

Bacillus subtilis A405 균주가 생성하는 내열성 항균 peptide의 특성 검정

구본성^{*} · 이승범 · 윤상홍 · 송재경 · 정대성¹ · 변명옥 · 류진창

농업과학기술원 생물자원부 분자유전과, ¹원예연구소 저장이용과

요약 : 전국에서 분리한 세균으로부터 항균력이 있는 길항세균들을 먼저 분리한 다음 그중 배양배지 속으로 강력한 항균력을 나타내는 peptide를 분비하는 A405균주를 선발, Biolog System 및 rDNA염기서열을 이용하여 *Bacillus subtilis* 로 동정하고 이 균주가 생성하는 항균 peptide의 항균력을 조사한 바 *Botrytis cinerea*, *Cercospora* sp., *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Celletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Pyricularia oryzae* 등의 식물병원균과 *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp. 등의 세균 및 효모인 *Candida albicans*의 성장도 억제하는 강력한 항균력을 보였다. 또한 이 균주가 생산하는 항균 peptide는 알콜, 아세트산과 같은 유기용매에 내성을 가지고 있었으며 proteinase K와 phenol 처리시에는 항균력이 감소되거나 소실되는 특성을 가지고 있었다. 이 항균 peptide를 SDS-PAGE, Native-PAGE 및 Tris-Tricine 전기영동으로 분자량이 3 kDa인 작은 peptide임을 확인하였고 aspartic acid, glycine, serine, glutamine, valine, leucine, isoleucine, proline, tyrosine 등의 9가지 아미노산으로 구성되어 있음을 Amino Acid Analyzer로 확인 하였으며 냉동건조한 항균 peptide 50 ug/ml을 체리토마토에 처리하여 과일의 선도유지를 조사한 결과 대조구에 비하여 월등한 선도유지 효과가 있음을 입증하였다.(1998년 7월 27일 접수, 1998년 12월 1일 수리)

Key words : antifungal peptide, bioautography, SDS-PAGE, native-PAGE, tris-tricine electrophoresis.

서 론

특수한 환경의 토양이나 물에는 많은 종류의 세균들이 적응하여 서식하고 있는데 이들은 대부분 미생물의 성장과 번식에 있어서 필수적인 것은 아니지만 불안한 생태계 시스템에서 미생물 자신들이 살아 남을 수 있는데 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져있는 aminoglycosides, β -lactams, polyketides 및 small polypeptide를 포함하는 2차 대사산물들을 생산하는 것으로 알려져 있다.

특히 이와같은 2차 대사산물들은 영양이 고갈된 열악한 환경에서 생산이 되는데 지금까지 사용된 대부분의 중요한 항생물질이나 의약품 산물들은 미생물에 의해서 생산된 것 들로서 그중 짧은 polypeptide로 구성된 많은 종류의 peptide 항생물질도 미생물에 의해서 생산된다 (Kleinkauf 등, 1996; Leifert 등, 1996).

그중에서도 이러한 항균물질을 생산하는 미생물을 이용하여 식물 병원균을 방제하고자하는 방법에 관한 연구가 많이 수행 되었는데 병이 발생하는 지역의 경작지에 미생물을 직접 투입하거나 미생물이 생산하는 항균 물질을 분리하여 살포하는 방법을 이용하고 있다. 이와 같은 목적으로 이용된 미생물로는 방선균 및 *Pseudomonas fluorescens* (Howell, 1979, 1980; Brisbane, 1988), *P. putida* (Colyer, 1984; Anderson, 1985), *P. cepacia* (Parke, 1990; Roitman 1990; McLoughlin, 1992)와 *Bacillus*계에 속하는 세균들이 대부분이다 (Thimon 등, 1992; Klich 등, 1994; Eshita 등, 1995; Kajimura 등, 1995; Feignier 등, 1995).

본 연구에서도 전국의 토양으로부터 분리한 수 백종의 세균들중 식물병원균의 성장을 억제하는 길항균을 선발하고 그 길항균들 중 강력한 내열성의 항균 peptide를 생산하는 세균인 *Bacillus subtilis* A405 를 선발하여 이 균주가 생산하는 항균 peptide를 분리, 정제하여 몇가지 특성을 검정하였기에 이를 보고하고자 한다.

