

Bacillus subtilis subsp. *kricitiensis*가 생산하는 항진균 물질 KRF-001의 구조결정

김성기* · 이남경 · 정태숙 · 김영국 · 최진자 · 복성해
한국화학연구소 생물공학연구실

Structure Determination of Antifungal KRF-001 Produced by *Bacillus subtilis* subsp. *kricitiensis*

Kim, Seong-Ki*, Nam-Kyung Lee, Tae-Sook Jeong, Young-Kook Kim,
Jin-Ja Choi and Song-Hae BoK

Biotechnology Lab., Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon 305-606, Korea

Abstract — An antifungal mixture of six members (component A to F), KRF-001 produced by *Bacillus subtilis* subsp. *kricitiensis* was isolated from the fermentation broth. Molecular weight of component A to F was determined by FAB-MS to be 1042, 1056, 1056, 1070, 1070 and 1084 respectively. Various instrumental analyses (amino acid analysis, GC-MS, ¹H-NMR, ¹H-¹H COSY NMR) revealed that the mixture was a homologous cyclic peptide composed of each one mole of glutamine, proline, tyrosine, serine, unusual β -amino acid and three moles of asparagine. The structural differences of component A to F were found in carbon number and terminal structure of the unusual β -amino acid. After determination of the sequence and stereochemistry of those amino acids, the tentative structure of KRF-001 was determined.

인체 및 식물체에 대한 병원성 곰팡이 감염의 치료 및 방제를 위한 저독성 항진균 물질의 개발은 오래 전부터 시도되었으나, 몇몇 polyene 계열의 화합물이 인체병원균의 치료제로(1-3), kasugamycin(4), polyoxin(5), validamycin(6) 등이 식물병원균의 방제에 사용될 뿐 실제로 이용되고 있는 화합물의 수는 극히 제한되어 있다.

이런 관점에서 본 연구실에서는 각종 진균증에 광범위한 항균력을 나타내고 독성이 적은 항생물질의 개발을 위하여 토양으로부터 항진균 활성을 나타내는 미생물을 분리, 조사한 결과, 신규미생물 *Bacillus subtilis* subsp. *kricitiensis*가 저독성의 광범위한 항진균 활성물질을 생산함을 보고하고, 이물질을 KRF-001으로 명명한 바 있다(7). 이 논문에서는 상기 항진균

물질 KRF-001의 분리, 정제 및 구조결정에 관하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 배양

KRF-001의 생산에 사용한 균주는 균주동정에 있어서 *Bacillus subtilis*와 대부분의 성질이 동일하였으나 세포의 크기, 포자의 위치 그리고 oxidase 반응의 차이가 확인되어(7) *Bacillus subtilis* subsp. *kricitiensis*로 명명하고 본 실험에 사용하였으며, 배양은 전 논문과 동일한 방법으로 행하였다(7).

생물활성 검정

Overlay method에 의해 만든 곰팡이 피검균 plate에 cylinder를 놓고 시료를 loading하여 확산된 시료의 피검균 억제환의 지름으로 생물활성을 검정

Key words: *Bacillus subtilis* subsp. *kricitiensis*, antifungals, KRF-001, structure determination

*Corresponding author

하였다(8). KRF-001의 활성검정에 사용한 피검균으로는 *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*와 *Trichophyton mentagrophytes*이었다.

KRF-001의 분리, 정제

Amberlite XAD-7 column chromatography : Amberlite XAD-7(Rohm & Hass Co.) 4l를 column(90×900 mm)에 충전시키고, 16l의 증류수로 resin을 세척 후, 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH로 활성화시켰다. 시료 4l를 resin에 매분 40 ml의 유속으로 흡착시킨 후, 8l의 증류수로 흡착되지 않은 물질을 제거하고 methanol 8l로 활성물질을 용출시켰다.

Silica gel column chromatography : Silica gel (Merck 7734, 300g)을 chloroform을 이용하여 column에 충전 후, 시료를 극소량의 methanol에 녹여 resin에 흡착시켰다. KRF-001의 용출은 methanol : chloroform=7 : 3의 용매를 이용하여 용출시켰다.

Sephadex LH-20 column chromatography : Sephadex LH-20 resin을 column(34×900 mm)에 methanol을 이용하여 충전시키고, 시료는 소량의 methanol에 녹여 loading시켰다. 시료의 용출은 methanol을 이용하여 매분 0.4~0.5 ml의 유속으로 행하였다.

HPLC : 각종 chromatography 후 얻어진 활성시료를 Perkin-Elmer HPLC(Series 410LC pump)를 이용하여 최종 정제를 행하였다. 이때 사용한 column은 Rsil C₁₈(10×250 mm, 10 μm, Alteck사)였으며, 시료는 30% acetonitrile에 녹여 불용물질을 원심분리로 제거한 후, 상등액만을 주입하였다. 또한 시료의 용출은 35%에서 50%까지 acetonitrile로 30분간에 걸쳐 gradient를 건 후, 그 이후는 50% acetonitrile로서 용출하였는데 이때의 유속은 매분 4 ml씩이었다. 활성시료의 분획은 UV 225 nm에서의 흡수 peak와 얻어진 분획들의 *in vitro* bioassay의 결과를 병행하여 확인하였다.

