

## *Bacillus cereus* 증식 억제능을 가지는 *Bacillus licheniformis* SCK 121057의 분리 및 특징

김용상<sup>1</sup> · 윤숙현<sup>1</sup> · 정도연<sup>2</sup> · 한금수<sup>2</sup> · 엄태봉<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>전북대학교 자연과학대학 생물과학부 및 전북대학교 유전공학연구소, <sup>2</sup>순창장류연구소

### Isolation of *Bacillus licheniformis* Producing Antimicrobial Agents against *Bacillus cereus* and Its Properties

Yong Sang Kim<sup>1</sup>, Suk Hyun Yun<sup>1</sup>, Do Yeon Jeong<sup>2</sup>, Kum Su Hahn<sup>2</sup>, and Tai-Boong Uhm<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biological Sciences and Institute for Molecular Biology and Genetics, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Republic of Korea

<sup>2</sup>Institute of Sunchang Fermented Soybean Products, Sunchang 595-804, Republic of Korea

(Received July 26, 2010/Accepted August 18, 2010)

In order to manufacture *Bacillus cereus*-free fermented soybean products, an antimicrobial agent-producing isolate against *B. cereus* was obtained from 150 traditionally fermented soybean products. The morphological and biochemical tests and the phylogenetic relationship among 16S rRNA gene sequences indicated that the isolate named as the strain SCK 121057 was most closely related to *Bacillus licheniformis*. The *B. licheniformis* isolate began to produce the antimicrobial agent after 48 h of incubation. The agent was nonproteinaceous and insensitive to heat, long term storage and protease K. Electron microscopic observation indicated that the agent attacked the membrane of *B. cereus*, leaving the ghost cell. The isolate inhibited growth of *B. subtilis*, *Lactobacillus brevis* and various types of pathogenic strains including *Escherichia coli*, *E. faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, and *A. parasiticus* as well as *B. cereus*. After coinoculation of *B. licheniformis* SCK 121057 and *B. cereus* in the ratio (as the basis of CFU/g sample) of 10 to 1 on the surface of cooked soybeans, cell numbers of *B. cereus* had been dramatically reduced after 31 days of incubation compared to those of single inoculation of *B. cereus*.

**Keywords:** antibacterial agent, antifungal agent, *B. cereus*, *B. licheniformis*

*Bacillus mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*와 함께 *Bacillus* subgroup I 에 속하는 그람 양성균인 *B. cereus*는 토양 및 공기 부유 미생물로서 전통 장류 제조 시 쉽게 오염되어 구토형 독소인 cereulide와 설사나 장염을 일으키는 독소인 non-hemolytic enterotoxin (Nhe), hemolytic enterotoxin (Hbl), cytotoxin K (CytK)를 분비한다. 이들 중 D-형 아미노산을 함유하며 cyclic peptide의 구조를 가지는 cereulide는 단백질로 구성된 설사 독소들과는 달리 열이나 단백질 가수분해에 대해 강한 저항성을 가지고 있다. *B. cereus*의 설사 독소 유전자는 염색체 상에 위치하는 반면 구토형 독소 유전자는 플라스미드에 위치하기 때문에 *B. cereus*는 구토 및 설사를 동시에 일으키는 종과 설사만 일으키는 종으로 구분할 수 있다. 설사형 독소 균주의 경우 외부 환경에 따라 전사 조절 단백질인

phospholipase C regulator (PlcR)가 전사인자인 PapR과 결합하여 독소 발현량을 조절하기 때문에 발효 상태에 따라 독소 분비량은 달라진다(4).

이에 따라 한국식품의약품안전청(KFDA)은 식품 안전성 확보를 위해 2007년부터 된장, 고추장, 청국장, 춘장을 포함하는 모든 시판 장류 제품에서 허용 *B. cereus* 균 수를  $1 \times 10^4$  CFU/g 이하로 고시하였다. 그러나 *B. cereus*는 자연계에 흔할 뿐 아니라 포자를 형성하여 열에 잘 견디고 장류에서 잘 자라기 때문에, 위해 요소 중점 관리 제도(HACCP)가 정착되지 않은 대부분의 전통 장류 제조업체에서는 KFDA가 정한 *B. cereus* 균수 상한선을 맞추기가 어려운 상황이다. *B. subtilis*와 *B. licheniformis*는 장류 발효에서 가장 중요한 역할을 하는 세균이며, 이들 중 일부 균주들은 다양한 종류의 계면 활성제나 항생물질들을 생산하여 경쟁 관계에 있는 주위 균들의 증식을 저해하는 것으로 보고되고 있다(5, 7, 10, 12, 15). *B. subtilis*

\* For correspondence. E-mail: tbuhm@jbnu.ac.kr; Tel: +82-63-270-3439, Fax: +82-63-270-3362

의 bacitracin, surfactin, iturins, *B. licheniformis*의 lichenysin, lichenicidine 등은 이와 같은 펩타이드계 저분자 물질로서 항세균 또는 항진균 특성을 나타낸다(1, 2, 6, 12, 14, 15). 우리는 전통 장류에서 *B. cereus* 계수 모니터링 동안 일부 제품에서 *B. cereus* 균수가 매우 낮다는 것을 발견했다. 이는 *Bacillus* 속들끼리 서로 길항적으로 작용하여 *B. cereus*에 대한 항균 능력이 있는 균의 우세 때문일 것으로 생각할 수 있기 때문에 이들 장류에서 *B. cereus*를 억제하는 발효균들의 분리를 시도 하였다.

본 연구는 전통 장류의 발효 시 문제되는 독소 생산 *B. cereus* 균의 증식을 효율적으로 억제하는 균들을 분리하고 그 특성을 조사한 뒤, 장류 생산에 적용 함으로서 *B. cereus*가 없는 무독성 전통 장류를 생산하는 데 그 목표를 두었다.

