

세균으로부터 항진균성 물질의 생산 및 특성

† 김 현 수 · ¹육 영 민 · ²여 수 환

계명대학교 미생물학과, ¹(주)계명 바이오테크, ²계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터
(접수 : 2003. 8. 25. 게재승인 : 2003. 12. 26.)

Production and Characteristics of Antifungal agents from Bacteria

Hyun-Soo Kim†, Young-Min Yook¹ and Soo-Hwan Yeo²

Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea,

¹Keimyung Biotech Co., Seonnam Myeon, Seongju Gun, Gyeongsangbukdo 719-832, Korea,

²Traditional Microorganism Resources Center, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

(Received :2003. 8. 25. Accepted : 2003. 12. 26.)

For the production of antifungal compound, strain B-1 was used as a strong producing strain among bacteria isolated from various soil samples. The optimum medium for the production of antifungal compound was PDB (potato starch 0.4%, dextrose 2%, pH 5.1). The optimum conditions for the production of antifungal compound didn't affect on the carbon and nitrogen sources. The produced compound showed broad antimicrobial activity to the tested strains such as five fungi and four bacteria. The optimum pH and temperature of the production antifungal compound were pH 5.0 and 28°C, respectively. Ether extract (1 µg/µl) of culture broth was confirmed inhibitory zone by the thin layer chromatography and plate assay. The antimicrobial compound was unstabled after heat (121°C) treatment. Strain B-1 was mass cultured in a 5-liter fermentor, containing 3 liters of PDB medium at 28°C, pH 5.0, 120 rpm with aeration (1 L/min).

Key Words : Antifungal compound, bacteria strain B-1, optimum culture condition, mass production

서 론

세균은 항생물질, 효소, 색소, 저해제, 생리활성물질 등 다양한 2차 대사산물을 생산하는 아주 유용한 미생물로서 신규 항생물질을 비롯한 각종 저해제, 생리활성 물질 등의 분리, 응용에 수많은 연구가 수행 중에 있다.

최근 사용약제에 대한 내성균의 출현과 면역억제제, 제암제 등의 사용으로 인하여 인간에게 질병을 일으키는 경우가 드물던 진균에 의한 기회감염이 증가되고 있는 추세이며(5) 이러한 기회감염은 화학요법을 받는 암환자나 골수이식, 장기이식, AIDS 환자 등과 같이 인체면역기능이 저하된 상태에서 특히 심각한 양상을 보이고 있다. 현재 개발되어 약물로 쓰이고 있는 약제로는 피부사상균증에 유효한 외용약제인 variotin, siccanin, pyrrolnitrin(1, 2)과 candida증에 유효한 nystatin(3), trichomycin, pimarinin, 심재성 진균증에 사용되는 amphotericin B(4) 등으로 그리 많지

않은 실정이다(5-8). 세균 감염증의 약재개발이 상당히 많은 발전을 해온 것에 비하여 진균증의 약재개발은 아직도 그 발전속도가 완만한 실정이나 특히 주목해야할 점은 심재성 진균증 환자가 매년 증가하고 있고 피부 진균증의 잠재 환자도 상당수에 달하고 있다는 점이다. 한편 농업용 항생물질의 개발은 이미 오래 전부터 시작되었다. 지금까지 농업의 발전을 위해 화학합성 농약을 사용하면서 적은 양으로도 효과가 좋고 가격이 저렴하며 소득증대에 크나 큰 역할을 하였음에도 불구하고 최근 환경오염문제와 더불어 농작물의 잔류 독성문제가 커다란 사회문제로 부각되고 있다. 기존의 많은 유기합성계 농약들도 암유발 가능성 또는 잔류독성 규제방침에 따라 그 사용이 점차 제한되고 있다. 따라서 최근들어 환경오염과 잔류독성에 대한 대처방안으로 내성 농약 및 비료의 연구개발이 이루어지고 있다. 농업용 항진균성 항생물질의 개발은 *Streptomyces*의 대사산물에서 베타열병 예방과 치료에 kasugamycin(9)과 blastidin S (Nucleoside 계)를 분리하여 실용화하였다(10). 이외 polyoxin(11)과 validamycin(12), cyclohexamide, griseofulvin(13) 등이 실용화되어 독성이 강한 일부 유기합성계 농약을 대체하고 식량증산에 이바지해 왔다(14). 또한 특정세균을 이용한 생물학적 해충방제 개발도 많이 진전되어 미생물 농약