KRF-001의 구조해석

분자량 측정 : KRF-001의 분자량은 JEOL DX-303 mass spectrometry를 이용하여 FAB ion(positive)화 방법으로 측정하였다. 측정시 matrix로는 glycerol을 사용하였고, Ar gas를 이용하여 3 Kv의 shut gun voltage와 30 mA의 emission 조건하에서 행하였다.

GC-MS(Gas chromatography-Mass spectrometry) : KRF-001의 산분해 산물의 GC-MS 분석은 Hewlett Packard GC-MSD(EI, 70 eV)를 이용하여 행하였다. 시료는 *t*-BDMS(*tert*-Butyldimethyl silyl) 유도체로서 injection하였으며, J&W사 fused silica capillary column(DB-1, 30 m, 0.25 μm)을 사용하여, 215 °C에서 280°C까지 매분 3°C씩 온도를 높여가며 분석하였다.

NMR : KRF-001을 CD₃OD에 녹여 Bruker AM300과 Bruker 500기종으로 NMR 분석을 하였다. 이때 내부표준물질로는 TMS를 사용하였다.

아미노산 분석 : KRF-001를 6 N HCl로 18시간 가수분해 후 얻어진 산분해 산물에 대하여 amino acid auto analyzer(Waters Co.)을 이용하여 아미노산 분석을 하였다.

아미노산 서열결정을 위한 부분 가수분해 : KRF-001(50 mg)에 30% trifluoroacetic acid(TFA 0.5 ml)를 가하여 110°C에서 3시간 30분 반응시켜 부분 가수분해를 행하였다. 반응 후 생성물(linear peptide)의 정제는 Lichrosorb C₁₈(4.6×250 mm) column을 이용하여 HPLC로 정제하였다. 이때 시료의 용출은 0.1% TFA를 포함하는 H₂O에서부터 0.1% TFA를 포함하는 50% acetonitrile까지 50분간 gradient를 걸어 행하였다.

아미노산 서열결정 : KRF-001의 아미노산 서열결정을 위하여 KRF-001를 부분가수분해한 후 얻어진 생성물(linear peptide)에 대하여, N말단 아미노산과 구성 아미노산들의 조합과 연결로 KRF-001의 아미노산 서열을 결정하였다. 즉 구성 아미노산은 부분 가수분해 산물을 6 N HCl로 110°C에서 24시간 반응시킨 후 얻어진 free 아미노산을 0.2 M NaHCO₃(50 μl)와 0.05 M dansyl chloride(50 μl)를 가하여 40°C에서 1시간 반응시킴으로 얻어진 Dansyl화 유도체를 polyamide TLC plate상에서 분석하였다(9). 또한 N말단 아미노산은 부분가수분해 산물을 먼저 Dansyl화시킨 후, 6 N HCl로 산분해하여 얻어진 Dansyl화 유도체를 polyamide TLC plate상에서 분석, 확인하였다.

KRF-001의 구성 아미노산의 입체구조 결정 : KRF-001의 구성 아미노산인 tyrosine, proline, glutamine, serine의 D형, L형을 판별하기 위하여 KRF-001을 완전가수분해시킨 후, 얻어진 이들 아미노산에 D-

amino acid oxidase(tyrosine, proline, serine) 또는 L-glutamate decarboxylase(glutamine)를 넣고 37°C에서 2시간 반응시킨 후 얻어진 생성물을 reversed phase HPLC를 이용하여 분석, D형, L형을 판명하였다(10), 또한 3몰의 asparagine은 부분가수분해로 얻어진 생성물 중 asparagine을 포함하는 분획을 다시 완전가수분해한 후 CD spectrum(JASCO J-20C, 0.1 N HCl)을 측정하여 L형, D형을 판별하였다.

결 과

KRF-001의 분리, 정제

KRF-001의 정제는 Fig. 1에 나타낸 것과 같이 발효액에서 원심분리에 의해 생산균주를 제거한 후, Amberlite XAD-7, Silica gel, Sephadex LH-20 column chromatography로 정제 후, 얻어진 활성분획을 reversed phase HPLC로 최종 정제하였다.

