

Bacillus amyloliquefaciens IUB158-0301 생산하는 항진균물질의 생화학적 특성 및 독성

김혜영 · 이태수*

인천대학교 생물학과

Received October 28, 2009 / Accepted November 25, 2009

Toxicity and Characteristics of Antifungal Substances Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* IUB158-03. Hye Young Kim and Tae Soo Lee*. Department of Biology, University of Incheon, Incheon, 406-840, Korea - The purified antifungal substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* IUB158-03 was positive to ninhydrin but negative to aniline, suggesting that the antifungal substance could be a peptide. FAB-MS, UV adsorption spectrum, and amino acid composition analysis revealed that the molecular weight of the antifungal substance was 1042 and that maximal adsorption was at 220 nm and 277 nm. The antifungal substance was composed of Asn₃, Gln₂, Ser₁, Gly₁, and Tyr₁. The composition and structural characteristics of antifungal substance were analysed by ¹H-NMR spectrum, ¹H-COSY, HMQC, which revealed that the compound belongs to the iturin A family. Temperature and pH had little effect on the stability of the antifungal substance in the ranges of -70~121°C and pH 6.0~10.0, respectively. It showed strong antibiotic activity against fungi. An *in vitro* cytotoxicity test using NIH3T3 cell showed that the antifungal substance does not have cytotoxicity. The number of circulating leukocytes and the hematobiological analysis of the mice administered with the antifungal substances was similar to those of the control group, indicating no cytotoxicity *in vivo*. Therefore, the antifungal substances extracted from culture broth of *Bacillus amyloliquefaciens* IUB158-03 have future potential as biocontrol agents against plant diseases caused by fungi.

Key words : Antifungal substance, *Bacillus amyloliquefaciens*, cytotoxicity

서 론

최근에 환경보호와 생태계 보전에 관해 국제적인 관심이 집중되면서 식물병의 방제를 위한 유기화학 농약의 과다사용으로 토양오염, 환경과 생태계의 파괴, 인축의 독성 등의 피해로 인한 문제점이 대두되고 있다. 이에 화학농약으로 인한 부작용을 해결하기 위하여 생태계에서 조절적 역할을 하는 미생물의 대사산물 및 추출물을 이용하여 직접 병원균과 길항작용을 하도록 하는 생물적 방제법이 진행되고 있다[18]. 1959년 미국, 영국에서 *Streptomyces griseus*가 생산하는 cycloheximide[7], *Penicillin nigricans*가 생산 하는 griseofulvin[6] 등이 제품화되어 사용되었으나 독성과 경제성 문제로 생산이 제한되었다. 그 후 *Streptomyces setonii*에서 벼 도열병에 선택적 효과가 있는 blasticidin S[17,19], *Streptomyces kasugaensis*에서는 kasugamycin[29]가 분리되어 실용화되었으며, 이외에도 polyoxin[8], validamycin[25] 등이 상품화되었다. 그리고 가장 성공적인 생물농약으로 *Agrobacterium radiobacter*를 이용하여 개발된 Galltro-A, Nogall/Diegall, Norbac84C 등의 제품이 등록되어 사용되고 있으며, *Pseudomonas cepacia*가 생산하는 항진균물질 pyrrolinitrin, *Pseudomonas fluorescens*가 생산하는 2,4-diacetylphloroglucinol이 규명되었으며, Bio-Save

(EcoScience), Blue Cicle (Stine Seed), Dagger (Ecogen) 등이 상품화되었다[30]. 최근 *Bacillus*속이 내생포자를 형성하여 환경 변화에 적응력이 우수하다는 점 때문에 제품의 보관성 및 대량 생산 방법에 유리한 점과 미국식품의약국(FDA)에 의해 인축에 대한 안전성이 입증되어 연구자들의 관심을 모으고 있다.

*Bacillus*속이 생산하는 항진균물질들은 *B. subtilis*가 생산하는 iturin A, mycosubtilin, fengycin, bacillopeptins, cyclic lipopeptide 계통의 bacillomycin A, D, F, L, S 의 구조가 밝혀졌으며[1,11,23], *B. licheniformis* BC98로부터 surfactin[27], *B. polymyxa* KT-8로부터 fusaricidins A, B, C, D [10] 등이 확인되었다. 또한 *B. amyloliquefaciens* RC-2가 생산한 iturin계열의 항생물질을 뽕나무의 탄저병균인 *Collectotrichum dematium*의 방제에 이용했다는 연구 보고가 있다[26]. 현재 *B. subtilis*가 생산하는 항진균질을 이용한 미생물제제는 Kodiak (Gustafson)으로 상품화되어 사용되고 있다[3].

