

## Antibacterial Effect of Bacteria Isolated from the Korean Traditional Foods against Pathogenic Bacteria

Kyung-Mi Moon and Moon-Soo Heo\*

Department of Aquatic Biomedical Sciences and Marine and Environment Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Received September 5, 2015 / Revised October 1, 2015 / Accepted October 8, 2015

Aquaculture continues to be an ever-growing sector. However, high-density farming increases disease outbreaks due to deteriorating water quality and internal stress. To prevent disease, the most common method chemotherapy is using antibiotic administration. In this study, probiotic bacteria were isolated from Korean traditional foods, such a Gochu pickle and cutlassfish salted seafood. Various bacteria were isolated, and their 16S rDNA sequences were analyzed. The antimicrobial activities of four isolates from Gochu pickle and seven isolates from cutlassfish salted seafood were assayed, in addition to the antibacterial activity of culture pellet and supernatant. The antibacterial activity of the pellet was higher than that of the supernatant. Isolate JKM-2 showed the highest antibacterial activity against *Streptococcus iniae* (43 mm), *S. parauberis* (40 mm), *S. mutans* (35 mm), and *Vibrio vulnificus* (26.5 mm). The sequences of the isolated strains were compared with those of *Bacillus subtilis* (97.71%), *B. tequilensis* (97.71%), *Brevibacterium halotolerans* (97.71%), *B. subtilis* (97.63%), *B. subtilis* (97.63%), *B. mojavensis* (97.54%), *B. vallismortis* (97.46%), *B. nanillea* (97.45%), *B. methylotrophicus* (97.37%), and *B. ssiamsensis* (97.37%). Future through analysis and new strains confirmed the bacterial cell material investigation of JKM-3, and to ensure sufficient stability, it is desired to verify the utility value as a substitute material for antibiotics by application to the form of the industry.

**Key words** : Antibacterial activity, *Bacillus subtilis* sp. JKM-2, Korean traditional food, 16S rDNA

### 서 론

어류 양식의 생산량은 매년 증가 되고 있는 추세이다[20]. 이러한 생산량의 증가를 도모하기 위한 어류들의 고밀도 사육은 수질 악화 및 어류들의 스트레스를 증가시키게 된다. 이로 인해 어류들의 질병 발생은 잦아지게 되며[8], 단독 감염 또는 두 가지 이상의 세균성 질병이 혼합 되어 감염이 발생된다고 알려져 있다[9, 11].

이를 치료하기 위해 가장 일반적인 방법은 화학적 요법인 항생제 투여 방법이 있다[5]. 하지만 항생제의 무분별한 사용은 내성 균주의 잦은 출현 및 생태학적으로도 많은 문제를 일으키며[6, 16, 23], 이러한 문제를 해결하기 위해 천연물질의 항생제나 합성항산화제를 사용하고 있지만 이는 고농도로 투여 될 시 발암성을 일으킨다는 연구 결과가 있다[12, 17].

따라서 안전 요법으로 알려진 프로바이오틱스에 대한 관심이 늘어나고 있으며, 현재까지도 많은 연구들이 진행되고 있다[10, 19, 22]. 프로바이오틱스란 숙주에 유익한 작용을 하며,

장내 균총(intestinal microbes)을 개선시켜 주는 살아있는 미생물 첨가제를 말한다[7]. 그리스어로 'for life'란 뜻을 가지며, 1965년 Lilly와 Stillwell은 이들을 성장촉진물로 정의하였고, 1974년 Parker는 장내 미생물 균형을 유지하는 대사물질로 정의하였다.

따라서 본 연구에서는 한국전통발효식품인 고추장아찌, 갈치 젓갈에서 분리 된 균주들을 이용하여 어류질병세균과 인체 유해세균에 대한 항균활성의 확인을 통해 세균성 질병에 대한 치료 및 예방의 가능성을 제시하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 분리

실험에 사용 된 균주는 한국전통발효식품인 고추 장아찌와 갈치 젓갈에서 분리하였다. 균주 분리를 위해 0.85% 생리식염수에 고추 장아찌와 갈치 젓갈을 각각 1g을 넣어 단계별로 희석시키고, Mann, Rogosa and Sharpe Agar (MRSA, Difco., USA)에 각각 100  $\mu$ l씩 도말하였다. 그리고 30 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양시킨 뒤, 배양된 균 중 단일 콜로니를 분리하고 Man Rogosa and Shape Broth (MRSB, Difco., USA)에 접종하여 30 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양시켰다. 분리 된 균주들은 25%(v/v) glycerol에 현탁 시켜 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

