

한국 전통젓갈에서 분리한 *Bacillus subtilis* JKK238 균주 유래 세 종류 Lipopeptide의 분리 및 특성

윤상홍* · 김정봉 · 임용호¹ · 홍성렬² · 송재경 · 김삼선 · 권순우 · 박인철 · 김수진 · 여윤수 · 구본성
농업생명공학연구원 미생물기능팀, ¹건국대학교 분자생명공학과, ²성균관대학교 유전공학과

Isolation and Characterization of Three Kinds of Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis* JKK238 from Jeot-Kal of Korean Traditional Fermented Fishes. Yoon Sang-Hong*, Jung-Bong Kim, Yoong-Ho Lim¹, Seong-Ryeul Hong², Jae-Kyeong Song, Sam-Sun Kim, Soon-Wo Kwon, In-Cheol Park, Soo-Jin Kim, Yun-Soo Yeo, Bon-Sung Koo. National Institute of Agricultural Biotechnology(NIAB), Suwon 441-707, Korea, ¹Department of Molecular Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea, ²Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea - About seven hundred bacterial strains were collected from Jeot-Kal, a Korean traditional fermented fishes, in various Korean districts. One of the strains designated JKK238 has its ability to antagonize *in vitro* the growth of a wide variety of plant pathogenic fungi responsible for diseases of economical importance. The JKK238 strain was isolated from Oh-Jeot, a kind of fermented shrimps, of Kangkyeung in Korea, and was identified as *Bacillus subtilis* based on its physiological characteristics, fatty acids compositions of cellular wall, and 16S rDNA sequence analysis. We isolated simply antimicrobial lipopeptides (AMLPP) by 25% ammonium sulfate precipitation of 3 days-old tryptic soy broth cultures of the JKK238 strain. Further analysis of AMLPP revealed that *B. subtilis* JKK238 produces a wide variety of antifungal lipopeptide isomers from the iturin, fengycin and surfactin families simultaneously. Above results indicate that the JKK238 strain can be added to the limited number *B. subtilis* strains reported to co-produce the three kinds of lipopeptide families.

Key words: *Bacillus subtilis*, lipopeptides, antifungal activities, iturin, fengycin, surfactin

젓갈은 한국 전통의 어패류 발효 식품으로 김치를 담글 때 조미료로 사용하기도 한다. 이것의 주 발효미생물은 lactic acid 세균으로 알려져 있으나 실제로는 다양한 미생물의 존재가 발효 시 발견되며 그 중 항균성을 가진 일부 *Bacillus* 균들이 분리되기도 한다. 일반적으로 *Bacillus subtilis*의 다수 strain들은 폭넓은 항생능과 다양한 구조를 가진 이차대 사산물을 생산하는 흥미 있는 특징을 가진다. 따라서 이들은 생물학적 방제의 적용에 매우 중요한 미생물 자원으로 알려져 있다. 특히 이들은 ribosome에 의해 합성되지 않는 iturin[9], surfactin[4], fengycin[12], plipastatin[11] 등과 같은 다수의 lipopeptide를 생산하는 것으로 알려져 있다. 현재 까지 약 10여 종의 lipopeptide가 분리되어 그것의 구조가 결정되어 있다. 일반적으로 이들은 7개 내외의 D-와 L- α -아미노산으로 이루어진 펩타이드와 한 개의 β -amino fatty acid 나 혹은 β -hydroxy fatty acid를 포함하는 cyclic lipopeptide 이다. 이들 대부분은 지방산 쇠의 길이나 결합형태가 다른 동종의 isomer의 혼합물로 동정된다. 대개 이들 peptide의

isomer들은 *B. subtilis* 균주의 배양조건에 따라 이것의 형태 나 양이 다르게 생산되는 것으로 알려지고 있다[1]. 특히 HPLC나 FPLC에 의한 이들 isomer들의 동정은 공식적으로 인정되지 않으므로 배양조건에 따른 *B. subtilis* 균주에 의한 lipopeptide isomer 생산을 연구하는 것은 매우 어렵다.

따라서 우리는 한국 전통 젓갈인 오젓으로부터 분리한 JKK238균주를 동정하였으며 이것이 생산하는 항균성 lipopeptide isomer의 분리 방법을 설정하고 각 lipopeptide의 동정 및 그 특성을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주의 선발

본 실험의 선발 대상균주들은 전국 각지에서 수집한 젓갈에서 채취, 분리된 것이다. 균주의 1차 선발은 아래에 공시한 곰팡이 균을 지시병원균으로 PDA고체배지에서 대치배양한 뒤 1 cm 이상의 균사 저지대를 보여주는 균들을 선발하였고 항세균 검정의 경우 분주 전 50°C로 식은 고체배지(Luria Bertinia, Listeria Enrichment Medium)에 하룻밤 배양한 병원균 2%(v/v)로 넣고 흔들어서 분주하여 검정배지를 만들었다. 그리고 대상균을 접종하여 배양한 뒤 그 저지

*Corresponding author
Tel. 82-31-299-1753, Fax: 82-31-299-1752
E-mail: shyo556@rda.go.kr

환을 관찰하여 선별하였다. 항균검정의 지시병원균으로는 다음 균주들을 사용하였다. *Botrytis cinerea*, *Cercospora* sp., *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Cellectotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Trichoderma* sp. 및 *Pyricularia oryzae*, *Streptomyces scabies*, *Erwinia amylovora* 등의 식물병원균과 *Listeria monocytogenes*와 같은 식중독균을 한국 농업미생물자원센터 (KACC)에서 분양 받아 사용하였다.

