

Bacillus subtilis LAM 97-44가 생산하는 항진균성 항생물질의 정제 및 특성

이동희* · 이노운 · 권태종

건국대학교 공과대학 미생물공학과

(2003년 3월 3일 접수, 2003년 4월 28일 수리)

병원에서 분리한 azole계 항진균성 항생물질에 대한 내성을 가지고 있는 *Candida albicans*에 대해 강한 활성을 가지는 항진균성 물질을 *Bacillus subtilis* LAM 97-44의 배양액으로부터 분리 정제한 후 그 특성을 조사하였다. 원심분리한 배양상등액을 butanol 추출, Diaion HP-20과 Dowex-50 adsorption chromatography, silica gel flash chromatography와 HPLC로 정제하였고 TLC와 HPLC로 확인하여 그 물질을 LAM-44A라 명명하였다. LAM-44A는 pH와 열에 매우 안정하였으며 *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.* 등에 대해 강한 활성을 나타낸 반면에 독성은 매우 적었다. 분리한 물질은 273 nm에서 최대흡광도를 가진 용점 202°C의 무색분말이었고 ninhydrin 반응결과 음성이었고 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR spectrum, 원소분석 등의 결과로 볼 때 분자량 282의 C₁₄H₃₄O₅의 화학식을 가진 물질로 동정되었다.

Key words: *Bacillus subtilis* LAM 97-44, antifungal antibiotic, azole-resistant *Candida albicans*

서 론

항진균성 물질에 대한 연구는 사람 및 동물의 진균성 질환의 치료목적과 더불어 각종 농작물의 항생물질을 이용한 병충해 방제나 식품산업, 목재 처리 등을 목적으로 활발히 진행하고 있으나 안전성이나 유효성 및 경제성 등으로 인해서 진균감염증 치료에 실용화되고 있는 것은 극히 드문 실정이다.^{1,3)}

그래서 본인 등은 독성이 적고 항진균성 활성이 강력한 새로운 항생물질을 얻기 위해 유용미생물을 토양에서 선별하던 중 인체 진균증을 일으키는 azole-resistant *Candida albicans* 등의 진균류에 감수성이 큰 항생물질은 생산하는 *Bacillus sp.* LAM 97-44를 분리하였다. 전보^{4,5)}에서는 균의 분리 및 동정과 생산조건의 최적화 등에 관해 발표하였으며, 본보에서는 물질의 특성에 관해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양. 실험에 사용한 균주는 시내의 S, St.K 등의 병원에서 분리한 azole계 항생물질에 대해서 내성이 비교적 큰 *Candida albicans*에 강한 활성을 가진, 토양으로부터 분리한 *Bacillus subtilis* LAM 97-44이며, 항진균성 항생물질을 생산하기 위해서 1.2% glucose, 0.8% glycerol, 0.1% malt extract, 0.2% NH₄H₂PO₄, 0.1% K₂HPO₄, 0.02%MgSO₄·7H₂O, 0.03% FeSO₄·7H₂O (pH 7.0) 조성의 배지 3 l을 5 l fermenter(Mituwa KJM-5S)에 넣고 전배양액을 2% 수준으로 접종하여 통기량 1 vvm, 교반속도 250 rpm으로 30°C에서 5일

간 배양한 후 원심 분리하여 그 상등액을 사용하였다.

항진균활성측정. 항진균성 항생물질의 정제 및 성질을 위한 항진균활성의 측정은 paper disc 방법으로 하였다. 직경 6 mm disc에 시료용액 30 μl을 흡수시킨 후 건조시켜, 시험균주인 *Candida albicans* IFO 0583을 도말한 Mueller-Hinton 한천평판배지에 올려놓은 다음 30°C에서 24시간 배양한 후 생긴 생육저지대의 크기를 관찰하였다. 항균 spectrum은 한천희석법으로 각 시험균에 대한 Minimal Inhibitory Concentration(MIC)을 측정하여 조사하였다.

