

메주로부터 분리한 *Bacillus polyfermenticus* CJ6의 항진균 활성

정지혜 · 장해춘[†]

조선대학교 식품영양학과

Antifungal Activity of *Bacillus polyfermenticus* CJ6 Isolated from Meju

Ji Hye Jung and Hae Choon Chang[†]

Dept. of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Abstract

The CJ6 bacterial strain, which possesses strong antifungal activity, was isolated from meju and identified as *Bacillus polyfermenticus* based on Gram staining, biochemical properties, and 16S rRNA gene sequencing. *B. polyfermenticus* CJ6 showed antimicrobial activity against the various pathogenic molds, yeasts, and bacteria. Antifungal activity from *B. polyfermenticus* CJ6 was reduced after 24 hr at 70°C but antifungal activity was not completely destroyed. The antifungal activity was stable in the pH range of 3.0~9.0, and inactivated by proteinase K, protease, and α -chymotrypsin, which indicate its proteinaceous nature. The apparent molecular masses of the partially purified antifungal compound, as indicated by using the direct detection method in Tricine-SDS-PAGE, was approximately 1.4 kDa.

Key words: *Bacillus polyfermenticus*, antifungal activity, proteinaceous nature

서 론

지금까지 개발된 미생물이 생산하는 항균 활성 물질들 중 대부분의 박테리오킨 및 bacteriocin-like substances(BLS)는 일부 세균에만 국한되어 항균작용을 나타내는 한계를 지니고 있다(1). 진균류에 의한 인간의 질병, 작물의 병해 유발, 식품의 부패 등으로 인한 문제 해결을 위하여 보다 효과적인 항진균 활성 물질의 개발이 요구되고 있다. 현재 사용되고 있는 진균류 제어용 화학요법은 세균감염증에 대한 화학요법에 비하여 그 발전이 매우 저조한 실정이고, 화학적으로 합성된 항생제는 효과가 일시적이며 난분해성이어서 인축 독성을 유발하는 것으로 알려져 있다(2). Peptide성 항균물질은 인체에 섭취되어 소화기관의 단백가수분해효소에 의해 분해됨으로 무독성이고 잔류성이 없어 항생제의 대체원으로서 이용될 수 있는 잠재력을 가지고 있다(2). 따라서 여러 가지 진균류에 대한 강력한 항진균 활성을 가진 항균성 peptide를 생산하는 새로운 미생물의 탐색 및 개발이 꼭 필요한 실정이다(2).

Bacillus 속은 산업적으로 중요한 종으로서, 오랜 세월 동안 식품 및 각종 발효산업에서 사용되고 있으며 protease, amylase, glucanases 및 cellulase 등의 중요한 효소 및 다양한 구조를 지니는 항균 활성 물질들을 생산하는 특징을 지니고 있다(1,3). *Bacillus* 속이 생산하는 항균 물질들은 중예

따라 다양하며(1,3), 이 중 alboleutin(4), bacillomycin(5,6), bacilysin(7), fengycin(8), iturin(9,10), mycosubtilin(11,12), rhizocitins(13)은 항진균 활성이 있다고 보고되고 있다.

특히 우리나라의 콩 발효식품에서 중요한 발효 미생물로 작용하는 *B. subtilis*나 *B. licheniformis*는 GRAS(generally regarded as safe) 미생물이며(14), 이들이 생산하는 항균물질은 항균 활성 범위가 매우 넓고 다양한 특징을 지니는 특성 때문에 새로운 항진균 활성 물질 생산균주로서 관심이 모아지고 있다(1,3).

그동안 프로바이오틱 생균제는 주로 유산균을 사용하여 제조되어 왔으나, 최근 *Bacillus polyfermenticus*를 이용한 *Bacillus* 속 프로바이오틱 생균제에 대한 산업적인 유용성이 증대되고 있다(15-17). 그 중에서도 *B. polyfermenticus* SCD(비스판균)는 프로바이오틱 생균제로 시판되고 있다(18). *B. polyfermenticus*는 1933년 일본의 Terakado가 공기로부터 분리한 그람 양성 비병원성균으로, 아포를 형성하고 plate 배양 시 콜로니의 색상으로 옅은 황색을 보이며 균주의 형태는 약 0.8×4~4 μm의 크기의 간균이다(19). 또한 비스판균은 20여종의 효소를 분비하여 영양을 보급시키며 인체의 3대 영양소인 탄수화물, 지방, 단백질 및 섬유소를 소화, 흡수시키고 병원성 균들인 티프스균, 파라티프스균, 적리균, 콜레라균 등을 용균시켜 증식을 억제하는 기능을 가지고 있다. 비스판균은 일본약국방외의약품성분규격에

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

당화균(amylolytic *Bacillus*)이라 하여 *B. subtilis* 및 *B. mesentericus*와 함께 게재되어 있으나, 국제명명규약(예를 들어 Bergey's manual)에 의한 분류명에는 존재하지 않는다(20). 그러나 미생물 분류상의 특징들을 비교해볼 때 *B. polyfermenticus*는 *B. subtilis*와 상당히 유사한 것으로 인정되고 있으나, *B. subtilis*와 다른 점은 유당을 분해하는 능력이 있고 포도당과 유당에서 초산과 젖산을 더욱 많이 생산하는 것 등이다(21). 현재 *B. polyfermenticus* 유래의 항균물질은 *B. polyfermenticus* SCD에 의해 생산되는 polyfermenticin SCD라고 명명된 박테리옌에 관한 연구가 이루어져 있으며, 이는 Gram 양성균과 Gram 음성균 그리고 곰팡이 중에서는 *Aspergillus oryzae*와 *Aspergillus niger*에서만 생육 저해활성을 가지는 항균력을 가지고 있다(21). 그러므로 식품의 부패나 식중독에 관여하는 곰팡이 및 세균, 효모 등의 미생물에 대해 적용될 수 있는 넓은 범위의 항균력을 가지고 있는 GRAS 등급의 항균제나 생균제제의 개발은 그 유용성을 더욱 크게 할 것이다.

