

## 생물방제균 *Bacillus subtilis* YB-70이 생산하는 항진균성 항생물질의 분리 및 구조결정

김용수<sup>1\*</sup> · 손종근<sup>2</sup> · 문동철<sup>3</sup> · 김상달<sup>1\*\*</sup>  
영남대학교 응용미생물학과<sup>1</sup> · 약학부<sup>2</sup>, 충북대학교 약학과<sup>3</sup>

**Isolation and Structure Determination of Antifungal Antibiotics from *Bacillus subtilis* YB-70, a Powerful Biocontrol Agent.** Yong-Su Kim<sup>1\*</sup>, Jong-Keun Son<sup>2</sup>, Dong-Chul Moon<sup>3</sup> and Sang-Dal Kim<sup>1\*\*</sup>. Korea Institute of Food Hygiene, Seoul, 156-050, Korea<sup>1\*</sup>, College of Pharmacy, Yeungnam University<sup>2</sup>, Kyongsan, 712-749, Korea, College of Pharmacy, Chungbuk University, Chungju 360-763, Korea<sup>3</sup>, Dept. of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan, 712-749, Korea<sup>1\*\*</sup>—A potential biocontrol bacterium, YB-70 was isolated from a rhizosphere in suppressive soil and identified as a strain of *Bacillus subtilis*. In several biochemical and *in vitro* antibiotic tests on *Fusarium solani* with the culture filtrates from *B. subtilis* YB-70, we found that antifungal mechanism of *B. subtilis* YB-70 was mediated by antibiotic substances produced from the bacterium. These antifungal substances were appeared to be heat-resistant, micromolecular, and ethyl alcohol soluble. Antifungal agents produced by *B. subtilis* YB-70 showed strong inhibition against root-rotting fungi *F. solani* in *in vivo* pot test. An antifungal substance, YBS-1s, was purified from the culture broth of *B. subtilis* YB-70 by isoelectronic precipitation, silica gel column chromatography and Sephadex LH-20 column chromatography. Three antifungal agents were isolated from the culture broth of *B. subtilis* YB-70. Various instrumental analysis by Fab-MASS, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, and amino acid analyzer revealed that the YBS-1A was a peptide antibiotics of iturin class containing seven amino acids from five different groups, and the other(YBS-1B) was an analogue of iturin group composed of 11 amino acids with larger molecular weight of about 1,500 dalton, which was larger than that of iturin A.

식물근부성 진균의 피해에 의해 인삼 등 경제식물의 수확이 매년 감소하고 있으나 그 동안 사용되어온 화학 합성 농약의 사용 규제가 점차 강화되어 무공해한 생물학적 방제법의 필요성이 대두되고 있다(1~3).

인삼근부균 *Fusarium solani*의 생물학적 방제를 위한 일련의 연구에서 저병해 인삼경작지로 부터 *F. solani*의 생육을 강력히 길항하는 생물방제균의 한 균주 YB-70을 각종 *in vitro*, *in vivo* 검증법을 통해 선발하였고, 이 균주가 *Bacillus subtilis* 근연종임을 동정한 바 있다(4). 아울러 선발한 방제균 *B. subtilis* YB-70의 식물근부균 *F. solani*에 대한 길항기작이 저분자성 길항물질에 의한 기작임도 추정된 바 있다(5).

따라서 본 연구에서는 생물방제균 *B. subtilis* YB-70이 생산하는 길항물질을 분리 정제하여 항진균성 항생물질임을 재확인하고 이들 항생물질의 구조를 각종 기기분석에 의해 분석하여 그 분자구조를 추정하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 생물방제균의 선발

경상북도 영풍군 소재 저병해 인삼경작지 토양으로 부터 식물근부균 *Fusarium solani*의 생육을 억제하는 길항 균주를 분리하고 그중 가장 억제력이 큰 YB-70 균주를 선발하였으며, 길항력은 potato dextrose agar/nutrient agar (PD/NA)배지(5)를 사용하여 28 °C에서 배양하면서 균체생성량(cell mass)을 측정함으로써 억제력을 조사하였다.

### 항진균성 항생물질의 생산

항생물질 생산용 배지(5)는 dextrose glutamate (DG)배지를 사용하였으며, 선발된 길항세균 *Bacillus subtilis* YB-70을 접종하여 30 °C에서 3일간 160 rpm으로 진탕배양하고 그 원심분리 상등액을 사용하였다.

### 생육억제거리 측정법

식물근부균 *F. solani*의 생육에 대한 선발된 길항세균의 억제능을 조사하기 위해 PD/NA평판배지의 좌측에 먼저 *F. solani*를 접종하여 2일간 28 °C에서 배양시킨 후 우측 4 cm의 간격에 길항세균 *B. subtilis* YB-70을 희석

\*Corresponding author

Tel. 82-53-810-2395, Fax. 82-53-811-4319

E-mail: sdkim@ynucc.yeungnam.ac.kr

Key words: *Bacillus subtilis* YB-70, Antifungal antibiotics, *Fusarium solani*

접종하여 28 °C에서 계속 배양(pairing culture)시키면서 두 미생물 개체군 서로간의 증식선단까지의 거리를 측정, 비교하였다.

### 균체증식억제 측정법

더욱 정확한 억제능을 확인하기 위해서 선발된 길항균주의 배양물을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여, 그 상등액을 2.64% potato dextrose broth (PDB)에 10%되게 gentamycin (15 µg/ml)과 함께 첨가한 후, 식물병원균의 전(前)배양 균사체를 멸균된 cork borer (φ3 mm)로 떠 내어 균일하게 접종하여 28 °C, 160 rpm에서 7일간 배양하였으며, Whatman No. 2 filter paper로 여과하고 105 °C에서 항량이 될 때까지 건조하여 그 균체량을 건물량으로 측정, 비교하였다.

### Agar hole 법

Clear zone 형성방법의 일환으로 멸균된 cork borer (φ3 mm, 6 mm)를 사용하여 식물병원균을 미리 도말하여 접종한 PDA plate (두께 4 mm)상에 원형의 agar hole를 만든 후 억제물질 (50 µl, 100 µl)을 투여하고 28°C에서 2~3일간 배양시킨 다음 그 억제환의 지름을 비교하였다.

