

Bacillus sp. YJ-63이 생산하는 항곰팡이 항생물질의 구조분석

정영기* · 신영준 · 정명주¹ · 주우홍² · 최재수³
동의대학교 미생물학과, ¹경성대학교 생물학과, ²창원대학교 생물학과
³부경대학교 식품생명공학부

Structural Analysis of the Antifungal Antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63. Jeong, Yong-Kee, Young-Joon Shin, Myung-Ju Jung¹, Woo-Hong Joo², and Jae Sue-Choi³. Department of Microbiology, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea, ¹Department of Biology, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea, ²Department of Biology, Changwon National University, Changwon, Korea, and ³Faculty of Food Sciences and Biotechnology, Pukyong National University, Pusan, Korea – Structural analysis was performed by the ¹H-NMR, ¹³C-NMR, amino acid composition analysis and FAB-mass. The instrumental analysis represented that the potential antifungal antibiotic belonged to the iturin E group antibiotic, consisting of 7 α -amino acid residues and a collection of β -amino acid with aliphatic side chain. Compared to the Iturin E group, notably, the potent antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63 carried longer β -amino acid side chain. In conclusion, these findings identified a potential antibiotic, which contained a stable cyclopeptide structure with long β -amino acid side chain.

Key words: Antifungal agent, Antibiotic, Thermostable antibiotic

항진균성 항생물질은 병원성 진균의 생육을 저지하여 진균성 질병을 치료하기 위한 의약품으로 개발되기도 하고, 식물병원균을 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 [5,7,14]. 1958년 Watanabe 등이 *Streptomyces*의 대사산물에서 베타도열병에 선택적 효과가 있는 blasticidin을 분리하였으며 [13,22], 1964년 Umezawa 등은 *Streptomyces kasugaensis*의 대사산물 중 항진균성 항생물질인 kasugamycin을 분리하여 실용화하였다 [11]. 그 외 polyoxin, validamycin, leptomycin, phosmidosine 등의 항진균성 항생물질이 있으나 [1,9,13,17,22,24], 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 [3,16], bacillomycin [10,21], mycosubtilin [2,18] 등이 있으며, *Pseudomonas*가 생산하는 pyroliniturin [6,12]과 pyoluteorin [8] 등이 있을 뿐이며 그 실용화의 노력도 아주 미약하다. 따라서 본 연구에서는 토양으로부터 분리한 *Bacillus*

sp. YJ-63으로부터 여러 가지 피해의 원인이 되는 곰팡이의 제거나 곰팡이 감염질환의 치료제로 사용하기 위한 항진균성 항생물질의 구조를 분석·동정하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

토양으로부터 분리한 *Bacillus* sp. YJ-63 [19]의 항곰팡이성 항생물질 생산을 위한 초기 배양은 LB배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.0)를 사용하였고, 35°C에서 170 rpm으로 18시간 전배양한 후 본 배양액(1.5% soluble starch, 1% tryptone, 0.5% yeast extract, pH 6.0) [20]에 2%(v/v)되게 접종하여 30시간 배양 후 원심 분리하여 그 상등액을 이용하였다.

항곰팡이성 항생물질의 분리 및 정제

배양 상등액을 Fig. 1과 같이 분리, 정제하였으며 순도를 확인하기 위하여 thin layer chromatography(TLC)를 행하였다. 즉, 배양 상등액을 butanol을 이용하여 추출한 후 rotary vacuum evaporator(Buch:REIII, Switzerland)에서 농축한 다음, 이 시료를 methanol에 녹여서 silica gel에 흡착시켜 ethyl acetate-methanol-water(60:8:5)를 이용하여 silica gel column(silica gel column 60, Merck Co., 70~30 ml), Sephadex LH-20(25~100 μ , sigma) column(\emptyset 1 \times 50 cm, bed volume 35 ml) chromatography를 행하였다. 그 다음 Bondapak C₁₈ column(3.9 \times 300 mm, waters)을 이용하여 분당 0.5 ml로 분획하였으며, 검출은 UV detector(278 nm,

*Corresponding author
Tel. 82-51-890-1534, Fax. 82-51-894-0840
E-mail: ykjeong@hyomin.donggeui.ac.kr

Dual λ Absorbance Detector, waters)를 이용하였다.