본 연구에서는 우리나라 재래식 메주로부터 항진균 및 항세균 활성을 나타내는 균주를 분리하였다. 이 중 가장 항진균 활성이 강하고 항진균 활성 범위가 넓은 *Bacillus polyfermenticus*를 분리하였고 분리균주의 항진균 활성 물질의 특성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

항진균 활성 균주의 분리

가정에서 제조된 재래형 메주를 수집하여, 이 중 1 g을 취하여 마쇄하였다. 마쇄된 메주가루를 10 mL의 멸균수에 현탁한 후, 현탁액을 100 μ L 또는 200 μ L를 취하여 Luria broth(LB, 1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) 평판배지, potato dextrose agar(PDA, Difco Laboratories, MI, USA), malt extract agar(MEA, Difco Laboratories) 배지에 도말하였다. LB 평판배지는 37°C, PDA 평판배지는 25°C, MEA 평판배지는 30°C에서 2~5일 동안 평판배양하면서 곰팡이 및 세균들에 대해 저해활성을 나타내는 균주를 분리하였다.

분리균주의 동정

항진균 활성 분리균주의 동정을 위하여 일차적으로 형태학적, 생화학적 특성을 조사하였다. 그람 염색 및 포자형성 관찰과 API 50 CHB system(BioMérieux Co., France)을 이용하여 당 발효능을 조사한 후에 균주동정 프로그램(<http://apiweb.biomerieux.com>)을 이용하여 균주를 동정하였다. 최종적인 동정은 분리균주의 16S rRNA gene 염기서열 결정을 통하여 시행하였다. 분리균주의 16S rRNA gene sequencing은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 분리균주의 chromosomal DNA를 Genomic DNA purification kit(Q-Biogene, USA)을 이용하여 분리한 후, 1차 PCR은

Universal primer(22)를 사용하여 시행하였다. 2차 PCR은 *B. subtilis*와 *B. polyfermenticus*의 16s rRNA gene의 서열 중 상동성이 높은 부위를 primer 서열로 합성하여(Ba4-F: 5'-AGCTGCTCCCTGATGTTAG-3'; 4-subRR: 5'-TCGAAGAATCGAATGATCCT-3') 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 pGEM-T easy vector(Promega Co., USA)에 cloning 한 후 ABI PRISM 3730 DNA analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 그 결과를 BLASTN 프로그램(23)을 이용하여 GenBank의 ribosomal RNA gene sequence와 비교하였으며 sequence의 상동성은 CLUSTAL X program을 이용하여 분석하였다.

조항균 물질의 준비

본 실험에 사용된 항균 물질은 다음의 방법에 의하여 준비하였다. 항균 물질 생성 균주를 tryptic soy broth(TSB, Difco Laboratories, USA) 5 mL에 접종하여 37°C에서 12시간 전배양한 후 전배양액을 50 mL TSB 액체 배지에 1% 접종하여 37°C에서 30시간 동안 본배양하였다. 본배양액을 원심분리(9,500 \times g, 15 min, 4°C)하여 얻은 상정액을 0.2 μ m membrane filter(Advantec MFS, Inc., Japan)로 제균한 후 배양상정액을 조항균 물질로 사용하거나 또는 동결건조(Labconco Co., USA) 후 3차 증류수로 녹여 5배, 10배, 20배 농축하여 사용하였다. 이때 대조구로는 TSB 액체 배지를 동결건조 후 실험구와 같은 배율로 농축한 것을 사용하였다.

분리균주의 항균 활성 측정

분리균주의 항균 활성은 direct method(3) 및 paper disk method(24)를 사용하여 Gram 양성균과 음성세균, 효모 및 곰팡이에 대하여 조사하였다. 항균 spectrum 실험에 사용한 미생물 중 ATCC 균주는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였으며 *Bacillus subtilis* DJ I (25), *Bacillus subtilis* cx I (26), *Aspergillus petrakii* PF-1, *Aspergillus ochraceus* PF-2, *Aspergillus nidulans* PF-3, *Cladosporium gossypicola* KF-2는 본 실험실에서 된장(DJ I), 토양(cx I), 메주(PF-1,2,3) 그리고 김치(KF-2)로부터 분리하여 동정한 균주를 사용하였다. 항균 활성 측정을 위한 감수성 세균은 LB 또는 brain heart infusion(BHI, Difco Laboratories, USA) 평판배지, 감수성 곰팡이는 MEA 또는 PDA 평판배지, 감수성 효모는 yeast mold broth(YMB, Difco Laboratories) 또는 sabouraud dextrose broth(SDB, Difco Laboratories) 평판배지에 1×10^6 cfu/mL로 도말하였다.