항진균성 항생물질의 정제. *Bacillus subtilis* LAM 97-44가 생산하는 항진균성 항생물질을 정제하기 위하여 배양액 5 l을 4°C, 10,000×g에서 15분간 원심분리하였다. 상등액에 동량의 수포화 butanol을 첨가하여 1시간 진탕 추출하였으며, 같은 조작을 3회 반복한 후 모아서 감압농축건조한 다음 정제에 사용하였다. Butanol에 전용하여 감압농축건조한 것을 물에 녹인 후 Diaion HP-20 column (3.5×60 cm)에 충전한 다음 10-100% methanol의 10% 단위의 각 농도 용액 500 ml씩 용출시켰다. Diaion HP-20 column chromatography로 얻은 활성분획을 감압농축한 다음 0.5 N HCl로 활성분획을 Dowex-50 column(3.0×40 cm)에 흡착한 후 수세한 다음 0.5 N NaOH로 용출시킨 활성분획을 silica gel(70-230 mesh, Merk) column(2.0×30 cm)에 충전한 후 chloroform-methanol을 90:10-0:100%(v/v)의 10%차의 비율로 각 농도별로 300 ml씩 가압용출시켰다. 40:60 혼합용액에서 얻어진 활성분획을 감압농축한 후 HPLC(Waters 484)를 이용하여 최종 정제하였다. 이때 사용한 column은 YMC-pack silica column (2.0×25.0 cm, YMC, Japan)이었으며 butanol/dioxane/water (95:5:0.1, v/v) 혼합용매를 사용하여 분당 2.5 ml 속도로 용출하였으며 활성물질은 UV detector 250 nm에서 검출되는 peak를 분획하여 항진균활성을 측정하면서 정제하였다(Fig. 1).

*연락처

Phone: 82-2-450-3522, Fax: 82-2-3437-8360

E-mail: dhyi@konkuk.ac.kr

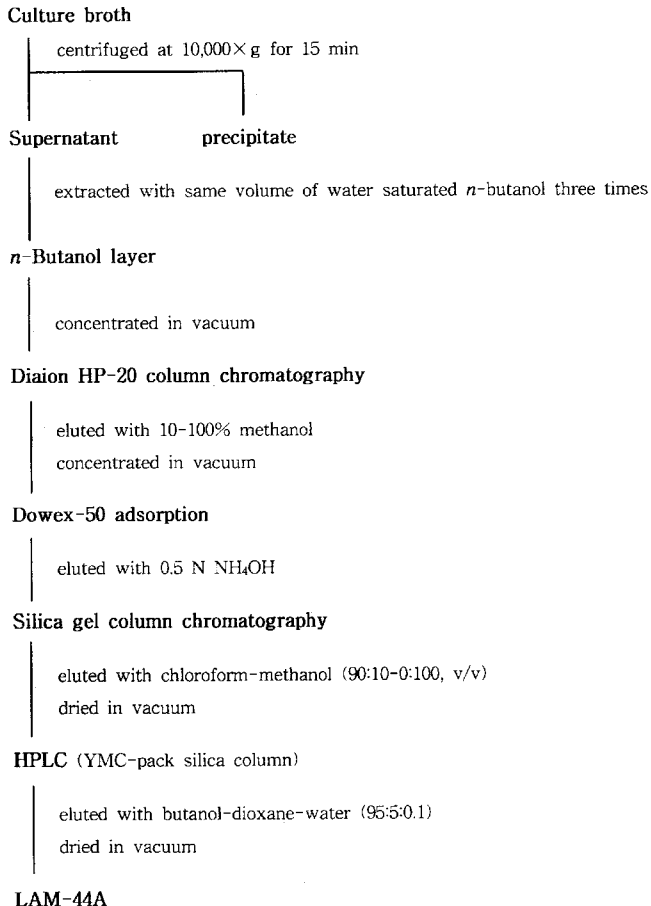


Fig. 1. Purification procedure of antifungal antibiotic LAM-44A produced by *Bacillus subtilis* LAM 97-44.

