

최 종
연구보고서

토착 미생물 유래 biosurfactant 탐색과
생산 관련 유전자의 발굴 및 활용

Application and study of the biosurfactant, genes
involved in biosurfactant biosynthesis from
indigenous microorganism

연구 기관
동 아 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “토착 미생물 유래 biosurfactant 탐색과 생산 관련 유전자의 발굴 및 활용에 관한 연구” 과제(제1협동과제 : 신규 biosurfactant 생산 토착 균주 선발, 특성 및 효과 검정, 제1세부과제 : Biosurfactant 대사 관련 유전자의 발굴 및 기능분석, 제2협동과제 : 식물병 방제와 환경 정화 효과 검정 및 대량 생산 제조 기술 확립)의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7월 14일

주관연구기관명 : 동아대학교

총괄연구책임자 : 최 용 락

협동연구기관명 : 창원대학교

협동연구책임자 : 주 우 흥

협동연구기관명 : 한동대학교

협동연구책임자 : 황 철 원

연 구 원 : 조 수 동

연 구 원 : 유 주 순

연 구 원 : 이 상 철

연 구 원 : 김 선 희

연 구 원 : 류 아 름

연 구 원 : 박 인 혜

연 구 원 : 김 선 아

연 구 원 : 김 청 혜

연 구 원 : 최 혜 정

연 구 원 : 이 민 아

연 구 원 : 장 혜 원

요 약 문

I. 제 목

토착 미생물 유래 biosurfactant 탐색과 생산 관련 유전자의 발굴 및 활용

II. 연구개발의 목적 및 필요성

미생물이 생산하는 biosurfactant는 화학계면 활성제에 비하여 생분해가 가능하여 저독성이며, 극한의 온도나 pH에서도 안정성을 가지면서, 토양과 수질 오염원의 환경 정화, 농업적 이용, 식품, 의약 및 화장품 등의 산업적 분야에도 다양한 기능을 보이고 있다. Biosurfactant를 농업적으로 활용하기 위한 방안은 다음의 두 가지 측면이 있다. 첫째는 미생물이 생성하는 glycolipid 계열과 lipopeptide 계열 물질의 항균 작용으로 식물 병원성 진균에 대한 응용 가능성이며, 둘째는 농경 지역에 증가되는 유류 오염과 각종 화학 물질로 오염된 토양과 수질을 정화시키는 기능을 활용한다는 점이다. 이러한 기능을 가진 biosurfactant로는 많은 물질이 알려져 있으나 다양한 토착 미생물이 생산하는 신기능 및 고기능성 물질의 분리 및 대량 생산 체제를 위한 연구가 아직 경제성이 있는 제품의 생산에는 미흡한 실정이다. 최근에는 생명 공학적 기법을 이용하여 biosurfactant 생산 관련 유전자의 해석이 이루어지고 있으나 관련 유전자의 도입에 따른 형질전환 균의 개발은 거의 초기 단계에 불과하다. 따라서 생명 공학 기법을 이용하여 기능성이 뛰어나면서 효율적으로 biosurfactant를 생산할 수 있는 기술의 개발이 필요하다고 사료 된다

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 토착 미생물 유래 biosurfactant 탐색과 생산 관련 유전자의 발굴 및 이에 대한 활용으로 그 연구개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

1. 제1협동과제 : 신규 biosurfactant 생산 토착 균주 선발, 특성 및 효과 검정
2. 제1세부과제 : Biosurfactant 대사 관련 유전자의 확보 및 기능 분석
3. 제2협동과제 : 식물병 방제 효과 및 환경 정화 검정 및 대량 생산 제조 기술 확립

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 신규 biosurfactant 생산 토착 균주 선발, 특성 및 효과 검증

Biosurfactant 생산력이 우수한 신규 미생물을 분리·선별하고자 각종 산지 토양에서 시료를 채취하여 미생물 균주를 분리하였다. TBM계 균주는 태백산에서, GBM계 균주는 계방산 부식토에서 각각을 분리한 균으로부터 길항력이 우수한 균주를 우선 선별하였다. 태백산과 계방산의 부식토로부터 식물병원성 균인 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxisporum* 및 *Botrytis cineria* 등에 각각 길항 활성을 보이는 총 50여 균주를 분리하고 이들 중 유효한 길항균주 47표본을 선발하였다. 항균활성이 우수한 균주 TBM40-3, TBM1552(2)-1, TBM3101(3)-9, GBM3302(2)-3, GBM3307(4)-4, GBM3308(3)-12, GBM3309(3)-11, A8-8, LP03, 그리고 DYL130가 선발되었다. 이 균주들의 생리·생화학적 특성과, 형태적인 특징, 16S rDNA서열, *gyrA*를 분석하여 동정한 결과 *Bacillus vallismortis* TBM40-3, *B. vallismortis* TBM1552(2)-1, *B. amyloliquefaciens* TBM3101(3)-9, *B. pumilus* GBM3302(2)-3, *Pseudomonas* sp. GBM3307(4)-4, *B. subtilis* GBM3308(3)-12, *Micrococcus* sp. GBM3309(3)-11, *B. subtilis* A8-8, *B. amyloliquefaciens* LP03, 그리고 *B. atrophaeus* DYL130로 명명하였다. 또한 항진균 활성은 없으나 lipase 분해활성이 강한 균주 DYL239와 BD57은 *Acinetobacter* sp. 로 동정되었다. DYL239과 BD57은 제 1 세부과제를 통해 lipase 유전자의 clonig 및 분석을 위한 실험에 사용되었다.

Bacillus vallismortis TBM40-3, *B. vallismortis* TBM1552(2)-1, *B. amyloliquefaciens* TBM3101(3)-9, *B. pumilus* GBM3302(2)-3, *Pseudomonas* sp. GBM3307(4)-4, *B. subtilis* GBM3308(3)-12, *Micrococcus* sp. GBM3309(3)-11, *B. subtilis* A8-8, *B. amyloliquefaciens* LP03, 그리고 *B. atrophaeus* DYL130이 다양한 기질(soybean oil, crude oil, tributyrin, kerosene, hexadecane, tetradecane dodecane, decane)에 대하여 높은 활성과 안정성을 보여 준다.

각 기질별 우수한 활성을 가지는 균주의 biosurfactant는 모두 유화활성 및 유화안정성이 합성 계면활성제와 유사하거나 우수하였다. 따라서 합성 계면활성제의 대체를 고려해 볼 수

있을 것이다.

이상과 같이 선별된 균주인 *B. subtilis* GBM3308(3)-12, *Micrococcus* sp. G3309(3)-11 *B. subtilis* A8-8, *B. atrophaeus* DYL130, 그리고 *B. amyloliquefaciens* LP03의 배양 상등액으로부터 biosurfactant를 분리하고 다음과 같이 분석하였다. *B. subtilis* GBM3308(3)-12와 *Micrococcus* sp. G3309(3)-11의 배양 상등액으로부터 부분 정제된 biosurfactant를 glass TLC (thin layer chromatography : Merck Silica gel 60 F₂₅₄)를 통하여 전개, 발색 시킨 결과 *B. subtilis* G3308(3)-12에서는 R_f(range-finding)값이 0.63인 밴드를 확인하였고, *Micrococcus* sp. G3309(3)-11에서는 R_f값이 0.67로 나온 밴드가 펩타이드 부분과 지방산으로 구성되어 있는 lipopeptide로 추정되었다. 확인된 부분을 추출, 농축하고 methanol에 녹여서 HPLC를 통하여 확인해 본 결과, *Micrococcus* sp. G3309(3)-11균주의 biosurfactant는 retention time이 3.514에서 peak가 나타났고, *B. subtilis* GBM 3308(3)-12의 추출물은 3.604와 7.986의 2개의 peak가 뚜렷이 보인다. 특히 *B. subtilis* GBM 3308(3)-12에서는 이들이 iturin A와 surfactin 표준물질과 retention time이 다소 일치하지 않았다. *B. subtilis* A8-8의 배양 상등액으로부터 정제된 biosurfactant는 분자량이 약 1100 Da인 lipopeptide iturin과 유사한 물질을 SDS-PAGE, TLC를 통하여 확인하였다. 또한 정제된 biosurfactant는 우수한 CMC(critical micelle concentration)를 가지는 것을 확인할 수 있었다. DYL130으로부터 분리된 biosurfactant는 기질로 kerosene, tributyrin, 및 soybean oil을 아주 잘 유화한다. DYL130의 배양 상등액을 column chromatography를 수행하고, TLC를 하여 물 발색에서 Fraction 4에서 R_f가 0.63 부근에 lipopeptide로 생각되어 지는 spot이 나왔다. 이것을 다시 회수 하여 물방울 붓고실험을 한 결과 표면장력을 감소시켜 물방울이 퍼지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 toluene을 유화시키는 실험에서 강한 활성과 안정성을 확인할 수 있었다. *B. amyloliquefaciens* LP03의 배양 상등액으로부터 biosurfactant를 추출하여 HPLC로 정제한 biosurfactant를 MALDI-TOF mass를 통하여 분석하였다. Fraction1의 분자량은 m/z 1044.8과 1512.9, fraction3은 m/z 1058.8과 1514.0, fraction4는 1072.8과 1513.1, fraction5는 1072.9와 1514.2, 그리고 fraction8은 1086.9 와 1491.2로 다양한 이성체가 존재한다. MALDI-TOF chromatogram에서 분자량이 m/z 1044, 1058, 1072, 그리고 1086은 iturin 또는 surfactin의 이성체라고 생각되어 진다. 또한 분자량이 m/z가 1512, 1513 그리고 1514는 아직 보고된 적이 없는 분자량이다. 신규 lipopeptide biosurfactant일 가능성이 높다. 분자량이 m/z 1491은 구성물질의 조성을 알아보기 위하여 TOF-MS/MS를 이용하여 분석하였다. Fraction8은 탄소수가 17개인 fatty acid와 Glu, Orn, Tyr, Ser, Glu, Val, Pro, Gln, Tyr, Leu의 10개의 아미노산이 연결되어 있다. 따라서 기존의 Thr Ser 잔기로 치환된 새로운 fengycin 임을 알 수 있었다.

따라서 제 1협동과제에서 분리, 동정된 균주 *B. amyloliquefaciens* LP03은 lipopeptide 생합성 유전자의 분석을 위해 사용되었으며, *Acinetobacter* 속의 DYL239와 BD57은 신규 lipase의 유전자를 크로닝하고 기능 분석을 위해 사용되었다.

TBM40과 LP03은 제 2 협동과제에 식물 생육 촉진, 토양중 유류 성분의 분해, 미생물 제제의 제조 등의 연구에 사용되었다.

나. Biosurfactant 대사 관련 유전자의 확보 및 기능 분석

길항력과 유류 분해능이 뛰어난 균주로 제1협동과제에서 분리한 *B. amyloliquefaciens* LP03로부터 Lipopeptide, Iturin과 Surfactin 생산에 관련되는 유전자를 클로닝하였다. Surfactin 생산에 관련되는 유전자의 nucleotide 크기는 38.146 kb이며, Iturin 생산과 관련된 유전자는 promotor를 포함하여, *Itu IV*, *Itu I*, *Itu II*와 *Itu III*의 4개의 ORF로 구성되어 있음을 확인 할 수 있었으며, *Itu IV*는 염기서열이 1.2 kb 영역의 크기로서 400개의 아미노산을 가지는 malonyl-CoA transacylase를 암호화하는 유전자이다. malonyl-CoA transacylase는 lipopeptide의 지방산의 결합을 촉매하는 효소이다. *Bacillus amyloliquefaciens* LP03은 *Itu I*, *Itu II*와 *Itu III*는 각각 약 11.9 kb, 16.0 kb, 7.8 kb와 3,282, 5,362, 2,618개의 아미노산을 암호화하고 있고 세 유전자 모두 lipopeptide에 peptide의 합성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 여기에서 보고한 Iturin operon은 *Bacillus subtilis*에서 보고된 Iturin operon과 높은 상동성을 보여 준다.

Surfactin 생산과 관련된 유전자는 *Srf I*, *Srf II*, *Srf III*, *Srf IV*, *Ata-03*, *Lpa-03*의 유전자들이 오페론을 이루고 있을 것이라 예상되어 지며 현재 *Ata-03*과 *Lpa-03*이 클로닝 되어져 있다. *Ata-03*와 *Lpa-03*은 각각 675 bp와 1302 bp의 염기로 구성되어져 있으며, *Ata-03*은 433개의 아미노산으로 된 aminotransferase를 암호화 하고, *Lpa-03*은 224개의 아미노산으로된 phosphopantetheinyl transferase를 암호화 한다. *Lpa-03*의 아미노산은 iturin A와 plipastatin B1을 생산하는 *B. subtilis*의 *Lpa-14*와 99%, plipastatin B1과 surfactin을 생산하는 *B. subtilis*의 *Lpa-8*과 87%, surfactin을 생산하는 *B. subtilis*의 *Sfp*와 74%, 그리고 surfactin을 생산하는 *B. pumilus*의 *Psf-1*과 44%의 상동성을 보여주며 이들 중 Phosphopantetheinyl transferase는 다양한 lipopeptide의 생산과 관련이 있다. 즉 Phosphopantetheinyl transferase는 lipopeptide의 합성과정과 세포외로 분비되는 과정, 생산 조절 등의 다양한 기능을 가질 것으로 예상되어 졌다.

새로운 유류분해 관련 유전자를 확보하기 위하여, 사하구 일대의 하수를 LB 고체배지에 도말하여 배양한 후 생육이 좋은 colony 5종을 선별하여 단일 colony를 확보하였으며 1%

tributyryn이 첨가된 고체배지에서 배양 후 BD27, 47, 57 가 tributyrin을 가수분해함을 확인하였다. BD27, 47, 57의 lipase 보존영역을 기준으로 하여 primer를 작성한후 PCR을 수행한 결과 BD 4와 5에서 단일 밴드가 보였고, 각각의 얻어진 단편을 pGEM T-easy vector에 cloning하여 염기서열을 결정하였다. 그 결과 BD57가 lipase 유전자를 가지고 있음을 알 수 있었다. DNA walking PCR을 이용하여 BD57의 완전한 lipase의 염기서열을 결정하였다. 그래서 BD57의 lipase 유전자 영역을 얻었으며 이는 2개의 ORF로 구성되어 있음을 알 수 있었다. BD57의 lipase 영역은 *Acinetobacter* sp. ADP1과 53%의 상동성을 나타내었고 lipase인 LipB는 *Acinetobacter calcoaceticus* 와 49%의 상동성을 나타내었다. DNA walking PCR로 얻어진 BD57의 lipase 영역의 염기서열을 바탕으로 BD Lip A의 아미노산 서열과 *Acinetobacter* 종의 다른 lipase와 비교하여 alignment를 하였다.

DY239는 tributyrin을 강하게 분해 활성을 가지는 것으로 분리되었으며, 16S rDNA 서열의 분석을 통해서 *Acinetobacter schindler*로 동정되었다. DY239의 Lipase 생산 관련 유전자를 cloning한 결과 LipB, LipA1, LipA2와 LipA3로 구성되어 있는 것으로 확인되었으며 이들 각각을 다른 균주의 유전자 및 단백질과 비교 하였을 때, 거의 53%이하의 상동성을 보여 준다. 이것은 이 단백질이 아직 보고된 적이 없는 것임을 나타내는 것이다.

다. 식물병 방제 효과 및 환경 정화 검정 및 대량 생산 제조 기술 확립

B. amyloliquefaciens LP03은 Gasoline으로 오염된 토양에서 식물체의 생육촉진 효과 유발한다. *B. amyloliquefaciens* LP03이 처리된 토양에서 녹두의 뿌리와 줄기 모두 성장이 촉진되는 것을 확인할 수 있다. 2%로 오염된 토양에서 LP03이 처리된 오염된 토양에서는 종자의 발아를 관찰할 수 있다. 이러한 결과는 gasoline으로 오염된 토양에서 식물의 성장에 있어 LP03이 중요한 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

식물 병원성의 균에 대한 항진균 효과와 부추에 대한 생육 촉진 효과를 *B. amyloliquefaciens* LP03와 *B. vallismortis* TBM40-3를 각각 처리하여 확인한 결과 시중에 판매되는 농약과 비슷한 효과를 나타내었다. 이것은 화학 농약을 대체할 수 있는 가능성을 제시하는 것이다.

Gasoline으로 오염된 토양에서의 균의 생육 정도를 확인하기 위해 cell counting 방법을 이용하여 균의 수를 측정한 결과 8일째 되는 날까지 꾸준한 성장을 하던 균이 13일이 되는 날 줄어든 것을 볼 수 있었다. 이는 hydrocarbon의 degradation과 비교하여 8일이 되는 날 이후로 더 이상 degradation이 급격히 일어나지 않는 것과 관계가 있는 것으로 보인다.

B. amyloliquefaciens LP03은 lipopeptide인 iturin을 생산하는데, 이는 항진균 활성뿐 아니라 계면활성능을 가지고 있다. 본 연구진은 유류에 오염된 토양에 미생물을 첨가한 후 토양내에 발현되는 iturin을 정량적으로 확인하기 위해 northern blotting을 수행 유류오염 토양을 LP03으로 처리한 후 28℃ 10일간 배양한 후 토양으로부터 전 RNA를 추출하여 Iturin 유전자를 이용하여 northern blotting 한 결과 배양 후 8일째 되는 날 Iturin이 확인이 발현되어 처리한 균이 유류를 분해하면서 토양에서 시간이 지남에 따라 생존률이 높음을 확인할 수 있었다.

Bacillus amyloliquefaciens LP03과 TBM40-3가 C-source로 SBO(Soybean oil)를 사용하면서 30℃, 200rpm에서 배양할 때의 생육이 WK(등유)를 사용하였을 경우보다 매우 활발하였다. 특히 LP03는 SBO에 탁월한 생육을 나타내어 이 균의 biosurfactant 생산과 미생물을 토양처리제 등으로의 사용 시에 대량배양을 위한 경제적 배지원으로 폐식용유를 탄소원으로 이용할 수 있음을 시사하였다.

TBM40-3을 대량 배양하기 위하여 여러 가지 탄소원에 대한 조건을 검토 하였다. 일반적인 탄소원으로서 glucose와 sucrose가 biosurfactant 생성에 있어서 효과적이지만, 경제적인 측면을 고려하여 대량 배양에는 폐식용유를 탄소원으로 사용하였다.

본 미생물제제가 제품화 되어져서 유통과정에서의 고온 및 장기보관에 따른 제제화된 미생물의 *Bacillus vallismortis* TBM40-3 제제의 생균수는 12개월 까지도 높은 수를 유지하므로 장기간 보존 및 유통에 있어서 안정성이 있으므로 미생물 정화 제제로서의 호용성을 가진다. 또, 균주 자체를 제제화 하였을 경우 물질 분리 등의 공정이 필요 없으므로 제제화에 따른 경제적인 비용이 줄어드는 장점이 있다.

2. 활용에 대한 건의

1. 본 연구로부터 탐색 분리된 항진균 활성 및 유류분해 활성을 가지는 *Bacillus vallismortis* TBM40-3균주는 특허 출원이 되어 있어서 등록 과정을 거쳐 산업체로 기술 이전 예정이다.
2. 항진균 활성 및 유류분해 활성이 우수하며 식물갯빛 곰팡이 균에 저항성 뛰어난 *Bacillus amyloliquefaciens* LP03은 특허 출원 중에 있다.
3. *Bacillus amyloliquefaciens* LP03의 biosurfactant 생합성 유전자는 확보하였으나, 이들 유전자들은 거대한 오픈론으로 구성되어 있어서 대량발현 시스템을 이용하기에는 해결해야 할 문제점이 다소간 있다.

4. 항진균 활성 및 유류분해 활성을 가지는 많은 균주 들이 분리되어 졌으므로 오염된 토양을 복원하고, 작물의 생산량을 증가시키는데 이용할 많은 자원이 확보되어 있다.
5. *Bacillus* 속의 균주들이 생산하는 biosurfactant는 여러 용도로 사용되어 질 수 있다. 의약품, 화장품, 식품 첨가제 등으로 다양하게 이용되어 질수 있는데, 이런 용도로 사용하기 위해서 생산방법의 변화와 biosurfactant 분리, 정제 방법을 새로 개발해야 한다.
6. 유류분해 능력이 있는 새로운 Lipase의 연구 많이 이루어 져야 한다.

SUMMARY

I. Title

Application and study of the biosurfactant, genes involved in biosurfactant biosynthesis from indigenous microorganism

II. Objectives and Significance of the Research

Biosurfactants have several advantages over the chemical surfactants, such as low toxicity, high biodegradability and high surface activity, and are suitable for application in a variety of industries. Although all surfactants to be used until now derived from petroleum, however interest in microbial surfactants has been steadily increasing in recent year due to their diversity, environmentally friendly nature, possibility of production through fermentation, and their potential application in the environmental protection, crude oil recovery, health care, food-processing, cosmetic, and agricultural industries. A plan to applicate agriculture of biosurfactant has the following two aspects. The first, glycolipid and lipopeptide from microorganism has antimicrobial and antifungal properties, second biosurfactant can be efficiently applied on the bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated sites and wastewater. At present few biosurfactants have been used on an industrial scale however because of the lack of cost effective production processes. Therefore the search for biosurfactant-producing microorganisms that can be grown economically on an industrial scale continues.

III. Contents and Scope of the Research

Thus, the object of the present work was to applicate and study of the biosurfactant, genes involved in biosurfactant biosynthesis from indigenous microorganism.

1. Isolation and characterization of indigenous microorganism producing novel biosurfactant
2. Analysis of the genes involved in biosurfactant biosynthesis from indigenous microorganism.
3. The control of phytopathogene, bio-remediation, and establishment of technology for large scale production

IV. Results of the Research and Suggestion for the Application

Microorganisms, producing of biosurfactant and inhibition of pytopathogenic fungi, were isolated from several areas in Korea. TBM strains were isolated from Taebaek mountain area and GBM strains were isolated from Gyebang mountain area. We were isolated 47 strains which has antifungal activity against *Rhizoctonia solani* AG2-2, *Rhizoctonia solani* AG2-1, *Rhizoctonia solani* AG-1(1A), *Fusarium oxisporum*, and *Botrytis cineria*. Isolated strains were tested of oil emulsification, oil stability, and surface tension. Finally, we selected 3 strains (TBM40-3, GBM3308(3)-12, GBM3309(3)-11). These strains were identified as *Bacillus vallismortis* TBM40-3, *B. subtilis* GBM3308(3)-12, *Micrococcus* sp. GBM3309(3)-11 on the basis of physiological, morphological characterization and 16S rDNA sequence.

Biosurfactant produced *B. vallismortis* TBM40-3 indicated the most oil emulsification (2.65) against soybean oil. And also it has quite activity against crude oil, tributyrin, decane, and kerosene, as substrates. Surface tension was reduced by 30 mN/m. Biosurfactant produced *B. subtilis* GBM3308(3)-12 has quite oil emulsification and oil stability against tributyrin and soybean oil. Biosurfactant produced *Micrococcus* sp. GBM3309(3)-11 has quite oil emulsification and oil stability against tributyrin and soybean oil.

When compared biosurfactant with synthetic surfactant, *B. vallismortis* TBM40-3 was similar in oil emulsification and excelled at oil stability. However, *B. subtilis* GBM3308(3)-12 and *Micrococcus* sp. GBM3309(3)-11 were similar in oil emulsification activity and were inferior to emulsification stability.

Biosurfactant of *B. subtilis* GBM3308(3)-12 and *Micrococcus* sp. GBM3309(3)-11 was purified by thin layer chromatography (TLC, Merck Silica gel60 F₂₅₄). RF value of biosurfactant from *B. subtilis* G3308(3)-12 is 0.63 and *Micrococcus* sp. G3309(3)-11 is 0.67. These spots was dissolved in methanol. Biosurfactant of *Micrococcus* sp. G3309(3)-11 has one peak, which retention time is 3.514, and *B. subtilis* G3308(3)-12 has two peaks (retention times are 3.604 and 7.986).

A8-8 was grown with crude oil as the sole carbon source, the biosurfactant from the strain emulsified crude oil, vegetable oil, and hydrocarbons. Soybean oil was the optimum substrate for the emulsifying activity and emulsion stability of the biosurfactant, both of which were superior to those of several commercially available surfactants. The biosurfactant was purified by a procedure including HCl precipitation, methanol treatment, and silica-gel chromatography. The partially purified biosurfactant

was analyzed by TLC (thin layer chromatography), SDS-PAGE, and HPLC and it reduced the surface tension of water from 72 mN/m to 26 mN/m at a concentration of 30 mg/l. Therefore, the purified lipopeptide biosurfactant has strong properties as an emulsifying agent and acts as an emulsion-stabilizing agent.

Bacillus atrophaeus DY130 has antifungal activity and oil degradation activity. It could degrade kerosene, tributyrin, and soybean oil, as substrates. RF value of biosurfactant from *B. atrophaeus* DY130 is 0.63. This was reduced surface tension and had oil emulsification and oil stability against toluene.

Bacillus atrophaeus DY130 has antifungal activity and oil degradation activity. It could degrade kerosene, tributyrin, and soybean oil, as substrates. RF value of biosurfactant from *B. atrophaeus* DY130 is 0.63. This was reduced surface tension and had oil emulsification and oil stability against toluene.

Several bacterial strains producing biosurfactants were isolated from polluted marine and soil by oil. One of the strains named LP03 showed strong production activity of biosurfactants. This strain was identified as a *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 based on the morphological, biochemical, and physiological characteristics.

The biosurfactant, produced by the strain, emulsified crude oil, vegetable oil, and hydrocarbons. The surface tension of the culture broth of *B. amyloliquefaciens* LP03 decreased to 30 mN/m. The crude biosurfactant was obtained from the culture broth by acid precipitation, freeze drying, solvent extraction, and evaporation. The emulsifying activity of the biosurfactant showed better than the chemically synthesized surfactant (SDS, Span40, Span 85). The biosurfactants had strong properties as an emulsifying agent and as an emulsion-stabilizing agent.

The purified biosurfactant fractions were identified and analyzed by MALDI-TOF mass spectrum displayed [M + H] peaks at m/z 1044, 1058, 1072, and 1086 and these peaks were separated by m/z 14. Comparison with the mass database indicated the peak at m/z 1491 was similar to the known lipopeptide fengycin. This material was different from two amino acid sequences and the number of carbon atoms its fatty acid side chain. Therefore, The material was identified as novel fengycin (fengycin S)

Oil contamination with petroleum hydrocarbons has caused critical environmental pollution and health defects. Hydrocarbon-degrading microorganisms have an important role in the biological treatment of this pollution. So, we investigated biosurfactant produced by *Bacillus* sp. TBM40-3. The TBM40-3 producing biosurfactants were isolated from Taeback Mountain soil samples and identified as *Bacillus* sp. by 16s

rDNA nucleotides and *gyrA* sequence analysis. The surface tension of culture filtrate of *Bacillus* sp. TBM40-3 decreased to 29 mN/m. Emulsification activity and stability of crude biosurfactant measured by using water-immiscible hydrocarbons and oil as substrate. Maximum emulsification activity and stability was obtained from soybean oil. The crude biosurfactant had potent properties as an emulsifying agent and an emulsion stabilizing agent.

A microbial strain was isolated from a soil sample from Deog-yu Mountain in Korea. This strain, referred to as DYL129, produced an extracellular lipase and was identified as an *Acinetobacter* species by sequencing of its 16S rDNA and phylogenetic analysis. A genomic library was constructed from *Hind*III fragments and a recombinant plasmid, pLip-1 was selected for further analysis by colony PCR. Sequencing of a 3.8 kb insert in this clone, pLip-1, revealed one incomplete and three complete open reading frames (ORFs). The ORFs were predicted to encode a partial lipase, two putative lipases and a 50S ribosomal protein. Genome-walking PCR also identified transcripts encoding a complete lipase chaperone and three lipase A proteins. The lipase structural gene of *Acinetobacter schindleri* DYL129 was similar to the lipase structural gene of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 (*lipBA*). However, a significant difference with BD413 lipase structural gene was that the three lipase genes, *lipA₁*, *lipA₂*, and *lipA₃*, are located downstream of one chaperone gene in *Acinetobacter schindleri* DYL129 (*lipBA_{1A₂A₃}*). Although the amino acid sequences of these lipases (LipA₁, LipA₂ and LipA₃) differ, they both have a common 'GHSHG' consensus motif. This motif is the conserved active-site pentapeptide of lipase A. Moreover, all the three lipases share a conserved domain, the so-called α/β hydrolase fold.

We investigate antifungal activity and effects of growth promotion by biosurfactant produced from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 and *Bacillus vallismortis* TBM40-3 against fungus causing plants disease (Gray Mold-Botrytis cineria). Antifungal activity against *B. cineria* infected to leek (*Allium tuberosum* Rottler) exhibited better than antifungal agent farming drug (smilex, Dong bang agro., Seoul, Korea) through the field test. After infected by plant's disease, the leaves growth and number are maintained under presenting biosurfactant produced strains. Especially, one of the strains, named *B. amyloliquefaciens* showed strong antifungal activity on field studies.

In conclusion, this technology will be transferred to domestic companies to make commercial products, which will protect plants from phytopathogenic diseases and treat of soil-environment contaminated.

CONTENTS

Part 1. The Outline for Research & Development -----	20
Chapter 1. The purpose and need for research & development -----	20
Chapter 2. The contents and limit for research & development -----	25
Part 2. The Present States of Technology and Development at Home and Abroad -----	28
Chapter 1. Current situation in domestic and foreign technology -----	28
Chapter 2. Future prospect -----	29
Chapter 3. Validity of technology -----	29
Part 3. The Results of Research & Development -----	31
Chapter 1. Introduction -----	31
Chapter 2. Isolation, characterization and investigation of novel native microorganism producing biosurfactant -----	33
1. Materials and Method -----	33
2. Results & Discussion -----	35
가. Isolation of antagonistic microorganisms producing biosurfactan-----	35
나. Identification of isolated strains-----	42
다. Emulsification activity and stability of strain producing biosurfactant -----	51
라. Isolation and identification of microorganis producing lipolytic enzyme ----	54
Chapter 3. Characterization of biosurfactant produced by microorganims -----	54
1. Materials and Method -----	54
2. Results & Discussion -----	55

가. Cell growth and surface tension of biosurfactants produced by microorganisms	55
나. Emulsification activity and stability of biosurfactants produced by microorganisms	56
Chapter 4. Purification and characterization of biosurfactants	66
1. Materials and Method	66
2. Results & Discussion	67
가. Purification and characterization of biosurfactants produced by TBM and GBM strains	67
나. Purification and characterization of biosurfactants produced by <i>Bacillus subtilis</i> A8-8	71
다. Purification and characterization of biosurfactants produced by <i>Bacillus atrophaeus</i> DY130	73
라. Purification and characterization of biosurfactants produced by <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LP03	77
마. Structural analysis of purified biosurfactant	80
Chapter 5. Cloning and analysis of gene-related biosurfactant production	84
1. Materials and Method	84
2. Results & Discussion	85
가. Analysis of gene-related Iturin biosynthesis	85
나. Analysis of gene-related surfactin biosynthesis	106
다. Cloning and analysis of gene-related oil-degrading	110
Chapter 6. Control effect of phytopathogenic fungi, bioremediation of farmland, and technology of production on a large scale	121
1. Materials and Method	121
2. Results & Discussion	123
가. Promotion of plant growth by bacteria producing biosurfactant	123
나. Antagonistic effect by bacteria producing biosurfactant	126
다. Oil degradation by bacteria in oil-contaminated soil	129

라. Optimal condition of large scale culture -----	130
Part 4. Achievements of Purpose and Contribution for Relative Field -----	139
Chapter 1. Purpose of Research & Development and Achievement -----	139
Chapter 2. Contribution for Relative Field -----	140
Part 5. Results of Research & Development and Application Plan -----	141
Part 6. Collection of Technology information -----	142
Part 7. References -----	142

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	20
제 1 절	연구개발의 목적 및 필요성	20
제 2 절	연구개발의 내용 및 범위	25
제 2 장	국내·외 기술개발 현황	28
제 1 절	국내외 기술개발 현황과 문제점	28
제 2 절	앞으로의 전망	29
제 3 절	기술도입의 타당성	29
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	31
제 1 절	서론	31
제 2 절	신규 biosurfactant 생산 토착 균주 선발, 특성 및 효과 검증	33
1.	연구수행 방법	33
2.	연구결과	35
가.	Biosurfactant 생성능이 우수한 길항 미생물의 분리	35
나.	분리된 균주의 동정	42
다.	Lipolytic 효소 생성 미생물의 분리 및 동정	51
제 3 절	유용미생물이 생산하는 Biosurfactant의 특성	54
1.	연구수행 방법	54
2.	연구결과	55
가.	Biosurfactant 생산 균주의 생균력과 표면장력	55
나.	Biosurfactant의 유화활성 및 유화 안정성	56
제 4 절	Biosurfactant의 정제, 특성 및 구조분석	66

1. 연구수행 방법 -----	66
2. 연구결과 -----	67
가. TBM 균주와 GBM 균주로부터 Biosurfactant 분리 및 특성-----	67
나. <i>Bacillus subtilis</i> A8-8의 biosurfactant 정제 및 특성-----	71
다. <i>Bacillus atrophaeus</i> DYLL130이 생산하는 biosurfactant의 특성-----	73
라. <i>B. amyloliquefaciens</i> LP03이 생산하는 biosurfactant의 특성 -----	77
마. 정제된 biosurfactant의 구조 분석-----	80
제 5 절 Biosurfactant 대사관련 유전자의 발굴 및 기능분석-----	84
1. 연구수행 방법 -----	84
2. 연구결과 -----	85
가. Iturin 생합성과 관련된 유전자의 분석-----	85
나. Surfactin 생합성과 관련된 유전자의 분석-----	106
다. 유류분해 관련 신규 유전자의 cloning 및 분석-----	110
제 6 절 식물병 방제 효과 및 환경정화 검정 및 대량생산 제조 기술 확립-----	121
1. 연구수행 방법 -----	121
2. 연구결과 -----	123
가. Biosurfactant 생성 우수 균주의 oil 오염 토양에서의 식물체 생장에 미치는 영향-----	123
나. Biosurfactant 생성 우수 균주의 길항효과 검정-----	126
다. 폐유로 오염된 토양에 유류 성분 분해-----	129
라. 대량배양 최적 조건 확립-----	130
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	139
제 1 절 연구개발의 목표달성도 -----	139
제 2 절 관련분야에의 기여도 및 기대효과-----	140
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	141

제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	142
제 7 장	참고문헌 -----	142

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적과 필요성

미생물이 생산하는 biosurfactant는 화학 계면활성제에 비하여 생분해가 가능하여 저독성이며, 극한의 온도나 pH에서도 안정성을 가지면서, 토양과 수질 오염원의 환경 정화, 농업적 이용, 식품, 의약 및 화장품 등의 산업적 분야에도 다양한 기능을 보이고 있다. Biosurfactant를 농업적으로 활용하기 위한 방안은 다음의 두 가지 측면이 있다. 첫째는 미생물이 생성하는 glycolipid 계열과 lipopeptide 계열 물질의 항균 작용으로 식물 병원성 진균에 대한 응용 가능성이며, 둘째는 농경 지역에 증가되는 유류 오염과 각종 화학 물질 (PAH 등)로 오염된 토양과 수질을 정화시키는 기능을 활용한다는 점이다. 이러한 기능을 가진 biosurfactant로는 많은 물질이 알려져 있으나 다양한 토착 미생물이 생산하는 신기능 및 고기능성 물질의 분리 및 대량 생산 체제를 위한 연구가 아직 경제성이 있는 제품의 생산에는 미흡한 실정이다. 최근에는 생명공학기술 기법을 이용하여 biosurfactant 생산 관련 유전자의 해석이 이루어지고 있으나 관련 유전자의 도입에 따른 형질 전환균의 개발은 거의 초기 단계에 불과하다. 따라서, 생명 공학 기법을 이용하여 기능성이 뛰어나면서 효율적으로 biosurfactant를 생산할 수 있는 기술의 개발이 필요하다고 사료되며 구체적인 내용은 다음과 같다.

제 1 항 기술적 측면

- 가. 계면 활성제의 세계시장의 수요규모는 2000년에 127억 달러에 달하지만, 주요 선진국은 생산량의 증가 보다는 고 부가가치의 신기술이 함유된 질적 성장을 꾀하며 저독성, 생분해성을 보이는 환경 친화적제품 (biosurfactant)에 대한 수요가 증가되고 있는 실정이다.
- 나. 유류 오염의 정화 및 식물 병원균의 항진균 효과가 우수한 biosurfactant를 생산하는 토착 미생물 자원이 확보되어 있어 이를 적극 활용 할 수 있다.
- 다. Biosurfactant 생산 관련 유전자를 이용한 대사회로 이해 및 형질 전환 균주의 개발이 가능하다.
- 라. 환경 친화적 농경지 토양의 유류 오염 제거 기술 개발 및 생물학적 병해 방제법을 개

발 할 수 있다.

- 마. 외국의 의존적인 기술에서 탈피하여 기술의 선진화를 조기에 실현 할 수 있다.
- 바. Biosurfactants는 종류와 구조가 다양하기 때문에 생합성에 관련된 유전자는 다수가 존재하는 것으로 알려져 있으며, 일부의 유전자만 클로닝 되어져 있다. 대부분의 생합성에 관련된 유전자는 수 개의 유전자가 하나의 오페론으로 구성되어 있다. 예로서 *P. aeruginosa*가 생산하는 biosurfactant인 rhamnolipid는 rhamnosyltransferase 생성 및 조절에 관여하는 유전자 (*rhlA*, *rhlB*, *rhlR*, *rhlI*)가 오페론을 형성하고 있는 것이 알려져 있다. 또한, *Bacillus* sp.의 세균에서는 lipopeptide 계인 surfactin과 iturin 생성에 관련된 유전자 일부(*lpa*, *sfp*, *itu*)가 클로닝 되어져 있으나, 이들 유전자의 기능과 생산 대사기구는 알려져 있지 않은 실정이다.
- 사. 이들 생합성 관련 유전자를 대량발현 시켜 경제적인 대량생산이 가능한 biosurfactant의 생산 시스템을 구축하거나 부가 가치가 높은 biosurfactant의 생산을 위한 균주의 개발이 필요한 실정이다.

제 2 항 경제 · 산업적 측면

- 가. 최근, 생물학적인 방법에 의해 농작물을 보호하려는 연구가 활기를 띠고 있으며 생물학적 제제의 실용화 가능성에 크게 낙관적이며, 미국에서는 진균과 세균을 이용한 주요 미생물 농약이 상업적으로 판매되고 있다. 현재 전 세계 생물 농약 시장은 7,000 억원 정도로 소규모이지만 매년 12% 정도의 고속성장을 지속하고 있으며, 특히 미생물 농약 분야는 연간 15~ 20%의 고속 성장을 지속할 것이라고 예측하고 있다.
- 나. 수입 대체 효과 및 국내 미생물 산업 육성에 기여 할 수 있다.
- 다. 유기 농법에 접목하여 미생물 농약을 개발함으로써 부가가치를 창출할 수 있어 경제 · 산업적으로 매우 의의가 크다.
- 라. 특히 세계 2대 농약 회사인 Monsanto 사가 화학 농약 생산을 중단함에 따라 필연적으로 다양한 미생물 농약을 개발하여야 할 것으로 생각되며 개발 성공 시 경제 · 산업적인 파급 효과는 지대할 것이다.
- 마. Biosurfactants는 표면을 활성화시키는 능력이 있는 물질로서 무독성, 안정성, 세척력, 유화능, 발포능, 분산 능 등의 특징을 가진다. 이러한 특징은 화학합성 surfactant로는 사용이 제한적인 분야인 의약품, 식품, 농업, 화장품 등의 분야와 화학합성 surfactant가 사용되는 분야까지 광범위하게 응용이 가능하다.

- 바. 환경 분야에 있어서 폐수정화, 난분해성 물질의 분해 등에 많은 미생물들이 이용되고 있으며, *P. aeruginosa*가 생산하는 biosurfactant인 rhamnolipid는 유류분해가 뛰어나며, 원유에 의한 토양오염 물질의 정화가 가능한 것으로 보고되고 있다.
- 사. 의학분야에 사용되는 항생제 중에서 일부는 *B. licheniformis* 와 *B. subtilis* 등에서 생산되어지는 항균효과 및 항암효과를 함께 가지는 biosurfactants의 사용이 가능하고, 이미 활용한 예가 있다.
- 아. 농업분야에 있어서는 농약의 분산력 증가를 위해 또는 그 자체가 각종 병원균에 대한 강력한 항균력을 가지므로 생물농약으로 개발될 수도 있다.
- 자. 기타 산업적 이용성은 화장품에 첨가하여 피부에 수분공급 효과, 항상성 유지 등이 있으며, 식품 분야에서 식품원료 가공에 유화제로 이용, 생명공학분야에서 동결보존제, 단백질 가용제, 효소 안정제 등으로 이용이 가능하고, 원유의 이동, 회수 분야에서도 biosurfactants는 이용될 수 있는 것이 보고되어 있다.

표 1. 국내 계면활성제 용도별 생산 및 판매실적 (1999년 조합사 기준)

(단위 : 톤, 100만원)

구분	생산량	국내판매		수출		합계	
		수량	금액	수량	금액	수량	금액
섬유(유재포함)	17,919	13,484	28,056	3,224	6,109	16,708	34,165
피혁(가지제포함)	1,709	1,189	1,787	513	555	1,702	2,342
제지·펄프공업	520	491	929	-	-	491	929
의약·화장품공업	213	104	251	109	170	213	421
염료·안료·도료·잉크공업	394	351	902	6	12	357	1,004
고무·플라스틱공업	223	205	597	-	-	205	597
농약공업	676	415	1,013	216	277	631	1,290
비료공업	0.2	0.2	2	-	-	0.2	2
토목(혼화제등)건축공업	92	82	130	-	-	82	130
기계(윤활유포함)금속공업	23,016	20,485	26,494	602	711	21,087	27,235
유출유처리제	85	81	109	-	-	81	109
세제공업	62,289	39,447	35,827	21,584	18,377	61,031	54,204
기타공업	4,676	3,142	1,808	949	1,084	1,091	5,892
소계	111,813	79,476	100,995	27,203	27,325	106,679	128,320
EO비이온성 계면활성제축합형	54,169	45,547	71,787	2,828	3,721	18,375	75,508
합계	165,982	125,023	172,782	30,031	31,046	155,054	203,828

표 2. 최근의 계면활성제 개발 동향

구분	최근의 주요현황	
계면활성제 응용기술에 의한 새로운 기능의 발굴	-하이브리드형 계면활성제 -유기규소계 계면활성제 -금속비누 -중합성 계면활성제 -고분자 계면활성제	-양이온, 음이온계면활성제 -반극성 유기붕소계 계면활성제 -베시클 형성 계면활성제 -발색성 계면활성제 -항균성 고정화 계면활성제
신규 천연계 계면활성제 기술개발	-사이클로 텍스트린 유도체 -항균성 프로틴계 계면활성제 -천연계 4급암모늄염	-토코페롤 유도체 -당질계 계면활성제 -라노린지방산 4급염유도체 -피마자유(트리글리세라이드)의 4급염 유도체
환경적합재료를 고려한 생분해성 계면활성제의 기술개발	-합성 계면활성제 및 Biosurfactant의 생분해성 -유기천이금속 계면활성제	

표 3. 세계 계면활성제의 연도별 시장전망

(단위 : 억 달러)

구분	1990년	1995년	1996년	1997년	2000년	2003년	2008년
음이온성	54.3	61.6	62.7	62.7	73.0	77.0	83.2
양이온성	7.3	9.3	9.6	10.0	11.0	13.0	17.0
비이온성	28.9	35.2	35.6	37.4	41.8	47.6	58.0
양쪽성	0.7	1.0	1.1	1.3	1.2	1.4	1.8
합계	91.2	107.1	108.5	111.4	127.0	139.0	160.0

*자료: 씨스캠닷컴(주), 신산업발전위원회 정밀산업분과위원회

제 3 항 사회·문화적 측면

- 가. 소득 증대와 환경에 대한 관심의 증대로 화학 물질 사용에 대한 우려되고 있어서 생분해성 계면 활성제의 개발이 요망된다.
- 나. 미생물 처리제의 개발로 화학 합성 농약과 비료의 절감 효과로 환경오염의 경감 및 환경 친화적 농업을 지향 할 수 있어서 실질적인 농가 소득 증대에 기여 할 수 있다.
- 다. 식품, 의약품, 농약 및 화장품 등의 각종 산업적 용도에 생분해성 계면 활성제의 대체에 의한 생태계보전과 국민 건강 증진에 기여 할 수 있다.
- 라. Biosurfactant 생산 관련 미생물 유전체 연구와 이를 환경오염 제거용의 bioremediation에 적용하고자 하는 기술 개발과 친환경 농업용 미생물 제제의 개발은 환경 문제 해결과 관련하여 사회, 문화적 측면에서 매우 중요하다.

제 2 절 연구개발 내용 및 범위

제 1 항 연구개발 목표와 내용

- 가. 제 1 협동 과제; 신규 biosurfactant 생산 토착 균주 선발, 특성 및 효과 검증.
 - 1. 각종 환경으로부터 신규 biosurfactant 생산 우수 균주를 탐색, 지속적 분리 및 특성 규명.
 - 2. 분리 균의 동정.
 - 3. Biosurfactant의 분리 정제 및 구조 결정.
 - 4. 정제된 물질의 유화 활성, 안정성, 길항력 등의 특성 규명.

- 나. 제 1 세부 과제 ; Biosurfactant 대사 관련 유전자의 발굴 및 기능분석
 - 1. 각종 환경으로부터 신규 biosurfactant 생산 우수 균주를 탐색, 특성 규명.
 - 2. 우수 생산 균주의 lipopeptides계 물질 생산관련 유전자 클로닝
 - 3. 우수 생산 균주의 유류분해 관련 유전자의 클로닝
 - 4. 클로닝된 유전자의 구조 해석 및 기능 분석.

다. 제 2 협동 과제 ; 식물병 방제와 환경 정화 효과 검정 및 대량 생산 제조 기술 확립.

1. Lipopeptide계 biosurfactant를 생산하는 균주의 *Botrycis* 속 병원균의 길항력 확인 포장 실험
2. Biosurfactant 대량 생산을 위한 최적 조건 확립.
3. Biosurfactant 경제적 생산을 위한 대량 배양용 배지 선발.
4. 개발된 처리제의 농업적 이용 방안을 확립을 위한 온실 및 포장 적용 시험.
5. 제제 개발 및 시제품 제작.

제 2 항 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연 구 개 발 목 표	연 구 개 발 내 용 및 범 위
1차 년도 (2003. ~ 2004.)		<ul style="list-style-type: none"> ○ 신규 biosurfactant 생산 우수 균주 선발 <ul style="list-style-type: none"> - 다양한 site로부터 균주의 탐색 및 분리 - 균주의 생리·생화학적 특성 검토 - 미생물의 계면활성능 검정 ○ Biosurfactant 생산 관련 유전자의 획득 <ul style="list-style-type: none"> - Biosurfactant 생산관련 유전자 확보 - Biosurfactant 생산관련 유전자 구조해석 ○ 최적 배양 조건 및 경제적 대량 생산법 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 생물 배양 조건 및 최적배지 검토
2차 년도 (2004.7 ~ 2005.7)	<ul style="list-style-type: none"> · 제 1 협동 과제 신규 biosurfactant 생산 토착 균주 선발, 특성 및 효과 검정 · 제 1 세부 과제 Biosurfactant 대사 관련 유전자의 확보 및 기능 분석. · 제 2 협동 과제. 식물병 방제 효과 및 환경 정화 검정 및 대량 생산 제조 기술 확립. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 신규 biosurfactant 생산 우수 균주 선발 <ul style="list-style-type: none"> - 균주의 생리·생화학적 특성 검토 - 미생물의 계면활성능 검정 - 생물학적 활성을 보이는 물질 분리 ○ Biosurfactant 생산 관련 유전자의 획득 <ul style="list-style-type: none"> - Biosurfactant 생산관련 유전자 확보 - 유류분해 관련 유전자의 확보 ○ 최적 배양 조건 및 경제적 대량 생산법 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 생물검정 (포장 및 온실 실험) - 생물 처리 조건 검토
3차 년도 (2005. ~ 2006.)		<ul style="list-style-type: none"> ○ Biosurfactant 생산 우수 미생물 선정 <ul style="list-style-type: none"> - Biosurfactant의 안정성, 유화활성 평가 - 신규 biosurfactant의 분리 및 구조동정 ○ Biosurfactant 생산 관련 유전자의 획득 <ul style="list-style-type: none"> - Biosurfactant 생산관련 유전자의 기능 확인 - 유류분해 관련 유전자의 구조해석 및 기능 검토 ○ 최적 배양 조건 및 경제적 대량 생산법 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 병원균 방제효과가 우수한 생물 제제의 개발 - 개발된 시제품의 검정.

