

## *Bacillus alkalophilshaggy* JY-827가 생산하는 항우식균물질의 생산조건과 분리, 정제 및 특성

전주연 · 류일환 · 이상욱<sup>1</sup> · 이갑상\*  
원광대학교 농화학과, <sup>1</sup>(주)푸드텍 연구개발실

**Production Condition, Purification and Properties of Anticaries Microbial Agent by *Bacillus alkalophilshaggy* JY-827.** Chun, Ju-Yean, Il-hwan Ryu, Sang-Uk Lee<sup>1</sup>, and Kap-Sang Lee\*. Department of Agricultural Chemistry, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk 570-749, Korea, <sup>1</sup>R & D Center, Foodtech Co., 93-21 Maryong-ri, Seosu-myeon, Kunsan 537-940, Korea – The study was performed to investigate the excellent microbial anticaries substance which is more effective than the chlorhexidine in the dental caries treatment. A typical strain which produced the most excellent antimicrobial substance was selected, and identified novel alkalophillic *Bacillus alkalophilshaggy* JY-827. For the maximal production of the microbial antibiotic against *Streptococcus mutans* from *B. alkalophilshaggy* JY-827, the optimal culture condition was in the medium containing glucose 15 g/L, pepton 10 g/L and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g/L the highest production of antibiotic against *S. mutans* was obtained at 25°C and pH 11.0 for 5 days. The antibiotic from *B. alkalophilshaggy* JY-827 was purified by organic solvent extraction, silica gel and sephadex LH-20 column chromatographies, and then crystallized with methanol. The crystallin composition of this antibiotic was as a circular shape. The melting point and  $[\alpha]_D^{20}$  were 152-154°C and +55°, respectively. Based on Instrumental analyses such as FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR and GC-mass, the antibiotic was identified as aminoglycoside. It was obtained as amorphous white powder, and soluble in water, methanol but insoluble in ether, chloroform. This antibiotic inhibited the growth of *S. mutans* to about 3 day at the concentration of  $2.5 \times 10^{-7}$  M. It was stable at the alkali condition but unstable within the acid condition. It was also stable up to 70°C.

**Key words:** *Bacillus alkalophilshaggy* JY-827, aminoglycoside, antimicrobial, *Streptococcus mutans*

1954년 미국의 Orland[1]는 무균 rat를 충치의 병인 연구에 도입하였으며, 그 결과 완전한 무균의 환경에서 사육한 rat의 경우 충치가 전혀 발생되지 않음을 확인함으로써 충치의 발생에는 세균의 존재가 필수적임을 처음으로 명확하게 증명하였다. 그는 또한 충치를 유발하는 균주의 탐색을 위하여 몇가지 종류의 단일세균을 감염시켜 실험함으로써 *Streptococcus*균의 한 균종이 충치의 발생에 관여함을 확인하였다. 그 후, 1960년대에 이르러 미국 NIH의 Fitzgerald들[2]은 충치가 발생된 rat와 hamster 계통으로부터 몇 종의 균주를 분리하여, 이들을 충치 비감수성 rat 및 hamster의 구강에 접종한 결과 *Streptococcus*속의 특정균이 충치를 유발한다는 사실을 관찰하였으며, Miami 대학의 Zinner들[3]은 형광항체법을 이용하여 사람으로부터 동물유래의 충치유발성 *Streptococcus*균과 면역학적으로 공통 항원성을 갖는 *Streptococcus*균의 성질은 이미 1924년 영국의 Clarke[4]가 발견한 균종과 일치하는 것으로 판명되었다. Clarke는 이러

한 균을 *Streptococcus mutans*라는 균종명으로 부르게 되었다. 충치 유발성 세균인 *S. mutans*의 구강으로부터의 제거, *S. mutans*의 치면부착 저해 효과를 나타내는 물질을 검색하기 위하여 천연물과 미네랄을 중심으로 다양한 연구가 이루어지고 새로운 화합물들이 개발되었으나, 광범위 항균제를 사용하고 있을 뿐 구강미생물에 대해 특이적인 항균제는 전무한 실정이다. 따라서 최근 호알칼리 영역에서 생육이 활발한 미생물을 중심으로 새로운 항균제의 개발이 주목되고 있다.

또한 최근 *S. mutans*의 살균에 미생물효소를 이용한 연구들이 새로이 주목받고 있다. Lis[5]는 *Fusarium* sp.의 galatose oxidase peptide와 *S. mutans* GTase의 glucan binding protein(GBD)를 hybrid한 단백질이 *S. mutans*에 살균효과가 있음을 보고하였으며, Kim 등[6]은 *Bacillus licheniformis*가 생산하는 분해효소 2종을 분리하고, 이 효소가 *S. mutans* peptidoglycan의 L-Ala, D-Glu 사이를 분해함으로써 *S. mutans*에 대하여 항균작용을 나타낸다고 보고하였다.

따라서 본 연구는 충치 및 치주 질환의 발병요인이 되는 원인균 *S. mutans*의 생육을 저해하고 치태형성에 관여하는 Glucosyltransferase의 작용을 저해하는 물질을 생산하는 새로운 호알칼리성 *Bacillus alkalophilshaggy* JY-827 균을

\*Corresponding author  
Tel. 063-850-6675 Fax: 063-850-6675  
E-mail: microbio@gaebiyok.ac.kr

분리하였다. 이 미생물이 생산하는 항균물질의 최적 생산 조건을 검토하고, 항균물질을 분리, 정제하여 그 구조를 규명함과 동시에 이 물질의 특성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

본 실험에 사용된 균주는 전보[7]에서 *S. mutans*에 대한 항균 활성이 우수한 균주를 분리, 동정하여 *B. alkalophilshaggy* JY-827로 명명한 새로운 호알칼리성균을 사용하였으며, 분리된 균들은 4°C에서 냉장보관하였다.

### 배지

*B. alkalophilshaggy* JY-827균의 생육은 GPY 평판 한천 배지(glucose 1%, pepton 0.5%, yeast extract 0.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02%,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1%, agar 1.5%)를 사용하였으며 실험목적에 따라 배지성분 중  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 의 %(w/v)농도를 달리하여 배지의 초기 pH를 11.0으로 조절하였다.

