THE KOREAN JOURNAL OF MYCOLOGY
Vol. 24, No 4, p293-304 December 1996
Copyright © 1996 by The Korean Society of Mycology
Printed in S. KOREA

Bacillus subtilis KS10이 생산하는 항진균물질의 정제 및 특성

류승우* · 맹학영[1] · 맹필재**
충남대학교 미생물학과 [1]중부대학 교양학부 (화학)

Purification and characterization of antifungal compounds produced by *Bacillus subtilis* KS1

Sung Woo Ryoo*, Hack Young Maeng[1] and Pil Jae Maeng**
Department of Microbiology, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea
[1]Department of Basic Education(Chemistry), Joongbu University, Chubu-Myeon, Geumsan-Gun, Chungnam 312-940, Korea

ABSTRACT: A bacterial strain, KS1, possessing strong antifungal activity was isolated from soil samples of ginseng fields and identified as *Bacillus subtilis*. In greenhouse test, the culture filtrate of *B. subtilis* KS1 showed strong protective effect against several fungal diseases of agricultural plants such as cucumber gray mold and wheat leaf rust. In addition, the crude butanol fraction of the culture filtrate exhibited antagonistic effect against several fungi including plant or human pathogens, such as *Botrytis maydis*, *Chytridium lagenarium* and *Candida albicans*. The antifungal compound, SW1, produced by *B. subtilis* KS1 was purified through consecutive chromatographic separations on a pep-RPC column and a μ Bondapak C_{18} reverse phase column. Temperature and pH showed little effect on the stability of the compound in the ranges -20-121°C and pH 4.0-10.0, respectively. The composition and structural characteristics of SW1 were analysed by HPLC and by ^{1}H-, ^{1}H-^{1}H-COSY, NOESY, COSY-NOESY and HOHAHA NMR spectroscopy, respectively, which revealed that the compound belongs to iturin A, a typical cyclic antifungal compound produced by *B. subtilis*. In contrast to the previously reported iturin A compounds which have one or no -CH_3 side chain in the hydrophobic hydrocarbon chain of β-amino acids, SW1 was shown to have a β-amino acid containing 12-carbon skeleton with two -CH_3 side chains.

KEYWORDS: Antifungal, *Bacillus subtilis*, Characterization, Iturin A, Purification

새로운 항생물질의 개발을 위한 노력은, 급속한 인구 증가로 인하여 인류가 직면하게 된 식량문제와 질병문제에 대처하는 방안의 하나로서, 지난 수십년 동안 지속되어 왔다. 특히, 진균에 의한 인간의 질병, 작물의 병해 유발, 식품의 부패 등이 심각한 문제로 제기되고 있기 때문에 유용한 항진균물질의 개발이 요구되고 있다.

지금까지 주로 방선균이 생산하는 항진균 물질들이 개발되어 진균감염증에 대한 화학요법에 활용되고 있으나, 세균감염증에 대한 화학요법에 비하여 그 발전이 매우 저조한 실정이다. 특히, 최근에는 항세균 항생물질, 스테로이드 호르몬, 면역억제제 또는 항암제 등의 사용에 따른 기회감염에 의한 내장진균증이 급속히 증가하고 있으며, 피부진균증 환자도 크게 늘어나고 있다. 현재까지 의약용으로 개발된 polyene계열의 항진균제로는 amphotericin B, nystatin, candicidin B 등을 들 수 있는데, 이들은 독성이 있어 국부치료제로만 사용되고 있다. 또한, 피부감염 치료용 경구투여제로 사용되고 있는 griseofulvin의 경우 polyene계열의 항생제와는 달리 fungistatic 항생제이므로 그 치료효과는 미흡한 상태이다. 따라서, 병원성 진균을 근원적으로 퇴

*Present address: Yuhan Research Center, Tangjeong-Dong, Kunpo-Shi, Kyonggi-Do 435-030, Korea
**Corresponding author

치할 수 있는 항진균성 항생제의 개발이 절실히 요구되고 있다. 한편, 농작물 병해의 주요한 원인이 되는 식물병원성 진균의 방제를 위하여 화학적으로 합성된 농약이 널리 쓰이고 있는데, 이러한 농약은 효과가 높고 가격이 저렴한 반면 그 방제효과가 일시적이고 난분해성이며 강한 인축독성을 유발하는 것으로 알려져 있어, 이에 대한 제도적 규제들이 점차 강화되고 있는 실정이다. 이에 따라, 여러가지 진균에 의한 농작물의 병해를 더욱 효과적으로 방제할 수 있고, 기존의 유기합성 농약에 비하여 환경오염의 위험성 및 인축에 대한 독성이 적은 새로운 농업용 항생물질을 생산하는 미생물의 탐색 및 개발은 매우 시급하고 긴요한 과제라 할 수 있다.

이러한 요구에 발맞추어, 새로운 항진균제 개발을 위한 연구가 광범위하게 진행되고 있는데, 이를테면 *Bacillus subtilis*가 생산하는 cyclolipopeptide인 iturin계 항진균제(Besson 등, 1978a, 1986; Isogai 등, Ohno 등, 1995; Eshita 등, 1995; Kajimura 등, 1995), *Aspergillus* 속 사상균이 생산하는 cyclopeptide 계열의 항진균제인 aculeacin A (Mizuno 등, 1977; Mizoguchi 등, 1977; P rez 등, 1981)와 echinocandin B (Schmatz 등, 1990; Taft and Seliirennikoff, 1988), 방선균의 일종인 *Actinomadurae*가 생산하며 *Candida albicans*의 균사형 세포에만 특이적으로 작용하는 항진균 물질인 Sch 40873 (Gullo 등, 1991), 식물 공생균인 Pisolithus tinctorius가 생산하는 페놀계 항진균제 (Suh 등, 1991) 등에 관한 연구를 들 수 있다. 본 연구에서는 높은 항진균력을 보이는 균주를 인삼포 토양으로부터 분리하여 동정하고, 이 균주가 생산하는 항진균물질의 물리 및 화학적 특성을 조사하고, NMR 등의 분석을 통하여 그 구조적 특성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

항진균 균주 분리 및 동정

인삼포 토양으로부터 채취된 시료로부터 분리된 균주들 중 우수한 항진균 효과를 보이는 균주를 선별하기 위하여, PD agar 배지 (20% potato, 2% dextrose, 2% agar)의 중앙에 시험용 진균을 접종하고 이를 중심으로 7-8개의 시료 균주를 접종한 다음, 30°C에서 5-7일 동안 배양하면서 진균의 생장억제 정도를 조사하였다. 한편, 항진균성 검증을 위한 시험용 진균으로는 *Alternaria alternata, Alternaria mali, Aspergillus niger, Botrytis cinerea, Botrytis maydis, Chytridium lagenarium, Fusarium oxysporum, Fusarium* sp. F 101, *Candida albicans*, 그리고 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하였다.