독성검사. 시험관내독성검사는 Sarcoma 180, MKN-45, P 388, HeLa, 3T3, mouse spleen cell 등을 이용하였으며 96 well culture plate에 각 세포수가 10⁴ cells/well이 되도록 우태 아혈청이 첨가된 RPMI 1640배지로 현탁 후 50 µl씩 분주한 다음 항진균성 항생물질 LAM-44A를 2단계씩 희석하여 50 µl씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양한 후 Carmichael 등⁶⁾의 MTT법으로 세포독성을 검사하였다.

생체 내 독성검사는 쥐(185-190 g)를 이용하였으며 각 구당 5마리를 사용하였다. 정제항생물질을 물에 녹인 후 매일 10 mg 씩 꼬리에 정맥주사하면서 체중을 측정하여 5마리의 평균치로 비교 검토하였다.

물리화학적 특성조사. TLC를 위해서 silica gel TLC plate (Merck F254 0.2 mm)를 사용하였으며 전개용매로는 Table 3의 용매를 사용하였고 실온의 밀폐용기에서 전개시킨 spot는 자외선 아래에서 관찰하였다. UV spectrum은 LAM-44A를 methanol에 녹여 UV spectrophotometer(Shimadzu UV-120A)를 사용하여 측정하였으며 IR spectrum은 KBr pellet으로 만든 다음 Biorad Digilab FTS-20/80으로 측정하였고 Perkin-Elmer Model 240C를 이용하여 원소분석 하였으며 Fisher melting point analyzer로 융점을 측정하였다. ¹H-NMR spectrum은 LAM-44A를 D₂O에 녹여서, ¹³C-NMR spectrum은 pyridine-d₅

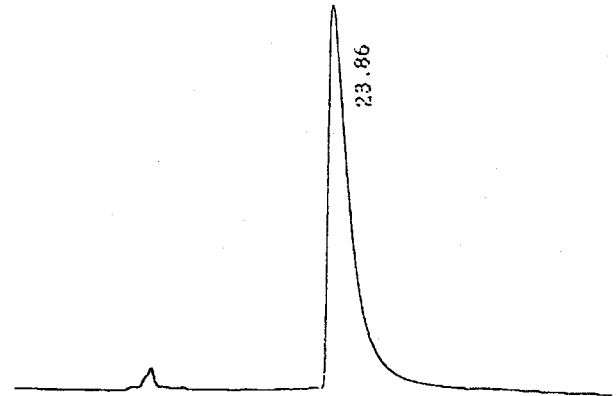


Fig. 2. HPLC profile of the antifungal antibiotic from *Bacillus subtilis* LAM 97-44.

에 녹여 Bruker Model 600을 사용하여 모두 400 MHz의 자기장에서 측정하였다.

결과 및 고찰

항진균성 물질의 정제. *Bacillus subtilis* LAM 97-44가 생산하는 항진균성 항생물질을 정제하기 위하여 원심분리한 배양상 등액에 동량의 수포화 butanol을 넣어 1시간 진탕 추출하였으며, 같은 조작을 3회 반복한 후 농축한 다음 소량의 물에 녹여 정제에 사용하였다. 먼저 Diaion HP-20 흡착 chromatography를 한결과 10% methanol로 용출시킨 분획에서 항진균활성이 있었다. 이 분획을 0.5 N HCl로 처리한 Dowex-50수지에 흡착시킨 후 0.5 N NH₄OH로 용출한 활성분획을 silica gel column chromatography를 하였다. Chloroform/methanol (90:10, v/v) 용액으로 가압 용출하여 얻은 활성분획을 HPLC로 정제하였다. YMC-Pack silica column (2×25 cm)을 사용하여 butanol/dioxane/water (95:5:0.1, v/v)를 용매로 분당 2.5 ml 속도로 용출한 결과 retention time 23.86과 36.41 peak에 항진균활성이 있었다. 이렇게 정제한 시료를 HPLC로 분석한 결과 완전히 정제되었음을 알 수 있었으며(Fig. 2), 각각을 LAM-44A와 B라 명명하고 이하의 실험에서는 정제된 시료 LAM-44A를 사용하였다.

