

Bacillus subtilis 168 균주가 분비하는 5 kDa 크기의 Bacteriocin

권건희¹ · 이황아² · 김정환^{1,2*}

¹경상대학교 농업생명과학원, ²경상대학교 대학원 응용생명과학부(BK21 program)

A Bacteriocin of 5-kDa in Size Secreted by *Bacillus subtilis* 168. Kwon, Gun-Hee¹, Hwang A Lee², and Jeong-Hwan Kim^{1,2*}. ¹Institute of Agriculture & Life Science, ²Division of Applied Life Science (BK21 program), Graduate School, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea – *Bacillus subtilis* 168 secreted antimicrobial substance(s) into culture medium and culture supernatant inhibited growth of some Gram positive bacteria. *B. cereus* and *Listeria monocytogenes* were the most sensitive organisms. The antimicrobial activity was destroyed when culture supernatant was treated by protease and proteinase K, indicating the proteinous nature of the substance (bacteriocin). The molecular weight of the bacteriocin was estimated to be 5 kDa by Tricine SDS-PAGE. *B. cereus* ATCC 14579 cells were killed when exposed to the bacteriocin, indicating that the mode of inhibition was bacteriocidal. These results show that *B. subtilis* 168 could be useful as a starter for fermented foods such as *cheonggukjang* where *B. cereus* contamination is a major concern.

Key words: *Bacillus subtilis* 168, bacteriocins, antimicrobial activity, *Bacillus cereus*

서 론

최근 식품 안전성에 대한 소비자들의 높은 관심으로 인해 유해균 증식을 억제할 목적으로 식품에 첨가되는 보존제들도 기존에 사용되던 인공화합물 들 대신 천연화합물들이 선호되고 있다[2, 10, 11]. 천연 보존제로 개발이 유망한 화합물들중 한 종류로 여러 세균들이 만드는 박테리오신들(bacteriocins)이 있다. 박테리오신은 리보솜에서 합성되는 단백질 또는 펩타이드 계통 항균물질로서 특정 생육환경에서 박테리오신 생산균주들이 비슷한 종류의 다른 균 생육을 저해할 목적으로 생산, 분비하는 것으로 알려져 있다[4, 7]. 박테리오신은 식품과 함께 인체내로 들어가더라도 소화관내 단백질 가수분해효소들(proteolytic enzymes)에 의해 분해되어서 인체에는 안전하다. 지난 수십년동안 신규 박테리오신들의 탐색 노력과 함께 박테리오신 특성 파악, 작용 기작 이해, 구조 유전자 클로닝, 박테리오신 구조 변형을 통한 항균 효과 개선, 대량 생산 기술 개발과 같은 식품에서의 응용에 필요한 연구들이 지속적으로 이루어지고 있다[16].

유산균이 생산하는 박테리오신들이 특히 잘 알려져 있고 이는 유산균이 GRAS(generally regarded as safe) 균들이어서 이들의 박테리오신들도 식품에 사용하기에 적합하기 때문이다[3]. 대표적인 종류들로는 *Lactococcus*가 생산하는 nisin, lacticin, *Leuconostoc*이 생산하는 leucocin, mesentericin 등이 있다[9, 14]. *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B.*

coagulans, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*와 같은 *Bacillus* 속들은 항생물질을 포함하여 다양한 항균물질들을 생산하고 여기에는 박테리오신이나 박테리오신 유사물질들도 포함된다[19, 20]. 우리나라의 청국장이나 된장, 일본의 natto, 중국의 douchi와 같은 아시아 각국의 전통 발효식품들의 발효에는 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, 및 *B. licheniformis* 종들이 관여한다[8]. 이들은 유산균과 마찬가지로 GRAS에 속하나 이들이 만드는 박테리오신에 대한 연구는 아직 미미하다. 국내의 경우 된장, 간장과 같은 전통발효식품들에서 분리한 간균들(bacilli)이 만드는 박테리오신들의 분리과 이들의 특성 연구들이 일부 수행되었다[13, 20]. 이들의 박테리오신들이 식품 보존제로 개발될 경우 식용에 안전한 균들에서 유래한 장점이 있어서 앞으로 보다 많은 연구가 요구된다. *Bacillus subtilis* 168은 유전체 서열분석이 완료된 *B. subtilis* 표준 균주로 LB 배지에서 배양중 항균물질을 배지중으로 분비한다. 배양 상등액의 항균활성을 조사한 결과 박테리오신으로 추정되었다. 본 논문에서는 *B. subtilis* 168이 만드는 박테리오신의 몇가지 특성을 조사하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용한 세균들 및 배양조건

