creative commons

COMMONS DEED

저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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

[UCI]I804:24011-200000242042

2011年 8月

석사학위논문

전통 김치에서 분리한 신규 *Bacillus* 속 균주 발효액의 항세균, 항염 및 항산화 활성연구

조선대학교 대학원

약 학 과

하 정 완

전통 김치에서 분리한 신규 *Bacillus* 속 균주 발효액의 항세균, 항염 및 항산화 활성연구

Antibacterial, Antiinflammatory and Antioxidative activities of a new Bacillus strain isolated from Kimchi

2011년 8월 25일

조선대학교 대학원

약 학 과

하 정 완

전통 김치에서 분리한 신규 *Bacillus* 속 균주 발효액의 항세균, 항염 및 항산화 활성연구

지도교수 유 진 철

이 논문을 약학석사 학위신청논문으로 제출함.

2011년 4월

조선대학교 대학원

약 학 과

하 정 완

하정완의 석사학위논문을 인준함.

위원장 조선대학교 교수 최 후 균 (인)

위 원 조선대학교 교수 최 홍 석 (인)

위 원 조선대학교 교수 유 진 철 (인)

2011년 5월

조선대학교 대학원

Contents

List of tables
List of figures
ABSTRACT

제1장 서론 ····· 1
제2장 재료 및 방법 ····· 4
제1절 항세균 활성을 나타내는 미생물의 분리 및 동정
1. 항세균 활성을 나타내는 미생물의 분리 ····· 4
2. 16S rRNA의 염기서열 ····· 4
제2절 *Bacillus sp CS61*균주의 최적 성장 배지분석 ····· 4
1. 탄소원 이용능력 및 항생제 내성 병원성 미생물 생육저해 효과 ····· 5
2. 질소원 이용능력 및 항생제 내성 병원성 미생물 생육저해 효과 ····· 5
3. 금속이온 이용능력 및 항생제 내성 병원성 미생물 생육저해 효과 ·· 5
제3절 최적배지 배양 시 *Bacillus sp CS61*균주의 생장 조건 분석 ····· 6
제4절 *Bacillus sp CS61*균주 발효액의 내열성 및 효소 안정성 ····· 6
제5절 *Bacillus sp CS61*균주 발효액의 항생제 내성 병원성 미생물, 장내 유해 세균에 대한 최소저해농도 분석 ····· 7
제6절 *Bacillus sp CS61*균주 발효액의 DPPH 라디칼 소거능 (DPPH radical scavenging activity)확인 실험 ····· 7
제7절 *Bacillus sp CS61*균주 발효액의 환원력(Reducing power) 확인 실험 ····· 7
제8절 *Bacillus sp CS61*균주 발효액에 의한 NO생성 억제 활성 및 세포 생존률 측정 ····· 8
제3장 결과 및 고찰 ····· 9

제1절 항세균 활성을 나타내는 미생물의 분리 및 동정 ····· 9
1. 형태학적 특성 분석 ····· 9
2. 분자생물학적 특성 분석 ····· 9
제2절 *Bacillus sp CS61*균주의 최적 성장 배지분석 ····· 9
1. 탄소원 이용능력 및 항생제 내성 병원성 미생물 생육저해 효과 ····· 9
2. 질소원 이용능력 및 항생제 내성 병원성 미생물 생육저해 효과 ····· 9
3. 금속이온 이용능력 및 항생제 내성 병원성 미생물 생육저해 효과 10
제3절 최적배지 배양 시 *Bacillus sp CS61*균주의 생장 조건 분석 ····· 10
제4절 *Bacillus sp CS61*균주 발효액의 내열성 및 효소 안정성 ····· 10
제5절 *Bacillus sp CS61* 균주 발효액의 항생제 내성 병원성 미생물, 장내 유해 세균에 대한 최소저해농도 분석 ····· 11
제6절 *Bacillus sp CS61* 균주 발효액의 DPPH 라디칼 소거능(DPPH radical scavenging activity)확인 실험 ····· 11
제7절 *Bacillus sp CS61* 균주 발효액의 환원력(Reducing power) 확인 실험 ····· 11
제8절 *Bacillus sp CS61*균주 발효액에 의한 NO생성 억제 활성 및 세포 생존률 측정 ····· 12
제4장 결론 ····· 13
제5장 참고문헌 ····· 28

List of tables

Table. 1 Similarity of nucleotide sequence of 16S rDNA of *Bacillus sp CS61* with related species ····· 24
Table. 2 Growth profile of *Bacillus sp CS61* ····· 25
Table. 3 Temperature stability of *Bacillus sp CS61* fermentation medium ····· 26
Table. 4 MIC(Minimum Inhibitory Concentration) test of *Bacillus sp CS61* fermentation medium against various pathogens 27

List of figures

Fig. 1 Stability of an antibacterial activity of *Bacillus sp CS61* fermentation medium against various digestive Enzyme ···· 16
Fig. 2 Effect of carbon source on the production of anti-MRSA substance from *Bacillus sp CS61* ····· 17
Fig. 3 Effect of nitrogen source on the production of anti-MRSA substance from *Bacillus sp CS61* ····· 18
Fig. 4 Effect of metal ion on the production of anti-MRSA substance from *Bacillus sp CS61* ····· 19
Fig. 5 DPPH radical scavenging activity of *Bacillus sp CS61* fermentation medium ····· 20
Fig. 6 Reducing power of *Bacillus sp CS61* fermentation medium 21
Fig. 7 Inhibition of NO production by *Bacillus sp CS61* fermentation medium ····· 22
Fig. 8 Cell viability test against various concentration of *Bacillus sp CS61* fermentation medium ····· 23

ABSTRACT

Antibacterial, Antiinflammatory and Antioxidative activities of a new Bacillus strain isolated from Kimchi

Ha Jung Wan
Adviser : Prof. Yoo Jin-Cheol Ph. D.
Department of Pharmacy
Graduate School of Chosun University

In order to search new antibacterial agents from bacterial source, one potent strain was isolated from *Kimchi*. It was a new strain which was classified as *Bacillus sp CS61* based on biochemical, morphological, physiological and 16S-ribosomal DNA sequence analysis. For the production of antibacterial compound, optimization of medium composition and fermentation conditions were studied. To determine suitable carbon sources, nitrogen sources and mineral sources, various compounds were examined. Maltose and beef extract were found to be the most effective carbon and nitrogen source while none of mineral sources were found suitable for the production. The strain showed the strongest antibacterial

activity at 72 hours when cultivated at 37℃ and pH 8.05. Furthermore it showed thermostability up to 60 ℃ and stability against digestive enzymes such as pronase and trypsin. The strains showed antibacterial activity specially against Gram positive but not against Gram negative bacteria. Moreover, *Bacillus sp CS61* also showed strong antioxidative activity which was measured by DPPH radical scavenging activity. While antiinflamatory activities was measured by reducing power and nitrite scavenging activity.

To sum up, in this study, we have isolated a new strain related to *Bacillus* which produced strong antibacterial, antiinflammatory and antioxidative activities in the culture media.