그 결과 화합물 A에서 F의 6개의 활성 peak가 UV 225 nm하에서 흡수 spectrum를 나타내었으며 *in vitro* bioassay에서도 활성분획으로 확인되어, KRF-001은 단일물질이 아닌 적어도 6개 이상의 활성물질들의 복합체임을 알 수 있었다(HPLC chromatogram 생략). 그리고 이들 A에서 F의 HPLC 후의 함량의 비율은 A가 40%, B가 16%, C가 20%, D가 14%, E가 7% 그리고 F가 2%였다

KRF-001의 구조결정

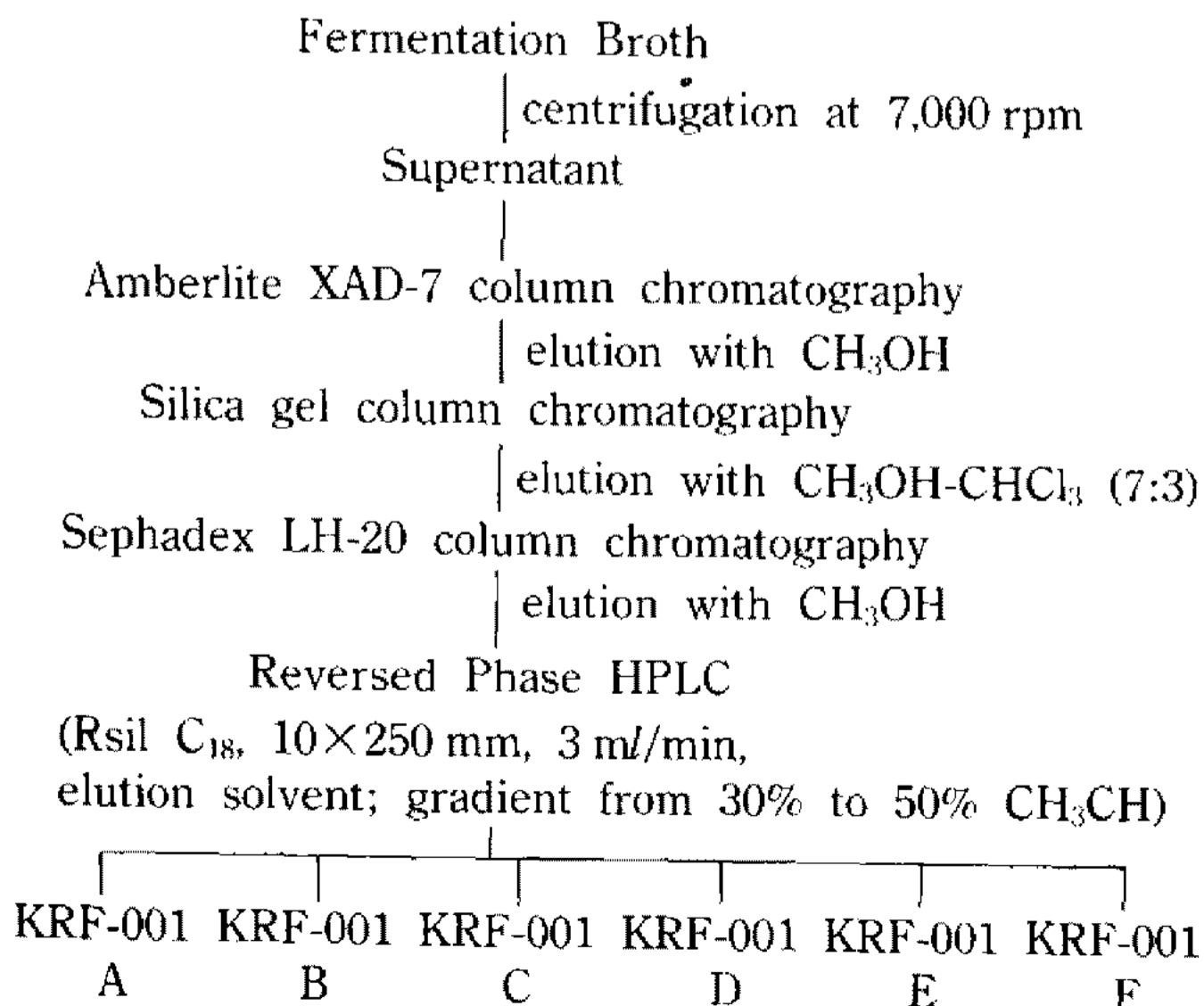


Fig. 1. Purification steps of KRF-001.

분자량 측정 : KRF-001의 분자량을 FAB-MS로서 측정한 결과 화합물 A는 1065, 화합물 B와 C는 1079, 화합물 D와 E는 1093, F는 1107에 $[M+Na]^+$ 의 강한 ion peak가 나타나, 화합물 A의 분자량은 1042, 화합물 B와 C는 1056, 화합물 D와 E는 1070, 화합물 F는 1084로 확인되었다(Fig. 2). 즉 KRF-001 화합물 A에서 F는 FAB-MS(positive ionization)에서 특징적으로 $[M+H]^+$ ion peak가 생성되기 어렵거나, 생성되지 않고 대신 $[M+Na]^+$ ion peak가 강하게 나타남을 알 수 있었다.

한편 A에서 F의 관계를 이들 분자량으로부터 생각해 볼 때, B와 C는 A보다 14 mass 늘어난, 즉 methyl기 1개(CH_3), D와 E는 A보다 28 mass 늘어난, 즉 methyl기 2개(C_2H_5), F는 A보다 42 mass 늘어난, 즉 methyl기 3개(C_3H_7)를 구조 중에 더 갖고 있다고 사료되었다.