### Bioautography에 의한 항생물질 밴드 확인

정제과정 중 항생물질의 분리 band를 확인하기 위하여 정제된 물질의 silica gel thin layer chromatography한 TLC (Merck, No. 7734160 GF<sub>254</sub>)를 *F. solani*의 chlamydospore가 접종된 배지 위에 덮어서 배양한 후 생육 억제된 부분을 확인하는 bioautography방법(6)으로 확인하였다.

### 길항물질의 항생특성 조사

식물병원균 *F. solani*의 생육을 억제하는 길항물질이 항생물질이나 siderophore 등의 저분자 물질인지 아니면 병원균 세포막 분해의 lytic enzyme과 같은 고분자성 물질인지를 확인하기 위해, 배양여액의 가열처리 후 잔존 억제력을 측정하거나, Sigma membrane sack (MW. 12,000)으로 분리한 내·외액의 억제능 측정과 또는 Amicon centriprep 10 (No. 4304, molecular weight cut-off 10,000)를 이용하여 분자량별로 구분하고 구분된 크기별 물질로 조사한 억제력 검증함으로써 내열성 저분자 물질임을 확인하였다. 이때 억제력 측정은 PDB 배지에 *F. solani*를 접종하고 28°C에서 7일간 진탕배양한 후 균체중량 측정법으로 측정하였다.

### Mass spectrum

JMS-AX505H mass spectrometer (Jeol)를 사용하여

positive Fab mass 방법으로 분자량을 측정하였다. 시료의 matrix로는 thioglycerol과 glycerol (1:1) 혼합액을 사용하였다.

### <sup>13</sup>C-NMR spectrum

Bruker 300MHz (ARX 300) spectrometer를 사용하였다. 시료는 MeOH-d<sub>4</sub>에 녹여 측정하였으며 내부표준 물질로는 tetramethylsilane (TMS)을 사용하였고, chemical shift value는 part per million (ppm) 단위로 나타내었다.

### 아미노산 분석

정제된 항진균성 항생물질을 각각 3 mg을 6N-HCl (200 µl)에 녹여 밀봉한 후, 115 °C에서 20시간 반응시켜 가수분해 하였다. 반응액을 감압건조하고, 200 µl의 물에 녹여 여과한 후 아미노산 분석에 사용하였다. 아미노산 분석은 Biochrom 20 Amino acid analyzer (Pharmacia, LKB)을 사용하여 측정하였다.

### 식물실험을 통한 생물방제력 측정

선발된 길항균주의 항진균성 항생물질이 실제 토양내에서 그 길항능력이 발휘되어 *F. solani*에 의한 식물근부병이 억제할 수 있는지 조사하였다. 발병 기주식물로는 그 생육도가 빠른 가지 (eggplant, *Solanum melongena* L.)의 종자를 사용하여 28 °C 항온실에서 미리 발아시킨 후 그 크기나 생육이 비슷한 종묘만 골라 *F. solani*가 접종된 멸균토양에 심고 조정제된 항생물질을 주입하여 식물생장 기간별로 식물생육도와 식물뿌리의 근부현상을 어느정도 억제할 수 있는가를 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 선발된 길항세균의 항진균성 길항기작

지금까지 대부분의 농업용 항진균성 항생물질의 생산균주는 *Streptomyces* 들이었으며 *Penicillium* 등 소수의 곰팡이가 항진균성 항생물질을 생산한다는 보고(7)가 있었으나, 세균을 이용한 항진균성 항생물질 개발은 itulin (8), fengymycin (9), pyrrolnitrin (10), KRF-001 (11) 등 몇몇 보고를 제외하고는 거의 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 *Fusarium solani* 등 식물근부균의 생육을 실제 토양내에서 억제할 수 있는 항진균성 항생물질 생산성의 강력한 길항균주를 분리하여 생물방제균으로 선발하였다. 이를 위하여 인삼의 저병해 경작지 토양의 근권세균을 대상으로 일차로 500여 균주의 토양세균을 분리하였고, 이들 균주 중 항진균성 활성이 가장 높은 YB-70 균주를 최종 선발하였으며, 선발된 길항균주 YB-70은 *Bacillus subtilis*이거나 그 근연종으로 동정할

수 있었다(4).

선발, 동정된 길항균주 *B. subtilis* YB-70의 식물병원성 진균 *F. solani*에 대한 길항기작이 저분자성 항생물질에 기인되는 현상인가를 조사하기 위해서 *B. subtilis* YB-70의 배양여액을 사용하여 아래와 같이 여러가지의 방법에 의해 조사한 결과는(Table 1) 내열성 저분자 항생물질에 기인함을 시사하고 있다. 즉 배양여액의 항진균성 활성총량(total activity)을 기준으로 했을때 100 °C에서 30분간 열 처리한 후 잔존 억제력을 측정하여 항진균성 활성을 백분율로 환산한 결과 기존 배양상등액에 존재하는 억제능에 82~83% 정도의 활성을 나타내었으며, 배양여액을 Sigma제 membrane sack (MW 12,000)를 사용하여 저분자성 물질을 제거한 후 그 억제력을 조사한 결과 82% 이상의 길항력이 상실되었다. c-HCl로 침전시킨 후 anhydrous ethanol로 추출한 추출물의 경우 약 83~85%의 항진균 활성을 나타내었다. 이들 몇가지 결과로 미루어 보아 선발된 길항균 *B. subtilis* YB-70의 *F. solani*에 대한 주 억제기작은 dialysis sack (MW 12,000)을 통과할 수 없는 식물병원균의 외막가수분해 효소 chitinase나  $\beta$ -1,3-glucanase와 같은 고분자성 물질이라기 보다는 열에 안정하며 anhydrous ethanol에 추출될 수 있는 저분자성 물질임을 알 수 있었다. 또한

**Table 1. Mechanism of the antifungal substances produced by *Bacillus subtilis* YB-70 against *F. solani***

Preparation	Fungal dry weight (%) <sup>f</sup>	Fungal colony size (%) <sup>g</sup>
Culture filtrates <sup>a</sup>	100.0	100.0
Dialyzed Sol. <sup>b</sup>	17.9	17.1
Amicon Centriprep. <sup>c</sup>	82.4	86.2
Heat-treated Sol. <sup>d</sup>	83.2	82.4
Ethanol solutes <sup>e</sup>	85.0	83.4

<sup>a</sup>Cultura filtrate was obtained by *B. subtilis* YB-70 grown in dextrose glutamate (DG) medium at 30 °C for 72 hrs. Cells were removed by centrifugation at 12,000×g for 20 min. The culture supernatants were then filtered aseptically by membrane filtration.