1차 선발된 항진균 균주들을 대상으로 agar block법 이용하여 항진균 역가를 조사하였다. 즉, 시험용 균주를 접종하여 30°C에서 48시간 동안 배양된 PPGS agar block (0.5% peptone, 0.3% glucose, 0.2% sucrose, 0.3% NaCl, 0.3% $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 0.05% KH_2PO_4, 20% (w/v) 감자 끓인 물, 2% agar, pH 7.4)을 시험용 진균이 18시간 동안 배양된 *Aspergillus* 완전고체배지 위에 올려 놓고 30°C에서 48시간 동안 배양하여 생장저해환의 지름을 측정하여 항진균력을 확인하였다.

선별된 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath, 1986)에 기술된 기준에 따라 형태학적 및 생리학적 여러 특성을 조사하여 동정하였다.

온실시험을 통한 항진균 효과 검증

선별된 균주를 900 ml의 PD 액체배지에서 전배양한 다음, 이를 30 l의 PPGS 배지 (Yoshihisa 등, 1989)에 접종하고 50 l 발효조에서 500 rpm의 속도로 교반하면서 30°C에서 48시간 동안 본배양하였다. 이 배양액이 식물병원성 곰팡이에 대하여 나타내는 항진균 활성을 온상재배한 작물을 이용하여 조사하였다. 이때, 벼도열병을 일으키는 *Pyricularia oryzae*, 벼잎집무늬마름병을 일으키는 *Rhizoctonia solani*, 오이잿빛곰팡이병을 일으키는 *Botrytis cinerea*, 토마토역병을 일으키는 *Phytophthora infestans*, 밀붉은녹병을 일으키는 *Puccinia recondita*, 그리고 보리흰가루병을 일으키는 *Erysiphe graminis*를 검증 대상으로 하였다.

항진균 물질의 분리

KS1이 생산하는 항진균 물질을 분리하기 위하여,

우선 KS1의 배양액에 butanol을 25% (v/v) 되게 가하여 분획하였다. 이 butanol 분획을 회전진공증발기로 농축하여 crude powder를 얻었다. Crude powder로부터 항진균물질을 순수분리하기 위하여, 0.5% (w/v) crude powder 용액을 준비하고, pep-RPC HR 5/5 reverse phase column을 이용한 FPLC를 통하여 1차 정제하였다. 이때, column은 15 ml의 25% CH_3CN과 35 ml의 25-50% CH_3CN 농도구배로 용출하였고, 용출속도 1 ml/min를 유지하면서 1 ml씩 분획하였다. 여기서 얻은 각 분획을 speed-vacuum 농축기로 건조한 다음, 100 μl의 증류수에 녹여 *C. lagenarium*을 시험 진균으로 하여 filter disc 법에 따라 항진균력을 조사하였다. 즉, 시험 진균을 도말한 PD agar 배지 중앙에 지름 8 mm의 filter disc를 올려 놓고 시험 시료를 60 μl씩 가한 다음, 30°C에서 48-72시간 배양하고 생장저해환의 지름을 측정하여 항진균력을 확인하였다.

1차 정제를 통하여 얻은 활성 분획 P-II를 pep-RPC HR 5/5을 통하여 2차 정제하였다. 이 때, column은 40%의 CH_3CN으로 용출하였으며, 용출속도는 0.3 ml/min을 유지하였다. 2차 정제를 통하여 얻은 항진균 분획을 μ Bondapak C_{18} reverse phase column을 이용한 HPLC를 통하여 최종 정제하였다. 용매는 48% CH_3CN를 사용하였고 용출속도는 1 ml/min로 유지하였다.

항진균 물질의 특성 및 구조 분석

정제된 항진균 물질의 아미노산 조성을 분석하기 위하여, 시료를 6 N HCl에 녹여 150°C에서 1시간 동안 산가수분해하고, 증류수로 희석한 다음 완전히 건조시켰다. 건조된 시료에 methanol, H_2O, triethylamine, phenylisotiocynate가 7:1:1:1 (v/v)로 혼합된 PITC유도체 시약 20 μl를 넣고 실온에서 20분 동안 방치한 다음 완전히 건조시켰다. 이 PITC유도체를 CH_3CN-인산완충용액 혼합액 (10% H_3PO_4를 가하여 pH 7.4로 적정한 2 mM Na_2HPO_4 940 ml과 CH_3CN 50 ml을 섞어 여과한 용액)에 녹였다. 이를 PICO-TAG column을 이용한 HPLC를 통하여 분석하였다.

항진균 물질의 UV spectrum은 UV/Visible spectrophotometer (Milton Roy)를 이용하여 얻었으며, 분자량은 FAB-mass spectroscopy system (Jeol)을 이용하여 측정하였다. 정제된 항진균 물질의 1H-1H COSY, ^{1}H-^{1}H NOESY, ^{1}H-^{1}H COSY/NOESY 및 ^{1}H-^{1}H HOHAHA ^{1}H-NMR spectrum은 500 FT-NMR spectrometer (Varian)를 이용하여 기록하였다.