제 1 장 서 론

최근 세계적으로 항생제의 무분별한 오남용으로 인한 내성 균주 출현은 그 문제가 심각하게 드러나고 있다. 이중 메티실린 내성률은 50%내외로 매우 높으며, 대한 병원 감염 관리학회가 최근 조사한 결과에 따르면 대부분의 대학병원과 종합병원에서 분리되는 MRSA(Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus)균주는 70~80%에 이른다고 한다. 병원성 세균 중 현재 전 세계적으로 가장 문제시 되고 있는 황색포도구균(Staphylococcus aureus)은 전체 인구의 약 30%에서 검출되는 그람양성구균으로, 병원 내 감염증을 유발하는 병원체로 널리 알려져 있다.[9] 황색포도상구균은 일차적으로 피부와 연부조직에 감염을 일으켜 농피증(pyoderma)의 원인이 되고, 골수염, 심내막염, 패혈증과 균혈증 등 생명을 위협하는 중한 전신 감염증을 유발하는 것으로 보고되고 있다.[8] 페니실린(Penicillin), 메티실린(methicillin) 등 포도상구균 항세균제는 그 효과가 우수하여 지난 수십 년간 본 감염증의 주요 치료약제로 사용되어 왔으나, 1961년 영국에서 메티실린에 내성을 보이는 균주(MRSA)가 처음 보고된 이후 전 세계적으로 지속적인 증가 추세를 보이고 있다(Standing Medical Advisory Committee, Department of Health, 1998). 이는 보다 위생학적으로 안전하고 효과적인 치료제의 개발이 절실함을 보여준다.

또한 새로운 항생물질을 만드는 데에 있어서 장내 세균 총에 의한 항생물질의 분해는 항생물질 및 항생제 대체 물질의 발명에 있어서 여러 장애 요인이 되기도 한다. 이러한 장내 세균 총 이라 함은 동물의 몸속에 들어와 장에 살고 있는 세균을 총칭하는데, 사람의 장에는 보통 약 1002조개의 장내 세균이 존재하며 그 종류만도 400여 종 이상이다. 동물에 존재하는 장내 세균에는 유익한 세균 및 유해한 세균이 있는데, 장내 유해 세균이 과다하게 존재하는 경우 장내 환경은 부패 환경으로 변하면서 악취가 심해지며 유해물질을 만든다. 이런 유해물질은 장 근육운동에 영향을 미치거나 강한 발암 작용을 만든다. 물론 이러한 유해물질은 간에서 대부분 해독작용을 거치지만 독성물질이 많아지면 간 기능이 저하되어 피로해지고 각종 성인질환을 유발하는 원인이 된다.

장내 유해세균으로는 엔테로코커스(*Enterococcus*), 리스테리아(*Listeria*), 황색포도상구균(*Staphylococcus*)등이 대표적이다. 엔테로코커스(*Enterococcus*)에 감염되게 되면 심내막염, 복막염 또는 요로 감염증을 유발한다. 리스테리아(*Listeria*) 감염은 주로 폐혈증형으로 나타나며, 토끼에서는 출혈성, 괴사성 자궁염을 동반한 유산, 닭에서는 심근염, 근육부종, 간의 괴사를 보인다. 이러한 장내 세균들에 저항성이 있는 항생물질의 개발이 필요하다.

바실러스(*Bacillus*)는 많은 펩티드 항생제를 생산하고, 다양한 산업에 중요한 종으로써 식품과 산업용로 안정성을 가지고 있어 항세균 활성에 관한 흥미로운 종이다.[(1)(2)] 이미 많은 바실러스 종들이 박테리오신(Bacteriocin)과 박테리오신 유사물질(Bacteriocin-like substances)을 생산하는 것으로 알려져 있다.[(11)] 박테리오신은 세포에 부착되어 있거나 외부로 방출될 수 있고, 성장주기(growth cycle) 전. 후에 생성될 수 있으며, 단백질 분해효소(protease) 같은 효소에 저항력을 가지며, pH, 온도에 안정적이다. 항세균 기작은 거의 알려져 있지 않으며, 세포막 채널(cell membrane channel)에 박혀 세포 용해(cell lysis)를 유도한다는 점이 보고되었다. 이러한 특징을 가지는 박테리오신은 항생제 대체재로써 부각되고 있으며, 식품의 부패방지제로 사용되는 항세균 물질이기 때문에 더욱 안정한 항세균제라 할 수 있다.[(7)(12-14)(17)(20)(23-24)(26)]

항산화(antioxidant)란 체내에서 일어나는 여러 산화작용을 방지하는 것을 말한다. 산화작용은 체내에 존재하는 여러 종류의 불포화 지방산이 산소에 의해 산화되면 과산화 지질이라고 하는 물질이 생성되고 이것이 증가하면 노화 현상이 촉진되는 현상을 말한다. 질병 및 노화는 체내 대사과정 중 발생하는 O_2^-(superoxide), NO(nitric oxide), NO_2(nitrogen dioxide), OH(hydroxyl), ROO(proxyl), RO(alkoxyl), HO_2(hydroperoxyl) 라디칼(radical) 등의 산화반응에 기인하며 생체 내에서는 이런 유해한 라디칼인 유리기로부터 생체를 방어하기 위한 수단으로써 수퍼옥사이드 디스무타제(SOD, superoxide dismutase), 카탈라제(CAT:catalase), 글루타치온 퍼옥시다제(GSHpx:glutathione peroxidase) 등의 항산화 효소나 비타민 E, 글루타치온 등의 항산화 물질이 존재하여 유리기를 제거함으로써 생체를 산화적 손상으로부터 보호한다. 그러나 이러한 항산화 방어계가 유리기 생성을 조절할 수

없을 정도로 저하될 때 조직의 산화적 스트레스와 손상이 촉진되며 체내에서 생성된 과잉의 유리기와 지질 과산화물은 단백질의 산화, DNA 손상과 같은 산화적 스트레스에 의한 상해를 증가시킨다.[21]

염증반응은 대식세포 및 마이크로글리아 세포의 활성으로 인한 염증인자의 증가로 나타나는 것으로, 정상적인 상태에서는 항원인식으로 인한 항원항체 반응으로 제거하는 역할을 하지만 과활성이 되면 병인으로 작용하게 된다.[18] 염증반응과 관련이 깊은 마이크로글리아 세포는 대식작용(phagocytosis), 항원표식작용(antigen presentation), 사이토카인(cytokine)과 ROS 또는 NO와 같은 염증매개인자의 분비 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[27] 일산화질소(NO)는 염증과 암을 포함한 다양한 병리생리학적 과정에서 iNOS에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다. NOS는 염증, 혈관확장, 신경전달, 종양세포와 신체의 항상성을 조절하는 중요한 효소로 L-아르기닌(L-arginine)으로부터 일산화질소(NO)를 생성하며, 염증 상태에서는 대식세포에 iNOS에 의해 일산화질소(NO)를 다량 생성하여 여러 만성질환을 일으키는 것으로 알려져 있다.[4][15][25] 대식세포에서 일산화질소(NO)의 생성은 iNOS의 발현과 직접적으로 연관되어 있고, LPS는 그람음성 세균의 세포벽 물질로서 면역 세포 등을 자극하여 일산화질소(NO)의 생성을 상승적으로 증가시킨다.