### 균체량의 측정

균체량은 세포건조중량(dry cell weight, DCW)으로 나타내었다. 평판배양한 분리균주를 GPY배지에 백금이로 접종하고 25°C에서 진탕배양하였다. 배양액을 24시간 간격으로 취하여  $12,000 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 분리된 균체를 증류수로 1회 세척 후 재원심분리하여 균체를 모으고 100~105°C에서 항량이 될 때까지 건조시킨 후, 세포건조중량을 구하였다.

### 항균활성 측정

*Streptococcus mutans*에 대한 항균력 측정은 brain heart infusion soft agar 배지(calf brain infusion from 200 g, beef heart infusion from 250 g, proteose pepton 10 g, NaCl 5 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2.5 g, glucose 2 g)에 피검균을 도말하고 cup cylinder 방법을 이용하여 37°C에서 48시간 배양하여 생성된 투명대의 크기로 측정하였다.

### 종균배양

분리 균주의 *S. mutans*에 대한 최적의 항균물질 생산 조건을 검토하기 위하여 GPY 배지 20 mL를 첨가한 100 mL 삼각 플라스크에 사면 배양한 분리 균주를 백금이로 1회 접종한 후, 25°C에서 4일간 진탕배양하여 정지기에 도달한 균주를 본 시험의 종균으로 사용하였다.

### 배양조건 최적화

종균 배양액을 GPY 배지 20 mL에 1.0%(v/v)되게 접종하고, 200-40°C범위에서 5°C간격으로 온도를 달리하여 5일

간 동안 진탕배양시킨 후 원심분리하여 배양 상등액의 항균활성을 측정하여 배양 최적온도를 측정하였으며, 항생물질 생산을 위한 최적 pH는 기본배지의 pH를 HCl과  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 로 4-12까지 조절하고 종균 배양액을 1.0%(v/v)씩 접종하여, 25°C에서 5일간 진탕배양시킨 후 원심분리하여 배양 상등액의 항균활성으로 측정하였다.

### 배지성분의 최적화

항생물질의 생산능이 우수한 탄소원의 선정은 기본배지에 각종의 탄소원을 1.0%(v/v)씩 첨가하고 종균 배양액을 1.0%(v/v)씩 접종하여, 25°C에서 5일간 진탕배양시킨 후 원심분리하여 배양 상등액의 항균활성을 측정하여 선정하였으며, 질소원은 각종의 유기질소원과 무기질소원을 탄소원으로 glucose가 첨가된 기본배지에 각각 1.0%(w/v)씩 첨가하여 배양후 항균활성을 측정하여 선정하였다. 또한 각종의 무기염류들을 탄소원으로 glucose와 질소원으로 pepton이 첨가된 기본배지에 각각 0.1%(w/v)씩 첨가하고 배양후 항균활성이 가장 우수한 성분을 선정하였다.

### 항균물질의 분리 및 정제

분리균주의 배양액을 원심분리하여 얻은 배양 상등액에 동량의 ethylacetate(EtOAc)를 첨가하였다. 용매층을 모아 회전증발기를 이용, 감압상태에서 용매를 제거한 후, silica gel column chromatography를 행하였다. Methanol(MeOH)로 용출시킨 용출액을 감압상태에서 용매를 제거한 후 sephadex LH-20 column chromatography를 행하였다. Sephadex LH-20은 MeOH로 활성화시키고 용출용매 MeOH:Dichloromethane=(5:1)(v/v)로 평형상태로 만든 다음, column에 충전시켰다. 같은 용매로 용출시켜 활성부분을 모아 용매를 감압상태에서 제거한 후 소량의 물에 용해시켜 동결건조를 하였다. 동결건조 후 분말상태의 항생물질을 소량의 MeOH에 용해시켜 4°C의 냉장실에서 방치시켜 결정성의 항균물질을 얻었다.

### 항균물질의 구조해석

Melting point 및  $[\alpha]_D$  용해점은 시료 1-2 mg을 취하여 Melting point 측정기(AX-80, Hitachi, Japan)로 측정하였으며,  $[\alpha]_D$ 는 시료 2-5 mg을 acetone에 용해한 후 polarimeter(JASCO, DIP-370, japan)로 측정하였고 acetone을 표준물질로 다음 식에 의해 계산하였다.

$$[\alpha]_D = \frac{100 \times A}{C \times L} (^\circ)$$

A: 선광각

C: 1 mL 속에 함유된 시료의 양(예 10 mg/mL 이면 c=1)

L: 측정관의 길이 (mm)

**Infrared Spectrum에 의한 해석**

IR spectrum은 spectrophotometer(JASCO, IR-700, Japan)을 사용하여 측정하였으며 시료는 KBr 정제법으로 조제하였다. 표준 물질로써는 시료가 들어 있지 않은 KBr 분말을 가압 정제하여 사용했고, 적외선 산란에 의한 손실이나 불순물의 흡수를 제거한 다음 spectrum에 의한 부분 구조의 추정을 행하였다.

**NMR(Nuclear Magnetic Resonance)에 의한 해석**

NMR spectrum은 FT방법(Pulse Fourier Transform Method)을 사용하여, 시료 7-10 mg을 측정용매 Aceton-D<sub>6</sub>D<sub>2</sub>O에 5-20%(w/v)비율로 용해시키고 TMS(Tetramethylsilane : (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si)를 기준물질로 하여 JEOL FX-100 NMR로 측정하였다.

**Mass spectrum에 의한 분자량 결정**

Mass spectrum은 고체시료 1 mg을 감압상태(10<sup>-6</sup>-10<sup>-8</sup> mmHg)에서 가열 기화시키고 negative ion FAS mass spectrum을 이용하여 Mass spectrometer(Bruker Co.)를 사용하여 측정하였다. 이때 용매는 aceton/glycerol(50 : 50, v/v)을 사용하였다.

**항균물질의 물리학적 성질 검토**

항균물질의 물리적 성질은 육안 관찰을 통하여 appearance를 측정하였으며, 극성 및 비극성용매에 대한 용해도의 측정은 시료 1 mg을 1 mL의 용매에 넣고 10분간 voltex mixer로 교반 후 잔존시료를 사전에 미리 측량 계속해 둔 여지를 이용하여 여과 한 후 용매를 완전히 제거하고 여지 위의 시료의 무게를 계속하여 50%이상 시료량이 감소하였을 경우 soluble로 결정하였으며, 20-40% 시료량이 감소하였을 경우 slightly soluble로 결정하였다.

