

Isolation of *Bacillus velezensis* SSH100-10 with Antifungal Activity from Korean Traditional Soysauce and Characterization of Its Antifungal Compounds

Mi Chang, Song Hee Moon and Hae Choon Chang[†]

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

전통재래 간장으로부터 항진균 활성 *B. velezensis* SSH100-10의 분리와 그 항진균 물질의 특성 구명

장미 · 문송희 · 장해춘[†]

조선대학교 식품영양학과 · 김치연구센터

Abstract

The SSH100-10 bacterial strain, which exhibits strong antifungal (anti-mold and anti-yeast) activity, was isolated from traditional Korean soysauce aged 100 years. The strain was identified as *Bacillus velezensis* based on Gram-staining, the biochemical properties and 16S rRNA gene sequence determination. *B. velezensis* SSH100-10 showed strong proteinase activity and NaCl tolerance, but did not produce enterotoxin. Two-antifungal compounds from *B. velezensis* SSH100-10 were purified using SPE, preparative HPLC, and reverse phase-HPLC. The purified antifungal compounds were identified as C₁₄ and C₁₅ iturin through MALDI-TOF-MS and amino acid composition analysis. The stability characteristics of the antifungal compounds after temperature, pH, and enzyme treatments suggested that *B. velezensis* SSH100-10 produced more than two antifungal compounds; pH-stable C₁₄ iturin A and C₁₅ iturin A, and unidentified pH-unstable compounds. The results suggested that *B. velezensis* SSH100-10 can be used in soybean fermentation as a starter. Moreover it has potential as a biopreservative in the food and feed industry and as a biocontrol agent in the field of agriculture.

Key words : *Bacillus velezensis*, antifungal activity, traditional fermented soysauce, iturin A

서 론

예로부터 된장, 고추장, 간장 등의 전통 콩발효식품은 우리나라 식생활에 중요한 기본 조미 식품으로 널리 이용되어 왔다(1,2). 재래식 전통 콩발효식품은 메주를 발효 효소원으로 이용한 것으로서, 늦은 가을에 콩을 삶고 찌른 후 육면체나 낮은 원기둥 형태로 성형하여 말린 뒤 이 메주덩어리를 벗겉으로 묶어 겨우내 매달아 말려 메주를 제조하였다. 이러한 과정 중 메주 내외에는 콩 발효에 적합한 미생물이 증식하게 되고, 이 균체 증식과 함께 생성된 단백분해효소에 의해 제조된 메주는 다량의 단백분해효소를 함유하게

된다. 제조된 메주는 소금, 물, 삶은 대두, 기타 고춧가루 등의 부원료와 함께 된장, 간장, 고추장 등을 담그는데 사용되고 수개월동안의 숙성기간을 통하여 독특한 발효식품으로서의 풍미를 지니게 된다(3,4). 이와 같은 콩발효식품은 항돌연변이성(5), 항산화능(6), 혈전용해능(7) 등 다양한 건강 기능성 효과들이 알려지면서 소비자의 관심도 증가하고 있다.

메주를 사용한 재래식 장류제조법은 *Aspergillus oryzae* 등의 특정 종균을 사용하는 개량형 장류제조법과 달리, 메주 제조과정 중 자연계의 많은 미생물 중 특히 포자를 형성하는 호기성균인 *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* 속 등의 곰팡이와 *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* 등의 *Bacillus* 속이 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다(8,9). 자연발효

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

방식에 따른 전통재래장류제조법은 이와 같은 다양한 발효 미생물들의 작용에 따라 *A. oryzae* 등의 koji제조법에 따른 개량식 장류 제품과는 차별화된 독특한 향과 맛을 지닌 우수한 제품생산이 가능하지만, 동시에 바람직하지 못한 잡균 즉 *A. flavus*, *A. petrakii*, *A. fumigatus*, *Penicillium* spp, *Pichia* spp 등의 mycotoxin 생성균이나 변패미생물이 검출되기 쉽다. 이와 같은 바람직하지 못한 미생물의 검출은 최종발효식품의 맛과 풍미를 크게 손상시킬 뿐만 아니라 등 각종 질환을 유발시킬 수 있어 경제적 손실과 함께 심각한 건강유해요소가 될 수 있다(10-12).

Bacillus 속은 오랜 세월동안 식품 및 각종 발효산업에 널리 사용되어진 균주이며 이 중 *B. subtilis* group (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*)은 European Food Safety Authority (EFSA)에 의해 “Qualified presumption of safe (QPS)”로 인정되어, 이들 group이 생산하는 각종 효소 및 다양한 항균물질들이 식품 및 각종 발효산업에 사용되고 있다(13,14). *Bacillus* group이 생산하는 항균물질은 종에 따라 다양하며, 이 중 subtilin(15), iturin(16,17), sublancin(18), bacilysin(19), fengycin(20)등은 항진균 활성이 있다고 보고되고 있다. 우리나라 콩발효식품에서 개량형 koji방식으로 생산된 장류와는 차별화된 풍미를 주는 것으로 알려진 *B. subtilis* group 미생물은 발효 미생물로서 뿐만 아니라 이들이 생산하는 항균물질 특히 항진균 활성물질 생산 균으로서 관심이 모아지고 있다(13,14).

본 연구에서는 100년 된 전통재래간장에서부터 강력한 항진균 활성(항곰팡이, 항효모)을 나타내는 *Bacillus* 균주를 분리하였다. 분리 균주의 동정과 특성 구명과 함께 이 균주가 생산하는 항진균 물질의 분리·정제 과정을 통하여 항진균 활성 원인 물질을 구명하였다.

재료 및 방법

항진균 활성 균주의 분리

항진균 활성 균주를 분리하기 위하여 광주 및 전라남도 지역의 가정집, 명가, 식당, 사찰 등으로부터 간장 20종을 수집하였다. 수집된 간장 1 mL를 취하여 멸균수 10 mL에 현탁한 후 순차적으로 희석하였다. 희석액을 tryptic soy broth (TSB, Difco, Franklin Lakes, NJ, USA)에 2% skim milk (Difco)와 3% NaCl을 각각 첨가한 배지에 도말한 후, 37°C에서 1~3일 동안 평판배양하여 간장 내 존재하는 균주를 1차 분리하였다. 일차에 분리된 균주들은 paper disk method(21)를 사용하여 항진균 활성을 조사하였으며, 항진균활성이 우수하면서, 항곰팡이와 항효모활성이 동시에 있는 균주를 2차 선정하였다.

