



Bacillus subtilis Complex BC1212에서 생산된 Surfactin의 시험관내 항균활성 및 토끼에서 일차피부자극시험

황미현¹ · 윤효인² · 임종환² · 김길수¹ · 이만휘¹ · 김남우³ · 김종춘⁴ · 박승춘¹

¹경북대학교 수의과대학, ²전남대학교 수의과대학, ³대구한의대학교, ⁴전남대학교 수의과대학

Antibacterial Activity *In Vitro* and Primary Dermal Irritation Test in Rabbits of Surfactin Produced *Bacillus subtilis* Complex BC2121

Mi-Hyun Hwang¹, Hyo-In Yun², Jong-Hwan Lim², Kil-Soo Kim¹, Man-hee Rhee¹,
Nam-Woo Kim³, Jong-Choon Kim⁴ and Seung-Chun Park¹

¹College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701

²College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-361

³Department of Herbal Biotechnology, Daegu Haany University, Gyeongsan

⁴College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Received January 10, 2005; Accepted March 10, 2005

ABSTRACT. The present study was carried out to investigate the antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* with antibiotic-resistance *in vitro* and the skin irritation in rabbits with surfactin produced by *Bacillus subtilis* Complex BC1212. The antibacterial activities of selected antimicrobial agents (surfactin, amoxicillin, colistin, norfloxacin and streptomycin) were evaluated by using the broth microdilution method. As the results, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the surfactin was less than 15.6 µg/ml. In the skin irritation test, two out of 4 rabbits showed very slight edema at 24 h after the administration of surfactin, and then recovered at 72 h. The change of body weight was normal during the skin irritation test. The primary irritation index in accordance with the Draize evaluation of topical reaction was calculated to be "0.125", which meant not irritating. Based on these results, it could be concluded that the test agent, surfactin, was a non-irritant. We could also think that the surfactin may be useful for the treatment of *S. aureus* infections such as bovine mastitis.

Keywords: Antibacterial activity, Dermal irritation study, Primary irritation index, Rabbits, Surfactin.

서 론

최근 가축에서 질병 예방 및 치료를 위한 항생제의 사용은 점차 증가하고 있으며, 이로 인하여 많은 부작용이 발생하고 있다. 따라서 세계적으로 가축에서의 항생제 사용을 제한하는 움직임과 함께 항생제가 들어있지 않은 축산물에 대한 소비자들의 관심이 높아지고 있다. 이러한 축산물을 생산하기 위해서 항생제 대신에 사용할 생균제, 효소제, 유기산제, 식물추출물 그리고 식물정유 등 천연소

재에 대한 연구개발이 크게 증가하고 있다.

Surfactin은 미생물이 생산하는 물질로 Kakinuma *et al.*(1969)이 처음으로 그 구조식이 마크로라이드 계열의 lipopeptide라는 사실을 처음 밝혔다. Surfactin이 발견된 이후 많은 새로운 생리활성작용이 보고되었다. Arima *et al.*(1968)은 surfactin이 피브린의 응고를 억제하는 기능이 있다는 사실을 처음 밝혔다. 이러한 항혈전작용 이외에도 surfactin에 대한 항균작용, 항암작용 그리고 콜레스테롤 저하작용이 보고되었다(Tsakagoshi *et al.*, 1970; Imai *et al.*, 1971; Kameda *et al.*, 1972).

1980년대에는 환경 및 생명공학 측면에서 surfactin에 대한 연구가 시작되었다. 유전공학기법의 발달과 발효기술의 발전에 따라 surfactin의 대량생산이 가능해져 이 물

Correspondence to: Seung-Chun Park, Laboratory of Veterinary Pharmacology and Toxicology, College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea
E-mail: parksch@knu.ac.kr

질을 환경에 적용하기 시작하였으며 이와 더불어 의학적인 관점에서 이 물질에 대한 많은 약리학적인 연구가 이루어져 왔다. Kim *et al.*(1998)은 *Bacillus subtilis* C9으로부터 분리된 surfactin이 혈소판의 세포액내의 phospholipase A2(PLA2)을 억제하여 arachidonic acid의 생성을 근본적으로 억제하고 염증매개인자의 형성을 억제하는 항염증작용이 있는 것으로 보고하였다.