아미노산 분석 : KRF-001에 ninhydrine 반응을 시키면 음성반응을 나타냈다. 그러나 6 N HCl, 110°C에서 가수분해 후 ninhydrine 반응을 시키면 양성반응을 나타냈다. 또한 산분해 산물을 TLC로 분석하면 각기 다른 Rf에서 몇 종류의 ninhydrine 발색을 하는 spot가 관찰되었다. 이점들을 고려할 때 KRF-001은 몇 개의 아미노산이 환상구조(cyclic structure)를 이루고 있어 그 자체로는 ninhydrine에 양성반응을 나타낼 수 있는 amine기(NH_2)가 돌출되어 있지 않으나, 산분해에 의해 생성된 아미노산의 NH_2 가 ninhydrine에

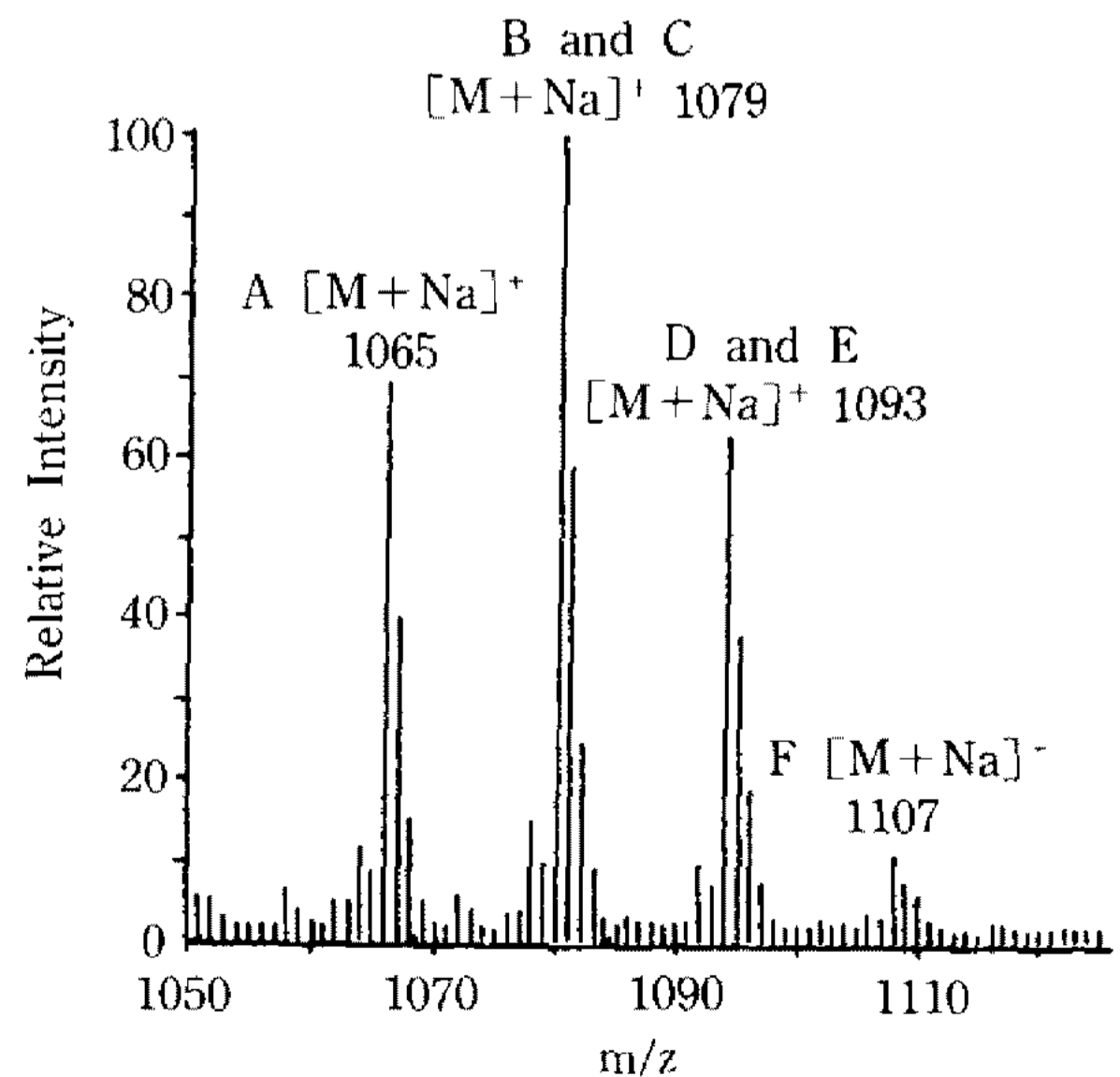


Fig. 2. FAB-MS spectrum of KRF-001 complex (A, B, C, D, E and F).