분리 균주의 곰팡이 및 효모에 대한 항진균 활성 측정은 spot-on-the-lawn test 방법(21)을 사용하였다. 활성 역가는

항균물질이 저해환을 형성하는 최대 희석배수의 역을 취하고, 이 값에 1 mL에 대하여 환산해주는 환산계수를 곱하여 AU/mL로 나타내었다. 사용된 감수성 균주 12종 가운데 ATCC 균주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)로부터 구입하였고, 이외의 균주는 본 연구실에서 메주(*Aspergillus petrakii* PF-1(22), *Aspergillus ochraceus* PF-2(22), *Aspergillus nidulans* PF-3(22)) 및 김치 (*Cladosporium gossypicola* KF-2(22), *Issatchenkia orientalis* GY1(23), *Saccharomyces servazzii* GY2(23), *Saccharomyces bulderi* HY(23), *Kazachstania exigua* WY3(23))로부터 분리한 균주를 사용하였다. 항균활성 측정시 감수성 곰팡이는 1×10^6 CFU/mL의 포자가 첨가된 malt extract agar (MEA, Difco) 또는 potato dextrose agar (PDA, Difco)배지에, 감수성 효모는 yeast extract-peptone-dextrose (YPD, Difco) 고체 배지에 1×10^6 CFU/mL로 도말하여 사용하였다.

이와 같은 항균 spectrum 실험결과, 다양한 감수성 진균들에 대해 가장 항균 활성이 강한 균주 1종을 최종 분리 균주로 선정하였다.

단백분해효소 활성 측정

분리 균에 의해 생산된 단백질분해효소의 활성을 측정하기 위한 조효소액으로는 37°C에서 24시간 전배양한 균주를 TSB (Difco) 액체배지에 1% 접종하여 24시간 동안 배양한 다음 원심분리(9,950 × g, 15 min, 4°C)하여 균체를 제거하고, 회수한 배양상정액을 membrane filter (0.45 μm pore size, Milipore, Beverly, USA)로 제균하여 사용하였다. 단백질분해효소의 활성은 Boonyaras 등(24)에 의한 azocasein법을 변형하여 측정하였다. 기질용액은 azocasein (Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.2 g을 20 mM Tris-HCl 5 mM CaCl₂ (pH 7.0) 100 mL에 현탁하여 사용하였다. 기질용액 1 mL에 조효소액 0.1 mL를 혼합하여 37°C에서 1시간 반응시키고 12% (w/v) trichloroacetic acid (Sigma) 2 mL를 첨가하여 반응되지 않은 azocasein을 침전시켜 반응을 정지시키고 4°C에서 30분 동안 방치한 후 원심분리(9,950 × g, 10 min, 4°C)하였다. 원심분리 후 상정액을 취하여 동량의 0.5 M NaOH를 혼합한 후 440 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성은 1시간 동안 조효소액 1 mL가 효소반응액을 440 nm에서 0.01을 증가시켰을 때 1 unit/mL로 규정하였다.

분리 균주의 동정

분리 균주는 그람염색을 통하여 형태학적 특성을 관찰하였으며, API 50 CHB system (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)을 이용하여 당 발효능을 조사하였다. 최종적인 동정을 위하여 분리 균주의 16S rRNA 염기서열 결정하여 GenBank에 등록된 표준균주(type strain)와의 상동성을 비교하였다. 염기서열 분석결과는 BLASTN 프로그램을 이용하여 Genbank에 등록된 염기서열과 비교하였으며 염기서

열의 상동성은 CLUSTAL W 프로그램을 이용하여 비교 분석하였다.

분리 균주의 내염성

배지 내 NaCl의 농도에 따른 분리 균주의 생육도를 조사하기 위해 TSB (Difco) 액체 배지에 NaCl을 0, 3, 6, 9, 12, 15% (w/v) 첨가하여 37°C에서 균주 생육도를 측정하였다. 준비된 TSB-NaCl 배지에 전 배양된 분리 균주 1%를 접종한 후 37°C에서 배양하면서 48시간 동안 6시간 간격으로 균체 생육도를 600 nm에서 흡광도로 측정하였다.

Enterotoxin 생성

Hbl과 Nhe enterotoxin 생성 여부는 *B. cereus* enterotoxin reversed passive latex agglutination (BCET-RPLA) kit (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England)과 *Bacillus* diarrhoeal enterotoxin visual immunoassay (BDE-VIA) kit (Tecra, New South Wales, Australia)를 각각 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험하였다.

항진균 물질의 안정성

pH 안정성

pH에 대한 영향을 알아보기 위하여 분리 균주의 배양상징액을 5 N HCl과 5 N NaOH를 사용하여 pH 2.0~10.0으로 조정한 후 37°C에서 2시간 동안 처리한 다음 항진균 활성을 측정하였다(22). HPLC를 이용하여 정제된 항진균 물질의 pH에 대한 영향을 알아보기 위하여 정제된 항진균 활성 물질을 pH 2.0 (50 mM glycine-HCl), pH 3.0 (50 mM glycine-HCl), pH 4.0 (50 mM glycine-HCl), pH 5.0 (50 mM sodium citrate), 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) 완충용액에 용해시켜 37°C에서 2시간 처리한 후 항진균 활성을 측정하였다.

열 안정성

온도에 의한 영향을 알아보기 위하여 배양상징액과 정제된 항진균 물질을 4°C, 25°C, 37°C, 50°C, 70°C에서 24시간, 100°C에서 30분, 121°C에서 15분간 열처리한 후에 잔존 활성을 측정하였다(25).

