

막걸리로부터 분리된 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주의 항균 활성

심현수, 김명동*
강원대학교 식품생명공학과

Received: November 10, 2015 / Revised: January 25, 2016 / Accepted: January 26, 2016

Antipathogenic Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* Isolated from Korean Traditional Rice Wine

Hyunsu Sim and Myoung-Dong Kim*

Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

The presence of bacterial strains showing antagonistic activity to common pathogens found in a variety of fermented foods in Korea was explored. A bacterium inhibiting the growth of pathogens such as *Aspergillus terreus* (KCTC6178), *A. flavus* (KCTC6984), *Staphylococcus aureus* (KCCM12214), *Escherichia coli* O157:H7 (KCCM40406), *Bacillus cereus* (KCTC1012), *Cryptococcus neoformans* (ATCC208821), *Salmonella typhimurium* (ATCC19430), and *Listeria monocytogenes* (KCTC3569) was isolated from *Makgeolli*, a Korean traditional rice wine. The strain showing high antipathogenic activity was identified as *B. amyloliquefaciens* based on the nucleotide sequence of the 16S ribosomal RNA gene. Compared with *B. amyloliquefaciens* KCTC1660, whose genome has been sequenced, the isolate exhibited significantly low activities of starch-degrading enzymes and high resistance to high temperature and low pH.

Keywords: Fermented foods, *Bacillus amyloliquefaciens*, antipathogenic activity, rice wine

서 론

지구상에서는 수 많은 미생물이 존재하며 그 중 약 400여 종의 미생물은 인간, 동물 그리고 식물에게 유해하다고 알려져 있다[23]. 특히, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 그리고 *Salmonella typhimurium* 등은 식품에서 발견되는 병원균으로 식중독, 리스테아증, 설사 등을 유발한다[18, 26]. *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus terreus* 그리고 *Aspergillus flavus* 등은 자연계에 흔히 존재하는 병원성 곰팡이로서 신부전증, 크립토크커스증, 호흡기 감염 등을 유발하는 것으로 보고되었다[7, 17, 19]. 과거에는 이러한 유해균을 제어하기 위하여 sulphonamide, cotrimoxazole, quinolone 그리고 항곰팡이제와 같은 합성 화학약품들을 주로 사용하였다[22]. 그러나 이러한 합성 화학약품의 사용은 환경파괴와 더불어 병원성균의 항생제에 대한 내성을 증진시키기 때

문에 점차 사용이 제한되고 있다[22]. 따라서, 이러한 문제를 해결하기 위하여 환경에 최소한의 영향을 미치는 생물농약(biological control agents)의 사용이 각광받고 있다[9].

최근 많은 종류의 *Bacillus* 속 균주들이 유해균의 생육을 억제하는 활성을 보유하고 있는 것으로 보고되고 있다[2]. 이러한 균주들은 병원성 세균과 병원성 곰팡이의 생육을 저해하는 지질 펩타이드와 같은 생리활성 물질들을 합성할 수 있다[26, 28]. 잘 알려진 지질 펩타이드로는 iturin, surfactin, bacillomycin, fengycins 그리고 mycosubtilin 등이 있다[4, 15].

*B. amyloliquefaciens*는 *Bacillus* 속에 속하는 그람양성 세균으로 식물의 생육을 촉진하고 병원성균의 생육을 억제하며 식물의 근권(rhizosphere)을 형성하는데 기여하는 것으로 알려져 있다[29]. *B. amyloliquefaciens*는 iturin, fengycin, bacilysin 그리고 surfactin 등과 같은 지질 펩타이드류의 항생물질을 생산할 수 있는 것으로 보고되었다[11, 29]. Benitez 등[2]의 연구결과에 따르면 *B. amyloliquefaciens* LBM5006 균주는 *A. niger*, *Fusarium graminearum* 그리고 *Cercosporina sojina*의 생육을 저해한다. Liu 등[13]은 *B. amyloliquefaciens* C06 균주가 생산하는 항생물질의 역할을 규명하고 항생물질 합성과 관련된 유전자를 보고하였다.

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6458, Fax: +82-33-259-5565

E-mail: mdkim@kangwon.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

본 연구에서는 *E. coli* O157:H7 KCCM40406 균주를 비롯한 여러 종류의 유해균에 대한 생육억제 효과를 보유하는 고초균을 발효식품으로부터 분리하고 생육특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주분리

유해균에 대한 생육억제 활성이 우수한 균주를 확보하기 위하여 강원도를 비롯한 전국에서 김치, 막걸리, 된장, 젓갈 등 44점의 발효식품을 수집하였다. 수집한 시료 1 g을 10 ml의 멸균된 생리식염수(0.85% NaCl)에 현탁한 후, 적정배수로 희석하여 고체 배지(MRS, TSA; BD Diagnostic, Franklin Lakes, NJ, USA)에 도말하였다[5]. 도말한 배지는 37°C에서 48시간 배양하여 단일 집락을 확보한 후 액체 배지(TSB, MRS; BD Diagnostic)에서 48시간 배양 후 -80°C에 보관하였다. 대조구 균주 및 유해균은 한국 미생물자원센터(KCTC, Daejeon, Korea)와 한국 미생물 보존센터(KCCM, Seoul, Korea)로부터 분양받아 사용하였다(Table 1).