<sup>b</sup>Culture filtrates were dialyzed at 4 °C for 3 days through a cellulose dialysis sack (M.W. cut-off, 12,000).

<sup>c</sup>Low molecular weight substances (below M.W. 10,000) was collected with Amicon Centriprep. 10 (No. 4304, M.W. 10,000 cut-off).

<sup>d</sup>Culture filtrates were heated at 100 °C for 30 min.

<sup>e</sup>Culture filtrates were precipitated by the addition of c-HCl (final pH 2.0), and then the pellets were extracted with methanol.

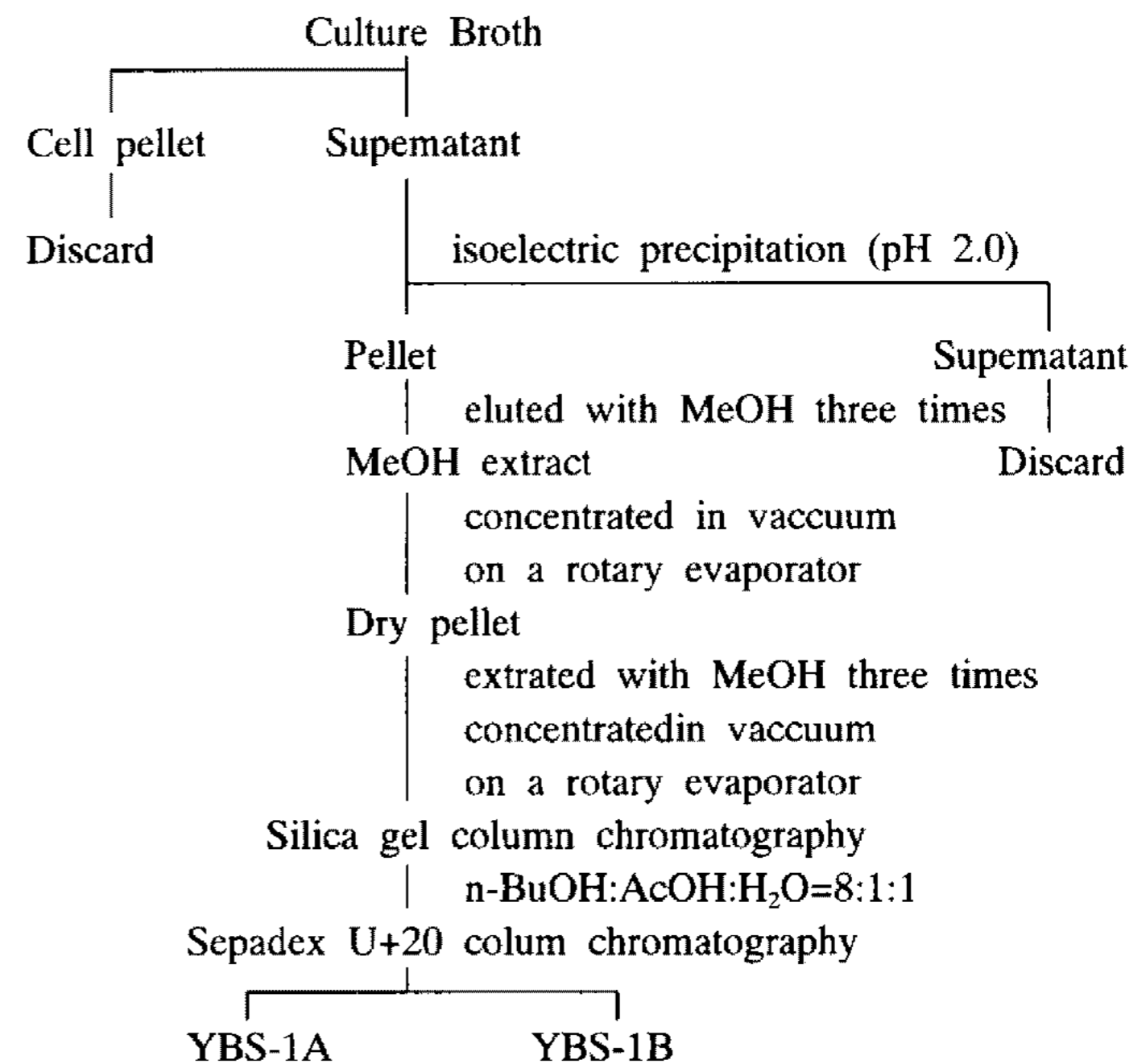
<sup>f</sup>Dry weight of *F. solani* with the treatment of *B. subtilis* YB-70 in PDB after 5 days of incubation at 28 °C. Completed inhibition ratio (100%)-dry weight of *F. solani* cultured with solutions relative to those cultured with water.

<sup>g</sup>Colony circle diameter of *F. solani* with the treatment of *B. subtilis* YB-70 on PD/NA plates after 5 days of incubation at 28 °C. Completed inhibition ratio (100%)-colony circle diameter of *F. solani* cultured with solutions relative to those cultured with water.

Amicon centriprep 10 (No. 4304, molecular weight cut-off 10,000)을 이용하여 저분자성 물질과 고분자성 물질을 분리하고, 그 각각의 억제활성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 2에 나타난 것과 같이 배양 7일 후의 억제활성도 기준으로 배양상등액이 식물근부균 *F. solani*의 생육을 무침가구 대비 60.5% 억제하였는데 이 중에 저분자성 물질에 의한 생육억제능이 전체 억제능력중 82% 이상으로 나타내었다. 상기의 모든 결과를 종합하여 볼 때 선발된 길항균 *B. subtilis* YB-70의 식물근부균에 대한 억제능은 82% 이상의 활성이 항생물질인 저분자성 물질이 주 원인인 것으로 추정할 수 있었다.

