

## *Bacillus subtilis* MJP10이 생산하는 Bacteriocin-Like Substances

양은주 · 장해춘\*  
조선대학교 식품영양학과

**Characterization of Bacteriocin-Like Substances Produced by *Bacillus subtilis* MJP1.** Yang, Eun Ju and Hae Choon Chang\*. Department of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea – The MJP1 bacterial strain, which possesses antifungal activity, was isolated from meju and identified as *Bacillus subtilis* based on its morphological and biochemical properties, as well as its 16S rRNA sequence. Antimicrobial activity was found against various species of Gram-positive bacteria, yeasts, and molds, including food-spoilage microorganisms. The antifungal activity was found to be stable after heat and proteolytic enzyme treatment, and in the pH range of 6.0~10.0. The antibacterial activity was stable in the pH range of 6.0~10.0, but about 50% of the activity was lost after 24 hr at 30°C. The antibacterial compound was also inactivated by proteolytic enzyme treatment, indicating its proteinaceous nature. The apparent molecular masses of the partially purified antifungal and antibacterial compounds, as indicated by using the direct detection method in Tricine-SDS-PAGE, were approximately 2.4 kDa and 4.5 kDa, respectively. These studies suggest that *B. subtilis* MJP1 produces two bacteriocin-like substances with antifungal and antibacterial activities.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, bacteriocin-like substance, antifungal activity, antibacterial activity

### 서 론

*Bacillus* 속은 넓은 항균 spectrum과 다양한 구조를 지니는 peptide antibiotics를 생산하는 특징을 지니고 있다. 박테리옌이나 bacteriocin-like substances(BLS)를 생산하는 *Bacillus* 속으로는 *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium* 등에 관한 보고들이 있다 [6, 26]. 이들이 생산하는 antibiotics는 ribosomal과 nonribosomal antibiotics로 분류할 수 있으며 [17], 합성되는 기작에 따라 subtilin [12], coagulin [5]이 전자에 속하고 이들은 antibacterial 활성이 있으며, surfactin [13], iturin group [15], fengycin [28], gramicidins [17], tyrocidine [17] 그리고 bacitracin [7]이 nonribosomal antibiotics에 속하며 antibacterial 및 antifungal 활성이 있다고 보고되고 있다.

박테리옌 중 nisin이 1998년 미국 FDA로부터 가공치즈 스프레드 식품에 사용되는 것이 승인된 이래, 박테리옌이 식품산업에서 사용될 수 있는 항균제재로서 인식됨에 따라 수많은 연구들이 이루어지고 있다. 특히 유산균이 생산하는 박테리옌은 유산균이 GRAS(generally regarded as safe) 미생물이며, 인간의 장내 단백분해효소에 의해 분해되므로 안전하다는 인식에 의해 박테리옌 관련 연구들 중 유산균

유래의 박테리옌에 관한 연구들이 가장 많이 이루어지고 있다 [1, 6, 10]. 그러나 이와 같은 유산균 박테리옌에 관한 수많은 연구보고가 있음에도 유산균 박테리옌이 실제 식품보존제로 널리 활용되지 못하는 가장 큰 이유는 항균 spectrum이 좁아 특히 그람 음성균이나 효모, 곰팡이에 대해서는 거의 항균력이 없다는 점 때문이다. 그러므로 Klaenhammer가 주장한바와 같이 [10] 식품부패나 식중독 등에 관여하는 세균, 효모, 곰팡이 등의 미생물에 대해 총체적으로 적용 가능한 넓은 범위의 항균력을 지닌 천연식품보존제의 개발이 요구된다. 주로 그람 양성균의 생육저해를 할 수 있는 유산균 박테리옌과 달리 [1, 6], *Bacillus*가 생산하는 박테리옌은 그 항균 활성 범위가 매우 넓고 다양한 특성을 지닌다 [6, 26]. 그동안 *Bacillus* 속으로부터의 박테리옌에 관한 관심은 유산균 유래의 박테리옌 보다 상대적으로 미흡하였다. 그러나 *Bacillus* 속 중 *B. subtilis*나 *B. licheniformis*들은 유산균과 같이 GRAS 미생물이며 [23], 우리나라의 청국장이나 일본의 natto를 비롯하여 극동 아시아나 아프리카 지역의 전통음료나 알칼리 발효식품에서 매우 중요한 발효미생물로 작용한다 [18, 29, 31]. 최근 소비자들은 저장기간이 연장되면서도 최소 가공된 식품을 선호하는 추세가 점점 증가하고 있다. 그러므로 오랜 역사동안 그 지역의 전통 발효식품과 함께 섭취해온 GRAS 등급의 *Bacillus* 속(*B. subtilis*, *B. licheniformis*)으로부터의 항균 물질 중 유산균 박테리옌의 한계를 극복할 수 있는 특징을 지닌 항균 물질을 이용한 천연식품보존제의 개발은 차세대 식품보

\*Corresponding author

Tel: 82-62-230-7345, Fax: 82-62-222-8086

E-mail: hcchang@mail.chosun.ac.kr

존제 및 사료 항생제 대체제로 활용 가능성이 매우 크다. 그러므로 본 연구에서는 우리나라 재래식 메주로부터 항진균 및 항세균 활성을 나타내는 *Bacillus subtilis* 균주를 분리하였으며 그 미생물학적 특성과 이 분리균주가 생산하는 bacteriocin-like substances를 부분정제하고 그 특성을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 항진균 활성 균주 및 감수성 곰팡이의 분리

가정에서 제조된 재래형 메주를 수집하여, 이 중 1 g을 취하여 마쇄하였다. 마쇄된 메주 가루를 10 ml의 멸균수에 현탁한 후, 200  $\mu$ l를 취하여 potato dextrose agar(PDA, Difco Laboratories, MI, U.S.A.) 배지에 도말하였다. 25°C에서 5일 동안 평판배양하면서 집락을 형성하는 균주들 중 곰팡이들에 대한 저해활성을 보이는 균주와 이에 감수성을 나타내는 곰팡이들을 분리하였다.