*연락처

재료 및 방법

사용균주의 선발

본 실험에 사용한 공시균주는 전국에서 채취한 다양한 환경의 토양으로부터 분리한 700여 세균들중 먼저 딸기잿빛곰팡이 병원균과 PDA고체배지에서 대치배양하여 딸기잿빛곰팡이 병원균의 성장을 억제하는 길항균들을 분리한 다음 액체배양하여 그 배양여액의 항균력을 측정하였다. 그 중 배양액을 5분 정도 끓인 후에도 항균력이 존재하는 균주들중 가장 강한 길항력을 보인 A405균주를 공시 균주로 선발하였다. 항균력 검정에 사용한 *Botrytis cinerea*의 *Cercospora* sp., *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Cellectotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* 및 *Pyricularia oryzae* 등 7종의 식물병원균들과 *Escherichia coli*, *Pseudomonas tolaasii* 및 *Candida albicans*는 농업과학기술원 분자유전과 미생물 분류실에서 분양받아 사용하였으며, 선발된 A405 균주의 동정은 먼저 액체배양한 균주를 광학 현미경으로 그 형태를 관찰 한 후 Biolog system으로 생화학적인 특성을 조사하였다. 또한 최근에 미생물의 분류에 많이 사용하는 rDNA 염기서열을 조사하여 공시균주를 동정하였다.

항균력 측정

식물 병원균에 대한 항균력 측정은 PDA 고체배지에 3-5일간 배양된 곰팡이들을 수술용 칼로 먼저 0.3 mm×0.3 mm 크기로 잘라 PDA 고체배지의 중앙에 접종한 다음, 그 주위에 지름 6mm의 살균된 paper disc를 올려놓고 0.45 μm filter에 통과된 내열성 peptide를 20 μl씩 일정하게 주입하였다. 28°C 항온기에서 3일간 배양한 후 병원균이 자라지 못하는 저지대의 반경을 측정하여 항균력을 측정 하였다.

Thin layer chromatography(TLC)

분리된 항균물질을 6N의 염산(HCl)에 잘 녹인 다음 질소가스를 충전하여 용기를 밀봉한 후 180°C 항온기에서 48시간동안 가수분해 시켰다. 가수분해된 항균물질을 각각 10 μl씩 silica gel TLC plate에 침적한 다음 n-butanol:acetic Acid:water(60:15:25, v/v/v) 혼합 용매를 이용하여 2시간 전개하고 0.1% ninhydrin으로 염색시켰다.

내열성 항균 peptide 확인

내열성을 가진 항균 peptide를 분리하기 위하여 공시균주 1 백금이를 LB액체 배지에 접종하여 28°C에서 4일간 배양한 다음 6,000 rpm으로 원심분리 하였다. 상등액에 0.8 포화도의 ammonium sulfate 첨가하여 4°C에 30분 동안 정치한 다음 10,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 공시균주가 분비한 모든 단백질을 침전시켰다. 침전된 총단백질을 투석막 (Spectrum사, 3,000 cut)에 넣어 하룻밤 교반하면서 ammonium sulfate를 제거한 뒤, centriprep (Amicon사)을 이용하여 농축하였다. 농축된 항균물질은 TLC, SDS-PAGE, Native-PAGE 및 Tris-Tricine 전기영동으로 확인하였다.

Polyacrylamide gel electrophoresis

분리된 항균 peptide의 SDS-PAGE, Native-PAGE 및 Tris-Tricine 전기영동은 Daniel 등의 방법 및 Biorad manual(4)에 준하여 실시하였다.

Bio-autography

항균 peptide들의 항균력을 확인하기 위해 15% polyacrylamide gel 및 Native gel에서 분리한 항균 peptide를 10 μl와 100 μl씩 2반복으로 전기영동을 실시한 후 10 μl씩 전기영동한 gel은 coomassie blue로 염색하였고, 100 μl씩 전기영동한 gel은 triton X-100과 PDA 액체배지로 10~20분간 세척한 후 150×150 mm 사각 petri-dish 상에 놓고 녹여서 48°C로 식혀둔 30 ml의 0.7% PDA top agar에 5×10^5 cells/ml의 *Botrytis cinerea*의 포자현탁액을 잘 혼합한 후 gel 위에 고르게 부어 굳히고 28°C에서 12시간 배양한 후 *Botrytis cinerea*가 자라지 못하는 항균단백질 밴드를 확인하였다.