항곰팡이성 항생물질의 구조분석

$^1\text{H-NMR}$ spectrum은 Bruker(German)사의 DMX 600MHz NMR spectrometer를 사용하였으며, 용매는 D_2O , 내부 표준물질로는 tetramethylsilane(TMS)를 사용하였고, chemical shift는 σ 값으로 part per million(ppm) 단위로 나타내었다.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum. Bruker사의 DMX 600MHz NMR spectrometer를 사용하였으며, 용매는 CDCl_3 , 내부 표준물질로는 TMS를 사용하여 $^1\text{H-NMR}$ 과 같이 σ 값으로 나타내었다.

아미노산 조성. 아미노산 조성분석은 항생물질을 6N-HCl에 녹여 110°C 에서 24시간 반응시켜 가수분해한 후 Pico-Tag 법[4]에 의해 분석하였다.

FAB-mass spectrum. Jeol사의 JMS-HX 110/110A Tandem mass spectrometer를 사용하여 positive FAB-MS 방법으로 분자량을 측정하였다.

결과 및 고찰

항곰팡이성 항생물질의 구조분석

분리, 정제한 항곰팡이성 항생물질을 TLC plate(Kieselgel 60 F254, Merck)를 이용하여 순도를 확인(Fig. 2)한 후 본 항생물질의 구조를 분석하였다(Fig. 1).

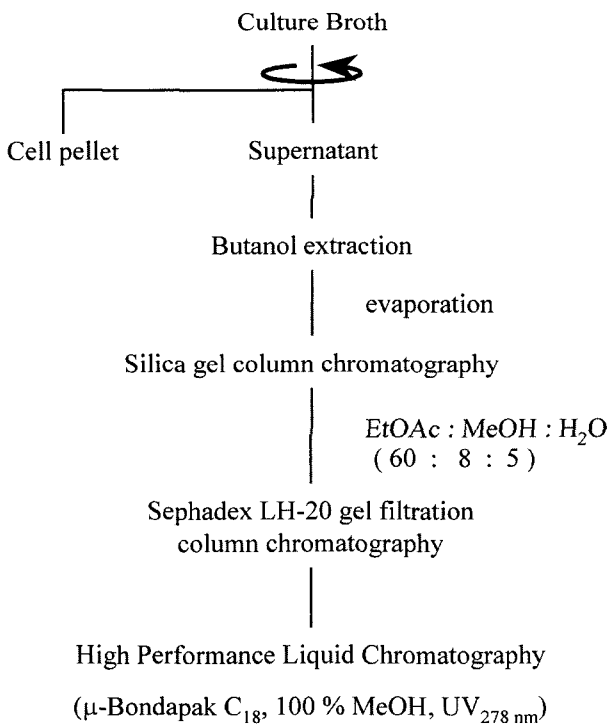


Fig. 1. Isolation and purification procedure of antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63.

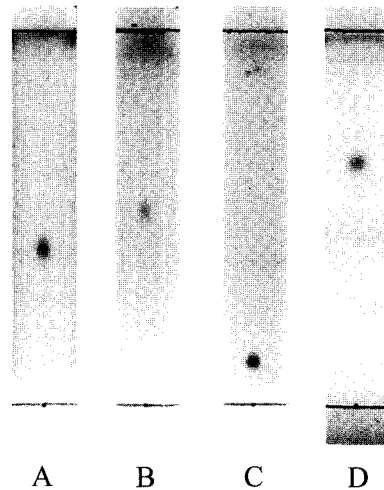


Fig. 2. Thin layer chromatography of the active fraction from HPLC. A, chloroform-methanol-water(65:25:4, $R_f=0.42$); B, butanol-acetone-water(4:6:1, $R_f=0.55$); C, ethyl acetate-methanol-water(60:8:5, $R_f=0.11$); D, dichloromethane-methanol-water(65:35:10, $R_f=0.65$).

