

Article

Epigallocatechin Gallate (EGCG)에 노출된 용혈성 *Bacillus cereus* MH-2의 세포 반응 및 프로테오믹 분석

김동민 · 박상국 · 오계현*

순천향대학교 자연과학대학 생명시스템학과

Cellular responses and proteomic analysis of hemolytic *Bacillus cereus* MH-2 exposed to epigallocatechin gallate (EGCG)

Dong-Min Kim, Sang-Kook Park, and Kye-Heon Oh*

Department of Life Science and Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 31538, Republic of Korea

(Received July 28, 2016; Revised August 12, 2016; Accepted August 12, 2016)

ABSTRACT: The aim of this work was to investigate the cellular responses and proteomic analysis of *Bacillus cereus* MH-2 exposed to EGCG. Strain MH-2 was isolated from commercial Ssamjang and has the hemolytic activity. Survival of the MH-2 strain with time in the presence of different concentrations of EGCG under sublethal conditions was monitored. The amount of alginate from MH-2 strain decreased depending on the increasing concentrations of EGCG and increased depending on the exposure time at any particular EGCG concentration. Analysis of SDS-PAGE and Western blot using anti-DnaK and anti-GroEL revealed that two stress shock proteins, 70 kDa DnaK and 60 kDa GroEL were found to decrease in proportion to the EGCG concentration in exponentially growing cultures. Scanning electron microscopic analysis demonstrated the presence of protrusions and fused rod forms on the cells treated with EGCG. 2-DE of soluble protein fractions from MH-2 cultures showed 20 protein spots changed by EGCG exposure. These proteins involved in enterotoxins (hemolysin BL lytic component L1 and hemolysin BL-binding protein), chaperons (DnaK and GroEL), cell defense (peptidase M4 family proteins), and various biosynthesis and energy metabolism were identified by peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF. These results provide clues for understanding the mechanism of EGCG-induced stress and cytotoxicity on *B. cereus* MH-2.

Key words: *Bacillus cereus* MH-2, EGCG, epigallocatechin gallate, hemolysis

고추장 및 쌈장 등의 장류는 우리나라의 고유 전통발효식품으로 자리잡아왔으며, 최근 웰빙 음식으로서 한식의 국제화를 선도하는 일부 식품기업들에서는 장류연구소를 설립하여 집중적으로 장류에 대한 여러가지 측면에서의 연구를 수행하고 있다. 최근 쌈장의 원료인 된장의 항암, 혈당강하, 항산화 효과, 돌연변이 억제 및 혈전 용해능 등 다양한 기능성이 보고되고 있어 기능성 쌈장에 대한 관심이 높아지고 있다(Kwak *et al.*, 2007). 그러나 쌈장의 제조공정에서 식중독을 유발할 수 있는 *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* 등이 유입될 수 있다. 특히 내생포자를 형성하는 *B. cereus*는 재료 준비과정부터 다른 균주들과 비교하여 상대적으로 많은 양이 유입될 수 있으나, 효율

적인 멸균법이 알려져 있지 않아 오랫동안 문제가 제기되어오고 있다.

*B. cereus*에 의한 세균성 식중독은 커다란 건강상의 문제를 일으키는 것으로 보고된 바 있으며(Granum and Lund, 1997; Guinebretière and Broussolle, 2002; Arnesen *et al.*, 2008), 이를 관리하기 위하여 우리나라에서는 2005년부터 식품의약품안전처에서 1 g당 1,000 CFU 이하로 규제하는 지침을 제정해 놓고 있는 상태이다. 기업 및 식품업체 등에서는 이를 해결하기 위해서 사용되는 물과 재료의 열처리, 또는 각종 첨가물을 이용하는 등의 물리화학적 방법으로 생산되고 있으며, 최근 천연물질을 첨가하여 저장성 및 품질을 향상시키기 위한 연구가 진행 중이다(Lee *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2013).

*B. cereus*에 의한 식중독은 일부 균주가 생성하는 설사형 독

*For correspondence. E-mail: kyeheon@sch.ac.kr;
Tel.: +82-41-530-1353; Fax: +82-41-530-1493

소인 hemolysin BL (HBL)과 구토형 독소인 cereulide에 의해 발생된다고 보고되었다(Yokoyama *et al.*, 1999; Guinebretière and Broussolle, 2002). 우리나라에서 *B. cereus*에 의한 식중독 사례는 매년 증가추세에 있어 이를 효율적으로 예방하는 대책이 필요할 것으로 사료된다(Choi *et al.*, 2011).

Epigallocatechingallate (EGCG)는 epigallocatechin (ECG), epicatechingallate (ECG), epicatechin (EC), gallocatechingallate (GCG)와 함께 녹차에 함유된 주요 카테킨의 한 종류로서, 항산화효과, 노화방지, 암세포분화방지, 항바이러스효과, 충치 예방효과 등의 다양한 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Yu *et al.*, 2004). 녹차추출물(tea polyphenol)은 식중독관련 미생물, 구강미생물 등 다양한 미생물들에 대하여 항균효과가 있는 것으로 보고된 바 있다(Cho *et al.*, 2010, 2011; Song *et al.*, 2010). *B. cereus*의 제거를 위하여 제조공정의 변화나 화학첨가제 첨가가 제기되어왔으나, 최근에 항미생물 효과와 더불어 건강상의 이유로 다양한 기능성을 가지는 천연물질을 이용한 활용하는 방안의 필요성이 주목을 받고 있으며, 이러한 다양한 기능을 충족시킬 수 있는 물질로서 EGCG가 관심의 대상이 되어왔다.

