

Bacillus polyfermenticus CJ6가 생산하는 항세균 물질의 특성 및 병원성 식중독 미생물의 성장 억제 효과

정지혜 · 장해춘[†]

조선대학교 식품영양학과, 김치연구센터

Characterization of Antibacterial Compounds from *Bacillus polyfermenticus* CJ6 and Its Growth Inhibition Effect on Food-Borne Pathogens

Ji Hye Jung and Hae Choon Chang[†]

Dept. of Food and Nutrition and Kimchi Research Center, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Abstract

In this study, *Bacillus polyfermenticus* CJ6 harboring antibacterial activity was isolated from meju. The anti-bacterial activity of *Bacillus polyfermenticus* CJ6 was stable in the pH range of 3.0~9.0, but it disappeared after culture at 70°C for 24 hr. Antibacterial activity was inactivated by proteinase K, protease, and α -chymotrypsin, indicating its proteinaceous nature. The growth inhibitory effects of *B. polyfermenticus* CJ6 culture on food-borne pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhi, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 were examined in this study. Approximately 6~6.2 log CFU/mL of each pathogen was co-cultured with *B. polyfermenticus* CJ6 in a 50 mL culture volume for 24 hr. Growth of *S. aureus* and *L. monocytogenes* was completely inhibited after 3 hr of incubation. Growth of *S. Typhi* and *E. coli* O157:H7 was also completely inhibited after 6 hr of incubation. The antibacterial compounds from *B. polyfermenticus* CJ6 were purified by solid phase extraction (C18 Sep-pak cartridge), recycling preparative HPLC, and analytical HPLC. Ultra-high performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis were used to identify the purified antibacterial compounds, which were confirmed to be five peptides (757.4153 Da, 750.3444 Da, 1024.5282 Da, 1123.6083 Da, and 1617.8170 Da).

Key words: *Bacillus polyfermenticus*, bacteriocin, food-borne pathogens, growth inhibition

서 론

Bacillus 속은 그람 양성균에 내생 포자를 형성하며 토양, 먼지, 물, 식물, 식품 그리고 곤충, 동물의 위 장관 등 다양한 환경에서 존재한다(1). *Bacillus* 속은 생리활성을 가진 수많은 단백질을 생산하며, 넓은 항균 spectrum과 다양한 구조를 지니는 항균물질을 생산하는 특징을 지니고 있다. 세균에서 생산되는 항균 활성 peptide나 protein은 bacteriocin 또는 bacteriocin-like substance(BLS)라고 하며 *Bacillus* 균주가 생산하는 많은 bacteriocin과 BLS가 보고되었다(2-4). Bacteriocin은 여러 종의 미생물이 생산하는 천연 항균성 단백질, 또는 단백질계 물질로서 일반적으로 bacteriocin을 생산하는 미생물과 형태, 계통학적으로 유사한 균종에 대하여 항균기작을 갖는 물질을 말한다(5). Bacteriocin은 인체에 무해하고 잔류성이 없으며 기존의 항생제가 2차 대사산물인데 반하여 plasmid나 chromosome으로부터 직접 생합성 되어 유전자조작 등에 의한 생물 공학적 응용이 쉽다는 장점이

있다(5).

식중독이란 병원성 미생물, 화학물질, 자연독 등을 함유한 식품을 섭취한 후 발생하는 질환으로 세계보건기구(WHO)에서는 “식품 또는 물의 섭취에 의해 발생되었거나 발생된 것으로 생각되는 감염성 독소형 질환”으로 규정하고 있다. 그러나 광범위하게 식중독은 섭취한 식품이 원인이 되어 발생하는 모든 질환을 의미하며, 병원체의 전파에 의한 감염 증상의 전염병과 대비된다(6).

식품의약품안전청의 통계에 따르면 2002년~2010년 12월 까지 우리나라에서 가장 많이 발생하는 세균성 식중독 원인 균을 살펴보면 pathogenic *Escherichia coli* 246건, *Salmonella* spp. 215건, *Vibrio parahaemolyticus* 177건, *Staphylococcus aureus* 165건 순으로 나타났으며, 2005년 이후 Norovirus로 인한 식중독 발생 또한 급격히 증가하고 있는 것으로 나타났다(7).

식품에서 식중독 세균과 부패 세균의 증식을 억제할 목적으로 많은 종류의 보존료 사용이 증가하게 되었다. 하지만

[†]Corresponding author. E-mail: hcchang@chosun.ac.kr
Phone: 82-62-230-7345, Fax: 82-62-222-8086

화학합성 보존료가 지속적으로 체내에 축적될 경우에는 만성독성, 발암성, 돌연변이 유발성 등의 부작용이 발생함에 따라 최근에는 독성과 잔류의 염려가 없는 천연물을 이용한 항균 활성 물질을 탐색하는 연구가 활발하게 진행되고 있다(8).

*B. polyfermenticus*는 약 $0.8 \times 4 \sim 4 \mu\text{m}$ 의 크기의 간균으로 그람 양성, 비병원성 균이며, 아포를 형성하고 평판 배양 시 옅은 황색의 콜로니를 형성한다(9). 또한 20여종의 효소를 분비하여 인체의 3대 영양소인 탄수화물, 지방, 단백질 및 섬유소를 소화, 흡수시키고 병원성 균들인 티프스균, 파라 티프스균, 콜레라균, 적리균 등을 용균시켜 생육을 억제하는 기능을 가지고 있다(9). 최근 *Bacillus* 속을 이용한 프로바이오틱 생균제에 관한 산업적 관심이 증대되고 있으며 그중 *B. polyfermenticus*를 활용한 생균제제는 이미 국내에서 일반의약품으로 시판되고 있다(10). 그러므로 식품의 부패와 식중독을 일으키는 세균에 대해 적용될 수 있는 GRAS (generally regarded as safe) 등급의 새로운 *B. polyfermenticus* strain 유래의 항균제나 생균제제의 개발은 그 유용성을 더욱 크게 할 것이다(11).

