

Characterization of Bacteriocin Produced from Isolated Strain of *Bacillus* sp.

Seung-Hee Ham, Nack-Shick Choi, Ja-Young Moon, Sun-Hwa Baek, Song-Min Lee and Dae-Ook Kang*

Department of Bio Health Science, Changwon National University, Changwon 51140, Korea

Received December 12, 2016 / Revised February 17, 2017 / Accepted February 22, 2017

As an effort to find a potential biopreservative, we isolated bacterial strains producing bacteriocin from fermented foods. A strain was finally selected and characteristics of the bacteriocin were investigated. The selected strain was identified as *Bacillus subtilis* E9-1 based on the 16S rRNA gene analysis. The culture supernatant of *B. subtilis* E9-1 showed antimicrobial activity against Gram-positive bacteria. Subtilisin A, α -chymotrypsin, trypsin and proteinase K inactivated the antimicrobial activity, which means its proteinaceous nature, a bacteriocin. The bacteriocin activity was fully retained at the pH range from 2.0 to 8.0 and stable at up to 100°C for 60 min. Solvents such as ethanol, isopropanol and methanol had no effect on the antimicrobial activity at the concentration of 100% but acetone and acetonitrile reduced the activity at up to 100% concentration. Cell growth of four indicator strains was dramatically decreased in dose-dependent manner. *Listeria monocytogenes* was the most sensitive, but *Enterococcus faecium* was the most resistant. *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* showed the medium sensitivity. The bacteriocin showed its antimicrobial activity against *B. cereus* and *L. monocytogenes* via bactericidal action. The number of viable cells of *L. monocytogenes* started to reduce after addition of bacteriocin to the minced beef. The bacteriocin was purified through acetone concentration, gel filtration chromatography and RP-HPLC. The whole purification step led to a 6.82 fold increase in the specific activity and 6% yield of bacteriocin activity. The molecular weight of the purified bacteriocin was determined to be 3.3 kDa by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry.

Key words : *Bacillus subtilis*, bacteriocin, molecular weight, physicochemical properties, purification

서 론

박테리옌신은 미생물의 리보솜에서 합성되는 천연의 무독성 방부제로 주목받고 있는 단백질성 또는 펩티드성 항균물질이며 인체에 섭취되면 소화효소인 단백질 가수분해효소에 의해 분해되어 인체에 무독하고 잔류성이 없다는 점에서 식품의 천연보존제로서 효용성이 증대되고 있다. 박테리옌신은 비교적 고온에서 안정하며 넓은 pH 범위에서 안정성을 갖고 무독, 무색, 무취하여 합성보존제를 대체할 수 있을 것으로 기대된다[11].

현재 널리 사용되고 있는 항생제는 2차 대사산물인 반면 박테리옌신은 자신의 유전자로부터 생합성되는 것이므로 유전자분석 및 조작을 통하여 분자수준에서 생산량을 최대화하기 쉬울 뿐만 아니라 박테리옌신의 구조유전자의 분자적 변이를 통하여 우수한 박테리옌신을 합성할 수 있다. 항생제는 사람에게 투여 시 항생제 내성균 출현과 항생제의 인체 내 축적

등과 같은 부작용이 있으나 박테리옌신은 인체에 섭취되면 단백질 가수분해효소에 의해 분해되어 인체에 무독하고 잔류성이 없기 때문에 보존제로 이용성이 증대되고 있다[4].

젖산균인 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*가 생산하는 박테리옌신인 nisin [15]이 보고된 이래 *Lactobacillus acidophilus*로부터 lactacin F [16], *Pediococcus acidilactici*로부터 pediocin SA-1 [2]과 pediocin SJ-1 [19] 그리고 *L. lactis* subsp. *cremoris*로부터 lactococcin A [12] 등의 박테리옌신이 생산됨이 보고되었다.

또한 *Bacillus* 속이 생산하는 항균물질들은 종에 따라 다양하며 *B. subtilis*가 생산하는 대표적인 항균물질은 subtilin [20], subtilisin A [7, 10], mersacidin [3], sublancin 168 [5], MJP1 [25], ericin S와 ericin A [21], Bac 14B [6], LFB112 [24] 등으로 *Bacillus* 속 중 상대적으로 많이 보고되었다. 이들 대부분은 peptide antibiotics라고 알려져 있으며 이러한 박테리옌신의 생물학적, 분자생물학적 특성에 관한 많은 연구들이 보고되었다.

지금까지 알려진 박테리옌신 중 식품보존제로 산업적으로 이용되고 있는 박테리옌신은 nisin으로서 이것은 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*에서 생산되며 자체 독성이 없으며 미국 FDA (Food and Drug Administration)로부터 GRAS (generally recognized as safe)로 인정되어 현재 가공치즈, 과일 및 야채 통조림, 발효유 제품, 육가공제품 등에 식품 보존제로 사용되고 있다[8]. 국내에서도 발효식품으로부터 식품부

*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3554, Fax : +82-55-213-3550

E-mail : dokang@changwon.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.

패균이나 식품 유래 병원성 미생물 등 다양한 미생물에 항균 활성을 나타내는 박테리옌을 생산하는 미생물을 탐색하고 박테리옌의 생산성과 물리화학적 특성을 증진시키기 위한 기초연구와 식품보존제서 이용과 같은 응용학적인 연구가 활발하게 진행되고 있다.

따라서 본 연구에서는 한국 전통 발효식품인 젓갈류 중 토하젓에서 분리한 *B. subtilis* E9-1가 생산하는 박테리옌의 물리적, 화학적, 생물학적 특성을 조사하고 정제하여 식품보존제로서 적용 가능성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

발효식품에서 미생물의 분리

일반 음식점 및 가정에서 수집한 물김치, 된장, 고추장 및 토하젓 등 식품시료를 멸균된 생리식염수로 $10^1 \sim 10^5$ 희석하여 *Lactobacilli* de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) 고체 배지에 도달한 후 37°C에서 배양하고 나타난 집락의 형태학적 특성에 근거하여 분리주를 선정하였다. 선정된 균주를 4 ml의 MRS 액체배지 37°C에서 15시간 배양하고 원심분리(10,000×g, 30 min, 4°C)한 상등액을 0.45 μm filter (Sartorius, Hannover, Germany)로 여과한 후 항균활성 확인에 사용하였다[9].