JKK238 균주의 동정

균주의 동정을 위해 Bergy's manual에 준한 생화학적 분석 외에도 세포벽의 지방산 분석, 16S rDNA 염기서열 분석을 시행하였다. 지방산 분석을 위한 시료조제는 순수히 분리된 집락을 TSA (tryptic soy agar)에 streaking하여 37°C에서 24시간 배양하고 그 집락을 긁어 Midi sherlock 시스템의 manual에 준해 일련의 유도화 과정을 행하여 Gas chromatography (Hewlette Packard 5890)로 세포벽에 함유된 지방산의 함량을 Midi sherlock 시스템의 표준균주의 자료와 비교 분석되어 그 균주의 속과 종의 동정을 추정하였다.

세균의 분자생물학적 동정법으로 널리 이용되는 16S rDNA 염기서열 분석은 16S rDNA의 conserve sequences를 참조하여 합성한 fD1과 rP2 primer를 사용하여 JKK238의 염색체 DNA로부터 PCR 방법으로 단편을 합성 분리하여 T-vector에 클로닝한 뒤 염기서열을 분석하였다. 결정된 염기서열은 DNASTAR의 MEGALIGN program을 사용하여 비교 분석되었다.

항균성 검정

식물 병원균에 대한 항균력 측정은 PDA 고체배지에 3~5일간 배양된 곰팡이들을 수술용 칼로 먼저 0.3 cm × 0.3 cm 크기로 잘라 PDA 고체배지의 중앙에 접종한 다음, 그 주위에 지름 6 mm의 살균 paper disc를 올려놓고 0.45 µm filter로 제공된 ammonium sulfate 침전액을 20 µl씩 일정하게 주입하였다. 25°C의 항온기에서 3일간 배양한 후 병원균이 자라지 못하는 저지대를 측정하여 항균력을 측정하였다.

조시료(AMLP: Anti-microbial lipopeptide)의 조제

JKK238 균주의 종배양액을 500 ml의 TSB (Tryptic Soy Broth, Difco BRL사)에 1%(v/v) 접종하고 38°C에서 3일간 진탕 배양한 뒤, 원심분리하여 (6,000 × g, 20분) 상층을 회수하였다. 회수된 상층 배양액은 ammonium sulfate 분말을 서서히 가하면서 최종 25% 농도가 되게끔 완전 용해시키고 재원심분리하였다. 침전된 pellet은 멸균증류수 20 ml로 녹이고 셀룰로오즈 투석막에 넣어 이틀간 증류수로 수차례 바꾸어 투석하였다. 투석된 시료는 -20°C에서 보관하면서 FPLC 분리시험에 사용하였다.

FPLC에 의한 정제

lipopeptide의 정제는 Amersham-Pharmacia의 FPLC시스템 (AKTA)을 사용하였다. 여기서 여러 펩타이드의 최적분리를 위해 역상칼럼인 5RPC ST 4.6/150을 고정상으로하고 0 → 50% → 50% → 70% → 100% 경사의 water-acetonitrile (in 0.1% TFA)을 이동상으로 214 nm의 파장에서 각 펩타이드의 피크 profile을 추적하고 각 분액을 다시 생리활성 검정한 뒤 각 피크의 해당 분액을 모아서 투석 후, 동결 건조하여 구조 동정을 위한 기기분석 시료로 사용하였다.

Thin layer chromatography에 의한 bioautography

물질의 분석을 위해서 행하는 TLC는 silica gel 60 plates (Merck사: 독일)를 사용하고 전개용매의 조성은 chloroform-methanol-water (65 : 25 : 4, v/v)이었다. Lipopeptide의 확인은 물로 분무하여 탐지하였다. TLC의 bioautography를 위해 TLC plate는 사각형 디시 (가로 14 cm × 세로 14 cm)에 놓고 자외선으로 30분간 멸균한 뒤 멸균된 PDA와 느타리 버섯 푸른곰팡이 병원균인 *Trichoderma* sp. 포자를 혼합하여 50°C로 식히고 분주하여 30°C에서 하룻밤 배양하여 항진균 저해 zone을 확인하였다.

항염증 활성 분석 및 세포독성 검정

Mouse macrophage like cell line, RAW 264.7과 ras-NIH3T3, NIH-3T3는 10% FBS가 포함된 DMEM을, LOVO, HT-29, Hela, MCF-3는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640을 5% CO₂, 37°C 항온기에서 배양했다.