본 실험에서는 발효 매주로부터 강력한 항혈전작용을 갖는 물질을 생산하는 *Bacillus subtilis* Complex BC1212 균주를 분리 및 동정하여 특허를 획득하였으며 분리된 균주를 배양하여 surfactin을 분리 및 정제하였다. 분리된 surfactin을 항생제 내성균주인 포도상구균에 대하여 항균활성을 처음으로 측정하였으며, 본 물질의 응용 가능성을 확인하기 위하여 토끼에서 피부자극성에 시험을 Draize *et al.*(1944)의 방법에 따라 평가하였다.

재료 및 방법

시험물질

본 시험에 사용한 surfactin은 매주에서 분리한 *B. subtilis* Complex BC1212 균주를 10 l의 Tryptic soy broth(Difco, USA)에 대량 배양한 후 원심분리(10,000 rpm, 20 min) 하였다. 원심분리 후 상층액은 3 l의 아세톤으로 추출하여 100 ml로 진공 농축하였다. 균체는 1 l의 아세톤을 첨가하여 추출한 후 진공 농축하여 앞서 농축한 상층액과 합쳐 동결건조를 실시하였다. 동결건조된 surfactin은 HPLC를 이용하여 surfactin의 함량과 생산량을 조사하였다. 그 결과, 발효액 1 l에는 surfactin이 500 mg이 함유되었다.

시험동물 및 사육환경

본 시험에서는 4 개월령의 New Zealand White 계통의 수컷 토끼를 호창상사(대구)로부터 구입하여 1주일간의 순화 및 검역을 거친 후 시험에 공시하였다. 본 계통의 토끼는 피부자극시험에 일반적으로 많이 사용되는 종으로서, 동일한 조건하에서 사람 피부보다 예민하게 반응하며 또한 비교적 풍부한 시험 기초자료가 있어 시험결과의 해석 및 평가가 용이하여 선택되었다. 입수 시 8마리(체중, 2.4 ± 0.2 kg)를 구입하여 피부에 이상이 없고 건강한 4마리를 선발하여 시험에 이용하였다. 사육조건은 온도 $22 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 20\%$, 환기횟수 12~15회/시간, 조명 150~300 Lux로 12시간(인공조명, 오전 8시~오후 8시)으로 하였으며, 순화, 검역 및 시험기간 동안 3단 4열의 사육 상자대에 배열된 스테인레스제 사육상자에 개체별로 수용하였다. 사육상자에는 시험번호와 동물번호를 기재한

개체식별카드를 부착하였다. 사료는 토끼용 고품사료(퓨리나 코리아, 평택)를, 물은 상수도수를 자유섭취 시켰다.

Surfactin의 항균활성

농축된 surfactin에 대한 항균활성을 조사하고자 한국 미생물보존센터로부터 항생제내성균주인 *Staphylococcus aureus* KCCM 40511(penicillin- and gentamicin-resistant), *S. aureus* KCCM 41294(tetracycline-, streptomycin-, and macrolide-resistant), *S. aureus* KCCM 40881(penicillin-sensitive), *S. aureus* KCCM 11593(penicillin-sensitive), *S. aureus* KCCM 40510(methicillin resistant), *S. aureus* KCCM 11812(penicillin-resistant)을 분양받아 tryptic soybean broth에 배양한 후 microdilution 방법(Geornaras and vonHoly, 2001)에 의하여 최소억제농도 (MIC, minimal inhibitory concentration)을 측정하였다. 또한 유방염이 걸린 우유에서 분리된 *S. aureus*에 대하여 같은 방법으로 MIC를 측정하였다. 대조 항생제로는 국내에서 젖소의 유방염에 사용되는 amoxicillin(AMX), colistin(COL), norfloxacin(NFLX) 그리고 streptomycin(STM)과 비교하였다.