제 2 장 국내·외 기술 개발 현황

제 1 절 국내·외 관련 기술의 현황과 문제점

제 1 항 국내 기술 현황

가. Biosurfactant 생성 미생물 선발과 특성

- 1) 토양 및 해양 미생물, *Bacillus* 속, *Burkholderia* 속, *Pseudomonas* 속에서 생산되는 자원이 확보 되어 있음. 특히 본 연구팀에는 다양한 활성을 지닌 균종이 확보되어 있으며, *Bacillus* 속 균종은 특히 출원 중이며 한국 생명공학연구원 유전자은행에 기탁되어 있다(균주 번호 KCTC 10383BP 및 KACC 91018).

나. 미생물의 배양학적 및 생성 biosurfactant의 특성 (lipopeptide 계 물질)

- 1) 유류를 유일한 탄소원으로 이용하여 다양한 온도와 pH에서 생육하며 biosurfactant 생성조건 확립되어져있다.
- 2) 생성된 물질의 유화 활성 및 유화 안정성이 화학 계면활성제와 대등하거나 우수하다.
- 3) 생성된 물질의 식물 병원성 생육 억제 효과로 잣빛곰팡이병을 유발하는 *Botrytis* 속 및 *Rhizoctonia* 속에 대해 높은 항균 효과가 밝혀져 있다.

다. 대량 배양 및 대량 생산 기술

- 1) 농업 부산물 및 폐유 등을 이용한 생산 미생물의 대량 배양 기술 및 최적 배지 선발이 요구된다.
- 2) Biosurfactant 대량 생산이 가능한 돌연 변이주의 확보가 요망된다.
- 3) Lipopeptide 및 Rhamnolipid 계열 생산 대사 관련 유전자가 일부 세균에서 획득되어진 것은 외국의 경우이며 국내에선 사례가 거의 없다.

제 2 항 현 기술 상태의 취약성

- 가. 미생물 생산의 biosurfactant의 각종 계면활성능의 연구 및 화학제품의 대응을 위한 연구가 매우 미흡한 상태이다.

- 나. Biosurfactant 생산 유전자 및 개발을 위한 생물 소재의 탐색이 한정된 균종에만 국한되어 있는 점이 취약하다.
- 다. Biosurfactant는 당지질 또는 당단백 등의 복잡한 물질 구조를 가지므로 대사 관련 유전자는 염색체 상에서 cluster를 형성하여 존재하거나 넓은 영역에 걸쳐 존재할 것으로 생각됨으로 이들 유전자 탐색 및 이용에 대한 연구에 국내외에서 아직 초보 단계라고 판단된다.

제 2 절 앞으로 전망

1. 환경 친화적인 산업기술의 개발은 21세기에 들어와서 가장 관심의 대상이 되고 있으며, 그 중 미생물을 이용한 bioremediation 기술은 매우 경제적이며, 미래 기술로서 각광받고 있다. 그러나 성공적인 적용을 위해서는 관련 미생물들의 생화학적 연구와 생물체의 유전정보를 바탕으로 한 생체 내에서의 관련 분해기구 및 분해대사경로 규명 등을 포함한 생물학적 분해에 대한 총체적 이해가 필수적이다.
2. 계면 활성제 산업의 미래 전망은 저독성이며 생분해성인 환경 친화적 제품 및 고기능화적 제품에 대한 수요가 증가 될 추세이므로 경제성 있는 biosurfactant의 수요는 급속히 증가될 것으로 추정된다. 따라서 경쟁력 있는 기능성 biosurfactant 생산 기술을 개발하여 국내 수요 증가에 대비하여 높은 수입 의존도에 대비해야 될 필요성이 제기 된다.

제 3 절 기술도입의 타당성

1. 미생물을 이용한 처리제는 환경 적응력이 중요하므로 국내에서 분리한 토착 균주의 이용이 가장 효율적이라고 생각된다.
2. 본 연구 과제는 신종의 biosurfactant 생산 생물 소재의 개발 측면에서는 기존의 기술을 반복하여 우수한 것을 찾아 낼 수 있으리라 기대되며, 생명 공학적 기법을 도입한 연구 과제는 처음 시도하는 연구이긴 하나 외국의 기술 도입 없이 실험을 수행할 계획이다. 본 연구자의 지난 연구에서 미생물 유전자의 재조합 및 대량 발현 시스템, 풍부한 연구 경험으로 축적된 연구 기법으로 가능할 것으로 생각된다.

3. 항 진균작용 및 농경지 토양에서의 효과 검정도 동아대학교 부속 농장 등의 자체 시설과 본 연구 참여 전문가들에 의하여 일차 검정을 수행한 후, 전문 산업 연구기관에서도 검증할 것이다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 서론

급속한 산업화와 도시화에 따른 인류 문제점 중에서 가장 심각하게 대두되어 있는 것이 환경오염문제이다. 환경오염은 인간 생활의 편리함을 추구하는 과정에 부수적으로 수반되는 환경오염물질의 과다한 사용에 따른 필연적인 결과로서 환경의 정상적인 자정작용을 넘어서서 인간의 건강과 생명을 위협하고 있어 인류의 미래에 불안한 그림자를 드리우고 있다. 이러한 오염은 토양오염, 지하수 오염 나아가 농작물의 오염을 유발하여 인류의 의식주가 환경오염물질에 노출되어 심각한 사회문제가 되고 있다. 환경오염은 지속적으로 확산되고 있는 실정이나, 환경오염을 예방하고 예측하고, 정화하기에는 매우 기술적인 난점이 많으며 시간적으로도 경제적으로 많은 노력과 투자가 필요하다. 환경오염 물질은 유기물에서 중금속등 무기물까지 다양하다. 이러한 물질은 많은 부분이 난분해성이므로 그 처리를 위하여 끊임없는 기술 개발이 요망되는 분야이다. 토양 오염은 특히 적절한 세척제를 이용하는 토양세척 기법을 도입하여 정화가능하며, 계면활성제가 일반적으로 세척제로 사용되고 있다.

지구 인구는 과밀화되어 있고 지구상에는 아직도 기아와 가난에서 벗어나지 못하고 있는 지역도 있어 식량 증산이 중요한 과제로 중요시되고 있다. 또한 소득증대와 인류의 필요에 따른 각종 작물의 증가와 유용식물의 작물화 등으로 화학 합성 농약의 사용이 계속되고 있다. 최근에는 국내에서도 지역사회의 세수 발굴과 지역개발 그리고 국민 소득의 증가와 여가 활용을 위하여 골프장이 급증하고 있어 과다한 화학농약의 사용이 문제가 되고 있다. 화학 합성 농약은 지속성과 속효성을 가지기 위하여 구조적으로 자연 분해 및 자정작용으로는 쉽게 분해도지 않으며 분해되지 않는 동안 세포독성이 있으므로 환경오염과 환경독성의 한 요인이 되고 있다. 그러므로 생물농약의 개발이 절실히 요구되고 있으며 화학농약 사용을 줄이면서 생물농약으로 이를 대체하고 있는 추세이다. 이러한 생물농약으로 개발되고 있는 미생물들은 다양한 형태의 물질을 생산하며 이들은 항 미생물 작용만 아니라 많은 부분에서 계면 활성 작용도 나타내고 있다.

계면활성제는 오일/물 또는 공기/물 표면간과 같은 극성과 수소결합정도가 다른 액상사이의 표면간에서 분별되는 친수성과 소수성을 모두 가지고 있는 분자들이다. 이들은 세제,

유화제, 기포제, 분산제제로서 사용되고 있으며, 식품, 생활용품, 세제, 의약품, 화장품, 섬유, 기계, 금속, 건축, 고무, 플라스틱, 도료, 사진공업 등에서도 필수 불가결한 요소이다. 우리나라에서는 가장 많이 쓰이고 있는 곳은 섬유공업이며 식품이나 의약품공업에도 그 용도가 증가하고 있는 실정이다. 그러나 현재 사용되고 있는 계면활성제는 석유에서 화학적으로 만들어져 있어 수질 등 오염의 원인을 제공하며, 독성이 높고 분해가 쉽게 되지 않는 점을 문제점으로 가지고 있다. 그리고 극한적인 온도와 pH 그리고 염도에서는 사용할 수 없다. 그러므로 계면활성제의 생분해도를 높이려는 시도와 함께 계면활성제 사용을 규제하고 환경과 조화를 이룰 수 있는 계면활성제의 개발과 생산이 요구되고 있다. 이와 같은 추세는 환경문제의 심각성과 함께 시민 의식의 할당으로 점점 그 요구가 증대할 것으로 예상되고 있다. 생물학적 계면활성제에 대한 연구는 이러한 점에서 그 중요성이 인식되어 최근 연구가 시작되어 끊임없이 주목을 받으며 활발히 연구되고 있는 분야이다. 이들은 독성이 낮으며 잘 분해되며 극한적인 온도, pH 그리고 염이 존재하는 곳에도 활용 가능하다. 이들 생계면활성제는 다양한 미생물에 의하여 생산되고 있다. 이들은 분자량에 기초하여 구분되고 있으며 첫째로서 저분자량 생계면활성제는 glycolipid, lipopeptide, corynomycolic acid, phospholipid 등이며 고분자량 분자는 emulsan, alasan, liposan, polysaccharide 그리고 단백질 복합체가 포함되고 있다. Lipopeptide는 bacillomycin, iturin, lichenysin, mycosubtilin, plipastatin, surfactin 등 *Bacillus* 속이 생산하는 것을 포함하고 있으며, 표면활성뿐만 아니라 항진균 및 항생 작용도 나타내고 있다. 특히 이들은 환경친화적으로 산업에서 화학적 계면활성제의 대체 물질로서 사용되며 특히 오일 오염의 해결과 토양에서의 생물정화 (bioremediation) 등과 같은 환경 분야에서의 사용이 빈번하며 나아가 그 사용이 증가하고 있는 추세이다. 특히 최근에는 생물학적 방제 효과도 동시에 있음에 착안하여 생물농약개발과 병행하여 생물 계면활성제에 대한 연구 개발이 시도되고 있어 연구 개발 인력이 보강되고 있다.

또한 미래기술로서 아토피, 건선 등에서 나타나는 면역기능 이상을 정상화 할 수 있는 면역 조절제의 개발로 직결될 수 있기에 생물 계면활성제에 대한 연구가 더욱 활발히 이루어지고 있다. 면역조절 물질도 항균효과와 계면활성 효과가 있으므로 해서 생물 계면활성제는 면역조절 물질, 항생물질 나아가 항진균제제의 개발로도 연결될 수 있다. 특히 상기의 저분자량 생물 계면활성제인 corynomycolic acid는 국내 벤처 기업에 의하여 대량 생산 기술을 토대로 다양한 기능성 소재로 개발되어 판매되고 다양한 미생물을 탐색하여 다양한 biosurfactant가 보고되고 있다. 한편 구조와 기능에 대하여도 충분히 연구되고 있으며, 또한 혈전 형성억제 등 다양한 기능도 가지고 있다고 보고되고 있다. 이들

biosurfactant는 그 합성에 대하여도 많이 규명되고 있을 정도로 매우 관심을 가지고 연구되고 있다.

그러므로 본 장에서는 생물학적 계면활성제를 생산하는 균주를 분리하여 이들 생산 균주를 동정하였으며 몇몇 균주를 선별하여 이들의 특성을 규명하였으며 화학 합성 계면활성제와 비교 분석하였다.

제 2 절 : 신규 biosurfactant 생산 토착 균주 선발, 특성 및 효과 검증

1. 연구수행 방법

가. Biosurfactant 생산능이 우수한 길항 미생물의 분리

배지 중에 탄소원이 결핍된 C-배지 (carbon-minimal medium)를 사용하여 biosurfactant를 생산하는 미생물을 분리하였으며, 사용된 배지의 조성은 NaCl 30 g/l, (NH₄)₂SO₄ 5 g/l, K₂HPO₄ 2 g/l, KH₂PO₄ 1 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/l, yeast extract 0.2 g/l, CaCl₂ 10 mg/l, FeSO₄·7H₂O 10 mg/l 및 trace element 용액 2 ml (7H₂O 7 mg/l, CoCl₂·6H₂O 6 mg/l, MoO₃ 1 mg/l, H₃BO₃ 1 mg/l, NiSO₄·6H₂O 1 mg/l, ZnSO₄·CuSO₄·5H₂O 0.5 mg/l)이고, 배지의 pH를 7.0으로 조정하여 사용하였다. 위와 같은 조성의 배지에 탄소원으로 crude oil 또는 soybean oil을 1 % 첨가한 다음 채취한 샘플 희석 액을 1 % 첨가하여 7일간 진탕 배양하였으며, 이때 생육된 균을 새로운 C-배지에 균주 및 원유를 각각 1%로 첨가하여 다시 배양하였다. 이렇게 3회 반복하여 생육한 균주를 LB 고체배지에 도말하여 37 °C에서 배양하였다. 선별된 단일 콜로니를 LB 액체배지에서 각각 전 배양시킨 후, 식물 병원성 곰팡이 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxisporum* 및 *Botrytis cineria* 3종의 곰팡이와 대치 배양을 통해 생육 저해 영역을 가지는 균주들을 분리하였다.

또한, 분리균들 중 A8-8, LP03 및 TBM40-3은 2 % crude oil 포함된 LB 고체배지에 균주를 접종하고 37 °C에서 24시간 배양하여, 유류분해 여부를 확인하였다.

나. Lipolytic 효소 생산 균주의 분리

Lipolytic 효소를 생산하는 균주의 분리를 위하여 부산시 사하구 일대 가정하수의 일부를 채취하여 시료로 사용하였으며, 배양배지는 LBM, R2A, M9 배지를 사용하였다. 배지의

조성은 LBM 배지는 polypeptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l에 탄소원으로 glucose 1 g/l를 첨가하였으며, R2A 배지는 yeast extract 0.5 g/l, proteose peptone 0.5 g/l, casamino acids 0.5 g/l, glucose 0.5 g/l, soluble starch 0.5g/l, Na-pyruvate 0.3 g/l, K₂HPO₄ 0.3 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.05 g/l이고, M9 배지의 조성은 Na₂HPO₄ 6g/l, K₂HPO₄ 3 g/l, NH₂Cl 1 g/l, NaCl 0.5 g/l와 같다. 각 배지에서 37 °C, 180 rpm으로 진탕 배양한 균주를 1% tributyrin이 첨가된 LB 고체 배지에 도말하여 37 °C에서 배양하여 생육활성대를 형성하는 것을 lipolytic 효소 활성 우수균으로 선별하여 사용하였다.

다. 균주의 염색체 DNA의 분리 및 동정.

선별된 균주의 동정을 위하여 형태학적, 생리학적, 생화학적 특징을 조사한 후 Bergey's manual of systematic bacteriology와 Manual of Methods for General Bacteriology를 근거로 하여 동정하였다. 또한 정확한 동정을 위하여 균주의 염색체 DNA를 다음과 같이 분리하였다. 염색체 DNA를 얻기 위하여 pre-culture한 균주를 LB배지 3 ml에 접종하여 37 °C shaking incubator에서 4 ~ 6시간 동안 배양하였다. 배양된 균주를 집균하여 1 X TEN buffer(Tris-HCl, EDTA, NaCl)로 washing하였다. 100 µl 멸균수를 첨가하여 95°C 이상의 water bath에서 10 분간 세포를 파괴하였다. 파괴된 세포를 13000 rpm, 4 °C에서 10 분간 원심분리하여 염색체 DNA가 포함되어있는 상등액을 얻고, 이렇게 분리된 염색체 DNA를 주형으로 하여 PCR(95 °C, 1 min: 55 °C, 1min: 72 °C, 2 min: 30 cycle)반응을 수행하였으며, 이들 균주의 16S rDNA를 획득한 다음 16S rDNA의 염기서열을 결정하였다. 이때 PCR 반응에 사용된 primer는 *E. coli* 16S rDNA의 upstream 9-27 bp와 downstream 1,542-1,525 bp의 영역을 oligonucleotide로 작성하여 사용하였다 (primer F : 5'-G A G T T T G A T C C T G G C T C A G -3', primer R : 5'-A G A A A G G A G G T G A T C C A G C C -3'). 이들의 16S rDNA의 염기서열을 결정한 다음 GenBank Database를 통하여 상동성을 비교하였으며, *Bacillus* 속과 *Pseudomonas* 속의 종들과 유전학적인 유연관계를 알아보기 위하여, ClustalX program을 이용하여 phylogenetic tree를 제작하였다. 또한, *Bacillus* 속의 균주들은 더 정확한 동정을 위하여 *Bacillus* 속의 *gyrA* 유전자 서열로부터 프라이머를 작성하였다 (F, 5' -CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT 3', R, 5' -CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT-3'). 작성된 primer를 이용하여 *gyrA* 유전자 부위를 합성하여 위의 16S rDNA에서와 마찬가지로 phylogenetic tree를 제작하였다.

2. 연구 결과

가. Biosurfactant 생산능이 우수한 길항 미생물의 분리

1) 태백산(TBM) 및 계방산(GBM)으로부터 길항력 우수 균주의 분리

Biosurfactant 생산능이 우수한 신규 미생물을 분리·선별하고자 각종 산지 토양에서 샘플을 채취하여 미생물 균주를 분리하였다. TBM 균주는 태백산에서, GBM 균주는 계방산 부식토에서 각각 분리한 균으로 길항성 검증을 위하여 식물 병원성균에 대한 길항력이 우수한 균주를 우선 선발 하였다. 태백산과 계방산의 부식토로부터 식물병원성 균인 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* 및 *Botrytis cineria* 3종에 각각 길항 활성을 보이는 총 50여 균주를 분리하여 이들 중 47균주를 길항성 균주로 선발하였다. 이 중에서 식물병원성균류 3종에 대하여 길항활성을 나타내는 균은 TBM40-3, TBM1552(2)-11, TBM3101(3)-9, GBM3302(2)-3, GBM3307(4)-4, GBM3308(3)-12 및 GBM3309(3)-11 이며, 특히 이 균들은 3종의 병원성 균에 대하여 우수한 활성을 나타내었다(Table 1-1, 1-2, Fig. 1-1 ~ 1-3).

2) 덕유산(DYL) 토양으로부터 길항력 우수 균주의 분리

덕유산 토양으로부터 Tributyrin을 잘 분해하는 균주와 식물 병원성 곰팡이, *B. cineria*, *F. oxysporum*에 길항력이 우수한 균주를 선별하였다. DYL11, 12, 14, 17, 19, 110, 111, 112, 116, 126, 128, 130, 239의 균주가 분리되었다. 이 중에서 tributyrin을 잘 분해하는 균주는 DYL 19, 128, 130, 239 이었고, *B. cineria*와 *F. oxysporum*에 동시에 활성을 가지는 균주는 DYL 14, 110, 111, 112, 130이었다 (Table 1-3). 또한 분리된 균주들의 특성을 파악하기 위해 lipase 활성 테스트를 하였다. 길항작용이 가장 강한 균주는 DYL 130, lipase 활성이 가장 좋은 균주는 DYL239이었다.

Bacillus sp. 균주가 생산하는 lipopeptide antibiotic에는 surfactin, fengacin, iturin등이 있으며, 특히 lipopeptide antibiotic 항균특성과 biosurfactant 특성을 동시에 가지고 있다. DYL130 이 병원균에 대한 길항력을 알아보기 위해 *Botrytis cineria*, *Fusarium oxysporium* 와 30 °C에서 2-3일 동안 대치배양 한 결과, DYL130은 *B. cineria*, *F. oxysporium* 에 높은 활성을 보였다 (Table 1-3, Fig. 1-2 ~ 1-3). 또한 DYL239는 lipase 활성이 가장 강하게 나타나서 lipase 관련 유전자 탐색에 지속적인 실험을 수행 하였다 (Table. 1-3).

3) 실험실 보유 균주

부산시 강서구 인근의 유류오염 지역으로부터 토양을 채취하여, biosurfactant 생성이 우수한

미생물을 분리하기 위하여 탄소원이 결핍된 C-배지 200 ml에 탄소원으로 crude oil 및 식용 oil 이 1% 되게 첨가하여 37 °C, 200 rpm으로 7일간 진탕 배양한 후, crude oil 분해능 및 유화제 생성능을 가진 세균이 생육하는 것을 확인하였다. 이렇게 3회 반복하여 생육한 균주를 LB-고체 배지에 도말하여 37 °C에서 배양하였다. 선별된 단일 균주를 LB 액체배지에서 각각 전 배양시킨 후, trybutyrin이 첨가된 배지에 배양한 후 투명환이 생성된 것을 우수한 균주로 보아 단일 콜로니를 선별하였다. 이 단일 콜로니들을 LB 액체배지에 접종하여 37 °C에서 전 배양시킨 후, crude oil 분해능 및 trybutyrin 분해능을 가진 수십 종의 균주를 분리하였으며, 이중에서 분해능이 강력한 A8-8 균주에 대하여 식물 병원성 곰팡이 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxisporum* 및 *Botrytis cineria* 3종에 대하여 항진균 효과를 확인한 결과 우수한 결과를 나타내었다 (Fig. 1-1 ~ 1-3).

LP03 균주는 경남 김해 지역의 하우스 토양 sample에서 biosurfactant 생성능이 우수한 미생물을 분리하기 위하여 A8-8과 같은 방법으로 균주를 분리하였다. 이중에서 분해능이 강력한 LP03 균주에 대하여 계속하여 실험하였다. 또한 식물 병원성 균 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxisporum* 및 *Botrytis cineria* 3종에 대하여 항진균 효과를 확인한 결과 아래의 그림(Fig. 1-1 ~ 1-3)과 같이 분명한 생육 저지대를 나타내었다.

4) Crude oil 분해 실험

분리된 균주 중 A8-8, LP03, 그리고 TBM40-3은 crude oil의 분해를 확인하기 위하여 LB 고체 배지에 crude oil을 첨가하고, 24 시간 배양한 후 투명대를 관찰하였다(Fig. 1-4). LP03은 3 균주 중 투명대 영역이 가장 큰 것을 관찰할 수 있다. 이것은 유류분해 활성이 가장 강한 것을 말한다. A8-8과 TBM40-3도 강한 유류분해 활성을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

Table 1-1. Antagonistic ability of isolates(TBM) against phytopathogenic fungi.

Isolated bacteria		Phytopathogenic fungi		
		<i>R. solani</i>	<i>B. cineria</i>	<i>F. oxysporum</i>
TBM	39(2)-1	-	+	+
	39(2)-10	+	++	-
	39(2)-11	-	++	+
	40-3	+++	++++	+++
	40-4	-	+	-
	40(2)-6	-	+	+
	40(2)-8	-	+	-
	40(2)-9	-	++	++
	40(3)-4	+++	+	-
	40(3)-5	-	+	-
	40(5)-5	-	+	-
	163(1)-2	+	+	+++
	1552(1)-3	++	-	-
	1552(2)-11	++++	+++	+++
	1552(2)-14	+	++	++
	1552(3)-11	+++	-	+
	1552(5)-10	-	+	++
	1654-2	-	+	-
	1654(4)-5	-	-	-
	3100(5)-8	++++	-	+++
	3100(4)-52	+++	-	-
	3101-1	-	-	-
	3101(1)-4	-	-	-
	3101(3)-9	++++	+++	+++
	3101(3)-12	-	++	-
	3101(5)-5	-	+	-
3102(3)-4	-	+	-	

	3103-5	++	+	-
	3103(1)-53	-	-	+
	3104(5)-56	+++	+	++
	31328	-	+	-

Table 1-2. Antagonistic ability of isolates(GBM) against phytopathogenic fungi.

Isolated bacteria		Phytopathogenic fungi		
		<i>R. solani</i>	<i>B. cineria</i>	<i>F. oxysporum</i>
GBM	3300(5)-2	-	+	++
	3301(5)-10	-	+	-
	3302(2)-3	+++	+++	+++
	3302(3)-13	-	+	-
	3302(5)-14	++	+	-
	3304(5)-8	-	+	-
	3304(4)-6	++	+	+
	3305-1	-	-	-
	3305(2)-85	-	-	-
	3305(3)-81	+	-	+
	3305(2)-85	-	-	-
	3307(4)-4	+++	+++	+++
	3308(2)-15	+	+	-
	3308(5)-15	-	+	-
	3302(5)-14	++	+	-
	3308(3)-12	++++	+++	++++
	3309(3)-11	++++	+++	++++
3309(5)-11	+++	+	++	

Table 1-3. Antagonistic ability of isolates(DYL) against phytopathogenic fungi.

Isolated bacteria	Tributylin	Antifungal activity		Lipase	gram staining	
		<i>B. cineria</i>	<i>F. oxysporum</i>			
DYL	DYL11	+	++	+	++	+
	DYL12	++	-	-	-	-
	DYL14	+	+	++	++	+
	DYL17	++	-	-	+	+
	DYL19	+++	-	-	++	+
	DYL110	+	+	++	++	+
	DYL111	-	-	-	-	+
	DYL112	++	+	+	++	+
	DYL116	++	+	++	++	+
	DYL126	++	-	-	++	+
	DYL128	+++	-	-	++	+
	DYL130	+++	+++	+++	++	+
	DYL239	++++	-	-	++++	-

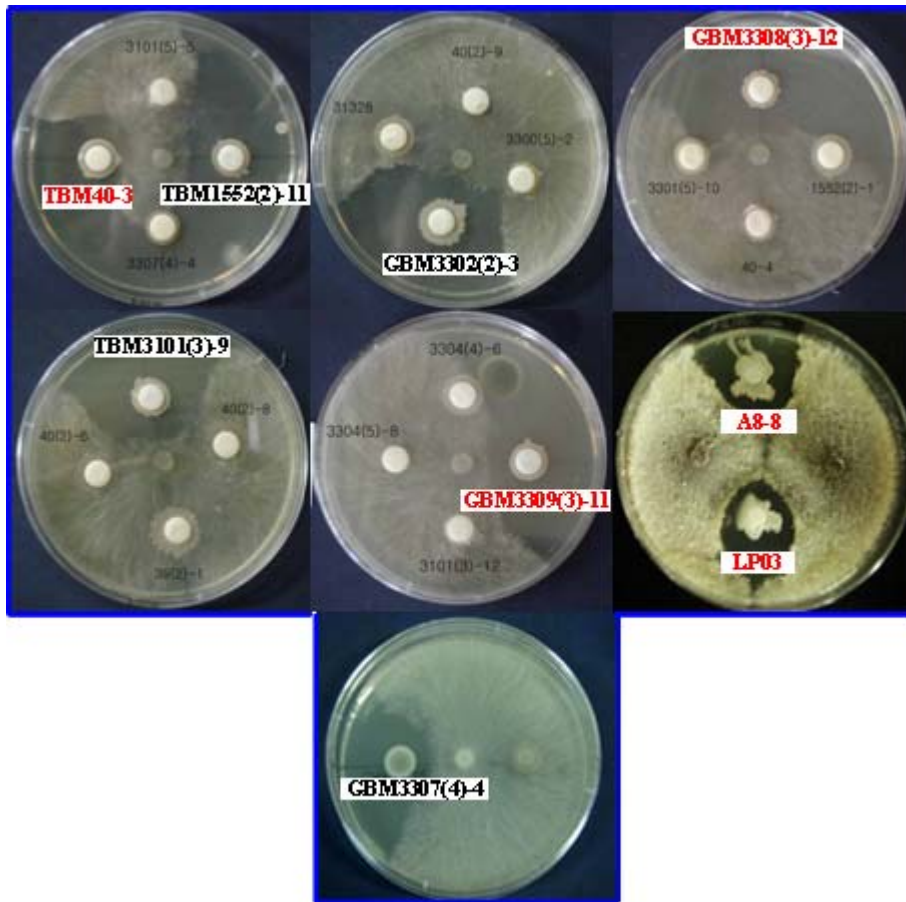


Fig. 1-1. Antifungal activity of isolated bacteria on *Rhizoctonia solani*.

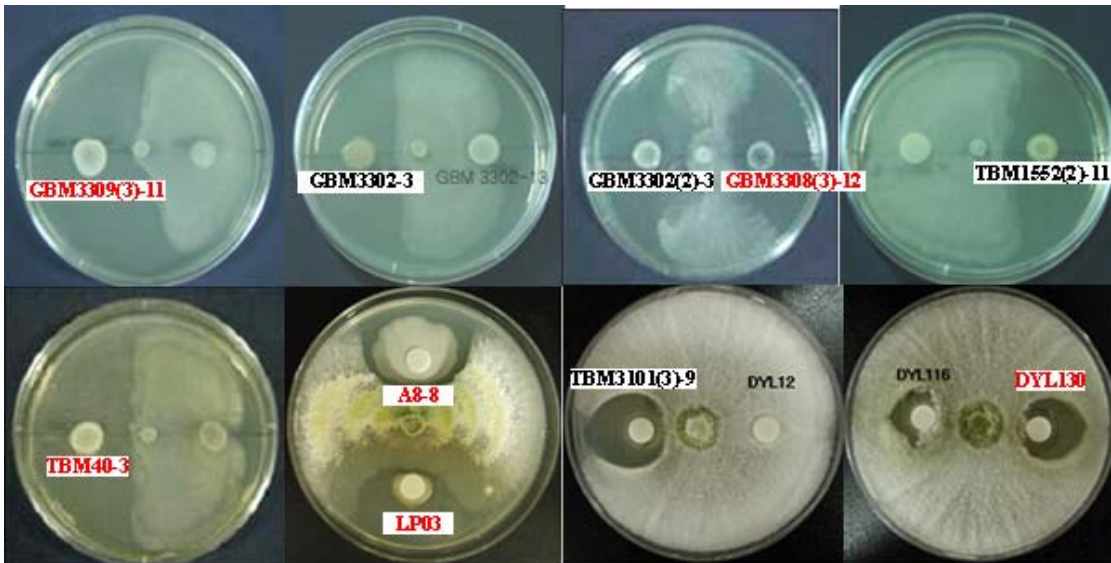


Fig. 1-2 Antifungal activity of isolated bacteria on *Botrytis cineria*.

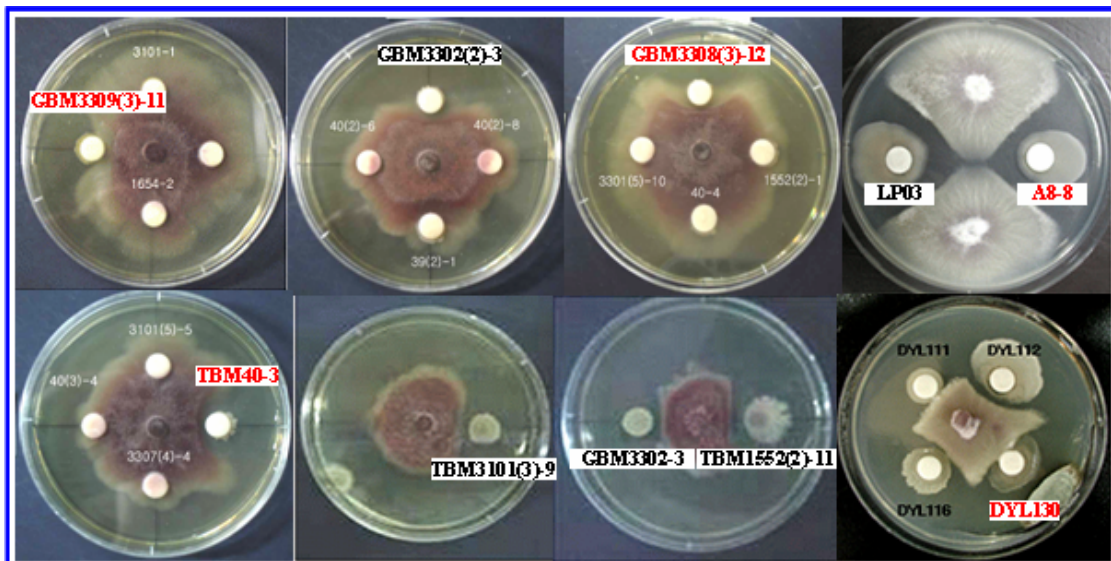


Fig. 1-3. Antifungal activity of isolated bacteria on *Fusarium oxysporum*.

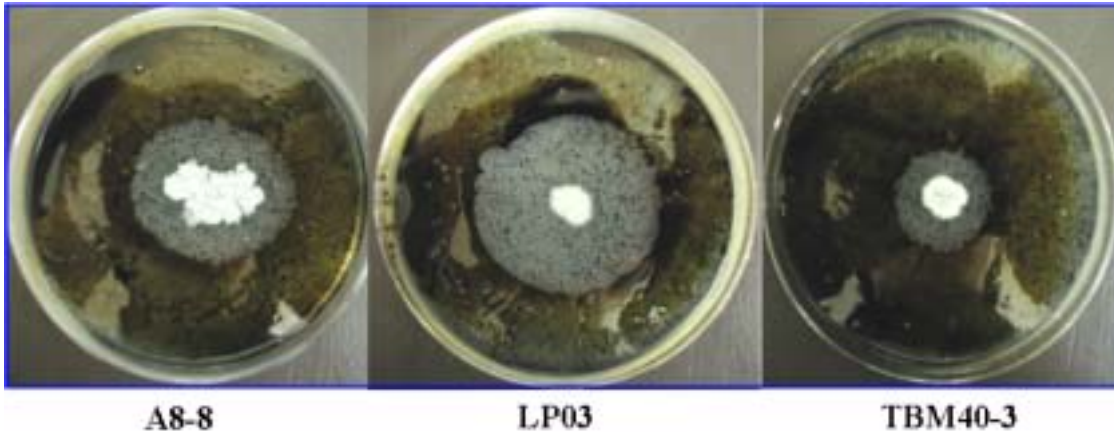


Fig. 1-4. Crude Oil-degrading activity of microorganisms

나. 분리된 균주의 동정

1) 태백산(TBM) 및 계방산(GBM) 분리 균주의 동정

분리 균주 중 식물병원성 균 3종에 대하여 우수한 길항력을 가지는 TBM40-3, TBM1552(2)-11, TBM3101(3)-9, GBM3302(2)-3, GBM3307(4)-4, GBM3308(3)-12 및 GBM3309(3)-11를 그람양성, 그람음성을 판별하기 위해서 그람염색을 하였다. 그람염색법에 의해 판별한 결과 GBM3307(4)-4만 그람 음성이었으며, 나머지 TBM40-3, TBM1552(2)-11, TBM3101(3)-9, GBM3302(2)-3, GBM3308(3)-12 및 GBM3309(3)-11은 그람양성균으로 확인되었다. 그리고 이들은 대부분 rod type의 형태로 관찰되었으며, TBM3109(3)-11는 구균으로 확인되었다. 분리 균주들의 형태적인 특징은 생리·생화학적 동정에 앞서 균종을 예비로 판정하는 지표로 삼았다. 분리된 7종의 균주들의 염색체 DNA를 분리하여 PCR 반응의 주형으로 사용하여 *E. coli*의 16S rDNA를 토대로 작성된 primer를 이용하여 PCR 산물 약 1.5 kb 얻고, 이것을 pGEM-T easy에 cloning하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 16S rDNA 염기서열은 NCBI BLAST를 통해 상동성을 조사하였으며, ClustalX program을 이용하여 유사한 *Bacillus* 종 및 *Pseudomonas* 종과의 유전학적인 연관성을 조사하였다 (Fig. 1-5). 그 결과 TBM40-3, TBM1552(2)-11, TBM3101(3)-9, GBM3302(2)-3, 및 GBM3308(3)-12는 *Bacillus* 속의 균주들과 98 %이상의 높은 상동성을 보였다. GBM3307(4)-4는 *Pseudomonas* 속의 균주와 98 %이상의 상동성을 보이며, GBM3309(3)-11는 *Micrococcus* 속과 98 % 이상의 상동성을 보였다. *Bacillus* 속의 균주들은 더 정확한 동정을 위하여 *gyrA*의 유전자서열을 분석한 결과 Fig. 1-6에서와 같이 균주들간 상관성을 가

졌다. *gyrA* 유전자 서열의 경우 같은 종에서는 98 %이상의 상동성을 보여 주고, 다른 종에서 상동성은 90%이하로 떨어진다. 따라서 TBM40-3은 *B. vallismortis*, TBM1552(2)-1은 *B. amyloliquefaciens*, TBM3101(3)-9과 GBM3308(3)-12는 *B. subtilis*, GBM3302(2)-3은 *B. pumilus*로 동정하였다. 또한 GBM3307(4)-4와 GBM3309(3)-11은 각각 *Pseudomonas* sp.와 *Micrococcus* sp.로 동정하였다.

또한 이들 선발 균주의 생리·생화학적 성질에 기초한 동정 결과, GBM3308(3)-12는 동정 kit 결과 *Bacillus subtilis*와 90.9 %의 상동성이 있음으로 확인되었고, GBM3309(3)-11은 *Micrococcus* sp.(72.3 %), TBM40-3은 *Bacillus vallismortis*(89.65 %), GBM3302(2)-3는 *Bacillus pumilus*(99.9 %), GBM3307(4)-4는 *Pseudomonas fluorescens*(99.9 %)와 유사한 결과를 나왔다(Table 1-4 ~ 1-6). 이것은 16S rDNA와 *gyrA* 분석과 유사한 결과이다. 따라서 *Bacillus* 속의 균주들은 정확한 동정을 위해 *gyrA* 유전자 분석을 통하여 신뢰도를 높이는 것이 바람직하고, 다른 속의 균주는 정확한 동정을 위한 유전학적인 지표의 개발이 필요하다.

2) 덕유산 분리(DYL) 균주의 동정

덕유산에서 분리된 균주중 식물 병원성 곰팡이에 대해서 항진균 활성이 가장 우수한 DYL130은 그램 염색법에 의해서 그램 양성균으로 확인되었으며, 전계방사형 주사전자현미경(Field Emission Scanning Electron Microscope, JSM-6700F, Jeol, Japan) 관찰에 의하여 rod type의 형태의 간균임을 확인하였고. 생리·생화학적인 특성을 조사한 결과 *Bacillus* 속과 높은 유사성을 가지는 것을 확인하였다(Table 1-7). 좀 더 정확한 유전학적인 동정을 위하여 16S rDNA 염기서열과 *gyrA* 염기서열은 NCBI BLAST를 통해 상동성을 조사하고, ClustalX program을 이용하여 유사한 *Bacillus* 종과의 유전학적인 연관성을 조사하였다. 16S rDNA 염기서열은 *Bacillus* 속의 종들과 99 %이상 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 1-5). 반면에 *gyrA* 염기서열은 *B. atrophaeus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. amyloliquefaciens*, 와 *B. atrophaeus* 각각 96 %, 85 %, 83 %, 81 %, 80 %, 80%였다. 따라서 DYL130은 *B. atrophaeus*로 동정하였다(Fig. 1-6).

3) 실험실 보유 균주

A8-8과 LP03은 그램 염색법에 의해서 그램 양성균으로 확인되었으며, 전계방사형 주사전자현미경(Field Emission Scanning Electron Microscope, JSM-6700F, Jeol, Japan) 관찰에 의하여 rod type의 형태가 관찰하여 간균임을 확인하였다. 선발균주를 API Kit를 이용하여

각 기질에 알맞은 혼탁도(McFarland)의 균액을 넣고 배양한 후 기질의 이용성 등의 결과를 판독하여 동정용 소프트웨어(API LAB Plus)로 이용하여 동정한 결과 (Table 1-7) A8-8은 *B. subtilis*, *Bacillus licheniformis* 와 *B. amyloliquefaciens* 각각 97.0 %, 45.2 %, 1.2 % 이었다. 그리고 LP03은 *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*와 *B. amyloliquefaciens* 각각 53.0 %, 45.2 %, 1.2 %의 상동성을 보여 *Bacillus* 속으로 동정하였으며, 좀 더 정확한 동정을 위하여 16S rDNA와 *gyrA* 유전자의 분석을 통하여 동정하고자 하였다. 동정을 위하여, 16S rDNA와 *gyrA* 유전자의 분석을 통하여 동정하고자 하였다. 16S rDNA 염기서열과 *gyrA* 염기서열은 NCBI BLAST를 통해 상동성을 조사하였으며, ClustalX program을 이용하여 유사한 *Bacillus* 종과의 유전학적인 연관성을 조사하였다. 16S rDNA 염기서열은 *Bacillus* 속의 종들과 99 %이상 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 1-5). 반면에 *gyrA* 염기서열은 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. amyloliquefaciens* 및 *B. atrophaeus* 각각 96 %, 85 %, 83 %, 81 %와 80 % 였다. 16S rDNA 염기서열 보다 *gyrA*의 염기서열이 분석결과 *Bacillus* 속의 종들과 구분이 뚜렷하다는 것을 알 수 있다(Fig. 1-6).

Table 1-4. Biochemical and physiological characteristics of isolates.

Characteristics	GBM3302(2)-3	GBM3308(3)-12	GBM3309(5)-11
Gram strain	+	+	+
Glycerol	+	+	+
Erythritol	-	-	-
L-arabinose	+	+	+
Ribose	+	+	+
D-xylose	+	-	-
Galactose	-	-	-
Glucose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Mannose	+	+	+
Sorbose	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Inositol	-	-	+
Mannitol	+	+	+
Sorbitol	-	-	+
N-Acetyl-glucosamine	+	+	-
Amygdaline	+	+	-
Maltose	-	+	+
Lactose	-	-	-
Melibiose	-	+	-
Saccharose	+	+	+
Trehalose	+	+	+
Inulin	-	+	-
Raffinose	-	+	+
Glycogen	-	+	+
Xylitol	-	-	-
Gentiobiose	-	+	-
2-Ketogluconate	-	-	-
5-Ketogluconate	-	-	-

+: Positive reaction, -: Negative reaction

Table 1-5. Biochemical and physiological characteristics of isolates.

Characteristics	TBM 3307(4)-4	Characteristics	GBM 3309(3)-11
Gram strain	-	Gram strain	+
Reduction of nitrates to nitrites	-	D-mannose	-
Indole production	-	D-maltose	-
Fermentation of D-glucose	-	D-lactose	-
Arginine dihydrolase	+	D-trehalose	-
Urease	-	D-mannitol	-
Hydrolysis of β -glucosidase	-	Xylitol	-
Hydrolysis of gelatin	+	D-melibiose	-
β -galactosidase	-	Reduction of nitrates to nitrites	+
Glucose (asimilation)	-	Alkaline phosphatase	+
Arabinose	-	Acetyl-methyl-carbinol production	+
Mamnose	+	D-raffinose	-
Mannitol	+	D-xylose	-
N-acetyl-glucosamine	+	D-saccharose methyl- α	-
Maltose	-	D-glucopyranoside	-
gluconate	+	N-acetyl-glucosamine	-
caprate	+	Arginine dihydrolase	-
adipate	-	Urease	+
malate	+		
citrate	+		
phenyl-acetate	-		
Oxidase test	+		

+: Positive reaction, -: Negative reaction

Table 1–6. Biochemical and physiological characteristics of isolates.

Characteristics	TBM40-3	TBM	TBM
		1552(2)-1	3101(3)-9
Gram strain	+	+	+
Glycerol	-	+	+
Erythritol	-	-	-
L-arabinose	-	+	+
Ribose	+	+	+
D-xylose	-	+	-
Galactose	+	+	-
Glucose	+	-	+
Fructose	+	+	+
Mannose	-	+	+
Sorbose	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Inositol	-	-	-
Mannitol	-	-	+
Sorbitol	-	-	-
N-Acetyl- glucosamine	+	-	+
Amygdaline	+	-	+
Maltose	+	-	+
Lactose	-	-	+
Melibiose	-	-	+
Saccharose	+	-	+
Trehalose	+	-	-
Inulin	-	-	+
Raffinose	-	-	-
Glycogen	+	-	+
Xylitol	-	-	+
Gentiobiose	+	-	-
2-Ketogluconate	-	-	-
5-Ketogluconate	-	-	-

+: Positive reaction, -: Negative reaction

Table 1–7. Biochemical and physiological characteristics of isolates.

Characteristics	LP03	A8-8	DYL-130
Morphological	rod	rod	rod
Gram stain	+	+	+
Mobility	+	+	+
Optimum temperature	37°C	37°C	37°C
Growth in air	+	+	+
Physiological			
Ortho-nitrophenyl	+	-	-
β -D-galactopyranoside			
Arginine dehydrolase	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Simmons citrate	-	-	-
Production of H ₂ S	-	-	-
Urease	-	-	-
Tryptophane deaminase	-	-	-
Indole	-	-	-
Proteolysis of gelatin	+	+	+
Glucose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Lactose	+	-	+
Ribose	+	+	+
Glycerol	+	+	+
Erythritol	-	-	-
Mannitol	+	+	+
Inositol	+	+	+
Sorbitol	+	+	+
Xylitol	-	-	+
Cellobiose	+	+	+
Rhamnose	-	-	-
Saccharose	+	+	+
Melibiose	+	+	+
Amygdalin	+	-	-
L(T)arabinose	+	+	+
2-Ketogluconate	-	-	-
5-Ketogluconate	-	-	-

+ : Positive reaction, - : Negative reaction

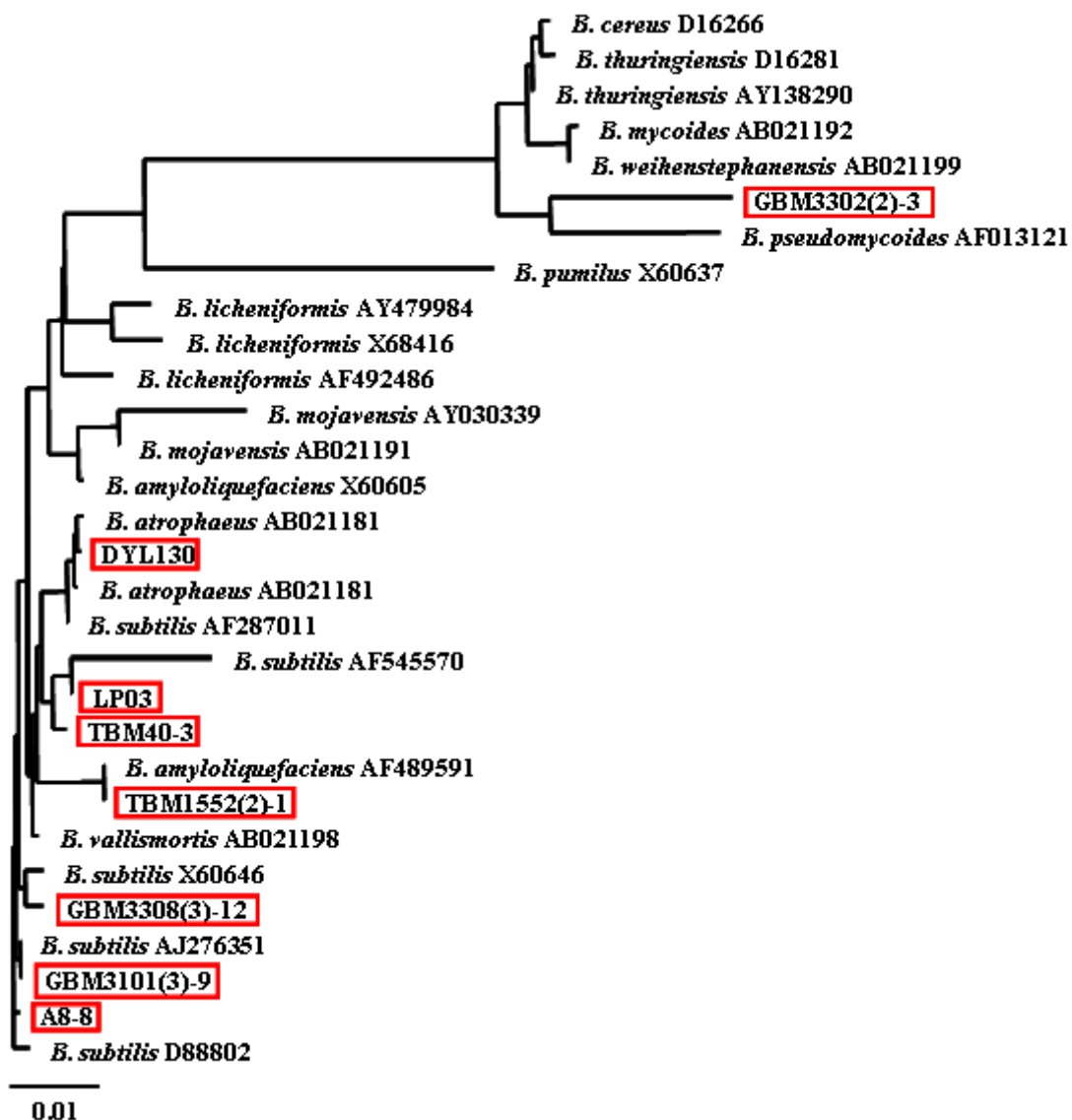


Fig. 1-5. Unrooted phylogenetic tree constructed from analysis of the 16S rDNA sequence of isolated the strains.