생물농약이 일반 화학농약에 비해 약효가 낮고, 환경에 따라 약효의 변동이 심하다는 결점이 있으나, 농산물에 독성물질이 잔류하는 염려가 없고 생태계에 안정성이 있다는 이점이 있어 환경 보호가 절실한 이 시기에 더욱 개발할 가치가 있다고 생각된다. 또한 외국에서 수입되는 미생물제제보다는 국내 부존자원인 토착미생물을 이용한 생물농약의 사용이 우리나라 기후와 토양환경에 잘 적응하여 더욱 효과적일 것으로 기대가 되고 있다.

우리나라 환경조건에 적응하며, 광범위한 항균력을 나타내

***Corresponding author**

Tel : +82-32-835-8242, Fax : +82-32-835-0763

E-mail : tslee@incheon.ac.kr

는 균주를 탐색하기 위하여 탄저병에 감염된 고추열매로부터 *Bacillus* spp 균주를 선별적으로 분리하고 동정하여 *Bacillus amyloliquefaciens* IUB158-03이라 명명하였다. 그리고 항진균물질을 정제하여 각종 진균에 광범위한 항균력이 있음을 확인하였다[13]. 본 연구는 *Bacillus amyloliquefaciens* IUB158-03 균주에서 분리·정제된 항진균물질의 물리·화학적 특성과 구조를 규명하고, 세포 및 동물실험을 통해 독성여부를 파악하여 인체 안정성을 확인하고자 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험 시료

B. amyloliquefaciens IUB153-03로부터 분리·정제한 항진균물질의 특성분석 및 독성시험을 하였다[16].

항진균물질의 특성 분석

유기용매에 대한 용해성

항진균물질의 water, acetic acid, acetone, methanol, chloroform, dichloromethane, hexane 등의 유기용매에 대한 용해성을 알아보기 위하여 항진균물질 100 µg/ml를 6시간 동안 실온에 방치한 후 원심분리하여 상층액을 얻어 Speed vac을 이용하여 건조시킨 다음 *C. gloeosporioides*를 대상으로 paper disc 방법에 의한 항진균 활성을 조사하였다.

pH에 대한 안정성

항진균물질의 pH에 대한 안정성을 알아보기 위하여 pH 3.0은 1M glycine 완충용액, pH 4.0~6.0은 1M citric acid 완충용액, pH 7.0~9.0은 1M tri (hydroxymethyl) aminomethane 완충용액, pH 10.0은 glycine-NaOH buffer 완충용액에 항진균물질 100 µg/ml로 처리하였다. 실온에 방치한 후 원심분리하여 상층액을 얻어 항진균 활성을 조사하였다.

온도에 대한 안정성

항진균물질의 온도에 대한 안정성을 알아보기 위하여 -70°C, -20°C, 4°C, 30°C에서 24시간, 50°C, 70°C, 90°C, 100°C에서 1시간, 121°C에서 15분, 121°C에서 30분 동안 처리한 후 원심분리하여 상층액을 얻어 항진균 활성을 조사하였다.

항진균물질의 성분 분석

TLC를 이용한 항진균물질 성분 확인

항진균물질의 성분을 확인하기 위하여 methanol로 용해한 다음 TLC plates에 점적한 후 ethyl acetate-methanol-water (50:18:5, v/v/v)로 전개시킨 다음 ninhydrin solution, aniline으로 분무하여 110°C에서 10분 동안 처리한 후 발색 정도를 확인하였다[14].

UV spectroscopy

항진균물질을 methanol로 용해시켜 200 nm에서 800 nm까

지 UV spectroscopy를 이용하여 흡광도를 측정하였다(Specord S10, Zeiss, Germany).

FAB-mass spectrum

항진균물질의 분자량은 FAB(JEOL JMS-AX505WA) mass spectrum을 이용하여 FAB ion화 방법으로 측정하였다.