**항균물질의 생리학적 특성 검토**

*Streptococcus mutans*에 대한 항균활성 분리 정제된 추출물 *S. mutans*에 대한 항균력 측정(MIC value)은 BHI broth(Difco, USA)을 screw cap tube에 취하고 추출물을 농도별(2.5×10<sup>-1</sup>-10<sup>-10</sup> M)로 첨가한 후 시험균을 4%(v/v) 되게 접종하여 37°C의 CO<sub>2</sub> 항온기에서 48시간 동안 배양 하면서 경시적인 균의 생육을 spectrophotometer(Varian DMS 200, USA)를 이용하여 620 nm에서 optical density로 측정하였다.

**pH 및 온도 안정성**

항균물질의 pH 안정성은 2.5×10<sup>-7</sup>-10<sup>-10</sup> M의 항균물질을 0.05 M sodium citrate-HCl buffer(pH 3-4), potassium phosphate buffer(pH 5-8), ammonium hydroxide-ammonium chloride buffer(pH 9-10) 용액에서 2시간 동안 처리후 생

성된 저지환의 크기를 측정하였으며, 온도 안정성은 동량의 항균물질을 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C 및 90°C에서 1시간동안 처리하였다. 각 온도에서 처리한 항균물질 수용액을 cup에 가한 다음 37°C에서 48시간 동안 배양한 후, 생성된 저지환의 크기를 측정하여 항균물질이 첨가되지 않은 대조군과 비교하였다.

**결과 및 고찰**

**배양조건 최적화**

분리균주 *B. alkalophilshaggy* JY-827가 생산하는 항균물질의 생산을 위하여 기초배지를 사용하여 균주의 생육과 항균물질 생산을 검토한 결과는 Fig. 1과 같이 균체의 생육은 배양시간 4일 이후에서 정지기에 도달하였다. 항균물질의 생산은 균체의 정지기인 4일을 경과하여 5일째 최대를 나타내었고 5일 이후에는 점차로 감소하였다. 배양온도에 따른 균주의 생육과 항균물질 생산을 검토한 결과, Fig. 2와 같이 균체의 생육 및 항균물질의 생산 모두 25°C에서

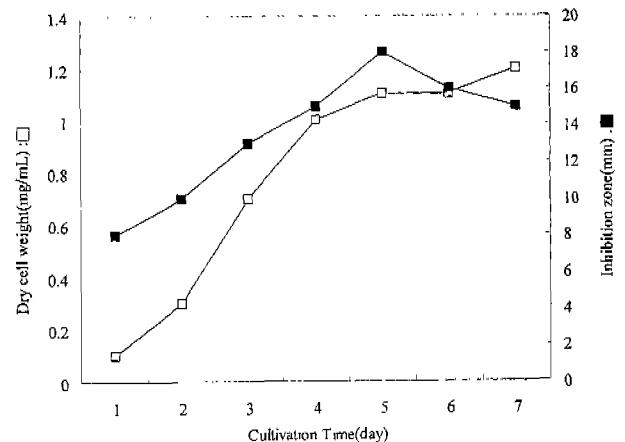


Fig. 1. Profiles of the cell growth and antibiotic production.

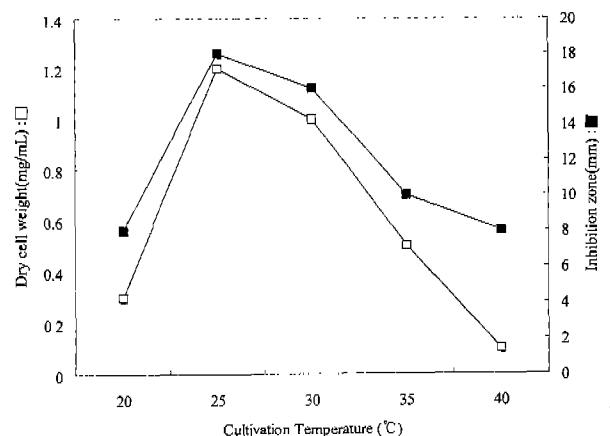


Fig. 2. Effect of the cultivation temperature on the antibiotic production.

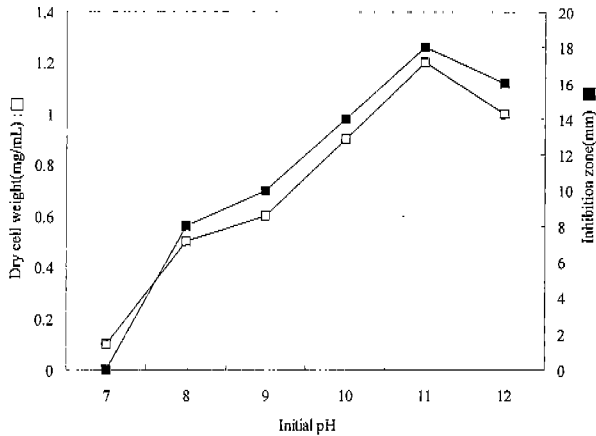


Fig. 3. Effect of the initial pH on the antibiotic production.

최대가 되었다. 이 결과는 Tomita 등[8]은 *Pseudomonas sorbicini*가 생산하는 항생물질인 sorbistin의 생산은 28°C에서 최대가 되었으며, Takeda[9], Kanda 등[10]은 30°C에 항생물질의 생산이 최대였다고 보고한 결과와는 달리 비교적 낮은 온도에서 최적의 결과를 나타내었다. 또한 초기 pH의 영향을 검토한 결과는 Fig. 3과 같이 균체의 생육 및 항균물질의 생산 모두 pH 11에서 최대가 되었다. 분리균주가 중성의 pH에서는 생육하지 못하고 알칼리 조건에서만 생육하는 것에 기인한 것으로 판단되며, 또한 대부분의 *Bacillus*속에 의한 항생물질의 최적 초기 pH는 7.5부근으로 보고되어 있으나[11], 본 실험에서는 매우 높은 pH값을 나타내었다.