본 연구는 안전한 전통식품인 김치에서 *Bacillus sp CS61* 균주를 분리해 내었을 때, 상기 균주의 발효액이 항생제 내성 병원성 미생물과 장내 유해 미생물에도 강력한 저해 효능과 발효액의 항산화 및 항염증 효능을 확인하였다. 또한 소화효소와 온도에의 안정성으로 미루어 볼 때 이 물질이 향후 위생학적으로 안전하고 유용한 의약품으로써의 가치가 있음이 사료된다.

제 2 장 재료 및 방법

제1절 항세균 활성을 나타내는 미생물의 분리 및 동정

1. 항세균 활성을 나타내는 미생물의 분리

항생제 내성 병원성 미생물인 메티실린 저항성 황색포도상구균(Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus,* MRSA)과 장내 유해 미생물에 항세균 활성을 나타내는 미생물을 얻기 위하여 메티실린 저항성 황색포도상구균을 지시균으로 미리 도말한 MH(Muller Hilton)배지에 김치 국물을 0.85% NaCl에 희석하여 도말 후 37℃, 24시간 배양하였다. 주변에 투명 환을 나타내는 집락을 3차에 걸쳐 새로운 MH 배지에 옮겨 배양하는 방법으로 순수 분리하였다. 순수 분리 배양된 미생물 균주는 20% 글리세롤을 첨가하여 영하 80℃에 보존하였다.

2. 16S rRNA의 염기서열

16S rRNA는 PCR기기(Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler)를 이용하여 증폭하였으며 primer로는 27f(5′-AGAGTTTGATCMTGGCT-3) 1492r(5′-AAGGAGGTGWTCCARCC-3′)[16]을 사용하였다. 증폭조건의 변성은 94°C에서 1분, annealing은 55°C에서 1분, 신장은 72°C에서 1분간 총 30회 반복하였다. 증폭된 DNA는 Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)와 oligo-nucleotide primers를 이용하여 염기서열을 확인하였다.[6]

제2절 *Bacillus sp CS61*균주의 최적 성장 배지분석

1. 탄소원 이용능력 및 항생제 내성 병원성 미생물 생육저해 효과

질소원인 효모 추출물을 1% 고정 후 탄소원의 종류를 달리하여 각각 1% 첨가하여 배양 배지를 제조하였다. 상기 배지에 *Bacillus sp CS61* 균주를 접종하여 37℃에서 배양한 후 세포 배양액을 시간별로 수득해 균주의 유해세균 저지 효과를 측정하였다. 측정 방법은 MH배지에 메티실린 저항성 황색포도상구균을 도말 후 시간별로 수득한 균주의 배양액을 paper disc 위에 확산 시킨 후 37℃에서 12시간 배양 하여 투명 환의 크기를 특정해 각 탄소원에 따른 생육저해 효과를 분석하였다.

2. 질소원 이용능력 및 항생제 내성 병원성 미생물 생육저해 효과

Bacillus sp CS61 균주의 질소원 이용능력을 알아보기 위해 유해 세균에 대한 생육 저해 효과가 뛰어남을 확인한 탄소원을 1% 첨가 후 비프 추출물, 말트 추출물, 트립톤, 효모 추출물, 오트밀, 소이, 펩톤을 질소원으로 하여 배양 배지를 제조하였다. 상기 배지에 균주를 접종하여 배양한 후 세포 배양액을 시간별로 수득해 균주의 유해세균 저해 효과를 측정하였다. 측정 방법은 MH배지에 메티실린 저항성 황색포도상구균을 도말 후 시간별로 수득한 균주의 배양액을 paper disc 위에 확산 시킨 후 37℃에서 12시간 배양 하여 투명 환의 크기를 특정해 각 질소원에 따른 생육저지 효과를 분석하였다.

3. 금속이온 이용능력 및 항생제 내성 병원성 미생물 생육저해 효과

Bacillus sp CS61 균주의 금속이온 이용능력을 알아보기 위해 유해 세균에 대한 생육 저해 효과가 뛰어남을 확인한 탄소원과 질소원을 각각 1%씩

첨가한 후 각 금속이온을 각각 0.1%씩 첨가하여 배지를 제조하였다. 상기 배지에 균주를 접종하여 배양한 후 세포 배양액을 시간별로 수득해 균주의 유해세균 저해 효과를 측정하였다. 측정 방법은 MH배지에 메티실린 저항성 황색포도상구균을 도말 후 시간별로 수득한 균주의 배양액을 paper disc 위에 확산 시킨 후 37℃에서 12시간 배양 하여 투명 환의 크기를 특정해 각 금속이온에 따른 생육저해 효과를 분석하였다.

제3절 최적배지 배양 시 *Bacillus sp CS61*균주의 생장 조건 분석

Bacillus sp CS61 균주의 최적 생장 배양 시간 및 그 때의 최적 pH를 확인하고자 하였다. 구체적으로, 최적 생장 배양 시간을 알아보기 위하여 균주를 최적배지 조건으로 37℃에서 배양하면서 24시간 간격으로 세포 배양액을 수득하고 660nm의 흡광도에서 세포의 농도를 측정 및 pH, 항세균 활성 정도를 측정하였다.

제4절 *Bacillus sp CS61*균주 발효액의 내열성 및 효소 안정성

Bacillus sp CS61 균주 발효액을 필터 후 30℃, 40℃, 60℃, 100℃, 121℃에서 각각 30, 60, 120분 열처리 한 후 MRSA가 도말된 아가배지에 paper disc를 올리고 반응액을 확산시켜 12시간 후 항세균 활성을 확인하였다. 또한 소화효소에 대한 안정성을 시험하기 위하여 소화요소인 Trypsin 과 Pronase를 이용 각각 1mM HCl과 2차 증류수로 희석하여 효소의 농도(mg/ml)가 각각 20, 10이 되게 한 후 균주 발효액과 혼합(최종농도가 1mg/ml)하여 37℃에서 3시간 배양 후 활성을 측정하였다.

제5절 *Bacillus sp CS61*균주 발효액의 항생제 내성 병원성 미생물, 장내 유해 세균에 대한 최소저해농도 분석

Bacillus sp CS61 균주 발효액의 세균성장의 최소저해농도를 분석하기 위해 항생물질 감수성 시험(MIC, Minimum Inhibitory Concentration)[(5)(10)(22)] 중 단계희석법을 수행하였다. 균주 발효액을 1/2농도씩 단계별로 희석하여 MH 배지 10ml에 섞어 굳힌 후 준비하였다. 각 병원성 미생물과 장내 유해 세균을 MH액체 배지에서 배양한 후 10^6 CFU/ml로 생균수를 조정하여 미리 준비한 배지에 스트리킹하고 12시간 후 균주 생육을 관찰하였다. 대조군으로는 반코마이신과 바시트라신을 사용하였다.