### 분리균주의 동정

항진균 활성을 나타내는 분리균주의 동정을 위하여 일차적으로 형태학적, 생화학적 특성을 조사하였다. 그람 염색 및 포자형성 관찰과 API 50 CHB system(BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)을 이용하여 당 발효능을 조사한 후에 균주동정 프로그램(<http://apiweb.biomerieux.com>)을 이용하여 균주를 동정하였다. 최종적인 동정을 위하여 분리균주의 16S rRNA 염기서열을 결정하여 알려진 균주들과 비교하였다. 분리균주의 16S rRNA의 염기서열은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 분리균주의 chromosomal DNA를 Wizard genomic DNA purification kit(Promega, Madison, WI, U.S.A.)를 이용하여 분리한 후에 universal primer인 27F(5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGA-TACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 PCR을 수행하였다[32]. 증폭된 PCR 산물은 Wizard SV Gel and PCR clean-up system(Promega, Madison, WI, U.S.A.)을 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 ABI PRISM 3730 DNA analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과를 BLASTN 프로그램을 이용하여 GenBank에 등록된 염기서열들과 비교하였으며, 상동성은 Clustal X와 Mega 2 program을 이용하여 비교분석하였다[27].

감수성 곰팡이들의 동정을 위한 ITS-5.8S rDNA sequencing은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 곰팡이들의 chromosomal DNA는 균사체를 saline solution(0.8% NaCl, 0.0125% tween 20)에 현탁 후 원심분리를 통하여 균사체를 획득하였다. 얻어진 균사체에 lysis buffer(0.05 M EDTA, pH 8.0, 0.3% SDS)를 가하여 10분간 방치한 후 멸균된 glass bead를 이용하여 균사체를 파쇄하였다. 원심분리(14,000 rpm, 3

min)후 상정액을 취하여 동일 부피의 isopropanol을 가하여 genomic DNA를 침전시켰다. 원심분리에 의해 얻어진 genomic DNA는 70% ethanol을 이용하여 세척을 하였다. 얻어진 genomic DNA는 미량의 멸균수를 첨가하여 현탁하고, 60°C에서 1시간 처리한 후 PCR에 사용하였다. PCR은 universal primer인 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 ITS4R(5'-CAGACTT(G/A)TA(C/T)ATGGTCCAG-3') primer를 사용하여 수행하였다[4, 30]. 증폭된 PCR 산물은 Wizard SV Gel and PCR clean-up system을 이용하여 정제한 후 ABI PRISM 3730 DNA analyzer를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

### 조항균 물질의 준비

본 실험에 사용된 항균 물질은 다음의 방법에 의하여 준비하였다. 분리균주를 LB 액체 배지(1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) 5 ml에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 전배양하였다. 100 ml LB 액체 배지에 1%의 전배양액을 접종하고, 다시 37°C에서 24시간 동안 본배양하였다. 본배양액을 4°C에서 원심분리(9,500  $\times$  g, 15 min)하여 얻은 상정액을 0.45  $\mu$ m membrane filter(Advantec MFS, Inc., Japan)로 제균하였다. 제균된 상정액을 동결 건조한 후에 20 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충액에 녹여 항균 활성 실험에 사용하였으며 항세균 활성 실험에는 배양상정액의 5배 농축 항균 물질을, 항진균 활성 실험에는 농축되지 않은 항균 물질을 사용하였다.

### 분리균주의 항균 활성 측정

분리균주의 gram 양성균과 음성균, 곰팡이 및 효모에 대한 항균 활성은 paper disk method[9]를 사용하여 조사하였다. 항균 활성 측정을 위한 감수성 세균은 LB 평판배지, 감수성 곰팡이는 MEA(malt extract agar, Difco Laboratories) 또는 PDA 평판배지, 감수성 효모는 YM(Difco Laboratories) 또는 sabouraud dextrose(Difco Laboratories) 평판배지에  $1 \times 10^6$  cfu로 도말하였다. 지시균주가 도말된 평판배지 위에 8 mm 직경의 paper disk(Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 놓고 항균 물질을 100  $\mu$ l씩 일정하게 가한 후에 감수성 세균은 37°C에서 24시간 동안 배양하고, 감수성 효모와 곰팡이는 25°C 또는 30°C에서 24~48시간 동안 배양하여 분리균주가 생산하는 항균 물질에 의한 생육 저지환 생성 여부를 관찰하였다.

### 생육시기에 따른 항균 활성 측정

분리균주를 37°C에서 0~168시간 동안 진탕배양하면서 A600(Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)에서 흡광도를 측정하여 생육곡선을 그리고, 이때 생육시기에 따른 항균 활성을 측정하였다. 항진균 활성 측정은 감수성 곰팡이인 *Aspergillus petrakii* PF-1의 포자를

PDA 배지 20 ml에  $5 \times 10^4$  cfu/ml로 첨가하여 petri dish에 부은 후에 균으면 항균 물질 10  $\mu$ l를 배지 위에 spotting하여 30°C에서 48시간 배양한 후 활성을 측정하였다. 항세균 활성은 LB 고체배지에 지시균으로 사용한 *B. subtilis* ATCC 6633을  $1 \times 10^5$  cfu로 도말한 후에 5배 농축한 항균 물질 10  $\mu$ l를 spotting한 후, 37°C에서 하룻밤 배양하여 활성을 측정하였다. 활성 역가는 미생물 배양액 ml당 AU(activity unit)로 표시하였다. 즉, 항균 물질을 순차적으로 2배씩 희석하여 저해환을 형성하는 최대 희석배수의 역을 취하고, 이 값에 1 ml에 대해서 환산해주는 환산계수를 곱하여 AU/ml로 나타내었다.