### 항생물질의 추출 및 정제

생물방제균 *B. subtilis* YB-70으로 부터 항진균성 항생물질의 추출 및 정제과정은 Fig. 1과 같이 수행함으로써 단일물질들로 정제할 수 있었다. 선발된 균주 *B. subtilis* YB-70를 항생물질 생산용 배지에 종(種) 배양액을 배지량의 5%되게 접종한 후 30 °C에서 160 rpm으로 3일간 배양한 후 9,500 rpm (11.9 g×1000, Himac CR 20B2)으로 원심분리하고 원침상등액을 HCl로 pH를 2.0으로 조정하여 4 °C에서 1일간 숙성시켰다. 숙성액을 12,000 rpm으로 2회 원심분리하고 모여진 침전물을 methyl alcohol로 3회 추출하였다. 추출액의 농축은 45~50 °C에서 rotary vacuum evaporator (Heidolph VV2000, Germany)로 수행하였다. 추출, 농축건조된 조정제 항진균성 항생물질을 silica gel (Merck, No. 7734, 70~230 mesh Kieselgel 60) column에 충전하고 이동상 (n-BuOH:AcOH:H<sub>2</sub>O=8:1:1) 100 ml로 전개시켜 분획 하였



**Fig. 1. Isolation and purification procedure of antifungal antibiotics YBS-1A and B produced by *Bacillus subtilis* YB-70.**

으며 (7 ml/fraction), 이들 중 항진균 작용을 나타내는 분획들을 (Fraction number 88~140) 모아 감압 건조시켰다(160 mg). 이 분획을 Sephadex LH-20 column (Pharmacia LKB, elution: methanol)으로 다시 정제하여 3개의 분획(YBS-1A, B)으로 나누었으며, 용매를 날려 보낸 후 백색분말상의 물질들을 얻었다(YBS-1A; 30 mg, B: 40 mg). 모든 과정 중 항진균성 항생물질의 이동은 ninhydrin 반응 등 화학적으로 정성하거나 silica gel thin layer chromatography를 이용하여 분리하고 분리된 활성 spot나 band는 plate 상에서 *F. solani*를 도포배양하는 bioautography법 방법(6)으로 확인함으로써 그 활성도를 추적하였다.

**식물시험을 통한 생물방제력 측정**

생물방제균 *B. subtilis* YB-70이 분비하는 항진균성 항생물질이 실제 토양내에서도 그 억제능력을 발휘하는지를 조정제 항생물질을 사용하여 조사하여 본 결과 Fig. 2에 나타난 것과 같이 토양내에서도 식물근부균 *F. solani*의 생육을 억제하는 능력이 있음을 확인하였다.

**항진균성 항생물질의 특성**

*B. subtilis* YB-70이 생산한 항진균성 항생물질은 극성 용매에서만 용해성, TLC Rf 값등의 여러 특성조사를 통해(5) 기존의 *B. subtilis*가 분비하는 항진균성 항생물질인 itulin A, bacillomycin, eumycin(12, 13)과는 유사한 것으로 추정되었다. 따라서 본 YBS-1s도 기존 *B. subtilis*가 생산하는 항진균성 항생물질 대부분이 peptide antibiotics(8, 12, 13)와 iturin A (8)라는 보고와 McKeen에 의해 보고된 peptide 항생물질(12) 그리고 국내에서 복 등에 의해 밝혀진 RFK-001(11) 등이 peptide성 항생물질이라는 결과와는 그 특성면에서 매우 유

사하다. 다만 타 유사 항생물질에 비해 YBS-1s는 고온에서의 안정성과 넓은 pH에서 활성을 유지하였으며(5), 물리화학적 변화에 강하게 견딜 수 있는 구조를 한 것으로 생각된다. 이는 환경 변화가 심한 토양에서의 활성유지에 중요한 요소로 생각된다.

**항진균성항생물질의 구조분석**

위의 Fig. 1의 방법으로 분리된 항진균성 항생물질들 가운데 물질 YBS-1A와 YBS-1B는 Fab-mass(Fig. 3, 5) <sup>1</sup>H-NMR <sup>13</sup>C-NMR(Fig. 4, 6), DEPT 그리고 아미노산 분석을 통하여 화학적인 구조분석을 시도하였다. YBS-1A는 positive fab mass spectrum에서 이미 보고(11)된 바가 있는 iturin과 같은 pattern을 보여 주었다(Fig. 3). 즉 6개의 혼합체인 iturin의 각 분자의 M+Na<sup>+</sup>에 기인하는 peak들을 m/z 1065, m/z 1079, m/z 1093 그리고 m/z 1107에서 각각 나타남을 확인할 수 있었다. 항균물질 YBS-1A의 <sup>13</sup>C-nmr spectrum은 비록 혼합물인 상태로 측정하였으나, 보고되어 있는 iturin A (14)로 부터 정제된 단일물질의 spectrum과 비교해 볼때 iturin 혼합체의 특징적인 signal들을 확인할 수 있었다(15) (Fig. 5). 즉 aromatic region에 tyrosine의 benzene ring 위치의 탄소에 기인하는 특징적인 signal이 116.3, 128.9, 131.5 그리고 157.4 ppm에서 iturin A로 부터 정제된 단