아미노산 조성분석

6N의 염산(HCl) 10 ml에 항균 peptide 1 mg를 잘 녹인 다음 질소가스를 충전하여 유리봉에 넣은후 용기를 밀봉하여 180°C 항온기에서 48시간동안 가수분해하여 amino acid analyzer로 아미노산을 분석하였다.

과일의 선도유지 조사

항균 peptide의 과일에 대한 선도유지 능력을 검정하기 위하여 체리토마토에 항균 peptide를 50 μg/ml의 농도로

분무한 다음 3시간동안 풍건하여 말린후 10⁵spores/ml 농도의 딸기 잿빛곰팡이병원균의 포자를 체리토마토 한개당 10 μl씩 점적하여 접종하였다. 항균 peptide와 딸기 잿빛곰팡이 병원균의 포자가 3 반복으로 처리된 체리토마토를 일회용 사각 접시(15 cm×15 cm)에 놓고 비닐로 밀봉하여 26℃ 항온기에 2주일간 저장한 후, 증류수를 처리한후 딸기 잿빛곰팡이 병원균의 포자를 접종한 대조구와 부패정도를 비교하여 과일 의 선도유지 능력을 조사하였다.

결과 및 고찰

내열성 항균 물질 생성 미생물의 성질

선발한 A405균주는 *Bacillus*의 전형적인 특성인 포자를 형성하는 간균형태의 그람 양성균으로 Biolog System으로 탄소원 이용여부를 조사하여 동정한 결과 표 1과 같이 *Bacillus subtilis*와 유사성이 0.708로 다른 균주에 비해 현저히 높았으며, 또한 최근에 미생물의 분류에 많이

Table 1. Closest species with an A405 strain producing an antimicrobial substance when analyzed by the Biolog System

Closest Species	SIM ^{a)}
1) <i>Bacillus subtilis</i>	0.708
2) <i>Bacillus coagulans</i>	0.025
3) <i>Bacillus subtilis</i> var <i>globgii</i>	0.010
4) <i>Bacillus licheniformis</i>	0.006
5) <i>Bacillus azotoformans</i>	0.001
6) <i>Bacillus alcaophilus</i> ss <i>halodulans</i>	0.000
7) <i>Bacillus megaterium</i>	0.000
8) <i>Bacillus thermoglucosidasius</i>	0.000
9) <i>Cellulomonas turbata</i>	0.000
10) <i>Bacillus pumilus</i>	0.000
11) other	0.000

^{a)}Similarity.



Fig. 1. The 16S rDNA sequence homology of the strain A405 and *Bacillus subtilis* used as a reference.

이용되는 분자생물학적인 방법인 rDNA염기서열을 이용하여 동정한 결과도 그림 1에서 보는 것처럼 *Bacillus subtilis*의 rDNA 염기서열과 99%의 유사성이 있는 것으로 나타났다. 이와같은 결과들을 종합해 볼 때 항균 peptide를 생산하는 A405 균주는 *Bacillus subtilis*인 것으로 생각되었다.

B. subtilis A405 균주의 항균활성

B. subtilis A405균주가 생산하는 물질의 수종의 식물 병원균 곰팡이에 대한 항균력 및 세균 및 효모에 대한 항균력을 조사한 결과 표 2에서 보는 것처럼 A405균주가 생산하는 항균 단백질은 식물병원균인 *Botrytis cinerea*, *Cercospora* sp., *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Celletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Pyricularia oryzae* 등의 식물병원균은 물론 *Escherichia coli*, *Pseudomonas* 등의 세균 및 효모인 *Candida albicans*의 성장도 억제하는 강력한 항균력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

Table 2. Anti-microbial activities of the peptide produced from *Bacillus subtilis* A405 strain

Fungi and bacteria tested	Antimicrobial Activities ^{a)}
Fungi	
<i>Botrytis cinerea</i>	+++
<i>Cercospora</i> sp.	++
<i>Fusarium oxysporum</i>	++
<i>Penicillium digitatum</i>	++
<i>Celletotrichum gloeosporioides</i>	++
<i>Rhizoctonia solani</i>	++
<i>Pythium ultimum</i>	++
<i>Pyricularia oryzae</i>	+++
Bacteria	
<i>E. coli</i> DH5 α	+
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	+
Yeast	
<i>Candida albicans</i>	+

^{a)}+++ : strong , ++ : moderate, + : weak.

