

## Bacillus subtilis MJP1이 생산하는 항세균 물질의 분리·정제 및 특성규명

임은정 · 양은주 · 장해춘\*  
조선대학교 식품영양학과

**Purification and Characterization of Antibacterial Compound Produced by *Bacillus subtilis* MJP1.** Yim, Eun Jung, Eun Ju Yang, and Hae Choon Chang\*. Department of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea - Antibacterial compound from *Bacillus subtilis* MJP1 was purified using C18 Sep-Pak cartridge, ion exchange chromatography, and gel filtration chromatography. The purified antibacterial compound showed antibacterial activity against *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, and *Enterococcus faecalis*. The purified antibacterial compound was found to be stable at 100°C for 5 min and in the pH range of 3.0~9.0, but it was unstable at pH 10.0. It was inactivated by proteinase K and pronase E, and heat treatment at 121°C for 15 min, but it was stable with lipase and  $\alpha$ -amylase treatment, which indicated its proteinoous nature. Ultra performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis were used to identify the purified antibacterial compound and confirmed the existence of two peptides (3356.54 Da, 3400.5244 Da).

**Key words:** *Bacillus subtilis*, antibacterial activity, peptide, purification

### 서 론

*Bacillus* 속은 Gram 양성, 간균, 호기성이며 아포를 형성한다고 알려져 있는 산업적으로 중요한 균주 중 하나로서, 다양한 효소와 항생물질을 다량 분비한다고 알려져있다[25]. *Bacillus* 속이 산업적으로 중요한 균주로 주목받는 이유로는 빠른 생육시간에 따른 짧은 발효주기와 그들이 세포외로 많은 양의 단백질을 분비하고, *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus licheniformis* 같은 속들은 식품 및 의약산업에서의 사용에 있어 안전한 GRAS 미생물로 인정되기 때문이다[21].

*Bacillus* 속은 기본구조가 다른 다양한 항균성 peptide를 생산하는데, 지금까지 많은 bacteriocin들이 보고되었다[2, 17, 26, 28]. 최근 수십년 동안 유산균으로부터 생산된 bacteriocin은 식품산업에서의 활용 가능성 때문에 다양한 연구가 이루어지고 있는 실정이다[6, 12, 19]. 그러나 유산균이 생산하는 대부분의 bacteriocin은 산성이상의 pH영역에서는 역가가 소실되기 때문에 식품산업에서의 응용 가능성에 제약이 있어 왔다[7]. 이에 반하여 *Bacillus* 속이 생산하는 bacteriocin은 넓은 범위의 pH 안정성을 나타내는 항균력을 보인다[10, 23]. 그러므로 유산균과 더불어 GRAS 미생물인 *Bacillus* 속이 생산하는 bacteriocin을 이용한 천연 식품 보존제, 식물의 무독성 농약, 가축 사료 첨가제 등에 대한 지속적인 연구 및 개발은 현대사회에서 부각되고 있는 합성 보

존제 및 첨가물에 대한 안전성 문제를 감소시킬 수 있을 것이다.

우리나라는 전통발효식품이 풍부하여 이로 부터 새로운 bacteriocin 생산 식품미생물을 개발할 수 있는 좋은 조건을 지니고 있다. 이러한 조건을 바탕으로 인체에 무해하며 광범위한 항균범위를 가진 새로운 bacteriocin의 탐색과 개발은 중요한 과제이다. 본 연구팀은 메주로부터 Bacteriocin-like substance(BLS)를 생산하는 *B. subtilis* MJP1을 분리하고 그 미생물학적 특성을 규명하고 이 분리 균주가 생산하는 BLS가 각각 분자량 및 특성이 다른 항진균 활성 물질과 항세균 활성 물질로 나누어짐을 전보에서 보고한 바 있다[27]. 이에 본 연구에서는 *B. subtilis* MJP1이 생산하는 BLS 중 항세균 활성 물질을 분리·정제하고 그 특성을 규명하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### *B. subtilis* MJP1의 배양 및 배양상등액의 준비

*B. subtilis* MJP1 집락(colony) 한 개를 5 mL LB 배지 (Luria-Bertani media: 1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% sodium chloride)에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 전 배양시킨 후, 100 mL LB 배지에 1%(v/v) 접종한 후, 37°C에서 24시간 동안 본배양하였다. *B. subtilis* MJP1의 본배양액을 4°C에서 원심분리(9,500×g, 15 min)하여 준비한 상등액을 0.22  $\mu$ m membrane filter(Advantec MFS, Bunkyo, Japan)로 제균하여 배양상등액을 준비하였다.

\*Corresponding author

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

E-mail: hcchang@chosun.ac.kr

### Solid Phase Extraction(SPE) 정제

Methanol 50 mL로 활성화시킨 후 3차 증류수 50 mL로 수세한 소수성 column인 C18 Sep-Pak cartridge(Waters Co., Boston, MA, U.S.A.)에 200 mL의 배양상등액을 통과시켜 소수성 물질들을 흡착시키고 50 mL의 3차 증류수로 다시 수세한 뒤 methanol(HPLC-grade, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, U.S.A.) 5 mL를 사용하여 C18 Sep-Pak column에 흡착된 소수성 성분을 용출시켰다. Methanol로 용출된 시료는 speed vac(Centra-Vac VS-802, Vision, Bucheon, Korea)을 이용하여 용매인 methanol을 완전히 제거하였다. 준비된 건조시료는 20 mM Tris-HCl(pH 8.5) 완충액에 녹여 다음 정제에 사용하였다.