본 연구팀은 우리나라 재래식 메주로부터 항세균 활성과 항진균 활성을 동시에 지니는 *B. polyfermenticus* CJ6를 분리하고 그중 항진균 활성 물질의 특성을 규명하여 보고한바 있다(12). 본 연구에서는 *B. polyfermenticus* CJ6가 생산하는 항세균 활성 물질을 분리·정제하여 그 특성을 규명하고, 더나가 우리나라 주요 식중독 세균인 *Salmonella* Typhi, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*의 생육 억제에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

메주로부터 분리하여 동정된 *B. polyfermenticus* CJ6를 항세균 활성 물질 생산 균주로 사용하였다(12). 항세균 활성 실험에서 감수성균으로 사용한 *B. subtilis* ATCC 6633과 식중독 세균인 Gram 음성균 *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi ATCC 19430, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, Gram 양성균 *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* ATCC 19113 균주는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. *B. polyfermenticus* CJ6의 항진균 활성 실험에서는 *Aspergillus petrakii* PF-1 균주(12)를 감수성 균주로 사용하였다. *B. polyfermenticus* CJ6, *S. Typhi*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 배양 배지는 tryptic soy broth (TSB, Difco, Sparks, MD, USA)를 사용하였으며, *L. monocytogenes*는 brain heart infusion(BHI, Difco)을 배양 배지로 사용하였다. *B. subtilis* ATCC 6633은 Luria broth (LB, 1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)를 사용하였으며, *A. petrakii* PF-1은 potato dextrose agar

(PDA, Difco)를 배양배지로 사용하였다.

B. polyfermenticus CJ6의 배양 및 항세균 활성 물질의 준비

B. polyfermenticus CJ6 균주를 5 mL TSB 액체배지에 접종하여 37°C에서 12시간 전배양한 후, 50 mL TSB 액체배지에 전배양액을 1% 접종하여 37°C에서 8시간 동안 본배양 하였다. 본배양액은 원심분리(9,500×g, 15 min, 4°C)한 후 상등액을 0.2 μm membrane filter(Advantec, Tokyo, Japan)로 여과하여 제공된 여과액을 항세균 활성 물질 시료로 사용하였다.

생육곡선과 항세균 활성의 측정

B. polyfermenticus CJ6의 배양시간에 따른 생육도와 항세균 활성을 조사하기 위하여 50 mL TSB 액체배지에 1% 접종하여 37°C에서 0~36시간 동안 진탕배양하면서 600 nm(Ultrospec 2100 pro, Amersham, Uppsala, Sweden)에서 흡광도를 측정하여 생육곡선을 그리고, 이때 생육시기에 따른 항세균 활성을 측정하였다.

항세균 활성 측정은 spot-on-the-lawn test(13)를 사용하여 다음과 같이 시행하였다. 감수성 세균인 *B. subtilis* ATCC 6633을 지시균으로 사용하여 LB 평판배지에 약 1×10^5 CFU/mL로 도말한 후 준비된 항세균 활성 물질 5 μL 를 배지 위에 spotting하여 37°C에서 12시간 배양한 후 항세균 활성을 측정하였다. 활성 역가는 항세균 활성 물질을 순차적으로 2배씩 희석하여 저해환을 형성하는 최대 희석배수의 역을 취하고, 이 값에 1 mL에 대해서 환산해주는 환산계수를 곱하여 AU/mL로 나타내었으며 3회의 반복실험을 한 후 평균 값을 사용하였다.

항세균 활성 물질의 안정성

항세균 활성 물질의 온도, pH 및 각종 효소처리에 대한 안정성을 조사하였다. 온도에 의한 영향을 알아보기 위하여 *B. polyfermenticus* CJ6의 배양상등액을 25°C, 37°C, 50°C, 70°C에서 24시간, 100°C에서 30분, 121°C에서 15분간 열처리 한 후에 잔존 활성을 측정하였다(11,14,15). 대조구는 배양상등액을 4°C에서 24시간 처리한 것으로 삼았다.

pH에 대한 영향을 알아보기 위하여 *B. polyfermenticus* CJ6의 배양상등액을 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 acetate), pH 7.0(50 mM Tris-HCl), pH 8.0(50 mM Tris-HCl), pH 9.0(50 mM glycine-NaOH) 완충용액을 5 N HCl과 5 N NaOH를 사용하여 조정한 후 4°C에서 4시간 동안 처리한 후 항세균 활성을 측정하였다(11,15). 대조구는 동일한 반응조건에서 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)로 처리하여 활성을 측정하였다.

각종 효소에 대한 영향을 알아보기 위하여 *B. polyfermenticus* CJ6의 배양상등액에 proteinase K(EC 3.4.21.64,

Sigma, St. Louis, MO, USA)는 10 mM Tris-HCl 50 mM NaCl 5 mM EDTA(pH 7.5), protease(type I, Sigma) 및 trypsin(EC 3.4.21.4, Sigma)은 50 mM Tris-HCl(pH 7.5), pepsin(EC 3.4.23.1, Sigma)은 10 mM citrate(pH 6.0), α -chymotrypsin(EC 3.4.21.1, type I-S, Sigma)은 10 mM phosphate(pH 7.0), lipase(EC 3.1.1.3, type VII, Sigma)는 50 mM Tris-HCl 10 mM CaCl₂(pH 7.0), α -amylase(EC 3.2.1.1, Type VIII, Sigma)는 50 mM sodium phosphate 10 mM NaCl(pH 7.0)에 4 mg/mL의 농도로 trypsin, α -chymotrypsin은 25°C에서 6시간을 처리하였고, 나머지 효소들은 37°C에서 6시간을 처리한 후에 잔존하는 항세균 활성을 측정하였다(11,15). 이때 대조구로서는 동일한 반응조건에서 효소첨가만을 제외한 것으로 삼았다. 잔존하는 항세균 활성 측정은 spot-on-the-lawn test(13)를 사용하여 감수성 세균으로는 *B. subtilis* ATCC 6633을 사용하였다.

Solid phase extraction(SPE) 정제

50 mL TSB 액체배지에서 전배양액을 1% 접종하여 37°C에서 4시간 동안 본배양한 배양상등액을 원심분리(9,500×g, 15 min, 4°C) 후 상등액을 0.2 μ m membrane filter로 제균하여 배양상등액을 준비하였다. 배양상등액 50 mL을 활성화된 소수성 column인 C18 Sep-pak cartridge(Waters, Boston, MA, USA)를 수세한 후에 통과시켜 소수성 물질들을 흡착시키고 20 mL의 3차 증류수로 다시 수세한 뒤 methanol(HPLC-grade, Fisher, Fair Lawn, NJ, USA) 7 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.