## 재료 및 방법

### *B. cereus* 길항균의 분리

전통 방법에 따라 제조한 150종의 된장 고추장, 청국장들을 구입 후 5 g을 취해 0.3 mM 인산 완충액(pH 7.2)으로 희석하였다. Nutrient agar (NA)와 *B. cereus* 선택 배지[chromogenic polymyxin B-methoprim agar (CPMA)] 표면에 희석된 균액을 각각 200  $\mu$ l씩 도포하고 30°C에서 24시간 배양 후, NA에서 자란 집락수에 비해 CPMA에서 자란 집락수의 비율이 매우 낮았던 12종의 장류를 선발하였다. NA에서 배양한 이 선발 장류의 집락들을 toothpick로 찍어 미리 만들어둔 NA와 CPMA 배지의 같은 위치에 각각 접종하여 24시간 후 CPMA에 자라지 않은 균들만을 수집하였다. 수집한 균들을 대상으로 Yun 등의 방법(16)에 따라 *B. cereus* 독소 유무 검사를 한 뒤, 선발한 균들을 Nutrient broth (NB)에 37°C, 78시간 배양하고 1,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 상층액만을 모아 -20°C에 보관하였다.

표준 균주인 *B. cereus* KACC 11240과 본 실험실에서 분리한 *B. cereus* JBE 0001 (GenBank accession no. FJ 982655), JBE 0002 (FJ 982656), JBE 0004 (FJ 982654), JBE 0005 (FJ 982657), JBE 0006 (FJ 982658), JBE 0008 (FJ 982659), JBE 0011 (FJ 982661)을 NB에서 37°C, 21시간 배양 후 100  $\mu$ l를 각 NA 표면에 골고루 도말하고 배지 중앙에 4 mm paper disc (3 M filter paper)를 올려놓았다. 냉동 보관했던 원심분리 상층액을 녹여 paper disc 중앙에 20  $\mu$ l를 분주하고 21시간 37°C로 배양 뒤 투명한 크기를 측정하여 8종의 *B. cereus* 모두에 대해 길항 능력을 가진 한 종(SCK 121057)을 분리하였다.

### 실험균들의 배양과 길항력 측정 방법

*B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* 배양은 Nutrient broth (NB) 배지, *B. cereus* 검출은 CPMA, *Lactobacillus brevis*와 *Enterococcus faecalis* 배양은 각각 *Lactobacilli* MRS broth와 Trypticase soy broth, *Aspergillus*

*flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*는 potato dextrose broth, *Candida albicans*는 yeast extract broth를 사용하였다. 사용한 균주들은 *B. cereus* JBE 및 *B. licheniformis* SCD strain들을 제외하고 표준 균주(type strain)이었으며 JBE 및 SCD strain들은 순창장류연구소가 수집하여 16S rRNA 유전자 서열 판독 후 계통도 분석과 46종류의 생화학적 검사에 의해 동정된 균주들이었다. 배양온도로 *A. ochraceus*는 25°C, *L. brivis* 28°C, *Aspergillus* 및 *C. albicans*는 30°C, 나머지 균들은 37°C에서 배양하였다. 이들 균주 증식에 대한 SCK 121057 균의 길항력은 각 균의 최적 온도에서 배양한 뒤 paper disc 주변의 투명한 직경으로 표시하였다.

### *B. cereus* 길항균의 동정

생화학적 동정을 위해 균을 새로운 NA 배지에 접종하고 37°C에서 18시간 배양하였다. 형성된 집락은 NA 배양액에 희석 후 46종 건조 배지 및 생화학 반응물로 구성된 BCL ID card (bioMérieux Vitek Inc., USA)에 주입하였고, 15분 간격으로 결과들이 VITEK 2 Compact software (bioMérieux Vitek)에 통합적으로 저장 분석되면서 14시간 후 동정이 완료되었다.

16S rRNA 유전자의 염기서열에 의한 균 동정을 위해 universal primer로서 518F (5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG-3')와 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3')을 이용, 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭 후, 동정에 중요한 50-900 bp 염기 서열을 포함하는 1,443 bp를 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems Inc., USA)를 사용하여 해독하였다. 이 염기 서열은 NCBI database로부터 BLASTN program (17)과 Ribosomal Database Project 10.10 (RDP)의 Seqmatch program (version 3)을 사용하여 표준 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들과 상동성을 비교하였다. 표준 균주와 함께 16S rRNA 유전자 서열과 높은 서열 일치도를 보인 균주들 중 계통 프로젝트를 통해 균주 동정에 대한 신뢰성이 확인된 균주들도 함께 사용하였으며 염기 서열들 간의 상호 비교는 CLUSTAL W 프로그램(13)을 사용하였다. 계통도는 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들을 정렬하고 시각적 관찰과 수작업으로 gap이 최소화되도록 보정한 후 Kimura's two-parameter method (8)와 maximum parsimony method를 사용하여 작성하였다. 산출한 각각의 계통수에서 각 분지에 대한 통계학적 신뢰도를 산출하기 위해 Bootstrap 분석을 1,000회 실행하였으며 계통 분석과 bootstrap 분석은 PAUP (version 4.0b)을 사용하였다(11).

