Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 34, No. 3, 221–227 (2006)

Bacillus subtilis ATCC6633이 *Bacillus subtilis* cx1의 박테리오신 생산에 미치는 유도효과

장 미 · 장해춘*
조선대학교 식품영양학과

Enhancement of Bacteriocin Production by *Bacillus subtilis* cx1 in the Presence of *Bacillus subtilis* ATCC6633. Chang, Mi and Hae Choon Chang*. *Department of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju, 501-759, Korea* – BSCX1 was an antimicrobial peptide produced by *Bacillus subtilis* cx1. Attempts were made to determine the location of inducing factor in the bacteriocin-sensitive cell affecting bacteriocin BSCX1 production. Mixed culture of the bacteriocin producer strain *B. subtilis* cx1 and its sensitive strain *B. subtilis* ATCC6633, increased production of bacteriocin BSCX1. The result suggested the presence of a bacteriocin inducing factor in the sensitive strain. The inducing factor was localized in the cell debris and intracellular fraction of *B. subtilis* ATCC6633. Bacteriocin BSCX1 inducing factor was found to be highly stable in the pH range 2.5-9.5, but inactivated within 3h over 50°C, and treatment with proteinase K destroyed its inducing activity, this result suggested that the inducing factor should be a proteinaceous nature.

Key words: *B. subtilis* cx1, *B. subtilis* ATCC6633, bacteriocin inducing factor

서 론

박테리오신은 주로 그람양성 세균에 의해서 생성되는 항균성 peptide나 protein으로서 세균의 생육을 저해하는 물질이며, 효소 역가 변경, 포자 성장억제, 음이온 운반자역할, 그리고 선택적 혹은 비선택적 작은 구멍 형성 등과 같은 다양한 방법으로 항균활성을 나타낸다[9]. 박테리오신은 세균에 의하여 생합성된 후 세포밖으로 배출된 화합물들로서, 이들은 대부분 주로 생성균과 같은 속(genus)이나 종(species) 등의 몇몇 균주들에 대해서만 항균활성을 나타내는 비교적 좁은 항균활성 범위를 가지고 있는 것으로 알려지고 있다[9]. 기존의 항생제가 2차 대사산물인데 반하여, 박테리오신의 경우 자신의 유전자로부터 직접 생합성되며 대부분 단백질로 이루어져 인체에 투여되면 장관내의 단백질 분해효소에 의해 분해되어 인체에 잔류성이 없는 것이 큰 특징이다. 항생제에 대한 대상 세균의 내성증가로 인하여 항생물질의 약리작용이 저하되므로 이러한 항균성 peptide들은 항생물질의 대체원으로서 이용될 수 있는 잠재력을 가지며, 이러한 항균성 peptide들의 많은 수가 기존의 항생물질에 내성을 갖는 세균들에 대하여 상당한 효과를 나타내었다[22].

Bacillus 속은 산업적으로 중요한 종으로서, 일반적으로 생물산업에서 숙주로 사용되고 있으며 산업적으로는 중요한 효소와 항생물질을 다량 분비한다. 산업적 이용면에서 *Bacillus* 균주들이 생산하는 세가지 중요한 산물로서 효소, 항생제 및 살충제를 들 수 있다. Protease, amylase, glucanases 및 cellulase 등의 효소가 다양한 *Bacillus* 균주들에 의해 생산되며, *Bacillus*속 내에서 박테리오신 또는 bacteriocin-like substances들이 *B. subtilis, B. megaterium, B. stearothermophilus, B. licheniformis, B. thuringiensis, B. cereus* 등에서 발견되어 보고되었다[21]. 그 중 *B. subtilis* 로부터의 subtilin과 *B. megaterium*의 megacin이 가장 잘 특성화된 박테리오신으로 알려져 있다[21]. 효소와 항생물질의 고생산성 균주 개발 및 발효기술의 향상과 더불어 *Bacillus subtilis* 균이 GRAS(Generally Regarded As Safe) 미생물로 인정됨에 따라 외래유용단백질, 항대사능 및 약리활성이 있는 다양한 2차 대사 산물 생산 숙주로서의 *Bacillus* 균의 중요성은 더욱 증대되었다.

본 연구팀은 토양으로부터 박테리오신 생성균주인 *B. subtilis* cx1을 분리 · 동정하여 그 미생물학적 특징을 보고하고[11], *B. subtilis* cx1이 생산하는 박테리오신 BSCX1을 분리·정제하여 그 특성을 규명한 바 있다[12]. 전보에서 분리한 *B. subtilis* cx1에 의해 생성되는 박테리오신 BSCX1은 분자량 9,500 dalton의 항균성 peptide로서 *B. subtilis* ATCC6633에 대해 강력한 항균활성을 나타내며, 60°C 이상의 온도에서는 불활성화 되어 열에는 불안정하지만 넓은 pH 구간(pH 2.5~9.5)에서 안정하여 항균활성을 유지함을 보고한 바 있다[12].