효소 안정성

각종 효소에 대한 영향을 조사하기 위하여 배양상징액과 정제된 항진균 물질에 proteinase K (EC 3.4.32.64, Sigma)는 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)/50 mM NaCl/5 mM EDTA, protease (type I, Sigma), trypsin (EC 3.4.21.4, Sigma) 및 α -chymotrypsin (EC 3.4.21.1, type I-S, Sigma)은 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), pepsin (EC 3.4.23.1, Sigma)은 10 mM

citrate (pH 6.0), lipase (EC 3.1.1.3, type VII, Sigma)는 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)/10 mM CaCl₂, α -amylase (EC 3.2.1.1, type VIII, Sigma)는 50 mM sodium phosphate (pH 7.0)/10 mM NaCl 완충액에 2 mg/mL 농도로 25°C 또는 37°C에서 24시간 처리한 후 100°C에서 5분 동안 끓여 효소를 불활성화 시킨 다음 잔존하는 항진균 활성을 측정하였다(25). 대조구로는 배양상징액과 정제된 항진균 물질에 효소액 대신 각 효소에 사용된 완충액을 첨가하여 동일한 조건으로 처리한 것으로 하였다.

pH, 온도, 효소 처리 후 잔존하는 항진균 활성 측정은 spot-on-the-lawn test 방법(21)으로 측정하였으며, 측정된 대조구의 항진균 활성(AU/mL)을 100으로 하였을 때 pH, 온도, 효소처리에 따른 항진균 활성을 대조구에 대한 상대값으로 나타내었다. 이때 감수성 균주로는 *A. petrakii* PF-1을 사용하였다. 항진균 물질의 안정성 조사 시 시판되는 iturin A (C₁₄₋₁₅, I1774, Sigma)를 이용하여 동일한 조건으로 처리함으로써 항진균 활성 물질특성을 비교하였다.

항진균 활성 물질 정제

C₁₈ Sep-Pak cartridge 정제

분리 균주의 항진균 활성 물질을 분리하기 위하여 분리 균주를 5 mL TSB 배지에 접종하여 30°C에서 12시간 전배양한 후 50 mL TSB 배지에 전배양액 1%를 접종하여 30°C에서 22시간 동안 본배양 하였다. 본배양액을 4°C에서 원심분리(9,950 × g, 15 min)하여 얻은 상징액을 0.2 μ m membrane filter로 제균하였다. 제균된 상징액을 100% methanol과 3차 증류수로 미리 soaking된 C₁₈ Sep-Pak cartridge (Waters, MA, USA)에 통과시켜 소수성 물질을 흡착시킨 후 methanol (HPLC-grade, Fisher, NJ, USA) 5 mL로 용출하였다. 용출 분획은 speed vac concentrator (Centra-Vac VS-802, Vision, Daejeon, Korea)를 이용하여 용매를 제거한 후 다음 정제 시료로 사용하였다.

Preparative HPLC (high performance liquid chromatography)

Sep-Pak 정제물을 30% acetonitrile (HPLC-grade, Fisher)에 녹인 후 0.45 μ m syringe filter (Advantec MFS, Tokyo, Japan)로 여과시킨 다음 preparative LC 9104 HPLC system (Japan Analytical Industry, Tokyo, Japan)을 이용하여 분리하였다. Column은 JAIGEL-W gel permeation chromatography column (W252, 20×500 mm, Japan Analytical Industry), detector는 3702 UV detector (Japan Analytical Industry)를 사용하였으며, 유속은 3 mL/min, UV 검출과장은 210 nm에서 측정하였다. 각각의 정제 분획은 용매를 제거한 후 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충액에 녹여 항진균 활성을 확인하였다.

Reverse phase-HPLC

Isocratic separative 조건을 사용하는 preparative HPLC 분리·정제 후, 다음단계 분리·정제 과정으로 gradient separation 조건을 사용할 수 있는 reverse phase-HPLC를 시행하였다. Preparative HPLC에서 항진균 활성을 나타낸 분획은 C₁₈ column (Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 사용하여 reverse phase-HPLC (Acme Younglin, Anyang, Korea)를 시행하여 각각 재분리 하였다. Column은 Luna 5 μ C₁₈ column (4.6 \times 250 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 사용하였으며 이때 유속은 0.4 mL/min, injection volume은 20 μ L, 검출과장은 UV 230 nm로 하였다. 항진균 활성 분획의 이동상 조건은 30% methanol을 30분까지 35%로, 35분까지 40%로, 40분까지 40%로 5분간 유지 후 45분까지 30%로, 70분까지 30%로 25분간 유지시켰다. 각각의 정제 분획은 용매를 제거한 후 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충액에 녹여 항진균 활성을 확인하였다.

항진균 활성 물질 구명

MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectroscopy) 분석

최종 정제된 항진균 활성 물질의 분자량을 확인하고자 UltrafleXtreme MALDI time-of-flight (TOF)/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA),

smartbeam II (355 nm Nd:YAG laser, repetition rate 1 kHz)를 이용하였으며, 시료는 물에 풀어 DHB matrix 용액(0.5% TFA/50% acetonitrile, 1:1, v/v)과 혼합한 후 MALDI용 시료 판에 점적하여 시행하였다. 분석 결과는 Flex Analysis software (version 3.3, Bruker Daltonics)를 사용하여 분석하였다.

아미노산 조성 분석

항진균 활성 물질의 아미노산 조성 분석을 위하여 최종 정제된 물질을 6 N HCl에 녹여 130 $^{\circ}$ C에서 24시간 반응시켜 가수분해 하고 증류수로 희석한 다음 Agilent 1200C HPLC (Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 분석하였으며, column은 Inno C₁₈ column (4.6 \times 150 mm, 5 μ m, Innopia, Anyang, Korea)을 사용하였다.

결과 및 고찰

항진균 활성 균주의 분리

항진균 활성 균주를 분리하기 위하여 간장시료를 멸균수에 희석하여 TSB 배지에 각각 2% skim milk와 3% NaCl을 첨가한 평판배지에 도말하여 1~3일간 배양한 후 형성된 미생물의 집락을 관찰하였다. 관찰 결과 98종의 세균이 1차

Table 1. Antifungal activity of the isolated strains

Indicator	Characteristic	Antifungal activity (AU/mL)			
		SSH 100-2	SSH 100-10	SSH 100-12	Meju6
Yeasts	<i>Issatchenkia orientalis</i> GY1	8	16	8	4
	<i>Saccharomyces servazzii</i> GY2	4	16	8	0
	<i>Saccharomyces bulderi</i> HY	8	32	16	0
	<i>Kazachstania exigua</i> WY3	16	32	16	16
	<i>Candida albicans</i> ATCC 11006	8	8	0	0
Molds	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 22546	20	20	10	10
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 96918	80	160	160	160
	<i>Aspergillus petrakii</i> PF-1	640	640	20	10
	<i>Aspergillus ochraceus</i> PF-2	640	640	10	10
	<i>Aspergillus nidulans</i> PF-3	20	40	10	10
	<i>Cladosporium gossypicola</i> KF-2	1,280	2,560	80	80
	<i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	40	80	20	10

The antifungal activity was measured by the spot-on-the-lawn method.

