creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[UCI]I804:24011-200000265263

2016년 2월

석사학위 논문

국내 전통식품에서 분리한 *Bacillus* 속 세균이 생산하는 항세균 펩타이드의 분리, 정제 및 특성 연구

조선대학교 대학원

약학과

김 미 리

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

국내 전통식품에서 분리한 *Bacillus* 속 세균이 생산하는 항세균 펩타이드의 분리, 정제 및 특성 연구

Purification and characterization of antibacterial peptide produced by *Bacillus* strain isolated from Korean traditional food

2016년 2월 25일

조선대학교 대학원

약학과

김 미 리

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

국내 전통식품에서 분리한 *Bacillus* 속 세균이 생산하는 항세균 펩타이드의 분리, 정제 및 특성 연구

지도교수 유 진 철

이 논문을 약학 석사학위 신청논문으로 제출함

2015년 10월

조선대학교 대학원

약학과

김 미 리

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

김미리의 석사학위 논문을 인준함

위원장	조선대학교 교수	홍 준 희	(인)
위 원	조선대학교 교수	김 은 애	(인)
위 원	조선대학교 교수	유 진 철	(인)

2015년 11월

조선대학교 대학원

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목차

List of Tables ---------- III

List of Figures ---------- IV

List of Abbreviations ---------- V

ABSTRACT ---------- VI

I. 서론 ---------- 1

II. 재료 및 방법 ---------- 6

1. 시약 ---------- 6
2. 항균펩타이드 생산 균주 분리 및 동정 ---------- 6
   a. 항균펩타이드 생산 균주 분리 ---------- 6
   b. 항균활성측정 ---------- 7
   c. 분자생물학적 특성 분석 균주 동정 ---------- 7
3. 항균펩타이드 배양 및 정제 ---------- 7
   a. 최적배양 조건 ---------- 7
   b. 항균펩타이드 정제 ---------- 8
   c. 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 ---------- 8
   d. 항균펩타이드 단백질정량 ---------- 9
4. 항균펩타이드 생물학적 활성 ---------- 9
   a. 항균펩타이드 최소억제농도 ---------- 9
   b. 항균펩타이드 안정성 ---------- 9
   c. 항산화력 측정 ---------- 10
      (1) DPPH 라디컬 소거능 ---------- 10

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(2) 환원력 측정---------- 11
(3) 총페놀 함량 측정---------- 11
d. 항염증 시험 평가---------- 11
(1) 세포 배양---------- 11
(2) 세포 생존율 측정---------- 12
(3) 일산화질소 생성 억제능 측정---------- 12
III. 결과 ---------- 13
1. 항균펩타이드 배양, 분리, 정제---------- 13
a. 항균펩타이드 생산 균주 분리---------- 13
b. 최적배양조건 ---------- 16
c. 항균펩타이드 정제---------- 20
2. 항균펩타이드 생물학적 활성---------- 23
a. 항균펩타이드 항균력활성---------- 23
(1) 항균펩타이드 최소억제농도---------- 23
(2) 항균펩타이드 온도, pH, 단백질분해효소, 유기용매 및 화학물질의 안정성---------- 26
b. 항산화력 측정---------- 30
(1) DPPH 소거능---------- 30
(2) 환원력 측정---------- 32
(3) 총페놀 함량 측정---------- 34
c. 항염증 시험 평가---------- 36
(1) 세포 생존율 및 일산화질소 생성 억제능 측정------- 36
IV. 결론 ---------- 38
V. 참고문헌 ---------- 41

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Tables

Table 1. Similarity of 16S rRNA gene sequence (CBS73) ---------- 14

Table 2. Minimum inhibitory concentration of *Bacillus* sp. CBS73 peptide ---- 24

Table 3. Effect of different temperature and pH on inhibitory activity of peptide ----------27

Table 4. Effect of various chemicals on antimicrobial activity ---------- 28

Table 5. Effect of various proteolytic enzymes ---------- 29

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Figures

Figure 1. The diverse mechanistic modes of action for antimicrobial peptides-- 3

Figure 2. Mode of action of AMPs. 4

Figure 3. Nighbor-joining tree based on nearly complete 16S rRNA sequences showing relationships between of *Bacillus sp.* CBS73 and related *Bacillus* strains 15

Figure 4. Effect of various carbon sources on the activity of antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. CBS73 17

Figure 5. Effect of various nitrogen sources on the activity of antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. CBS73 18

Figure 6. Effect of various metal ion sources on the activity of antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. CBS73 19

Figure 7. Elution profile of *Bacillus* sp. CBS73 antimicrobial peptide 21

Figure 8. Determination of the molecular weight and MALDI-TOF 22

Figure 9. DPPH radical scavenging activity of CBS73 antimicrobial peptide in different concentration 31

Figure 10. Reducing power of CBS73 antimicrobial peptide 33

Figure 11. Total phenol contents of CBS73 antimicrobial peptide 35

Figure 12. Effect of the CBS73 antimicrobial peptide on cell viability and NO production 37

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Abbreviations

AMP	Antimicrobial peptide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ESBL	Extended spectrum beta lactamase
FBS	Fetal bovine serum
IMP	Imipenem resistance
LPS	Lipopolysaccharide
MDR	Multidrug-resistant
MIC	Minimum inhibitory concentration
MRSA	Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NO	Nitric oxide
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TPC	Total phenol contents
VRE	Vancomycin-resistant *enterococci*
VRSA	Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*
GRAS	Generally recognized as safe

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Mi Ri Kim
Advisor : Prof.Jin Cheol Yoo, Ph.D.
Department of Pharmacy,
Graduate school of Chosun University

Bacillus sp.CBS73 was selected from several numbers of *Bacillus* strains preserved in our laboratory isolated from Korean traditional foods.

One of the reasons to study microorganism diversity is sequencing of the 16S rRNA gene, including which has several advantage size, and availability of databases for comparison. Fermented broth of CBS73 tested maximum antimicrobial activity against *Mycobacterium smegmatis*.

Antimicrobial peptide production from the strain was optimized by using various nutritional parameters. 1% Fructose, 1% Beef extract, 0.1% NaCl were found to be the best carbon, nitrogen and metal ion sources.

AMP CBS73 was purified by ammonium sulfate precipitation and gel chromatography respectively. In order to identify its structural characteristics, MALDI-TOF, and antimicrobial activity test against various Gram-positive and Gram-negative bacteria, including MRSA and *E. coli* were performed.

The CBS73 was precipitated using 30-80% ammonium sulfate. AMP CBS73 was purified to homogeneity by using sequential gel chromatographic steps. i.e. Sepharose CL-6B, Sephadex G-50 and Sephadex G-25 respectively.

The purified CBS73 exerted a molecular weight of 5210.2Da, as determined via mass spectrometry based on matrix-assisted laser desorptionionization-time-of-flight (MALDI-TOF) method and Tricine-SDS.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

AMP CBS73 was found to be stable over a broad range of pH 4.0 - 10.0 and thermos tolerant up to 100℃, where it lost its complete activity above 100℃. The effect of several chemicals on the AMP was evaluated. The AMP was resistant to various organic solvents and trypsin, α-chymotrypsin, lipase, proteinase K, protease, papain, pepsin and other various organic solvents.

This AMP CBS73 exhibited broad-spectrum antimicrobial activity against tested Gram-positive and Gram-negative bacteria. Analysis of the minimal inhibitory concentration (MIC) revealed that CBS73 have antibacterial effects against Gram-positive bacteria including VRE, VRSA and Gram-negative bacteria including *Escherichia coli*, Salmonella.

The antioxidant activity was evaluated by determining the reducing powers, total phenol content, and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) scavenging activity. DPPH scavenging activity and reducing power of the AMP CBS73 showed lower antioxidant activity when compared to the control group at the same concentration of ascorbic acid whereas total phenolic content determined that more than one-third of the phenol-containing Gallic acid at the same concentration.

When the Raw 264.7 murine macrophage macrophages stimulated by LPS was a CBS73 antimicrobial peptide to produce an increase of the carbon monoxide did not show the effect of inhibiting the production thereafter by treatment at a concentration of 1-100㎍/㎖ and 1-50㎍/㎖ concentrations did not show cytotoxicity.

Thus, from this study it can be concluded that, *Bacillus sp.* CBS73 strain isolated from domestic Korean traditional food able to produce antimicrobial peptide having high antibacterial effect, low molecular weight, stable over wide range of pH, temperature, enzyme & chemicals and moderate antioxidant activity.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅰ. 서론

바실러스 속 미생물 중 하나인 *B.subtilis*는 평균 4-5% 유전체가 항생제 합성에 관여하고, 24개 이상의 구조적으로 다양한 항균 화합물을 생성한다[1].*Bacillus subtilis*는 토양, 물, 식물과 관련된 곳에서 발견되는 호기성 내포자를 형성하는 간균이다[2]. 그람 양성 박테리아이면서 이들이 생산하는 항생물질의 주종인 펩타이드들은 구조적으로 매우 단단하고 소수성이며 환상구조이다[3]. 또한 *Bacillus subtilis*를 포함하는 *Bacillus sp.*가 생산하는 다양한 종류의 항균물질로는 박테리오신, 항균펩타이드, 리포펩타이드, 글리코펩타이드, 리보솜이 없는 원형펩타이드가 대표적이다[4].

항균펩타이드는 진화론적으로 고대 분자로 살아있는 유기체인 인간부터 박테리아에서까지 발견되었다[5]. 대부분의 항균펩타이드는 양이온성이며, 특정한 박테리아 세포막을 표적하여 지질 이중층 구조막의 붕괴를 야기한다[6, 7]. 대다수의 항균펩타이드는 친수성 또는 소수성의 양친매성 구조로, 이러한 구조는 항균펩타이드가 지질 구성 요소 (소수성 영역)와 인지질 그룹 (친수성 영역)에 결합할 수 있다[8]. 음으로 하전된 세포막과의 상호 작용을 통해 막 안전성을 파괴하고 단백질, DNA, RNA 합성을 억제하거나, 특정 세포 내 표적과의 상호 작용에 의해 세포를 죽인다[9].

또한 그람 음성균 및 진균, 바이러스, 기생충과 항생제에 내성을 가지는 그람 양성균을 죽이거나 중화하는 넓은 범위의 항균 스펙트럼을 가지고 있다[10]. 특정 항균펩타이드는 항생제 내성 세균을 죽이는 것으로 알려져 있는데 예를 들어, 니신(펩타이드계열 항생제)과 반코마이신(항생제)은 모두 세포벽 합성을 저해한다. 그러나, 내성 황색 포도상 구균 (MRSA) 균주는 반코마이신에 저항성을 가지고 있는 반면, 니신에 의해 저해된다[11]. 이러한 항균펩타이드는 기존의 항생제의 문제점을 보완할 수 있는 연구 대안 중 하나이다[12]. 지금까지 총 5,000개 이상의 항균펩타이드가 발견되었고 최근까지 연구되고 있다[13].

보통 12-50개 잔기로 구성되어있으며 직선구조, 연장된 나선구조, 하나의 이황화

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

결합으로 인한 고리구조, 2개 또는 3개의 이황화 결합으로 안정화된 시트구조를 포함하는 3차원구조로 분류할 수 있다 (Figure 1)[8]. α-나선 구조는 두 개의 인접한 아미노산 사이의 거리는 약 0.15nm이며, 중심과 관련하여 이들 사이의 각도는 평면도에서 약 100도이다. 이러한 구조를 가진 항균펩타이드 중 protegrin, magainin, 순환-indolicin 및 나선- indolicin이 대표적이다[14]. β-시트 구조의 펩타이드는 이들 가닥 사이의 이황화 결합에 두 개 이상의 β-가닥으로 구성되어있다[6].