본 실험에 사용한 균주들을 Table 1에 표시하였다. Bacilli와 *E. coli*, *Salmonella*, 및 *Staphylococcus*는 Luria-Bertani (LB)(Bacto tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L) 배지에서 37°C 진탕 배양하였다. 유산균들은 MRS 배지에서 30°C 정지 배양하였다. *Listeria*와 *Enterococcus*는

*Corresponding author

Tel: 82-55-751-5481, Fax: 82-55-753-4630

E-mail: jeonghkm@gsnu.ac.kr

Table 1. Bacterial strains used in this study.

Species	Strain number (other strain designations)	Source and relevant information
Gram (+)		
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	From air; produces restriction endonuclease Bce14579I
<i>Bacillus coagulans</i>	ATCC 7050	From evaporated milk
<i>Bacillus subtilis</i>	168	Genome sequenced strain ((NC009126)
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	From urine; Antibiotic drugs intended for use in laboratory diagnosis of disease
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	ATCC 4646	From dental caries
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	From poultry, England
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	ATCC 25923	From clinical
Gram (-)		
<i>E. coli</i> 0157:H7	ATCC 43894	From feces from outbreak of hemorrhagic colitis, Michigan; Produces exopolysaccharide and Shiga-like toxin I & II
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA 98	

BHI(brain heart infusion) 배지에서 37°C 진탕배양하였다.

생육중 균수와 항균력 변화

B. subtilis 168 생육과 항균 역가 측정을 위해 200 mL LB 액체배지에서 37°C, 60시간 진탕 배양하였다. 시간대별로 배양액을 회수하여 UV-visible spectrophotometer(Shimadzu uv-1601, Kyoto, Japan)을 이용하여 OD₆₀₀ nm에서 측정하였다. 항균력은 회수한 배양액을 원심분리 후 여과(0.45 µm, Sartorius, Goettingen, Germany)한 상등액을 회수하여 동결 건조(Chuo-ku, Tokyo, Tokyo Rikaikat Co.)한 후 20 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액에 현탁하여 항균력을 측정하였다. 항균력 측정 시료를 순차적으로 2배씩 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)로 희석하여 접종하고 저해환을 형성하는 최대 희석배수를 확인하였다. 희석배수의 역을 취하고 이 값에 1 mg에 대해서 환산해주는 환산계수를 곱하여 mg protein당 AU(activity unit)로 항균력을 나타내었다.

저해 스펙트럼 조사

B. subtilis 168을 1% 되게 200 mL LB 배지에 접종하여 24시간 배양 후 얻은 상등액을 여과한 후 동결 건조한 시료를 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)에 녹여서 박테리옌 시료로 사용하였다. 저해 spectrum 확인을 위해 Gram 양성 및 음성균 10종을(Table 1) 사용하여 paper disk method[6]로 실험을 진행하였다. 각 균주를 LB, BHI, 혹은 MRS 평판배지에 1×10⁵ cells로 도말한 후 8 mm 직경의 paper disk (Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 놓고 그 위에 박테리옌 시료 30 µg을 가한 후에 37°C에서 24 시간 둔 다음 저해환의 직경을 측정하여 저해 정도를 확인하였다.

효소처리가 항균 활성에 미치는 효과

B. cereus ATCC 14579를 LB 평판배지에 1×10⁵ cells로

도말한 후 8 mm 직경의 paper disk 를 올려놓고 저해 스펙트럼 조사에 사용한 것과 동일한 *B. subtilis* 168 박테리옌 시료 2.8 µg을 가하였다. 단백질가수분해 효소액 5 µL를 paper disk 한 쪽 면에 첨가하여 37°C 24시간 배양 후 관찰하였다[12]. Proteinase K(Takara, B2205A, Japan), protease (Sigma, P5147, Type XIV, from *Streptomyces griseus*), pepsin(Sigma, P7000, E.C. 3.4.23., from porcine gastric mucosa), trypsin(Fluka Analytical, E.C. 3.4.21.4, from hog pancreas) 4가지 효소를 사용하였다. Proteinase K는 원상태인 액상 상태, protease, trypsin은 5 mM 인산완충용액(pH 7.0), pepsin은 0.02 N HCl에 녹여 효소액을 만들어서 protease는 0.042 unit, proteinase K는 3 unit, pepsin은 6.7 unit, 그리고 trypsin은 21.04 unit를 사용하였다.