일반증상 및 사망의 관찰

검역 및 순화기간에는 매일 1회씩 모든 동물에 대해 관찰하였고, 시험물질 적용기간에는 투여 전과 후에 1회씩 일반증상 및 사망의 유무에 관하여 관찰하였다. 단, 이상 증상이 발현되면 증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 개체별로 기록하였다.

체중측정

동물 입수 시와 시험물질 적용 전, 적용 후 1일 및 3일 째에 개체별 체중을 측정하였다.

피부자극시험

시험군의 구성 및 시험물질의 적용. 시험물질을 적용하기 위해 적용 전날에 동물의 배부(가로세로 약 15 cm 씩)를 동물용 전기제모기로 제모 하였다. 동물의 척추를 중심으로 좌우 각각 2개소(각각 찰과 및 비찰과 부위, 2.5 cm×2.5 cm 크기)를 설정하여, 좌측구획은 무처리 대조구획으로, 우측구획은 시험물질을 적용하는 처치구획으로 정하여 시험하였다. 찰과는 주사침을 이용하여 표피만 손상되고 출혈이나 진피에 손상이 가지 않을 정도로 "#" 모양으로 실시하였다. 투여 당일 surfactin 500 mg/ml를 우측의 찰과부위 1개소와 비찰과부위 1개소에 각각 0.5 ml를 적용하였고, 대조구획에는 처치를 하지 않았다. 적용 후 처치구획 및 대조구획을 거즈로 덮은 후 비자극성 테

이프로 잘 고정하여 24시간 동안 적용시켰다. 시험물질을 적용하고, 24시간 경과 후 잔류하는 시험물질을 제거하기 위해 미온수로 적용부위를 부드럽게 세정해 주었다.

적용부위의 관찰 및 자극성의 평가. 적용부위의 피부 반응 평가는 식품의약품안전청의 "의약품등의독성시험기준"에 표시된 피부반응의 평가기준에 따라 실시하였다. 24시간 동안 시험물질을 적용한 후 패취를 제거하여 24시간째(패취 제거 직후) 및 72시간째(패취 제거 후 48시간째)에 유발된 홍반(erythema)과 가피(eschar), 부종(edema) 등의 자극성 반응을 관찰하였다. 모세혈관의 울혈에 의한 피부 발적 등 여러 가지 원인으로 인하여 혈액에 의해 피부에 나타난 적색반응은 홍반으로 평가하였고, 부식작용 또는 괴저에 의하여 생긴 피부조직의 부육상태는 가피로 하였으며, 체액이 괴화조직에 축적되어 부어 오른 것은 부종으로 평가하였다. 결과에 대한 자극성의 정도 판정은 일반적으로 많이 이용되는 Draize *et al.*(1944)의 방법에 따라 일차피부자극지수(primary skin irritation index, PII)의 산출방법에 따랐다.

결과 및 고찰

최근에 기지의 화합물에 대한 새로운 약리효능이 알려지면서 기지의 안전한 화합물에 대한 다양한 용도의 개발은 신물질의 탐색만큼 중요한 분야를 차지하게 되었다. 이점에 착안하여 기지의 물질인 surfactin의 강력한 항염증작용과 *S. aureus*에 대한 항균작용은 소의 유방염치료에 있어서 치료제의 응용 가능성이 매우 높은 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서는 surfactin을 분리정제하여 항균제 내성균주인 *S. aureus*에 대한 항균효과시험을 실시하였으며 피부자극에 대한 유무를 확인하고자 하였다.

