

내열성 항곰팡이 항생물질의 생산 최적화

신 영 준 · 정 명 주 · †정 영 기
동의대학교 미생물학과

(접수 : 2000. 9. 6., 게재승인 : 2000. 10. 29.)

Optimization of the Production of a Thermostable Antifungal Antibiotic

Young-Joon Shin, Myung-Ju Jung, and Yong-Kee Jeong†
Dept. of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea
(Received : 2000. 9. 6., Accepted : 2000. 10. 29.)

The optimum conditions for the production of an antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63 were investigated. The optimized medium consisted of 1.5% soluble starch, 1% tryptone and 0.5% yeast extract, and temperature and initial medium pH for production were optimal at 35°C and pH 6.0, respectively. Production yield was significantly improved by shaking culture using 50 ml medium in 500 ml flasks. Under these conditions, the production of the antifungal antibiotic was growth-dependent, from 35 hrs into cultivation to the stationary phase and endospore formation

Key Words : antifungal agent, antibiotic, thermostable antibiotic

서 론

항진균성 항생물질은 병원성 진균의 생육을 저지하여 진균성 질병을 치료하기 위한 의약품으로 개발되기도 하고, 식물 병원균을 방제하기 위한 농약용 항생물질로도 많이 개발되고 있다. 또한 최근에는 식품의 곰팡이에 의한 부패를 막기 위하여 무독 내열성 항곰팡이 항생물질의 개발에도 주목하고 있다. 실제 항곰팡이성 항생물질의 개발은 심각한 환경오염을 막기 위한 대체농약 개발의 필요성 때문에 농업에 응용하기 위한 목적으로 가장 먼저 연구가 행해졌다(1-5). 1958년 Watanabe 등이 *Streptomyces*의 대사산물에서 벼도열병에 선택적 효과가 있는 blasticidin을 분리하였으며(6,7), 1964년 Umezawa 등은 *Streptomyces kasugaensis*의 대사산물 중 항진균성 항생물질인 kasugamycin을 분리하여 실용화하였다(8). 그 외 polyoxin, validamycin, leptomycin, phosmidosine 등의 항진균성 항생물질이 있으나(9-14), 완전히 실용화되기까지는 독성 등 여러 문제점을 가지고 있으며, 이들 대부분이 방선균 및 곰팡이를 생산균주로 하는 대사산물이다. 세균에 의해 분비되는 항진균성 항생물질로는 *Bacillus subtilis*가 생산하는 iturin(15,16), bacillomycin(17,18), mycosubtilin(19,20) 등이 있으며, *Pseudomonas*가 생산하는 pyrrolinitrin(21,22)과 pyoluteorin(23) 등이 있을 뿐이며 그 실용화의 노력도 아주 미약하다. 본 연

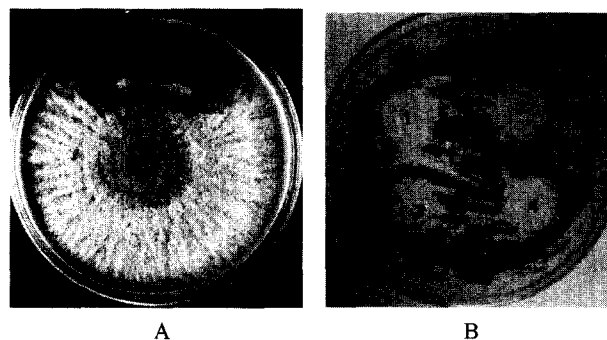


Figure 1. Antifungal activity (A) and Temperature stability of the antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63 (B). 1, no heat; 2, 100°C (30 min); 3, 100°C (60 min); 4, 121°C (15 min)

구에서는 토양으로부터 분리한 *Bacillus* sp. YJ-63으로부터 여러 가지 피해의 원인이 되는 곰팡이의 제거나 곰팡이 감염질환의 치료제로 사용할 수 있는 항진균성 항생물질을 대량으로 생산하기 위한 배지의 최적조건을 검토하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