항진균성 항생물질의 pH안정성. *Bacillus subtilis* LAM 97-44가 생산하는 항진균성 물질 LAM-44A 20 µg/ml 용액을 0.2 N HCl과 0.2 N NaOH용액으로 pH 2-12로 조정하고 4°C에서 12시간 방치 후 다시 pH7로 중화한 다음 잔존하는 항진균활성을 조사한 결과는 Fig. 3과 같이 중성에서 산성영역에서는 매우 안정하였으나 알칼리성에서는 다소 불안정하며 pH 12에서 약 30% 정도 실활하였다.

항진균성 항생물질의 열안정성. 항진균성 물질 LAM-44A를 10 µg/ml 농도로 해서 100°C, 121°C에서 60분간 처리하면서 열처리 시간에 따른 잔존활성도를 측정 한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 100°C에서 60분간 처리하여도 약 95% 이상의 활성을 유지하였으므로 본 물질은 기지의 항진균성 물질에 비해서 열에 매우 안정하다는 것을 알 수 있었다.^{7,8)}

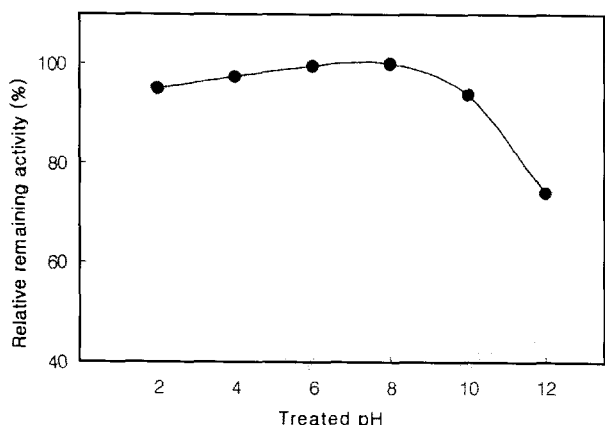


Fig. 3. pH stability of the antifungal antibiotic from *Bacillus subtilis* LAM 97-44.

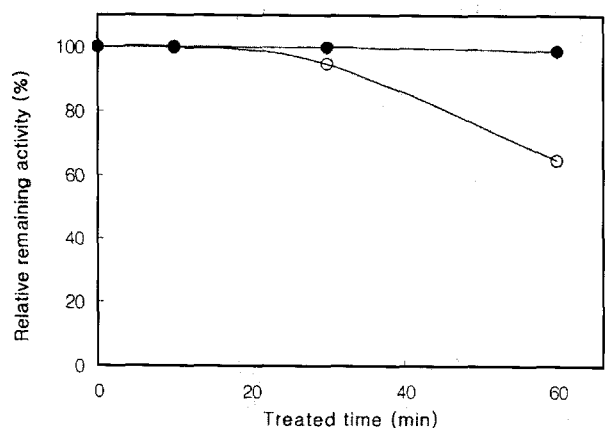


Fig. 4. Heat stability of the antifungal antibiotic from *Bacillus subtilis* LAM 97-44. (●: 100°C; ○: 120°C)