### Ion Exchange Chromatography(IEC) 정제

20 mM Tris-HCl(pH 8.5) 완충액에 녹인 SPE 정제물은 0.45 µm syringe filter(Advantec MFS, Bunkyo, Japan)로 여과시킨 후 Bradford 방법[3]을 이용하여 시료 내 단백질 양을 정량하였다. SPE 정제 시료는 FPLC(Fast Protein Liquid Chromatography) system(AKTA Prime plus, GE healthcare Bio-sciences, Uppsala, Sweden)을 사용하여 IEC 정제를 시행하였다. 유속 4 mL/min로 20 mM Tris-HCl 완충액(100 mL)을 평형화 시킨 Hi Prep™ 16/10 DEAE FF column(GE healthcare Bio-sciences, Uppsala, Sweden)에 4.35 mg/mL의 단백질 농도를 지닌 SPE 정제 시료를 2 mL loading하였다. 이를 80 mL의 20 mM Tris-HCl 완충액으로 수세한 후, 동일 완충액 260 mL에 0 M~0.65 M NaCl의 기울기를 주어 용출시킨 후 100 mL의 1 M NaCl로 수세하였다. 이때 용출물질은 280 nm에서 그 흡광도를 측정하여 단백질 분획만을 회수하였다. 용출된 분획은 M.W.<1000인 dialysis membrane(Spectra/Por®, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, U.S.A.)을 사용하여 탈염한 후 동결건조하였다. 동결건조된 시료는 20 mM Tris-HCl(pH 8.5) 완충액 1 mL에 녹여 항균활성을 확인한 후 다음 단계의 정제시료로 사용하였다.

### Gel Filtration Chromatography(GFC) 정제

GFC 정제는 FPLC system(AKTA Prime plus)하에서 Hi Prep™ 16/60 Sephacryl™S-100(GE healthcare Bio-sciences, Uppsala, Sweden) column을 사용하여 시행하였다. 완충액 {20 mM Tris-HCl(pH 8.5)/0.15 M NaCl} 120 mL로 평형화시킨 column에 2 mL 시료를(단백질농도: 0.36 mg/mL) loading 한 후 동일완충액 180 mL를 사용하여 0.5 mL/min의 유속으로 GFC를 시행하였다. GFC시 정제물은 280 nm에서 그 흡광도를 측정하여 정제분획을 얻었다. GFC를 시행한 분획들은 M.W.<1000인 dialysis membrane을 사용하여 투석시킨 후 동결건조하여 20 mM Tris-HCl(pH 8.5) 완충액에 녹여 항균활성을 확인하였다. 항균활성이 확인된 분

획은 다시 동일한 방법으로 2차 GFC를 시행하였다.

### N-말단 아미노산 서열분석

정제된 시료는 tricine-SDS-PAGE[20]로 하나의 band가 있음을 확인한 후 N-말단 아미노산 서열분석의 시료로 사용하였다. N-말단 아미노산 분석은 Edman degradation 방법에 의해 Pricise 491 HT protein sequencer(Applied Biosystems, Wilmington, DE, U.S.A.)에 PTH analysis column(2.1×220 mm, Applied Biosystems, Wilmington, DE, U.S.A.)을 사용하여 시행하였다.

### Liquid Chromatography(LC)를 이용한 Electrospray ionization tandem mass spectrometry(ESI-MS/MS)

LC-ESI-MS/MS를 이용하여 정제한 항세균 물질의 단백질 내부서열을 확인하고자 하였다. 준비된 시료에 시료양의 1/20에 해당하는 trypsin을 37°C에서 12시간 동안 처리 한 후, 생성된 peptide fragment를 Hybrid mass spectrometer system(Q-TOFII, Manchester, England)을 이용하여 분석하였다.

### Ultra Performance Liquid Chromatography(UPLC)를 이용한 Electrospray ionization tandem mass spectrometry(ESI-MS/MS)

정제한 항세균 물질을 UPLC에 의한 ESI-MS/MS를 시행하였다. Trypsin을 2 µg/µL 농도로 37°C에서 12시간 동안 처리한 시료는 Synapt HDMS(high definition mass spectrometry™) (Waters Co., Boston, MA, U.S.A.)를 사용하여 이온화하고 분자량을 측정하였다.

### 아미노산 조성분석

정제한 물질의 아미노산 조성을 알아보기 위하여 밀폐된 조건에서 시료에 6 N HCl에 1% phenol을 첨가하고 질소를 채워 105°C에서 20시간 동안 digestion 시킨 후 AccQ-Flour Reagent Kit(Waters Co., Boston, MA, U.S.A.)로 유도체화 하여 아미노산 분석기로 분석하였다. 분석기기는 amino acid analyzer(Waters 2690, Waters 747, Waters Co., Boston, MA, U.S.A.), column은 AccQ-Tag(3.9×150 mm, Waters)를 사용하였다.

### 최대 흡수 파장 확인

*B. subtilis* MJPI 최종 정제물질의 최대 흡수 파장을 알아보기 위하여 wave scanning을 시행하였다. 준비된 정제물을 3차 증류수 1 mL에 녹인 후 Ultrospec 2100 pro(Amersham Biociences, Uppsala, Sweden)을 사용하여 190 nm부터 900 nm의 범위 내에서 1 nm 단위로 최대흡수파장을 측정하였다.

### 정제된 항세균 물질의 안정성

최종 정제된 항세균 물질의 pH, 온도 및 각종 효소처리에

대한 안정성을 조사하였다. pH에 대한 영향을 조사하기 위하여 pH 3.0(50 mM glycine-HCl), pH 4.0(50 mM sodium acetate), pH 5.0(50 mM sodium acetate), pH 6.0(50 mM sodium citrate), pH 7.0(50 mM Tris-HCl), pH 8.0(50 mM Tris-HCl), pH 9.0(50 mM glycine-NaOH), pH 10.0(50 mM glycine-NaOH) 완충용액을 5 N HCl과 5 N NaOH로 보정하여 만들었다. 동결 건조된 정제물을 각 pH별 완충용액에 각각 용해시켜 37°C에서 2시간 동안 처리한 후 그 활성을 측정하였다.

온도의 영향을 알아보기 위하여 동결 건조된 정제물을 20 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충액에 녹인 후 4°C, 30°C, 50°C, 70°C에서 24시간, 100°C에서 5분과 30분 그리고 121°C에서 15분 동안 처리한 후 항세균 활성을 측정하였다.