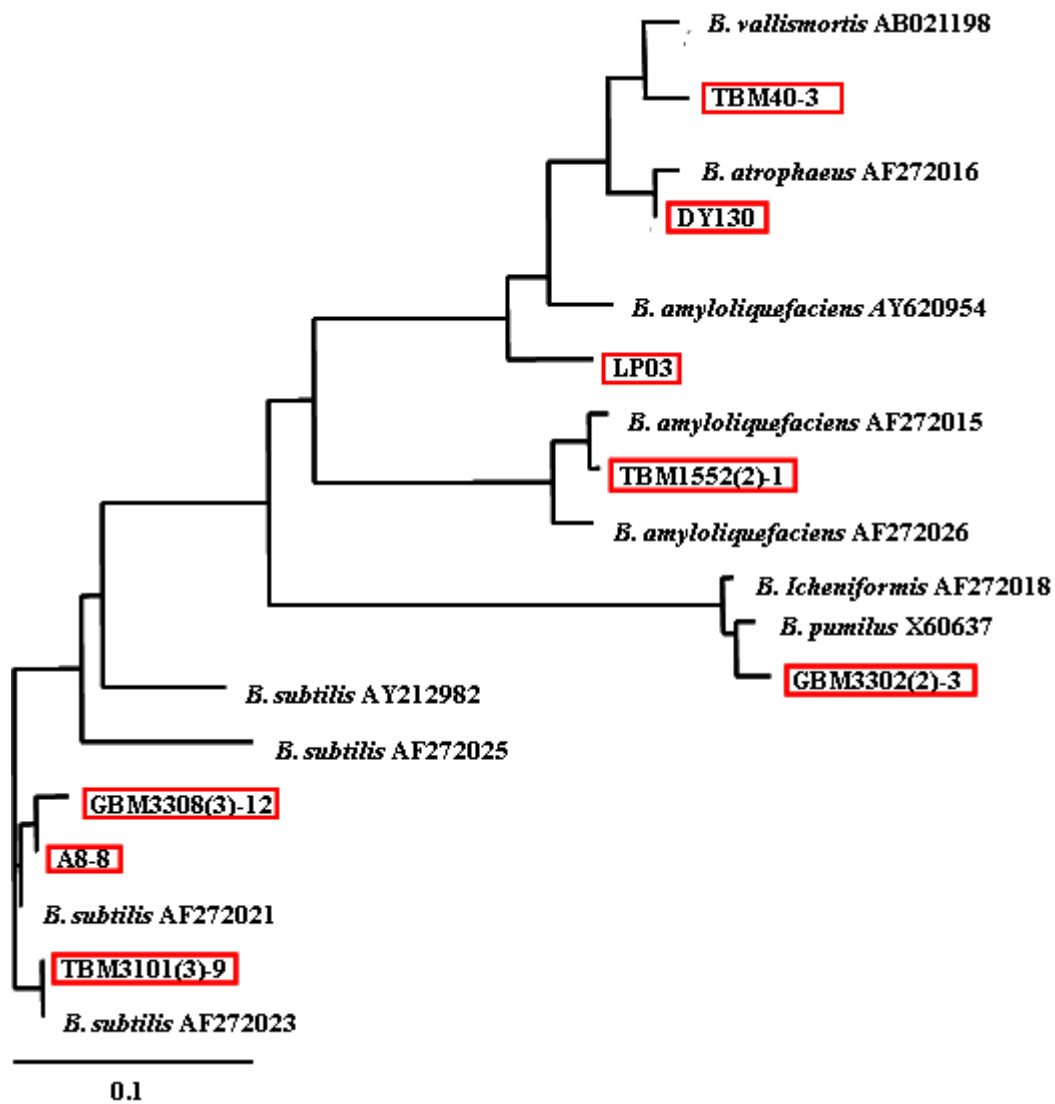


Fig. 1-6. Unrooted phylogenetic tree constructed from analysis of the *gyrA* sequence of isolated the strains.

다. Lipolytic 효소 생성 미생물의 분리 및 동정

덕유산 토양으로부터 tributyrin을 잘 분해하는 균주 DYL239의 균주가 분리되었다. Fig. 1-7의 A 그림은 고체 배지에서 분해 활성을 확인한 것으로 화살표로 나타낸 것이 DYL239 균주이다. 다른 colony에 비해서 상대적으로 활성이 우수한 것을 확인할 수 있다. Fig. 1-7의 B, C 그림은 좀 더 확실하게 활성을 확인하기 위해서 lipase 기질로서 tributyrin과 Tween 20을 사용하여 활성을 확인하였다. DYL239 균주를 동정하기 위해 분리된 게놈 DNA를 주형으로 PCR 반응을 수행하여 16S rDNA 서열을 증폭하였다. 증폭된 1.5 kb DNA 단편을 GEM-T-easy vector에 클로닝하고 염기서열을 결정했다. 16S rDNA 염기서열을 분석하여 *Acinetobacter schindleri*로 동정하고 분류도를 나타내었다 (Fig. 1-9). Lipase 활성을 가지는 *Acinetobacter schindleri* DY239에 대하여 계속적으로 lipase 유전자 탐구를 수행 하였다.

부산시 사하구 일대의 가정하수로부터 유용효소를 생산하는 균주를 분리하였다. LB 고체배지에 도말하여 37 °C에서 12 시간동안 정치배양 후 생육이 좋은 colony 5 종을 선별하여 단일 colony를 얻었다. 이 단일 colony들을 1 % tributyrin이 첨가된 고체배지에 도말하여 배양 후 투명환의 생성여부로 가수분해능력을 확인하였다(Fig. 1-8). 투명환이 생성된 BD27, 47, 57 균주를 정확한 동정하기 위해서 16S rDNA 동정을 한 결과 BD27, 47, 57 균주가 *Acinetobacter*속으로 99 %의 상동성을 나타내었으며, *Acinetobacter* 속의 균주들과 연관 관계를 Fig. 1-9에 나타내었다. 그 결과 BD27과 BD47은 *Acinetobacter junii*와 밀접한 관련이 있고, BD57은 *Acinetobacter anitratus*와 밀접한 관련이 있다. 이 균주들에 대하여 lipase 유전자 cloning 등을 계속 실험하였다.

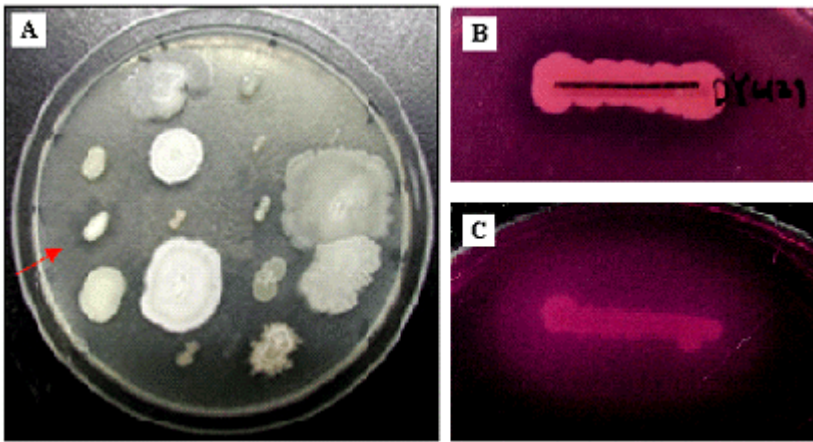


Fig. 1-6. The screening of the strain DY239 showing lipase activity and activity test by a simple activity staining method. (A) The plate is containing 1 % tributyrin and the strain DY239 is marked by a red arrow. (B), (C) Lipase activity tested on the TBN and TWN-LB plates. The plates were prepared by using phenol red (0.01 %) along with lipidic substrate (1 % tributyrin; A, 1 % Tween 20; B), 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ and 1.3 % agar.

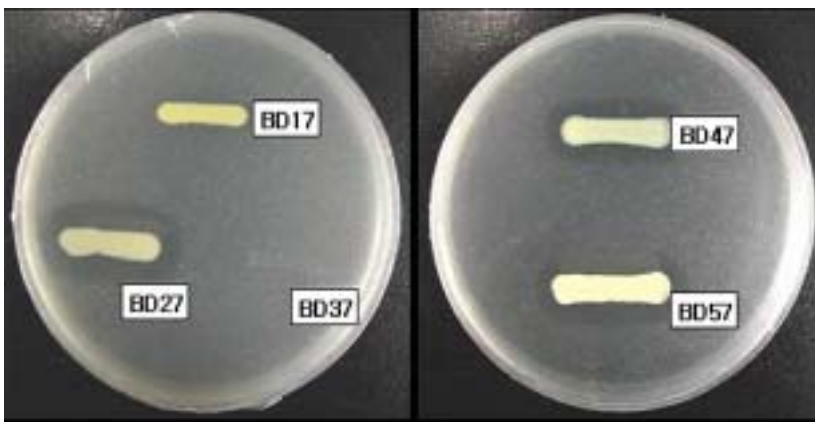


Fig. 1-7. Lipolytic activity test of isolates from Baek-du mountain on LB agar plate containing 1 % tributyrin.

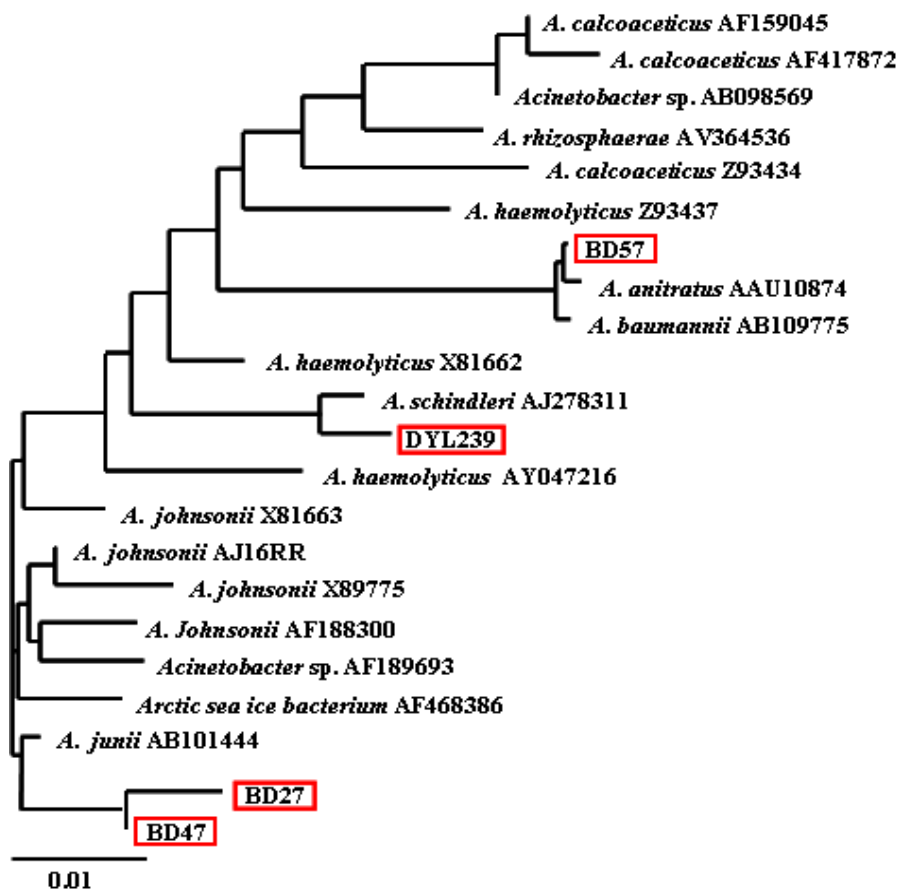


Fig. 1–8. Unrooted phylogenetic tree constructed from analysis of the 16S rDNA sequence of isolated the strains.(The scale bar indicates 0.01 nucleotide per nucleotide position.)

제 3 절 유용미생물이 생산하는 biosurfactant의 특성

1. 연구수행 방법

가. 균주의 생육도 측정.

선별된 균주의 생육정도를 조사하기 위하여, LB액체배지 500 ml에 전배양시킨 균주를 접종하여 37 °C에서 90 시간 동안 200 rpm으로 진탕배양하였다. 배양시간에 따른 균체의 성장은 진탕배양한 배양액을 6 시간 간격으로 일정량 (1 ml) 취하고 UV-VIS spectrophotometer(U-1601, Shimadzu, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도(optical density)를 측정하였다.

나. 표면장력 측정.

LB 액체배지에서 배양한 균주의 배양액을 6시간 간격으로 취하여 원심분리하였다. 균체를 제거한 배양 상층액을 Millipore 0.2 µm을 이용하여 여과한 후, Du Nouy Tensiometer (Itoh Seisakusho, Ltd. Tokyo, Japan)의 ring method를 이용하여 표면장력을 3회 반복하여 측정하고 그 평균값을 계산하였다.

다. Biosurfactant의 유화활성 및 안정성

일반적으로 사용되는 화학합성 계면활성제와 길항작용이 우수한 균주에 의해 생산된 biosurfactant의 소수성 탄화수소들과 oils 성분에 대한 유화활성 및 유화안정성 시험은 Cirigliano와 Carman의 방법에 따라서 실시하였다. Biosurfactant 용액은 균주의 배양용액을 Millipore 0.2 µm 여과막을 통과시켜 멸균시킨 것을 사용하였다.

여과액 2 ml를 마개 있는 유리시험관에 넣고, pH 3.0의 0.1 M sodium acetate 완충액 2 ml와 혼합한 용액에 1 ml의 기질을 넣고 2분간 최고속도로 vortex mixing 한 후 10 분간 정치한 후 540 nm에서의 현탁도를 측정하였다. 기질은 soybean oil, crude oil, kerosene 등을 포함한 8가지 종류의 탄화수소 화합물을 사용하였으며, 화학합성 계면활성제는 Tween 류, Span 류, Triton X-100, SDS를 사용하였다.

유화안정성은 유화활성 측정 시와 동일한 방법으로 처리한 후에, 실온에 방치하면서 매 10 분마다 60 분 동안 540 nm에서의 현탁도를 측정하여 Log 값으로 환산하여 나타내고, 그 때의 기울기를 유화활성의 안정도, 상수 K_d (시간당 붕괴되는 유화력의 기울기 값)으로 나타내었다.

2. 연구결과

가. Biosurfactant 생산 균주의 생균력과 표면장력

B. vallismortis TBM40-3, *B. amyloliquefaciens* TBM1552(2)-1, *B. subtilis* TBM3101(3)-9, *B. pumilus* GBM3302(2)-3, *P. fluorescens* GBM3307(4)-4, *B. subtilis* GBM3308(3)-12, *Micrococcus* sp. GBM3309(3)-11이 생산하는 biosurfactant이 생산하는 biosurfactant의 특성을 알아보기 위하여 배양 시간대 별로 표면장력을 측정된 결과를 Fig. 2-1에 나타내었다. *B. vallismortis* TBM40-3은 배양 후 6시간 되는 때에 표면장력이 급격히 감소하여 24 시간 후에 배지의 표면장력이 58 mN/m에서 최대 29 mN/m 정도까지 저하되었으며, 저하된 표면장력은 그 이후에도 계속 유지되어 TBM40-3이 생산하는 biosurfactant의 표면장력 저하능이 우수한 것을 확인할 수 있었다. *B. amyloliquefaciens* TBM1552(2)-1은 57 mN/m에서 표면장력이 서서히 떨어지다가 최대 54시간대부터 급격히 떨어져서 31 mN/m까지 감소한다. *B. subtilis* TBM3101(3)-9는 표면장력의 변화가 거의 없다. *B. pumilus* GBM3302(2)-3은 57 mN/m에서 31에서 최대 31.95 mN/m까지 저하되었다. *P. fluorescens* GBM3307(4)-4는 57 mN/m에서 최대 30 mN/m까지, *B. subtilis* GBM3308(3)-12는 57 mN/m에서 최대 29 mN/m까지, *Micrococcus* sp. GBM3309(3)-11배양 후 36시간 되는 때에 표면장력이 서서히 감소하여 48시간 후에 배지의 표면장력이 57 mN/m에서 최대 30 mN/m 정도까지 저하되었다. TBM40-3, GBM3308(3)-12와 GBM3309(3)-11의 biosurfactant는 30시간부터 30 mN/m 정도의 표면장력을 보이면서 안정한 곡선을 그린다. 따라서 표면장력 저하능이 우수하다.

Bacillus amyloliquefaciens LP03의 배양용액에 생성된 biosurfactant의 특성을 알아보자 경시적으로 표면장력을 측정된 결과 배양 후 6 시간대부터 급격히 감소하다가 24시간 후에 배지의 표면장력이 57 mN/m에서 최대 32 mN/m 정도까지 저하되었으며, 이러한 현상은 생육이 정지된 66 시간 후까지 계속 되었다 (Fig. 2-1).

Bacillus subtilis A8-8의 배양용액에 생성된 biosurfactant의 특성을 알아보고자 세포의 성장과 표면장력을 측정된 결과 배양 후 대수 증식기에 해당하는 6 시간대부터 36 시간 까지 배양액의 표면장력이 급격히 감소하여 배양액의 표면장력이 57 mN/m에서 최대 26 mN/m 정도까지 저하되었으며, 이러한 현상은 생육이 정지된 66 시간 이후까지 계속 되었다 (Fig. 2-1). 24시간대부터는 일정한 표면 장력 값을 유지하는데 이것은 biosurfactant의 생산이 정지 되는 것을 말하는 것이 아니라 배양액 내에 biosurfactant의 농도가 최저 표면장력을 가지는 농도가 존재하는 시점을 말한다. 그리고 그 이후 에도 계속생산 biosurfactant의 생산은 계속 이루어진다. 이러한 결과는 해양 유류 분해 세균인 *Pseudomonas* sp. 으로부터의 계면활성제의 생산이 배양 2일 후인 정지기 초기에 가장 많이 생산되는 결과와 유사하였다.

Bacillus atrophaeus DYL-130이 생산하는 biosurfactant의 특성을 알아보기 위하여 배양 시간대 별로 표면장력을 측정 한 결과(DeNouy Tensiometer : Itoh Seisakusho, Japan) 배양 후 12시간 되는 때에 표면장력이 급격히 감소하여 28 mN/m로 나타나고, 배양 시간 후에 배지의 표면장력이 57 mN/m에서 최대 28 mN/m 정도까지 저하되었으며, 저하된 표면장력은 그 이후에도 계속 유지되어 DYL-130이 생산하는 biosurfactant의 표면장력 저하능이 우수한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2-1).

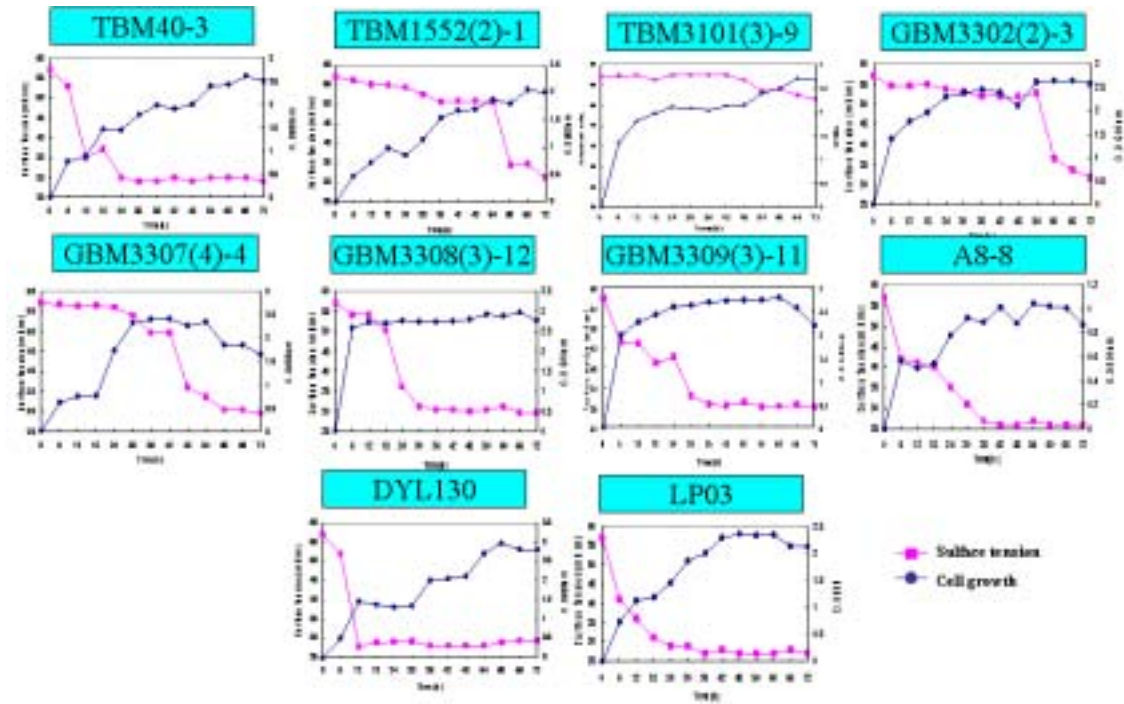


Fig.2-1. Cell growth and surface tension decreases in culture broth by the TBM40-3, TBM1552(2)-1, TBM3101(3)-9, GBM3302(2)-3, GBM3307(4)-4, GBM3308(3)-12, GBM3309(3)-11, A8-8 DYL130, LP03.

나. Biosurfactant의 유화활성 및 유화 안정성

1) Biosurfactant의 유화 활성

TBM40-3, TBM1552(2)-1, TBM3101(3)-9, GBM3302(2)-3, GBM3307(4)-4, GBM

3308(3)-12, GBM3309(3)-11, A8-8, DYL130 그리고 LP03 각 균주가 생산하는 biosurfactant의 유화활성을 측정하여 Table. 2-1에 나타내었다.

Bacillus vallismortis TBM40-3이 생산하는 biosurfactant는 soybean oil에서는 유화활성이 약 2.65로서 가장 높은 활성을 보여주며, crude oil을 기질로 사용한 경우도 높은 활성을 확인할 수 있다. 또한 tributyrin, tetradecane 및 decane도 비교적 높은 활성을 보이는 반면에 dodecane, kerosene 등의 탄화수소를 기질로 사용한 경우는 상대적으로 낮은 편이었다.

B. subtilis A8-8이 생산하는 biosurfactant는 crude oil에 상당한 유화력을 보였으며, 대두유에서는 유화활성이 약 2.75로서 가장 높은 활성을 보였으며 kerosene, tributyrin, crude oil도 비교적 높은 활성을 보인다. 반면에, tetradecane, dodecane 및 decane 등의 소수성 탄화수소를 기질로 사용한 경우는 전반적으로 낮은 편이었고, 탄소수가 증가함에 따라 활성이 증가하는 경향이 있었다.

B. atropheus DYL130이 생산하는 biosurfactant는 kerosene에서 유화활성이 약 2.88로서 가장 높은 활성을 보였으며, tributyrin, soybean oil도 비교적 높은 활성을 보이는 반면에 decane, crude oil 등의 탄화수소를 기질로 사용한 경우는 상대적으로 낮은 편이었다. 이와 같은 탄화수소류를 기질로 사용한 결과는 *Pseudomonas aeruginosa*가 생산하는 계면활성제의 경우와는 상반되는 활성을 보이는 것이며, kerosene에 대한 유화능력이 뛰어난 것으로 보인다.

B. amyloliquefaciens LP03이 생산하는 biosurfactant는 crude oil에 상당한 유화력을 보였으며, 대두유에서는 유화활성이 약 2.79 unit로서 가장 높은 활성을 보였으며 kerosene, tributyrin, crude oil 및 tetradecane도 비교적 높은 활성을 보인다. 반면에, hexadecane, dodecane 그리고 decane 등의 소수성 탄화수소를 기질로 사용한 경우는 전반적으로 낮은 편이었고, 탄소수가 증가함에 따라 활성이 증가하는 경향이 있었다.

B. subtilis GBM3308(3)-12은 dodecane을 기질로 사용한 경우 2.26으로 가장 높은 활성을 나타낸다. Soybean oil을 기질로 사용한 경우는 1.46으로 비교적 높은 활성과 다른 균주의 biosurfactant와 마찬가지로 고른 활성의 범위를 보여 준다.

Micrococcus sp. GBM3309(3)-11이 생산하는 biosurfactant는 다른 균주들이 생산하는 것과 달리 tributyrin에 대한 활성이 2.39로 가장 뛰어나며, kerosene, decane 및 soybean oil에서 비교적 높은 활성을 보여 준다.

B. amyloliquefaciens TBM1552(2)-1, *B. subtilis* TBM3101(3)-9, *B. pumilus* GBM3302(2)-3, 및 *P. fluorescens* GBM3307(4)-4 각 균주가 생산하는 biosurfactant는 각각 kerosene, dodecane,

kerosene, crude oil을 기질로 하여 유화활성을 측정된 결과 2.11, 2.35, 2.56, 그리고 2.36으로 각 기질에 대한 가장 높은 값을 가졌다.

따라서 같은 종의 균주들이라 할지라도 주로 생산하는 biosurfactant에 의해 다른 기질을 잘 유화 시킬 수 있는 결과를 보여 준다. 산업적 응용을 위해서는 필요 목적에 따라 균주의 선택이 반드시 필요하며, 몇 균주의 복합적인 처리도 필요하리라고 생각되어 진다.

2) Biosurfactant의 유화안정성

TBM40-3, TBM1552(2)-1, TBM3101(3)-9, GBM3302(2)-3, GBM3307(4)-4, GBM3308(3)-12, GBM3309(3)-11, A8-8, DYL130 그리고 LP03 각 균주가 생산하는 biosurfactant의 유화안정성을 측정하여 Table. 2-2에 나타내었다. 유화활성의 안정도는 상수 K_d (시간당 붕괴되는 유화력의 기울기 값)로 나타내었으며, 여러 가지 탄화수소류 및 oils을 기질로 사용하여 측정하였다. K_d 값이 0에 가까울수록 유화안정성이 우수한 것을 나타낸다.

B. vallisortis TBM40-3이 생산하는 biosurfactant는 soybean oil, tributyrin 및 hexadecane을 사용하였을 때, 각각 K_d 값이 -0.00, -1.79, -1.86으로 우수한 결과를 나타내었다.

B. subtilis A8-8의 경우 soybean oil과 tributyrin에서 각각 -0.00과 -1.88의 결과를 나타내었다.

B. atropheus DYL130은 활성이 kerosene에서 활성이 가장 높지만 안정성은 -11.32로 상당히 낮은 값을 가졌다. 이에 비해 soybean oil에서는 활성도 높으면서 안정성도 -0.00으로 가장 안정한 것을 확인 할 수 있었다.

B. amyloliquefaciens LP03이 생산하는 biosurfactant는 유화활성이 가장 높은 기질 soybean oil에서 가장 높은 유화안정성인 -0.13을 나타내었다. 비교적 유화활성 높은 기질 kerosene에서도 유화안정성이 -0.54로 높은 것을 확인할 수 있었다.

B. subtilis GBM3308(3)-12의 biosurfactant는 모든 기질에서 유화안정성이 높은 값을 나타내었으며, 특히 유화활성이 높은 기질인 dodecane에서 유화안정성 값이 -0.35로 가장 높은 값을 나타내었고, 그 다음으로 tributyrin과 crude oil에서 유화 안정성이 -0.83으로 측정되었다.

Micrococcus sp. GBM3309(3)-11이 생산하는 biosurfactant도 유화안정성이 모든 기질에서 높은 값을 나타내었으며, 유화활성이 가장 높았던 기질 tributyrin에서는 -1.91이었다. 유화안정성이 다른 기질과 비교하여 높은 기질은 soybean oil과 kerosene으로 유화안정성 값이 각각 -0.87, -0.89 였다.

B. amyloliquefaciens TBM1552(2)-1, *B. subtilis* TBM3101(3)-9, *B. pumilus* GBM3302(2)-3, 및 *P. fluorescens* GBM3307(4)-4 각 균주가 생산하는 biosurfactant는 모든 기질에 비슷한 유화안정성을 나타내는 것으로 확인되었다. TBM1552(2)-1는 kerosene에서 -0.64, TBM3101(3)-9은 dodecane에서 -1.07, GBM3302(2)-3는 kerosene에서 -0.79, 그리고 GBM3307(4)-4은 crude oil에서 -0.64로 높은 유화 안정성을 나타내는 것을 확인하였다.

3) Biosurfactant와 commercial surfactants의 유화 활성 및 안정성 비교

Biosurfactant는 24시간째 배양하여 생성된 것을 사용하였으며, 유화제 및 안정제는 재료 및 방법에 언급된 Sigma 사의 것을 사용하였으며, 각각의 CMC 값을 측정하였다 (자료 미제시), 그리고 유화 활성 및 안정성은 CMC 값을 기초로 하여 각각의 균주가 생산하는 biosurfactant의 유화활성이 가장 좋았던 기질로 하여 측정하였다. 그리고 측정된 결과를 biosurfactant와 비교하여 Table 2-3 ~ 2-7에 나타내었다.

Soybean oil에서 활성이 가장 높았던 TBM40-3, LP03 및 A8-8의 biosurfactants와 Tween 류, Span 류, Triton X-100 과 SDS와 비교하였다(Table 2-3). 각각 균주들의 biosurfactant는 Tween 류 그리고 Triton X-100과 활성 및 안정성이 높거나 거의 유사한 값을 가지므로 충분히 합성유화제를 대체할 수 있다.

Tributylin을 기질로 한 경우, GBM3309(3)-11이 생산하는 biosurfactant와 현재 사용되고 있는 유화제 및 유화안정제 들과 비교한 것을 Table 2-4에 나타내었다. Tween 80보다는 활성이 좀 낮지만 다른 유화제들과 비교하였을 때 비슷하거나 우수한 것을 알 수 있었으며, 유화 안정성도 유사한 값을 가졌다.

Kerosene을 기질로 한 경우, DYLL130의 경우 활성이 가장 높지만 안정성은 -11.32로 크게 떨어지는 값을 가진다. TBM1552(2)-1과 GBM3302(2)-3은 활성 및 안정성 면에서도 합성유화제에 비하여 대체적으로 우수한 값을 보여주었다(Table 2-5).

Dodecane을 기질로 한 경우, GBM3101(3)-9와 GBM3308(3)-12의 biosurfactants를 사용하여 합성 유화제와 비교한 것을 Table 2-6에 나타내었다. 유화활성 및 유화안정성 값이 합성유화제와 비교하여 비슷한 값을 보여 주는 것을 확인할 수 있다.

Crude oil을 기질로 한 경우, crude oil에 대하여 유화활성이 가장 높았던 균주 GBM3307(4)-4의 biosurfactant를 합성유화제와 비교한 것을 Table 2-7에 나타내었다. 유화활성 및 안정성에 있어서 합성유화제와 비교하여 유사하거나 월등히 우수한 것을 확인할 수 있었다.

각각의 기질에 대한 유화활성 및 유화안정성에 있어서 분리된 미생물들이 생산하는 biosurfactant는 높은 활성과 안정성을 가지고 있으며, 합성유화제와 비교 하였을 때에도 차이는 있으나, 유화활성 및 안정성이 유사하거나 뛰어난 것을 확인할 수 있다. 이것은 본 연구에서 분리된 미생물 들이 생산하는 biosurfactant를 합성유화제를 대체할 수 있을 것이라 생각한다.

Table 2-1. Emulsification activity of biosurfactant from bacteria

Substrate	Emulsification activity(OD _{540nm}) ^a									
	TBM40-3	TBM 1552(2)-11	TBM 3101(3)-9	GBM 3302(2)-3	GBM 3307(4)-4	GBM 3308(3)-12	GBM 3309(3)-11	A8-8	DYL130	LP03
Soybean oil	2.65	1.18	0.73	1.46	1.57	1.64	1.58	2.75	2.10	2.79
Tributylin (C4:0)	1.59	1.15	1.24	2.00	1.22	1.56	2.39	1.94	1.99	1.54
Kerosene	0.84	2.11	1.22	2.56	1.24	1.37	1.97	1.46	2.88	1.75
Crude oil	1.96	1.27	1.19	1.20	2.36	1.17	1.20	1.08	1.16	1.18
Hexadecane (C16)	1.30	1.19	1.20	1.22	1.25	1.31	1.13	1.06	1.59	0.79
Tetradecane (C14)	1.54	1.71	1.64	1.93	1.09	0.87	1.10	0.55	1.40	1.29
Dodecane (C12)	1.17	1.19	2.35	1.24	1.13	2.26	0.94	0.71	1.39	0.39
Decane(C10)	1.62	1.59	1.18	1.12	1.22	1.29	1.69	0.60	1.30	0.30

^aThe emulsification assay was performed in the presence of the biosurfactant as described in the text. After an initial 10-min holding period, absorbance readings were taken every 10 min for 60 min.

Table 2-2. Emulsification stability of biosurfactant from bacteria

Substrate	Decay constant(K _d , 10 ⁻³) ^a									
	TBM40-3	TBM 1552(2)-11	TBM 3101(3)-9	GBM 3302(2)-3	GBM 3307(4)-4	GBM 3308(3)-12	GBM 3309(3)-11	A8-8	DYL130	LP03
Soybean oil	-0.00	-1.06	-1.02	-0.97	-0.95	-2.06	-0.87	-0.00	-0.00	-0.13
Tributylin (C4:0)	-1.79	-1.23	-1.03	-1.11	-0.46	-0.83	-1.91	-1.88	-9.56	-2.22
Kerosene	-2.89	-0.46	-1.74	-0.79	-1.02	-1.45	-0.89	-2.32	-11.32	-0.54
Crude oil	-3.48	-1.28	-1.49	-1.19	-0.64	-0.83	-1.09	-5.89	-2.21	-5.25
Hexadecane (C16)	-1.86	-1.61	-1.21	-1.48	-1.17	-1.34	-1.99	-2.54	-3.18	-3.26
Tetradecane (C14)	-4.66	-2.62	-1.89	-1.57	-0.70	-1.28	-2.41	-4.48	-5.08	-3.08
Dodecane (C12)	-5.03	-1.77	-1.07	-1.09	-1.33	-0.35	-1.99	-6.41	-3.65	-3.65
Decane(C10)	-3.39	-1.79	-2.00	-2.20	-1.39	-1.61	-1.18	-6.11	-5.43	-7.53

^aThe log of the absorbance was plotted versus time and the slop(decay constant, K_d) calculated.

Table 2-3. Comparison of emulsification activity and stabilization by biosurfactant and commercial surfactants (soybean oil as substrate)

Surfactant	Emulsification activity (OD _{540nm}) ^a	Decay constant (K_d , 10 ⁻³) ^b
TBM40-3	2.65	-0.00
LP03	2.79	-0.13
A8-8	2.75	-0.00
Tween 20	2.71	-0.14
Tween 40	2.63	-0.12
Tween 80	2.60	-0.14
Span 40	1.80	-0.43
Span 85	0.88	-5.68
Triton X-100	2.36	-0.18
SDS	1.51	-16.05

^aThe emulsification assay was performed in the presence of the biosurfactant as described in the text. After an initial 10-min holding period, absorbance readings were taken every 10 min for 60 min.

^bThe log of the absorbance was plotted versus time and the slope (decay constant, K_d) calculated.

Table 2-4. Comparison of emulsification and stabilization properties of biosurfactant and commercial surfactants(tributyrin as substrate).

Surfactant	Emulsification activity (OD _{540nm}) ^a	Decay constant (K _d , 10 ⁻³) ^b
GBM3309(3)-11	2.39	-1.91
Tween20	2.38	-0.78
Tween40	2.39	-2.18
Tween80	2.71	-1.63
Span85	2.14	-1.22
Triton X-100	1.92	-1.07
SDS	1.88	-2.35

^aThe emulsification assay was performed in the presence of the biosurfactant as described in the text. After an initial 10-min holding period, absorbance readings were taken every 10 min for 60 min.

^bThe log of the absorbance was plotted versus time and the slop(decay constant, K_d) calculated.

Table 2-5. Comparison of emulsification and stabilization properties of biosurfactant and commercial surfactants (kerosene as substrate).

Surfactant	Emulsification activity (OD _{540nm}) ^a	Decay constant (K _d , 10 ⁻³) ^b
TBM1552(2)-1	2.11	-0.46
GBM3302(2)-3	2.56	-0.79
DYL130	2.88	-11.32
Tween20	2.15	-2.39
Tween40	2.39	-0.64
Tween80	1.98	-0.95
Span85	2.14	-0.48
Triton X-100	2.10	-0.21
SDS	1.65	-5.41

^aThe emulsification assay was performed in the presence of the biosurfactant as described in the text. After an initial 10-min holding period, absorbance readings were taken every 10 min for 60 min.

^bThe log of the absorbance was plotted versus time and the slop(decay constant, K_d) calculated.

Table 2-6. Comparison of emulsification and stabilization properties of biosurfactant solution and commercial surfactants (Dodecane as substrate)

Surfactant	Emulsification activity(OD _{540nm}) ^a	Decay constant(K _d , 10 ⁻³) ^b
GBM3101(3)-9	2.35	-1.07
GBM3308(3)-12	2.26	-0.35
Tween20	2.11	-1.88
Tween40	2.54	-1.18
Tween80	2.27	-1.73
Span85	2.89	-1.02
Triton X-100	2.36	-0.17
SDS	2.13	-0.35

^aThe emulsification assay was performed in the presence of the biosurfactant as described in the text. After an initial 10-min holding period, absorbance readings were taken every 10 min for 60 min.

^bThe log of the absorbance was plotted versus time and the slop(decay constant, K_d) calculated.

Table 2-7. Comparison of emulsification and stabilization properties of biosurfactant solution and commercial surfactants (crude oil as substrate).

Surfactant	Emulsification activity(OD _{540nm}) ^a	Decay constant(K _d , 10 ⁻³) ^b
GBM3307(4)-4	2.36	-0.64
Tween20	2.11	-2.88
Tween40	2.54	-0.24
Tween80	2.27	-3.95
Span85	2.89	-0.15
Triton X-100	2.36	-0.19
SDS	2.13	-6.43

^aThe emulsification assay was performed in the presence of the biosurfactant as described in the text. After an initial 10-min holding period, absorbance readings were taken every 10 min for 60 min.

^bThe log of the absorbance was plotted versus time and the slop(decay constant, K_d) calculated.

제 4절 Biosurfactant의 정제, 특성 및 구조분석

1. 연구수행 방법

가. Biosurfactant의 추출, 물질의 분리 및 구조 분석

Biosurfactant를 추출하기 위하여 대상균주를 전배양한 용액을 6 리터의 LB 액체배지에 재접종하여 37 °C에서 5일간 진탕 배양하였다. 배양용액을 10,000 rpm에서 10분간 4 °C에서 원심분리하여 균체를 제거한 상등액을 진한 염산을 서서히 가하면서, pH 2.0이 되게 조정하여 4 °C에서 하룻밤 방치하여 biosurfactant를 침전시켰다. 원심분리하여 침전물을 회수하고, 알칼리성 수용액 (pH 8.0 with NaOH)에 용해하여 동결건조 시켰다. 건조된 물질은 methanol로 추출하여 농축한 것을 부분 정제한 biosurfactant로 사용하였다. 세포내에 존재하는 물질을 추출하기 위하여, 균을 고체배지에 37°C에 5일간 배양한 후 균체를 수거하였다. 수거한 세포는 Tris buffer를 첨가한 후, sonicator를 이용하여, 균체를 파괴하였으며, 13,000 rpm으로 4 °C에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액은 다시 butanol로 3회 추출하여 농축한 것을 부분 정제한 biosurfactant로 사용하였다. 정제한 물질은 glass TLC (thin layer chromatography, silica gel 60 F₂₅₄, MERCK) 전개용매는 CH₂Cl₂ : MeOH : DW (65: 25: 5) 사용하여 전개하였다. 하이드록시기의 발색시약으로는 10 % 황산을 사용하였고, 지질의 발색시약으로는 DPH(1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene)을 사용하였으며 유리 아미노산의 발색시약으로는 ninhydrin을 사용하여 발색시켰다. Lipopeptide의 직접적인 발색을 위하여 dH₂O를 사용하여 발색하였다. 발색을 띄는 band를 회수하여 methanol로 추출하였다. 최종 methanol로 녹여 HPLC로 분석하였다. 조건은 acetonitrile : H₂O (60 : 40)을 용매로 사용하여 250 nm 파장에서 체크 하였다. 유속은 0.5 ml/min으로 하였고, column은 C₁₈ 4.6 × 150 mm, 5 μm을 사용하여 측정하였다. 다른 분석 조건은 methanol : H₂O (90 : 10)을 전개 용매로 사용하여 214 nm 파장에서 체크 하였다. 유속은 2 ml/min으로 하였고, column은 C₁₃ 4.6 x 250 mm, 5 μm 사용하여 측정하였다. HPLC 분석을 통한 peak를 회수하여 다시 같은 방법으로 분석하였다. 회수된 peak의 분자량을 확인하기 위하여 MALDI-TOF mass로 분석하였으며, 아미노산 조성을 ESI-MS/MS로써 분석하였다.

나. Biosurfactant의 특성 확인

1) Biosurfactant의 CMC (critical micelle concentration) 측정.

정제된 biosurfactant의 CMC는 연속적으로 2배의 농도씩 희석하면서 앞에서 언급한 표면

장력을 측정하였다. 이 때, 희석비율 vs. 표면장력을 plotting하여 표면장력이 갑자기 증가하는 지점의 희석비율로부터 농도를 계산하였다.

2) Biosurfactant의 활성 테스트

정제된 biosurfactant의 활성을 확인하기 위하여, alkaline water, LB broth, crude biosurfactant, 정제된 biosurfactant를 para film에 25 μ l를 떨어뜨리고, methylene blue를 첨가해서 10 분후에 방울을 관찰하고, 사진촬영을 한다.

정제된 biosurfactant의 crude oil 분해 활성을 확인하기 위하여, petri 접시에 멸균수 20 ml를 첨가하고, crude oil 20 μ l를 첨가하여 oil film을 형성시킨다. 형성된 oil film위에 biosurfactant를 20 μ l를 떨어뜨려 oil film의 붕괴를 확인한다.

2. 연구 결과

가. TBM 균주와 GBM 균주의 Biosurfactant의 정제 및 특성

1) TBM 1552(2)-1, TBM 3100(1)-4, TBM 3101(3)-9, GBM 3302(2)-3, GBM 3304(4)-6 및 GBM 3309(5)-11, GBM 3305(2)-85 그리고 GBM 3305(3)-81 균주로부터 biosurfactant 분리

Fig. 3-1에서 TBM 1552(2)-1, TBM 3100(1)-4, TBM 3101(3)-9, GBM 3302(2)-3, GBM 3304(4)-6 및 GBM 3309(5)-11, GBM 3305(2)-85, GBM 3305(3)-81는 물 발색과 황산 및 UV 발색에서 다수의 spot으로 물질이 관찰되었다(Fig 3-1). 또한 biosurfactant라고 생각되어 지는 spot은 T3100(1)-4와 G3302(2)-3을 제외하고, 모든 균에서 똑같은 R_f 를 가지는 것을 확인할 수 있었다. Fig 3-1와 같이 윗부분의 band가 lipopeptide계 biosurfactant로 판단된다.

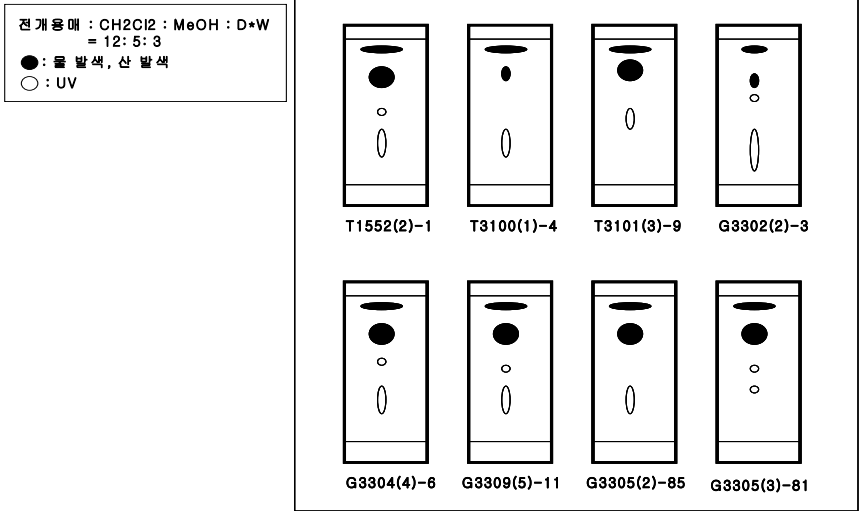


Fig. 3-1. Thin layer chromatography of extracted biosurfactant from various strains.

2) *B. subtilis* GBM 3308(3)-12, *Micrococcus* sp. GBM 3309(3)-11 균주의 biosurfactant 분리

부분 정제된 biosurfactant를 glass TLC (thin layer chromatography : Merck Silica gel 60 F₂₅₄)를 통하여 정제하고 분석하였다. 정제된 sample은 발색시약을 이용하여 발색하여 확인하였으며 정제한 biosurfactant를 glass TLC를 사용하여 구성 물질을 분석한 결과를 Fig. 3-2에 나타내었다. F1과 F4는 하이드록시기의 발색시약으로 10% 황산을 사용한 것이고, F2와 F5는 지질의 발색시약으로 DPH(1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene)을, F3과 F6은 유리 아미노산의 발색시약으로 ninhydrin을 사용하여 발색시킨 것이다 (Fig 3-2).