Tricine-SDS-PAGE

B. subtilis 168 균주를 LB 배지(100 mL)에서 24시간 배양하여 얻은 상등액을 여과하였다. 여과한 상등액을 80% ammonium sulfate(Amresco, Solon, OH, USA) 침전 후 투석하여서 20 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액에 녹여 시료로 사용하였다. 단백질 농도를 Bradford법[1]으로 측정하여 50 µg을 tricine polyacrylamide gel(16% acrylamide)에 걸어 주고 30 mA에서 전기영동을 행하였다[17]. 전기영동 후 항균력을 확인 할 gel은 30분씩 4회 멸균수로 씻고 30 분간 UV에 쬐인 후 지시균주를 그 위에 중층하였다. 지시균주는 *L. monocytogenes* ATCC 19111와 *E. faecalis* ATCC 29212을 각각 1×10⁵ cells 사용하였다.

저해기작

B. subtilis 168 박테리옌의 *B. cereus* ATCC 14579에 대한 저해 기작을 문 등[15]의 방법으로 조사하였다. *B. cereus* ATCC 14579를 LB 배지에서 배양한 후 원심분리하

여 세포를 회수하고 이를 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH8.0)으로 1회 세척 후 동일 완충용액 2 mL에 1×10^8 cells/mL 농도로 현탁하였다. 3시간 후 앞의 tricine-SDS PAGE에 사용한 것과 동일한 박테리옌 시료 50 μ g을 첨가하고 24시간 두면서 일정 간격으로 시료를 취하여 생균수를 측정하였다.

결과 및 고찰

***B. subtilis* 168 생육중 항균력 변화**

B. subtilis 168을 LB 배지에 1% 접종한 후 37°C에서 60 시간 동안 진탕 배양하면서 균 증식과 항균력을 측정하였다 (Fig. 1). 균 증식은 계속 꾸준히 이루어짐을 흡광도 측정 결과에서 알 수있고 배양 60시간에 1.6 부근에 도달하였다. 항균력은 배양 16시간부터 20시간째 급격히 증가하다가 24시간 이후 급격히 감소됨을 알 수 있었다. 27시간 이후로는 항균력이 100 AU/mg 단백질로 일정하게 유지됨을 확인 할 수 있었다. 최대 항균력은 배양 20-24시간에 관찰되었고 400 AU/mg 단백질이었다.

저해 스펙트럼

10종의 Gram 양성균과 음성균을 대상으로 *B. subtilis* 168에 의한 저해 여부를 조사하였다(Table 2). *S. aureus* subsp.

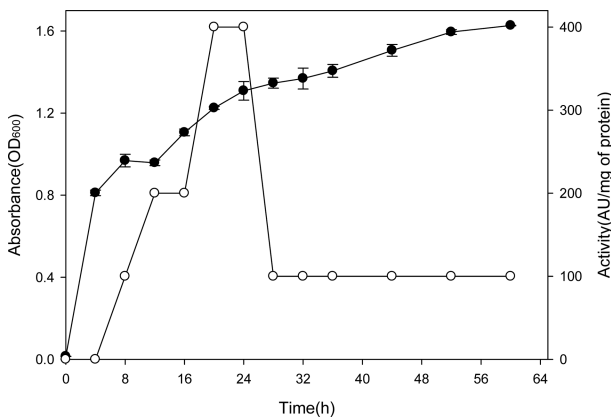


Fig. 1. Changes in the absorbance and antibacterial activity of *B. subtilis* 168 during 60 h cultivation in LB at 37°C. ●, absorbance (OD₆₀₀); ○, antibacterial activity (AU/mg protein).

aureus ATCC 25923를 제외한 모든 Gram 양성균들은 저해 되었으나 음성균들은 저해를 보이지 않았다.