생산균주의 배양

벼도열병균인 *Botrytis cineria* KT 433에 대해서 강한 생육 억제 활성을 가지며 100°C와 121°C에서 열처리한 후에도 열처리하지 않은 시료와 동일한 활성을 보여 높은 온도에서도 안정성을 나타내는 분리균주 *Bacillus* sp. YJ-63 (Figure 1)의 항곰팡이성 항생물질 생산을 위한 초기 배양은 LB배지 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.0)를 사용하였

†Corresponding Author : Department of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea
Tel : +82-51-890-1534, Fax : +82-51-894-0840
E-mail : ykjeong@hyomin.dongeu.ac.kr

고, 35°C에서 170 rpm으로 18시간 전배양한 후 본배양액에 2%(v/v)되게 접종하여 30시간배양 후 원심분리하여 그 상등액을 이용하였다.

검정균의 배양과 포자 현탁액의 조제

검정균 *B. cineria* KT 433을 2.4% potato dextrose agar(PDA) 배지를 이용해서 25°C에서 3일간 배양하여 항곰팡이성 항생물질을 검정하였다. 검정균의 포자현탁액 제조를 위하여 *B. cineria* KT 433을 PDA 고체배지에서 20°C에서 10일간 배양하여 포자가 흑색으로 착색되면 10 ml/plate씩 멸균 생리식염수로 현탁하여, 이 현탁액 100 µl를 PDA 고체배지 평판에 도말 한 후 활성측정에 이용하였다.

항진균 활성의 측정

항진균 활성을 측정하기 위해 Agar hole법을 사용하였다(24). *B. cineria* KT433 포자현탁액을 도말한 PDA 평판배지상에 멸균된 cork bore (Ø 3 mm)를 이용하여 원형의 hole을 만든 후 활성물질을 일정량 투여하였다. 그런 다음 *B. cineria* KT433의 최적 온도인 20°C에서 3~4일간 배양하면 hole 속의 활성물질이 확산되어 *B. cineria* KT433의 생육을 억제하게 되는데 이때 생육 억제환의 지름(mm)을 비교하였다.

항곰팡이성 항생물질 생산을 위한 최적 배양 조건 검토

Bacillus sp. YJ-63의 항곰팡이성 항생물질생산을 위한 최적배양조건은 배지 조성, 초기 pH, 온도, 통기량 순으로 행하였다. 배지 조성은 LB배지에 탄소원, 질소원, 인산염 및 금속염의 순서로 검토하였으며, 배양 후 항곰팡이 활성과 생육도 및 pH를 검토하였다. 항곰팡이 활성은 agar hole법을 이용하여 저해환의 지름을 mm단위로 나타내었고, 생육도는 UV spectrophotometer를 이용하여 660 nm에서 optical density를 측정하였다. 탄소원은 LB배지에 각종 탄소원을 1% 첨가하여 배양한 후 항곰팡이 활성이 가장 높은 탄소원을 선택하였으며 결정된 탄소원은 농도별로 첨가하여 항곰팡이 활성을 검토하였다. 질소원은 결정된 탄소원을 넣은 다음 LB배지에서 tryptone, yeast extract를 제거하고 각종 유기 및 무기질소원을 1%씩 첨가해서 배양하여 탄소원과 같이 항곰팡이 활성을 검토하였다. 정해진 탄소원과 질소원을 넣은 후 각각의 인산염과 금속염을 0.02%씩 첨가하여 위와 동일한 방법으로 검토하였다. 초기 pH는 결정된 배지에 1N-HCl과 1N-NaOH로 pH 4.0~10.0까지 조절하여 초기 pH가 항곰팡이성 항생물질생산에 미치는 영향을 검토하여 최적 pH를 정하였다. 온도는 앞서 정해진 배지조건에 따라 20~45°C까지 배양하여 항생물질 생산을 위한 최적온도를 설정하였다. 통기량의 영향은 500 ml 진탕 플라스크에 배지를 50~300 ml씩 넣어 170 rpm으로 진탕배양 후 항곰팡이 활성을 측정하여 결정하였다. 그리고 항곰팡이성 항생물질의 최대생산시기는 정해진 최적배양조건으로 배양하여 시간별로 활성 측정을 함으로써 배양최적시간을 결정하였다.