세포 독성 활성 - 세포독성은 MTT assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 사용하여 분석하였다 [6]. 96-well cell culture plate에 5 × 10⁴의 세포를 plating하고 37°C에서 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 96-well plate에 50 µl MTT solution (stock concentration: 0.5 mg/ml)를 첨가하여 4시간 동안 37°C에서 반응 시켰다. 각 well에 100 µl dimethyl sulfoxide (DMSO)와 20 µl Sorenson's solution (0.1 M glycine, 0.1 M NaCl, pH 10.2)을 첨가하여 formazan crystal을 용해시켰다. 세포 내에서 MTT가 formazan으로 reduction된 양을 540 nm의 흡광도를 이용하여 측정한다. 생존율은 물질을 처리하지 않은 세포의 흡광도 값의 백분율로 계산을 하며 세포 독성은 대조군과 percent survival의 차이로 나타내었다.

항염증 활성: nitrite/nitrate의 정량 - Macrophage 내의 NOS에 의해 L-arginine으로부터 생성된 NO의 산화물인 nitrite (NO₂)와 nitrate (NO₃)는 macrophage로부터 유리된다. 이 유리된 nitrite와 nitrate를 정량함으로써 NOS 활성도를 간접적으로 측정하여 항염증 활성을 분석하였다. 먼저 nitrate를 nitrate reductase를 사용하여 nitrite로 전환시킨 후 총 nitrite 양을 Griess reagent를 가해 비색 정량했다. 일정량의 cell medium, 56 mM KHPO₄ (pH 7.4), 2.5 µM FAD, 100 µM

NADPH, nitrate reductase 0.1 unit를 포함하여 total incubation mixture를 1,000 μ l로 하고, 37°C 에서 20분간 incubation한 후 sodium pyruvate 10 mM, lactate dehydrogenase 10 mg/ml를 포함하는 buffer 250 μ l를 가한 후 5분간 incubation하며, 반응은 deproteinizing agent(0.42 M zinc sulfate in 0.5 M NaOH) 250 μ l를 가한 후, 4°C ice 에서 10분간 방치함으로써 종결되었다.

이어서 11,000 \times g에서 10분간 원심분리한 후 supernatant 500 μ l를 Griess reagent(0.5% naphthylethylene-diamine dihydrochloride, 5% sulfanilamide, 25% H₃PO₄) 1000 μ l에 가한 후 20분 동안 방치하고, 540 nm에서 흡광도를 측정했다. Standard solution은 NaNO₂ 160 μ M을 희석하여 사용했다. iNOS의 활성억제 검색은 24-well plate에 세포를 분주한 뒤, LPS(lipopolysaccharide; 100 ng/ml)과 IFN- γ (interferon- γ ; 10 U/ml)의 iNOS 유도물질과 시료(항균펩타이드)를 처리하여 18시간 배양한 상층액을 취하고, 여기에 Griess reagent를 가해 섞어준 다음 상온에서 10분 동안 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정했다. 표준물질로 sodium nitrite(5~50 μ M)를 사용하여 검량선을 작성했다.

Maldi-Tof Mass(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass) 분석

MALDI mass는 Reflex기기(Bruker사; Daltonic Reflex, 독일)를 사용하는 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix의 굴절 양식으로 분석하였다. 가속 및 굴절 전압은 28.5와 30.0 kV이었다.

결과 및 고찰

항균성 lipopeptide 생산 미생물의 선발 및 동정

전국각지에서 수집한 젓갈에서 분리한 세균 700여 주를 대상으로 한국에서 문제가 되는 6종의 식물병원성곰팡이(*Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Cellectotrichum coccodes*, *Fusarium oxysporum*, *Pyricularia oryzae*, *Trichoderma* sp.)에 대한 길항검정을 하여 1차 선발한 결과 두 종 이상에서 우수한 길항력을 보여주는 광범위 항균력 균주 79주와 1종에 특이적 길항력을 보이는 균주 41주를 선발하였다. 그 중 항균 원인물질이 단백질이나 펩타이드일 가능성을 검색하는 2차 선발과정에서 6주가 선발되었다. 우리는 이들 배양액의 ammonium sulfate 침전물(AMPLP)에서 항균 효과가 탁월하고 다양한 지시병원균에 광범위한 항균

Table 1. Biochemical and physiological characteristics of JKK238.

| Characteristics | JKK238 strain |
|------------------------------|--------------------|
| Gram stain | + |
| Morphology | mucoidy and sticky |
| Formation of spores | + |
| Mobility | + |
| Flagella | 1 |
| Optimal temperature | 37°C |
| Catalase | + |
| Casein hydrolysis | + |
| Gelatin hydrolysis | + |
| Utilization of propionate | - |
| Utilization of citrate | + |
| Deamination of phenylalanine | - |
| 7% NaCl | + |
| 10% NaCl | - |
| Nitrate reduced to nitrite | + |
| Egg yolk | - |
| Decomposition of tyrosin | - |
| Formation of citrate | - |
| Formation of indole | - |

성을 보이는 JKK238을 본 연구의 공시 균주로 최종 선택 하였다.