항균물질의 용매 및 효소에 대한 반응

항균력이 확인된 침전물의 특성을 조사하기 위하여

유기용매와 효소등으로 반응시킨 후 항균력을 조사한 결과 alcohol, acetone과 같은 유기용매와 DNase, RNase와 같은 효소 및 chloroform을 처리 하였을때에는 침전물의 항균력에 변화가 없었으나 10 μ g/ml의 proteinase K를 처리하였을 때와 phenol을 처리하였을 때는 항균력이 감소되는 변화가 있었는데 특히 phenol을 처리하였을 때는 항균력이 완전히 소실됨을 알 수 있었다(표 3).

Table 3. Chracterization of the AMF-405 peptide produced by *Bacillus subtilis* A405 strain

Treatment	Antimicrobial Activity to plant pathogenic fungi, <i>Botrytis cinerea</i> ^{a)}
Ethyl alcohol extraction	++
Methyl alcohol extraction	++
Acetone extraction	++
Hexan extraction	++
Chloroform extraction	++
Phenol extraction	-
DNase	++
RNase	++
Proteinase K	+

^{a)}++ : 10.0 mm , + : 6.0 mm, - : 0.0 mm.



Fig. 2. TLC analysis of the acid hydrolyzed substances precipitated with ammonium sulfate from broth culture of A405 strain. Samples were developed with combination of n-Butanol : Acetic Acid : Water = 60:15:25. The antimicrobial substance of the sample were stained with Ninhydrin. Lane 1 : A405 strain, Lane 2 : B5-12 strain, Lane3 : 18-14 strain

또한 이 항균물질을 6N의 염산에 가수분해 한 다음 TLC에 전개한 후 ninhydrin으로 염색한 결과 그림 2에서 보는 것처럼 아미노산 염색이 되는 것으로 보아 이 항균물질은 아미노산으로 구성된 단백질 계통의 물질임을 알 수 있었다.

항균물질의 등정 및 내열성

B. subtilis A405 균주를 LB 액체배지에 4일간 배양한 다음 원심분리한 상등액에 0.8 포화도의 ammonium sulfate를 첨가하여 침전시킨 총단백질을 SDS-PAGE로 전기영동한 결과는 그림 3과 같다. 그림 3의 A에서 보는 바와 같이 *B. subtilis* A405 균주가 생산하는 항균물질에는 전형적인 단백질 형태를 띠는 것들과 다른 형태의 단백질군이 함께 존재함을 확인하였으며 Bioautography로 항균력을 조사한 결과 다른 형태의 단백질군에서 강력한 항균력을 보임을 확인할 수 있었다.

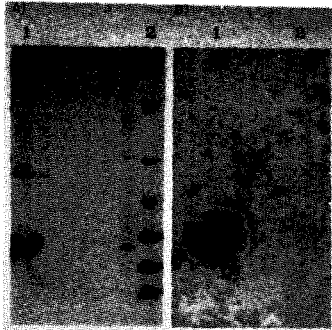


Fig. 3. Antimicrobial activities of the peptide from *Bacillus subtilis* A405 detected on SDS-PAGE.
A : SDS-PAGE B : Bioautography
1:Peptide of *B. subtilis* A405, 2:Low Molecular Weight Standard

이 단백질군을 다시 Native-PAGE로 전기영동하고 bioautography로 항균력을 확인하였는데 그림 4에서 보는 바와 같이 Native gel에서는 전형적인 단백질의 형태를 보임을 알 수 있었으며(그림4-B) bioautography로 그 단백질군이 항균력을 가지고 있음도 확인할 수 있었다. 이와 같은 형태의 단백질은 SDS-PAGE시 가끔 작은 분자량의 peptide들이 SDS, tracking dye등과 뭉쳐서 전기영동시 전형적인 단백질의 밴드와는 다른 형태를 띠게 된다는 보고가 있어 다시 10~20% gradient Tris-Tricine 전기영동을 한 후 염색해본 결과 그림 5에서 보는 것처럼 분자량 3.0 kDa의 peptide 밴드를 확인할 수 있었다