본 연구팀은 위와 같은 일련의 연구를 수행도중, 박테리

*Corresponding author
Tel: 82-62-230-7345, Fax: 82-62-222-8086
E-mail: hcchang@mail.chosun.ac.kr

오신 BSCX1 생산균주인 *B. subtilis* cx1과 이에 감수성을 나타내는 *B. subtilis* ATCC6633의 공동배양을 통해 감수성 균주에 의해 박테리오신 생산이 촉진되는 현상을 발견하였다. 그러므로 본 연구에서는 *B. subtilis* ATCC6633으로부터 박테리오신 BSCX1의 생산 유도물질을 분리하여 이 유도물질(inducing factor)의 유도 작용의 확인과 동시에 유도물질의 특성을 규명하였다.

재료 및 방법

항균물질 생산 균주 및 배양조건

박테리오신 BSCX1 생성균주로는 본 실험실에서 분리한 균주인 *B. subtilis* cx1[11]을 사용하였고, 항균력 측정을 위하여 사용된 감수성 균주로는 공시균주 *B. subtilis* ATCC6633을 사용하였다. 각각의 균주는 30°C에서 배양되었고, 5 mL LB 액체배지에 1% 접종하여 전 배양한 후 본 실험에 사용되었다.

조항균 물질의 제조

본 실험에 사용된 항균물질은 다음의 방법에 의하여 부분 정제하여 조항균 물질 상태로 준비하였다. 전 배양된 *B. subtilis* cx1을 50 mL LB 액체배지에 1% 접종하고, 다시 30°C에서 18시간 본 배양한 후 4°C에서 24시간 보관하였다. 배양액을 원심분리(9,950 × g, 15 min, 4°C)하여 균체를 제거하고, 회수한 상징액은 membrane filter(0.45 μm pore size, Milipore, Beverly, USA)로 제균하였다. 제균한 상징액은 동결건조(Labconco. Kansas, USA)하여 -70°C에서 보관하였으며, 항균물질 사용 시 50 mM Tris-HCl(pH 8.3)에 녹여 사용하였다.

박테리오신 생성능 검증

박테리오신 BSCX1의 항균활성은 paper disk method[12]를 사용하여 조사하였다. *B. subtilis* cx1에 대해 감수성을 나타내는 *B. subtilis* ATCC6633을 대수기 초기 상태의 세포로 준비하여 LB 배지에 도말한다. 그 위에 paper disk(직경 8 mm)를 놓고 준비된 항균물질을 일정량 투여한 후 30°C에서 12시간 배양하여 disk 주위에 형성된 투명환의 크기를 caliper(Mitutoyo, Japan)로 3회 이상 측정하여 그 평균값을 항균활성으로 표시하였다. 또한 식품매개 병원성 세균에 대한 BSCX1의 항균 활성은 *Salmonella typhi* ATCC19430, *Escherichia coli* ATCC25922, *Listeria monocytogenes* KCTC3569를 사용하여 확인하였다. *S. typhi*, *E. coli*는 LB 액체배지, *L. monocytogenes*는 BHI(Brain Heart Infusion, Difco.) 액체배지에 배양하였으며, 37°C에서 14시간 전 배양한 후 계대 배양하여 대수기 초기 상태 세포로 준비하여 이를 지시균주로 하여 박테리오신 BSCX1의 항균활성을 측정하였다.

감수성균주(*B. subtilis* ATCC6633)에 의한 BSCX1 생산의 유도효과

박테리오신 BSCX1 생산균주에 대한 감수성 균주의 박테리오신 생산 유도 작용 유무 및 그 효과의 정도를 확인하기 위해 감수성 균주인 *B. subtilis* ATCC6633과 박테리오신 생산균주인 *B. subtilis* cx1을 공동배양 하였다. 30°C에서 14시간 전 배양된 *B. subtilis* cx1을 50 mL LB 액체배지에 1% 접종하고, 여기에 30°C에서 12시간 배양된 *B. subtilis* ATCC6633 배양액을 0.01%(v/v), 0.1%(v/v), 1%(v/v)씩 각각 첨가하여 30°C에서 18시간 공동 배양한 후 항균활성을 측정하였다.