항균펩타이드가 항균성을 발휘하는 정확한 메커니즘은 아직 알려져 있지 않지만, 일반적으로는 양이온 펩타이드가 박테리아 막에서 음전하 인지질 머리 그룹과 정전기력에 의해 상호 작용을 방해를 일으키는 것으로 알려져 있다[15]. 가장 널리 알려진 메커니즘은 "barrel stave"모델과 "carpet model"모델이 있다 (Figure 2)[16]. 첫 번째 메커니즘은 'Barrel-stave'모델로 펩타이드의 소수성 부분이 타켓 세포막의 지질과 결합 후 직접적으로 관통하여 구멍을 형성한다[17]. 이 때 항균펩타이드는 모노머로 막의 표면에 결합 후 올리고머화 되어 구멍을 형성한다. 이 메커니즘에서 펩타이드의 이차구조인 소수성 α-나선구조 및 β-시트 구조는 기공 형성에 필수적이고, 친수성 펩타이드 부분이 통로에 공간을 형성하는 동안 펩타이드 부분과 막 지질이 상호작용한다[15, 18]. 두번째 메커니즘인 "carpet"모델은 항균펩타이드가 세포막에 세제와 같은 방식으로 막 표면 구조에 영향을 준다[19]. 이와 같은 상호 작용은 세포막의 음이온성 인지질 머리 부분에 펩타이드의 양전하를 갖는 부분이 결합하여 세포막 표면을 감싼다. 이 때, 세포막의 일부분에 펩타이드의 농도가 높아지면 펩타이드가 세포막에 마이셀을 형성하고, 그 후 세포막의 이중 막 구조가 파괴되어 펩타이드가 세포 내로 침투하여 작용한다[20].

그 외에 또다른 메커니즘으로는 세균의 세포막 투과성으로 이온 채널의 형성 및 활성화 또는 세포 내 표적을 차단하는 기작을 가진다[16].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

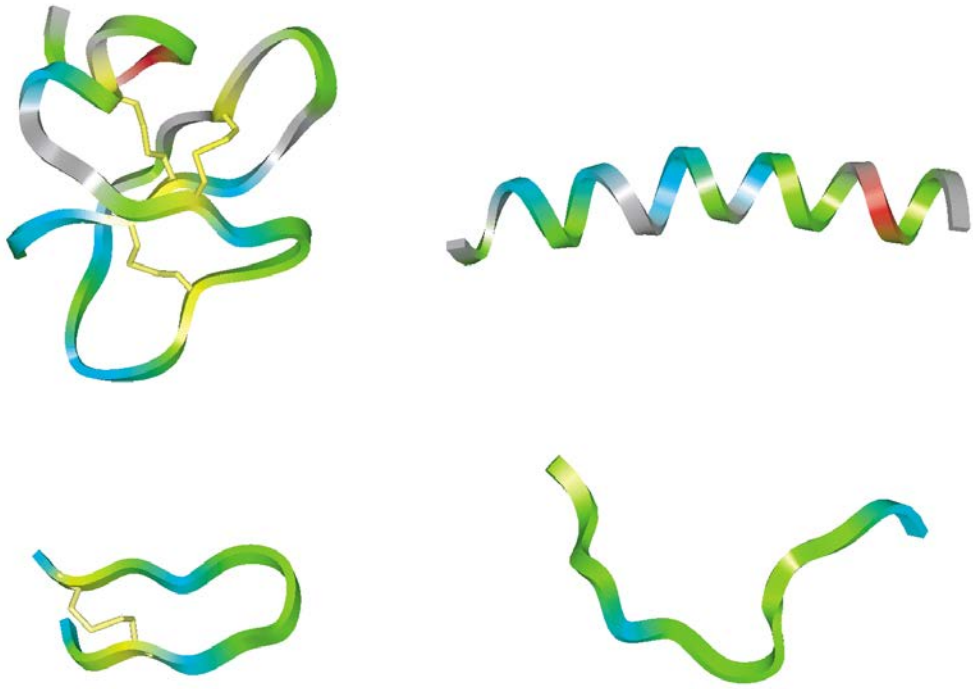


Figure 1. Molecular models of the different structural classes of cationic peptides[7].

These models (taken from the NMR structural database) are based on two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy of the peptides in aqueous solution for human-defensin-2 (HBD-2) or a membrane mimetic condition (other peptides). (a) HBD-2 (PDB code 1FQQ), which forms a triple-stranded β-sheet structure (containing a small α-helical segment at the N-terminus) stabilised by three cysteine disulphide bridges. (b) The amphipathic α-helical structure of magainin 2 (PDB code 2MAG). (c) The-turn loop structure of bovine bactenecin (model based on the published structure10). (d) The extended boat-shaped structure of bovine indolicidin (PDB code 1G89). The backbone structures are shown with the charged regions in blue and the hydrophobic residues in green.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

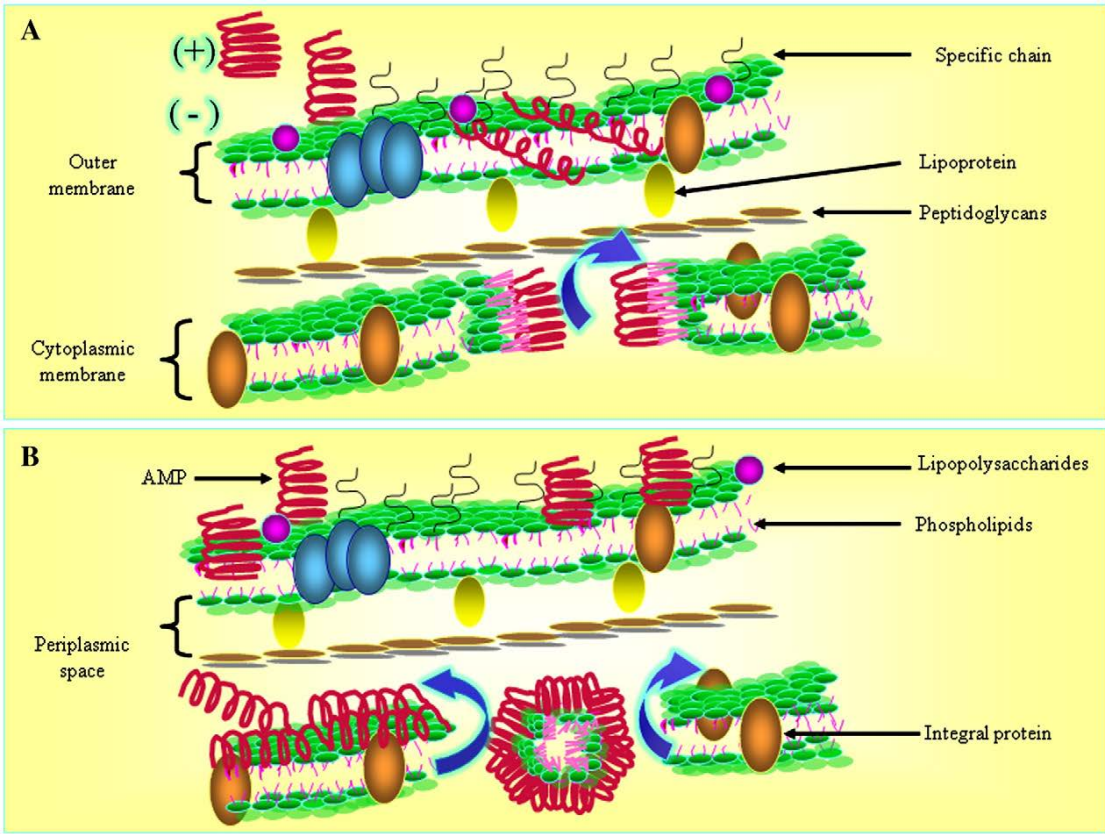


Figure 2. Mode of action of AMPs[16].

(A) Barrel stave model. The peptides bind to the cell membrane, then the peptides themselves insert into the hydrophobic core of the membrane forming a pore, causing leakage of cytoplasmic material and death of the cell. (B) Carpet model. Peptides bind to the phospholipids at the outer surfaces of the cell membrane, followed by the alignment of the peptide monomers, then the peptides reorient themselves towards the hydrophobic core of the membrane causing the disintegration of the lipid bilayer. Abbreviations: AMP, antimicrobial peptide.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

대표적인 그람 양성 병원성 미생물에 효과를 보이는 펩타이드계열 항생제로는 바시트라신이 있으며, 이는 박토프레놀 피로인산염을 세포질 합성 펩티도글리코 전구물질의 전달을 억제함으로써 작용한다. 리보솜이 아닌 다른 항생 펩타이드인 스트렙토그라민은 단백질 합성 억제제이다[21]

이러한 항균펩타이드는 항생제의 신속하고 광범위한 항균활성 때문에 가장 유망한 차세대로써 많은 관심을 받고 있다[22].

본 논문은 한국 전통음식인 김치로부터 유효물질을 생산하는 바실러스 균주를 분리하고 균주가 생산하는 항균펩타이드 분리 정제 및 생화학적 특성을 조사하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 시약

바실러스에서 생산하는 항균펩타이드의 최적배지 조건으로 Fructose (Junsei, japan), Beef extract (oxoid, USA), NaCl (OCI Company Co, Ltd, korea), Ammonium sulfate (OCI Company Co, Ltd, korea)을 사용하였다.

항균펩타이드 정제는 Sepharose CL-6B, Sephadex G-50, Sephadex G-25, Sephadex G-10 GE 헬스케어 (GE Healthcare, korea) 제품을 사용하였다. 모든 화학물질과 일반시약은 시그마 (St. Louis, USA)제품을 사용하였다.

항산화 효능 및 안정성 시험에 사용된 Trypsin, Proteinase K, Lipase, α-chymotrypsin, Papain, Pepsin, Protease, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Ascorbic acid, Foline-Ciocalteau reagent 와 Gallic acid 은 시그마 (Sigma, USA) 제품을 사용하였다.

NO생성 억제능과 세포 생존율 실험은 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal bovine serum (FBS)와 Penicillin-streptomycin 용액은 Invitrogen (Grand Island, NY, USA)을 사용하였고, Lipopolysaccharide (LPS), dimethyl sulfoxide(DMSO), Griess reagent와 Methyl-(4,5-dimethylthiazol-2-2,5-diohenyltetrazolium bromide (MTT)은 시그마 (Sigma, USA)제품을 사용하였다.

2. 항균펩타이드 생산 균주 분리 및 동정

a. 항균펩타이드 생산 균주 분리

항균펩타이드 생산 균주를 분리하기 위하여 전통식품인 김치 1ml과 0.85% 염화나트륨 9ml을 희석하고 MRS평판배지에 도말 후, 37℃ 배양기에서 12 시간 배양하였다. 집

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

락이 형성된 MRS평판배지에서 하나의 콜로니를 옮겨 새로운 평판배지에 다시 도말하여 37℃ 배양기에서 12 시간 배양하였으며, 순수한 콜로니를 얻을 때까지 반복하였다. 분리된 바실러스를 Mueller Hinton 액체배지에 배양한 후, 장기보관을 위하여 20% (v/v) 글리세롤 (Glycerol)을 첨가한 보관용기에 넣은 후 -80℃에 보관하였다.

b. 항균활성 측정

순수하게 분리한 바실러스 균주의 병원성 균주에 대한 항균 활성 능력을 측정하기 위하여 디스크 활성 시험법을 이용하여 확인하였다. Mueller Hinton 배지에 병원성 균주를 도말 후 항균활성은 디스크확산 (8㎜,Toyo Roshi Kaisah, Ltd)방법으로 페트리 접시에 *Mycobacterium smegmatis*을 도말 후, 잔존활성부분을 측정하였다.

c. 분자생물학적 특성 분석 균주 동정

BLAST프로그램 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)을 DNA의 유사정도를 확인하기 위하여 이용하였다.