#### 항진균 물질 및 항세균 물질의 안정성

항진균 물질 및 항세균 물질의 pH, 온도 및 각종 효소처리에 대한 안정성을 조사하였다. pH에 대한 영향을 알아보기 위하여 분리균주의 배양상징액을 5 N HCl과 5 N NaOH를 사용하여 pH 3.0~12.0으로 조정하여 37°C에서 2시간 동안 처리한 다음, 항균 활성을 측정하였다. 온도에 의한 영향을 알아보기 위하여 배양상징액을 30°C, 50°C, 70°C에서 24시간, 100°C에서 30분, 121°C에서 15분간 열처리한 후에 잔존활성을 측정하였다. 각종 효소에 대한 영향을 알아보기 위하여 분리균주의 배양상징액에 proteinase K(EC 3.4.21.64, Sigma Co., U.S.A.), protease(type I, Sigma), pronase E (protease type XIV, Sigma), trypsin(EC 3.4.21.4, Sigma), lysozyme(EC 3.2.1.17, Sigma),  $\alpha$ -chymotrypsin(EC 3.4.21.1, type I-S, Sigma), pepsin(EC 3.4.23.1, Sigma), carboxypeptidase A(EC 3.4.17.1, Sigma), lipase(EC 3.1.1.3, type VII, Sigma),  $\alpha$ -amylase(EC 3.2.1.1, Type VIII, Sigma)는 2 mg/ml, aminopeptidase I(EC 3.4.11.22, Sigma)는 1 unit/ml, carboxypeptidase B(EC 3.4.17.2, Sigma)는 200 unit/ml의 농도로 처리한 후에 잔존하는 항균 활성을 측정하였다. 잔존 활성 측정은 paper disk method를 사용하였으며, 감수성 곰팡이로는 *A. petrakii* PF-1과 감수성 세균으로는 *B. subtilis* ATCC 6633을 사용하였다.

#### 항균 물질의 부분 정제

항진균 활성 분리균주를 100 ml LB 액체 배지에서 37°C, 24시간 진탕배양한 후, 4°C에서 원심분리(9,500  $\times$  g, 15 min)하여 회수한 상징액을 0.45  $\mu$ m membrane filter로 제균하였다. 제균된 상징액을 methanol과 3차 증류수로 미리 soaking된 소수성 column인 C<sub>18</sub> Sep-Pak cartridge(Waters Co., Massachusetts, U.S.A.)에 흡착시킨 후, 3차 증류수로 수세하고 acetonitrile(HPLC-grade, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, U.S.A.)로 용출하였다. Acetonitrile에 녹아있는 분획은 speed vac concentrator(Centra-Vac VS-802, Vision, Korea)를 이용하여 용매를 제거하고, 20 mM Tris-HCl(pH 7.5)에 녹여 항진균 활성과 항세균 활성 측정 및 Tricine-SDS-

PAGE에 사용하였다.

#### Tricine-SDS-PAGE

C<sub>18</sub> Sep-Pak column으로 부분 정제한 시료로부터 항진균 활성과 항세균 활성을 나타내는 물질의 분자량을 Tricine-SDS-PAGE[21]를 통하여 결정하였다. 18% acrylamide gel을 사용하였고, 표준 분자량 물질로는 polypeptide SDS-PAGE standards(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.)를 사용하였다. 전기영동 후 coomassie brilliant blue G (Sigma Co., U.S.A.)로 단백질을 염색하였다. Gel 상에서 항균 활성을 나타내는 물질의 band 확인은 다음의 direct detection 방법[2]에 준하여 시행하였다. 즉 전기영동한 gel을 25%(v/v) isopropanol과 10%(v/v) glacial acetic acid 용액에 담근 후 상온에서 2시간 고정시키고 나서 증류수로 1시간 동안 세척하였다. 세척한 gel은 염색된 gel상에서의 band와 비교하여, 주요 band 부위를 잘라 PDA 고체배지 위에 놓고 그 위에 PDA top agar(0.7%, w/v) 20 ml와 *A. petrakii* PF-1 포자( $5 \times 10^4$  cfu/ml)가 함께 섞인 것을 증충한 다음, 30°C에서 48시간 배양한 후, 항진균 생육 저해환이 생성되는 band를 확인하였다. 항세균 활성 확인은 gel을 LB 고체배지 위에 놓고 그 위에 LB top agar(0.7%, w/v) 20 ml와 *B. subtilis* ATCC 6633( $1 \times 10^4$  cfu/ml)이 함께 섞인 것을 증충한 다음, 37°C에서 16시간 배양한 후 항세균 생육 저해 활성을 보이는 band를 확인하였다. 대조구로는 acrylamide gel을 direct detection에 사용된 band gel과 같은 크기로 잘라 동일한 세척 및 항균 활성 측정법을 시행하여 acrylamide 성분에 의한 생육 저해 작용이 없음을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

#### 항진균 활성 균주 및 감수성 곰팡이의 분리 및 동정

메주 가루를 멸균수에 희석한 시료를 일반적인 곰팡이 배지인 PDA 평판배지에서 5일간 배양한 후, 형성되는 미생물의 집락을 관찰하였다. 다양한 종류의 세균과 곰팡이들이 동일한 배지 내에서 관찰되었으며, 이 중 곰팡이들에 저해 활성을 나타내는 균주 1종과 이에 감수성을 나타내는 곰팡이 3종을 선별하여 분리하였다.