† Corresponding Author : Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, 704-701, Korea
Tel : +82-53-053-580-5284, Fax : +82-53-053-580-6447
E-mail : hskim@kmu.ac.kr

으로 작물보호 분야에 도입되어 사용되었으며 농작물, 산림 및 인간건강 보호를 위해 성공한 미생물 살충제로 여러 시험지역에서는 기존의 화학 합성 농약을 미생물 살충제로 대체하고 있는 중이며, 이에 관한 연구도 세계적으로 매우 활발히 진행되어지고 있다. 항진균성 항생물질은 진균성 질병을 치료하기 위한 의약품 개발뿐만 아니라 식물병원균을 방제하며 분해성 물질로 잔류 독성의 염려가 상대적으로 적은 농약용 항생물질로도 많이 개발되어지고 있다(15). 이는 우리나라와 같은 식량증산을 중시하는 곳에서는 그 개발이 크게 요구될 것이며 인체나 동물에 무독하고 안전한 항생물질 농약 그리고 환경보전에 맞는 농약, 병원 병충의 성질에 맞는 농약 항생물질로서 개발될 수도 있다. 그 외 여러 가지 항균활성을 가지는 첨가제와의 혼합에 따른 항진균의 효과를 훨씬 증대시킬 수 있으며 이런 약제의 용도뿐만 아니라 실생활의 항곰팡이 제제로 이용하여 좀 더 쾌적한 환경을 누릴 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 각종 진균증에 광범위한 항균력을 나타내고 독성이 적은 항진균 항생물질을 개발하고자 항진균성 물질을 생산하는 세균을 이용하여 그 생물활성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

본 실험에 사용된 공시 균주는 토양시료로부터 분리한 세균으로 B-1이라 명명하였다. 균주의 항균성 물질 생산 최적배지를 검토하기 위하여 기본 배지로 A6 (soy bean meal 1%, glucose 1%, NaCl 0.5% CaCO₃ 1%, pH 7.0), ISP No. 2 (yeast extract 0.4%, malt extract 1%, dextrose 0.4%, pH 7.2), LB (peptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, pH 7.0), YM (yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, peptone 0.5%, glucose 1%, pH 5~6), PDB (potato starch 0.4%, dextrose 2%, pH 5.1) 배지에 접종하여 37°C, 1~5일간 배양하였다. 항진균성 물질의 생산능이 우수한 PDB를 기본 배지로 하여 탄소원으로 dextrin, glucose, glycerol, maltose, sodium acetate, soluble starch, sucrose, xylose를 각각 1% (w/v)로 첨가하여 수행하였으며, 질소원으로 최적 탄소원이 첨가된 배지에 유기 질소원으로 asparagine, casamino acid, corn steep liquor, leucine, peptone, soybean meal, yeast extract를 무기질소원으로는 NH₄Cl, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄를 각각 1% (w/v)로 첨가하여 실시하였다. 항균활성은 agar plate 상에서 agar diffusion법으로 저해환 (clear zone)을 검토하여 조사하였으며, 시험균으로는 *Aspergillus flavus*를 사용하였다. 또한 균주 배양 초기 pH는 5, 6, 7, 8, 9, 10으로 조절하고 온도는 28°C, 37°C에서 생산 최적조건을 조사하였다.

항균 spectrum

B-1 균주를 28°C, 120 rpm에서 2일간 배양한 후 원심 분리하여 얻은 배양상등액과 ether 추출물을 시험균주가 증식된 agar plate 상에 paper disc (Ø 6 mm, Advantec Co.)를 일정한간격으로 놓은 후 20 µl씩 첨가하여 clear zone의 유무 및 크기를 판단하는 agar diffusion 법을 사용하였다. Ether

추출물은 B-1 균주의 2일 배양액 50 ml를 2배량의 ether로 추출하여 Na₂SO₄로 건조한 다음 감압 농축시켜 소량의 ether에 용해 (1 µg/µl 농도)시켜 사용하였다.