Recycling preparative HPLC(high performance liquid chromatography) 정제

SPE 처리 후 methanol을 제거한 시료는 80%(v/v) aqueous acetonitrile에 완전히 녹인 후에 0.20 μ m syringe filter로 여과하여 HPLC(LC 9104, Japan Analytical Industry, Tokyo, Japan) 정제 시료로 사용하였다. 항세균 물질을 분리하기 위한 1차 HPLC 정제 조건은 다음과 같다. HPLC column은 JAIGEL-W252 prep-column(Japan Analytical Industry)을 사용하였으며, 20×500 mm 규격 column 한 개를 사용하였다. 80% aqueous acetonitrile을 용매로 flow rate는 3 mL/min 조건으로 시행하였으며, UV detector(3702, Japan Analytical Industry)를 사용하여 210 nm의 파장에서 검출하였다. 분리·정제된 모든 분획은 speed vac을 이용하여 용매를 완전히 제거하여 spot lawn method(13)를 사용하여 다음과 같이 항균 활성을 측정하였다. 용매가 제거된 각 분획을 10 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충액 20 μ L에 녹여 이중 10 μ L는 *B. subtilis* ATCC 6633에 대한 항세균 활성을, 나머지 10 μ L는 *A. petrakii*에 대한 항진균 활성을 나타내는

구획을 조사하였다. 항세균 활성이 확인된 구획만을 다시 80% aqueous acetonitrile에 완전히 녹인 후 0.20 μ m syringe filter로 여과하여 동일한 방법으로 2차 HPLC를 시행하였다.

Analytical HPLC 정제

Recycling preparative HPLC로 정제된 시료를 5%(v/v) aqueous acetonitrile에 완전히 녹인 후에 0.20 μ m syringe filter(Minisart RC 4, Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany)로 여과하여 analytical HPLC(Younglin Acume HPLC, Younglin, Anyang, Korea) 시료로 사용하였다. Analytical HPLC 정제 시 LUNA 5 μ C18(2) column(4.6×250 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 사용하였으며 5% aqueous acetonitrile(A), 80% aqueous acetonitrile(B) 용매를 사용하여 분리·정제하였다. Flow rate는 0.4 mL/min으로 하여 gradient 조건은 처음 A: 100%, B: 0%로 시작하여 Fig. 3의 gradient 조건에 따라 분리·정제하였고, UV detector(UV730D, Younglin)를 사용하여 210 nm의 파장에서 검출하였다. 용출된 분획을 구획별로 나누어 speed vac으로 용매를 완전히 제거하였으며 각 분획은 10 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충액 10 μ L에 녹여 spot lawn method(13)를 사용하여 *B. subtilis* ATCC 6633에 대한 항세균 활성을 나타내는 구획을 조사하였다.

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

정제된 항세균 활성을 나타내는 물질을 UPLC에 의한 ESI-MS/MS를 시행하였다. 항세균 활성을 나타내는 3개의 분획을 acquity BEH C18 1.7 μ m column(2.1×100 mm, Waters)을 사용하여 0.1% formic acid/100% H₂O와 0.1% formic acid/100% acetonitrile을 용매로 정제한 후 Synapt HDMS(High Definition Mass Spectrometry™, Waters)를 사용하여 이온화하고 분자량을 측정하였다.

식중독 세균 생육 저해 활성

B. polyfermenticus CJ6의 식중독 세균 4종에 대한 생육 저해 활성을 조사하였다. 식중독 세균과 *B. polyfermenticus* CJ6는 5 mL TSB 또는 BHI 액체배지에 각각 1%씩 접종하여 37°C에서 12~24시간 배양한 후 원심분리(9,500×g, 15 min, 4°C)하여 균체를 회수하였다. 각각의 식중독 세균과 *B. polyfermenticus* CJ6는 약 6.0~6.2 log CFU/mL로 회석하였다. 회석된 각각의 식중독 세균 1종과 *B. polyfermenticus* CJ6를 1:1 volumn으로 50 mL TSB 또는 BHI 액체 배지에 접종하여 접종 직후 혼합 균체 농도가 최종 약 6.2~6.4 log CFU/mL가 되도록 하였다. 이를 37°C에서 0~24시간 동안 진탕배양하면서 3시간마다 식중독 세균과 *B. polyfermenticus* CJ6의 생균수를 측정하였다. 식중독 세균과 *B. polyfermenticus* CJ6의 변별은 plate 상에서 *B. polyfermenticus* CJ6는 plate 배양 시 점질물을 포함한 불룩한 모양의 colony

를 형성함에 반하여 식중독 세균은 일반적 세균 colony 모양으로 확연히 구분할 수 있었다. 대조군으로는 각 식중독 세균과 *B. polyfermenticus* CJ6의 균체 배양액을 50 mL TSB 또는 BHI 액체배지에 최종 약 6.0~6.2 log CFU/mL가 되도록 각각 단독 접종하여 배양한 것으로 하였다.

결과 및 고찰

생육시기에 따른 항세균 활성

B. polyfermenticus CJ6는 배양 4시간경 대수기를 나타내며 16시간 이후 정지기에 도달함을 알 수 있었다. 항세균 활성은 배양 4시간부터 나타나기 시작하여 8시간에 최대 활성(102,400 AU/mL)을 나타내었으며 이후 급격히 항세균 활성이 감소하여 배양 12시간에 최대 활성의 50%를 나타내며 배양 16시간 이후에는 거의 활성이 소실되어(12,800 AU/mL) 이후 36시간까지 3,200 AU/mL 정도의 활성을 유지하였다(Fig. 1).

기존의 보고에서 *B. polyfermenticus* CJ9이 생산하는 항세균 활성 물질은 생육 12시간에 최대 활성을 나타내고 정지기에 접어든 생육 36시간 이후부터 72시간까지도 최대 활성을 유지하다가, 사멸기인 96시간에 최대 활성의 50%가 감소하여 120시간에는 활성이 완전히 소실되었다고 보고되어 *B. polyfermenticus* CJ9이 *B. polyfermenticus* CJ6보다 생육에 따른 항세균 활성 안정성이 높음을 알 수 있었다(11). 그러나 *B. polyfermenticus* SCD의 항세균 활성은 생육 3시간에 최대 활성(약 6,400 AU/mL)을 나타내고 생육 4시간에 정지기에 이르러 급격하게 활성이 감소하는 것으로 나타나 본 연구 결과에서와 같이 정지기에 진입하면서 바로 항세균 활성이 감소함을 알 수 있었다(14). 이러한 항세균 활성의 감소는 균의 포자형성과 세포의 자가분해에 의한 세포 내 단백분해 효소의 방출에 의하여 분해 작용에 의한 결과로 생각되며 (2), 이로부터 *B. polyfermenticus* CJ6가 생산하는 항세균 활성 물질은 단백분해효소에 의해 분해되는 단백질성 물질을 추정할 수 있다.