효소의 영향을 알아보기 위하여 proteinase K(EC 3.4.32.64, Sigma Co., St. Louis, MO, U.S.A.), protease(type I, Sigma), pronase E(type XIV, Sigma), trypsin(EC 3.4.21.4, Sigma),  $\alpha$ -chymotrypsin(EC 3.4.21.1, Sigma)은 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)/10 mM CaCl<sub>2</sub> 완충액에, lipase(EC 3.1.1.3, type VII, Sigma)는 50 mM Tris-HCl(pH 7.0)/10 mM CaCl<sub>2</sub> 완충액에,  $\alpha$ -amylase(EC 3.2.1.1, type VIII, Sigma)는 50 mM sodium phosphate(pH 7.0)/10 mM NaCl 완충액에 10 mg/mL가 되도록 준비하였다. 정제물에 trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin을 1 mg/mL의 농도로 25°C에서 6시간을 처리하고, 나머지 효소들도 같은 농도로 37°C에서 6시간 처리하였다. 처리된 효소는 100°C에서 5분 동안 끓여 불활성화 시킨 후, 잔존하는 항세균 활성을 측정하였다. 대조구로는 정제물에 효소액 대신 20 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충액을 첨가하여 동일한 조건으로 처리한 것으로 삼았다.

#### 항균 활성 assay

*B. subtilis* MJPI의 GFC를 통한 정제물의 항세균 활성과 최종 정제물의 항균특성(안정성, spectrum)은 spot-on-the-lawn test[9] 방법에 의하여 측정하였다. 항균활성 측정을 위한 각각의 감수성 세균은 LB 또는 brain heart infusion (BHI, Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.)고체배지에  $1 \times 10^6$  cfu/plate로 도말하였다. 이에 항균정제물을 2배씩 순차적으로 희석하여 각각 10  $\mu$ L씩 spotting한 후, 37°C에서 하룻밤 배양하여 고체배지상에 형성된 감수성 균에 대한 생육저해환(clear zone)으로 그 활성을 측정하였다. 항세균 활성 역가는 단계별 정제물을 순차적으로 2배씩 희석하여 지시균주에 대해 저해환을 형성하는 최대 희석배수의 역을 취하고, 이 값에 1 mL에 해당하는 환산계수를 곱하여 AU/mL로 나타내었다.

*B. subtilis* MJPI의 SPE 정제물을 IEC를 통한 정제 시 용출된 5개의 peak의 항균활성(항세균, 항진균)은 paper disk method[24]를 사용하여 측정하였다. 즉 *B. subtilis* ATCC 6633은 LB 배지에  $1 \times 10^6$  cfu/plate로 도말하고, *Aspergillus*

*petrakii* PF-1은 potato dextrose agar(PDA, Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.)배지 20 mL에 포자를  $5 \times 10^4$  cfu/mL로 첨가하여 petri dish에 부은 후 굳으면 직경 8 mm paper disk(Advantec, Toyo Roshi, Bunkyo, Japan)를 배지위에 놓고 20 mM Tris-HCl에 녹여진 각각의 항균물질을 100  $\mu$ L씩 일정하게 가하였다. 감수성세균(*B. subtilis* ATCC 6633)은 37°C에서 24시간 동안, 감수성곰팡이(*A. petrakii* PF-1)는 30°C에서 48시간 동안 배양하여 항균물질에 대한 생육저지환 생성여부를 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### Ion Exchange Chromatography(IEC) 정제

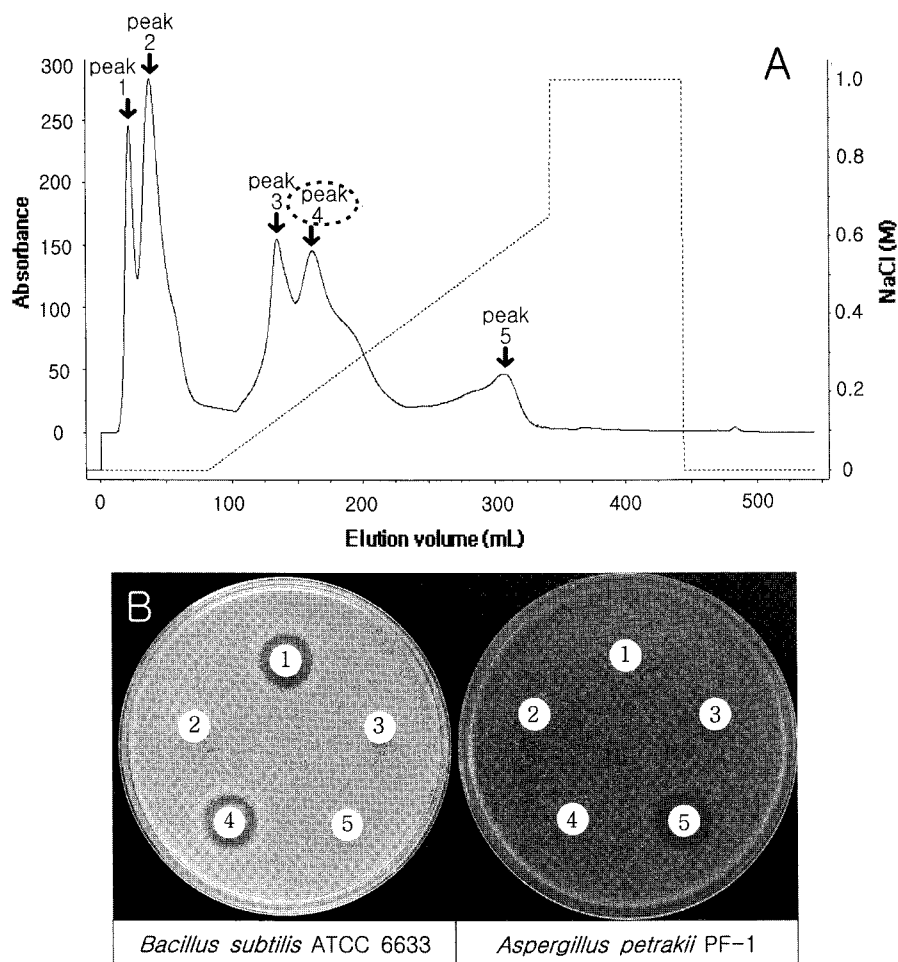
*B. subtilis* MJPI가 생산하는 항세균 물질을 정제하기 위하여 배양 상등액을 SPE 정제한 후 IEC정제 시료로 사용하였다. DEAE column을 사용하여 anion exchange chromatography를 실시하였을 때 column의 resin에 결합하지 않고 20 mM Tris-HCl에 용출되어져 나온 2개의 peak와 resin에 결합한 뒤 0 M~0.65 M의 NaCl 농도구배를 준 구간에서 용출된 3개의 peak를 얻을 수 있었다(Fig. 1-A). 이 다섯 개의 peak들을 각각 dialysis membrane을 사용하여 투석 한 후 그 항균활성을 확인한 결과 peak 1과 peak 4에서는 항세균 활성이 관찰되었고, peak 5에서는 항진균 활성만이 관찰되었다(Fig. 1-B). 항세균 활성이 확인된 2개의 구간 중에서 DEAE column의 resin에 결합하는 peak 4만을 투석하고 이를 동결건조 한 후 다음 단계의 정제 실험 시료로 사용하였다.