Direct method(3)에서는 5 mL TSB 액체배지에서 12시간 전 배양된 분리균주 6 μ L를 감수성 균주가 도말된 평판배지 위에 micropipette을 사용하여 3 cm 길이로 직접 그어 주었다. Paper disk method(24)는 감수성 균주가 도말된 평판배지 위에 8 mm 직경의 paper disk(Advantec, Toyo Roshi

Kaisha, Ltd., Japan)를 놓고 항균 물질을 100 µL씩 일정하게 가하였다. 항세균 실험에서는 37°C에서 12시간 동안 배양하고, 항진균 실험은(효모와 곰팡이) 25°C 또는 30°C에서 24~72시간 동안 배양하여 분리균주의 항균활성을 측정하였다. 항균활성은 diamatic caliper(CD-15CPX, Mitutoyo, Japan)를 사용하여 생육저지환의 지름으로 측정하였다.

생육시기에 따른 항진균 활성 측정

분리균주는 37°C에서 0~120시간 동안 진탕배양하면서 600 nm(Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)에서 흡광도를 측정하여 생육곡선을 그리고, 이 때 생육시기에 따른 항진균 활성을 측정하였다. 항진균 활성 측정은 spot-on-the lawn test(27)를 사용하여 다음과 같이 시행하였다. 감수성 곰팡이인 *Aspergillus petrakii* PF-1의 포자를 PDA 배지 20 mL에 1×10^6 cfu/mL로 첨가하여 petri dish에 부은 후에 균으면 항진균 물질 10 µL를 배지 위에 spotting하여 30°C에서 48시간 배양한 후 활성을 측정하였다. 활성 역가는 항진균 물질을 순차적으로 2배씩 희석하여 저해환을 형성하는 최대 희석배수의 역을 취하고, 이 값에 1 mL에 대해서 환산해주는 환산계수를 곱하여 AU/mL로 나타내었으며 3회의 반복실험을 한 후 평균값을 사용하였다.

항진균 물질의 안정성

항진균 물질의 온도, pH 및 각종 효소처리에 대한 안정성을 조사하였다. 온도에 의한 영향을 알아보기 위하여 배양상징액을 25°C, 30°C, 37°C, 50°C, 70°C에서 24시간, 100°C에서 30분, 121°C에서 15분간 열처리한 후에 잔존활성을 측정하였다(21,28). pH에 대한 영향을 알아보기 위하여 배양상징액을 5 N NaOH와 5 N HCl를 사용하여 pH 3.0~pH 9.0으로 조정하여 4°C에서 4시간 동안 처리한 후, 항진균 활성을 측정하였다(21,28). 각종 효소에 대한 영향을 알아보기 위하여 분리균주의 배양상징액에 proteinase K(EC 3.4.21.64, Sigma Co., USA)는 10 mM Tris-HCl 50 mM NaCl 5 mM EDTA (pH 7.5), protease(type I, Sigma) 및 trypsin(EC 3.4.21.4, Sigma)은 50 mM Tris-HCl(pH 7.5), pepsin(EC 3.4.23.1, Sigma)은 10 mM citrate(pH 6.0), α-chymotrypsin(EC 3.4.21.1, type I-S, Sigma)은 10 mM phosphate(pH 7.0), lipase(EC 3.1.1.3, type VII, Sigma)는 50 mM Tris-HCl 10 mM CaCl₂(pH 7.0), α-amylase(EC 3.2.1.1, Type VIII, Sigma)는 50 mM sodium phosphate 10 mM NaCl(pH 7.0)에 4 mg/mL의 농도로 처리한 후에 잔존하는 항진균 활성을 측정하였다(21,28).

항진균 물질의 부분 정제

항진균 활성 분리균주를 50 mL TSB 액체 배지에서 37°C, 30시간 진탕배양 한 후, 원심분리(9,500×g, 15 min, 4°C)하여 회수한 상징액을 0.2 µm membrane filter로 제균하였다. 제균된 상징액을 100% methanol과 3차 증류수로 미리 soaking된 소수성 column인 C₁₈ Sep-Pak(Waters Co.,

Massachusetts, USA)에 흡착시킨 후, 3차 증류수로 수세하고 100% methanol로 용출하였다. Methanol에 녹아있는 분획은 Speed Vac Concentrator(Centra-Vac VS-802, Vision, Korea)를 이용하여 용매를 제거한 후 멸균수에 녹여 항진균 활성 측정 및 Tricine-SDS-PAGE(29)에 사용하였다.

Tricine-SDS-PAGE

C₁₈ Sep-Pak column으로 부분 정제한 시료로부터 항진균 활성을 나타내는 물질의 분자량을 Tricine-SDS-PAGE를 통하여 결정하였다. 18% acrylamide gel을 사용하였고, 표준 분자량 물질로는 polypeptide SDS-PAGE standards (Bio-Rad, USA)를 사용하였다. 전기영동 후 coomassie brilliant blue G(Sigma Co., USA)로 단백질을 염색하였다. Gel 상에서 항균활성을 나타내는 물질의 band 확인은 direct detection 방법(30)에 준하여 시행하였다. 전기영동 한 gel을 25%(v/v) isopropanol과 10%(v/v) glacial acetic acid 용액에 담근 후 상온에서 30분간 고정시키고 나서 증류수로 1시간 30분 동안 세척하였다. 세척한 gel은 염색된 gel상에서의 band와 비교하여, 주요 band 부위를 잘라 PDA 평판배지 위에 놓고 그 위에 PDA top agar(0.7%, w/v) 10 mL를 분주하여 균힌 후에 배지 표면에 *Cladosporium gossypii* KF-2를 전면에 도말한 다음, 25°C에서 72시간 배양한 후, 항진균 생육 저해환이 생성되는 band를 확인하였다. 대조구로는 acrylamide gel을 direct detection에 사용된 band gel과 같은 크기로 잘라 동일한 세척 및 활성 측정법을 시행하여 acrylamide 성분에 의한 생육 저해 작용이 없음을 확인하였다.