본 연구에서는 시판되고 있는 씹장에서 용혈성 *B. cereus* MH-2를 분리하여, EGCG에 노출시켰을 때 나타나는 세포 반응에 대하여 조사하였으며, EGCG의 다양한 농도와 시간에 노출된 *B. cereus* MH-2에서 alginate의 생성을 관찰하였다. 또한 이 세균이 EGCG에 의해 유도되는 스트레스 충격단백질인 DnaK와 GroEL의 변화를 Western blot을 통하여 조사하였으며, EGCG에 노출된 세포의 외부형태 변화를 주사전자현미경으로 관찰하였다. 또한 EGCG에 의한 단백질 발현의 변화를 2-D PAGE와 MALDI-TOF를 활용하여 프로테옴 분석을 실시하였다.

재료 및 방법

세균의 분리 및 배양

시중에서 판매되고 있는 씹장(C사, 한국)으로부터 농화배양 기법을 통하여 용혈성 *Bacillus cereus*를 분리하였다. 5% sheep blood가 첨가된 blood agar (Difco Co.)에 시료를 도말하여 배양하였다. 이후 고체 평판 배지상의 집락 주변에 투명대가 형성된 집락을 선별하여, 선별된 균주를 blood agar 배지에 3회에 걸친 도말 평판법을 통한 순수배양기법으로 투명대(clear zone)를 형성하는 세균을 분리하여 최종 선별하였다. 분리세균은 LB 액체배지에 접종하여, 진탕배양기(37°C, 160 rpm)

에서 유지하며, 본 실험에 이용하였다.

EGCG에 대한 분리세균의 생존율 조사

분리세균에 대한 EGCG의 살균 효과를 알아보기 위하여 균주를 LB 액체 배지에 배양하였다. 대수생장기를 거치면서 파장 660 nm에서 혼탁도가 1.0일 때, 배양액을 4°C를 유지하며 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 얻어진 균체를 PBS buffer로 3회 세척하고, 다시 동일조건 하에 원심분리를 실시하여 얻어진 균체를 다양한 농도의 EGCG에 노출시켰다. 2시간 간격으로 LB 고체 평판배지에 100 µl씩 평판도말하여 37°C에서 24시간 배양한 후, 형성된 집락을 계수하여 EGCG 농도와 노출시간에 따른 분리세균의 생존율을 각각 조사하였다.

EGCG 노출에 의한 alginate 생성량 측정

EGCG의 노출 시간과 농도에 따른 alginate의 생성량 변화는 이미 보고된 방법(Chang *et al.*, 2007)을 이용하여, 상등액에 포함되어있는 alginate를 정제하여 측정하였다. 다양한 농도의 EGCG (1,000-3,000 µg/ml)가 첨가되어있는 LB 액체배지에 각각 분리세균을 접종하여 EGCG에 노출시킨 후, 2시간 마다 상등액을 취하여 ice ethanol (-20°C)을 첨가한 후, -20°C에서 18시간 동안 처리하였다. 처리된 시료를 원심분리를 이용하여 4°C를 유지하면서 13,000 rpm에서 1시간 원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조 시킨 후, 증류수에 녹여 alginate를 얻었다. 얻어진 alginate 시료 100 µl와 5% phenol solution 100 µl를 잘 혼합한 후, 500 µl의 sulfuric acid를 첨가한 뒤, 30초 동안 잘 혼합하여 80°C에서 30분간 반응시켰다. 반응시킨 튜브를 식힌 뒤 490 nm에서 흡광도를 측정하여 alginate를 정량하였다. 정량은 sodium alginate (Sigma)에 의해 만들어진 표준곡선을 활용하였다. 표준곡선은 5, 10, 25, 50, 100 µg의 alginate를 제조하여 반응시킨 후, 490 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

단백질 획득 및 정량

분리세균을 EGCG에 노출시킨 후, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 균체를 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 3회 세척하였다. 이후 동일 buffer에 균체를 현탁하여 4°C를 유지하면서, 초음파 분쇄기를 이용하여 50 W로 30초간 15회 반복하면서 파쇄하여 단백질을 추출하였다. 파쇄된 세포는 13,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후, 단백질을 포함하고 있는 상등액을 취하여 Bradford 방법(Bradford, 1976)으로 단백질을 정량하였다. 정량은 bovine serum albumin (BSA)에

의해 만들어진 표준 곡선을 활용하였다.

EGCG 노출에 따른 세포 외부형태의 관찰

EGCG에 노출된 세균 세포의 외부형태 변화를 주사전자 현미경을 통하여 관찰하였다. 세균을 LB 액체배지에 접종하여 12시간 동안 배양시킨 후, PBS로 3회 세척하여 균체를 준비하였다. 준비한 균체를 2,000 µg/ml의 EGCG에 각각 2시간, 8시간 동안 노출시킨 후, 배양액을 원심 분리하여 균체를 회수하고, 여과지에 부착하여 고정 및 탈수한 후, hexamethyl disilazane 원액에 20분간 반응시켜 공기 중에서 건조하였다. 건조시킨 membrane filter를 slide glass 위에 부착하여 sputter coater (IB-3, Giko Engineering Co.)를 사용하여 gold coating 한 후, JSM-6700F 주사전자현미경(JEOL)으로 관찰하였다.

SDS-PAGE와 Western blot 분석

추출한 단백질을 Bollag 등의 방법(1996)에 따라 SDS-PAGE를 실시하였다. Separating gel은 12% acrylamide gel을 사용하고, stacking gel은 4% acrylamide gel을 사용하였다. 전기영동 후 gel은 staining solution (0.1% Coomassie brilliant blue R-250, 45% methanol, 10% acetic acid)으로 1시간 염색하였고, destaining solution I (50% methanol, 10% acetic acid)과 destaining solution II (5% methanol, 7% acetic acid)로 탈색하였다. 스트레스 충격단백질(예, DnaK와 GroEL)을 분석하기 위하여 Sambrook 등의 방법(2001)에 따라 Western blot을 실시하였다. 1차 항체는 anti-DnaK와 anti-GroEL (StressGen Biotechnologies Corp.)을 사용하였고, 2차 항체는 anti-mouse IgG HRP conjugate (Promega)를 사용하였다. 반응 검출을 위하여 Western blot detection system (Intron)을 사용하여 X-ray film (AGFA)에 현상한 후, 스트레스 충격단백질의 발현을 비교 분석하였다.