또한 박테리오신 유도물질의 세포내 분포를 알아보기 위하여 감수성 균주를 세포내(intracellular extract), 세포외(extracellular extract) 및 세포파쇄물(cell debris)로 분획하여 박테리오신 생성균 배양액에 첨가한 후 그 활성을 비교하였다. 즉 30°C에서 15시간 100 mL LB 액체배지에서 본 배양된 감수성 균주 *B. subtilis* ATCC6633을 원심분리(9,950×g, 15 min, 4°C)하여 균체와 상징액을 분리하여 상징액을 세포외 분획으로 삼았다. 균체는 50 mM Tris-HCl(pH 8.3) 완충용액 20 mL을 가하여 sonication(Ampi: 60, Pulse: 2 sec, Time: 5 min, Newtown, USA)한 후 원심분리(9,950×g, 25 min, 4°C)하여 상징액을 세포내 분획으로 그리고 침전물은 세포 파쇄물로 분리하였다. 세포내 분획은 membrane filter(0.45 μm, Milipore)로 제균한 후 사용하였으며, 세포 파쇄물은 20 mL LB 액체배지에 현탁시켜 박테리오신 유도 작용 실험에 사용하였다. 아무것도 첨가하지 않은 *B. subtilis* cx1만의 배양에 의해 생성된 BSCX1의 항균활성을 대조구로 삼았으며, 동일한 조건에서 *B. subtilis* cx1에 각각의 유도물질을 첨가하여 배양한 후 생성된 BSCX1의 항균활성을 측정하였다. 이때 대조구보다 더 커진 생육저해환의 크기로 박테리오신 유도활성을 확인하였으며, 대조구와 함께 박테리오신 유도 항균활성은 반드시 동일한 plate에서 3회 이상 측정하여 확인하였다.

유도물질의 안정성 확인

온도의 영향 : 유도물질 활성에 대한 온도의 영향을 알아보기 위하여 감수성 균주를 sonication하여 얻은 세포내 분획을 제균하여, 4°C, 30°C, 37°C, 50°C, 70°C에서 3시간 열처리하였으며 100°C에서는 30분, 121°C에서는 15분간 처리하였다. 각각의 온도에서 처리된 유도물질을 박테리오신 생산균인 *B. subtilis* cx1 배양액에 2.5%(v/v) 첨가하여 항균물질의 생산을 유도하는지 확인하였다.

pH 영향 : 유도물질 활성에 대한 pH의 영향을 알아보기 위하여 pH 2.5(50 mM glycine-HCl), pH 4.5(50 mM sodium acetate), pH 6.0(50 mM sodium citrate), pH 7.0 (10 mM phosphate), pH 9.5(50 mM glycine-NaOH)완충용액을 1 N HCl과 1 N NaOH로 보정하여 만들었다[30]. 각

각의 pH에 해당하는 완충용액에 유도물질을 M.W. 1,000 투석막(Spectrum, USA)을 이용하여 24시간동안 4°C에서 투석하였다. 투석 후 용적이 늘어난 유도물질 용액은 centricon (amicon, M.W. 3,000)으로 투석전의 부피까지로 농축한 후 *B. subtilis* cx1 배양액에 2.5%(v/v) 첨가하여 항균물질의 생산을 유도하는지 확인하였다.

단백분해효소의 영향 : 박테리오신 BSCX1의 생산을 유도하는 유도물질에 단백분해효소인 proteinase K(EC 3.4.21.64, Sigma)를 처리하였다. Proteinase K는 10 mM Tris-HCl(pH 7.5)에 녹여 20 mg/mL가 되도록 준비하고 유도물질에 최종 2 mg/mL 농도로 37°C에서 4시간동안 반응시킨 후 protease inhibitor인 AEBSF(4-(2-aminoethyl)-benzensulfonyl fluoride)를 100 mM 농도가 되도록 첨가하여 37°C에서 4시간 처리하여 proteinase K를 완전히 실활시켰다. 이와 같이 proteinase K를 처리한 유도물질은 *B. subtilis* cx1 배양액에 2.5%(v/v) 첨가하여 박테리오신 유도활성을 확인하였다. 대조구로는 proteinase K를 처리하지 않은 유도물질을 *B. subtilis* cx1에 첨가하여 생성된 항균물질의 항균활성을, 또 다른 대조구로는 유도물질에 proteinase K 처리 시에 사용한 완충액만 동량 *B. subtilis* cx1 배양에 첨가하여 그 항균활성을 측정한 것으로 삼았다.

결과 및 고찰

박테리오신 생산 균주와 감수성 균주의 공동배양

B. subtilis ATCC6633에 의하여 *B. subtilis* cx1으로부터 박테리오신 BSCX1의 생산이 유도되는 현상을 확인하기 위하여 박테리오신 생산균주 *B. subtilis* cx1과 감수성 균주인 *B. subtilis* ATCC6633을 공동 배양하여 항균활성을 비교하여 보았다. 전보[11]의 연구결과에 따르면 *B. subtilis* cx1은 *B. subtilis* ATCC6633에 대하여 강력한 항균활성을 가지고 있으며, *B. subtilis* cx1의 생육시기에 따른 항균물질의 활성을 측정하였을 때, 대수기 초기인 생육 3시간부터 항균활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. 이에 박테리오신 생산균을 먼저 접종한 뒤, 균체생육도가 대수기 초기(O.D.≃0.2)에 도달할 때 전 배양된 감수성 균주를 배양액에 대하여 0.01%(v/v), 0.1%(v/v), 1%(v/v) 접종하였다. 그 결과 공동배양에서 *B. subtilis* cx1만을 단독 배양한 것에(≃12.3 mm clear zone) 비해 항균활성이 증가되었음을 확인하였다(Table 1). 특히 감수성 균주를 0.1% 첨가하여 공동배양한 배양액에서 가장 큰 역가(≃15.5 mm clear zone)를 나타내었다. 이 결과로부터 감수성 균주와의 공동배양에 의해 *B. subtilis* cx1의 박테리오신 생산이 유도되어 그 항균활성이 증대됨을 알 수 있었다.

