

항진균성 항생물질을 생산하는 *Bacillus* sp. LAM 97-44의 분리 및 동정

이노운 · 김천석 · 도재호 · 정인찬¹ · 이현우² · 이동희^{3*}

한국인삼연초연구원 제품개발부, ¹한서대학교 화학과,
²연세대학교 원주의과대학 생화학교실, ³건국대학교 미생물공학과

초 록 : 항진균제를 개발하기 위하여 토양으로부터 700주의 세균, 방선균, 곰팡이를 분리하였으며, 이들 배양액을 조사한 결과 *Candida albicans*의 성장을 억제시킬 수 있는 LAM 97-44 균주를 항진균성 항생물질 생산균으로 선발하였다. 분리균주를 동정하기 위해 생산균 LAM 97-44 균주의 형태학적 특성, 배양학적 특성, 생리학적 특성, 균체성분 등을 조사하였다. LAM 97-44 균주는 2~3×1~1.5 μm 크기의 포자를 형성하는 간균이며, 포자의 형태는 ellipsoid 형 이었다. LAM 97-44 균주는 arabinose, cellulose, xylose를 이용하지 못하였으나 fructose, glucose, glycerol, maltose, raffinose 등은 이용하는 것으로 나타났다. 지방산 분석결과 iso-와 anteiso-인 성분으로 구성되어 있었으며, menaquinone은 *Bacillus*속 세균의 전형적인 isoprenoid 사슬이 7개인 menaquinone(MK-7)이었다. 이러한 결과를 종합하면 LAM 97-44 균주는 *Bacillus subtilis*와 유사한 균으로 동정되었다.(1998년 4월 16일 접수, 1998년 6월 18일 수리)

서 론

진균류는 동식물계의 병원균으로서 뿐만아니라, 건강한 사람의 인체에도 생존하고 있어 다른 병원체의 감염으로 면역 기능이 약화되었거나, 항생물질, 호르몬류, 항암제 등의 과용으로 인해 진균류의 저항력 내성이 증가했을 때는 여러가지 진균증을 일으킨다. 대표적인 진균증은 *Candida albicans* 등의 *Candida* sp.에 의한 칸디다증, *Aspergillus fumigatus* 등의 *Aspergillus* sp.에 의한 아스페르길루스병(국균증), *Cryptococcus neoformans*에 의한 효모균증, *Mucor* sp.과 *Rhizopus* sp. 등에 의한 zygomycosis증, *Epidermophyton floccosum*과 *Trichophyton* sp.에 의한 dermatophytoses증 등이 있다.¹⁾ 많은 항진균 치료제중에서 최근 널리 사용되고 있는 물질은 polyene antibiotics, griseofulvin, flucytosine, tolnaftate, imidazole 유도체 등이 있다.²⁾

Streptomyces species에 의해 생산된 polyene계 항생물질은 주로 세균에 대한 감수성이 크지만 임상적으로 각종 진균증에도 넓은 항균 spectrum을 보이고 있다.^{3,4)} 모든 polyene계열 항생물질은 lactone ring에서 결합된 이중결합 체계와 β-수산화된 부분을 가진 macrolide이다.⁵⁾ 이러한 항진균제 그룹의 화합물은 nystatin,⁶⁾ amphotericin B,⁷⁾ candicidin,⁸⁾ pimaricin,⁹⁾ trichomycin¹⁰⁾과 hamycin¹¹⁾ 등이 있다.

1962년에 도입된 합성약품인 tolnaftate은 피부 사상균증을 치료하는데 가장 좋은 항생제로 사용하였다.¹²⁾ 이 항진균제는 griseofulvin 처럼 *Candida* species에는 전혀 효과가 없으며, 피부 사상균에 대해서 살균효과가 단지 증식하는 세포안에서 나타난다.^{13,14)}