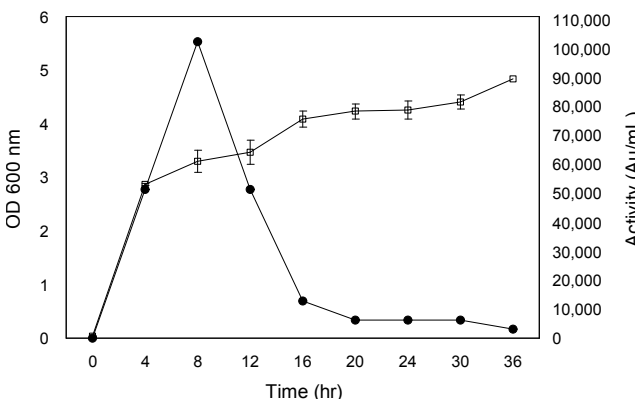


Fig. 1. Growth and antibacterial activity of *B. polyfermenticus* CJ6. □, *B. polyfermenticus* CJ6 cell growth; ●, antibacterial activity (AU/mL) against *B. subtilis* ATCC 6633. All values were mean ± SD (n=3).

항세균 활성 물질의 안정성

항세균 활성 물질의 안정성

B. polyfermenticus CJ6의 항세균 물질의 열안정성 실험 결과 항세균 활성 물질은 37°C에서 24시간 처리 시 그 활성이 50% 저하되며 70°C에서 24시간 처리 후 역가가 완전히 소실되어 열에 불안정함을 알 수 있었다(Table 1). pH에 대한 안정성 실험에서 *B. polyfermenticus* CJ6의 항세균 활성 물질은 pH 3.0~9.0 구간에서 안정한 활성을 나타내어 분리균주가 생산하는 항세균 물질은 산성에서부터 알칼리 영역까지 전 pH 구간에서 안정함을 알 수 있었다(Table 1). 각종 효소에 대한 영향을 살펴본 결과 *B. polyfermenticus* CJ6의 항세균 활성 물질은 pepsin, trypsin, α-amylase, lipase 처리에 영향을 받지 않았으나 protease, α-chymotrypsin을 처리 시 역가가 크게 감소하였으며 proteinase K의 단백분해 효소에 역가를 완전히 상실하였다(Table 1).

이로부터 *B. polyfermenticus* CJ6가 생산하는 항세균 활성 물질은 단백질성 물질임을 추정할 수 있다. 현재까지 *B. polyfermenticus*가 생산하는 bacteriocin 물질에 대한 연구는 많지 않으며 *B. polyfermenticus* CJ9이 생산하는 항세균 활성 물질과 *B. polyfermenticus* SCD가 생산하는 polyfermenticin SCD라는 물질이 보고되고 있다(11,14). *B. polyfermenticus* CJ9이 생산하는 항세균 활성 물질은 37°C 이상

Table 1. Effect of heat, pH and enzyme treatment on the antibacterial activities of *B. polyfermenticus* CJ6

Treatment	Antibacterial activity (AU/mL)
Control	102,400
Heat 25, 24 hr	102,400
Heat 37, 24 hr	51,200
Heat 50, 24 hr	1,600
Heat 70, 24 hr	0
Heat 100, 30 min	0
Heat 121, 15 min	0
Control	102,400
pH 3.0	102,400
pH 4.0	102,400
pH 5.0	102,400
pH 6.0	102,400
pH 7.0	102,400
pH 8.0	102,400
pH 9.0	102,400
Control	102,400
Enzyme Proteinase K	0
Enzyme Protease	6,400
Enzyme Pepsin	102,400
Enzyme Trypsin	102,400
Enzyme α-Chymotrypsin	6,400
Enzyme Lipase	102,400
Enzyme α-Amylase	102,400

The antibacterial activity was measured by the spot-on-the lawn test. *B. subtilis* ATCC 6633 was used as indicator.

의 온도에서 그 활성이 완전히 소실되어 열에 불안정하고 pH 5.0~9.0 구간에서 안정하였으며 proteinase K, protease, trypsin, α-chymotrypsin에 활성이 완전히 소실되었으며 Gram 양성균에서 Gram 음성균에 이르기까지 넓은 범위의 항세균 활성을 가지는 것으로 나타났다(11). Polyfermenticin SCD는 열에 안정하며, pH 2.0~9.0 구간에서 안정하였으며 proteinase K에 의해 활성이 소실되었으며 항세균 spectrum이 좁은 것으로 보고되고 있다(14). *B. polyfermenticus* CJ6가 생산하는 항세균 활성 물질은 위 두건의 보고와 단백질 분해 효소에 실패한다는 점은 유사하지만, 보다 세부적인 특징 즉 실패하는 단백질 분해 효소의 종류, 항세균 활성 물질의 안정된 pH 구간, 항균 스펙트럼, 항균력 등에서 다소 다른 특징을 나타내는 것으로 보인다. 또한 *B. polyfermenticus* CJ6가 생산하는 항진균 활성 물질과 그 특성을 비교 시 항진균 활성 물질은 121°C에서 15분간 열처리 시에도 원래 역가의 25% 정도를 유지할 정도로 열에 매우 안정하다는 차이점이 있다(12).

Recycling preparative HPLC 정제

B. polyfermenticus CJ6가 생산하는 항세균 활성 물질을 정제하기 위해 배양 상등액을 SPE 정제한 후, recycling preparative HPLC JAIGEL-W252 column(20×500 mm)으로 분리·정제하여 8개의 분획을 얻었다(Fig. 2A). 각 분획의 항세균 및 항진균 활성을 확인한 결과 3, 4번 분획에서 가장 강한 항세균 활성을 나타내었으나 3번 분획은 항진균 활성도 함께 검출되어(Fig. 2A-a, b), 4번 분획만을 이후의 정제 시료로 사용하였다. 4번 분획을 5배 농축하여 2차 HPLC 정제를 시행하여 5개의 분획을 얻었다(Fig. 2B). 분리

된 5개의 분획의 항세균 및 항진균 활성을 조사한 결과 5개의 분획 모두 항진균 활성은 나타내지 않았으며 4-4번 분획에서 가장 강한 항세균 활성을 나타내어(Fig. 2B-a, b) 다음 단계의 정제 실험 시료로 사용하였다.