결과 및 고찰

항진균 균주 동정

인삼포 토양으로부터 채취된 시료로부터 분리된 균주들 중 가장 우수한 항진균 효과를 보이는 KS1 균주를 선발하고, 이 균주의 형태학적 및 생리학적 여러 특성을 조사하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath, 1986)에 기술된

Table 1. Morphological, cultural and physiological characteristics of the antifungal bacterial strain, KS1

1. Morphological characteristics	
Cell form	Rods
Gram stain	Positive
Spore formation	Positive
Motility	Positive
Colony shape	Irregular, Concave
2. Cultural characteristics	
Nutrient broth (pH 6.8)	++
Sabouraud dextrose broth (pH 5.7)	++
Growth in 7% NaCl	+
Growth in lysozyme	−
3. Physiological characteristics	
Catalase	+
Oxidase	+
Voges-proskauer test	+
Acid from D-Glucose	+
L-Arabinose	+
D-Xylose	+
D-Mannitol	+
Hydrolysis of Casein	+
Starch	+
Utilization of citrate	+
Degradation of tyrosine	−
Deamination of phenylalanine	−
Nitrate reduced to nitrite	+

Table 2. Antifungal activity of culture filtrate of *B. subtilis* KS1 against several plant pathogenic fungi

Plant diseases	Pathogenes	Relative protective value (%)
Rice blast	*Pyricularia oryzae*	14
Rice sheath blight	*Rhizoctonia solani*	70
Cucumber gray mold	*Botrytis cinerea*	97
Tomato late blight	*Phytophthora infestans*	58
Wheat leaf rust	*Puccinia recondita*	95
Barley powdery mildew	*Erysiphe graminis*	78

기준에 따라 동정하였다.

KS-1 균주의 형태적 특성을 분석한 결과, 세포는 Gram 양성의 원통형 모양이었고, 운동성을 갖고 있었다. 또한, 내생포자를 형성하고, 불규칙한 모양의 우유빛 colony를 나타내었다(Table 1). 이러한 특징들로부터 KS1 균주가 *Bacillus* 속에 속하는 세균임을 확인하였다. 이어서 이 균주가 갖는 여러 가지 생리적 특성과 배양상의 특성을 조사하였다 (Table 1). KS1 균주 catalase 반응, oxidase 반응, Voges-Proskauer 반응, citrate의 이용성, casein과 전분의 가수분해반응, 질산염 환원반응에서 양성을 나타내었고, D-glucose, L-arabinose, D-xylose, D-mannitol을 이용하여 산을 생성하였다. 그러나, tyrosine의 분해, phenylalanine의 탈아미노반응, indole 생성반응에서는 음성을 나타내었다. 배양상의 특징으로서, KS1은 nutrient broth와 Sabouraud dextrose broth, 그리고 7%의 NaCl이 첨가된 nutrient broth에서 성장할 수 있었던 반면, lysozyme의 존재하에서는 전혀 생장하지 못하였다. 이와 같은 결과를 종합하여 KS1을 *B. subtilis*로 동정하였다.

온실시험을 통한 항진균력 검증

선별된 균주가 몇몇 식물병원성 진균에 대하여 나타내는 항진균 활성을 조사하기 위하여 온상시험을 수행한 결과, 오이잿빛곰팡이병의 원인균인 *Botrytis cinerea*와 밀붉은녹병의 원인균인 *Puccinia recondita*에 대하여 탁월한 방제효과를 나타내었으며, 보리흰가루병의 원인균인 *Erysiphe graminis*와 벼잎집무늬마름병의 원인균인 *Rhizoctonia solani*에도 상당한 저해효과를 보였다(Table 2). 그러나, 벼도열병을 일으키는 *Pyricularia oryzae*에 대한 방제효과는 미미한 것으로 나타났다. 한편,

Table 3. Antifungal activity of crude butanol extract from *B. subtilis* KS1 culture against several fungi

Tested fungi	Diameter of inhibition zone (mm)
Aspergillus niger	7
Alternaria alternata	15
Alternaria mali	12
Alternaria sp. 104	17
Botrytis cinerea	18
Botrytis maydis	22
Candida albicans	12
Chytridium lagenarium	20
Fusarium oxysporum	9
Fusarium sp. 101	12
Saccharomyces cerevisiae	15

Kim 등 (1991)은 *P. oryzae*에 대하여 가장 강력한 항균력을 보이는 KRF-001이라는 항진균 물질을 생산하는 *B. subtilis* 균주를 분리한 바 있다. 따라서 *B. subtilis* KS1은 Kim 등 (1991)이 보고한 균주와는 상이한 활성범위를 가짐이 확인되었다.

항진균 추출물의 항진균 활성 범위

PPGS 배지에서 배양된 *B. subtilis* KS1 세포로부터 얻은 butanol 분획을 회전진공증발기로 농축하여 crude powder를 얻었다. 이 추출물의 항진균 활성을 filter disc법으로 분석한 결과, *B. maydis*와 *C. lagenarium*에 대하여 가장 높은 생장 저해효과를 나타내었으며, *C. albicans*와 *S. cerevisiae*와 같은 효모 세포에 대하여도 비교적 높은 저해효과를 나타내었다. 그러나, *A. niger*에 대하여는 낮은 저해효과를 나타내었다(Table 3).

항진균물질의 정제

B. subtilis KS1의 배양액 30 l로부터 얻은 bu-

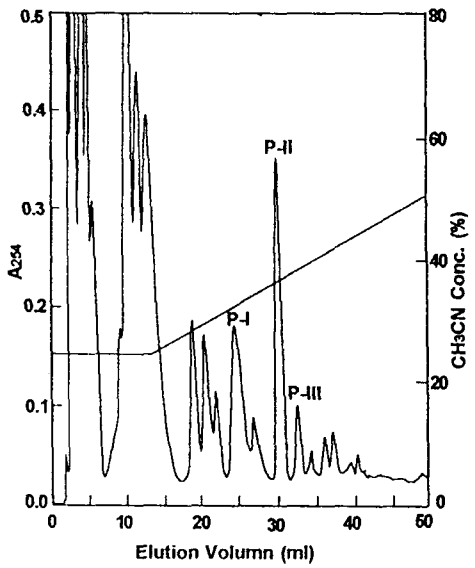

Fig. 1. Fractionation of crude butanol extract from culture filtrate of *B. subtilis* KS1 by reverse phase chromatography using a pepRPC HR 5/5 column (Pharmacia). Column dimensions, 0.5 X 5 cm; Fraction volume, 1.0 ml; Flow rate, 1 ml/min.