아미노산 조성 분석

항진균물질의 아미노산 조성을 분석하기 위하여 6N HCl에 녹여 110°C에서 24시간 반응시켜 가수분해하고, 증류수로 희석한 다음 완전히 건조시켜 methanol, H₂O, triethylamine, phenylisothiocyanate가 7:1:1:1로 혼합된 PITC (phenylisothiocyanate)로 유도체를 시약 20 µl를 넣고 실온에서 20분 동안 방치한 다음 완전히 건조시켰다. 이 PITC유도체를 CH₃CN 인산완충용액에 녹여 PICO-TAG column을 이용한 HPLC (Hewlett Packard 1100 Series)를 통하여 분석하였다[2].

NMR spectroscopy에 의한 분자구조 분석

항진균물질을 MeOH에 용해시켜 ¹H-NMR spectrum, ¹H-COSY, HMQC을 600 NMR (Bruker, Avance-600)로 분석하였으며, 내부 표준물질로는 tetramethylsilane (TMS)를 사용하였으며 chemical shift는 δ value로 ppm 단위로 나타내었다.

항진균물질의 독성 실험

세포독성 실험

항진균물질의 세포독성을 알아보기 위해서 MTT{3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide} 방법을 사용하였다[21]. 서울대학교에서 분양 받은 NIH3T3 (마우스 섬유아 정상 세포)을 2×10⁵ cells/ml 로 희석하여 96 well plate (Corning Co., USA)에 100 µl 씩 주입하여 배양한 다음 세포의 상층액을 제거한 후 항진균물질을 0, 10, 50, 100, 500, 1,000, 2,000 µl/ml의 농도로 100 µl 씩 처리하여 배양하였다. 암 조건에서 well 당 5 µg/ml 농도의 MTT solution을 10 µl 씩 첨가 한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 암 상태로 배양하였다. 푸른색의 MTT formazan이 생성되면 DMSO로 용해시켜 ELISA plate reader (Wavepower 340, Bio-Tek Co., USA)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다[24]. 실험군의 흡광도를 대조군의 흡광도와 비교하여 생존율을 구하였으며, 50% inhibition concentration (IC₅₀)은 생존율에 의거하여 구하였다.

$$\text{Viability (\%)} = \frac{(T-B)}{(C-B)} \times 100$$

T: 실험군의 평균 흡광도

C: 대조군의 평균 흡광도

B: 기준 흡광도

혈액 중 백혈구 수와 혈액 생화학적 검사

4주령의 ICR 수컷 마우스(20~25 g)를 사용하였으며, 대조

균은 생리식염수를 경구투여하고, 나머지 4군은 항진균조추출물을 500, 1,000, 2,500, 5,000 mg/kg body weight 농도로 stomach tube를 이용하여 경구투여 한 후[15], 부검하여 심장 채혈한 혈액을 K₂ ethylenediamineteraacetic acid(EDTA)가 포함된 CBC용기(Becton Dickinson Co., USA)에 넣어 잘 섞은 다음 Turk's solution으로 염색한 후 혈구계수기로 백혈구 수를 측정하였다.

항진균물질이 간, 신장, 담관 등의 장 기능에 영향이 미치는지를 알아보기 위하여 심장 채혈한 다음 원심 분리하여 혈청을 얻은 후 혈액 생화학적 검사 자동분석장치(200FR, Toshiba, Japan)로 혈액 생화학적 검사를 하였다.

결과 및 고찰

항진균물질의 특성 분석

항진균물질의 특성분석을 위하여 유기용매에 대한 용해성, pH와 온도에 대한 안정성을 *C. gloeosporioides*를 대상으로 항진균 활성을 실험하였다.

항진균물질이 methanol에 용해되어 나타난 활성을 100%로 하여 극성이 높은 용매인 water, acetic acid에서 항진균 활성을 보였으며, 극성이 낮은 용매인 acetone, chloroform, dichloromethane과 비극성 용매인 hexane에서는 항진균 활성을 보이지 않았다. 그러므로 항진균물질은 극성물질인 것으로 입증되었다(Table 1).