항진균성 물질의 특성

B-1 균주가 생산하는 항균성 물질의 특성을 조사하기 위해 김(16)의 방법에 따라 배양액을 1 N HCl, 1 N NaOH를 사용하여 pH 2.0 및 pH 11.0으로 조정하여 실온에서 4~5시간 처리한 다음, 중성 (pH 7.0)으로 조정하여 *Bacillus subtilis*를 시험균주로 하여 항균효과를 조사하였다. 열처리의 경우 배양액을 121°C, 1기압에서 30분간 처리한 다음 잔존 활성을 조사하였다.

항진균성 물질의 TLC 분석

항진균성 물질의 특성으로 유기용매 전용성을 검토하기 위해 ether 추출물 (1 µg/µl)을 TLC (Silica gel 60 F254) 상에 1 µl spot하여 UV lamp의 254 nm로 조사하여 분석하였다. 전개용매로는 CH₂Cl₂, CH₃OH를 각각 9 : 1로 혼합하여 사용하였다. 항균성 물질의 확인은 전개한 TLC plate를 부패양과와 버섯에서 분리한 푸른곰팡이를 증정한 PDB agar plate 상에 얹고 실온에서 30분간 방치후 28°C에서 24시간 배양하여 저해환 형성 유·무를 확인하는 plate assay를 사용하였다.

항진균성 물질 대량생산

항진균성 물질의 대량생산을 위해 항진균성 물질 생산 최적 조건을 기초로 5 l 용량의 Jar Fermentor를 이용하여 대량 생산조건을 검토하였다. 생산 최적배지인 PDB (Difco Co.)는 고가이므로 산업적 응용면을 고려하여 HANDBOOK OF Microbiological Media(17)를 참고하여 직접 제조하여 사용하였다. 배양은 28°C, 120 rpm, 통기량 1 L/min으로 pH 5.0에서 2일간 배양하였다.

결과 및 고찰

항진균성 물질 생산 조건

공시균의 생육과 항진균성 물질 생산에 대한 최적배지를 조사하기 위해 5종류의 배지를 사용하여 항균성 물질의 생산을 조사한 결과 Table 1에서와 같이 PDB에서만 항진균성 물질이 생산되었으며 배양 2일째 최대 생산량을 나타내었다. 따라서 기본배지로 사용하였으며 또한 직접 제조한 PDB의 경우 시판용 PDB에 비해 생산능이 다소 우수하다고 판단되었다.

탄소원의 영향

Table 1의 결과에서 탄소원의 영향을 검토하기 위해 기본배지인 PDB에 탄소원을 각각 1% 첨가하여 배양일수에 따른 생산능을 조사한 결과, Table 2에서와 같이 탄소원은 항진균성 물질 생산에 큰 영향이 없다고 사료되었으며 PDB 경우 Table 1에서와 같이 배양 2일째 항균효과가 가장 우수하였다.

Table 1. Production of antifungal compound on various media

Media	Antibiotics production				
	Incubation time(days)				
	1	2	3	4	5
	<i>Asp. flavus</i>				
A6	-	-	-	-	-
ISP No.2	-	-	-	-	-
LB	-	-	-	-	-
YM	-	-	-	-	-
PDB	+	++	+	+	-
PDB*	+	+++	+	+	-

Antimicrobial activity was tested by agar diffusion method (paper disc) using culture broth (20 μ l).
 +, - : diameter of inhibitory zone (- : no inhibition, + : under 12 mm, ++ : 13~15, +++ : above 16 mm)
 * : Hand made PDB

Table 2. Effect of carbon sources on the antifungal compound production

Carbon source (1%)	Antifungal compound production			
	Incubation time(days)			
	2	3	4	5
	<i>Asp. flavus</i>			
Dextrin	-	-	-	-
Glucose	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-
Sodium acetate	-	-	-	-
Soluble starch	-	-	-	-
PDB	++	+	+	-

Antifungal activity was detected as described in Table 1.

Table 3. Effect of nitrogen sources on the antifungal compound production

Nitrogen source (1%)	Antifungal compound production			
	Incubation time(days)			
	2	3	4	5
	<i>Asp. flavus</i>			
Asparagine	-	-	-	-
Casamino acid	-	-	-	-
Corn steep liquor	-	-	-	-
Leucine	-	-	-	-
Peptone	-	-	-	-
Soybean meal	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-
Yeast extract	-	-	-	-
NaNO ₃	-	-	-	-
NH ₄ Cl	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-
PDB	++	+	+	-

Antimicrobial activity was detected as described in Table 1.