균주동정

분리한 균주의 염색체 DNA는 5 ml의 TSB(BD Diagnostic) 배지에서 24시간 배양한 후 추출하였다[20]. 분리한 균주의 16S rRNA 영역의 증폭은 518F(5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG)와 800R(5'-TACCAGGGTATCTAATCC) 프라이머를 사용하였다[6]. 증폭한 16S rRNA 유전자 영역의 염기서열은 National Center for Biotechnology Information(NCBI, Bethesda, MD, USA)의 BLAST를 사용하여 타 균주와의 상

동성을 비교하여 분리한 균주를 동정하였으며[1], 계통도는 근린결합법(neighbor-joining method)[25]을 사용하여 작성하였다.

항균활성 검정

분리된 균주의 항균활성 검정은 well diffusion 방법[14]을 변형하여 수행하였다. *B. cereus* KCTC1012와 *S. aureus* KCCM12214는 TSA(BD Diagnostic), *L. monocytogenes* KCTC3569, *E. coli* O157:H7 KCCM40406 그리고 *S. typhimurium* ATCC19430 균주는 LB(5 g/l yeast extract, 10 g/l tryptone, 10 g/l NaCl), *C. neoformans* ATCC208821 균주는 YEPD(10 g/l yeast extract, 20 g/l peptone, 20 g/l glucose) 배지에서 24시간 배양한 후 멸균 증류수로 희석한 후 10⁶ 만큼 세포수를 계수하여 각각의 유해균의 생육에 적합한 평판배지에 도말하였다. 평판배지는 실온에서 30분간 건조 후 직경 약 8 mm의 크기로 well을 만들고 동일한 배지로 well을 채운 후 굳혔다. 배지를 굳힌 well에 분리한 균주를 24시간 배양하여 얻은 배양액 50 µl를 점적한 후 30°C 또는 37°C에서 24시간 배양하였으며, 생성된 생육저해환의 크기를 비교하여 항균력을 평가하였다.

A. terreus KCTC6178 및 *A. flavus* KCTC6984 균주는 potato dextrose broth(PDB; BD Diagnostic) 배지에 접종하여 25°C에서 4일간 배양하였다. 형성된 포자를 멸균 증류수로 2회 세척한 후 20분간 초음파(Vcx130, Sonics & Materials Inc., Newtown, CT, USA) 처리하여 균질화한 후, 균질액을 potato dextrose agar(PDA; BD Diagnostic) 배지에 도말한 후 멸균된 종이 디스크(8 mm, Duksan, Ansan, Korea)를 밀착시키고 균주 배양액을 20 µl 점적하여 25°C에서 5일간 배양하여 항균력을 평가하였다.

Table 1. Strains used in this study.

Name	Strain No	Culture conditions
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MBE1283	TSA, 37°C
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KCTC1660	TSA, 37°C
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KCTC2105	TSA, 37°C
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KCCM12090	TSA, 37°C
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KCCC12091	TSA, 37°C
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KCCC12092	TSA, 37°C
<i>Bacillus cereus</i>	KCTC1012	TSA, 30°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCCM12214	TSA, 37°C
<i>Listeria monocytogenes</i>	KCTC3569	LB, 37°C
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	KCCM40406	LB, 37°C
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC19430	LB, 37°C
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC208821	YPD, 30°C
<i>Aspergillus terreus</i>	KCTC6178	PDA, 25°C
<i>Aspergillus flavus</i>	KCTC6984	PDA, 25°C

전분분해 효소활성

B. amyloliquefaciens 균주의 α -amylase 효소활성은 Park 등[21]의 방법을 변형하여 측정하였다. 균주를 가용성 전분(1%, w/v) 이 탄소원으로 첨가된 합성배지[21]에 초기흡광도(OD₆₀₀)가 0.1이 되도록 접종하여 37°C에서 24시간 동안 진탕 배양한 후 원심분리(16,060 × g, 5분)하여 회수한 상등액을 조효소액으로 사용하여 효소활성을 측정하였다. 효소반응은 1.8 ml의 1%(w/v)의 가용성 전분(Duksan)을 함유한 인산염 완충액(50 mM, pH 6)에 0.2 ml의 조효소액을 첨가하고 각 반응온도에서 30분 동안 반응하였다. 반응이 종료된 반응액 0.1 ml을 취하여 1 ml의 3,5-dinitrosalicylic acid 용액과 100°C에서 10분간 반응시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다[16]. 효소활성(1 unit)은 가용성 전분으로부터 1분 동안 1 µmole의 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

Glucoamylase 효소활성은 Liu 등[12]의 방법을 변형하여 측정하였다. 가용성 전분(1%, w/v)이 탄소원으로 첨가된 합성배지에서 24시간 동안 배양한 *B. amyloliquefaciens* 균주의 배양액을 원심분리(16,060 × g, 5분)하여 회수한 상등액을 조효소액으로 사용하여 효소활성을 측정하였다. 초산염 완충액(10 mM, pH 5.0, 0.1 ml)에 조효소액(0.7 ml)과 1%(w/v) 가용성 전분(0.2 ml)을 첨가하여 각 반응온도에서 30분 동안 반응시킨 후 100°C에서 10분 동안 가열하여 반응을 종결시킨 후 포도당 정량키트(YD Diagnostic, Yongin, Korea)를 사용하여 생성된 포도당의 양을 측정하였다. Glucoamylase 효소활성(1 unit)은 가용성 전분으로부터 1분 동안 1 μmole의 포도당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

효소활성 측정에 사용한 균체 배양 상등액 중의 단백질 농도는 Bradford Dye Reagent(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 제조사가 제시한 조건에서 측정하였으며 적정 농도로 희석된 bovine serum albumin(Biosesang, Sungnam, Korea)을 이용하여 검량선을 작성하였다[5].