Flucytosine은 최초로 암 치료제로 사용하기 위해 개발한 불

화 피리미딘이다. 이 항생제의 항진균작용은 좁은 spectrum을 가지고 있다. 즉 높은 활성으로 폐의 아스페르길루스병(국균증)의 성공적 치료가 보고 되었으며,¹⁵⁾ 효모와 *Candida albicans*에도 제한적으로 높은 항균력을 나타내었다.¹⁶⁾ Flucytosine은 *Cryptococcus neoformans* 균주에 대해서 *in vitro*에서 작용한다.¹⁷⁾

미생물에 의해 생산되는 것으로 밝혀진 10,000 여종의 항생물질 가운데 약 2/3에 해당하는 64% 정도가 방선균으로부터 발견되었으며, 세균으로부터는 13% 정도, 곰팡이로부터는 23% 정도가 발견되었다.¹⁸⁾ 특히 세균에 의해 생산하는 항진균성 항생물질에 관한 연구는 매우 저조한 실정이다.

따라서, 본 연구는 독성이 없는 강력한 신규 항진균성 항생물질을 개발하기 위해 토양에서 항진균성 물질을 생산하는 균주를 분리하였다. 특히 *Candida albicans*균주에 항균력이 큰 물질을 생산하는 세균인 *Bacillus* sp. LAM 97-44 균주를 선발하여 미생물학적 동정의 실험 결과를 보고 하는 바이다.

재료 및 방법

균의 분리

항진균성 물질을 생산하는 균주를 분리하기 위하여 서울 근교와 강원도의 산림 부식토를 채취하여, 1주일간 통풍이 잘 되고, 그늘진 장소에서 건조하였다. 이 토양 시료 1 g을 멸균된 증류수 3 ml에 넣어 잘 혼합한 후, 희석배수에 따라 희석하여 분리용 평판배지(1.0% glucose, 0.3% peptone, 0.2% yeast extract, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O, 0.01% K₂HPO₄, 1.5% agar, pH 7.0±1)에 도말한 후 30°C에서 2~5일간 배

찾는말 : 항진균성 항생물질, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*

*연락처

양하면서, 평판배지에 생긴 집락을 관찰하여 약 700여주를 분리하여 4°C에 보관하면서 향진균성 물질을 생산하는 균주 선별용으로 사용하였다.

향진균성 물질 생산균주의 선발

토양으로부터 순수 분리한 700여 균주를 기초배지(1.0% glucose, 0.3% peptone, 0.2% yeast extract, 0.01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01% K_2HPO_4 , pH 7.0±1)에 접종하여 (2×15 cm test tube, 7 ml medium) 30°C에서 7일간 배양하였다. 이 배양액을 여과한 후 70 µl를 paper disc(직경 7 mm, 두께 2 mm)에 주입하여 건조한 후 *Candida albicans* IFO 0583를 도말한 평판 배지 위에 올려놓은 후 30°C에서 2일간 배양하여 생육 저지대를 관찰하였다. 이때 저지환이 큰 균주를 1차 선별하였다. 2차 선별에 있어서는 1차 선별된 균주의 재현성을 확인 하기 위해 100 ml 삼각 flask에 20 ml씩 분주한 기초배지에 백금이로 2 loop씩 접종하여 왕복 진탕배양기(진폭 3 cm, 105 strokes/min)로 30°C에서 7일간 배양하였다. 배양액을 여과한 후 여액 70 µl를 paper disc에 흡수시켜 건조한 후 1차 선별과 같은 방법으로 향진균력을 조사하였다.

선발 균주의 배양

향진균성 항생물질을 생산하기 위하여 전배양 배지(1.0% glucose, 0.3% peptone, 0.05% yeast extract, pH 7.0±1)를 100 ml 삼각 flask에 20 ml 씩 분주하여 121°C에서 15분 가압 살균한 후 선별된 LAM 97-44 균주를 백금이로 2 loop 접종하고 30°C 배양기에서 5일간 배양하여 종균으로 사용하였다. 향진균성 항생물질의 생산은 생산배지(1.2% glucose, 0.8% glycerol, 0.1% malt extract, 0.2% $NH_4H_2PO_4$, 0.1% K_2HPO_4 , 1 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 mM $FeSO_4$, pH 7.0±1)를 500 ml 삼각 flask에 50 ml씩 분주하여 121°C에서 15분 가압 멸균한 후 전배양액을 2% 접종하여 30°C 왕복진탕기(진폭 3 cm, 105 strokes/min)에서 배양하였다.