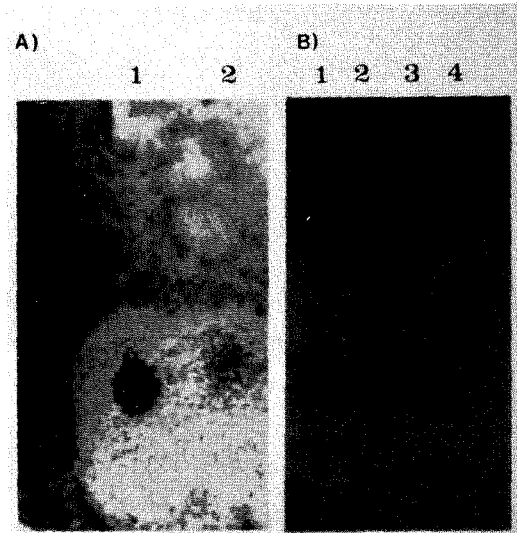


Fig. 4. Antimicrobial activities of the peptide detected on Native-PAGE.

A : Bioautography B : Native-PAGE

In B, lane 1 : 20 μ l, lane 2 : 10 μ l, lane 3 : 5 μ l, lane 4 : 1 μ l

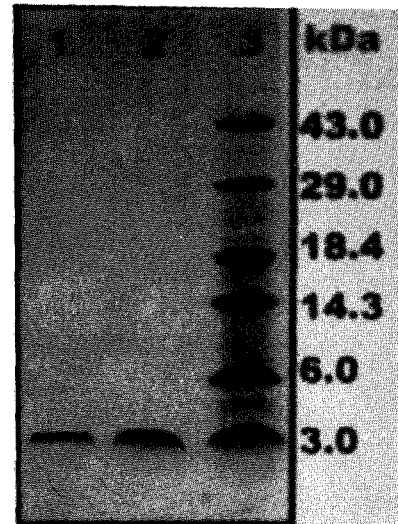


Fig. 5. The antimicrobial peptide band appeared on 10~20% gradient tris-tricine electrophoresis.

1 : 10 μ l, 2 : 15 μ l, 3 : Low molecular weight standard

분리정제된 항균 peptide 역가

분자량이 확인된 항균 peptide를 순수 분리 정제하기 위하여 ammonium sulfate의 포화도를 0.2씩 증가 시키면서 침전시킨 peptide를 투석하여 Tris-Tricine 전기영동을 실시하였다. 그림 6과 같이 항균력을 나타내는 3 kDa의

peptide는 ammonium sulfate의 포화도가 0.2에서 0.4 사이에서 90% 이상이 침전되어 회수되었으며, 더 이상의 정제가 필요 없을 정도로 순수하게 분리되었다. 이와 같이 분리된 항균 peptide를 냉동 건조하여 분말화 한 후 10 µg/ml에서부터 200 µg/ml까지 농도별로 항균력을 측정하여 보았을 때 20 µg/ml의 저농도에서도 항균력을 보임을 알 수 있었다.

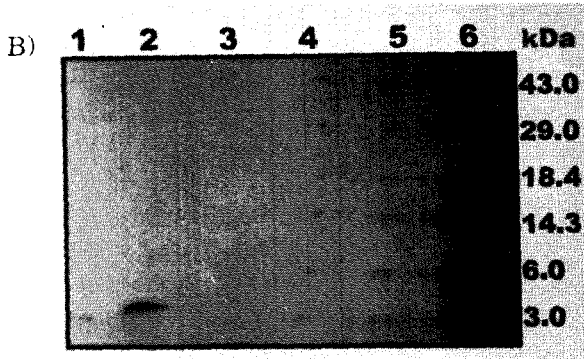
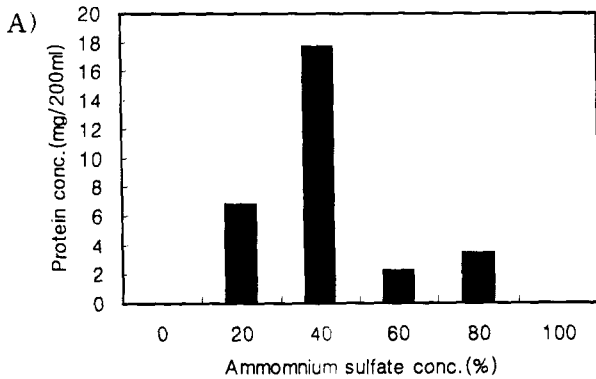


