oral cavities of AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 1578-1583.
  27. Yu, G. Y., J. B. Sinclair, G. L. Hartman, and B. L. Bertagnolli. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol. Biochem.* **34**, 955-963.
  28. Vikmon, M., A. Stadler-Szoke, and J. Szejtli. 1985. Solubilization of Amphotericin B with  $\gamma$ -cyclodextrin. *J. Antibiotics.* **38**, 1822-1824.
  29. Weitzman, I. and R. C. Summerbel. 1995. The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 240-159.
  30. Whipps, J. M. 1987. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytol.* **107**, 127-142.
  31. Wong, J. H., J. Hao, Z. Cao, M. Qiao, H. Xu, Y. Bai, and T. B. Ng. 2008. An antifungal protein from *Bacillus amyloliquefaciens*. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 1888-1898.
  32. Zhang, B., C. Xie, and X. Yang. 2008. A novel small antifungal peptide from *Bacillus strain* B-TL2 isolated from tobacco stems. *Peptides* **29**, 350-355.
  33. Zhao, Z., Q. K. Wang, K. Brian, C. Liu, and Y. Gu. 2010. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components. *Bioresour. Technol.* **101**, 292-297.

#### 초록 : 인체 병원성 진균에 대한 *Bacillus* sp. BCNU 2003의 항진균 효과

최혜정 · 양옥희<sup>1</sup> · 김야엘<sup>1</sup> · 최연희<sup>2</sup> · 안철수<sup>2</sup> · 정영기<sup>3</sup> · 김동완<sup>4</sup> · 주우홍<sup>1\*</sup>

(창원대학교 생물공학협동과정, <sup>1</sup>창원대학교 생물학과, <sup>2</sup>조아제약, <sup>3</sup>동아대학교 생명공학과, <sup>4</sup>창원대학교 미생물학과)

항생제 및 항진균제 개발에 있어 미생물 유래 천연 생리활성물질 분리를 통한 선도물질을 확보하는 일은 매우 중요하며, 신규 물질을 확보하기 위해 꾸준한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 천연 항생물질의 개발을 위한 연구의 일환으로 태백산 일대의 토양에서, 인체에 다양한 감염증을 유발하는 효모와 곰팡이에 대하여 강한 항진균 활성을 나타내는 BCNU 2003 균주를 분리하여 항진균 활성 물질의 이용가능성에 대해 연구하였다. BCNU 2003은 계통적으로는 *B. amyloliquefaciens*와 *B. vallismortis*의 subcluster에 속하는 균주로 동정되어 *Bacillus* sp. BCNU 2003으로 명명하였다. 항균물질 분리를 위해 ethyl acetate (EA) 추출물과 펩타이드 추출물로 나누어 그람양성 세균, 그람음성 세균 및 진균에 대한 항균활성을 측정한 결과, EA 추출물이 6종의 인체병원성 진균에 대해 모든 높은 항진균 활성을 나타내었다. 특히 기회성 감염을 유발하는 *A. niger*, *C. albicans* 그리고 *Sa. cerevisiae*에 대해 높은 억제 활성을 나타냈으며, 균배양액에서 낮은 저해율을 보였던 *Ep. floccosum*에 대해서도 EA 추출물은 높은 활성을 나타내었다. 따라서 다양한 인체 병원성 진균에 대해 넓은 항균스펙트럼을 가지는 *Bacillus* sp. BCNU 2003 균주의 활성물질 분리를 통해 특정 항균 및 항진균 물질의 대량생산 조건 등의 추가적인 연구를 수행한다면, 인체 감염증을 포함한 광범위한 피부치료제의 응용개발이 가능하리라 사료된다.