향진균성 항생물질의 활성 측정

향진균성 활성은 paper disc법^{19,20)}에 의해 시료 70 µl를 paper disc에 흡수시킨 후 건조하여 시험균주인 *C. albicans* IFO 0583을 도말한 평판배지 위에 올려놓은 후 30°C 배양기에서 20~40시간 배양하였다. 평판 배지에 생긴 생육 저지대의 직경을 측정하여 상대적 활성을 조사하였다.

선발 균주 보존

순수 분리한 LAM 97-44 균주는 전배양배지에 접종하여 30°C에서 25시간 배양하여 test tube(2.0×20 cm)에 3 ml 씩 분주하여 -70°C deep freezer(REVCO. U. S. A)에 넣어 보존하여 사용하였다.

선발균주의 형태 및 배양학적 특성

선발균주의 크기와 형태는 Gerhart 등²¹⁾의 방법에 따라 그림 염색하여 광학현미경(Nikon, FK-IIA, Japan)으로 관찰하

였다. 또한 선발균주의 외형을 관찰하기 위하여 2.0% phosphotungstic acid로 negative 염색하여 gold coating한 후 전자현미경(Philips, SEM 515, Netherland)을 이용하여 관찰하였으며, glucose-nutrient agar 배지, skim milk 배지, luria-bertani 배지에서 생육한 집락의 크기, 모양과 색깔등을 관찰하였고, 반유동 고체배지(tryptose 1.0%, sodium chloride 0.5%, agar 0.5%)에 배양하여 운동성을 조사하였다.

생리학적 특성

균주의 생리학적 특성을 조사하기 위하여 Methods for general and molecular bacteriology²²⁾와 Bergey's manual of systematic bacteriology²³⁾에 기술된 방법에 의하여 casein 분해능, 전분 분해능, gelatin 액화력, 당 발효성, indole 생성능, nitrate 환원력, Voges-Proskauer 시험, catalase와 oxidase 생산능 등을 조사하였다.

탄소원의 이용성

탄소원의 이용성에 있어서 carbon utilization basal salt agar medium, 즉 $(NH_4)_2SO_4$ 2.64 g, KH_2PO_4 2.38 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 5.65 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 g을 물 1 l에 녹인 배지에 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.64 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.11 g, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.79 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15 g을 물 1 l에 녹인 용액인 Pridham & Gottlieb trace salts을 1 ml 첨가하여 pH를 6.7로 조절한 다음 2%의 agar를 첨가한 후 살균하여 사용하였다. 각 탄소원은 10% stock solution을 여과한 다음 1% 량이 되게 첨가하여 실험하였다.

지방산 분석

향진균성 항생물질 생산 균주 LAM 97-44의 지방산 분석²⁴⁾을 위하여 동결건조 균체 20 mg과 5% methanolic-HCl 2.0 ml를 넣고, 100°C에서 3시간 가열하여 지방산을 fatty acid methylester(FAME)화 하였다. FAME를 n-hexane 3.0 ml로 3회 반복 추출하였으며, n-hexane 추출물에 두배의 증류수를 넣어 혼합한 후, 원심분리하여 n-hexane층만 분리하여 질소가스로 농축한다. 농축된 FAME를 n-hexane에 넣어 이를 FAME 분석 시료로 사용하였다. 지방산 분석은 gas chromatography(Hewlett-Packard, 5890-II, U. S. A.)로 분석하였으며, column은 capillary column(HP-1)을 사용하였고, detector는 flame ionization detector(FID), injection 온도는 250°C column 온도 200°C, 운반 가스로 수소가스를 사용하였다.