결과 및 고찰

탄소원의 영향

Bacillus sp. YJ-63의 기본 배지인 LB배지에 Figure 2에서

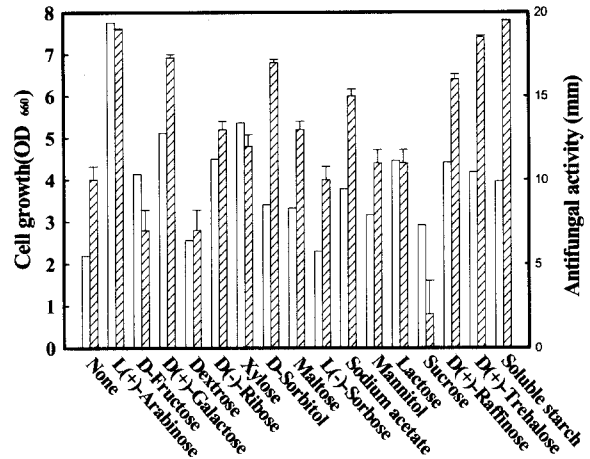


Figure 2. Effect of carbon source on the production of antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63. □ cell growth; ▨ antifungal activity.

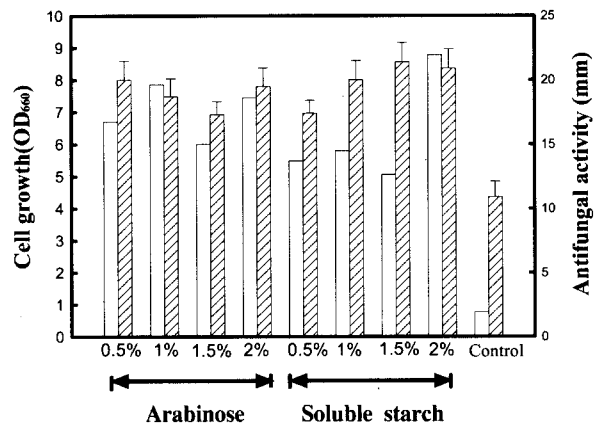


Figure 3. Effect of arabinose and soluble starch concentration on the production of antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63. □ cell growth; ▨ antifungal activity.

와 같이 각종 탄소원을 1%(w/v)씩 첨가하여 30시간 배양 후 항곰팡이 활성과 생육정도를 검토한 결과 D-fructose, dextrose 및 sucrose를 제외한 대부분의 탄소원에서 생육의 증가와 함께 항곰팡이 활성의 증가도 보였다. 특히, L-arabinose와 soluble starch를 첨가한 경우는 탄소원을 첨가하지 않은 control과 비교할 때 활성이 약 2배정도 증가함을 보였다. 따라서 Figure 3와 같이 L-arabinose와 soluble starch를 0.5~2%까지 농도별로 첨가하여 배양한 결과 1.5% soluble starch를 첨가한 경우 가장 높은 항곰팡이 활성을 나타냄으로써 탄소원은 soluble starch로 결정하고 농도는 1.5%로 하였다.