비성장속도 측정

B. amyloliquefaciens MBE1283 균주의 생육특성을 조사하기 위하여 TSB 배지에 초기 세포흡광도가 0.1이 되도록 접종하고 배양온도를 25°C에서 55°C까지 설정하고 비성장속도를 측정하였다. 배지의 초기 pH가 균체 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 인산염 완충액(100 mM)을 사용하여 pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 및 9로 조정하였고 45°C에서 배양하

였다. 비성장속도는 대수기로 성장하는 균주 배양액의 흡광도(OD₆₀₀)를 30분 마다 측정하여 결정하였고, 대조구 균주로 유전체 정보가 밝혀진 *B. amyloliquefaciens* KCTC1660 균주[24]를 사용하였다.

통계처리

모든 측정은 3회 반복하였으며 통계처리는 SPSS(v. 21, IBM, Armonk, NY, USA)를 이용하였으며 Duncan의 다중 범위검정법[27]으로 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

항균활성이 우수한 균주 선발 및 동정

전국 각지에서 수집한 44점의 발효식품으로부터 분리된 균주 중 유해세균에 대한 생육억제 활성을 보이는 *Lactobacillus plantarum*을 비롯한 젖산균과 유해 곰팡이에 대한 생육억제 활성을 보유한 *B. amyloliquefaciens*를 비롯한 고초균을 분리하였다. 그 중 막걸리에서 분리한 MBE1283으로 명명된 균주는 유해세균과 유해 곰팡이에 대해 공통적으로 가장 높은 항균활성을 나타내었다.

MBE1283 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 이용하여 다른 고초균들과 비교하고 계통도를 작성한 결과, 기존에 보고된 *B. amyloliquefaciens*와 매우 높은 상동성(99%)을 나타내었다(Fig. 1). 따라서 MBE1283 균주를 *B. amyloliquefaciens* MBE1283으로 명명하고 미생물자원센터

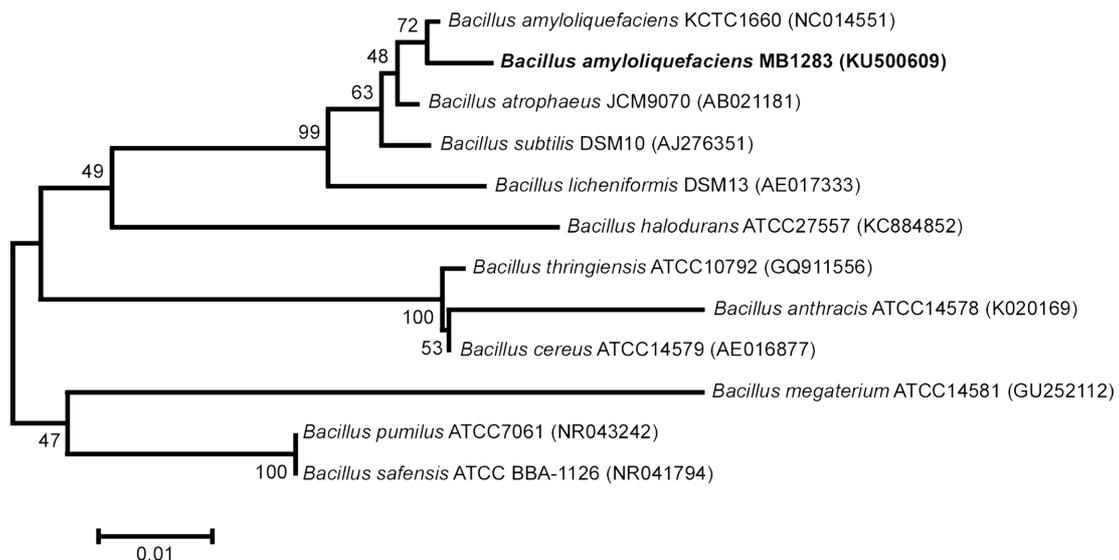


Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree showing relationships between *B. amyloliquefaciens* MBE1283 and related strains. The tree was constructed from an alignment of the full-length sequence of 16S rRNA gene from various *Bacillus* strains. The number on the nodes correspond to the bootstrap percentages based on 1,000 pseudoreplicates. The bar denotes the relative branch length. The 16S rRNA sequences are identified by their GenBank accession number in parentheses.