곰팡이에 대해 생육 저해 활성을 나타내는 분리균주는 포자를 형성하는 gram 양성균의 간균이며, API 50CHB system을 이용하여 당 이용성 조사를 통한 균주 동정 결과 *Bacillus subtilis*로 판정되었다. 보다 정확한 동정을 위하여 항진균 활성 분리균주의 16S rRNA 염기서열을 결정하고(1,451 bp) 이를 GenBank에 등록된 다른 균주들의 염기서열과 비교한 결과 *B. subtilis* Z99104와 99%의 상동성을 보였다. 따라서 항진균 활성을 보이는 본 균주는 최종 *B. subtilis*로 동정되었으며 *B. subtilis* MJPI이라 명명하였고, 그 16S rRNA 염

기서열은 GenBank에 EU024822로 등록하였다.

*B. subtilis* MJPI에 감수성을 나타내는 곰팡이 3종의 균주 동정을 위하여 ITS-5.8S rDNA sequencing을 시행하여 염기서열을 비교한 결과 PF-1과 PF-2는 *Aspergillus petrakii* AF203793, *Aspergillus ochraceus* AY373854와 99%의 상동성을, PF-3는 *Aspergillus nidulans* AF455499와 98%의 상동성을 나타내었다. 3종의 곰팡이는 *A. petrakii* PF-1, *A. ochraceus* PF-2, *A. nidulans* PF-3로 명명하였으며, 항진균 활성 실험을 위한 감수성 균주로 사용하였다.

#### 분리균주의 항균 활성

Gram 양성균과 음성균 10종의 세균과 곰팡이 8종, 그리고 효모 3종을 대상으로 *B. subtilis* MJPI에 의한 항균 활성을 조사하였다(Table 1). Paper disk method를 통하여 항균 활성을 측정된 결과, gram 양성균인 *Listeria monocytogenes* ATCC 19113, *B. subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213에 대한 저해 활성을 나타내었으며, gram 양성균 중 *Micrococcus luteus* ATCC 13513, *Streptococcus mutans* ATCC 25175와 gram 음성균들에는 활성을 나타내지 않았다. 곰팡이와 효모에 대한 실험에서 *A. petrakii* PF-1, *A. ochraceus* PF-2, *A. nidulans* PF-3, *Epicoccum nigrum* KF-1, *Cladosporium gossypicola* KF-2, *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, *Candida albicans* ATCC 24433, *C. albicans* ATCC 11006, *C. albicans* ATCC 18804에 대한 생육 저해

활성을 나타내었다.

*B. subtilis* MJPI의 항세균 활성이 gram 양성균들에 집중되어 있으므로 세균이 생산하는 항균 물질인 박테리옌이 근연관계의 종에 저해 활성을 나타내는 특성과 유사하며, 특히 *L. monocytogenes* ATCC 19113에 강한 저해 활성을 보이므로 박테리옌 그룹 중에서 *Listeria*에 강한 항균 활성을 나타내는 특징을 가진 class IIa군[6]의 특성과 유사하다. Paper disk method를 사용한 항균 활성 실험에서 저장곡물에서 ochratoxin 등의 곰팡이 독소를 생성하는 것으로 알려진 곰팡이 종에 속하는 *A. petrakii* PF-1, *A. ochraceus* PF-2, *A. nidulans* PF-3에 대한 항균 작용뿐 아니라 인체에 피부질환을 일으키는 *E. nigrum* KF-1, 알레르기나 염증성 폐렴에 관여하는 *C. gossypicola* KF-2, 그리고 여성의 질, 손톱 또는 피부에서 염증을 일으키는 병원성 균인 *C. albicans* stain들에 대해서도 항균 활성을 나타내었으며 특히 *B. subtilis* MJPI의 균체를 직접 가하여 실험한 direct method에 의한 항균 실험에서 매우 강력한 항균 활성을 나타내어 천연식품보존제나 사료보존제로서 뿐만 아니라 새로운 항생제 대체 의약소재로서 응용 가능성을 시사하였다(Fig. 1).

#### 생육시기에 따른 항진균 활성 및 항세균 활성

*B. subtilis* MJPI의 생육에 따른 항진균 활성 및 항세균 활성의 변화를 조사하였다(Fig. 2). 생육곡선 측정 결과, MJPI 균주는 배양 12시간 후에 대수기 중반을 지나 24시간 정도에 생육 정지기에 이르렀으며, 48시간 이후로 사멸기에

Table 1. Inhibitory spectrum of *B. subtilis* MJPI.

Microorganisms	Indicator species	Antimicrobial activity
Gram-positive bacteria	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+++
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 13513	-
	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 29213	++
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	++
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113	+++
Gram-negative bacteria	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43895	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-
	<i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430	-
Molds	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 22546	-
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 96918	-
	<i>Aspergillus petrakii</i> PF-1	+++
	<i>Aspergillus ochraceus</i> PF-2	+++
	<i>Aspergillus nidulans</i> PF-3	+++*
	<i>Epicoccum nigrum</i> KF-1	+++
	<i>Cladosporium gossypicola</i> KF-2	+++
	<i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	+
Yeasts	<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	+
	<i>Candida albicans</i> ATCC 11006	+
	<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	+

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each sensitive indicator. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition: -, no inhibition zone; +, below 13.5 mm; ++, 13.5~15.5 mm; +++, above 15.5 mm; \*, turbid zone.