Table 1. Enhancement of bacteriocin BSCX1 production by *B. subtilis* cx1 in the presence of *B. subtilis* ATCC6633.

Co-cultivation	Antimicrobial activity (mm)
B. subtilis cx1	$12.32_{\pm 0.12}$
B. subtilis cx1 + *B. subtilis* ATCC6633 0.01%	$14.44_{\pm 0.29}$
B. subtilis cx1 + *B. subtilis* ATCC6633 0.1%	$15.54_{\pm 0.26}$
B. subtilis cx1 + *B. subtilis* ATCC6633 1%	$14.33_{\pm 0.31}$

Values are mean ± S.D.(n=3)
B. subtilis ATCC6633 was used as a sensitive lawn to assay of antimicrobial activity. Antimicrobial activity was expressed as a diameter of clear zone by growth inhibition
B. subtilis cx1 was inoculated(1%(v/v)) and cultured in LB broth for 3h, and then 0.01%(v/v), 0.1%(v/v) and 1%(v/v) of *B. subtilis* ATCC6633 was added separately into *B. subtilis* cx1 culture.

박테리오신 감수성 균주로부터 유도물질에 의한 박테리오신 유도 활성

감수성균주로부터 기원하는 박테리오신 유도물질이 감수성 균주의 어느 위치에 존재하는지 밝히기 위해 *B. subtilis* cx1의 항균물질에 감수성 균주인 *B. subtilis* ATCC6633으로부터 세포외 분획(extracellular extract), 세포내 분획(intracellular extract) 그리고 세포 파쇄물(cellular debris)로 나누었다. 각각의 분획을 전 배양된 *B. subtilis* cx1 배양액에 2.5% 첨가하여 배양한 후 cx1만을 단독 배양한 것과 비교하여 그 활성을 관찰하였다.

세포외 분획에서는 박테리오신 유도효과가 관찰되지 않았으나, 세포내 분획과 세포 파쇄물을 첨가한 두 경우 모두 *B. subtilis* cx1 단독배양보다 높은 항균활성을 보여 박테리오신의 유도효과를 확인하였으며(Fig. 1) 세포 파쇄물에서도 세포내 분획과 동일한 유도효과를 나타내었다. 이로부터 박테리오신 유도물질은 세포내 및 세포벽에 존재함을 알 수 있으며 Table 1의 박테리오신 생산균 *B. subtilis* cx1과 감수성 균주인 *B. subtilis* ATCC6633의 공동 배양시 항균활성이 증가되었던 결과와 일치하는 결과이다. 즉 세포벽에 존재하는 유도물질에 의해 감수성 균주와의 공동배양시 박테리오신 생산균에 박테리오신 생산을 자극하게 되어 그 항균 활성이 커진 것이라 생각되어진다. 만약 유도물질이 세포내에만 존재한다면 공동배양시 유도 효과를 나타내지 못할 것이라 예측할 수 있다.

식품매개 병원성 세균에 대한 항균활성

박테리오신 BSCX1은 대표적인 식품매개 병원성 세균인 *S. typhi* ATCC19430, *L. monocytogenes* KCTC3569과 *E. coli* ATCC25922에 대하여 항균활성을 나타내었다. 특히 감수성 균주 *B. subtilis* ATCC6633으로부터의 세포내 분획물을 *B. subtilis* cx1에 첨가하여 배양한 경우 박테리오신 BSCX1의 활성이 유도되어 더욱 큰 항균 활성을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 2). 박테리오신 BSCX1이 *Listeria* sp., *Salmonella* sp.에 대해 항균활성을 나타내은 박테리오신의 산업적 이용 측면에서 유용하다 할 수 있다. *L. monocytogenes*는 식품의 가공 및 저장 중에 생존, 성장하여 식중독의 발