Menaquinone(MK) 분석

동결건조 균체 200 mg을 30 ml의 chloroform:methanol (2:1, v/v)혼합액에 현탁시켜 빛이 차단된 상태에서 12시간 진탕하여 추출하였고, 이 추출물로부터 균체를 제거한 후 추출액을 감압 건조하였다. 건조된 시료는 소량의 acetone으로 용해한 후, 질소가스로 농축하여 quinone 분석용 시료로 사용하였다. 시료를 thin layer chromatography plate에서 petroleum benzene:ethyl ether (85:15, v/v)혼합액으로 전개하여 254 nm에서 quinone band의 위치를 확인하고 acetone

으로 추출한 후 여과하여 질소가스로 농축시켜 갈색 유리 병에 보관하면서 HPLC(Hitachi, L-3000, Japan)로 분석하였다. 이때 표준 quinone으로는 MK-7을 사용하였다

결과 및 고찰

사용균주의 선발

신규 항진균성 항생물질을 탐색하기 위해 토양으로 부터 순수분리한 700여 균주중 *C. albicans* IFO 0583에 대한 항균력을 평판배지에서 희석법으로 조사하여 항생물질을 생산하는 30여 균주를 1차 선별하였다. 이 30여 균주중 항진균 활성이 우수한 5균주를 2차로 선별하였다. 2차 분리균주 5종의 발효액 50 µl를 *C. albicans* IFO 0583이 도말된 평판배지 위의 paper disc (직경 7 mm, 두께 2 mm)에 주입하고 5일간 배양한 결과 생육저지대 크기가 크고 clear zone의 크기가 변화하지 않는 균주 LAM 97-44를 항진균성 항생물질 생산균으로 최종 선별하였다(Fig. 1).

선발 균주의 형태 및 배양학적 특성

항진균성 항생물질 생산균으로 선별된 LAM 97-44의 형태적 특성을 조사하기 위하여 glucose-nutrient agar 배지, potato dextrose agar배지, oat meal agar 배지, skim milk배지에서 배양한 결과 생육상태가 좋았으며, 이 균의 집락은 원형의 pale yellow color을 보였다. Nutrient agar에서는 생육상태가 좋지않았다. 형태학적 특징은 Fig. 2과 같이 전자현미경으로 관찰한 결과 길이가 2~3 µm이며, 폭은 1~1.5 µm인 간균으로 판명되었다.

생리학적 특성

생리학적 특성을 조사한 결과 LAM 97-44 균주는 포자를

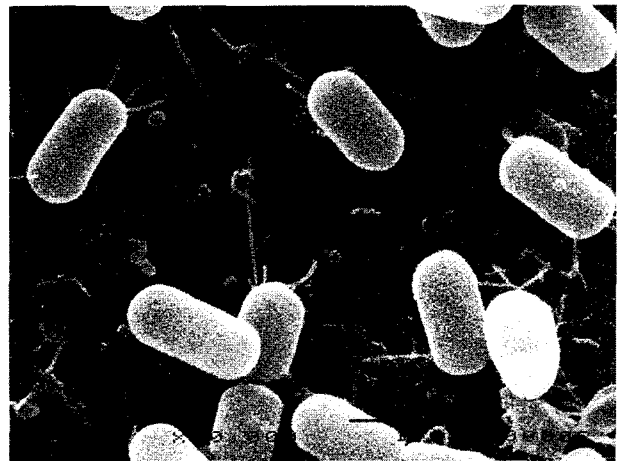


Fig. 2. Scanning electron microscopic photograph of the strain LAM 97-44.

The strain was cultivated with the isolation medium for 3 days.

형성하며 운동성이 있는 간균으로서, gelatin, starch를 가수분해하고 catalase 활성이 있는 균으로 판단된다. Voges-Proskauer test에서는 양성반응을 보였으며, 균의 성장은 30°C에서 매우 양호하였으나, 50°C이상에서는 거의 성장되지 않았다(Table 1). 탄소원 이용성을 조사한 결과 Table 2에서와 같이 fructose, glucose, glycerol, inulin등을 이용하