결과 및 고찰

항진균 활성 균주의 분리 및 동정

매주가루를 멸균수에 희석한 시료를 LB, PDA, MEA 평판배지에 도말하여 2~5일간 배양한 후, 형성된 미생물의 집락을 관찰하였다. 배양된 평판배지에서 다양한 종류의 세균(352종)과 곰팡이(10종)들이 관찰되었으며, 이 중 형성된 곰팡이 집락들에 대해 생육 저해활성을 나타내는 균주 18종을 1차 선별하였다. 1차 선별된 18종의 미생물은 균체를 직접 감수성균주에 가하는 direct method(3)를 사용하여 Table 1의 곰팡이 7종에 대한 항진균 활성을 조사하였다. 이 중 가장 항진균 활성이 강하고 그 활성 범위가 넓은 균주 1종을 선별하였고, 이를 CJ6라 명명하였다(data not shown). 최종 선별된 분리균주 CJ6의 곰팡이 7종에 대한 항진균 활성은 Fig. 1에 나타내었다.

항진균 활성을 나타내는 분리균주는 포자를 형성하는 Gram 양성균의 간균이며, API 50 CHB system을 이용한 균주 동정 결과에서 *Bacillus subtilis*로 86.1%의 상동성을 나타내었다. 보다 정확한 동정을 위하여 항진균 활성 분리균주의 16S rRNA gene의 염기서열을 결정하여(1,520 bp) 이를 GenBank에 등록된 표준균주(type strain)나 참고균주(ref-

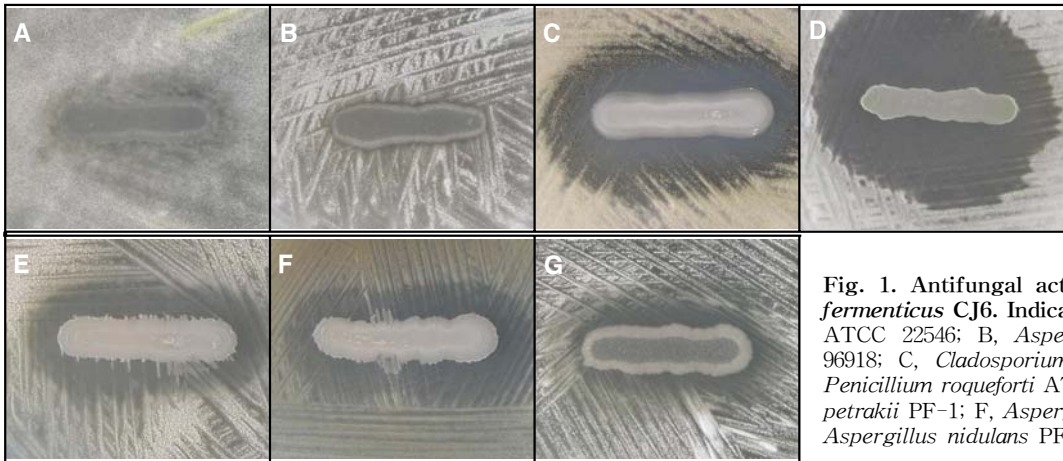


Fig. 1. Antifungal activities of the *B. polyfermenticus* CJ6. Indicator: A, *Aspergillus flavus* ATCC 22546; B, *Aspergillus fumigatus* ATCC 96918; C, *Cladosporium gossypicola* KF-2; D, *Penicillium roqueforti* ATCC 10110; E, *Aspergillus petrakii* PF-1; F, *Aspergillus ochraceus* PF-2; G, *Aspergillus nidulans* PF-3.

Table 1. Inhibitory spectrum of *B. polyfermenticus* CJ6

Microorganisms	Indicator	Antimicrobial activity			
		Supernatant	5×	10×	20×
Gram-positive bacteria	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	++	++	+++
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 13513	-	+	+	++
	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	-	+	+	++
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113	++	+++	+++	+++
	<i>Bacillus subtilis</i> DJ I	-	-	-	+
	<i>Bacillus subtilis</i> cx I	-	+	+	++
Gram-negative bacteria	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	+	++	+++
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43895	-	-	+	++
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	+	+
	<i>Salmonella</i> Typhi ATCC 19430	-	-	+	+
Molds	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 22546	-	-	-	-
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 96918	-	-	-	+
	<i>Aspergillus petrakii</i> PF-1	-	-	+	++
	<i>Aspergillus ochraceus</i> PF-2	+	+	+++	+++
	<i>Aspergillus nidulans</i> PF-3	-	-	+	++
	<i>Cladosporium gossypicola</i> KF-2	++	+++	+++	+++
Yeasts	<i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	-	-	+	+++
	<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	-	-	-	+
	<i>Candida albicans</i> ATCC 11006	-	-	-	+
	<i>Candida albicans</i> ATCC 18804	-	-	-	+

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each sensitive indicator. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition: -, no inhibition zone; +, below 14.05 mm; ++, 14.05~17.05 mm; +++, above 17.05 mm. Control experiment were carried out by using the culture media (TSB-without inoculation) concentrates (1×, 5×, 10×, 20×). No inhibition zone was observed through control experiment.

erence strain)의 16S rRNA gene 염기서열들과 상동성을 비교한 결과 분리균주는 *B. polyfermenticus*와 99.9%의 상동성을 나타내었다. 이에 분리균주는 최종 *B. polyfermenticus*로 동정되었으며 이를 *B. polyfermenticus* CJ6 (GenBank No. FJ436014)라 명명하였고, 그 16S rRNA gene의 염기서열은 GenBank에 등록하였다.