선발된 JKK238 균주의 형태적 생화학적 특성은 Table 1에서 보는 바와 같으며 특히 이 균주는 간균 형태의 크기가 약 0.74 μ m \times 2.6 μ m인 그람 양성균으로서 편모를 가지고 포자 형성능이 있으며 TSB 고체배지 상의 성장 초기에 점질성 집락을 형성한다. 또한 38°C가 최적 성장 온도이며 55°C 이상에서는 영양적 성장이 불가능하고 7% NaCl이 첨가된 고농도의 염 배지에서 성장이 가능하다. 또한 JKK238의 또 다른 동정을 위해 세포벽의 지방산 조성 분석과 16S rDNA 염기서열을 결정하였다. Table 2는 JKK238 균주의 세포벽 지방산 조성을 표준균주인 *B. subtilis* ATCC37015와 비교한 결과인데 Midi sherlock 시스템의 data bank와 비교 분석 시, *B. subtilis* 표준균주에서 전형적으로 나타나는 5종의 지방산이 유효한 양으로 탐지되었으며 그 유사성이 0.711임을 보여주었다. 또한 JKK238의 16S rDNA를 포함한 클론의 염기서열 분석 결과에서 총 954의 염기 배열 중 945 개가 표준균주인 *B. subtilis* ATCC37015와 약 99%의 rDNA 염기서열 상동성을 보였다(rDNA 염기서열 자료 생략). 이상의 결과에 따라 JKK238은 *B. subtilis*임을 알 수 있었다.

Table 2. Fatty acids composition of JKK238 cell walls by MIDI sherlock systems.

| strains | Fatty acids composition (%) | | | | |
|------------------------------------|-----------------------------|-----------|------|----------|-----------|
| | 15:0 iso | 15:0 ante | 16:0 | 17:0 iso | 17:0 ante |
| JKK238 | 38.6 | 33.4 | 2.5 | 9.2 | 4.5 |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC37015 | 32.8 | 37.4 | 3.0 | 8.5 | 7.8 |

Table 3. Anti-microbial spectra of *Bacillus subtilis* JKK238 against plant pathogenic fungi and bacteria.

| Fungi | Activities | Bacteria | Activities |
|--|------------|----------------------------------|------------|
| <i>Botrytis cinerea</i> | +++ | <i>Erwinia carotovora</i> | ++ |
| <i>Pyricularia oryzae</i> | +++ | <i>Listeria monocytogenes</i> | +++ |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | +++ | <i>Streptomyces scabies</i> | +++ |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | ++ | <i>Streptococcus aureus</i> | + |
| <i>Penicillium sp.</i> | +++ | <i>Salmonella typhimurium</i> | - |
| <i>Collectotrichum gloeosporioides</i> | +++ | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | - |

+++; 10~15 mm, ++; 5~10 mm, +; below 5 mm

AMLP의 생리활성(항균성, 약리성) 특성

3일간 배양된 JKK 238 AMP의 항균 스펙트럼을 확인하기 위하여, 식물에서 심각한 병해를 일으키는 6종의 곰팡이, 1종의 세균 및 1종의 방선균, 2종의 식중독세균 및 다수의 젖산균 등을 지시균으로 시험관 내(in vitro) 항균성 검정을 수행한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 이 AMLP는 벼도열병균(*Pyricularia oryzae*), 포도 및 딸기 잭빛 곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 과채류의 저장병균(*Penicillium sp.*), 토마토의 시들음병균(*Fusarium oxysporum*), 고추의 탄저병균(*Collectotrichum gloeosporioides*) 및 무의 잘록병균(*Rhizoctonia solani*)로 이루어진 6종의 공시 병원성 곰팡이 모두에 대하여 뛰어난 항진균 활성을 보였다. 특히, 벼도열병균(*Pyricularia oryzae*), 포도 및 딸기 잭빛 곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)에 대하여 가장 강력한 항진균활성을 보였다. 또한, 본 AMLP시료는 특이하게도 곰팡이와 세포벽의 구조가 매우 다른 세균이나 방선균의 일부 중에서도 항진균활성을 나타냄을 확인하였다. 즉, 감자의 더듬이병을 야기하는 방선균(*Streptomyces scabies*), 원예작물에 연부병을 일으키는 세균(*Erwinia carotovora*) 및 변질된 햄이나 소세지에서 식중독을 일으키는 세균(*Listeria monocytogenes*)에 대하여 뛰어난 항진균 활성을 보였다. 특히 Fig. 1에서 보는 바와 같이 proteinase K 처리나 열처리(100°C, 30분)에서도 항진균활성의

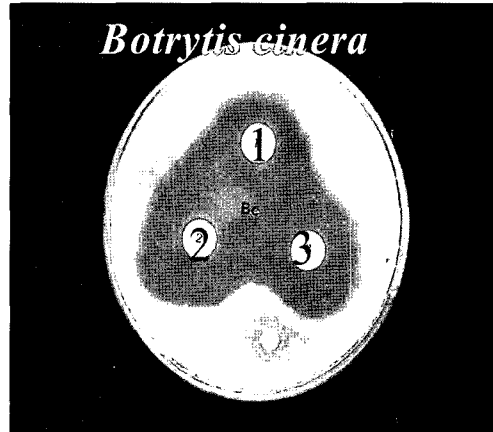


Fig. 1. Antifungal activities of AMP treated by heat and proteinase K treatment. 1; AMLP: 25% ammonium sulfate precipitates of 3 days-old TSB cultures of JKK238. 2; Proteinase K treatment(1.4 mg/ml, 30°C, 24 hr). 3: Heat treatment (100°C, 30 min).