항진균성 항생물질의 생물학적 특성. 정제된 항진균성 항생물질 LAM-44A의 임상적으로 분리한 azole 내성 *Candida albicans*를 비롯한 효모, 곰팡이, 세균 등의 각종 미생물에 대한 최소생육억제농도(MIC)를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 즉 LAM-44A는 세균에 대해서는 높은 농도에서만 어느 정도 항균활성이 있었으나 *Aspergillus oryzae*, *A. flavus*와의 곰팡이에 대해서는 활성이 없었다. 그러나 병원에서 임상적으로 분리한 azole 내성 *C. albicans*의 몇 균주를 비롯한 *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* 등에 대해서는 강한 항진균활성을 나타내었다. 이러한 항균범위는 *Bacillus* sp.에서 얻은 신규 항진균성 항생물질인 cispentacin^{9,10}과 유도체¹¹)에 비해서는 넓었으나 azorybacilin^{12,13})에 비해서는 좁은 항균범위였으나 그 2종류의 항진균성 물질과 최소생육억제농도는 유사하였다. 한편 독성검사를 위하여 MTT법으로 *in vitro* 세포독성을 측정된 결과 Sarcoma 180, MKN-45, P388, HeLa, 3T3, mouse spleen cell 등의 사용한 모든 세포주에 대하여 1 mg/ml의 농도에서 전혀 독성을 나타내지 않았으며(테이터 미제시) 쥐를 이용한 급성 독성조사에서도 Table 2에서 보는 바와 같이 체중의 차이가 거의 없었기 때문에 독성이 없거나 적은 것으로 판단되었다.

항진균성 항생물질의 물리화학적 특성. *Bacillus subtilis*

Table 1. Antimicrobial spectrum of the antifungal antibiotic LAM-44A from *Bacillus subtilis* LAM 97-44

Test microorganisms	MIC (μg/ml)
<i>Candida albicans</i> IFO0583	0.5
<i>Candida albicans</i> ATCC 36801	0.7
<i>Candida albicans</i> *(azole-resistant)	1-3.5
<i>Cryptococcus neoformans</i> IFO 1197	1.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC 1552	15.0
<i>Torulopsis versatilis</i>	25.0
<i>Aspergillus flavus</i> IFO 6343	7.0
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642	>100.0
<i>Aspergillus oryzae</i> KCTC 1229	25.0
<i>Fusarium oxysporum</i> IFO9761	>100.0
<i>Rhizoctonia solani</i> IFO 6258	>100.0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	20.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	15.0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 65389	20.0

*5 strains of medically isolated.

Table 2. Acute toxicity of the antifungal antibiotic LAM-44A by administration to rat

Administrated days	Rat weight (g)	
	Non-administrated	Administrated
0	187	190
4	190	191
8	205	203
12	213	211
16	216	215

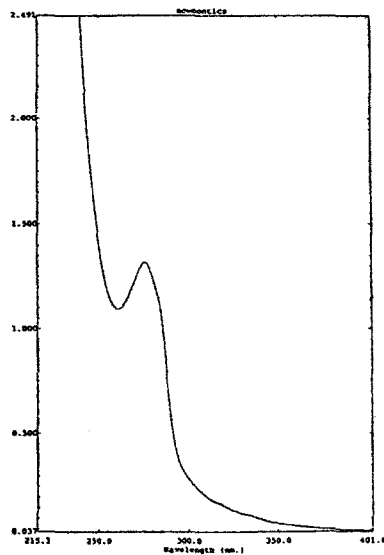
Five rats were used for each treatment and each rat was administrated 10 mg/day.

LAM 97-44가 생산하는 항진균성 항생물질 LAM-44A의 이화학적 특성은 Table 3에 나타난 바와 같이 무색의 분말로 melting point는 202°C이었으며 물, methanol, ethanol, butanol, dioxane, pyridine에는 잘 용해하였으나 acetone, chloroform, ethyl ether, butyl acetate, benzene, hexane 등에는 녹지 않아서 극성이 큰 물질로 판단되었다. Rf치는 dioxane-isopropanol-water (90:10:0.1)에서 0.37, acetonitrile-butanol-water (80:20:0.1)에서 0.63, butanol-methanol-water(40:40:20)에서 0.65였으며 ninhydrin 반응결과가 음성이었으므로 *Bacillus subtilis*가 생산하는 항진균성 항생물질인 iturins,¹⁴⁻¹⁶ bacillomycins^{17,18}와 mycosubtilins^{19,20} 등과는 달리 아미노산은 물론이고 아민기도 없는 것으로 나타났다.