분리균주의 항균 spectrum

Gram 양성균과 음성균 세균 10종, 곰팡이 7종 및 효모 3종을 대상으로 *B. polyfermenticus* CJ6에 의한 항균 활성을 조사하였다(Table 1). *B. polyfermenticus* CJ6의 배양상징액을 paper disk method(24)를 통하여 항균 활성을 측정

결과, Gram 양성균인 *B. subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 19113에 대한 저해 활성을 나타내었으며, *Aspergillus ochraceus* PF-2와 *C. gossypicola* KF-2의 곰팡이를 저해하였다. *B. polyfermenticus* CJ6의 배양상징액을 5배, 10배, 20배 농축하여 처리한 구에서 분리균주는 Gram 양성균과 음성균을 모두 저해하였으며 *Candida albicans* strain 효모들에 대해서도 저해 활성을 나타내었다. 곰팡이에 대한 실험에서는 *Aspergillus flavus* ATCC 22546을 제외한 *Aspergillus fumigatus* ATCC 96918, *A. petrakii* PF-1, *A. ochraceus* PF-2, *Aspergillus nidulans* PF-3, *C. gossypicola* KF-2, *Penicillium roqueforti* ATCC 10110에

대한 생육 저해활성을 나타내었다(Table 1). 이때 대조구로 사용된 TSB 액체 배지만을 농축하여(5배, 10배, 20배) 처리한 구에서는 사용된 세균, 효모, 곰팡이에 대해 어떠한 저해 활성도 나타나지 않음을 확인하였다.

*B. polyfermenticus*는 GRAS 균주로서 최근 정장용 생균제제(probiotics)로 시판되고 있다(18). 그러나 항균 활성을 지닌 *B. polyfermenticus*에 관한 보고는 많지 않으며, 기존에 개발된 *B. polyfermenticus* SCD도 항세균 활성과 *A. oryzae*와 *A. niger*의 단 두 종에 제한된 항진균 활성에만 한정되는 한계가 있다(21). 그러므로 보다 강력하고 항세균 활성과 항진균 활성을 동시에 지니는 GRAS 미생물의 개발이 요구되며, 항세균 활성과 항진균 활성을 동시에 나타내는 *B. polyfermenticus* CJ6에 관한 본 연구 결과는 새로운 항균 활성(항세균+항진균) *B. polyfermenticus* 균주의 개발이라는 측면에서 그 의미가 크다.

생육시기에 따른 항진균 활성

B. polyfermenticus CJ6(Fig. 2)의 생육에 따른 항진균 활성을 조사하였다. *B. polyfermenticus* CJ6는 배양 12시간에 1차 대수기 중반을 지나 24시간에 생육 정지기에 잠시 이르다가 다시 36시간에 2차 대수기에 접어들어 생육 60시간경 최대 생육도를 나타내었다(A_{600} : 7.63). 그 이후 사멸기에 접어들면서 세포 현탁도가 서서히 감소하였다(A_{600} : 6.16). 항진균 활성은 배양 6시간부터 나타나기 시작하여 30시간 이후부터 최대 활성(3,200 AU/mL)을 나타내었으며, 자가분해에 의한 포자방출시기인 72시간 이후 급격히 활성이 감소(1,600 AU/mL)하였으나 그 후 120시간까지 활성(1,600 AU/mL)이 유지되었다(Fig. 2).

세균의 일반적인 생육곡선은 sigmoid 형태를 나타내며, 포자를 형성하는 세균은 sigmoid 곡선의 정상기(정지기)에서 급격히 세포 현탁도가 떨어지는 형태를 나타낸다. Fig. 2의 *B. subtilis* ATCC 6633의 생육곡선이 나타내는 바와 같이 포자를 형성하는 세균의 전형적인 생육곡선과는 달리, *B. polyfermenticus* CJ6의 생육곡선은 2단 생육곡선 후 서서

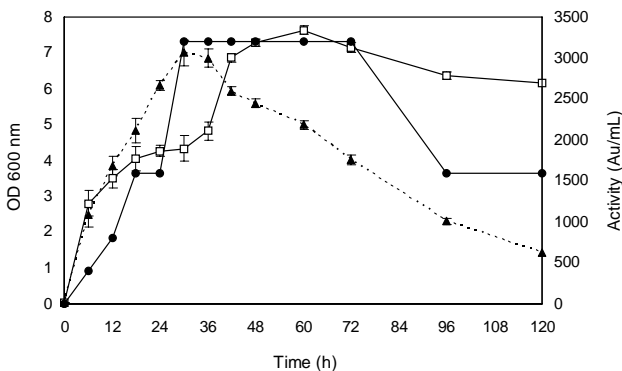


Fig. 2. Growth and antifungal activity of *B. polyfermenticus* CJ6. □, *B. polyfermenticus* CJ6 cell growth; ▲, *B. subtilis* ATCC 6633 cell growth; ●, antifungal activity (AU/mL) against *A. petrakii* PF-1. All values were mean±SD (n=3).

히 세포 현탁도가 감소하는 형태를 나타내었다.