#### \*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3473, Fax : +82-64-756-3493

E-mail : msheo@jejunu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### 분리균주의 항균활성 탐색

본 실험에 사용된 어류질병세균과 인체유해세균은 미생물 자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)와 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에서 분양 받고(Table 1) stock (25% glycerol)화시켜 -70°C에서 보관하여 사용하였다. 유해세균들은 각각 해당 배지에 알맞게 배양하였고, 분리된 균주들은 MRSB에 접종시켜 30°C에서 48시간 동안 배양하였다. 다 자란 배양액은 14,240 ×g로 원심 분리하여 상등액과 균체를 나누어 항균 활성에 사용하였고, 분리된 상등액은 0.45 µm syringe filter (Whatman, UK)를 통해 여과하였으며, 균체는 0.85% 생리식염수 1 ml에 현탁하여 사용하였다. 다음 멸균된 8 mm paper disc (ADVANTEC, Japan)에 50 µl씩 분주하여 30°C에서 24시간 동안 건조시켰다. 병원균들은 MacFarland turbidity 0.4로 조절하고 Muller Hinton Agar (MHA, Difco, USA)에 도말하여 각 배양 온도에 따라 48시간 배양시켜 형성된 억제환을 측정하였다.

### 16S rDNA 염기서열 분석

모든 균주는 Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 genomic DNA는 각각 27F/1492R universal primer 0.5 µM primer, 200 µM deoxynucleoside triphosphate, Taq DNA polymerase (Bioneer, Korea) 3 µl를 사용하여 PCR를 수행하였다. PCR 반응 조건은 Initial denaturation (95°C, 2분), Denaturation (95°C, 30초), Annealing (55°C, 30초), Extension (72°C, 30초)으로 총 30 cycle로 수행되었고, 마지막으로 다시 한번 Extension (72°C, 5분)하였다. 증폭된 PCR product는 ethidium bromide가 첨가하여 1% agarose (promegaCo., USA) gel에서 전기 영동하여 확인하였다. 다음 Accuprep™ PCR purification Kit (Bio-

neer, Korea)를 사용하여 PCR product에 남은 primers, nucleotides, polymerases, salts를 제거하고 정제시킨 뒤, elutionbuffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) 30 µl로 elution 하였다. 그리고 ABI prism™ bigdye™ terminator cycle sequencing Ready reaction kit V.3.1 (Fluorescent dye terminators method)와 ABI 3730XL capillary DNA sequencer를 사용하여 PCR product의 염기서열을 분석하였다. 다음 염기서열은 EzTaxone (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)를 이용하여 상동성을 조사하였다. 다음 ClustalX로 multiple alignment를 수행한 뒤, MEGA 6.0로 계통도(phylogenetic tree)를 작성하였다.

## 결과 및 고찰

### 분리균주의 항균활성 탐색

분리균주들의 항균활성 탐색 결과, 고추 장아찌에서 분리된 3종(Table 2)과 갈치 젓갈에서 분리된 7종(Table 3)이 높은 항균활성을 나타내었다. 특히 JKM-2은 43 mm (*S. iniae*), 40 mm (*S. parauberis*), 35 mm (*S. mutans*) 26.5 mm (*V. vulnificus*)로 4개의 균주 중 항균 활성이 가장 높았다. JKM-1은 28 mm (*V. vulnificus*), 27 mm (*S. iniae*), 25 mm (*S. mutans*), 24 mm (*S. parauberis*)의 높은 항균 활성이 나타났다. JKM-3은 균체 및 상등액에서 대부분 항균 활성이 측정되지 않았다. 그리고 상등액에서 JKM-2는 19 mm (*V. vulnificus*), 11 mm (*S. mutans*)의 항균 활성이 관측되었고, 그 외 나머지 균주들은 관측되지 않았다(Table 4). 갈치 젓갈에서의 균체 항균 활성 측정 결과, GKM-5는 35 mm(*S. parauberis*), 28 mm(*V. vulnificus*), 27 mm(*S. mutans*)로 높은 항균 활성을 나타냈다. 다음 GKM-8은 32 mm(*S. parauberis*), 30 mm(*S. mutans*), 21 mm(*S. iniae*), GKM-6은 27 mm(*S. mutans*), 20 mm(*S. parauberis*)의 항균 활성이 측정되었다. 그리고 GKM-2는 25 mm(*V. vulnificus*)에서만 높은 항균 활성을 나타냈다. 상등액에서도 높은 항균 활성이 관측되는 균주들은 없었고, 나머지 균주들은 균체 및 상등액에서 10-20 mm 사이의 항균 활성이 측정되었다(Table 3).