Surfactin의 항균작용

약물동태학적으로 surfactin은 lipopeptide의 구조를 갖고 있어 장내에서 흡수가 일어나지 않는다. 그럼에도 불구하고 최근 surfactin의 다양한 효능이 새롭게 밝혀지면서 surfactin을 포함한 기능성식품 및 의약품으로 그 이용가치가 크다고 할 수 있다. 특히 젖소 유방염 치료에 있어서 유방내 주입법은 약물의 흡수과정을 거치지 않기 때문에 응용이 가능하다. 무엇보다 젖소의 유방염에 가장 큰 문제점은 최근에 사용되는 항생제들로 유방염치료가 되지 않고 있다. 그 이유는 유방염의 원인균인 *S. aureus*의 항생제 내성 획득과 유방 내 심한 염증반응에 기인하는 것으로 생각된다.

본 연구에서는 항생제 내성균주인 *S. aureus*에 대한 surfactin의 항균활성 정도를 평가하기 위하여 항균제 내성을 갖은 균주를 한국미생물보존센터에서 분양 받아 항균활성을 측정하였으며, 그 결과를 Table 1에 요약하였다. Penicillin 감수성 균주인 *S. aureus* KCCM 11593과 MRSA(methicillin resistant *S. aureus*) 균주인 *S. aureus* KCCM 40510에서 AMX의 MIC 값이 두 균주 모두 0.1 µg/ml 이하로 나타났다. 그러나 STM과 COL은 250 µg/ml 이상의 높은 MIC 값을 보여주었다. 유방염 젖소에서 분리한 *S. aureus* KPU2003과 *S. epidermis* KPU2003 모두 항균제 내성 보유균과 같은 내성 양상을 보여주었다. Surfactin은 *S. aureus* KCCM 41294를 제외한 시험에 사용된 모든 균주에서 15 µg/ml 이하의 항균활성을 나타내었다. Surfactin이 항생제 내성균주인 *S. aureus*에 뛰어난 항균활성이 있다는 보고는 처음이며, 이러한 결과로부터 surfactin은 염증에 효과적인 항균물질 후보로 사료되었다. 따라서 염증을 동반하는 소의 유방염 치료에 응용할 수 있는 치료 후보물질로 생각되었으며 임상에 적용

Table 1. Antibacterial activity of surfactin against various *Staphylococcus aureus* with antibiotic-resistance

Bacterial strains	MIC (µg/ml) of various antimicrobial agents				
	SF	AMX	COL	NFX	STM
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 40511	7.8	125	>250	7.8	>250
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 41294	31.3	125	>250	>250	>250
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 40881	15.6	31.3	>250	31.3	>250
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 11593	15.6	<0.1	>250	7.8	>250
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 40510	15.6	<0.1	>250	7.8	>250
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 11812	15.6	125	>250	31.3	>250
<i>Staphylococcus aureus</i> KPU2003 ^a	15.6	7.8	>250	7.8	>250
<i>Staphylococcus epidermis</i> KPU2003 ^a	15.6	7.8	>250	7.8	>250

Staphylococcus aureus KCCM 40511, penicillin- and gentamicin-resistant; *Staphylococcus aureus* KCCM 41294, tetracycline-, streptomycin-, and macrolide-resistant; *Staphylococcus aureus* KCCM 40881, penicillin-sensitive; *Staphylococcus aureus* KCCM 11593, penicillin-sensitive; *Staphylococcus aureus* KCCM 40510, methicillin-resistant; *Staphylococcus aureus* KCCM 11812, penicillin-resistant.

^aClinically isolated strains from animals in Korea. SF, surfactin; AMX, amoxicillin; COL, colistin; NFX, norfloxacin; STM, streptomycin. MIC, Minimal inhibitory concentration.

Table 2. Clinical observations

Concentration (mg/ml)	Dose (ml)	N	Sex	Body weight (kg)		Weight gain (kg)	Clinical signs	Death rate
				Day 0	Day 7			
500	0.5	4	Male	2.35 ± 0.18	2.64 ± 0.13	0.29 ± 0.08	Normal	0/4

Values were expressed as Mean ± S.D.

하기 위하여 토끼에서 일차피부자극시험을 실시하였다.

으로 생각된다.