Analytical HPLC 정제

두 차례에 걸친 recycling preparative HPLC 정제 시료는 analytical HPLC로 다시 정제하였다(Fig. 3). 총 3개의 peak로 분리하여 각 peak의 항세균 활성을 확인하였을 때 3개의 peak 모두에서 항세균 활성이 관찰되었다. 항세균 활성은 peak 2, peak 1, peak 3 순으로 강한 활성을 나타내었다(Fig. 3). 3개의 분획은 각각 분취하여 분자량 결정을 위한 ESI-MS/MS 분석의 시료로 사용되었다.

UPLC를 이용한 ESI-MS/MS

정제된 *B. polyfermenticus* CJ6가 생산하는 항세균 활성 물질(3 peaks-Fig. 3)의 정확한 분자량을 결정하기 위하여 UPLC를 이용하여 ESI-MS/MS를 시행하였다. 3개의 peak 중 1번 peak에서는 2개(M.W.: 757.4153 Da, 750.3444 Da), 2번 peak에서는 1개(M.W.: 1024.5282 Da), 3번 peak에서는 2개(M.W.: 1123.6083 Da, 1617.8170 Da)의 각각 다른 분자량을 나타내는 5개의 peptide가 검출되었다(Fig. 4A~E). 이상의 결과로부터 *B. polyfermenticus* CJ6가 생산하는 항세균 활성 물질은 분자량이 약 750 Da, 1024.5 Da, 약 1120~1600 Da의 적어도 3개 이상의 서로 다른 항세균 활성 물질을 생산함을 알 수 있었다. 지금까지 다양한 분자량과 특징을 지닌 *Bacillus* 균주가 생산하는 bacteriocin이 보고되고 있으며 (16-24), 이들의 분자량이 보고된 논문들과 모두 비교 분석

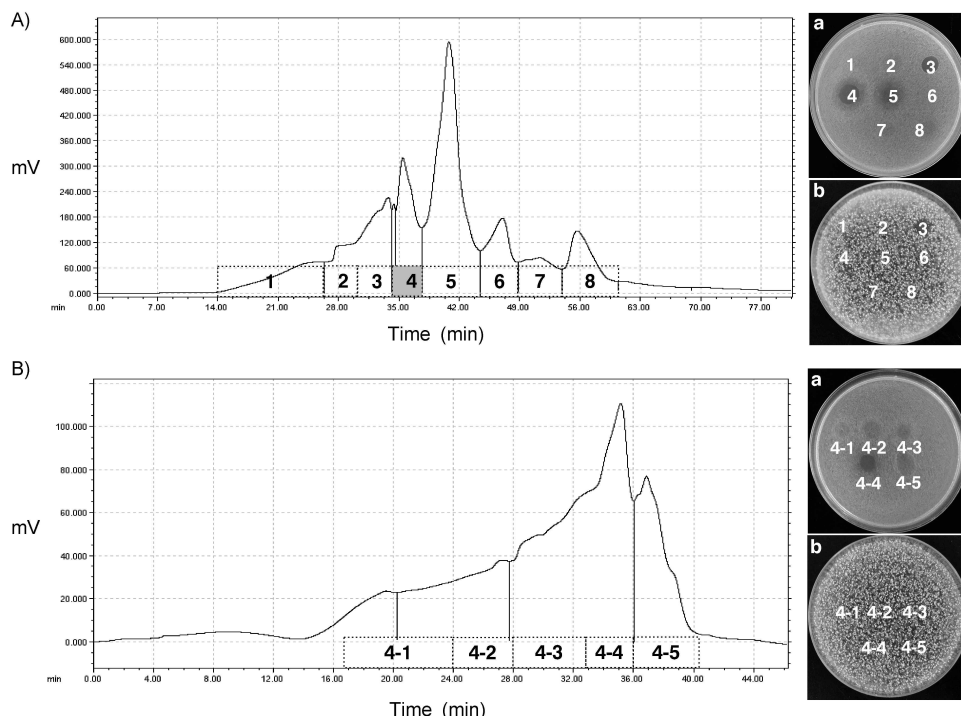


Fig. 2. Isolation of the antibacterial compounds by recycling preparative HPLC. A, Chromatogram of a recycling prep-HPLC after solid phase extraction (SPE) by first injection; B, Chromatogram of a recycling prep-HPLC of the fraction 4 by second injection; a, Antibacterial activity against *B. subtilis* ATCC 6633; b, Antifungal activity against *A. petrakii* PF-1.

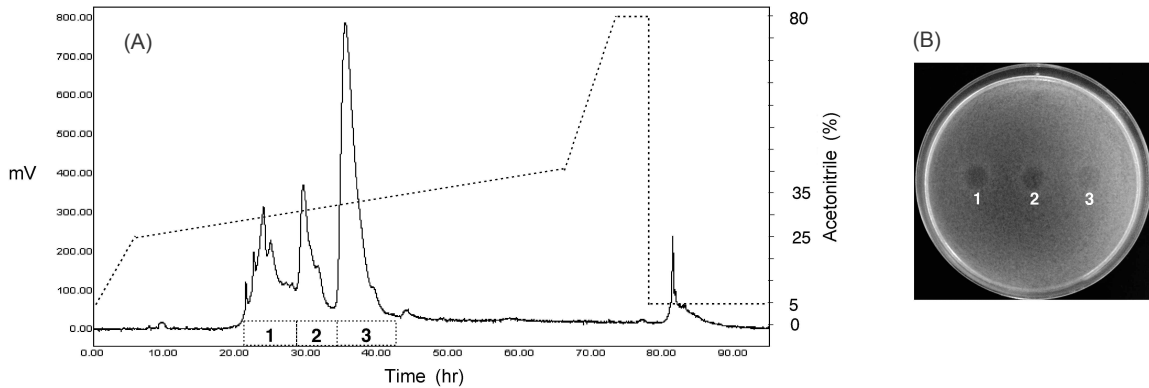


Fig. 3. Isolation of the antibacterial compounds by reversed-phase analytical HPLC. A, Chromatogram of analytical HPLC. Aqueous acetonitrile gradient was shown as dotted line (···); B, Antibacterial activities by spot-on-the lawn test. *B. subtilis* ATCC 6633 was used as indicator.