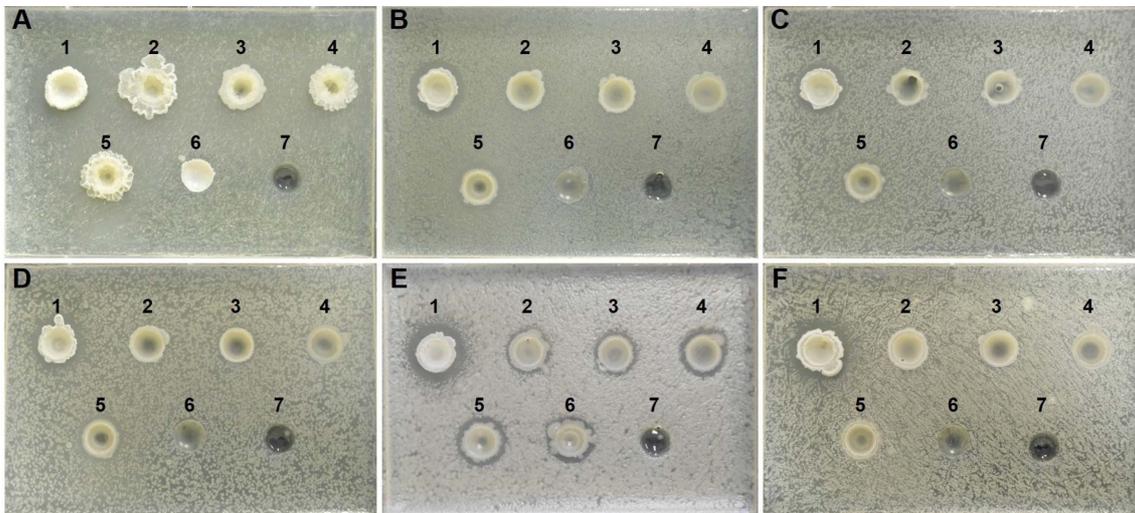


Fig. 2. Antipathogenic activity of *B. amyloliquefaciens* strains against *Cryptococcus neoformans* ATCC208821 (A), *Listeria monocytogenes* KCTC3569 (B), *Escherichia coli* O157:H7 KCCM40406 (C), *Salmonella typhimurium* ATCC19430 (D), *Bacillus cereus* KCTC1012 (E) and *Staphylococcus aureus* KCCM12214 (F). 1, MBE1283; 2, KCTC1660; 3, KCTC2105; 4, KCCM12090; 5, KCCM12091; 6, KCCM12092; 7, negative control (TSB).

에 기탁하였다(KCTC18343P).

MBE1283 균주의 항균활성

유해균에 대한 *B. amyloliquefaciens* MBE1283 균주와 *B. amyloliquefaciens* 대조군 균주들(KCTC1660, KCTC2105, KCCM12090, KCCM12091, KCCM12092)의 항균활성을 비교하였다(Table 2). MBE1283 균주는 본 연구에서 사용한 모든 유해균에 대해 생육억제 활성을 나타내었다(Fig. 2). *C. neoformans* ATCC208821과 *S. aureus* KCCM12214가 도말된 배지의 경우, 대조군으로 사용한 균주들은 아무런 생육억제 활성이 나타나지 않았지만 MBE1283 균주 주변에는 뚜렷한 생육저해환이 형성되었다. *B. amyloliquefaciens* KCCM12090 균주는 *L. monocytogenes* KCTC3569, *E. coli* O157:H7 KCCM40406 그리고 *S. typhimurium* ATCC19430에 대해 생육억제 효과를 나타내었으나 MBE1283 균주의 저해활성에 비해 상대적으로 미약하였다. *B. cereus* KCTC1012의 경우 시험에 사용한 모든 *B. amyloliquefaciens* 균주에 의하여 생육이 억제되었으나 MBE1283 균주가 상대적으로 가장 높은 생육억제 활성을 나타내었다.

A. terreus KCTC6178에 대한 *B. amyloliquefaciens* 균주의 항균활성을 검정한 결과, MBE1283 균주와 KCCM12092 균주만이 성장하였으며 검정에 사용한 다른 균주들은 성장하지 않았다(Fig. 3A). *A. flavus* KCTC6984에 대한 항균활성 검정 결과, MBE1283 균주를 점적한 종이 디스크 주변에 생성된 뚜렷한 생육저해환을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 대조군으로 사용한 *B. amyloliquefaciens* KCCM12090, 12901

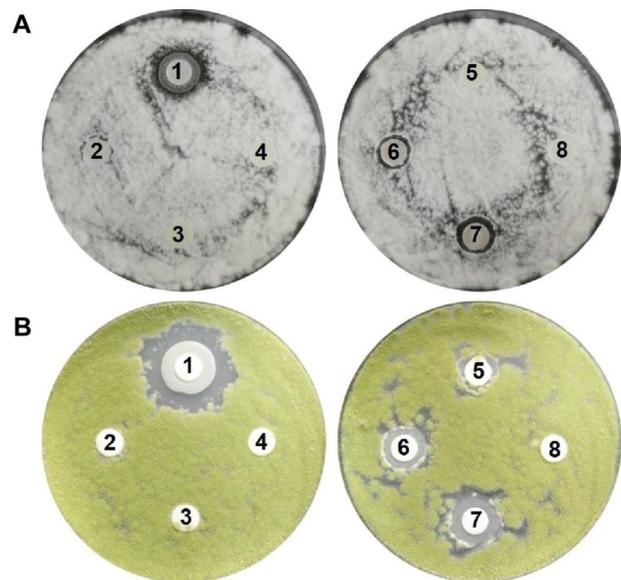


Fig. 3. Antifungal activity of *B. amyloliquefaciens* strains against *A. terreus* KCTC6178 (A) and *A. flavus* KCTC6984 (B). 1, MBE1283; 2, KCTC1660; 3, KCTC2105; 4, negative control (TSB); 5, KCCM12090; 6, KCCM12091; 7, KCCM12092; 8, negative control (TSB).

