

Bacillus subtilis JW-1 균주가 생산하는 bacilysin의 풋마름병 억제 효과 및 특성

김신덕*

서경대학교 화학생명공학과

Isolation and characterization of bacilysin against *Ralstonia solanacearum* from *Bacillus subtilis* JW-1

Shin-Duk Kim*

Department of Chemical and Biological Engineering, Seokyeong University, Seoul 02713, Republic of Korea

(Received May 2, 2018; Revised May 17, 2018; Accepted May 24, 2018)

The inhibitory compound (Compound S) against *Ralstonia solanacearum* and its conversion product (Compound S') were isolated from the culture filtrate of *Bacillus subtilis* JW-1 using a series of chromatography procedures. The structures were elucidated as alanyl-L-β-(2,3-epoxycyclohexyl-4-one)alanine and alanyl-L-β-(2,3-dihydroxycyclohexyl-4-one)alanine, respectively on the basis of nuclear magnetic resonance spectral data, including ¹H, ¹³C, ¹H-¹H correlation spectroscopy and heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy. The compound S exhibited a broad antimicrobial activity against G⁺, G⁻ bacteria, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. The activity loss of the conversion product revealed that the epoxy function was essential for activity of Compound S.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, antibiotic, bacilysin, bacterial wilt

환경 오염과 먹거리 안전성에 대한 관심이 높아지면서 지난 70 년간 무공해 농약을 개발하기 위한 목적으로 국내외에서 천연물 기원의 생리활성물질 탐색이 활발히 진행되어 왔다. 그러나 작물의 뿌리 상처를 통해 식물체에 침투하여 주요 경제 작물에 풋마름병(bacterial wilt)을 유발시킴으로써

(Tans-Kersten *et al.*, 2001) 막대한 경제적 손실을 초래하는 토양성 식물 병원균인 *Ralstonia solanacearum*에 대한 생물학적 방제는 아직 초보적인 단계이다(Fujiwara *et al.*, 2011). 본 연구실에서 풋마름병에 대한 생물학적 방제제 개발을 위하여, 토마토와 고추의 근권 토양으로부터 강한 풋마름병 발병억제 활성(*in vivo* pot assay에서 80% 발병 억제)을 보인 균주를 분리하여 16S rRNA 염기서열 분석과 배양 및 생화학적 특성에 의거하여 *Bacillus subtilis* JW-1 (이하 JW-1 균주)로 동정하고, 생명공학 연구원 자원센터에 기탁하였고(KCTC33068), JW-1 배양액에서 활성성분으로 novel surfactin isoform인 J물질을 처음으로 분리하여 구조와 특성을 보고하였다(Kwon and Kim, 2014). JW-1 배양액에서 풋마름병균 저해활성물질을 분리하는 과정에서 surfactin isoform 이외에 *R. solanacearum*에 대해 강한 *in vitro* antibiosis를 보이는 생리활성물질 Compound S와 conversion product로 추정되는 Compound S'의 존재가 확인되었다. 본 연구에서는 JW-1 균주가 생산하는 강한 antibiosis 활성을 나타내는 저해 활성물질을 분리, 특성 조사를 실시하고, 활성물질 생산을 위한 배양조건을 확립하고자 한다.

JW-1 균주의 활성물질 생산을 위한 최적 배지를 선별하기 위해 Nutrient 배지, CDox 배지(sucrose 30 g, NaNO₃ 3 g, MgSO₄·7 H₂O 0.5 g, KCl 0.5 g, FeSO₄·7 H₂O 0.01 g, K₂HPO₄ 1 g/L, pH 7.2)와 GA 배지[K₂HPO₄ 7 g, KH₂PO₄ 2 g, MgSO₄·

*For correspondence. E-mail: sdkim@skuniv.ac.kr;
Tel.: +82-2-940-7171; Fax: +82-2-919-0345