또한 pH에 대한 안정성은 pH 7.0을 100%로 하여 pH 6.0~8.0까지는 동일한 안정성을 나타냈으나, pH 3.0에서는 용해가 잘 되지 않아 활성이 낮았으며, pH 4.0, pH 5.0에서 용해는 되었지만 항진균 활성이 감소하는 경향을 나타냈다(Table 2). 온도에 대한 안정성은 낮은 온도에서 나타난 항진균 활성과 100°C에서 1시간, 121°C에서 15분, 121에서 30분 동안 열 처리

Table 1. Solubility of the antifungal substance purified from the crude culture extract of *B. amyloliquifaciens* IUB158-03 in various solvents

| Solvents | Inhibition zone diameter (mm) ^a | Antifungal activity (%) ^b |
|-----------------|--|--------------------------------------|
| Water | 20 | 100 |
| Acetic acid | 15 | 75 |
| Acetone | 0 | 0 |
| Methanol | 20 | 100 |
| Chloroform | 0 | 0 |
| Dichloromethane | 0 | 0 |
| Hexane | 0 | 0 |

^aA paper disc (8 mm in diameter) containing 50 µl of the antifungal substance purified was evaluated for the growth inhibition of *C. gloeosporioides*.

^bInhibition values were calculated as percentages of the growth of *C. gloeosporioides*.

Table 2. Different pH on the stability of the antifungal substance purified from the crude extract of *B. amyloliquifaciens* IUB158-03

| pH | Inhibition zone diameter (mm) ^a | Antifungal activity (%) ^b |
|----|--|--------------------------------------|
| 3 | 10 | 50 |
| 4 | 12 | 60 |
| 5 | 15 | 75 |
| 6 | 20 | 100 |
| 7 | 20 | 100 |
| 8 | 20 | 100 |
| 9 | 20 | 100 |
| 10 | 20 | 100 |

^aA paper disc (8 mm in diameter) containing 50 µl of the antifungal substance purified was evaluated for the growth inhibition of *C. gloeosporioides*.

^bInhibition values were calculated as percentages of the growth of *C. gloeosporioides*.

하여 확인된 항진균 활성 정도가 동일하게 나타났으므로 높은 온도에도 매우 안정하다는 것을 확인할 수 있었다(Table 3). 이는 *Bacillus* spp.가 생산하는 iturin이 열, 산 및 알칼리에 안정한 물질이며, 식물병원 진균 및 세균에 효과가 있다는 연구 보고[9,12,28]와 유사한 것으로 나타났다. 또한 고열에 대한 항진균물질의 안정성은 미생물제제화 공정 과정 중에서 열을 가하여 건조시킬 경우에 발생될 수 있는 항진균력의 감소를 극복할 수 있다고 판단된다.

항진균물질의 성분 분석

항진균물질을 TLC를 이용하여 성분을 확인한 결과 Table 4와 같이 ninhydrin용액에서는 자주색을 나타내었으나, aniline용액에서는 발색되지 않았다. α-아미노산, 펩타이드 및 단

Table 3. Different temperature on the stability of the antifungal substance purified from the crude culture extract of *B. amyloliquifaciens* IUB158-03

| Temperature (°C) | Time ^c | Inhibition zone diameter (mm) ^a | Antifungal activity (%) ^b |
|------------------|-------------------|--|--------------------------------------|
| -20 | 12 hr | 24 | 100 |
| 70 | 1 hr | 24 | 100 |
| 90 | 1 hr | 24 | 100 |
| 100 | 1 hr | 24 | 100 |
| 121 | 15 min | 24 | 100 |
| 121 | 30 min | 24 | 100 |

^aA paper disc (8 mm in diameter) containing 50 µl of the antifungal substance purified was evaluated for the growth inhibition of *C. gloeosporioides*.

^bInhibition values were calculated as percentages of the growth of *C. gloeosporioides*.

^cSamples were held for the various time interval.

Table 4. Color reactions of the antifungal substance purified from the crude culture extract of *B. amyloliquefaciens* IUB158-03

| Solvent system | Color reaction at 110°C |
|---------------------------------|-------------------------|
| ninhydrin solution ^a | purple |
| aniline ^b | colorless |

^aNinhydrin (0.2%) in ethanol.

^b0.2 ml of aniline was added to the mixture of 100 ml acetone, 2 g diphenylamine, and 10 ml phosphoric acid (85%).

백질들은 100°C 근처에서 ninhydrin과 반응하여 자주색의 착색물질을 만든다는 사실로 보아 항진균물질은 아미노산으로 구성되어 있다는 것을 알 수 있었으며, aniline에는 발색되지 않았기 때문에 구성요소 중 당은 함유되어 있지 않은 것으로 확인되었다.