**배지성분의 최적화**

항균물질 생산에 미치는 각종 성분의 영향을 검토한 결과는 다음과 같다. 탄소원은 기본 배지의 glucose 대신에 각각의 탄소원 농도를 1.0% 되게 첨가하여 5일간 배양한 결과는 Table 1과 같다. Glucose의 첨가시 가장 좋은 항균

Table 1. Effect of carbon sources on the antimicrobial agent production

Carbon source	Inhibition zone (mm)
Control	18.0
Dextrin	14.3
Glucose	18.0
Manitol	13.9
Sucrose	15.5
Fructose	13.7
Lactose	14.0
Raffinose	11.3
Cellulose	11.8
Galactose	13.5
Maltose	13.2
Soluble starch	16.5
Xylose	14.1

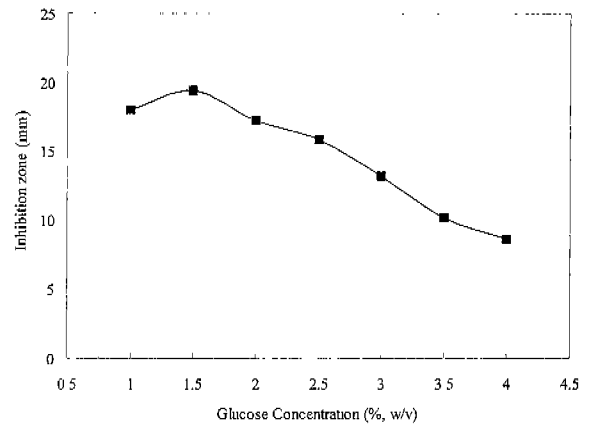


Fig. 4. Effect of the glucose concentration on the antibiotic production.

물질 생산을 나타내었으며, glucose의 농도를 1-4%로 조절하고 항균활성을 측정된 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 1.5%(w/v) 첨가하였을 때 가장 좋았으며, 그 이상의 농도에서는 감소하였다. Anthracyclin 항생제 arugomycin의 생산에 2.0%(w/v)를 사용하였다는 Kwaki 등(12)의 보고와 비교적 낮은 농도의 탄소원을 요구한다는 사실을 알 수 있었다.

질소원에 따른 항균물질 생산을 검토한 결과 Table 2에 나타내었다. 표에서 보는 바와 같이 yeast extract를 포함한 유기질소원들은 항균물질의 생산에 좋은 효과를 보인 반면, KNO<sub>3</sub>를 포함한 무기질소원들은 비교적 낮은 생산 효과를 나타내어 항균물질의 생산에 유기질소원이 효과적임을 알 수 있었으며, 유기질소원 중 pepton 첨가시 현저한 항균물질 생산 증가를 나타내었다. 또한 Fig. 5에 나타낸 바와같이 1.0%(w/v)의 농도로 첨가시 항균물질의 생산이 가장 좋았다. Shomura 등[13]은 yeast extract의 효과에 대해서는 *Micromonospora* sp. SF-1917에 의한 항진균성 항생물질

Table 2. Effect of nitrogen sources on the antimicrobial agent production

Nitrogen source	Inhibition size (mm)
Control	8.1
Beef extract	16.5
Malt extract	17.2
Pepton	20.7
Trypton	18.1
Soybean meal	15.0
Yeast extract	19.5
KNO <sub>3</sub>	10.7
NaNO <sub>3</sub>	10.3
NH <sub>4</sub> Cl	11.9
NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub>	10.0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	8.7
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9.6

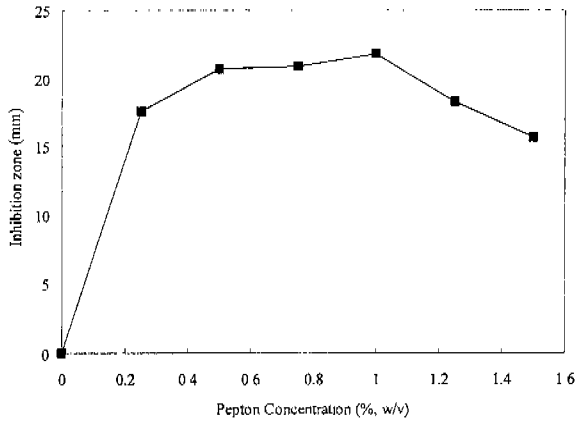


Fig. 5. Effect of pepton concentration on the antibiotic production.

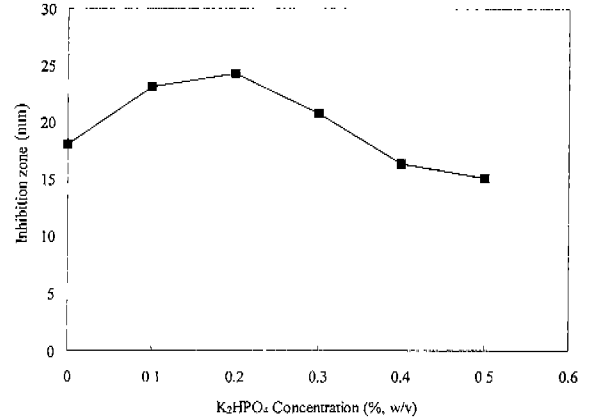


Fig. 6. Effect of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> concentration on the antibiotic production.

Table 3. Effect of mineral sources on the antimicrobial agent production

Mineral source	Inhibition zone size (mm)
Control	18.5
BaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	21.0
NaCl	13.8
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	18.4
KCl	11.3
CuSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	18.4
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	15.7
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	23.1
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	14.9
CaCl <sub>2</sub>	10.8
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	9.4
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	9.5

dapiramycin의 생산에 0.2%의 yeast extract를 사용하였다고 보고하였으며, Nishio 등[14]도 kanamicin의 생산에 질소원으로 yeast extract가 가장 좋았다고 보고하였으며, Yoo[15]도 0.8%의 yeast extract를 사용할 때 가장 우수한 결과를 보였다고 보고하였다. 이와같이 대다수의 항생제의 생산에 질소원으로서의 yeast extract를 첨가하여 행하는 것과는 다른 결과를 나타내었다. 따라서 이후의 실험에서는 배지의 질소원으로서 pepton 1.0%(w/v)를 첨가하여 행하였다.