Table 1. Taxonomical properties of strain LAM 97-44

Characteristics	Strain LAM 97-44
Gram stain	+
Shape of a cell	Rod
Cell size	2~3×1~1.5 µm
Spore shape	Ellipsoidal
Spore position	Central
Anaerobic growth	-
Motility	+
Voges-Proskauer test	+
Hydrolysis of	
Gelatin	+
Starch	+
Production of catalase	+
oxidase	-
Nitrate reduction	+
Indole test	-
NaCl and KCl requirement	-
Acid from	
D-Glucose	+
L-Arabinose	+
D-Xylose	-
D-Mannitol	+
Growth in NaCl	
2%	+
5%	+
7%	-
Growth at	
10°C	+
30°C	+
40°C	+
50°C	+

+: positive, -: negative

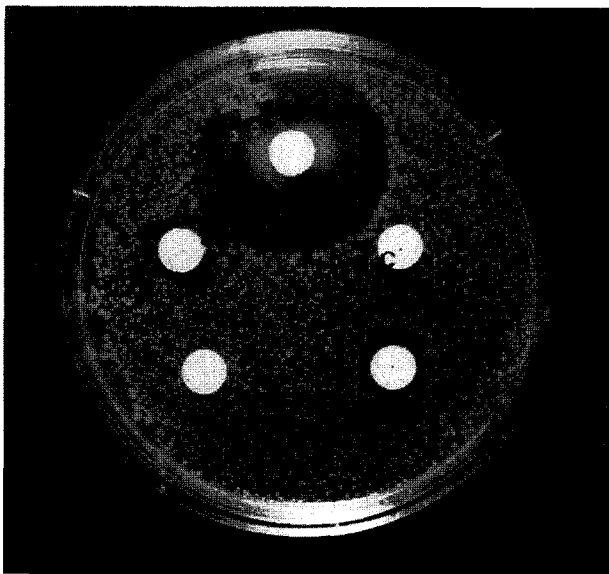


Fig. 1. Fungicidal activity of the culture filtrates of isolated microorganisms against *Candida albicans* IFO 0583.

A-E were each other antifungal antibiotics

Table 2. Utilization of various carbon sources of LAM 97-44

Carbon sources	Utilization
Arabinose	-
Cellulose	-
Dextrin	-
Fructose	+
Glucose	+
Glycerol	+
Inulin	+
Lactose	+
Maltose	+
Mannitol	+
Raffinose	+
Sucrose	+
Sorbose	-
Soluble starch	+
Sorbitol	+
Xylose	-

+: utilized, -: not utilized

Cells were cultivated in carbon utilization basal salt agar medium supplemented with 1.0% of each carbon source.

The growth was checked after cultivation at 30°C for 10 days.

였으나 arabinose, cellulose, dextrin 등은 이용하지 않는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 LAM 97-44 균주는 *Bacillus subtilis*와 유사한 것으로 판명되었다.^{23,24)}

세포내 지방산 분석

LAM 97-44의 세포내 지방산 조성을 분석하기 위해 균체를 전처리한 뒤 gas chromatography를 이용하여 분석한 결과 iso-와 anteiso-인 가지달린 fatty acid인 성분으로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다(Table 3). 따라서 *Bacillus*속 세균의 지방산 주성분인 13-methyltetradecanoic acid (iso-), 12-methyltetradecanoic acid(anteiso-)인 가지달린 fatty acid type과 유사하였다.²⁵⁾

Quinone 분석

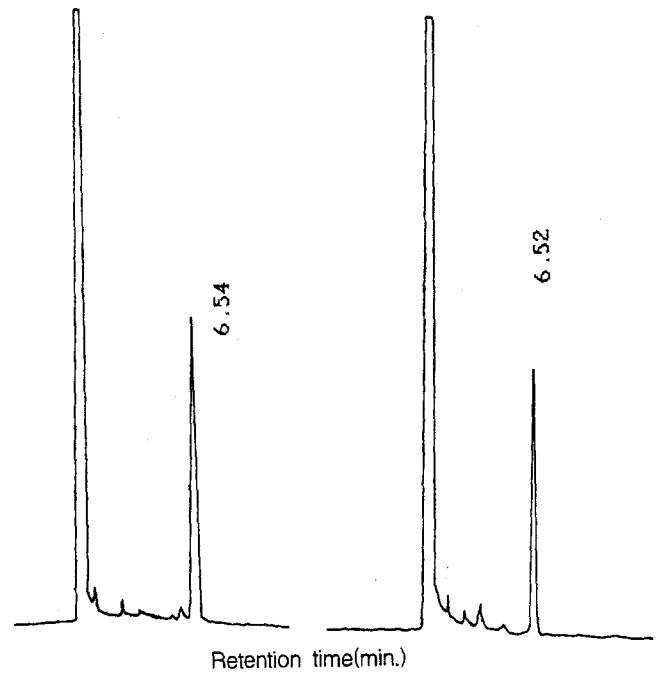
항진균성 항생물질 생산균으로 선별된 LAM 97-44균주의 세포내 quinone 종류를 조사하기 위하여 동결건조 균체