일반증상 및 사망률

토끼에서 시험물질의 1회 피부적용에 의한 일반증상 변화를 관찰한 결과(Table 2), 시험물질의 적용에 의한 이상증상이나 사망동물은 관찰되지 않았다. 시험물질 적용 후 식욕 부진(anorexia) 그리고 운동성감소(decreased locomotor activity)도 관찰되지 않았다. 시험기간 중 체중변화는 Table 2에서 보는 바와 같이, 시험물질 적용 후 1일째의 체중과 시험 종료일인 3일째 체중을 비교한 결과, 평균 0.29 kg이 증가하여 정상적인 체중증가를 나타내었다.

피부자극성의 평가

Surfactin은 젖소의 유방염치료에 응용이 가능한 물질이므로 상품화로 응용을 하기 이전에 surfactin의 일차피부자극성 잠재력을 평가하였다. 시험물질 적용 후 24시간 및 72시간째에 적용부위의 자극성을 평가한 결과는 Table 3에 요약하였다. 모든 동물의 대조구 및 처치구의 비찰과 구획에서는 어떠한 이상조건도 관찰되지 않았으나 찰과 구획에서는 시험물질 적용 후 24시간째에 2마리의 토끼에서 미약한 홍반증상을 보여주었다. 그러나 72시간째에는 모두 정상으로 회복되었다. 상기 결과를 이용하여 Draize *et al.*(1944)의 방법에 따라 일차피부자극성 정도를 평가한 결과, surfactin의 일차피부자극지수는 0.125로써 비자극성 물질로 평가되어 의학적 응용이 가능한 것

감사의 글

본 연구는 바이오그린 21사업 연구비로 진행되었으며 황미현은 BK21 지원사업 연구비로 지원되었습니다.

참고문헌

- Arima, K., Kakinuma, A. and Tamura, G. (1968): Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 488-494.
- Draize, J.H., Woodard, G. and Calvery, H.O. (1944): Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **82**, 377-390.
- Geornaras, I. and von Holy, A. (2001): Antimicrobial susceptibilities of isolates of *Staphylococcus aureus*, *Listeria* species and *Salmonella* serotypes associated with poultry processing. *Int. J. Food Microbiol.*, **70**, 29-35.
- Imai, Y., Sugino, H. and Takinuma, A. (1971): Hypocholesterolemic effect of surfactin, a novel bacterial peptide lipid. *Takeda Kenkyusho Ho.*, **30**, 728-734.
- Kakinuma, A., Hori, M., Isono, M., Tamura, G. and Arima, K. (1969): Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 971-972.
- Kameda, Y., Matsui, K., Kato, H., Yamada, T. and Sagai H.

Table 3. Effects of surfactin (500 mg/ml) on skin irritation in rabbits

Site	Control site								Test site							
	Erythema & eschar				Edema				Erythema & eschar				Edema			
	Intact		Abraded		Intact		Abraded		Intact		Abraded		Intact		Abraded	
Phase (hrs)	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72
No. 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
No. 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
No. 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No. 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean score	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0	0	0	0	0
ΣMean score	0				0				0.5				0			
Total	0								0.5							
P.I.I.	0								0.125							

P.I.I. : primary irritation index=total/4.

(1972): Antitumor activity of *Bacillus natto*. 3. Isolation and characterization of a cytolytic substance on Ehrlich ascites carcinoma cells in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 1126. *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 1551-1557.

Kim, K., Jung, S.Y., Lee, D.K., Jung, J.K., Park, J.K., Kim, D.K. and Lee, C.H. (1998); Suppression of inflammatory responses by surfactin, a selective inhibitor of platelet

cytosolic phospholipase A2. *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 975-985.

Tsukagoshi, N., Tamura, G. and Arima, K. (1970): A novel protoplast-bursting factor (surfactin) obtained from *Bacillus subtilis* IAM 1213. II. The interaction of surfactin with bacterial membranes and lipids. *Biochim. Biophys. Acta.*, **196**, 211-214.