제6절 *Bacillus sp CS61*균주 발효액의 DPPH 라디칼 소거능(DPPH radical scavenging activity)확인 실험

Blois의 방법[(3)]을 응용하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrzyl(DPPH)를 사용한 방법으로 측정하였다. DPPH 1.2mg을 메탄올 10ml에 용해한 다음 DPPH 100ul에 동결 건조한 *Bacillus sp CS61* 균주의 발효액을 희석하여 준비한 시료 10ul, 메탄올 90ul을 혼합하여 상온에 10분간 방치시킨 다음 517nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가군과 무 첨가군의 흡광도 차이를 백분율(%)로 표시하여 전자 공여능으로 하였다. 무 첨가군은 메탄올을 사용하였다.

제7절 *Bacillus sp CS61*균주 발효액의 환원력(Reducing power) 확인 실험

Bacillus sp CS61 균주의 환원력 실험은 Oyaizu 방법[(19)]에 의해 균주의 발효액을 동결건조 한 후 희석하여 준비한 시료 200ul 당 0.2M 인산나트륨(Sodium phosphate buffer : pH6.6)과 1% 페리시안화칼륨(potassium ferricyanide)을 각각 20ul씩 넣고 혼합하여 50℃에서 20분간 반응시켰다. 반

응시킨 각 시료에 10% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid)을 200ul씩 가하여 혼합 후 10분간 원심분리 하였다. 상층액에 동량의 0.1% 염화 제2철($FeCl_3$)을 첨가한 후, 700nm에서 흡광도를 특정하였다. 반응시킨 시료의 높은 흡광도는 높은 환원력을 나타내었으며, 대조군으로 아스코르브산을 사용하였다.

제8절 *Bacillus sp CS61*균주 발효액에 의한 NO생성 억제 활성 및 세포 생존률 측정

Bacillus sp CS61 균주의 발효액이 NO 생성을 억제하는지 확인하기 위하여 비활성 시에는 NO 생성 수준이 매우 낮으나, LPS로 활성화시킬 때 NO 생성이 유도된다고 알려져 있는 대식 세포주인 Raw264.7 세포를 사용하여 CS61 발효액의 효과를 측정하였다.

구체적으로, Raw264.7 세포를 10% Fetal Bovain Serum(FBS)이 포함된 DMEM 배지에서 $1X10^5$세포/ml의 농도로 현탁하여 96웰플레이트에 분주한 다음, 5% CO_2 배양기에서 37℃의 조건으로 배양하였다. 상기 Raw264.7 세포를 배양하면서 동결 건조한 균주의 발효액을 희석한 시료와 최종농도 1ug/ml의 LPS를 함께 처리하였다. 대조군으로는 LPS를 처리하지 않은 군(NA), LPS만 처리한 군(LPS)를 사용하였으며 12시간 후 세포 배양액을 회수하여 NO의 양을 그리이스(Griess) 반응을 이용해 측정하였다. 세포는 회수하여 세포생존율 측정에 이용하였으며, 세포생존율은 MTT 분석법에 따라 측정하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제1절 항세균 활성을 나타내는 미생물의 분리

1. 형태학적 특성 분석

형태적인 특성은 그람염색법을 통하여 그람양성의 간균임을 확인하였다.

2. 분자생물학적 특성 분석

Table. 1에서 보여 주는 바대로 본 균주는 16S rRNA 유전자 염기서열결정 및 분석법을 통하여 *Bacillus subtilis subsp. subtilis NCIB 3610*(T)과 99.596% 유사함으로 드러났다.

제2절 *Bacillus sp CS61*균주의 최적 성장 배지분석

1. 탄소원 이용능력 및 항생제 내성 병원성 미생물 생육저해 효과

Bacillus sp CS61 균주의 탄소원 효과를 조사하기 위하여 질소원인 효모추출물을 1% 고정 후 탄소원의 종류를 달리하여 각각 1% 첨가하여 각 탄소원에 따른 생육저해 효과를 분석한 결과 Fig. 2 와 같이 말토오스가 포함된 배지에서 60시간 배양 시 유해세균 저해 효과가 높았다.

2. 질소원 이용능력 및 항생제 내성 병원성 미생물 생육저해 효과

Bacillus sp CS61 균주의 질소원 이용능력을 알아보기 위해 유해 세균에 대한 생육 저해 효과가 뛰어남을 확인한 탄소원을 1% 첨가 후 질소원의 종류를 각각 1% 첨가하여 각 질소원에 따른 균주의 유해세균 저해 효과를 측

정한 결과 Fig. 3와 같이 비프 추출물을 질소원으로 포함하는 배지에서 60시간 배양 시 유해세균 저해 효과가 높았다.

3. 금속이온 이용능력 및 항생제 내성 병원성 미생물 생육저해 효과

Bacillus sp CS61 균주의 금속이온 이용능력을 알아보기 위해 유해 세균에 대한 생육 저해 효과가 뛰어남을 확인한 탄소원과 질소원을 비프 추출물을 각각 1%씩 첨가한 후 각 금속이온을 각각 0.1%씩 첨가하여 배지를 제조하여 각 금속이온에 따른 생육저해 효과를 분석한 결과 Fig. 4와 같이 모든 금속이온이 유해세균 생육을 저해하는 능력을 감소시킴을 확인하였다.

제3절 최적배지 배양 시 *Bacillus sp CS61*균주의 생장 조건 분석

최적 생장 배양 시간을 알아보기 위하여 *Bacillus sp CS61* 균주를 최적배지 조건으로 37℃에서 배양하면서 24시간 간격으로 세포 배양액을 수득하고 660nm의 흡광도에서 세포의 농도를 측정 및 pH, 항세균 활성 정도를 측정한 결과 Table. 2에서 보여 주는 바대로 *Bacillus sp CS61* 균주는 72시간 배양 시 성장 정도 및 항세균 활성이 우수하였으며 그 때의 pH는 8.05를 나타내었다.

제4절 *Bacillus sp CS61*균주 발효액의 내열성 및 효소 안정성

Bacillus sp CS61 균주 발효액을 필터 후 30℃, 40℃, 60℃, 100℃, 121℃에서 각각 30, 60, 120분 열처리 한 후 MRSA가 도말된 아가배지에 paper disc를 올리고 반응액을 확산시켜 12시간 후 항세균 활성을 확인한 결과 Table.

3에서 보여 주는 바대로 발효액을 100℃ 이상 열처리 하였을 때 메티실린 저항성 황색포도상구균에 대한 항세균 활성이 감소하는 경향을 확인하였다. 또한 Typsin과 Pronase의 소화효소에 대한 안정성을 실시하였을 때 Fig. 1과 같이 본 발효액은 항세균 활성의 감소가 거의 드러나지 않았다.