분리주의 항균활성 조사

분리주 배양상등액의 항균활성을 조사하기 위해서 agar well diffusion 사용하였다. 시험균인 *Micrococcus luteus* IAM 1056 배양액을 1% 농도로 접종하고 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 완충액을 함유한 enriched nutrient broth (ENB, 1.25% brain heart infusion (BHI), 0.55% nutrient broth, 0.25% yeast extract), soft agar (0.8% agar) 16 ml를 부어 test plate를 제조하였다[13]. 박테리옌의 항균활성을 arbitrary unit (AU)로 표기하였고 상등액을 2배씩 희석하여 저해환을 형성하는 최대 희석률의 역수를 취한 값을 AU로 정의하였고, 시료 1 ml에 대한 환산계수를 곱하여 AU/ml로 나타내었다.

분리주의 동정

최종 선정한 분리주의 염색체 DNA를 분리하고 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG)와 1429R (TACGGYTACC TTGTTACGACTT) primer로 PCR 증폭한 16S ribosomal RNA 유전자의 염기서열을 분석과 phylogenetic tree 작성을 통해 동정하였다[1].

가수분해효소에 대한 내성

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사의 α-amylase (519 U/mg), α-chymotrypsin (83.9 U/mg), carboxypeptidase A (73 U/mg), lipase (4,307 U/mg), subtilisin A (10 U/mg),

trypsin (13,500 U/mg), pepsin (3,280 U/mg) 및 proteinase K (30 U/mg) 등을 각각의 완충액에 20 mg/ml로 녹여 제조한 저장액을 농축한 시료에 2 mg/ml의 농도로 첨가하여 각 효소에 따른 최적 온도에서 5시간 반응시켜 활성의 변화를 관찰하였다.

항균스펙트럼

박테리옌의 여러 시험균에 대한 항균활성의 확인을 위해 agar well diffusion 법을 사용하였다. *B. cereus* KCCM 11204, *E. faecium* KCCM 12118, *Escherichia coli* KCCM 11835, *L. monocytogenes* KCCM 40307, *M. luteus* IAM 1056, *Salmonella enteritidis* KCCM 12021, *Shigella boydii* KCCM 41649, *S. aureus* subsp. *aureus* KCCM 40050, *Streptococcus mutans* KCTC 3065 등을 시험균주로 사용하여 test plate에서 저해환의 형성 유무를 조사하였다.

물리화학적 특성 조사

박테리옌의 열안정성을 조사하기 위해 박테리옌 용액 (300 AU)을 40, 60, 80 및 100°C에서 각각 30, 60, 90, 120분간 열 처리한 후 잔존하는 박테리옌의 항균활성을 측정하였다. 박테리옌 용액의 pH를 10 M NaOH와 10 M HCl 용액으로 2, 4, 6, 8, 10, 12로 맞춰 상온에서 3시간 반응시킨 후 잔존하는 박테리옌의 항균활성을 측정하였다. 또한 박테리옌 용액을 Speed Vac (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)으로 증발시킨 후 최종 농도가 20%, 40%, 60%, 80%, 100%인 isopropanol, methanol, ethanol, acetone, acetonitrile 등의 용매에 녹인 후 상온에서 3시간 반응시킨 후 잔존하는 박테리옌의 항균활성을 측정하였다.

농도별 박테리옌에 대한 시험균의 감수성 조사

박테리옌에 대한 시험균의 감수성을 비교하기 위해 농축된 배양 상등액을 액체배지에 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 mg/ml 농도로 첨가한 후 *M. luteus* IAM 1056, *S. aureus* subsp. *aureus* KCCM 40050, *E. faecium* KCCM 12118, *B. cereus* KCCM 11204, *L. monocytogenes* KCCM 40307 등의 시험균을 배양하였다. 각 배지에 시험균을 1% 접종하고 12시간 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

박테리옌의 작용기작

B. subtilis E9-1가 생산하는 박테리옌의 작용기작을 알아보기 위해 시험균 *B. cereus*와 *L. monocytogenes* 배양액을 ENB, BHI 액체배지에 1% 접종하여 2시간 배양 후 시료를 첨가하고 1시간 마다 배양액을 채취하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 채취한 배양액을 10배씩 연속 희석하여 각 시험균에 맞는 고체배지에 평판도말한 후 30°C 또는 37°C 배양기에 24시간 배양하여 자란 집락수를 측정하였다.

식품보존성 활성 확인

B. subtilis E9-1가 생산하는 박테리오신이 식품보존제로서 가능성을 확인하기 위해 농축액을 이용하여 식품보존성 실험을 실시하였다. 마트에서 다진 소고기를 구매하여 무균대에서 20분간 자외선을 쬐어주었다. 자외선을 쬐어준 소고기를 15 ml conical tube에 2 g 넣고 BHI 배지 5 ml를 첨가하여 섞은 다음 *L. monocytogenes* 배양액을 conical에 1% 접종하여 상온에서 24시간 배양 후 박테리오신 시료(100 mg/ml) 5 ml를 첨가하고 배양하였다. 24시간 간격으로 채취한 시료를 10배씩 연속 희석하여 BHI 고체배지에 평판 도말한 후 37°C 배양기에 24시간 배양하여 자란 집락 수를 측정하였다[14].

박테리오신 정제

아세톤을 이용한 박테리오신의 농축

B. subtilis E9-1의 배양 상등액과 acetone을 1:3 비율로 혼합한 후 냉동고에 1시간 보관하여 원심분리(10,000× g, 25분, 4°C)하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액을 회전감압농축기(EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 약 10배 농축하였다.

겔여과크로마토그래피(gel filtration chromatography)

Acetone 농축액을 0.45 µm filter로 여과한 후 FPLC (fast protein liquid chromatography)를 이용하여 겔여과크로마토그래피(GFC)를 실시하였다. Column은 superdex peptide 10/300 GL을 사용하였고, 멸균된 증류수로 column의 2배 부피로 평형화시킨 후 농축액 1 ml을 column에 주입하여 멸균된 증류수로 column의 1.5배 부피로 용출시켰다. 유속은 0.5 ml/min 이고, 분획은 1 ml씩 받았으며, 지시균인 *M. luteus*를 사용하여 박테리오신 활성을 AU/ml로 나타내었다.