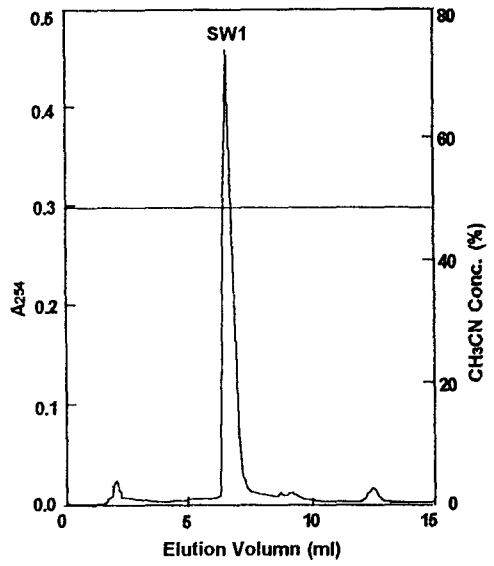

Fig. 2. Purification of P-II-I fraction from a pepRPC HR 5/5 column by HPLC through a μ Bondapak C_{18} column. Column dimensions, 0.39 X 30 cm; Flow rate, 1 ml/min.

tanol 추출물의 crude powder를 물에 녹인 5% 용액을 pepRPC HR5/5 column을 이용한 FPLC를 통하여 1차 정제하였다. 그 결과, CH_3CN의 농도가 30%, 35%, 40% 되는 부분에서 각각 항진균 활성을 보이는 3개의 분획, 즉, P-I, P-II 및 P-III가 용출되었다(Fig. 1). 이러한 결과는 *B. subtilis* KS 1이 적어도 3 가지 성분의 항진균물질을 생산함을 보여 준다. 이들 분획 중 가장 높은 항진균력을 보이는 P-II 분획을 동일한 column을 통하여 다시 정제하여 항진균 활성을 가진 P-II-I 분획을 얻었다(그림 생략). 이 P-II-I 분획을 μ Bondapak C_{18} column을 이용한 HPLC를 통하여 최종 정제하여 SW1 분획을 얻었다(Fig. 2).

항진균 물질의 물리 · 화학적 특성

온도에 대한 SW1의 안정성을 조사한 결과, SW 1은 열에 매우 안정하여, -20~90°C에서 12시간 그리고 121°C에서 15분 동안 처리하여도 전혀 항진균력이 약화되지 않는 것으로 나타났다(Table 4). 한편, pH에 대한 안정성을 조사한 결과, pH 4-10 범위에서는 안정한 반면, pH 3 이하에서는 활성을 상실하였다(Table 4). 즉, 산성 pH에서 WS1은 항진균력을 상실하였는데, 이는 SW1이 pH 3 이하에서는 용해도가 떨어져 침전되기 때문인 것으로 사료된다.

SW1의 자외선 흡수 spectrum을 분석한 결과, 이 물질은 210 nm의 자외선을 가장 많이 흡수하였으며, 230 nm 부근에서 shoulder를 나타내었다(Fig. 3). 이러한 결과는 SW1이 peptide 계통의 항진균물질임을 뒷받침해 준다.

정제된 SW1을 산가수분해한 다음, 그 산물을 PITC유도체화 하고, 이를 PICO-TAG column을 이용한 HPLC를 통하여 분석하였다(Fig. 4). 그 결과, SW1은 Asn/Asp, Gln/Glu, Ser, Tyr, Pro 등의 α-아미노산과 확인되지 않은 β-아미노산을 함유하고 있음을 알 수 있었다. 특히, Asn/Asp는 다른 아미노산보다 더 많이 존재함을 확인하였다.

FAB-mass spectroscopy system을 이용한 분자량 분석의 결과, Na^+ ion이 결합한 상태에서 1081의 분자량을 갖는 것으로 나타났다(Fig. 5). 따라서 SW1의 분자량은 1058임이 확인되었다.

Table 4. Thermal and pH stability of the purified antifungal compound, SW1

Effect of temperature[a]	
Temperature (°C)	Diameter of inhibition zone (mm)
-20	18
30	20
50	20
70	19
90	20
Autoclaving (121°C, 15 min)	19
Effect of pH[b]	
pH	Diameter of inhibition zone (mm)
pH 3.0	0
pH 5.0	18
pH 7.0	20
pH 10.0	19

[a]To examine the thermal stability of SW1, the compound was incubated for 12 hours at given temperatures.
[b]To examine the pH stability of SW1, the compound was incubated at 25°C for 12 hours at given pHs.

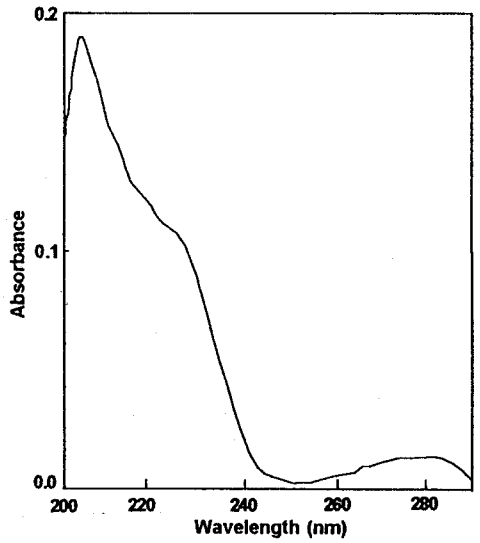

Fig. 3. UV absorption spectrum of SW1 purified from the culture filtrate of *B. subtilis* KS1.

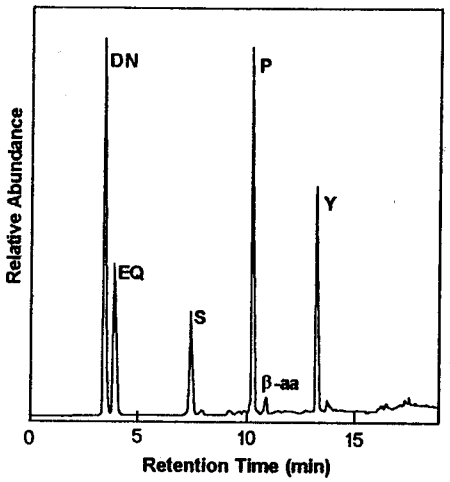

Fig. 4. Analysis of the amino acid composition of SW1 purified from the culture filtrate of *B. subtilis* KS1 by HPLC using a Pico-Tag column. Abbreviations; DN, Asp or Asn; EQ, Glu or Gln; S, Ser; P, Pro; Y, Tyr; β-aa, β-amino acid.