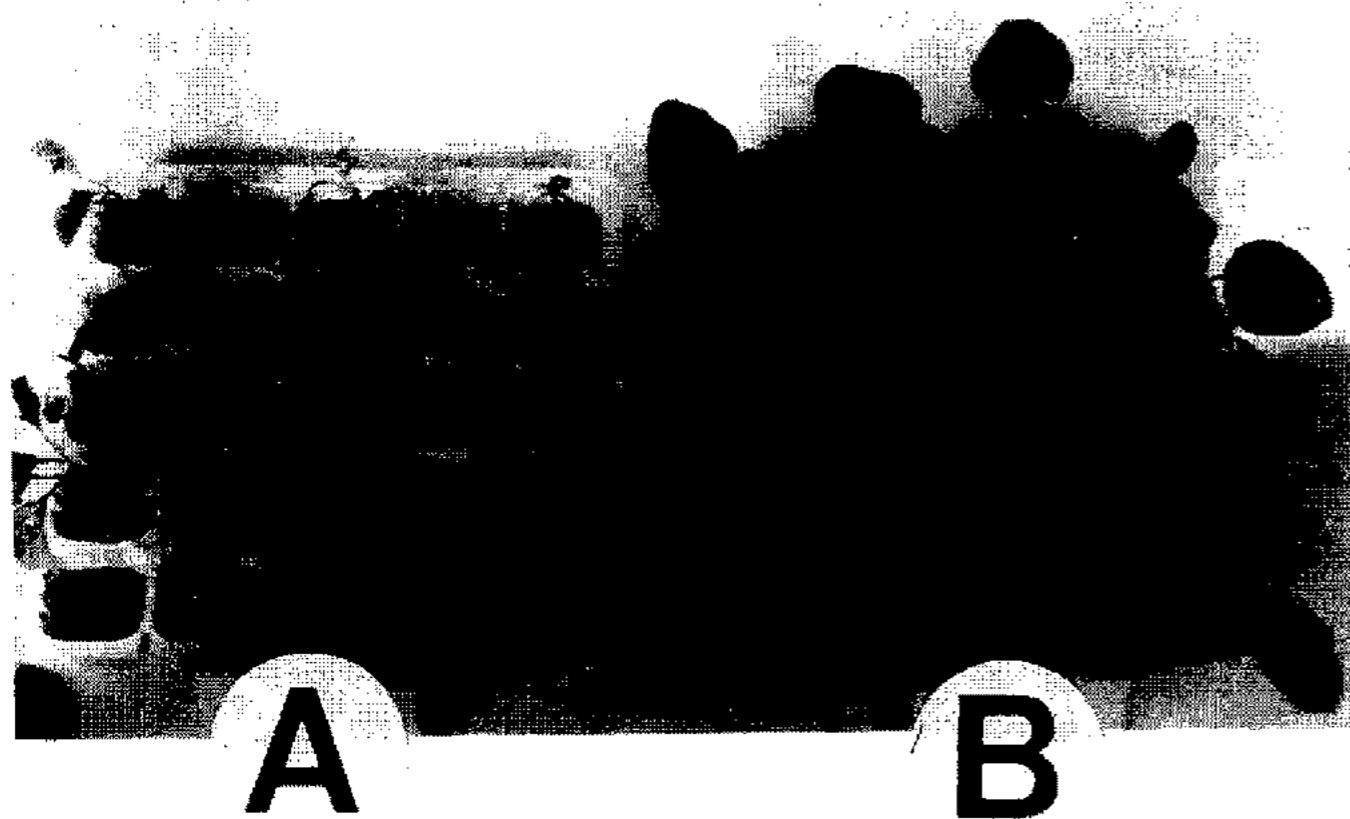


Fig. 2. In vivo suppressive effect of antifungal antibiotics from *B. subtilis* YB-70 against phytopathogenic *F. solani*.  
A: *F. solani* only.  
B: *F. solani* with antifungal substances from *B. subtilis* YB-70.

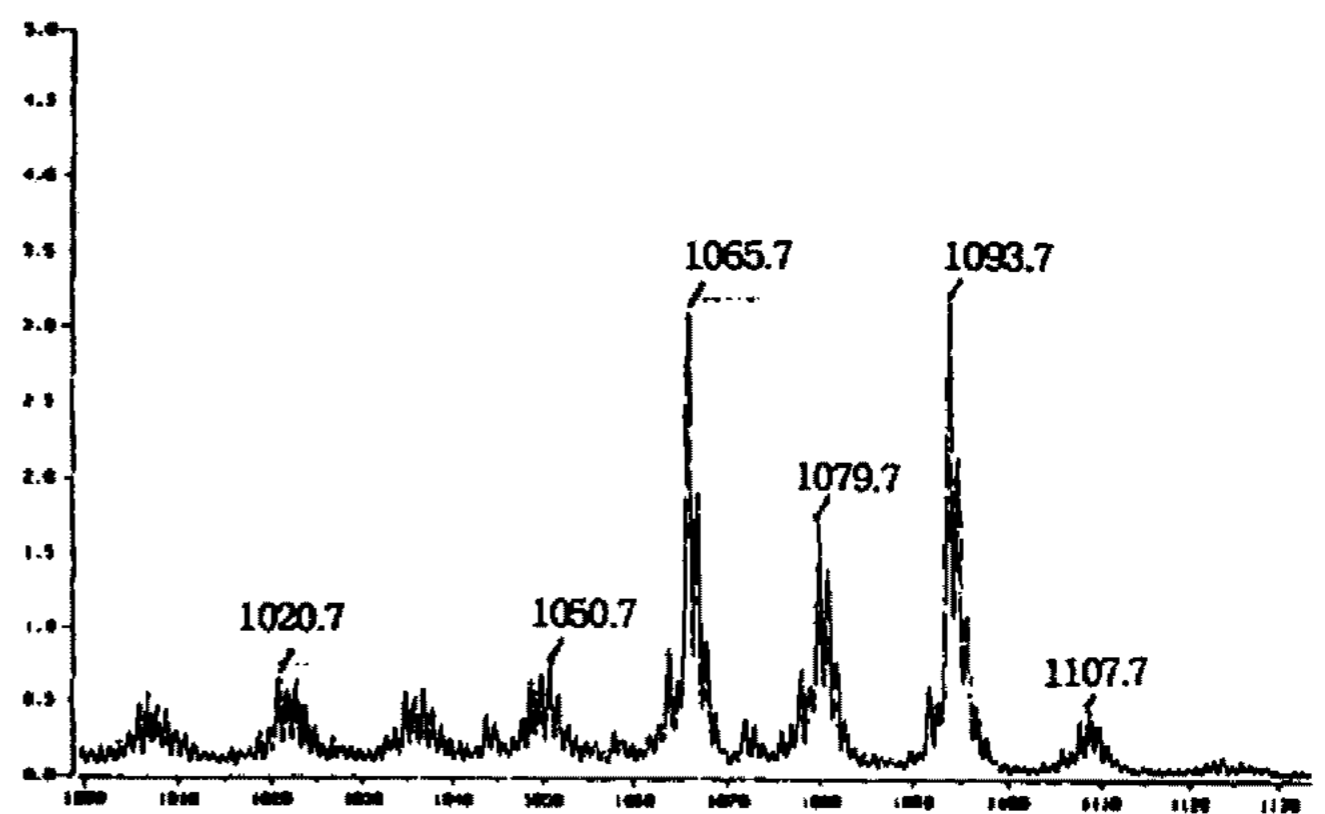


Fig. 3. Positive FAB-mass spectrum of compound YBS-1A.