역상 HPLC (reverse phase high-performance liquid chromatography)

GFC 활성분획을 4배 농축하여 0.2 µm syringe filter로 여과 후 0.1% TFA 수용액으로 평형화시킨 C₁₈ column에 주입하여 분리하였다. 완충 용액으로는 buffer A (3차 증류수/0.1% TFA), buffer B (80% acetonitrile/20% methanol)를 사용하였다. 시료 1 ml 주입 후 10 분간 100% buffer A로 세척하고, 10분부터 50분까지 buffer B로 0~100% 까지 선형 농도 구배를 걸어주었고, 다음 10 분간 100% buffer B로 용출시켰다. 각 분획 1 ml의 항균활성을 AU/ml로 나타내었다.

Tricine SDS-PAGE 분석

역상 HPLC로 정제한 박테리오신의 순도와 분자량을 추정하기 위하여 tricine SDS-PAGE를 수행하였다. 정제한 박테리오신 용액 50 µl를 Speed Vac을 이용하여 농축한 후 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 gel을 coomassie blue로 염색, destaining solution으로 탈색하였다. 탈색 후 gel을 증류

수로 20분마다 5번 교체하면서 세척하였다. 세척이 끝난 gel을 UV로 10분 동안 쬐어준 뒤 gel 위에 *M. luteus*가 접종된 ENB 고체배지를 부어준 후 30°C 배양기에서 12시간 배양하여 항균 활성인 투명환을 확인하였다[17, 18].

Mass spectrometry 분석

역상 HPLC로 정제한 박테리오신의 정확한 분자량을 측정하기 위하여 정제된 *B. subtilis* E9-1의 전기영동 gel 상에서 확인된 단일 밴드의 시료를 한국기초과학지원연구원에 MALDI TOF/TOF 분석을 의뢰하였다.

결과 및 고찰

박테리오신 생산 균주의 탐색 및 선발

MRS 고체배지에 생성된 집락의 형태학적 특성의 차이에 따라 12주 미생물을 분리하여 4 ml MRS 액체배지에 37°C에서 24시간 배양한 후 agar well diffusion method법으로 항균활성을 나타내는 6주를 1차 선발하였다. 1차 선발들 중 상대적으로 항균활성이 넓으며 proteinase K를 처리하였을 때 항균활성이 사라지는 단백질성 항균물질을 생산하는 분리주를 최종적으로 선발하였다. 최종 선발된 분리주를 주사전자현미경으로 관찰한 세포형태를 Fig. 1에 나타내었으며 막대모양의 간균임을 확인할 수 있었다.

분리주의 동정

선발된 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석결과 *B. subtilis* E9-1와 99% 상동성을 나타내었다(Fig. 2). 따라서 최종 선정된 분리주는 *B. subtilis*에 속하는 박테리아로 결론 내렸다.

항균물질의 가수분해효소에 대한 감수성

B. subtilis E9-1가 생산하는 항균물질이 단백질성, 즉 박테리오신인지 확인하기 위해 몇 가지 가수분해효소에 대한 내성을 조사하였다(Table 1). Carboxypeptidase A, lipase, α-amylase

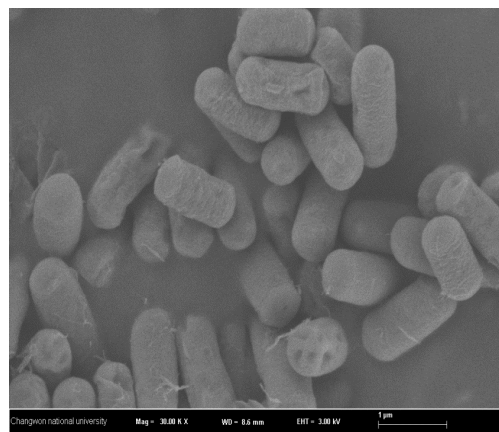


Fig. 1. Scanning electron microscopy of *B. subtilis* E9-1.

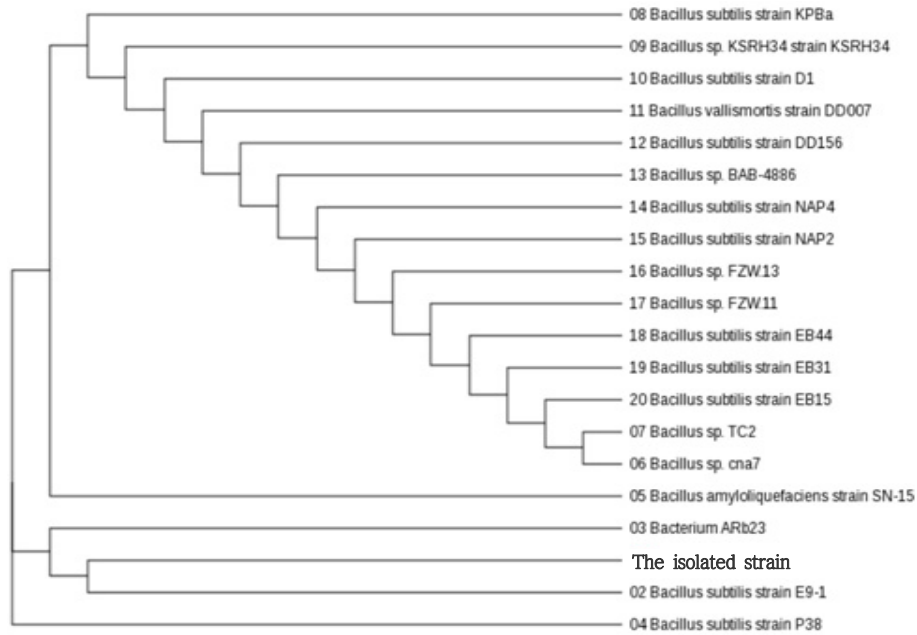


Fig. 2. Phylogenetic tree of *B. subtilis* E9-1 based on 16SrRNA gene sequence analysis. The tree was constructed by the maximum likelihood method.

및 pepsin 등의 처리는 항균활성에 전혀 영향이 없었으나, α-chymotrypsin, trypsin, proteinase K 처리 시에는 활성이 약간 감소하였으며, subtilisin A에 의해서는 항균활성이 완전히 사라져 항균활성물질이 단백질성 물질 즉 박테리오신임을 확인할 수 있었다. 여러 단백질 가수분해효소에 대해 감수성이 다르게 나타나는 것은 박테리오신의 아미노산조성에 따라 효소의 반응 정도가 영향을 받는 것으로 생각된다. α-Amylase 처리 시 항균활성의 변화가 없었으므로 탄수화물 부분이 박테리오신 분자 내에 없거나 활성과는 무관한 것으로 생각된다.