제5절 *Bacillus sp CS61*균주 발효액의 항생제 내성 병원성 미생물, 장내 유해 세균에 대한 최소저해농도 분석

Bacillus sp CS61 발효액의 세균성장의 최소저해농도를 분석하기 위해 항생물질 감수성 시험(MIC, Minimum Inhibitory Concentration)[(5)(10)(22)] 중 단계 희석법을 수행하였다. 그 결과 Table. 4에서 보여 주는 바대로 그람 음성균(살모넬라, 대장균, 슈도모나스)에는 항세균력을 나타내지 않았으며 그람 양성균(엔테로코커스, 황색 포도상구균, MRSA, VRE)에 강한 항세균력을 보였다.

제6절 *Bacillus sp CS61*균주 발효액의 DPPH 라디칼 소거능(DPPH radical scavenging activity)확인 실험

항산화물질은 지질의 산화과정 중 생성되는 R·, ROO·등의 유리라디칼에 전자를 전해줌으로서 산화의 진행을 방지한다. 전자 공여능은 유리라디칼에 전자를 공여하여 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있다. 이 실험에서 동결건조한 *Bacillus sp CS61* 발효액의 DPPH 소거능을 나타낸 것으로 Fig. 5에서 보여 주는 바대로 고농도에서 프리라디칼 소거능을 갖는 것을 확인할 수 있었다

제7절 *Bacillus sp CS61*균주 발효액의 환원력(Reducing power) 확인 실험

Bacillus sp CS61 균주의 발효액의 환원력에 대한 효과는 Fig. 6에 나타내었으며, 대조군인 아스코르브산과 비교하였을 때 고농도에서 *Bacillus sp CS61* 발효액이 높은 환원력을 나타내었다

제8절 *Bacillus sp CS61*균주 발효액에 의한 NO생성 억제 활성 및 세포 생존률 측정

Fig. 7에 나타난 바와 같이, LPS만 처리한 군(LPS)에서는 NO가 과량 생산되었으며, LPS와 함께 *Bacillus sp CS61* 발효액의 농도를 점차 증가하여 처리하였을 경우에는 그 농도가 증가할수록 NO의 생성이 더욱 억제됨을 확인할 수 있었으며, Fig.8에 나타난 바와 같이 이때의 생존율에는 변화가 없음을 확인하였다. 따라서 *Bacillus sp CS61* 발효액은 면역세포가 활성화 되었을 때 세포 생존율에는 변화를 일으키지 않으면서 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제하고 있음을 알 수 있었다.

제 4 장 결 론

김치에서 생성되는 여러 물질들 중 항생제 내성 병원성 미생물인 메티실린 저항성 황색포도상구균(MRSA)에 항세균 활성을 나타내는 미생물 집락을 선별하여 순수 분리하고, 최종 선별된 균주를 동정하여 바실러스의 분자 생물학적 특성(16S rRNA gene sequence)을 분석 결과, 본 균주는 *Bacillus subtilis subsp. subtilis 와* 99.596% 일치하였다. 이에 "*Bacillus sp CS61*"로 명명하고 이 물질의 특성을 조사하였다.

*Bacillus sp CS61*균주의 최적 성장배지를 알아보기 위해 탄소원, 질소원 및 금속이온을 달리한 배지에서 배양한 후 균주의 생장 정도 및 병원성 미생물 생육 저해 효과를 분석하였다. *Bacillus sp CS61*의 탄소원 이용능력을 알기위해 질소원인 효모 추출물을 1% 고정 후 탄소원의 종류를 달리하여 37도에서 배양 후 균주의 유해세균 저지 효과를 측정한 결과 말토오스가 포함된 배지에서 60시간 배양 시 유해세균 저해 효과가 높음을 볼 수 있었다. 이에 최적의 탄소원인 말토오스를 1% 첨가한 후 비프 추출물, 말트 추출물, 트립톤, 효모 추출물, 오트밀, 소이, 펩톤을 질소원으로 하여 배양 하여 시간별로 균주의 질소원 이용능력을 지켜본 결과 비프 추출물을 질소원으로 포함하는 배지에서 60시간 배양 시 유해세균 저해 효과가 가장 높았다. 탄소원과 질소원을 최적의 것으로 1%씩 고정 시킨 후 금속이온을 각각 0.1%씩 첨가하여 균주의 이용능력을 측정한 결과 모든 금속이온이 유해세균 생육을 저해하는 능력을 감소시킴을 확인하였다.

*Bacillus sp CS61*균주의 최적 생장 배양 시간 및 그때의 최적 pH를 확인하기 위하여 유해세균 생육을 저해하는 능력을 증가 시킨 탄소원 질소원을 첨가한 최적의 배지를 이용하여 37도에서 배양하면서 24시간 간격으로 세포 배양액을 수득하고 660nm의 흡광도에서 세포의 농도를 측정 및 pH, 항세균 활성 정도를 측정하였다. 이에 본 균주는 72시간 배양 시 성장 정도 및 항세균 활성이 우수하였으며 그 때의 pH는 8.05를 나타내었다.

*Bacillus sp CS61*균주의 내열성 및 효소 안정성을 확인하기 위해 균주 배양액을 필터 후 30℃, 40℃, 60℃, 100℃, 121℃에서 각각 30, 60, 120분 열처

리 한 후 MRSA가 도말된 아가배지에 paper disc를 올리고 반응액을 확산시켜 12시간 후 항세균 활성을 확인한 결과 발효액을 100℃ 이상 열처리 하였을 때 메티실린 저항성 황색포도상구균에 대한 항세균 활성이 감소하는 경향을 확인하였다. 또한 Typsin과 Pronase의 소화효소에 대한 안정성을 실시하였을 때 본 배양액은 항세균 활성의 감소가 거의 드러나지 않았다.

*Bacillus sp CS61*균주의 항세균 활성 물질의 최소저해농도를 분석하기 위하여 항생물질 감수성 시험(MIC, Minimum Inhibitory Concentration) 중 단계희석법을 수행하였는데 균주 배양액을 각 농도별로 희석하여 MH배지를 이용 대조군으로는 반코마이신과 바시트라신을 써서 균주 생육을 관찰한 결과 그람음성균(살모넬라, 대장균, 슈도모나스)에는 항세균력을 나타내지 않았으며, 그람양성균(엔테로코커스, 황색 포도상구균, MRSA, VRE)에 강한 항세균력을 보였다.

DPPH 라디칼 소거능(DPPH radical scavenging activity)확인 실험을 통해 본 균주의 항산화능을 측정하였다. 항산화물질은 지질의 산화과정 중 유리라디칼에 전자를 공여하여 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있다. 동결 건조한 *Bacillus sp CS61*균주 발효액의 DPPH 소거능을 나타낸 것으로 고농도에서 프리라디칼 소거능을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

환원력(reducing power)확인 실험은 대조군으로 아스코르빈산을 사용하였으며 이에 비해 고농도에서 *Bacillus sp CS61*균주 발효액이 높은 환원력을 나타내었다.