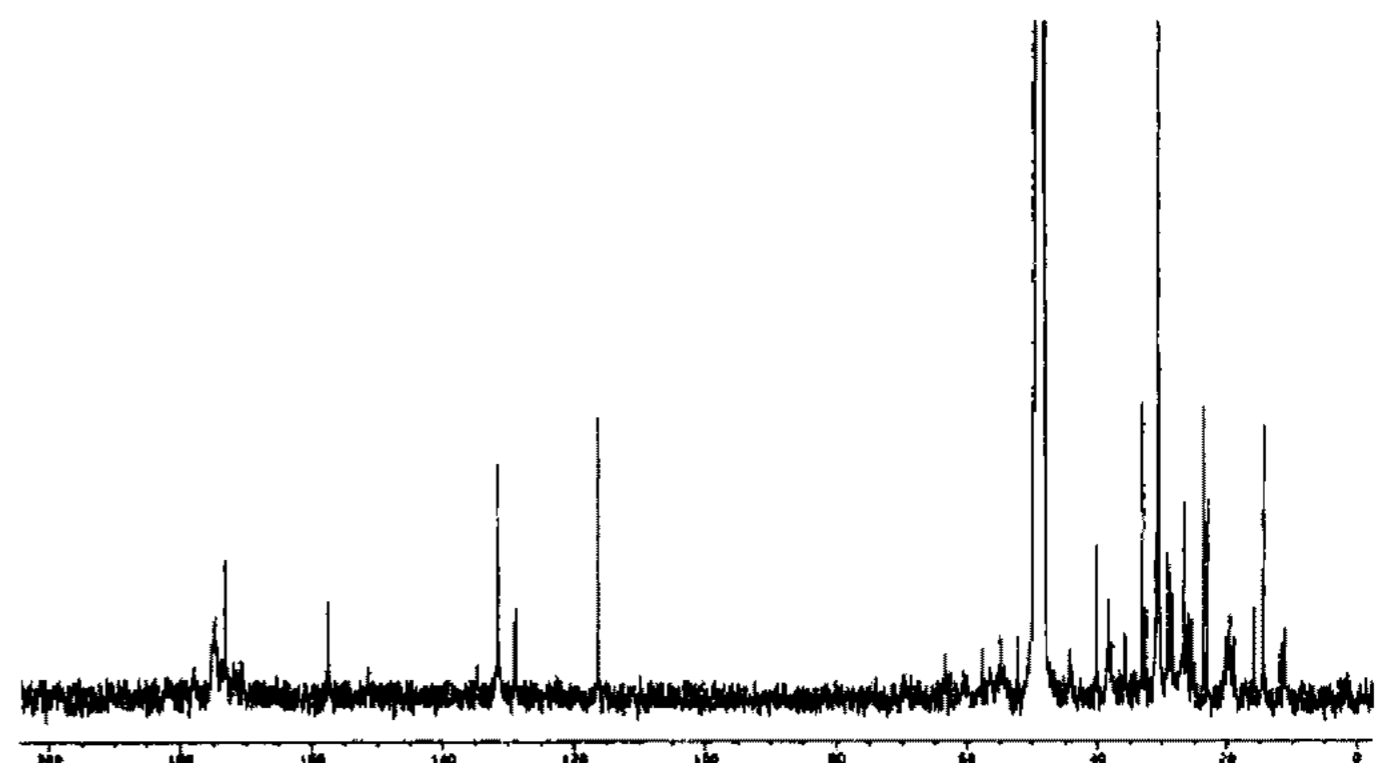


Fig. 4. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of compound YBS-1A.



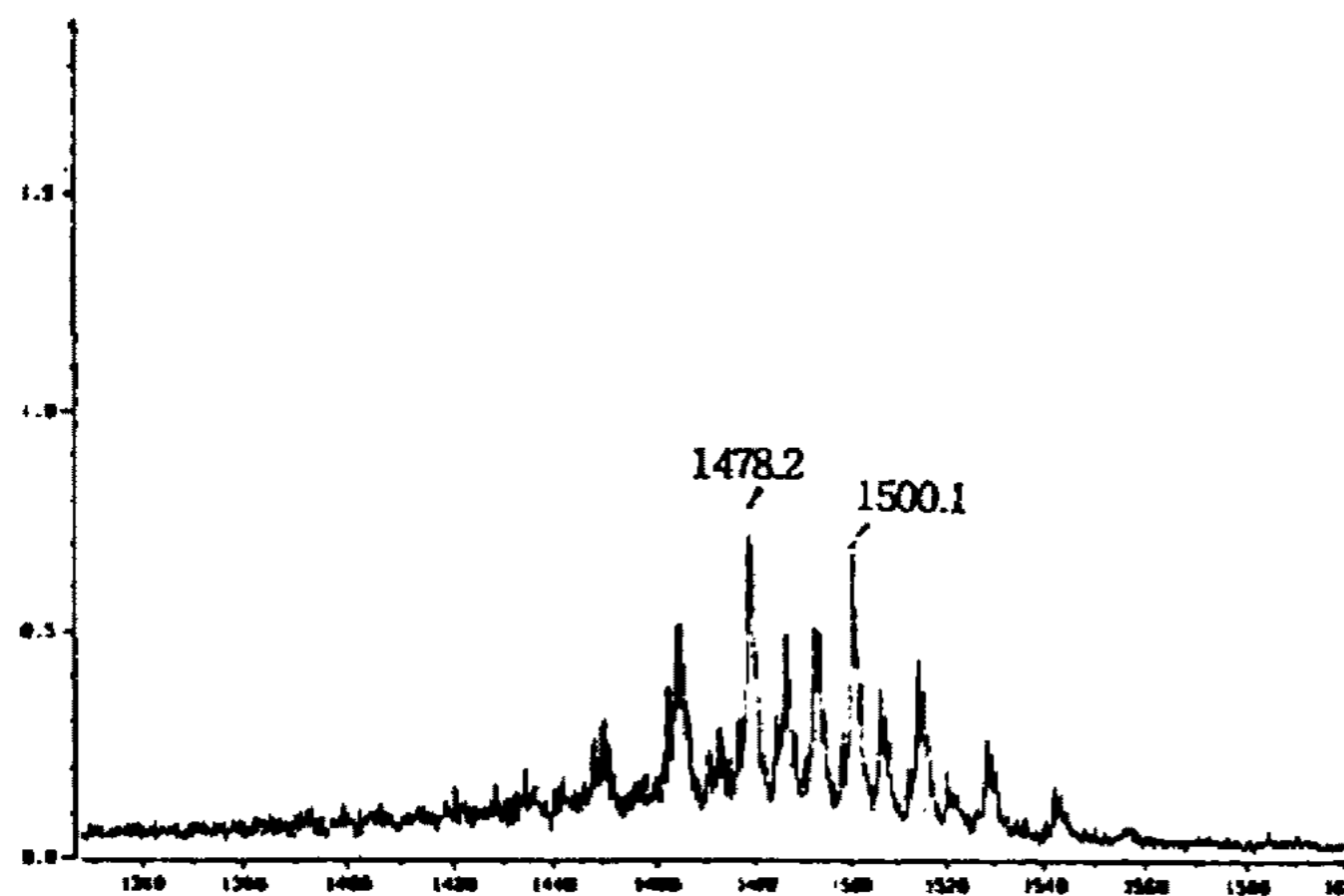


Fig. 5. Positive FAB-mass spectrum of compound YBS-1B.