2-DE와 in-gel digestion

EGCG에 노출된 분리세균의 단백질 변화를 분석하기 위하여 대상 균주를 2,000 µg/ml 농도의 EGCG에 2시간 동안 노출시킨 후 획득된 단백질 시료와 대조군으로 EGCG에 노출되지 않은 균주에서 얻은 단백질 시료를 각각 준비하여 기존에 기술된 방법으로 이차원 젤 전기영동(2-DE)을 실시하였다(Ho et al., 2004). 염색된 단백질 spots는 젤에서 잘라내어, 30 mM potassium ferricyanide와 100 mM sodium thiosulfate를 1:1로 혼합한 용액을 사용하여 탈염색하고, 증류수로 세척하였다. 세척된 gel은 50% acetonitrile과 100% acetonitrile으로 각각

15분간 반응 후, 100 mM ammonium bicarbonate (pH 7.8)를 넣고 5분간 반응시켰다. 반응시킨 gel에 100% acetonitrile을 넣고 gel이 흰색으로 변하면 acetonitrile을 제거하였으며, 진공 원심분리 농축기로 남아있는 여액을 제거하고, 건조시켰다. 건조된 gel은 0.2 µg trypsin (Promega sequence grade)으로 37°C에서 16시간 동안 처리하여 gel에 있는 단백질을 peptide로 분해시켰다. 분해된 peptides를 추출하기 위하여 25 µl의 elution buffer [50% acetonitrile, 5% trifluoroacetic acid (TFA)]를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 교반시켰다. 반응시킨 elution buffer를 새로운 1.5 ml 튜브로 옮기고 진공 원심분리 농축기로 농축하였으며 이 과정을 2회 반복하였다.

MALDI-TOF/MS를 이용한 단백질 동정

농축된 peptides는 0.1% TFA 용액에 녹인 후, zip-tip C18 pipette tips (Millipore)를 사용하여 탈염하였다. Peptides는 CHCA solution (10 mg/ml CHCA in 0.5% TFA/50% ACN, 1:1)을 첨가하여 분석용 시료를 만들었으며, PTFE (polytetrafluoroethylene) 필름으로 코팅된 96 well plate (Applied Biosystems Inc.)에 1 µl씩 주입하였다. Mass spectra는 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems)를 사용하였으며, 각 단백질은 MASCOT (<http://www.matrixscience.com>)의 NCBI DB 활용에 근거하여 MALDI fingerprint data로부터 동정되었다(Cottrell and London, 1999).

결과 및 고찰

세균의 분리 및 배양

시중에 판매되고 있는 싹장으로부터 농화시킨 배양액에서 5% sheep blood가 첨가된 blood agar에서 투명대가 관찰되는 균주를 선별하여 blood agar에서 3회에 걸친 도말 평판법을 통한 순수배양으로 투명대가 뚜렷한 세균인 *Bacillus cereus* MH-2를 선별하였다. 선별된 균주는 LB 액체배지에 접종하여, 진탕배양기에서 37°C에서 160 rpm의 배양조건을 유지하면서 본 실험에 이용하였다.

EGCG에 대한 분리세균의 생존율 조사

분리세균 MH-2에 대한 EGCG의 농도와 노출 시간에 따른 생존율을 알아보기 위한 실험을 실시하였다. 전반적으로 노출 시간과 농도에 비례하여 세균의 집락의 수가 점차 감소하는 양상을 보였으며, 4,000 µg/ml의 EGCG 농도에 노출시킨 분리

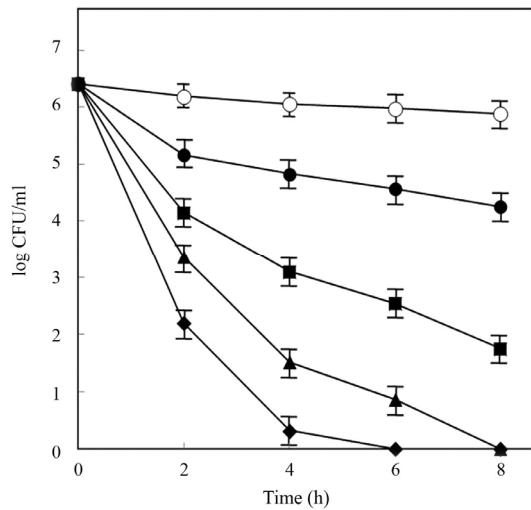


Fig. 1. Survival rate of *Bacillus cereus* MH-2 following exposure to EGCG. MH-2 cells were maintained at the concentrations of 0 µg/ml (○), 1,000 µg/ml (●), 2,000 µg/ml (■), 3,000 µg/ml (▲), and 4,000 µg/ml (◆) EGCG. At intervals, the numbers of colonies (CFU/ml) were measured.

세균은 빠르게 생존율이 감소하여 6시간 이후 집락을 관찰할 수 없으며, 3,000 µg/ml의 농도에 노출시킨 세균은 8시간 이후 집락이 관찰되지 않았다(Fig. 1). Shigemune 등(2012)은 500 µg/ml의 농도의 EGCG에 노출된 *B. cereus* 균주의 내생포자형성이 억제되어 생존율이 감소하였으나, 6시간 이후부터는 내생포자형성이 증가하여, 발아하는 세포의 수가 증가한다고 보고하였다. 본 연구결과에 따르면 4,000 µg/ml 이상의 고농도의 EGCG에 노출된 세균의 사멸이 급격히 이루어져, 노출 6시간 이후에 집락이 관찰되지 않았다. 이는 일정 농도 이상의 EGCG는 *B. cereus*에 대하여 뛰어난 살균 효과를 가지는 것으로 사료된다.