*Bacillus sp CS61*균주 발효액이 NO 생성을 억제하는지 확인하기 위하여 비활성 시에는 NO 생성 수준이 매우 낮으나, LPS로 활성화시킬 때 NO생성이 유도된다고 알려져 있는 대식 세포주인 Raw264.7 세포를 사용하여 *Bacillus sp CS61*균주 발효액의 효과를 측정하였다. LPS만 처리한 군(LPS)에서는 NO가 과량 생산되었으며, LPS와 함께 *Bacillus sp CS61*균주 발효액의 농도를 점차 증가하여 처리하였을 경우에는 그 농도가 증가할수록 NO의 생성이 더욱 억제됨을 확인할 수 있었으며, 이때의 생존율에는 변화가 없음을 확인하였다. 따라서 *Bacillus sp CS61*균주 발효액은 면역세포가 활성화되었을 때 세포 생존율에는 변화를 일으키지 않으면서 NO의 생성을 농도 의

존적으로 억제하고 있음을 알 수 있었다.

따라서 *Bacillus sp CS61*균주 발효액은 그람양성균에 높은 항세균 능력을 보임과 동시에 DPPH 라디칼 소거능과 높은 환원력을 나타내었으며 일산화질소의 생성을 억제함을 확인하였다. 이에 본 연구의 *Bacillus sp CS61*균주 발효액은 항생제 내성 병원성 미생물 및 장내 유해 미생물을 대상으로 하는 항생제 대체제, 면역증강제로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

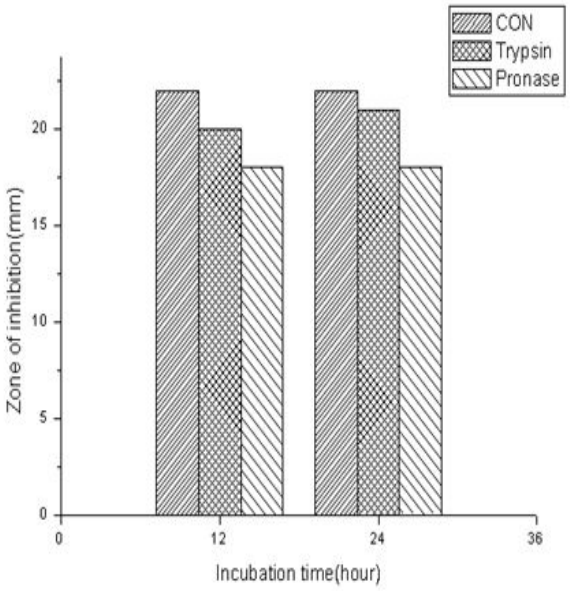

Fig. 1 Stability of an antibacterial activity of *Bacillus sp CS61* fermentation medium against various digestive Enzyme

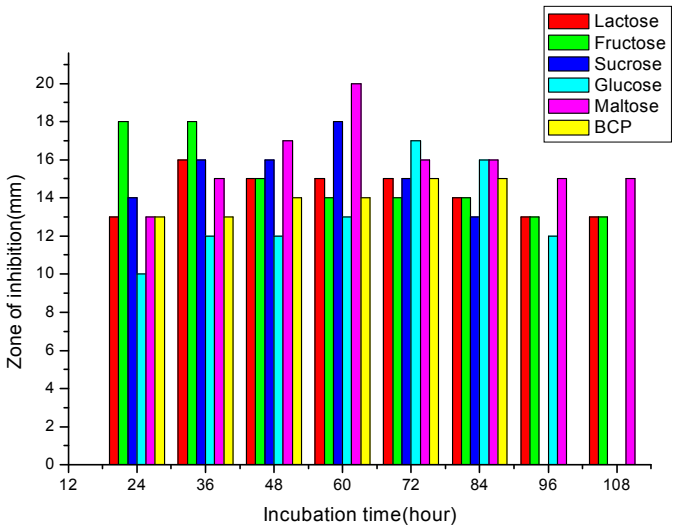

Fig. 2 Effect of carbon source on the production of anti-MRSA substance from *Bacillus sp CS61*

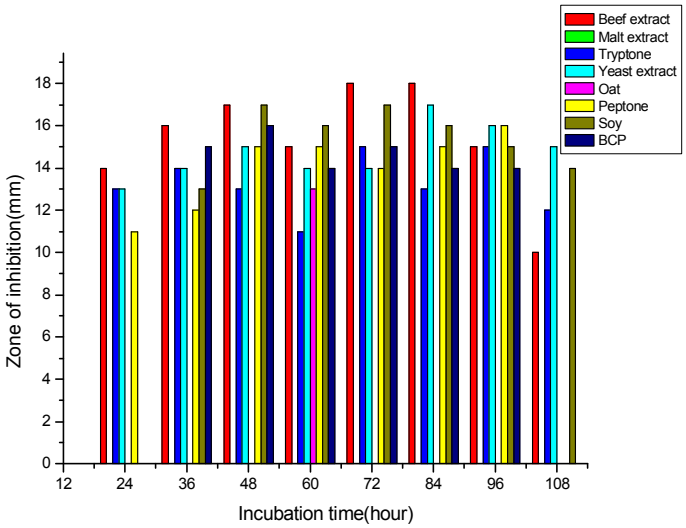

Fig. 3 Effect of nitrogen source on the production of anti-MRSA substance from *Bacillus sp CS61*

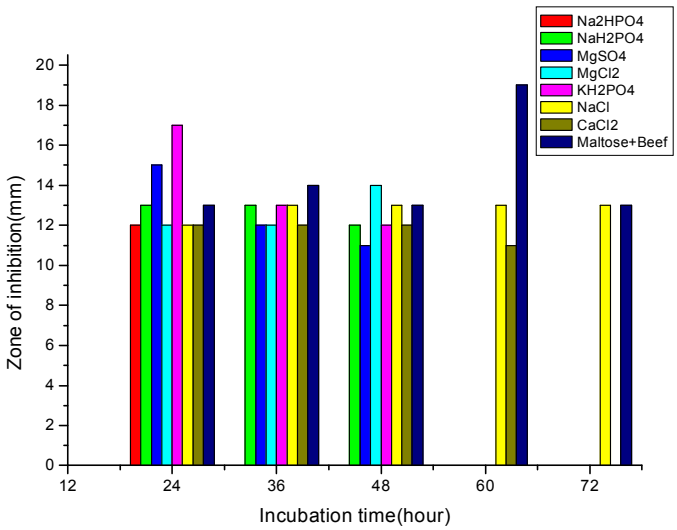

Fig. 4 Effect of metal ion on the production of anti-MRSA substance from *Bacillus sp CS61*