하였을 때 본 실험에서 분리·정제된 5개의 peptide는 지금까지 보고된 bacteriocin과 다른 분자량을 지니는 것으로 나타났다. 향후 본 실험에서의 5개의 peptide는 bacteriocin 물질의 특성 실험, 구조 분석 등의 연구를 진행하여 어떤 물질인지 명확히 규명되어야 할 것이다.

식중독 세균 생육 저해활성

식중독 세균 4종을 각각 *B. polyfermenticus* CJ6와 동일한 농도(6.0~6.2 log CFU/mL)로 배지에 1:1로 접종하고 이를 공동배양한 후 *B. polyfermenticus* CJ6의 식중독 세균의 생육 저해 효과를 조사하였다(Fig. 5). *S. Typhi*는 단독 배양 시 생육이 점차 증가되어 24시간에 최대 생육도(9.30 log CFU/mL)를 나타내었으나, *B. polyfermenticus* CJ6와 공동배양 하였을 때에는 공동배양 6시간만에 완전히 생육이 저해되는 것으로 나타났다(Fig. 5). *E. coli* O157:H7은 단독 배양 시 12시간에 최대 생육도(9.97 log CFU/mL)를 나타내었으나, *B. polyfermenticus* CJ6와 공동배양 하였을 때는 공동배양 6시간에 완전히 생육이 저해되는 것으로 나타났다(Fig. 5). *S. aureus*는 단독 배양 시 12시간에 최대 생육도(9.18 log CFU/mL)를 나타내었으나, *B. polyfermenticus* CJ6와 공동배양에서는 3시간만에 완전히 생육이 저해되는 것으로 나타났다(Fig. 5). *L. monocytogenes*는 단독 배양 시 24시간에 최대 생육도(11.19 log CFU/mL)를 나타내었으나, *B. polyfermenticus* CJ6와 공동배양에서는 배양 3시간만에 완전히 생육이 저해되는 것으로 나타났다(Fig. 5). 그러나 *B. polyfermenticus* CJ6의 생육은 각각의 식중독 세균과 공동배양 또는 *B. polyfermenticus* CJ6 단독 배양에서 거의 유사한 패턴으로 나타나 *B. polyfermenticus* CJ6의 생육이 식중독 세균에 의해 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(Fig. 5). Chang과 Chang(25)이 보고한 박테리옌을 생산하는 유산균 *Leuconostoc citreum* GJ7을 24시간 배양한 후 그 배양액에 식중독 세균 *E. coli* O157:H7, *S. Typhi*, *S. aureus*의 각 식중독 세균을 약 5 log CFU/mL로 접종하여 공동 배양한 결과 *S. Typhi* 균주만 배양 18시간에 완전히 제어되었으며,

E. coli O157:H7, *S. aureus*는 배양 36시간까지 완전히 생육이 제어되지 않는 것으로 보고된 바 있다(25). 본 연구에서는 박테리옌 생성균주 *B. polyfermenticus* CJ6와 식중독 세균을 동일한 농도(6.0~6.2 log CFU/mL)로 접종 후 공동배양 하여도 배양 3시간~6시간만에 완전히 식중독 세균의 생육이 억제되어 *B. polyfermenticus* CJ6가 매우 강력한 식중독 세균 저해능이 있는 균주임을 알 수 있다. 또한 Gram 음성균(*S. Typhi*, *E. coli* O157:H7, 6시간)보다 Gram 양성균(*S. aureus*, *L. monocytogenes*, 3시간)에 대하여 더 빠른 시간내에 생육을 저해함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 프로바이오틱 균주로서 필요한 특성 중 장내 유해 세균에 대한 항미생물능과 관련하여 장내 유해한 세균의 생육을 억제하면서 *B. polyfermenticus* CJ6의 생육은 유지하여 장내 유용 세균 밸런스를 개선할 수 있을 것으로 생각한다. 본 연구 결과를 통하여 *B. polyfermenticus* CJ6는 정장작용 및 식중독 예방 및 치료용 생균제재(probiotic)로 활용할 수 있을 것이며 더불어 본 균주가 생산하는 항세균 활성 물질을 천연 보존제 등 다양한 관련 산업에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

B. polyfermenticus CJ6가 생산하는 항세균 활성 물질의 특성을 규명하고 정제하였다. 생육에 따른 항세균 활성은 배양 4시간부터 나타나어 정지기인 배양 8시간에 최대 활성(102,400 AU/mL)을 나타내고 이후 급격히 활성이 감소되었다. *B. polyfermenticus* CJ6의 항세균 활성 물질은 37°C에서 24시간 처리 시 활성의 50% 저하되고 70°C에서 24시간 처리 시 활성이 완전히 소실되어 열에 불안정하였으며, pH 3.0~9.0 구간에서 안정한 활성을 나타내었다. *B. polyfermenticus* CJ6의 항세균 활성 물질은 protease, α -chymotrypsin을 처리 시 역가가 크게 감소하였으며 proteinase K의 단백분해 효소에 역가를 완전히 상실하여 단백질성 물질임을 추정하였다. *B. polyfermenticus* CJ6는 *E. coli* O157:H7, *S. aureus*,