EGCG 노출에 따른 alginate 생성량 변화

분리 세균인 MH-2가 다양한 농도의 EGCG에 노출되었을 때 생성되는 alginate의 양을 측정하였다. Alginate 생성량은 EGCG의 농도가 증가함에 따라 감소하였으며, 특정 EGCG 농도에서 노출시간이 진행됨에 따라 생성량은 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 16시간의 배양기간 동안 alginate 최대 생성량은 1,000 µg/ml의 EGCG에서 12시간 경과 후 59 µg, 그리고 2,000 µg/ml과 3,000 µg/ml에서 10시간 경과 후, 각각 37 µg과 14 µg으로 측정되었다. EGCG 노출에 따른 *B. cereus*의 alginate의 생성량을 측정한 연구 결과는 거의 알려진 바 없다. 그러나 alginate의 생산은 열악한 주변 환경에서 세균들이 생존하는데 중요한 요인으로 알려져 있다. 병원성 및 토양세균

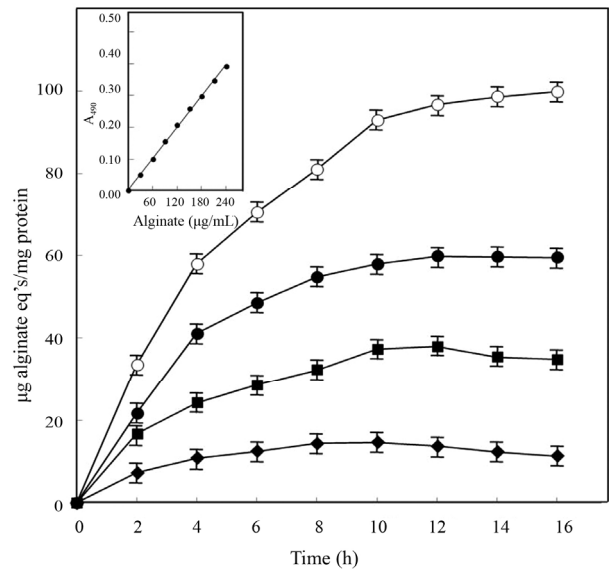


Fig. 2. Exopolymer production as alginate equivalents by *Bacillus cereus* MH-2. The cells were grown in LB only (○), or LB in the presence of the concentrations of 1,000 µg/ml (●), 2,000 µg/ml (■), and 3,000 µg/ml (◆) EGCG. The standard curve for alginate quantification was shown as the inner box in Fig. 2. These data represent the mean±SD based on triplicate studies.

으로 널리 알려진 *Pseudomonas* 속(genus)에서 alginate 생산과 관련된 연구는 많이 보고되었다. 열, 독성화학물질, 폭약, 항생제 등 외부환경요인의 노출에 따른 alginate 생성량의 변화를 관찰한 연구결과는 *Ps. syringae*와 *Ps. putida*에서 각각 보고되었다(Keith and Bender, 1999; Lee et al., 2008). 이러한 결과들을 바탕으로 EGCG에 노출된 *B. cereus*에서도 외부환경적 스트레스 요인에 저항하고 세포생존을 위한 수단으로서 alginate를 생성하는 것으로 사료된다.

EGCG 노출에 따른 세포 외부형태의 관찰

분리세균인 MH-2의 EGCG 처리 농도와 시간에 따른 세포 외부 형태변화를 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 미처리된 MH-2 세포는 정상적으로 둥근 간균의 매끈한 세포표면이 관찰된 반면에, 2,000 µg/ml의 농도에서 2시간 동안 노출된 세균은 세포의 표면이 울퉁불퉁해지고, 특정 부분이 돌출되기 시작하는 것을 관찰할 수 있었다. 8시간 노출된 세균에서는 세포의 표면이 더욱 불규칙해지고, 크고 작은 돌출부의 생성과 함께 세포의 몽그러진 형태도 관찰되었다(Fig. 3). EGCG에 노출된 후의 형태 변화는 세균의 종류에 따라 다른 것으로 보고되었다. Shigemune 등(2012)은 EGCG에 노출된 *B. cereus* JCM2152의 세포에서 표면이 심하게 주름이 지고, 찌그러지

는 모습을 관찰하였으며, *Klebsiella pneumoniae*에서는 저농도에서는 천공이 관찰되었으며, 농도가 증가함에 따라 심하게 일그러지고 뭉그러지는 것으로 보고하였다(Cho *et al.*, 2011).

EGCG의 사멸효과에 대해서는 두 가지 기작이 제시되었다; (1) 세포막의 손상에 의한 세포사멸을 유도한다는 기작(Ikigai *et al.*, 1993)과 (2) EGCG가 직접적으로 펩티도글리칸에 결합하여 세포벽을 손상 및 세포벽 생합성을 방해한다는 기작이다(Shimamura *et al.*, 2007). 본 연구 결과에 따르면 외부형태의 심각한 변화로 보아 세포벽의 손상을 초래하여 세포 사멸을 일으킨 것으로 판단되나, 구체적으로 세포에 영향을 미치는 기작을 명백히 밝히기 위한 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