손실이 거의 없는 것으로 나타났다. 이외에도 AMLP 시료 12 µM 내외의 낮은 농도에서도 염증작용을 유발하는 것으로 알려진 nitrite 발생량을 현저히 감소시켰다. 따라서 JKK238의 AMLP는 우수한 항염증제 및 항곰팡이제로의 개발 가치를 부여해 준다.

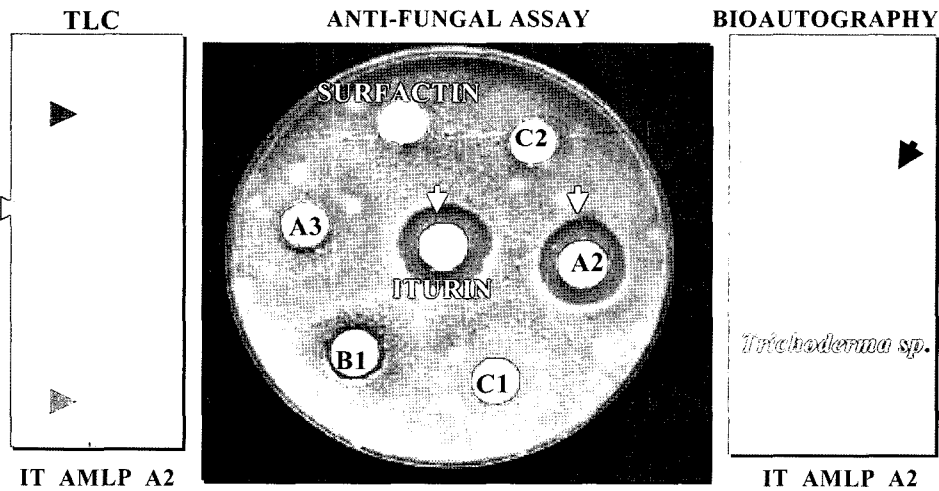


Fig. 2. Anti-fungal activity assay of each fractions separated by FPLC and TLC bioautography. IT, iturin standard; AMP, crude 25% ammonium sulfate precipitates of JKK238 cultures; A2, #13 peak separated by FPLC; B1, #15; C1, #21.

Lipopeptide의 분리 및 특성

항균력의 존재가 확인된 AMLP는 농축하여 상기에서 설명한 FPLC 조건에서 분리하였다(Fig. 3). 각 피크를 모아 활성 검정을 한 결과는 A피크가 강한 항진균 활성, B 피크는 보다 약한 항진균과 항염증 효과, C피크는 *L. monocytogenes*에 대한 항균활성의 주 유효물질임이 추정되었다(Table 4). 이들 각 peak들은 모두 oil-drop collapse에 의해 강력한 세정능을 가짐을 알 수 있었다. 우리는 이외에도 유효 활성물질의 부분정제를 위해 hydrophobic chromatography의 일종인 phenyl sepharose 4B($\phi 1.5 \times 20$ cm)에 이동상 용매(6 mM phosphate buffer, pH6.8 → 70% ethylene glycol in 6 mM PB)를 linear gradient로 하여 유효 물질을 분획하였다(1 ml/분, 25 ml/tube). 총 17분획에 대한 항균성 검정에서 10번에서 14번 분획이 주 유효물질로 나타나 이들이 매우 소수성이 강한 물질임을 알 수 있었으며 이들 분획을 투석막으로(M.W; 14,000) 투석 시, 감자더듬이병균(*Streptomyces scabies*)을 제외한 공시 지시병원균에 항균활성의 변화가 없다는 점이나 FPLC상의 gel filtration column을 통한 분획에서 주 항균물질의 분자량이 60,000으로 추정된다는 결과(미공개 자료)를 유추하여 볼 때, 처음에는 이들이 단백질일 가능성이 유력한 것으로 생각하였으나 MALDI-TOF 결과에서 분자량이 2,000 이하인 peptide임을 예상할 수 있었다.