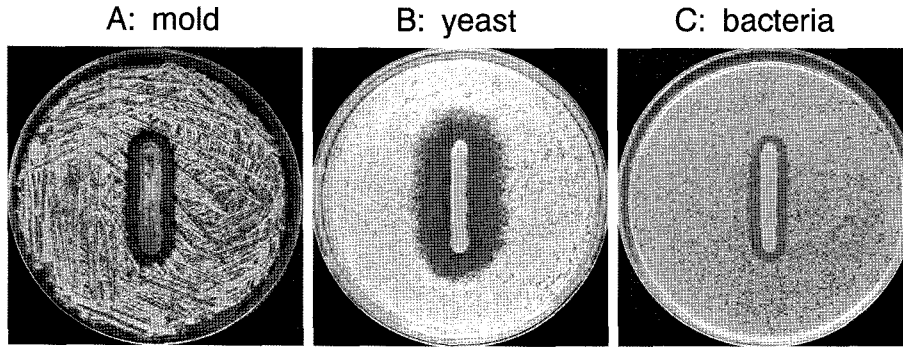


Fig. 1. Antimicrobial activity of the isolated *B. subtilis* MJP1. A, *A. petrakii* PF-1; B, *C. albicans* ATCC 24433; C, *B. subtilis* ATCC 6633.

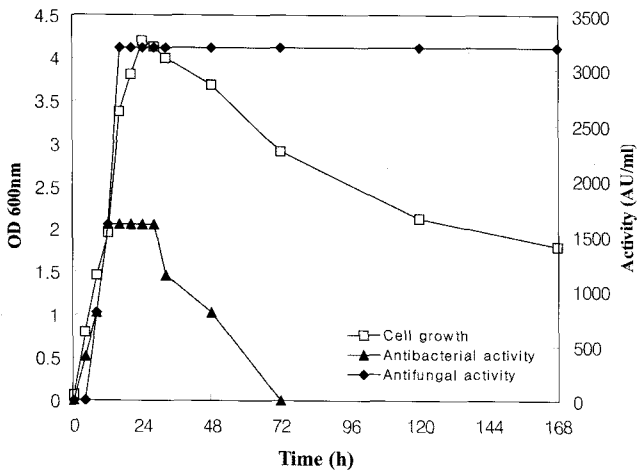


Fig. 2. Growth and antimicrobial activity of *B. subtilis* MJP1. Symbols: □, cell growth; ◆, antifungal activity(AU/ml) against *A. petrakii* PF-1; ▲, antibacterial activity(AU/ml) against *B. subtilis* ATCC 6633.

접어들음을 알 수 있었다. 항진균 활성은 배양 8시간부터 나타나기 시작하여 16시간 이후부터 최대 활성(3,200 AU/ml)을 나타내었으며, 균주의 생육이 사멸기에 접어들어도 항진균 활성이 계속 유지되었다. 반면 항세균 활성은 생육 초기부터(배양 4시간) 검출되기 시작하여 대수기 중반에 이르는 12시간부터 생육 28시간까지 최대 항균 활성(1,600 AU/ml)을 나타내었으며, 이후로 조금씩 감소하기 시작하여 72시간 이후에는 활성을 상실하였다. 많은 박테리옌들이 영양원이 고갈되는 정지기에 축적되는 반면[33], *B. subtilis* MJP1이 생산하는 항균 물질은 생육 초기부터 왕성하게 분비되기 시작함을 알 수 있었다. 항세균 활성이 균이 사멸기에 접어들면서 급격히 소실되는 결과는 사멸기에 포자형성과 함께 *B. subtilis* MJP1의 자가분해에 의한 세포 내 단백질 분해효소의 방출에 의하여 분해 작용의 결과로 생각된다[3]. 이에 반해 항진균 활성 물질은 생육에 따른 세포 내 단백질 분해효소의 방출과 이 효소 작용에 영향을 받지 않으므로 단백질성 물질이거나 단백질 가수분해효소의 영향을 받지 않는

물질임을 추정할 수 있다.

**항진균 물질 및 항세균 물질의 안정성**

pH 안정성 실험에서 항진균 활성과 항세균 활성 모두 pH 6.0~10.0 구간에서 비교적 안정하게 나타나 두 물질이 중성과 알칼리 pH 영역에서 안정함을 알 수 있었다(Table 2). *B. subtilis* MJP1의 배양 상정액을 pH 3.0~12.0으로 조정하여 37°C에서 2시간 동안 처리 후, 균체 배양 후의 배양액 pH인 pH 7.8로 회복시켰을 때 pH 처리에 의해 활성이 감소된 pH 3.0~5.0 구간은 항진균 활성과 항세균 활성을 100% 회복하였다. 또한 pH 11.0에서 항진균 활성은 100%, 항세균 활성은 50% 회복되었다(data not shown). 온도에 대한 안정성은 항진균 활성은 열처리에 영향을 받지 않는 것으로 나타난 반면 항세균 활성은 30°C 이상의 열처리에서는 50% 이상의 활성이 감소되는 결과를 나타내어 열에 불안정한 현상을 보였다. 각종 효소에 대한 영향을 살펴본 결과 항진균 활성은 단백질 가수분해효소를 비롯한 어떠한 효소에도 영향을 받지 않았다. 항세균 활성은 lysozyme, a-amylase, lipase 등의 처리에는 영향을 받지 않았으나, 단백질 가수분해효소나 peptidase 처리로 불활성화 되어 역가를 상실하였다(Table 2). 이상의 실험 결과, *B. subtilis* MJP1은 항진균 활성과 항세균 활성이 있는 각각의 물질을 생산하며, 이 두 물질은 서로 다른 특성을 가지고 있음을 추정할 수 있었다. 또한 항진균 물질은 단백질 가수분해효소에 영향을 받지 않는 물질인 반면, 항세균 물질은 단백질 또는 펩타이드로 이루어진 박테리옌 또는 박테리옌 유사 물질이며, 당이나 지질의 결합이 항균 활성에 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.