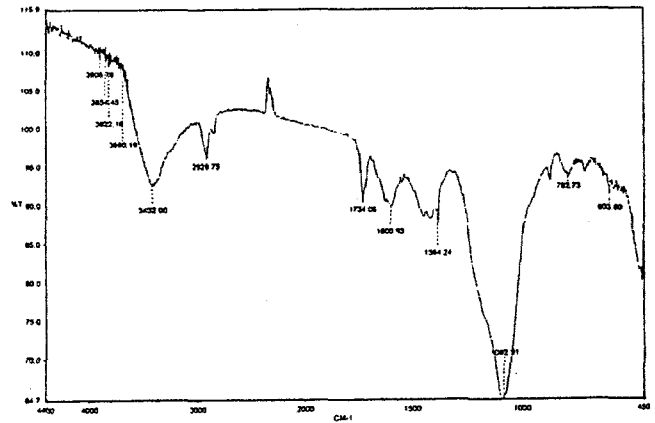
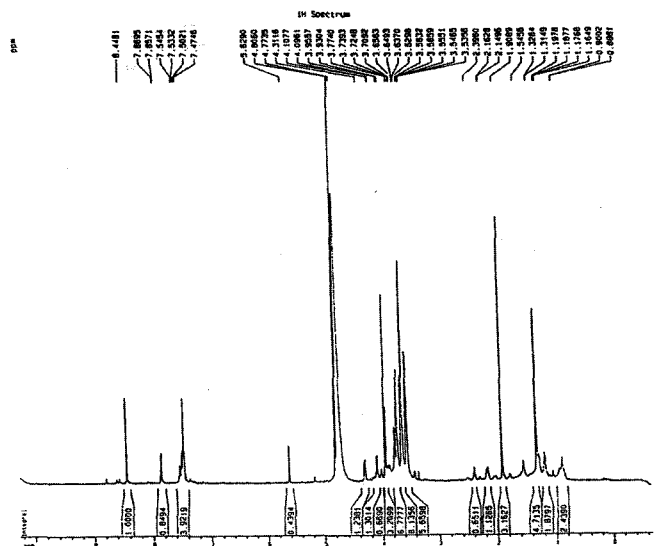
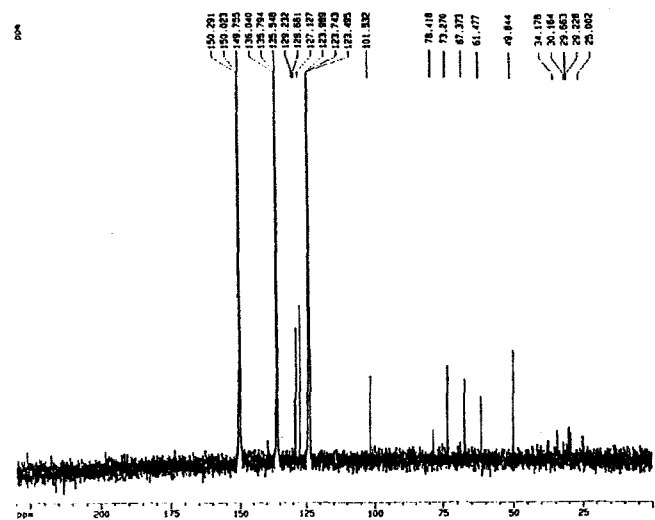
항진균성 항생물질 LAM-44A의 methanol 용액은 273 nm에서 최대흡광도를 보였고(Fig. 5), IR spectrum은 Fig. 6과 같이 3432 cm⁻¹의 peak는 hydroxyl기를 보여주며 1734.1 cm⁻¹의 peak는 carbonyl기를 나타내고 1600 cm⁻¹의 peak는 탄소와 탄소의 이중결합이 1384.2 cm⁻¹ peak는 C-O결합이 있음을 보여준다. ¹H-NMR spectrum은 Fig. 7과 같으며 proton이 30-36개로 추정되었고 1-2.5 ppm 부근의 singlet signal 은 2개의 CH₃ 및 탄소와 탄소사이의 단일결합에 있는 proton임을, 3.45 ppm에서 OCH₃을 3.5-4.7 ppm 부근에서 sugar 6.2-7.0 ppm 부근에서 탄소와 탄소 사이의 이중결합이 있음을 알 수 있었다. Fig.