유산균을 포함한 probiotics는 발효 식품에 있어 중요한 역할을 하고 다양한 항균 물질을 생산한다고 알려져 있다[1]. 대표적인 항균 물질 박테리옌은 항균 범위가 매우 광범위하여 유해 세균들을 억제하거나 사멸시키는데 효과적이라고 알려져 있다[2, 3]. 또한 2차 대사산물로 알려져 있는 항생제와 달리, 박테리옌은 자신의 유전자로부터 직접 생합성하고[2] 단백질로 구성되어 있어 인체 내 가수분해 효소에 의해 쉽게 분해되기 때문에 생체 내 무독성이며 잔류성이 적다[21]. 본 연구에서 사용된 분리균주들은 어류질병세균 및 인체유해세균에서 대부분 상등액에서의 항균 활성이 나타나지 않았으며, 박테리옌이 균체 내 생합성하는 것으로 추측된다. 따라서, 균체 내 물질에 관한 규명 및 추가 연구가 진행되어야 할 것으로 여겨진다.

Table 1. List of strains used of antibacterial experiment

Bacteria name	Strain. No.	Temperature
<i>Streptococcus iniae</i>	KCTC 3657	25
<i>Streptococcus parauberis</i>	KCTC 3651	25
<i>Edwardsiella tarda</i>	KCTC 12267	25
<i>Vibrio furnisii</i>	KCCM 41679	30
<i>Vibrio fluvialis</i>	KCCM 40827	30
<i>Aeromonas hydrophila</i>	KCCM 32586	26
<i>Vibrio vulnificus</i>	KCCM 41665	30
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KCCM 11965	37
<i>Aeromonas salmonicida</i>	KCCM 40239	26
<i>Listonella anguillarum</i>	KCTC 2711	25
<i>Candida albicans</i>	KCTC 7270	25
<i>Listeria monocytogens</i>	KCCM 40307	37
<i>Escherichia coli</i>	KCCM 40880	37
<i>Propionibacterium acens</i>	KCCM 41747	37
<i>Streptococcus mutans</i>	KCCM 40105	37

Table 2. Inhibitory effect of isolates from Gochu pickled against bacterial pathogens

Pathogenic bacteria	Isolate					
	GKM-1		GKM-2		GKM-3	
	supernatant	pellet	supernatant	pellet	supernatant	pellet
<i>S. iniae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. Parauberis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>E. tarda</i>	-	-	-	-	-	-
<i>V. furnisii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>V. fluvialis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>V. vulnificus</i>	-	15	11	25	11	20
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>L. anguillarum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	9	-
<i>L. monocytogens</i>	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	10	12	-
<i>P. acens</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. mutans</i>	-	-	-	-	-	-

Pathogenic bacteria	Isolate							
	GKM-4		GKM-5		GKM-6		GKM-7	
	super	pellet	super	pellet	super	pellet	super	pellet
<i>S. iniae</i>	-	23	-	-	-	-	-	21
<i>S. Parauberis</i>	-	35	-	20	-	-	-	32
<i>E. tarda</i>	-	-	-	-	-	15	-	-
<i>V. furnisii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. fluvialis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. vulnificus</i>	18.9	28	-	18	-	17	-	19
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	9.5	-	-	-	-	-	-
<i>L. anguillarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	9.5	-	-	10	10	+
<i>L. monocytogens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	9.2	-	-	-	-	-	-
<i>P. acens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. mutans</i>	13.5	27	-	27	-	-	-	30

Table 3. Inhibitory effect of isolates from Cutlassfish salted Seafood against bacterial pathogens

Pathogenic bacteria	Isolate					
	JKM-1		JKM-2		JKM-3	
	supernatant	pellet	supernatant	pellet	supernatant	pellet
<i>S. iniae</i>	+	27	-	43	-	-
<i>S. Parauberis</i>	-	24	-	40	-	13
<i>E. tarda</i>	-	-	-	-	-	-
<i>V. furnisii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>V. fluvialis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>V. vulnificus</i>	-	28	-	26.5	-	18.5
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	-	-	12	-	-
<i>L. anguillarum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogens</i>	-	12	-	+	-	-
<i>E. coli</i>	-	12.5	-	10	-	-
<i>P. acens</i>	-	13.5	-	+	-	-
<i>S. mutans</i>	-	25	-	35	-	-