질소원의 영향

탄소원으로 1.5% soluble starch가 첨가된 LB배지에서 질소원인 tryptone과 yeast extract를 제거한 다음 각종 질소원을 첨가하여 최적질소원을 검토하였다. 그 결과 Figure 4에서와 같이 무기질소원과 아미노산을 첨가할 경우 균의 생육 및 활성이 매우 저조하였으며, 유기질소원 중 soytone, yeast extract, beef extract, malt extract 첨가는 yeast extract와 tryptone이 혼합된 control과 비교할 때 생육의 증가는 보였으나 활성은 낮

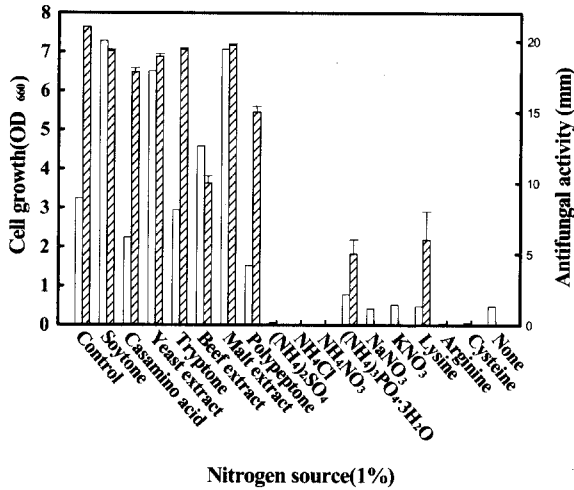


Figure 4. Effect of nitrogen source on the production of antifungal antibiotic from *Bacillus* sp YJ-63. Control was consisted of 1.5% soluble starch, 1% tryptone and 0.5% yeast extract. □ cell growth; ▨ antifungal activity.

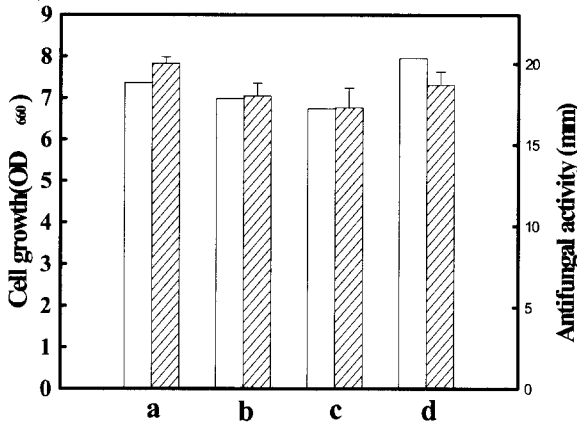


Figure 5. Effect of tryptone and yeast extract concentration on the production of antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63. (a) tryptone 1.0% + yeast extract 0.5% (b) tryptone 1.0% + yeast extract 1.0% (c) tryptone 0.5% + yeast extract 0.5% (d) tryptone 0.5% + yeast extract 1.0%. □ cell growth; ▨ antifungal activity.

게 나타났으므로 yeast extract와 tryptone을 여러 농도로 혼합하여 배양한 결과 1% tryptone과 0.5% yeast extract를 혼합한 경우 최고의 활성을 나타내어 최적 질소원으로 결정하였다(Figure 5).

인산염의 영향

탄소원인 soluble starch 1.5%, 질소원인 yeast extract 0.5%와 tryptone 1%를 첨가한 배지에 각종 인산염을 0.02%씩 첨가하여 항곰팡이성 항생물질의 생산성을 검토한 결과 Figure 6에서와 같이 대부분의 인산염은 균의 생육과 항생물질 생산성을 증가시키지 않아 인산염은 항곰팡이성 항생물질 생산에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

금속염의 영향

앞서 결정된 1.5% soluble starch, 1% tryptone, 0.5% yeast extract를 구성성분으로 하는 배지에 항곰팡이성 항생물질 생

