

● 연구속보 1

Bacteriocin을 생산하기 위한 발효 최적 조건 연구

유진영
(생물공학연구부)

I. 서론

Bacteriocin은 생성균주내에서 유전적 기반이 안정한 것으로 알려져 있지만 배양방법에 따라 그 생산이 많이 좌우되는 것으로 보고되고 있다(1-3). *Lactobacillus bulgaricus*이 생산하는 항균성 물질인 bulgarican은 우유 배지에서 45°C, 48시간 배양했을 때 최대의 역가를 나타내며 pH 2.2에서 최대의 안정성을 보인 반면(4), *Streptococcus lactis*가 생산하는 bacteriocin은 pH를 중성 부근으로 조절할 경우 높은 수율로 생산됨이 확인되었으며(5), 적정 pH는 6.0-6.6으로 보고하고 있다(6). 또한 고온성 젖산균인 *Streptococcus thermophilus*가 생산하는 bacteriocin의 경우 pH 6.0을 최적 pH로 보고하고 있으나(7), Baranova 등(8)은 pH 조절효과를 확인할 수 없었다고 보고한 바 있다.

저자들은 자연계로 부터 bacteriocin을 생산하는 균주를 분리, *Streptococcus* sp.로 동정하고 그 성질을 조사한 바 있다(9). 본 연구에서는 저자들이 분리, 동정한 *Streptococcus* sp. 1112-1균주의 bacteriocin생산 최적 배양조건을 검토하기 위하여 배지의 조성, 배양방법 및 비타민 요구성 등을 조사하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 bacteriocin생산균주로는 저자들이 분리한 *Streptococcus* sp. 1112-1을 사용하였

으며(9), 발효용 배지의 조성은 Difco사의 *Lactobacilli* MRS broth를 기본 배지로 사용하여 실험하였다.

항균활성은 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014을 target organism으로 하여 agardiffusion assay (10) 방법으로 측정하였다. 비교물질로서는 Aplin & Barrett사의 nisin(10⁶ iu/ml)을 사용하였으며, 항균물질의 농도와 target organism에 대한 생육저지환의 직경을 비교하여 상대적인 값으로 표현하였다.

2. 배양조건

배지성분의 최적조건을 결정하기 위하여 탄소원은 dextrose를 제거한 기본 배지에 glucose등의 7가지 탄소원을 각각 20g/l씩 첨가하여 37°C에서 12시간 배양하여 증식도와 항균력을 측정하였다. 질소원은 proteose peptone등의 유기태 질소원과 urea등의 무기태 질소원을 이용하여, 무기염류는 기본배지에서 5개의 염류를 각각 단독으로 제거한 후 탄소원과 같은 방법으로 측정하였다. 배양장치는 New Brunswick사의 C-32 bench-top fermentor(working vol. 500ml) 및 Multigen fermentor(working vol. 1 liter)를 이용하였고 배양 중 pH조절은 pH-4000 controller에 peristaltic pump를 부착하여 3 N KOH용액으로 하였다. 교반은 200rpm으로 고정하였으며 통기는 하지 않았다.

3. 비타민 요구성

비타민 요구성은 vitamin-free yeast carbon base에 glucose 10g/l, adenine, guanine, cytosine, thymine, xanthine, hypoxanthin 각각 5mg/l을 첨가하고 riboflavin등 10종의 비타민을 1μg/ml씩 첨가하되 target 비타민은 제외하고 37°C에서 16시간 배양후 증식정도와 항균력유무를 측정하여 요구성을 확인하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 배지 pH의 영향

균체성장 및 대사산물의 생산을 위한 적정 pH를 결정하기 위하여 pH를 변화시키면서 균체의 생성과 항균성 물질의 생성 추이를 조사한 결과 Table 1과 같이 나타났다. 증식을 위한 적정 pH