$^1\text{H-NMR}$ spectrum

Fig. 3에서처럼 0.6 ppm과 1 ppm사이에 지방족 화합물의 말단 methyl기의 proton에 기인하는 signal과 1 ppm과 4 ppm 사이에 methyl group이나 methylene group의 proton에 기인하는 signal을 보였고, 6.7 ppm과 7 ppm에서 benzene환의 proton에 기인하는 signal을 보였다. 즉, 본 항생물질이 methylene과 methyl group을 갖는 지방족 화합물과 benzene환을 가지고 있음을 알 수 있었다.

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum

Fig. 4에서처럼 10 ppm과 60 ppm사이에 지방족 화합물의 carbon에 기인하는 signal과 100 ppm과 150 ppm사이

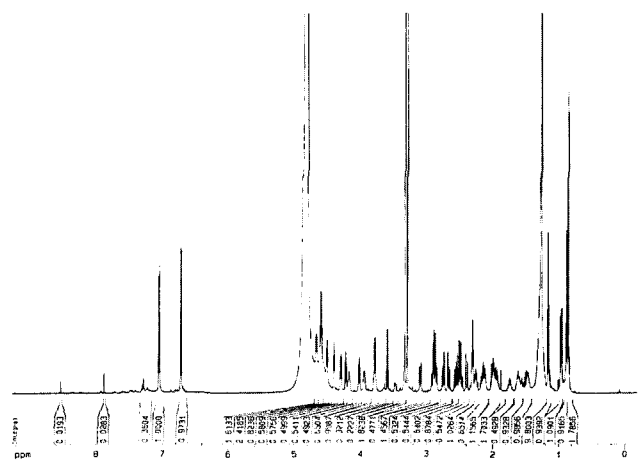


Fig. 3. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63.

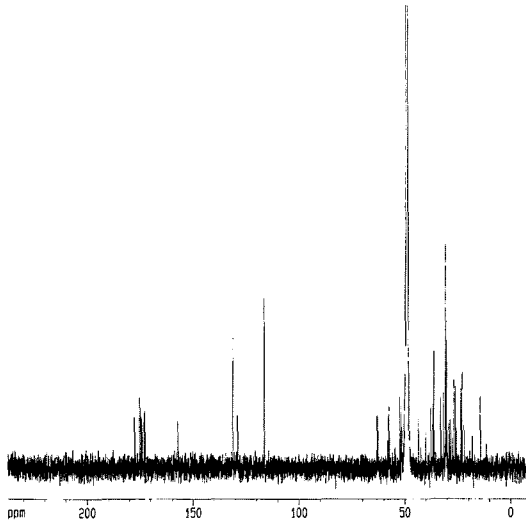


Fig. 4. ¹³C-NMR spectrum of the antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63.

에 benzene환의 carbon에 기인하는 singal을 보였는데 특히, tyrosine benzene환의 carbon에 기인하는 전형적인 signal인 116, 128, 131 및 157 ppm을 보였으며, 170 ppm에서 180 ppm사이에 carboxylic acid의 carbon에 기인하는 signal을 보였다. 이 결과 본 항생물질은 구조상 지방족 화합물과 아미노산인 tyrosine이 존재하고 있음을 알 수 있었다.

아미노산 분석

정제된 항생물질의 아미노산 조성은 Table 1과 같이 aspartate(asparagine), glutamate(glutamine), proline, serine 및 tyrosine이며, 그 몰 농도비는 3:1:1:1:1 이었다.

FAB-mass spectrum

Bacillus sp. YJ-63으로부터 분리한 항곰팡이성 항생물질의 분자량을 알아보기 위해 positive FAB-mass를 행한 결과는 Fig. 5과 같이 [M+H]⁺의 peak가 m/z 1072, m/z 1086 및 m/z 1100에 나타남으로써 1071, 1085 및 1099의 3가지의 서로 다른 분자량을 갖는 물질임을 알 수 있었다.