3.항균펩타이드 생산 균주의 배양 및 정제

a. 최적배양 조건

탄소원, 질소원, 무기염류의 영양원에 대한 항균펩타이드 생산성을 관찰하기 위하여, 최적배양조건을 확인하였다. 탄소원의 변화에 따른 항균펩타이드 CBS73의 생산성을 조사하기 위해, 질소원 Yeast extract 1%를 고정 후 1%의 각 종류별 탄소원 (Glucose, Mannitol, Starch, Lactose, Fructose, Sorbitol, Maltose, Sucrose)을 첨가하였다. 탄소원 선정 후 최적의 탄소원 1%를 고정하고, 각 종류별 질소원 (Beef extract, Malt extract, Tryptone, Yeast extract, Oat meal, Soytone, Peptone, Dried yeast)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1%를 첨가하여 배양하였다. 탄소원과 질소원의 대조군으로 MRS배지를 사용하였으며 37℃, 170rpm에서 24 시간 배양하여 항균활성의 변화를 확인하였다.

마지막으로 무기염류의 변화에 따른 항균펩타이드 CBS73의 생산성을 조사하기 위해, 선정된 탄소원 1%, 질소원 1%를 고정 후 Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, $MgSO_4$, $ZnSO_4$, $MgCl_2$, KH_2PO_4, $FeSO_4$, NaCl, $CaCl_2$ 0.1%를 첨가하여 37℃, 170rpm에서 24 시간 배양하였다.

최고의 항균 활성을 보이는 배지를 *B. subtilis* CBS73의 최적배양배지로 선정하였다.

b. 항균펩타이드 정제

항균펩타이드 CBS73를 MRS액체배지 (Difco™ lactobacilli MRS broth) 10㎖에 접종 후, 37℃에서 24 시간, 170rpm에서 전 배양 하였다. 250㎖의 최적배지에 1%의 전 배양액을 접종한 후, 다시 37℃에서 12-24 시간 동안 170rpm에서 본 배양하였다. 본 배양액을 4℃에서 원심분리 (10,000rpm, 50 분)하여 균체를 제거하고 상등액에 황산암모늄 (ammonium sulfate)을 30-80%으로 포화시켜 침전물을 얻었다. 얻어진 침전물은 10mM Tris-HCl (pH 7.0)버퍼에 녹인 다음 1-30 kDa 아미콘으로 농축 및 탈염하여 정제용 시료로 사용하였다.

시료를 정제하기 위하여 Sepharose CL-6B (2.2㎝ × 84㎝), Sephadex G-50 (1.5㎝ × 89㎝), Sephadex G-25 (1.0㎝ × 54㎝), Sephadex G-10 겔 크로마토그래피를 수행하여 정제하였다.

c. 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동

정제된 항균펩타이드 CBS73의 분자량을 확인하기 위해 Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide 젤 전기영동 (Tricine SDS-PAGE)을 수행하였다. 염색은 Coomassie Brilliant Blue R-250, 탈색은 메탈올 : 빙초산 : 물 (1:1:8 v/v)으로 조성하여 사용하였다. 항균펩타이드 CBS73의 크기를 확인하기 위한 Size marker로써 Low-range protein marker (Fermentas, USA)을 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

d. 항균펩타이드 단백질 정량

단백질의 농도는 Lowry[23]방법을 이용하여 측정하였다. BSA (Bovine Serum Albumin, Thermo) 검정곡선을 측정하기 위하여 BSA의 농도를 1.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0㎎/㎖으로 희석하여, EP tube에 BSA를 각각 10㎕씩 넣었다. 항균펩타이드 CBS73는 2㎕와 Distilled water 8㎕을 혼합하였다. Bio-Rad DC™ Protein Assay Reagent A 1㎖과 DC™ Protein Assay Reagent 10㎕을 혼합하여 BSA튜브와 CBS73튜브에 50㎕씩 첨가하였다. DC™ Protein Assay Reagent B 400㎕씩 각각 넣어준 후, 20분간 실온에서 반응시켰다. 각 well에 200㎕씩 분주한 후, 분광광도계를 이용하여 750㎚에서 흡광도를 측정하였다.

4.항균펩타이드 생물학적 활성

a. 항균펩타이드 최소억제농도(MIC)

여러 항생제에 대한 최소억제농도를 실험하였다[24]. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistant *S.aureus* (VRSA), 그리고 Vancomycin-resistant *enterococci* (VRE), IMP (Imipenem resistance *Pseudomonas aureus*), ESBL (Extended spectrum beta lactamase *Escherichia coli*), *Alcaligenes faeclis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus sabtilis*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Enterococcus faecalis*을 테스트 균주로 사용하였다. 테스트 균주를 페트리 접시에 접종함에 따라 37℃에서 배양하였고, 결과를 12 시간 후 확인하였다.

b. 항균펩타이드 안정성

항균펩타이드의 pH에 대한 영향을 알아보기 위해 배양액을 Citric acid-sodium phosphate (pH 2.0 - 6.0), Tris-HCl buffer (pH 7.0 - 9.0), Sodium bicarbonate-

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

sodium hydroxide buffer (pH 10.0)을 사용하여 pH 2.0 - 10.0 으로 조정한 후, 25℃에서 1 시간 동안 반응 후 디스크 확산법으로 항균활성을 측정하였다.

다양한 온도에 대한 영향을 알아보기 위해 배양액을 20℃, 40℃, 60℃, 80℃, 100 ℃에서 30 분간, 121℃에서 15 분 동안 반응 후, 잔존활성을 측정하였다.

다양한 단백질 분해효소에 대한 영향은 Lipase (50mM Tris-HCl, pH 7.5), Proteinase K (50mM Tris-HCl, pH 7.5), α-chymotrypsin (50mM Tris-HCl, pH 7.5), Trypsin (50mM Tris-HCl, pH 8.0), Protease (50mM Tris-HCl, pH 7.5), Papain (50mM Tris-HCl, pH 7.5), Pepsin (50mM Tris-HCl, pH 7.5)의 최종 농도가 1㎎/㎖가 되도록 혼합 후, 25℃, 1 시간 반응한 후에 잔존활성을 측정하였다.

다양한 유기용매 및 화학물질에 대한 영향은 배양액에 Acetone, Chloroform, Ethanol, Methanol, Ethyl acetate, EDTA, Trichloroacetic acid, Triton X-100, Tween20, Tween80을 반응시켰다. Table 4의 농도를 참고하여 배양액과 1:1로 희석하여 잔존활성을 측정하였다.

c. 항산화력측정

(1)DPPH 라디컬 소거능

DPPH 라디컬 소거능 시험은 C. Sanchez-Moreno[25]의 방법을 통하여 DPPH (1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, sigma chemical co.st.Louis.MO.USA)에 의한 전자 공여능 (electron donating ability, EDA)을 측정하였다.

0.3mM의 DPPH용액 100㎕에 다양한 농도의 단백질용액 100㎕을 96 well 플레이트에 첨가하여 혼합한 다음 실온에서 30 분간 반응시킨 후 517㎚에서 흡광도를 측정하였다.

항산화력은 계산식에 의해 전자공여능 (%)을 구하였으며, 대조구는 시료 대신 메탄올은 첨가하였고 Ascorbic acid을 사용하였다

항산화력 계산식은 다음과 같다

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

$$\text{항산화력} = \left[1 - \left(\frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right)\right] * 100$$

(2) 환원력 측정

Reducing power는 Oyaiza[26]의 방법으로 측정하였다. 물과 희석한 항균펩타이드 용액 200㎕에 200mM sodium phosphate (pH 6.6) 와 10% potassium ferricyanide 20㎕ 혼합하였다. 50℃에서 20 분간 반응 후 10% TCA (Trichloroacetic acid) 200㎕ 첨가하였다. 10 분간 원심 분리한 상등액 500㎕에 0.1% ferric chloride 500㎕ 혼합한 후 700㎚에서 흡광도를 측정하였다.

(3)총페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Yen and Hsieh[27]의 방법을 사용하였다. 희석한 항균펩타이드 1㎖에 Foline-ciocalteau reagent와 10% Na_2CO_3를 각각 1 ml씩 혼합하였다. 1 시간 동안 실온에서 반응시킨 후, 700㎚에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 Gallic acid를 사용하였다.

d. 항염증 시험 평가

(1)세포배양

실험에 사용된 마우스 대식세포주인 Raw 264.7세포를 5% CO_2, 37℃ 배양하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% antibiotics (penicillin-streptomycin)을 첨가한 DMEM배지를 사용하였다. 세포가 80% 이상 자랐을 때 계대배양하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(2) 세포 생존율 측정

CBS73 농도에 따른 Raw 264.7세포의 생존율을 측정하기 위해 배양된 Raw 264.7을 96 well 플레이트에 1.0×10^6 cells/㎖농도의 세포를 100㎕씩 분주하고 정제된 CBS73을 각 농도 별로 배양된 Raw 264.7에 첨가하여 24 시간, 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 세포 생존율은 1㎎/㎖농도의 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetra-zolium bromide)시약을 각 well에 100㎕씩 첨가한 후, MTT시약이 환원되도록 1-2시간동안 반응시켰다. 그 후 각 well에 형성된 결정이 손상되지 않게 배지를 제거한 후, formazan 결정을 용해시키기 위하여 DMSO용액 100㎕씩 분주하고 540㎚에서 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해서 환원된 양을 나타내며, 각 well에 존재하는 세포의 생존 수와 비례한다.

(3) 일산화질소 생성능력 측정

CBS73에 의한 일산화질소 생성 억제능을 측정하기 위해 배양된 Raw 264.7을 96well에 1.0×10^6 cells/㎖농도의 세포를 100㎕씩 분주하고 37℃, 5% CO_2 에서 배양하였다. LPS (1㎕/㎖)단독, LPS와 정제된 CBS73을 각 농도 별로 세포에 처리한 후, 24 시간, 37℃, 5% CO_2 조건하에 배양하였다. 배양 후 상등액과 그리스시약 (Griess reagent) 1:1조건으로 혼합하여 10 분 반응시킨 후, 540㎚에서 흡광도를 측정하여 일산화질소 생성 변화를 확인하였다.