선정되었다. 분리 세균 98종의 항진균 활성 측정 결과 항균 활성이 우수하면서 동시에 장류에서 유해 미생물인 곰팡이 *A. petrakii*와 효모 *I. orientalis*에 공통적으로 항균 활성이 있는 균주를 2차로 4종 선별하였다(data not shown). 분리 균주 4종의 항균 spectrum 및 항균 활성을 조사하기 위하여 효모와 곰팡이 총 12종에 대한 항진균 활성을 조사하였을 때, 분리 균주 4종 중 SSH100-10이 사용된 지시균 모두에 대해 가장 강한 항진균 활성을 나타내어 이를 최종 분리 균주로 선정하였다(Table 1).

최종 선정된 분리 균주 SSH100-10은 전남 해남군에서 수집한 향미가 우수한 100년 묵은 간장에서 분리된 균주로서 특히 알레르기, 피부염 및 염증성 폐렴에 관여하는 *C. gossypicola* KF-2, 신장독소인 ochratoxin A를 생성하는 *A. petrakii* PF-1과 식품과 사료의 저장기간 중 부패를 일으키는 곰팡이 독소인 ochratoxin A, B, C를 생산하는 것(12)으로 알려진 *A. ochraceus* PF-2에 대한 항균 활성이 우수한 것으로 확인되었다. 또한 장류 및 김치에서 산막효모 형성으로 불쾌취를 형성하는 산막효모 4종에 대해서도 가장 강한 항균활성을 나타내었다.

분리 균주의 동정

분리 균주 SSH100-10은 colony의 표면이 거칠고 주름진 아이보리색이었으며, 형태는 간균의 gram 양성 세균이었다. API 50 CHB system을 이용하여 당 이용성 조사를 통한 균주 동정결과 *B. velezensis* (synonym of *B. amyloliquefaciens*)로 동정되었다(data not shown). 보다 정확한 동정을 위하여 분리 균주의 16S rRNA gene 염기서열을 결정한 후(1,378 bp), 이를 GenBank에 등록된 다른 균주들과 염기서열을 비교한 결과 표준균주인 *Bacillus velezensis* CR-502와 99.4% 상동성을 나타내어, 분리 균주는 *B. velezensis* SSH100-10으로 명명하였고, 그 16S rRNA gene의 염기서열은 GenBank에 등록하였다(Accession No. JX483603).

분리 균주의 단백질분해활성

TSB 배지에 2% (w/v) skim milk가 첨가된 평판 배지위에 제공된 균주의 24시간 배양상징액을 가하였을 때 Fig. 1와 같이 장류에서 분리된 4종 균주 모두 높은 단백질분해활성을 보였다. 대조구로는 *B. subtilis* ATCC 6633을 사용하였다. 정확한 효소활성 단위 표시를 위해 azocasein을 기질로 한 반응에서 *B. subtilis* ATCC 6633의 효소활성이 16 units/mL 임에 비해 4종의 장류 분리 균주 모두 250 units/mL를 넘는 높은 단백질분해활성을 나타내었다. 이와 같은 높은 활성은 단백질이 주기질인 장류발효식품의 발효종균으로서의 유용한 특성이다.

분리 균주의 내염성

일반적으로 된장염도 10~14%(26), 간장염도 16.4~

26.3%(26), 고추장염도 7.3~16.6%(27)임을 고려할 때, 내염성은 장류 발효종균의 중요한 특성중 하나이다. 분리 균주 *B. velezensis* SSH100-10의 염농도에 따른 생육도를 조사하였을 때 Fig. 2와 같이 0% NaCl배지에서 36시간에 최대 생육도(A_{600} : 6.38)에 도달하였으며, 3%와 6%, 9% NaCl농도에서도 A_{600} 4.08~5.56이상의 생육도를 나타내었다. 또한 12% NaCl배지에서도 생육속도가 다소 느리지만 서서히 증가하여 생육48시간에 A_{600} 3.51의 생육도를 나타내었다. 그러나 15% NaCl조건에서는 거의 생육하지 못하였다. 이와 같은 결과로부터 본 분리 균주 *B. velezensis* SSH100-10은 높은 내염성을 나타냄을 알 수 있고 이와 같은 특성은 장류 발효종균으로서 적합한 특성이다.

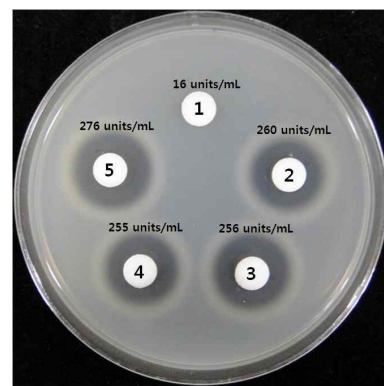


Fig. 1. Extracellular protease activities of the isolated strains and *B. subtilis* ATCC 6633.

1: *B. subtilis* ATCC 6633, 2: SSH100-2, 3: SSH100-10, 4: SSH100-12, 5: meju6. Cell free extract; (100 μ L) of the isolated strains were added into TSB plate with 2% (w/v) skim milk.

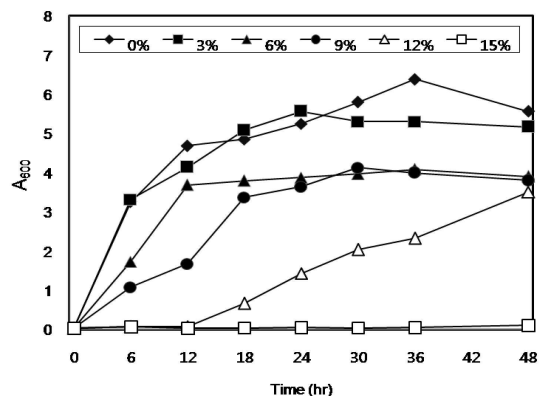


Fig. 2. Effect of NaCl on the cell growth of *Bacillus velezensis* SSH100-10.

B. velezensis SSH100-10 was inoculated (1% (w/v)) and cultivated for 48 hr in TSB broth containing 0~15% (w/v) NaCl.

잠재적 유해요소(enterotoxin)의 검지

최근 *B. subtilis* strain중 설사형 독소인 enterotoxin을 나타내는 균주들에 대한 보고가(28,29) 증가함에 따라 EFSA는 전통적으로 QPS균주로 인정되어온 *B. subtilis* group (*B.*

subtilis, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*)이라 하더라도 strain별로 각각 균주에 대한 안전성 검증이 이루어져야 함이 옳다고 지적하고 있다(28). 이에 분리 균주 *B. velezensis* SSH100-10의 enterotoxin 생성 여부를 조사하였을 때, Table 2의 결과와 같이 *B. velezensis* SSH100-10은 enterotoxin을 생성하지 않음을 알 수 있었다. 이에 반해 대조구로 사용된 *B. cereus* ATCC 14579는 알려진 바와 같이(30) enterotoxin검지에서 양성반응을 나타내었다.