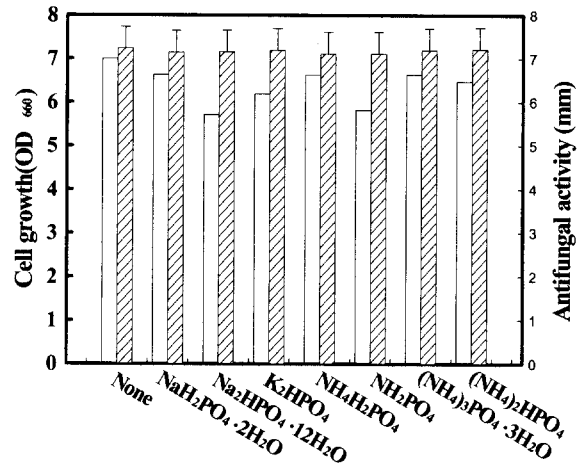


Figure 6. Effect of phosphorous source on the production of antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63. □ cell growth; ▨ antifungal activity.

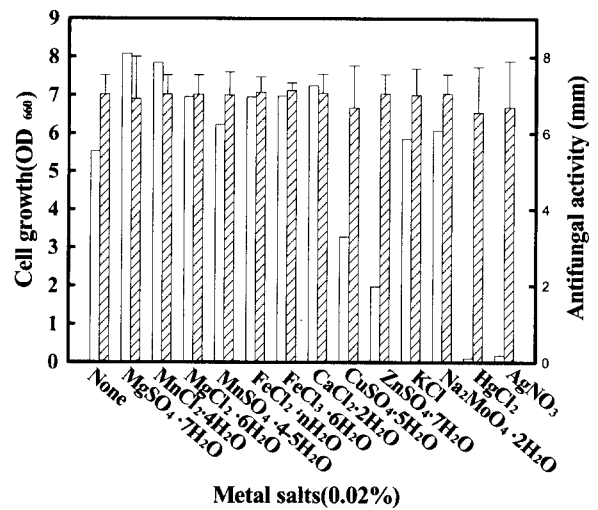


Figure 7. Effect of metal ions on the production of antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63. □ cell growth; ▨ antifungal activity.

산을 위한 금속염의 영향을 검토하기 위해 각각 0.02%씩 첨가하여 검토한 결과 Figure 7과 같이 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4 \cdot 5H_2O$ 및 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 의 경우 대조군과 비슷한 효과를 나타내었으나 대부분의 경우 균의 생육 및 항생물질 생산에는 영향을 나타내지 않는 것으로 나타났다.

이상과 같은 결과로 항곰팡이성 항생물질 생산을 위한 배지 조성은 탄소원으로 soluble starch 1.5%, 질소원으로 tryptone 1%와 yeast extract 0.5%로 결정되었으며 인산염이나 금속염은 항곰팡이성 항생물질 생산에 영향을 주지 못하거나 저해하는 결과를 보였다.

초기 pH의 영향

항생물질 생산을 위한 최적 배지의 초기 pH를 pH 4.0~10.0까지 조절하여 초기 pH가 항곰팡이성 항생물질 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Figure 8과 같다. *Bacillus* sp. YJ-63은 pH 5.0~8.0 범위에서 높은 생육도를 나타냈으며 최적 pH는 pH 6.0으로 생육도와 항곰팡이성 항생물질의 생산

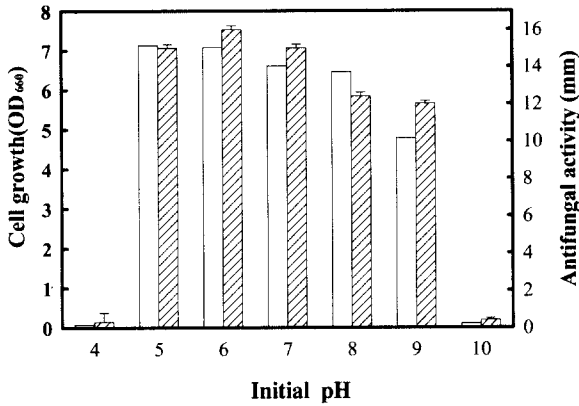


Figure 8. Effect of initial pH on the production of antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63. □ cell growth; ▨ antifungal activity.