### SCK 121057균의 독소 및 항균물질 유전자 유무

SCK 121057균이 *B. cereus*의 설사 독소 유전자(*nheABC*, *hblACD*, *cytK*) 또는 구토 독소 합성 효소 유전자(*cesA* 및 *cesB*)를 갖는가를 확인하기 위하여 Yun 등의 방법(16)에 따라 multiplex PCR을 실시하였다. Cereulide 합성 효소 유전자 *cesA*, *cesB* 및 설사독소들을 발현시키는 전사조절 유전자 *plcR-papR* 검출용 primer 서열들은 Table 1과 같고, PCR 조건으로 94°C에서 2분간 초기 변성 후, 94°C 1분간 변성, 58°C

**Table 1.** The PCR primers used in this study

Primer pair	Sequence	Target sequence (GenBank accession no.)	Size (bp)
cesAF cesAR	GTTGGCGTGTATGTGATCG GGTGAACAGCTTCTCTCTGC	Cereulide synthetase A, <i>cesA</i> (AB248763)	662
cesBF cesBR	AAAGAATGTTTCACCGAAGACGGTT ACACACTTCTTTTCCGATTCCACCT	Cereulide synthetase B, <i>cesB</i> (AB248763)	1161
plcRF plcRR	CRGGYGCRGTATACCCAAGT TGAAATACCCCATGYCATYG	Phospholipase C regulatory protein, <i>plcRpapR</i> (DQ153391)	888
lchAF lchAR	ACGGCCGATCAGGAGCTTTC TCTCAGCGCCTTCGATCTGC	Lichenysin synthetase, <i>lchAA</i> (AJ005061)	557
lchBF lchBR	TTTGACCCGGAGCTCGTTGA CTGAGGGCGGAAAGCAGGAT	Lichenysin synthetase, <i>lchAB</i> (AJ005061)	706
lchCF lchCR	CATGTATACGGGCCGACGGA CTGAAGCCCGAGATGGCTT	Lichenysin synthetase, <i>lchAC</i> (AJ005061)	1173
lanM1F lanM1R	TCGCTGACCACCGAGGAAAA CGCTTTCTGCATGGTCCCAG	Lantibiotic modification enzyme1, <i>licM1</i> (NC006270)	571
lanM2F lanM2R	CGACAGCGCACTACGCCCTCT TCCCGCATGCTGCAGAAAAAT	Lantibiotic modification enzyme2, <i>licM2</i> (NC006270)	776
srfAF srfAR	CAGCGGCAGCGGATTAATG GGCCTTCAAATCGCCTGCT	Surfactin synthetase A, <i>srfAA</i> (NC000964)	1,025
srfBF srfBR	CGGTGTGTCATGGCGGATTT TCGAAAGCGGACGGTTCAA	Surfactin synthetase AB, <i>srfAB</i> (NC000964)	696
srfCF srfCR	TTCACTGTCGGAGGCGGAAA ACCGGCAGATAGGCTGCTCC	Surfactin synthetase AC, <i>srfAC</i> (NC000964)	933

1분간 결합, 72°C 1분간 증폭 과정을 30회 반복하고 72°C에서 5분간 마지막 증폭을 실시하였다. 항균물질 유전자 유무를 확인하기 위해 *B. licheniformis*의 lichenysin 합성 효소 유전자인 *lchAA*, *lchAB*, *lchAC*와 lantibiotic 수식 효소 유전자인 *licM1*, *licM2*, *B. subtilis*의 surfactin 합성효소 유전자 *srfAA*, *srfAB*, *srfAC*를 선택하여 PCR을 수행하였다. 사용한 primer 서열들은 Table 1과 같고, PCR 조건은 94°C에서 2분간 초기 변성 후, 94°C 1분간 변성, 60°C 1분간 결합, 72°C 1분간 증폭 과정을 30회 반복하고 72°C에서 5분간 마지막 증폭을 실시하였다.

#### 주사전자현미경(SEM)에 의한 길항 작용의 확인

37°C에서 21시간 배양한 *B. cereus* JBE 0006 배양액 1 ml에 동일 조건에서 배양한 SCK 121057의 원심분리 상층액 2 ml를 넣고 37°C에서 8시간 더 배양시켰다. 배양액을 1,000 rpm에서 3분간 원심 분리 후 상등액을 제거하고 9% NaCl로 2번 pellet을 세척한 뒤 2.5% glutaraldehyde 1차 고정, 1% osmium tetroxide 2차 고정, ethanol 탈수과정을 거쳤다. 고정 탈수된 균을 membrane filter (0.22 µm, Millipore JG)에 옮기고 80°C에서 10시간 건조시킨 뒤 ion sputter로 20분간 금(Au)을 코팅시켜 주사전자현미경(Bio-LV SEM, Hitachi, Japan)에서 관찰하였다.

#### 장류 적용 실험

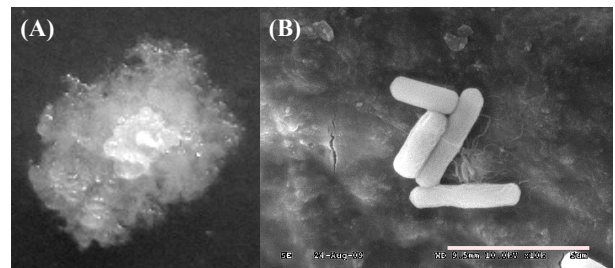
37°C, 21시간 배양한 *B. cereus* JBE 0008 배양액 0.1 ml과 동일 조건에서 배양한 SCK 121057 배양액 0.9 ml을 섞어 미

리 멸균한 삶은 콩에 접종하고 47°C, 50시간 배양하여 청국장을 제조하였다. 대조균은 *B. cereus* JBE 0008 배양액 0.1 ml과 NB 0.9 ml을 넣고 같은 조건에서 청국장을 제조하였다. 발효한 청국장을 상온(22-24°C)으로 옮겨 날짜 별로 일정량 콩을 꺼내 NB에 희석한 뒤, CPMA 표면에 희석액 100 µl를 도포하여 *B. cereus* 집락수를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### SCK 121057의 동정 및 특성

NA에서 배양 후 형태는 백색의 집락 주위로 반투명의 광택 환을 형성하였다(Fig. 1A). 균을 1,500× 배율의 광학 현미경으로 관찰하였을 때 움직임이 매우 활발하였고 그람 염색에서 양성을 나타냈다. 10,000배로 확대한 주사전자현미경(SEM) 관찰 결과 균의 형태는 간균으로 0.7-0.8 µm × 2.2-4.0 µm의 크기를 보였으며 편모들을 가진 것이 확인되었다(Fig. 1B). 46종류