7 H₂O 0.1 g, (NH₄)₂SO₄ 1 g, yeast extract 0.05 g, Fe₂(SO₄)₃ 0.15 mg, MnSO₄·H₂O 5 mg, CuSO₄·5 H₂O 0.16 mg, sucrose 13 g/L, pH 7.0]에 각각 접종하여 200 rpm, 37°C에서 배양하며, 매 2시간마다 pH 변화, 배지 종류와 배양 시간에 따른 균체 밀도와 활성을 측정하였다. 균체 성장은 620 nm에서의 흡광도로 측정하고, 활성물질 생산은 *R. solanacearum*에 대한 antibiotic activity를 paper disc diffusion method로 측정하였다. 본 실험에서 사용된 *R. solanacearum*은 농업과학기술원에서 분양 받은 균주와 꽃마름병에 감염된 고추와 토마토에서 분리한 균주를 사용하였다. Tryptic soy agar (Sigma-Aldrich) plate에 100 µl의 *R. solanacearum* broth (10⁸ CFU/ml)를 함유한 top agar를 분주하여 균한 bioassay 용 plate에 배양액 20 µl을 점적한 paper disc (직경 5 mm)를 올려놓고 37°C에서 24시간 배양하여 나타난 생육 저지환의 크기로 활성도를 나타내었다. 배지 성분에 따라 균체 성장에는 별 차이가 없었으나, 저해활성은 큰 차이를 나타내었다. Nutrient 배지에서는 균체 성장은 잘 이루어졌으나 활성물질 생산이 전혀 이루어지지 않았고, CDox 배지의 경우 활성물질 생산이 미미한 반면에 GA 배지에서는 빠른 균체 성장과 높은 활성물질 생산이 이루어졌다(자료 미제시). 이로서 JW-1 균주의 활성물질 생산에 탄소원으로는 sucrose, 질소원으로는 ammonium salt가 효과적임을 알 수 있었다. 균체 성장이 빠르고 높은 활성물질 생산을 보인 GA 배지에서 JW-1 균주의 배양 특성을 조사한 결과 균체의 성장과 활성물질의 생산이 같이 동시에 이루어지는 것으로 나타났다.

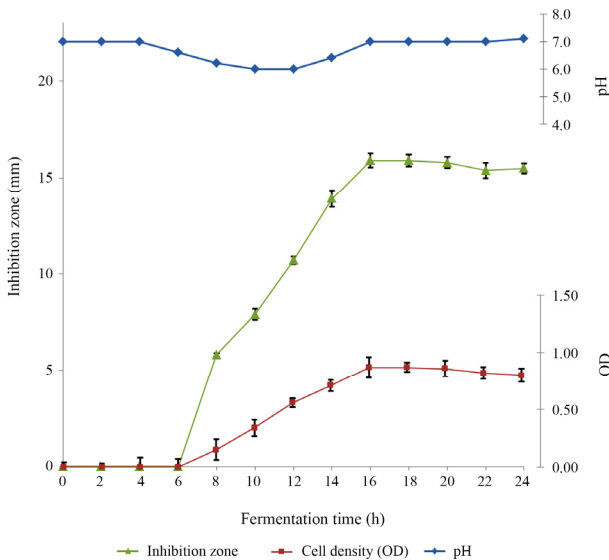


Fig. 1. Time course of production of Compound S by *Bacillus subtilis* JW-1 strain. The diameters of inhibition zones (mm) included the paper disc diameter (5 mm). The data are the means of three replications. Vertical bars indicate standard deviations.

배양액의 pH 변화는 처음 성장시기는 7.0에서 6.0으로 감소하였다가 다시 상승하여 배양 16시간째에 pH 7.0에 도달한 후 유지되다가 24시간 후 pH가 다시 상승하기 시작하는 것으로 나타났다. 활성물질의 생산은 배양 16시간, pH 7.0에서 최고에 달하였다(Fig. 1).