발색을 하는 것으로 사료된다. 위의 결과로부터 KRF-001은 몇 개의 아미노산이 환상구조를 이루고 있을 가능성이 크므로 KRF-001의 산분해 산물에 대하여 아미노산 자동 분석기를 이용하여 KRF-001의 구성 아미노산 분석을 행하였다. 그 결과 aspartic acid (Asp), glutamic acid(Glu), serine(Ser), proline (Pro), tyrosine(Tyr) 그리고 특이한(unusual) 아미노산(A.A.)의 존재가 확인되었고 그들의 몰비는 Asp : Glu : Ser : Pro : Tyr : Unusual A,A=3 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1임을 알 수 있었다(chromatogram 생략).

Unusual 아미노산의 구조 : KRF-001의 A에서 F의 산분해에 의하여 얻어진 unusual 아미노산을 *t*-BDMS화하여 GC-MS 분석을 하면 이들 화합물들은 M⁺ 이온이 생성되지 않고 아미노산의 *t*-BDMS화 아미노산의 특이한 ion peak인 [M-C₄H₉]⁺의 fragment ion이 A로부터 m/z 414에, B와 C로부터 m/z 428에, D와 E로부터 m/z 442에 그리고 F로부터 m/z 456에 강하게 나타났다. 또한 amine기에 연결되어 있던 *t*-BDMS 분자 2개가 떨어진 fragment ion이 A로부터는 m/z 240에, B와 C로부터는 254에, D와 F로부터는 m/z 268에, F로부터는 m/z 282에 강하게 나타났다. 즉 이들 ion peak의 high mass data로부터 A의 unusual amino acid의 구성식은 C₁₄H₂₉NO₂, B와 C의 unusual amino acid의 구성식은 C₁₅H₃₁NO₂, D와 E의 unusual amino acid의 구성식은 C₁₆H₃₅NO₂, 그리고 F의 unusual amino acid의 구성식은 C₁₇H₃₅NO₂임을 확인할 수 있었다.

한편 A에서 F의 500 MHz ¹H-NMR과 ¹H-¹H COSY spectrum(spectrum 생략) 해석하여 보면, δ1.25에 다수의 methylene기에 기인하는 signal이 나타나

Table 1. ¹H-NMR data focused on the side chain terminal structure in β-amino acid. t; triplet, d; doublet, m; multiplet

Compound	¹ H-NMR signal at 80.9	Terminal structure
Component A	3H, t	Normal-type
Component B	6H, m	Anteiso-type
Component C	6H, d	Iso-type
Component D	6H, d	Iso-type
Component E	3H, t	Normal-type
Component F	6H, m	Anteiso-type

unusual한 아미노산들은 straight chain lipophilic한 아미노산일 가능성이 크다고 사료되었다. 또한 A에서 F의 NMR spectrum에서 δ1.25의 수소수의 적분수를 면밀히 해석하여 보면 unusual한 아미노산은 β-amino acid일 가능성이 크다고 사료되었으며, 이는 COSY spectrum에서 δ4.25에 나타나는 C₃번 탄소의 methionine signal이 주위의 4개의 proton과 cross peak의 양상으로 나타나, unusual amino acid가 β-amino acid일 가능성을 더욱 뒷바침하였다.

또한 이들 잠정적 β-amino acid의 straight chain 말단구조는 δ0.9의 signal의 수소수와 split pattern에 의하여 Table 1과 같이 해석되어(11), A의 말단구조는 *normal*-type, B는 *anteiso*-type, C는 *iso*-type, D는 *iso*-type, E는 *normal*-type, F는 *anteiso*-type으로 되어 있으리라고 사료되었어, 잠정적으로 Fig. 3과 같이 구조해석을 행하였다.

KRF-001의 아미노산 서열결정 : KRF-001의 A에서 F는 아미노산 분석결과 Asp 3몰, Ser, Pro, Tyr, Glu 그리고 β-amino acid 1몰씩으로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 그러나 GC-MS와 NMR 분석결과 β-amino acid의 구조가 밝혀졌고, 또한 FAB-MS로 측정된 KRF-001의 분자량을 고려할 때, KRF-001의 구성 아미노산인 Asp와 Glu은 asparagine(Asn)과 glutamine(Gln)이 산분해시 산화된 형태라고 사료된다(Asp와 Glu이 구성 amino acid일 경우 분자량 4 mass의 차이를 보임).