SDS-PAGE와 Western blot 분석

스트레스 충격단백질의 발현양상을 조사하기 위하여 분리

균주 MH-2를 다양한 농도의 EGCG (1,000–4,000 $\mu\text{g/ml}$)에 노출시킨 후, 스트레스 충격단백질인 DnaK와 GroEL의 발현과 (Fig. 4), 3,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 EGCG에서 1시간 간격으로 노출에 의해 유도 발현되는 DnaK와 GroEL을 조사하였다(Fig. 5). Fig. 4에서 보여주는 바와 같이, EGCG 농도에 따른 세균에서 발현되는 DnaK와 GroEL의 양은 EGCG의 농도가 증가함에 따라 발현량이 점차 감소하였으며, 노출 시간이 증가함에 따라 DnaK와 GroEL의 발현량이 급격히 감소하였다(Fig. 5). 일반적으로 스트레스 충격단백질인 DnaK와 GroEL은 열과 NaCl과 같은 스트레스 요인들에 의해서도 발현이 변화하는 것으로 알려져 있다. Periago 등(2002)은 스트레스 요인으로 열과 NaCl에 노출된 *B. cereus* ATCC 14579 균주에서 여러 가지 단백질의 변화를 관찰하였으며, 특히 DnaK와 GroEL 발현은 변화로 노출 시간이 증가할수록 유도되는 양이 증가한

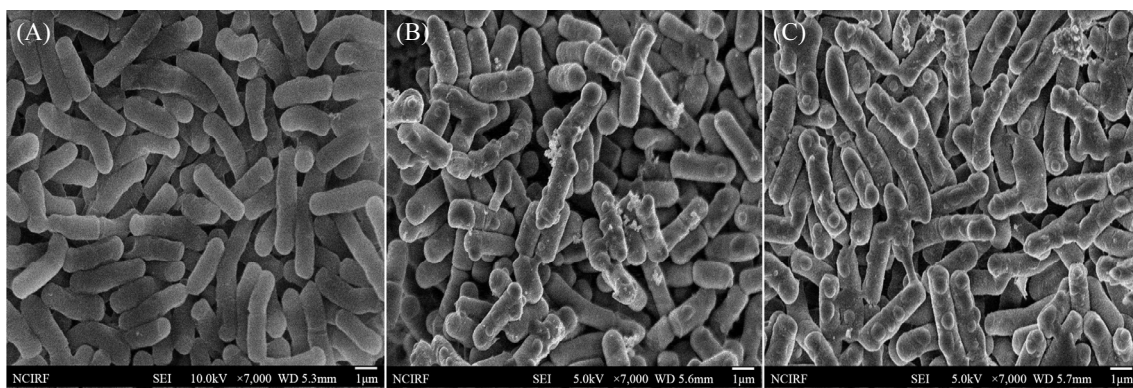


Fig. 3. Scanning electron micrographs of *Bacillus cereus* MH-2. (A) untreated cells, (B) cells treated with 2,000 $\mu\text{g/ml}$ EGCG for 2 h, and (C) cells treated with 2,000 $\mu\text{g/ml}$ EGCG for 8 h.

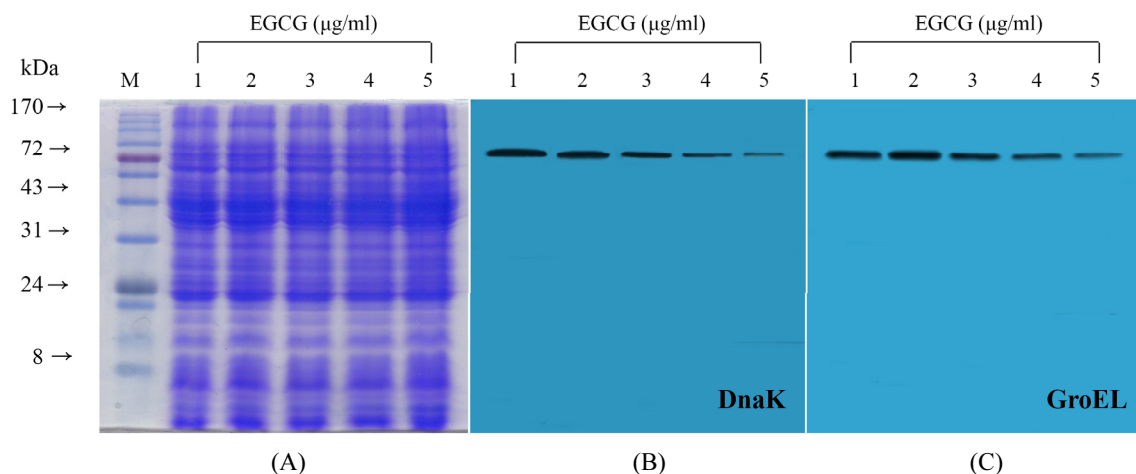


Fig. 4. Induction of stress shock protein (SSPs) in *Bacillus cereus* MH-2 treated with different EGCG concentrations for 1 h; 0 $\mu\text{g/ml}$ (lane 1), 1,000 $\mu\text{g/ml}$ (lane 2), 2,000 $\mu\text{g/ml}$ (lane 3), 3,000 $\mu\text{g/ml}$ (lane 4), 4,000 $\mu\text{g/ml}$ (lane 5). The SSPs were analyzed by SDS-PAGE (A), and western blot with anti-DnaK (B), and anti-GroEL (C) monoclonal antibodies, respectively.

후에 일정하게 유지되는 것을 보고하였다. 본 실험을 통해서 사용된 EGCG는 노출 농도 및 시간이 증가함에 따라 유도되는 DnaK와 GroEL은 점차 사라지는 것으로 관찰되었는데, 이는 EGCG가 세포독성물질로 작용하여 세포사멸을 유도한 결과로 스트레스 충격단백질의 발현이 감소하는 것으로 열이나 NaCl의 노출 결과 발현되는 정도에서 차이가 있는 것으로 사료된다.

EGCG에 노출된 분리세균에서 프로테옴 발현 변화

먼저 EGCG에 노출되었을 때, 분리세균 MH-2에서 나타난

다양한 프로테옴 발현 변화를 이차원 전기영동(2-DE)을 통하여 비교 관찰하였다. 2,000 µg/ml의 EGCG에 2시간 동안 노출된 *B. cereus* MH-2 균주의 프로테옴 발현 변화 양상을 관찰한 결과, pH 4-7의 범위에서 약 20개의 단백질이 EGCG 노출에 의해 비교적 크게 증가하거나 감소하는 spot들이 관찰되었다 (Fig. 6).