세포의 Nitric oxide생성 공식은 다음과 같다.

$$\text{production of nitric oxide}(\%) = 100 \times \frac{\text{AT}}{\text{AC}}$$

AC = absorbance of control

AT = absorbance of tested extract solution

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

B. 결과

1. 항균펩타이드 배양, 분리, 정제

a. 분자생물학적 특성 분석

본 실험실에서 보유한 100여종의 각종 전통식품으로부터 항균펩타이드를 생산하는 균주를 선별하였으며, 이 균주를 *B. subtilis* CBS73이라고 명명하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열을 결정하여 GenBank에 등록된 표준균주와 상동성을 비교한 결과 *Bacillus subtilis subsp. subtilis*와 99.72%로 일치하였으며(Table 1), *B. subtilis* CBS73의 염기서열에 의한 계통발생학적 위치는 Phylogenetic tree (Figure 3)로 나타내었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 1. Similarity of 16S rRNA gene sequence

Rank	Name	Strain	Accession	Pairwise Similarity(%)	Diff/Total nt
1	*Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum*	FZB42(T)	CP000560	99.79	3/1453
2	*Bacillus methylotrophicus*	CBMB205(T)	EU194897	99.79	3/1438
3	*Bacillus subtilis subsp. subtilis*	NCIB 3610(T)	ABQL01000001	99.72	4/1453
4	*Bacillus siamensis*	KCTC 13613(T)	AJVF01000043	99.72	4/1453
5	*Bacillus amyloliquefaciens subsp. amyloliquefaciens*	DSM 7(T)	FN597644	99.59	6/1453
6	*Bacillus subtilis subsp. inaquosorum*	KCTC 13429(T)	AMXN01000021	99.52	7/1453
7	*Bacillus tequilensis*	KCTC 13622(T)	AYT001000043	99.52	7/1453
8	*Bacillus vallismortis*	DV1-F-3(T)	JH600273	99.45	8/1453
9	*Bacillus subtilis subsp. spizizenii*	NRRL B-23049(T)	CP002905	99.38	9/1453
10	*Brevibacterium halotolerans*	DSM 8802(T)	AM747812	99.24	11/1453

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

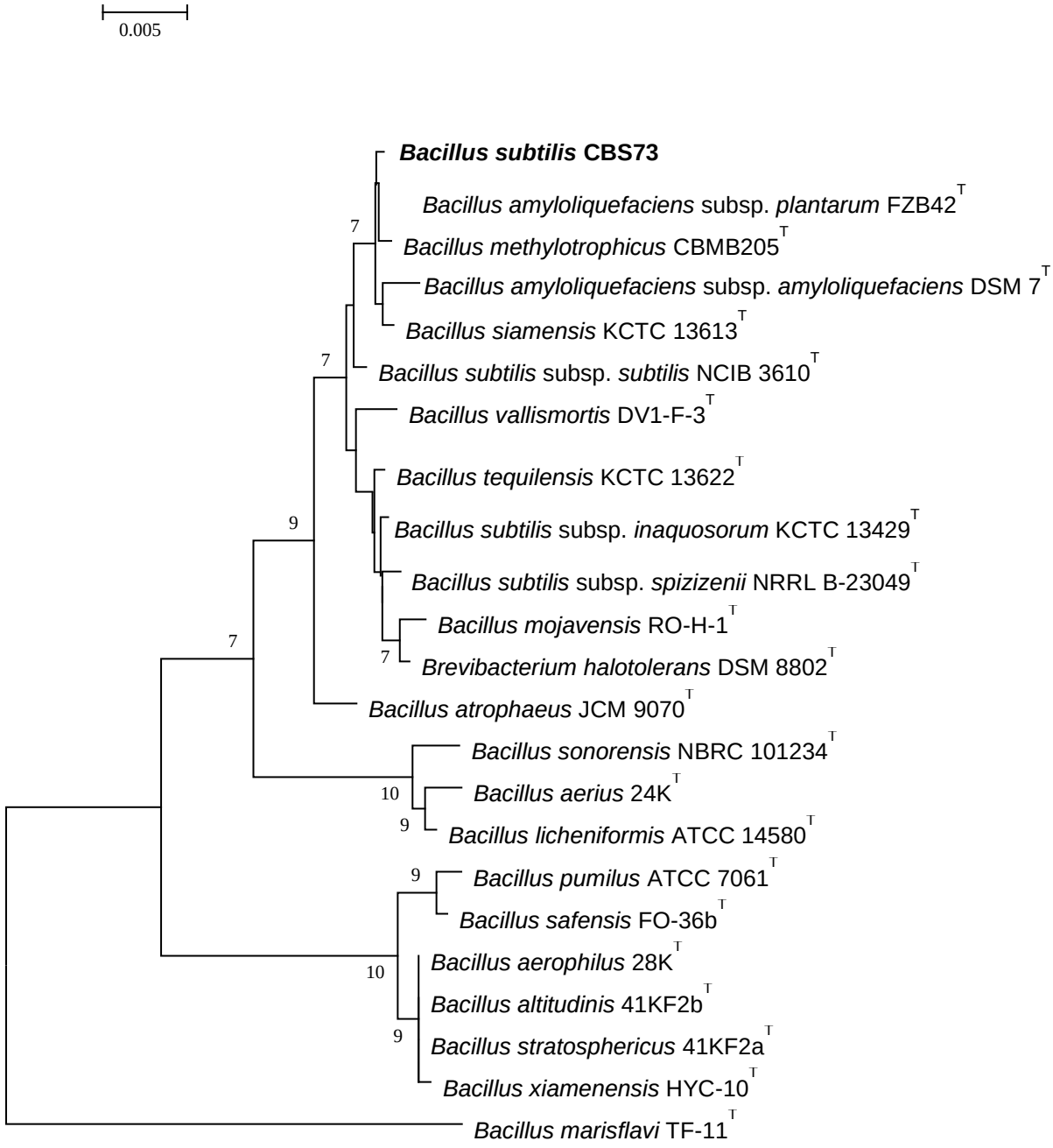


Figure 3. Nighbor-joining tree based on nearly complete 16S rRNA sequences showing relationships between of *Bacillus sp.* CBS73 and related *Bacillus* strains.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

b. 항균펩타이드 최적배양 조건

항균펩타이드 CBS73 생산은 탄소, 질소, 무기염류의 영양성분으로 이루어진다. 다양한 탄소원, 질소원, 무기염류의 조건 속에서 배양하여 최고의 조건을 결정하였다. 항균펩타이드 생산을 위해 탄소원에 따른 항균활성을 조사하기 위해 질소원 Yeast extract 1% 고정 후, 다양한 탄소원 (Glucose, Mannitol, Starch, Lactose, Fructose, Sorbitol, Maltose, Sucrose) 1%를 첨가하여 37℃, 170rpm, 24 시간 동안 배양하였다. 그 결과 항균활성은 Fructose 1%를 첨가하였을 때 최고의 활성을 보였다 (Figure 4). 질소원에 따른 활성을 조사하기 위해 탄소원 중 활성이 가장 뛰어난 Fructose 1%를 고정한 후, 다양한 질소원 (Beef extract, Malt extract, Tryptone, Yeast extract, Oat meal, Soytone, Peptone, Dried yeast) 1%를 첨가하여 37℃, 170rpm, 24 시간 동안 배양하였다. 그 결과 항균활성은 Beef extract 1%를 첨가하였을 때 가장 최고의 활성을 보였다 (Figure 5).

무기염류에 따른 활성은 선정한 탄소원 Fructose 1%와 질소원 Beef extract 1%를 고정한 후, 다양한 무기염류 (Na_2HPO_4, NaH_2PO_4, $MgSO_4$, $ZnSO_4$, $MgCl_2$, KH_2PO_4, $FeSO_4$, NaCl, $CaCl_2$) 0.1%를 첨가하여 37℃, 170rpm, 24 시간 동안 배양하였다. 그 결과 항균펩타이드 활성은 NaCl 0.1%를 첨가하였을 때 가장 최고의 활성을 보였다 (Figure 6).

Fructose 1% + Beef extract 1% + NaCl 0.1%의 최적의 배지조건에서 12-24시간, 170 rpm, 37℃일 때 최고의 배양조건을 결정하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

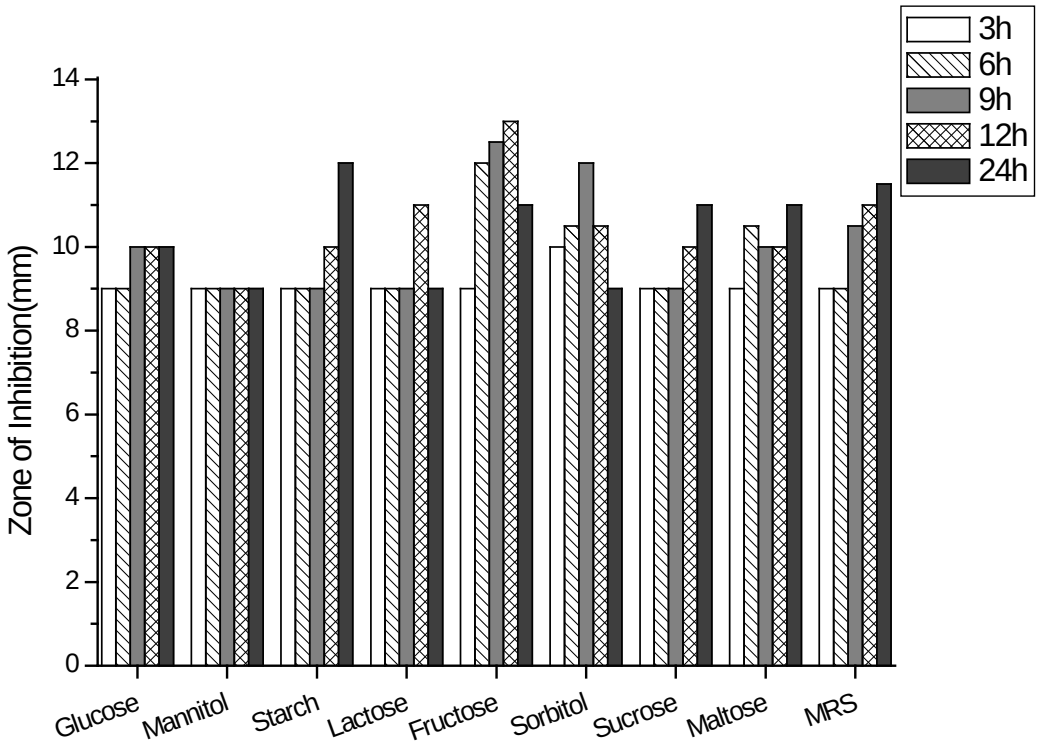


Figure 4. Effect of various carbon sources on the activity of antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. CBS73

Production medium was supplemented with various carbon sources such as Glucose, Mannitol, Starch, Lactose, Fructose, Sorbitol, Sucrose, Maltose each at a level of 1% (w/v) by keeping the nitrogen sources constant.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

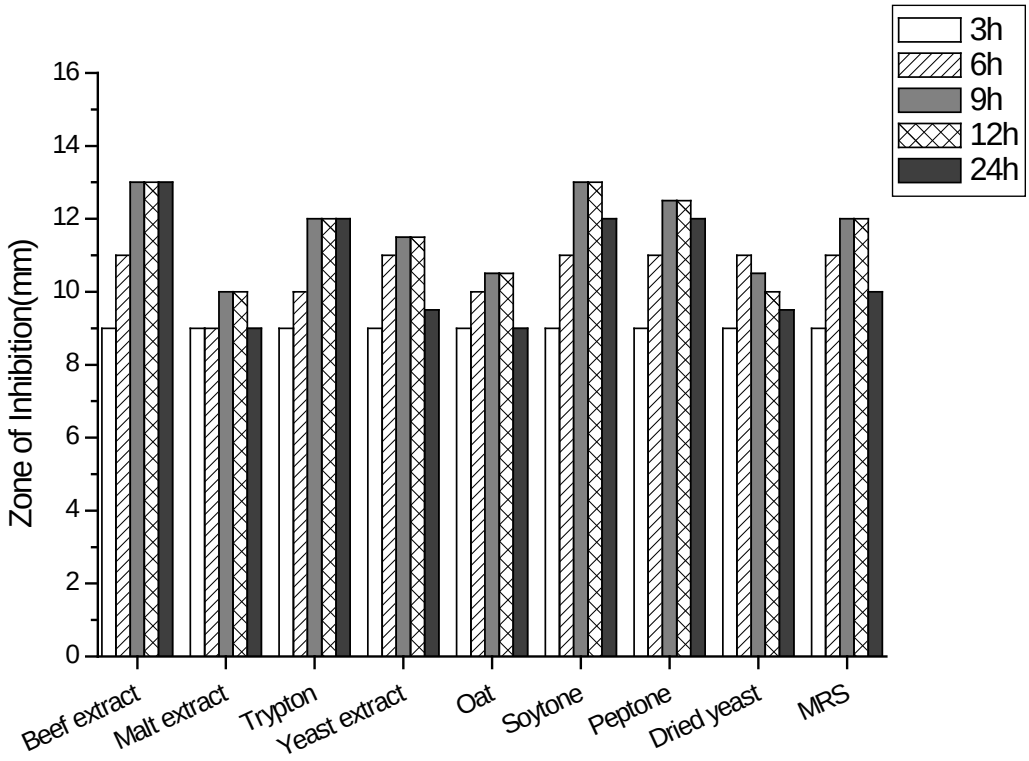


Figure 5. Effect of various nitrogen sources on the activity of antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. CBS73