무기염류가 항균물질의 생산에 미치는 영향을 검토한 결과를 Table 3에 나타내었다. 표에서 나타낸 바와 같이 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 사용할 때 가장 우수한 생산능을 나타내었다. BaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O를 제외한 ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 등의 금속염을 사용할 때 생산능이 급격히 저하되는 결과를 보였다. 이 결과는 Yoo 등[15]이 보고한 KCl을 0.2% 사용할 때 가장 생산능이 증가하였다고 보고한 결과와는 다른 결과를 나타내었으나, 금속염을 사용할 때 생산능이 감소하였다는 결과

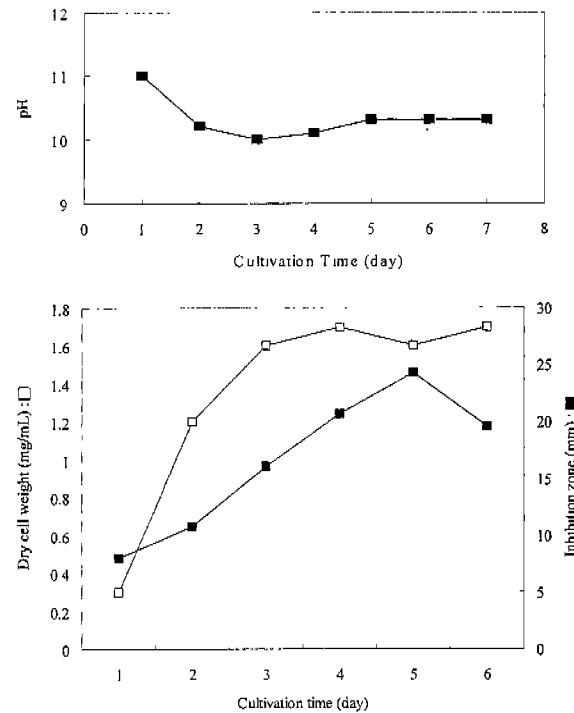


Fig. 7. Profiles of the cell growth and the antibiotic production at optimal medium.

와 유사한 결과를 나타내었다. Vanittanakom과 Loeffler[11]은 0.076%의 KCl을 사용하였다고 보고하였으며, Mizuno 등[17]은 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O의 무기염류가 항생물질의 생산을 증가시킨다고 보고하였으며, Tanaka 등[18]은 0.2%의 NaCl을 사용하였다는 보고와는 다른 경향의 결과를 나타내었는데, 이는 균주의 생리학적 차이에 기인한 것으로 생각되었다. 또한 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 농도에 대한 영향을 살펴본 결과를 Fig. 6에 나타낸 바와 같이 0.2%(w/v)에서 가장 생산능이 좋았으며, 이상의 농도에서는 감소하는 결과를 나타내었다.

이상과 같이 *B. alkalophilshaggy* JY-827 균주의 항균물질 생산을 위한 최적배지 조성은 glucose 1.5%, pepton 1.0%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.0%이었다.

이상의 최적배지에서 경시적으로 항균물질의 생산을 측정한 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 균체의 생육은 3일 이후에 정지기에 도달하였으며, 항균물질의 생산은 균체가 정지기에 도달한 2일 후, 즉 배양 5일째 최대에 도달하였다. 이 결과는 Samanta 등[19]이 보고한 Mycoversillin, Takeda 등[20]이 보고한 baciphelacin의 생산시 균체의 생육이 정지기에 도달한 후에 최대가 된다는 결과와 일치하였다.

**항균물질의 분리 및 정제**

균주 배양액 상등액에 ethylacetate(EtOAc) 추출, silica gel column chromatography, sephadex LH-20 column chromatography, 동결건조 후 분말상태의 항생물질을 소량의 McOH에 용해시켜 4°C의 냉장실에서 결정화의 과정에 의해 정제한 결과 환상의 결정을 얻었다. 결정 항균물질을 n-BuOH : AcOH : H<sub>2</sub>O(3 : 1 : 1(v/v), upper phase) 용매계를 사용하여 thin layer chromatography를 행한 후 UV조사와 Iodine vapor로 발색시켰을 때 단일 spot(Rf: 0.41)임을 확인하였다. 또한 동일 용매계로 전개 후 Iodine, 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Alkaline KMnO<sub>4</sub>, ferric chloride로 발색시 양성의 반응을 나타내어 본 항균물질은 당을 화학구조상에 포함하고 있음을 알 수 있었다.

**항균물질의 구조해석**

Melting point 및  $[\alpha]_D^{20}$ , 용해점은 시료 1-2 mg을 취하여 Melting point 측정기(AX-80, Hitachi, Japan)로 측정하였으며,  $[\alpha]_D^{20}$ 은 시료 2-5 mg을 acetone에 용해한 후 polarimeter(JASCO, DIP-370, japan)로 측정한 결과 용점 온도 범위는 152-154°C이었고,  $[\alpha]_D^{20}$ 은 +55° 였다.

**Infrared Spectrum에 의한 해석**

항균물질의 구조성분을 추정하기 위하여 KBr pellet 법을

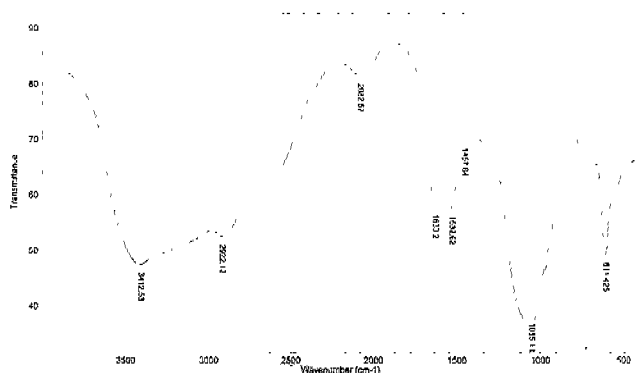


Fig. 8. IR spectrum of the antibiotic.