Table 3. Physicochemical properties of the antifungal antibiotic LAM-44A

Appearance	colorless
Melting point	202°C
UV (λ_{max})	273 nm
Elemental analysis	
Carbon	59.36%
Hydrogen	12.37%
Oxygen	28.27%
Molecular formular	$C_{14}H_{34}O_5$
Molecular weight	282
Solubility	
Soluble	H ₂ O, methanol, ethanol, butanol, dioxane, pyridine
Insoluble	acetone, chloroform, ethyl ether, butyl acetate, benzen, hexane
R _f value	
Chloroform : methanol : water (90 : 10 : 0.1)	0.69
Butanol : methanol : water (40 : 40 : 20)	0.65
Acetonitrile : butanol : water (80 : 20 : 0.1)	0.63
Butanol : dioxane : water (95 : 5 : 0.1)	0.41
Dioxane : isopropanol : water (90 : 10 : 0.1)	0.37
Chemical reaction	
Positive	sulphuric acid, Benedict, Molish, Anthrone, iodine
Negative	ninhydrin

**Fig. 5. UV spectrum of the antifungal antibiotic from *Bacillus subtilis* LAM 97-44.**

8에 있는 ^{13}C -NMR spectrum에서 10-16개의 탄소 signal이 관측되었다. LAM-44A의 원소분석결과 C 59.36%, H 12.37%, O 28.27%로 나타나 위의 이화학적 특성 및 기기분석결과와 종합하여 볼 때 $C_{14}H_{34}O_5$ 의 화학식을 가지는 열에 안정한 분자량이 적은 물질임을 알 수 있었다.

**Fig. 6. IR spectrum of the antifungal antibiotic from *Bacillus subtilis* LAM 97-44.****Fig. 7. 1H -NMR spectrum of the antifungal antibiotic from *Bacillus subtilis* LAM 97-44.****Fig. 8. ^{13}C -NMR spectrum of the antifungal antibiotic from *Bacillus subtilis* LAM 97-44.**