### Gel Filtration Chromatography(GFC) 정제

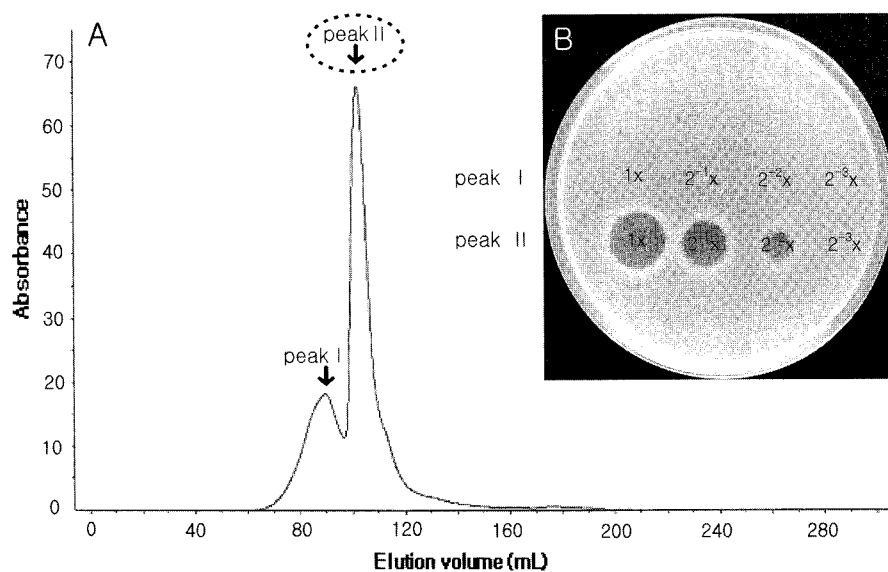
IEC 정제를 시행하여 획득된 항세균 활성이 있는 peak 4 구간을 투석 후 1차 GFC 정제를 시행하였을 때 2개의 peak를 얻을 수 있었다(Fig. 2-A). 각각의 peak에 해당하는 구간은 각각 투석한 뒤 그 항세균 역가를 확인하였다. GFC를 통하여 분리된 2개의 peak 중 peak II구간에서만 역가가 확인되었고(Fig. 2-B), 이 구간만을 모아 GFC 2차 정제를 시행하였을 때 단일한 peak를 얻을 수 있었다(Fig. 3-A). GFC 2차 정제를 통하여 얻어진 단일 peak로부터 항세균 역가를 확인 할 수 있었다(Fig. 3-B).

### N-말단 아미노산 서열분석

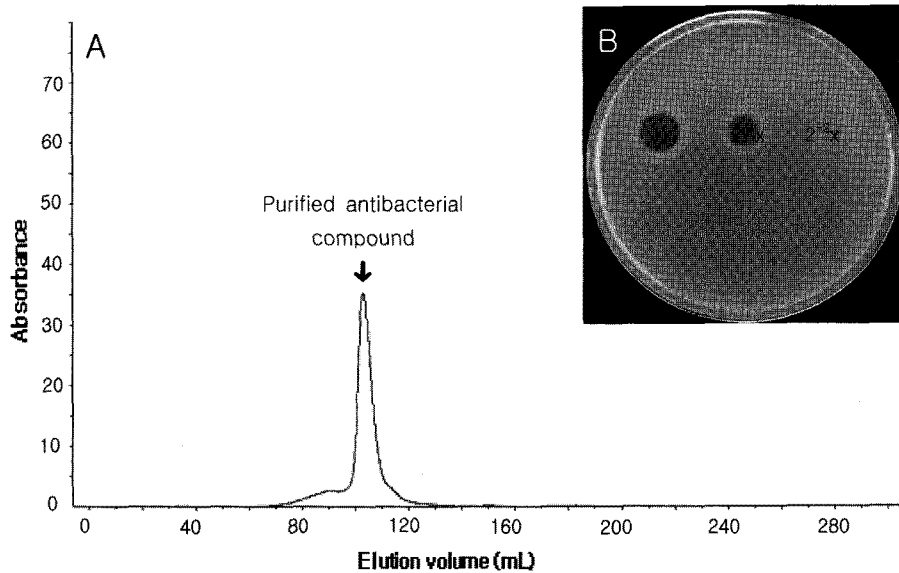
정제된 시료는 tricine-SDS-PAGE[20]를 한 후 Edman degradation 방법에 의한 N-말단 아미노산 서열분석을 시도하였으나, N-말단이 blocking되어 아미노산 서열을 확인할 수 없었다. N-말단이 blocking되어 아미노산 서열을 확인할 수 없는 것은 N-말단이 glutamine인 경우 R group이 cyclize되어 pyrrolidone carboxylate(pyroglutamate)화 되거나, N-말단이 acylation, carbamylation 또는 methylation이