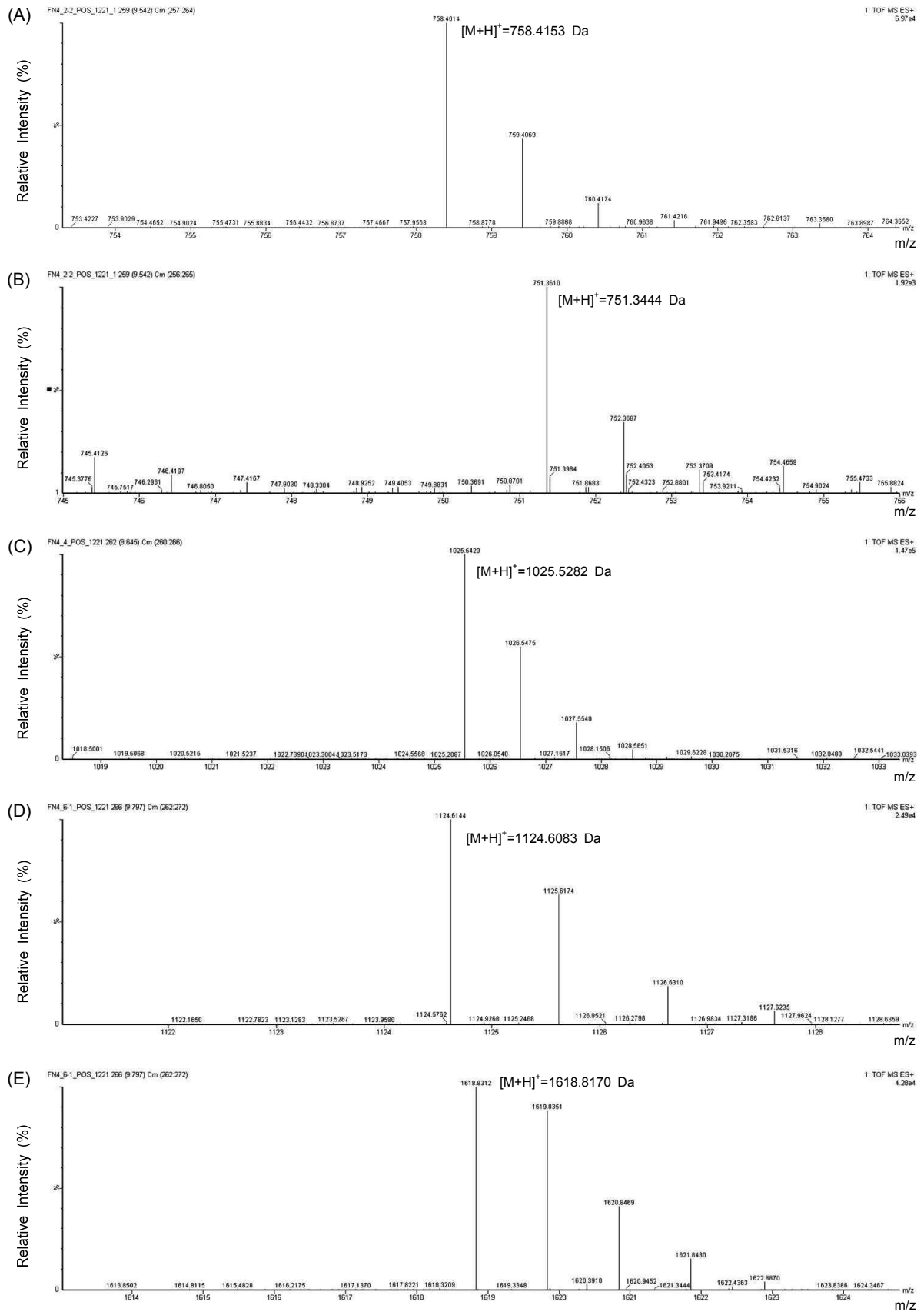


Fig. 4. Electrospray ionization tandem mass spectrum of the purified antibacterial compound from *B. polyfermenticus* CJ6 using ultra performance liquid chromatography. A&B, peak 1 in Fig. 3; C, peak 2 in Fig. 3; D&E, peak 3 in Fig. 3.

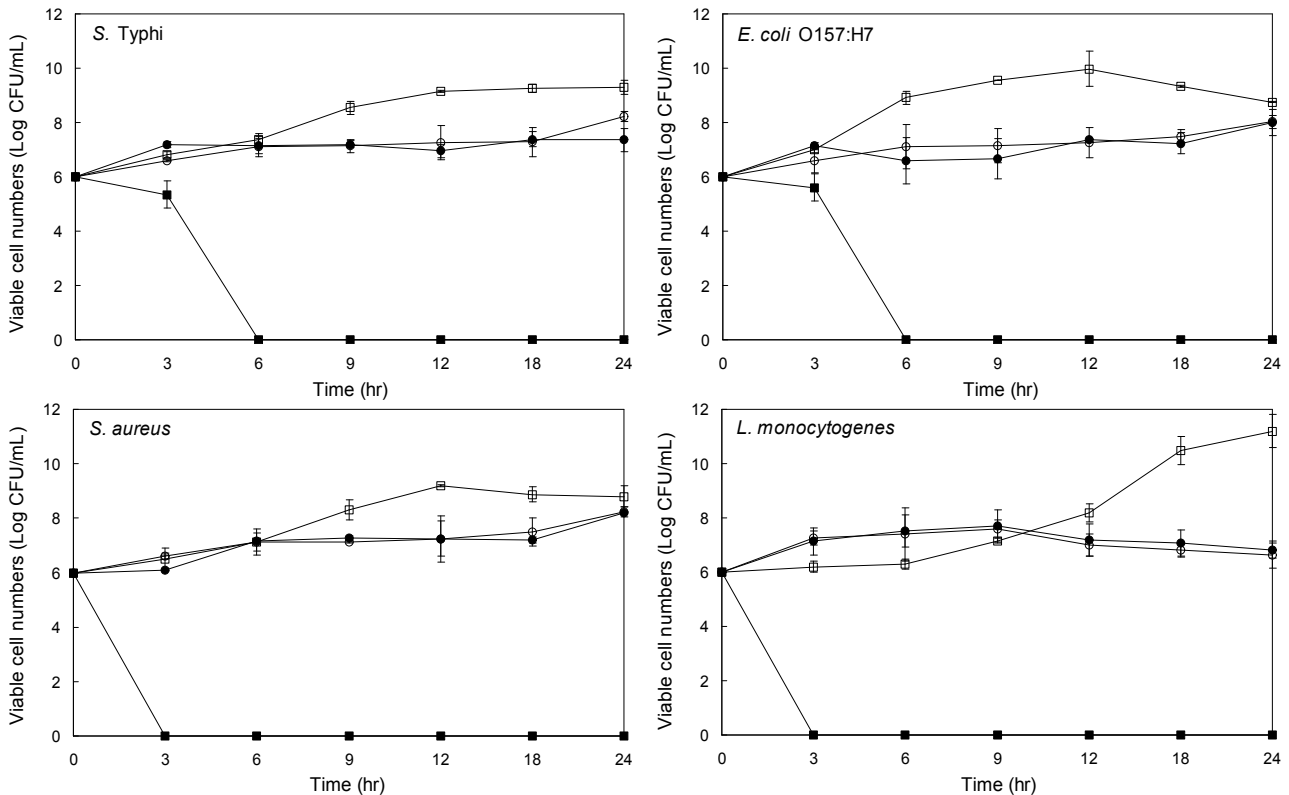


Fig. 5. Growth of the inoculated food-borne pathogens in *B. polyfermenticus* CJ6 culture. ●, *B. polyfermenticus* CJ6 growth with pathogen cell growth; ○, *B. polyfermenticus* CJ6 growth without pathogen cell growth; ■, pathogen growth with *B. polyfermenticus* CJ6 cell growth; □, pathogen growth without *B. polyfermenticus* CJ6 cell growth. All values were mean \pm SD (n=3).