^{1}H-NMR spectroscopy에 의한 항진균물질의 구조분석

정제된 SW1의 구조를 규명하기 위하여 이 물질의 ^{1}H-NMR spectrum(Fig. 6)을 비롯하여 ^{1}H-^{1}H COSY, ^{1}H-^{1}H NOESY 및 ^{1}H-^{1}H HOHAHA spectrum(그림 생략)을 얻어 분석하였다. 그 결과, 3개의 Asn과 1개의 Gln이 갖는 amino기 4개의 존재를 비롯하여, Ser의 -CH_2OH (1개), Asn의 -CH_2- (3개), Gln의 -CH_2CH_2- (1개), Tyr의 -CH_2Ph (1개), 그리고 Pro과 β-아미노산 (-$CH_2CH_2CH_2$-)의 존재를 확인할 수 있었다. 또한, β-아미노산의 측쇄

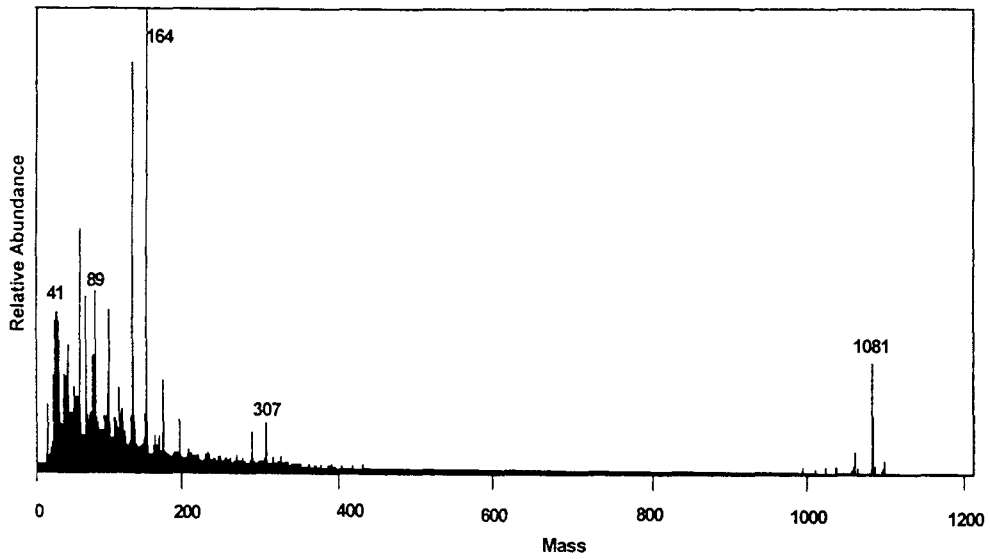

Fig. 5. FAB-MS spectrum of of SW1 purified from the culture filtrate of *B. subtilis* KS1.

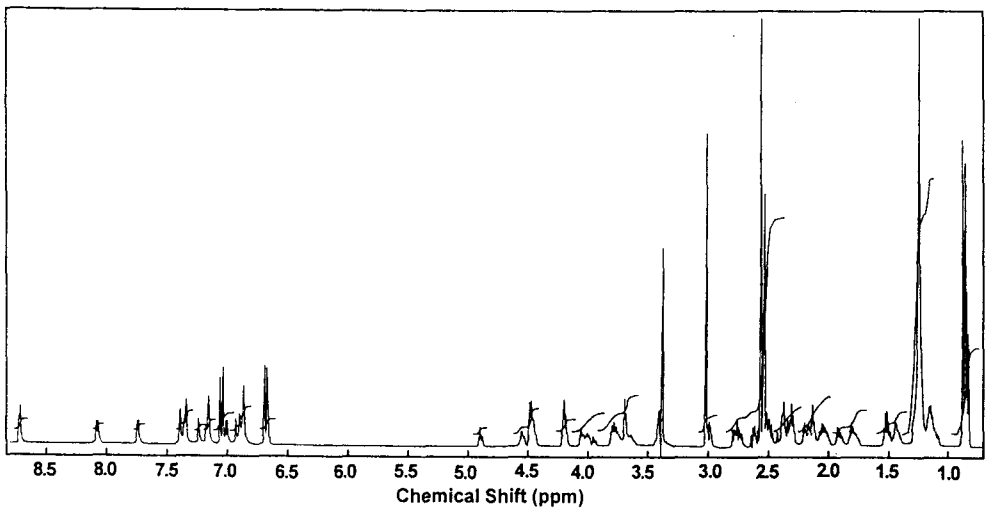

Fig. 6. 500 MHz ^{1}H-NMR spectrum of SW1 purified from the culture filtrate of *B. subtilis* KS1.

에 3개의 methyl기, 즉, -CH_2CH_3 1개와 -$CH(CH_3)$-2개가 존재함이 밝혀졌는데, 이는 이 측쇄에 2개의 methyl기 가지가 붙어 있음을 말해 준다. Fig. 6에서 보는 바와 같이, SW1의 ^{1}H-NMR spectrum은 cyclic peptide 항진균제인 iturin A 및 mycosubtilin의 경우와 유사한 양상을 나타내었으며 (Garbay-Jaureguiberry 등, 1978; Gueldner 등, 1988), 위의 분석을 통하여 얻은 정보를 바탕으로 하여 각각의 proton signal들을 assign할 수 있었다. 즉, 1.4 ppm 부분의 signal은 β-아미노산의 β-탄소에 결합되어 있는 수소, 1.25 ppm 부분의 signal은 β-아미노산의 측쇄에 존재하는 ethylene기의 수소, 1.6-3.6 ppm 부분에서는 Asn, Gln, Pro, Ser, Tyr 등 α-아미노산의 β- 또는 γ-탄소에 결합되어 있는 수소 것으로 각각 밝혀졌다. 또한, 4.0-4.6 ppm 부분의 signal들은 Asn, Gln, Pro, Ser, Tyr

의 α-탄소에 결합되어 있는 수소, 4.8 ppm 부분의 signal들은 Ser의 β-탄소에 붙어 있는 hydroxyl의 수소, 6.6 ppm과 7.0 ppm 부분의 signal들은 Tyr의 aromatic 탄소에 결합된 수소, 그리고 7.1 ppm과 8.7 ppm 부분의 signal들은 3개의 Asn, Ser, Tyr, Gln, 그리고 β-아미노산의 amino기가 갖는 수소의 것임이 각각 밝혀졌다. 이러한 분석 결과를 종합하여, SW1은 Asn 3개, Tyr, Pro, Ser, Gln 각각 1개, 2개의 methyl기 곁가지를 지닌 탄화수소 사슬을 갖는 β-아미노산 1개가 고리형으로 연결된 cyclic lipopeptide 계통의 항진균물질임을 확인하였다. 또한, FAB-mass spectroscopy 분석 결과 SW1의 분자량은 1058로 분석되었으므로, 이 β-아미노산의 탄화수소 사슬은 12개의 탄소원자를 갖는 것으로 확인되었다.