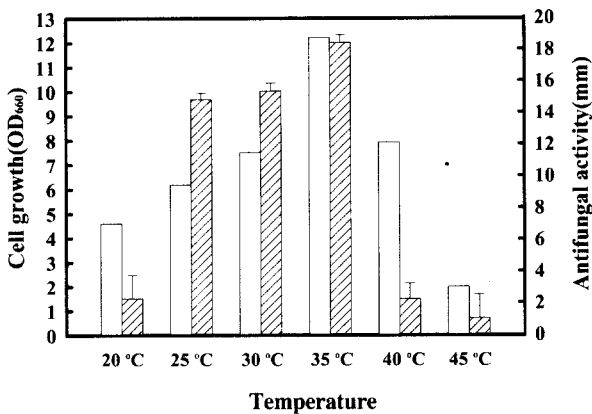


Figure 9. Effect of temperature on the production of antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63. □ cell growth; ▨ antifungal activity.

성이 가장 높았다.

배양 온도의 영향

앞서 결정된 배지조성의 pH를 pH 6.0으로 하여 배양 온도를 20~45°C까지 범위에서 배양하여 항생물질 생산성을 조사한 결과는 Figure 9에서와 같이 35°C에서 가장 높은 생육과 항곰팡이 활성을 보였다.

통기량의 영향

통기량에 따른 균의 생육과 항곰팡이성 항생물질의 생산성을 검토하기 위해 앞서 결정된 최적배양배지를 pH 6.0으로 조정 후 500 ml 진탕 플라스크에 50~300 ml씩 넣어 35°C에서 170 rpm으로 24시간 진탕배양한 후 균의 생육 및 항곰팡이 활성을 검토한 결과는 Figure 10과 같이 50 ml의 배지를 넣은 플라스크에서 가장 높은 생육과 활성을 나타내어 균의 생육 및 항곰팡이성 항생물질 생산에 산소의 필요성을 시사하였다.

항곰팡이성 항생물질 생산을 위한 배양의 경시 효과

항곰팡이성 항생물질 생산을 위한 최적배양조건으로 *Bacillus* sp. YJ-63을 배양하여 시간에 따른 항곰팡이 활성 정도와 생육 및 배양여액의 pH 변화를 조사하였다. Figure 11에서와 같이 항생물질은 정지기부터 생산되었으며, 최고 생산량은 사멸기인 73시간째로 나타나 전형적인 2차 대사산물의 형태

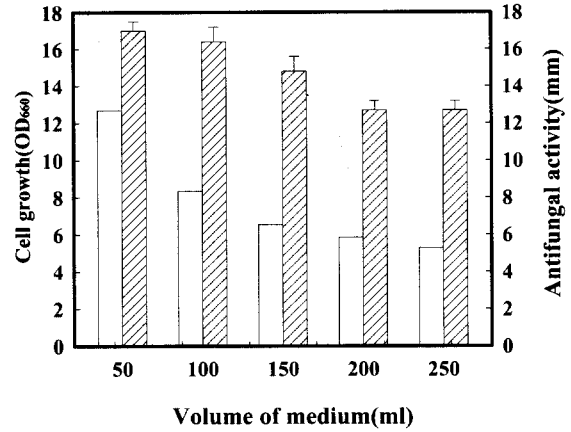


Figure 10. Effect of aeration on the production of antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63. □ cell growth; ▨ antifungal activity.

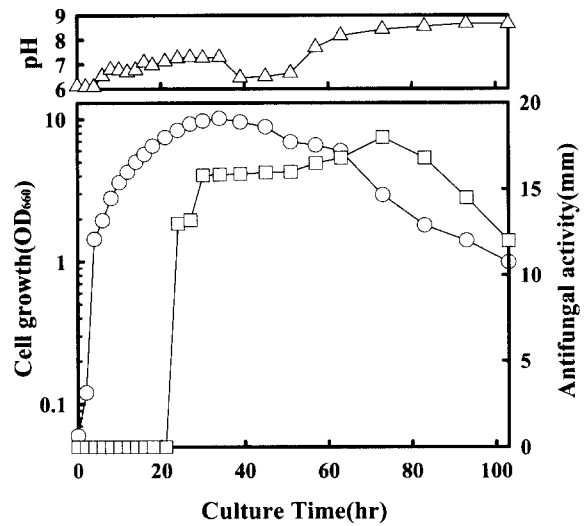


Figure 11. Time profiles of cell growth and production of antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63 under optimal conditions. -△-, final pH; -○-, cell growth; -□-, antifungal activity.