*B. subtilis*가 생산하는 항진균 활성 물질들은 iturins A-E, bacillomycins(D, F, L), mycosubtilin 등을 포함하여 대부분 polypeptides로서 열에 매우 안정하며, 구조 내에 자연계에 존재하지 않는 D형 아미노산을 가지거나 cyclic peptide의 구조를 가지므로 단백질 가수분해효소에도 영향을 받지 않는 것으로 알려져 있다[8, 14, 24]. *B. subtilis* MJP1이 생산하는 항진균 물질도 이와 유사한 특징을 나타내므로 기존에 알려

**Table 2. Effect of pH, heat and enzyme treatment on the antimicrobial activity of *B. subtilis* MJP1.**

	Treatment	Antifungal activity	Antibacterial activity
pH	3.0	+	+
	4.0	+	+
	5.0	+	+
	6.0	++	+++
	7.0	+++	+++
	8.0	+++	+++
	9.0	+++	+++
	10.0	+++*	+++
	11.0	++*	+
	12.0	-	-
Heating	30, 24 h	+++	++
	50, 24 h	+++	+
	70, 24 h	+++	+
	100, 30 min	+++	+
	121, 15 min	+++	+
Enzyme	Proteinase K	+++	-
	Protease	+++	-
	Pepsin	+++	-
	Trypsin	+++	-
	$\alpha$ -Chymotrypsin	+++	-
	Aminopeptidase I	+++	-
	Carboxypeptidase A, B	+++	-
	Pronase E	+++	-
	Lysozyme	+++	+++
	$\alpha$ -Amylase	+++	+++
	Lipase	+++	+++

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each sensitive indicator. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition: -, no inhibition zone; +, below 13.5 mm; ++, 13.5~15.5 mm; +++, above 15.5 mm; \*, turbid zone.

진 항진균 물질 그룹에 속하거나 유사한 구조의 물질로 추정된다.

#### 항균 물질의 부분 정제 및 Tricine-SDS-PAGE

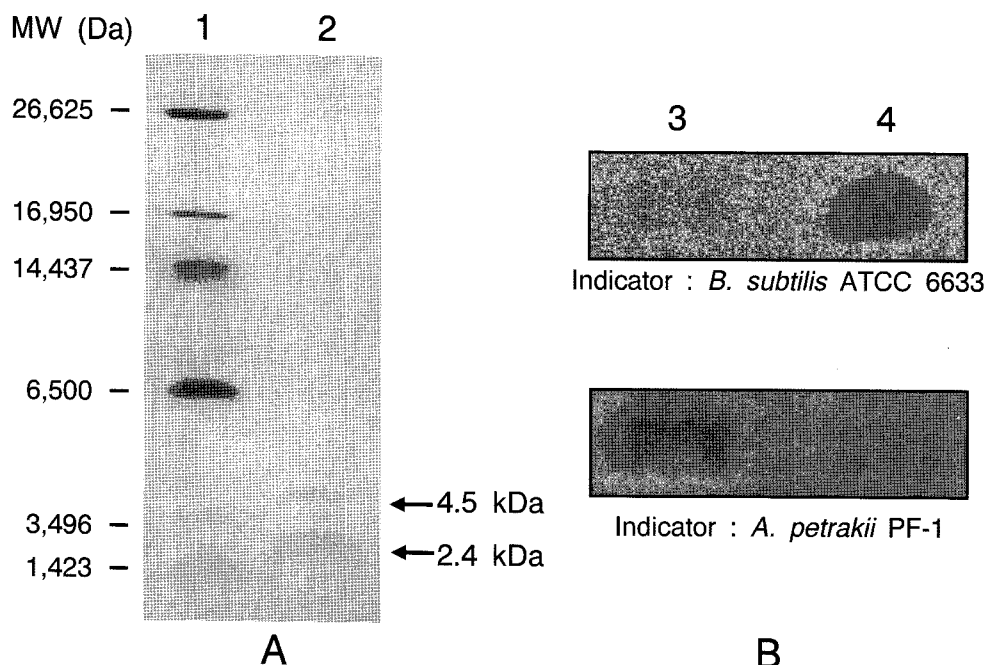
*B. subtilis*로부터의 펩타이드성 항생물질들은 대부분이 소수성을 가진다고 알려져 있으며[24], 또한 많은 박테리옌들이 구조적으로 소수성을 지니고 있는 특징을 가지므로 hydrophobic column을 이용한 정제가 많이 이루어지고 있다 [19, 22]. 본 연구에서는 *B. subtilis* MJP1이 생산하는 항진균 물질 및 항세균 물질의 부분 정제를 위하여 배양상정액을 C<sub>18</sub> Sep-Pak column에 흡착시킨 후 acetonitrile로 용출하여 얻은 분획에서 강한 항진균 활성(25,600 AU/ml)과 항세균 활성(6,400 AU/ml)을 관찰하였다. 이러한 결과를 바탕으로 *B. subtilis* MJP1이 생산하는 항진균 물질과 항세균 물질은 소수성을 가지는 물질임을 알 수 있었다.

C<sub>18</sub> Sep-Pak column으로 부분 정제된 시료를 Tricine-SDS-PAGE로 단백질 분리를 하였을 때 두 개의 주된 band가 관찰되었다(Fig. 3). 두 개의 band를 잘라 *A. petrakii*

PF-1과 *B. subtilis* ATCC 6633에 대한 항균 활성을 direct detection 방법으로 측정된 결과, 분자량 2.4 kDa 부분의 band는 *A. petrakii* PF-1에서만 항균 활성을 나타내었고(Fig. 3-lane 3), 분자량 4.5 kDa band에서는 *B. subtilis* ATCC 6633에 대해서만 항균 활성을 나타내었다(Fig. 3-lane 4). 이상의 실험 결과로부터 *B. subtilis* MJP1은 분자량 약 2.4 kDa과 분자량 약 4.5 kDa 정도의 두 개의 다른 항균 물질을 생산함을 확인하였다. 이 두 가지 항균 물질 중 분자량 2.4 kDa 정도의 단백질은 항진균 활성만 지니고 항세균 활성은 없으며, 분자량 4.5 kDa 정도의 단백질은 항세균 활성만을 지닌 서로 다른 물질이며, 단백분해효소나 peptidase 처리 실험에서 이와 같은 효소들이 항세균 활성에는 영향을 미치지 않지만 항진균 활성에는 영향을 미치지 않는 결과로부터 항세균 물질은 박테리옌이며, 항진균 물질은 구조 내에 D형 아미노산을 가지거나 cyclic peptide 구조를 지니는 등의 일반적인 단백질 구조에 변형이 일어난 어떤 구조의 물질로 추정된다[8, 24].