UV spectroscopy

항진균물질을 UV spectroscopy 결과 220 nm, 277 nm에서 λmax로 측정되었다(Fig. 1). 이는 *B. subtilis*로부터 cyclic lipopeptide의 길항물질인 bacillomycin D는 에탄올 용액에서 200 nm, 275 nm에서 최대 흡광도를 나타냈으며[22], bacillomycin F는 203 nm, 275 nm에서 최대 흡광도를 나타냈다는 보고[20]와는 약간의 차이를 보였지만 200 nm부분과 275 nm에서 최대 흡광도를 갖고 있는 것은 peptide 결합과 방향족 아미노산으로 구성되어 있다는 것을 확인할 수 있었다.

FAB-mass spectrum

항진균물질의 분자량은 FAB ion화 방법으로 측정하여 분자량을 분석한 결과, Na⁺ ion이 결합한 상태에서 1065의 분자량을 갖는 것으로 나타났으며, 따라서 *B. amyloliquefaciens* IUB158-03이 생산한 항진균물질의 분자량은 1,042 Da임이 확인되었다(Fig. 2). Yu and Sihclair [31]에 의하면 *B. amyloliquefaciens* B94인 항진균물질의 분자량이 1,044 Da이며, 열에 안정

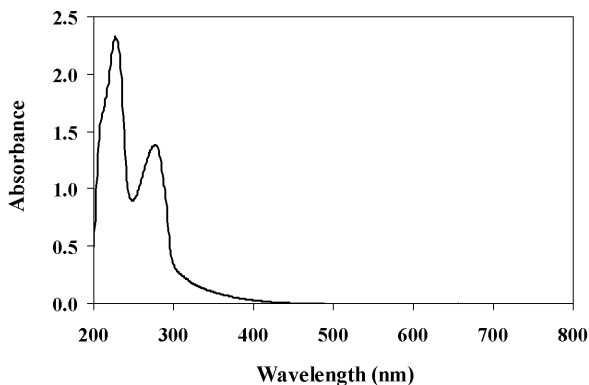


Fig. 1. UV absorption spectrum of antifungal substance purified from the crude culture extract of *B. amyloliquefaciens* IUB158-03.

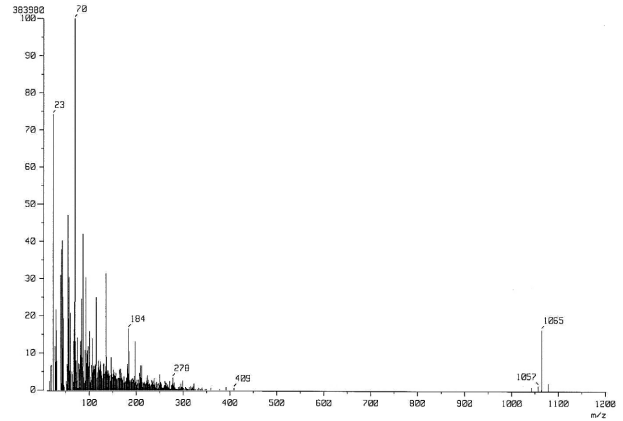


Fig. 2. Positive ion FAB-mass spectrum of the antifungal substance purified from the crude culture extract of *B. amyloliquefaciens* IUB158-03.

한 peptide라는 결과와 매우 유사하게 나타났다. 그리고 *Bacillus subtilis* KS03가 생산하는 iturin A의 분자량이 1,042 Da였으며[5], *Bacillus subtilis* JA에 의해 생산된 lipopeptides iturin A의 분자량도 1042.4 Da와 1056.5 Da의 두 가지의 성분을 얻을 수 있었다[4].

아미노산 분석

항진균물질의 아미노산 조성은 Table 5와 같이 asparagine & aspartic acid, glutamine, serine, glycine, tyrosine이 확인 되었으며, 이들의 mole비는 분석 결과를 토대로 계산해 보면 3:2:1:1:1로 구성되었다. Syuntaro 등[26]에 의하면 *B. amyloliquefaciens* RC-2가 생산하는 iturins는 Asn₃, Gln₂, Pro₁, Ser₁, Tyr₁으로 구성되었으며, 또한 *Bacillus subtilis*.가 생산하는 iturin A는 Asn₃, Gln₂, Pro₁, Ser₁, Tyr₁, iturin C는 Asn₄, Gln₂, Pro₁, Tyr₁으로 구성되었다고 연구보고 되었다[16]. 이에 *B. amyloliquefaciens* IUB158-03에서 생산한 항진균물질의 아미노산 조성이 기존에 알려진 *Bacillus* spp.가 생산한 항진균물질과 다르다고 판단되었다.