또한 Fig. 2에서 보는 바와 같이 TLC상의 분리와 물에

의한 유효밴드의 탐지나 proton NMR 결과에서 지방산쇄 존재의 분명한 시그날은 이들 물질이 항균성 *Bacillus*에서 흔히 생산되는 일종의 lipocyclopeptide임을 분명히 보여주고 있다. 결과적으로 투석막에서 주 유효물질이 빠져나가지 못하는 이유가 이들이 극성과 비극성으로 이루어진 lipocyclopeptide로 수용액상에서 고농도로 존재 시, 단량체가 모여져 분자량이 큰 미셀(micell)로 존재하기 때문인 것으로 설명할 수 있다. 이것을 뒷받침해주는 최근의 보고가 있다[2]. 일반적으로 *Bacillus subtilis*의 배양액으로부터 lipopeptide의 1차 시료조제는 acid precipitation법[3], C₁₈ column법[8], ultrafiltration법[5] 등이 보고되었으나 본 연구에서는 처음으로 ammonium sulfate 침전법으로 lipopeptide를 조제할 수 있음을 보여주었다. AMLP의 FPLC chromatogram에서 약 20여 개 이상의 피크가 관찰되었으나 제일 앞 부분의 피크들은 투석(MW: 1,000)시 빠져나가는 저분자물질로 항균성과 항염증의 주 유효물질이 아님을 확인하였기 때문에 Fig. 3과 같이 크게 3그룹으로 구분될 수 있었다. 여기서 정제된 각 분획에 대한 생리활성 검정 결과(Table 4)에서 보는 바와 같이 A2(13번 fraction)는 항진균에 주 유효물질임을 알 수 있었고 B1(15번), B2(16번)는 항진균 효과와 주 유효 항염증물질임을 확인하였다. C1피크(21번)와 C2피크(23번)는 비교적 작은 피크로서 항 곰팡이와 항염증활성이 거의 없으나 항*listeria*의 주 유효 peptide이었으며 나머지 뒷부분의 두 피크(#26 & #27)는 매우 강력한 생

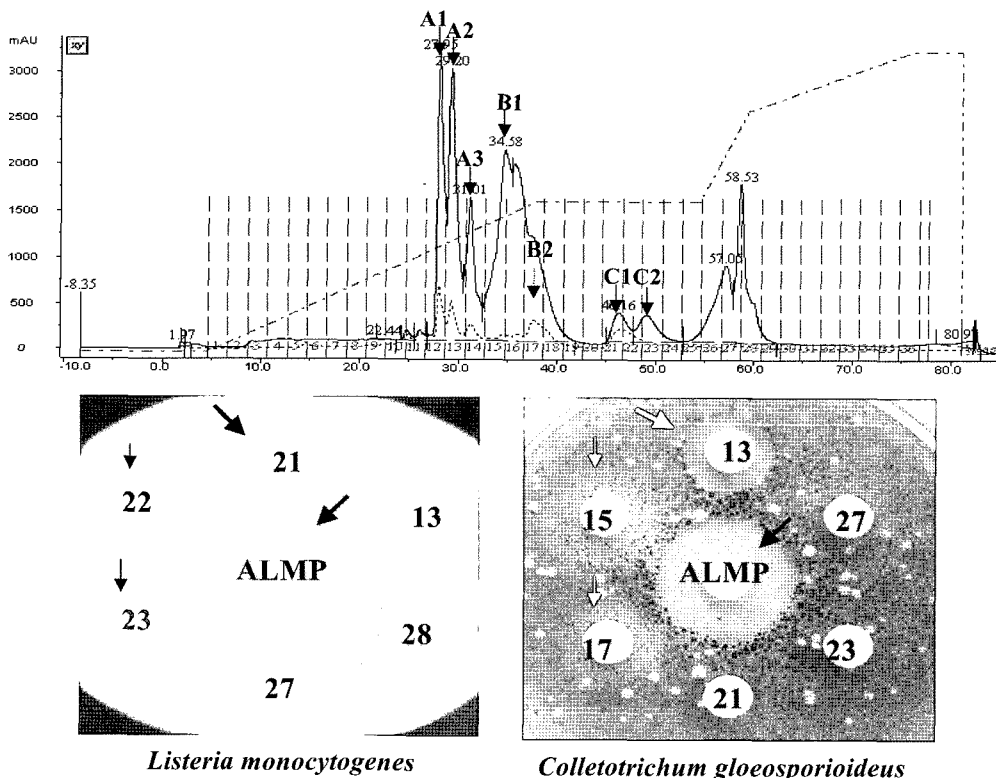


Fig. 3. FPLC chromatogram and antimicrobial assay of each fractions separated by FPLC.

Table 4. Bioactive assay of each fractions separated by FPLC

| Peak name (peak no. Molecular weight) | Antibiosis | | | Dosage concentration (1 µg) | |
|--|--------------------------------------|-----------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------|
| | <i>Colletotricum gloeosporioides</i> | <i>Trichoderma</i> sp | <i>Listeria monocytogenes</i> | Anti-inflammatory activities | Cytotoxicity |
| A | A1(#12, 1057) | ++ | ++ | — | N.T |
| | A2(#13, 1057) | +++ | +++ | ± | +++ |
| | A3(#14, 1071) | ++ | ++ | — | N.T |
| B | B1(#15, 1464) | ++ | ++ | — | +++ |
| | B2(#17, 1470) | ++ | ++ | — | N.T |
| C | C1(#21, 1018) | — | — | +++ | +++ |
| | C2(#23, 1036) | — | — | ++ | +++ |

Antibiosis: +++ (>10 mm), ++ (10~5 mm), ± (< 5 mm)

Anti-inflammatory activities: +++ (> 90% inhibition of NO production), ++ (70%)

Cytotoxicity(MTT assay): +++ (> 90% death ratio), — (< 1%) N.T: not tested

Anti-inflammatory activity is measured by amounts of nitrite/nitrate, control is LPS(lipopolysaccharide; 100 ng/ml). Cytotoxicity is measured by MTT assay. Molecular weights of each peak was determined by MALDI-TOF spectra.