항진균 활성을 나타내거나 항세균 활성을 나타내는 *Bacillus* 속에 대한 많은 보고들이 있지만 항진균 활성과 항세균 활성을 동시에 나타내는 *Bacillus*에 대한 보고는 많지 않다. Fungicin M4를 생산하는 *B. licheniformis* M-4는 *Mucor* 속 등의 곰팡이에 대한 항진균 활성과 항세균 활성을 보였으나 항세균 활성 범위는 *B. megaterium*과 *Corynebacterium glutamicum*의 단 두 종에 제한되었으며 활성도 비교적 낮게 나타났다[14]. *B. amyloliquefaciens* ES-2는 곰팡이, 효모, 세균에 대한 넓은 범위의 항균 활성을 가지며, 원인 물질을 규명한 결과 항진균 활성을 가지는 fengycins와 항진균 활성, 항세균 활성을 함께 가지는 surfactins를 동시에 생산하였다[25]. 구조는 다르지만 fengycin과 surfactin은 둘 다 lipopeptide 계열의 물질이며 분자량이 2,000 Da 미만으로 단백분해효소의 영향을 받지 않는 특성을 가지고 있다 [24, 25].

*B. subtilis* MJP1이 생산하는 항진균 활성 물질은 넓은 pH 범위(pH 2.0~11.0)와 100°C 이상의 열처리에서 안정하였다. SDS-PAGE gel 상에서 분자량 2.4 kDa의 band를 나타내며 단백질분해효소나 peptidase 처리(proteinase K, protease, pepsin, trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, aminopeptidase I, carboxypeptidase A-B, pronase E)에 실패하지 않았다. 이와 같은 특징은 *Bacillus* 유래의 많은 항진균 활성 물질들에서 보고된 바 있으며[8, 16, 20] 이를 bacteriocin-like substance의 특징들로 규정한 바 있다[5, 11]. 본 실험에서 분리한 *B. subtilis* MJP1이 생산하는 넓은 범위의 항진균 활성 및 항세균 활성 물질은 식품 위생상 유해한 곰팡이인 *A. petrakii*, *A. ochraceus*, *A. nidulans* 등과 세균 및 피부, 손톱, 여성의 질에서 Candidiasis를 일으키는 *Candida albicans* 등에 대해 강력한 항균 활성을 나타내므로 천연식품보존제 및 사료보존제로의 활용과 함께 항생제 대체 의약품으로의 활용이 기



**Fig. 3. Tricine-SDS-PAGE and direct detection of partially purified antimicrobial compounds from *B. subtilis* MJP1.** A. Tricine-SDS-PAGE of partially purified antimicrobial compounds after Coomassie brilliant blue G staining. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, partially purified antimicrobial compounds. B. Direct detection of antimicrobial compound by using the gel overlaid with the indicator stain. Lane 3,  $\approx$  2.4 kDa band gel; lane 4,  $\approx$  4.5 kDa band gel.

대된다. 향후 실험에서 물질들의 정제와 구조분석을 통하여 기존의 항균 물질들과 구조적, 기능적 특성들을 비교 분석하고, 항균 작용에 있어 단일효과 및 두 물질의 상승효과 등에 대한 연구가 필요하다.

## 요 약

메주로부터 항곰팡이 활성을 보이는 균주 1종과 이에 감수성을 나타내는 곰팡이 3종을 분리하였다. 분리된 균주는 형태학적, 생화학적 특성 조사와 16S rRNA 염기서열 결정을 통한 균주 동정결과 *Bacillus subtilis* MJP1으로 명명하였고, 3종의 곰팡이는 ITS-5.8S rRNA 염기서열 분석을 통하여 *Aspergillus petrakii* PF-1, *A. ochraceus* PF-2, 그리고 *A. nidulans* PF-3로 명명하였다. *B. subtilis* MJP1은 곰팡이에 대한 강한 저해활성 뿐만 아니라 *Candida* 속 효모들과 그람 양성균에 대한 넓은 범위의 저해활성을 나타내었다. *B. subtilis* MJP1의 생육에 따른 항균 활성을 측정된 결과 항진균 활성은 배양 16시간부터 최대 활성(3,200 AU/ml)을 나타내어 균이 사멸기에 접어든 후에도 활성을 그대로 유지한 반면, 항세균 활성은 대수기 중반인 12시간부터 28시간까지 가장 높은 활성(1,600 AU/ml)을 보이다가 72시간 이후에는 활성을 상실하였다. pH 안정성 실험에서 항진균 활성과 항세균 활성 모두 pH 6~10 구간에서 비교적 안정한 결과를 보였으나, 열처리 실험에서 항진균 활성은 영향을 받지 않은 반면, 항세균 활성은 30°C 이상의 온도에서는 불안정한