활성물질 생산에 가장 효과적인 GA 배지에서 JW-1 균주를 16시간 배양한 배양액(5 L)으로부터 활성물질을 activity-based fractionation에 의해 분리하였다. 배양액을 6,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후 상등액을 Amberlite XAD 16 column (3.5 × 45 cm)에 흡착시키고 증류수로 세척한 후 methanol로 용출시켜 감압 농축한 후 silica gel column chromatography (silicagel 60, Merck, 3.5 × 45 cm)를 ethanol: H₂O (10:1) 용매 조건으로 행하여 활성 분획(F7~F9, 1.4 g)을 획득하였다. 활성분획을 다시 감압 농축한 다음 70% methanol을 이용하여 Sephadex LH-20 (Pharmacia) column chromatography를 행한 후 최종 분리과정으로 HPLC (Waters, C₁₈ µbondapak column, 1% HCOOH: MeOH = 87:13 isocratic system, 210 nm UV detection)을 실시하여 compound S (39 mg)와 S' (15 mg)을 분리하였다. 분리한 compound S와 S'은 TLC plate 상에 각각 single band (silica gel 60 F₂₅₄, Merck, 1-butanol-acetic acid-water = 4:1:4, rf = 0.37 and 0.24) 그리고 각각 HPLC의 단일 peak (rt 15.2 min 와 11.8 min)로 분리되어 순도가 확인되었다.

TLC plate 상에서 ninhydrin positive한 Compound S band는 2% 4-(p-nitrobenzyl)-pyridine acetone 용액(w/v) (이하 NBP reagent)으로 spray하고, 110°C에서 5분간 가열한 후 식힌 다음 10% (v/v) tetraethylene pentamine acetone 용액을 spray하면 옅은 노란색 바탕에 blue spot을 나타내어 epoxide 구조를 포함함을 알 수 있었다(Hamcock *et al.*, 1974). 분리한 Compound S (2 mg)을 2 N HCl 용액에 녹여 105°C에서 12시간 산 가수분해를 실시한 다음 2 N NaOH로 중화시킨 후 TLC (Silicagel 60 F₂₅₄, n-propanol: water = 7:3 v/v)를 행하면 두 개의 ninhydrin positive spot, alanine (rf 0.22)과 동정되지 않는 amino acid (rf 0.57)가 확인되어 compound S는 alanine과 동정되지 않은 amino acid로 구성된 dipeptide로 추정되었다.

Compound S의 구조는 ESI-MS, ¹H NMR, ¹³C NMR, 2D COSY 등의 data를 근거로 결정하였다. Electrospray ionization (ESI) mass spectrometer (Hewlett-Packard) positive mode로 분석한 결과 (M+H)⁺ peak는 m/z 271.1에 나타났다. 분자식은 ESI-MS와 NMR (Bruker AV 500) data에 의해 C₁₂H₁₈N₂O₅로 동정되었다. ¹³C NMR spectrum에서 12개 carbon signal이 확인되었으며, DEPT에 의해 carbon의 multiplicity를 확인할 수 있었다(1 × methyl, 3 × methylene, 5 × methine). 또한 amide

carbonyl resonance (δ 173.3 ppm), 두 개의 amino acid α -methine group (δ 51.3와 51.0 ppm)과 carboxyl carbon (δ 174 ppm) peak 존재로 Compound S는 dipeptide로 동정되었다. ^1H NMR spectrum에서 Ca1 proton δ 3.66 (q, $J=7.0$ Hz, 1H)와 δ 1.59 (d, $J=7.0$ Hz, 3H)의 doublet의 coupling에 의해 alanine residue의 H- α 1과 methyl group으로 확인되었다. Triplet의 H- α 2 (δ 4.24)과 C- β 2 (δ 51.3) methylene carbon 간의 HMBC correlation이 확인되고, 또한 H- β 2 (δ 1.75, 2H) methylene proton은 H-1' methine proton (δ 2.31)와 coupling을 보여 $-\text{C}_{\alpha 2}\text{H}-\text{C}_{\beta}\text{H}_2-\text{C}_{\gamma}\text{H}$ -임이 확인되고, δ 3.16 ppm (dd, $J=8.1, 3.2$ Hz, 1H)과 3.55 ppm (d, $J=8.1$ Hz, 1H) 두 peak는 전형적인 α, β -epoxy ketone의 chemical shift이며, H-3' (δ 3.55, doublet)의 chemical shift는