Fig. 3-2에서 F1, F2, F3은 *B. subtilis* G3308(3)-12균주의 결과이고, F4, F5, F6은 *Micrococcus* sp. G3309(3)-11균주의 결과이다. *B. subtilis* G3308(3)-12에서는 R_f값이 0.63인 밴드를 확인하였고, *Micrococcus* sp. G3309(3)-11에서는 R_f값이 0.67로 나온 밴드를 확인할 수 있었고, silica를 끓여 추출 및 농축, methanol로 최종 volume 2 ml에 녹였다. 녹인 물질은 HPLC를 통하여 분석한 chromatogram을 Fig. 3-3에 나타내었다. Fig. 3-3의 A는 *Micrococcus* sp. G3309(3)-11균주의 biosurfactant를 HPLC 분석한 결과이고, B는 *B. subtilis* G3308(3)-12균주의 biosurfactant를 HPLC 분석한 결과이다. A에서는 retention time이 3.514에서 peak가 나타났고, B에서는 3.604와 7.986의 2개의 peak가 뚜렷이 보임을 알 수 있다. 특히 *B. subtilis* GBM 3308(3)-12에서는 이들이 iturin A와 surfactin 표준물질과 retention time이

다소 일치하지 않았다. MS/MS 분석 결과와 비교하여 확인하여야 할 것으로 판단된다. PDA로 체크한 spectrum도 표준물질과는 다소 상이하여 현재의 단계에서는 구조를 판단하기는 어렵다.

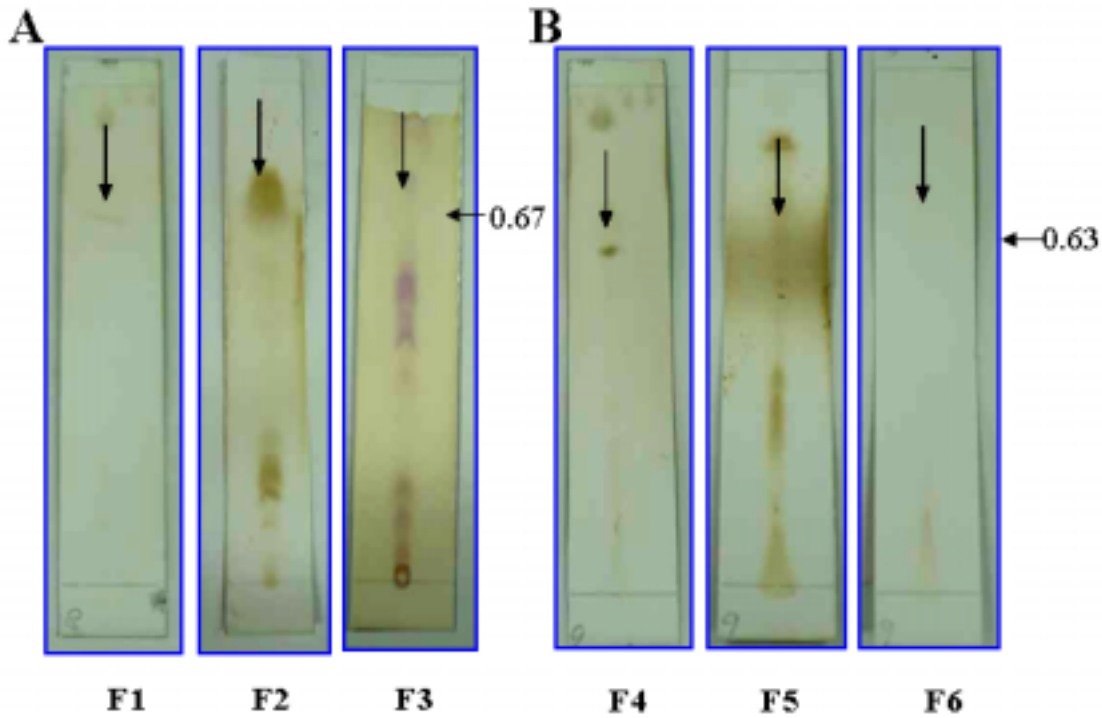


Fig. 3-2. TLC analysis of extracted crude surfactant from *Micrococcus sp.* GBM3309(3)-11 and *B. subtilis* GBM3308(3)-12. (A : *Micrococcus sp.* G3309(3)-11 B : *B. subtilis* G3308(3)-12, F1 and F4 : 10% H₂SO₄, F2 and F5 :1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, F3 and F6 : ninhydrin)

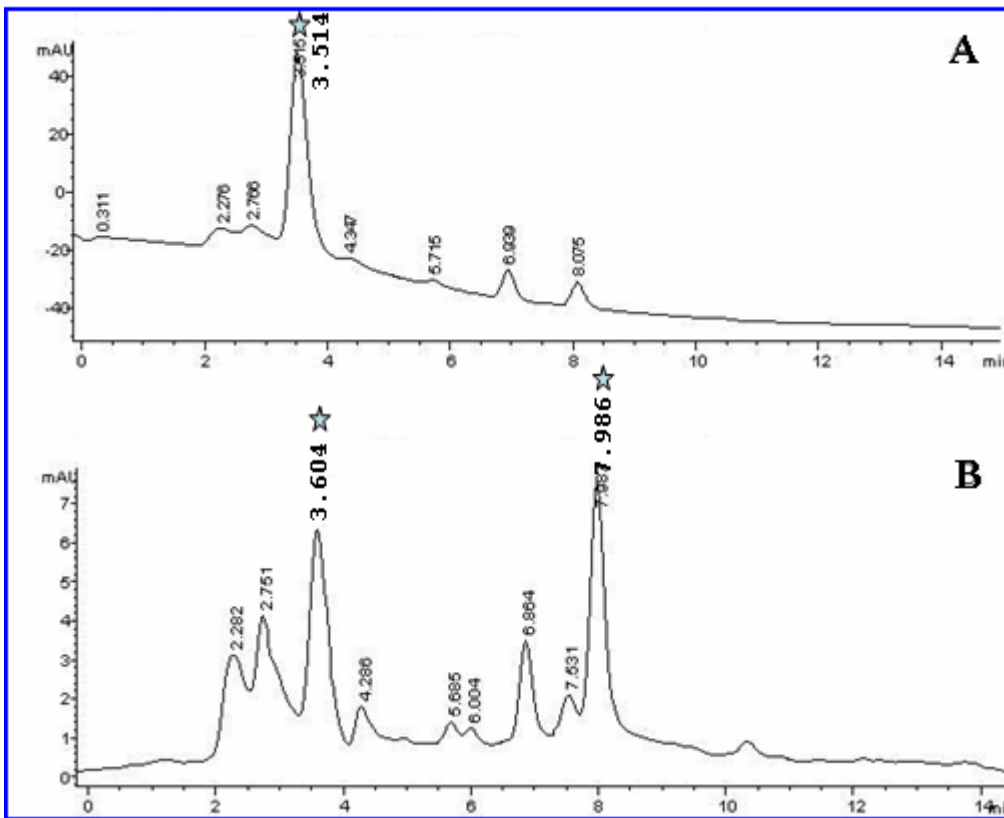


Fig. 3-3. HPLC chromatogram of biosurfactant from *B. subtilis* GBM 3308(3)-12 and *Micrococcus* sp. GBM 3309(3)-11 (A : *Micrococcus* sp. GBM3309(3)-11, B : *B. subtilis* GBM3308(3)-12)

나. *Bacillus subtilis* A8-8의 biosurfactant 정제 및 특성

1) Biosurfactant의 분리, 정제 및 분석

Biosurfactant는 A8-8 배양액으로부터 원심분리하여 세포를 제거하고 12N HCl을 사용하여 4°C에서 밤새 침전하여 원심분리에 의해 갈색의 침전물을 얻었다. 얻어진 침전물을 methanol로 3회 추출하여 농축하고 silica gel로 충전된 column chromatography를 통하여 정제하였다. 정제한 biosurfactant를 SDS-PAGE와 TLC를 통하여 분자량과 구성물질을 분석한 결과를 Fig. 3-4에 나타내었다. SDS-PAGE를 통하여 넓게 퍼진 단일 band를 확인하였으며 분자량이 약 1,100 Da으로 추정되어 진다. SDS-PAGE를 통하여 확인된 단편을 잘라내어 acetone을 사용하여 추출하고 추출된 것을 TLC를 통하여 분석한 결과 iturin과 유사한 R_f 값과 색깔을 지니는 것을 확인하였다. HPLC를 통하여 분석한 결과 용출 시간이 iturin과 일치 하였다.

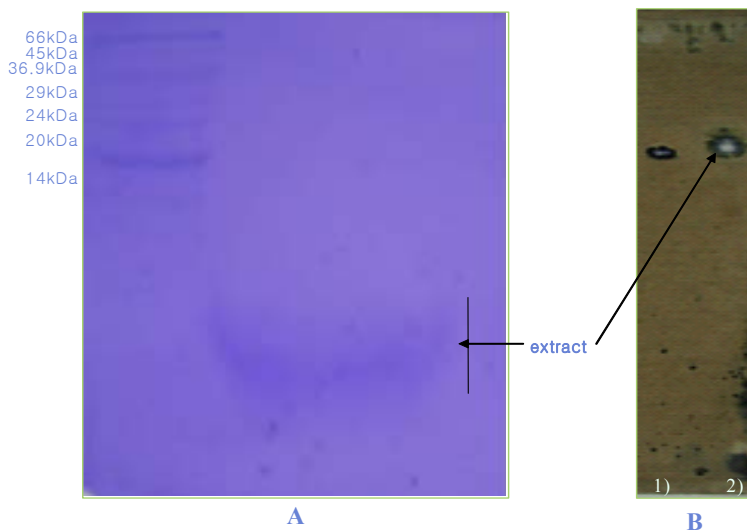


Fig. 3-4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns and TLC showing purified biosurfactant. (A: The biosurfactant was loaded 30 μ l(14.4 μ g) and standard markers (BSA, 66kDa; albumin, 45 kDa; pepsin, 34.7 kDa; trypsinogen, 24 kDa; lactoglobulin, 18.4 kDa and lysozyme, 14.3 kDa) was 10 μ l. B: 1) Iturin A was used to standard marker, 2) The one spot was indicated biosurfactant extracted from

SDS-PAGE gel)

2) 정제된 biosurfactant의 CMC

배양액에서 산 침전, 용매추출 및 column chromatography에 의해 정제한 biosurfactant의 CMC 는 Fig. 3-5에서와 같이 20 mg/L인 것으로 나타났다. 이 때의 최소 표면장력은 배양 상등액으로 측정 한 값과 거의 비슷하게 물의 표면장력을 72 mN/m에서 29 mN/m로 떨어뜨렸다. 이 결과는 지금까지 알려진 *Bacillus* sp. 및 *Norcardia* sp. 등의 균주들의 표면장력 저하능이 25-40 mN/m 정도의 범위로 보고된 내용과 비슷한 경향을 나타낸 것이다. 세포의 성장에 따라 표면장력을 측정과 비슷하게 초기의 적은 biosurfactant의 농도에서 급격히 표면장력이 떨어지며 임계 값, 즉 CMC 값에 가까워질수록 표면장력의 저하 정도가 줄어드는 경향을 보이다가 CMC 농도 이상의 biosurfactant의 농도 에서는 표면장력이 일정해 진다. 이와 같은 결과는 *Norcardia* sp. 등의 균주와 유사한 결과를 나타낸다.

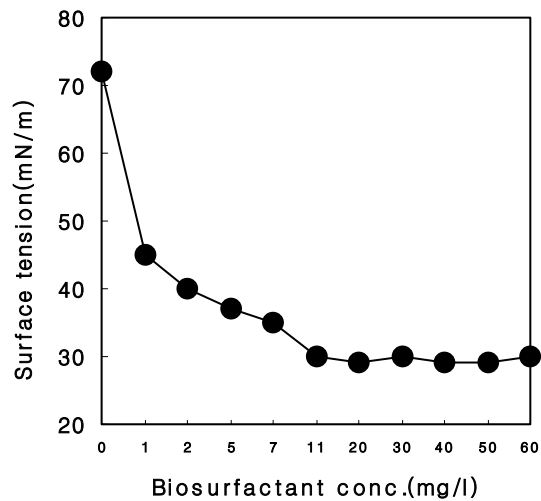


Fig. 3-5. Surface tension decreases by the purified biosurfactant A8-8(The surface tension was measured by using the Ring method on a DeNouy Tensiometer at room temperature).

다. *Bacillus atrophaeus* DYL130이 생산하는 biosurfactant의 특성

B. atrophaeus DYL130가 생산하는 biosurfactant를 정제하기 위하여 전배양한 배양액을 2 l의 LB배지에 접종하여 72 시간동안 배양하였으며, 배양용액을 원심분리(10,000 rpm, 4 °C)하여 균체를 제거한 상등액을 수집 하였다. 배양상등액은 column chromatography (DIAON HP20)를 이용하여 정제하였다. 정제된 sample중 fraction 2~6번까지를 TLC하여 결과를 Fig. 3-6-A에 나타내었다. Fraction 2~6중에서 fraction 4, 5에서 spot을 확인하였으며 R_f 값은 0.758이었다 (Fig. 3-6). Fraction 4의 표면활성을 확인하기 위하여 drop collapsing test를 통하여 활성을 확인하였으며, Fig. 3-7에 나타내었다. 다음으로 1차로 정제된 물질을 다시 전개용매 chloroform : methanol = 6 : 4를 이용하여 전개하였다. 이때 R_f 값이 0.48, 0.78, 0.87인 물질을 dH₂O 발색을 통하여 각각 확인 하였으며 (자료 미제시), 이 중에 활성을 가진 spot을 찾기 위하여 각각을 100 % methanol 300 μ l로 3회 반복하여 추출하고, alkalic water(pH10) 300 μ l에 녹여 drop-collapsing test로 활성을 test 하였으며, 이를 다시 TLC로 확인하였다. 이 결과를 Fig. 3-6에 나타내었으며, R_f 은 0.78이었다. 이는 *Bacillus subtilis*가 생산하는 lipopeptide와 유사한 값이다.

정제된 biosurfactant의 toluene 유화능을 알아보기 위하여 column chromatography에 의하여 정제된 fraction 4에 대하여 유화능을 test하였으며, 그 결과를 Fig. 3-8에 나타내었다. Supernatant의 경우 3가지 층을 관찰 할 수 있는데, 각각은 ① 투명한 toluene층과 ② toluene과 biosurfactant가 emulsion 상태로 존재하는 중간층 ③ 그리고 배양액(배양배지)만으로 존재하는 아래층이다. Fraction 4의 경우, 실온에서 1시간동안 방치한 후에도 emulsion 상태를 유지함을 관찰할 수 있다. 이러한 결과로 보아 DYL-130이 생산하는 biosurfactant는 toluene 유화력이 매우 뛰어난 것으로 생각된다.

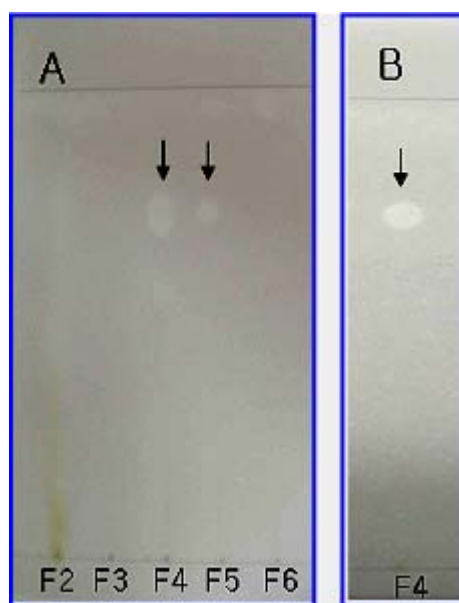


Fig. 3-6. Purification of biosurfactant by column chromatography (DIAON HP20) and TLC. (A : The purified sample was confirmed by TLC (thin layer chromatography, silica gel 60 F254, MERCK) with CMW (chloroform/methanol/water = 65 : 25 : 4) as a developing solvent mixture. B : And the gel band were scratched off from the plate with CM (chloroform/methanol = 6 : 4) as a developing solvent mixture, and extracted three times with 100% methanol. Extracted sample was confirmed by TLC with CMW)

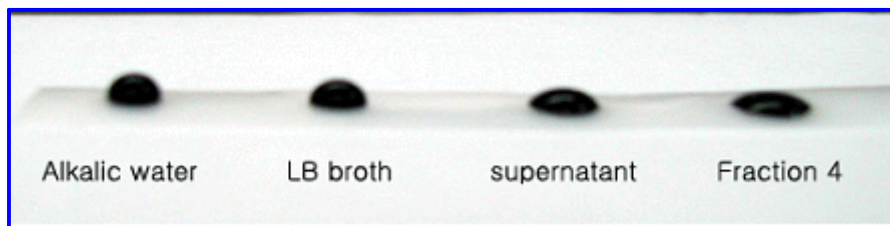


Fig. 3-7. Biosurfactant activity of culture supernatant and fraction 4 of *Bacillus atrophæus* DYL-130.(25 μ l droplets of each culture supernatant and purified sample(fraction 4) on a parafilm underground. Methylene blue was added to stain the supernatants for photographic purposes and had no influence on the droplets)

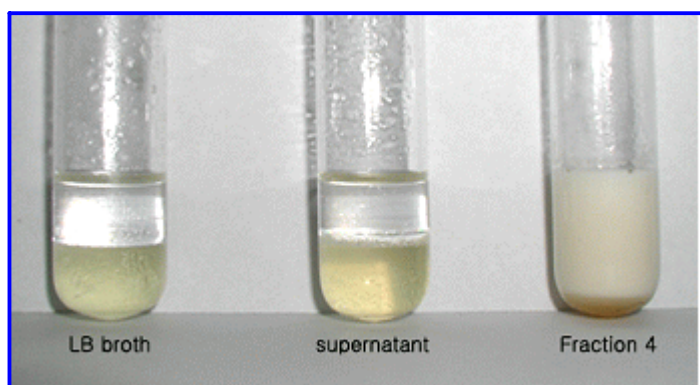


Fig. 3-8. Comparison of the emulsifying activity with culture supernatant and purified sample.(An equal volume of toluene was added to supernatant, fraction 4, LB broth and mixed in glass vials. The layers represent the stabilized emulsions after 1h of incubation)

DYL130 정제된 Biosurfactant를 이용하여 CMC(critical micelle concentration)을 측정한 결과를 Fig. 3-9에 나타내었다. CMC 값은 0.23 mg/ml 이며, 이 때 표면장력은 30 mN/m 정도였다. 이 결과는 지금까지 알려진 *Bacillus* sp. 및 *Norcardia* sp. 등의 균주들의 표면장력 저하능이 25 -40 mN/m 정도의 범위로 보고된 내용과 비슷한 경향을 나타낸 것이다. 세포의 성장에 따라 표면장력을 측정과 비슷하게 초기의 적은 biosurfactant의 농도에서 급격히 표면장력이 떨어지며 임계 값, 즉 CMC 값에 가까워질수록 표면장력의 저하 정도가 줄어들어 가는 경향을 보이다가 CMC 농도 이상의 biosurfactant의 농도에서는 표면장력이 일정해진다. 이와 같은 결과는 *Norcardia* sp. 와 본 연구에 사용된 *B. subtilis* A8-8등의 균주와 유사한 결과를 나타낸다.

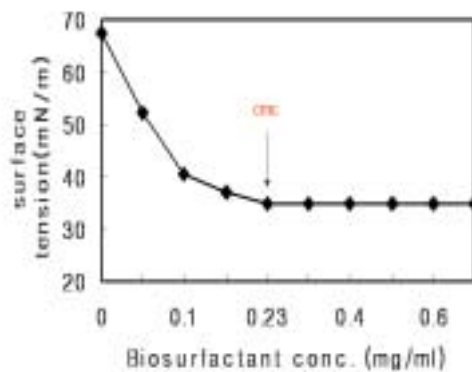


Fig. 3-9. Surface tension of the partially purified biosurfactant.(The surface tension was measured by using the Ring method on a DeNouy Tensionmeter at room temperature.)

라. *Bacillus amyloliquefaciens* LP03이 생산하는 biosurfactant의 특성

B. amyloliquefaciens LP03이 생산한 biosurfactant를 분리하기 위하여 LP03 배양액을 원심분리하여 세포를 제거하고, 상등액을 수거하였다. 수거된 상등액에 12N HCl을 사용하여 4°C에서 밤새 침전하여 원심분리에 의해 갈색의 침전물을 얻어서 진공건조기로 완전히 건조 시켰다. 건조된 물질을 methanol로 3회 추출하여 농축하고 silica gel로 충전된 column chromatography를 통하여 정제하였다. 정제한 biosurfactant는 HPLC를 수행하여 분석하였다(Fig. 3-10). Fig. 3-10에서 A의 No. 1은 정제된 biosurfactant의 HPLC chromatogram을 나타내고, No. 1을 B의 TLC를 통하여 전개를 하고, dH₂O 발색을 하여 R_f 0.71의 흰색을 나타내는 단일 spot을 확인하였다. Fig. 3-10에서 A의 No. 2 ~ No. 6 chromatogram은 No. 1을 분획별로 받아서 확인한 것으로 단일 peak가 회수한 것을 확인할 수 있다.

No. 1의 활성을 확인하기 위하여, 물이 들어 있는 petri dish에 crude oil 20 μ l를 떨어뜨리고 oil 필름을 형성하였다. 형성된 필름을 biosurfactant를 떨어뜨려 oil film이 붕괴되는 것을 Fig. 3-11을 통하여 확인하였다.

Fraction1 (No. 2), fraction3 (No. 3), fraction4 (No. 4), fraction5 (No. 5), fraction8 (No. 6)의 활성을 확인하기 위하여, 실험 방법과 같이 하여 Fig. 3-12에 실험 결과를 나타내었다. 부분적으로 정제된 biosurfactant는 Fig. 3-10에서 No. 1에 해당하는 biosurfactant 혼합물을 사용한 것이다. Fraction8과 fraction5가 활성이 강하고, 그 다음은 fraction3가 강한 crude oil 분해 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있다. Fraction1과 fraction2는 상대적으로 활성이 약한 것을 확인할 수 있다.

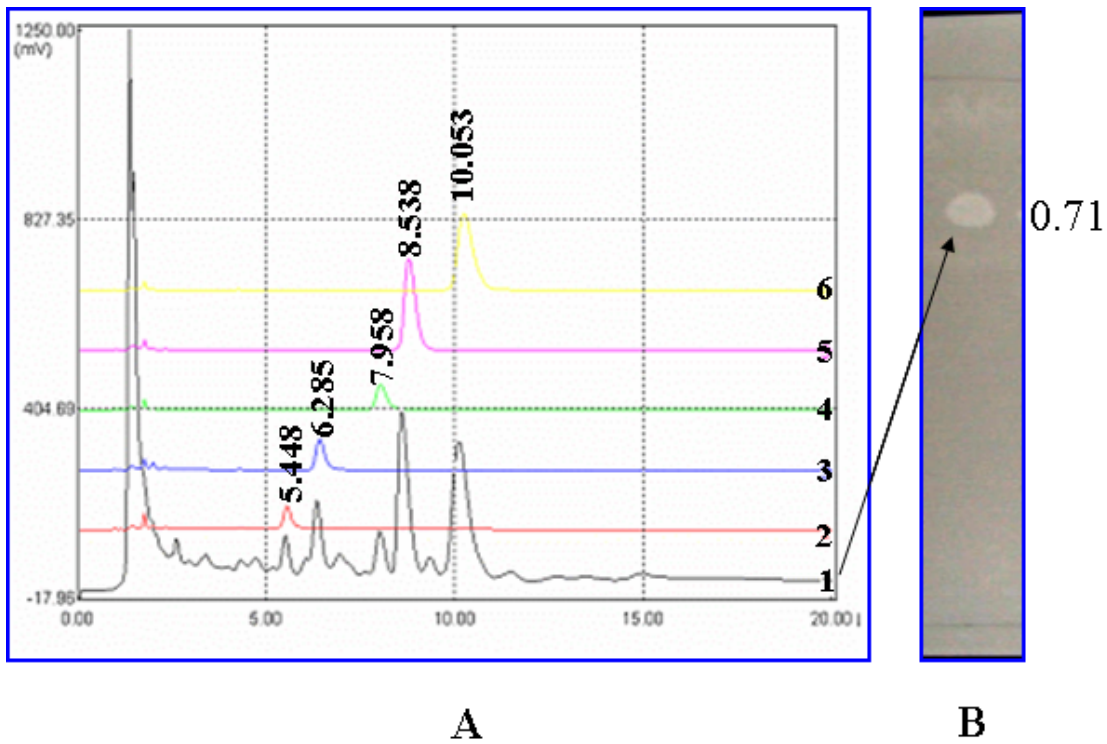


Fig. 3-10. HPLC chromatogram and TLC of biosurfactant from *B. amyloliquefaciens* LP03 (1 : partially purified biosurfactant, 2 : fraction1, 3: fraction3, 4 : fraction 4, 5 : fraction5, 6: fraction8)



Fig. 3-11. Crude Oil-degrading test of purified biosurfactant from *B. subtilis* A8-8.

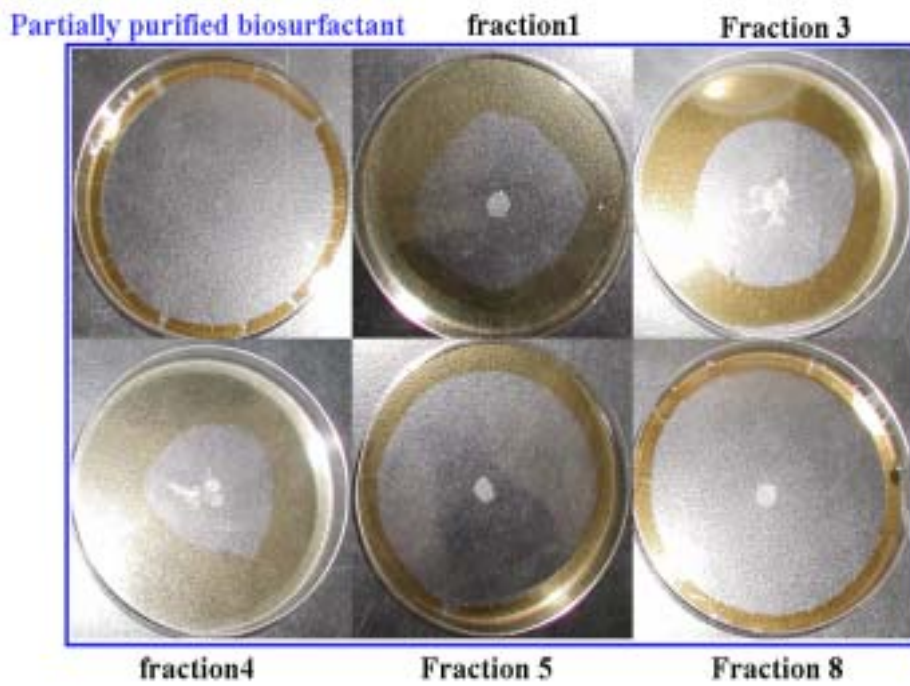


Fig. 3-12. Crude oil-degrading activity of purified biosurfactant from *B. amyloliquefaciens* LP03

마. 정제된 biosurfactant의 구조분석

각각의 fraction의 biosurfactant의 분자량 및 구조를 확인하기 위하여, MALDI-TOF mass를 통하여 분석하였다(Fig. 3-13). Fraction1의 분자량은 m/z 1044.8과 1512.9, fraction3은 m/z 1058.8과 1514.0, fraction4는 1072.8과 1513.1, fraction5는 1072.9와 1514.2, 그리고 fraction8은 1086.9 와 1491.2로 나타났다. 다양한 분자량이 존재하는 것은 biosurfactant의 지방산 성분의 잔기에 구성되는 탄소수의 차이에 따른 이성질체가 존재를 하기 때문이다. MALDI-TOF chromatogram에서 분자량이 m/z 1044, 1058, 1072, 그리고 1086은 iturin 또는 surfactin의 이성체라고 생각되어 진다. 이성체의 존재는 fatty acid 부분의 탄소 수가 바뀌어서 일어나는 경우와 peptide 부분에서 amino acid 치환이 일어나는 경우 두 가지가 있다. 전자의 경우 분자량 $14(\text{CH}_2)$ 의 배수로 증가하거나 감소하는 경향을 보인다. 또한 분자량이 m/z 가 1512, 1513 그리고 1514는 아직 보고된 적이 없는 분자량이다. 신규 lipopeptide성 biosurfactant일 가능성이 높다.

분자량이 m/z 1491은 분자량이 fengycin B의 isoform과 비슷하였다. 따라서 구성물질의 조성을 알아보기 위하여 TOF-MS/MS를 이용하여 분석한 결과를 Fig. 3-14에 나타내었다. 그 결과 Fraction8은 탄소수가 17개로 구성된 fatty acid와 Glu, Orn, Tyr, Ser, Glu, Val, Pro, Gln, Tyr, Ile의 10개의 아미노산이 연결되어 있다. 현재 보고된 fengycin은 A형과 B형이 있다. A형은 6번째 아미노산이 Ala이고 fatty acid 부분에 탄소수가 14 ~ 17개 까지 존재하며, B형은 6번째 아미노산이 Val이고, fatty acid 부분에 탄소수가 15 ~ 17개 까지 존재하는 것으로 보고되어 있다 (Fig. 3-15 : A, B). 그러나 fraction8의 m/z 1491인 biosurfactant는 펩타이드 구조의 4번째 아미노산이 기존의 Thr에서 Ser인 것으로 보아 보고된 것과는 전혀 다른 새로운 fengycin임을 알 수 있었다(Fig. 3-16). 따라서 이 물질을 fengycin S로 명명하였다.

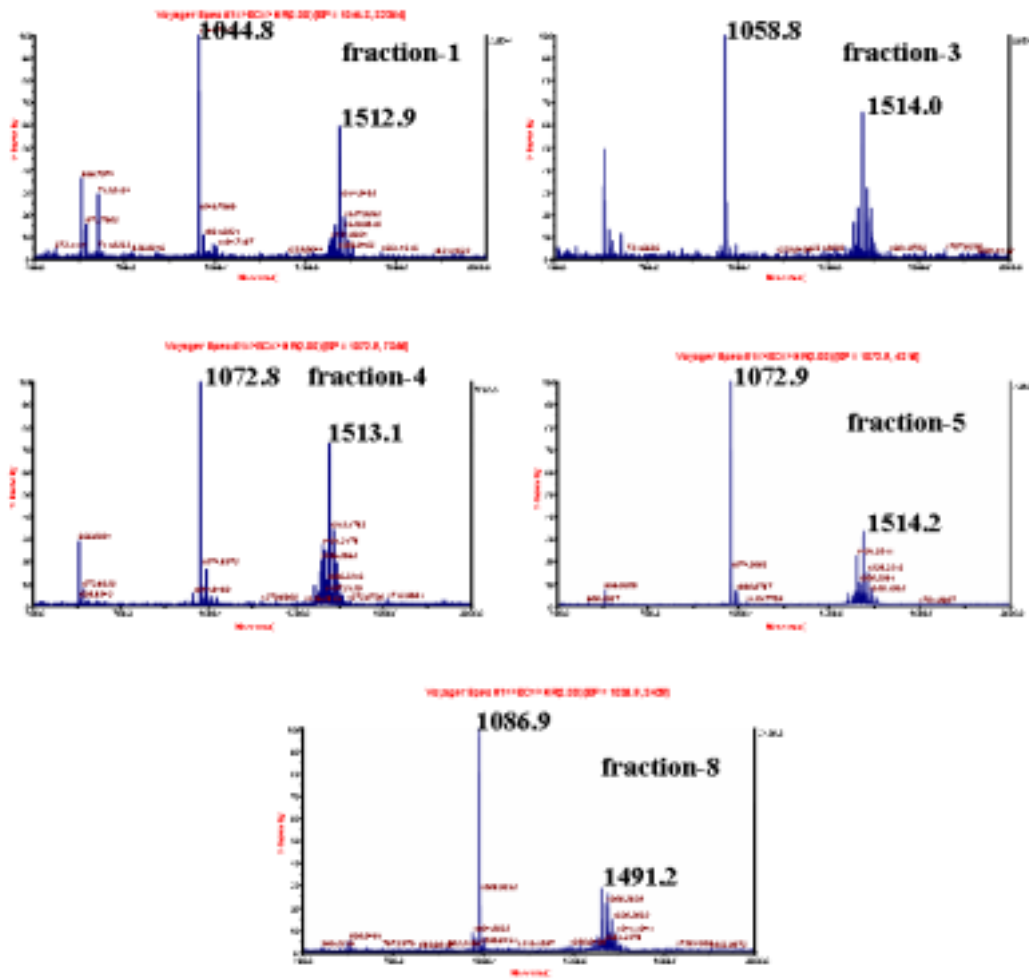


Fig. 3-13. MALDI-TOF mass spectrum of HPLC fraction produced by *B. amyloliquefaciens* LP03. The lipopeptide appeared as a complex mixture of several isoforms.

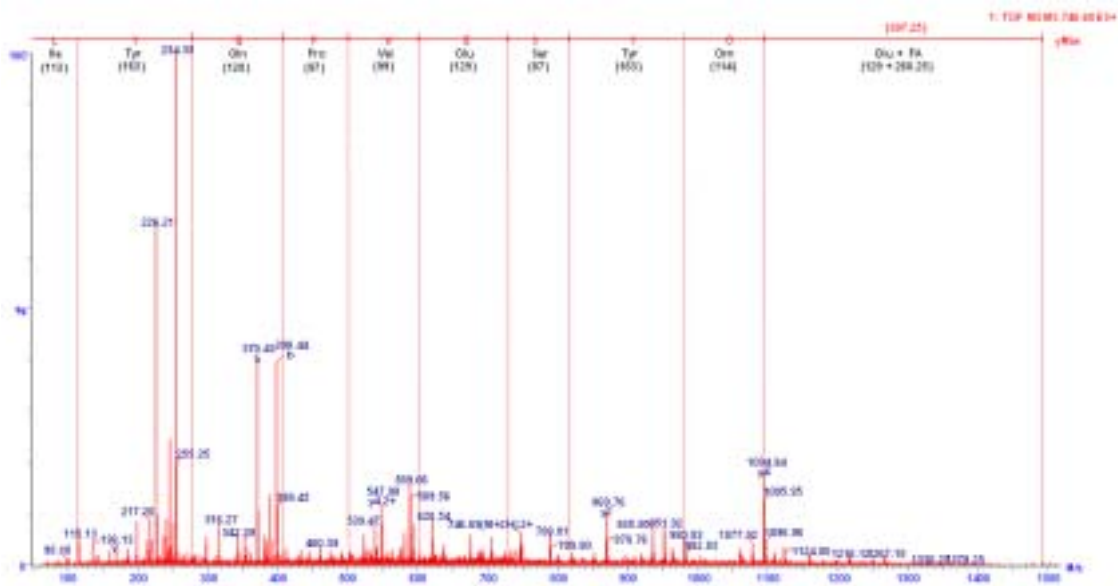


Fig. 3-14. TOF-MS/MS spectrum of the precursor ion m/z 1494 from fraction8. The amino acid sequences of the peptides were assigned from y_n ions series

제 5 절 Biosurfactant 대사 관련 유전자의 발굴 및 기능분석

1. 연구수행 방법

가. lipase 유전자의 cloning

Lipolytic 활성을 나타내는 균주로부터 lipolytic 유전자를 cloning하기 위해 NCBI의 BLAST를 통하여 lipase의 보존영역을 조사하였으며, 이를 이용하여 primer(LipAR : 5'-GCAGAAAAAGTCAACTTGAT-3', LipAF : 5'-AGATGGTTCCAGTTGTAATT-3')가 작성되었다. 주형으로서 BD 2, 4, 5의 염색체 DNA가 사용되었으며, Go Taq으로 PCR을 하였다. PCR은 다음과 같이 행해졌다. 94 °C, 4분 1회 행한 후 변성(94 °C, 1분), annealing(37 °C, 45초), 신장(72 °C, 4분)으로 5회 행한 다음 변성(94 °C, 30초), annealing(54 °C, 30초), 신장(72 °C, 10초)로 25회 수행하여 72 °C에서 4분간 행한다. 얻어진 단편을 pGEM T- easy vector에 cloning하여 염기서열을 결정하였다. 그리고 NCBI의 BLAST를 이용하여 아미노산 분석을 통해 알려져 있는 균주들과의 상동성을 분석하였다.

얻어진 lipase 유전자의 일부 단편으로부터 완전한 lipase 유전자를 얻기 위해 DNA walking PCR를 실험하였다. DNA walking Speed Up Primix kit (seegene Co.)를 사용하여 실험하였다. lipase 유전자 단편을 가진 선별된 균주의 염색체 DNA가 주형으로 사용되었고, 기지의 lipase 영역에서 최소한 3개의 target specific primer를 작성하였다. primer는 18~23 뉴클레오티드 길이, TSP1은 $55\text{ °C} \leq T_m \leq 60\text{ °C}$, TSP2, 3은 $60\text{ °C} \leq T_m \leq 65\text{ °C}$ 가 되도록 했으며, kit에 들어있는 미지의 영역에 결합될 Annealing control primer(ACP 1, 2, 3, 4)의 binding site(5'-AGGTC, 5'-TGGTC, 5'-GGGTC, 5'-CGGTC)의 염기서열이 포함되지 않도록 한다. 제조업체의 방법에 따라 총 3번의 PCR이 수행되어졌다. PCR 조건은 다음과 같다. 첫 번째 PCR은 변성(94 °C, 5분), annealing(42 °C, 1분), 신장(72 °C, 2분)으로 1회 수행되었으며, 변성(94 °C, 30초), annealing(55 °C, 30초), 신장(72 °C, 100초)로 30회정도 수행되었으며, 마지막으로 72 °C, 7분이 수행되어졌다. 두 번째 PCR은 94 °C, 3분으로 1회 수행 후 변성(94 °C, 30초), annealing(55~60 °C, 30초), 신장(72°C, 100초)로 35회, 72 °C, 7 분간 1 회로 수행되어졌다. 세 번째 PCR 조건은 두 번째 PCR 조건과 동일하며, annealing온도가 60~65°C로 주어졌다. 얻어진 PCR 단편을 회수하여 pGEM T-easy vector에 ligation되었으며, *E. coli* TOP 10F'에 형질전환되었다. x-gal, ampicillin, IPTG가 첨가된 LB고체배지에 도말하여 37 °C에서 배양한 후 white colony만 선별하여 재조합체가 얻어졌으며(pLip-BD5w), 염기서열을 결정하였다. 선별된 균주의 lipase영역의 일부와

DNA walking PCR로 얻어진 단편의 염기서열을 분석하여 완전한 lipase의 염기서열을 결정하였다.

2. 연구결과

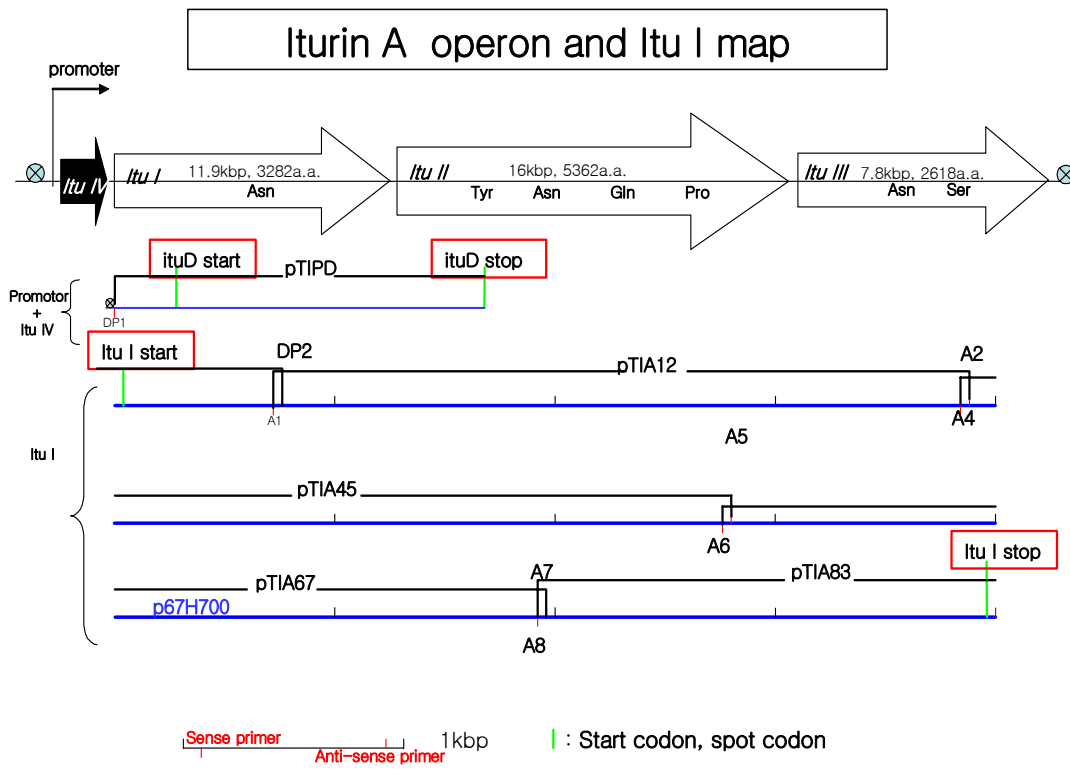
가. Iturin 합성과 관련된 유전자의 분석

1) 유전자 클로닝 및 유전자 서열

길항력과 유류 분해능이 뛰어난 균주 *B. amyloliquefaciens* LP03로부터 Lipopeptide, Iturin과 Surfactin 생산에 관련되는 유전자를 클로닝하기 위하여 이미 보고 되어져 있는 염기서열을 토대로 관련 유전자의 operon 모식도를 나타냈다 (Fig. 4-1).

Fig. 2-1은 iturin 합성에 관여하는 유전자의 오페론 구조와 각 유전자의 염기서열을 결정하고 유전자들의 분석을 위하여 작성된 subclone들을 보여 주고 있다. 1차년도에 *B. amyloliquefaciens* LP03으로부터 Iturin operon의 promotor 영역, *Itu IV*와 일부 *Itu I*을 보고하였다. 현재는 그 이후로 모든 clone이 얻어 졌으며, *Itu I* 유전자를 포함하는 clone은 각각 pTIA12, pTIA45 그리고 pTIA67로 명명하고. *Itu II* 유전자를 포함하는 clone은 pTIB12, pTIB34, pTIB715 및 pTIB661로 명명하였으며, *Itu III* 유전자를 포함하는 clone은 pTIC111과 pTIC23로 명명하였다. 각각의 clone은 다시 염기서열 결정에 적당한 size로 다시 subclone을 작성하고 염기서열을 결정하였다. Fig. 4-2에 나와 있는 것과 같이 직접적으로 Iturin 생합성에 관여하는 operon의 염기서열이 완전히 결정되었다. 총 클론으로 작성된 nucleotide 크기는 38.146 kb이며, promotor 부분은 -35 box, -10 box, 및 전사 개시점을 나타내었다. 그리고 각각의 ORF의 개시 코돈과 stop 코돈을 표시 하였다.

Iturin 생산과 관련된 유전자는 promotor를 포함하여, *Itu IV*, *Itu I*, *Itu II*와 *Itu III*의 4개의 유전자로 구성되어 있음을 확인 할 수 있었으며, nucleotide 서열과 amino acid 서열을 Fig. 4-2에 나타내었다. 유전자의 양쪽 방향의 염기서열이 확인된 것을 보면, *Itu IV*는 염기서열이 1.2 kb 영역의 크기로서 400개의 아미노산을 가지는 malonyl-CoA transacylase를 암호화하는 유전자이다. malonyl-CoA transacylase는 lipopeptide의 지방산의 결합을 촉매하는 효소이다. *Bacillus amyloliquefacien* LP03은 *Itu I*, *Itu II*와 *Itu III*는 각각 약 11.9 kbp, 16.0 kbp, 7.8 kbp와 3282, 5362, 2618개의 아미노산을 암호화 하고 있고 세 유전자 모두 lipopeptide에 peptide의 합성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 여기에서 보고한 Iturin operon은 *Bacillus subtilis*에서 보고된 Iturin operon과 높은 상동성을 보여 준다.



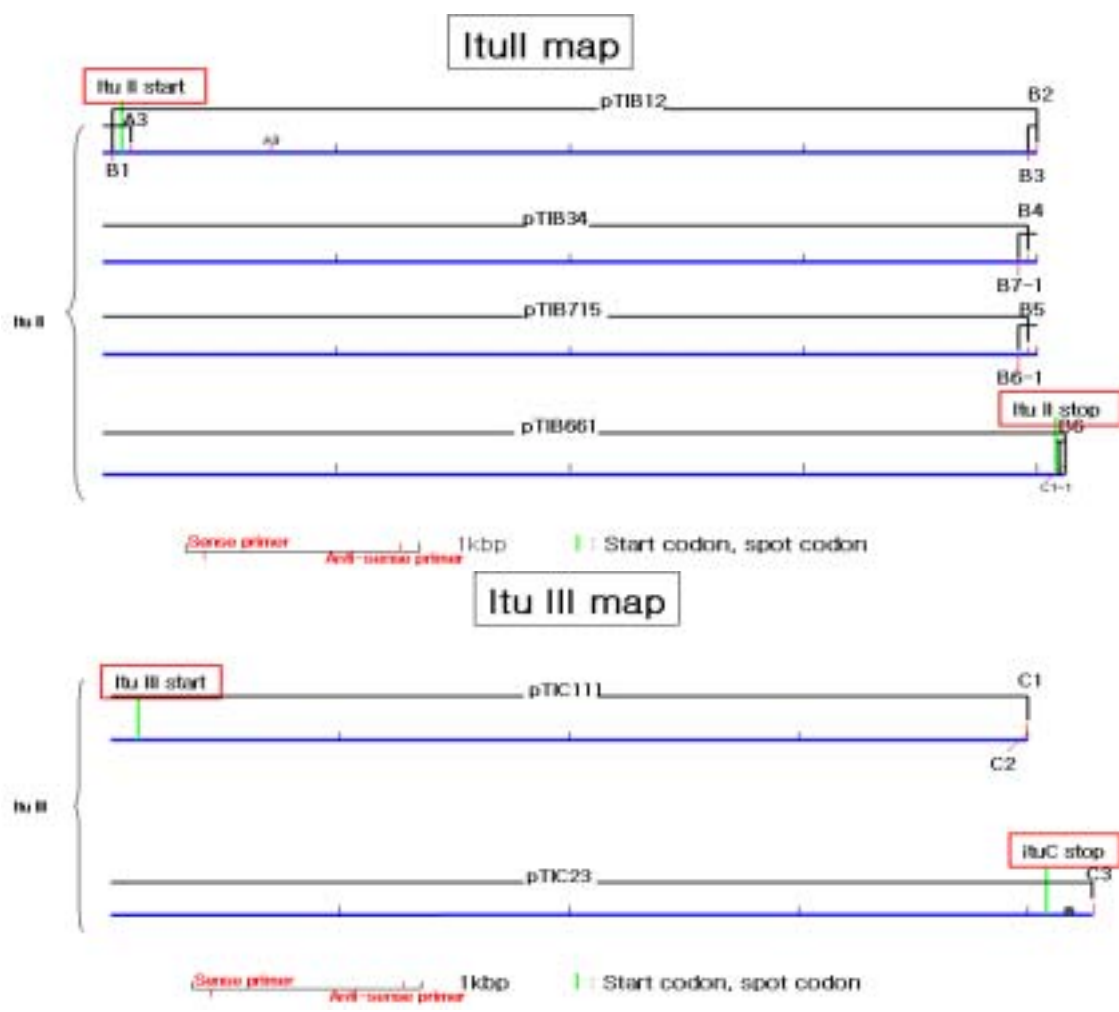


Fig. 4-1. The Iturin synthetase operon and subclones.