B. polyfermenticus SCD를 TSB배지에서 배양하여 polyfermenticin SCD를 생산할 때 정지기 이후 항균활성이 급격히 감소되는 반면(21), *B. polyfermenticus* CJ6는 생육곡선상 2번의 대수기를 나타내고, 2차 대수기에 이르러 항진균 활성 물질의 생산이 최대값을 나타내었으며 그 이후 지속적으로 항진균 활성 물질이 분비됨을 알 수 있었다. 또한 균이 사멸기에 도달하면서 세포 현탁도 감소 현상과 함께 항진균 활성이 감소되는 결과는 균이 사멸기에 이르러 포자형성과 함께 세포의 자가분해에 의해 세포 내 단백질분해효소의 방출에 의한 영향으로 생각되며 이로부터 *B. polyfermenticus* CJ6에 의해 생산된 항진균 활성 물질은 세포 내 단백질수분해효소에 의해 분해되는 단백질성 물질임을 추정할 수 있다.

항진균 물질의 안정성

B. polyfermenticus CJ6는 70°C 이상의 열처리에서 항진균 활성이 감소되는 결과(3,200→1,600 AU/mL)를 보였다(Table 2). 그러나 항진균 활성 물질은 121°C에서 15분간 열처리하였을 때 역가가 완전히 소실되지 않고 일부 남아있는 것(800 AU/mL)을 확인할 수 있었다. pH 안정성 실험 결과 *B. polyfermenticus* CJ6의 항진균 활성 물질은 pH 3.0~9.0 구간에서 안정한 활성을 나타내어 분리균주가 생산하는 항진균 활성 물질이 산성에서부터 알칼리 영역에서 안정함을 알 수 있었다(Table 2). 각종 효소에 대한 영향을 살펴본 결

Table 2. Effect of heat, pH, and enzyme treatment on the antifungal activities of *B. polyfermenticus* CJ6

	Treatment	Antifungal activity (AU/mL)
Heat	Control	3,200
	25, 24 hr	3,200
	37, 24 hr	3,200
	50, 24 hr	3,200
	70, 24 hr	1,600
	100, 30 min	1,600
	121, 15 min	800
pH	Control	3,200
	3.0	3,200
	4.0	3,200
	5.0	3,200
	6.0	3,200
	7.0	3,200
	8.0	3,200
	9.0	3,200
Enzyme	Control	3,200
	Proteinase K	200
	Protease	0
	Pepsin	3,200
	Trypsin	3,200
	α-Chymotrypsin	0
	Lipase	3,200
	α-amylase	3,200

The antifungal activity was measured by the spot-on-the lawn test. *A. petrakii* PF-1 was used as indicator.

과 *B. polyfermenticus* CJ6의 항진균 활성 물질은 pepsin, trypsin, α -amylase, lipase 처리에는 영향을 받지 않았으나, proteinase K 처리시 역가가 감소하였으며 protease, α -chymotrypsin의 단백분해효소 처리로 항진균 활성이 불활성화 되어 역가를 상실하였다(Table 2). 이로부터 *B. polyfermenticus* CJ6가 생산하는 항진균 활성 물질은 pH 및 열에 비교적 안정하며, 일부 단백분해효소에 의해 항진균 활성이 크게 감소되거나 실활되어 단백질성 물질임을 추정할 수 있었다. 이와 같은 결과는 생육시기에 따른 항진균 활성 실험에서의 결과와 일치하는 결과이다. 또한 단백질성 물질임에도 pH 3.0~9.0 구간에서 안정한 활성을 보이고 121°C에서 15분간 열처리에는 항진균 활성이 완전히 소실되지 않는 결과로부터 *B. polyfermenticus* CJ6가 생산하는 항진균 활성 물질은 3차 이상의 복잡한 단백질 구조가 아닌 1, 2차 구조만을 지니는 저분자성 단백질 물질의 특성을 지님을 추측할 수 있었다.

Bacillus 속 유래의 항진균 활성 물질에 관한 그동안의 연구를 살펴보면, 대부분 단백분해효소의 영향을 받지 않는 물질이다. *B. licheniformis* M-4가 생산하는 fungicin M4의 항진균 활성 물질은 cyclic peptide 구조를 가지며 proteinase K, trypsin, carboxypeptidase A 등의 단백분해 효소에 영향을 받지 않았으며(31), *B. subtilis*가 생산하는 항진균 활성 물질인 bacillomycin D와 plipastatin B1은 구조 내에 D형 아미노산을 가지므로 단백분해효소에 영향을 받지 않았다(32,33). 이는 *Bacillus* 속이 생산하는 항진균 활성 물질들이 열에 매우 안정하며 cyclic peptide의 구조를 가지거나 물질 구조 내에 D형 아미노산을 가져 단백분해효소에도 영향을 받지 않기 때문이다(31,34,35). 그러나 *B. polyfermenticus* CJ6이 생산하는 항진균 활성 물질은 pH와 열에는 안정하나 일부 단백분해 효소에 불안정하므로 기존에 보고된 *Bacillus* 유래의 항진균 활성 물질들과 서로 다른 구조를 가지는 단백질성 물질임을 추정할 수 있었다.