그리고 12092 균주 또한 *A. flavus*의 생육을 저해하였으나 저해 활성은 미미한 것으로 판단되었다. 항균활성 평가 결과, *B. amyloliquefaciens* MBE1283 균주는 6종의 유해균과 2종의 유해 곰팡이에 대해 항균활성을 나타냈으며, 5점의 표준균주와 비교하였을 때 상대적으로 우수한 항균활성을 보

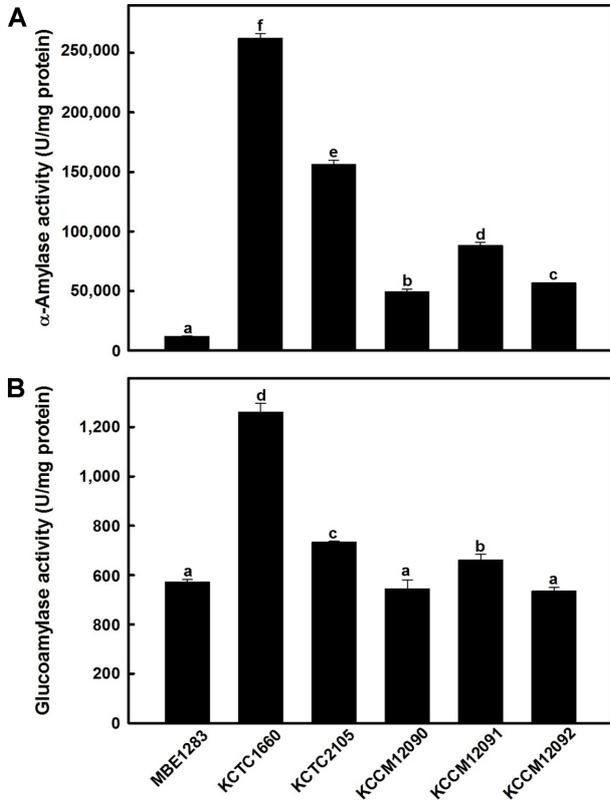


Fig. 4. Enzyme activity of α -amylase (A) and glucoamylase (B) for *B. amyloliquefaciens* strains. Cell-free crude enzyme solution was obtained by centrifuging *B. amyloliquefaciens* strains grown in synthetic medium supplemented with soluble starch (1%) at 37°C for 1 day. Different letters indicate significant difference between means.

였다. 이러한 결과는 *B. amyloliquefaciens*가 *A. flavus* 등 다양한 병원균에 항균활성을 지닌다는 Ranjbariyan 등[22]의 연구보고와 유사하였다. *B. amyloliquefaciens*가 이러한 유해균들에 대해 항균활성을 나타내는 것은 *B. amyloliquefaciens*가 생성하는 iturin, fengycin 또는 surfactin과 같은 지질 펩타이드가 유해균의 생육을 저해하기 때문으로 판단된다[11].

MBE1283 균주의 전분분해 효소활성

가용성전분을 함유한 합성배지에서 *B. amyloliquefaciens* 균주들을 배양한 후 회수한 상등액을 사용하여 균주의 전분분해활성을 측정하였다. MBE1283 균주의 경우 α -amylase 효소활성이 $11,791.46 \pm 387.37$ U/mg protein으로 시험에 사용한 *B. amyloliquefaciens*중 가장 낮은 수준을 나타내었고(Fig. 4A), 효소활성이 가장 우수하였던 *B. amyloliquefaciens* KCTC1660 균주가 나타낸 효소활성($262,331.80 \pm 4063.09$ U/mg protein)의 약 4.5%에 해당하는 상대적으로 매우 낮은 활성을 나타내었다.

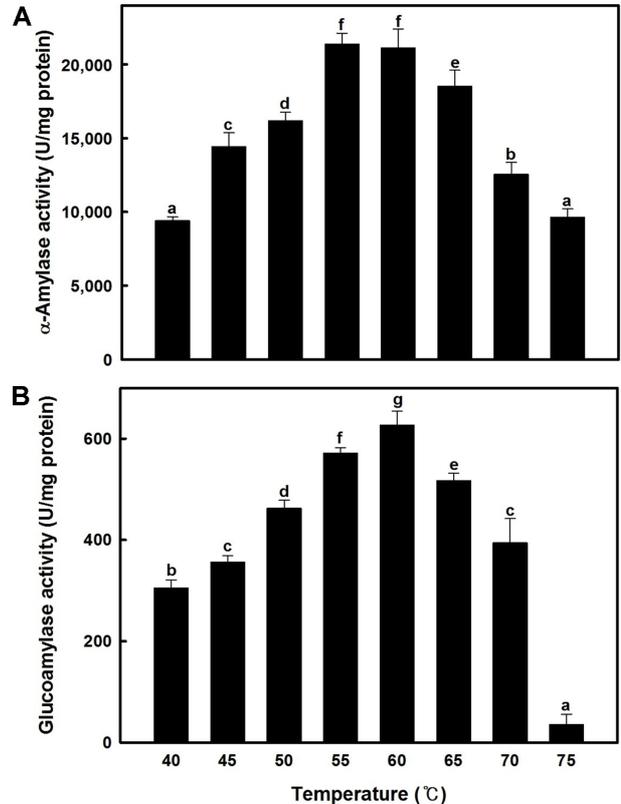


Fig. 5. Enzyme activity of α -amylase (A) and glucoamylase (B) for *B. amyloliquefaciens* MBE1283 at an indicated temperature. Different letters indicate significant difference between means.