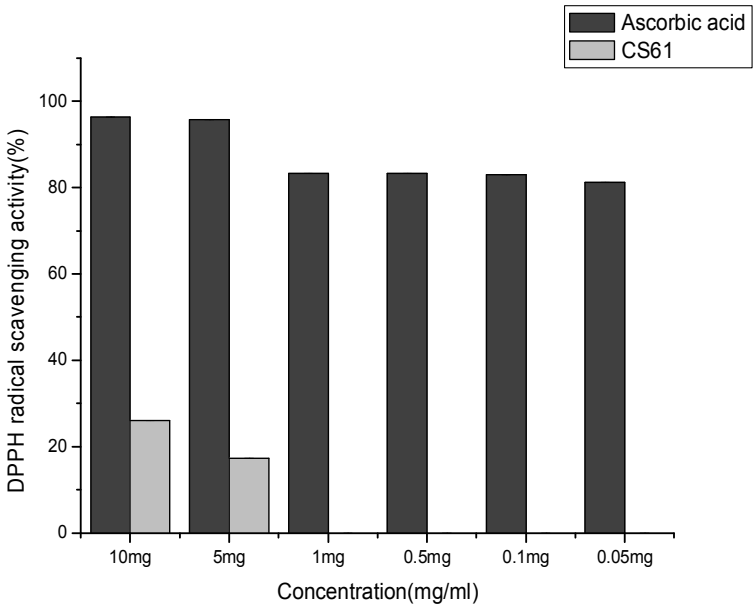

Fig. 5 DPPH radical scavenging activity of *Bacillus sp CS61* fermentation medium

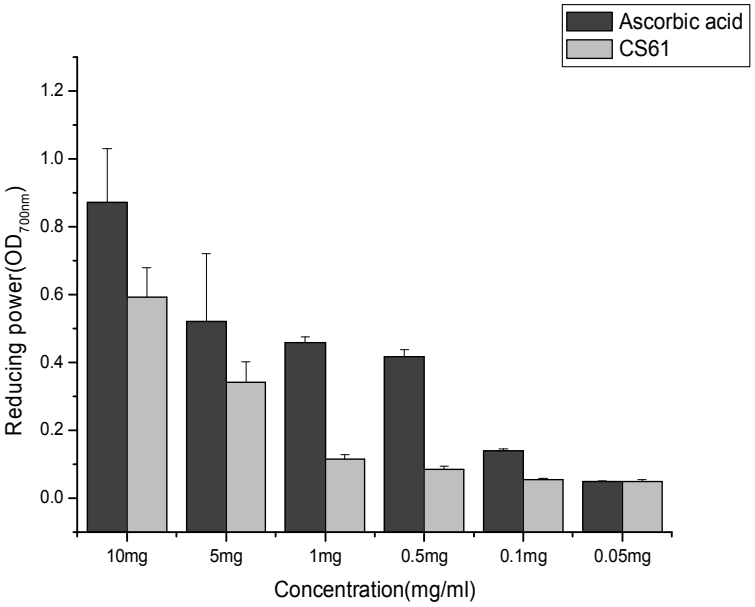

Fig. 6 Reducing power of *Bacillus sp CS61* fermentation medium

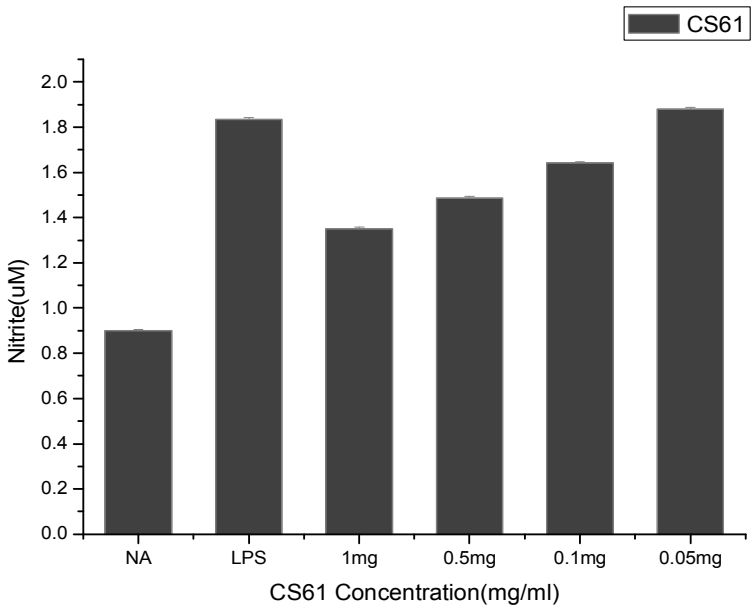

Fig. 7 Inhibition of NO production by *Bacillus sp CS61* fermentation medium

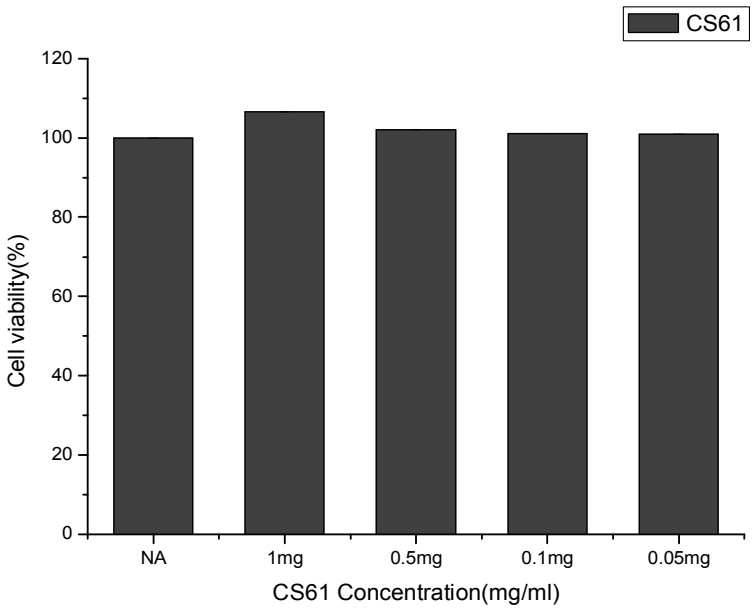

Fig. 8 Cell viability test against various concentration of *Bacillus sp CS61* fermentation medium

	Name/Title	Strain	Accession	Similarity	Diff/Total nt
1	*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*	NCIB 3610(T)	ABQL01000001	99.596	6/1484
2	*Bacillus vallismortis*	DSM 11031(T)	AB021198	99.528	7/1484
3	*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*	NRRL B-23049(T)	AF074970	99.432	8/1409
4	*Bacillus tequilensis*	NRRL B-41771(T)	EU138487	99.401	7/1168
5	*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*	BGSC 3A28(T)	EU138467	99.401	7/1168
6	*Bacillus mojavensis*	IFO 15718(T)	AB021191	99.124	13/1484
7	*Bacillus atrophaeus*	JCM 9070(T)	AB021181	99.122	13/1480
8	*Brevibacterium halotolerans*	LMG 21660(T)	AJ620368	99.122	13/1480
9	*Bacillus licheniformis*	ATCC 14580(T)	CP000002	97.842	32/1483
10	*Bacillus aerius*	24K(T)	AJ831843	97.772	33/1481
11	*Bacillus sonorensis*	NRRL B-23154(T)	AF302118	97.729	32/1409
12	*Bacillus altitudinis*	41KF2b(T)	AJ831842	97.23	41/1480
13	*Bacillus aerophilus*	28K(T)	AJ831844	97.1	43/1483
14	*Bacillus stratosphericus*	41KF2a(T)	AJ831841	97.1	43/1483
15	*Bacillus safensis*	FO-036b(T)	AF234854	96.932	44/1434
16	*Bacillus pumilus*	ATCC 7061(T)	ABRX01000007	96.831	47/1483
17	*Bacillus vietnamensis*	15-1(T)	AB099708	95.936	56/1378
18	*Bacillus aquimaris*	TF-12(T)	AF483625	95.74	63/1479
19	*Bacillus acidicola*	105-2(T)	AF547209	95.547	66/1482