	CCTTGCTCACTCAATAGGCCGATTTACTGCCTCAACCGGTATCGGGCTGGGTCATTAC	60
	ATGTTCTGCGCGTATTTTGCCTTGCAGATTTTCTCATCCAGATCCATTCTTGCGCC	120
	GCATTTATAATCAAGCGCCATCAGTTTACAAATCCTTACAGATATACAAATGAATTTT	180
	CAATAAACAGAAAAATGTAATTTCTGACACAATAATGCCAATAGCCCTAAAAATATGA	240
	AACATGAAGAGCGCGACCTAAGTGAAGAAAGCCGGTAACAGGCTCCACTCCGGCTTTTC	300
	ATCATCTCTCTTTAAGACTGATTTTCGGTGAACCCACATGTTTTATTTATGAATAAT	360
	ATATCTAATTGTTTTGAAAAATCGAAACAATAACTCCTCGAAAGTATTC	420
	GTTATAATCATGC	480
	TAGGAT GTAGAT	
	A AGGGATAATTTGTAGGATATTGATTTTCCTGT	
	-10 +1	
F2	<i>itu IV</i> -> M N N L A F L F P G Q G S	
	TCAATATGATCGGAGGAATCTCATGAACAATCTTGCCTTTTTATTTCCTGGACAAGGGTC	540
F2	Q F V G M G K Q F W N D F V L A K R L F	
	TCAATTTGTAGGAATGGGCAACAATTTTGAATGATTTTGTGCTCGAAAGAGATTGTT	600
F2	E E A S D A I S L D V K K L C F N G D M	
	TGAAGAAGCGAGCGATCGATCTCCTTGGATGTAATAAAAACTGTGTTTAAACGGAGATAT	660
	
	
F2	Q I Q E L K E R M E R H E N E L S E Q E	
	GCAAATCCAAGAGCTGAAAGAGAGAATGGAAGACATGAAAATGAGCTCTCAGAACAAGA	1620
F2	L E H S I H L C K L I C E A K Q L P A W	
	GCTCGAATTCGATCCATTTATGCAAATTAATTTGCGAGGCTAACAGCTTCGGCTTG	1680
F2	E E L R I L K *	
F3	<i>itu I</i> -> M Y T S Q F	
	GGAAGAATTGCGGATTTTAAAAATAGCGCCAGGAGGGGACCTATGATACCAGTCAAT	1740
F3	Q T L V D V I R E R S N I S D R G I R F	
	TCCAACCTTAGTAGATGTCAATTCGGGAAAGCAATATCTCTGACCGCGGGATCCGTT	1800
	
	
	
F3	Y S K K L F K K S R I E V L S N D Y L H	
	AATATTCGAAAAAAGCTGTTTAAAGAAAAGCAGAATCGAGGTTTTATCAAACGACTACTTAC	13560
F3	I L S A I L E Q P S I L I E H I G L S G	
	ACATTCTATCGCGGATTTTGAACAGCCAAGCATTCTAATTGAACATATCGGATTGAGCG	13620
F3	S N E E E E N A L D S I Q L N F *	
	GCAGCAATGAGGAAGAAGAGAAGCGCTTGATTCTATTCAATTGAACTTTTAGGGAAAAG	13680
F2	<i>itu II</i> -> M S V F K N Q E	
	CATTATTTCTTTAAATTATATAAAATGAGGTGCTCCAATGTCGGTATTTAAAAACCAAGA	13740
F2	T Y W E N L F D E E D G L S A F P Y F K	
	AACGTACTGGGAAAACCTGTTTGTGAAGAAGACGGCCTAAGCGCATTCCCTTACTTTAA	13800
F2	A A D K A S L A R T G Y Q E K C I C R S	
	AGCAGCGGATAAAGCGTCGTTGGCCCGTACCGGTACCAGGAAAAATGCATCTGCCGTTTC	13860
F2	L S P E V S Q R I M T M A N H S D M A A	
	CTTATCTCCGGAAGTATCCCAAAGAATCATGACAATGGCGAATCATTCCGATATGGCGGC	13920

.....		
.....		
.....		
F2	T K L F K K K T I A V L A K D Y V M I L TACAAAAGTGTAAAAAGAAAACCATGCTGTATTGGCCAAGGATTACGTCATGATCCT	29700
F2	S A I M R N P S I P L K D I Q L S E K V TTCGGCGATTATGAGAAACCCATCCATTCCCTTTAAAAGACATTCAATTAAGCGAAAAAGT	29760
F2	N K S K H L A S T I E L D F * AAACAAAAGTAAACATCTCGCAAGCACAATCGAATTGGATTTCTAATCACGGGGCCAGCG GCTGTCCCGGCATGAATGCCGCGGCTGCCGCGAGCTGCCTGAAAACAGGAATGAAACCAA	29820 29880
F3	<i>itu III</i> -> M S E F K Q Q E L F W G R M F H CTGGAGGATATGAATGTCAGAATTCAAACAACAGGAGTTGTTCTGGGGCCGAATGTTTC	29940
F3	T E D R P G A F P S F Q V S D S T V K L ACACGGAAGACCGTCCCGGTGCATTCCCTCGTTTCAAGTGTCCGACTCAACAGTAAAGC	30000
F3	D I T S G S D C I H S S L S A E V S R R TTGATATAACAAGCGGATCTGACTGTATTCACAGTTCATTGAGTGCAGGAGGTATCACGGC	30060
.....		
.....		
F3	A L E K R G R T V S D V I M L D S K I T AAGCCTTAGAAAAGCGGGGGCGACCGTATCTGATGTGATTATGCTGGATTCTAAAATCA	37320
F3	D S A T H L S E E E I Q E I V H L N M D CCGATTCGGCAACTCATTATCGGAAGAGGAAATCCAAGAGATCGTCCATCTGAATATGG	37380
F3	I I P D Y Y R E I L T I P S I K D K I R ACATTATTCGGACTACTACAGAGAAATATTAACCATTCCTTCGATTAAGGATAAAAATCA	37440
F3	G Y L A Y H N E L I N P A P L T P T S I GAGGCTATCTTCGATACACAATGAACTGATCAATCCGGCGCCGTTAACGCCAACATCCA	37500
F3	I C Y A A M * TCATTTGCTATGCGGCGATGTAACCGATGATAGGGGCTGGACACAATCAACAGCACAGCA TTATCTTGAGTACAAATTAAGGAGATCACGTGACGATCTTTGAACCTCACAATATCGA AGAAAATACGGATGCAATTCGATCTATTATCAAAGGATTGAAGAACGGCATCATCACGG ACTTGTCTTGAAGAACAACGTCAATAGGATCGTTTGGGGGAGACGCAAAGTTTGACAA AATGTAAGTGATCAAGGTAAAACGCCGCTGGTCTGGCACTCAGCGCGTTTTTTATTAA AAAGGCAGAGTCACTACTCTGTGTTGCGAAGGCTTACTCCACAGCCGTTCTCCATGACC GGTTGTCATCAAATGGTAAAAAATCATCATACATTTTAAGGAAAAAGAAGGATGTCAAG TTATTAGAAAAAGTGTAGCGTATGTTTATGGGTAAGTACTAGCTCTATTATTGAGTTGCTTAA CTGCGGAGTCTGCTTTTTACTGCCGTAAGTCAATTTGGTCTCAAATGGTAAAAGTTCCC CGAATTTAAAGAAAAGGAGGAGTGTAAAGTTATGTGTAATAAATGTTGCGTATGCCTAT GGTCCCTTGCTTTATTATTGAGTTGCTTCACTGGGAAGTCTGCGTA	37560 37620 37680 37740 37800 37860 37920 37980 38040 38100 38146

Fig. 4-2. Nucleotide sequence and amino acid sequence of *iturin* operon of *Bacillus amyloliquefaciens* LP03.

2) Iturin 생합성에 관여하는 단백질의 분석

*Itu IV*는 염기서열이 1.2 kb 영역의 크기로서 400 개의 아미노산을 가지는 malonyl-CoA transacylase를 암호화하는 유전자이다. malonyl-CoA transacylase는 lipopeptide의 지방산의 결합을 촉매하는 효소이다. *Itu IV*의 아미노산은 *B. subtilis* RB14의 *ituD*와 96 %, *B. subtilis* ATCC663의 *fenF*와 80 %, *B. subtilis* 168의 *fabD*와 44 %, 그리고 *B. anthracis str. Ames*의 *fabD*와 43 %의 상동성을 보였다 (Fig. 4-3).

Iturin operon은 iturin synthetase I, iturin synthetase II, iturin synthetase III의 amino acid 서열을 분석한 결과 각각 3982 a.a, 5362 a.a 그리고 2542 a.a를 암호화하는 거대한 open reading frame으로 되어 있다. NCBI BLAST를 통하여 amino acid서열을 분석한 결과 기능적인 도메인을 다수 가지고 있는 다효소 복합체로 나타나는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 4-4의 A는 1개의 AMP-binding domain, 1개의 PKS domain, 1개의 Aminotransferase domain, 3개의 Condensation domain, 그리고 4개의 PP-binding domain으로 구성되어 있는 iturin synthetase I을 나타낸다. 이것은 fatty acid와 amino acid Asn의 축합반응에 관여한다.

Fig. 4-4의 B는 4개의 AMP-binding domain, 4개의 PP-binding domain, 6개의 condensation domain으로 되어 있는 iturin synthetase II를 나타낸다. 구성 되어 있다. 이 다효소 복합체는 iturin synthetase I에 의해 생성되어진 fatty acid와 Asn의 복합체에 계속적으로 4개의 아미노산(Tyr, Asn, Gln, Pro)을 중합시키는 기능을 수행한다.

Fig. 4-4의 C는 2개의 AMP-binding domain, 2개의 condensation domain, 2개의 PP-binding domain으로 구성된 iturin synthetase III를 나타낸다. 이 다효소 복합체는 Asn과 Ser을 지금까지 형성된 복합체에 연결해서 최종적으로 iturin을 완성하게 된다.

Itu IV	MDNLAFLEFPQQGSQFVGMGKQFVNDVFLAKRLFEEASDAISLDVVKKLCFNGDHDHELTKTM	60
Itu D	MDNLAFLEFPQQGSQFVGMGKQFVNDVFLAKRLFEEASDAISLDVVKKLCFNGDHDHELTKTM	60
Fen F	MDNLAFLEFPQQGSQFVGMGKSFVNDVFLAKRLFEEASDAISHDVVKKLCFDGDMTELTRTM	60
Fab D	H SKIAFLFPQQGSQFI GMGKELYEQVPA AKRLF DEADETLETKLSSLIFE GD A EELTLTY	60
Fab D	H GKLAFLFPQQGSQAVGMGK QLAENHKEVANVF AK A DEVLQD SLSEVIFEG SQEKLTLY	60
Itu IV	HAQPAILTVSVIAFQVYMQEIGVKPRFLAGHSLGEYSALVCAGALSFQDAVTLVRQIGIL	120
Itu D	HAQPAILTVSVIAFQVYMQEIGVKPRFLAGHSLGEYSALVCAGALSFQDAVTLVREIGIL	120
Fen F	HAQPAILTVSVIA Y QVYMQEIGIKPHFLAGHSLGEYSALVCAG VL SFQ EAVKL IRQIGIL	120
Fab D	HAQP ALL TS LAVLEK F- KE SG IT PD F TAGHSLGEYSALVAAGALSF K DAV Y TVR KRGE F	119
Fab D	HAQP ALL TS- FA IL TAL KEY YD IT PD FVAGHSLGEYSALVAAGAL TF EDAV Y AVR KRGE Y	119
Itu IV	HQNADPQQQGTHAAVTHLSLQTLQEI C SKVSTEDFPAGVACHNSEQQHVISGHRQAVERV	180
Itu D	HQNADPQQQGTHAAV TL SLQTLQEI C SKVSTEDFPAGVACHNSEQQHVISGHRQAVERV	180
Fen F	HQNAD PE L Q L G THAA IT Q V Y I Q PL Q DL C TE I ST EDFP V G V A CH NS D Q Q H V IS G H R Q A VE P V	180
Fab D	H KEAV P AG F G A MA A IL G DA E AL K Q V T D K V TE E G N L V Q L A N L H C P G Q I V I S G T A K G V E L A	179
Fab D	H EEAV P G G E G A M A A IL G AD P H L K H V T E E V T E G E Y AV Q I A H D H S T K Q I V I S G T K Q G V E I A	179
Itu IV	IKMAEEKGAAYTY-LHVSAPFHSS L IRSASEQFQTVLHRYSFREAAWP I ISNV T AR P YSS	239
Itu D	IKMAEEKGAAYTY-LHVSAPFHSS H IRSASEQFQTVLHRYSP R DAAWP I ISNV T AR P YSS	239
Fen F	IK K AE R IG A J H TY-LHVSAPFHSS S HIRSASEQFQ T AL H Q Y S F R D A E W P I I SN V T A I P Y N	239
Fab D	S ELAK E NGAK R A I PL E VS G PFH S EL H K P AA E KL K E V L D A C D I K D AD V P V I S N V S A D V H T E	239
Fab D	S Q R A K E NG A K R A I P L K V S G P F H S A L H K P AA E K F Q S V L H E I T I Q D T H I P V I A N V T A D V I T S	239
Itu IV	GHSISEHLQ H HTMPVRW T ES H YLL L HGVPEV I EMGPN N VLAGLLR K T H H I V P Y P L G Q	299
Itu D	GHSISEHL K Q H HTMPVRW T ES H YLL L HGV T EV I EMGPN N VLAGLLR K T H H I V P Y P L G Q	299
Fen F	G H SV R EHL Q T H HTMPVRW A ES H YLL L HGV T EV I EMG P KN V L V G L L K K I T H H I A A Y P L G Q	299
Fab D	K AD I KE K L I E Q L Y S P V R F E S I N K L I A E G V T T F I E I G P G K V L S G L V K K V H R R L	292
Fab D	G A H I Q E K L I E Q L Y S P V L W Y P S I E Y H V N Q G V D T F I E I G P G K V L A G L M K S I D S S V K A Y A I	297
Itu IV	TSDVHLLSHSAERKKHIVRLRKKQLHKLMIQSVIARNY N KD S AAYS H M T TAL F TQ I Q E L K	359
Itu D	TSDV P PL S HS T ER K K H I V H L R K K Q L H K L M I Q S V I A R N Y N K D S AAYS T M T P L F T Q I Q E L K	359
Fen F	TSD L H L L S D S A E R H E N I V H L R K K Q L H K H I Q S I A R N Y N K D A K T Y S N L T T P L F P Q I Q L L K	359
Itu IV	ERMERHENE L SEQELEHS I HL C K L I C E A K Q L P A W E L R I L K	400
Itu D	ERM K R H E D V L SEQELEHS I HL C K L I C E A K Q L P A W E L R I L K	400
Fen F	ER V ER K E V E L S A E E LEHS I HL C Q L I C E A K Q L P T W E Q L R I L K	400

Fig. 4-3. Amino acid residue sequence comparison of ItuIV of *Bacillus amyloliquefaciens* LP03, ItuD of *B. subtilis* RB14, FenF of *B. subtilis* ATCC 6633, FabD of *B. subtilis* 168, FabD of *B. anthracis* str.Ames. (Regions of identity were not shown as shaded areas. Hyphens represent gaps introduced to optimized sequence alignments)

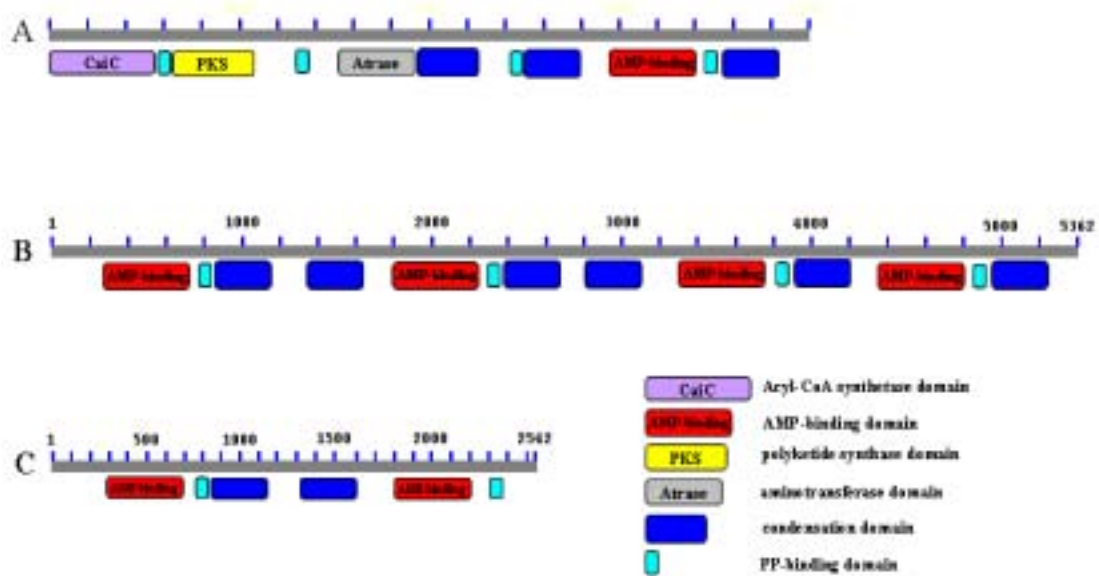


Fig. 4-4. The functional domain of Iturin operon(A, *Itu I*; B, *Itu II*; C, *Itu III*).

Fig. 4-5과 Fig. 4-6은 AMP-binding domain(Adenosine Mono-Phosphate binding)의 상동성을 비교한 그림이다. 빨간색으로 표시된 부분은 아래에서 나타내고 있는 모든 단백질 서열과 일치할 경우를 나타내고, 파란색으로 표시된 amino acid 잔기는 하나 이상의 다른 부분이 있을 경우를 나타낸다. 또한 '-'은 다른 단백질과 비교하여 amino acid에 gap이 있는 부분이다. Fig. 4-5에서 모두 일치하는 서열은 비교된 부분에서 2, 16, 21, 49, 295, 401, 564, 565, 580, 589 및 598번째의 amino acid 잔기들에서 완전히 일치하는 것을 나타내고 있다. 반면에 Fig. 4-6의 경우 AMP-binding domain 1보다 더 일치하는 서열이 많았으며, 155에서 165의 영역은 단백질 사이에 고도로 보존된 영역으로 보인다. 2개의 잔기를 제외하고, 이 영역은 모두 일치하는 영역이다.



		250	260	270	280	290	300	310	320	
	*.....*								
1P63_A	272	KQVLTHTDQVLYVAATTPKVVFDTHSD	DIYMC	TAQVGMVT	QHSYLLYDQFLACGATLHFDQ	VPA	PTP	ARMQVYV346		
ItuI	180	KQVMTLTHRLIHTCAIGTALAIHSD	SFLSNMP	LTHD	GLIACHEVFPITGIRQNLMP	EIFIR	RP	LANKA253		
gi 5915762	5701	KQVMIRORGLWYITWADRYVYQDEQI	DFALYSS	IAPD	LTVTSIFTPPLISGRVIVYRH	SQ	GEPL	IRKVF5771		
gi 37577047	1649	KQVQVSHQSAVNFNLSDQRYFLNQS	VILHKT	YSFD	ASIMELPMMPYGGASVYLLPQ	GGEK	EPDM	MILKV11720		
gi 6563400	623	KQVMVSHKGLQNLQAQIQITPQLTSDS	RYLQFAS	FSPD	ASISEILMALQSGATLYLQTK	DSL	L	PKPLIEQL694		
gi 2226245	184	KQAMLTQNLYSKANDVAGYLGMDERD	VYCALPM	CHVF	CLTVCHNAPLMSGATVLIQEQ	FS	PASV	PKLY253		
gi 2648777	231	KAVMSTHRNLYAVYQYLEWVDRTPD	VDFIVLQPY	FHSF	QNTSMNAPIANGSTIVLIQD	PRD	IKR	ILES1302		
gi 4092069	314	MELNDIKYDKLYLMSIINKVLYKNTN	ASVPSMLPVYDEM	GLI	GFCTPLPFQCNIFQMSF	IDF	IKP	YLAMQCN390		
gi 2808753	206	KQVMVSHRNLVSKLSIHLRLGHDA	DGQVSMLEPP	YDEM	GLIGDIIITPYVGGFAHLMAP	HTF	VQ	PLMLLET1279		
gi 6007550	190	KQVILTHHNILSMTAGTYVMNHFTQ	QVTLANMP	LHWGA	IVFLQIMAVDLACDQIHVPM	LVL	R	QFLQML1263		

		330	340	350	360	370	380	390	400	
	*.....*								
1P63_A	347	DKHVNIIYYTAPTAIRALMAEDGKA	LEDT	DRSSLR	ILQSVGEPINFSAMSMYMK	IGK	AKCP	VYDTM4716		
ItuI	254	HEKASILSSRFQFYVYFLKPLQV	EPD	GLSHIKVIANGAEPILPEL	CDQFLKR	CAF	RLK	RSAILWYGLA325		
gi 5915762	5772	RQKQAGIVKLTPSHLSLVKINDA	SDSSIKRL	IVGSDL	KTELAKETER	FTH	NIE	IWNYGPT5834		
gi 37577047	1721	EEQGITAMHFVPSMLHAPLRYLQV	QVPI	KTNRL	KRVFSDGDLQAEVSRFCFL	LP	DVTL	TNSYGP1788		
gi 6563400	695	SNHCITHITLPPSALAVMGSE	LSALQTI	VAGSASS	AEIIRQMSAG	RN	FPN	AYGPT751		
gi 2226245	254	KQQQATIFAGVPTMYNYLQHQND	KKD	DFSSIR	LCTSDGASMPVALLTAFEK	FD	VT	ILEYGLS318		
gi 2648777	303	QKVRASIPQSVPTMYAAIINHFQV	KKY	ILSSVK	KACISGAALPVEVKRPFEEI	TD	GL	VEYGLS367		
gi 4092069	391	DKYTCVSGAARYNFAFQYVYKTP	QILNQ	NLKHV	FAILSQAEPISKTTIDQFTEA	FK	VG	IKHWIKPAGL464		
gi 2808753	280	SRTGASTVYARNFQFQCLRRITP	QGRADL	ILSMRL	ALNQAEPISPTDLDQFAEY	FA	PQ	FR	TALLPCYGLA353	
gi 6007550	264	QKHQVSIQMSRYNFAFSLINQA	REIKWST	NLSSMK	FLVWAGQVSVKTRILEI	LE	Q	LQ	ERAIKPAPGM337	

		410	420	430	440	450	460	470	480	
	*.....*								
1P63_A	417	ETGGRPI TPLGAI	E	LKA					GSATRP440	
ItuI	326	EASVGAAPSKIQE	F	VPV	Ihrdyinligeravvskedqscas	FVEY	QGF375			
gi 5915762	5835	ETVYQCMYQYDAGM		QVS					VPIDKP5860	
gi 37577047	1789	EATVRAAFDCELE		LER					IPIDKP1813	
gi 6563400	752	EASVCATIAKCTEID		KE					ISIGKA774	
gi 2226245	319	EASEVTCRNFDRGR		KP					GSIGTS341	
gi 2648777	368	ETSEVALQNFYQLN		KE					GSIGIF390	
gi 4092069	465	EHLLIVAGSNFQGE	vhitvntkk	lrekn	ivelkeek	ksstet	TSF		YSGIIV518	
gi 2808753	354	EATLNVTVRPADEP	vvesfd	aaaleag					YGDAP402	
gi 6007550	338	ESCSGITMSAGLSK	elt						YSLQRP366	

		490	500	510	520	530	540	550	560	
	*.....*								
1P63_A	441	FFVQVPAIVDNDG	HFQEGATE	RNLVITD	QVQDARTL	PDGHER	FQDT	FSTFR	M495	
ItuI	376	IDYQCLRISDETN	ERVEDG	IIGHIQIK	DW	TQGY	NMP	PESTEK	VLTSQDMV	
gi 5915762	5861	ASNWQLYILDGRQ	EVQPV	GIAGELYISG	DQV	ARDYL	NP	PELTS	SDKFLPNFFLpg	
gi 37577047	1814	IHHVRLYILNQKQ	KMLP	ADCI	GELYIAG	ADV	ARDYL	NP	PELTS	
gi 6563400	775	IANVQVYILDQYL	QFVPI	GVF	DELHIGG	LGL	ARDYL	NP	PELTS	
gi 2226245	342	ILHVENKYVDPLG	RELPA	HQV	DELIVKQ	PVM	KD	YK	MP	
gi 2648777	391	FPDTYAVVIDQEG	KVLP	I	GEV	DELIVKQ	PQV	M	KD	
gi 4092069	519	YKGIQLRIYNPES	IKRYT	FQW	DEIMISS	ESV	T	L	Q	
gi 2808753	403	VADVEVAVYDAAT	GRV	PD	TV	AEIRVSD	PDV	ARD	Y	
gi 6007550	367	IPGATIRIVDQEN	NFL	PER	EIG	RLQIQG	NSV	T	Q	

		570	580	590	600	610
	*.....*				
1P63_A	496	YFSGD	GARR	DEDDY	MITQ	VQD
ItuI	428	-KT	GL	GF	IS	SG
gi 5915762	5918	YRT	GL	L	AM	R
gi 37577047	1871	YKT	GL	L	AM	R

```

gi 6863400 882 YKTGELARLYLPGNIEYLGRIDNQVKIRGFRIDLEGEI EELI NQHSWQAACV903
gi 2226245 392 LYTGELARRDEEDGYFYIVDGRKIDMI IVGQYNYVYFREV EEVLYSHPDVKEAVV443
gi 2648777 441 LLTGEMAKMDEEDGYFYIVDGRKIDMI IAGQYNYVYFREV EEVLYEHPAVVEAAV492
gi 4092069 582 HRTGDSQFIIN-DMLYISGRIRKIDMI IIRGRNPFYFQNI EGVIDGVSQVROGSV632
gi 2808753 462 LRTGQVGRPHD-GQLYVYGRTRKIDVI IVQGRNIHFQDVE ---QTASRY---GA506
gi 6007850 417 FTTGELGVLKSK-GLPFTTGRSKQEI IINGWNYFAHEL ETTIRKLEQVYVSYT467

```

Fig. 4-5. Amino acid residue sequence comparison of AMP-bind Domain 1.

```

          10      20      30      40      50      60      70      80
IPG3_A  109 SYRELHEDVCRFANTLLDLDIKKIDVVAIYMEVPEAAVAMLACARIQAVHESVIFGDFSPPEAVAGCIIDSSSKLYITADEL88
ItuI    2978 TYRQLNERAMRLARTLRKQVQADQFVAIICPHRIELIVGILAVLKAQBAAYVPIDEYFPEERIQYMLRDSRAEVLTQES3057
gi 511490 2569 SYQELNAKAMQLARYLROKQVQPNEMVGIHVDSLEMIYQMLGVLKAQBAAYVPIIDYFQERISYHMEQSGAALLLTQKQ2648
gi 511490 3615 TYHELNIKAMQLARYLREKQVTEPHFVAJINTERSELEMIYQIPSIILKAQBAAYVIDPAYFQERIQYILLEQSGATLLLTQSH3694
gi 6449056 250 TYRELNEKSNRLARTLRQVYQADQTLVAIHAERSELEMIYSINAIKKAQBAAYVPIDEYFPEERIQYVLDKANADVLVQHR369
gi 6449056 1800 TYRQLNERAMRLARTLRARQVQADQFVATISRNSTELVGTILAILKAQBAAYVPIDEYFQERIQYILEQSKAGIILMPSD1879
gi 5915762 5574 TYRELNEKSNQLARYLROKQVYKADTIVAIHAERSEPMVGIHQDILKAQBAAYLPIDEYFPEERIKYMLEQSGAAIILADHR5653
gi 6136084 491 TYQELMERSAQLAKALREKQIASGSIYSINAHSELEIYVAIHAVLRSQAAYLPIDYFQERIQYILLEQSQVTLTLLTQSH570
gi 3142696 28 SYRELNERAMRLARTLRSQVYTKDGLVQLMTERSIDMIYQMLGILKAQBAAYVIDENWFRQRIQYMLDQSGTELLLTQSH107
gi 6175106 54 SYQELNERKAMQLARALLEKQVQTDISIYGVNNEKSIEMVTAIILAVLKAQBAAYVPIIDYFQERIQYILEQSQTKIVLTQKS133

          90      100     110     120     130     140     150     160
IPG3_A  189 GVRAGESIFLAKKVVdIdIkopvvtswelvtvvlkrTgsddIQGQERDLMMDLIEKASPEHQFESAMNAEDFLPILYTSQST268
ItuI    3058 LLDQLP-----YDGDVYLLIDENSYHEEHNFESESDAHDLAYMIYTSQST3103
gi 511490 2649 LITQQLAFSDIILY-----LDQESMLHEASNLEPIARFQDIAYIITYTSQST2694
gi 511490 3695 VLNKLPYDIEMLD-----LITDQNYVEDGTNLFPNQSTDLAYIITYTSQST3740
gi 6449056 370 FRKSLVFDQPMID-----LNDGTSYHADCSLLSPIARHSHLAYVIYTSQST4415
gi 6449056 1880 YRQQTITTEQVIL-----LDESSSYHEEAPNLEPLSNANHLAYVIYTSQST1925
gi 5915762 5654 QDLQTLHSEAVE-----LTDGESSYPADNLEPAGNADSLAYIITYTSQST5697
gi 6136084 571 LDFMLRFAGSVILY-----LDQESLYEDQSTSFAPESKFDOLAYMIYTSQST6116
gi 3142696 108 LVKQVAFDGHMLVL-----DGAQSVYHEDGSNLESLSGPNDLAYVIYTSQST1154
gi 6175106 134 VSQLVHEDVQVSGEVY-----VLDEQQLDARETANLHQPSPKPTDLAYVIYTSQST1182

          170     180     190     200     210     220     230     240
IPG3_A  269 GKPKQVLTHTTGQYLVAATTFKYVFDYHPG-DIYNCTAqVGMVTDHSHYLLYQFLACQATTLMFEDVFMpTPARMCOVVD347
ItuI    3104 GKPKQVLIIEHQGLADYIMMAKEVYVROEKT-NPFLYSS-ISEFDLTVTSIPTPLVTQNTIIVFDGEEK-SAVLSEIM63177
gi 511490 2695 GKPKQVMIEHQSYVNYANAMKDAYRLOTFP-VLLQMAS-FAFDVSAQDFARALLTQKQLIVCPNEVka-DPASLYAIIK2771
gi 511490 3741 GKPKQVMIEHQSIINCLQMRKEEYEFQFGD-TALQVFS-FAFDQFVASLFPAPILAGATSVLPKREKak-DEVALKXLIa3816
gi 6449056 416 GKPKQVMVEHQGIVNSLQMRKAPFKHSAED-RYLVLYP-YVFDAPFILNFPQELISQAALYLLFNEDnk-DLFAIQVYLK491
gi 6449056 1925 GKPKQVLIIEHQGLSNYIMMAKEVYVKNEXT-NPFLYSS-ISEFDLTVTSIPTPLVTQNTIIVFDGEEK-TALLSSIYQ1999
gi 5915762 5698 GKPKQVMIRORGLVNYITMADEVYVQGEQI-DFALYSS-IAFDLTVTSIPTPLISQNRVIYVPSSEd-GEPLIRKVF65772
gi 6136084 617 GKPKQAMITHQGLVNYIMMAKVVYQGEAv-DFPLYSS-ISEFDLTVTSIPTPLLSQNTIHVYRQADK---YQVILDIK690
gi 3142696 155 GQPKQVMLESHHQLGNLKTYPFEPFKISTLD-HMLLFAS-YSEFDAAMEIIPQALFQDAILVYPTSETIId-DYERFQYMA230
gi 6175106 183 GKPKQTMLEHQDIANLQSFQNSFQVTEQD-RIDLFAS-MKFDASVMEMFMALLSQASLYILSKOTId-DFAFBHYLS258

          250     260     270     280     290     300     310     320
IPG3_A  348 KHQVNYLYTAPTAIRALMAEDDKadEGTDFSSLRILQSYDEPIINPEAMENYMKKI-DkaKCPVYDTMWDTEQDQPMITPL426
ItuI    3178 DSRIDMIKLTPAHLHVIKENNIa-GD---TAIRKMIYQGENLSTRLAKSVSEDFkD-RLDIFNEYQPTFAVVOCHMIYH3250
gi 511490 2772 KYDITIFEATPALVIPLNEYIYE-QKLDISQIQILIVQSDCSMEDFKILVSRF-Gs-TIRIVNSYVYTEACIDESSYTE2847
gi 511490 3817 SEETIHYYGVPSLPSAILDWSS---SKLDQNLRCVYTLGQKLPAAQIVKXIKKXN-K-EIEVMNEYQPTENSVVTTIM63889
gi 6449056 492 LERITHFSTSPRLQAMTEQMN---AEIDFYHQVYVQGRKLEPDVLERLFSIQ-P-QIRINNEYQPTENSVVSTPQF564
gi 6449056 2000 DQRYDIIKLTPAHLHYLKAMNI---ANKIAIRKMIYQGENLSTQLAQSTHEDF-Dg-QIEICNEYQPTETVYVQMLY62072

```

```

gi 5915762 5773 DQKAGIVKLTFSHLSLKVMDA-----SSSSIKRLIVGGEDLKTDLAKEITERF-Hh-NIEIYNEYGPTEVVGCMIIYQ5844
gi 6136084 691  DNKVGIIKLTPTHLKLIKHIDG-----KASSIRRFIVGDENLPTKLAKQIYDHF-De-NVQIFNEYGPTETVVGCMIIYL762
gi 3142696 231  DHHITVAALPFTYAVYLEPOR-----NEWLRILVYTAGSAASTELYVKMKD-----QVAYFYNGYQPTENSVATSIMF236
gi 6175106 259  ENELTIIITLFPYTLTHLTPER-----ITSLRIMITAGSASSAPLVKMKD-----KLYYINAYQPTETSICATIME324

          330      340      350      360      370      380      390      400
IPG3_A    427  PQA-IE--LKASATRFPPFVQPALVNEGRHFGDQATEKINLVITDdePDQARTLFDGHERFQCTVYFSTFK--N--494
ItuI      3251  FDAveDK--REFVPIGTAAANTDIYVADASSNEVPIGVIGELIYISG--PQVARGVMNRPDLTAEKPFVENEYvpggK--3322
gi 511490 2848  QPL--SSIIhwTGTVPIDKPYANMKMYIMNQYLQIQPVVIGELCIGG--ADVARGVLRNPDLTAEKPFVNEF--Vpg-2918
gi 511490 3890  DIQ--VE--QEITIGCPVSNVDVYIVNCHQQLQPVVIGELCIGG--DGLARGVLRNPDLTAEKPFVNEF--Vpg-3056
gi 6449056 565  VYS--AD--EQITIGKPVANHQAYILGAHRQIQPIGVPGELIYVGG--SGVARGVLRNPDLTAEKPFVDHLL--Ipr-631
gi 6449056 2073  YDA--VKd-rRESVPIGTAAAMTSIYVLDGDMKFPVIGVPGEMYISG--ADVARGVLRNPDLTAEKPFVENEY--Vtg-2142
gi 5915762 5845  YDA--GMd-rQVSVPIGKPSWQELYILDGRQEVQVGIAGELIYISG--DQVARGVLRNPDLTAEKFLPNEF--Lpg-5914
gi 6136084 763  YDE--QTt-tQESVPIGVPADWQVLYLLDASHQFVPGSLGEMYIAG--DQVARGVLRNPDLTAEKFDNEF--Rpg-832
gi 3142696 297  VSK--DEr-aQQLISIGKPFVNRHYVMDVHHLAPIGVAGELCYSG--PGLARGVLRNPDLTAEKPFVNEF--Page367
gi 6175106 325  APS--NQL-sVQSVPIGKPIQNTHIYIVNEDLQLLPTSSGELCIGG--VGLARGVMNRPDLTAEKPFVNEF--Vpg-394

          410      420      430      440      450
IPG3_A    495  ---MYPSDQGARSDGQYMITGSDVDVLRNVShHRLOTAEIESALVAHKIAEAAY547
ItuI      3323  ---MYKSDQDLAKRLKDNLYYIQRVDEQVKIRhHRIELGEIEAAMHNAAVOKAAV3375
gi 511490 2919  --ekLYRTQDLARMPDQWVEFLGRNDHGVKIRhRIELGEIEAQLRKHDSIKEATV2973
gi 511490 3957  --erMYKTQDLAKMSSDGNIEYVGRVDEQVKVRhYRIELGEIESAILEYEKIKEAVV4011
gi 6449056 632  --rkMYKTQDLAKMSPDGRIEYLGRIDHGVKIRhYRIELGEIEAALSNELEEVRETTV686
gi 6449056 2143  --erMYKTQDLAKMLPDGNIEYLRGRMDEQVKIRhFRIELGEIETAMLQASEIKEAVV2197
gi 5915762 5915  --erMYRTQDLAKMSPDGHIEYLGRIDHGVKIRhYRIELGEIEHQLLRHSDIKEAAV5969
gi 6136084 833  --tkMYRTQDLAKMLPDGMETAGSMHYGVKIRhHRIEHDEIETRLTQHEAVKEAVV887
gi 3142696 368  agyeRYRTQDLARMPDGNIEYLGRIDHGVKIRhYRIELGEIEAQILKVEDVQEVIV424
gi 6175106 305  --ekMYRTQDLAKMLTDTTIEFLGRIDHGVKIRhHRIELGEIESVLLAHEHITRAVV449

```

Fig. 4-6. Amino acid residue sequence comparison of AMP-binding Domain 2.

Fig. 4-7는 PKS(polyketide synthases) domain과 상동성을 나타내고 있다. PKS는 Claisen 축합을 성공적인 decarboxylating에 의해 polyketides로 불리는 다양한 다른 산물에 간단한 fatty acids를 중합한다. Lipopeptide, iturin에서 fatty acid 부분의 중합에 관여하는 Domain으로 생각되어진다. 또한 PKSs는 하나 또는 그 이상의 큰 multi functional protein들로 구성되는 modular type I PKSs와 몇 가지 monofunctional subunit들의 복합체인 반복되는 type II PKSs 두 그룹으로 구분할 수 있다.

PKS domain에서 비교된 서열에서 active site는 187, 333 그리고 380에 있는 Gly, His 그리고 His으로 모든 단백질에서 잘 보존되어있는 것을 확인할 수 있다.



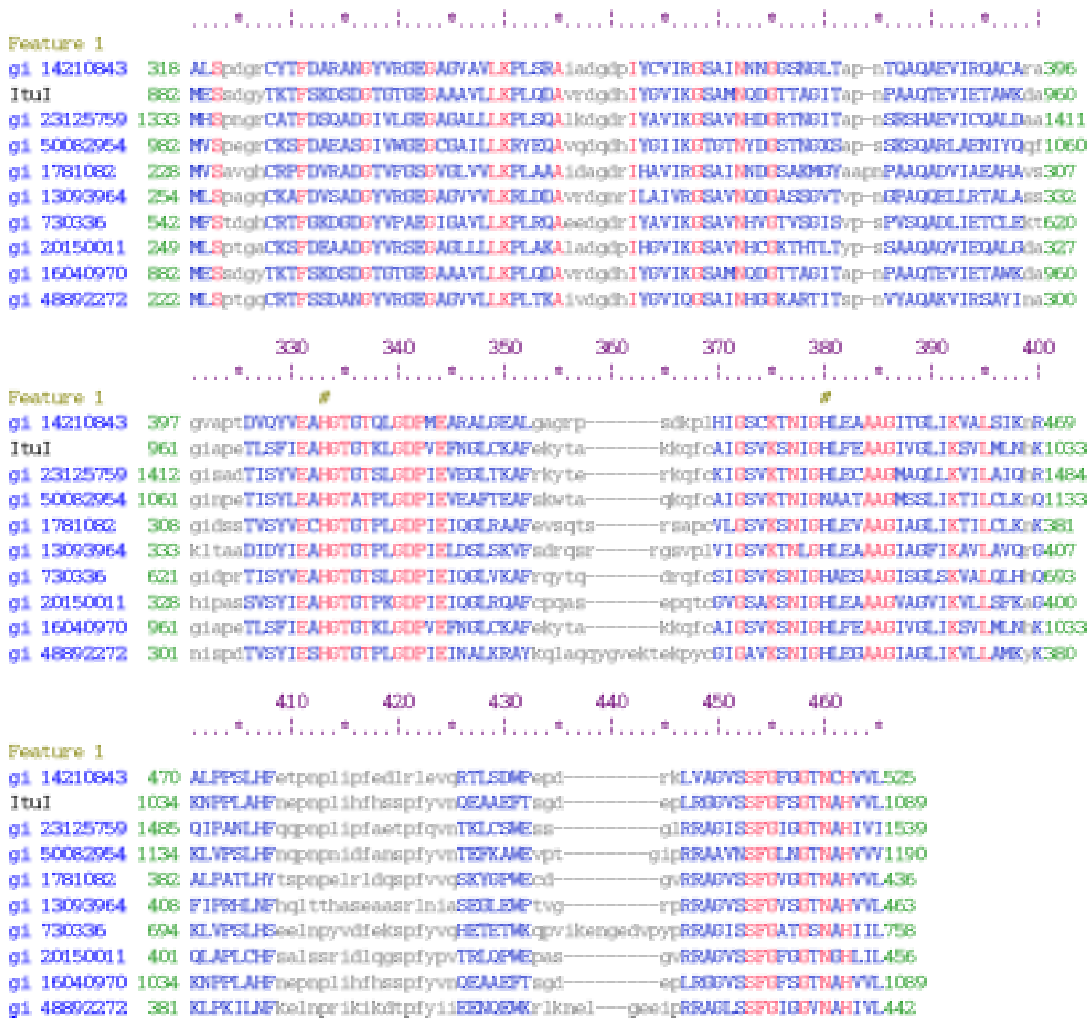


Fig. 4-7. Amino acid residue sequence comparison of PKS Domain.

Fig. 4-8은 Aminotransferase domain의 상동성을 비교한 것을 나타내고 있다. 이 Domain은 Iturin에서 첫 번째 amino acid인 Asn을 전달하는 기능을 가진 도메인으로 생각되어진다. *Itu I*은 하나의 Aminotransferase의 domain을 가지고 있으며, Asn만을 옮겨주는 역할을 한다.



```

gi 1170030 241 TADHGALLIIDEVMTGF-RVSRSQMYGLDPVAADLFFGKVMSSGGnp-aAAFGG-AQVMhRE-----AFLGpry307
gi 1170028 276 TRDNGVLLIFDEVMTGF-RLAYGGAGEYFGITEPLDTLTLKIKIIGGGIp-vGAYGG-EDIMhMV-----APAGpny342

           330       340       350       360       370       380       390       400
           ..*....l...*.....l...*.....l...*.....l...*.....l...*.....l...*.....l...
IDGD      299 F--- YTTIYSDPLPAAVGLRYLDVYQGG---LVARAVYMGDRLSSGLLDLMEHFDCIGDVRGGGLLDLQVEIYKDESt370
ItuI      1805 EkrtfVAGTFFMTHFLTMRESLAVLRHLQTEGLLYEQLNOKTAYLVDELNRCFEDQAQVPIRMVRFQSLFRFVSSLDND-1883
gi 267498 306 H--- GTTFQGNPIACSAALATLDVLKEEN---LIDNAREVQAYASERLNLKREYEMIGSIRSVOLMIGIEIID-Pqt376
gi 120779 294 L--- GSTYAGNPFIACVAALEVLYKVFQEN---LLOKANDLQQLKDLGLLAAKHPFEIGDVRGLGAMIAIELFDGGh385
gi 1168492 281 H--- GSTYQGNPLACAVAGAAFDIINTPE---YLEGIQAKRQRFVDHLQKIDGQYDVFSDIRGNOLLIGAEIKPQYhk382
gi 543846 283 H--- GTTFQGNMLANAAVNAIQIVFOFD---FLQSAADKQAFLKEGLEA-ELKSPFYKQIRGKRLMLGIBCTDP---330
gi 1175339 312 H--- TGTFRGNQLAMATGVASLKIHRDEN---LAQNAQSRGSEYLTVALRELSEYFPCIGDVRGGRLMNGIIVDERqa383
gi 730217 285 H--- GSTTFQGNPLACAVSIASLEVLEDEK---LADRSLELGEYFKSELESID--SEVIKRVRGKGLFIQVELTEA---361
gi 1170030 308 Q--- AGTLSQNPVAMAGLATLRAAADAV---Y-ATLDRNADRLVAMLSEALTDAGVPHQIPRAGRNFSVFFSEAPvt378
gi 1170028 343 Q--- AGTLSQNPLAMTAGIHTLKRLKQAG---TYEYLDKIKELTNGILEAGKKTGHPKQGYISOMFGFFFARpy414

           410       420       430       440       450       460       470
           ..*....l...*.....l...*.....l...*.....l...*.....l...*.....l...
IDGD      371 kep--- adgLGAKITRECHNLELsnnivQLPQh---G-DVFRIAPFLTVSDEIDIGLESLLGQAIERAL432
ItuI      1884 ---L---FFYHLNYKGV---YVMEG---RnCFLSVA---HTADDIENIIGAVKDTVEDLR1928
gi 267498 377 kk--- pdgaAVLRIILDLAGQGV---LFIYLCgnEgEVIRMIPELSVTRKQIDGGDLMLGALVKYk436
gi 120779 366 nk--- pdakLTAEIVARARDKGL---ILLSCgpYhNVLRIIVPLTIEDAQIRGGLEIISQCFDEAK425
gi 1168492 353 ---rARDFLYAGAEAVY---MVLSA---GpDVMRFAPSLVYEDADIDEGNORSFAHVAKV404
gi 543846 331 ---YADIIAELOTLQL---LVLPA---GpERDGAAPLVTRKDEIAEAVSRLKQAIAHHC381
gi 1175339 384 kdatsgayprdosLAAAIQKACFRNKL---LLERDgrGqNVVRYLCAVNIQSECEEFIKRFKQSVVDAL449
gi 730217 362 ---ASFYCERLKEEGL---LCKET---HITVIRFAPELIISKEDLDMAIEKIKHVLRMA-401
gi 1170030 379 dfasa-cnsqvrYPAFFHALLDAYypp---csTFEAMFYSAALDDAAAFRIVDALFGAAAAAV439
gi 1170028 415 nfads-kksdteKFGFFFRMLEEVYfa---psQFEAMFTSLAHTPEDIQLTIAAAERYLSRI-474

```

Fig. 4-8. Amino acid residue sequence comparison of Aminotranferase Domain.