2-DE에서 증감이 관찰된 spot들은 MALDI-TOF에 의한 peptide mass fingerprinting을 이용하여 동정을 실시하였다. MALDI-TOF 분석 결과는 Table 1에 요약되었다. 이들 단백질 가운데, EGCG에 노출된 MH-2 세포에서 다양한 기능을

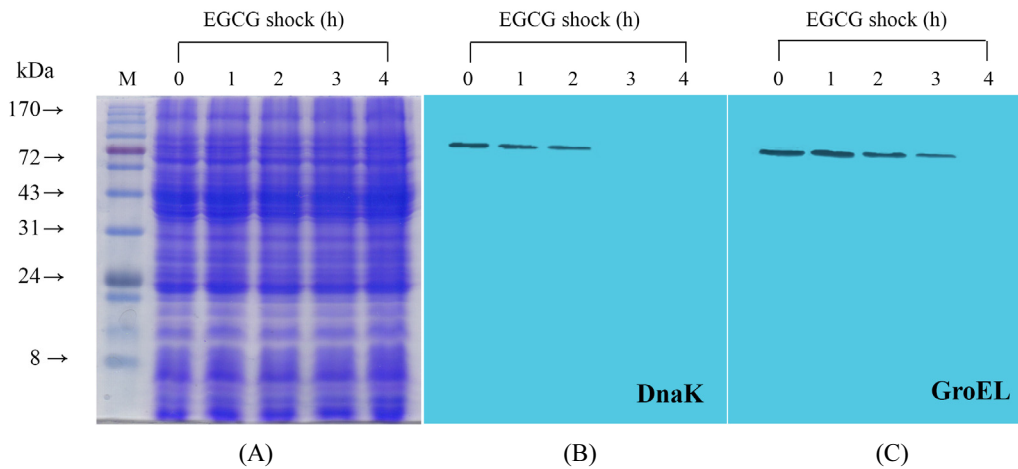


Fig. 5. Induction of stress shock proteins (SSPs) in *Bacillus cereus* MH-2 treated with 3,000 µg/ml EGCG for different exposure times (h). The SSPs were analyzed by SDS-PAGE (A), and western blot with anti-DnaK (B), and anti-GroEL (C) monoclonal antibodies, respectively.

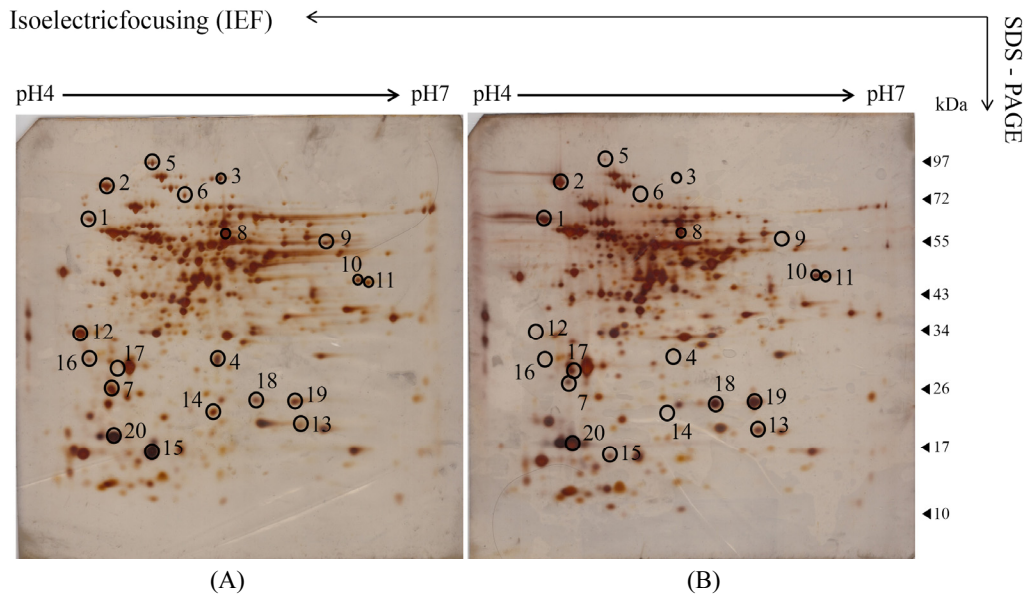


Fig. 6. Two-dimensional gel electrophoresis pattern of total *Bacillus cereus* MH-2 proteins in Luria-Bertani broth without EGCG (A) or in the presence of 2,000 µg/ml EGCG for 2 h (B). The number associated with MALDI-TOF/MS identified spots is listed in Table 1.

수행하는 단백질들, 특히 스트레스 충격단백질(DnaK, GroEL), alginate 생합성 단백질(alginate biosynthesis protein, AlgB), 세포 방어요소(예, peptide M4 family proteins)의 증가가 확인되었다. Western blot에서 EGCG 노출 농도와 시간이 증가함에 따라 아치사 조건(sub-lethal condition)에 도달하여 세포의 치사로 인한 스트레스 충격단백질의 발현 감소가 관찰되었으나, 2-DE에서 사용된 EGCG 농도에서는 이들 단백질이 증가되는 것으로 나타났다. 스트레스 충격단백질을 포함하여 증가된 단백질들은 저 농도의 EGCG에 노출된 분리세균에서 증가됨으로서, 세포가 열악한 환경에 노출되었을 때 세포를 방어하거나 세포의 생존을 돕는데 중요한 역할을 하는 것을 시사한다. Periago 등(2002)은 *B. cereus* ATCC 14579에서 온도,

pH, ethanol, NaCl과 같은 외부 환경요인의 변화에 의해서 DnaK와 GroEL의 발현이 유도되는 것으로 보고하였다.