L. monocytogenes ATCC 19111와 *B. cereus* ATCC 14579에 대한 저해 효과가 가장 컸으며, 이는 *B. subtilis* 168의 항균 활성이 Gram 양성균들에 한정되는 것으로 여겨진다. *L. monocytogenes* ATCC 19111에 강한 저해 활성을 보이므로 박테리옌 그룹들 중에서 *Listeria*에 강한 항균 활성을 나타내는 특징을 가진 class IIa군[6] 특성과 유사하다. *B. cereus*는 실사형 혹은 구토형 독소를 생산하는 유해균으로 쌀이나 쌀 가공품 그리고 볶음 등에 분포한다[18]. 볶음에 분포하는 *B. cereus* 포자는 쉽게 청국장으로 옮겨갈 수 있다. *B. subtilis* 168을 청국장 제조시 종균으로 사용하면 *B. cereus* 증식은 억제될 수도 있을 것이다. 청국장에서 분리한, 혈전용해능이 우수한 *B. subtilis* 및 *B. amyloliquefaciens* 균주들과 168을 청국장 제조에 사용한 결과들을 보면 비록 168의 α -amylase, α -galactosidase, β -glucosidase, 그리고 단백질 가수분해효소들(산성, 중성, 및 알칼리성) 역가는 타 균주들 보다 현저히 낮지만 168을 콩에 접종하여 청국장 발효를 2-3일 진행한 후에는 타 균주들과 차이가 없는 양질의 청국장을 얻을 수 있었다[5]. 이상 결과들로 볼 때 *B. subtilis* 168은 청국장 종균으로 사용 가능하며 특히 *B. cereus* 저해효과가 예상되어 발효식품 안전성 측면에서 유리할 것이 예상된다.

효소처리가 항균 활성에 미치는 영향

B. subtilis 168의 항균 물질의 효소 처리에 따른 반응을 조사하였다. 지시균주로는 *B. cereus* ATCC 14579를 1×10^5 cell을 사용하여 37°C에서 관찰한 결과 protease나 proteinase K 처리 후 저해 환이 사라졌다(Fig. 2). 이 두 효소는 비특이적 단백질 가수분해 효소임을 고려할 때 *B. subtilis* 168이 만드는 항균 물질은 단백질 혹은 펩타이드 박테리옌으로 여겨진다.

박테리옌 분자량 추정

Tricine-SDS PAGE을 통하여 *L. monocytogenes* ATCC 19111와 *E. faecalis* ATCC 29212에 대한 항균력을 측정 한 결과 gel 상에서 약 5 kDa 부위에서 두 균 공히 저해하는, 항균력을 지닌 밴드를 관찰 할 수 있었다(Fig. 3). Coomassie로

Table 2. Inhibitory spectrum of *B. subtilis* 168 bacteriocin.

Indicator species	Activities	Indicator species	Activities
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	+++ ¹⁾	<i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050	+
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	++	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC 4646	++
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	+++	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 25923	-
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	+	<i>Streptococcus thermophilus</i> KFRI 193	+
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43894	-	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98	-

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each sensitive indicator.

¹⁾-, no inhibition zone; +, 1.23-1.36 mm; ++, 1.81-1.92 mm; +++, above 2.1 mm.

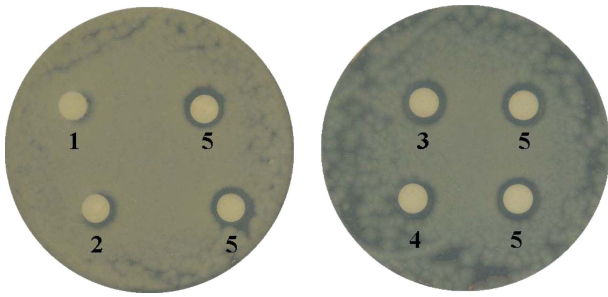


Fig. 2. Effect of proteolytic enzyme treatment on the antibacterial activity of *B. subtilis* 168. 1, lyophilized supernatant + proteinase K; 2, lyophilized supernatant + protease; 3, lyophilized supernatant + pepsin; 4, lyophilized supernatant + trypsin; 5, lyophilized supernatant control (no enzyme treatment). *B. cereus* ATCC 14579 was used as an indicator.