**Fig. 1.** (A) Colony morphology and (B) scanning electron micrograph of the strain SCK 121057.

**Table 2.** Biochemical characterization for the identification of the strain SCK 121057

Test	Reaction	Test	Reaction
β-Xylosidase	-	Phenylalanine arylamidase	+
L-Lysine arylamidase	-	L-Proline arylamidase	-
L-Aspartate arylamidase	-	β-Galactosidase	+
D-Mannose	+	L-Pyrrolydonyl arylamidase	+
D-Melezitose	-	α-Galactosidase	-
N-Acetyl-D-glucosamine	-	Alanine arylamidase	+
Palatinose	+	Tyrosine arylamidase	+
L-Rhamnose	-	β-N-Acetyl-glucosaminidase	-
β-Glucosidase	+	Ala-Phe-Pro arylamidase	-
β-Mannosidase	-	Cyclodextrin	+
Phosphorylcholine esterase	+	D-Galactose	-
Pyruvate	-	Glycogen	+
α-Glucosidase	+	Myoinositol	+
D-Tagatose	-	Methyl-α-D-glucopyranose	+
D-Trehalose	+	Ellman	+
Inulin	-	Methyl-D-xylosidase	-
D-Glucose	+	α-Mannosidase	-
D-Ribose	-	Maltotriose	+
Putrescine assimilation	-	Glycine arylamidase	-
Growth in 6.5% NaCl	+	D-Mannitol	+
Kanamycin resistance	+	Esculin hydrolase	+
Oleandomycin resistance	-	Tetrazolium red	+
Leucine arylamidase	+	Polymyxin B resistance	+

의 생화학적 검사 결과를 Vitec 2 Compact Software에서 분석한 결과 91%의 확률로 *B. licheniformis*로 분류되었다(Table 2), 계통도 분석 결과 SCK 121057은 표준 균주인 *B. licheniformis* DSM 13과 가장 가까운 근연 관계로 16S rRNA 유전자 서열 상동성은 99.72% (1,439 bp/1,443 bp)였다(Fig. 2). 따라서 생화학 분석과 계통학적 분류를 고려하여 SCK 121057을 *B. licheniformis*로 동정하였다.

**SCK 121057 배양 중 항균 물질 생성**

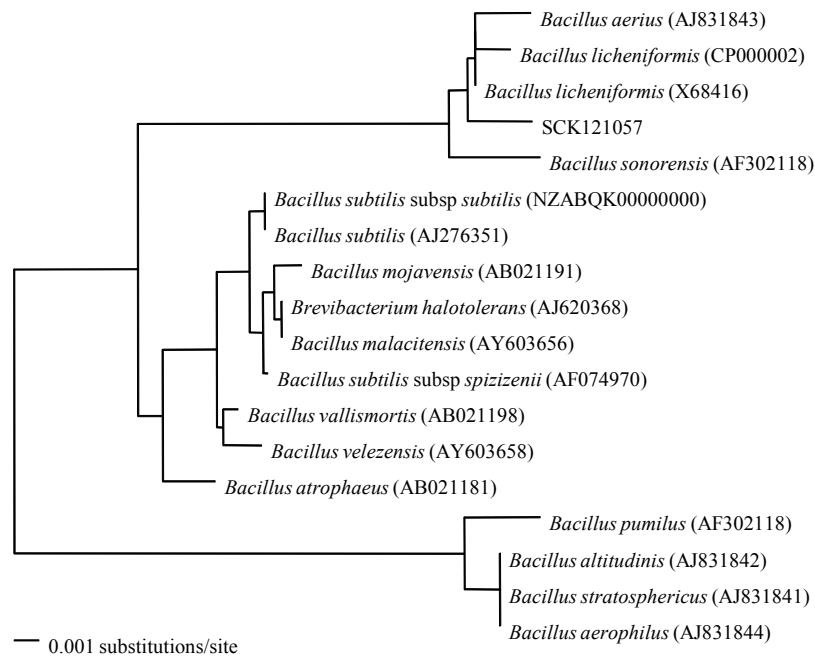
Fig. 3은 SCK 121057균을 NB배지에서 37°C로 배양했을 때 배양 시간에 따른 성장 곡선과 항균 물질의 생성을 나타낸 것이다. 균 증식은 배양 후 18시간에 최대에 도달하였지만 항균 물질 생성은 48시간 이후부터 급격히 증가하여 90-100시간 이후부터는 일정한 활성을 보였다. 미생물 증식 과정 중 사멸기에 이르러 항균 물질 방출이 시작된 점과, *B. subtilis*가 생산하는 항균 물질인 surfactin 생성과 포자 형성 개시는 서로 연관이 있다는 보고(9)를 고려할 때, 이 항균 물질 생성은 영양 물질의 고갈 또는 포자 형성과 관련되어 있는 것으로 추정되었다.

항균력을 나타내는 투명환의 직경은 27°C에서 82시간 배양 시 5.5 mm, 37°C에서 8 mm, 47°C에서 4 mm로서 37°C의 배양 조건이 항균 물질 생산에 적합한 온도였다.