*B. subtilis*가 생성하는 cyclic lipopeptide 계통의 항진균물질들은 아미노산 조성이 서로 매우 유사하고, 자연계에는 존재하지 않는 D-form의 아미노산을 가지며, 특이적으로 β-아미노산을 반드시 갖고 있는데 이 β-아미노산에 비극성 잔기가 결합된 공통된 특징을 갖는다. 또한, cyclic peptide의 극성 부분과 β-아미노산에 연결된 비극성 부분이 한 물질 내에 존재하는 특이성 때문에 계면 활성제로의 이용도 가능한 것으로 보고 되었다 (George 등, 1992). *B. subtilis*가 생산하는 항진균 cyclic lipopeptide 물질로는 iturin A, C, D, E (Besson 등, 1978a, Winkelmann 등, 1983; Besson and Michel, 1986), bacillomycin A, D, F, L, S (Besson 등, 1978a; Mhammedi 등, 1982; Peypoux 등, 1980, 1981, 1984, 1985), mycosubtilin (Walton 등, 1949), surfactin (Besson and Michel, 1992; Ohno 등, 1992), 그리고 bacillopeptin (Kajimura 등, 1995) 등을 들 수 있다. 이들 중 iturin A는 2 개의 D-Asn을 비롯하여 각각 1 개 씩의 L-Asn, L-Ser, L-Pro, L-Gln, D-Tyr, 그리고 β-아미노산으로 이루어져 있다. Iturin C는 iturin A의 L-Asn 대신 L-Asp를 갖고 있으며 β-아미노산의 탄화수소 잔기의 terminus 또는 subterminus에 $-CH_3$ 가지를 갖는다. 한편, iturin D는 iturin A를 구성하는 L-Asn 또는 L-Gln 중 하나의 carboxamide기가 carboxyl 기로 대체된 구조를 가지며, iturin E는 iturin D의 carboxyl group이

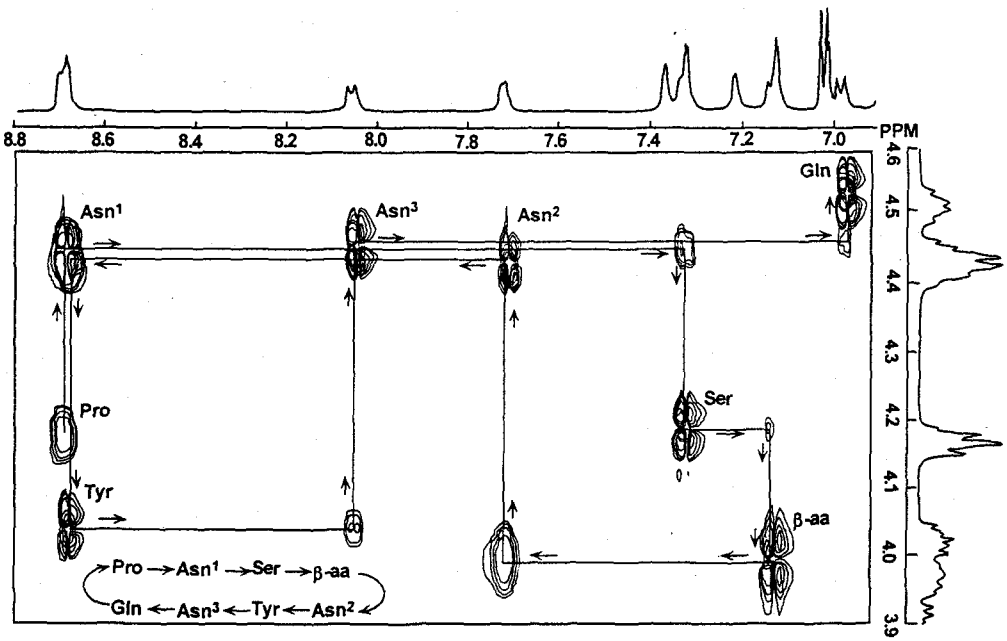

Fig. 7. ^1H-^1H COSY/NOESY spectrum and identified structure of SW1 purified from the culture filtrate of *B. subtilis* KS1.

methyl ester로 대체된 구조를 갖는다. 따라서, SW1은 iturin A와 동일한 아미노산 조성을 갖는 것으로 확인되었다. 또한, SW1의 ^1H-^1H COSY/NOESY spectrum을 얻어 분석한 결과, SW1은 iturin A와 같이 -Pro-Asn-NHCH(R)CH_2CO-Asn-Tyr-Asn-Gln-의 아미노산 서열을 갖는 cyclic peptide임이 밝혀졌다(Fig. 7).

이상에서 살펴 본 바와 같이, 본 연구에서 분리된 SW1은 iturin A에 속하는 물질로 밝혀졌다. 그러나, 지금까지 알려진 iturin A계 물질들의 β-아미노산에 붙어 있는 탄화수소 사슬이 곁가지가 없거나 terminus 또는 subterminus에 1개의 -CH_3 곁가지를 갖는 것과는 달리 (Ohno 등, 1992; Kim, 1991), SW1의 β-아미노산은 2개의 -CH_3 곁가지가 붙어 있는 탄화수소 사슬을 가짐이 확인되었다. 이러한 결과는, 항진균활성을 나타내는 *B. subtilis* 균주들이 β-아미노산의 탄화수소 사슬이 서로 다른 iturin A를 생산할 수 있으며, 아울러 각 균주들의 배양액이 서로 다른 작용범위를 나타낼 수 있음을 말해 준다.