Table 1. Effect of pH on the production of antimicrobial substance by isolate 1112-1 at 35°C

pH	Biomass (g/L)	Activity (iu/ml)	Yp/s* (iu/g)	Yx/s**	Growth rate (h ⁻¹)	VP*** (iu/L/h)	Qp**** (iu/g/h)
5.5	0.20	62	41333	0.13	—	5166	25833
5.8	1.06	424	98605	0.25	0.4592	35333	33333
6.2	3.24	1875	99734	0.17	0.8230	156250	48225
6.5	3.60	1729	91000	0.19	1.0000	144083	40023
7.0	3.52	1380	73797	0.19	0.9711	115000	32670
7.5	3.42	1241	65661	0.18	0.8712	103417	30239
8.0	2.80	531	26550	0.14	0.7702	44250	15804
8.5	0.02	—	—	—	—	—	—

Sugar source : glucose 20g/L, * : product yield, ** : growth yield, *** : volumetric productivity, **** : specific productivity

는 6.2에서 7.5정도로 최적 pH는 6.5이었고, 항균성 물질 생산을 위한 최적 pH는 6.2이었다. 최대 균체 생성량은 12시간 후 pH 6.5에서 3.6g/l, 항균성 물질의 최대 생성량은 pH 6.2에서 1,875iu/ml이었다. 이러한 pH범위는 Hirsch의 *Streptococcus lactis*에 의한 nisin생산시험(5), Rayman과

Hurst의 시험(6)과 비슷한 결과를 나타내었다.

2. 발효온도의 영향

항균성물질을 생산하기 위한 최적발효온도를 검토해 본 결과는 Table 2와 같았다. Table에서 보는 바와 같이 41°C에서는 균의 증식이 미약함

Table 2. Effect of fermentation temperature on the production of antimicrobial substance by isolate 1112-1

Temp (°C)	Biomass (g/L)	Activity (iu/ml)	Yp/s (iu/g)	Yx/s	Growth rate (h ⁻¹)	VP (iu/L/h)	Qp (iu/g/h)
25	1.02	733	198108	0.28	0.4205	61083	58961
30	3.31	1790	94860	0.18	0.6619	149167	45065
35	3.11	1861	100034	0.17	0.8237	155083	49867
38	3.00	1662	90326	0.16	0.9387	138500	46167
41	0.10	—	—	—	—	—	—

pH 6.2, Glucose : 20g/L

과 동시에 항균성물질을 생산하지 못하였으며 35°C에서 균의 증식 및 항균력이 최대로 나타났다. Berridge(15)는 *Streptococcus lactis*의 경우 발효온도에 따라 생성되는 물질의 저해패턴이 변화된다는 것을 발견하였으며, nisin생성의 최적온도는 28~30°C라고 보고하였다.

3. 탄소원의 영향

Bacteriocin생산균주인 1112-1의 최적 배지조성을 알아보기 위하여 여러가지 탄소원에 대하여 실험한 결과, Table 3에 나타난 바와 같이 xylose 및 몇가지 이당류를 이용하지 못하는 것으로 나

Table 3. Effect of sugar sources on the production of antimicrobial substance by isolate 1112-1

Sugar	Biomass (g/L)	Activity (iu/ml)	Yp/s (iu/g)	Yx/s	Growth rate (h ⁻¹)	VP (iu/L/h)	Qp (iu/g/h)
Glucose	3.24	1897	100904	0.17	0.8230	158083	48791
Sucrose	0.46	151	—	—	—	—	—
Mannose	2.49	1897	101443	0.13	ND	158083	63589
Xylose	0.30	156	—	—	—	13000	—
Fructose	2.42	1897	104807	0.13	ND	158083	65243
Maltose	0.30	134	—	—	—	11167	—
Galactose	0.33	152	—	—	—	—	—

Sugar concentration : 20g/L

타났다. 한편 glucose, mannose, fructose는 잘 이용되어 각각 3.24, 2.49, 2.42g/l의 균체 생성량을 보였으며, 항균성 물질은 1,897iu/ml의 농도로 생산되었다. 따라서 이용되는 당류의 확보 용이성을 고려할 때 glucose를 기질로 선택하는 것이 바람직하였다. Baranova와 Egorov(11)은 *Strepto-*

*coccus lactis*의 경우 glucose, fructose, sucrose가 Rao와 Pulusani(7)은 *Streptococcus thermophilus*가 생산하는 bacteriocin의 경우 lactose가 좋은 탄소원임을 보고한 바 있다. Glucose를 농도별로 검토해 본 결과는 Table 4와 같았다. Glucose의 농도가 증가됨에 따라 균체량은 서서히 증가되어