항곰팡이성 항생물질의 동정

Table 1. Amino acid composition of the antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63

Amino acid	Amount (nM/ml)	Molar ratio
Aspartate Asparagine	3.844	2.66 (3)
Glutamate Glutamine	1.447	1.00 (1)
Proline	1.445	0.99(1)
Serine	1.043	0.72(1)
Tyrosine	1.137	0.79 (1)

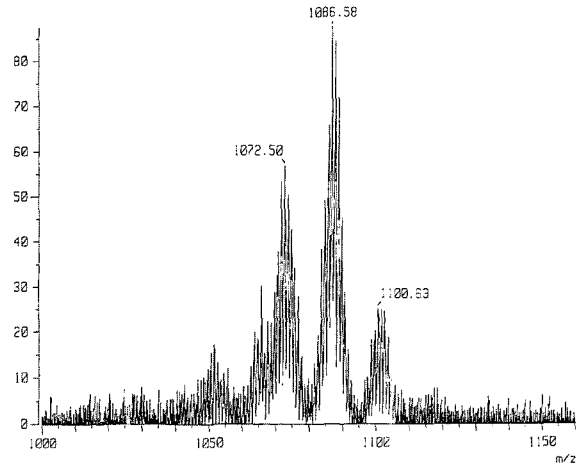


Fig. 5. Positive FAB-mass spectrum of the antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63.

Bacillus sp. YJ-63으로부터 분리한 항곰팡이성 항생물질의 구조를 분석해 본 결과 기존의 *B. subtilis* 유래 iturin계 항생물질과 기본 구조가 유사함을 나타내었다. Iturin계 항생물질은 *B. subtilis*로부터 생산되는 항진균성 항생물질로서 7개의 α-amino acid와 1개의 β-amino acid가 결합한 환상의 구조로 β-amino acid는 methylene기의 수에 따라 탄소수를 달리하여 동일한 항생물질이라도 여러 분자량을 가지며 탄소수가 증가할수록 항진균 활성이 증가된다는 보고가 있다[3]. Iturin계 항생물질의 종류는 α-amino acid의 종류나 농도 및 β-amino acid와 연결된 α-amino acid에 따라 나뉘며, 이들은 모두 다양한 탄소수를 갖는 β-amino acid를 갖는다(Table 1).

α-amino acid와 분자량에 따른 분류

Table 1에서 처럼 분리된 항곰팡이성 항생물질은 Asx 3, Glx 1, Pro 1, Ser 1 및 Tyr 1의 아미노산 종류와 몰농도를 가진다. 이러한 결과는 Table 2의 iturin A, iturin C, iturin D 및 iturin E와 동일한 조성과 농도를 나타내었

Table 2. Iturin species found from strains of the *B. subtilis*

Iturins	α-amino acids	Lipid-Peptide linkage
Iturin A	Asn3, Gln1, Pro1, Ser1, Tyr1	
Iturin C	Asx3, Gln1, Pro1, Ser1, Tyr1	Ser-β-AA
Iturin D	Asx3, Glx1, Pro1, Ser1, Tyr1	
Iturin E	Asx3, Glx1, Pro1, Ser1, Tyr1	
Mycosubtilin	Asn4, Gln1, Pro1, Ser1, Tyr1	Asp-β-AA
Bacillomycin D	Asn2, Gln1, Pro1, Ser1, Thr1, Tyr1	
Bacillomycin L	Asx2, Glu1, Ser2, Thr1, Tyr1	Thr-β-AA
Bacillomycin F	Asn3, Gln1, Pro1, Thr1, Tyr1	