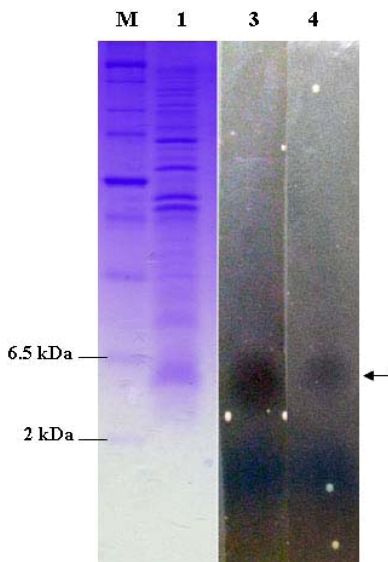


Fig. 3. Tricine-SDS-PAGE of *B. subtilis* 168 bacteriocin. Lane: 1, Acrylamide gel stained with Coomassie brilliant blue; 2, gel overlaid with *Listeria monocytogenes* ATCC 19111; 3, gel overlaid with *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; M, broad range protein marker (NEB, Ipswich, MA, USA).

염색된 SDS gel 해당 위치에서도 동일 크기의 펩타이드가 확인되었다. 이 결과로부터 *B. subtilis* 168이 생산하는 5 kDa 크기 펩타이드는 항균력을 지닌 박테리오신임을 확인할 수 있었다.

저해 기작

B. subtilis 168 박테리오신에 노출된 *B. cereus* ATCC 14579의 생균수 변화를 측정하였다. 박테리오신에 노출되지 않은 대조구의 경우 초기균수 1×10^8 cell/mL는 6시간째 1×10^5 cells/mL 까지 감소하였으나 6시간 이후 차츰 균수가 증가하여 배양 24시간에는 5×10^7 cells/mL까지 다시 증가하였다. 반면 *B. subtilis* 168 박테리오신에 노출된 *B. cereus*

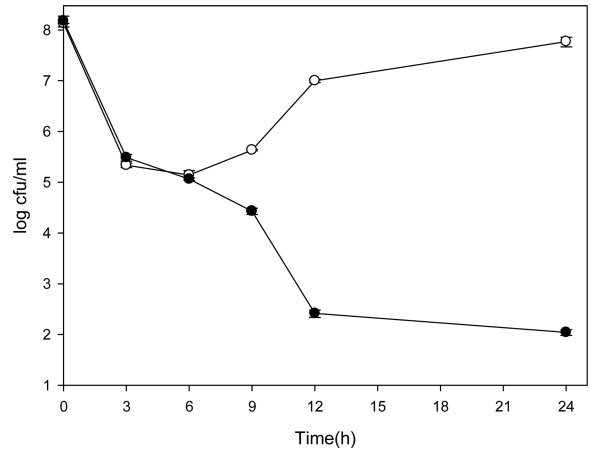


Fig. 4. Mode of inhibition by *B. subtilis* 168 bacteriocin. O, No addition of *B. subtilis* 168 bacteriocin into the suspension of *B. cereus* ATCC 14579 cells (1×10^8 cells/mL); ●, 50 µg of *B. subtilis* 168 bacteriocin was added into the suspension of indicator cells.

세포들의 경우에는 박테리오신 첨가 시점으로부터 3시간 이후부터(Fig. 4 그래프 상에서 6시간 이후) 생균수가 감소하였으며, 배양 24시간에는 1×10^2 cells/mL까지 감소 하였다. 이상 결과는 *B. subtilis* 168 박테리오신에 의한 저해는 민감한 세균을 죽이는, 즉 살균(bactericidal) 기작임을 보여주는 것이다. 청국장과 같은 전통발효식품들의 단점인 안전성 문제를 보완하는 가장 좋은 방법은 발효균들중에서 유해균을 억제하는 균주들을 찾아서 종균으로 사용하는 것이다. 이런 측면에서 *B. subtilis* 168은 청국장 종균으로 가능성이 있는 것으로 생각된다. 앞으로 168보다 효소활성이 우수한 GRAS 균주들 중에서 유해균 억제능이 우수한 균들을 찾는 노력이 필요할 것으로 생각된다.