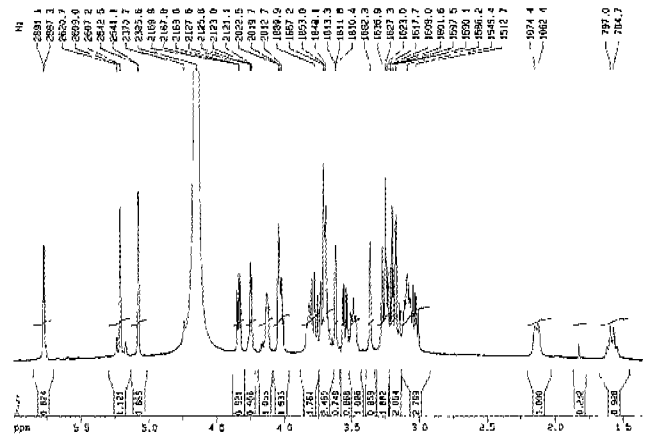


Fig. 9. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the antibiotic.

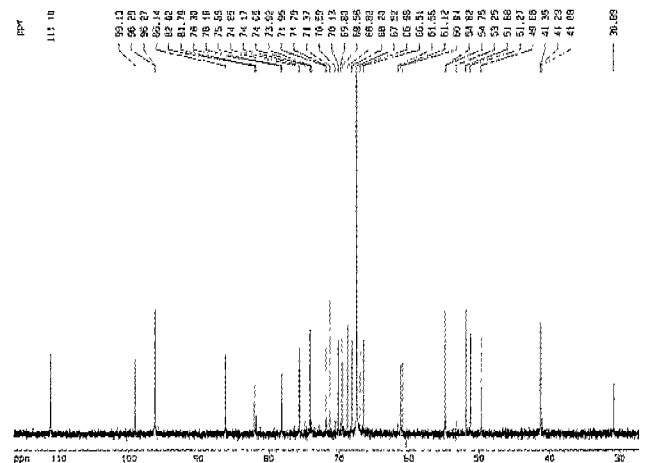


Fig. 10. <sup>13</sup>C-NMR spectrum of the antibiotic.

이용하여 분리 항균물질의 적외선 흡수 spectrum을 조사한 결과 Fig. 8과 같다. Spectrum에서 당류의 특이적 흡수띠인 3400 cm<sup>-1</sup>에서 O-H group, 2900 cm<sup>-1</sup>에서 C-H group, 1633과 1055 cm<sup>-1</sup>에서 C=O stretching band와 C-O stretching band가 나타나고 있으며, 1532 cm<sup>-1</sup>에서 amino group이 확인되어 아미노당 화합물로 추정되었다.

**NMR(Nuclear Magnetic Resonance)에 의한 해석 및 Mass spectrum에 의한 분자량 결정**

JY-827균이 생산하는 항균물질의 구성성분을 좀더 세밀하게 조사하기 위하여 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR 분석을 행한 결과를 Fig. 9, 10에 나타내었다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 4.3 ppm과 5.2 ppm 사이의 doublet들은 당의 anomeric proton들이었으며, 특히 5.07, 3.38, 3.51, 3.70, 3.75, 3.88 ppm의 D-glucose를 확인하였다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum의 경우 Fig. 10에서 보는 바와 같이 95-112 ppm 부근의 anomeric carbon의 특징적인 chemical shift, 98.5 ppm에서 D-glucose가 확인되었다. 60-80 ppm 단당류의 carbon

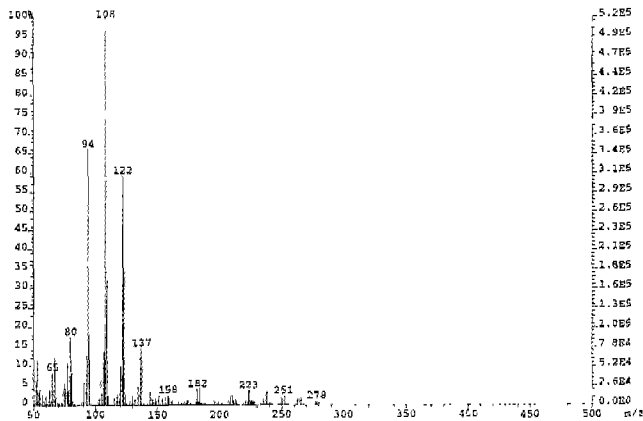


Fig. 11. Mass spectrum of the antibiotic.

Table 4. Physical properties of purified aminoglycoside antimicrobial compound

Melting point	152-154°C	
$[\alpha]_D^{20}$	+ 55°	
Appearance	Amorphous white powder	
Solubility	Water	S
	Methanol	S
	Ethanol	SS
	Isopropanol	SS
	Isoamyl alcohol	SS
	Hexan	SS
	Benzen	SS
	Ether	I
	Chloroform	I
	Aceton	I

S : Soluble, SS : Slightly soluble, I : Insoluble

peak들이 확인되었다.[21] Mass spectrum을 이용하여 항균 물질의 분자량을 측정된 결과 Fig. 11에서 보는 바와 같이 분자량이 278임을 확인하였다.

이와 같은 결과를 종합 분석하여 본 결과 amino group 을 갖는 glucoside로 판단되었다.

항균물질의 물리학적 성질 검토

항균물질의 물리적 성질은 육안 관찰을 통하여 appearance를 측정하였으며, 극성 및 비극성용매에 대한 용해도를 측정된 결과 Table 4에 나타내었다. Aminoglycoside antibiotic은 무정형의 백색 분말의 형태를 갖고 있으며, 물이나 methanol과 같은 극성 용매에 잘 용해되는 반면, ether, chloroform과 같은 비극성 용매에 잘 용해되지 않는 결과를 보였다. 이 결과는 neomycin을 비롯한 aminoglycoside antibiotic의 성질과 일치하는 결과를 얻었다[22].

항균물질의 생리학적 특성 검토

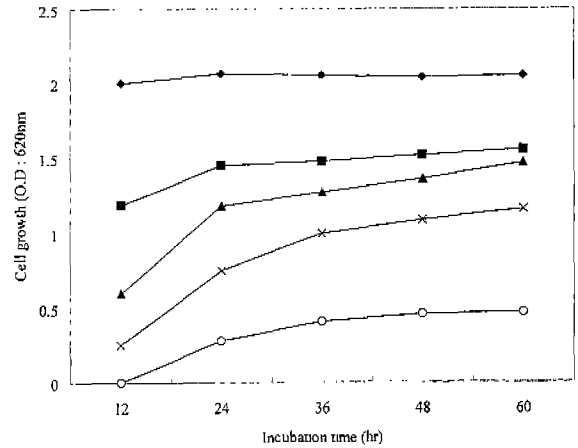


Fig. 12. Effect of aminoglycoside antibiotic on growth of *Streptococcus mutans*.