Production medium was supplemented with various nitrogen sources such as Beef extract, Malt extract, Tryptone, Yeast extract, Oat, Soytone, Peptone, Dried yeast each at a level of 1% (w/v) by keeping the metal ion sources constant.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

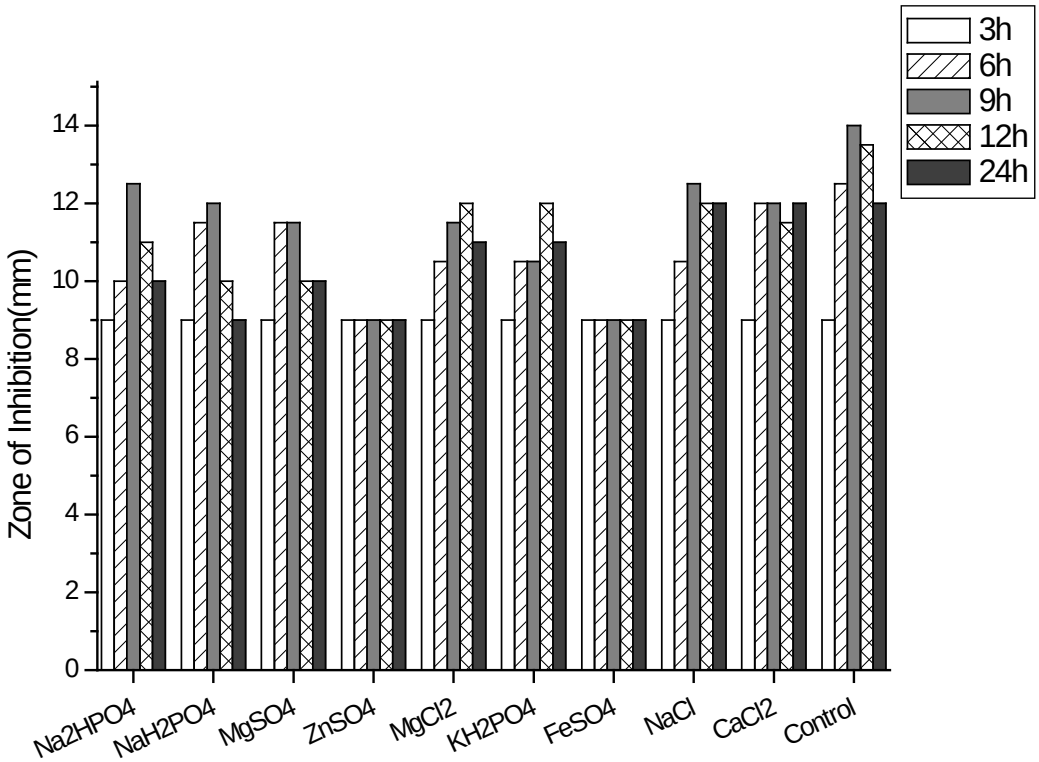


Figure 6. Effect of various metal ion sources on the activity of antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. CBS73

Production medium was supplemented with various nitrogen sources such as Disodium phosphate, Monosodium phosphate, Magnesium sulfate, Zinc sulfate, Magnesium chloride, Monopotassium phosphate, Ferric sulfate, Sodium chloride, Calcium chloride each at a level of 0.1% (w/v) to the production medium.

Control : Fructose 1% + Beef extract 1%

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

c. 항균펩타이드 정제

항균펩타이드 CBS73은 37℃, 170rpm, 12-24시간 배양 후, 배양액을 10,000rpm, 50 분 동안 원심분리 하였다. 상등액에 황산암모늄 (Ammonium sulfate)을 첨가하여 농도 별로 분획을 나누어 농축하였다. 가장 높은 항균활성을 나타낸 30-80% 황산암모늄 농축액을 겔 크로마토그래피를 수행하기 위한 분리정제 펩타이드 시료로 사용하였고, Sepharose CL-6B, Sephadex G-50, Sephadex G-25, Sephadex G-10 겔 크로마토그래피을 이용하여 정제하였다. 정제된 항균펩타이드 CBS73의 활성분획을 모아 Tricine SDS-PAGE로 하나의 밴드를 확인 후, MALDI-TOF을 이용하여 5210.2 Da의 분자량을 확인하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

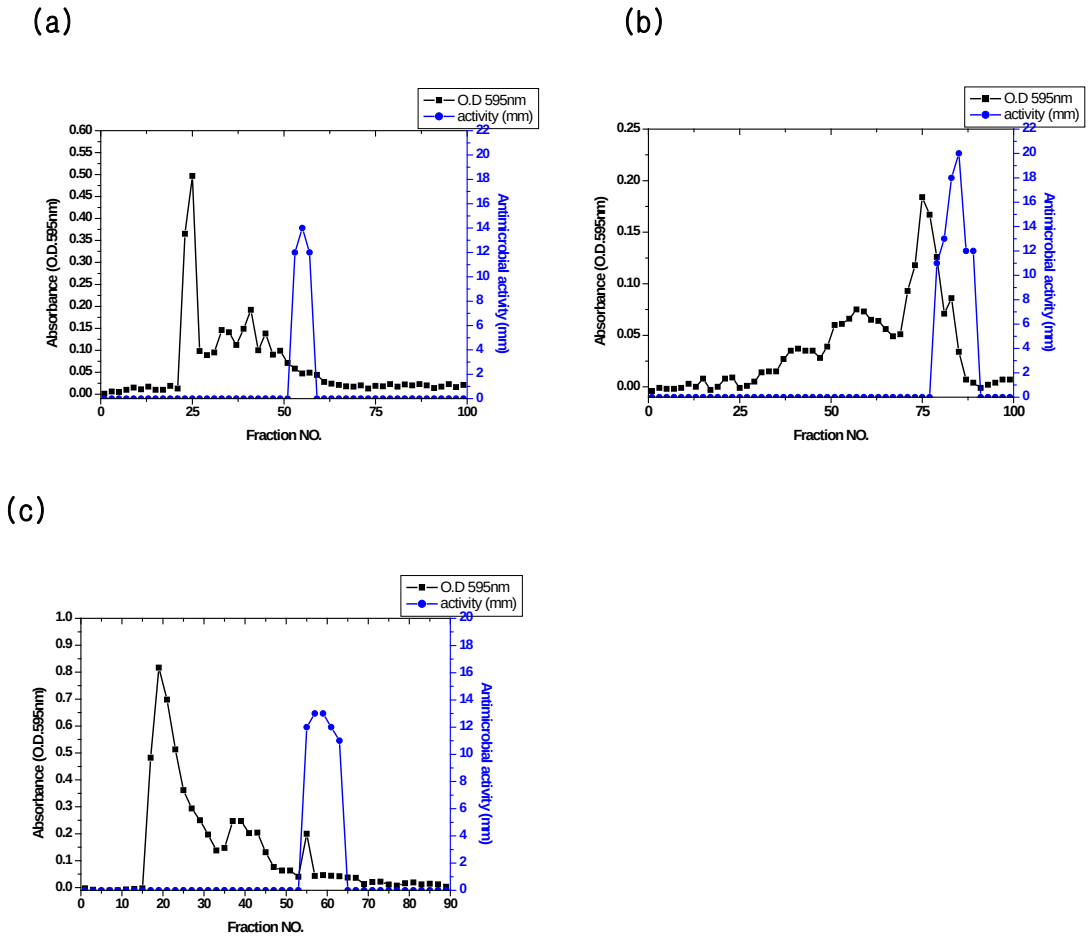


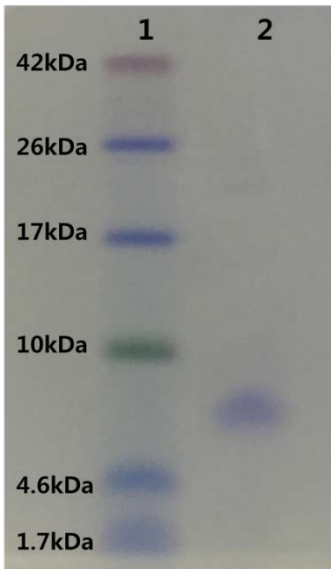
Figure 7. Elution profile of *Bacillus* sp. CBS73 antimicrobial peptide

(a) Gel filtration chromatography with Sepharose CL-6B column (2.2cm x 84cm). The proteins were eluted at a flow rate of 5ml/min. (b) Gel filtration chromatography with Sephadex G-50 column (1.5cm x 89cm). (c) Gel filtration chromatography with Sephadex G-25 column (1.0cm x 54cm). The proteins were eluted at a flow rate of 1 ml/min.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(a)



(b)

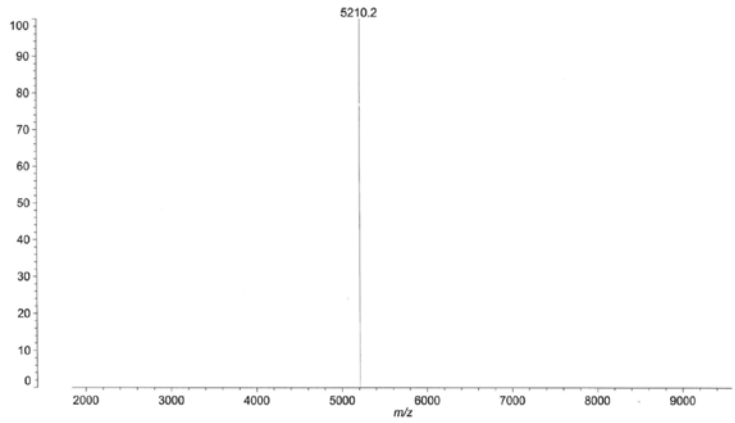


Figure 8. Determination of the molecular weight

(a)Tricine SDS-PAGE and activity staining of CBS73 peptide. Lane 1, protein size marker with the corresponding value in kDa on the left; Lane 2, purified CBS73 peptide. (b) MALDI-TOF data.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 항균펩타이드 생물학적 활성

a. 항균펩타이드 항균력활성

(1) 항균펩타이드 최소억제농도(MIC)

Table 2에서 보여준 것과 같이, 항균펩타이드 CBS73은 테스트균주로 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistant *S.aureus* (VRSA), 그리고 Vancomycin-resistant *enterococci* (VRE), IMP (Imipenem resistance *Pseudomonas aureus*), ESBL (Extended spectrum beta lactamase *Escherichia coli*), *Alcaligenes faeclis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus sabtilis*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Enterococcus faecalis*을 사용한 결과 폭 넓은 항균활성을 확인하였다. 그람 양성인 VRE, VRSA, 그람 음성인 *Escherichia coli*, Salmonella에서 Vancomycin과 Bacitracin보다 더 강한 항균활성을 보여주었다.