항균 스펙트럼

여러 시험균에 대한 항균 스펙트럼을 조사한 결과는 Table 2와 같다. *B. subtilis* E9-1가 생산하는 박테리오신은 *B. cereus* KCCM 11204, *M. luteus* IAM 1056, *L. monocytogenes* KCCM 40307, *E. faecium* KCCM 12118 및 *S. aureus subsp. aureus*

Table 1. Susceptibility of antimicrobial activity to hydrolytic enzymes

| Enzyme | Activity |
|--------------------|----------|
| α-Amylase | + |
| α-Chymotrypsin | - |
| Carboxypeptidase A | + |
| Lipase | + |
| Subtilisin A | - |
| Trypsin | - |
| Pepsin | + |
| Proteinase K | - |

KCCM 40050 등 그람 양성균에 대해서 항균활성이 나타났으나 식중독 균인 *S. enteritidis*나 대장균과 같은 그람 음성균에 대한 항균활성은 나타나지 않았다. 이 중 *M. luteus* IAM 1056에 대해 가장 높은 항균활성을 나타내었다. 일반적으로 *Bacillus* 속에서 생산되는 대부분의 박테리오신은 그람양성 세균에 대해 상대적으로 높은 항균활성을 나타내는 것으로 알려져 있다[7, 9, 21]. *B. subtilis* LFB112에서 생산되는 박테리오신은 그람 양성균 뿐만 아니라 대장균, 녹농균 및 *Salmonella*속 등 그람 음성균 심지어 진균류 등에 광범위한 항균활성을 나타내었다[24].

물리화학적 특성 조사

B. subtilis E9-1가 생산하는 박테리오신의 물리화학적 특성

Table 2. Antimicrobial spectrum of bacteriocin produced from *B. subtilis* E9-1

| Test organisms | Activity |
|--|----------|
| <i>Enetrococcus faecium</i> KCCM 12118 | ++ |
| <i>Escherichia coli</i> KCCM 11835 | - |
| <i>Bacillus cereus</i> KCCM 11204 | ++ |
| <i>Listeria monocytogenes</i> KCCM 40307 | + |
| <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> KCCM 40050 | ++ |
| <i>Salmonella enteritidis</i> KCCM 12021 | - |
| <i>Micrococcus luteus</i> IAM 1056 | +++ |
| <i>Shigella boydii</i> KCCM 41649 | - |
| <i>Streptococcus mutans</i> KCTC 3065 | - |

Inhibition zone : +, > 10 mm; ++, > 15 mm; +++, > 20 mm

중 온도에 대한 안정성을 확인한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 40, 60, 80, 100°C에서 60분간 가열했을 때 항균활성의 변화가 없었으나 40°C를 제외하고 90분 이상 가열 시 항균활성이 반으로 감소하였다. 40°C에서는 90분까지는 항균활성의 변화가 없었으나 120분간 처리 시 항균활성이 50% 유지하였다. 따라서 *B. subtilis* E9-1가 생산하는 박테리오신은 비교적 열에 안정함을 알 수 있었다. 한편 박테리오신 LFB [24]는 50, 60, 70°C에서 15분간 열처리해도 온전한 항균활성을 유지하였으나 80°C와 90°C에서 15분간 열처리 시 10-20% 감소하였고 100°C에서 30분간 처리하면 활성이 완전히 사라졌다. *B. licheniformis* 유래 박테리오신은 [9] 100°C에서 60분간 열처리 시 항균활성이 50%로 감소하였으며 *L. lactis*가 생산하는 박테리오신도 [13] 100°C에서 30분간 열처리할 경우 항균활성이 반으로 감소하였다.

Fig. 4에 나타난 바와 같이 박테리오신은 pH 2.0~8.0에서는 안정하였으나, pH 10.0과 12.0에서는 각각 50%와 25% 정도의 활성만이 잔존하였다. 일반적으로 박테리오신은 산성의 pH 범위에서 항균활성이 높게 나타나는 것으로 보고되었으나 본 논문에서 연구한 박테리오신은 pH 8.0까지 항균활성을 유지하였다. 현재 상업화되어 식품에 적용하고 있는 nisin은 산성 pH영역에서 안정하여 산성식품에 한정적으로 사용되고 있으며, pH 5.0 이상에서는 활성이 감소하는 것으로 알려져 있다. 분리주 *B. subtilis* E9-1에서 생산되는 박테리오신은 산성은 물론 약염기성 pH에서도 비교적 활성이 안정함을 확인하였으므로 약알칼리성 식품 이외에도 제조나 숙성 과정 중에 pH가 낮아지는 식품에도 유용할 것이라고 판단된다.

여러 용매가 박테리오신 활성에 미치는 영향을 조사한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Isopropanol, methanol 및 ethanol 등은 모든 농도범위에서 박테리오신은 온전한 항균활성을 유지

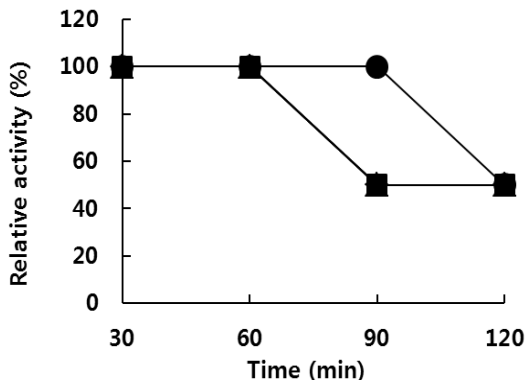


Fig. 3. The effect of temperature on antimicrobial activity of bacteriocin. Bacteriocin solution (300 AU) was incubated at indicated temperatures for 120 min and sampled at 30 min intervals. The residual antimicrobial activity was measured and expressed as relative activity (%). The symbols: ●, 40°C; ■, 60°C; ▲, 80°C; ◆, 100°C.