*β-AA is the abbreviation for the liposoluble β-amino acid

다. Iturin A는 asparagine, glutamine, proline, serine 및 tyrosine으로 구성되어 있으며, iturin C와 D는 iturin A의 asparagine이나 glutamine 중 하나의 아미노산이 aspartate나 glutamate로 변환된 형태로 Iturin A보다 분자량이 1 증가되었다. Iturin C는 항곰팡이 활성이 없는 구조이다. 그리고, iturin E는 iturin A의 asparagine이나 glutamine 중 하나의 아미노산이 aspartate나 glutamate로 변환된 후 methylation된 형태로 iturin A보다는 15 증가된 분자량을 가지며 iturin D보다는 14 증가된 분자량을 갖는다. Table 3에는 iturin A, D 및 E의 β -amino acid에 따른 분자량을 나타내었으며, 분리된 항생물질은 FAB-MS에서 1071, 1085 및 1099의 분자량을 나타내어 14차이가 나는 서로 다른 분자량을 보였는데, 이는 β -amino acid의 methylene 수의 차이로 밝혀졌다. 아미노산 종류 및 농도 그리고 분자량을 고려 할 때 분리된 항생물질은 iturin D나 E에 속함을 알 수 있었다. 그러나 분리된 항생물질은 기존에 밝혀진 iturin D나 E에 비해 β -amino acid의 methylene수가 더 많음을 알 수 있었고, 이는 항곰팡이 활성에 있어 중요한 결과로 사료된다.

Table 3. Identification of the antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63

Iturins	β -amino acid		
	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆
Iturin A	C ₄₈ H ₇₄ N ₁₂ O ₁₄ (1042)	C ₄₉ H ₇₆ N ₁₂ O ₁₄ (1056)	C ₅₀ H ₇₈ N ₁₂ O ₁₄ (1070)
Iturin D	C ₄₈ H ₇₃ N ₁₁ O ₁₅ (1043)	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₁ O ₁₅ (1057)	C ₅₀ H ₇₇ N ₁₁ O ₁₅ (1071)
Iturin E	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₁ O ₁₅ (1057)	C ₅₀ H ₇₇ N ₁₁ O ₁₅ (1071)	C ₅₁ H ₇₉ N ₁₁ O ₁₅ (1085)

Table 4. TLC of Iturin group antibiotics and the antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63 on silica gel 60 in various solvents

Antibiotics	R _f		
	Solvent A	Solvent B	Solvent C
Iturin A	0.35	0.53	0.45
Iturin D	0.18	0.35	0.34
Iturin E	0.60	0.77	0.83
Antifungal antibiotic from <i>Bacillus</i> sp. YJ-63	0.42	0.55	0.62
Mycosubtilin	0.26	0.48	0.45
Bacillomycin D	0.21	0.40	0.42
Bacillomycin L	0.16	0.38	0.38
Bacillomycin Fa	0.47	0.45	0.63
Bacillomycin Fb	0.23	0.39	0.42
Bacillomycin Fc	0.15	0.30	0.36

solvent A: chloroform-methanol-water(65:25:4)
 solvent B: butanol-acetone-water(4:6:1)
 solvent C: chloroform-dimethylformamide-water(25:22:3)

Table 5. Comparison Iturin E with the antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63

		β -Amino acid			
		C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇
Iturin E*	MW	1057	1071	1085	-
	A	53	35	11	-
Antifungal antibiotic From <i>Bacillus</i> sp. YJ-63	MW	-	1071	1085	1099
	B	-	33	52	15

*: product of *Bacillus subtilis* grown in a brain-heart infusion
 A: % / total β -amino acid
 B: relative concentration on FAB-MS spectrum

TLC양상에 따른 분류

Bacillus sp. YJ-63 유래 항곰팡이성 항생물질의 iturin D와 E의 분류를 위해 기존에 밝혀진 여러 iturin계 항생물질과의 서로 다른 3가지 용매계[10]에서 TLC양상을 비교하였다(Table 4). 그 결과 기존에 밝혀진 iturin계 항생물질과는 다른 R_f를 보였으나 전개조건의 상이함을 고려하여 각 용매계에서의 R_f의 증감을 비교하였다. Table 4에서와 같이 iturin D는 solvent B에서 가장 높은 R_f를 보였고 solvent A와 C에는 감소하는 결과를 보였으나, iturin E의 경우 solvent A에서 B로 0.17의 R_f 증가와 solvent B에서 C로 0.06의 R_f 증가를 보였다. 분리된 항생물질 또한 iturin E와 같이 solvent A에서 B로 0.13의 R_f 증가와 solvent B에서 C로 0.07의 R_f 증가를 보여 iturin E에 속함을 확인하였다.