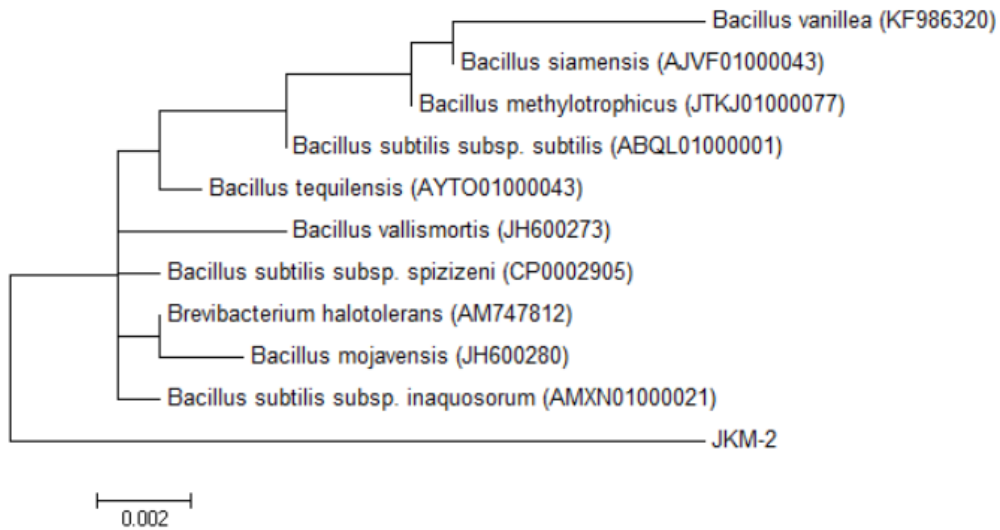


Fig. 1. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing position of JKM-2 (from 1,000 replications) are shown at branch. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

**16S rDNA 염기서열의 계통학적 분석**

본 연구에서 사용된 GKM1~7, JKM1~3 균주들은 16S ribosomal RNA PCR 증폭을 통해 전체 염기 서열을 얻었다. 그리고 EzTaxone을 이용하여 분석한 결과, JKM-2는 *Bacillus subtilis* 97.71%, *Bacillus tequilensis* 97.71%, *Brevibacterium halotolerans* 97.71%, *Bacillus subtilis* 97.63%, *Bacillus subtilis* 97.63%, *Bacillus mojavensis* 97.54%, *Bacillus vallismortis* 97.46%, *Bacillus nanillea* 97.45%, *Bacillus smethylotrophicus* 97.37%, *Bacillus siamensis* 97.37%로 분석되었고, 이에 대한 계통수를 작성 하였다(Fig. 1). 다음 JKM-1은 *Pullulanibacillus pueri* 99.89%, JKM-3은 *Leuconostoc citreum* 97.96%, GKM-1은 *Bacillus sonoriensis* 98.19%, GKM-2는 *Bacillus subtilis* 99.25%, GKM-3은 *Pediococcus ethanolidurans* 99.13%, GKM-4는 *Bacillus subtilis* 98.90%, GKM-5는 *Leuconostoc mesenteroides* 99.67%, GKM-6은 *Lactobacillus brevis* 99.56%, GKM-7은 *Bacillus safensis* 98.57%의 상동성을 보였다. 그리고 JKM-2과 JKM-3은 신종 확인 실험이 수행되어야 할 것으로 사료 된다.

**감사의 글**

본 연구는 교육부와 한국연구재단의 지원으로 수행된 연구 결과(No. 2013H1B8A2032163) 및 2015년도 제주대학교 연구년기간에 연구되었음.

**References**

1. Ahn, J. E., Kim, K. K. and Lee, H. R. 2012. Isolation and characterization of a bacteriocin producing *Lactobacillus sake* B16 from Kimci. *J. Sci. Food* **41**, 721-726.
2. Cleveland, J., Montville, T. J. And Chikindas, M. L. 2001.

Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71**, 1-20.