Table 4. Effect of glucose concentration on the production of antimicrobial substance by isolate 1112-1

Conc. (g/L)	Biomass (g/L)	Activity (iu/ml)	Yp/s (iu/g)	Yx/s	Growth rate (h ⁻¹)	VP (iu/L/h)	Qp (iu/g/h)
7	1.52	619	99839	0.25	0.8170	51583	33847
10	1.71	699	84116	0.21	0.7431	58250	34104
20	3.11	1861	100034	0.17	0.8237	155083	49867
30	3.07	1847	77151	0.22	0.8347	153917	50201
40	2.82	1847	78263	0.12	0.8347	153917	54503
50	3.17	1479	75536	0.16	0.8180	123250	38880
60	2.82	1455	70154	0.14	0.8117	121250	42997

20g/l의 농도일 때 3.11g/l로 최대를 나타내었고, 그 이상에서는 큰 변화를 보여주지 않았으며 항균성 물질의 생성도 비슷한 경향을 나타냈다. Kozlova등(12)은 *Streptococcus lactis*의 경우 glu-

cose 20g/l가 적당하다고 하여 본실험의 결과와 비슷하였으며, *Streptococcus thermophilus*의 경우는 lactose 20g/l가 적당하다고 보고되어 있다(7).

4. 질소원의 영향

질소원의 영향을 보기 위하여 여러가지 유기태

질소원과 무기태 질소원을 실험하 결과(Tabel 5), proteose peptone과 lab lemco powder를 같이 사용

Table 5. Effect on nitrogen sources on the production of antimicrobial substance by isolate 1112-1

Nitrogen source	Biomass (g/L)	Activity (iu/ml)	Yp/s (iu/g)	Yx/s	VP (g/L/h)	Qp (iu/L/h)
Proteose peptone + Lab Lemco powder	3.11	1861	100034	0.17	155083	49867
Proteose peptone Lab Lemco powder	3.52	2391	127834	0.19	199250	56605
Urea	2.18	1532	120535	0.17	127667	58563
NH ₄ Cl	0.88	671	227458	0.30	55917	63686
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.24	1432	176246	0.15	11933	96392
NH ₄ NO ₃	1.50	998	104777	0.16	83167	55489
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.75	2169	195339	0.16	180750	103168
KNO ₃	1.74	1432	146571	0.18	119333	68425
Casein	1.77	1950	219348	0.20	162500	91653
None	1.70	3782	307480	0.14	315167	185939
None	1.20	1668	204663	0.15	139000	115545

Nitrogen source was added basing upom nitrogen equivalent(2.637g/L)

하는 것 보다 proteose peptone을 단독으로 사용하는 것이 더욱 효과가 있어 2,391 iu/ml의 역가를 나타내었으며 무기태소질소원에서는 casein acid hydrolyzate가 가장 효과가 좋아 3,782iu/ml를 나타내었다. 따라서 질소원은 casein acid hydrolyzate로 결정하였으며, 농도별로 실험해 본

결과 적정농도는 15g/ℓ로 판단되었고, 이때의 product yield와 specific productivity는 각각 371, 728iu/g, 184,780iu/g/h이었다(Table 6). 한편 Kozlova등(12)은 *Streptococcus lactis*의 경우 30mg %정도의 casein acid hydrolyzate가 적당하가도 보고하였다.

Table 6. Effect of casein concentration on the antimicrobial substance by isolate 1112-1

Conc. (g/L)	Biomass (g/L)	Activity (iu/ml)	Yp/s (iu/g)	Yx/s	VP (iu/L/h)	Qp (iu/g/h)
3	1.92	1625	165816	0.20	135417	70548
5	2.40	1802	126901	0.17	150167	62545
8	2.14	2900	246809	0.18	241667	112718
10	1.70	2896	329091	0.19	241333	142044
15	1.60	3550	371728	0.17	295833	184780
20	1.60	3550	397092	0.18	295833	184780
25	1.60	3550	302128	0.14	295833	184780