Table 2. Test results using BCET-RPLA kit and BDE-VIA kit

	<i>B. velezensis</i> SSH100-10	<i>B. cereus</i> ATCC14579
BCET-RPLA kit test index ¹⁾	0	128
BDE-VIA test index ²⁾	0	5

¹⁾Production of the hemolytic BL (Hbl) enterotoxin in growing cells was determined using the BCET-RPLA kit. For the BCET-RPLA test, the indices from 0 to 128 corresponded to the last supernatant dilution rate (among 1/2 serial dilutions) for which enterotoxin remained detectable. According to the manufacturer's instructions, strains with an index of 0 were considered negative.

²⁾Production of the non-hemolytic enterotoxin (Nhe) in growing cells was measured the BDE-VIA kit. For the BDE-VIA test, indices from 1 to 5 corresponded to the coloration intensity. According to the manufacturer's instructions, strains with an index of <3 were considered negative.

항진균 활성 물질 정제

Preparative HPLC 정제

B. velezensis SSH100-10이 생산하는 항진균 물질을 정제하기 위하여 배양 상정액을 C₁₈ Sep-Pak cartridge를 사용하여 정제한 후 preparative HPLC 정제 시료로 사용하였다. Acetonitrile-용매(30%)를 이용하여 3 mL/min로 용출한 결과 15개의 주요한 분획을 얻을 수 있었으며, *A. petrakii* PF-1과 *I. orientalis* GY1에 대한 항진균 활성 확인 결과 *A. petrakii* PF-1에 대해서는 1~3과 5~15 분획에서 저해활성을 나타내었으며, *I. orientalis* GY1에 대해서는 13과 15 분획에서 저해활성을 나타내었다(Fig. 3A, 3a). 이에 항진균 활성을 나타내었던 분획 가운데 곰팡이와 효모에 대해 공통으로 저해활성을 나타내는 13과 15 분획을 다음단계의 정제시료로 사용하였다.

Reverse phase-HPLC 정제

Preparative HPLC에서 분리된 항진균 활성 분획 13과 15을 각각 재분리하기 위하여 C₁₈ column을 이용하여 reverse phase-HPLC 정제를 시행하였다. 정제분획 13번을 재분리한 결과 2개의 분획(13-1, 13-2)을 수집하였으며(Fig.

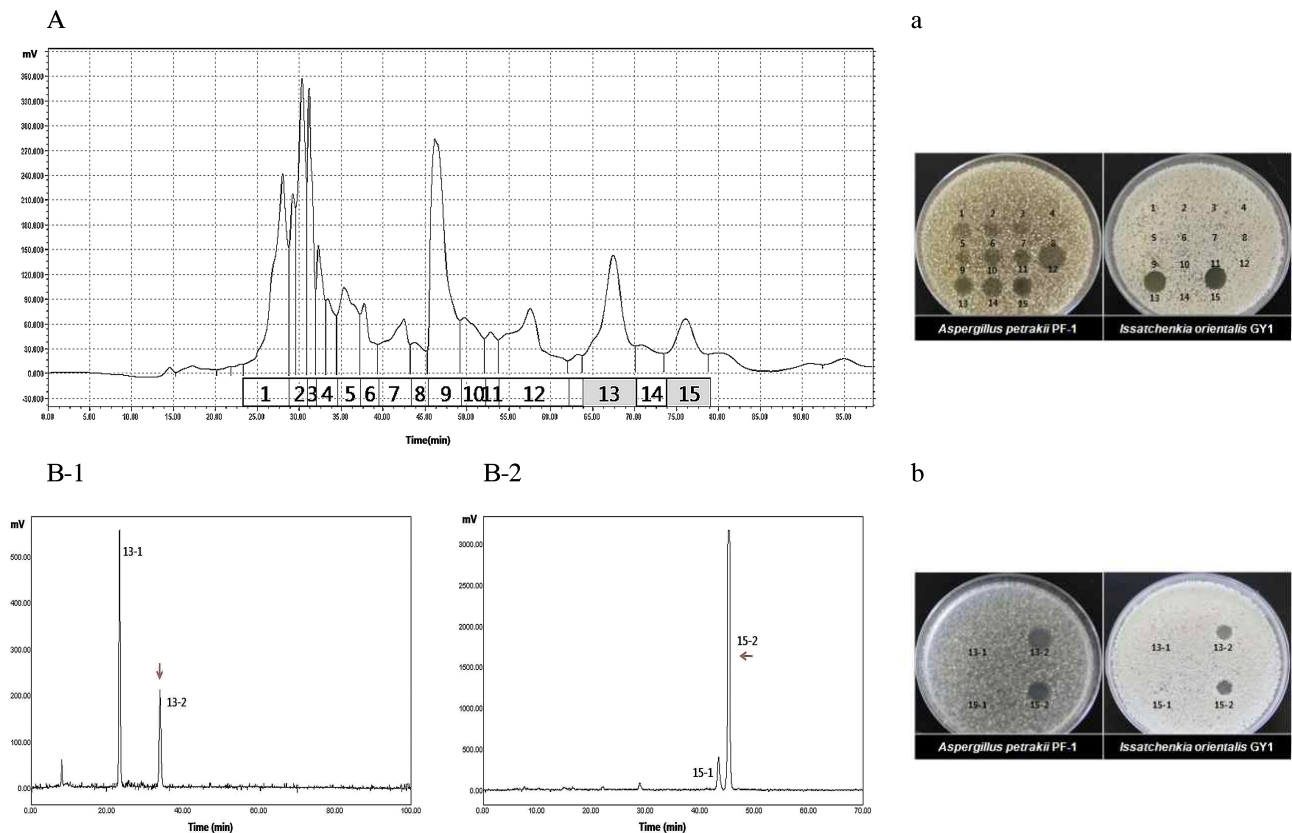


Fig. 3. Purification of antifungal compounds by preparative HPLC and reverse phase-HPLC.