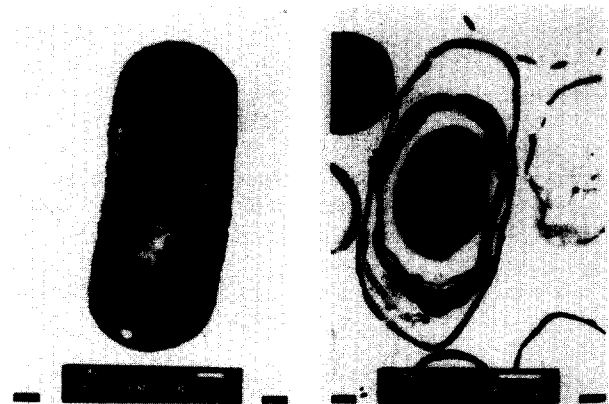


Figure 12. Transmission electron micrograph of antifungal antibiotic producing bacteria cultured 24 hrs (A) and 72 hrs (B).

인 비증식연관형 (non growth-associated)으로 나타났으며, 72시간 배양 후 전자현미경으로 관찰한 결과 포자를 형성하였다 (Figure 12). 이상과 같이 *Bacillus* sp. YJ-63에 의한 항곰

Table 1. The optimal culture conditions for the production of antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63

| | | |
|---------------------|----------------|---------------------------------------|
| Medium conditions | Soluble starch | 1.5 % |
| | Yeast extract | 0.5 % |
| | Tryptone | 1.0 % |
| | Initial pH | pH6.0 |
| Physical conditions | Temperature | 35 |
| | Aeration | 50 ml medium /500 ml shaking flask |
| | Culture time | 73 hrs |
| | | |

팡이성 항생물질 생산을 위한 최적 조건은 Table 1과 같으며, 포자형성이후에 항생물질이 생성되는 것으로 나타났으므로 (24), 이후에는 dipicolinic acid 등을 첨가하여 포자생성을 촉진시키는 포자형성용 배지의 개발과 방제군의 건조포자체 제조방법이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

내열성의 항공팡이성 항생물질을 생산하는 *Bacillus* sp. YJ-63 으로부터 항생물질을 대량으로 생산하기 위한 최적조건을 검토한 결과는 다음과 같다.

항생물질을 생산하기 위한 배양조건은 35℃, pH 6.0이었으며, 최적생육 배지는 1.5% soluble starch, 1% tryptone, 0.5% yeast extract로 조성하여 500 ml의 삼각플라스크에 50 ml씩 분주하여 진탕배양하였다. 이와 같은 최적조건에서 항생물질은 정지기부터 생산되는 비증식연관형으로서 포자형성 이후부터 생산되었다.