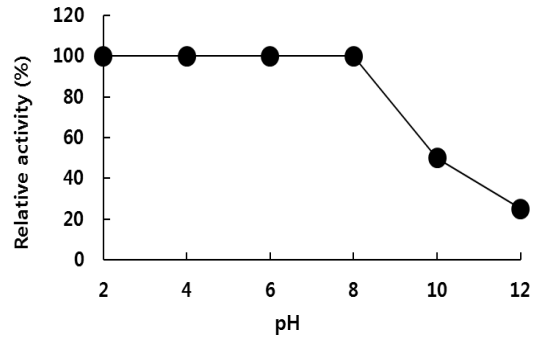


Fig. 4. The effect of pH on antimicrobial activity of bacteriocin. The pH of 300 AU of bacteriocin solution was adjusted with 10 N NaOH or HCl to indicated values and incubated at room temperature for 3 hr. The residual antimicrobial activity was determined and expressed as relative activity (%).

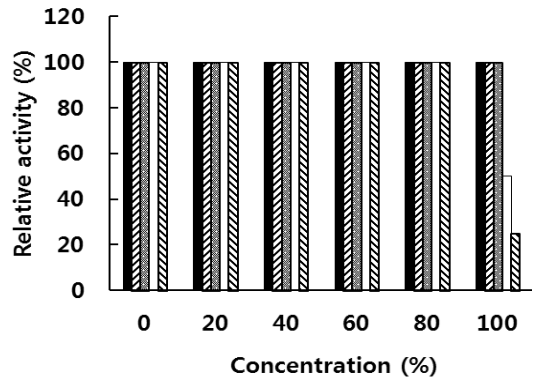


Fig. 5. The effect of organic solvents on antimicrobial activity of bacteriocin. About 300 AU of bacteriocin solution was evaporated and dissolved in 20, 40, 60, 80 and 100% of each solvent and then incubated at room temperature for 3 hr. The residual antimicrobial activity was determined and expressed as relative activity (%). The symbols: ■, isopropanol; ▨, ethanol; ▩, methanol; □, acetone; ▧, acetonitrile.

하였으나 acetone과 acetonitrile은 80%까지 항균활성의 변화가 없었으나 100%에서 acetone과 acetonitrile은 각각 50%와 25%로 항균활성이 감소하였다. 따라서 역상 HPLC를 이용한 박테리오신 정제를 위해 시험한 모든 용매가 적합하다고 생각되지만 극성유무를 따져서 acetonitrile과 methanol 혼합용매를 선택하였다.

농도별 박테리오신에 대한 시험균의 감수성 조사

B. subtilis E9-1에서 생산되는 박테리오신에 대한 시험균의 감수성을 조사한 결과는 Fig. 6과 같다. 농축액 시료농도 기준으로 50% 시험균의 생육을 저해하는 50% 최소저해농도 (MIC₅₀)는 *L. monocytogenes*와 *B. cereus*의 경우 각각 15 mg/ml와 35 mg/ml, *E. faecium*은 45 mg/ml, *S. aureus*는 25 mg/ml

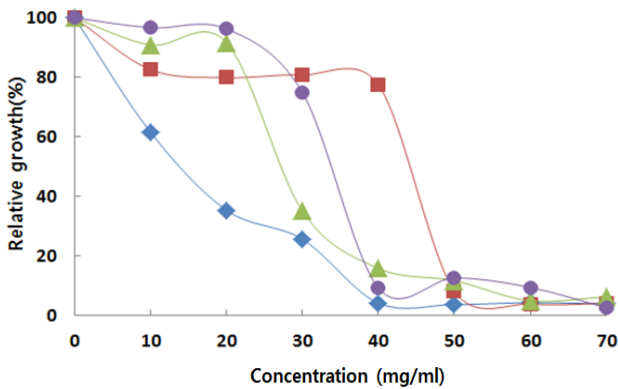


Fig. 6. Dose-dependent sensitivity of test organisms. The symbols: -◆-, *L. monocytogenes*; -■-, *E. faecium*; -▲-, *S. aureus*; -●-, *B. cereus*.

로 나타났다. 이상의 결과로부터 본 박테리오는 식품유래 병원성 세균의 일종인 *L. monocytogenes*에 대해 상대적으로 강한 항균활성을 나타냄으로써 저온저장 식품의 보존제로 활용될 가능성이 있을 것으로 기대된다.

박테리오신의 작용기작

박테리오신의 항균활성을 나타내는 작용기작을 조사한 결

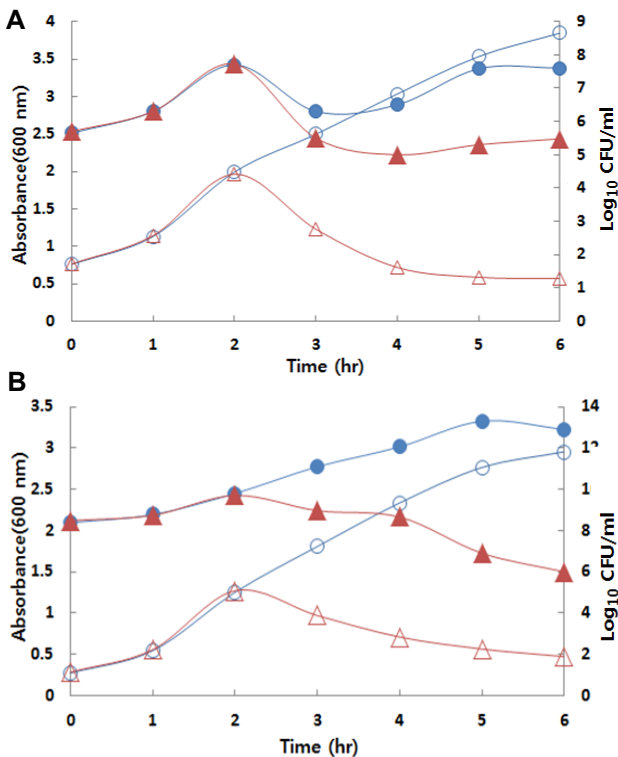


Fig. 7. Mode of action of the bacteriocin against *B. cereus* (A) and *L. monocytogenes* (B). The symbols: -○-, absorbance at 600 nm (control); -●-, Log₁₀ CFU/ml (control); -△-, absorbance at 600 nm (40 mg/ml); -▲-, Log₁₀ CFU/ml (40 mg/ml).

과를 Fig. 7에 나타내었다. 시험균인 *B. cereus*와 *L. monocytogenes*에 배양 상등액 농축액 시료를 첨가한 이후 흡광도와 CFU/ml 값이 감소하였으나 박테리오신 시료를 첨가하지 않은 대조구에서는 배양시간에 비례하여 세포생장이 일어난 결과 흡광도와 생균수(CFU/ml)가 증가하였다. 이러한 결과로 볼 때 *B. subtilis* E9-1가 생산하는 박테리오신은 *B. cereus*와 *L. monocytogenes*에 대해 살균제(bactericidal)로 작용함을 확인하였다.