Shown are the chromatogram of preparative HPLC after C₁₈ Sep-pak cartridge (A) and the chromatograms of reverse phase-HPLC of antifungal fraction 13(B-1) and fraction 15(B-2). The fractions collected by HPLC purification were concentrated by vacuum evaporation, dissolved in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), and their antifungal activities were assayed on *A. petrakii* PF-1 and *I. orientalis* GY1 lawn plates.

3B-1), 정제분획 15번 역시 2개의 분획(15-1, 15-2)으로 분리되었다(Fig. 3B-2). 각각의 분획을 수집하여 *A. petrakii* PF-1과 *I. orientalis* GY1에 대한 항진균 활성을 spot-on-the-lawn test(21)로 확인한 결과, 13-1과 15-1 분획은 항진균 활성이 관찰되지 않았고, 13-2와 15-2 분획은 곰팡이와 효모에 대한 저해활성을 동시에 나타내어(Fig. 3b), 다음 항진균 물질 구명을 위한 분석시료로 사용하였다.

항진균 활성 물질 구명

항진균 활성 물질의 MALDI-TOF-MS 분석

Reverse phase-HPLC 정제를 통하여 최종 분리된 2종의 항진균 물질 13-2와 15-2 분획의 구조를 구명하기 위하여 1차적으로 MALDI-TOF-MS 분석을 시행하여 각각의 물질의 분자량을 확인하였다. MS 분석 결과 최종 분리된 항진균 물질 13-2와 15-2는 단일물질로 확인되었으며, 13-2는 m/z 1,065.5 ($[M+Na]^+$)를 나타내었고 15-2는 m/z 1,079.5 ($[M+Na]^+$)를 나타내었다(Table 3). 이는 기 보고된 *Bacillus* 속 유래의 항진균성 peptide인 iturin 계열의 분자량과 일치하였으며, 13-2는 β -amino acid의 탄소수가 14개인 iturin A (C_{14} iturin A, M.W. 1,042)와 일치하였고 15-2는 β -amino acid의 탄소수가 15개인 iturin A (C_{15} iturin A, M.W. 1,056)와 일치하였다.

항진균 활성 물질의 안정성

pH 안정성 실험결과 *B. velezensis* SSH100-10 배양상징액의 항진균 활성은 pH 6.0~7.0 구간에서 활성이 안정하였으나 pH 8.0 이상에서 활성이 감소하여 이후의 구간(pH 9.0~10.0)에서는 활성을 나타내지 않았다. 또한 pH 5.0 이하에서는 활성이 서서히 감소하였지만 pH 2.0까지 활성을 유지함을 알 수 있었다(Table 4). 온도 및 각종 효소처리에 대한 안정성을 확인한 결과 처리 전 구간에서 100% 활성을 유지하였다. 이로부터 배양상징액을 사용한 *B. velezensis* SSH100-10이 생산하는 항진균 물질의 특징은 pH에는 영향을 받지 않으나 온도나 각종 효소처리에는 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다.

B. velezensis SSH100-10으로부터 최종 정제된 항진균 활성 물질 13-2와 15-2의 pH 안정성 실험 결과, 두 개의 항진균 활성 물질 모두 pH 2.0에서 pH 10.0까지의 전 영역에서 안정된 활성을 나타내었다. 온도 및 각종 효소를 처리한 안정성 실험 결과 역시 모든 온도와 각종효소 처리구간에서 100% 활성을 나타내어 온도에 안정하며, 다양한 효소처리에 영향을 받지 않음을 확인하였다(Table 4). 동시에 동일한 처리 조건에서 대조구로 시판되는 C_{14-15} iturin A를 이용하여 두 개의 항진균 활성물질의 안정성과 비교한 결과, 본 연구에서 구조 분석결과 C_{14} iturin A와 C_{15} iturin A로

Table 3. Amino acid composition and assignment of antifungal compounds produced from *B. velezensis* SSH100-10

Antifungal fraction	Mass peak (m/z)	Amino acid composition analysis			Probable assignment
		Amino acids	Amount (pmol/ μ L)	Molar ratio	
13-2	1,065.5	Aspartate (Asparagine)	32	2.9 (3)	C_{14} Iturin A, $[M+Na]^+$
		Glutamate (Glutamine)	13	1.2 (1)	
		Proline	11	1.0 (1)	
		Serine	8	0.7 (1)	
		Tyrosine	11	1.0 (1)	
15-2	1,079.5	Aspartate (Asparagine)	92	3.4 (3)	C_{15} Iturin A, $[M+Na]^+$
		Glutamate (Glutamine)	36	1.3 (1)	
		Proline	27	1.0 (1)	
		Serine	24	0.9 (1)	
		Tyrosine	26	1.0 (1)	

아미노산 조성 분석

분리·정제된 2종의 항진균 물질의 아미노산 조성을 각각 분석한 결과 두 개의 항진균 활성 물질 모두 Asx, Glx, Pro, Ser, Tyr의 아미노산이 검출되었으며, 구성 비율은 3:1:1:1:1을 나타내었다(Table 3). 기 보고된 iturin A는 탄소수 14~15개를 지닌 β -amino acid를 포함한 L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser 서열을 지닌다. 따라서 두 물질의 분자량 측정 결과와 아미노산 조성 분석결과로부터 13-2는 C_{14} iturin A, 15-2는 C_{15} iturin A임을 확인하였다.

구명된 13-2와 15-2물질의 특성과 시판되는 iturin A는 동일한 특성을 나타내어, 각각의 pH와 온도 처리에도 안정된 활성을 나타내었고 각종의 효소처리에도 전혀 영향을 받지 않음을 확인하였다(Table 4).

이상의 결과로부터 *B. velezensis* SSH100-10이 생산하는 항진균 물질은 pH에 영향을 받지 않는 iturin A(13-2, 15-2) 이외에도 pH 6.0~7.0이 최적 pH이며 산성이나 알칼리 조건에서 불활성화 되는 특징을 지닌 또 다른 항진균 물질을 생산함을 알 수 있었다. 또한 이 또 다른 항진균 물질은 iturin A와 같이 단백질수분해효소를 비롯한 다양한 효소에

모두 영향을 받지 않으므로 비단백질성 물질이며, 당이나 지질의 결합이 항진균 활성에 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 iturin A로 구명된 13-2와 15-2의 분리·정제 과정에서(Fig. 3a) 효모인 *I. orientalis*에 대해서는 항진균활성이 없으나 곰팡이인 *A. petrakii*에 대해 활성을 보인 분획(Fig. 3a-5,6,7,9,10,11,12,14분획)은 제외하였음을 고려할 때, *B. velezensis* SSH100-10이 생산하는 iturin A의 또 다른 항진균 물질은 항효모 활성은 없고 항곰팡이 활성을 지닌 물질로 추정된다.