KRF-001은 기기분석 결과 cyclic peptide로 추정

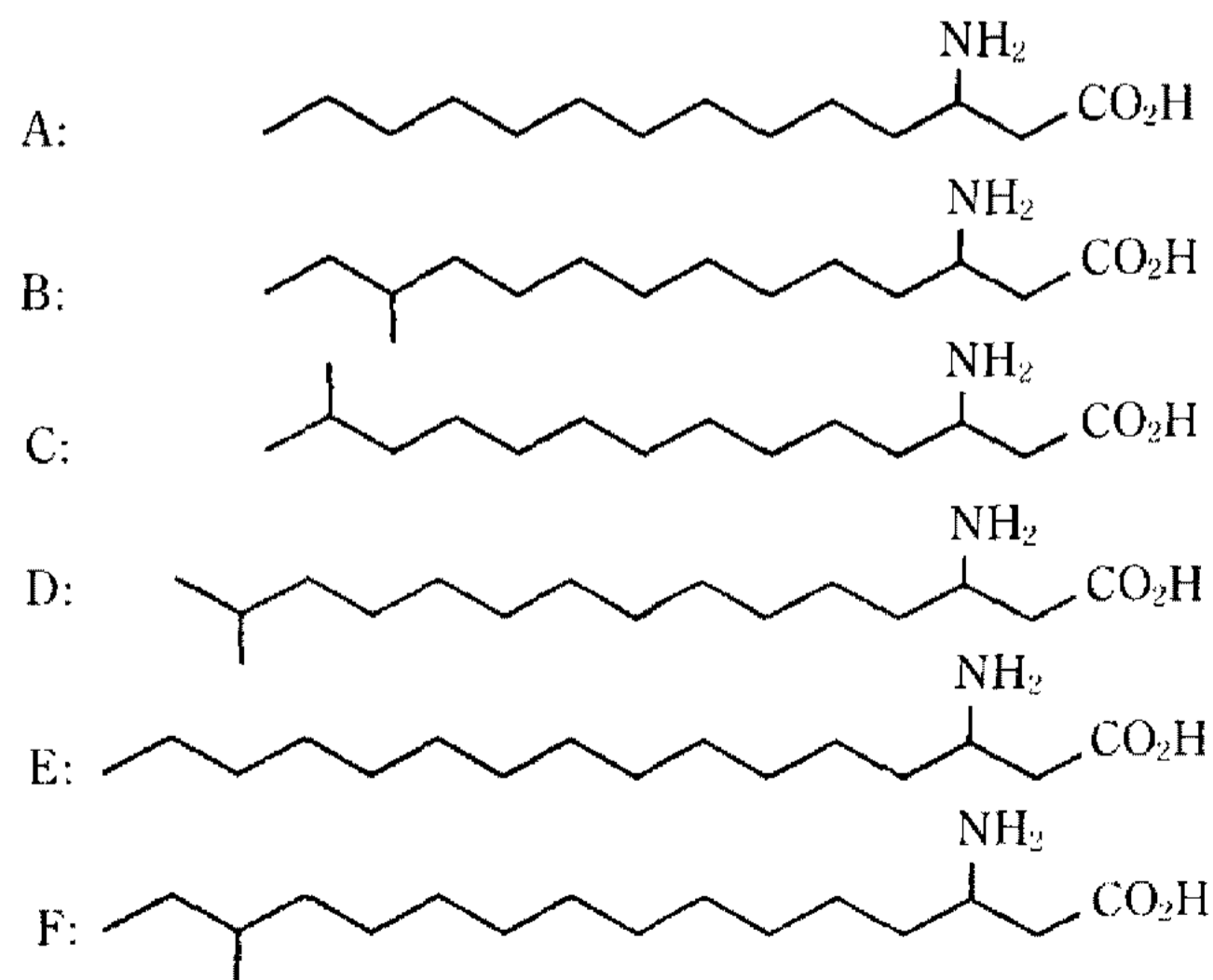


Fig. 3. Structure of β-amino acid in KRF-001 complex (A, B, C, D, E, and F).

