

## *Bacillus* sp. YJ-63이 생산하는 항곰팡이성 항생물질의 단리

신영준, 정명주, 정영기\*

동의대학교 미생물학과

전화 (051) 890-1534, FAX. (051) 894-0840

An antifungal antibiotic was produced from *Bacillus* sp. YJ-63, and antibiotic was purified to a homogeneity by butanol extraction, Silica-gel column chromatography, Sephadex LH-20 gel filtration column chromatography and HPLC. The purified antibiotic showed one spot on Thin Layer Chromatography, which was negative to ninhydrin and positive to iodine. This finding indicated that the antibiotic was a cyclopeptide structure. UV absorption spectrum of the antibiotic in methanol was maximal at 277 nm, which corresponded to the spectrum for all of the Iturin antibiotic. The antibiotic was stable up to 121°C and in the range of pH 3.0~12.0 with a stable of  $\alpha$ -amino acid and  $\beta$ -amino acid, and showed high activity for fungi and yeasts,

### 서 론

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. 1958년 Watanabe 등이 *Streptomyces*의 대사산물에서 벼도열병에 선택적 효과가 있는 blasticidin을 분리하였으며, 1964년 Umezawa 등은 *Streptomyces kasugaensis*의 대사산물 중 항진균성 항생물질인 kasugamycin을 분리하여 실용화하였다. 그 외 polyoxin, validamycin, leptomycin, phosmidosine 등의 항진균성 항생물질이 있으나, 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, bacillomycin, mycosubtilin 등이 있으며, *Pseudomonas*가 생산하는 pyrrolinitrin과 pyoluteorin 등이 있을 뿐이며 그 실용화의 노력도 아주 미약하다.

본 연구에서는 여러 가지 피해의 원인이 되는 곰팡이의 제거나 곰팡이 감염질환의 치료제로 사용할 수 있는 항진균성 항생물질을 *Bacillus* sp. YJ-63으로부터 추출 및 정제하였기에 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### *Bacillus* sp. YJ-63의 생산

LB 배지에서 35°C, 170 rpm으로 18시간 전배양한 후 본 배양액에 2%(v/v) 되도록 접종하여 30시간 배양후 원심분리하여 그 상등액을 사용하였다.

### 항곰팡이 활성 측정

Thin Layer Chromatography(TLC)에 의해 나타난 spot 부분을 분획하여 각 분획의 methanol 용출액을 agar hole에 투여한 후 억제환의 지름을 비교하였다.

### 항곰팡이성 항생물질의 정제

배양 상등액을 butanol로 3회 추출하여 얻어진 시료를 methanol에 녹여 동량의 silica gel에 흡착시킨 후 ethyl acetate-methanol-water(60:8:5) 용매계의 silica gel column chromatography로 분획하고, 활성분획은 모아 100% methanol 용매계의 Sephadex LH-20 gel filtration column chromatography를 행하였다. 그 다음 HPLC를 행하여 main peak를 확인하였다.

### Thin Layer Chromatography(TLC)에 의한 활성물질의 확인

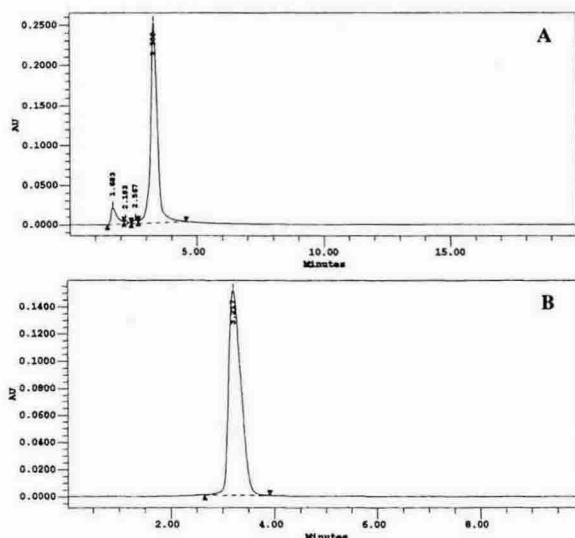
시료를 methanol에 녹여 TLC plate(Kieselgel 60 F254, Merck)에 점적하고 ethyl acetate-methanol-water(60:8:5, v/v) 용매계와 dichloromethane-methanol-water(65:35:10, v/v, 하부만 이용) 용매계로 전개하였다. 발색제로는 Iodine 증기와 0.25% acetic ninhydrin을 이용해 발색하거나 UV Illuminator(TL-200, 312 nm)를 이용하여 분리양상을 관찰하고 활성물질을 확인하였다.

### 항곰팡이성 항생물질의 이화학적 특성

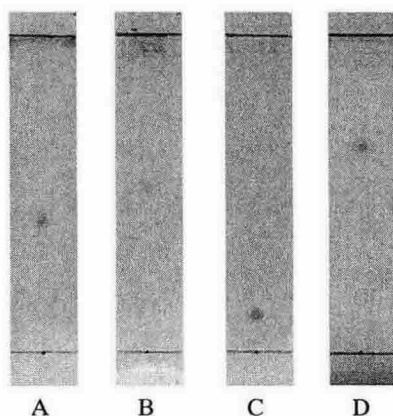
정제된 항곰팡이성 항생물질을 이용하여 유기용매에 대한 용해성, UV absorption spectrum, 온도 안정성, pH 안정성 및 항균활성을 검토하였다.

## 결과 및 고찰

*Bacillus* sp. YJ-63이 생산하는 항곰팡이성 항생물질을 butanol 추출, Silica-gel column chromatography, Sephadex LH-20 gel filtration column chromatography 그리고 HPLC를 행하여 정제하였으며, 서로 다른 전개용매를 이용한 TLC 상에서 하나의 spot를 관찰하였다. 정제된 항곰팡이성 항생물질은 121°C에서도 열처리하지 않은 시료와 동일한 온도 안정성과 pH 3.0~12.0까지의 넓은 범위의 pH 안정성을 보였는데, 이는  $\alpha$ -amino acid and  $\beta$ -amino acid의 견고한 결합에 의한 것으로 생각되어진다. UV흡수는 tyrosine에 기인하여 277 nm에서  $\lambda_{max}$ 를 보였고, 진균에만 선택적 활성을 보였다. 이와 같은 성질은 인축에 미치는 독성 문제를 고려해야 함으로 정제된 항생물질을 쥐의 비장세포에 처리하는 초기실험을 행한 결과 비장세포수의 증가를 부임으로 인축에는 해가 없으리라 생각되나 보다 깊은 연구를 해야 할 것으로 사료된다.



**Fig.** HPLC chromatograms on Bondapak C18 column of the active fraction from Sephadex LH-20 column chromatography (A) and the active fraction from Bondapak C18 column (B).



**Fig.** 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,  $R_f = 0.65$ ).

#### 참고문헌

1. Maget-Dana R., Peypoux F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology*. **87**:151-174. Review(1994)
2. Besson F., Hourdou M.L., Michel G. 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(1990)
3. Eshita S.M., Roberto N.H., Beale J.M., Mamiya B.M., Workman R.F. Bacillomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group: isolations, structures, and antifungal activities of the congeners. *J. Antibiot.(Tokyo)*. **48**:1240-1247(1995)
4. Tenoux I., Besson F., Michel G. Studies on the antifungal antibiotics: acillomycin D and bacillomycin D methylester. *Microbios*. **67**:187- 193(1991)
5. Besson F., Michel G. Mycosubtilins B and C: minor antibiotics from mycosubtilin-producer *Bacillus subtilis*. *Microbios*. **62**:93-99(1990)