항진균 물질의 부분 정제 및 Tricine-SDS-PAGE

B. polyfermenticus CJ6의 배양상정액을 C₁₈ Sep-Pak column에 흡착시킨 후 100% methanol로 용출하여 얻은 분획에서만 강한 항진균 활성을 관찰하였다(data not shown). 이러한 결과는 *B. polyfermenticus* CJ6가 생산하는 항진균 활성 물질은 소수성 물질임을 의미한다. *B. polyfermenticus* CJ6의 배양상정액을 각각 C₁₈ Sep-Pak column으로 부분 정제한 시료를 Tricine-SDS-PAGE로 단백질 분리를 하였을 때 세 개의 주된 band를 나타내었다(Fig. 3). 세 개의 band를 각각 잘라 *C. gossypicola* KF-2에 대한 항진균 활성을 direct detection 방법으로 측정된 결과, 분자량 1.4 kDa 부분의 band에서 *C. gossypicola* KF-2에 대한 항진균 활성을 나타내었으며 다른 band 부분에서는 항진균 활성이 관찰되지 않았다. 이상의 실험 결과로부터 *B. polyfermenticus* CJ6

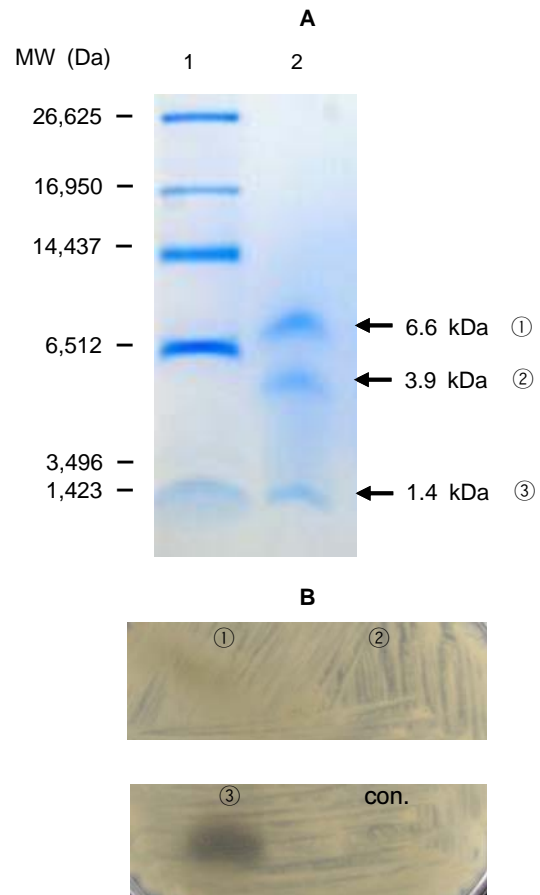


Fig. 3. Tricine-SDS-PAGE and direct detection of partially purified antifungal compounds from *B. polyfermenticus* CJ6. A. Tricine-SDS-PAGE of partially purified antifungal compounds after Coomassie Brilliant Blue G staining. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, partially purified *B. polyfermenticus* CJ6 antifungal compounds. B. Direct detection of antifungal compounds from *B. polyfermenticus* CJ6 by using the gel overlaid with the indicator stain.

이 생산하는 항진균 활성 물질의 분자량은 약 1.4 kDa임을 확인하였다.

B. polyfermenticus CJ6가 생산하는 항진균 활성 물질에 관한 본 연구는 지금까지 거의 보고되지 않은 넓은 범위의 항진균 활성을 가지는 *B. polyfermenticus* 유래의 항진균 활성 물질에 관한 보고이다. 본 연구 결과는 새로운 항진균 활성 미생물의 개발이라는 측면과 아울러 식품 및 사료 등에 천연보존제(biopreservative)로 활용함으로써 저장성 향상 뿐만 아니라 열처리량 감소에 의한 영양적 가치, 맛, 조직감 향상 등을 기대할 수 있을 것이다. 또한 *Listeria* 등의 병원성 균, 부패미생물 그리고 피부질환 원인균 곰팡이의 제어에도 사용될 수 있으므로 식품, 향장 및 의약 산업에서도 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 이를 위하여 본 연구진은 본 항진균 활성 물질의 정제 및 구조분석, 물질 기능적 특성규명 등의 연구를 시행중에 있다.