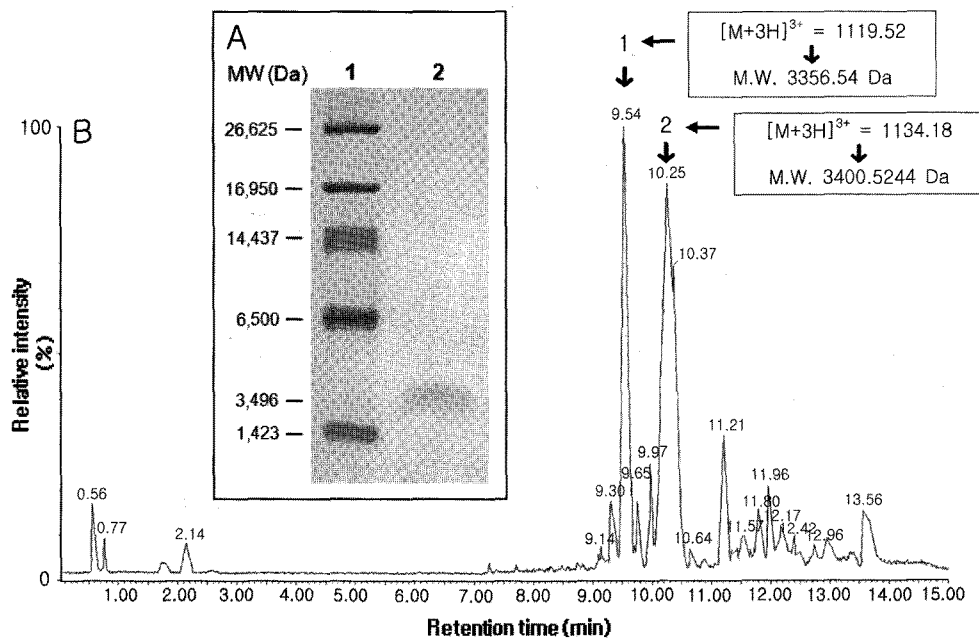
**Fig. 1. DEAE-ion exchange chromatographic purification of antimicrobial compounds from *B. subtilis* MJ1 and their antimicrobial activities.** A. Elution profile. Peak 1~5 was eluted by a linear NaCl gradient (0~0.65 M) for 65 min with flow rate 4 mL per min. (—), protein profile; (---), NaCl gradient. B. Antimicrobial activities by paper disk method. Left: antibacterial activity against *B. subtilis* ATCC 6633. Right: antifungal activity against *A. petrakii* PF-1. 1, peak 1; 2, peak 2; 3, peak 3; 4, peak 4; 5, peak 5.



**Fig. 2. First gel filtration chromatogram of peak 4 in Fig. 1.** A. Elution profile. B. Antibacterial activity by spot-on-the-lawn test. Peak I and peak II fractions were diluted (2 $\times$ ) serially and assayed their antibacterial activities against *B. subtilis* ATCC 6633.



**Fig. 3.** Second gel filtration chromatogram (GFC) of peak II in Fig. 2. A. Elution profile. B. Antibacterial activity by spot-on-the-lawn test. The arrow pointed peak was diluted (2×) serially and assayed antibacterial activity against *B. subtilis* ATCC 6633.



**Fig. 4.** Tricine-SDS-PAGE and electro spray ionization tandem mass spectrum of the purified antibacterial compound from *B. subtilis* MJPI using ultra performance liquid chromatography. A. Tricine-SDS-PAGE of the purified antibacterial compound after Coomassie brilliant blue G staining. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, the purified compound. B. Mass spectrum of the purified compound using UPLC.

된 경우 Edman 반응을 방해하기 때문이라고 알려져 있다 [14]. 또한 Edman sequencing 방법은 dehydro잔기와 같은 보기 드문 아미노산이 있는 경우 불가능하다고 알려지고 있으며, sublancin 168[18]이 가진 thioether ring과 cerein 7B [16]가 가진 disulfide bridge 같은 분자 내 결합에 의해 방해된다고 보고되고 있다. 이러한 경우 N-말단의 blocking group을 제거한 뒤 다시 분석하거나 N-말단의 분석을 포기

하고 단백질 내부의 아미노산서열을 분석하는 방법 등이 있다[8, 13, 22].

본 연구에서도 정제한 항세균 물질의 N-말단 아미노산 서열분석을 확인할 수 없었기 때문에 LC-ESI-MS/MS를 사용하여 peptide fragment를 이용한 단백질 내부서열을 확인하고자 하였으나 이 분석방법으로도 peak가 검출 되지 않아 정제된 항세균 물질의 내부서열을 확인 할 수 없었다.

Ultra performance liquid chromatography(UPLC)를 이용한 Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS)

본 연구에서 정제된 *B. subtilis* MJPI 항세균 정제물은 여러 단계의 정제 과정을 통하여(Fig. 1~3) 단일 peak로 나타났고, 이는 tricine-SDS-PAGE 상에서도 단일 band로 보여졌다(Fig. 4-A). 이 정제된 물질의 정확한 분자량을 결정하기 위하여 UPLC를 이용하여 ESI-MS/MS를 시행 하였을 때 단일 peak와 band로 보여진 정제물에서 두 개의 분자량이 서로 다른 peptide 1(M.W.: 3356.54 Da)과 peptide 2(M.W.: 3400.5244 Da)가 검출되었다(Fig. 4-B). 이와 같은 결과로부터 *B. subtilis* MJPI로부터 분리된 두 개의 peptide는 같은 수의 아미노산에 잔기정도 차이의 peptide로서, 매우 유사한 이온 세기 및 분자적 특징을 지닌 것으로 추정된다. 이와 같은 특징 때문에 본 연구에서의 정제 과정 중 단일물질로 정제된 것처럼 보였으나 실제로는 매우 유사한 두 개의 peptide가 혼입된 결과로 나타난 것으로 생각되어진다.

**아미노산 조성분석**

*B. subtilis* MJPI으로부터 정제된 항세균물질(Fig. 3)의 아미노산 조성을 분석한 결과 *B. subtilis* MJPI 항세균물질은 분석된 아미노산 중 glycine을 가장 많이 함유하였으며, alanine, leucine, isoleucine, proline 등의 비극성 계열의 아미노산 함량이 높은 것으로 나타나 소수성을 가진 peptide임을 알 수 있었다(Table 1). *B. subtilis* MJPI 항세균물질은 정제 과정 중 C18 Sep-Pak column에 흡착되어 소수성 물질임이 추정되었으며 이는 본 아미노산 조성 분석 결과와 동일함을 알 수 있었다. Lanthionine과 같은 modified 아미노산은 분석되지 않았으며, cysteine과 tryptophan은 아미노산 조성분석 시행 시 산 가수분해에 의한 protect 처리를 하지 않아 검출되지 않았다.