○:  $2.5 \times 10^{-8}$ , ×:  $2.5 \times 10^{-9}$ , ▲:  $2.5 \times 10^{-10}$ , ■:  $2.5 \times 10^{-11}$ , ◆: Control

*Streptococcus mutans* JC-2에 대한 항균활성

분리 정제된 추출물  $2.5 \times 10^{-1} - 10^{-10}$  M의 *S. mutans* JC-2에 대한 항균력 측정(MIC value)한 결과 Fig. 12와 같다.  $2.5 \times 10^{-7}$  M 농도에서는 배양 60시간까지 균체의 생육이 확인되지 않았으며,  $2.5 \times 10^{-8} - 10^{-11}$  M 농도에서도 lag phase가 연장되고 대수기의 생육도 저하되는 항균효과를 나타내었다. 이 결과는 *Pyricularia oryzae*, *Penicillium*에 대하여 Octacosamicin의 최소생육 저지농도가 25 µg/mL, 50 µg/mL라고 보고한 Dobashi[23]의 결과와 polyoxin은 12.5 µg/mL[24] kasugamicin은 12.5 µg/mL[25], oregano 정유는 0.05 µg/mL[26]의 최소생육 저지농도에 비해 매우 효과적인 항균활성을 나타내었다. Streptomycin을 위시한 amino glycoside계 항생제들은 균체 RNA안정화 붕괴, DNA 기능장애 등 다양한 연구보고가 있으나 가장 주목되는 보고는 ribosome계의 단백질 합성을 저해하여 m-RNA

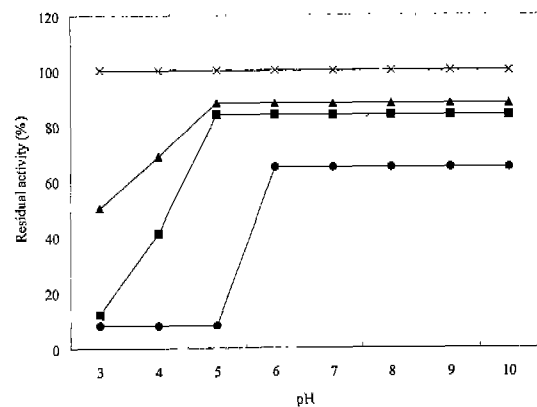


Fig. 13. Stability to pH of aminoglycoside antibiotic in antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*.

●:  $2.5 \times 10^{-10}$ , ■:  $2.5 \times 10^{-9}$ , ▲:  $2.5 \times 10^{-8}$ , ×:  $2.5 \times 10^{-7}$

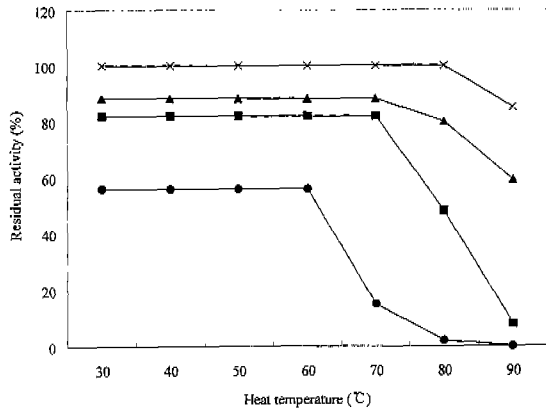


Fig. 14. Stability to heat of aminoglycoside antibiotic in antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*.

●:  $2.5 \times 10^{-10}$ , ■:  $2.5 \times 10^{-9}$ , ▲:  $2.5 \times 10^{-8}$ , ×:  $2.5 \times 10^{-7}$

기능을 저해하는 것이 가장 유력시 되고있다[27].

#### pH 및 온도 안정성

항균물질  $2.5 \times 10^{-7}$ – $10^{-10}$  M을 각종 pH 범위의 완충액으로 처리후, 생성된 저지환의 크기를 측정하여 항균물질이 첨가되지 않은 대조군과 비교한 결과를 Fig. 13에 나타내었다. 표에서 나타낸 바와 같이 pH 6, 7, 8, 9, 10에서 비교적 안정한 반면, pH 5.0이하에서 잔존활성이 급격히 감소하는 결과를 나타내었다. 이러한 결과로부터 분리된 항균물질은 산에는 불안정하지만 알칼리에 안정하다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 당당류의 경우, glucoside들이 산에는 불안정하고 중성 또는 알칼리 pH에서는 안정하다는 사실 및 이당류의 경우에 있어서도 glycoside 결합은 산에 불안정하다는 사실[28]에 기인하여 항균물질의 활성이 실행되는 것으로 생각되었다.

또한 동량의 항균물질을 30–90°C 온도에서 1시간동안 처리후, 생성된 저지환의 크기를 측정하여 항균물질이 첨가되지 않은 대조군과 비교한 결과를 Fig. 14에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이  $2.5 \times 10^{-7}$  M의 농도에서는 80°C까지,  $2.5 \times 10^{-8}$  M,  $2.5 \times 10^{-9}$  M 농도에서는 70°C까지 안정하였다. 따라서 본 항균물질은 비교적 온도에 안정하다는 것을 알 수 있었다.

#### 감사의 글

이 논문은 2000년도 원광보건대학의 교비지원비의 일부에 의해서 연구된 결과로 학교 당국에 감사드립니다.