Table 2. The components of amino acids from the hydrolysate of antifungal antibiotic YBS-1A by the amino acids analysis

Amino acid	Ret. time	Area		Mole % (YBS-1/Standard)	Component ratio % (No.)
		Standard (1M)	YBS-1A		
Aspartic acid	10.225	258440	1012919	392	286 (3)
Serine	12.167	245023	284665	116	85 (1)
Glutamic acid	14.642	344330	1384388	402	293 (*)
Proline	15.625	500925	747924	149	109 (1)
Tyrosine	27.117	279451	383943	137	100 (1)

\*The numerical value expressed in consideration of a little impurity of glutamic acid in dextrose glutamate (DG) medium.

일물질과 일치하게 나타남을 볼 수 있다. 그리고 정제된 단일물질일 경우에는  $\beta$ -amino acid의 terminal methyl기에 기인하는 peak가 14.5 ppm에 하나의 peak만 나타내지만 항균물질 YBS-1A는 10에서 20 ppm 사이에 10개의 terminal methyl기에 기인하는 peak들을 확인함으로써 YBS-1A는 이미 보고된 peptide 혼합물인 iturin임을 알 수 있었다(iturin 혼합물일 경우 총 10개의 methyl기를 가지고 있다). 아울러 이 물질을 가수분해하여 구성 아미노산을 분석하였을 때 aspartic acid, serine, glutamic acid, proline 그리고 tyrosine이 확인되었으며, 이들의 구성비는 3:1:1:1:1(Table 2)로 iturin과 일치함을 확인하였다(11, 14). 그리고 아미노산 서열과, 구성 아미노산들의  $\alpha$ 위치의 stereochemistry는 더 이상 확인하지 않았다.

한편 항생물질 YBS-1B는 TLC에서 단일 spot를 나타내었으며,  $^{13}\text{C}$ -nmr spectrum은 항균물질 YBS-1A와 아주 유사한 pattern을 보여주었다(Fig. 6). 즉 tyrosine에 기인하는 aromatic 지역의 4개의 peak (116.3, 128.8, 131.5, 157.4 ppm), 170에서 180 ppm 사이에 나타나는 carboxylic acid들에 기인하는 peak들, 70에서 10 ppm

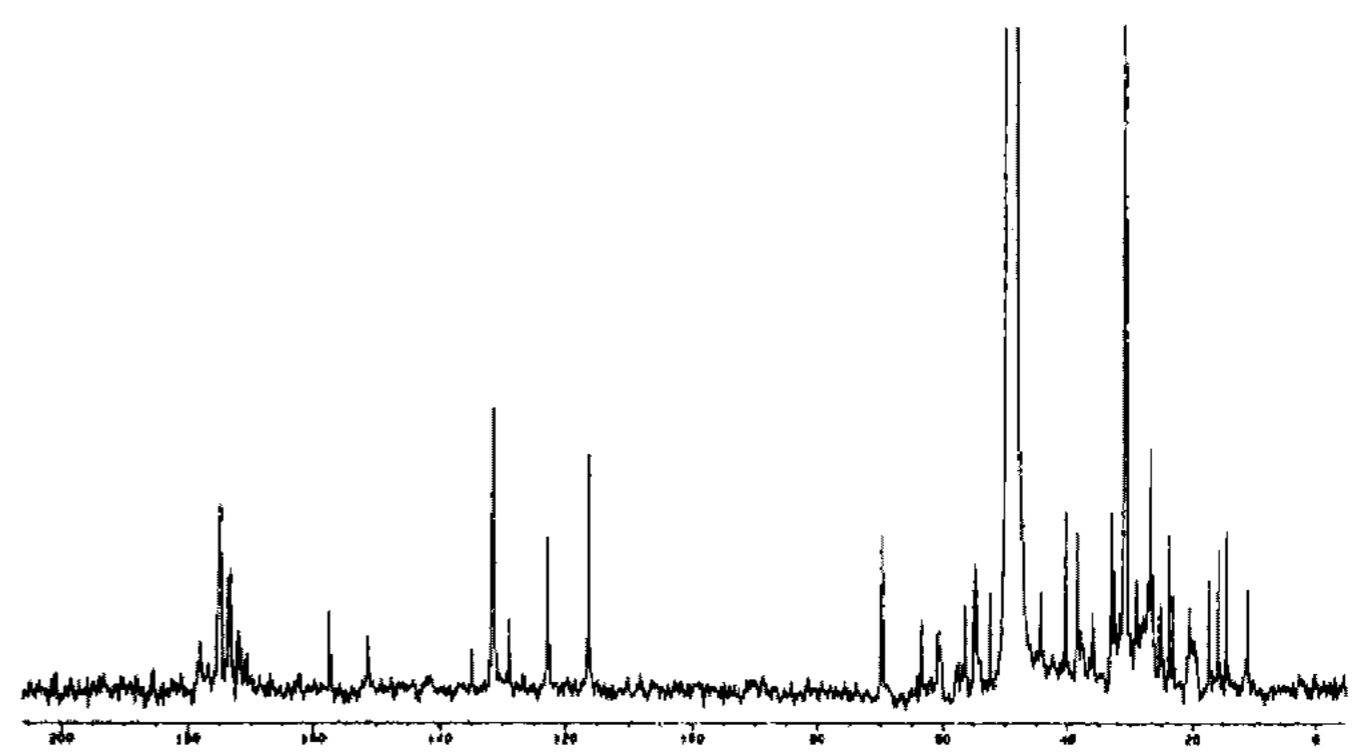


Fig. 6.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound YBS-1B.