Table 3. Compositional analysis of intracellular fatty acids of the strain LAM 97-44

Fatty acid type	Ratio of fatty acid* (%)
14 : 0 Iso	1.76
15 : 0 Iso	12.25
15 : 0 Anteiso	42.68
16 : 0 Iso	5.73
16 : 1 w11c	0.99
16 : 0	4.55
16 : 4 w11c	1.06
16 : 5	0.90
16 : 6 Iso	10.37
16 : 7 Anteiso	19.10
18 : 0	0.63

Iso: iso branched fatty acid, Anteiso : anteiso branched fatty acid.

*: Ratio of fatty acid calculated from gas chromatogram



LAM-44 Standard (menaquinone)

Fig. 3. High-performance liquid chromatogram of menaquinones of strain LAM 97-44.

200 mg을 30 ml의 chloroform : methanol(2 : 1) 혼합액에 현탁시켜 차광한 다음 냉장 정치시키면서 quinone을 추출하였다. 이 추출액을 HPLC로 분석한 결과(Fig. 3), *Bacillus*속 세균의 전형적인 isoprenoid 쇠가 7개인 menaquinone(MK-7)을 가지고 있었다.²⁴⁾

지금까지 항진균성 항생물질 생산균인 LAM 97-44의 동정을 위하여 형태학적, 생리학적, 화학적 특성을 분석한 결과를 종합하면 LAM 97-44의 균주는 *Bacillus subtilis*와 같은 특징을 보였다.^{23,24)}

참고문헌

1. Davise, H. L (1995) Medically important fungi(3rd ed.). Washington D.C., ASM Press, 11-17.
2. Motchi, M (1980) Present state of fungal infections in autopsy cases in Japan, A, Statistical survey of all autopsy cases during the ten-year period from 1966-1975, *Am. J. Clinical Pathol.*, 74940, 410-416.
3. Brajtburg, L., W. G. Powderly and G. S. Kobayashi (1990) Amphotericin B. current understanding of the mechanism of action. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34, 183-188.
4. Gallis, H. A. and R. H. Drew (1990) Amphotericin B. 30 years of clinical experience. *Rev. Infect. Dis.*, 12, 308-329.
5. Lampen, J. O. (1966) Interference by polyenic antifungal antibodies (especially nystatin and filipin) with specific membrane functions. Biochemical studies of antimicrobial drugs. In Sixteenth Symposium of the Society for General Microbiology, London, University Press, Cambridge, England, 111-130.