분리한 항곰팡이성 항생물질과 Iturin E와의 비교

Iturin계 항생물질의 β -amino acid는 배지 조성에 따라 다른 탄소수를 갖게 되며 탄소수가 증가할수록 항진균 활성이 증가된다는 보고[3]가 있다. Iturin E의 경우 β -amino acid의 탄소수가 16개까지 밝혀졌으며, Table 5와 같이 동일한 배지에서 전체 β -amino acid에 대해 C₁₄가 가장 많고 C₁₅, C₁₆의 순이다. 그러나 *Bacillus* sp. YJ-63에서 분리한 항곰팡이성 항생물질은 C₁₇의 존재를 시사하고 있으며, FAB-MS에서 상대적인 농도를 비교할 때 C₁₆이 가장 많았고, C₁₅, C₁₇순이었다.

요 약

토양으로부터 분리한 *Bacillus* sp. YJ-63으로부터 항진균성 항생물질을 분리하여 그 구조를 분석한 결과는 다음과 같다. 항생물질은 7개의 α -amino acid와 1개의 β -amino acid가 결합한 환상구조를 가지는 iturin E 계에 속하며 특히, β -amino acid의 methylene 수가 기존의 iturin E 보다 더 많은 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 동의대학교 일반연구과제의 지원으로 수행되었으며 지원에 대하여 감사드립니다.

REFERENCES

- Asano, N., Y. Kameda, K. Matsui, S. Horii, H. Fukase, and H. Validamycin. 1990. A new pseudo-tetrasaccharide antibiotic. *J. Antibiot.* **43**: 1039–1041.
- Besson, F. and G. Michel. 1990. Mycosubtilins B and C: minor antibiotics from mycosubtilin-producer *Bacillus subtilis*. *Microbios.* **62**: 93–99.
- 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.
- Bidlingmeyer, B. A., S. A. Cohen, and T. L. Tarvin. 1984. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivation. *J. Chromatography.* **366**: 93–104.
- Cook, R. J. 1985. Biological control of plant pathogens: Theory to application. *Phytopathol.* **75**: 25–28.
- Corbell, N. and J. E. Loper. 1995. A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* **177**: 6230–6236.
- Davison, J. 1988. Plant beneficial bacteria. *Biotechnol.* **6**: 282–286.
- 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.
- 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.
- 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.* **48**: 1240–1247.
- 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.* **49**: 682–688.
- Kirmer, 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.
- 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.
- 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.* **42**: 470–471.
- Leong, J. 1986. Siderophores : Their biochemistry and possible role in biocontrol of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**: 187–209.
- Maget-Dana, R. and F. Peypoux. 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology*, **87**: 151–174.
- Miyamoto, Y. and S. Ogawa. 1992. Total synthesis of (+)-validamycin H. *Carbohydr. Res.* **223**: 299–301.
- 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.* **39**: 636–641.
- Shin, Y. J., M. J. Jung, J. U. Park, W. H. Joo, and Y. K. Jeong. 2000. Isolation and identification of a bacterium producing antifungal antibiotic. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **29**: 832–836.
- Shin, Y. J., M. J. Jung, and Y. K. Jeong. 2000. Optimization of the production of a thermostable antifungal antibiotic. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**: 584–588.
- Tenoux, I., F. Besson, and G. Michel. 1991. Studies on the antifungal antibiotics: bacillomycin D and bacillomycin D methylester. *Microbios.* **67**: 187–193.
- 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.* **44**: 375–381.
- Yonehara, H., H. Seto, S. Aizawa, T. Hidaka, and A. Shimazu. 1968. The detoxin complex, selective antagonists of blasticidin S. *J. Antibiot.* **21**: 369–370.
- Zhang, D. and M. J. Miller. 1999. Polyoxins and nikkomycins: progress in synthetic and biological studies. *Curr. Pharm. Des.* **5**: 73–99.

(Received Oct. 18, 2001/Accepted Dec. 9, 2002)