3. Drider, D., Finland, G., Hechard, Y., McMullen, L. M. and Prevost, H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 564-582.
4. El-Rhman, A. M., Khattab, Y. A. and Shalaby, A. M. E. 2009. *Micrococcus luteus* and *pseudomonas* species probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.* **27**, 175-180.
5. Eldar, A., Shapiro, O., Bejerano, Y. and Bercovier, H. 1995. Vaccination with whole-cell vaccine and bacterial protein extract protects tilapia against *Streptococcus difficile* meningoencephalitis. *Vaccine* **13**, 867-870.
6. Esiobu, N., Armenta, L. and Ike, J. 2002. Antibiotic resistance in soil and water environments. *Int. J. Environ. Health Res.* **12**, 133-144.
7. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365-378.
8. Heo, W. S., Kim, Y. R., Kim, E. Y., Bai, S. C. and Kong, I. S. 2003. Effects of dietary probiotic, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* I2, supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paalichthys olivaceus*). *Aquaculture* **376-379**, 20-24.
9. Hwang, S. D. 2007. M.D. thesis. Pukyong National University, South Korea.
10. Jang, I. S. 2012. M.D. thesis. Jeju National University, South Korea.
11. Jung, S. H. and Kim, J. W. 2000. *In vitro* antimicrobial activity in combination of antibacterials against fish-pathogenic bacteria. *J. Fish Pathol.* **13**, 45-51.
12. Kang, H. M. 1973. M.D. thesis. Ajou University, South Korea.
13. Koo, C. S. 1994. Food culture in the world. Hyangmunsa.
14. Koo, H. H. and Chung, S. H. 1994. Effects of paans ginseng and ganoderma lucidum extract in the growth of lactic acid bacteria. *Kor. J. Food Nutr.* **7**, 45-50.

15. Lilly, D. M. and Stillwell, R. H. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* **147**, 747-748.
16. Newman, S. G. 1993. Bacterial vaccines for fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* **3**, 145-185.
17. Ooi, L. G. and Ling, M. T. 2010. Cholesterol-lowering effects probiotics and prebiotics: a review of *in vivo* and *in vitro* findings. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 2499-2522.
18. Parker, R. B. 1974. The other half of the antibiotics story. *Anim. Nutr. Health.* **29**, 4-8.
19. Salminen, S., Ouwehand, A. C., Benno, Y. and Lee, K. 1999. Probiotics: How should they be defined trends. *Food. Sci. Technol.* **10**, 107-110.
20. Statistics Korea. 2014. Aqua culture survey.
21. Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocine of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**, 722-756.
22. Trafalska, E. and Grzybowska, K. 2004. Probiotics-an alternative for antibiotics. *Wiad. Lek.* **57**, 497-498.
23. Wston, D. P. 1993. Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aquaculture. In: Baird, D., Beveridge, M. V. M., Kelly, L. A. and Muir, J. F. (eds.), *Aquaculture and Water Resource Management*. Backwell Science, Oxford, U.K.
24. Yun, S. S. 1985. Korea Food Researcher, pp. 17-18, Shinkwang Publisher, Seoul, Korea.

### 초록 : 한국전통식품으로부터 분리 된 세균의 항균활성 효과

문경미 · 허문수\*

(제주대학교 해양과학대학 수산생명의학과)

매년 어류 양식의 생산량은 증대되고 있으며, 생산량 증가를 위한 고밀도 사육은 수질 악화 및 어류들의 스트레스를 증가시켜 질병들이 잦아지게 된다. 이로 인한 경제적 피해는 어류 양식 어민들에게 있어 막대한 피해를 입게 되며, 이를 예방하기 위해 화학 요법인 항생제를 투여하게 된다. 본 연구에서는 항생제 대체 물질 및 안전 요법으로 알려진 프로바이오틱스를 분리하기 위해, 한국전통식품인 고추 장아찌와 갈치 젓갈에서 다양한 세균을 분리하였다. 분리된 균주들은 16S rDNA 염기서열을 분석 및 동정하고, 상층액 및 균체로 나누어 항균 활성을 측정하였다. 고추 장아찌에서 분리된 4종과 갈치 젓갈에서 분리된 7종은 상층액 보다 균체에서 항균 활성이 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 그 중 JKM-2는 43 mm(*S. iniae*), 40 mm(*S. parauberis*), 35 mm(*S. mutans*), 26.5 mm(*V. vulnificus*)로 가장 높은 항균 활성을 나타냈다. 본 균주의 염기서열 분석 결과, *Bacillus subtilis* 97.71%, *Bacillus tequilensis* 97.71%, *Brevibacterium halotolerans* 97.71%, *Bacillus subtilis* 97.63%, *Bacillus subtilis* 97.63%, *Bacillus mojavensis* 97.54%, *Bacillus vallismortis* 97.46%, *Bacillus nanillea* 97.45%, *Bacillus smethylophilicus* 97.37%, *Bacillus ssiamensis* 97.37%로 분석되었다. 추후 JKM-3의 신종 균주 확인과 균체 물질 규명 및 분석을 통하여 충분한 안정성을 확보하고 양식 산업에 적용시켜 항생제 대체 물질로서의 이용가치를 확인하고자 한다.