A, Iturin; B, Fengycin; C, Surfactin family.

세정능을 보였다.

한편 TLC상에서의 항곰팡이 유효물질을 확인하기 위한 bioautography 실험에서 상기 기술된 용매로 전개된 TLC판을 lipopeptide의 탐지가 가능한 물로 분무하여 관찰하면 A2 피크는 Rf지 0.62 부근에 물에 젖지 않는 단일밴드가 나타나는데 이 밴드는 기 보고된 항곰팡이 펩타이드인 iturin 표준품과 동일한 Rf치를 가지므로 iturin으로 추정된다. 또한 전개된 TLC판은 느타리버섯에서 발생하는 푸른 곰팡이병의 원인균인 *Trichoderma* sp. 포자를 대상으로 bioautography를 행하였으며 여기서 A2가 강력한 항곰팡이 효과의 주원인물질임을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 일반적으로 *B. subtilis* 한 균주가 세종의 lipopeptide를 동시에 생산하는 보고는 일

부 보고되었으나[7, 10], 본 균주와 동일한 세 종류의 lipopeptide를 동시에 생산하는 경우는 거의 없는 것으로 알려져 있다. 특히 Fig. 3에서 보는 바 처럼 JKK238은 iturin, fengycin, surfactin을 약 9 : 8 : 7의 비율로 생산하는데 기존 보고에 비해 비교적 균등한 비로 생산하는 것은 항곰팡이 방제 효과에 많은 장점을 가질 수 있다. 그 이유는 단독으로는 항균효과가 없는 surfactin이 항균성이 강한 iturin이나 fengycin과 혼합되었을 시 이들의 항균활성의 synergic effects를 증가시킨다는 보고가 있기 때문이다[3].

Maldi-Tof에 의한 lipopeptide의 구조분석

FPLC에서 정제된 A 피크들을 동결건조하여 maldi-tof 분

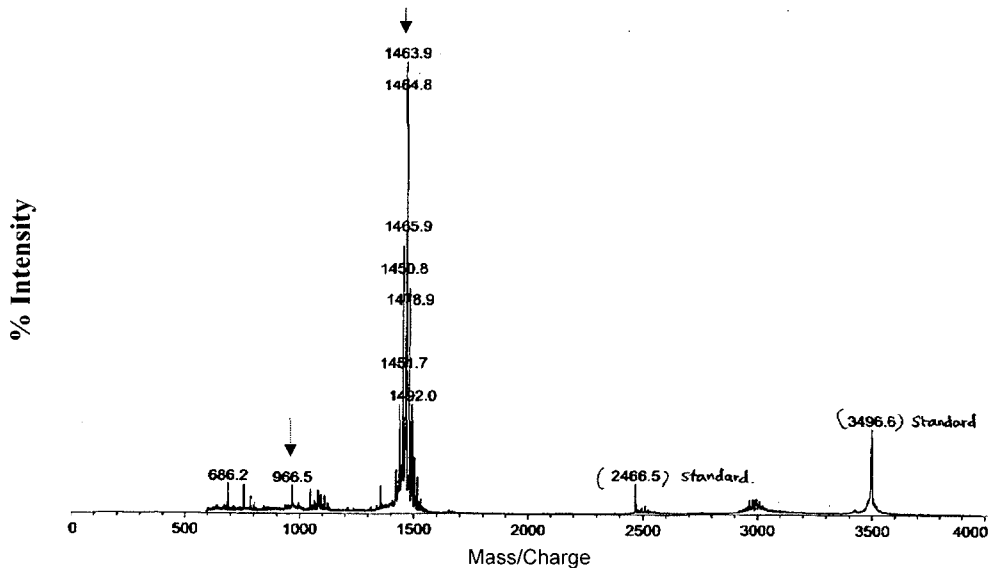


Fig. 4. MALDI-TOF mass spectra from B1(#15 peak) separated by FPLC.