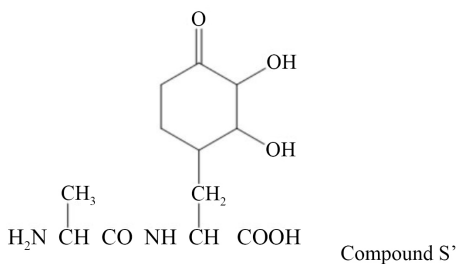
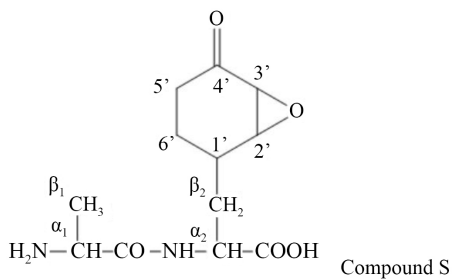


Fig. 2. Structures of Compound S and Compound S'.

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR data for compound S in D_2O (δ in ppm and J in HZ)

Position	δ_{H}	Multiplicity	J	^{13}C
α 1	3.66	1H, q	$J=7.0$	51.0
β 1	1.34	3H, d	$J=7.0$	18.6
C=O				173.3
α 2	4.24	1H, t	$J=7.2$	51.3
β 2	1.75	2H, dd	$J=7.2, 2.6$	34.5
Coo-				174
1'	2.31	1H, dtt	$J=10.2, 3.2, 2.6$	41.0
2'	3.16	1H, dd	$J=8.1, 3.2$	55.5
3'	3.55	1H, d	$J=8.1$	54.6
C=O				205.8
5'	2.41	2H, m		38.8
6'	1.93	2H, m		28.3

바로 옆에 carbonyl group이 존재하며 carbonyl group에 의해 deshield되었음을 나타내었다. δ 2.31 (H-1') peak와 δ 1.93 ppm (2H, m, H-6') 간의 coupling이 확인되어 cyclohexanone ring의 존재가 확인되어 Compound S의 모든 carbon과 proton peak의 배정이 이루어졌다(Table 1). 이상의 spectral 결과와 문헌상의 data를 비교하여 Compound S는 alanyl-L- β -(2,3-epoxycyclohexyl-4-one)alanine (Fig. 2)으로 bacilysin과 동일한 물질로 동정되었다(Walker and Abraham, 1970).

순수하게 분리된 Compound S' 역시 ninhydrin spray에 positive 하였으며, 산 가수분해 후 실시한 TLC plate 상에 두 개의 ninhydrin positive spot, alanine과 동정되지 않는 아미노산으로 분리되어 dipeptide compound이며, epoxide function에 특이적인 NBP spray reagent에 대해서는 발색반응을 보이지 않아 epoxide function은 포함하지 않음을 시사하였다. ^{13}C NMR spectrum은 compound S의 spectrum과 유사하며 단지 epoxide carbon C2'와 C3' peak가 δ 74.3과 70.4 ppm으로 각각 downfield로 shift되어 oxirane ring이 dihydroxy group으로 가수분해되었음을 알 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 Compound S' 구조는 alanyl-L- β -(2,3-dihydroxy cyclohexyl-4-one)alanine으로 동정되었다.

Compound S는 수용액 상태에서 냉장 보관시 5일 이후, pH 4 이하의 산성조건에서는 2일 이후 급격하게 Compound S'으로 전환됨이 HPLC (rt=11.8 min)에 의해 확인되어 Compound S'은 Compound S의 conversion product로 동정되었다. Compound S는 *R. solanacearum* 뿐만 아니라 G^+ , G^- bacteria, yeast, *Candida albicans*에 대해서도 강한 antimicrobial 활성(Table 2)을 나타내었으나 conversion product인 Compound S'는 antibiosis 활

Table 2. Antimicrobial activity of Compound S (25 $\mu\text{g/ml}$)

Test organisms	Inhibition zone (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 p	13 \pm 0.2
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	12 \pm 0.4
<i>Ralstonia solanacearum</i>	17 \pm 0.3
<i>Escherichia coli</i> AB 1157	15 \pm 0.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027	10 \pm 0.2
<i>Salmonella typhimurium</i> TV 119	8 \pm 0.6
<i>Xanthomonas oryzae</i>	12 \pm 0.3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11 \pm 0.4
<i>Candida albicans</i> IFO 1594	20 \pm 0.5

For Bacteria; nutrient agar, 37°C, 24 h incubation, for fungi and yeast; malt extract agar, 30°C, 3 day incubation

The data are expressed as means of three replications \pm standard deviations.