**항균 물질의 특징**

항균 물질의 물리화학적 특성을 알기 위하여 온도에 의한 영향과 가수분해 효소의 반응성을 조사하였다. 배양액(pH 8.6°C±0.2)을 37°C에서 3개월간 밀봉 저장한 후 항균 활성력은 밀봉 전과 동일하였다. 또한 배양 상등액을 121°C에서 10분간 고압 멸균한 뒤 항균 활성은 멸균 전과 차이가 없었고, 배양액 ml당 400 U의 proteinase K를 넣고 50°C에서 30분간 반응시킨 후의 항균 활성도 비처리군과 같았다(Fig. 4). 대표적인 발효균인 일부 *B. subtilis*은 200 μM의 농도에서 적혈구 용혈 작용을 가지는 계면 활성제인 surfactin을 비롯한 다수의 bacteriocin을 생산하며 일부 *B. licheniformis*는 lichenysin 이 외 항진균 및 항세균 특성을 가지는 lichenicidine과 bacteriocin 들을 생산한다. Cyclic lipopeptide 구조를 가진 *B. subtilis* surfactin (MW 1.036 kDa)과 *B. licheniformis* lichenysin A (MW 1.006-1.034 kDa)는 구조 내 protease 저항성을 나타내는 D-형 아미노산과 cyclic peptide로 구성되어있어 protease 저항성을 가지며, *B. licheniformis*가 생산하는 peptide 항생제인 lichenicidin의 경우 100°C에서 4시간 저장이나 protease K 처리 후에도 활성을 잃지 않았다고 보고되었다(2).

항균 물질의 열 저항성과 protease 저항성이 *B. licheniformis*가 생산하는 lichenysin이나 lichenicidin, 또는 *B. subtilis*의 surfactin의 물리화학적 특성과 유사하였으므로 SCK 121057균



**Fig. 2.** Neighbour-joining tree based on 16S rRNA sequences (1,443 bp), showing the phylogenetic relationship between the strain SCK 121057 and closely related species of *Bacillus*. Bar, 1 substitution per 1,000 nucleotides.

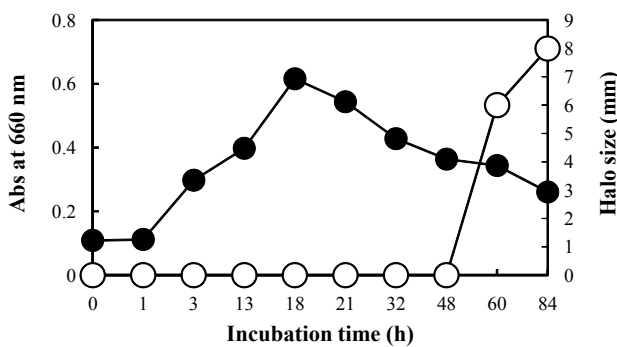
이 이들 합성 효소 유전자나 수식 효소 유전자들을 가지는지 확인하고자 PCR을 수행하였다. 양성 대조군으로 사용한 *B. licheniformis* SCD 112023는 lichenysin A 합성 효소 유전자 *lchAA*, *lchAB*, *lchAC* 및 lichenicidine 수식 효소 유전자인 *licM1*, *licM2*와 surfactin 합성 효소 유전자 *srfAA*, *srfAB*, *srfAC*를 모두 함유했던 반면(Fig. 5A), SCK 121057에서는 이들 유전자들 어느 것도 검출되지 않았다(Fig. 5C). 또한 SCK 121057은 *B. cereus*의 구토 독소 합성 효소 유전자 *cesA*, *cesB*와 설사독소 전사조절 유전자인 *plcR* 및 *papR*도 함유하지 않아 *B. cereus* 장독소들 역시 생산하지 않음을 알 수 있었다(결과 미제시). SCK 121057의 항균 물질은 앞으로 구조 분석이 필요하지만 저장 보존성과 매우 높은 열 안정성, 비특이적

protease에 의해 분해되지 않는 것으로 볼 때 일반 단백질의 성분이 아닌 D-형 아미노산이 포함되어거나 cyclic form으로 된 peptide 계열 물질, 또는 저분자의 비 단백질 계통의 화학 물질로 추정되었다.

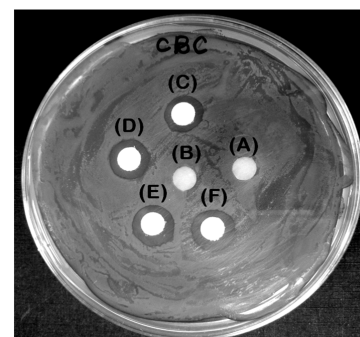
**SCK 121057의 항균 spectra**

SCK 121057균의 병원성 세균 및 곰팡이에 대한 항균 효과는 Table 3에 요약되어 있다.

표준 균주들과 전통 장류에서 분리한 *B. cereus* 12종을 대



**Fig. 3.** Growth curve of the strain SCK 121057 and the production of antimicrobial agents at various incubation times. Dark circles and open circles indicate growth curve and halo size indicating antimicrobial activities, respectively.



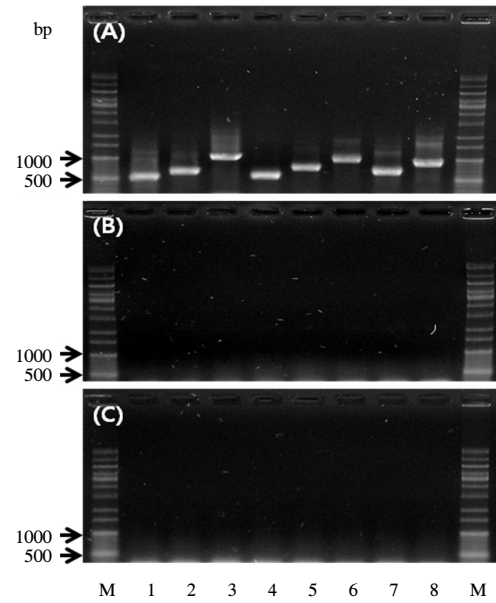
**Fig. 4.** Antimicrobial activity of culture filtrate of the strain SCK 121057 against *B. cereus* JBE 0008. (A) Distilled water; (B) proteinase K solution (8 U in 20 µl DW) incubated at 50°C for 30 min; (C) culture filtrate without treatment; (D) culture filtrate incubated at 50°C for 30 min; (E) culture filtrate treated with proteinase K (8 U in 20 µl culture filtrate) at 50°C for 30 min; (F), culture filtrate autoclaved at 121°C for 10 min. Amount of loaded sample on the paper disc was 20 µl.