Iturin계 항진균제들은 세포막에 존재하는 phospholipid와 작용하여 세포막의 구조와 물리적 특성을 변화시킴으로써 세포막을 파괴하는 것으로 알려져 있다 (Maget-dana 등, 1985; Besson 등, 1978b; Latoud 등, 1986, 1990). 특히, iturin A는 원형질막을 통과하여 핵막 및 세포내 소기관의 막과도 상호작용하는 것으로 밝혀졌다 (Thimon 등, 1995). Iturin계 물질들은 *Bacillus* 속의 균주들이 생산하는 다른 peptide 항생물질들과 마찬가지로 multienzyme system의 작용에 의하여 합성되는데, Feignier 등(1996)은 이 과정에 관여하는 iturin synthase를 구성하는 두 개의 subunit인 ITs와 I-Tagp를 각각 정제하였으며, ITs는 L-Ser을, I-Tagp는 L-Asn, D-Asn, L-Gln 및 L-Pro를 활성화함을 밝혔다. 한편, *B. subtilis*가 생산하는 lipopeptide 계통의 항진균물질 생산에 관련된 유전자들에 대한 연구 surfactin 합성 유전자들을 중심으로 활발히 진행되고 있다 (Nakano 등, 1988, 1991a, 1991b; Nakano and Zuber, 1980, 1990). 그러나 아직까지 iturin synthase 유전자와 그 발현에 관련된 유전자들은 아직 명확히 규명되어 있지 않다.

적 요

인삼포 토양으로부터 강력한 항진균력을 보이는 KS1 균주를 분리하고 *Bacillus subtilis*로 동정하였다. 온상시험에서 *B. subtilis* KS1의 배양액은 오이잿빛곰팡이병, 밀붉은녹병 등의 진균성 농작물병에 대하여 탁월한 방제효과를 나타내었다. 또한, *B. subtilis* KS1 배양액의 butanol 분획은 *Botrytis maydis, Chytridium lagenarium, Candida albicans* 등 식물 또는 사람의 병원성 진균을 비롯한 몇몇 진균류에 대하여 억제효과를 나타내었다. 이 균주가 생성하는 항진균물질을 pep-RPC reverse phase column과 μ Bondapak C_{18} reverse phase column을 이용하여 분리 정제 하였다. 정제된 항진균물질의 열안정성 및 pH 안정성을 조사한 결과, -20-121°C와 pH 4.0-10.0의 범위에서 안정하였다. 이 물질의 조성 및 구조적 특징을 HPLC와 ^1H-, ^1H-^1H-, COSY, NOESY, COSY-NOESY 및 HOHAHA NMR spectroscopy를 통하여 각각 분석한 결과, *B. subtilis*가 생산하는 고리형 peptide 중 iturin A에 속하는 물질로 확인되었다. 그러나, 지금까지 알려진 iturin A계 물질들의 β-아미노산에 붙어 있는 탄화수소 사슬이 곁가지가 없거나 terminus 또는 subterminus에 1개의 -CH_3 곁가지를 갖는 것과는 달리, SW1의 β-아미노산은 2개의 -CH_3 곁가지가 붙어 있는 탄화수소 사슬을 가짐이 확인되었다.

감사의 글

본 연구를 수행하는 데 기술적인 지원을 해 주신 한국인삼연초연구원의 이청호 박사님, LG화학중앙연구원의 옥종화 박사님, 경상대학교의 정영륜 교수님께 감사드립니다.

참고문헌

Besson, F., and Michel, G. 1986. Isolation and characterization of new iturin: iturin D and iturin E. *J. Antibiotics*. **40**: 437-442.

Besson, F., Peyponx, F., Michel, G. and Del-

combe, L. 1978a. Identification of antibiotics of iturin group in various strains of *Bacillus subtilis*. *J. Antibiotics*. **31**: 384-388.

Besson, F., Peyponx, F., Michel, G. and Delcombe, L. 1978b. Mode of action of iturin A, an antibiotic isolated from *Bacillus subtilis* on *Micrococcus leteus*. *Biochim. Biophys. Res. Commun*. **81**: 297-304.

Besson, F. and Michel, G. 1992. Biosynthesis of iturin and surfactin by Bacillus subtilis: Evidence for amino acid activating enzymes. *Biotechnol. Lett*. **14**: 1013-1018.

Eshita, S. M., Roberto, N. H., Beale, J. M., Mamiya, B. M. and Workman, R. F. 1995. Bacillomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group: isolations, structures, and antifungal activities of the congeners. *J. Antibiot*. **48**: 1240-1247.

Feignier, C., Besson, F. and Michel, G. 1996. Characterization of iturin synthetase in the wild-type *Bacillus subtilis* strain producing iturin and in an iturin defficient mutant. *FEMS Microbiol. Lett*. **136**: 117-122.

Garbay-Jaureguiberry, C., Roques, B.P., Delcambe, L., Peypoux, F. and Michel, G. 1978. NMR conformational study of iturin A, an antibiotic from *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett*. 93: 151-156.

George, G., Sung-Chyr, L. and Mukul, M. S. 1992. Surface-active compounds from microorganism. *Bio/Technology*. **10**: 60-65.

Gueldner, R.C., Reilly, C.C., Pusey, P.L., Costello, C.E., Arrendale, R.F., Cox, R.H., Himmelsbach, D.S., Crumley, F.G. and Cutler, H.G. 1988. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with Bacillus subtilis. *J. Agric. Food. Chem*. **36**: 366-370.

Gullo, V., Gunnarsson, I., Hegde, V., Horan, A., Loebenberg, D., Marquez, J., Patel, M., Puar, M. and Schwartz, J. 1991. A novel antifungal from an Actinomadurae with preferential activity against the mycelial phase of *Candida albicans*. *J. Indus. Microbiol*. **8**: 65-68.

Isogai, A., Takayama, S., Murakoshi, S. and Suzuki, A. 1982. Structure of β-amino acids in antibiotics iturin *A. Teraheadron Lett*. **23**: 3065-3068.

Kajimura, Y., Sugiyama, M. and Kaneda, M. 1995. Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis FR-2*. *J. Antibiot*. **48**: 1095-1103.