**Table 1. Amino acid composition of the purified antimicrobial compound from *B. subtilis* MJPI.**

| Amino acid       | pmole           | Mole %          |
|------------------|-----------------|-----------------|
| Asx <sup>a</sup> | 88.38           | 15.50           |
| Glx <sup>b</sup> | 21.07           | 3.70            |
| Ser              | 17.89           | 3.14            |
| Gly              | 136.47          | 23.94           |
| His              | 0.00            | 0.00            |
| Thr              | 15.18           | 2.66            |
| Arg              | 0.00            | 0.00            |
| Ala              | 91.88           | 16.12           |
| Pro              | 49.23           | 8.64            |
| Tyr              | 1.13            | 0.20            |
| Val              | 24.40           | 4.28            |
| Met              | 0.00            | 0.00            |
| Ile              | 56.34           | 9.88            |
| Leu              | 61.66           | 10.82           |
| Phe/Lys          | 6.67            | 1.17            |
| Cys              | ND <sup>c</sup> | ND <sup>c</sup> |
| Trp              | ND <sup>c</sup> | ND <sup>c</sup> |
| Total            | 570.3           | 100.05%         |

<sup>a</sup>Asx, the sum of asparagine and aspartic acid.

<sup>b</sup>Glx, the sum of glutamine and glutamic acid.

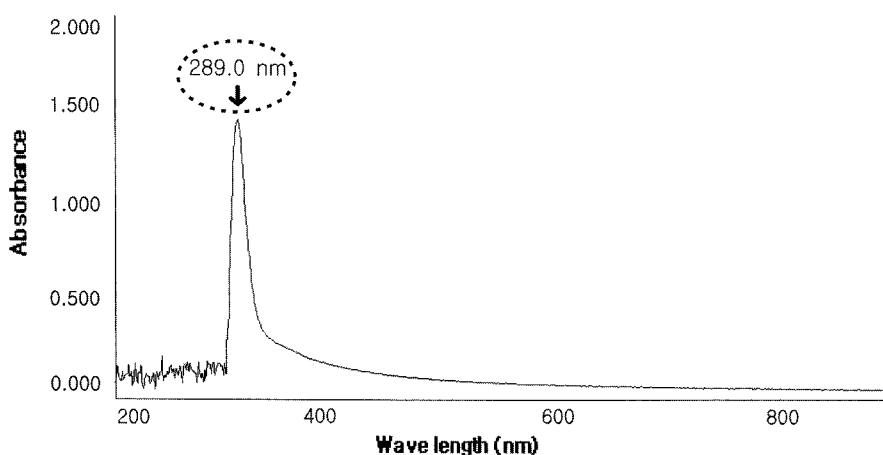
<sup>c</sup>ND, not determined.

**항세균 물질의 scanning**

GFC 2차 정제물의 최대 흡수 파장을 알아보기 위하여 190 nm부터 900 nm의 범위에서 wave scanning을 시행하였다. 이로부터 *B. subtilis* MJPI이 생산하는 항세균 활성 물질의 최대 흡광파장은 Fig. 5에서 나타난 바와 같이 289.0 nm이며 이때 흡광도는 1.141을 나타내었다.

**항세균 물질의 안정성**

정제된 항세균 물질은 pH 3.0부터 pH 9.0까지의 영역에



**Fig. 5. Wave scanning of the purified antimicrobial compound from *B. subtilis* MJPI.** Wave scanning condition: wavelength(nm), 190~900; scan step, 1 nm; scan speed, 1800 nm/min.

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

|                   | Treatment              | Antimicrobial activity (AU/mL) |
|-------------------|------------------------|--------------------------------|
| pH                | 3.0                    | 6,400                          |
|                   | 4.0                    | 6,400                          |
|                   | 5.0                    | 6,400                          |
|                   | 6.0                    | 6,400                          |
|                   | 7.0                    | 6,400                          |
|                   | 8.0                    | 6,400                          |
|                   | 9.0                    | 6,400                          |
|                   | 10.0                   | 1,600                          |
|                   | Heating                | 4°C, 24 hr                     |
| 30°C, 24 hr       |                        | 6,400                          |
| 50°C, 24 hr       |                        | 6,400                          |
| 70°C, 24 hr       |                        | 1,600                          |
| 100°C, 5 min      |                        | 6,400                          |
| 100°C, 30 min     |                        | 3,200                          |
| 121°C, 15 min     |                        | 0                              |
| Enzyme            | Proteinase K           | 0                              |
|                   | Pronase E              | 0                              |
|                   | Protease               | 1,600                          |
|                   | Trypsin                | 3,200                          |
|                   | $\alpha$ -Chymotrypsin | 3,200                          |
|                   | Lipase                 | 6,400                          |
| $\alpha$ -Amylase | 6,400                  |                                |

\**B. subtilis* ATCC 6633 was used as a sensitive strain.

서 안정함을 확인하였다(Table 2). 전보에서 *B. subtilis* MJP1의 배양상등액의 pH 안정성 실험[27]에서는 pH 3.0부터 pH 5.0까지의 범위에서는 항세균 활성이 감소 하였으며 pH 6.0에서 pH 10.0 구간에서 안정하게 나타난다고 보고한 바 있다. 본 연구의 *B. subtilis* MJP1 항세균 물질의 정제물과 배양상등액을 pH 안정성 측면에서 비교하였을 때 본 연구에서 정제된 항세균 물질이 더 넓은 pH 범위에서 안정성이 있음을 알 수 있었다.

정제된 항세균 물질은 4°C, 30°C, 50°C에서 24시간 처리와 100°C에서 5분 처리에서는 역가를 그대로 유지하였다. 70°C에서 24시간 처리에서는 원래 역가의 25%정도를 나타내었으나, 100°C에서 30분 처리에서는 원래 역가의 50%정도를 나타내었으며, 121°C에서 15분 동안 처리 시에는 역가가 완전히 소실됨을 확인하였다(Table 2). 전보에서 보고된 배양상등액의 온도 안정성 실험 결과[27]와 비교 시, 전보에서는 50°C 이상의 온도에서는 역가가 50%이상 감소하였고 이러한 패턴이 121°C에서 15분 처리 시까지도 그대로 유지하여 원래 역가의 50%를 유지하는 차이를 관찰할 수 있었다.