**Table 3.** Antimicrobial activities of the strain SCK 121057 against bacteria and fungi

Test strain	Halo (mm)	Culture condition <sup>a,b</sup>
<i>B. cereus</i> KACC 10001	11-14	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> KACC 10004	10-11	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> KACC 11240	12-14	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> KACC 12672	7-9	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> KACC 12682	12-15	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> JBE 0001	7-9	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> JBE 0002	11-13	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> JBE 0004	15-19	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> JBE 0005	6-8	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> JBE 0006	13-17	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> JBE 0008	7-8	NA, 37°C
<i>B. cereus</i> JBE 0011	10-11	NA, 37°C
<i>B. licheniformis</i> KCTC 1918	0	NA, 37°C
<i>B. licheniformis</i> SCD 121033	0	NA, 37°C
<i>B. licheniformis</i> SCD 121035	0	NA, 37°C
<i>B. licheniformis</i> SCD 122037	0	NA, 37°C
<i>B. licheniformis</i> SCD 123021	0	NA, 37°C
<i>B. licheniformis</i> SCD 124031	0	NA, 37°C
<i>B. subtilis</i> KCTC 1021	8-9	NA, 37°C
<i>B. subtilis</i> KCTC 1107	10-11	NA, 37°C
<i>B. subtilis</i> KCTC 1326	9-10	NA, 37°C
<i>B. subtilis</i> KACC 11974	9	NA, 37°C
<i>B. subtilis</i> KACC 12610	9-10	NA, 37°C
<i>B. subtilis</i> KACC 12680	6-7	NA, 37°C
<i>E. coli</i> KACC 13821	11-13	NA, 37°C
<i>E. faecalis</i> KACC 11304	7	TSA, 37°C
<i>M. luteus</i> KACC 13377	10-11	NA, 37°C
<i>L. brevis</i> KACC 11433	7-8	MRS, 28°C
<i>P. aeruginosa</i> KACC 10259	0	NA, 37°C
<i>S. aureus</i> KACC 10778	11-12	NA, 37°C
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> KCTC 1621	10-11	NA, 37°C
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> KCTC 1916	10-11	NA, 37°C
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> KCTC 1927	11-12	NA, 37°C
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> KCTC 3881	8-9	NA, 37°C
<i>A. flavus</i> KACC 41403	14-15	PDA, 30°C
<i>A. flavus</i> KACC 41809	9-10	PDA, 30°C
<i>A. flavus</i> KCTC 6134	16-17	PDA, 30°C
<i>A. flavus</i> KCTC 6905	9-11	PDA, 30°C
<i>A. flavus</i> KCTC 16682	9-10	PDA, 30°C
<i>A. fumigates</i> KACC 41186	0	PDA, 30°C
<i>A. ochraceus</i> KACC 40077	10	PDA, 25°C
<i>A. parasiticus</i> KACC 40074	15-16	PDA, 30°C
<i>A. parasiticus</i> KACC 41862	11-12	PDA, 30°C
<i>A. parasiticus</i> KCTC 6598	15-16	PDA, 30°C
<i>C. albicans</i> KACC 30062	0	YEA, 30°C

<sup>a</sup> NA, Nutrient agar; TSA, Trypticase soy agar; MRS, *Lactobacilli* MRS agar; PDA, Potato dextrose agar; YEA, Yeast extract agar.

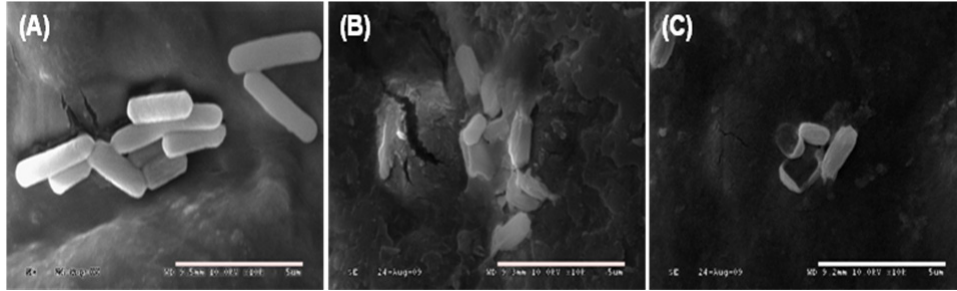
<sup>b</sup> The bacteria and fungi were grown on agar plates for 18-21 h and 4 days, respectively.



**Fig. 5.** Gel electrophoresis of PCR products for the detection of lichenysin synthetase A, B, and C genes (lanes 1 to 3), lantibiotic modification enzyme 1 and 2 genes (lanes 4 to 5), and surfactin synthetase A, B, and C genes (lanes 6 to 8). (A) *B. licheniformis* SCD 112023 as a positive control. (B) *B. licheniformis* SCD 112028 as a negative control. (C) The strain SCK121057.