요 약

매주로부터 곰팡이 및 세균 등에 생육 저해활성을 나타내는 균주 *B. polyfermenticus* CJ6을 분리·동정하였다. 분리 균주 *B. polyfermenticus* CJ6는 2단 대수기를 나타내는 생육 곡선상 특이점을 나타내었으며 배양 30시간 이후부터 최대 활성을 나타내었고 사멸기 이후 활성이 다소 감소되었으나 120시간까지 활성을 유지하였다. *B. polyfermenticus* CJ6의 항진균 활성 물질은 70°C 이상에서 활성이 감소되었으나 121°C에서 15분간 열처리 시 역가가 완전히 소실되지 않았다. pH 안정성 실험에서는 pH 3.0~9.0 구간에서 안정한 활성을 나타내었으며, 각종 효소에 대한 영향에서 항진균 활성 물질은 proteinase K, protease, α-chymotrypsin 등의 단백 분해효소 처리로 역가를 상실하거나 일부 감소되어 단백질 성 물질임을 추정하였다. 균주의 항진균 활성 물질을 C₁₈ Sep-Pak column으로 부분 정제한 후 Tricine-SDS-PAGE 및 direct detection 실험을 통하여 분자량이 약 1.4 kDa의 물질임을 확인하였다. *B. polyfermenticus* CJ6가 생산하는 항진균 활성 물질은 기존에 거의 보고되지 않은 *B. polyfermenticus* 유래의 단백질성 항진균 활성 물질로서 천연보존제 및 천연항균제재로 사용이 기대되며, 이를 위하여 항진균 활성 물질들의 정제 및 구조분석 등의 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지방기술혁신 사업에 의한 연구비로 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Jack RW, Tagg JR, Ray B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 59: 171-200.
2. Ryoo SW, Maeng HY, Maeng PJ. 1996. Purification and characterization of antifungal compounds produced by *Bacillus subtilis* KS1. *Kor J Mycology* 24: 293-304.
3. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 40: 722-756.
4. Omura S, Iwai Y, Masuma R, Hayashi M, Furusato T, Takagaki T. 1980. A new peptide antibiotic, alboleutin. *J Antibiot* 33: 758-759.
5. Eshita SM, Roberto NH, Beale JM, Mamiya BM, Workman RF. 1995. Bacillomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group: isolations, structures, and antifungal activities of the congeners. *J Antibiot* 48: 1240-1247.
6. Tenoux I, Besson F, Michel G. 1991. Studies on the antifungal antibiotics: bacillomycin D and bacillomycin D methylester. *Microbios* 67: 187-193.
7. Newton GG. 1949. Antibiotics from a strain of *B. subtilis*: bacilipin A and B and bacilysin. *Br J Exp Pathol* 30: 306-319.
8. 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.
9. 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.
10. Maget-Dana R, Peypoux F. 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physico-chemical properties. *Toxicology* 87: 151-174.
11. Besson F, Michel G. 1990. Mycosubtilins B and C: minor antibiotics from mycosubtilin-producer *Bacillus subtilis*. *Microbios* 62: 93-99.
12. Peypoux F, Pommier MT, Marion D, Ptak M, Das BC, Michel G. 1986. Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *J Antibiot* 39: 636-641.
13. Kugler M, Loeffler W, Rapp C, Kern A, Jung G. 1990. Rhizocitricin A, an antifungal phosphono-oligopeptide of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: biological properties. *Arch Microbiol* 153: 276-281.
14. Sharp RJ, Scawen MD, Atkinson T. 1989. Fermentation and downstream processing of *Bacillus*. In *Bacillus. Biotechnology Handbooks*. Harwood CR, ed. Plenum Press, New York. p 255-292.
15. Green DH, Wakeley PR, Page A, Barnes A, Baccigalupi L, Ricca E, Cutting SM. 1999. Characterization of two *Bacillus* probiotics. *Appl Environ Microbiol* 65: 4228-4291.
16. Hoa NT, Baccigalupi L, Huxham A, Smertenko A, Van PH, Ammendola S, Ricca E, Cutting SM. 2000. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacteriophylaxis of gastrointestinal disorders. *Appl Environ Microbiol* 66: 5241-5247.
17. Park HS, Lee SH, Uhm TB. 1998. Selection of microorganisms for probiotics and their characterization. *J Food Sci Nutr* 3: 433-440.
18. Biscan, Binnex Co., Korea. 2001. <http://www.bi-nex.com/>
19. Duc LH, Cutting SM. 2003. Bacterial spores as heat stable vaccine vehicles. In *Expert Opinion on Biological Therapy*. School of Biological Sciences, Royal Holloway, University of London. Vol 3, p 1263-1270.
20. Sneath PHA. 1986. Endospore-forming gram-positive rods and cocci. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, eds. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, MD. p 1104-1139.
21. Lee KH, Jun KD, Kim WS, Paik HD. 2001. Partial characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. *Lett Appl Microbiol* 32: 146-151.
22. Yoon JH, Lee ST, Park YH. 1996. Inter- and intraspecific phylogenetic analysis of the genes *Nocardioides* and related taxa based on 16s rDNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* 48: 187-194.
23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>. 2006
24. Tagg JR, McGiven AR. 1971. Assay system for bacteriocin. *Appl Microbiol* 21: 943.
25. Chang M, Chang HC. 2007. Characteristics of bacterial-koji and doenjang (soybean paste) made by using *Bacillus subtilis* DJI. *Kor J Microbiol Biotechnol* 35: 325-333.
26. Chang M, Chang HC. 2006. Enhancement of bacteriocin production by *Bacillus subtilis* cx1 in the presence of *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Kor J Microbiol Biotechnol* 34: 221-227.
27. Hoover DG, Harlander SK. 1993. Screening methods for detecting bacteriocin activity. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Hoover DG, Steenson LR, eds. Academic Press, Inc., San Diego, USA. p 23-39.
28. Yang EJ, Chang HC. 2007. Characterization of bacter-

- iocin-like substances produced by *Bacillus subtilis* MJPI. *Kor J Microbiol Biotechnol* 35: 339-346.
29. Schägger H, von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166: 368-379.
30. Bhunia AK, Johnson MC, Ray B. 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Indust Microbiol* 2: 319-322.
31. Lebbadi M, Galvez A, Maqueda M, Martinez-Bueno M, Valdivia E. 1994. Fungicin M4: a narrow spectrum peptide antibiotic from *Bacillus licheniformis* M-4. *J Appl Bacteriol* 77: 49-53.
32. Peypoux F, Besson F, Michel G, Delcambe L. 1981. Structure of bacillomycin D, a new antibiotic of the iturin group. *Eur J Biochem* 118: 323-327.
33. Tsuge K, Ano T, Shoda M. 1995. Characterization of *Bacillus subtilis* YB8, coproducer of lipopeptides surfactin and plipastatin B1. *J Gen Appl Microbiol* 41: 541-545.
34. Katz E, Demain AL. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol Rev* 41: 449-474.
35. Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* 56: 845-857.

(2009년 2월 5일 접수; 2009년 3월 18일 채택)