The diameter of inhibition zone (mm) included the paper disc diameter (5 mm).

성이 거의 없어 intact oxirane ring 구조가 Compound S 활성화에 필수적임이 확인되었다.

본 연구실에서 강력한 꽃마름병 biocontrol agent로 선발한 *Bacillus subtilis* JW-1 배양액에서 꽃마름병 발병 억제물질로 novel surfactin isoform에 이어 Compound S를 분리하였다. Compound S는 spectral data와 문헌조사 등을 통해 이미 보고된 바 있는 bacilysin과 동일한 물질임이 밝혀졌으나, bacilysin의 *R. solanacearum*에 대한 저해활성은 아직 보고된 바 없었으며, 또한 본 연구에서 conversion product인 Compound S'의 분리를 통해 oxirane ring 구조가 bacilysin 활성화에 필수적임을 확인할 수 있었다.

또한 최근에 bacilysin의 *Nostoc* sp., *Anabaena* sp.와 *Microcystis aeruginosa* 등에 대해 강한 anticyanobacterial activity가 보고되었다(Wu *et al.*, 2014). 따라서 *Bacillus subtilis* JW-1 균주는 꽃마름병 방제가 뛰어난 plant growth promoting rhizobacteria로서 뿐만 아니라 최근 심각한 문제로 대두되고 있는 유해한 녹조 현상을 해결하는 biocontrol agent로의 개발 가능성이 아주 높은 균주로 사료된다.

적 요

꽃마름병 균에 대해 강한 저해활성을 갖는 활성물질 Compound S와 conversion product인 compound S'이 *Bacillus subtilis* JW-1 배양액에서 일련의 크로마토그래피 방법으로 분리 정제되었고, ¹H NMR, ¹³C NMR, ¹H-¹H COSY와 HMBC 등의 spectra 분석에 의해 구조가 alanyl-L-β-(2,3-epoxycyclohexyl-4-one)alanine와 alanyl-L-β-(2,3-dihydroxycyclohexyl-4-one)alanine로 각각 동정되었다. Compound S는 G⁺, G⁻ bacteria, yeast와 *Candida albicans* 등에 대해 광범위한 antimicrobial

activity를 나타내며, conversion product의 활성화 상실을 통해 intact oxirane ring이 Compound S의 활성화에 필수적임이 밝혀졌다.

감사의 말

본 연구는 2016년도 서경대학교 교내 연구비 지원에 의해 이루어졌음.

References

- Fujiwara, A., Fujisawa, M., Hamasaki, R., Kawasaki, T., Fujie, M., and Yamada, T. 2011. Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 4155-4162.
- Hammock, L., Hammock, B., and Casida, J. 1974. Detection and analysis of epoxides with 4-(p-nitrobenzyl)-pyridine. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **12**, 759-764.
- Kenig, M. and Abraham, E. 1976. Antimicrobial activities and antagonists of bacilysin and anticapsin. *J. Gen. Microbiol.* **94**, 37-45.
- Kwon, J.W. and Kim, S.D. 2014. Characterization of an antibiotic produced by *Bacillus subtilis* JW-1, that suppresses *Ralstonia solanacearum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 13-18.
- Tans-Kersten, J., Huang, H., and Allen, C. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J. Bacteriol.* **183**, 3589-3605.
- Walker, J.E. and Abraham, E.P. 1970. The structure of bacilysin and other products of *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* **118**, 563-570.
- Wu, L., Wu, H., Chen, L., Xie, S., Zang, H., Borriss, R., and Gao, X. 2014. Bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 has specific bactericidal activity against harmful algal bloom species. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 7512-7520.