상으로 한 증식 억제 효과에서, 저해 정도에 차이는 있었으나 12종 모두 SCK 121057의 항균 물질에 의해 저해를 받았다. 이러한 점을 고려할 때 장류 발효 균으로 SCK 121057과 같은 *B. cereus* 저해균의 사용은, HACCP 시스템의 도입이 어려운 장류 업체에서 오염 문제를 해결할 수 있는 효과적 대안으로 여겨진다. 장류 주요 발효 균주들인 *B. subtilis*와 *B. licheniformis* 각 6종을 대상으로 저해 효과를 확인한 결과 *B. licheniformis*에 대해서는 전혀 증식 저해를 보이지 않았으나 *B. subtilis*들에 대해서는 모두 증식이 억제되었다. 따라서 SCK 121057균을 장류 주 발효균으로 사용할 경우 *B. subtilis*들은 증식 저해 때문에 발효 과정에 효과적으로 관여 못할 것으로 예상되었다. 이 항균 물질은 또한 효모인 *Candida albicans*를 제외하고 곰팡이들에 대해 항진균 특성을 나타냈는데, ochratoxin A 생산 균인 *A. ochraceus*와 aflatoxin B, G, M을 생산하는 *A. flavus* 및 *A. parasiticus* 균들에 대해 효과적(투명환 직경 9-17 mm)이었다. 전통 장류 발효 시 mycotoxins의 생성은 위생상 중요한 문제이고 이들 독소들은 간암이나 신장 독성을 유발할 수 있기 때문에 항진균 효과를 가진 이 균의 사용은 숙성과정에서 위생 발효를 위해 가치가 있을 것으로 예상된다. 또한 이 항균 물질은 병원성 세균으로서 *S. aureus*, *E. coli*, *M. luteus*에 대한 저해 능력(투명환 직경 10-12 mm)이 있었고 특히 식중독과 염증 반응에 중요한 병원성 균인 *S. aureus*는 5균주 모두 증식이 확실히 억제되었다. 앞으로 식품 이외 의료나 위생분야에서 사용 가능성을 위해 methicillin 저항 균주(MRSA)를 포함하는 *S. aureus*균들에 대해 이 물질의 항균력을 광범위하게 조사할 필요가 있다.





**Fig. 6.** Scanning electron micrographs of *B. cereus* JBE 0006. (A) Intact *B. cereus*; (B) and (C) *B. cereus* treated with culture filtrate of the strain SCK 121057 for 8 h. Bar length is 5  $\mu$ m.

**SEM에서 항균 작용의 확인**

SCK 121057 배양액의 원심분리 상층액을 *B. cereus* 배양액에 넣고 8시간 추가 배양 후 전자 현미경 결과는 Fig. 6와 같다. Fig. 6A는 원심분리 상층액을 넣지 않은 *B. cereus* 사진으로 표면이 말끔한 간균 형태를 보였다. 그러나 원심분리 상층액을 첨가한 경우 세포막이 터지거나 녹아 내용물이 흘러나온 형태(Fig. 6B)를 보였으며, 세포 껍질만 있는 ghost도 나타났다(Fig. 6C). 일반적으로 처리 후 균 표면은 대조 군에 비해 거칠며 부분적으로 녹아있는 형태를 나타냈고 전체적으로 균의 크기도 감소되어 있었다. 전자 현미경 관찰로부터 SCK 121057의 항균 성분은 세포막 구조에 직접적으로 작용하거나, 세포막 합성이나 대사에 영향을 주는 것으로 보인다. 이와 함께, 활발하게 증식한 *B. cereus* JBE0006 배양액 0.5 ml에 SCK121057 배양 원심 상층액 0.5 ml를 첨가하고 37°C에서 3시간과 6시간 후에 *B. cereus*의 운동성을 녹색 필터를 장착한 위상차 현미경에서 관찰했다. 첨가 직전 *B. cereus* 균들은 매우 활발한 운동성을 보였으나 첨가 3시간 후 움직임은 현저히 감소했고, 6시간 후에는 거의 정지 되었다(결과 미제시).

**제조 적용 실험**

한천 배지 상에서 SCK 121057균은 12종의 다른 *B. cereus* 들에 대해 모두 증식 저지력을 나타냈다. 하지만 실제 장류 발효 과정 중에서도 *B. cereus*에 대한 증식 억제능이 있는지 확인하기 위하여 SCK 121057과 *B. cereus* JBE0008을 삶은 콩 g당 각각  $2.2 \times 10^5$  CFU와  $2.33 \times 10^4$  CFU(약 10:1)로 혼합 접

종한 뒤 21-23°C의 조건에서 31일간 *B. cereus* 균수 변화를 관찰하였다(Table 4). 두 균 사이의 비율 10의 값은 주 발효균인 SCK 121057가 삶은 콩에서 증식하는 동안 1/10 비율로 *B. cereus*가 오염된다는 가정이며 실제 오염 비율은 장류 제조 환경에 따라 달라질 수 있다. *B. cereus*만 접종한 대조군은 배양 시간이 증가함에 따라 꾸준히 증가하여 한달 후  $5.1 \times 10^6$  CFU/g까지 증가한 반면, SCK 121057균과 혼합 접종한 경우 *B. cereus* 균수는  $1.3 \times 10^2$  CFU/g에 머물러 장류 제조에 실제 적용 가능함을 보였다. 따라서 SCK 121057균의 장류 적용 시험에서는 KFDA의 *B. cereus* 허용 기준( $1 \times 10^4$  CFU/g sample)을 충족시켰다.