결과를 보였다. 각종 효소에 대한 안정성 실험에서 항진균 활성은 어떠한 효소에도 영향을 받지 않았으나, 항세균 활성은 단백분해효소 처리 후에 활성이 실패 됨으로써 항균 물질이 단백질성 물질을 추정하였다. C<sub>18</sub> Sep-Pak column으로 부분 정제한 항균 물질이 항진균 활성과 항세균 활성을 나타내므로 소수성을 가지는 물질임을 알 수 있으며, Tricine-SDS-PAGE 및 direct detection을 통하여 항진균 물질의 분자량은 약 2.4 kDa 정도이며, 항세균 물질의 분자량은 약 4.5 kDa으로 확인되었다. 따라서 *B. subtilis* MJP1은 항진균 활성과 항세균 활성을 가진 bacteriocin-like substances를 생산함을 알 수 있고 이와 같은 새로운 항미생물 물질은 천연 식품보존제 및 사료보존제 뿐만 아니라 항생제 대체 의약품으로도 활용이 기대되며, 이를 위하여 향후 이 물질들의 보다 정확한 구조 및 특성 규명 등의 연구가 필요하다.

## 감사의 글

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신 사업에 의한 연구비로 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Barefoot, S. F. and C. G. Nettles. 1993. Antibiotics revisited: bacteriocins produced by dairy stater cultures. *J. Dairy Sci.* 76: 2366-2379.

2. Bhunia, A. K., M. C. Johnson, and B. Ray. 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Indust. Microbiol.* **2**: 319-322.
3. Bizani, D. and A. Brndelli. 2002. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. Strain 8 A. *J. Appl. Microbiol.* **93**: 512-519.
4. Carbone, I. and L. M. Kohn. 1993. Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the Selerotiniaceae. *Mycologia.* **85**: 415-427.
5. Hyronimus, B., C. Le Marrec, and M. C. Urdaci. 1998. Coagulins, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. *J. Appl. Microbiol.* **85**: 42-50.
6. Jack, R. W., J. R. Tagg, and B. Ray. 1995. Bacteriocin of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**: 171-200.
7. Johnson, B. A., H. Anker, and F. L. Meloney. 1945. Bacitracin: a new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group. *Science.* **102**: 376-377.
8. Katz, E. and A. L. Demain. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible function. *Bacteriol. Rev.* **41**: 449-474.
9. Kim, S. I., I. C. Kim, and H. C. Chang. 1999. Isolation and identification of antimicrobial agent producing microorganisms and sensitive strain from soil. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**: 526-533.
10. Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* **70**: 337-349.
11. Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 39-85.
12. Klein, C. C. Kaletta, and K. D. Entian. 1993. Biosynthesis of the lantibiotic subtilin is regulated by a histidine kinase/response regulator system. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 296-303.
13. Kluge, B., J. Vater, J. Salnikow, and K. Eckart. 1998. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *FEBS Lett.* **231**: 107-110.
14. Lebbadi, M., A. Gálvez, M. Maqueda, M. Martínez-Bueno, and E. Valdivia. 1994. Fungicin M4: a narrow spectrum peptide antibiotic from *Bacillus licheniformis* M-4. *J. Appl. Bacteriol.* **77**: 49-53.
15. Maget-Dana, R. and F. Peypoux. 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology.* **87**: 151-174.
16. Munimbazic, C. and L. B. Bullerman. 1998. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 959-968.
17. Nakano, M. M. and P. Zuber. 1990. Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*. *Biotechnol.* **10**: 223-240.
18. Odunfa, S. A. and G. F. Oyeyiola. 1985. Microbiological study of the fermentation of ugba, a Nigerian indigenous fermented food flavor. *J. Plant Foods.* **6**: 155-163.
19. Oscáriz, J. C. and A. G. Pisabarro. 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.* **4**: 13-19.
20. Potera, C. 1994. From bacteria: a new weapon against fungal infection. *Science.* **265**: 605.
21. Schägger, H. and G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.
22. Shafer, W. M. 1997. *Antibacterial peptide protocols. Methods in molecular biology.* Humana, Totowa, NJ.
23. Sharp, R. J., M. D. Scawen, and T. Atkinson. 1989. Fermentation and downstream processing of *Bacillus*, pp. 255-292. In Harwood, C. R. (ed.), *Bacillus. Biotechnology handbooks*, Plenum Press, New York.
24. Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* **56**: 845-857.
25. Sun, L., Z. Lu, X. Bie, F. Lu, and S. Yang. 2006. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 1259-1266.
26. Tagg, G. R., A. S. Dajani, and L. W. Wannamaker. 1976. Bacteriocin of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**: 772-756.
27. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
28. Vanittanakom, N., W. Loettler, U. Koch, and G. Jung. 1986. Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J. Antibiot.* **39**: 881-901.
29. Wang, J. and D. Y. D. Fung. 1996. Alkaline-fermented foods: a review with emphasis on pidan fermentation. *Crit. Rev. Microbiol.* **22**: 101-138.
30. White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA for phylogenetics, pp. 315-322. In Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. (eds.), *PCR protocols: a guide to the methods and applications.* Academic Press, Inc., New York.
31. Yokotsuka, T. 1985. Fermented protein foods in the orient, with emphasis on shoyu and miso in Japan, pp. 197-247. In Wood, B. J. B. (ed.), *Microbiology of Fermented Foods.* Elsevier Applied Science, London.
32. Yoon, J. H., S. T. Lee, and Y. H. Park. 1996. Inter- and intraspecific phylogenetic analysis of the genus *Nocardioideis* and related taxa based on 16S rDNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 187-194.
33. Zuber, P., M. M. Nakano, and M. A. Marahiel. 1993. Peptide antibiotics, pp. 896-916. In Sonenshein, A. C., J. A. Hoch, and R. Losick. (eds.), *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics.* American Society for Microbiology, Washington, D.C., U.S.A.

(Received Oct. 4, 2007/Accepted Nov. 12, 2007)