그람 양성균 VRSA에서 Vancomycin과 Bacitracin의 최소억제농도는 80㎍/㎖이상의 농도를 나타내었고, 항균펩타이드 CBS73은 20㎍/㎖의 최소억제농도를 확인하였다. 그람 음성균으로 Salmonella 에서 Vancomycin과 Bacitracin의 최소억제농도는 80㎍/㎖이상의 농도를 나타내었지만, 항균펩타이드 CBS73은 10㎍/㎖의 최소억제농도를 확인하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 2. Minimum inhibitory concentration of *Bacillus* sp. CBS73 peptide

Test organisms		MIC(μg/ml)		
		CBS73	Bacitracin	Vancomycin
Alcaligenes faecalis ATCC 1004	G(-)	80	>80	>80
Salmonella typhimurium KCTC 1925	G(-)	10	>80	>80
Escherichia coli KCTC 1923	G(-)	80	>80	>80
ESBL B1*	G(-)	80	>80	.>80
ESBL P3*	G(-)	80	>80	>80
ESBL S1*	G(-)	80	>80	>80
ESBL U4*	G(-)	80	>80	>80
ESBL W1*	G(-)	80	>80	>80
Pseudomonas aeruginosa KCTC 1637	G(-)	80	>80	>80
IMP 120**	G(-)	80	>80	>80
IMP 123**	G(-)	>80	>80	>80
IMP129**	G(-)	80	>80	>80
Bacillus subtilis ATCC 6633	G(+)	80	>80	>80
Micrococcus luteus ATCC 9341	G(+)	80	1.25	1.25
Mycobacterium smegmatis ATCC 9341	G(+)	0.15	0.15	0.15
Enterococcus faecalis ATCC 29212	G(+)	>80	20	1.25
VRE 4***	G(+)	20	20	>80
VRE 6***	G(+)	>80	>80	>80
VRE 82***	G(+)	40	5	>80
VRE89***	G(+)	40	>80	>80
VRE98*	G(+)	>80	80	>80
VRSA****	G(+)	20	>80	>80

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Test organisms		MIC (μg/ml)		
		CBS73	Bacitracin	Vancomycin
Staphylococcus aureus KCTC 1928	G(+)	80	10	1.25
MRSA693E*****	G(+)	>80	10	1.25
MRSA 4-5*****	G(+)	80	2.5	1.25
MRSA 5-3*****	G(+)	80	2.5	1.25
MRSA S3*****	G(+)	80	40	1.25
MRSA U4*****	G(+)	80	80	0.625
MRSA S1*****	G(+)	80	40	1.25
MRSA B15*****	G(+)	80	40	1.25

*ESBL, Extended spectrum beta lactamase *Escherichia coli*; **IMP, Imipenem resistant *Pseudomonase aureus*; ***VRE, Vancomycin resistant *Enterococcus faecium*; ****VRSA, Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*; *****MRSA, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(2)항균펩타이드 온도, pH, 단백질분해효소, 유기용매의 안정성

항균펩타이드 CBS73의 온도, pH의 영향에 대한 안정성은 Table 3에 나타내었다. CBS73의 온도 안정성은 다양한 온도에서 잔존활성을 측정하였다. 20-100℃의 온도에서는 안정하였지만 그 이상의 온도에서는 잔존활성이 줄어드는 것을 확인하였다. 항균펩타이드 CBS73의 pH 안정성은 다양한 범위의 pH버퍼 (pH 2.0 - 10.0)에서 측정하였더니, pH 4.0 - 10.0 에서 안정함을 확인하였지만, pH 2.0 에서 잔존활성 없음을 확인하였다.

CBS73에 대해 다양한 화학물질에 대한 안정성을 Table 4에 나타내었다. TCA (Trichloroacetic acid), Triton X-100을 제외하고 나머지 화학물질에는 반응 하지 않음을 확인 할 수 있었다.

단백질분해효소에 대한 안정성은 Table 5에 나타내었다. CBS73와 Lipase, Proteinase K, α-chymotrypsin, Trypsin, Protease, Papain, Pepsin 반응 후, *Mycobacterium smegmatis*를 디스크확산 법을 이용하여 측정하였다. 항균펩타이드 CBS73은 모든 단백질분해효소에 안정함을 확인하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 3. Effect of different temperature and pH on inhibitory activity of peptide

Treatment	Residual activities (%)
Temperature (Time)	
None	100
20 ℃, 30 min	100
40 ℃, 30 min	100
60 ℃, 30 min	104.1
80 ℃, 30 min	84.8
100 ℃, 30 min	81.3
121 ℃, 15 min	0
pH	
2	0
4	103.7±5.77
6	98.2±5.77
8	96.4±17.32
10	100

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 4. Effect of various chemicals on antimicrobial activity

Treatment	Concentration	Residual activity(%)
None		100
Acetone	10 % (v/v)	102.2±5.77
Chloroform	10 % (v/v)	100
Ethanol	10 % (v/v)	102.4±5.77
Methanol	10 % (v/v)	105.0
Ethyl acetate	10 % (v/v)	134.5
EDTA	10 mM/ml	107.3±5.77
Trichloroacetic acid	100 mg/ml	0
Triton X-100	1 % (v/v)	0
Tween 20	10 % (v/v)	90.0
Tween 80	10 % (v/v)	85.7

* Antimicrobial peptide was pre-incubated for 1h at room temperature with chemicals and then assayed for antimicrobial activity. Antimicrobial peptide activity measured in the absence of any chemicals was considered as none (100 %).

* After treatment with TCA samples were centrifuged 8,000rpm for 5min and the supernatant was neutralized to pH 7.0 before testing for antimicrobial activity.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 5. Effect of various proteolytic enzymes

Proteolytic enzymes	Residual activity(%)
None	100
Lipase	102.0±5.8
Proteinase K	105.8±5.8
Protease	102.0±5.8
α-chymotrypsin	98.2
Trypsin	96.4±5.8
Pepsin	98.1±5.8
Papain	102.0±11.0

* Peptide was treated with 1mg/ml of each enzyme and incubated at room temperature for 1h and then boiled for 2min at 100℃ for enzyme inactivation. Peptide solution without any proteolytic enzymes treatment was taken as none (100%).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

b. 항산화력 측정

(1) DPPH 라디컬 소거능

DPPH는 항산화 물질과 반응하게 되면 본래 보라색의 안정한 free radical인 DPPH가 무색으로 변하게 되는데 항산화 활성을 비교적 신속하고 간단하게 측정할 수 있는 방법 중 하나이다. 517㎚에서 DPPH 라디컬의 흡광도 변화를 측정함으로써 라디컬 소거 효과를 조사 하였다. CBS73 및 Ascorbic acid의 DPPH 라디컬 소거능은 농도의존적으로 저해됨을 확인하였다. 모든 실험은 3번을 수행하였고, 평균값을 측정하였다.

CBS73의 DPPH소거능를 이용하여 항산화 활성을 측정한 결과는 Figure 9에 나타내었다. 500㎍/㎖의 농도에서 CBS73은 9.7±1.35의 억제율을 나타내었다. Ascorbic acid는 DPPH방법에 의한 항산화 활성 측정을 위한 대조군으로 사용하였다. Ascorbic acid의 농도는 1-500㎍/㎖까지 변화를 측정하였고, 농도가 500㎍/㎖일 때, 88.26±0.26의 억제율을 나타내었다. Ascorbic acid의 농도변화에 따라 억제 백분율이 상승됨이 관찰되었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

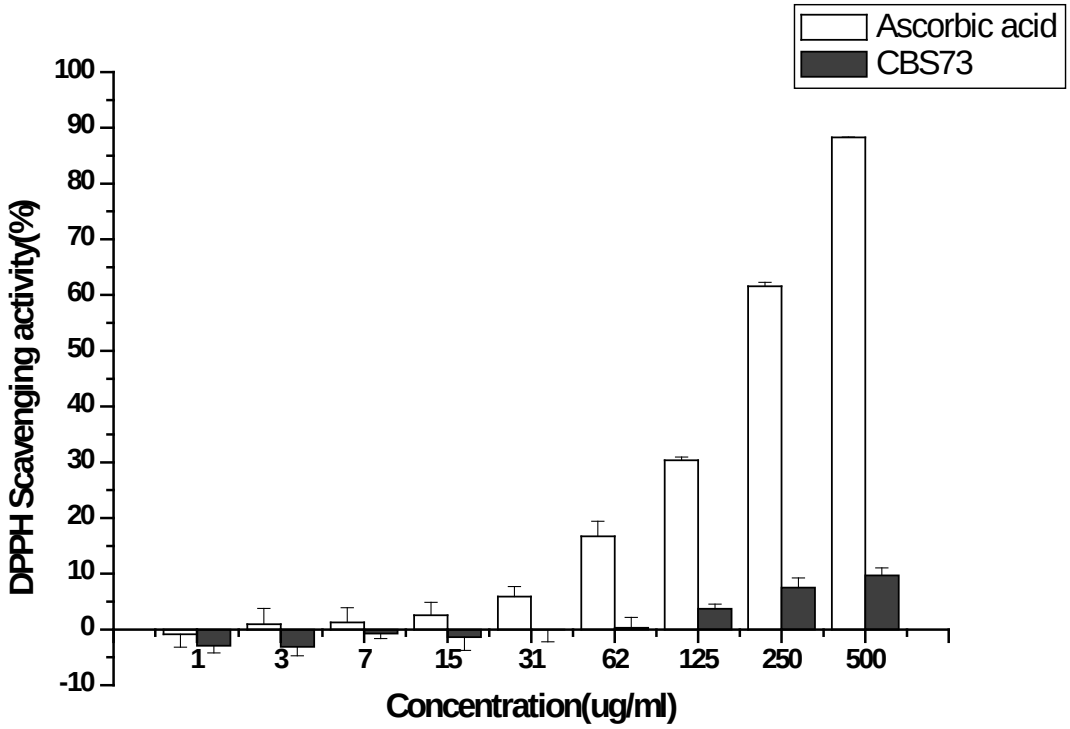


Figure 9. DPPH radical scavenging activity of CBS73 antimicrobial peptide in different concentration.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(2) 환원력 측정

환원력은 700nm에서 ferric-ferricyanide (Fe^{3+})혼합물이 수소를 공여하여 유리 라디컬을 안정화시켜 ferrous (Fe^{2+})로 전환하는 환원력을 흡광도 값으로 측정하는 방법이다. 환원력을 측정하기 위해 대조구로써 Ascorbic acid를 사용하였으며, 항균펩타이드 CBS73의 환원력은 Figure 10에 나타내었다. 모든 실험은 3번을 수행하였고, 평균값을 측정하였다.