질소원의 영향

PDB에 각각의 유기 혹은 무기 질소원을 1% 첨가하여 생산능을 배지에서 조사한 결과, Table 3에서와 같이 PDB를 제외한 다른 질소원을 첨가하였을 경우 항진균성 물질이 생산되지 않았으므로 Table 2와 3의 결과에서 PDB를

공시균주인 B-1의 항진균성 물질 생산 최적배지성분으로 결정하였다.

pH 및 배양온도

생육초기 pH에 대한 영향을 알아보기 위하여 사용배지의 pH를 5, 6, 7, 8, 9, 10으로 조정하여 배양하였다. 그 결과 Fig. 1에서 보인 바와 같이 pH 5에서 균의 생육이 가장 우수하였으며 pH가 증가함에 따라 균 생육도가 다소 감소하는 경향을 보였다. 배양 온도의 영향을 알아보기 위하여 28 $^{\circ}$ C, 37 $^{\circ}$ C의 온도 조건하에 각각 실험한 결과 28 $^{\circ}$ C에서 균의 생육이 24 hr 이후부터 48 hr까지 다소 양호한 결과로 나타났다(Fig. 2). 이들 조건(Fig. 1, Fig. 2)에 이에 따른 각각의 항균효과를 검토하기 위하여 버섯 곰팡이균을 시험균으로 하여 조사한 결과 48 hr의 pH 5와 28 $^{\circ}$ C에서 항균효과가 가장 우수하였으나(Table 4, Table 5), pH 7 이후 및 37 $^{\circ}$ C의 72 hr 배양 이후는 생성된 항균성물질이 분해되는 결과를 보인다고 추정되었다.

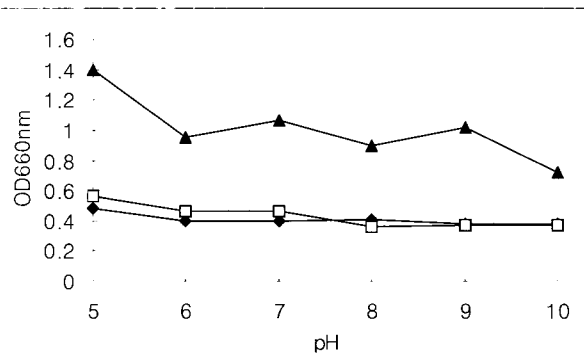


Figure 1. Effect of initial pH on the growth of the strain B-1.

- ▲- : Cell growth in 48hr
- : Cell growth in 24hr
- ◆- : Cell growth in 12hr

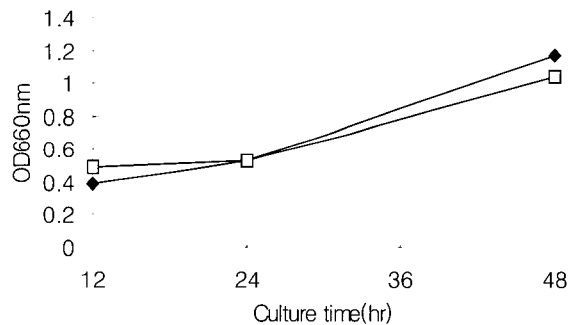


Figure 2. Effect of culture temperature on the growth of the strain B-1.

- : Cell growth at 37 $^{\circ}$ C
- ◆- : Cell growth at 28 $^{\circ}$ C

항균 Spectrum

B-1이 생산하는 항균성 물질의 항진균 및 항세균 효과

를 검토하기 위하여 PDB 배양상등액 20 μl 와 ether 추출농축물 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)을 사용하여 Gram(+) 세균 2균주, Gram(-) 세균 2균주, 곰팡이 5균주, 효모 1균주 대상으로 항균 활성을 조사한 결과 진균에 강한 항균력을 가지며, 세균에도 작용하는 광범위한 항균효과를 나타내었다(Table 6).