NMR spectroscopy에 의한 분자구조 분석

항진균물질의 구조를 규명하기 위하여 ¹H-NMR spectrum, ¹H-COSY, HMQC으로 분석한 결과 0.85 ppm은 aliphatic

Table 5. Amino acid composition of the antifungal substance purified from crude culture extract of *B. amyloliquefaciens* IUB158-03

| Amino acid | Molar ratio% | (nmol/ml) |
|----------------------------|--------------|-----------|
| Asparagine & Aspartic acid | 31.58 (3) | 306.68 |
| Glutamine | 15.25 (2) | 148.16 |
| Serine | 10.17 (1) | 98.80 |
| Glycine | 9.55 (1) | 92.72 |
| Tyrosine | 8.18 (1) | 79.43 |

chain에 methyl가 존재함을 확인할 수 있었으며, 1.27 ppm의 큰 peak는 methylene group의 긴 사슬이 존재함을 의미한다. 1.5-3.6 ppm 부분에서는 Asn, Gln, Ser, Tyr 등 α-아미노산의 β-또는 γ-탄소에 수소 결합되어 있음을 확인하였다. 4.0-4.5 ppm부분은 α-탄소에 결합되어 있는 수소를 나타내며, 6.7 ppm과 7.7 ppm의 두 doublet은 방향족화합물을, 7 ppm 부근에서 doublet을 보이는 것은 tyrosine의 유도체가 함유되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 3). 이러한 분석 결과 *B. amyloliquefaciens* IUB158-03에서 생산한 항진균물질은 iturin계에 속하는 물질로 밝혀졌으나, 아미노산의 조성이 기존에 밝혀진 성분과 차이점이 있어 앞으로 새로운 항진균물질 개발의 가능성이 있다고 판단되어 물질의 구조 분석에 대한 연구를 진행하고 있다.

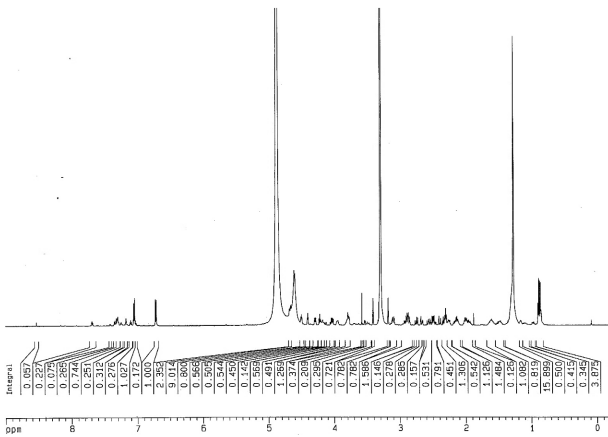


Table 7. Hematobiological analysis in ICR mice administered with the crude culture extract of *B. amyloliquefaciens* IUB158-03

| Dose (mg/kg body weight) | control | 500 | 1000 | 2500 | 5000 |
|--------------------------|------------------------|-----------|------------|------------|------------|
| No. of mice | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Total protein (g/dl) | 4.88±0.15 ^f | 4.41±0.06 | 4.91±0.12 | 4.77±0.16 | 4.95±0.04 |
| Albumin (g/dl) | 1.93±0.09 | 1.72±0.03 | 1.92±0.09 | 1.86±0.11 | 1.95±0.04 |
| ALP ^b (IU/l) | 245±7.07 | 243±16.26 | 274±41.71 | 234±14.14 | 316±4.94 |
| AST ^c (IU/l) | 84.5±27.58 | 60±5.66 | 77±24.04 | 62±14.14 | 71.5±12.02 |
| ALT ^d (IU/l) | 35±2.83 | 28.5±4.94 | 28.5±3.54 | 30.5±2.12 | 27.5±0.71 |
| Bilirubin (mg/dl) | 0.22±00.00 | 0.17±0.04 | 0.21±0.01 | 0.19±0.01 | 0.21±0.01 |
| Cholesterol (mg/dl) | 183.5±40.3 | 142±9.89 | 200±16.97 | 155±11.31 | 166±1.41 |
| BUN ^e (mg/dl) | 15.15±1.76 | 15.4±4.67 | 16.85±0.63 | 19.1±4.066 | 17.9±0.07 |
| Glucose (mg/dl) | 315±9.89 | 301±11.31 | 274±16.26 | 194±29.7 | 199±16.97 |
| Creatinine (mg/dl) | 0.41±0.01 | 0.38±0.00 | 0.38±0.00 | 0.34±0.01 | 0.35±0.01 |