보통 환원력은 항산화 활성과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다[28]. CBS73의 농도가 500㎍/㎖일 때 흡광도 값이 0.566±0.03을 나타내었고, Ascorbic acid의 농도가 500㎍/㎖일 때 1.384±0.026의 흡광도 값을 나타내면서 약 3배 차이를 확인하였다. 높은 수준의 항산화 활성은 아니지만 미비한 수준의 활성이 있다고 생각된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

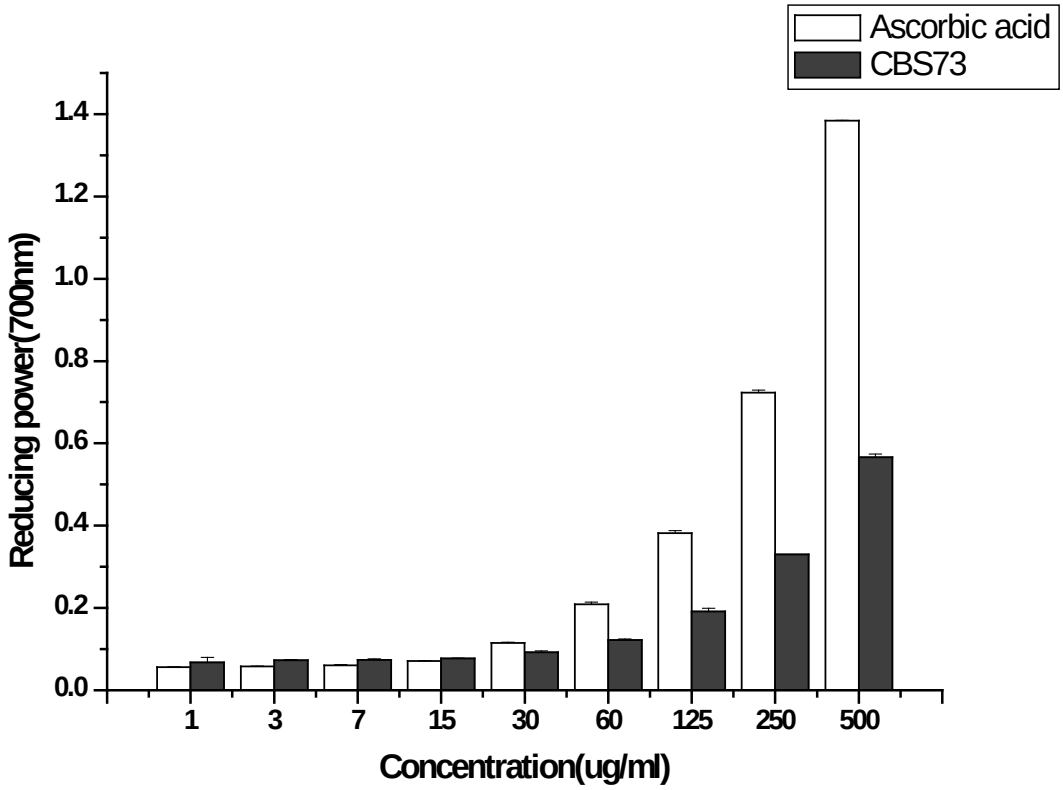


Figure 10. Reducing power of CBS73 antimicrobial peptide

The absorbance (700nm) was plotted against concentration of sample. All values are mean ± SD of triplicates.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(3) 총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량 측정은 Folin-Ciocalteu reagent가 추출물의 페놀성 화합물에 의해 환원된 결과 몰리브덴이 청색으로 발색하는 원리로 측정하였다. 총 페놀 함량을 조사하기 위해 대조군으로 Gallic acid을 사용하였고, Folin-Ciocalteu 비색법에 따라 최대 파장인 700㎚에서 측정하였다. 모든 실험은 3번을 수행하였고, 평균값을 측정하였다.

항균펩타이드 CBS73의 총 페놀 함량은 Figure 11에 나타내었다. CBS73의 농도가 500㎍/㎖일 때 0.339±0.03의 흡광도 값을 보였고, Gallic acid의 농도가 500㎍/㎖일 때 2.712±0.06의 흡광도를 확인하였다. Gallic acid는 농도의존적으로 흡광도 값이 상승됨을 관찰하였지만, 항균펩타이드 CBS73은 미비한 수준을 보여주었다.

CBS73은 페놀의 구조를 포함하는 물질이 거의 없다는 것으로 생각된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

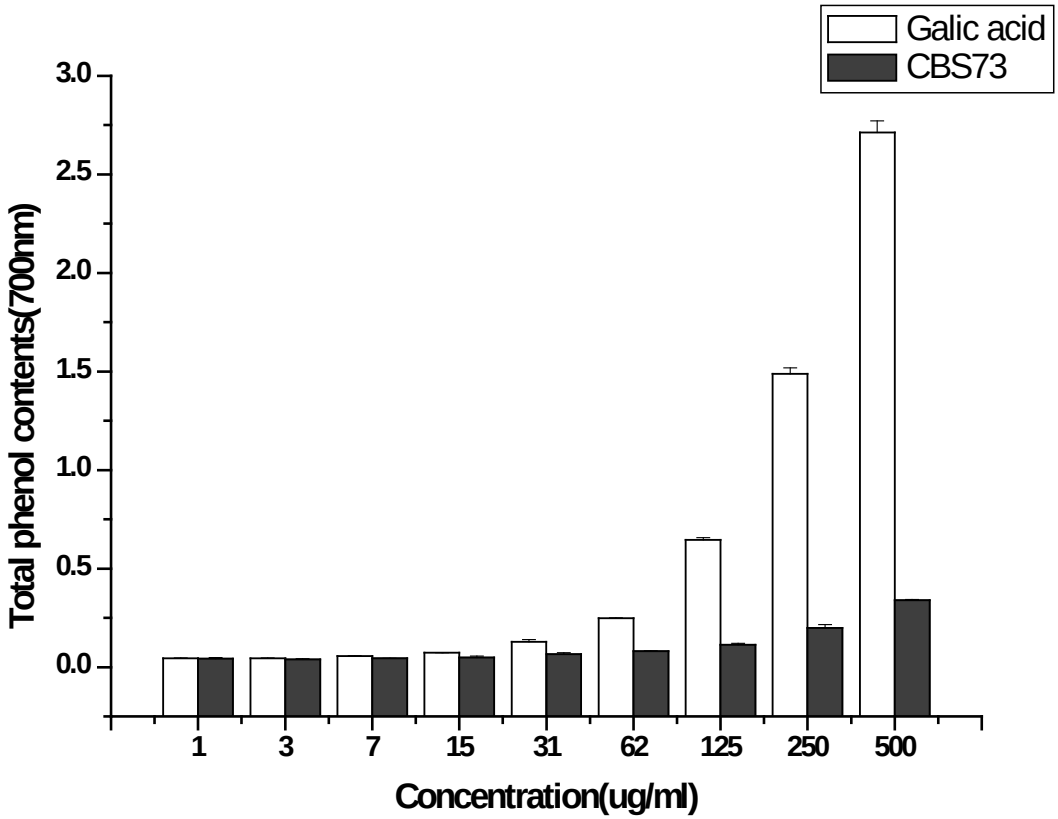


Figure 11. Total phenol contents of CBS73 antimicrobial peptide

Total phenolic content was measured using the Yen and Hsieh method. Absorbance values represent triplicates of different samples analysed.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

d. 항염증 시험 평가

(1) 세포 생존율 및 일산화질소 생성 억제능 측정

Raw 264.7 세포를 24 시간동안 배양 후, 항균펩타이드 CBS73 을 다양한 농도로 처리한 후 흡광도 540 ㎚에서 세포 생존율을 측정하였다. 항균펩타이드 CBS73 을 처리하지 않은 세포의 생존율은 100%로 하였다. Figure 12(a)에서 나타낸 바와 같이, CBS73 은 1-50 ㎍/㎖의 범위에서 세포독성을 나타내지 않았지만, 50 ㎍/㎖이상의 농도에서 세포독성을 나타내어 세포생존율이 감소함을 확인하였다.

대식세포는 LPS와 같은 자극에 따라 일산화질소를 생산한다. LPS에 의해 유도된 일산화질소 생성의 CBS73에 농도에 따른 억제능 효과를 측정하기 위해 그리스시약을 이용하여 일산화질소의 농도를 측정하였다. Figure 13(b)에 나타낸 바와 같이, LPS 처리된 세포의 NO 생성량은 처리되지 않은 세포와 비교하여 일산화질소 생성이 증가함을 확인하였다. LPS와 1-100 ㎍/㎖ CBS73를 함께 처리한 세포의 일산화질소 생성 억제능을 비교하였을 때 본 펩타이드는 일산화질소의 생성을 억제하는 효과가 없음을 확인하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(a) (b)

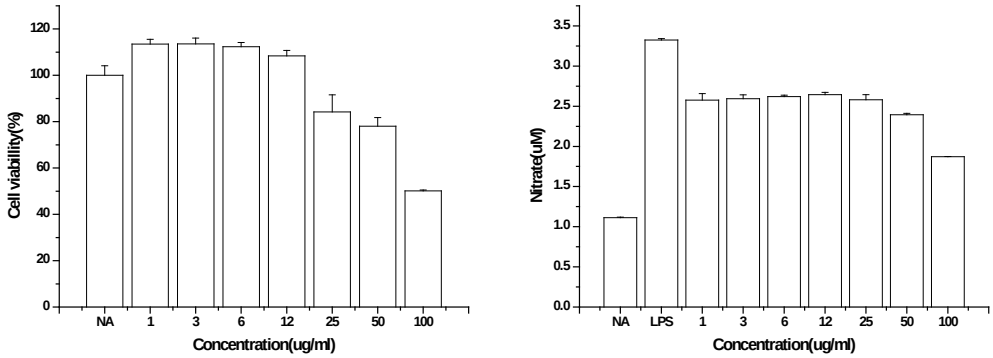


Figure 12. Effect of the CBS73 antimicrobial peptide on cell viability and NO production.

(a) Cell viability was measured after 24 h incubation. Survival rates were tested with MTT assay in Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were incubated in the presence or absence of 1-100μg/ml peptide for 24 h. (b) Cells were incubated with the various concentration of peptide for 30 min, followed by treatment with 1μg/ml of LPS and incubated for 24 h. The amounts of NO were determined using the Griess reagent in the culture medium. Each bar shows the mean ± S.D of three independent experiments performed in triplicate.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

IV. 결론

본 연구에서는 항균펩타이드 생산 균주를 한국 전통음식으로부터 분리하였다. 실험실에서 분리한 100여종의 균주 중에서 항균활성이 높은 *Bacillus* 균주를 우선 선별하였고, 이들 중 강력한 항균펩타이드를 생산하는 *Bacillus sp.* CBS73을 선택하였다. *Bacillus sp.* CBS73는 최적배양조건에서 배양한 후, 배양액으로부터 항균펩타이드를 분리, 정제하였고 항균, 항산화, 항염증 및 생화학적 특성을 조사하였다.

Bacillus sp. CBS73 유전자 염기서열 (16S rRNA sequence)을 분석한 결과 *Bacillus sp.* CBS73은 *Bacillus subtilis subsp. Subtilis*와 99.72% 일치하였으며, 계통발생학적 위치는 phylogenetic tree figure으로 나타내었다. 일반적으로 *Bacillus* 속 균주는 iturin, fengycin, mycosubtulin과 같은 항균물질을 생산한다.

항균펩타이드 CBS73의 최적배양실험을 통해 선정된 (1.0% Fructose, 1.0% Beef extract, 0.1% NaCl) 최적배양배지조건에서 37℃, 170rpm, 12-24시간의 조건에서 배양하였을 때 최대 항균활성을 나타내었으며 점차 시간이 지날수록 항균활성이 감소하였다 (Figure 4-6). 최대 항균활성을 보이는 시점에서 배양액을 회수하여 황산암모늄(Ammonium sulfate)침전, 겔 크로마토그래피 칼럼인 Sepharose CL-6B, Sephadex G-50, Sephadex G-25, Sephadex G-10을 수행하여 항균펩타이드를 분리, 정제하였으며 순수한 펩타이드를 CBS73이라고 명명하였다. 위의 단계를 통해 최종 정제된 CBS73은 Tricine-SDS를 통하여 단일 펩타이드임을 확인하였고, MALDI-TOF분석을 통하여 분자량이 5210.2 Da인 항균펩타이드임을 확인하였다. 기존에 보고 되었던 다른 바실러스 균주가 생산하는 펩타이드와 비교 한 결과, *Bacillus subtilis* R75 (12 kDa)[29], *Bacillus subtilis* EMD4 (3.5 kDa)[30], *Bacillus subtilis* SK.DU.4 (5323.9 Da)[4] 이들 바실러스 생산 항균 펩타이드와 다른 분자량을 가짐을 확인하였다.

정제된 항균펩타이드 CBS73은 다양한 병원성 그람 양성균과 그람 음성균에 대해 최소억제농도를 시험한 결과 항균펩타이드 CBS73은 그람 양성균과 그람 음성균에 폭넓은 항균효과를 확인하였다(Table 2). CBS73은 Bacitracin과 Vancomycin과 대등한 항균효과를 보였지만, 특히 *salmonella*에서 10㎍/㎖, VRSA에서 20㎍/㎖의 최소억제농도

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

를 보여줌으로써 더 강한 항균활성을 나타내었다.