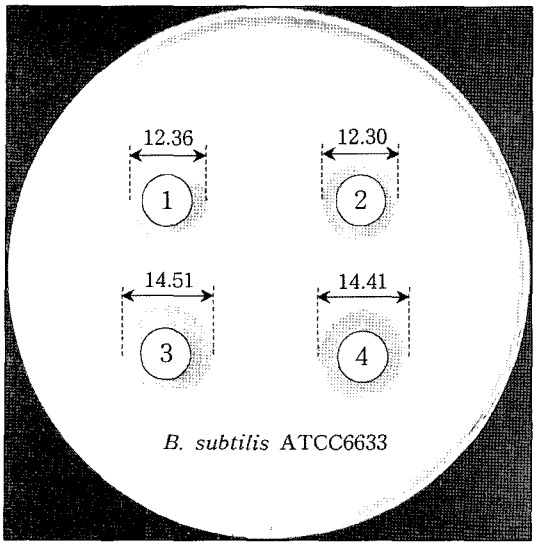

Fig. 1. Inducing effect of *B. subtilis* ATCC6633 on the antimicrobial activity of BSCX1. The prepared putative inducing factor fractions from *B. subtilis* ATCC6633 were added (2.5%) to separate 50 mL of LB broth containing 1% (v/v) inoculum from an overnight LB broth culture of *B. subtilis* cx1. Bacteriocin activity was assayed by using paper disk method. 1. BSCX1 from culture of *B. subtilis* cx1 (control); BSCX1 from culture of 2. *B. subtilis* cx1+extracellular extract of *B. subtilis* ATCC6633, 3. *B. subtilis* cx1+intracellular extract of *B. subtilis* ATCC6633, and 4. *B. subtilis* cx1+cell debris of *B. subtilis* ATCC6633.

생에 관여하므로 중요한 문제점이 되고 있으며 각종 식품에 오염되어 사람과 동물에게 유산, 패혈증 또는 화농성 뇌막염 등 Listeriosis를 유발하는 치명적인 병원성 세균으로 알려져 있다[20]. 또한 낮은 온도(4°C)에서 독성이 훨씬 높은 것으로 알려져 냉장고에 저장하고 있는 여러 식품에서의 *L. monocytogenes*의 성장과 독성이 우려되는 실정이다[29]. *Salmonella* 속은 소와 돼지에서 살모넬라 감염증을 유발하며 닭을 포함하는 가금류에서는 파라티푸스, 조류티푸스를, 사람에게는 장티푸스 및 살모넬라 감염증을 일으켜 경제적으로 또한 공중보건학적으로 중요한 질병의 원인 미생물로 인식되고 있다. 특히 가금류에 발병하여 산란저하와 높은 폐사 등으로 양계농장에 경제적 손실을 주고 있어, 농가에서는 항생제나 설파아제를 투약하여 방제하고 있으나 항생제나 설파아제는 내성균의 출현, 투약량의 증가, 잔류성 등의 부작용으로 인해 보건상의 큰 문제점이 대두되고 있다. 따라서 BSCX1 생산균주를 부작용이 없는 식품 첨가용 미생물제제로 개발하거나 BSCX1의 생물학적 사료첨가제로서의 효용을 기대할 수 있다.

유도물질(Inducing Factor: IF)의 안정성

온도의 영향 : *B. subtilis* cx1에 의해 생산되는 박테리오신 BSCX1의 유도 작용을 나타내는 *B. subtilis* ATCC6633으로부터 세포내 추출물(intracellular extract)을 준비하여 membrane filteration으로 제균한 후, 4°C, 30°C, 37°C, 50°C, 70°C에서 각각 3시간씩 열처리하였으며, 100°C에서는 30분, 121°C에서는 15분간 처리하여 유도물질이 *B. subtilis* cx1 배양액내에서 여전히 박테리오신 생산을 촉진시킬 수 있는지 확인하였다. 대조구로는 *B. subtilis* cx1만 단독 배양한 것과 *B. subtilis* cx1에 열처리하지 않은 유도물질을 넣은 것으로 하였다. 37°C에서 열처리 후 *B. subtilis* cx1 배양액에 첨가하여 박테리오신 생산 유도활성을 확인한 결과 *B. subtilis* cx1만을 배양한 경우보다 더 큰 활성을 보이며 *B. subtilis* cx1에 열처리하지 않은 유도물질을 넣은 대조구와 같은 활성을 나타내어 37°C정도의 열처리에서는 박테리오신 유도활성을 유지함을 확인하였다(Table 2). 그러나 50°C이상에서는 3시간 이내에 그 활성이 소실되어 *B. subtilis* cx1에 첨가하여 배양하여도 유도효과를 나타내지 못하였다. 이와 같이 BSCX1의 유도물질은 열에 불안정하며 이로부터 유도물질은 분자량이 클 것으로 예측되어진다.

pH 안정성 : 유도물질의 pH 안정성을 알아보기 위해 pH 2.5부터 pH 9.5까지 준비된 완충용액에 24시간 처리하여 얻은 시료를 *B. subtilis* cx1 배양에 첨가하여 박테리오신 유도효과를 살펴보았다. *B. subtilis* ATCC6633으로부터 분획된 유도물질은 Table 3에서와 같이 전 pH 구간에서 안정하여 *B. subtilis* cx1 배양액에 첨가하여 배양하였을 때 박테리오신 BSCX1의 유도 효과를 나타내었다.