참고문헌

1. Strohl, W. R. (1997) In *Industrial antibiotics: Today and the future*. Strohl, W. R. (ed.), Biotechnology of antibiotics (2nd ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 3-47.
2. Lartey, P. A. and Mochle, C. M. (1997) In *Recent advances in antifungal agents*. Annual Reports in Medicinal Chemistry, Plattner, J. J. (ed.), Academic Press, pp. 151-160.
3. Fostel, J. M. and Lartey, P. A. (2000) Emerging novel antifungal agents, *Therapeutic Focus* **5**, 25-32.
4. Lee, N. W., Kim, C. S., Do, J. H., Jung, I. C., Lee, H. W. and Yi, D. H. (1998) Isolation and identification of *Bacillus* sp. LAM97-44 producing antifungal antibiotics. *Agric. Chem. Biotechnol.* **41**, 208-212.
5. Yi, D. H. and Lee, N. W. (2000) Production conditions of *Bacillus* sp. LAM97-44 for a water-soluble antifungal antibiotic. *J. Ind. Sci. Tech.* **25**, 215-229.
6. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Grzdar, A. F., Monna, J. D. and Mitchell, K. B. (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay, assesment of chemosensitivity test. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
7. Kim, Y. S. and Kim, S. D. (1994) Antifungal mechanism and properties of antibiotic substances produced by *Bacillus subtilis* YB-70 as a biological control agent. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**, 296-304.
8. Lee, E. T. and Kim, S. D. (2001) Antifungal substance, 2,4-diacetylphlriroglucinol, produced from antagonistic bacterium *Psuedomonas fluorescens* 2112 against *Phytophthora capsici*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 37-42.
9. Konishi, M., Nishio, M., Saitoh, K., Miyaki, T., Oki, T. and Kawaguchi, H. (1989) Cispentacin, a new antifungal antibiotic: Production, isolation, physico-chemical properties and structure. *J. Antibiotics* **42**, 1749-1755.
10. Capobianco, J. O., Zakula, D., Coen, M. L. and Goldman, R. C. (1993) Anti-Candida activity of cispentacin: The active transport by amino acid permeases and possible mechanisms of action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 1037-1044.
11. Ziegelbauer, K., Babczinski, P. and Schonfeld, W. (1998) Molecular mode of action of the antifungal beta · amino acid BAY 10-8888. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2197-2205.
12. Fujiu, M., Sawairi, S., Shimada, H., Takaya, H., Aoki, Y., Okuda, T. and Yokose, K. (1994) Azoxybacilin, a novel antifungal agent produced by *Bacillus cereus* NR2991: Production, isolation and structure elucidation. *J. Antibiotics* **47**, 833-835.
13. Aoki, Y., Yamamoto, M., Hosseini-Mazinani, S. M., Koshikawa, N., Sugimoto, K. and Arisawa, M. (1996) Antifungal ozocibacilin exhibits activity by inhibiting gene expression of sulfite reductase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 127-132.
14. Besson, F., Hourdou, M. L. and Michel, G. (1990) Studies on the biosynthesis of iturin, an antibiotic of *Bacillus subtilis*, and a lipopeptide containing beta-hydroxy fatty acids. *Biochem. Biophys. Acta.* **1032**, 101-106.
15. Maget-Dana, R. and Peypoux, F. (1994) Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology* **87**, 151-174.
16. Jeong, Y. K., Shin, Y. J., Jung, M. J., Joo, W. H. and Choi, J. S. (2002) Structural analysis of the antifungal antibiotic from *Bacillus* sp. YJ-63. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 21-25.
17. Tenoux, I., Besson, F. and Michel, G. (1991) Studies on the antifungal antibiotics: bacillomycin D and bacillomycin D methylester. *Microbios.* **67**, 187-193.
18. Eshita, S. M., Roberto, N. H., Beale, J. M., Mamiya, B. M. and Workman, R. F. (1995) Bacillomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group: isolations, structures, and antifungal activities of the cingeners. *J. Antibiotics* **48**, 1240-1247.
19. Peypoux, F., Pommier, M. T., Marion, D., Ptak, M., Das, B. C. and Michel, G. (1986) Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipid antibiot from *Bacillus subtilis*. *J. Antibiotics* **39**, 636-641.
20. Besson, F. and Michel, G. (1990) Mycosubtilins B and C: minor antibiotics from mycosubtilin-producer *Bacillus subtilis*. *Microbios.* **62**, 93-99.

Purification and Characterization of an Antifungal Antibiotic from *Bacillus subtilis* LAM 97-44

Dong-Heui Yi*, Lee No-Woon and Kwon Tae-Jong (Department of Microbiological Engineering, KonKuk University, Seoul 143-701, Korea)

Abstract: A novel antifungal antibiotic for azole-resistant *Candida albicans* was purified from the culture broth of *Bacillus subtilis* LAM 97-44 by butanol extraction, Diaion HP-20 and Dowex-50 adsorption chromatography, silica gel flash chromatography followed by HPLC and designated LAM-44A. LAM-44A was stable for 60 min at 100°C, and pH range from 2 to 10. MIC values were observed at 0.5-3.5 µg/ml against various *Candida albicans* strains. The antibiotic showed no cytotoxicity for S180, MKN-45, P388, HeLa and 3T3 at the concentration of 1 mg/ml. LAM-44A was colorless powder soluble in water, methanol, ethanol, butanol and negative to ninhydrin reaction. The antibiotic had maximum absorption at 273 nm in methanol, and melting point was 202°C. The molecular weight and formula were determined to be 282 and C₁₄H₃₄O₅ by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR spectrum and elemental analysis.

Key words: *Bacillus subtilis* LAM 97-44, antifungal antibiotic, azole-resistant *Candida albicans*

*Corresponding author