또한 장독소(enterotoxins)와 물질대사에 관여하는 여러 가지 단백질들이 감소하는 것으로 확인되었다. 특히 본 연구에서 사용된 용혈성 MH-2 균주가 EGCG에 노출되었을 때, 용혈독소인 hemolysin BL lytic component L1과 hemolysin BL-binding protein의 발현이 감소되는 것은 흥미로운 일이다. Hemolysin BL은 binding component B, 그리고 두 가지의 lytic components L1과 lytic components L2가 결합하여 구성되며, *B. cereus*로 인한 설사형 식중독을 일으키는 주독소라는 것을 발표하였다(Ryan et al., 1997). 또한 hemolysin은 *B. cereus* 뿐만 아니라, *Escherichia coli* O157, 일부 *Streptococcus* 속,

Table 1. Proteins identified by MALDI-TOF/MS fingerprinting

Spot No.	Identified protein	Accession	Sequence coverage (%)	Fold change
Chaperone				
1	Chaperone protein, DnaK	AIY75640	64	↑
2	Chaperone protein, GroEL	KC895964.1	58	↑
Enterotoxins				
3	Hemolysin BL lytic component L1	WP_000714434	36	↓
4	Hemolysin BL-binding protein	WP_000976168	52	↓
Energy metabolism, pathway factors				
5	Aconitate hydratase	WP_000238553	56	↓
6	Phosphoglyceromutase	WP_001231145	43	↓
7	Phenylalanine racemase, partial	WP_046132418	26	↓
Proteases				
8	Alkaline serine protease	WP_000790931	42	↓
Transporter				
9	Peptide ABC transporter permease	WP_000413413	38	↓
Biosynthesis, biosynthesis of cofactor, protein synthesis				
10	Alginate biosynthesis protein, AlgB	CUB10867	48	↑
11	Peptidyl-tRNA hydrolase	WP_032870877	61	↓
12	Thioredoxin	WP_000044822	68	↓
13	Phosphotransferase	WP_007407453	46	↑
14	MecA protein	WP_033707457	62	↓
Cell envelope				
15	Penicillin binding protein	WP_001256637	51	↓
16	Cell division protein, FtsN	WP_000053726	50	↓
17	Wall-associated protein	WP_049107569	27	↑
Cell defence factor				
18	Peptidase M4 family proteins	WP_000758747	35	↑
Cell lysis factor				
19	ArpU family phage transcriptional regulator	WP_016122511	80	↑
Flagellum components				
20	Phage tail length tape measure protein	WP_000896627	39	↑

Listeria 속의 세균에서도 발견되는 주요 용혈독소로 보고된 바 있다. Friedman 등(2006)은 *B. cereus*와 *B. anthracis*에서 생성되는 독소가 EGCG의 phenolic OH 기(group)와 결합하여 독소를 불활성화 시킨다고 보고하였는데, 이는 EGCG가 *B. cereus*가 생성하는 독소의 발현을 억제하는데 관여한다는 것으로 연관지어 볼 때 매우 흥미로운 내용이다.

본 연구에서 용혈성을 나타내는 분리 균주 MH-2 세균이 EGCG에 노출되었을 때, hemolysin 관련 단백질 발현의 감소는 EGCG의 용혈독소 억제 및 무독화 소재로의 가능성과 나아가 식품산업에서 용혈성을 가진 세균 및 식중독 세균을 조절할 수 있는 기능성 소재로서의 이용가능성을 제시할 수 있다. 쌈장이나 고추장 등에 포함되어있는 용혈성 *B. cereus* 오염에 대한 문제는 국민건강에 문제가 될 수 있다. 이를 극복하기 위한 몇 가지 대안이 제기되고 있으며, 그 가운데 천연 식품첨가물은 종류에 따라 다양한 기능성을 가지고 있어서 건강에 이로운 측면을 제공할 수 있다. 그러나 이를 활용하는데 있어서 천연물 자체가 가지는 맛이나 향으로 인하여 본래의 물성이 변화할 수 있기 때문에 기호식품으로서 문제가 될 수도 있다. 따라서 이 문제를 해결하기 위한 고려도 있어야 할 것으로 사료된다.

녹차와 그 추출물은 다양한 측면에서 이용하려는 노력이 있어왔으나, 식품보존을 위한 천연 식품첨가물로서의 연구는 여전히 미비한 편이다. 따라서 본 연구에서는 식중독 원인 세균인 용혈성 *B. cereus*에 대한 EGCG 노출에 따른 다양한 특성 조사를 실시하였다. 향후 이들 결과를 기초로 하여 용혈성 *B. cereus*가 가지는 독성 단백질의 저해 기작을 규명하는 방향으로 추진되어야 할 것이다.

적 요

본 연구의 목적은 시중에 판매되고 있는 쌈장에서 용혈성을 가지는 *Bacillus cereus* MH-2를 분리하여, EGCG 노출에 따른 MH-2 균주의 세포 반응과 프로테옴 분석을 위해 수행되었다. 다양한 농도의 EGCG에 노출된 MH-2 균주는 노출시간이 증가함에 따라 생존률은 점차 감소함을 보였다. MH-2 균주의 alginate 생성량은 EGCG의 농도가 증가함에 따라 감소하였으며, 특정 EGCG 농도에서 노출시간이 진행됨에 따라 그 생성량은 증가하는 것으로 나타났다. SDS-PAGE 및 anti-DnaK와 anti-GroEL의 단일항체를 이용한 Western blot 통한 분석으로, 두 가지 스트레스 충격단백질인 70 kDa의 DnaK와 60 kDa의 GroEL의 발현은 대수생장기의 배양에서 EGCG의 농