**식품 적용에 안전성 고찰**

미국 식품의약품안전청(FDA)는 *B. licheniformis* 발효로 제조한 6종의 효소 제품(GRAS Notice Inventory No. 22, 24, 72, 79, 265, 277)들을 GRAS로 인증하였고 미국 환경보호청(EPA)은 *B. licheniformis* 균의 인체에 대한 유해성과 안전성을 평가하였다. EPA는 *B. licheniformis*가 인간의 건강과 환경에 위해를 끼친다는 보고 없이 장기간 amylase, protease, 항생제 등의 발효 산업에 주요하게 사용되어왔기 때문에 *B. subtilis*와 동등한 수준에서 이 균의 인체 위험도가 낮다고 평가하였다(3). 최근 우리가 조사한 150여 종의 국내 전통 장류에는 *B. licheniformis*, *B. velezensis*, *B. subtilis*가 주 발효 세균이었으며, *B. cereus*를 제외하고 이들 균들에 의한 위생적인 문제들이 현재까지 보고된 바는 없다. 그러나 GRAS로 인식해왔던 *B. subtilis*까지도 24종의 계면활성제와 항생물질들을 생산하며 각 항균 물질들의 독성은 아직까지 정량적으로 평가되지 않았다. PCR에 의한 유전자 확인에서 SCK 121057은 *B. licheniformis*과 *B. subtilis*의 일부 균주가 생산하는 계면활성제 lichenysin, surfactin과 항생제 lichenicidine을 생산하지 않는 것으로 보이지만 *B. cereus*의 세포벽을 붕괴시키는 항균 물질의 작용으로 보아 고등 동물에서의 세포 독성 가능성이 있다. 산업적인 장류 제조 관점에서 항균 물질을 생산하는 발효균의 채용은, 항균 물질에 의한 인체 독성 문제를 고려해야 함과 동시에 발효과정 중 병원성 균 증식을 억제 함으로서 병원성 독소 생산을 감소시킬 수 있는 양면적인 특성을 가진다고 할 수 있다. 따라서 SCK 121057균을 장류에 사용하기 위해

**Table 4.** Changes in cell numbers of *B. cereus* JBE 0008 during the mixed culture with strain SCK 121057

Incubation (day)	<i>B. cereus</i> cell no. ( $\times 10^3$ /g)	
	<i>B. cereus</i> only	<i>B. cereus</i> + SCK 121057 1:10 (Mixing ratio as CFU/g)
0	2,330	2,330
2	13,900	1
7	120,000	30
14	310,000	33
21	470,000	42
31	510,000	13

항균성 물질들의 구조 규명과 장류 섭취에 대한 인체 안전성 평가가 선행되어야 할 것이고, 이를 위해 이 균으로 제조한 장류 제품을 동물에서 독성 검사를 통해 안전성을 검증 받을 필요가 있다.

## 적요

장류 제조에 *Bacillus cereus*의 오염을 줄이기 위한 방법으로 전국 150 종 장류에서 분리한 무독소 *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus licheniformis* 균들을 대상으로 *B. cereus*에 대해 억제 능력이 큰 한 균주 SCK 121057를 선발하였다. SCK 121057은 생화학 검사 및 16S rRNA 유전자 서열에 의한 계통도 분석 결과 *B. licheniformis*로 동정되었고 12 종의 *B. cereus* 이외에 중요 병원성 균인 *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus* 등의 증식을 억제하였다. SCK 121057이 생산하는 항균 물질은 고압멸균 조건에서 열 안정성, proteinase K에 대한 가수 분해 저항성, 37°C에서 장기 저장성을 지닌 구조적으로 매우 안정한 물질이었고, 전자현미경 관찰에서 이 물질은 *B. cereus*의 세포막을 손상시켜 ghost cell을 형성하였다. SCK 121057 균과 *B. cereus*를 혼합 접종한 청국장 적용 실험 결과 *B. cereus* 균수는 대조군에 비해 극적으로 감소되었다.

## 감사의 말

본 연구는 2010년 수행 농림기술개발사업(ARPC-20083069) 및 2010년 전북대학교 자연계열 대학원생 지원 프로그램(김용상)에 의해 지원되었습니다. 표준 균주들을 분양해 준 한국농업미생물자원센터(KACC)에 감사 드립니다.

## 참고문헌

- De Lucca, A.J. and T.J. Walsh. 1999. Antifungal peptides: Novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1-11.
- Dischinger, J., M. Josten, C. Szekat, H. Sahl, and G. Bierbaum. 2009. Production of the novel two-peptide lantibiotic lichenicidin by *Bacillus licheniformis* DSM 13. *PLoS One* 4, 1-11.
- Edberg, S.C. 1992. US EPA human health assessment: *Bacillus licheniformis*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., USA.
- Gohar, M., K. Faegri, S. Perchat, S. Ravnum, O. Okstad, M. Gominet, A. Kolste, and D. Lereclus. 2008. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One* 3, 1-9.
- Grangemard, I., J. Wallach, R. Maget-Dana, and F. Peypoux. 2001. Lichenysin: A more efficient cation chelator than surfactin. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 90, 199-210.
- Jung, S.S., J.I. Choi, W.H. Joo, H.H. Suh, A.S. Na, Y.K. Cho, J.Y. Moon, K.C. Ha, D.H. Paik, and D.O. Kang. 2009. Characterization and purification of the bacteriocin produced by *Bacillus licheniformis* isolated from soybean sauce. *J. Life Sci.* 19, 994-1002.
- Katz, E. and A.L. Demain. 1977. The peptide antibiotics of Bacillus: Chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.* 41, 449-474.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evolution* 16, 111-120.
- Nakano, M.M., R. Magnuson, A. Myers, J. Curry, A.D. Grossman, and P. Zuber. 1991. *srfA* is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 173, 1770-1778.
- Ryu, H.S., M.Y. Shon, S.J. Cho, S.K. Park, and S.W. Lee. 2007. Characterization of antibacterial substance-producing *Bacillus subtilis* isolated from traditional Doenjang. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 50, 87-94.
- Swofford, D.L. 1998. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. 4.0 ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Tagg, J.R., A.S. Dajani, and L.W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40, 722-756.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Yakimov, M.M., K.N. Timmis, V. Wray, and H.H. Fredrickson. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1706-1713.
- Yang, E.J. and H.C. Chang. 2007. Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Bacillus subtilis* MJ1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 35, 339-346.
- Yun, S.H., Y.S. Kim, S.K. So, D.Y. Jeong, K.S. Hahn, and T.B. Uhm. 2009. Detection of *plcR-papR* genes by PCR in identifying enterotoxin genes-harboring *Bacillus cereus* strains. *Kor. J. Microbiol.* 45, 425-429.
- Zhang, Z., S. Schwarz, L. Wagner, and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7, 203-214.