5. 무기염류의 영향

기본배지에 함유되어 있는 potassium phosphate, magnesium sulfate, sodium acetate, ammoni-

um citrate, manganes sulfat를 각각 단독으로 제거한 후 무기염류의 효과를 조사한 결과(Table 7), 가장 많은 영향을 주는 것은 sodium acetate와 ammonium citrate이었으며, 이들의 적정 농도

Table 7. Effect of omission of various salt on the production of antimicrobial substance by isolate 1112-1

Salt omitted	Biomass (g/L)	Activity (iu/ml)	Yp/s (iu/g)	Yx/s	VP (g/L/h)	Qp (iu/L/h)
K ₂ HPO ₄	1.89	2718	190336	0.13	226500	119778
MgSO ₄	1.50	2718	222970	0.12	226500	150699
Sodium acetate	1.88	1370	97440	0.13	114167	60792
Ammonium citrate	2.07	938	63723	0.14	78167	37817
MnSO ₄	1.79	2476	183272	0.13	206333	115077

는 각기 3g/l, 2g/l로 나타났다(Table 8, 9). Rayman과 Hurst(6)는 magnesium sulfate가 nisin의 생산수율을 높여준다고 하였고 Kozlova(13)등은 nisin의 생산수율이 potassium phosphate의 농도가 감소하면 같이 감소되어 potassium phos-

phate가 K⁺ ion의 공급원일 뿐만 아니라 완충작용에 영향을 준다고 보고하였다. Baranova와 Egorow(11)는 bacteriocin생성이 유기산과 potassium phosphate에 의하여 상당한 영향을 받는다고 보고하였다.

Table 8. Effect of sodium acetate concentration on the production of antimicrobial substance by isolate 1112-1

Conc. (g/L)	Biomass (g/L)	Activity (iu/ml)	Yp/s (iu/g)	Yx/s	VP (g/L/h)	Qp (iu/L/h)
1	1.59	3195	252969	0.13	266250	167453
3	1.37	4339	379948	0.12	361583	263929
5	1.73	3725	277985	0.13	310417	179224
7	1.24	2380	128579	0.07	198333	159945
9	1.34	1981	105485	0.07	165083	121397

Table 9. Effect on ammonium citrate concentration on the production of antimicrobial substance by isolate 1112-1

Conc. (g/L)	Biomass (g/L)	Activity (iu/ml)	Yp/s (iu/g)	Yx/s	VP (g/L/h)	Qp (iu/L/h)
1	1.88	3315	247338	0.14	276250	146942
2	1.37	4339	263853	0.12	361583	263929
3	1.87	2756	195323	0.13	229667	122816
4	1.69	2292	113018	0.12	191000	113018

6. 비타민 요구성

젖산균은 증식을 위하여 여러가지 영양성분의 요구가 까다로운 것으로 알려져 있어 선발균주의 증식에 미치는 아미노산 및 비타민의 영향을 검토해 본 결과 특별한 아미노산을 요구하지 않았으며 비타민의 효과만을 Table 10에 나타내었다.

즉 *Streptococcus* sp. 1112-1균주는 증식 및 항균성물질의 생성을 위하여 riboflavin과 pantothenic acid를 요구하는 것으로 나타났다. Baranova등(14)은 이들이 분리한 *Streptococcus lactis*가 pantothenic acid, nicotinamide, pyridoxine, biotin, riboflavin을 요구하는 것으로 보고한 바 있다.

Table 10. Vitamin requirement of isolate 1112-1

Vitamin	Growth	Activity	Final pH
Vitamin B ₁₂ *	0.18	+	4.3
Folic acid	0.19	+	4.2
Thiamine	0.19	+	4.3
Nicotinic acid	0.09	+	5.1
Pyridoxine	0.20	+	4.3
Riboflavin	0.03	-	6.6
Panthenic acid	0.05	-	6.2
Biotin	0.18	+	4.3
Insoitol	0.19	+	4.3
Paraaminobenzoic acid	0.18	+	4.3
Mixed	0.18	+	4.3