도에 비례하여 감소하는 것을 확인하였다. EGCG에 노출된 세균의 세포 외부형태 변화를 주사전자현미경을 이용하여 관찰한 결과, 세포 표면의 돌출부 생성과 함께 세포의 뭉그러짐이 관찰되었다. EGCG에 노출된 *Bacillus cereus* MH-2 배양의 수용성 단백질 부분에 대한 2-DE에서 20개의 단백질 스팟이 EGCG 노출에 의해 크게 변화하는 것이 확인되었다. 장독소(hemolysin BL lytic component L1, hemolysin BL-binding protein), chaperon (DnaK, GroEL), 세포방어요소(peptidase M4 family proteins), 에너지 및 물질대사 등에 수반되는 이들 단백질은 MALDI-TOF를 사용한 peptide mass fingerprinting에 의해 동정되었다. 이들 결과는 *B. cereus* MH-2에 대한 EGCG-유도 스트레스와 세포독성의 기작을 이해하는데 중요한 단서를 제공할 것이다.

감사의 말

본 연구는 순천향대학교의 학술연구지원사업의 연구비 지원 하에 수행되었습니다.

References

- Amesen, L.P., Fagerlund, A., and Granum, P.E. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 579-606.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., and Edelstein, S.J. 1996. Protein methods. 2nd ed. New York, Wiley-Liss, USA.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Chang, W.S., van-de-Mortel, M., Nielsen, L., de-Guzman, G.N., Li, X., and Halverson, L.J. 2007. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *J. Bacteriol.* **189**, 8290-8299.
- Cho, Y.S., Oh, J.J., and Oh, K.H. 2010. Antimicrobial activity and biofilm formation inhibition of green tea polyphenols on human teeth. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **15**, 359-364.
- Cho, Y.S., Oh, J.J., and Oh, K.H. 2011. Synergistic anti-bacterial and proteomic effects of epigallocatechin gallate on clinical isolates of imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Phytomedicine* **18**, 941-946.
- Choi, K.B., Lim, H.S., Lee, K., Ha, G.Y., Jung, K.H., and Sohn, C.K. 2011. Epidemiological investigation for outbreak of food poisoning caused by *Bacillus cereus* among the workers at a local company in 2010. *J. Prev. Med. Public Health* **44**, 65-73.

- Cottrell, J.S. and London, U.** 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 355–3567.
- Friedman, M., Henika, P.R., Levin, C.E., Mandrell, R.E., and Kozukue, N.** 2006. Antimicrobial activities of tea catechins and theaflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. *J. Food Prot.* **69**, 354–361.
- Granum, P.E. and Lund, T.** 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**, 223–228.
- Guinebrière, M.H. and Broussolle, V.** 2002. The enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 3053–3056.
- Ho, E.M., Chang, H.W., Kim, S.I., Kahng, H.Y., and Oh, K.H.** 2004. Analysis of TNT (2,4,6-trinitrotoluene)-inducible cellular responses and stress shock proteome in *Stenotrophomonas* sp. OK-5. *Curr. Microbiol.* **49**, 346–352.
- Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., and Shimamura, T.** 1993. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1147**, 132–136.
- Kang, B.R., Im, G.E., and Kim, D.H.** 2013. Effect of anti-microbial materials on storages of Ssamjang. *J. Appl. Biol. Chem.* **56**, 11–17.
- Keith, L.M. and Bender, C.L.** 1999. AlgT (σ^{22}) controls alginate production and tolerance to environmental stress in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* **181**, 7176–7184.
- Kwak, C.S., Lee, M.S., and Park, S.C.** 2007. Higher antioxidant properties of cheonggukjang, a fermented soybean paste, may be due to increased aglycone and malonylglycoside isoflavone during fermentation. *Nutr. Res.* **27**, 719–727.
- Lee, K.I., Moon, R.J., Lee, S.J., and Park, K.Y.** 2001. The quality assessment of doenjang added with Japanese apricot, garlic and ginger, and samjang. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* **17**, 472–477.
- Lee, B.U., Park, S.C., Cho, Y.S., and Oh, K.H.** 2008. Exopolymer biosynthesis and proteomic changes of *Pseudomonas* sp. HK-6 under stress of TNT (2, 4, 6-trinitrotoluene). *Curr. Microbiol.* **57**, 477–483.
- Periago, P.M., van Schaik, W., Abee, T., and Wouters, J.A.** 2002. Identification of proteins involved in the heat stress response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3486–3495.
- Ryan, P.A., Macmillan, J.D., and Zilinskas, B.A.** 1997. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* **179**, 2551–2556.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** 2001. Molecular cloning, pp. 14–19. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Shigemune, N., Nakayama, M., Tsugukuni, T., Hitomi, J., Yoshizawa, C., Mekada, Y., Kurahachi, M., and Miyamoto, T.** 2012. The mechanisms and effect of epigallocatechin gallate (EGCG) on the germination and proliferation of bacterial spores. *Food Control* **27**, 269–274.
- Shimamura, T., Zhao, W.H., and Hu, Z.Q.** 2007. Mechanism of action and potential for use of tea catechin as an anti-infective agent. *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* **6**, 57–62.
- Song, Y.J., Cho, Y.S., and Oh, K.H.** 2010. Antibacterial effects and cellular responses of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* exposed to green tea polyphenols. *J. Microbiol.* **38**, 198–206.
- Yokoyama, K., Ito, M., Agata, N., Isobe, M., Shibayama, K., Horii, T., and Ohta, M.** 1999. Pathological effect of cereulide, an emetic toxin of *Bacillus cereus*, is reversible in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **24**, 115–120.
- Yu, M.O., Chun, J.W., and Oh, K.H.** 2004. Effect of tea catechin, EGCG (epigallocatechin gallate) on killing of oral bacteria. *Korean J. Microbiol.* **40**, 364–366.