효소의 영향을 살펴보았을 때 amylase나 lipase 등의 처리에는 정제물의 항세균 활성이 소실되지 않았으나, 단백질 가수분해효소인 proteinase K, pronase E 등의 처리에서는 활성이 완전히 소실되었고 trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, protease 등

의 처리에는 활성이 50% 이상 감소함을 관찰하였다(Table 2). 전보에서[27] *B. subtilis* MJP1 배양상등액의 효소 안정성 실험시 amylase 및 lipase 처리 때는 항세균 활성이 소실되지 않았으나, 실험에 사용된 모든 단백질수분해 효소처리구에서는 역가가 완전히 소실되는 결과를 보고한 바 있다. 이는 배양상등액에 비하여 정제물은 분리된 bacteriocin이 더 정제되어 농축된 상태이므로 trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, protease 등의 효소에 상대적으로 안정한 결과로 보여지나, 대체적으로 배양상등액과 정제물로 부터의 효소안정성 실험 결과[27]는 유사한 것으로 보여진다. 이상의 실험결과로부터 *B. subtilis* MJP1으로부터의 정제된 항세균 물질은 당이나 지질의 결합이 항세균 활성에 영향을 주지 않는 peptide류임을 알 수 있었다.

본 연구에서 *B. subtilis* MJP1으로 부터 분리·정제된 항세균 활성 물질은(Fig. 1-peak 4) 분자량 3356.54 Da과 3400.5244 Da의 두 개의 peptide로 구성되며 이 두 개의 peptide는 매우 유사한 특징을 지니는 항세균 물질임을 밝힌 바 있다. 그러나 *B. subtilis* MJP1은 이것 외에도 다른 항세균 물질을 생산함을 알 수 있다. 본 연구에서는 IEC를(Fig. 1) 통한 *B. subtilis* MJP1의 항세균 물질의 분리·정제 과정에서 두 개의 peak(peak 1, 4)에서 항세균 활성이 관찰되었으나 peak 1 구간은 제외시키고 peak 4만을 다음 단계의 정제시료로 사용하였다. 더 나아가 전보에서 보고된 *B. subtilis* MJP1으로 부터의 배양상등액을 이용한 항세균 물질의 안정성 실험 결과[27]와 본 연구의 항세균 활성 정제물의 안정성 실험결과(Table 2)의 차이로 부터 peak 1(Fig. 1)에 존재하는 항세균 물질은 본 연구에서 분리·정제된 peak 4내에 존재하는 항세균 물질과는 다소 다른 특징(소수도, 구성 amino acid, 물질 안정성 등)을 지닌 물질임을 추정할 수 있었다. 이상과 같은 연구결과로부터 *B. subtilis* MJP1은 적어도 두 개 이상의 특성이 서로 다른 항세균 활성물질을 생산함을 추정할 수 있다.

#### 항균 spectrum

*B. subtilis* MJP1으로 부터 정제된 항세균 물질의 항균 활성을 Gram 양성균 6종과 Gram 음성균 4종을 대상으로 조사하였다. *B. subtilis* MJP1으로부터의 항세균 물질은 *Listeria monocytogenes* ATCC 19113에 대해 가장 강한 항균활성을 나타내며 동종의 *B. subtilis* ATCC 6633에 대해서도 높은 항균활성을 나타내었다. 이외에 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212에 대해서도 항세균 활성이 관찰되었다. 그러나 Gram 양성균 중에서 *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Micrococcus luteus* ATCC 13513와 Gram 음성균인 *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* serovar. Typhi ATCC 19430에 대해서는 활성이 관찰되지 않

**Table 3. Inhibitory spectrum of the purified antimicrobial compound from *B. subtilis* MJPI.**

| Microorganism          | Indicator species  | Antimicrobial activity (AU/mL) |
|------------------------|--|--------------------------------|
| Gram-positive bacteria | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633                           | 6,400                          |
|                        | <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113                     | 12,800                         |
|                        | <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 29213 | 3,200                          |
|                        | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212                      | 3,200                          |
|                        | <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 13513                         | 0                              |
|                        | <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175                       | 0                              |
| Gram-negative bacteria | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922                           | 0                              |
|                        | <i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43895                   | 0                              |
|                        | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853                     | 0                              |
|                        | <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi ATCC 19430          | 0                              |

\*Activity was expressed as the antimicrobial activity (AU/mL) using spot-on-the-lawn test against each sensitive indicator.

았다(Table 3).

*Bacillus thuringiensis*가 생산하는 bacteriocin인 tochicin의 경우 동종에게만 저해 활성을 나타낸다고 보고되고 있으며[17], *Bacillus cereus*가 생산하는 cerein7[15]과 *B. subtilis*가 생산하는 subtilin[11], subtilisin A[1]의 경우 Gram 양성균에서 활성을 보였다고 보고되었다. 이 외에도 *Bacillus*속이 생산하는 thuricin 7[4], entomocidus 9[5] 등은 *L. monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *P. aeruginosa*와 같은 병원 미생물을 억제한다는 보고들이 있다.

전보에서 *B. subtilis* MJPI 배양상등액은 *B. subtilis*와 *L. monocytogenes*에 대해 가장 강한 항균활성을 나타내었고 *S. aureus* subsp. *aureus*와 *E. faecalis*에서 대해서도 항균활성을 나타내었다. 그 외의 Gram 양성균 및 Gram 음성균에 대해서는 활성을 나타내지 않았다[27]. *B. subtilis* MJPI 배양상등액은 *B. subtilis*와 *L. monocytogenes*에서 동일하게 가장 강한 항균활성을 나타내었지만[27], 본 연구의 분리·정제 항세균물질은 *L. monocytogenes*에 대하여 가장 강한 항균활성을 나타내었다(Table 3).

이상의 연구결과로부터 *B. subtilis* MJPI로부터 정제된 항세균 물질은 bacteriocin이며 열에 안정하며 분자량이 4000 Da 이하이고 저해 활성이 나타난 감수성균 중에서 *L. monocytogenes*에 가장 강한 활성을 보이는 특징 등으로 부터 bacteriocin class IIa군의 특성과 유사하다고 볼 수 있다.

## 요 약

*B. subtilis* MJPI이 생산하는 항균물질을 분리·정제하기 위하여 SPE, IEC, GFC를 통한 정제를 수행하였다. 정제된 항세균 물질은 tricine SDS-PAGE에서 하나의 band임을 확인 한 후 N-말단 아미노산 서열분석을 하였으나 N-말단이 blocking 되어 그 서열을 분석할 수 없었다. 이에 그 내부서열을 알아보기 위한 LC를 이용한 ESI-MS/MS를 시행하였으나 내부서열도 확인할 수 없었고, UPLC를 이용한 ESI-

MS/MS를 시행한 결과 항세균 활성 물질은 분자량이 매우 유사한 2개의 peptide(3356.54 Da, 3400.5244 Da)가 존재함을 확인하였다.