*corresponding vitamin was omitted
Vitamin concentration was 1mg/L

7. 배양특성

선정된 배지조성으로 회분식 발효시 항균성 물질의 생성패턴을 조사한 결과는 Table 11과 같다. 균체의 생성은 배양 후 8.5시간에 1.81g/l가 생성되어 정지기에 접어들며, 항균성 물질의 생산도 12시간에 3,894iu/ml로서 최대에 도달되는데 이 결과로부터 균체의 증식과 항균성 물질의 생산은 상호관련이 있으며, 사용된 탄소원은 발효 22시간까지 서서히 이용됨을 알 수 있었다. 이와같은 결과는 Grusina등(15)이 보고한 바와 같은 경향이며, Egorov등(16)이 보고한 최대 항균성 물질 생산량인 2,200iu/ml보다는 월등히 높은 값을 나타낸다.

Table 11. Fermentation profile of 1112-1 for antimicrobial substance

Elapsed Fermentation Time(hour)	Biomass (g/L)	Activity (iu/ml)	Residual Glucose (g/L)
0	0.04	ND	20.0
4.5	0.29	228	18.7
6.5	1.16	1697	12.8
8.5	1.81	1980	6.9
12	1.81	3894	4.4
14	1.83	3864	4.4
18	1.83	3894	1.7
22	1.77	3894	0.5
24	1.76	3894	0.1

Fermentation was carried out in NBS Multigen fermentor(working volume : 1L)

IV. 요약

Bacteriocin생산균주인 *Streptococcus* sp. 1112-1의 최적 배양조건과 배양 특성을 검토하였다. 탄소원은 glucose 20g/l, 질소원은 casein acid

hydrolyzate 15g/l, 무기염류는 sodium acetate 3g/l 와 ammonium citrate 2g/l가 bacteriocin생성에 많은 영향을 주는 것으로 나타났으며 배지 pH는 6.2, 발효온도는 35°C일때 높은 생성수율을 보였다. 선발균주는 증식 및 항균물질의 생성에 riboflavin과 pantothenic acid의 비타민을 요구하였다. 회분식 발효시 항균성물질의 생산패턴은 배양 12시간에 3,894iu/ml로 최대를 나타냈으며 균체 생성은 배양 8.5시간에 정상기에 도달하였다.

참고 문헌

- Hertman, I. and R. Ben-Gurion 1958 : *J. Gen. Microbiol.* **21**, 135.
- Shahani, K. M., J. R. Vakil and A. Kilara 1977 : *Cultured Dairy Products J.* **12**, 8.
- Fernandes, C. F., K. M. Shahani and M. A. Amer 1988 : *J. Dairy Sci.* **71**, 3222.
- Reddy, G. V., K. M. Shahani, B. A. Friend and R. C. Chandra 1983 : *Cultured Dairy Products J.* **18**, 15.
- Hirsch, A. 1951 : *Nature*, **167**, 1031.
- Rayman, K. and A. Hurst 1984 : *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, Vandamme, E. J. ed., Marcel Dekker Inc. 607.
- Rao, D. R. and S. R. Pulusani 1981 : *J. Food Sci.* **46**, 630.
- Baranova, I. P., N. S. Egorov and V. A. Grushina 1977 : *Appl. Biochem. Microbiol.* **13**, 550.
- 유진영, 이인선, 정건섭, 남영중 1991 : 한국산업미생물학회지 19권 1호 8.
- Tramer, J. and G. G. Fowler 1964 : *J. Sci. Food Agric.* **15**, 522.
- Baranova, I. P. and N. S. Egorov 1969 : *Appl. Biochem. Microbiol.* **5**, 137.
- Kozlova, Y. I., N. S. Egorov, I. P. Baranova and V. N. Maksimov 1972 : *Microbiology.* **41**, 893.
- Kozlova, Y. I., T. I. Golikova, I. P. Baranova and N. S. Egorov 1979 : *Mikrobiologiya.* **48**, 443.
- Baranova, I. P., N. S. Egorov and O. I. Sil' vestrova 1973 : *Appl. Biochem. Microbiol.* **9**, 44.
- Grushina, V. A., I. P. Baranova and N. S. Egorov 1979 : *Appl. Biochem. Microbiol.* **15**, 360.
- Egorov, N. S., I. P. Baranova and O. I. Sil' vestrova 1972 : *Microbiology.* **41**, 712.