Fig. 4-9, Fig. 4-10 그리고 Fig. 4-11는 Condensation domain의 상동성을 나타낸 것이다. 이 domain은 주로 peptide antibiotics을 하성하는 multi-domain enzyme들에 주로 발견된다. 이 domain은 non-ribosomal peptide 생합성에 peptide 결합 형성에 촉합반응을 촉매한다. 보통 phosphopantetheine binding domain의 carboxy side에 발견된다. HHXXXDG motif 부분에 돌연변이는 active site의 부분으로 제안되는 활성이 파괴된 것을 보여준다. Fig. 4-9는 149 ~ 155 부분에 HHIADG의 서열을 확인할 수 있었고, Fig. 4-10은 141 ~ 147 부분에 HHIISDG 그리고 Fig. 4-11는 141~147 부분에 HHIISDG의 motif를 확인할 수 있었다. Fig. 4-10과 Fig. 4-11에 두 번째, 세 번째 domain은 상당히 유사한 것을 확인할 수 있었다.



```

      250      260      270      280      290      300      310      320
.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....
gi 24212667 1262 SFEDRQVSIKLDIAQVGRDLNRLASQNGATLYVMVLSAYVITLLSKYTGQDDIIVGTFSAQRNH—SDTEGIIDMFVNTLAI1339
ItuI      2168 GVEDRQCTVRLGRPLSEALRSLSTQMRKSVFVTVMLGARHLFLHQLTKQSGLYIGIPAAQDSH—MKQHDLTQNCYVMIPV2245
gi 24212667 2302 TFDQRRTAFPSLEAGKADALRRLAKETDSTLYMVLASYSAPLRSKTCQDDIIVGTFPAQRSD—ADVSRVTDMFVNTLAI2379
gi 113316   2160 DYRQRRELEFELDERITTEALRRLARTARVSLYSVLLGAMCLMLNMYTQGHDLVVGTFSAQRDQ—PEFDRAWQFFANILLAL2237
gi 113317   2213 KYDQDDLSIELSKKETENELRGVAKRCKSSLYVVLVSVYCVMLASYANGSDVSVGIPVSRKTH—PQFQSVIGDFVNLVVL2290
gi 232186   2301 SFQRDITVTFSAQRKLAELKRLAACTGTTLYMLLLAAVNVLLHKYSQDQEVVGTFPAQRSH—ADVENIIDMFVNTLAI2378
gi 730367   1260 DFRQDTIEVNIIDKDMADGLHRLMAETGTTLYMILLAVYSILLSKLSQDDIVVQSPAQRSPH—ADLERYIDMFVNTLAI1337
gi 3041735 1258 SFQRDITVTFSAQRKLAELKRLAACTGTTLYMILLAVYSILLSKLSQDDIVVQSPAQRSPH—ADLERYIDMFVNTLAI1335
gi 3041735 2304 SFQRDITIRFRTOSETAKAVEKLLAETGTTLHMVLLHAVHFVFLSKISQDDIVIGSVTAQRTH—ADVDQDMDFMFVNTLAI2381
gi 730329   225  GVEPKELFPLSEARTKAPTELAKSGHTTLLSTALQAVNSVLSRYQCSDELAFQTVYSRPAedKQVEHMLDFINVVS304

```

Fig. 4-9. Amino acid residue sequence comparison of condensation Domain 1.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....
gi 730366 1048 KQDTYFVSSAKRMFYVLLQ—LEDQDTSYNMPAVLLELDKLN—PEKMEAFKELIKRHE—SLRTSFQDAGQDFVQRI1121
ItuI      2503 KkaYFVTFSPAQGRVIFLHQ—LEPDQLAQNMFGHSITGRKYD—EQALISSLQGVNORHE—AFRTYFDIIDG—DIVQRI2575
gi 24212667 1058 KQEHYFL—H—MEESSEHSSASSRMRESAITHASSENSE—GFVYSKAGARISQINEtpcVLETSPVLENS—TFPQRI1128
gi 24212667 2095 KQDTYFVSSAKRMFYVLLQ—LEDQAQTSYNMPAVLRLTQELD—VERLNSVMOQLMORHE—ALRTTFEIKDG—ETVQRI2167
gi 232186 3140 QDYYFVSSAKRMFYVNO—FVVGDISYNMPSIMLEIDKLE—RTRELSAFKRLIERHE—SLRTSFEIING—KPVQRI3212
gi 232186 2094 FTQYFVSSAKRMFYIILE—FEDAGITTYVYVYMFTEIDKLD—YQRFYAIRKSLVNRHE—ALRTSFYSLNG—EPVQRI2166
gi 232186 1058 EDQYFVSSAKRMFYLINE—FDRSGTAYNLPVNMFLDKLN—YRQLEAAVKKLVNRHE—ALRTSFHSING—EPVQRI1130
gi 730367 1052 QRDYFVPLSFSQKRLYALHQ—LADQSTQYMPAVLLELDKLN—RQRLESVLTELVNRHE—ALRTVFVLDQD—EPVQI11124
gi 3041735 1054 YQGHYFVSPAQGRVYILNQ—LQDQNTSYVYVAVLLELDQVD—KDRLENAIQQLNRHE—ILRTSFDMDG—EPVQTV1126
gi 3041735 2098 KQDMYFVSSAKRMFYVLLQ—LDROTISYNMPSVLLMEQELDtwPAKLT—POLVNRHE—SLRTSFEANG—EPVQRI2169

```

```

      90      100      110      120      130      140      150      160
.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....
gi 730366 1122 HDVYFPTLQTTVLD—ERTDQEAAAAFIKPFDLSQAPLFRAGIVKISDERHLLVDMHIISDQVSNVILRSPQEL1196
ItuI      2576 EDVYDFVtwr—tmsRDEFDIAYSDFVYKFDLQDAFLYRABLTKIENEQAEILLDMHIISDQVSNVILRSLAL2650
gi 24212667 1129 HVCY—DFNITENIer—gRRSDEAINASFVYRFDLAKAPLFRIGLLGLRGRHMLLDMHIISDQVSIIGMLEELARI1203
gi 24212667 2168 MEEARCEIAYFEAP—ESETERIYSEFIKPFKIDQLPLFRIGLIRKSDTQVLLFDMMHIISDQAVVVLIERLSKI2242
gi 232186 3213 HEDVDNMYQYVAS—NEQVEKMIDEFIQPFDLSVAPLLRVELLKLEDRHVLIFDMHIISDQISSNIMKLEDEL3287
gi 232186 2167 HGVVLEQIAYSEAK—EDIEIQIYVESFVQPFDEIAFLLRVGLVKLASDRYFLDMHIISDQVSMOITREIADL2241
gi 232186 1131 HGVVLEQIAYSEST—EDIQVERITAEFMOFFALEVRFLLRVGLVKLASDRHFLDMHIISDQVSMOIMIQEIAIDL1205
gi 730367 1125 YFENAFDLKELMES—EQMLESAIETFIKPFYLSQPLFRACVITMGRNRGPELLDMHIISDQVSMSTLVQEPTEL1200
gi 3041735 1127 H-KN—ISPHLEawkgrESDASEIKAFVQPFELNRAFLVRSKLVQLEEKRHLLIDMHIITDQSTGILIGDLAKI1201
gi 3041735 2170 IEKAEVDLHYFEAK—EDEADQIKKFIRPFDLNDAFLIRAALLRIEAKRHLLIDMHIISDQVSRGIFVKELALL2244

```

```

      170      180      190      200      210      220      230      240
.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....*.....
gi 730366 1197 YNNEKLPALRIQYKDYAVMGRQPKTDAYKTQSEAYMLKQLRQELPVLDELPADHARFVRSFADEKVSFTLDQE—VASRI273
ItuI      2651 YHQKcLPTIEFYKDFARQNRQRLNDQAKRQETVMLEDFQDEIPVLDELPTDQSKAERSSESDQRVYCSLQPD—VIRSS2727
gi 24212667 1204 YRQDELPLRLIQYKDYAVMGRQAAEQ—YKQDQAYMKRYFADELPLVLELLSDVPSFVYQSFEDRQVSIKLDAG—VKDR1279
gi 24212667 2243 YDGETLEPLRIQYKDYAVMGRHFTSSELYKQKQSEHMLKELDQELPVLTLPTDYSRPVAVQTFEDRIAPSLEAG—KADA2319
gi 232186 3288 YQGNALPELRIQYKDFAVMGRNEMFQSEAFKQSEYMWYVADERPILDIPTDVPSEMQSEFDGAQLTPTGRQ—LMDG3364
gi 232186 2242 YRKEKELABLHIQYKDFAVMGRNEMFQSDALEKQKTYMLNTFAEDIPVNLSTDVPSETIOSFEDDITVTFSAQRK—LASE2318
gi 232186 1206 YRKEKELPLTGIQYKDFVMHNLLQSDVTEKQSEASLAERICRSDSESTDRLPK—YQFPKALMVKDLHSVQessLMMI1263
gi 730367 1201 YQKDELPALMLHYKDFAVMGRQEKHKELYKQSEAYMLDQLQSSLPVLELPLDKTRFPLDFRQDTIEVNIIDK—MADE1277
gi 3041735 1202 YQGADLELPQIHYKDYAVMGRQUTWY—QKDEEYMLDVFQDELPLDELPADFERAERSFADEYVMFQLDKQ—ITAQ1275
gi 3041735 2245 YRQDELPEPTLHYKDFAVMGRNEMFQSEAFKQSEYMWYVADERPILDELPLDYAKFVQSEFRQDTIRFRTOSE—TAKA2321

```

		250	260	270	280	290	300
gi_730366	1274	LHRLAREKSTLYWVLLAAYTAF	LRRLSDQED	I	VQSP	IAGRRPHKIDLEP	IIGHPVWTLALRTRPEL338
Itu1	2728	LDLDAQKATLTYVLLAAYWVLL	LHKYTSQED	I	VQTP	ASGRNHpdiek1ig1fiqt1girtkph2792	
gi_24212667	1280	LHRLAQRGATLYWVLLSAYTTL	SKYTSQED	I	VQTP	ASGRNHSDTEGI	IIGHPVWTLAIRSEVK1344
gi_24212667	2320	LRRLAKETDSTLYWVLLASYSAF	LKTCSDQED	I	VQSP	YAGRRSDADVSKV	IIGHPVWTLALRTRYP2384
gi_232186	3365	LRYVATETDSTLYWVLLAAYWVLL	SKYTSQED	I	VQTP	IYGRSHTDLENI	IIGHPVWTLANKRPF3429
gi_232186	2319	LKRLAAETDSTLYWVLLAAYWVLL	LHKYTSQED	I	VQTP	IAGRRSHADVENI	IIGHPVWTLALKQYTP12383
gi_232186	1284	YTRMQQRGQGHYIMFYLLRIMF	LKSYTSQED	I	VQTP	IAGRRSHADVENML	IIGHPVWTLAIRSELN1348
gi_730367	1278	LHRLAETDSTLYWVLLAAYTTL	LKLSQED	I	VQSP	AAGRRPHADLESY	IIGHPVWTLANKRPF1342
gi_3041735	1276	IKSLMAETDSTLYWVLLAAYWVLL	SKYASQED	I	VQSP	TAGRRTHFDLQVPGHP	IIGHPVWTLALRTRAP1340
gi_3041735	2322	VEKLLAETDSTLYWVLLAAYWVLL	SKTSQED	I	VQSP	TAGRRTHADVQEMPGHP	IIGHPVWTLALRTRAP2386

Fig. 4-10. Amino acid residue sequence comparison of condensation Domain 2.

		10	20	30	40	50	60	70	80
gi_730366	1048	KDQTYFVSSAQRRI	YVLLQ	LEDAQTSY	NMPAVLLE	EDKLN	PERMERAF	KELIKRHE	SLRTS
Itu1	3540	eeqYFVSSAQRRI	YVLLSH	TEDEGL	TYNMTGAMK	VEQTD	ID	PERLNAAF	KRLIARHE
gi_24212667	1058	KDGHVPL	H	MHESch	ISSASSRMR	ESA	I	HASSENSE	GFVYSKAGART
gi_24212667	2095	KDQTYFVSSAQRRI	YVLLQ	LEDAQTSY	NMPAVLRL	TGELD	VERKLN	SVHQDL	MORHE
gi_232186	3140	GDQTYFVSSAQRRI	YVLLQ	LEDAQTSY	NMPAVL	LEKLE	RTRKLSAF	KRLIERHE	SLRTS
gi_232186	2094	PTDQTYFVSSAQRRI	YVLLQ	LEDAQTSY	NMPAVL	LEKLE	YORFETA	IKSLVNRHE	ALRTS
gi_232186	1058	EDQTYFVSSAQRRI	YVLLQ	LEDAQTSY	NMPAVL	LEKLE	YORFETA	IKSLVNRHE	ALRTS
gi_730367	1052	QRDQTYFVSSAQRRI	YVLLQ	LEDAQTSY	NMPAVL	LEKLE	YORFETA	IKSLVNRHE	ALRTS
gi_3041735	1054	YDQTYFVSSAQRRI	YVLLQ	LEDAQTSY	NMPAVL	LEKLE	YORFETA	IKSLVNRHE	ALRTS
gi_3041735	2098	KDQTYFVSSAQRRI	YVLLQ	LEDAQTSY	NMPAVL	LEKLE	YORFETA	IKSLVNRHE	ALRTS

		90	100	110	120	130	140	150	160
gi_730366	1122	HDEVPFTLQTTVLD	ERTDEQ	AAAAAF	IKPFDLSQA	PLFRAQ	IVKISDER	HLLVDMHI	ISDGV
Itu1	3613	HQNVFTLQTTVLD	ERTDEQ	AAAAAF	IKPFDLSQA	PLFRAQ	IVKISDER	HLLVDMHI	ISDGV
gi_24212667	1129	HVCY	DFNIEMI	GRSSDE	AIMAS	FVRTFL	DLAKAP	PLFRIGL	IGLEERN
gi_24212667	2168	MEBACEI	AYFEAP	EEETERI	VSEF	IKPFI	LDQL	PLFRIGL	IKHSOTE
gi_232186	3213	HEEYDFM	SYOVAS	NEQVEK	MIDEF	I	QPF	DL	SVAP
gi_232186	2167	HQNVELQI	AYSEAK	EDIEIQ	IVES	FYQPF	DL	EIA	PLRVGL
gi_232186	1131	HQNVELQI	AYSEST	EDQVERI	I	AEP	NO	F	AL
gi_730367	1125	YFEMAF	IKLEME	EDMLESA	I	ET	F	IKP	F
gi_3041735	1127	H-KN	ISPHLE	aaakgr	EDDAEEI	IKAP	YQ	PE	LN
gi_3041735	2170	IEKAEV	DLHVFEAK	EDEADQ	IKREF	IRP	FD	LN	DA

		170	180	190	200	210	220	230	240
gi_730366	1197	YNNKLP	PALRIQ	YKDI	AVM	RSDF	KTD	DAV	KT
Itu1	3688	YEQNE	PLSLIQ	YKDI	AVM	RSDF	KTD	DAV	KT
gi_24212667	1204	YKDEDL	PLRLQ	YKDI	AVM	RSDF	KTD	DAV	KT
gi_24212667	2243	YDGETL	PLRIQ	YKDI	AVM	RSDF	KTD	DAV	KT
gi_232186	3288	YGRNAL	PELRIQ	YKDI	AVM	RSDF	KTD	DAV	KT
gi_232186	2242	YKIKEL	ABELHIQ	YKDI	AVM	RSDF	KTD	DAV	KT
gi_232186	1206	YKIKEL	PTLGIQ	YKDI	AVM	RSDF	KTD	DAV	KT
gi_730367	1201	YQKEL	PALNLH	YKDI	AVM	RSDF	KTD	DAV	KT
gi_3041735	1202	YQADL	ELPQIH	YKDI	AVM	RSDF	KTD	DAV	KT
gi_3041735	2245	YKDEDL	PEPTLH	YKDI	AVM	RSDF	KTD	DAV	KT

		250	260	270	280	290	300
	******
gi 730366	1274	LHRLARENDSTLYNVLAAAYTAFLSKLSGQEDI	IYGSPVAGSPTKQLEPILGMEFVNTLALRTRPE	I1338			
ItuI	3765	LSQMEEDTGAATLYMILLAAAYTILSKYSQEDI	IYGTSPSAGEHEDVYEPVYGMFVNTLYIRNHP	3829			
gi 24212667	1280	LNLAEONGATLYNVMLSAYYTLISKYTGQDDI	IYGTSPSAGEHSDTEGIIIGMEFVNTLAIRSEVK	1344			
gi 24212667	2320	LRLAKETDSTLYNVLASYSATLSKIIGQDDI	IYGSPPVAGSQAQVSRVIGMEFVNTLALRTPK	2384			
gi 232186	3365	LYRVATETDTTLYNVLAAAYVWLSKYSQEDI	IYGTPIVGRSHDLENIYGMFVNTLAMRNKPE	3429			
gi 232186	2319	LKRLAAETDTTLYNMLLAAAYVWLSKYSQEEI	IYGTPIAGSADVENIYGMFVNTLALKNTPI	2383			
gi 232186	1284	YTRNQDQEQHYIMFYLLRIMFFLSKYSQDDI	IYGTPIAGSADVENMIGMEFVNTLAIRSELN	1348			
gi 730367	1278	LHRLAETDTTLYNMLLAVYSILSKLSGQEDI	IYGSPPVAGSPTKQLEPILGMEFVNTLAMRSKPE	1342			
gi 3041735	1276	LKSLAETDTTMYNMLLAAAFVWLSKYSQDDI	IYGSPTAGSPTKQLEPILGMEFVNTGALRTAPA	1340			
gi 3041735	2322	VEKLLAETDTTLYNMLHAVFHWLSKISQDDI	IYGSPTAGSPTKQLEPILGMEFVNTLALRMEAK	2386			

Fig. 4-11. Amino acid residue sequence comparison of condensation Domain 3.

Fig. 4-12는 PP-bing domain의 상동성을 나타낸 것이다. PP-bing domain은 phosphopantetheine 부착 부위이다. 4'-phosphopantetheine prosthetic group은 Ser(세린)을 통하여 부착한다. 이 prosthetic group은 활성화된 fatty acid와 amino-acid group의 부착을 위한 'swinging arm'으로써 활동한다. 이 domain은 4개의 helix bundle을 형성한다. 부착부위 Ser(세린)은 어떤 그룹에서는 Ala으로 대체되어 있다. Fig. 4-12 (A, B, C, 그리고 D)는 32번째 부위에 Ser이 잘 보전된 것을 확인할 수 있다.

		10	20	30	40	50	60	70
	*******
1DWS_A	7	NOVLDILADLTGSDVYKKNLDELNLF	GLLDSMGTVQLLLELQSQFGVDAPYSEFD	kEMDTENKI	IAKY76			
ItuI	584	TELLSIFSEVLN--GRKVLADSYFD--MGAN	SLQLSQAERIEOKFDRRLAVSDLF--	TYPSITDLAAV	L648			
gi 6226680	1766	QGLRRIIAEELRYPEKELDTRDFAE--LGLN	SLMAMAIRREAEQFVGIELSATMLF--	NHPTVKS	LASYL1832			
gi 730335	1065	DYVPTIMQEVKTS--DIEMDGEFFD--YGG	ELLAVTVADRIRKHEISCEPSYTDLF--	EYSTIKN	ISQVI1129			
gi 730335	3870	SMILDLPTSELRIDREDFEIDGLFQD--YVD	SIILAQVLRIRNKLEAALDPSILY--	EYPTIQR	FADML3936			
gi 232186	2014	NKLAEIMHNYLGVN--KIGVLDNEFE--LGG	SLRAMTHISQVHKEFDVELFLKVLF--	ETPTISA	LAQVI2078			
gi 24212667	3046	ELLAGIMQDVLGMS--EVGVINFFS--LGG	SLIKGIQMASRELNGH--GMKLEMKDLN--	QFTIEEL	TQVY3109			
gi 24212667	978	KATAAIMQDVLNVE--KAGIFDNFFS--TGG	SLKAMTLTKIKETGIEIQQQLF--	ETPTISA	LAERA1042			
gi 24212667	2015	QKVADIMAOVLQAE--QVGVYDHEFD--IGG	SLAGMKMALVHDELQVELSLKDLF--	QPTVEEL	LAQVI2079			
gi 730367	972	ADLAHIMEDVLRKQ--HIGIRDQFFQ--LGG	SLKAAALVSRIRKILNVELFLSEVF--	SYPTVES	MAVKL1036			

A

		10	20	30	40	50	60	70
	*******
1DWS_A	7	NOVLDILADLTGSDVYKKNLDELNLF	GLLDSMGTVQLLLELQSQFGVDAPYSEFD	kEMDT--	PNKII	IAKY76		
ItuI	1293	ELKTVISNASGIRAEKLDLNAHFID--LGM	SLMISQVKKALADEFGVDIFMDRFF--	DTLTHLQ	SVIDYL1360			
1LOH_A	6	ERVKKIIGEQLVKQESVTRNKASVVE--LGA	DSLDTVELVMALGEEFDTEIFDEAE--	KITT--	VQAAIDY173			
gi 1703097	8	ERIEQVLABQLGIPAEQITREADRRLGME	SLDLVELVSALEDEVGRVYEQSOLE--	GJET--	VGHMELT75			
gi 1168311	6	KRLQKIVSEQLSYDFEKVTSTADFGKGLGA	DSLDIIEIINTIETEFNIDIEDHYAS--	KITT--	VQDALNY173			
gi 1703092	13	DVVLVYLKLYKIDPEKLSVNSHFNKGLGL	DSLDQVEIIMADEDFGRFIFDIDAE--	KLMC--	PQETVDY180			


```

qi 9297111 297 MYLROQLAKQLERPAEDMDIHAGVYE-LGLDSSLLTYVQETIGDKVGDALPTLLF--EFTT-IARLAHL363
qi 730336 1693 MYFKQVILSSVYIKLPAGQIDARAP-LEAYGIDGIMIMHVIGQLEKVPD-SLSKTLFF--EYQD-IRSLTRYF1758
qi 730336 3856 DMVYTLFSDGLKIAAEFFETDEPFOE-YGIDSIILAQLVQDMQGLNGDIDPSILF--EYPT-IESFAHML3922
qi 730336 2493 DELTAGLAEVLYMDNEDIDPEAFID-IGMDSITGLEMIKAIKQYGTSLNVTKYV--DVPT-TDFAVYL2559

```

B

```

          10      20      30      40      50      60      70
...*...|...*...|...*...|...*...|...*...|...*...|...*...|
IDV5_A      7  NQVLDIILADLTGSDDVKKMLDNLNLF+GLLDGMDTVQLLLELQSQDFWDAPYSEFD+KEMDTFNKI IAKV76
ItuI      2423  RQLARIMGELFD--LESVGRSDRFLA-LGGNSLQATLMLSKVQKTFHCKVSTGQFF--NHQTVKELARFI2487
qi 3041735  972  KKLAKIMHGILGVK--AGVTDNEFFM-IGGHSLKAMMTAKIQEHPHKEVPIKVLV--EKPTIQELALYL1035
qi 232186  2014  NKLAKIMHNYLGVN--KIGVLDNEFF-LOGHSLRAMTHISQVHKDFDWELFLKVLV--ETPTISALAAQYI2078
qi 232186  978  EKLAKIMGKVLGIS--QIGIQDNEFFS-LOGHSLKAITLISRMKRCWWDIPLRLV--EAPTIQEISWYI1042
qi 232186  4098  AQLVLIHQEVLGIE--LIGITDNEFF-LOGHSLKATLLVAKIYEYMQIEMFLNVVF--KHSTINMKIAEYI4162
qi 24212667 3046  ELLAGIMQDVLGMS--EVGVTDNEFFS-LOGDSIKGIQMASRLNQH-DWLEMLKILN--QHPTEELTQVY3109
qi 730367  2013  TVMAKIMGKLLNVD--ELGVSANFFK-LOGDSIKALQVCAELKQR-GEFTTVRSMF--EQHTLQELSAVY2076
qi 730366  2014  KTMAYIMGKVLGMS--RVGIHDSFFP-LOGDSIKALQVAARLAAE-DNSMTIRDLF--RYSTIQELCRHI2077
qi 730366  968  NKLSQLMEDVLRNG--PVGIDHNEFFD-RGGHSLKATALVSRIAKEFDVQVFLKDYF--AHPTEDELATVI1032

```

C

```

          10      20      30      40      50      60      70
...*...|...*...|...*...|...*...|...*...|...*...|...*...|
IDV5_A      7  NQVLDIILADLTGSDDVKKMLDNLNLF+GLLDGMDTVQLLLELQSQDFWDAPYSEFD+KEMDTFNKI IAKV76
ItuI      3460  aKLTOLMKEVVLGISHA--GIKHNEFFD-LGGNSIRAAALAAARIHKELDVLSELKDIF--KFFTIEQLADka3824
qi 3041735  2017  ESLCRIMQKTLGIE--AIGIDNEFFD-LOGHSLKQMMLIANIQAELKSVFLKALF--EQPTVROLAAYM2081
qi 232186  2014  NKLAKIMHNYLGVN--KIGVLDNEFF-LOGHSLRAMTHISQVHKDFDWELFLKVLV--ETPTISALAAQYI2078
qi 232186  978  EKLAKIMGKVLGIS--QIGIQDNEFFS-LOGHSLKAITLISRMKRCWWDIPLRLV--EAPTIQEISWYI1042
qi 232186  4098  AQLVLIHQEVLGIE--LIGITDNEFF-LOGHSLKATLLVAKIYEYMQIEMFLNVVF--KHSTINMKIAEYI4162
qi 24212667 2015  QKVADIMAGVLAQE--QVGYDHEFFD-IGGHSLAGMKMVALVHQELQVELSLKDLF--QSPTEVGLAAQYI2079
qi 730367  972  ADLAHIMGKVLNKG--HIGIRDDFFQ-LOGGSLKAAALVSRIRHKILNVELFLSEVF--SYPTVESMAVKL1036
qi 730366  968  NKLSQLMEDVLRNG--PVGIDHNEFFD-RGGHSLKATALVSRIAKEFDVQVFLKDYF--AHPTEDELATVI1032
qi 3334467  545  ETLVYTIMQDVLGIE--KIGIKDNEFYA-LOGDSIKALQVAARLHS-YQLKLETRDILL--KYPTIDQLVHYI608

```

D

Fig. 4-12. Amino acid residue sequence comparison of PP-binding Domain (A, domain1; B, domain2; C, domain3; D, domain4)

나. Surfactin 합성 관련 유전자의 분석

Surfactin 생산과 관련된 유전자는 Srf I, Srf II, Srf III, Srf IV, Ata-03, Lpa-03의 유전자들이 오페론을 이루고 있을 것이라 예상되어진다(Fig. 4-13).

현재 *Ata-03*과 *Lpa-03*이 클로닝 되어져 있다. *Ata-03*와 *Lpa-03*은 각각 1302 bp와 675 bp의 염기로 구성되어져 있으며, *Ata-03*은 433개의 아미노산으로 된 aminotransferase를 암호화 하고, *Lpa-03*은 224개의 아미노산으로된 phosphopantetheinyl transferase를 암호화 한다 (Fig. 4-14). *Ata-03*의 아미노산은 비교한 단백질의 아미노산과 98% 이상의 상동성을 보여준다(Fig. 4-15). *lpa-03*의 아미노산은 iturin A와 plipastatin B1을 생산하는 *B. subtilis*의 *lpa-14*와 99 %, plipastatin B1과 surfactin을 생산하는 *B. subtilis*의 *lpa-8*과 87 %, surfactin을 생산하는 *B. subtilis*의 *sfp*와 74 %, 그리고 surfactin을 생산하는 *B. pumilus*의 *psf-1*과 44 %의 상동성을 보여준다(Fig. 4-16). Phosphopantetheinyl transferase는 다양한 lipopeptide의 생산과 관련이 있다. 즉 lipopeptide의 합성과정과 세포 외로 분비되는 과정, 생산 조절 등의 다양한 기능을 가질 것으로 예상되어 진다.

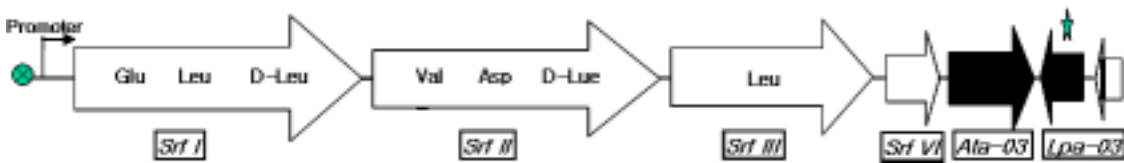


Fig. 4-13. The surfactin synthetase operon

```

TTGAAGGGATTGTCTACATGGAATGATGACGCAGCAAAGAGCTGACACAGAACATTATCTGAAGAAAACCCGACGTCCTT 81
ata-03 → M N D D A A K E L N R T L S E E N P H V L
CATATCTTTCTGTATTGBCAGAGAGATTTTATCCAAAGBBGTCTACACAATCCBCBAAGCBAAAGCCAAAGGCC 162
H M L S D L G R E L F Y P K G V L T Q S A E A K A K A
GGAAAGTATAATCCACGATCCGGATTCGCCCTCACAAGBCCAGTCCATGCACTTTTCCCATATTCAAGBAGACACTGTC 243
G K Y N A T I G I A T S Q G B E S M H F S H I Q E T L S
GCCTATAACCCCGATGATATCTACGATATATGCTCCBCBCAGBBAJAAAGAGCCCTCAGAAGBAAATGBCCTGAAAAATG 324
A Y N P D D I Y D Y A P P Q G K E P L R Q E M L K K M
GTCCTGAAJAATCCTCATTAGCCBCAAAGACATCAGCACGBCGATCTGTACAAACGCTTTAACAACACGBCCTGAGCATT 405
R L E N P S L A G K D I S T P I V T N A L T H G L S I
GCCTGAGAAATCCTCAGCATTGAAAGGGATGCGCTGCTCTGBCCGATAAATATGGGGAAATTACAAATTTCAATTTCGGT 486
A A D L F V N E G D A L L L P D K Y M G N Y N F I F G
GTCCGGCCAAAGCCATCCATTGAGACGTACCCGCTTTTTCAGCCGGATGGGCTTTTAAAGCCGCGGCTGTCCGAGCTG 567
Y R R K A S I E T Y P L F Q R D G R F N A A G L S E L
CTGAAAAGCAGBAAGAAAGBCCGATTTGTCGTGCTGAATTTCCGCAATAAATCCGACAGCTATACGCCCGGGAAGAGGAA 648
L K K Q E E K A I V Y L N F P N N P T G Y T P G E E
GGTTCAGAAATCCTCAGCCTGATCCTGAGGCCAGCGAGCCGCAAGAGATTTGTCGTCTCCTGACGATGCTATGAC 729
A S E I V S V I L E A A E A G K E I V Y L Y D D A Y Y
AATCTGTTTACGATGAAACGCCATTCCAGBAATCCATCTTCAGCAACTCCGCAAGTCAGCAGCCCGGTCCTTCCGCTG 810
N L F Y D E T A I Q E S I F S K L A Q V H D R V L C V
AAATAGAGACCCGACGAAGAAJAAATACGCGTGGGCTTCCGCTGCTTTTATTACTACGACACAJAAAGCCGAAJAA 891
K I D G A T K E N Y A M G F R Y G F I T Y S T K S E K
GGCTCGCCGTCTCCAGGGAAJAAJCAJAAAGGATTTATGAGGGAGCAGATTCAGGCCCCCGCATCCGTCGCCAAAGCTTT 972
A L R Y L E G K T K G I I R G T I S S A P H P S Q T F
ATGCGCGCCGATCCAGTCCAGGAATACGAGAAAGAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAA 1053
M L R A M Q S P E Y E K E K S L K Y N I M K K R A D K
GTGAAAGCCGCTCTTCCAGAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAA 1134
V K A Y L A E N K H Y E D V M T P Y P F N S G Y F M C
GTCCGCTGAAAGACATAAAGCCCGAAATTAAGAGTGTGCTGCTTGAJAAAGAGAGAAATCCGAGCAGATATCCATTAA 1215
Y R L K D I N A G E L R Y S L L E K R G I G T I S I N
GGAAAGATTTGCGAATCCGATTTTCACTGTGTTGAAGAGAACACATCCCGGATCTGTTCCAGAGAAATTTATCAAGAAC 1296
G T D L R I A F S C V E E E H I A D L F E E I Y Q E A
AAGCAGCTGCAGAAACAGBCCGAAATATCAGGCTGACAAJAAJAAAGBAGBBGATACCCCTCTTTTCTATGCTTACAGC 1377
K Q L Q K Q A E I S G ▶ >>>>>>>>>> <<<<<<<<<<< ▶ L L
CTCTTCATAGCTTTTTCATCTCAATCCGTCACAAAATCCGGATGCGCCGACAAACGCGCAGCTTATAATTCCTCGTCCG 1458
E E Y T K M E I G D C F D P H A A C V A L K Y E E D A
ATCATACTGCGGATGAACAAGCTTTCATGTCGCGTCCGCGAGCTCAATGACACATGCGCCGCTGCTTTGAGCGCGAGCCT 1539
D Y T R I H D P L E I S V H G D D D K L R V S
GAATGAAATCAAGCGAAAGGAAAGCCCTTTTCCGCGGCTGCTGATAAAGCTTTCTTTTCACTGACCAAGGATGAAJAA 1620
F S D L P L S L G K G A Q K I E S E K M S M L H Y F Y
ATCGTCTGCTGATCGGCGCTTTCCGCTTGCAGATCACTGTAATCCGTCGCGAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJAAJ 1701
D T Q Q D P H K A Q L D S Y E T P S F F R K A I D I T
CCCGGGCTTCAITTTTTCAATATCTATGCGGATCGCTTTTGAATCAACGGCACACAGGATCCAGCGCCCGGAATGGAA 1782
G P K M K E I D I G I P K S D V A C V I M R G S H S I
GTTAAAGTGCATGTCCGAAAGCCCGGGATGTACGCTTTCCGTAATCCGTCGACGCTGAATGAJAATCCCGGCGGATCA 1863
N F H M D P L A P I Y P K G Y E Q V S F S I G A P D L
TCCGTAAAGCCTTCCGCGCAGCTGCTGGATCAGCATGTCCCGGATCAAGGTCGCGTGAACATCTCCCTTATGTAJAAAG 1944
G Y A K A A A T R I L M D G I L T R H A D E K H Y F R
CGGCAITTTTCCGCTTTTCCCGGACACGGCCCGCATCATCCGATCCTCTCCCGCAGAAAGCGGCGGCTCATATA 2025
R C K E R K E A S V A A M M R D E E G A S L P R D M Y
AACTCGTAAATCTTCATGTCAGATCT2054
V G Y I K M □ □ lpa-03

```

Fig. 4-14. Nucleotide sequence of *Ata-03* and *Lpa-03* of *Bacillus amyloliquefaciens* LP03. (The start codon and stop codon (bold) were indicated. The designated primers were showed italic type. The putative μ-independent terminator

downstream of Lpa-03 was indicated by > and < above the sequence)

LP03	MNDAAKELNRTLSEENPHVLHMLSDLGRELFPYKGVLTQSAEAKAKAGKYNATIGIATS	60
RB14	MN- DA AKELNRTLSEENPHVLHMLSDLGRELFPYKGVLTQSAEAKAKAGKYNATIGIATS	59
CY22	MN- DA AKELNRTLSEENPHVLHMLSDLGRELFPYKGVLTQSAEAKAKAGKYNATIGIATS	59
A13	MN- DA AKELNRTLSEENP Y VVLHMLSDLGRELFPYKGVLTQSAERK- QGR KYNATIGIATS	58
LP03	QGESHMFSHIQETLSAYNPDDIYDYAPPQGKEPLRQEWLKKMRENPFLAGKDISTPIVT	120
RB14	QGESHMFSHIQETLSAYNPDDIYDYAPPQGKEPLRQEWLKKMRENPFLAGKDISTPIVT	119
CY22	QGESHMFSHIQETLSAYNPDDIYDYAPPQGKEPLRQEWLKKMRENPFLAGKDISTPIVT	119
A13	QGESHMFSHIQETLSAYNPDDIYDYAPPQGKEPLRQEWLKKMRENPFLAGKDISTPIVT	118
LP03	NALTHGLSIAADLFVNEGDALLLPDKYWGNYNFI FGVRKASIE TYPLFQRDGRFNAAGL	180
RB14	NALTHGLSIAADLFVNEGD TLLL PDKYWGNYNFI FGVRKASIE TYPLFQQDGRFNAAGL	179
CY222	NALHTGY-IAADLFVNEGDALLLPDKYWGNYNFI FGVRKASIE TYPLFQQDGRFNAAGL	178
A13	NALHTGY-IAADLFVNEGDALLLPDKYWGNYNFI FGVRKASIE TYPLFQQDGRFNAAGL	177
LP03	SELLKKQEEKAIIVLNFNNPTGYTPGEEEAISEIVSVILEAAEAGKEIVVLVDDAYYNLF	240
RB14	SELLKKQEEKAIIVLNFNNPTGYTPGEEEAISEIVSVILEAAEAGKEIVVLVDDAYYNLF	239
CY22	SELLKKQEEKAIIVLNFNNPTGYTPGEEEAISEIVSVILEAAEAGKEIVVLVDDAYYNLF	238
A13	SELLKKQEEKAIIVLNFNNPTGYTPGEEEAISEIVSVILEAAEAGKEIVVLVDDAYYNLF	237
LP03	YDETAIQESIFSKLAQVHDRVLCVKIDGATKENYAWGFRVGFITYSTKSEKALRVLEGKT	300
RB14	YDETAIQESIFSKLAQVHDRVLCVKIDGATKENYAWGFRVGFITYSTKSEKALRVLEEKT	299
CY22	YDETAIQESIFSKLAQVHDRVLCVKIDGATKENYAWGFRVGFITYSTKSEK-LRVLEEKT	297
A13	YDETAIQESIFSKLAQVHDRVLCVKIDGATKENYAWGFRVGFITYSTKSEK-LRVLEEKT	296
LP03	KGIIRGTISSAPHPSTFMLRAMQSPEYEKEKSLKYNIMKKRADKVKAVLAENKHYEDVW	360
RB14	KGIIRGTISSAPHPSTFMLRAMQSPEYEKEKSLKYNIMKKRADKVKAVLAENKHYEDVW	359
CY22	KGIIRGTISSAPHPSTFMLRAMQSPEYEKEKSLKYNIMKKRADKVKAVLAENKHYEDVW	357
A13	KGIIRGTISSAPHPSTFMLRAMQSPEYEKEKSLKYNIMKKRADKVKAVLAENKHYEDVW	356
LP03	TPYPFNSGYFMCVRLK DINAGELRVSLEKRGIGTISINETDLRIAFSCVVEEHIADLFE	420
RB14	TPYPFNSGYFMCVRLK DINAGELRVSLEKRGIGTISINETDLRIAFSCVVEEHIADLFE	419
CY22	TPYPFNSGYFMCVRLK DINAGELRVSLEKRGIGTISINETDLRIAFSCVVEEHIADLFE	417
A13	TPYPFNSGYFMCVRLK DINAGELRVSLEKRGIGTISINETDLRIAFSCVVEEHIADLFE	416
LP03	EIYQEAQQLQKQAEISG	437
RB14	EIYQEAQQLQKQAEISG	436
CY22	EIYQEAQQLQKQAEISG	434
A13	EIYQEAQQLQKQAEISG	433

Fig. 4-15. Amino acid residue sequence comparison of *Ata*-03 of *B. amyloliquefaciens* LP03. (Asparate transaminase-like protein of *B. subtilis* RB14 and *B. subtilis* A13, Aat22 of *Bacillus* sp. CY22)

LP03	MKIYGVYMDRPLSAGEEDRMMAAVSAEKREKRRFYHKEDAHRTLIGDMLIRTAATAAKAYG	60
RB14	MKIYGVYMDRPLSAGEEDRMMAAVSAEKREKRRFYHKEDAHRTLIGDMLIRTAATAAKAYG	60
BBK-1	MKIYGVYMDRPLSAGEEDRMMAAVSAEKREKRRFYHKEDAHRTLIGDMLIRTAATAAKAYG	60
CY22	MKIYGVYMDRPLSAEEDRMMAAVSAEKREKRRFYHKEDAHRTLIGDMLIRAAAKAYG	60
YB8	MKIYGIYMDRPLSQEENERFMSFISPEKREKRRFYHKEDAHRTLIGDVLVRSVISRQYQ	60
168	MKIYGIYMDRPLSQEENERFMTFISPEKREKRRFYHKEDAHRTLIGDVLVRSVISRQYQ	60
LP03	LDPAGISFSVQEQYGKPYIPALPDMHFNISHSGRWIVCAVDSKPIGIDIEKMKPGTIDI	120
RB14	LDPAGISFVQEQYGKPYIPALPDMHFNISHSGRWIVCAVDSKPIGIDIEKMKPGTIDI	120
BBK-1	LDPAGISFSVQEQYGKPYIPALPDMHFNISHSGRWIVCAVDSKPIGIDIEKMKPGTIDI	120
CY22	LDPAGISFSVQEQYGKPYIPALPDMHFNISHSGRWIVCAVDSKPIGIDIEKMKPGTIDI	120
YB8	LDKSDIRFSTQEQYGKPCIPDLPAHFNISHSGRWVIGAFDSQPIGIDIEKTKPISLEIAK	120
168	LDKSDIRFSTQEQYGKPCIPDLPAHFNISHSGRWVIGAFDSQPIGIDIEKTKPISLEIAK	120
LP03	RFFSPTEYSDLQAKHPDQQTDFYHLWSMKESEIKQAGKGLSLPLDSFSVRLKDDGHVSI	180
RB14	RFFSPTEYSDLQAKHPDQQTDFYHLWSMKESEIKQAGKGLSLPLDSFSVRLKDDGHVSI	180
BBK-1	RFFSPTEYSDLQAKHPDQQTDFYHLWSMKESEIKQAGKGLSLPLDSFSVRLKDDGHVSI	180
CY22	RFFSPTEYSDLQAKHPDQQTDFYHLWSMKESEIKQAGKGLSLPLDSFSVRLKDDGHVSI	180
YB8	RFFSKTEYSDLLAKDKDEQTDYFHLWSMKESEIKQEGKGLSLPLDSFSVRLHQDQVSI	180
168	RFFSKTEYSDLLAKDKDEQTDYFHLWSMKESEIKQEGKGLSLPLDSFSVRLHQDQVSI	180
LP03	ELPDGHEPCFIRT YDADEEYKLAVCAAHPDFCDG IEMKTYEELL	224
RB14	ELPDGHEPCFIRT YDADEEYKLAVCAAHPDFCDG IEMKTYEELL	224
BBK-1	ELPDGHEPCFIRT YDADEEYKLAVCAAHPDFCDG IEMKTYEELL	224
CY22	ELPDGHEPCFIRT YDADEEYKLAVCAAHPDFCDG IEMKTYEELL	224
YB8	ELPDSSHSPCYIKTYEYDPPGYKMAVCAAHPDFPEDITMVS YEELL	224
168	ELPDSSHSPCYIKTYEYDPPGYKMAVCAAHPDFPEDITMVS YEELL	224

Fig. 4-16. Amino acid residue sequence comparison of *Lpa-03* of *Bacillus amyloliquefaciens* LP03, *Lpa-14* of *B. subtilis* RB14, *Lpa-8* of *B. subtilis* YB8, *Sfp* of *B. subtilis* ATCC21332, and *Pst-1* of *B. pumilus*. (Regions of identity were not shown as shaded areas. Hyphens represent gaps introduced to optimized sequence alignments).

다. 유류분해 관련 신규 유전자의 cloning 및 분석

1) lipase 유전자 단편의 cloning

BD27, 47, 57가 lipolytic 유전자를 cloning하기 위하여 *Acinetobacter* 종이 생산하는 lipase 유전자로부터 primer(Lip AR, Lip AF)를 작성하여 PCR을 한 결과 약 590 bp 정도의 PCR 단편을 획득하였으며, 그 결과를 Fig. 4-17에서 나타내었다. BD57에서는 약 590 bp 정도에서 진한 밴드를 관찰하였으나, BD27는 2개의 밴드가 보였으며, BD47는 57와 약 590 bp 정도의 같은 위치에서 단일 밴드가 보였으나, 밴드가 약하게 보였다. 세 균주 모두에서 590 bp의 PCR 단편이 획득된 것으로 보아 이 단편이 lipolytic 유전자의 일부분으로 예상되어 0.6% 아가로스 겔을 이용하여 단일밴드로 회수하였다. pGEM T-easy vector에 cloning하여 염기서열을 결정하였고, 염기서열의 아미노산 상동성을 분석해 본 결과 BD57가 *Acinetobacter calcoaceticus* 가 생산하는 lipase와 51%의 상동성을 보였다. BD57가 lipase 유전자를 가지고 있음을 알 수 있었고, 이 균주에 대하여 계속하여 실험하였다.

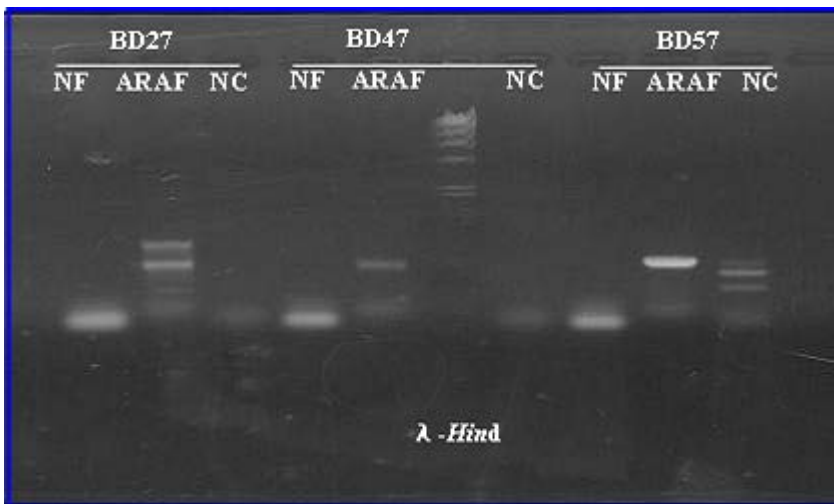


Fig. 4-17. PCR product of BD5 was obtained by PCR using consensus primers for conserved region of lipase from *Acinetobacter* sp.

2) Lipolytic 활성 유전자의 구조 분석

DNA walking PCR로 얻어진 BD57의 lipase 영역의 염기서열을 Fig. 4-18와 Fig. 4-19에 나타내었으며, 이를 토대로 한 아미노산 염기서열은 NCBI의 BLAST를 통하여 분석되어졌다. 그 결과 Fig. 4-18과 4-19와 같이 lipase foldase인 LipB(1032bp, 344aa)와 lipase부분인 LipA(975, 325aa)로서 2개의 ORF를 지니고 있으며, BD57가 지니고 있는 lipase 영역의 아미노산 상동성을 비교해 본 결과 *Acinetobacter* sp. ADP1과 53 %의 상동성을 보였으며, lipase foldase인 LipB는 *Acinetobacter calcoaceticus* 와 49 %의 상동성을 나타내었다 (Fig. 4-20). 이 구조는 *Pseudomonas* sp.과는 다른 ORF구조를 가지며, *Acinetobacter calcoaceticus*와 유사한 ORF구조를 보였다. 아미노산을 바탕으로 BD5 Lip A의 아미노산 서열을 *Acinetobacter* 종의 다른 lipase와 비교하여 alignment를 하였다(Fig. 4-21). Fig. 4-21에서 보이는 것과 같이 *Acinetobacter* 종의 다른 lipase와 BD57에서 lipase와 관련된 활성자리인 G-H-S-H-G 아미노산 서열이 잘 보존되어 있었다. 그리고 Jaeger와 Eggert에 의해 구분된 Group 1 proteobacterial lipase들과 BD57의 lipase의 아미노산 서열은 *A. calcoaceticus*가 생산하는 lipase와 가장 가까운 유사성을 보였다.