Table 4. Effect of pH, heat and enzyme treatment on the antifungal compounds produced by *B. velezensis* SSH100-10

Treatment	Antifungal activity (AU/mL) ¹⁾			
	CFCS ²⁾	13-2	15-2	Iturin A ³⁾
Control	100	100	100	100
pH	2.0	25	100	100
	3.0	25	100	100
	4.0	25	100	100
	5.0	50	100	100
	6.0	100	100	100
	7.0	100	100	100
	8.0	50	100	100
	9.0	0	100	100
	10.0	0	100	100
	Heating	Control	100	100
4°C, 24 hr		100	100	100
25°C, 24 hr		100	100	100
37°C, 24 hr		100	100	100
50°C, 24 hr		100	100	100
70°C, 6 hr		100	100	100
100°C, 30 min		100	100	100
121°C, 15 min		100	100	100
Enzyme	Control	100	100	100
	Proteinase K	100	100	100
	Protease	100	100	100
	Trypsin	100	100	100
	α -Chymotrypsin	100	100	100
	Pepsin	100	100	100
	Lipase	100	100	100
	α -Amylase	100	100	100

¹⁾Relative activity of control(100). The antifungal activity was measured by the spot-on-the-lawn method. *A. petrakii* PF-1 was used as an indicator.

²⁾CFCS is cell-free culture supernatant of *B. velezensis* SSH100-10.

³⁾Iturin A (Sigma, composed of C₁₄-15).

그동안 수행된 *B. velezensis* (synonym of *B. amyloliquefaciens*)가 생산하는 iturin과 같은 lipopeptide계열의 항진균 물질관련 연구는 주로 농업에서 생물농약 (biocontrol agent) 으로 활용하기 위한 방안으로 연구되어져 왔다(31-35). *B. velezensis*가 간장, 된장, 고추장과 같은 우리나라 전통 장류와 메주의 발효에 관여하는 주요한 균주중 하나임을 보고한 연구(36,37)는 있으나, 이들 균주로부터 항진균을 분리·정제하여 그 특성을 명확하게 밝힌 연구는 거의 없다.

본 연구에서 분리한 *B. velezensis* SSH100-10은 향미가

좋은 100년 묵은 재래간장에서 분리한 균주로서 된장용 koji인 *A. oryzae*(단백분해능: 약 70 units/mL)를 능가하는 우수한 단백질분해능과 높은 내염성을 나타내어, 장류용 발효종균으로서의 기본 특성을 지니고 있음을 알 수 있다. 이와 동시에 장류제조과정 중 쉽게 오염될 수 있는 *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. petrakii*, *P. roqueforti* 등의 식품 위해 및 변패곰팡이와 장류에 이취를 주는 *I. orientalis* 등의 산막효모 등에 대한 항진균활성특성은 *B. velezensis* SSH100-10이 장류발효에 활용될 수 있는 우수한 균주가 될 수 있음을 시사한다. 장류의 유해요소인 산막효모나 곰팡이의 생육저지를 위하여 전통적 방법에서는 화학한 햇볕아래에서 장독 뚜껑 여닫기를 반복하는 번거로움이 있었으며, 현대적 장류생산 방식에서도 주정의 살포나 방부제를 사용하고 있다. 이와 같은 현실을 고려할 때, 본 연구의 *B. velezensis* SSH100-10은 천연보존제를 생산하는 QPS등급의 안전한 균주로서 우수한 발효능과 함께 콩발효식품의 안전과 위생수준을 향상시킬 수 있는 장류 발효종균으로서 활용될 수 있을 것이다. 동시에 본 연구결과는 식품향장산업의 생물학적 보존제(biopreservative) 및 농업에서의 생물농약(biocontrol agent) 등으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

향미가 우수한 100년 묵은 재래 간장에서 부터 강력한 항진균 활성(antifungal)균주를 분리·동정하여 *Bacillus velezensis* SSH100-10으로 명명하였다. *B. velezensis* SSH100-10은 식품 위해 및 식품 변패곰팡이에 대한 항곰팡이 활성과 장류에 이취를 주는 산막효모 등에 대한 항효모 활성이 동시에 있으며, 강력한 단백질분해활성을 나타내었다. NaCl 내염성도 우수하여 12% NaCl 농도하에서도 생육 48시간에 A₆₀₀에서 3.51의 생육도를 나타내었다. 또한 최근 *Bacillus subtilis* group 중 일부 균주에서 설사형 독소인 enterotoxin을 나타내는 균주들에 대한 보고가 증가함에 따라, 안전성검증의 일환으로 enterotoxin 생성 여부를 조사하였을 때, 본 분리 균주는 enterotoxin 검지반응에서 음성을 나타내었다. *B. velezensis* SSH100-10이 생산하는 항진균 활성물질을 SPE, preparative HPLC, reverse phase-HPLC로 정제 후, MALDI-TOF-MS와 아미노산 조성 분석을 통하여 그 항진균 원인 물질이 C₁₄ iturin A와 C₁₅ iturin A임을 구명하였다. 또한 *B. velezensis* SSH100-10의 배양상징액과 분리·정제된 항진균 물질 C₁₄ iturin A와 C₁₅ iturin A와 대조군으로 시판되는 C₁₄-15 iturin A의 pH, 온도, 효소 안정성 실험을 통하여 *B. velezensis* SSH100-10은 pH, 열, 효소처리에 매우 안정한 iturin A 이외에도 pH에 불안정한 또 다른 구명되지 않은 항진균 물질을 생산함을 보고하였다. 본 연구에서 보고된 강력한 항진균 활성을 지니는 *B. velezensis*