#### 요 약

분리균주 *Bacillus alkalophilshaggy* JY-827가 생산하는 항균물질의 생산을 최적 배양 조건 및 배지조성은 각각

25°C, pH 11, glucose 1.5%(w/v), pepton 1.0%(w/v),  $K_2HPO_4$  0.2%(w/v)였으며, 기본배지와 최적배지에서 항균물질 생산은 피집균 *S. mutans*에 대하여 18.0과 24.3 mm로 나타나 항균물질의 생산은 기본배지에 비해 최적배지에서 생산시 약 1.5배 정도 증가되었다. 또한 균주 배양 상등액에 ethylacetate(EtOAc) 추출, silica gel column chromatography, sephadex LH-20 column chromatography, MeOH 재결정후 융점 152–154°C이었고,  $m[\alpha]_D^{20}$ 은 +55°의 환상의 결정을 갖는 백색분말을 얻었다. IR,  $^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -NMR을 통하여 분석하여 본 결과 amino group을 갖는 glucoside로 판단되었다. 분리정제된 aminoglycoside antibiotic은 물이나 methanol과 같은 극성 용매에 잘 용해되는 반면, ether, chloroform과 같은 비극성 용매에 잘 용해되지 않는 결과를 보였다. *S. mutans* JC-2에 대한 항균력(MIC value)은  $2.5 \times 10^{-7}$  M이었다. 온도 및 pH 안정성은 각각 70°C까지 안정하였으며, pH 6–10의 알칼리영역에서 비교적 안정한 반면, pH 5.0이하의 산성영역에서는 잔존활성이 급격히 감소하는 결과를 나타내었다.

#### REFERENCES

1. Orland, F. J. and N. Y. Ann. 1959. *Acad. Sci.* **78**, 285.
2. Fitzgerald, R. J. and Mc-Daniel, E.G. 1960. Dental calculus in the germ-free rat, *Arch. Oral Biol.* **2**: 239
3. Zinner, D. D. and J. M. Jablon. 1986. Art and Science of Dental Caries Research, ed. by R. S. Harris. Academic Press, New York, p. 88.
4. Clarke, J. K. 1924. on the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br. J. Exp. Pathol.* **5**: 141.
5. Lis, M. and H. K. Kuramitsu. 1997. Galactose oxidase-glucan binding fusion proteins as targeting inhibitors of dental plaque bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**: 999–1003.
6. Kim, S. Y., S. H. Ohk, D. H. Bai, and J. H. Yu. 1999. Purification and properties of bacteriolytic enzymes from *Bacillus licheniformis* YS-1005 against *Streptococcus mutans*. *Bioci. Biotech. Biochem.* **63**(1): 73–49.
7. Ryu, I. H., J. Y. Chun, and K. S. Lee. 2000. Isolation and identification of novel alkalophilic *Bacillus alkalophilshaggy* JY-827 with Anticaries microbe *Bacillus alkalophilshaggy*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* Publishing
8. Tomita, K., Y. Hosino, Y. Venoyama, H. Tsukura, and H. Kawaguchi. 1976. New antibiotic complex of bacterial origin. *J. antibio.* **26**: 1147–1151.
9. Takeda, R. and M. Isono. 1975. New antibiotic baciphelacin. *J. antibio.* **28**: 717–719.
10. Kanda, N., N. Ishizaki, N. Inoue, M. Ohima, and A. Handa. 1975. DB-2073 a new alkylresorcinol antibiotic. *J. antibio.* **17**: 307–312.
11. Vanittanakom, N and W. Loeffler. 1986. Fengycin-A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtil-*



- lis* F-29-3. *J. Antibio.* **36**: 888–901.
12. Kwaki, H., V. Hayawa, and M. Nakagawa. 1983. Arugomycin J, Antibiotics, a new anthracyclin antibiotic. *J. Antibio.* **36**: 1569–1571.
  13. Shomura, T., N. Nishizawa, M. Iwata, J. Yoshida, M. Ito, and S. Amano. 1983. Studies on a new nucleoside antibiotic, Dapiramycin. *J. Antibio.* **36**: 1300–1304.
  14. Nishio, M., K. Tomatsu, M. Konishi, K. Tomira, T. Oki, and H. Kawaguchi. 1989. Karnamicin, a complex of new antifungal antibiotics. *J. Antibio.* **17**: 852–864.
  15. Yoo, J. H. 1994. Studies on the antifungal antibiotic produced by *Bacillus* sp. SY-414. Kangwon national University
  16. Mizuno, K., A. Yagi, S. Sato, and M. Takada. 1997. Studies on aculeacin I. *J. Antibio.* **30**: 297–302.
  17. Tanaka, Y., K. Hirata, Y. Takahashi, Y. Iwai, and S. Omura. 1987. Globopeptin, a new antifungal peptide. *J. Antibio.* **33**: 283–295.
  18. Samanta, A. K. and S. K. Bose. 1984. Mycoversilin, a new antifungal antibiotic. *J. Antibio.* **30**: 728–732.
  19. Takeda, R. and M. Isono. 1975. A new antibiotic, baciphelacin. *J. Antibio.* **28**, 717–719.
  20. McComb, E. A. and R. M. Mccready. 1957. Determination of acetyl in pectin and in acetylated Carbohydrated polymers. *Anal. Chem.* **29**: 819–821.
  21. Susan, B., J. Maryadcle, S. Ann, E. H. Patricia, and F. K. Joanne. 1996. Merck Index, 12, Merck & Co.
  22. Dobashi, K., N. Matsuda, M. Hamada, H. Naganawa, T. Takida, and T. Takeuchi. 1988. Novel antifungal antibiotics octacosamicins A and B. *J. Antibio.* **41**, 1525–1541.
  23. Isono, K., J. Nagatsu, Y. Kawashima, and S. Suzuki. 1965. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. *Agric. Biol. Chem.* **29**, 848–854.
  24. Umezawa, H., Y. Okami, T. Hashimoto, Y. Suhara, M. Hamada, and T. Takeuchi. 1965. A new antibiotic kasugamycin. *J. Antibio. Ser. A*, **18**: 101–106.
  25. Yoo, Y. S., G. M. Park, and Y. B. Kim. 1993. Antimicrobial activity of soone medical herbs and spices against *Streptococcus mutans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 187–191.
  26. Giancarlo, L. and P. Francesco. 1982. Antibiotics an integrated view, 50, springer-verlar New york
  27. Conn, E. E., P. K. Stumpf, G. Bruening, and R. H. Doi. 1984. *Outlines of Biochemistry*, p. 343-392. 5th ed. John Wiley & Sons.

(Received September 7, 2000)