6. Hazn, E. L. and R. Brown (1950) Two antifungal agents produced by a soil actinomycete. *Science*, **112**, 423.
7. Gold, W. and H. A. Stout (1956) Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete I. *In vitro* studies. In H. Welch and F. Marti-Ibanez[ed.]. *Antibiotics Annual, 1955-1956*. Medical Encyclopedia, New York, 579-586.
8. Lechevalier, H. and R. F. Acker (1953) A new antifungal antibiotic. *Mycologia*, **45**, 155-171.
9. Struyck, A. P. and I. Hoette (1958) A new antifungal antibiotic. In H. Welch and F. Marti-Ibanez[ed.]. *Antibiotics Annual, 1957-1958*. Medical Encyclopedia, New York, 875-885.
10. Hosoya, S. and N. Komatsu (1952) A new antibiotic with trichomonadicidal and antifungal activities. *J. Antibiot.*, **5**, 564-566.
11. Thirumalachar, M. J. and S. K. Menon (1961) A new antifungal antibiotic. Discovery and biological studies. *Hindustan Antibiot. Bull.* **3**, 136-138.
12. Noguchi, T. (1962) Antitrichophyton activity of naphthiomates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **259-267**.
13. Weinstein, M. H. (1964) Antifungal properties of tolnaftate *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **595-601**.
14. Robinson, H. M., Jr. Raskin and J. Rolnaftate (1965) A Potent topical antifungal agent. *Arch. Dermatol.*, **91**, 372-376
15. Walsh, T. J., G. Melcher, M. Rinaldi, J. Lecciones, D. McGough, J. Lee, D. Callender, M. Rubin and P. A. Pizzo (1990) Trichosporon beigeli, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1616-1622.
16. Shadomy, S (1969) *In vitro* studies with 5-fluorocytosine. *Appl. Microbiol.* **17**, 871-877.
17. Waldorf, A. R. and A. Polack (1983) Mechanisms of 5-fluorocytosine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **23**, 79-90.
18. Berdy, J. (1989) The discovery of new bioactive microbial metabolites: Screening and identification, In Bushell M. E. and U. Grafe(ed.), *Bioactive metabolites from microorganisms*, Elsevier, Amsterdam. 3-25.
19. Victor Lorian, M. and D. Editor(1991) *Antibiotics in laboratory medicine (3nd)*, Williams & Wilkins, 17-52.
20. John H. Hash (1975) *Antibiotics*. Academic Press. vol. 43, 60-61.
21. Gerhart, P., R. C. G. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester and G. B. phillips (1994) *Manual of methods for general bacteriology*. ASM. Washington, 5-10.
22. Williams, S. T., M. E. Sharpe and J. G. Holt (1992) *Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 1, 2nd ed.* Springer. Verlag, 46-50.
23. Holt, J. G. S. T. Williams, N. R. Krieg and P. H. A. Sneath (1994) *Bergey,s manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins, Ninth, ed. 559-562.
24. Ballows, A., H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K-H Schlerifer (1992) *The prokaryotes*. Springer-Verlag, Vol. 1. 2nd ed. 79-87.
25. Kroppenstedt, R. M. and H. J. kutzner (1978) Biochemical taxonomy of some problem actinomycetes. *Zentralbl. Bakteriologie, parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1. Suppl.*, **6**, 125-133

Isolation and Identification of *Bacillus* sp. LAM 97-44 Producing Antifungal Antibiotics

No-Woon Lee, Cheon-Suk Kim, Jae-Ho Do, In-Chan Jung¹, Hyeon-Woo Lee² and Dong-Heui Yi^{3*}(*Department of Product Development, Korea Ginseng and Tobacco Reseach Institute, Taejon 305-345, Korea; ¹Department of Chemistry Hanseo University 360, Daegok-ri, Haemi, Seosan, Chung-Nam, 356-820, Korea; ²Department of Biochemistry, Wonju College of Medicine, Yonsei University, Wonju 220-701, Korea; ³Department of Microbiological Engineering, Kon-Kuk University, Seoul, 133-701, Korea*)

Abstract : In order to develop an effective antifungal antibiotics, over 700 isolates of bacteria, mold and actinomycetes were screened from soil, and LAM 97-44 were selected as a strain producing the strong antifungal antibiotics against *Candida albicans*. Morphological, cultural and physiological characteristics fo LAM 97-44 were investigated for the indentification. The cell size of LAM 97-44 was 2~3×1~1.5 μm, and the shape of spore was of ellipsoidal. As a carbon source, LAM 97-44 utilized fructose, glucose, glycerol, maltose and raffinose but did not utilize arabinose, cellulose and xylose. The fatty acids of the cells included various iso-type and anteiso-type. Conclusively, the strain LAM 97-44 was proved to be *Bacillus subtilis*.

Key words : antifungal antibiotics, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*

*Corresponding author