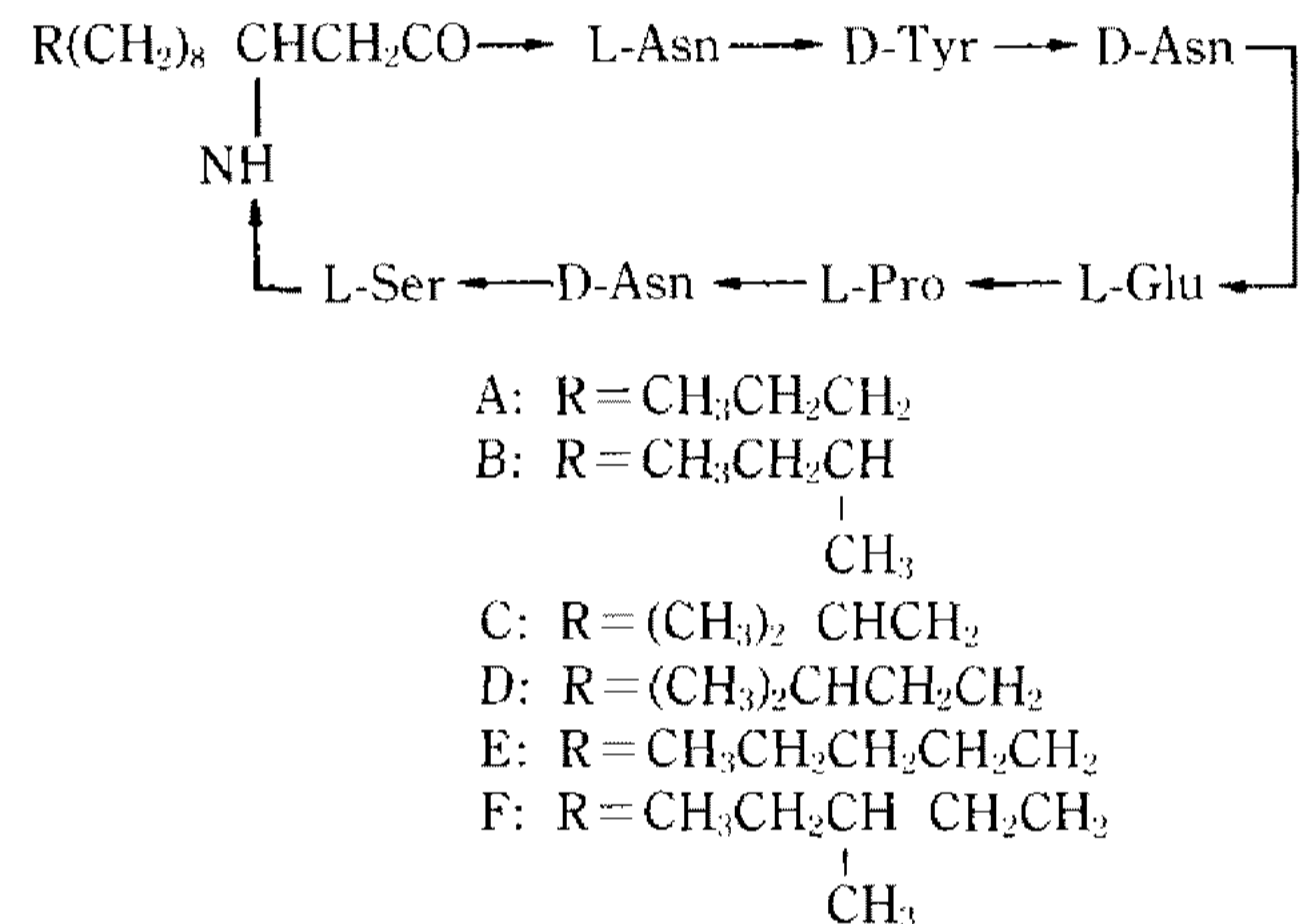
Table 2. Amino acid sequence data of partial hydrolysates of KRF-001 obtained from reversed phase HPLC (Lichrosorb C₁₈, 4.6×250 nm, elution solvent; 0 to 3' 0.1% TFA and then gradient to 0.1% TFA in 50% CH₃CN)

Fraction	Rt (min)	Amino acid sequence
1	6.9	Asp→Glu
2	7.7	Glu→Pro→Asp
3	8.8	Glu→Pro
4	15.3	Pro→Asp→Ser
5	18.6	Tyr→Asp
6	19.8	Ser→β-amino acid
7	20.1	Ser→β-amino acid→Asp
8	23.8	Tyr→Asp→Glu→Pro→Asp
9	25.2	Ser→β-amino acid→Asp→Tyr→Asp→Glu

되어 아미노산의 서열을 규명하기 위한 부분가수분해 생성물을 reversed phase HPLC를 이용하여 정제하였다. 그 결과 Table 2에 나타낸 것과 같이 적당한 크기의 linear peptide들이 선별되어, dansyl화법을 이용, N말단 아미노산과 구성 아미노산을 판별, 이들의 조합과 연결로 KRF-001의 아미노산 서열 결정을 행하였다.

KRF-001의 구성 아미노산의 입체구조(configuration): KRF-001의 구성 아미노산 configuration의 구별은 효소(D-amino acid oxidase, L-glutamate decarboxylase)를 이용한 방법과 CD spectrum으로 D-형, L-형을 판별하였다. 즉 1몰씩 존재하는 Tyr, Ser, Pro, Gln은 KRF-001을 완전가수분해 후 이들의 분획을 정제하여 효소반응을 시키는 방법으로 확인하였고, 3몰의 Asn은 이들을 포함하는 부분가수분해 생성물(linear peptide)을 다시 완전가수분해한 후, CD spectrum을 이용하여 확인하였다. 그 결과 Tyr 경우 D-amino acid oxidase를 반응시킨 후 HPLC 분석시, Tyr의 Rt에 peak가 나타나지 않아 D-amino acid oxidase에 의하여 분해되었으므로 D-형의 Tyr임을 확인할 수 있었다. 또한 Pro의 경우 D-amino acid oxidase로 처리 후에도 HPLC 분석시 Pro의 peak가 그대로 남아있어 L-형 Pro임을 확인하였고, Ser의 경우는 D-amino acid oxidase에 반응되지 않아 L-형임을 HPLC 분석으로 확인하였으며, Glu은 L-glutamate decarboxylase의 처리 후의 HPLC 분석에 의하여 Glu의 peak가 사라져 L-형임이 확인되었다.