단백분해효소(proteinase K) 처리 : 감수성 균으로부터 분리된 박테리오신 유도물질을 함유한 세포내 분획추출물에 단백분해효소(proteinase K)를 처리한 후 protease inhibitor인 AEBSF를 처리하여 proteinase K를 실활 시킨 후 박테리오신 유도활성을 측정하였다. 대조구로 사용된 proteinase K를 처리하지 않은 유도물질을 첨가한 *B. subtilis* cx1 배양액의

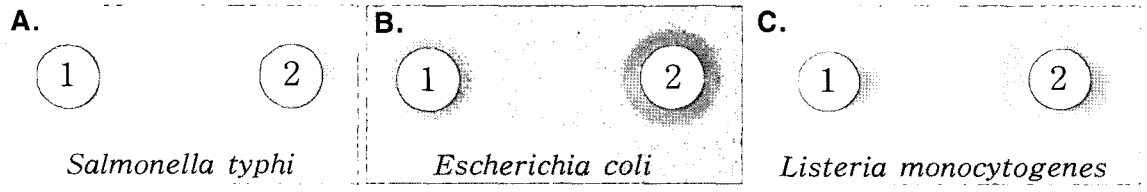

Fig. 2. Antimicrobial activity of BSCX1 against pathogenic bacteria; *Salmonella typhi* ATCC19430 (A), *Escherichia coli* ATCC25922 (B) and *Listeria monocytogenes* KCTC3569 (C). 1. Not induced bacteriocin: BSCX1 from culture of *B. subtilis* cx1; 2. Induced bacteriocin: BSCX1 from culture of *B. subtilis* cx1+intracelluar fraction from *B. subtilis* ATCC6633.

Table 2. Effect of temperature on the inducing activity of the inducing factor from *B. subtilis* ATCC6633.

Culture condition		Activity (mm)
control	*B. subtilis* cx1 (producer alone)	$12.34_{\pm 0.28}$
	B. subtilis cx1 with inducing factor	$14.45_{\pm 0.26}$
Inducing factor /heat treated	4°C	$14.74_{\pm 0.17}$
	30°C	$14.64_{\pm 0.27}$
	37°C	$14.53_{\pm 0.30}$
	50°C	$12.44_{\pm 0.27}$
	70°C	$12.57_{\pm 0.11}$
	100°C	$12.60_{\pm 0.27}$
	121°C	$12.68_{\pm 0.22}$

Values are mean ± S.D. (n=3). Heat treatment: at 4°C, 30°C, 37°C, 50°C and 70°C for 3 h, at 100°C for 30 min, and at 121°C for 15 min. *B. subtilis* ATCC6633 was used as an indicator.

Table 3. Effect of pH on the inducing activity of the inducing factor from *B. subtilis* ATCC6633.

Culture condition		Activity (mm)
control	producer alone (*B. subtilis* cx1)	$12.25_{\pm 0.27}$
	B. subtilis cx1 with inducing factor	$14.43_{\pm 0.21}$
Inducing factor /pH treated	pH 2.5	$14.48_{\pm 0.17}$
	pH 4.5	$14.31_{\pm 0.31}$
	pH 6.0	$14.48_{\pm 0.16}$
	pH 7.0	$14.43_{\pm 0.31}$
	pH 9.5	$14.42_{\pm 0.37}$

Values are mean ± S.D.(n=3). *B. subtilis* ATCC6633 was used as an indicator.

Table 4. Effect of proteinase K on the inducing activity of the inducing factor from *B. subtilis* ATCC6633.

Enzyme treatment	Activity (mm)
B. subtilis cx1	$12.35_{\pm 0.3}$
B. subtilis cx1 with inducing factor	$14.45_{\pm 0.23}$
B. subtilis cx1 with inducing factor treated with proteinase K (2 mg/mL) and then AEBSF (100 mM)	$12.39_{\pm 0.16}$

Values are mean ± S.D. (n=3). The serine protease inhibitor, AEBSF was added after the inducer was treated with proteinase K for 4 h at 37°C and then held for additional 4 h at 37°C. *B. subtilis* ATCC6633 was used as an indicator.

경우 항균활성이 증가하였으나, proteinase K를 처리한 후 유도물질을 첨가한 *B. subtilis* cx1의 항균활성은 또 다른 대조구인 유도물질을 첨가하지 않은 *B. subtilis* cx1 단독배양시의 항균활성과 같은 정도의 항균활성을 보여 박테리오신 유도 작용이 일어나지 않음을 알 수 있었다(Table 4).

이러한 결과로부터 *B. subtilis* ATCC6633으로부터 분리된 *B. subtilis* cx1의 박테리오신 활성 유도물질은 proteinase K에 의해 분해되어 실활되는 단백질성 물질임을 알 수 있었다.