MBE1283 균주의 glucoamylase 효소활성은 571.05 ± 35.97 U/mg protein으로 대조구로 사용한 KCCM12090 균주(544.86 ± 35.81 U/mg protein)와 KCCM12092 균주(535.03 ± 15.52 U/mg protein)의 효소활성과 유사한 수준을 나타내었다(Fig. 4B). Glucoamylase 효소활성은 KCTC1660 균주가 가장 높은 효소활성을 나타내었다($1,260.43 \pm 35.97$ U/mg protein). *B. amyloliquefaciens* MBE1283 균주는 대조구로 사용된 균주들에 비하여 매우 낮은 α -amylase 효소활성을 나타냈으나 glucoamylase 효소활성은 몇몇 대조구 균주와 유사하게 나타났다.

따라서 본 연구에서 분리된 균주는 16S rRNA 유전자 염기서열을 기준으로 판단하면 기존에 보고된 *B. amyloliquefaciens*와 상동성이 99%로 매우 유사하지만 전분분해 효소활성을 기준으로 본다면 기존의 균주와는 다른 생육특성을 보일 것으로 추정되며 유전체 규명을 포함한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단되었다.

반응온도에 따른 MBE1283 균주의 전분분해 효소활성을 평가하기 위하여 40°C 부터 75°C까지 다양한 온도에서 효

소활성을 측정하였다(Fig. 5). MBE1283 균주는 40°C에서 305.23 ± 16.07 U/mg protein으로 가장 낮은 α -amylase 효소활성을 나타내었다. 반응온도가 증가할수록 효소활성이 유의적으로 증가하여 55°C에서 가장 높은 α -amylase 효소활성($21,396.66 \pm 720.76$ U/mg protein)을 나타냈으며 60°C 이상으로 반응온도가 증가하면서 활성이 감소하였다. 기존에 보고된 다수의 *B. amyloliquefaciens* 유래의 α -amylase의 효소활성이 고온에서 활성이 유의적으로 증가하는 것과 유사하게 MBE1283 균주의 α -amylase 효소활성도 반응온도가 증가할수록 효소활성이 증가하는 것을 알 수 있었다[8].

Glucoamylase 효소활성의 경우, α -amylase 효소활성과 유사하게 반응온도가 증가할수록 효소활성이 유의적으로 증가하였으나 65°C 이상부터 활성이 급격히 감소하여 75°C에서 35.62 ± 20.45 U/mg protein으로 가장 낮은 효소활성을 나타내었다. Glucoamylase 효소활성은 60°C에서 가장 높게 나타났다(627.19 ± 27.28 U/mg protein). α -Amylase와 glucoamylase 모두 높은 반응온도에서도 일정 수준의 활성을 유지하였으나 70°C 이상에서는 효소활성이 급격히 감소되었다.

배양조건에 따른 MBE1283 균주의 비성장속도

배양온도에 따른 대조구 균주와 MBE1283 균주의 비성장속도를 측정한 결과, 배양온도 25°C에서는 두 균주 모두 낮은 비성장속도를 나타내었다(Fig. 6A). 배양온도 30°C와 35°C에서 KCTC1660 균주의 비성장속도는 각각 1.24 ± 0.07 , 1.28 ± 0.03 (1/h)로 MBE1283 균주(0.74 ± 0.02 , 1.01 ± 0.02 (1/h))보다 유의적으로 높았다. 그러나 배양온도 45°C에서는 MBE1283 균주가 KCTC1660 균주보다 상대적으로 높은 비성장속도를 나타내었으며 50°C 이상에서 KCTC1660 균주는 성장하지 못한 반면 MBE1283 균주는 55°C에서도 성장

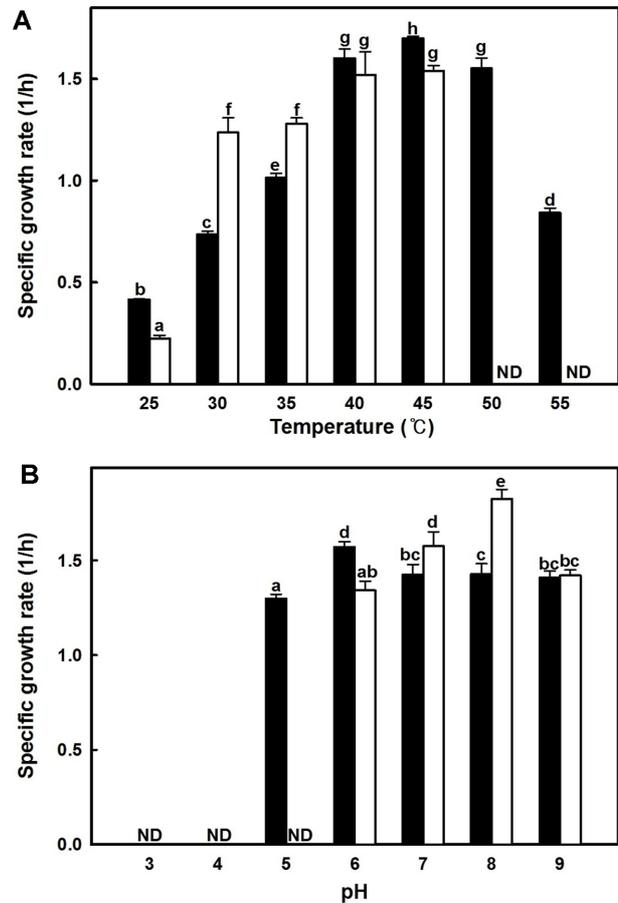


Fig. 6. Influences of temperature (A, pH 6.0) and pH (B, 45°C) on specific growth rate of *B. amyloliquefaciens* strains. Cells were grown in TSB at an indicated temperature and pH. Specific growth rates were determined at an exponential growth phase (■: MBE1283, □: KCTC1660). Different letters in indicate a significant difference between means. ND: not detected.