Table 3. The components of amino acids from the hydrolysate of antifungal antibiotic YBS-1B by the amino acids analysis

Amino acid	Ret. time	Area		Mole % (YBS-1/Standard)	Component ratio % (No.)
		Standard (1M)	YBS-1B		
Serine	10.433	245023	515069	210	100 (1)
Glutamic acid	14.225	344330	2598888	755	360 (3)
Proline	15.108	500925	910864	182	87 (1)
Alanine	20.383	177826	527640	297	141 (1)
Isoleucine	24.492	164615	334443	203	97 (1)
Tyrosine	27.150	279451	1969201	705	336 (3)
Lysine	32.375	598094	1626852	272	130 (1)

사이에서 aliphatic carbon들에 기인하는 signal 등이 항균물질 YBS-1A와 아주 유사하였다.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum 역시 YBS-1A와 아주 유사한 pattern을 보여주며 peak의 broad한 정도로 보아 YBS-1A와 같이 유사한 유도체들의 혼합물임을 알 수 있다.

그러나 positive fab mass spectrum에서 m/z 1500 부근에 항균물질 YBS-1A와 유사하게 peak들이 group으로 나타내었다(Fig. 4). 아울러 이 물질의 아미노산 분석 결과 serine, glutamic acid, proline, alanine, isoleucine, tyrosine, lysine이 확인이 되었으며, 이들의 mole비는 분석결과를 토대로 계산해 보면 1:3:1:1:1:3:1(Table 3)로 항생물질 YBS-1A와는 그 구성 아미노산이 다르게 나타났다. 이와같은 점들을 고려할 때, YBS-1B는  $\beta$ -amino acid의 side chain 부분은 itulin과 유사하며, peptide들의 구성이 ituline과 다른 물질들의 혼합물인 것으로 추정된다. 이 물질의 구조에 대한 연구는 향후 계속될 예정이다.

## 요 약

인삼근부균 *Fusarium solani*의 생육을 강력히 저해하는 생물방제균을 저병해 인삼경작지 근권토양에서 분리,

선발하여 *Bacillus subtilis*로 동정한 바 있고, 이 생물방제균 *B. subtilis* YB-70의 식물근부균 *F. solani*의 생육에 대한 길항작용이 항진균성 항생물질에 기인된다는 사실을 배양생산물 분자량별 활성도 검증, 열처리에 의한 잔존 활성도 측정 등에 의해 열에 강한 저분자성 항생물질로 재확인하였고 *in vivo* test에서도 *F. solani*에 의한 근부병을 강력히 억제할 수 있음을 하였다.

생물방제균 *Bacillus subtilis* YB-70이 생산하는 항진균성 항생물질을 pH 침전, 용매추출, silica gel chromatography, LH-20 column chromatography 등을 통해 항생물질 YBS-1A, B로 분리, 정제 할 수 있었으며, 이 물질의 구조를 MS, NMR, amino acid analysis로 추정해 본 결과 YBS-1A는 5종 7개의 amino 산으로 구성된 itulin A 계열 항생물질로 규명되었으며, YBS-1B는 7종 11개의 amino 산으로 구성된 분자량 1,500정도의 itulin A 보다 좀 더 큰 항생물질로 추정되었다.

### 감사의 글

본 논문은 한국과학재단 핵심전문연구비(931-0500-014-2) 지원에 의해 수행된 연구의 일부로 연구비 지원에 감사합니다.

### 참고문헌

1. Henis, Y., and I. Chet. 1975. Microbial control of plant pathogens. *Adv. Appl. Microbiol.* **19**: 85-111.
2. Baker, R. 1968. Mechanisms of biological control of soil-borne plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* **6**: 263-294.
3. Cook, R. J. 1985. Biological control of plant pathogens: Theory to application. *Phytopathol.* **75**: 25.
4. Kim, Yong-Su, Ho-Seong Lim, and Sang-Dal Kim. 1994. *Bacillus subtilis* YB-70 as a biocontrol agent of *Fusarium solani* causing plant root-rot. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 68-74.
5. Kim, Yong-Su, and Sang-Dal Kim. 1994. Antifungal mechanism and properties of antibiotic substances produced by *Bacillus subtilis* YB-70 as a biological control agent. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 296-304.
6. Harsh, J.H. 1975. Antibiotic assays-principles and precautions. Pp 55-69 *In Methods in Enzymology*, Vol. 43, Antibiotics, Academic press.
7. Brian, P. W., J. M. Wright, J. Stubbs, and A. M. Way. 1951. Uptake of antibiotic Metabolites of soil microorganisms by plant. *Nature* **167**: 347-349.
8. Besson, F., F. Peypoux, G. Michel, and L. Delcambe. 1976. Characterization of iturin A in antibiotics from various strain of *Bacillus subtilis*. *J. Antibiot.* **29**: 1043-1049.
9. Leoffler, W., J.S.M. Tschen, N. Vanittanakom, M. Kugler, E. Knorpp, T. F. Hsieh, and T.G. Wu. 1986. Antifungal effects of bacilycin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3: A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *J. Phytopath.* **115**: 204-213.
10. Howell, C. R., and R. D. Stipanovic. 1980. Suppression of *Pythium*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoloteorin. *Phytopathol.* **70**: 712-715.
11. 김성기, 이남경, 정태숙, 김영국, 최진자, 복성해. 1991. *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis*가 생산하는 항진균 물질 KRF-001의 구조결정. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 598-603.
12. Mckeen, C. D., C. C. Reilly, and P. L. Pusey. 1986. Production and partial characterization of antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathol.* **76**: 136-139.0
13. Hosono, K., and H. Suzuki. 1983. Acylpeptide, the inhibitors of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase. I. Purification physiochemical properties and structure of fatty acid residues. *J. Antibiot.* **36**: 667-673.
14. Chae, G. P., S. Makoto, and K. Hiroshi. 1990. Suppression effect of *Bacillus subtilis* and its products in phytopathogenic microorganisms. *J. Ferment. Bioeng.* **69**:1-7.
15. PHA C. G, M. Shoda and H. Kubota. 1990. Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and it's products on phytopathogenic microorganism. *J. Ferment. Bioeng.* **69**:1-7.

(Received 25 November 1996)