Table 1. Similarity of nucleotide sequence of 16S rDNA of *Bacillus sp CS61* with related species

Parameters	Final pH	Bacterial growth(OD_{660nm})	Inhibition zone (mm)
Incubation period(hr)			
24	7.93	2.34	16
48	8.15	2.4	19
60	8.13	2.189	18
72	8.26	2.22	17
84	8.57	2.16	17
96	9.0	1.87	17
108	8.97	1.84	15
pH			
4	7.05	1.936	14
5	7.98	1.787	14
6	8.05	1.755	18
7	8.33	1.054	15
8	8.44	1.026	12
9	8.6	0.711	11

Table 2. Growth profile of *Bacillus sp CS61*

Temperature(℃)	Exposure time(min)	Inhibition (mm)	Residual activity(%)
40℃	30	20	100
	60	20	100
	120	20	100
60℃	30	20	100
	60	20	100
	120	20	100
80℃	30	13	65
	60	13	65
	120	0	0
100℃	10	12	63.16
	30	12	63.16
	60	0	0
121℃	15	0	0

Table 3. Temperature stability of *Bacillus sp CS61* fermentation medium

Test organisms		MIC		
		Vancomycin	Bacitracin	BA6
Alcaligenes faecalis ATCC 1004	G(-)	>80	>80	>80
Enterococcus faecalis ATCC 29212	G(+)	2.5	5	5
Bacillus subtilis ATCC 6633	G(+)	0.3	40	>80
Staphylococcus aureus KCTC 1928	G(+)	5	>80	40
Micrococcus luteus ATCC 9341	G(+)	2.5	40	>80
Mycobacterium smegmatis ATCC 9341	G(+)	1.25	>80	40
Salmonella typhimurium KCTC 1925	G(-)	>80	>80	>80
Escherichia coli KCTC 1923	G(-)	>80	>80	>80
Pseudomonas aeruginosa KCTC 1637	G(-)	>80	>80	>80
MRSA693E	G(+)	1.25	1.25	10
MRSA 4-5	G(+)	0.625	1.25	0.625
MRSA 5-3	G(+)	0.625	1.25	0.625
VRE 82	G(+)	>80	40	20
VRE 89	G(+)	>80	40	20
VRE 98	G(+)	>80	>80	20

Table 4. MIC(Minimum Inhibitory Concentration) test of *Bacillus sp CS61* fermentation medium against various pathogens

제 5 장 참고문헌

[1] Anthony Arguelles-Arias, Marc Ongena, Badre Halimi, Yannick Lara, Alain Brans, Bernard Joris and Patrick Fickers. (2009). Bacillus amyloliquefaciens GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. Microbial Cell Factories 8:63 doi:10.1186/1475-2859-8-63

[2] Babasaki K, Taka0 Y, Shimonishi, Kurahashi K. (1985). Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by Bacillus subtilis 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. Journal of Biological Chemistry, 1985;98:585 - 603.

[3] Blosis MS. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature., 181 :1190-200.

[4] Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response.Nat. Immunol. 2: 907-916.

[5] Craig WAS, B (1986). Antibiotics in Laboratory Medicine, 2nd EdWilliams & Wilkins: USA 477.

[6] Chun, J. and M. Goodfellow, (1995). A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences, *Int.* J. Syst. Bact. 45:240-245.

[7] G. Zheng and M.F. Slavik. (1999). Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated Bacillus subtilis strain. Letters in Applied Microbiology, 28, 363 - 367

[8] Henry Shinefield, M.D. et al.,(2002). The New England J. of Med. 346:491-496.

[9] Isabel C.V, Robert S.K., Francisco A.K., J. Am. Acad. Dermatol. 50:845-849, 2004

[10] Jacobs M R, Appelbaum P C. (1995). Antibiotic-resistant

pneumococci. Rev Med Microbiol. ;6:77 - 93

[11] Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. (1995). Bacteriocins of Grampositive bacteria. Microbiological Reviews 59, 171 - 200.

[12] Katz E, Demain A L. (1977). The peptide antibiotics of Bacillus: chemistry, biogenesis, and possible functions. Bacteriological Reviews, 41,449-474.

[13] Klaenhammer TR. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev ;12:39 - 86.

[14] Klaenhammer, T.R. (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie 70, 337 - 349.

[15] Laskin, D. L. and Pendino, K. J. (1995). Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 35: 655-677.

[16] Lee, S. D., S.O. Kang and Y.C. Hah, (2000). C*atellatospora koreensis* sp. nov., a novel actinomycetes isolated from a gold-mine cave, *Int.* J. Syst. Evol. Microbiol. 50:1103-1111.

[17] Mah, J.-H., K.-S. Kim, J.-H. Park, M.-W. Byun. Y.-B. Kim, and R.-J. Hwang. (2001). Bacteriocin with a broad antimicrobial spectrum, produced by *Bacillus* sp. isolated from Kimchi. *J Microbiol. Biolechnol.* 11: 577-584.

[18] Nathan C. Points of control in inflammation. Nature. (2002). ; 420(6917) : 846-52.

[19] Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosarnine. Japanese J NlItr, 44(6): 307-315

[20] RALPH W. JACK, JOHN R. TAGG, AND BIBEK RAY.(1995). Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. MICROBIOLOGICAL REVIEWS, Vol. 59, No. 2, p. 171 - 200

[21] Sayre ML, Perry G, Smith AM. (2008). Oxidative stress and

neurotoxicity. Chemical Research in Toxicology ; 21 : 172-88.

[22] Sohng JK, Yamaguchi T, Seong CN, Baik KS, Park SC, et al. (2008). Production, isolation and biological activity of nargenicin from Nocardia sp. CS682. Arch Pharm Res 31: 1339-1345.

[23] Stein T. (2005). Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology, 56,845-857.

[24] Tagg, G R., A. S. Dajani, and L. W. Wannamarker. (1976). Bacteriocin of gram-positive bacteria. *8acteriol. Rev. 40:*722-756.

[25] Wu, G. and Morris, S. M. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. Biochem. J. 336: 1-17.

[26] Yang, E. J. and H. C. Chang. (2007). Charaterization of bacteriocin-Iike-substances prouced by *Bacillus subtilis* MJPI. *KOI:* J. *Microbiol. Biotechnol.* 35: 339-346.

[27] Vilhardt F.(2005). Microglia: phagocyte and glia cell. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.; 37 : 17-21.