항균펩타이드 CBS73의 다양한 온도 (20℃, 40℃, 60℃, 80℃, 100℃)범위에서 30분 동안 온도 안정성을 확인한 결과, 100℃까지 안정함을 보이고 100℃이상의 온도를 유지하였을 때 시간의 지남에 따라 활성이 저해되는 것을 확인할 수 있었다. CBS73 pH (pH 2.0 - 10.0)안정성을 확인한 결과, pH 4.0 - 10.0에서 안정한 것임을 확인하였다. 하지만, 121℃나 산성의 조건에서는 활성이 저해되었다 (Table 3). *Bacillus subtilis* EMD4[30]는 pH 3.0 - 9.0, 80℃까지 안정함을 보아 비슷한 특징을 보임을 알 수 있었다. 계면활성제와 화학물질에 대한 안정성 확인한 결과, 계면활성제인 Trichloroacetic acid, Triton X-100에 억제되었고, Tween20, Tween80에서는 활성이 저하되는 것을 확인하였다 (Table 4). 단백질분해효소인 Proteinase K, Protease, a-chymotrypsin, Trypsin, Papain, Pepsin의 안정성을 확인한 결과, 유사한 결과를 보이는 *Bacillus licheniformis* MKU3 (1.5 kDa)으로부터 생산되는 Bacitracin은 proteinase K, trypsin, pronase E에 영향을 받았지만[31] *Bacillus subtilis* CBS73은 영향을 받지 않음을 확인하였다(Table 5).

안정성시험 결과 CBS73은 기존에 보고된 바실러스 생산 펩타이드와 온도 및 pH의 안정성은 비슷하였지만 단백질 분해효소와 화학물질에 대한 안정성에서는 차이를 보였다.

DPPH 라디컬 소거능은 페놀성 물질에 대한 항산화 반응의 지표로써, 환원력이 클수록 DPPH 라디컬 소거능이 더 높다고 한다[32]. 그러므로 항균펩타이드 CBS73에 대한 항산화 활성은 DPPH 라디컬소거능, 환원력, 총 페놀함량 측정법을 이용하여 시험하였다. DPPH는 항산화 물질과 반응하면 본래 보라색의 안정한 free radical인 DPPH가 무색으로 변하게 되는데 517㎚에서 흡광도를 측정함으로써 DPPH 라디컬 소거능을 측정할 수 있다. 항균펩타이드 CBS73의 DPPH 라디컬 소거능은 농도 별로 시험하였을 때 농도 의존적으로 증가함을 확인할 수 있었지만, 대조구인 Ascorbic acid와 비교하여 효과가 미비하다는 것을 확인하였다. 환원력은 700㎚에서 ferric-ferricyanide (Fe^{3+})혼합물이 수소를 공여하여 유리라디칼을 안정화시켜 ferrous (Fe^{2+})로 전환하는 환원력을 흡광도 값을 통해 측정할 수 있다. CBS73은 1-15㎍/㎖의 농도에서는 대조군인 Ascorbic acid보다 환원력이 좋았지만, 고농도에서는 대조군

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

보다 낮은 환원력을 나타내었다. 총 페놀 함량 측정은 Folin-Ciocalteu reagent가 추출물의 페놀성 화합물에 의해 환원된 결과 몰리브덴이 청색으로 발색하는 원리로 측정하였다. 1-30㎍/㎖의 농도까지는 대조구인 Gallic acid와 비슷한 수준의 총 페놀 함량을 보이지만, 농도가 점차 증가할수록 차이가 커지는 것을 확인하였다. 그러므로 페놀성 구조를 가지는 물질의 함량이 미비 할 것으로 예상된다.

항균 및 항산화 효능 이외에 LPS에 의한 Raw 264.7 세포에서 CBS73의 일산화질소 생성에 미치는 억제 효과를 평가하였다. Lipopolysaccharide (LPS)은 그람 음성균의 외막 성분으로 단핵구 및 대식세포로부터 산화 질소 및 여러 염증성 사이토카인의 생성을 유도한다. 100㎍/㎖의 농도에서 세포의 생존율이 50%까지 저해되었지만, 1-50㎍/㎖의 농도에서는 생존율이 80%이상이면서 일산화질소 생성 억제능 또한 영향을 받지 않는 것임을 알 수 있었다(Figure 13(a),(b)). 결론적으로, 한국 전통식품으로부터 분리한 항균펩타이드 CBS73은 그람 음성 병원성 미생물에 대한 항균효과, 항산화 효능, 세포독성을 확인함으로써 신규한 펩타이드 계열 그람 음성세균의 치료제로써 가능성을 확인하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

V. 참고문헌

1. Ongena, M. and P. Jacques, *Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol.* Trends Microbiol, 2008. 16(3): p. 115-25.
2. Kunst, F., et al., *The complete genome sequence of the gram-positive bacterium Bacillus subtilis.* Nature, 1997. 390(6657): p. 249-256.
3. Katz, E. and A.L. Demain, *The peptide antibiotics of Bacillus: chemistry, biogenesis, and possible functions.* Bacteriological Reviews, 1977. 41(2): p. 449.
4. Baindara, P., et al., *Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant Bacillus subtilis strain SK. DU. 4 isolated from a rhizosphere soil sample.* AMB Express, 2013. 3(1): p. 2.
5. James, S.G., C. Holmström, and S. Kjelleberg, *Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2.* Applied and Environmental Microbiology, 1996. 62(8): p. 2783-2788.
6. Bulet, P., R. Stöcklin, and L. Menin, *Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates.* Immunological reviews, 2004. 198(1): p. 169-184.
7. Zhang, L., A. Rozek, and R.E. Hancock, *Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes.* Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(38): p. 35714-35722.
8. Jenssen, H., P. Hamill, and R.E. Hancock, *Peptide antimicrobial agents.* Clinical microbiology reviews, 2006. 19(3): p. 491-511.
9. Brogden, K.A., M. Ackermann, and K.M. Huttner, *Small, anionic, and charge-neutralizing propeptide fragments of zymogens are antimicrobial.* Antimicrobial agents and chemotherapy, 1997. 41(7): p. 1615-1617.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

10. Stark, M., L.-P. Liu, and C.M. Deber, *Cationic hydrophobic peptides with antimicrobial activity.* Antimicrobial agents and chemotherapy, 2002. 46(11): p. 3585-3590.

11. Brumfitt, W., M.R. Salton, and J.M. Hamilton-Miller, *Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus and vancomycin-resistant enterococci.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2002. 50(5): p. 731-734.

12. Xiao, H., et al., *The application of antimicrobial peptides as growth and health promoters for swine.* Journal of animal science and biotechnology, 2015. 6(1): p. 19.

13. Zhao, X., et al., *LAMP: a database linking antimicrobial peptides.* 2013.

14. Bahar, A.A. and D. Ren, *Antimicrobial peptides.* Pharmaceuticals, 2013. 6(12): p. 1543-1575.

15. Brogden, K.A., *Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?* Nature Reviews Microbiology, 2005. 3(3): p. 238-250.

16. Guaní-Guerra, E., et al., *Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease.* Clinical Immunology, 2010. 135(1): p. 1-11.

17. Ehrenstein, G. and H. Lecar, *Electrically gated ionic channels in lipid bilayers.* Quarterly reviews of biophysics, 1977. 10(01): p. 1-34.

18. Breukink, E. and B. de Kruijff, *The lantibiotic nisin, a special case or not?* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1999. 1462(1): p. 223-234.

19. Rotem, S. and A. Mor, *Antimicrobial peptide mimics for improved therapeutic properties.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2009. 1788(8): p. 1582-1592.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

20. Oren, Z. and Y. Shai, *Mode of action of linear amphipathic α-helical antimicrobial peptides.* Peptide Science, 1998. 47(6): p. 451-463.

21. Hancock, R.E., *Peptide antibiotics.* The Lancet, 1997. 349(9049): p. 418-422.

22. Le, C.-F., et al., *In vitro properties of designed antimicrobial peptides that exhibit potent antipneumococcal activity and produces synergism in combination with penicillin.* Scientific reports, 2015. 5.

23. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* J biol Chem, 1951. 193(1): p. 265-275.

24. Islam, M., et al., *Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of cloxacillin for selected isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) with their antibiogram.* Bangladesh Journal of Veterinary Medicine, 2008. 6(1): p. 121-126.

25. Sánchez-Moreno, C., J.A. Larrauri, and F. Saura-Calixto, *A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998. 76(2): p. 270-276.

26. Oyaizu, M., *Studies on products of browning reaction--antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine.* Eiyogaku zasshi= Japanese journal of nutrition, 1986.

27. Yen, G.-C. and C.-L. Hsieh, *Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (Eucommia ulmoides) toward various lipid peroxidation models in vitro.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. 46(10): p. 3952-3957.

28. Siddhuraju, P., P. Mohan, and K. Becker, *Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (Cassia fistula L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp.* Food chemistry, 2002. 79(1): p. 61-67.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

29. Sharma, N., et al., *Purification and characterization of bacteriocin produced by Bacillus subtilis R75 isolated from fermented chunks of mung bean (Phaseolus radiatus).* Food Technology and Biotechnology, 2011. 49(2): p. 169.

30. Liu, X., et al., *Properties of a Bacteriocin Produced by Bacillus subtilis EMD4 Isolated from Ganjang (Soy Sauce).* Journal of microbiology and biotechnology, 2015.

31. Kayalvizhi, N. and P. Gunasekaran, *Production and characterization of a low-molecular-weight bacteriocin from Bacillus licheniformis MKU3.* Letters in applied microbiology, 2008. 47(6): p. 600-607.

32. Kang, Y.-H., Y.-K. Park, and G.-D. Lee, *The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds.* Korean Journal of Food Science and Technology (Korea Republic), 1996.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

감사의 글

어느덧 짧지 않은 기간 2년의 대학원 생활을 마무리하며 지난 시간들을 돌이켜보니 많은 추억이 떠오릅니다. 많이 부족한 저를 석사 과정 동안 연구에 매진할 수 있도록 아낌없는 격려와 지도를 해주신 지도 교수님이신 유진철 교수님께 진심으로 먼저 감사 드립니다. 그리고 매 순간마다 소중한 충고와 조언을 해주셨던 김은애 교수님, 홍준희 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 교수님들의 많은 가르침 덕분에 제가 무사히 졸업을 할 수 있게 되었습니다.

또한 가족보다 더 많은 시간을 함께 보내며 제일 힘이 되어 준 최윤희 박사님, 저의 활력소가 되어준 최윤석 오빠, 최지은 언니, 외국어 공부에 도움을 준 판띠 산데쉬, 레그미 수딥, 라흐만 사이퍼에게 감사의 말을 전하고 싶습니다. 벌써 함께한 지 6년이 되어가며 서로에게 힘이 되어준 조유진, 언제나 말동무가 되어준 임다혜, 김세연 언니, 힘들 때마다 옆에 있어 준 이수민 그리고 조언을 아낌없이 해준 생화학실험실의 윤효정 언니, 김진영 언니, 김가람 언니에게도 진심으로 감사 드립니다.

마지막으로 언제나 저를 믿어주고 응원을 아낌없이 해준 저의 가족이자 지금까지 키워주신 부모님께 먼저 감사 드리며 제가 가장 사랑하는 동생들과 이 기쁨을 함께 나누고 싶습니다. 이 모든 분들의 가르침과 응원을 잊지 않고 생각하며 더 발전되고 사회에 공헌할 수 있는 한 사람이 되도록 노력하며 살아가겠습니다. 이 모든 분들께 저의 작은 결실인 이 논문을 바칩니다.

2015년 12월

김 미 리

Collection @ chosun