Table 4. Effect of initial pH on the antifungal compound production

Incubation pH	Incubation time(hr)					
	Inhibitory zone(ϕ , mm)					
	12	24	48	72	96	120
5	-	13	16	11	11	12*
6	-	11	15	11	9	5*
7	-	12	15	9	9	-
8	-	14	15	10	-	-
9	-	13	15	10	-	-
10	-	-	14	11	-	-

Antimicrobial activity was detected as described in Table 1. Cultivation was performed at 28°C. *: Unclear zone

Table 5. Effect of culture temperature on the antifungal compound production

Incubation temperature	Incubation time(hr)					
	Inhibitory zone(ϕ , mm)					
	12	24	48	72	96	120
28°C	-	13	16	11	11	12*
37°C	-	13*	12	-	-	-

Antimicrobial activity was detected as described in Table 1. Cultivation was performed at pH 5.0. *: Unclear zone

Table 6. Antimicrobial spectrum of produced compound by B-1.

Sample Strains	Culture broth (20 μl)	Ether extract (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
	Inhibitory zone (ϕ mm)	
Gram(+) bacteria		
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	15	15
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1927	-	11
Gram(-) bacteria		
<i>Escherichia coli</i> K-12	-	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1930	-	9
Yeast		
<i>Candida albicans</i> KCTC 1940	-	-
Fungi		
<i>Aspergillus flavus</i>	9	13
<i>Aspergillus fumigatus</i> IFO 5840	8*	15
<i>Aspergillus niger</i>	10	15
fungi from onion	12	10
fungi from mushroom	17	18

Antimicrobial activity was detected as described in Table 1. *: unclear zone

항진균성 물질의 잔존 활성

항진균성 물질의 특성을 조사하기 위해 배양상등액을 산처리, 알칼리처리, 열처리한 다음 잔존활성을 측정된 결과 Table 7에서 보인 바와 같이 비처리시 (control)와 비교하였

을 때 항균성 물질은 산, 알칼리처리시 비처리에 비해 각각 82%, 73%의 활성이 잔존하였고, 열처리시 완전히 실패되어 열에 상당히 불안정한 특성을 나타내었다.

Table 7. Residual activity of the antimicrobial compound after acid, alkali and heat treatments

Strains	Treatment			
	Control	Acid	Alkali	Heat
Inhibitory zone (ϕ , mm)				
<i>B. subtilis</i>	10	9	8	-

항진균성 물질의 전용성

항진균성 물질의 물질정제를 위한 특성으로 유기용매 전용성을 검토하였다. 배양액의 ether 추출농축물을 사용하여 TLC로서 분석하였으며, plate assay를 통하여 항진균성 물질의 존재는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 Rf 0.5 위치(Fig. 3(A))에서 spot 및 항균력(Fig. 3(B))이 확인되었으며, 항진균성 물질이 ether에 전용되는 것을 확인하였다. 시험균(fungi)이 증충된 PDB agar plate에 plate assay법을 이용하여 항균력을 확인하였다.

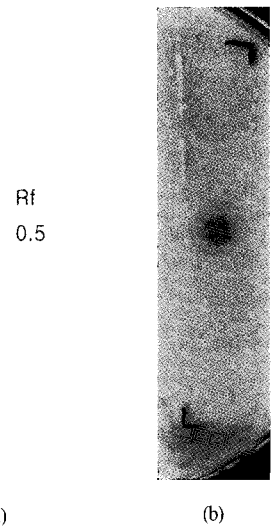


Figure 3. (a) : TLC analysis of ether extract. The antimicrobial compounds were extracted with ether and chromatographed on silica gel plate (Silica gel 60 F₂₅₄) with methylene chloride and methanol (9 : 1). (b) : Antimicrobial activity of spot. Developed plate (a) was analyzed on agar plate containing isolated fungus from rotten onion.

항진균성 물질 대량생산

항진균성 물질의 대량생산을 위해 5 l 용량의 Jar fermentor를 이용하여 대량생산을 실시하였다. 사용 배지인 PDB는 산업적 측면을 고려하여 실험실에서 직접 제조하여 사용하였다. 그 결과 기존의 시판 PDB 제품과 비교하여 그 항균 활성이 더 우수하거나 동등한 효과를 보였다(결과 미개재). 본 공시균주는 현재 동정 중에 있으며 대량생산을 통한 응용분야의 적합성 연구도 수행 중에 있다.