^aWBC: white blood cell, ^bALP: alkaline phosphatase, ^cAST: aspartate aminotransferase, ^dALT: alanine aminotransferase, ^eBUN: blood urea nitrogen, ^fMean±S.E.

결과 세포독성이 없는 것으로 확인되었으므로 항진균물질이 인·축에 해로운 영향을 주지 않는다고 판단되었다. 이는 항진균물질을 식물병의 생물적 방제제로 사용하였을 경우 식물에 잔류되어 사람이 섭취하더라도 인체에 유해한 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었으며, 생물농약의 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

요 약

B. amyloliquefaciens IUB158-03균주에서 정제된 항진균물질은 극성인 용매에 잘 용해되고, pH 6.0~10.0와 -70~121°C에서와 같이 넓은 범위의 온도 및 pH에서 안정성을 보였다. 항진균물질의 FAB-MS, UV 흡수 스펙트럼, 아미노산 조성 등을 분석한 결과 분자량은 1,042 이었고, TLC를 이용하여 분석한 결과 ninhydrin solution에서 보라색으로 발색되었다. UV 스펙트럼은 220 nm, 277 nm에서 λ_{max} 를 보였으며, Asn₃, Gln₂, Ser₁ Gly₁, Tyr₁의 아미노산 조성을 갖는 것으로 나타났다. 그리고 ¹H-NMR spectrum, ¹H-COSY, HMQC 을 분석한 결과 iturin A계에 속하는 물질로 확인되었다. NIH3T3 섬유아세포에 대해 항진균물질이 세포독성을 나타내지 않는 것은 물론 마우스에 항진균물질을 경구투여하여 장기 내의 변화와 백혈구 수, 생체내의 생리적인 기능면에서 정상 마우스와 차이를 보이지 않았으므로 생체독성이 없는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구를 통하여 *B. amyloliquefaciens* IUB158-03에서 분리된 항진균물질이 앞으로 고추탄저병의 생물적 방제제로 이용될 수 있는 잠재성을 갖고 있는 것으로 사료된다.

References

- Besson, F., F. Peypoux, G. Michel, and L. Delcambe. 1977. Structure de la Bacillomycin L, antibiotics gene de *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* **77**, 61-67.
- 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.
- Brannen, P. M. and D. S. Kenney. 1997. Kodiak-a successful biological-control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 169-171.
- Chen, H., C. Yuan, K. Cai, Z. Zheng, and Z. Yu. 2008. Purification and identification of iturin A from *Bacillus subtilis* JA by electrospray ionization mass spectrometry. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* **48**, 116-120.
- Cho, S. J., S. K. Lee, B. J. Cha, Y. H. Kim, and K. S. Shin. 2003. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS. Microbiol. Lett.* **6**, 47-51.
- De Carli, L. and L. Larizza. 1988. Griseofulvin. *Mutat. Res.* **195**, 191-196.
- Dykstra, K. H. and H. Y. Wang. 1990. Feedback regulation and the intracellular protein profile of *Streptomyces griseus* in a cycloheximide fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 191-197.
- 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.
- Gueldner, R. C., C. C. Reilly, P. L. Pusey, C. E. Costello, R. F. Arrendale, R. H. Cox, D. S. Himmelbach, F. G. Crumley, and H. G. Cutler. 1988. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. *J. Agri. Food. Chem.* **36**, 366-370.
- Kajimura, Y. and M. Kaneda. 1997. Fusaricidins B, C and D new depsipeptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa* KT-8: isolation, structure elucidation and biological activity. *J. Antibiot (Tokyo).* **50**, 220-228.
- Kajimura, Y., M. Sugiyama, and M. Kaneda. 1995. Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus Subtilis* RF-2. *J. Antibiot (Tokyo).* **48**, 1095-1103.