SSH100-10은 맛있는 발효과정의 종균으로서의 작용과 더불어 콩발효식품에서 유해요소가 될 수 있는 바람직하지 못한 미생물을 제어함으로써 콩발효식품의 안전과 위생 수준을 개선할 수 있는 우수한 종균으로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 식품기술개발사업에 의한 연구비로 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Bae YD (2002) Tradition and change of ethnic cuisine through the doenjang. *Korean Ethnic*, 35, 51-78
- Kim GT, Hwang YI, Lim SI, Lee DS (2000) Carbon dioxide production and quality changes in Korean fermented soybean paste and hot pepper-soybean paste. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 29, 807-813
- Lee SS (1995) Meju fermentation for a raw material of Korean traditional soy products. *Korean J Mycology*, 73, 161-175
- Ham SS, Choi KK, Cui CB, Lee BG, Joo DS, Lee DS (2004) Quality characteristics of soy sauce fermented by *Bacillus licheniformis* NH20 isolated from traditional meju and *Aspergillus oryzae*. *Food Sci Biotechnol*, 13, 537-543
- Lim SY, Rhee SH, Park KY, Yun HS, Lee WH (2004) Inhibitory effect of methanol extracts and solvent fractions from doenjang on mutagenicity using in vitro SOS chromotest and in vivo drosophila mutagenic system. *J Korean Soc Food Nutr*, 33, 1432-1438
- Kim MH, Im SS, Yoo YB, Kim GE, Lee JH (1994) Antioxidative materials in domestic meju and doenjang-(4)-separation of phenolic compounds and their antioxidative activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 23, 792-798
- Ra KS, Oh SH, Kim JM, Suf HJ (2004) Isolation of fibrinolytic enzyme and β -Glucosidase producing strains from doenjang and optimum conditions of enzyme production. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 33, 439-442
- Yoo SK, Cho WH, Kang SM, Lee SH (1999) Isolation and identification of microorganisms in Korean traditional soybean paste and soybean sauce. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol*, 27, 113-117
- Kang MJ, Kim SH, Joo HK, Lee GS, Yim MH (2000) Isolation and identification of microorganisms producing the soy protein-hydrolyzing enzyme from traditional meju. *J Korean Soc of Agric Chem Biotechnol*, 43, 86-94
- Moss MO (2008) Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables. *J Appl Microbiol*, 104, 1239-1243
- Melin P, Sundh I, Hakansson S, Schnürer J (2007) Biological preservation of plant derived animal feed with antifungal microorganisms: safety and formulation aspects. *Biotechnol Lett*, 29, 1147-1154
- Bennett JW, Klich M (2003) Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev*, 16, 497-516
- Jack RW, Tagg JR, Ray B (1995) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev*, 59, 171-200
- Tag JR, Dajani AS, Wannamaker LW (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev*, 40, 722-756
- Klein C, Kaletta C, Entian KD (1993) Biosynthesis of the antibiotic subtilin is regulated by a histidine kinase/response regulator system. *Appl Environ Microbiol*, 59, 296-303
- Besson F, Hourdou ML, Michel G (1990) Studies on the biosynthesis of iturin, an antibiotic of *Bacillus subtilis*, and a lipopeptide containing beta-hydroxy fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 1032, 101-106
- Regine MD, Peypoux F (1994) Iturins, a special class of pore-forming lipopeptide; Biological and physicochemical properties. *Toxicology*, 87, 151-174
- Dubois JY, Kouwen TR, Schurich AK, Reis CR, Ensing HT, Trip EN, Zweers JC, Dijn JM (2009) Immunity to the bacteriocin sublancin 168 is determined by the SunI (YolF) protein of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 651-661
- Nexton GG (1949) Antibiotics from a strain of *B. subtilis*: bacilipin A and B and bacilysin. *Br J Exp Pathol*, 30, 306-319
- Vanittanakom N, Loeffler W, Koch U, Jung G (1986) Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J Antibiot*, 39, 888-901
- Tagg JR, McGivern AR (1971) Assay system for bacteriocin. *Appl Microbiol*, 21, 943
- Yang EJ, Chang HC (2007) Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Bacillus subtilis* MJ1. *Korean J Microbiol Biotechnol*, 35, 339-346
- Chang M, Jung JH, Chang HC (2011) Anti-film-forming-yeast activity of *Bacillus velezensis* isolated from Korean traditional soybean product. Paper presented at

- 2011 International Symposium and Annual Meeting of The Korean Society for Microbiology and Biotechnology, June 23, Gyeongju, Korea
24. Sookkheo B, Sinchaikul S, Phutrakul S, Chen ST (2000) Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearmothermophilus* TLS33. *Protein Expr Purif*, 20, 142-151
 25. Jung JH, Chang HC (2009) *Bacillus polyfermenticus* CJ9, isolated from meju, showing antifungal and antibacterial activities. *Korean J Microbiol Biotechnol*, 37, 340-349
 26. Park BJ, Jang KS, Kim DH, Yook HS, Byun MW (2002) Changes of microbiological and physicochemical characteristics of doenjang prepared with low salt content and gamma irradiation. *Korean J Food Sci Technol*, 34, 79-84
 27. Lee SL (1986) The fermentation food of Korea. 3th ed, Ewha Women's University press, Seoul, p 94-110
 28. European Food Safety Authority (EFSA) (2005) Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA J*, 226, 1-12
 29. Sorokulova IB, Pinchuk IV, Denayrolles M, Osipova IG, Huang JM, Cutting SM, Urdaci MC (2008) The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. *Dig Dis Sci*, 53, 954-963
 30. Kim JB, Kim JM, Cho SH, Oh HS, Choi NJ, Oh DH (2011) Toxin genes profiles and toxin production ability of *Bacillus cereus* isolated from clinical and food samples. *J Food Sci*, 76, T25-29
 31. Nagòrska K, Bikowski M, Obuchowski M (2007) Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica*, 54, 495-508
 32. Arrebola E, Jacobs R, Korsten L (2010) Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *J Appl Microbiology*, 108, 386-395
 33. Chen L, Wang N, Wang X, Hu J, Wang S (2010) Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10. *Bioresource Tech*, 101, 8822-8827
 34. Nam MH, Myung SP, Hong GK, Sung JY (2009) Biological control of strawberry fusarium wilt caused by *fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* using *Bacillus velezensis* BS87 and RK1 formulation. *J Microbiol Biotechnol*, 19, 520-524
 35. Anthony AA, Marc O, Badre H, Yannick L, Alain B, Bernard J, Patrick F (2009) *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Micro Cell Factories*, 8, 63
 36. Lee HA, Kim JH (2012) Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* strains with antifungal activity from meju. *Prev Nutr Food Sci*, 17, 64-70
 37. Shin DH, Kwon DY, Kim YS, Chung DY (2011) Traditional kochujang of science and technology. *Public Health Edu*, 94-98

(접수 2012년 8월 27일 수정 2012년 9월 27일 채택 2012년 10월 5일)