요 약

토양으로부터 분리한 균주 중 항진균 활성이 우수한 균주를 선발하여 B-1이라 명명하였다. B-1의 항균성 물질 생산에 대한 배양조건을 검토하기 위해 최적배지, 탄소원, 질소원, pH, 온도별로의 영향을 조사하였다. PDB 배지에서 항균력이 우수하였으며 탄소원·질소원에는 별다른 영향이 없었다. pH와 온도에서는 각각 pH 5.0, 28°C에서 항균력이 우수하였다. 항균 활성은 진균에서 강하게 나타났으며 일부 세균에서도 항균력을 나타내었다. 항진균성 물질은 산, 알칼리 처리 후 잔존 활성은 70~80%로 나타났으며 열처리시 완전히 실효되어 열에 대해 상당히 불안정하다는 것을 확인하였다. 항균성 물질위 용매 전용성을 위해 TLC를 통하여 분석하였으며 plate assay를 실시하여 항균성 물질을 확인하였다. 항진균성 물질의 대량생산을 위해 기본배지인 PDB를 직접 실험실 내에서 제조하였으며 시판의 PDB와 비교하였을때 항균성 물질 생산면에서나 가격면에서 더 나은 결과를 보였다.

감 사

본 연구는 계명대학교 산학연 컨소시엄과 과학기술부·과학재단 지정 계명대학교 전통미생물자원 및 산업화 연구센터의 일부지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kirner, S., P. E. hammer, D. S. Hill, A. Altmann, I. Fisher, 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 Loper, J. E (1995), A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, *J. Bacteriol.* **177**, 6230-6236.
- Yu, B. G (2001), The aggregation state and hemolytic activity of nystatin, *J. Kor. Pharm. Sci.* **31**, 1-5.
- Koh, C. M., H. J. Joo, and H. S. Park (1984), In vitro antifungal activity of amphotericin B, clotrimazole and 5-fluorocytosine in alone and in combination against *Candida* species, *J. Kor. Soc. Microbiol.* **19**, 35-40.
- Kim, K. J (2000), Therapeutic strategy to fungal infections for primary care doctors, *J. Kor. Acad. Fam. Med.* **21**, 1245-1252.
- Kim, C. W., I. R. Byung, and H. Won (1973), Susceptibility of dermatophytes to antifungal drugs, *J. Kor. Dermatol.* **11**, 139-150.
- Clark, A. C. and P. B. Fernandes (1992), The need for new antifungal drugs. New approaches for antifungal drugs, Birkhaeser, Boston, 1.
- McGinnis, M. R. and M. G. Rindali (1991), Antifungal drugs, *In Antibiotics in laboratory medicine* 3th ed., Lorian, V. Ed., p198, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Oh, Y. J (1992), Studies on the optimization of media composition and cultural conditions for kasgamycin production by *Streptomyces kasugaensis*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 583-587.
- Bae, M. (1978), Present status and future of antibiotics for agriculture, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 141-148.
- Reveni, M., H. Cohen, T. Zahavi, and V. Venzion (2000), Polar-a potent polyoxin B compound for controlling powdery mildews in apple and nectarine trees, and grapevins, *Crop protection* **19**, 393-399.
- Edward, J. K., R. P. Adams, and K. K. Kartha (1990), Trehalase activity in plant tissue culture, *Phytochemistry* **29**, 2525-2528.
- Ko, B. S., T. Oritani, and K. Yamashita (1992), Synthesis and biological activity of 6'-phenylgriseofulvin as analogs of antibiotic griseofulvin, *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **35**, 395-398.
- Kim, S. U., J. W. Lee, S. H. Lee, S. H. Lee, and S. H. Bok. (1991), Identification of bacteria having antifungal activity isolated from solid and its activity, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 337-342.
- Sin, Y. J., M. J. Jung, J. U. Park, W. H. Joo, Y. K. Jeong. (2000), Isolation and identification a bacterium producing antifungal antibiotic, *Kor. J. Food. Sci. Nutr.* **29**, 832-836.
- Kim, H. S. (1997), Isolation and Production of antifungal Compound from methylotrophic Actinomycetes, *J. Inst. Nat. Sci.* **16**, 49~59.
- Ronald, M. A. (1993), Handbook of microbiological media, p724, CRC Press, N.W., Boca Raton, Florida