현재까지 수많은 박테리오신들이 분리되어 그 특성 규명이 이루어졌으며 박테리오신 연구에 관한 발표가 증가하면서 박테리오신 생산 조절 기작과 분비기전에 대한 논문들이 있지만 아직 이에 대해 정확한 규명은 이루어지지 않고 있다. 이로 인해 유용 박테리오신의 이종 발현 등 박테리오신의 산업적 응용에 있어 그 필요성은 실로 막대하나 어려움이 따른다. 그 이유는 서로 다른 종간에 존재하는 유전자표현 system의 차이와 일단 단백질로 표현된 박테리오신 전구체(pre-bacteriocin)가 세포막을 통과하면서 정확히 활성화되고 세포외로 분비되도록 해주는 system의 차이(species-dependent posttranslational processing and secretion barriers) 등을 내재하고 있기 때문이다. 지금까지 박테리오신 생산 조절에 대해 정확히 알려진 것이 거의 없지만 조절 메카니즘이 존재함은 명백한 사실이다. 기존에 알려진 박테리오신 생산조절은 세포농도 의존적 quorum-sensing mechanism을 통하여 이루어진다는 것이다[1, 7, 23, 26]. 이 경우 박테리오신은 박테리오신 스스로가 autoinducer로 작용하거나 peptide pheromone이나 autoinducer peptides에 의해 quorum-sensing mechanism을 통해 조절된다고 알려지고 있다[13, 16, 17]. 이 밖에도 박테리오신 생산조절에는 pH, 온도, growth phase, 배지조성, 그리고 다른 미생물 등이 중요한 역할을 한다고 알려지고 있다[3-5, 8, 27]. 이와 같이 기존의 연구들에서 보고된 바에 따르면 박테리오신 생산조절은 박테리오신 유도작용이 박테리오신 생산균주 자체내의 특정 peptide에 의해 박테리오신 유도 작용이 일어난다는 것이 대부분이다. 다른 미생물과의 공동배양에 의해 박테리오신 생산이 증진된다는 보고는 있었으나[2, 3, 17, 30] 감수성 균주로부터 박테리오신 생산을 유도하는 유도물질의 존재여부를 보고한 연구로는 Barefoot 등(1994)에 의하여 *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC4792로부터 얻어진 inducing agent의 박테리오신 유도현상 규명이 이루어진 보고가 있었다[3]. 또한 본 실험실에서 김치로부터 김치산패 원인균인 *Lb. plantarum*의 생육을 저해하는 *Leu. mesenteroides* B7을 분리하여 그 감수성 균주(*Lb. delbrueckii* KFRI347, *Lb. plantarum* KFRI464)로부터 분리된 유도물질을 이용하여 박테리오신 생산의 유도현상을 보고 한 바 있다[30]. 박테리오신 생산과 그 박테리오신에 감수성인 균주로부터 단백질성 특성이 있는 유도물질에 관한 연구는 위 2건의 보고가 현재까지 보고된 전부이며, 이 두 경우 모두 유산균 유래 박테리오신과 박테리오신 유도물질을 지니는 감수성 균주 역시 유산균인 경우였다. 그러나 본 연구에서는 이와 같은 현상이 *Bacillus*에도 존재함을 규명한 최초의 보고라는 점에서 그 의의가 더욱 크다 할 것이다.

요 약

박테리오신 BSCX1은 *Bacillus subtilis* cx1에 의해 생산되는 항균성 peptide이다. *B. subtilis* cx1의 박테리오신