S. Typhi, *L. monocytogenes*의 식중독 세균과의 각각 공동 배양에서 배양 3~6시간 이내에 식중독 세균의 생육을 완전히 저해하는 것으로 나타났다. *B. polyfermenticus* CJ6가 생산하는 항세균 활성 물질은 SPE, recycling preparative HPLC, analytical HPLC을 이용한 4단계의 정제과정을 통하여 최종 항세균 활성을 나타내는 3개의 분획을 분리하였다. 정제된 물질의 분자량을 결정하기 위하여 UPLC를 이용한 ESI-MS/MS를 시행한 결과 3개의 분획에서 분자량이 다른 5개의 peptide(757.4153 Da, 750.3444 Da, 1024.5282 Da, 1123.6083 Da, 1617.8170 Da)를 확인하였으며 이는 기존에 보고된 bacteriocin 분자와는 다른 분자량을 지니는 것으로 나타났다. *B. polyfermenticus* CJ6와 식중독 세균과의 공동 배양 실험에서 *B. polyfermenticus* CJ6는 식중독 세균에 대하여 매우 강력한 항세균 활성을 나타내며 그 원인물질이 되는 새로운 항 미생물 peptides 물질은 천연식품 보존제 및 사료 보존제뿐만 아니라 정장용 제제, 식중독 예방 및 치료용 생균제 등으로도 활용이 기대되며, 이를 위하여 분리된 5개의 peptide의 정확한 구조 및 특성 규명 등의 연구가 앞으로 필요할 것이다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 식품기술개발사업에 의한 연

구비로 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

문헌

- Nicholson WL. 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cell Mol Life Sci* 59: 410-416.
- Bizani D, Brandelli A. 2002. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8 A. *J Appl Microbiol* 93: 512-519.
- Zheng G, Yan LZ, Vederas JC, Zuber P. 1999. Genes of the *sbo*-*alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilosin. *J Bacteriol* 181: 7346-7355.
- Paik HD, Bae SS, Park SH, Pan JG. 1997. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19: 294-298.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 71: 1-20.
- Oldfield EC. 2001. Emerging foodborne pathogens: keeping your patients and your families safe. *Rev Gastroenterol Disord* 1: 177-186.
- Korea Food & Drug Administration. 2010. http://e-stat.kfda.go.kr/sub2/sub2_5.jsp
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 40: 722-756.
- Duc LH, Cutting SM. 2003. Bacterial spores as heat stable vaccine vehicles. In *Expert Opinion on Biological Therapy*. School of Biological Sciences, Royal Holloway, University

- of London, Egham, UK. Vol 3, p 1263-1270.
10. Biscan, Binex Co. Ltd., Busan, Korea. 2001. http://www.bi-nex.com/sub02/sub_01_view.asp?bd=product_info&mode=&num=173&GotoPage=1&keyfield=&keyword=&sp_group=&p_type=일반의약품&sr=&tr=&mr=&sp_text=&p_col=&sp_name=
 11. Jung JH, Chang HC. 2009. *Bacillus polyfermenticus* CJ9, isolated from meju, showing antifungal and antibacterial activities. *Kor J Microbiol Biotechnol* 37: 340-349.
 12. Jung JH, Chang HC. 2009. Antifungal activity of *Bacillus polyfermenticus* CJ6 isolated from meju. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 509-516.
 13. Hoover DG, Harlander SK. 1993. Screening methods for detecting bacteriocin activity. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Hoover DG, Steenson LR, eds. Academic Press, Inc., San Diego, CA, USA. p 23-39.
 14. Lee KH, Jun KD, Kim WS, Paik HD. 2001. Partial characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. *Lett Appl Microbiol* 32: 146-151.
 15. Yang EJ, Chang HC. 2007. Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Bacillus subtilis* MJPI. *Kor J Microbiol Biotechnol* 35: 339-346.
 16. Cherif A, Rezgui W, Raddadi N, Daffonchio D, Boudabous A. 2008. Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD110. *Microbiol Res* 163: 684-692.
 17. Khalil R, Elbahloul Y, Djadouni F, Omar S. 2009. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 19 strain. *Pakistan J Nutr* 8: 242-250.
 18. Sebei S, Zendo T, Boudabous A, Nakayama J, Sonomoto K. 2007. Characterization, N-terminal sequencing and classification of cerein MRX1, a novel bacteriocin purified from a newly isolated bacterium: *Bacillus cereus* MRX1. *J Appl Microbiol* 103: 1621-1631.
 19. Stein T, Borchert S, Conrad B, Feesche J, Hofemeister B, Hofemeister J, Entian KD. 2002. Two different lantibiotic-like peptides originate from the ericin gene cluster of *Bacillus subtilis* A1/3. *J Bacteriol* 184: 1703-1711.
 20. Naclerio G, Ricca E, Sacco M, De Felice M. 1993. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 59: 4313-4316.
 21. Oscáriz JC, Pisabarro AG. 2000. Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *J Appl Microbiol* 89: 361-369.
 22. Abriouel H, Franz CM, Ben Omar N, Gálvez A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev* 35: 201-232.
 23. Ahern M, Verschuere S, van Sinderen D. 2003. Isolation and characterization of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. *FEMS Microbiol Lett* 220: 127-131.
 24. Shelburne CE, An FY, Dholpe V, Ramamoorthy A, Lopatin DE, Lantz MS. 2007. The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilisin A. *J Antimicrob Chemother* 59: 297-300.
 25. Chang JY, Chang HC. 2011. Growth inhibition of foodborne pathogens by kimchi prepared with bacteriocin-producing starter culture. *J Food Sci* 76: M72-M78.

(2011년 3월 21일 접수; 2011년 6월 3일 채택)