REFERENCES

- Suzui, T. (1992), Biological control of soilborne diseases with antagonistic microbe. Pro. 92 Agric. Biotech. Symp. In *New Biopesticides*, Pp. 55-76.
- Davison, J. (1988), Plant beneficial bacteria, *Biotechnol.* **6**, 282-286.
- Cook, R. J. (1985), Biological control of plant pathogens : Theory to application. *Phytopathol.* **75**, 25.
- Leong, J. (1986), Siderophores : Their biochemistry and possible role in biocontrol of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**, 187-209.
- Cook, R. J. and K. F. Baker, (1983), The nature and practice of biological control of plant pathogens. Ann. Phytopath. Soc., St. Paul., Pp. 539.
- Larsen S. H., D. M. Berry, J. W. Paschal, and J. M. Gilliam, (1989), 5-Hydroxymethyl blasticidin S and blasticidin S from *Streptomyces setonii* culture A 83094. *J. Antibiot.* (Tokyo), **42**, 470-471.
- Yonehara H, H. Seto, S. Aizawa, T. Hidaka, and A. Shimazu, (1968), The detoxin complex, selective antagonists of blasticidin S. *J. Antibiot.* (Tokyo), **21**, 369-370.
- Hotta K. (1996), Mechanism of multiple aminoglycoside resistance of kasugamycin-producing *Streptomyces kasugaensis* MB273 : involvement of two types of acetyltransferases in resistance to astromycin group antibiotics. *J. Antibiot.* (Tokyo), **49**, 682-688.
- Zhang D., M. J. Miller, (1999), Polyoxins and nikkomycins: progress in synthetic and biological studies. *Curr. Pharm. Des.* **5**, 73-99.
- Emmer G., N. S. Ryder, and M. A. Grassberger, (1985), Synthesis of new polyoxin derivatives and their activity against chitin synthase from *Candida albicans*. *J. Med. Chem.* **28**, 278-281.
- Miyamoto Y., S. Ogawa, (1992), Total synthesis of (+)-validamycin H. *Carbohydr. Res.* **223**, 299-301.
- Asano N., Y. Kameda, K. Matsui, S. Horii, H. Fukase, and H. Validamycin, (1990), a new pseudo-tetrasaccharide antibiotic. *J. Antibiot.* (Tokyo), **43**, 1039-1041.
- Kuhnt M, F. Bitsch, M. Ponelle, J. J. Sanglier, Y. Wang, and B. Wolff, (1998), Microbial conversion products of leptomycin B. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 714-720.
- Uramoto M, C. J. Kim, K. Shin-Ya, H. Kusakabe, K. Isono, D. R. Phillips, and J. A. McCloskey, (1991), Isolation and characterization of phosmidosine. A new antifungal nucleotide antibiotic. *J. Antibiot.* (Tokyo), **44**, 375-381.
- Maget-Dana R., F. Peypoux, (1994), Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology*, **87**, 151-174.
- Besson F., M. L. Hourdou, and G. Michel, (1990), Studies on the biosynthesis of iturin, an antibiotic of *Bacillus subtilis*, and a lipopeptide containing beta-hydroxy fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta.* **1032**, 101-106.
- Eshita S. M., N. H. Roberto, J. M. Beale, B. M. Mamiya, and R. F. Workman, (1995), Bacillomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group: isolations, structures, and antifungal activities of the congeners. *J. Antibiot.* (Tokyo), **48**, 1240-1247.
- Tenoux I., F. Besson, and G. Michel, (1991), Studies on the antifungal antibiotics: bacillomycin D and bacillomycin D methylester. *Microbios.* **67**, 187-193.
- Besson F., G. Michel, (1990), Mycosubtilins B and C: minor antibiotics from mycosubtilin-producer *Bacillus subtilis*. *Microbios.* **62**, 93-99.
- Peypoux F., M. T. Pommier, D. Marion, M. Ptak, B. C. Das, and G. Michel, (1986), Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *J. Antibiot.* (Tokyo), **39**, 636-641.
- Kirner S., P. E. Hammer, D. S. Hill, A. Altmann, I. Fischer, L. J. Weislo, M. Lanahan, K. H. van Pee, and J. M. Ligon, (1998), Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* **180**, 1939-1943.
- Corbell N. and J. E. Loper, (1995), A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* **177**, 6230-6236.
- Duffy B. K. and G. Defago, (1999), Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2429-2438.
- Yousten, A. A. and E. W. Davidson, (1982), Ultrastructural analysis of spores and parasporal crystals formed by *Bacillus sphaericus* 2297, *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 1449-1455.