12. Katz, E. and A. L. Demain. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.* **41**, 449-474.
13. Kim, H. Y. and T. S. Lee. 2009. Isolation of antifungal substances by *Bacillus amyloliquefaciens* IUB158-03 and antagonistic activity against pathogenic fungi. *Kor. J. Mycol.* **37**, 96-103.
14. Kim, S. H., B. C. Hyun, J. W. Suh, C. O. Kim, C. S. Yon, D. K. Lee, K. P. Kim, J. K. Jung, Y. H. Lim, and C. H. Lee. 1993. Taxonomy, purification and physicochemical properties of novel antifungal antibiotics AF-011A. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 556-563.
15. Kim, S. U., J. W. Lee, S. H. Lee, and S. H. Bok. 1991. Identification of bacteria having antifungal activity isolated from soils and its biological activity. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 337-342.
16. Konz, D., S. Doekel, and M. A. Marahiel. 1999. Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. *J. Bacteriol.* **181**, 133-140.
17. Kuhnt, M., F. Bitsch, M. Ponelle, J. J. Sanglier, Y. Wang, and B. Wolff. 1998. Microbial conversion products of leptomyacin B. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 714-720.
18. Kuthubutheend, A. J. and G. J. F. Pugh. 1983. The effects of fungicides on soil fungal populations. *Soil Biol. Biochem.* **11**, 297-303.
19. Larsen, S. H., D. M. Berry, J. W. Paschal, and J. M. Gilliam. 1989. 5-Hydroxy methyl blasticidin S and blasticidin S from *Streptomyces setonii* culture A83094. *J. Antibiotics.* **42**, 470-471.
20. Mhammedi, A., F. Peypoux, F. Besson, and G. Michel. 1982. Bacillomycin F, a new antibiotic of iturin group: Isolatibiotic Characterization. *J. Antibiotics (Tokyo).* **35**, 306-311.
21. Mossman, B. T. 1983. *In vitro* approaches for determining mechanisms of toxicity and carcinogenicity by asbestos in the gastrointestinal and respiratory tracts. *Environ. Health Perspect* **53**, 155-161.
22. Peypoux, F., F. Besson, and G. Michel. 1980. Characterization of a new antibiotic of iturin group: Bacillomycin D. *J. Antibiotics* **33**, 1146-1149.
23. Peypoux, F., M. T. Pommier, B. Das, C. F. Besson, L. Delcambe, and G. Michel. 1984. Structure of Bacillomycin D and Bacillomycin L peptidolipid antibiotics from *Bacillus subtilis*. *J. Antibiotics.* **37**, 1600-1604.
24. Price, P. and T. J. McMillan. 1990. Use of the tetrazolium assay in measuring the response of human tumor cells to ionizing radiation. *Cancer Res.* **150**, 1392-1396.
25. Robson, G. D., P. J. Kuhn, and A. P. Trinic. 1988. Effects of validamycin A on the morphology, growth and sporulation of *Rhizoctonia cerealis*, *Fusarium culmorum* and other fungi. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 3187-3194.
26. Syuntaro, H., S. Yoshida, H. Sugie, H. Yada, and Y. Fujii. 2002. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry* **61**, 693-698.
27. Tendulkar, S. R. and Y. K. Saikumari, V. Patel, S. Raghotama, T. K. Munshi, P. Balaram, and B. B. Chattoo. 2007. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 2331-2339.
28. Turner, J. T. and P. A. Backman, 1991. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Dis.* **75**, 347-353.
29. Umezawa, H., Y. Okami, T. Hashimoto, Y. Suhara, M. Hamada, and T. Takeuchi. 1965. A new antibiotic, Kasugamycin. *J. Antibiotics.* **5**, 753-757.
30. William, Q. 1996. "New Microbial Pesticides for IPM", *The IPM Practitioner.* **8**, 5-10.
31. Yu, G. Y. and J. B. Sihclair. 1997. Purification and identification of an antifungal protein produced by a potential biocontrol *Bacillus amyloliquefaciens* B94 (Abstracts). *J. Phytopathology.* **87**, 107.