정제된 항세균 물질의 항균 spectrum을 조사한 결과, *L. monocytogenes*에 가장 강한 항균활성을 나타내며 이외에 *B. subtilis*, *S. aureus* subsp. *aureus*, *E. faecalis* 등의 Gram 양성균에서 항균활성을 나타내었다. 정제된 *B. subtilis* 항세균 물질은 pH 3.0부터 pH 9.0 범위에서는 안정하였으며 4°C, 30°C, 50°C에서 24시간, 100°C에서 5분 동안 매우 안정하였고, 70°C에서 24 시간, 100°C에서 30분 동안 처리한 구간부터 역가가 감소하여 121°C에서 15분 동안 처리한 구간에서는 역가가 완전히 소실되었다. 효소 안정성 실험에서 정제된 항세균 물질은 일부 단백분해효소에 의해 분해되어 역가를 상실하였으며, lipase나  $\alpha$ -amylase에서는 안정함을 나타냈다. 이로부터 정제된 항세균 물질이 넓은 pH 범위에서 안정하고, 비교적 높은 온도에서도 활성을 유지한다는 점을 관찰할 수 있었으며, 단백분해효소에 의해 분해되므로 bacteriocin임을 확인하였다.

본 연구를 통하여 *B. subtilis* MJPI로부터 분리·정제된 bacteriocin은 class IIa군의 특성과 유사하며, *B. subtilis* MJPI은 본 분리 bacteriocin 이외에도 다른 항세균 물질과 항진균 물질을 생산하는 균주임을 알 수 있었다.

## REFERENCES

- Babasaki, K., T. Takao, Y. Shimonishi, and K. Kurahashi. 1985. Subtilisin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *J. Biochem.(Tokyo)*. **98**: 585-603.
- Bizani, D. and A. Brandelli. 2002. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8A. *J. Appl. Microbiol.* **93**: 512-519.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method quantities of protein utilizing the principle of protein-dye



- binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
4. Cherif, A., H. Ouzari, D. Daffonchio, H. Cherif, K. Ben Slama, A. Hassen, S. Jaoua, and A. Boudabous. 2001. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**: 243-247.
  5. Cherif, A., S. Chehimi, F. Limem, B. M. Hansen, N. B. Hendriksen, D. Daffonchio, and A. Boudabous. 2003. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. entomocidus HD9. *J. Appl. Microbiol.* **95**: 990-1000.
  6. Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* **43**: 164-167.
  7. Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* **44**: 100-117.
  8. Farries, T. C., A. Harris, A. D. Auffret, and A. Aitken. 1991. Removal of N-acetyl groups from blocked peptides with acylpeptide hydrolase: Stabilization of the enzyme and its application to protein sequencing. *Eur. J. Biochem.* **196**: 679-685.
  9. Hoover, D. G. and S. K. Harlander. 1993. Screening methods for detecting bacteriocin activity, pp. 23-39. In D. G. Hoover and L. R. Steenson. (eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Academic Press, Inc., San Diego, U.S.A.
  10. Jack R. W., J. R. Tagg, and B. Ray. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**: 171-200.
  11. Jansen, E. F. and D. J. Hirschmann. 1944. Subtilin-an antibacterial product of *Bacillus subtilis*: culturing conditions and properties. *Arch. Biochem.* **4**: 297-309.
  12. Jiraphocakul, S., T. W. Sullivan, and K. M. Shahani. 1990. Influence of a dried *Bacillus subtilis* culture and antibiotics on performance and intestinal microflora in turkeys. *Poult. Sci.* **69**: 1966-1973.
  13. Meyer, H. E., M. Heber, B. Eisermann, H. Korte, J. W. Metzger, and G. Jung. 1994. Sequence analysis of lantibiotics: chemical derivatization procedures allow a fast access to complete Edman degradation. *Anal. Biochem.* **223**: 185-190.
  14. Niall, H. D. 1973. Automated Edman degradation: The protein sequenator. *Methods Enzymol.* **27**: 942-1010.
  15. Oscariz, J. C., I. Lasa, and A. G. Pisabarro. 1999. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **178**: 337-341.
  16. Oscariz, J. C., L. Cinatas, H. Holo, I. Lasa, I. F. Nes, and A. G. Pisabarro. 2006. Purification and sequencing of cerein 7B, a novel bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *FEMS Microbiol. Lett.* **254**: 108-115.
  17. Paik, H. D., S. S. Bae, S. H. Park, and J. G. Pan. 1997. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 294-298.
  18. Paik, S. H., A. Chakicherla, and J. N. Hansen. 1998. Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *J. Biol. Chem.* **273**: 23134-23142.
  19. Piard, J. C. and M. Desmazeaud. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antimicrobial factors. *Dairy. Sci. Tech.* **72**: 113-142.
  20. Schagger, 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.
  21. Schallmeyer, M., A. Singh, and O. P. Ward. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* **50**: 1-17.
  22. Smith, B. J. 1994. Chemical cleavage of proteins. *Methods Mol. Biol.* **32**: 297-309.
  23. Tagg, J. R., A. S. Dajani, and L. W. Wannamaker. 1976. Bacteriocin of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**: 722-756.
  24. Tagg, J. R. and A. R. Mcgiven. 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.* **21**: 943.
  25. Uyangaa, T. 2007. Studies on the culture medium for large production of spores of *Bacillus subtilis* and purification of antibacterial activity of *Bacillus* sp. strain. (PhD dissertation). An seoung: Hangkyoung University.
  26. Von Döhren, H. 1995. Peptides, pp. 129-171. In L. C. Vining and C. Stuttard. (eds.), *Genetics and Biochemistry of Antibiotic Production*. Butterworth-Heinemann, Newton, M.A.
  27. Yang, E. J. and H. C. Chang. 2007. Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Bacillus subtilis* MJP1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 339-346.
  28. Zheng, G., L. Z. Yan, J. C. Vederas, and P. Zuber. 1999. Genes of the *sbo-alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilosin. *J. Bacteriol.* **181**: 7346-7355.

(Received Jan. 6, 2010/Accepted Feb. 25, 2010)