Table 2. Inhibition zone of *Bacillus amyloliquefaciens* strains against pathogens.

Microorganisms	Inhibition zone (diameter, mm)*					
	MBE1283	KCTC1660	KCTC2105	KCCM12090	KCCM12091	KCCM12092
<i>B. cereus</i> KCTC1012	9.20 ± 0.60^c	6.50 ± 0.33^b	4.20 ± 0.31^a	6.23 ± 0.42^b	7.20 ± 0.35^b	7.20 ± 0.32^b
<i>S. aureus</i> KCCM12214	10.42 ± 0.82^c	4.25 ± 0.42^b	4.30 ± 0.36^b	3.32 ± 0.28^{ab}	3.20 ± 0.35^{ab}	2.23 ± 0.29^a
<i>L. monocytogenes</i> KCTC3569	8.85 ± 0.45^c	3.25 ± 0.26^{ab}	3.45 ± 0.30^{ab}	4.20 ± 0.37^b	3.36 ± 0.23^{ab}	2.50 ± 0.30^a
<i>E. coli</i> O157:H7 KCCM40406	7.24 ± 0.33^c	3.34 ± 0.36^b	3.20 ± 0.40^b	3.35 ± 0.31^b	4.20 ± 0.36^b	1.20 ± 0.29^a
<i>S. typhimurium</i> ATCC19430	8.34 ± 0.42^c	3.20 ± 0.28^b	3.25 ± 0.30^b	3.30 ± 0.32^b	4.30 ± 0.30^b	1.34 ± 0.26^a
<i>C. neoformans</i> ATCC208821	9.25 ± 0.35^d	8.30 ± 0.40^{cd}	6.25 ± 0.38^b	6.60 ± 0.35^b	7.20 ± 0.60^{bc}	2.54 ± 0.30^a
<i>A. terreus</i> KCTC6178	8.45 ± 0.42^b	nd**	nd**	2.27 ± 0.30^a	3.10 ± 0.45^a	nd**
<i>A. flavus</i> KCTC6984	18.25 ± 1.21^c	nd**	nd**	nd**	3.20 ± 0.38^a	6.83 ± 0.45^b

*Averages and standard deviations from three independent experiments were shown. Means within each row with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

**nd: Not detected

하였다.

배지의 초기 pH를 조정하고 MBE1283 균주의 비성장속도를 측정하였다(Fig. 6B). MBE1283 균주는 pH 5에서 9까지 성장하였으며 pH 6에서 가장 높은 비성장속도(1.57 ± 0.03 (1/h))를 나타내었으며, pH 5에서는 비성장속도가 1.30 ± 0.02 (1/h)로서 상대적으로 가장 낮은 수준을 나타내었다. 그러나 대조구로 사용된 KCTC1660 균주는 pH 5에서는 성장하지 못하였으며, 배지의 초기 pH가 높아질수록 비성장속도가 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 pH 8에서 비성장속도가 1.82 ± 0.05 (1/h)로 MBE1283 균주의 비성장속도(1.43 ± 0.06 (1/h))보다 유의적으로 높은 수준을 나타내었다. 결론적으로 MBE1283 균주는 유전체 정보가 알려진 KCTC1660 균주에 비해 고온에 대한 내성이 우수하고 낮은 pH에서도 잘 성장하였으며 배양온도 45°C, 배지 pH 6에서 성장속도가 가장 우수하였다.

기존의 *B. amyloliquefaciens* 균주와 관련된 연구는 *B. amyloliquefaciens*가 세포외로 분비하는 amylase, phytase 또는 protease 등과 같은 효소나 식물생육 촉진 효과 그리고 식물병원균에 대한 항균효과가 주로 이루어졌다[3, 10, 13]. 그러나 본 연구에서는 식물병원균이 아닌 인체에 유해한 식중독 유발 세균 및 병원성 진균에 대한 항균활성을 평가하는 연구를 수행하여 막걸리로부터 분리된 *B. amyloliquefaciens* MBE1283 균주의 우수한 항균활성을 검증하였으며 전분분해와 관련된 효소활성 및 다양한 생육조건에서의 비성장속도 측정을 통하여 기존에 보고된 *B. amyloliquefaciens* 균주와는 상이한 생육특성을 보이는 것을 확인하였다. 향후 차세대 유전체 해독(next generation sequencing) 기법 등을 이용하여 전체 유전체 염기서열을 해석하고 균주의 생리학적 특성을 규명한다면 생물산업적 관점에서 높은 활용성이 기대된다.