```

H Q R H Q K I W V C U L G F F I L S L 120
ATGCAACGATGCACAAAACATATGCTGCTGCTCGGATTTTTTATTTTGAGCCCTC
I A C U Y W L S P D S E N T S P Q P N Q 180
ATCCCATGTGTATTGGCTAAGCCACAGACTCGGAAAATACTTCACCTCAGCCAAATCAG
D E A R R L U A T S Q S T L N S P L H E H 240
GATGAAGCTAGGTTGGTAGCTACTTCACAACTACTTTAAATTCACCAATTAACCGAAAT
T Y L S K S Q Q D T Q U N C Q L K I D S 300
ACTTATTTGACTAAAAGTCAGCAAGTACTCAAGTTAACTGCCAATTA AAAAATTGATAGT
S Q H L U U N S Q T R D C F E Y F I T Q 360
TCAGAGCATTTAGTTGTGAATAGCCAAACCCGCTGACTGCTTTGAATATTTTATTAGCCAG
V G E S N L Q Q U K T H F E K F I Q D Q 420
TATGGCGAGAGCAATTTACACAGGTTAAACTCATTTTGAGAAATTTATACAGATCAA
V L E P A R S Q I I D L W T R Y L K Y R 480
TATTTAGAGCCAGCCCGCTCAGCAGATTATTGATTTGTCGACCGCTTATTTAAATACCGT
E Q L A Q I Q P P Q S K Q Q D Q N Y F Q 540
GAGCAGCTTCCACAAATTCAGCCGCTCAATCTAACAACAAGATCAAAATTTATTTCAA
K I F S S I Q D I R K R F F S A S E I E 600
AAGATCITCAGTTCATTCAGATATAAGAAAACGTTTCTTCTGCTGCTGAAATGAA
G L F S T E D I V Q N Y T L D R M K I L 660
GGCTTATTTTCAACAGAGCATTATTCAGAACTACACATTAGATCGCATGAGATTTTA
E D S S L S E I E K A K K L K E R F E Q 720
GAAGATTGATCTTTAAGCGAATTCAAAACCTAAAACACTCAAGAGCCGCTTTGACAA
L P E D W Q E N L Q Y L S K L D D L H A 780
TTACCAAGAGACTGGCAGAAAACCTACAAAACCTTCAAGCTTGATGATTTACAGCA
L T K Q I K A R N G S A E E L R Q H R T 840
CTGACCAACAATTAAGCTCGCAATGGTTCAGCAGAGGAACCTCGGCAATGCGTACA
A L A G A E A T Q R L E T L D I Q R N A 900
GCCTTGGCTGGAGCCGAGGCACTCAGCGATTAGAACTTTAGATATACAGCGTAATGCC
W Q Q R U T G Y L N Q R D E U L H S N M 960
TGCAACAGCGAGTGACTGGCTACTTAATCAGCGTGATGAAGTCCCTGCATAGCAATATG
S D S A K K Q A I Q Q L R Q Q Q F S S S 1020
AGTGACAGCGCTAAAACCAAGCTATTCAACAACACTACGCCAACACAATTTAGCTCATCG
Q E Q L R L R Y F E T U H D Q G G E L P 1080
CAAGAACAGCTTCCTTAGAACTTTTGAACACTCCATGACCAAGGAGCTGAAGTACCC
F N Y *
TTTAACTACTAGC

```

Fig. 4-18. The nucleotides of the genes encoding lipase foldase(BD57-LipB)

CTTCTCATACAAAATAAAAATAGTGCAGTAAAAAT <u>G</u> AAAAGGAACTTAATATTTTTCTGT	1200
A A I L S G L S U S A T H A T N A E Q U	
GCTGCAATAGCTCTCAGGACTGAGTGTTCAGCAACCCATGCCACAATGCAGAGCAAGTC	1260
K S S F U V Y S T Y A Q T K Y P L U F N H	
AAAAGCTCATTTCGTCTATTCAACTTATGCACAAACCAATATCCATTGGTTTTTAACCAT	1320
G H A G F N R U G T D Y L G L D Y W Y Q	
GGTATGCCGGTTTTAACCGAGTTGGAAACAGATACGCTTGGTCTGGACTACTGGTATCAG	1380
I L P D L A R N G G N U W A T R U S P F	
ATTCTTCCTGATCTTGGCGTAACCGAGGAAATGTCTGGGCAACAGAGTTTCACCGTTT	1440
N S T E U R G E Q L A Q Q U E E I I A I	
AACTCAACTGAAGTTCGTGGGAAACAACTTGCCCAACAGTAGAAGAATTATTGCCATC	1500
T G K P K U N L I G H S H G G P T I R Y	
ACCGGAAAGCCTAAAGTCAACTTGATCGGACATAGCCACGGGGACCAACAATTCCGCTAT	1560
U A G I M P E K U A S L T T I G A P H K	
GTCCGCTGGGATCATGCCGTGAAAAGTCCGCTTCGCTTACTACTATTGGTGCACCTCACAA	1620
G S P H A D U I L N U E G T P L S G L A	
GGATCGCCAATGGCAGATGTCATCCTGAATGTTGAGGGTACTCCTCTATCCGGGCTGGCA	1680
T L U N W F S A A I T W A G C L D P N S	
ACATTAGTAAACTGGTTTTCCCGCAGCAATTACTTGGGCAGGAGGTCTAGACCCCAATAGT	1740
Y P H D S L A G A H S L S T Q G S A Q F	
TATCCGCATGACTCCCTAGCAGGTGCCACAGTTTATCGACTCAAGGCTCTGCACAGTTT	1800
N A Q F P M G U P T T S C G E G A Y Q E	
AAATGCCAGTTTTCAATGGGTGTTCCCTACCAGCTCTTGTGGTGCAGGGTCTTATCAGGAG	1860
K G I C M Y S F S G N K A L T N P L D P	
AAAGGCATTTGTATGTATTCACTCTGGTAATAAAGCGCTGACGAACCCATTAGATCCA	1920
F D H A L T G S S L U U D P F G D N D G	
TTTGACATGGCATTGACAGGAGTAGTCTAGTGGTTGACCCATTTGGGGATAATGATGGG	1980
L U S R C S A K F G K T I R D D Y N W N	
CTTGTGCTCGATGCAGTGCCAAATTTGGTAAACTATTGCTGACGACTATAACTGGAT	2040
H L D E U N Q U H G I R S I F A A D P U	
CATTTAGATGAAGTCAATCAGCTCATGGGAATACGTTCTATTTTTGCAGCAGACCCTGTA	2100
S U V R Q H A N R L K L Q G L *	
TCGGTTTTATCGTCAACATGCTAACCGTTTTAAACTTCAAGGATTATAAGCTTTAAACAA	2160

Fig. 4-19. The nucleotides of the genes encoding lipase (BD57-LipA). Start codon and stop codon are underlined.

```

RAG-1      -----MSGKFINHRTIUFGUITSUULLLLLLLIYYVFKPEAQTQHQNH-TQTIQPENTULES
SY-01      ----MKIKLLNHRIFLGLNVCLLLSLULIYFIFKPEAQKHENDLHQQNQLSSEMNIQK
ADP1       -----MNGSKKIYLGIGLVALLHIFIYMLMPKDTANASSQIE-STNASAIATSPG
BD57       KLKEDIFMQRMQKKIWWCULGFFILSLIACUYMLSPDSENTSPQPM-QDEARLUATSQST
           : . * :: : : :: . . : :

RAG-1      ATAHNKQGKLP TLAASLQGTEIDCP IQVDANGKILTVGIRSCFDYFFSSSLGKTEAELU
SY-01      IDDTNHKGIPLNAPS LQGTEIDCP IQVDANGKILTVGIRSCFDYFFSSSLGKTELELI
ADP1       QQNQLSENTTPFGSUSQHD TQUNCQLQLNAANHLIUNEQTRNCFEYFLTQYGEKSLTQID
BD57       LNSPLNENTYLS--KSQQDTQUNCQLKIDSSQHLVUNSQTRDCFEYFITQYGESMLQQVK
           :.. * :.***: * :***: * :***: * :***: * :***: * :***: * :***:

RAG-1      ADIRQYLLATLPESASHYAIYLLDQYUAYHHALQNLKPNAGFKSMNUDALQKUVDQHAKU
SY-01      SDIRQYLKATLPDSASSYASYLLDQYUAYIHALKMLKSTSSFTTGD AEGFKQLDQHYKU
ADP1       QDIKNYFTQSLPQPARDQAQDLWQRYLK YREELGNLKEPAIAKT-DIAYYRAUFTSRQML
BD57       THFEKFIQDQYLEPARSQIIDLWTRYLKYREQLAQIQPPQSKQQ-DQNYFQKIFSSIQDI
           . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

RAG-1      QQQFFNAAEINALFGNERNLNQFNLEQMRIHANKNLTTQEKATELAKLIDELPPALADGV
SY-01      QQQFFNSAEINALFGNERNLNQFNTDQMRIHANKSLNAQQKATELANLIDQLPSTLADGV
ADP1       RQRFFSATEIAGLFGSEDIYNQYTLERMAILNHSKLSEIEKAKQLKALFDQLPQDWKANL
BD57       RKRFFSASEIEGLFSTEDIYQNYTLDRMKILEDSSLSEIEKAKKLKERFEQLPEDWQENL
           : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

RAG-1      RUSHQFAELQQLTKEIQAKGCSAQDLRSHRESLLGPEAADRLEKUDQEEAVWQTQUNHQL
SY-01      RVFNQFAELPQLTKEIQEKGCSAQEIRNHRESLLGAEAADRLEKUDQEEARWQKQUNSYL
ADP1       EQLSKLDDLKQLTTSIKKNGCSAQELHDHRTNLUGHDATARLEQLDVERSNHWSNUTQYL
BD57       QXL SKLDDLHALTKQIKARNGSAEELRQHRTALAGAEATQALETLDIQRNAVWQRUTGYL
           . : : : * **..* : ..***: : : : * * : : : * * * : * : : * : . * : . * **

RAG-1      SARDQILKSDANDASKQQSIAELRNSSFGTKEDLLRAQSYEUNHDQKSKGS---
SY-01      SEREQILKSNVSDSNKQQSIEQLRNSTFATKENLLRAQSYEIHNDQKKLH----
ADP1       DERQTI LNSNMSD TAKQNAISALRSKNFTAPQDQIRUQAFESAKDQGGSLPFSE
BD57       NQRDEULHSNMSDSAKKQAIQQLRQQQFSSSQEQLRLRTFETUHDQGGELPFNY
           . * : : * : : . * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :

```

Fig. 4-20. The aa sequence alignment of lipase B from BD57 was compared with those of other lipase from *Acinetobacter* sp. RAG-1, *Acinetobacter*. sp SY-01, and *Acinetobacter*. sp ADP1.

```

RAG-1      HKKKYLSAHTLNAGHLHSSGSUVHAGLFDLSPKASVQMCNUVSCSUGGSTYUTSSYAKT
SY-01      HKKKYLNANULNTGHLASSGSUVHAGLFDLAPKALVQMCNUSSCTUGGSTNUTSSYAKT
ADP1       -----HKFKLLFTLLLLVLTQPVFATSPIQNPITTSFVUISDYAKT
BD57       -----MRTFNKTAQLLTUTLAAALGLSFAAQQAASATQ-VIEKTKSDYAKT
           : * * . . . * ****

RAG-1      KYPILLAHGMAGFSAUG----PLQYWNGITEDLVGNGANUFVAQQASFNSSEURGEQLLL
SY-01      KYPILLAHGMAGFSAUG----PLQYWNGITEDLVGNGANUFVAQQASFNSSEURGEQLLL
ADP1       KYPILSHGLFGFNKLGTEAFGLDYVYQIPQDLARNGANUVUTRQSTANTSEFRGEQLLA
BD57       KYPILMHGWLGWSRIGTDSIGLDYVYQILPDNARNGSTUFAAQLSPANTTMHRGEQLIH
           ****:: ** *:. :* *:* * *:. **:*.:.: :. *:: *****:

RAG-1      QAKQLAITGAQKUNLIGHSHGSSQSRUYVASLHPTKVASUTAUGGPTKGSVUADUUYS--
SY-01      QTKQLAITGAQKUNLIGHSHGSSQSRUYVASLLPKVASUTAUGGPTKGSVUADUUVS--
ADP1       EVQDILAITGAQKUNLIGHSHGSSQSRUYVAGVLPANIASUSTIGGPAKGAPLADLIYKT-
BD57       QVEDULAITGKKKLNLIGHSHGSGPTULYVAATQPQYIASITGVAGTYHGSKVADDIQHNS
           :.:***** :*:*****. :* ** . * :*: :*. :*: :** :.

RAG-1      ITQSPUGPIAAPVUAAAUADAFSLUGIGSGHYDQDAIAGLNSLTTAGSANFNSRFPAGU
SY-01      VUKSPUGPALAPIIAGUNAFFSLUGIGSGHYDQDALAGLNSLTTAGSANFNRFPAAU
ADP1       LAGTLEAPIATIFNUAMN-FITIGQFDDPQKYPHNSUGAAYSLSLEGACKFNIFPAGU
BD57       LSRTAFNILGDYIUGPLIALGQLKPELEIDFDASHKSLTQAGSNTFNASUAQQMVKDGUL
           : :.. :. : : : :. : * : :. : :.

RAG-1      PTTA-CGSGTELUN--GURYYSWGTTGULTNULDPLDYALUATSLLIS-GENDGLUPRCS
SY-01      PTTA-CGSGTELUN--GURYYSWGTSPTNALDPLDYALTATSLLIP-SENDGLUPRCS
ADP1       PTTA-CGQGESSUN--GURYYSWGASPLTNPLDPSDYGLSLTSVFSG-KMNDGLUPSCS
BD57       ASTENCHKMLKQKDSKGIHYYSWTGUAQATHALDIDTILHQLGPLSYGNKDNHGHUSRCS
           :.* *... . : *::***** *.. ** ** : :. : :*****.* **