(BSCX1)은 *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Listeria monocytogenes* KCTC3569를 포함한 그람양성균과 *Salmonella typhi* ATCC19430, *Escherichia coli* ATCC25922와 같은 그람음성균에 대해서도 비교적 넓은 항균활성 범위를 가진다. 박테리오신 생산균주인 *B. subtilis* cx1과 그것의 감수성 균주인 *B. subtilis* ATCC6633을 공동 배양한 결과, 박테리오신 BSCX1의 생산이 증가됨을 확인할 수 있다. 이 결과는 박테리오신 생산균주 *B. subtilis* cx1의 성장 배지내에 박테리오신 감수성 균주가 존재함이 BSCX1 생산을 촉진시키는 것을 의미 한다. 감수성 균주의 박테리오신 유도 작용을 확인하였으므로 유도물질이 감수성 균주의 어느 위치에 존재하는지 밝히기 위해 *B. subtilis* ATCC6633을 분획하여 실험한 결과 세포내 분획과 세포파쇄물에 모두 유도물질이 존재함을 확인하였다. BSCX1 유도물질의 유도활성은 pH 2.5에서 pH 9.5에 걸쳐 전 구간에서 유지되었으며, 50°C 이상에서는 3시간 이내에 불활성화 되었다. 유도물질에 단백분해효소인 proteinase K를 처리한 결과 유도활성이 사라져 단백질성 물질임을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. Anderssen, E. L., D. B. Diep, J. F. Nes, V. G. H. Eijsink, and J. Nissen-Meyer. 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new-peptide bacteriocins, plantaricin EF and JK and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2269-2272.
2. Antonio, M., J. Rufino, and R. Jose Luis. 2004. Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of gram-positive. *Arch. Microbiol.* **181**: 8-16.
3. Barefoot, S. F., Y. R. Chen, T. A. Bodine, M. Y. Shearer, and M. D. Hughes. 1994. Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin Lactacin B. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3522-3528.
4. Biswas, S. R., P. Ray, M. C. Johnson, and B. Ray. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1265-1267.
5. de Vuyst, L., R. Calleweart, and K. Crabbe. 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* **142**: 817-827.
6. Diep, D. B., L. S. Havarsein, and I. F. Nes. 1995. A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol. Microbiol.* **18**: 631-639.
7. Eijsink, V. G. H., M. B. Brurberg, P. H. Middelhoven, and I. H. Nes. 1996. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *J. Bacteriol.* **178**: 2232-2237.
8. Franz, C. M. A. P., M. E. Stiles, and M. J. Belkum. 2000. Simple method to identify bacteriocin induction peptides and to auto-induce bacteriocin production at low cell density. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**: 81-185.
9. Jack, R. W., J. R. Tagg, and B. Ray. 1995. Bacteriocin of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**: 171-200.
10. Junttila, J., S. E. Niemela, and J. Hirn. 1988. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and mom hemolytic listeria. *J. Appl. Bacteriol.* **65**: 321-327.
11. Kim, S. I., I. C. Kim, and H. C. Chang. 1999. Isolation and identification of antimicrobial agent producing micro-organisms and sensitive strain from soil. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**: 526-533.
12. Kim, S. I., J. Y. Chang, I. C. Kim, and H. C. Chang. 2001. Characterization of bacteriocin from *Bacillus subtilis* cx1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 50-55.
13. Kleerebezem, M. and L. E. Quadri. 2001. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptide* **22:** 1579-1596.
14. Klein, C., C. Kaletta, and K. D. Entian. 1993. Biosynthesis of the lanthibiotic subtilin is regulated by a histidine kinase/ response regulator system. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 296-303.
15. Klein, C. and K. D. Entian. 1994. Gene involved in self protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2793-2801.
16. Kuipers, O. P., M. M. Beerthuyzen, P. G. de Ruyter, E. J. Luesink, and W. M. de Vos. 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.* **270**: 27299-27304.
17. Kuiper, O. P., P. G. de Ruyter, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos. 1998. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* **64**: 15-21.
18. Lars, A. and A. Holck. 1995. The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Bacteriol.* **177**: 2125-2137.
19. Lee, K. H., H. M. Kwon, C. H. Hong, and S. G. Park. 1999. Characterization of *salmonella* species isolated from poultry slaughterhouse and pork meat processing plants. *J. Food Hyg. Safety* **14**: 97-103.
20. Lee, S. H. and Y. S. Lim. 1997. Antimicrobial effects of schizandra chinensis extract against *Listeria monocytogenes*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 442-447.
21. Mah, J. H., K. S. Kim, J. H. Park, M. W. Byun, Y. B. Kim, and H. J. Hwang. 2001. Bacteriocin with a broad antimicrobial spectrum, produced by *Bacillus* sp. isolated from kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 577-584.
22. Moll, G. N., G. C. K. Roberts, W. N. Konings, and A. J. M. Driessen. 1996. Mechanism of lantibiotic-induced poreformation. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**: 185-191.
23. Nislen, T., I. F. Nes, and H. Holo. 1998. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. *J. Bacteriol.* **180**: 1848-1854.

24. Paik, H. D., N. K. Lee, K. H. Lee, Y. I. Hwang, and J. G. Pan. 2000. Identification and partial characterization of cerein BS229, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* BS229. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 195-200.
25. Park, S. Y., Y. J. Yang, Y. B. Kim, J. H. Hong, and C. Lee. 2002. Characterization of subtilein, a bacteriocin from *Bacillus subtilis* CAU131(KCCM 10257). *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 228-234.
26. Reichmnn, P. and R. Hakenbeck. 2000. Allelic variation in a peptide-inducible two-component system of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **190**: 231-236.
27. Sip, A., W. Grajek, and P. Boyaval. 1998. Enhancement of bacteriocin production by *Carnobacterium divergens* AS7 in the presence of a bacteriocin-sensitive strain *Carnobacterium piscicola*. *Int. J. Food Microbiol.* **42**: 63-69.
28. Vincent, G. H. E., M. B. Brurberg, P. H. Middelhoven, and I. F. Nes. 1996. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *J. Bacteriol.* **178**: 2232-2237.
29. Wood, K. V. and M. Woodbine. 1979. Low temperature virulence of *Listeria monocytogenes* in the avian embryo. *Zbi. Bakteriol. hyg. I. Abt. Orig.* A**243**: 74-81.
30. Yang, E. J., J. Y. Chang, H. J. Lee, J. H. Kim, D. K. Chung, J. H. Lee, and H. C. Chang. 2002. Characterization of the antagonistic activity against *Lactobacillus plantarum* and induction of bacteriocin production. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **34**: 311-318.

(Received July 6, 2006/Accepted Aug. 9, 2006)