요 약

강원도를 비롯한 전국에서 발효식품 44점으로부터 유해균에 대한 생육억제 활성이 우수한 고초균주를 분리 및 동정하였으며, 생육억제 활성이 가장 우수하였던 *Bacillus amyloliquefaciens* MBE1283로 명명된 균주의 유해균에 대한 생육억제 활성, 전분분해 효소활성 및 생육특성을 조사하였다. *Escherichia coli* O157:H7 KCCM40406을 비롯한 8종류의 유해균에 대한 생육억제 활성을 평가한 결과, 막걸리에서 분리된 *B. amyloliquefaciens* MBE1283 균주는 다른 *B. amyloliquefaciens* 균주들에 비해 유의적으로 높은 유해균 생육억제 활성을 나타내었다. *B. amyloliquefaciens* MBE1283 균주의 α -amylase 효소활성은 대조구 균주들과 비교하였을 때 현저히 낮았으나 glucoamylase 효소활성은 대

조구로 사용한 균주와 유사한 수준이었다. *B. amyloliquefaciens* MBE1283 균주의 최적 생육온도는 45°C로서 대조구 균주보다 온도에 대한 내성이 있는 것으로 판단되었으며, 균체 성장에 적합한 최적 배지는 pH 6이었다. 본 연구를 통하여 막걸리로부터 분리된 *B. amyloliquefaciens* MBE1283 균주는 여러 종류의 유해균에 항균활성을 지니며 높은 온도와 낮은 pH에 대하여 내성을 지닌 것을 알 수 있었다.

Acknowledgments

This work was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ009477)" Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Anzai Y, Kudo Y, Oyaizu H. 1997. The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas* supports synonymy of these three genera. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 249–251.
- Benitez LB, Velho RV, Lisboa MP, Medina LF, Brandelli A. 2010. Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. *J. Microbiol.* **48**: 791–797.
- Borgiat PT, Campbell LL. 1978. α -Amylase from five strains of *Bacillus amyloliquefaciens*: evidence for identical primary structures. *J. Bacteriol.* **134**: 389–393.
- Chae GP, Makoto S, Hiroshi K. 1990. Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. *J. Ferment. Bioeng.* **69**: 1–7.
- Choi DH, Park EH, Kim MD. 2014. Characterization of starch-utilizing yeast *Saccharomycopsis fibuligera* isolated from Nuruk. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 407–412.
- Claudio TS, Anne MW, Leonard WM, Roger M, Arnold S, Ariana B, et al. 2002. Sequencing of 16S rRNA Gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 1117–1123.
- Davis ND. 1981. Sterigmatocystin and other mycotoxins produced by *Aspergillus* species. *Food. Prot.* **44**: 711–714.
- Deb P, Talukdar SA, Mohsina K, Sarker PK, Sayem SA. 2013. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *Springerplus* **2**: 154–165.
- Ghisalberti EL. 2000. Bioactive metabolites from soilborne fungi: natural fungicides and biocontrol agents. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **21**: 181–250.
- Idriss EE, Makarewicz O, Farouk A, Rosner K, Greiner R, Bochow H, et al. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology* **148**: 2097–2109.
- Koumoutsis A, Chen XH, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, et al. 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive

- cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* **186**: 1084–1096.
12. Liu GL, Wang DS, Wang LF, Zhao SF, Chi ZM. 2011. Mig1 is involved in mycelial formation and expression of the genes encoding extracellular enzymes in *Saccharomycopsis fibuligera* A11. *Fungal. Genet. Biol.* **48**: 904–913.
 13. Liu J, Zhou T, He D, Li XZ, Wu H, Liu W, et al. 2011. Functions of lipopeptides bacillomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 43–52.
 14. Magaldi S, Mata-Essayag S, Hartung de Capriles C, Perez C, Colella MT, Olaizola C, et al. 2004. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *Int. J. Infect. Dis.* **8**: 39–45.
 15. Maget-Dana R, Peypoux F. 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology* **87**: 151–174.
 16. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426–428.
 17. Moreno OJ, Kang MS. 1999. Aflatoxins in maize: The problem and genetic solutions. *Plant breeding* **118**: 1–16.
 18. Mounia O, Stephane C, Linda S, Monique L. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **18**: 414–420.
 19. Noverr MC, Phare SM, Toews GB, Coffey MJ, Huffnagle GB. 2001. Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. *Infect. Immun.* **69**: 2957–2963.
 20. Park EH, Lee DH, Seo JH, Kim MD. 2011. Cloning and characterization of a glyoxalase I gene from the osmotolerant yeast *Candida magnoliae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 277–283.
 21. Park JW, Kim BJ, Lee JW, Kim YB. 2002. Purification and characterization of a maltopentaose-producing amylase from *Bacillus megaterium* KSM B-404. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 352–358.
 22. Ranjbariyan AR, Shams-Ghahfarokhi M, Kalantari S, Razzaghi-Abyaneh M. 2011. Molecular identification of antagonistic bacteria from Tehran soils and evaluation of their inhibitory activities toward pathogenic fungi. *Iran J. Microbiol.* **3**: 140–146.
 23. Rohmer L, Hocquet D, Miller SI. 2011. Are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis. *Trends Microbiol.* **19**: 341–348.
 24. Ruckert C, Blom J, Chen X, Reva O, Borriss R. 2011. Genome sequence of *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7(T) reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42. *J. Biotechnol.* **155**: 78–85.
 25. Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406–425.
 26. Sutyak KE, Wirawan RE, Aroutcheva AA, Chikindas ML. 2008. Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *J. Appl. Microbiol.* **104**: 1067–1074.
 27. Victor C. 1976. Uses and abuses of Duncan's multiple range test. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* **89**: 251–253.
 28. Yoshida S, Hiradate S, Tsukamoto T, Hatakeda K, Shirata A. 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology* **91**: 181–187.
 29. Yu GY, Sinclair JB, Hartman GL, Bertagnolli BL. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol. Biochem.* **34**: 955–963.