RAG-1      NHLGTUIRDMYFNHLDEUNQVLGLUG-FLQNPUPYRTQANRLKNQGLHKKKYLNANUL
SY-01      SHLGTUIRDMYAFNHLDEUNQILGLUG-FLQNPUPYRTQANRLKNQGL-----
ADP1       SHLGTUIRDMYVWNHLDEUNQILGLRSIFAQDPUSIFRQHANRLKGQHL-----
BD57       AFHGVUIHDQYKLNHTDLANMHFGLKGFAPDPVALYRQHANRLKLQGL-----
           :.***:* * * * . * :** . * :** : * :***** *.*

```

Fig. 4-21. The aa sequence alignment of lipase A from BD57 was compared with those of other lipase from *Acinetobacter* sp. RAG-1, *Acinetobacter*. sp SY-01, and *Acinetobacter*. sp ADP1.(Conserved sequence G-X-S-X-G is squared box)

3) DY239의 lipase gene cloning 및 분석

A. schindleri DY239의 lipase 유전자를 cloning 하기 위하여 아래와 같이 southern blotting을 수행 하였다. Fig. 4-22의 A는 게놈 DNA를 분리하여 제한효소 *Hind* III *Pst* I, *Bam*H I, *Eco*R I, *Kpn* I, *Sac* I, *Bam*H I -*Pst* I (B-P) 그리고 *Bam*H I -*Eco*R I (B-E)으로 절단하고 전기 영동한 사진을 보여 준다. B는 방사성 동위원소로 labeling한 probe를 이용하여 southern blotting을 수행하여 X-ray 필름에 노출 시킨 결과를 보여 준다. 약 3.8 kb의 단편에서 signal을 가지는 것을 확인할 수 있다. 이 단편을 cloning 하기 위하여 다시 게놈 DNA를 제한 효소 *Hind* III로 절단하고, 2-5 kb 영역의 DNA 단편이 포함된 gel을 회수하여 pUC118에 삽입하여 원하는 DNA 단편이 삽입된 clone을 획득해서 pLip-1이라 명명하였다. 삽입된 insert size는 3,818 bp이었고, 염기 서열을 결정하였다. 3,818 bp 크기의 insert 단편은 Lip B 전체와 Lip A 일부가 결실된 clone 이었다.

완전한 유전자를 모두 찾기 위해서 genome-walking PCR 원리를 이용하여 완전한 clone이 획득 되었다. Fig. 4-23에 염기서열을 결정한 것을 나타내었다. Fig. 4-23에서 -35와 -10 box의 promotor 영역을 확인할 수 있으며, RBS도 존재를 한다. ORF의 구성은 Lip B, LipA1, LipA2, LipA3로 구성 되어 있다.

LipB는 lipase chaperone으로 1,032 bp이고, LipA1은 1011 bp의 크기에 337 a.a.로 되어 있으며, LipA2도 1,011 bp의 크기에 337 a.a.로 구성되어 있으나, LipA3는 438 bp에 146 a.a.로 다소 크기가 작은 단백질이다.

Fig. 4-24은 LipA1, LipA2, LipA3와 다른 종의 lipase A를 비교한 것을 A에 나타내었고, B에는 LipB를 다른 종과 비교를 하였다. LipaseA를 비교한 결과 LipA1, LipA2, LipA3는 *A. calcoaceticus* ADP1의 LipA와 상동성이 각각 42 %, 53 %, 33 %로 나타났고, *Acinetobacter* sp. SY-01의 LipA와는 각각 41 %, 47 %, 31 %의 상동성을 가지는 것을 확인하였다. 단백질 수준에서 이 정도의 차이는 새로운 종류의 단백질이라 할 수 있다. LipB는 *A. calcoaceticus* ADP1와 *Acinetobacter* sp. SY-01의 LipB와 비교해서 53 % 와 32 %의 상동성을 가지는 것을 확인 할 수 있었다.

Fig. 4-25는 발현벡터 pET32a에 *A. schindleri* DY239의 *LipA1*과 *LipB*를 재조합하여 *E. coli* DH5-α에 도입하여 tributyrin를 분해하는 것을 확인한 것이다. pET32a 발현벡터와 *LipB* 유전자가 재조합된 pETLipB의 경우 tributyrin의 분해 활성을 확인할 수 없다. 그러나 *LipA1* 유전자가 재조합된 pETLipA는 강한 활성을 확인할 수 있다. Fig. 4-26은 LipA1 단백질을 정제한 것이다. Line 1은 분자량 확인을 위한 표준 단백질, Line 2는 sonication sample, Line 3은 fraction 9, Line 4는 fraction 10, Line 5는 fraction 11, Line 6는 fraction

12, Line 7은 fraction 13 그리고 Line 8은 fraction 14를 나타낸다. Line 3의 경우 57 kDa의 분자량을 가지는 LipA를 하나의 깨끗한 band로 정제하였다.

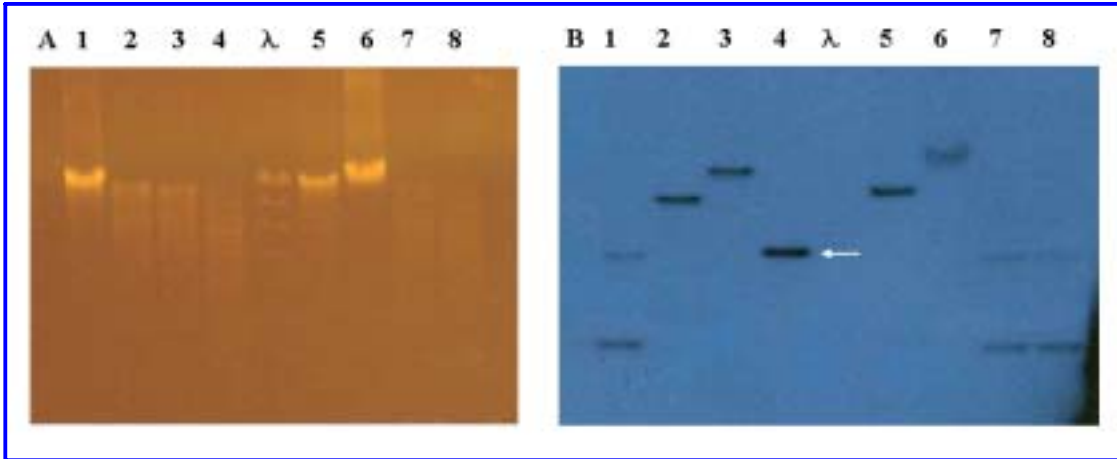


Fig. 4-22. Southern blotting of genomic DNA from *Acinetobacter schindleri* DY239 by various restriction enzymes.(Lanes : 1, *Bam*H I; 2, *Pst* I; 3, *Eco*R I; 4, *Hind* III; 5, *Kpn* I; 6, *Sac* I; 7, *Bam*H I-*Pst* I; 8, *Bam*H I-*Eco*R I and λ, λ-*Hind* III digested marker. (A) The result of DNA electrophoresis after the digestion for 2 h. (B) The hybridization membrane was washed in washing solution (0.2 × SSC, 0.1 % SDS) and it was exposed to X-ray film)

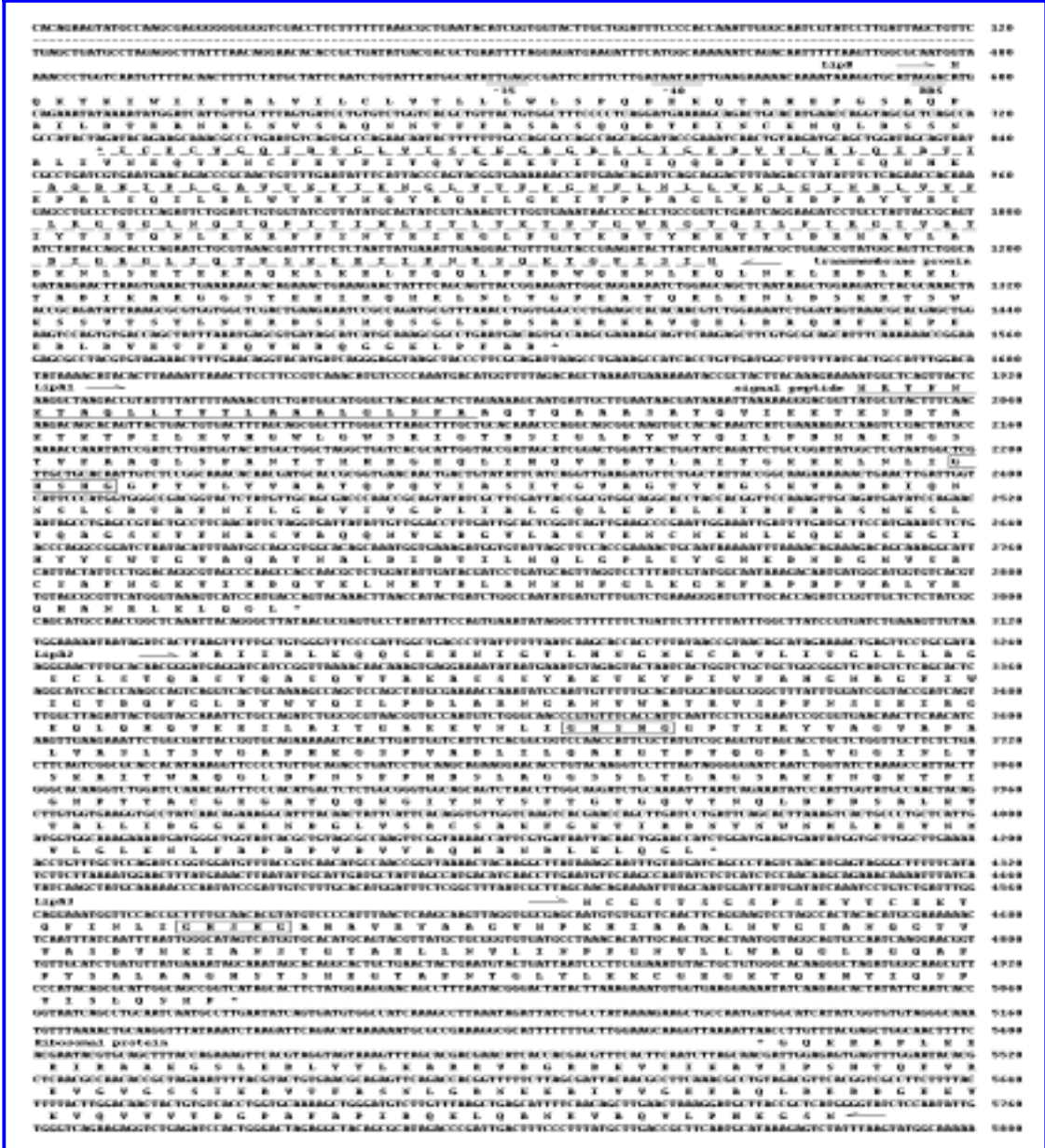


Fig. 4-23. The nucleotides and deduced amino acid sequences of *lipA1*, *lipA2*, and *lipA3* and *lipB* from *Acinetobacter schindleri* DY239. (Potential promoter regions (-10, -35), RBS and signal peptide sequence (24 aa) are labeled and underlined. The reversed amino acid sequence, a putative transmembrane protein are underlined by a dotted line and the conserved active site pentapeptide (G-H-S-H-G) are boxed)

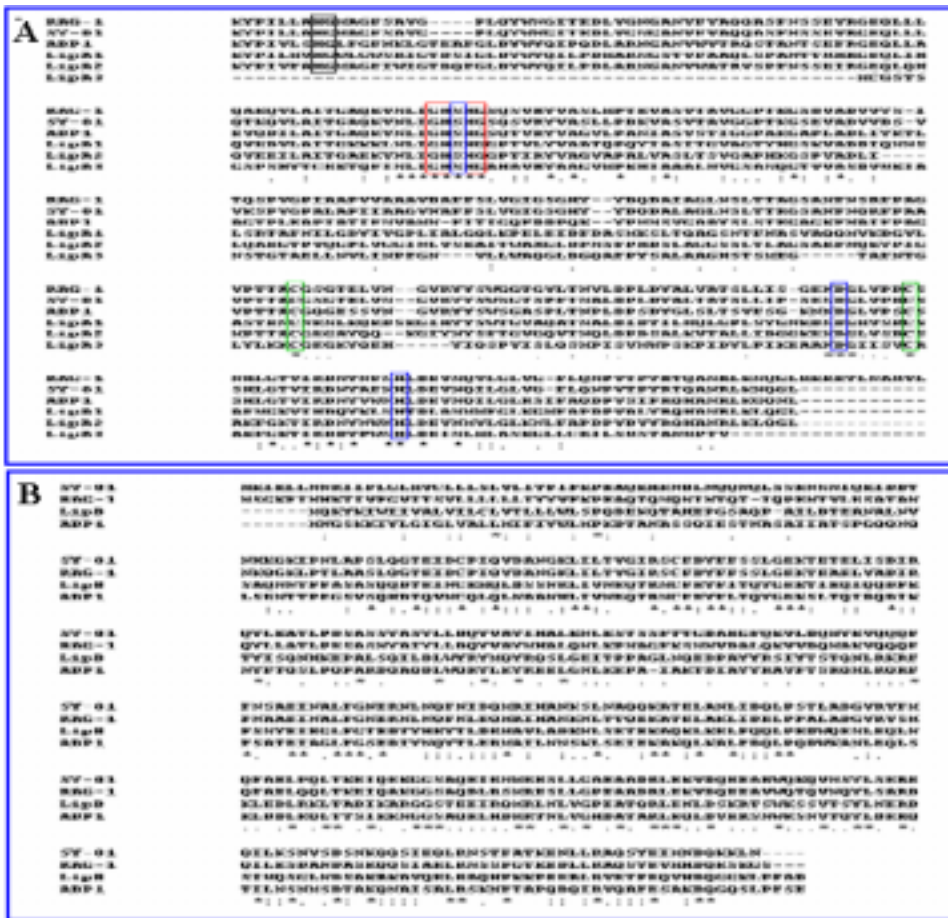


Fig. 4-24. The amino acid sequence alignment of lipases (LipA₁, LipA₂, and LipA₃) and lipase chaperone from *Acinetobacter schindleri* DY239 were compared with those of other lipases using Clustal W, a multiple alignment program.

(A) shows the result of alignment of amino acid sequences of lipase A from *Acinetobacter* sp. RAG-1 (AAD29441), *Acinetobacter* sp. SY-01 (AAP44577) and *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 (YP047804). A pentapeptide sequence, G-H-S-H-G (red box), catalytic triad (blue box) and cysteine residue (green box) are highly conserved in all lipase sequences. An oxyanion hole is conserved in RAG-1, SY-01, ADP1, LipA₁, and LipA₂. (B) Amino acid sequence alignment of lipase chaperone (LipB) from *A. schindleri* DY239 and other lipase B from *Acinetobacter* sp. RAG-1 (AAD29442), *Acinetobacter* sp. SY-01 (AAP44576) and *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 (YP047803).

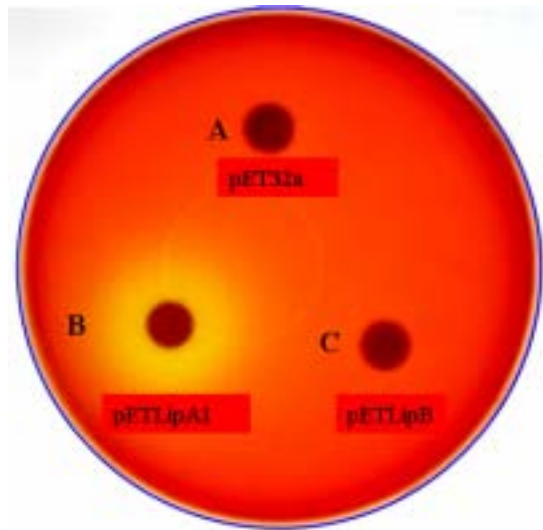


Fig. 4-25. The activity of lipase from *Acinetobacter schndleri* DY239.
 (A : pET32a, B : pETLipA1, C : pETLipB)

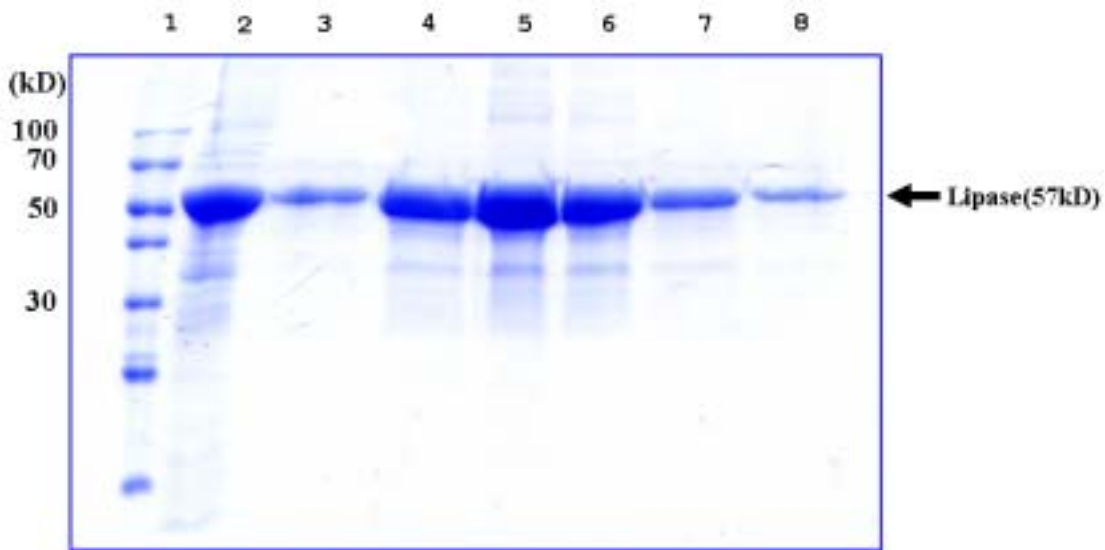


Fig. 4-26. The lipase protein SDS-PAGE was purified from *Acinetobacter schndleri* DY239. (1 : Marker, 2 : sonication sample, 3: fraction 9, 4 : fraction 10, 5 : fraction 11, 6 : fraction 12, 7 : fraction 13, 8 : fraction 14)

제 6 절 식물병 방제 효과 및 환경 정화 검정 및 대량 생산 제조 기술 확립.

1. 연구수행 방법

가. Biosurfactant를 생산하는 균주의 oil 오염 토양에서의 식물체 성장에 미치는 영향

LB-broth를 사용하였으며, 배지의 조성은 yeast extract 5.0 g/L, tryptone 10 g/L, sodium chloride 10 g/L를 함유하고 있다. 균주, LP03을 접종하여 30 °C에서 200 rpm 으로 2 일간 배양한 후 OD₆₀₀에서 OD값을 1.5로 조정하여 사용하였으며 negative control로는 D.W (멸균된 3차 증류수)를 사용하였다.

Green gram 종자를 incubator 내에서 1 day 발아시킨 후 뿌리의 길이가 같은 종자를 선 발하여 멸균한 흙을 1 %, 2 % oil로 오염시킨 흙을 50 ml tube 에 담은 후 선별된 종자를 2 cm 깊이로 심었다. oil의 유실을 줄이기 위해 wrap으로 입구를 막았다.

나. Biosurfactant 생성 우수 균주의 길항효과 검증

홍해 지역에서 부추를 재배하는 농가의 비닐하우스에 기존의 부추재배와 같은 조건으로 실험을 실행하였고 또한 잣빛곰팡이 병이 자연 발생된 부추를 사각형 pot에 이식하여 실험 하였다.

LB-broth를 사용하였으며, 배지의 조성은 yeast extract 5.0 g/L, tryptone 10 g/L, sodium chloride 10 g/L를 함유하고 있다. 두 균주 LP03과 TBM40-3을 접종하여 37°C에서 200 rpm 으로 1 일간 배양한 후 OD₆₀₀에서 OD값을 1.5로 조정하여 사용하였다. Positive control로 농약 (살균제, 스톱렉스, 수화제 : 1 g/L)을 사용하였으며, negative control로는 D.W (3차 증류수)를 사용하였다.

준비된 4 가지, 두 균주, 농약, D.W를 각각 50 mL을 pot 당 7 일 간격으로 옆면에 살포 한다. 동시에 한 pot 당 10포기의 부추를 선정하여 엽장 및 엽수를 측정한다.

○엽장측정법 : 가장 긴 잎 하나를 측정한다.

○엽수측정법 : 가장 긴 잎 하나를 1매로 하고 나머지를 상대적으로 측정한다.

* 3차례에 걸쳐 측정하였으며 10 포기의 부추를 측정하여 평균한 값으로 표를 만들었으며, 표준편차를 구하여서 분포도를 알아보았다 (Microsoft excel program을 사용하여 자료 처리를 하였다).

다. 폐엔진유로 오염된 토양 유류성분 분해

LB-broth를 사용하였으며, 배지의 조성은 yeast extract 5.0 g/L, tryptone 10 g/L, sodium chloride 10 g/L 를 함유하고 있다. 균주, LP03, DYLL110과 DYLL130을 접종하여 30℃에서 200 rpm으로 2일간 배양한 후 OD600에서 OD값을 1.5로 조정하여 사용하였으며 negative control로는 D.W (멸균된 3차 증류수)를 사용하였다. 30 % oil이 함유된 토양 100 g을 화분에 넣고 negative control로써 oil이 함유되지 않은 토양을 사용한다. 이어서 화분에 1 ml 의 균 배양액을 투입한 후 2 일 단위로 균의 수를 cell counting 방법으로 측정한다. 30 % oil이 함유된 토양 100 g을 화분에 넣고 negative control로써 oil이 함유되지 않은 토양을 사용한다. 이어서 화분에 1 ml의 균 배양액을 투입한 후 2 일 단위로 hydrocarbon의 양을 측정한다. 2일 단위로 채집한 토양의 양과 같은 volume의 toluene을 넣어 강하게 vortexing한 후 UV-spectrophotometer를 이용하여 420 nm에서 hydrocarbon의 양을 측정한다.

라. 대량배양 시스템 확립

1) 탄소원으로 폐 오일의 사용

배지중에 탄소원이 결핍된 C-배지(Carbon-minimal medium)를 사용하였으며, 배지의 조성은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, CaCl_2 10 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L, NaCl 30 g/L, yeast extract 0.2 g/L 및 trace element 용액 2 mL (MoO_3 1 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg/L, H_3BO_3 , 1 mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 6 mg/L, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L)를 함유하고 있으며, pH 7.0으로 조정하여 사용하였다. 탄소원으로 등유와 식용유 각각 1%씩 첨가한 C-배지에 두 균주 LP03과 TBM40-3을 접종하여 30 ℃와 37 ℃에서 200 rpm으로 하루 배양하여 OD₆₀₀에서 OD값을 측정 하였다.

2) 대량배양 최적조건 확립

대량배양용 최적 배지 및 경제적인 배지를 선발하여 배양 단가를 낮추기 위하여 곡물류, 농산 부산물 등을 대상으로 균주의 생육을 조사하며, 아울러 생물 활성도 조사하여 생육이 최대이면서 생물 활성이 가장 우수한 배양 조건을 확립한다. 성장 양상을 조사하기 위해 사용한 배지조성 (g/L)은 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 15 g, KH_2PO_4 3 g, NaCl 0.5 g, NH_4Cl 1 g, 멸균 전 pH는 7.4이며, CaCl_2 1 mM, casamino acid 0.2 %가 되도록 121 ℃에서 15 분간 분리 멸균 후 첨가하였고, 탄소원으로 Glucose를 별도로 멸균한 후 3 % 농도로 접종하였

다. 전배양은 일정시간 배양한 균주를 백금이에 취하여 500 ml 용량의 플라스크에 멸균한 후 준비된 100 ml의 배지에 접종하고, 37 °C에서 180 rpm의 진탕속도로 24 시간 동안 진탕 배양하였다. 본 배양은 전 배양한 배양액을 7L 용량의 생물 배양기 (KoBioTech Co. Ltd., Korea)에 멸균되어 준비된 5L의 동일배지에 1 % (v/v)를 접종하여 전배양과 동일한 방법으로 2 일간 배양하였다. 주기적인 시간에 따라 성장양상을 살펴보기 위하여 배양시간에 따른 pH값의 변화와 Dilution method를 이용하여 평판 도말된 배지상에 나타나는 균주의 colony를 계수하였고, 분광광도계 (Helios β, Unucan, England)를 사용하여 OD₆₀₀에서 변화 값을 측정하였다.

마. *Bacillus vallismortis* TBM40-3 제재의 안정성

Bacillus vallismortis TBM40-3을 전 배양하여 10 mL의 균주를 2 L 삼각 플라스크에 멸균시켜 준비한 700 ml의 배지 (yeast extract 5 g, NaCl 5 g, sucrose 1 g/L)에 접종한 후 37 °C, 180 rpm의 속도로 24 시간동안 진탕 배양하였다. 본 배양은 전배양한 배양액을 100 ℓ 용량의 생물 배양기에 멸균시켜 준비한 70 ℓ의 동일배지에 1 % (v/v)를 접종하여 전배양과 동일한 방법으로 2일간 배양하였다. 배양액에 700 g의 탈지분유를 넣어 충분히 교반한 후 원심 분리하여 집균을 하였다. 집균된 균체를 적당한 양의 멸균수에 녹이고, 동결건조 용기에 넣어 -70 °C 냉동고에서 overnight 시킨다. 동결된 균주를 동결건조기에 넣어서 수분을 완전히 증발시키고, 증량제로 분말 아미노산 가루 일정량과 혼합하여 미생물제제를 제조하였으며 미생물제제에 존재하는 생균수는 단계별로 회석하고 평판 도말법을 이용하여 1, 2, 6 그리고 12개월 기간으로 조사하였다.

2. 연구 결과

가. Biosurfactant를 생산하는 균주의 oil 오염 토양에서의 식물체 성장에 미치는 영향

Gasoline으로 오염된 토양에서 식물체의 성장에 있어서 길항균인 *B. amyloliquefaciens* LP03의 효과를 확인하기 위하여 멸균한 토양에 gasoline을 다양한 농도로 첨가하여 토양을 오염시킨 후 식물체를 확인하였다(Fig. 5-1, Fig. 5-2).

그 결과 gasoline이 2 % 농도로 오염된 토양에서는 녹두는 거의 성장할 수 없으나, 1 % 이하의 농도로 오염된 토양에서는 *B. amyloliquefaciens* LP03이 처리된 토양에서 녹두의 뿌리와 줄기 모두 성장이 촉진되는 것을 확인할 수 있다. 또한 아래의 그림 Fig. 5-1 B를 통하여 2 %로 오염된 토양에서 LP03이 처리된 오염된 토양에서는 seed의 발아를 관찰할 수 있으나 대조구에서는 seed가 썩는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 gasoline으로

오염된 토양에서 식물의 성장에 LP03이 중요한 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

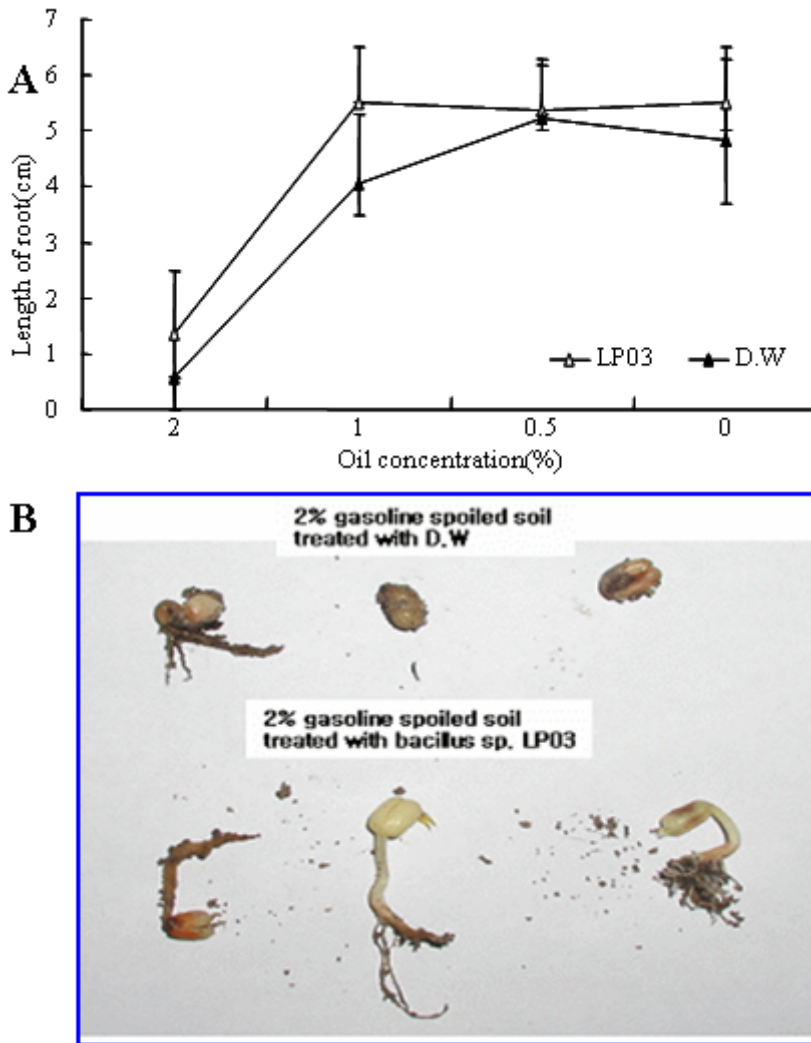


Fig. 5-1. Effect of seed growth by *B. amyloliquefaciens* LP03 in soil contaminated 2% Gasoline.(A, Growth of Root; B, germination)

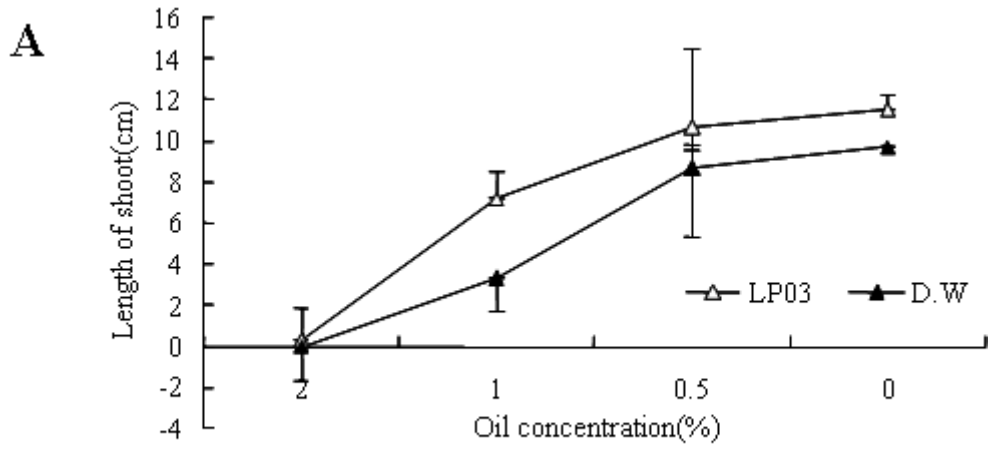


Fig. 5-2. Effect of mung bean growth by *B. amyloliquefacens* LP03 in soil contaminated Gasoline(A, Growth of shoot; B, extension of shoot).

나. Biosurfactant 생성 우수 균주의 길항효과 검증

Fig. 5-3은 식물 병원성의 균에 대한 항진균 효과와 부추에 대한 생육 촉진 효과를 확인하기 위한 실험의 대조구 실험으로 A는 negative control로써 식물 병원성 균을 접종하고 미생물 대신에 멸균수만 준 것으로 4~10일이 경과하는 동안 병반이 심해지고 결국에는 고사한 것을 볼 수 있다. B는 positive control로써 잿빛 곰팡이 병에 유효성이 있는 농약 (스미렉스 수화제)을 사용한 것으로써 병원성 곰팡이에 의한 병반이나 고사를 확인할 수 없었다.

Fig. 5-4는 *Bacillus amyloliquefaciens* LP03을 식물 병원성 곰팡이 *Botrytis cineria*를 접종한 후 접종한 것으로 negative control과 달리 부추 잎의 푸른빛이 유지됨을 볼 수 있다. 또한 농약을 사용한 positive control의 결과와 비슷한 효과를 얻을 수 있었다. 실험 마지막 날에도 무르지 않은 잎이 많이 보인다. 하지만 일주일 후와 마지막 날에 차이가 많이 보인다. 첫날과 일주일 후에 차이가 보이긴 하지만 더 이상 병이 번지지 않고 유지됨을 볼 수 있다. 이는 엽장과 엽수를 측정하여 보니 더욱 뚜렷이 나타났다. 특히 이 균주의 경우 상태가 호전되어 생장이 계속되었다.

Fig. 5-5는 *Bacillus vallismortis* TBM40-3을 접종하여 실험한 것으로 LP03의 경우와 비슷한 효과를 보이나 LP03에 비하여 활성적인 면이 약간 떨어지는 면은 있으나 이것도 농약을 사용한 positive control에 비하여 크게 나쁘지 않은 결과를 얻을 수 있었다. LP03 균주의 경우와 마찬가지로 TBM40-3 균주도 식물 병원균에 대한 유용한 방제균으로 사용될 수 있을 것으로 나타났다.

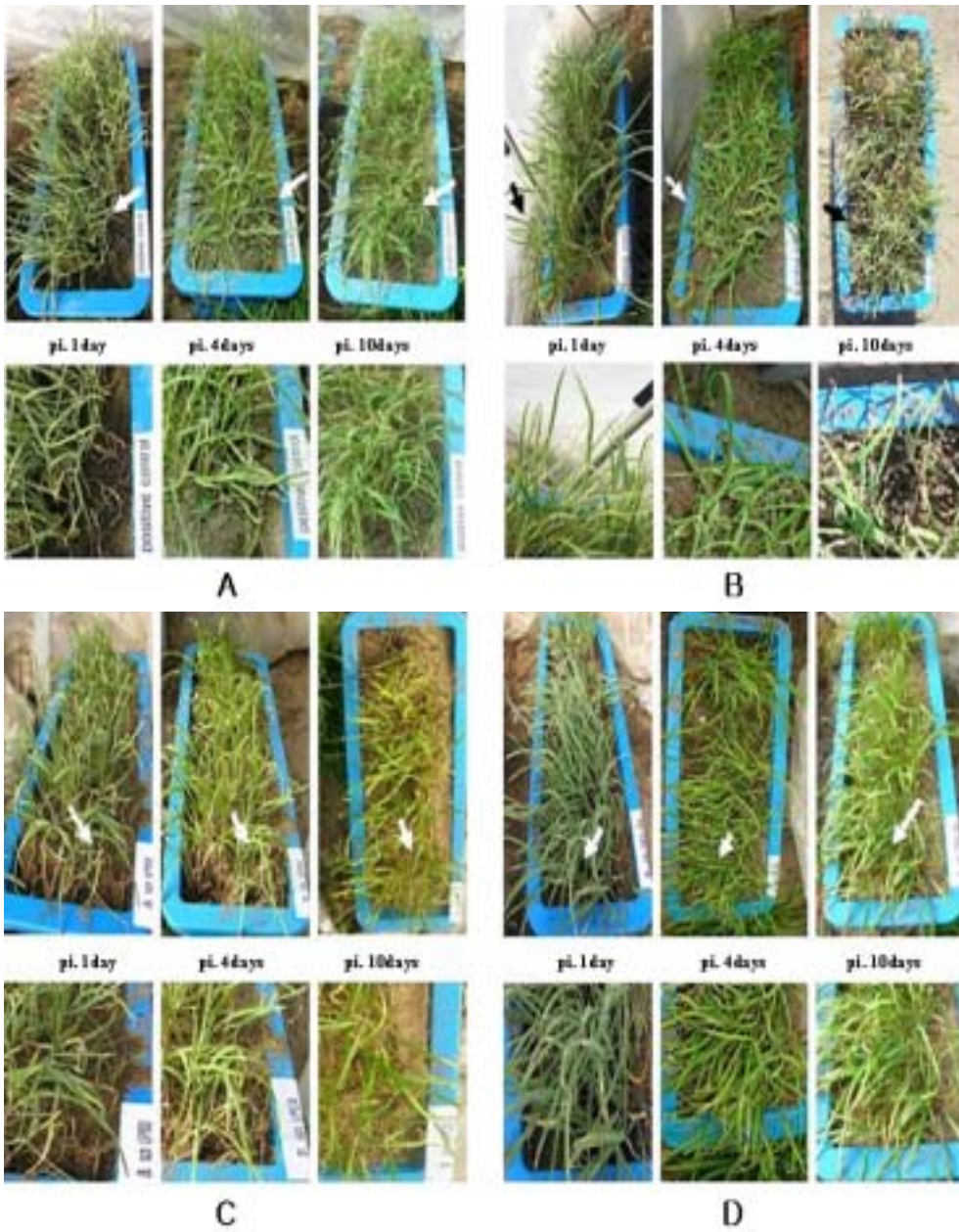


Fig. 5-3. Control effect of phytopathogenic fungi by *B. amyloliquifaciens* LP03 and *B. vallismortis* TBM40-3. (A : 스미랙스 수화제, B : dH₂O, C: TBM40-3, D: LP03)

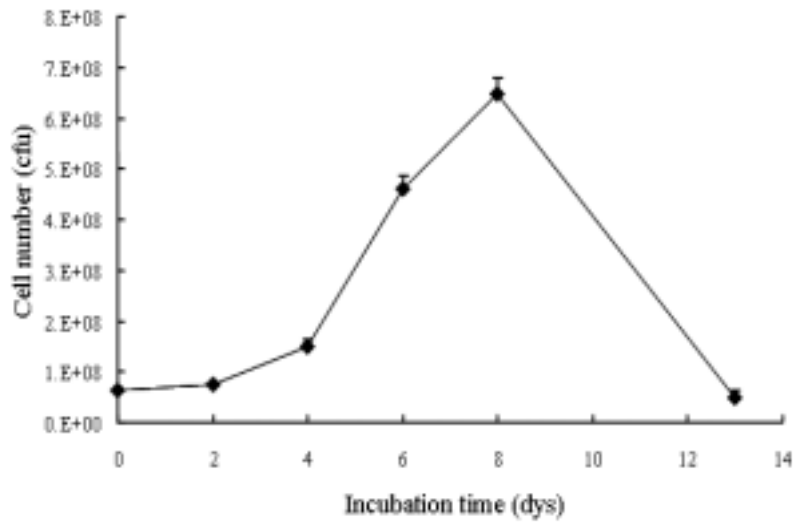


Fig. 5-4. Cell growth of *B. amyloliquefaciens* LP03 in soil cotamimated by gasoline.

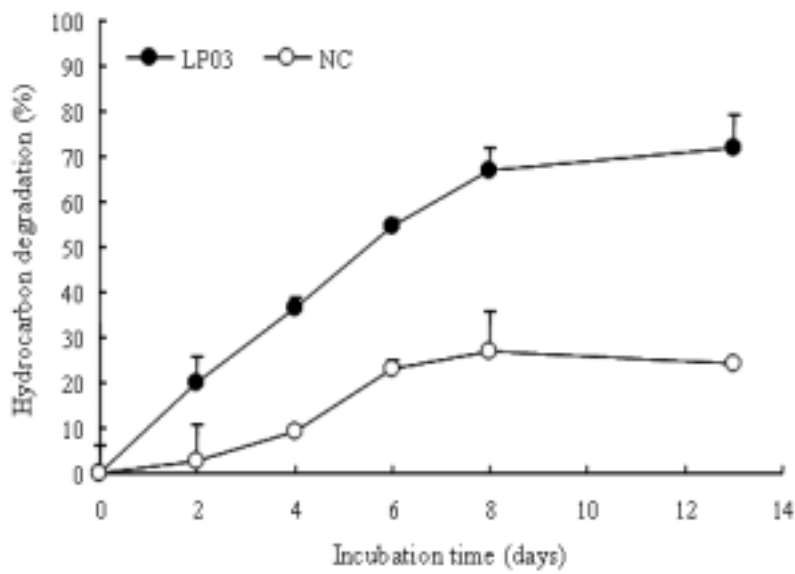


Fig. 5-5. Hydrocarbon degradation rate by *B. amyloliquefaciens* LP03 in soil contaminated by gasoline.

다. 폐유로 오염된 토양에서 유류성분 분해

Gasoline으로 오염된 토양에서의 균의 생육 정도를 확인하기 위해 cell counting 방법을 이용하여 균의 수를 측정하였다. 8일째 되는 날까지 꾸준한 성장을 하던 균이 13일이 되는 날 줄어든 것을 볼 수 있었다 (Fig. 5-6). 이는 hydrocarbon의 degradation과 비교하여 8일이 되는 날 이후로 더 이상 degradation이 급격히 일어나지 않는 것과 관계가 있는 것으로 보인다.

균의 oil 분해능을 측정하기 위해 Hydrocarbon 측정방법을 이용하여 oil의 분해정도를 측정하였다. 균을 투입하지 않은 tube에 비해 많은 양의 hydrocarbon이 degradation 된 것을 확인할 수 있었으며 마지막 날에 거의 75 %의 hydrocarbon이 줄어든 것을 볼 수 있다 (Fig. 5-7). 이러한 결과는 *B. amyloliquefaciens* LP03이 oil 분해력에 우수한 효과를 보여주는 것이다.

상기의 결과를 토대로 보았을 때 유류에 오염된 토양내에 균을 첨가하였을 때 식물의 성장 및 오염유류의 분해가 대조구에 비해 잘 이루어짐을 알 수가 있었으며, 이는 *B. amyloliquefaciens* LP03이 갖는 biosurfactant에 의한 것으로 판단된다. LP03은 lipopeptide인 iturin을 생산하는데, 이는 항진균 활성뿐 아니라 계면활성을 가지고 있다. 본 연구진은 유류에 오염된 토양에 미생물을 첨가한 후 토양 내에 미생물이 생존하면서 계면활성제를 생산하는지 확인하기 위해 northern blotting을 수행하여 iturin 생산 유전자의 전사산물 생산 여부를 확인하였다(Fig. 5-6). 유류오염 토양을 LP03으로 처리한 후 28 °C 10일간 배양한 후 토양으로부터 전 RNA를 추출하여 iturin 생합성 관련 유전자와 Northern Blotting 실험을 한 결과 배양 후 유전자 전사산물이 감소하다가 8일째 되는 날 iturin 생합성 관련 유전자가 확연히 검출(Fig. 5-6)되어 처리한 균이 유류를 분해하면서 토양에서 시간이 지남에 따라 생존률이 높음을 확인할 수 있었다.

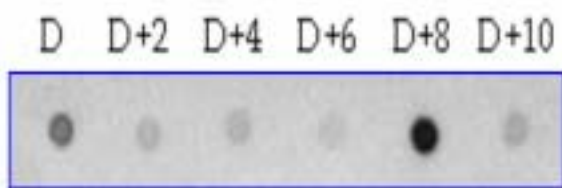


Fig. 5-6. The expression of *Itu IV* gene in soil.

라. 대량 배양 최적조건 확립

1) 탄소원으로 폐오일의 사용

Biosurfactant 생성능이 우수한 것으로 기 분리된 균주의 유화활성과 식물병의 항균활성이 확인된 특성을 이용하고자 우선 대량배양 조건을 확인 하였다. *Bacillus* 속 두 균주를 목적 세균으로 하여 각종 유류 중에서 등유 (WK: White Kerosine)와 식용유 (SBO : Soy Bean Oil)에서의 탄소원이용 최적조건을 우선 확립하였다. 나중 이용의 가치를 높이기 위해 탄소원을 2가지 (식용유, 등유)로 각종온도에서 검토하였다 (Fig. 5-7, 5-8).

Bacillus amyloliquefaciens LP03과 TBM40-3가 C-source로 SBO를 사용하면서 30 ℃, 200 rpm에서 배양할 때의 생육이 WK를 사용하였을 경우보다 매우 활발하였다. 생육 OD₆₁₀은 3차례 측정하여 평균값으로 결정하였으나, 반복 간에는 큰 차이가 없었다. 특히 LP03는 SBO에 탁월한 생육을 나타내어 이 균의 biosurfactant 생산과 미생물을 토양처리제 등으로의 사용 시에 대량배양을 위한 경제적 배지원으로 폐식용유를 탄소원으로 이용할 수 있음을 시사하였다.

식용유상에서의 생장

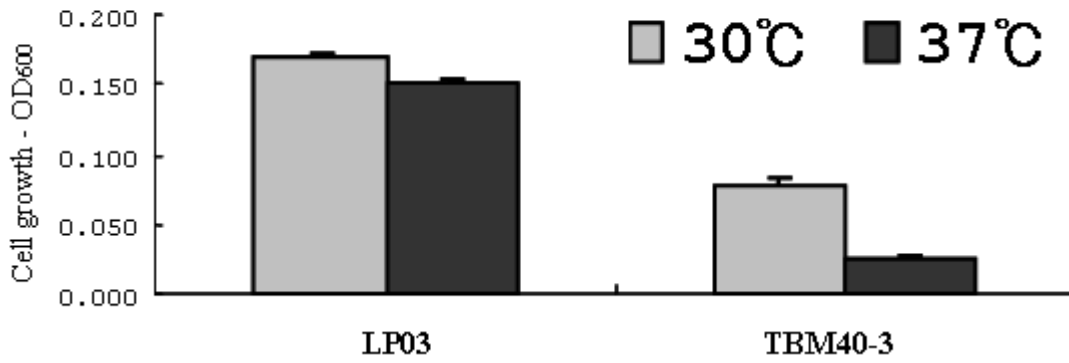


Fig. 5-7. Effect of *Bacillus* sp. growth by C-source(SBO).

등유상에서의 생장

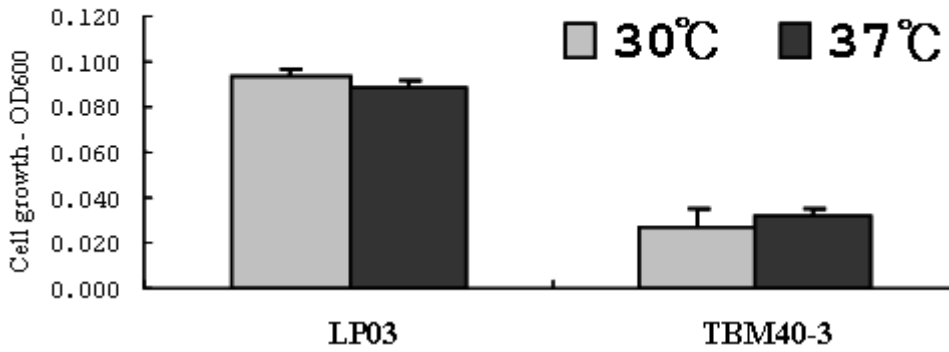


Fig. 5-8. Effect of *Bacillus* sp. growth by C-source(WK).

2) 탄소원에 따른 균의 생육도와 표면장력

다양한 탄소원에 따른 biosurfactant의 생산능력을 알아보기 위하여 기본배지인 LB액체 배지에 탄소원을 각각 0.1 % 되도록 첨가하여 72 시간 동안 배양하면서 일정한 시간 간격으로 배양상등액의 표면장력을 측정하였다. 그 결과 Fig. 5-9과 Fig. 5-10에서 보는 것과 같이 TBM40-3은 glucose를 탄소원으로 하여 배양하였을 경우 배양 36 시간 후에 표면장력이 28 mN/m으로 가장 낮았으며, 그 외에 다양한 기질을 탄소원으로 하였을 경우에도 배양 9 시간째에 표면장력이 비교적 낮은 29 mN/m까지 저하되는 것을 관찰하였다. 또한 이러한 표면장력의 저하는 배양 60 시간 이후에도 계속되는 것으로 나타났다. 따라서 *Bacillus vallismortis* TBM40-3은 다양한 탄소원을 이용하여 biosurfactant를 우수하게 생산해 낼 수 있다는 것을 보여준다.

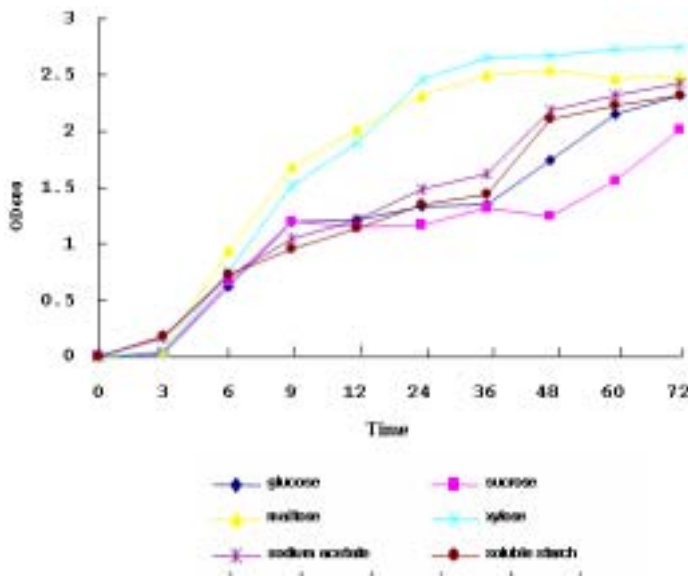


Fig. 5-9. Pattern of cell growth by culture of *Bacillus vallismortis* TB40-3.(The cultivation was performed in C-medium containing glucose, sucrose, maltose, xylose, sodium acetate, soluble starch, respectively)

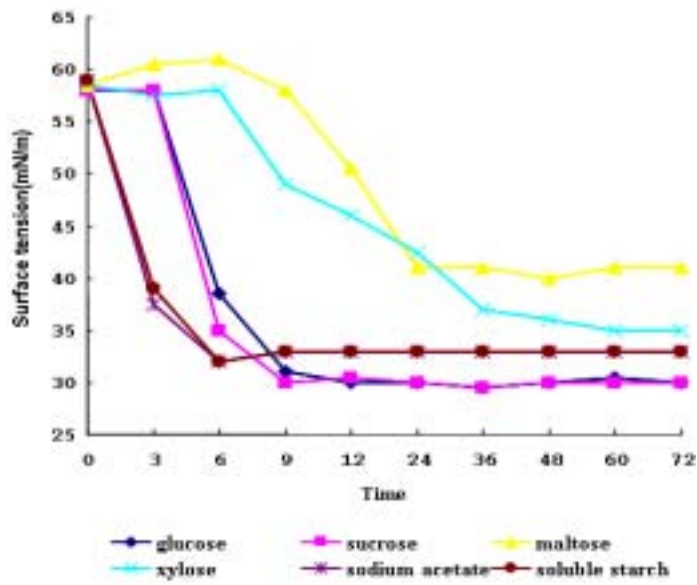


Fig. 5-10. Change of cell growth and patterns of biosurfactant production by cultivation times.

Fig. 5-11는 7L fermentor를 보여주고 있다. 여기에 값싼 배지 5 L를 사용하여 TBM40-3을 1/100 vol으로 접종하여 36시간 동안 배양을 하면서 pH와 DO를 확인 하였다(Fig. 5-12). DO(demand oxygen)는 균의 성장에 따라 소모되어 짐으로 시간이 지남에 따라 줄어들게 된다. pH의 경우 두 번째 배양에서 떨어지는 것을 보이는데 이것은 첫 번째 배양보다도 균의 생장이 잘 이루어지면서 그것에 따른 부산물로써 산성 물질이 나오는 것이다. 7 L의 배양의 정보를 바탕으로 100 L fermentor에 70 L 분량의 배지를 넣고, TBM40-3을 1/100 vol으로 접종하고, 36 시간 동안 균의 생육도를 측정한 결과 Fig. 5-13에 나타내었다. 2번째 배양에서 균이 훨씬 잘 생육하는 것을 볼 수 있었다. 앞으로는 다양한 값싼 기질 뿐만 아니라 균체의 수거량을 더 많이 증가 시킬 수 있는 배지의 성분을 검토하는 것이 필요하다.

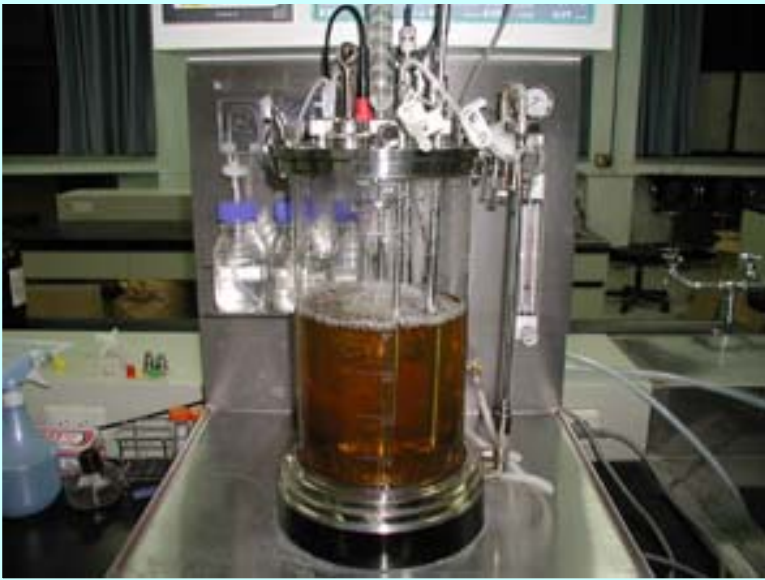


Fig. 5-11. Jar fermentor for scale up of microorganism.

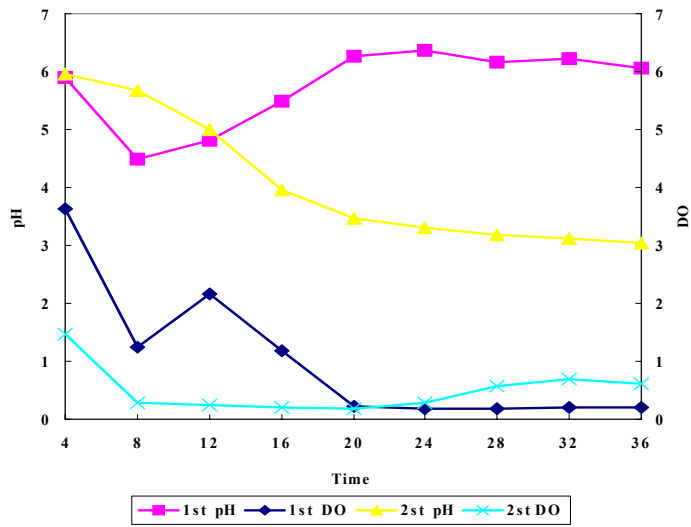


Fig. 5-12. The effect of pH and DO in fermentor by *Bacillus vallismortis* TBM40-3 culture.

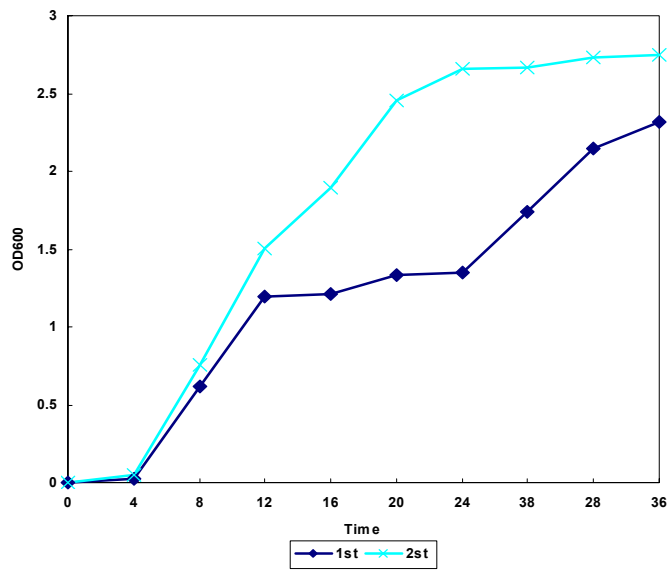


Fig. 5-13. Cell growth of *Bacillus vallismortis* TBM40-3 in 100 L fermentor.

대량배양용 최적 배지 및 경제적인 배지를 선별하여 배양 단가를 낮추기 위하여 곡물류, 농산 부산물 등을 대상으로 균주의 생육을 조사하며, 아울러 생물 활성도 조사하여 생육이 최대이면서 생물 활성이 가장 우수한 배양 조건을 확립한다. 성장 양상을 조사하기 위해 사용한 배지조성 (g/L)은 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 15 g, KH_2PO_4 3 g, NaCl 0.5 g, NH_4Cl 1 g, 멸균 전 pH는 7.4이며, CaCl_2 1 nM, casamino acid 0.2%가 되도록 121 °C에서 15분간 분리 멸균 후 첨가하였고, 탄소원으로 Glucose를 별도로 멸균한 후 3% 농도로 접종하였다. 전배양은 일정시간 배양한 균주를 백금이에 취하여 500 mL 용량의 플라스크에 멸균한 후 준비된 100 ml의 배지에 접종하고, 37 °C에서 180 rpm의 진탕속도로 24시간 진탕 배양하였다. 본 배양은 전 배양한 배양액을 7L 용량의 생물 배양기 (KoBioTech Co.Ltd.,Korea)에 멸균되어 준비된 5 L의 동일배지에 1 % (v/v)를 접종하여 전배양과 동일한 방법으로 2일간 배양하였다. 주기적인 시간에 따라 성장양상을 살펴보기 위하여 배양시간에 따른 pH 값의 변화(Fig. 5-12)와 Dilution method를 이용하여 평판 도말된 배지상에 나타나는 균주의 colony를 계수하였고, 분광광도계 (Helios β , Unucan, England)를 사용하여 흡광도 600 nm에서 변화 값을 측정하였다. 따라서 이 결과를 토대로 100 L 배양기에서 균을 배양하고, 총 균수를 계수한 결과를 Table 5-1에 나타내었다.

Fig. 5-14는 *Bacillus vallismortis* TBM40-3을 제제화 과정을 나타내고 있다. TBM40-3은 위의 대량배양 조건으로 배양을 하여 다음과 같은 과정을 거쳐 최종적으로 시제품 DA403을 만들었다. 균주를 순수분리해서 종균 배양을 하고, 7 L에서 seed culture를 해서 100L에서 대량 배양을 했다. 배양액을 원심분리를 하여 균체만 수거 하고, 균체에 여러 가지 증량제와 세포 보호제를 첨가하여 동결건조 과정을 거쳐 최종적으로 DA403을 만들었다. 개발된 시제품은 Fig. 5-15에 나타내었다.

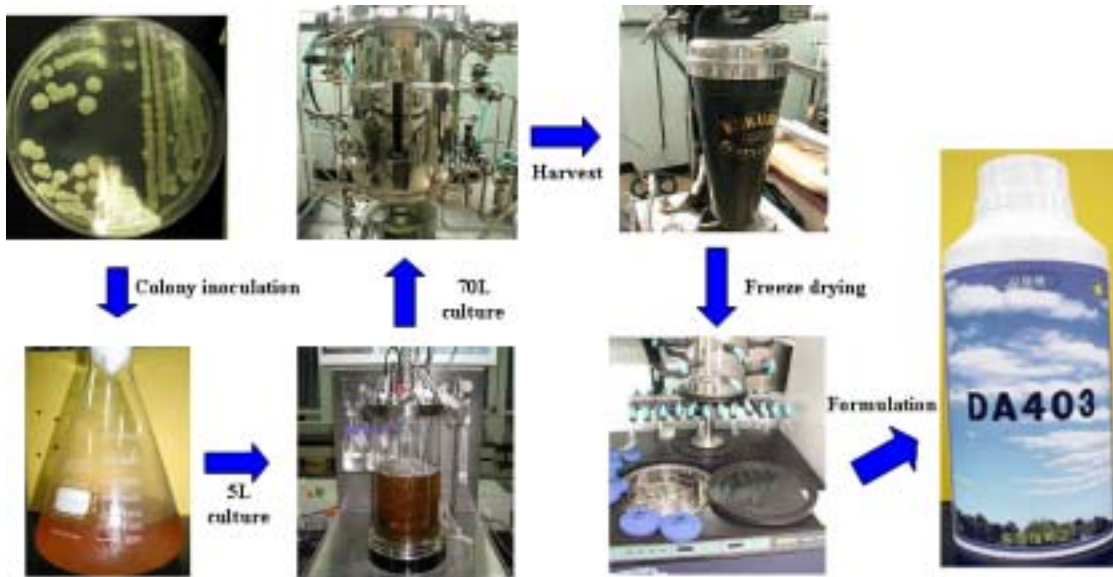


Fig. 5-14. Formulation of *Bacillus vallismortis* TBM40-3.

DA403

◆ **특성 및 효능**

1. DA403의 미생물은 토양에서 분리한 균주로 식물 병균성 균의 생육을 억제하여 식물의 생육을 촉진합니다.
2. DA403의 미생물은 항진균 효과 및 방부작용이 있는 lipopeptide를 생산합니다.
3. DA403은 토양의 오염물 유출 및 PHN을 분해하는 효과가 있는 환경과 미생물 제재입니다.
4. DA403은 화학노약과 대립된 효과를 가지며 화학노약의 대체 및 화학노약 과 농포도 가능 합니다.

신제품

DA403

동아대학교

Fig. 5-15. Product of microorganism formula.

3) *Bacillus vallismortis* TBM40-3의 제제의 안정성

본 미생물제제가 제품화 되어져서 유통과정에서의 고온 및 장기보관에 따른 제제화된 미생물의 장기 보존 및 생존 안정성을 위한 조사실험을 수행한 결과를 Table 5-1에 나타내었다. 그 결과, *Bacillus vallismortis* TBM40-3 제제의 생균수는 12개월 까지도 높은 수를 유지하므로 장기간 보존 및 유통에 있어서 안정성이 있으므로 미생물 정화 제제로서의 효용성을 가진다. 또, 균주 자체를 제제화 하였을 경우 물질 분리 등의 공정이 필요 없으므로 제제화에 따른 경제적인 비용이 줄어드는 장점이 있다.

Table 5-1. Changes in cell numbers of the product of microorganism formula

Periods	Viable cell counts of <i>Bacillus vallismortis</i> TBM40-3
after 1 months	$\approx 5.0 \times 10^9$ CFU/ml
after 2 months	$\approx 4.7 \times 10^8$ CFU/ml
after 6 months	$\approx 4.2 \times 10^8$ CFU/ml
after 12 months	$\approx 4.0 \times 10^7$ CFU/ml

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도(점수)
1차년도 (2003. 7. ~ 2004. 7.)	○ 신규 biosurfactant 생산 우수 균주 선발.	40
	○ Biosurfactant 생산 관련 유전자 획득.	30
	○ 최적 배양 조건 및 경제적 대량 생산법 확립.	30
2차년도 (2004. 7. ~ 2005. 7.)	○ 계면 활성 및 항균 활성의 검정.	30
	○ 신규 biosurfactant의 확인	40
	○ Biosurfactant 생산 관련 유전자의 기능 분석	30
3차년도 (2005. 7. ~ 2006. 7.)	○ 분리 정제 및 구조 확인.	30
	○ 유류분해 신규 유전자 추가 획득 및 분자적 해석	30
	○ 온실 및 포장 실험에 의한 효과 검정.	40
최종평가	○ 특허 출원 및 논문.	40
	○ 신규 biosurfactant 생산능 우수 균주의 개발.	10
	○ 신규 biosurfactant 생산 관련 유전자의 기능 분석.	20
	○ 온실 및 포장에서의 효과 검정.	30

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도 및 기대효과

1. 기술적 측면

- 1) 생분해성, 환경 친화적 계면 활성제의 개발 기술 확립.
- 2) 환경 생태계 보전과 국민 건강 증진을 위한 환경 미생물 자원 탐색과 biosurfactant 이용 기술 개발.
- 3) 환경 친화적 농경지 토양 오염 제거능 및 생물학적 병해충 방제능 등의 복합 기능을 가진 미생물 처리제 개발 기술의 확립.
- 4) Biosurfactant 생산 관련 대사기구의 규명 및 관련 유전체의 기능적 분석.

2. 경제 · 산업적 측면

- 1) 환경 친화형 환경 미생물의 산업화 조기 실현으로 그린라운드에 대처
- 2) 미래형, 생분해성 계면 활성제의 개발로 화학 계면활성제의 수입 대체 효과 및 환경 친화적이며 고부가가치 신규 biosurfactant 제품의 산업화
- 3) 길항 미생물의 생물 농약 개발 완료시 부가가치 창출 가능
 - 국내외적으로 미생물 농약 시장의 증가 추세이므로, 농가 부산물 및 각종 폐유를 이용한 배지로 대량 배양 시스템의 체제 개발로 생산 단가를 경제성 있게 하여 충분한 경쟁력 향상이 가능함
- 4) 다양한 병원균에도 적용 가능하여 신규 미생물 농약 개발에서의 부가가치 발생이 기대됨

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 결과의 활용

1. 특허출원 및 상품화

가. 토착 미생물 유래의 유용미생물에 대한 기능적 고찰을 통한 특허출원

나. 우수한 biosurfactant 생성능을 가지는 유용미생물 개발은 과련 기업체를 통한 제제화

다. 우수한 기능을 가지는 biosurfactant를 경제적으로 분리하여 과련 기업체를 통한 제제화

2. 논문발표

가. 우수한 biosurfactant 생성 미생물의 특성과 항진균 및 유류 분해 특성.

나. 우수한 biosurfactant 생성 미생물로부터 biosurfactant 분리 및 기능 검토.

다. 우수한 biosurfactant 이용하여 Field에 적용.

제 2 절 활용 계획

1. 본 연구 과제에서 얻어진 계면활성제 생산 과련 신규 유전자를 형질 전환시킨 균종을 특허로 출원하게 될 것이며 필요한 산업체에 기술 이전이 가능할 것이다.

2. 과련 학문 분야의 기초 자료뿐만 아니라 친환경 계면 활성제로 필요로 하는 식품 및 화장품 산업에의 응용 기술에 활용되어질 수 있다.

3. 친환경 생물 농약으로의 개발도 가능하여 복합 기능을 가진 미생물 제재로의 개발이 가능하다.

4. 본 연구 과제에서 얻어진 신규 biosurfactant 생산 균주 및 대량 생산 기술 방법 등은 특허로 출원하게 되므로 본 기술을 필요로 하는 연구자 및 기업에 기술 이전 또는 상품화가 가능할 것이다.

5. Biosurfactant 생성균주의 환경정화에 응용방안 모색

제 6 장 해외과학기술정보

해당사항 없음

제 7 장 참고문헌

- [1] Ajdic, D., McShan, W. M., McLaughlin, R. E., Savic, G., Chang, J., Carson, M. B., Primeaux, C., Tian, R., Kenton, S., Jia, H., Lin, S., Qian, Y., Li, S., Zhu, H., Najjar, F., Lai, H., White, J., Roe, B. A., Ferretti, J. J. 2002. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**, 14434-14439.
- [1] Arima, K., A. Kakinuma, and G. Tamura. 1968. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**, 488-494.
- [2] Baek, K. H., H. S. Kim, S. H. Moon, I. S. Lee, H. M. Oh, and B. D. Yoon. 2004. Effects of soil types on the biodegradation of crude oil by *Nocardia* sp. H17-1. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 901-905.
- [3] Banat, I. M. 1995. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal—state of the art. *Acta. Biotechnol.* **15**, 251-267.
- [4] Barford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- [5] Bechard, J., K. C. Eastwell, P. L. Sholber, G. Mazza, B. Skura. 1998. Isolation and partial chemical characterization of an antimicrobial peptide produced by a strain of *Bacillus subtilis*. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 5355-5361.
- [6] Beebe, J. L., and Umbreit, W. W. 1971. Extracellular lipid of *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Bacteriol.* **108**, 612-515.
- [1] Borjana K. Tuleva, George R. Ivanov and Nelly E. Christova., 2002. Biosurfactant Production by New *Pseudomonas putida* Strain. *Z. Naturforsch*, **57c**, 356-360.
- [7] Calvo, C., Martinez-C., F., Mota, A., Bejar, V., and Quesada, E. 1998. Effect of cations, pH and sulfate content on the viscosity and emulsifying activity on the

Halomonas eurihalina. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 205-209.

- [6] Cha, J. Y., B. G. Kim, S. Y. Chung, Y. S. Cho, Y. L. Choi and Y. L. Lee. 1999. Characterization of crude oil degradation by *Klebsiella* sp. KCL-1 isolated from sea water. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 452-457.
- [11] Choi, S. Y., C. S. Kim, M. H. Lee, M. O. Hwang, and K. H. Min. 1991. Octane biodegradability by crude oil-utilizing bacteria carrying OCT plasmid. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 82-87.
- [7] Choi, W. S., E. H. Lee, E. H. Shim, J. S. Kim, H. W. Ryu, and K. S. Cho. 2005. Bacterial communities of biofilms sampled from seepage groundwater contaminated with petroleum oil. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 952-964.
- [12] Chopineau, J., F. D. Muccafferty, M. Therisod, and A. M. Klibanov. 1988. production of biosurfactant from sugar alcohol and vegetable oils catalized by lipase in a nonaqueous medium. *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 208-214.
- [8] Chun, J., and K. S. Bae. 2000. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial gyrA gene sequence. *Antonie van Leeuwenhoek.* **78**, 123-127.
- [9] Cirigliano, M. C. and G. M. Carman. 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 747-750.
- [10] Cirigliano, M. C. and G. M. Carman. 1985. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 846-850.
- [12] Davila, A. M., Marchel, R., Vandecasteele J. P. 1997. Sophorose lipid fermentation with differentiated substrate supply for growth and production phases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 496-501.
- [13] Desai, J. D. and I. M. Banat. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Micrbiol. Molecul. Biol. Rev.* **61**, 47-64.
- [14] Duitman, E. H., Hamoen, L. W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt, M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F., Vater, J. 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 13294-13299.
- [15] Eppard, M., W. E. Krumbein, C. Kock, E. Rhiel, J. T. Sraley, and E. Stackebrandt. 1996. Morphological, physiological, and molecular characterization of actinomycetes isolated from dry soil, rocks, and monuments surfaces. *Arch. Microbiol.* **166**, 12-22

- [16] Foulger D., Errington J. 1998. A 28 kbp segment from the spoVM region of the *Bacillus subtilis* 168 genome. *Microbiol.* **144**, 801-805.
- [17] Georgiou G., S. C. Lim and M. M. Sharma. 1992. Surface-active compounds from microorganisms. *Bio/technol.* **10**, 60-65.
- [18] Gerhardt, P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow, and E. W. Wester. 1981. Manual of methods for general bacteriology. *American Society for Microbiology, N. Y.*
- [19] Gray, J. P., and R. P. Herwig. 1996. Phylogenetic analysis of the bacterial of the bacterial communities in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4049-4059.
- [20] Greek, B. F. 1991. Sales of detergents growing despite recession. *Chem. Eng. News.* **69**, 25-52.
- [21] Helgason, E., Rilstone, J., Wu, M., Kolonay, J. F., Beanan, M. J., Dodson, R. J., Brinkac, L. M., Gwinn, M., DeBoy, R. T., Madpu, R., Daugherty, S. C., Durkin, A. S., Haft. D. H., Nelson, W. C., Peterson, J. D., Pop, M., Khouri, H. M., Radune, D., Benton, J. L., Mahamoud, Y., Jiang, L., Hance, I. R., Weidman, J. F., Berry, K. J., Plaut, R. D., Wolf, A. M., Watkins, K. L., Nierman, W. C., Hazen, A., Cline, R., Redmond, C., Thwaite, J. E., White, O., Salzberg, S. L., Thomason, B., Friedlander, A. M., Koehler, T. M., Hanna, P. C., Kolsto, A. B., Fraser, C. M. 2003. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. **423**, 81-86.
- [22] Huang, C. C.,A. Takashi, and S. Makoto. 1993. Nucleotide sequence and characteristics of the gene, lpa-14, responsible for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis* RB14. *J. Ferment. Bioengin.* **76**, 445-450.
- [23] Hwang, K. A, J. R. Lee, S. J. Kim, Y. S. Kim, and H. J. Ahn. 1999. Surface activity and enviromental characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* JRT-4. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 159-165.
- [24] Hourdou, M. L., and F. Besson. 1994. Surfactin et antibiotiques ituriniques :structure prorietyes et biosynthese des lipopeptides de *Bacillus subtilis*. *Reg. Biochim.* **1**, 35-42.
- [25] Joel Chopineau, Frank D. McCafferty, Michal Therlsod, and Alexander M. Kllbanov., 1988. Production of Biosurfactants from Sugar Alcohols and Vegetable Oils Catalyzed by Lipase in a Nonaqueous Medium. *Biotechnol. Bioengin.* **31**, Pp.

208-214.

- [26] John, G. H., N. R. Krieg, and P. H. A. Sneath. 1994. Bergey's manual of systematic bacteriology. 9th ed. *Williams and Wilkins, Baltimore*.
- [27] Kaeppli, O., and Finnerty W. R. 1980. Characteristics of hexadecane partition by the growth medium of *Acinetobacter* sp. *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 495-501.
- [28] Kakinuma, A., A. Ouchida, T. Shima, H. Sugino, M. Isono, G. Tamura, and K. Arima. 1969. Conformation of the structure of surfactin by mass spectrometry. *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1669-1671.
- [29] Kalinovskaya, N. I., T. A. Kuznetsova, E. P. Ivanova, L. A. Romanenko, V. G. Voinov, F. Huth, and H. Laatsch. 2002. Characterization of surfactin-like cyclic depsipeptides synthesized by *Bacillus pumilus* from Ascidian *Halocynthia aurantium*. *Mar biotechnol. (NY)*. **4**, 179-188.
- [30] Kaplan, N., and Rosenberg E. 1982. Exopolysaccharide distribution and bioemulsifier production in *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 1335-1341.
- [31] Katz, E., A. L. Demain. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis and possible functions. *Bacteriol. Rev.* **41**, 449-474.
- [32] Kim, H. J., B. J. Kim, J. Y. Kong, and H. S. Koo. 2000. Isolation and characterization of oil degrading bacteria from south sea of korea. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 27-34.
- [33] Kim, H. J., B. J. Kim, S. D. Ha, S. H. Hwang, and J. Y. Kong. 1999. Degradation of crude oil and purification of biosurfactant from marine bacterium *Pseudomonas* sp. CHCS-2 *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 192-197.
- [34] Kim, J. S., Powalla, M., Lang, S., Wagner, F., Lunsdorf, H, Wray, V. 1990. Microbial glycolipid production under nitrogen limitation and resting cell conditions. *J. Biotechnol.* **13**, 257-266.
- [35] Kim, S. H., B. D. Yoon, C. H. Lee, H. Y. Seo, H. M. Oh, T. Katsuragi, and Y. Tani. 1997. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *J. Ferment. Bioengin.* **28**, 71-75.
- [36] Kim, S. H., E. J. Lim, S. O. Lee, J. D. Lee and T. H. Lee. 2000. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. *Biotech. Appl. Biochem.* **31**, 249-253.
- [37] Kim, S. H., and K. T. Jang. 2001. Protein Experiment note. A revised ed. *World Science Press*.

- [38] Kim, S. W., J. S. Yoo, S. C. Lee, Y. S. Cho, Y. C. Lee, and Y. L. Choi. 2001. Isolation of oil-degrading bacterium, *Providencia rettgeri* 4A3 and characterization of crude oil degradation. *Kor. J. Life Science*. **11**, 530-536.
- [39] Kluge, B., J. Vater, J. Salnikow, and K. Eckart. 1989. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC21332. *FEBS Lett.* **231**, 107-110.
- [40] Konz, D., Doekel, S., and Marahiel, M. A. 1999. Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. *J. Bacteriol.* **181**, 133-140.
- [41] Konz, D. and Marahiel, M. A. 1999. How do peptide synthetases generate structural diversity. *Chem. Biol.* **6**, 39-48.
- [42] Kretschner, A., H. Bock, and F. Wagnee. 1982. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkane. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 864-870.
- [43] Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, and A. Danchin, et al. 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. **390**, 249-56.
- [44] Kuske, C. R., S. M. Bams, and J. D. Busch. 1997. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3614-3621
- [46] Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685.
- [47] Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C., and Walsh C. T. 1996. A new enzyme superfamily-the phosphopantetheinyl transferases. *Chem. Biol.* **3**, 923-936.
- [48] Lee, C. H., H. S. Kim, H. H. Suh, S. H. Choi, H. M. Oh, and B. D. Yoon. 1997. Microbial degradation of arabian light crude by *Acinetobacter* sp. A54. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 520-526.
- [49] Lee, S. C., Y. J. Jung, J. S. Yoo, Y. S. Cho, I. H. Cha and Y. L. Choi. 2002. Characteristic of biosurfactants produced by *Bacillus* sp. LSC11. *Kor. J. Life Science*. **12**, 745-751.

- [50] MacFaddin, J. F. 1984. *Biochemical Tests for Identification for Medical Bacteria*, 2nd ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
- [51] Magaritis A., K. Kennedy, J. E. Zajic, and D. F. Gerson. 1979. Biosurfactant Production by *Nocardia erythropolis*. *Dev. Ind. Microbiol.* **20**, 623–630.
- [52] Marahiel, M. A., Nakano, M. M., and Zuber, P. 1993. Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Mol. Microbiol.* **7**, 631–636.
- [53] Menkhaus, M., Ullrich, C., Kluge, B., Vater, J., Vollenbroich, D., and Kamp, R. M. 1993. Structural and functional organization of the surfactin synthetase multienzyme system. *J. Biol Chem.* **68**, 7678–7684.
- [54] Michael C. Cirigliano and George M. Carman., 1984. Isolation of Bioemulsifier from *Candida Lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 747–750.
- [55] Morikawa, M., Y. Hirata, and T. Imanaka. 2000. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochem. Biophys. Acta.* **1488**, 211–218.
- [56] Mulligan, C. N., G. Mahmoudides, and B. F. Giggs. 1989. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biotech.* **12**, 199–210.
- [57] Rahman, K. S. M., I. M. Banat, J. Thahira, Tha. Thayumanavan, P. Lakshmanaperrumalsamy. 1999. Bioremediation of gasolin contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresource Technol.* **81**, 25–32.
- [58] Parkinson, M. 1985. Bio–surfactant. *Biotechnol. Adv.* **3**, 65–83.
- [59] Reuter, K., Mofid M. R., Maraahiel, M. A., and Ficner, R. 1999. Crystal structure of the surfactin synthetase–activating enzyme sfp: a prototype of the 4′–phosphopantetheinyl transferase superfamily. *EMBO J.* **18**, 6823–6831.
- [60] Reva, O. N., C. Dixelius, J. Meijer, and F. G. Priest. 2004. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**, 249–259.
- [61] Rheinheimer, G. 1981. *Microbiologic der gewalsser*. 3rd. ed. p. 251. gustav Fischer Verlag Stuttgart.
- [62] Ron, E. Z., and E. Rosenberg. 2001. Natural roles of biosurfactant. *Environ. Microbiol.* **3**, 229–236.
- [63] Rosenberg, E., and E. Z. Ron. 1999. High– and low–molecular–mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 154–162.

- [64] Santos, L. G., O. Kappeli, and A. Fiechter. 1982. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as a sole carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 864-870.
- [65] Sarah J. Macnaughton, John R. Stephen, Albert D. Venosa, Gregory A. Davis, Yun-Juan Chang, and David C. White. 1999. Microbial Population Changes during Bioremediation of an Experimental Oil Spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 3566-3574.
- [66] Schulz, D., A. Passeri, M. Schmidt, S. Lang, F. Wagner, V. Wray, and W. Gunkel. 1991. Marine biosurfactants, I. Screening for biosurfactants among crude oil degrading marine microorganism from the North Sea. *Z. Naturforsch.* **46**, 167-203.
- [67] Shaw, A. 1994. Surfactants-94. *Soap Cosmet. Chem. Specialities* **70**, 24-30
- [68] Siefert, J. L., Larios-Sanz, M., Nakamura, L. K., Slepecky, R. A., Paul, J. H., Moore E. R., Fox, G. E., and Jurtshuk, P. Jr. 2000. Phylogeny of marine *Bacillus* isolates from the Gulf of Mexico. *Curr. Microbiol.* **41**, 84-88.
- [69] Son, H. J., S. H. Go, G. Lee, and S. J. Lee. 1996. Emulsification of crude oil by *Acinetobacter* sp. SH-14. *Kor. J. Microbiol.* **34**, 363-369.
- [70] Soon-Wo Kwon, Chang-Yung Kim, Jin-Chang Ryu and Seung-Joo Go., 2002. Phylogenetic analysis of the genera *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, and *Sinorhizobium* on the basis of internally transcribed spacer region. *Kor. J. Soil Sci. & Fert.* **35**, 12-26.
- [71] Stachelhaus, T. and Marahiel, M. A. 1995. Molecular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS. Microbiol Lett.* **125**, 3-14.
- [72] Suk, W. S., H. J. Son, G. Lee, and S. J. Lee. 1999. Purification and characterization of biosurfactants produced by *Pseudomonas* sp. SW 1. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 56-61.
- [73] Suzuki, T., Hayashi, K., Fujikawa, K., Tsukamoto, K. 1965. The chemical structure of polymyxin E. The identities of polymyxin E1 with colistin A and polymyxin E2 with colistin B. *J. Biol. Chem.* **57**, 226-227.
- [74] Symmank, H., P. Franke, W. Saenger, and F. Bernhard. 2002. Modification of biologically active peptides: production of a novel lipopeptide after engineering of *Bacillus subtilis* surfactin synthetase. *Protein Engin.* **15**, 913-921.
- [75] Tsuge, K., Ano, T., and Shoda, M. 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.

- [76] Tsuge, K., Ano, T., and Shoda, M. 2001. Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *J. Bacteriol.* **183**, 6265–6273.
- [77] Touchstone, J. C. 1992. Practice of thin layer chromatography. pp. 166. 3rd. ed. John Wiley & Sons, Inc.
- [78] Wei, Y. H., and Chu, I. M. 1998. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Enzyme. Microb. Technol.* **22**, 724–728.
- [79] Wise, W. G., J. V. McArthur, and L. J. Skimkets. 1997. Bacterial diversity of a Carolima bay as determined by 16S rRNA gene analysis: confirmation of novel taxa. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1505–1514.
- [80] Woo, S. H., and J. M. Park. 2004. Biodegradation of aromatic compound from soil by drum bioreactor system. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 435–441.
- [81] Yakimov, M. M., K. N. Timmis, V. Wray, and H. L. Fredrickson. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1706–1713.
- [82] Yoo, D. S., B. S. Lee, and E. K. Kim. 2005. Characteristics of microbial biosurfactant as an antifungal agent against plant pathogenic fungus. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 1164–1169.
- [83] Zajic, J. E., H. Guignard, and D. F. Gerson. 1977. Properties and biodegradation of a bioemulsifier from *Corynebacterium hydrocarboclitatus*. *Biotechnol. bioeng.* **19**, 1303–1302.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.