식품보존 활성

다진 소고기와 시험균 *L. monocytogenes*를 사용하여 박테리오신의 식품보존제로서 가능성을 확인하였다. 박테리오신 시료를 첨가하고 2일까지 대조군과 비슷한 양상을 보였으나, 2일부터 시료를 첨가하지 않은 대조구에서는 CFU/ml 값이 증가하였으나 농축 시료를 첨가한 소고기에서의 CFU/ml 값은 감소하였다(Fig. 8). 이러한 결과는 육류의 저온 저장 중 식품병원성 세균인 *L. monocytogenes*의 생육을 저해하여 저장기간을 연장하는 효과가 있을 것으로 기대된다.

박테리오신의 정제

B. subtilis E9-1를 500 ml의 LB 액체배지에서 37°C, 30시간 배양한 후 원심분리하여 얻은 배양상등액의 박테리오신 활성은 640 AU/ml을 나타내었다. 배양상등액과 아세톤을 1:3의 부피비로 섞은 후 1시간 반응시킨 후 원심분리하여 상등액을 회수하고 농축한 용액의 박테리오신 활성은 2,560 AU/ml로 나타났다. 농축액을 겔여과크로마토그래피와 역상 HPLC를 순차적으로 실시하여 정제한 결과는 Table 3과 같다.

아세톤 농축액을 겔여과 column인 superdex peptide HR 10/300을 사용하여 겔여과크로마토그래피를 실시하였다. 먼저 멸균된 증류수를 column의 2배 부피로 평형화 시킨 후 아

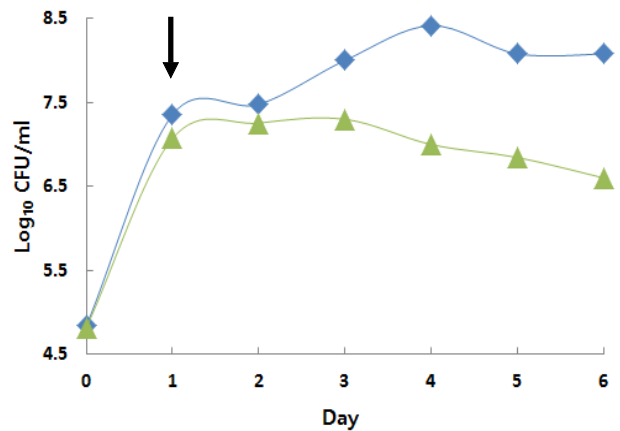


Fig. 8. Cell growth of *L. monocytogenes* in minced beef with or without bacteriocin. The symbols: -◆-, control; -▲-, bacteriocin. The arrow indicates the addition of bacteriocin sample.

Table 3. Purification of the bacteriocin

| Purification step | Total volume (ml) | Total protein (mg) | Activity (AU/ml) | Total Activity (AU) | Specific activity (AU/mg) | Purification fold | Yield (%) |
|-------------------------------|-------------------|--------------------|------------------|---------------------|---------------------------|-------------------|-----------|
| Culture supernatant | 500 | 52.5 | 640 | 320,000 | 6,095.2 | 1 | 100 |
| Acetone extraction | 50 | 5.545 | 2,560 | 128,000 | 23,083.9 | 3.79 | 40 |
| Gel filtration chromatography | 75 | 1.5375 | 640 | 48,000 | 31,219.5 | 5.12 | 15 |
| HPLC | 60 | 0.462 | 320 | 19,200 | 41,558.4 | 6.82 | 6 |

세톤 농축액 1 ml를 column에 주입하여 증류수로 column의 1.5배 부피로 용출시켰다. 용출된 분획들의 *M. luteus*에 대한 항균활성을 조사한 결과 7~12, 16~18번째 분획에서 항균활성이 나타났다. 활성분획들만 모아 이후 실험에 사용하였다. 겔여과크로마토그래피에서 얻은 항균활성 분획을 모아서 농축 후 역상 HPLC를 통해 박테리오신을 정제하였다. Acetonitrile/methanol (8:2) 혼합용매를 이동상으로 사용하여 유속을 1 ml/min으로 유지하면서 용출한 60개 분획 중 43과 44번 분획에서만 항균활성을 나타내었다.

여러 시행착오를 거쳐 최종적으로 확립한 배양상등액의 아세톤 농축, 겔여과크로마토그래피 및 역상 HPLC 등의 과정을 통한 박테리오신을 정제할 수 있었다. 그러나 아세톤 농축과정을 제외한 나머지 두 단계에서는 항균활성(AU/ml)이 급격히 감소하였으므로 정제과정 중 변성과 같은 요인에 의해 많은 활성이 소실되어 결과적으로 정제도가 6.8배 밖에 증가하지 않았다. 따라서 이온교환크로마토그래피와 같은 추가연구를 통해 더 효율적인 정제과정의 확립이 요구된다.

Tricine SDS-PAGE 분석

Tricine SDS-PAGE로써 역상 HPLC를 통해 정제된 박테리오신의 분자량을 추정하였다(Fig. 9). 전기영동한 겔을 염색한 결과 박테리오신으로 생각되는 뚜렷한 하나의 밴드가 관찰되었고, 분자량이 알려진 표준단백질과 비교함으로써 박테리오신은 약 3.4 kDa의 분자량을 가지는 것으로 추정할 수 있었다. 또한 전기영동한 겔을 탈염색 한 후 증류수로 20분마다 교체하면서 1시간 세척하였다. 세척한 gel을 petri dish에 옮기고 UV로 10분동안 쬐어준 뒤 gel 위에 *M. luteus*가 접종된 ENB soft agar를 중층하고 30°C 배양기에서 24시간 배양한 결과 박테리오신으로 추정되는 밴드와 일치하는 부분에만 항균활성을 나타내는 투명환이 관찰되어 염색된 밴드는 정제된 박테리오신임을 확인할 수 있었다.