Fig. 6. Antimicrobial activity of the peptide produced by *Bacillus subtilis* A405 precipitated with different ammonium sulfate concentrations on tris-tricine electrophoresis.

A: Ammonium sulfate precipitation, B: Tris-Tricine electrophoresis

In B, lane 1 : precipitated with 20% ammonium sulfate saturation; lane 2 : precipitated with 40% ammonium sulfate saturation; lane 3 : precipitated with 60% ammonium sulfate saturation; lane 4 : precipitated with 80% ammonium sulfate saturation; lane 5 : precipitated with 100% ammonium sulfate saturation; lane 6 : Low molecular weight standard.

항균 peptide의 아미노산 조성

항균 peptide의 아미노산 조성을 알아보기 위하여 순수하게 분리된 항균 peptide를 가수분해시켜 amino acid analyzer로 분석한 결과는 그림 7과 같이 aspartic acid, glycine, serine, glutamine, valine, leucine, isoleucine, proline, tyrosine 등 9가지의 아미노산으로 구성된 항균 peptide임을 알 수 있었다.

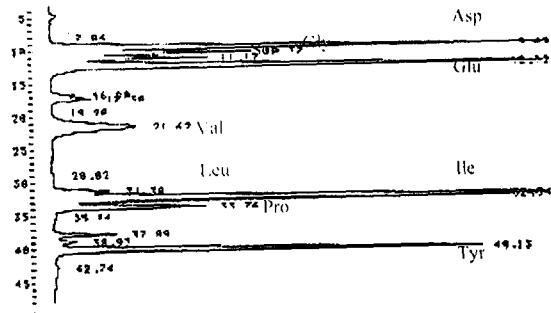


Fig. 7. Chromatogram of the antimicrobial peptide produced by *Bacillus subtilis* A405 appeared on amino acid analyzer.

항균 peptide의 체리토마토에 대한 선도유지 능력

항균 peptide의 미니토마토에 대한 선도 유지 능력을 알아 보기 위하여 항균 peptide를 체리토마토에 분무한 후 딸기 잭빛곰팡이 병원균의 포자를 접종하여 26°C에서 2주일간 저장한 후 항균 peptide의 선도유지능력을 조사한 결과는 그림 8과 같다.

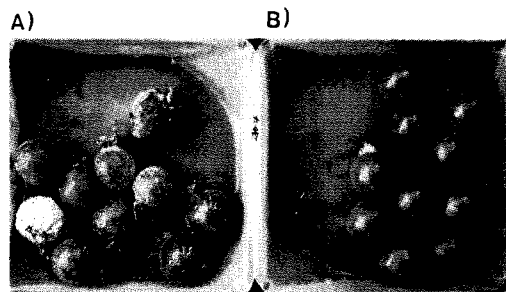


Fig. 8. Inhibition of gray mold on cherry tomatoes inoculated by spray with the antimicrobial peptide produced by *Bacillus subtilis* A405. A : Untreated, B : Treated with AMP-405

그림 8에서 보는 것처럼 증류수를 처리한 대조구(그림 8-A)에서 딸기 잿빛 곰팡이병이 발병한데 비하여 항균 peptide를 처리한 시험구(그림 8-B)는 병원균 접종후 2주일까지도 발병이 없는 것으로 보아 본 연구에서 분리한 항균 peptide는 과일의 선도유지에 좋은 효과가 있는 것으로 생각되며 이에 대한 연구는 앞으로 더 수행되어야 할 것으로 생각된다.