석을 행하였는데 A1과 A2 피크는 모두 분자량이 1,057로 나타났고 이 결과는 *B. subtilis*에서 기 보고된 항 곰팡이 펩타이드인 iturin A3, A4, A5와 분자량이 동일하였다. 그러나 A3는 1,071로 iturin A6, A7과 동일하나 보다 자세한 검토가 필요하다. 그러나 lipopeptide A분획들 중에서 A2외 에는 항곰팡이 활성이 거의 없거나 매우 미약하였다. A2(#13 lipopeptide)와 표준품 iturin A(Sigma I-1774)의 TOCSY-NMR spectra는 정확히 일치하였으므로 이것의 peptide moiety는 iturin A 표준품과 동일함이 증명되었으나 A1과 A2의 항 진균 활성의 차이는 지방산 쇠의 결합 양식(ante혹은 iso 형태)에 기인하는 것으로 추정된다. iturin과 mycosubtilin의 경우, n 형태의 지방산 쇠가 iso나 anteiso 형태의 지방산 쇠보다 활성이 더 강하다는 기존 보고를 고려한다면 A1은 iso 형태의 지방산 쇠를 가진 것으로 생각된다[13].

항염증 주 피크인 B1의 MALDI-TOF 분석에서 분자량은 1,464로 기 보고된 항 곰팡이 펩타이드인 fengycin A1과 정확히 일치하였다. fengycin A와 B의 차이는 각각 D-alanine과 D-valine의 존재이다. 따라서 MALDI-TOF spectra에서 D-alanine과 D-valine의 분자량 차이만큼의 peptide moiety 분자량 시그널이 나타나는데 Fig. 4에서 보는 바처럼 D-alanine의 존재를 암시하는 분자량 966의 시그널을 볼 수 있었기 때문에 B1은 fengycin A1일 가능성이 유력하다[13]. 또한 항 *Listeria* 효과가 전혀 없는 surfactin 표준품(Sigma S-3523)과는 달리 강한 항 *Listeria* 효과를 보여주는 C1과 C2는 각 분자량이 1,018과 1,036임을 확인하였다. 특히 C2의 경우 surfactin 표준품의 분자량과 정확히 일치하였다. 이것은 지방산 쇠의 길이나 결합 양식이 항균성의 차이를 보인다는 기존 보고를 고려할 때 향후 연구에서 지방산 쇠의 정확한 구조를 밝힐 필요가 있을 것으로 생각된다.

요 약

한국 전통 젓갈로부터 항균성 lipopeptide를 생산하는 JKK238 균주를 분리하여 16S rDNA 및 세포벽의 지방산 조성 분석 등에 따라 *Bacillus subtilis*로 동정하였다. JKK238 균주를 3일 간 배양한 TSB 액체배지의 25% ammonium sulfate 침전물이 대부분의 lipopeptide를 포함하고 이들이 다양한 식물병원성 곰팡이나 세균의 성장을 강력히 저해함을 알 수 있었다. 또한 FPLC에 의해 분리 및 정제된 각 lipopeptide의 Maldi-tof 분석에서, 이 균주가 iturin A, fengycin, surfactin과 같은 세 종류의 lipopeptide의 isomer들을 동시에 생산하는 균주임을 밝혔다.

감사의 글

본 연구는 농림특정기술개발사업의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Akpa, E., P. Jacques, B. Wathélet, M. Paquot, R. Fuchs, H. Budzikiewicz, and P. Thonart. 2001. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **91**: 551-561.
2. Grau, A., C. Juan, J. C. Gomez-Fernandez, F. Peypoux, and A. Ortiz. 2001. Aggregational behavior of aqueous dispersions of the antifungal lipopeptide iturin A. *Peptides* **22**: 1-5.
3. Hiraoka, H. O. Asaka, T. Ano, and M. Shoda. 1992. Characterization of *Bacillus subtilis* RB14, Coproducer of peptide antibiotics iturin A and surfactin. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **38**: 635-640.
4. Kluge, B., J. Vater, J. Salnikow, and K. Eckart. 1988. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *FEBS Lett.* **231**: 889-901.
5. Lin, S. C. and H. J. Jiang. 1997. Recovery and purification of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus subtilis* by ultrafiltration. *Biotechnol. Techniq.* **11**: 413-416.
6. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63.
7. Phister, T. G., D. J. O'Sullivan, and L. L. McKay. 2004. Identification of bacilysin, chlorotetaine, and iturin A produced by *Bacillus* sp. strain CS93 isolated from Pozol, a Mexican fermented maize dough. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 631-634.
8. Razafindralambo, H., and M. Paquot. 1993. Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography* **639**: 81-85.
9. Regine, M.D. and F. Peypoux. 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology* **87**: 151-174
10. Roongsawang, T., T. Kameyama, M. Haruki, M. Morikawa. 2002. Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. *Extremophiles* **6**: 499-506.
11. Tsuge, K., T. Ano, and M. Shoda. 1996. Isolation of a gene essential for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics plipastatin B1 and surfactin in *Bacillus subtilis* YB8. *Arch. Microbiol.* **165**: 243-251
12. Vanittanakam, N. and W. Loeffler. 1986. Fengycin - a novel antifungal lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis* F29-3. *J. Antibiotics (Tokyo)* **39**: 888-901.
13. Wang, J., J. Liu, X. Wang, J. Yao, and Z. Yu. 2004. Application of electrospray ionization mass spectrometry in rapid typing of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis*. *Let. Appl. Microbiol.* **39**: 98-102.

(Received Oct. 19, 2005/Accepted Dec. 9, 2005)