요 약

B. subtilis 168 균주는 배양중 항균물질을 배지중으로 분비하며 배양상등액은 몇몇 그램 양성균을 저해한다. *B. cereus*와 *L. monocytogenes*의 저해 정도가 가장 컸었다. 배양상등액을 protease와 proteinase K로 처리할 경우 항균력이 상실되어서 항균물질은 단백질성(박테리오신)임을 알수있었다. Tricine SDS-PAGE에 의해서 박테리오신 분자량은 5 kDa으로 확인되었다. 박테리오신은 민감한 균을 죽임으로써 생육을 저해하는 것으로 밝혀졌다. 이상 결과들에서 *B. subtilis* 168은 청국장과 같은 *B. cereus* 오염이 문제되는 발효식품들의 종균으로 유용할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2008년 울춘재단(농심) 기초연구비 지원을 받아 수행된 연구입니다. 이황아는 교육과학기술부의 2단계

BK21 프로그램 지원을 받았습니다. 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Bradford, M. M. 1976. Rapid and sensitive methods for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Cho, M., E.-K. Bae, S.-D. Ha, and J. Park. 2005. Application of natural antimicrobials to food industry. *Food Sci. Indus.* **38**: 36-45.
- Gálvez, A., H. Abriouel, R. L. López, and N. B. Omar. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **120**: 51-70.
- Jack, R. W., J. R. Tagg, and B. Ray. 1995. Bacteriocin of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**: 171-200.
- Jeong, W. J., A. R. Lee, J. Chun, J. Cha, Y.-S. Song, and J. H. Kim. 2009. Properties of *Cheonggukjang* fermented with *Bacillus* strains with high fibrinolytic activities. *J. Food Sci. Nutr.* **14**: 252-259.
- Kim, S. I., I. C. Kim, and H. C. Chang. 1999. Isolation and identification of antimicrobial agent producing microorganisms and sensitive strain from soil. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**: 526-533.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol.* **12**: 39-86.
- Kwon, G.-H., H.-A. Lee, J.-Y. Park, J. S. Kim, J. Yim, C.-S. Park., D. Y. Kwon, Y.-S. Kim, and J. H. Kim. 2009. Development of a RAPD-PCR method for identification of *Bacillus* species isolated from Cheonggukjang. *Int. J. Food Microbiol.* **129**: 282-297.
- Lee, K.-H., J.-Y. Park, S.-J. Jeong, G.-H. Kwon, H.-J. Lee, H. C. Chang, D. K. Chung, J.-H. Lee, and J. H. Kim. 2007. Characterization of Paralantarin C7, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paraplantarum* C7 isolated from Kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 287-296.
- Lim, S. M. and D. S. Im. 2007. Bactericidal effect of bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* K11 isolated from Dongchimi on *Escherichia coli* O157. *J. Food Hyg. Safety* **22**: 151-158.
- Lind, H., H. Jonsson, and J. Schnqrer. 2005. Antifungal effect of dairy propionibacteria—contribution of organic acids. *Int. J. Food Microbiol.* **98**: 157–165.
- Maeng, K.-H., J.-S. Kim, G.-E. Ji, and J. H. Kim.. 1997. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from human intestines and the characteristics of their bacteriocins. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **26**: 1228-1236.
- 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.
- Michael, D. P. and M. A. Harrison. 2002. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technol.* **56**: 69-78.
- Moon, G.-S., J.-J. Jeong, G.-E. Ji, J.-S. Kim, and J. H. Kim. 2000. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus* sp. T7 isolated from humans. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 507-513.
- Settanni, L. and A. Corsetti. 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **121**: 123-138.
- Scjagger, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Proc. Natl.* **1**: 16-22.
- Stenfors Arnesen, L. P., A. Fagerlund, and P. E. Granum. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev.* **32**: 579-606.
- Tagg, G. R., A. S. Dajani, and L. W. Wannamarker. 1976. Bacteriocin of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**: 722-756.
- Yang, E. J. and H. C. Chang. 2007. Characterization of bacteriocin-like-substances produced by *Bacillus subtilis* MJP1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 339-346.

(Received January 16, 2010/Accepted April 13, 2010)