한편 3몰의 Asn은 KRF-001의 부분가수분해 fr. 1 (Table 2, Asp→Glu), fr. 2 (Table 2, Glu→Pro

**Fig. 4.** Structure of KRF-001 complex (A, B, C, D, E, and F).

→Asp), fr. 7 (Table 2, Ser→β-AA-Asp)를 다시 완전가수분해 후 각각 Asp 분획을 얻어 CD spectrum으로 확인하였다. 그 결과 fr. 1의 Asp는 D-형, fr. 2의 Asp는 D-형, fr. 2의 Asp는 D-형, fr. 7의 Asp는 L-형임이 확인되었다.

KRF-001의 구조: 위의 분석결과로부터 KRF-001의 잠정구조는 Fig. 4과 같이 결정하였다. 마지막으로 이 항진균물질 KRF-001으로 총칭되는 cyclic peptide 복합체의 적절한 응용방법과 유기화학연구에 의한 활성 증대면을 기대하여 본다.

고 찰

본 연구에 의해 잠정적으로 구조결정된 KRF-001의 구조를 살펴보면 8개의 amino acids가 환상구조를 이루고 있고, 구성 amino acids 중 하나는 lipophilic

straight chain을 갖고 있는 unusual β -amino acid일 가능성이 크다고 보여진다. 이와 같은 KRF-001의 잠정구조를 볼 때, KRF-001 A-F의 구조는 이미 *Bacillus subtilis*로부터 보고된(11, 12) Iturin A계열 cyclic peptides와 거의 동일한 구조라고 사료되었다. 그러나 이들 두 화합물의 독성을 살펴보면, KRF-001은 급성경구 독성시험에서 5000 mg/Kg으로 극히 저독성을 나타내는 반면(7), Iturin A계열 화합물은 157 mg/Kg으로 강한 독성을 나타내(13), 두 화합물 사이에는 아주 현저한 차이를 나타낸다. 이런 독성시험의 현저한 차이는 KRF-001의 구조 중에는 Iturin A의 구조와 미세한 부분에서(unusual amino acid일 가능성이 큼) 구조적 상이점이 존재할 가능성이 크다고 할 수 있다. 이들 두 화합물의 미세한 구조의 차이점은 향후 연구를 계속할 예정이다.

요 약

신규 미생물 *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis*의 배양액으로부터 식물 및 인체 병원균에 폭넓은 항진균 활성을 나타내는 KRF-001으로 총칭되는 6개의 cyclic peptide의 복합체(A에서 F)를 분리하였다. 이 6개 peptides의 분자량은 FAB-MS 측정결과, A가 1042, B와 C가 1056, D와 E가 1070 그리고 F가 1084였다. 이 복합체의 구조를 각종 기기분석을 통해 해석한 결과, 구조 중에 1몰씩의 glutamine, proline, tyrosine, serine 및 unusal β -amino acid와 3몰의 asparagine을 공통적으로 갖고 있으나, β -amino acid의 탄소수와 말단 methyl 구조에 차이점이 있음을 알 수 있었다.

구성 amino acid들의 서열과 입체구조 결정에 의하여 KRF-001의 잠정구조를 결정하였다.

참고문헌

1. Oxford, A.E., H. Raistric and P. Simonart: *J. Biochem.*, **33**, 240 (1939)
2. Hazen, E.L. and R. Brown: *Science*, **112**, 423 (1950)
3. Gold, W., H.A. Stout, J.F. Pagano and R. Donovan: *Antibiot. Annu.*, **1956**, 579 (1955)
4. Umezawa, H., Y. Okami, T. Hashimoto, Y. Suhara, M. Hamada and T. Takeuchi: *J. Antibiot.*, **18**, 101 (1965)
5. Isono, K., J. Nagatsu, Y. Kawahima and S. Suzuki: *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 848 (1970)
6. Iwasa, T., H. Yamamoto and M. Shibata: *J. Antibiot.*, **23**, 595 (1970)
7. Kim, S.U., J.W. Lee, S.H. Lee and S.H. Bok: *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 337 (1991)
8. Nkanga, E.-J. and C. Hagedorn: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **14**(1), 51 (1978)
9. 令堀和友, 崎山文夫, 鈴木絃一: 續生化學實驗講座 2 蛋白質 化學(上), 東京化學 同人, 199 (1987)
10. Peypoux, F., M. Guinand, G. Michel, L. Delcambe, B.C. Das and E. Lederer: *Biochemistry*, **17**, 3993 (1978)
11. Besson, F., F. Peypoux, G. Michel and L. Delcambe: *J. Antibiot.*, **23**, 1043 (1976)
12. Isogai, A., S. Takayama, S. Murakoshi and A. Suzuki: *Tetrahedron Lett.*, **23**, 3065 (1982)
13. Clairbois, J.P. and L. Delcambe: *Arch. Belges Derm. Syph.*, **14**, 63 (1958)

(Received September 27, 1991)