Mass spectrometry 분석

역상 HPLC로 정제한 박테리오신을 tricine SDS-PAGE로 박테리오신의 예상 분자량을 추정한 후 정확한 분자량을 구하

기 위해 한국기초과학지원연구원에 의뢰하여 MALDI-TOF/TOF로 분석한 결과 Fig. 10에 나타난 바와 같이 정제한 박테리오신의 정확한 분자량은 3347.6 Da임을 확인하였다.

지금까지 보고된 대부분의 박테리오신은 3.0-5.0 kDa 범위의 작은 peptide성 물질인 것으로 알려진 바와 같이 본 연구에서 정제한 박테리오신도 비슷한 분자량을 보였다[2, 7-9, 13, 19, 21, 22]. 반면에 *L. paracasei* SD1에서 생산된 박테리오신은 24 kDa[23] 그리고 박테리오신 Bac 14B [6]은 21 kDa의 비교적 큰 분자량을 나타내었다. 한편 lactacin F [16]는 예외적으로 2.5 kDa의 작은 분자량을 나타내었다. 한국 전통 발효식품인 토하젓에서 분리한 *Bacillus subtilis*가 생산하는 박테리오신은 식중독과 관련된 병원성 미생물에 대한 항균효과를 나타내므로 앞으로 이와 관련된 아미노말단 아미노산 서열분석 및 유전자 클로닝과 분석 등의 추가연구 및 식품에 응용연구 등이

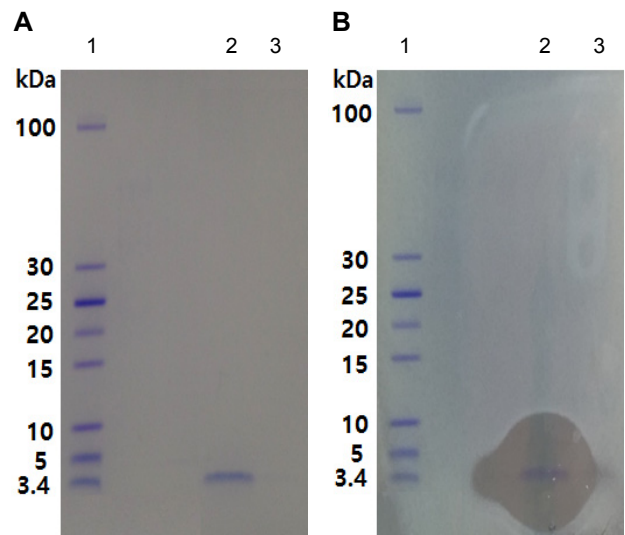


Fig. 9. Tricine SDS-PAGE and detection of antimicrobial activity of the purified bacteriocin. (A) Gel stained with Coomassie brilliant blue. (B) Gel overlaid with ENB soft agar containing 1% of *M. luteus* IAM 1056. Lane 1, marker; lane 2, purified bacteriocin #43 fraction; lane 3, purified bacteriocin #44 fraction.

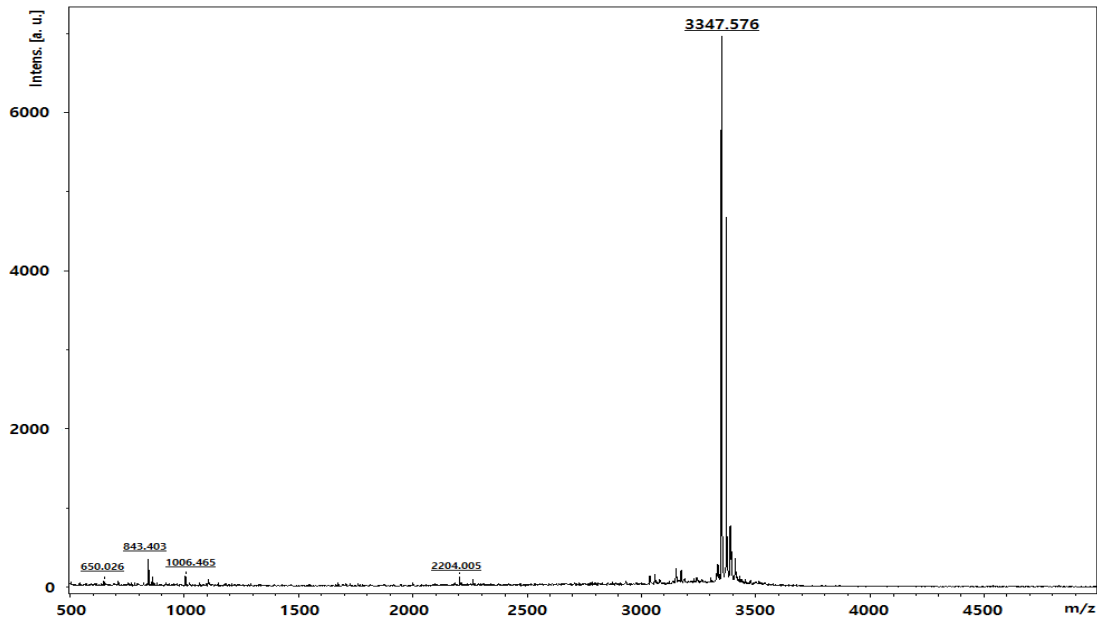


Fig. 10. Mass spectrometry of purified bacteriocin by MALDI-TOF/TOF.

기대된다.

감사의 글

이 논문은 2015~2016년도 창원대학교 자율연구과제 연구비의 지원으로 수행된 결과임.