Kim, S.K. 1991. 신규 항진균 물질 KRF-001의 분리 · 정제 및 구조 결정. pp. 221-233. *In*: Proc. of the 2nd Symposium on the Biochemical Methodology for the Research and Development of the Bioactive Substances, Biochem. Soc. R.O.K., Seoul, Korea.

Kim, S.-U., Lee, J.-W., Lee, S.-H. and Bok, S.-H. 1991. Identification of bacteria having antifungal activity isolated from soils and its biological activity. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol*. **19**: 337-342.

Latoud, C., Peypoux, F., Michel, G., Genet R. and Morgat, J.L. 1986. Interactions of antibiotics of the iturin group with human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*. **856**: 526-535.

Latoud, C., Peypoux, F. and Michel, G. 1990. Interaction of iturin A, a lipopeptide antibiotic, with *Saccharomyces cerevisiae* cells: influence of the sterol membrane composition. *Can. J. Microbiol*. **36**: 384-389.

Maget-Dana, R., Ptak, M., Peypoux, F. and Michel, G. 1985. Pore-forming properties of a lipopeptide antibiotic: iturin A. *Biochim. Biophys. Acta*. **815**: 405-409.

Mhammadi, A., F. Peyponx, F. Besson, and G. Michel. 1982. Bacillomycin F, a new antibiotic of iturin group: Isolation and Characterization. *J. Antibiotics* **35**: 306-311.

Mizoguchi, J., Saito, T., Mizuno, K. and Hayano, K. 1977. On the mode of action of a new antifungal antibiotic, aculeacin A: inhibition of cell wall synthesis in Saccharomyces cerevisiae. *J. Antibiot*. **30**: 308-313.

Mizuno, K., Yagi, A., Satoi, S., Takada, M.,

Hayashi, M., Asano, K. and Matsuda, T. 1977. Studies on aculeasin. I. Isolation and characterization of aculeacin A. *J. Antibiot.* **30**: 297-302.

Nakano, M.M., Magnuson, R., Myers, A., Curry, J., Grossman, A.D. and Zuber, P. 1991a. srfA is an operon required for surfatin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **173**: 1770-1778.

Nakano, M.M., Marahiel, M.A. and Zuber, P. 1988. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **170**: 5662-5668.

Nakano, M.M., Xia, L. and Zuber, P. 1991b. Transcription initiation region of the srfA operon which is controled by the ComP-ComA signal transduction in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **173**: 5487-5493.

Nakano, M.M. and Zuber, P. 1989. Cloning and charaterization of srfB regulatory gene involved in surfactin production and competence in *Bacillus*. *J. Bacteriol.* **171**: 5347.

Nakano, M.M. and Zuber, P. 1990. Identification of genes required for the biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. pp. 397-405. *In*: Hoch, J. and Ganesan, A.D. eds. Genetics and biotechnology of bacilli, vol. 3. Academic Press, New York.

Ohno, A., Ano, T. and Shoda, M. 1992. Production of a lipopeptide antibiotic surfactin with recombinant *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Lett.* **14**: 1165-1168.

Ohno, A., Ano, T. and Shoda, T. 1995. Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer, Bacillus subtilis RB14, in solid state fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* **80**: 517-519.

Pérez, P., Varona, Garcia-Acha, I. and Durán, A. 1981. Effect of papulacandin B and aculeacin A on β-(1, 3) glucan-synthase from *Geotrichum lactis*. *FEBS Lett.* **129**: 249-252.

Peypoux, F., Besson, F., Michel G. and Delcambe, L. 1981. Structure of bacillomycin D, a new antibiotic of the iturin group. *Eur. J. Biochem.* **118**: 323-327.

Peypoux, F., Besson, F. and Michel, G. 1980. Characterization of a new antibiotic of iturin group: bacillomycin D. *J. Antibiotics* **33**: 1146-1149.

Peypoux, F., Marion, D., Maget-Dana, R., Ptak, M., Das, B.C. and Michel, G. 1985. Structure of bacillomycin F, a new peptidolipid antibiotic of the iturin group. *Eur. J. Biochem.* **153**: 335-340.

Peypoux, F., Pommier, M.-T., Das, B.C., Besson, F., Delcombe, L. and Michel, G. 1984. Structure of bacillomycin D and bacillomycin L peptidolipid antibiotics from *Bacillus subtilis*. *J. Antibiot.* **37**: 1600-1604.

Peypoux, F., Pommier, M.-T., Marion, D., Ptak, R.M., Das, B.C. and Michel, G. 1986. Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipid antibiotics from *Bacillus subtilis*. *J. Antibiot.* **39**: 636-641.

Schmatz, D.M., Romancheck, M.A., Pittarelli, L.A., Schwartz, R.E., Fromtling, R.A., Nollstadt, K.H., Vanmiddlesworth, Wilson, K.E. and Turner, M.J. 1990. Treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia with 1, 3-β-glucan synthesis inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5950-5954.

Sneath, P.H.A. 1986. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. pp. 1104-1207. *In*: Sneath, P.H.A., Nicholas, S.M., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. vol. 2. Willams and Wilkins Co., Baltimore.

Suh, H.-W., Crawford, D.L., Korus, R.A. and Shetty, K. 1991. Production of antifungal metabolites by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* strain SMF. *J. Indus. Microbiol.* **8**: 29-36.

Taft, C.S. and Seliirennikoff, C.P. 1988. LY 121019 inhibits *Neurospora crassa* growth

and (1-3)-β-D-glucan synthase. *J. Antibiot.* **41**: 697-701.

Thimon, L., Peypoux, F., Wallach J. and Michel, G. 1995. Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**: 101-106.

Walton, R.B. and Woodguff, H.B. 1949. A crystalline antifungal agent, mycosubtilin, isolated from subtilin broth. *J. Clin. Invest.* **28**: 924-926.

Winkelman, G., Allagaier, H., Lupp, R. and Jung, G. 1983. Iturin AL-A new long chain Iturin A possessing an unusual high content of C_{16}-β-amino acids. *J. Antibiot.* **36**: 1451-1457.

Yoshihisa, H., Zenji, S., Fukushi, H., Katshiro, K., Haruhisa, S. and Takahito, S. 1989. Production of antibiotics by *Ps. cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. *Soil Biol. Biochem.* **21**: 723-728.