인용문헌

- Anderson, R.C. and D. Guerra (1985) Responses of bean to root colonization with *Pseudomonas putida* in a hydrophobic system. *Phytopathol.* 75:992~995.
- Brisbane, P.G. and A.D. Rovira (1988) Mechanism of inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by fluorescent *Pseudomonas*. *Plant. Pathol.* 37:104~111.
- Colyer, P.D. and D.M. Mount (1984) Bacterization of potatoes with *Pseudomonas putida* and its influence on post harvested soft rot disease. *Plant Dis.* 68:703~706.
- Bollag, D. M. and S. J. Edelstein (1991) *Protein Method.* John Wiley & Son Inc. pp.71~180
- Eshita, S. M., N. H. Roberto, B. M. Beale and R. F. Workman (1995) Bacillomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group. *J. Antibiot.* 48:1240~1247.
- Feignier, C., F. Besson, and G. Michel (1995) Studies on lipopeptide biosynthesis by *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbial Letter* 127:11~15.
- Howell, C. R. and R. D. Stipanovic (1979) Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, Pyoluteorin. *Phytopathol.* 69:480~482.
- Howell, C. R. and R. D. Stipanovic (1980) Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, Pyoluteorin. *Phytopathol.* 70:712~715.
- Kajimura, Y., M. Sugiyama, and M. Kaneda (1995) Bacillopeptin, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2. *J. Antibiot.* 48:1095~1103.
- Kleinkauf, A. and V. Dohren (1996) A non-ribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 236:335~351.
- Klich, M. A., K. S. Arthur, A. R. Lax, and J. M. Bland (1994) Iturin A: a potential new fungicide for stored grain. *Mycopathologia* 127(2):123~127.
- Leifert, C., H. Li, C. Siripun, S. Hampson, S. Workman, D. Sigeo, H. A. S. Epton, and A. Harbour (1996) Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. *J. Applied Bacteriol.* 78:97~108.
- McLoughlin, T. J., J. P. Quinn, A. Bettermann, and R. Bookland (1992) *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1760~1763.
- Parke, J. L. (1990) Population dynamics of *Pseudomonas cepacia* in the pea spermosphere in relation to biocoltrol *Pythium*. *Phytopathology.* 80:1307~1311.
- Roitman, J. N., N. E. Mahoney, and W. J. Janiswicz (1990) Production and composition of phenylpyrrole metabolites produced by *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:381~386.
- Thimon, L., F. Peypoux, R. Magaret-Dana, B. Roux, and G. Michel (1992) Interaction of bioactive lipopeptide, iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 16(2):144~151.

Characterization of a heat-resistant antimicrobial peptide secreted by *Bacillus subtilis* A405

Bon-Sung Koo^{*}, Seung-Bum Lee, Sang-Hong Yoon, Gae-Kyung Song, Dae-Sung Chung², Myung-Ok Byun, and Jin-Chang Ryu (Dept. of Molecular Genetics, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon, Korea, and ¹Dept. of Postharvest Technology, National Horticulture Research Institute, RDA, Suwon, Korea)

Abstract : An antimicrobial peptide producing bacterium, *Bacillus subtilis* A405, was screened and identified among 700 of antagonistic bacteria. The heat-resistant antimicrobial peptide, AMP-405, was purified from the broth culture of *B. subtilis* A405 through 20~40% ammonium sulfate precipitation and ultrafiltration. The AMP-405 exhibited strong antimicrobial activities against *Botrytis cinerea*, *Cercospora* sp., *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Celletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Pyricularia oryzae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp. and *Candida albicans*. The molecular weight of the peptide was about 3.0 kDa determined by SDS-PAGE, Native-PAGE and Tris-Tricine gradient electrophoresis, and composed of 9 kinds of amino acid such as aspartic acid, glycine, serine, glutamine, valine, leucine, isoleucine, proline, tyrosine. To determine the efficiency of AMP-405 as a potential maintenance of fruits freshness, cherry tomato was stored at 25°C for 2 weeks after treatment with 50 µg/ml of AMP-405 and 10⁵ spores/ml of *Botrytis cinerea* simultaneously. Treatment with AMP-405 resulted in significantly less infection by *Botrytis cinerea*, than the treatment with tap water as a control.

*Corresponding author (Fax : +82-331-290-0392, E-mail : bskoo@niast.go.kr)