References

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filioussis, G., Ambrosiadis, I. and Koidis, P. 2008. Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: production conditions, purification and characterization. *Bioresour. Technol.* **99**, 5384-5390.
- Bierbaum, G., Brötz, H., Koller, K. P. and Sagl, H. G. 1995. Cloning, sequencing and production of the lantibiotic mersacidin. *FEMS Microbiol. Lett.* **127**, 121-126.
- Doopedia. Bacteriocin. <http://www.doopedia.co.kr/>
- Dubois, J. Y. F., Kouwen, T.R.H.M., Schurich, A. K. C., Reis, C. R., Ensing, H. T., Trip, E. N., Zweers, J. C. and van Dijk, J. M. 2009. Immunity to the bacteriocin sublancin 168 is determined by the sun I (YolF) protein of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 651-661.
- Hammami, I., Rhouma, A., Jaouadi, B., Rebai, A. and Nesme, X. 2009. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. *Lett. Appl. Microbiol.* **48**, 253-260.
- Huang, T., Geng, H., Miyapuram, V.R., Sit, C. S., Vederas, J. C. and Nakano, M. M. 2009. Isolation of variant of subtilisin A with hemolytic activity. *J. Bacteriol.* **191**, 5690-5696.
- Jeong, S. Y., Park, C. S., Choi, N. S., Yang, H. J., Kim, C. Y., Yoon, B. D., Kang, D. O., Ryu, Y. W. and Kim, M. S. 2011. Characteristics of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ET45 isolated from Kimchi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 74-80.
- Jung, S. Y., Choi, J. I., Joo, W. H., Suh, H. H., Na, A. S., Cho, Y. K., Moon, J. Y., Ha, K. C., Paik, D. H. and Kang, D. O. 2009. Characterization and purification of the bacteriocin produced by *Bacillus licheniformis* isolated from soybean sauce. *J. Life Sci.* **19**, 994-1002.
- Kawulka, K. E., Sprules, T., Diaper, C. M., Whittall, R. M., McKay, R. T., Mercier, P., Zuber, P. and Vederas, J. C. 2004. Structure of subtilisin A, a cyclic antimicrobial peptides from *Bacillus subtilis* with unusual sulfur to alpha-carbon cross-links: formation and reduction of alpha-thio-alpha-amino acid derivatives. *Biochemistry* **43**, 3385-3395.
- Kim, H. J., Lee, N. K., Cho, S. M., Kim, K. T. and Paik, H. D. 1999. Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria by Lacticin NK24, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* NK24 from fermented fish food. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**, 1035-1043.
- Kojic, M., Strahinic, I. and Topisirovic, L. 2005. Proteinase PI and lactococcin A genes are located on the largest plasmid in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* S50. *Can. J. Microbiol.* **51**, 305-314.
- Lee, J. Y., Choi, N. S., Chun, S. S., Moon, J. Y. and Kang, D. O. 2015. Purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. KD 28 isolated from Kimchi. *J. Life Sci.* **25**, 180-188.
- Liu, G., Wang, Y., Gui, M., Zheng, H., Dai, R. and Li, P. 2012. Combined effect of high hydrostatic pressure and en-

- terocin LM-2 on the refrigerated shelf life of ready-to-eat sliced vacuum-packed cooked ham. *Food Control* **24**, 64-71.
15. Mattick, A. T. and Hirsch, A. 1947. Further observations on an inhibitory substance (Nisin) from Lactic Streptococci. *Lancet*. **2**, 5-8.
 16. Muriana, P. M. and Klaenhammer, T. R. 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 114-121.
 17. Schagger, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **1**, 16-22.
 18. Schagger, H. and Von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
 19. Schved, F., Lalazar, A., Henis, Y. and Juven, B. J. 1993. Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 67-77.
 20. Stalin, V., Perumal, K., Abraham, L., Stanley and Kalaichel van, P. T. 2010. Screening and production of subtilin from *Bacillus subtilis* isolated from nutrient-rich organic and bio-dynamic manures. *J. Life Sci.* **4**, 34.
 21. Stein, T., Borchert, S., Conrad, B., Feesche, J., Hofemeister, B., Hofemeister, J. and Entian, K. D. 2002. Two different lantibiotic-like peptides originate from the ericin gene cluster of *Bacillus subtilis* A1/3. *J. Bacteriol.* **184**, 1703-1711.
 22. Todorov, S. D., Rachman, C., Fourier, A., Dicks, L. M., van Reenen, C. A., Prévost, H. and Dousset, X. 2011. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. *Anaerobe* **17**, 23-31.
 23. Wannun, P., Piwat, S. and Teanpaisan, R. 2014. Purification and characterization of bacteriocin produced by oral *Lactobacillus paracasei* SD1. *Anaerobe* **27**, 17-21.
 24. Xie, J., Zhang, R., Shang, C. and Guo, Y. 2009. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. *Afr. J. Biotechnol.* **8**, 5611-5619.
 25. Yang, E. J. and Chang, H. C. 2007. Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Bacillus subtilis* MJP1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 339-346.

초록 : *Bacillus* 속 분리주가 생산하는 박테리오신의 특성 조사

함승희 · 최낙식 · 문자영 · 백선화 · 이송민 · 강대욱*
(창원대학교 생명보건학부)

토하젓에서 분리한 박테리오신 생산 균주 중 상대적으로 넓은 항균스펙트럼을 나타내는 1균주를 선발하였고 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 *B. subtilis* E9-1와 거의 일치하는 것으로 동정되었다. *B. subtilis* E9-1가 생산하는 박테리오신의 물리화학적 특성을 조사하였고, 박테리오신을 정제하였다. 이 박테리오신은 *B. cereus* KCCM 11204, *M. luteus* IAM 1056, *L. monocytogenes* KCCM 40307, *E. faecium* KCCM 12118 및 *S. aureus* subsp. *aureus* KCCM 40050 등에 대해서 항균활성을 나타내었다. pH 2.0~8.0 범위에서는 안정하였으나 8.0 이상에서는 항균활성이 감소하였다. Isopropanol, ethanol 및 methanol 등의 유기용매에서 100%까지, acetone과 acetonitrile에서는 80%까지 항균활성을 유지하였다. 내열성의 경우 40~100°C에서 60분까지는 안정하게 항균활성을 보였다. 박테리오신 농도를 증가시키면서 *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. faecium* 및 *S. aureus* subsp. *aureus* 등 시험균 4주의 감수성을 조사한 결과 농도 의존적으로 시험균의 생육이 감소하였고 이 중 *L. monocytogenes* 의 감수성이 가장 높게 나타났다. 박테리오신의 작용양상을 알아본 결과 *B. cereus*와 *L. monocytogenes* 배양액에 박테리오신 용액을 첨가한 후 흡광도와 CFU값이 감소하여 bactericidal임을 확인하였다. 식품에 적용 가능성을 알아보기 위해 실험한 결과 3일째부터 박테리오신을 처리하지 않은 대조구에 비해 실험구에서 생균수(CFU/ml)가 감소하였다. 아세톤을 이용한 배양상등액의 농축, superdex peptide HR 10/300 column 이용한 겔여과크로마토그래피, 역상 HPLC로써 박테리오신을 정제하였다. 역상 HPLC를 통해서 정제한 박테리오신의 분자량을 tricine SDS-PAGE로 분석한 결과 약 4 kDa이었고 질량분석법으로 측정한 정확한 분자량은 3347.6 Da로 나타났다.