

토양으로부터 항균물질 생성균 및 감수성 균주의 분리 및 동정

김수인 · 김인철* · 장해춘†

조선대학교 식품영양학과

*목포대학교 식품공학과

Isolation and Identification of Antimicrobial Agent Producing Microorganisms and Sensitive Strain from Soil

Soo-In Kim, In-Cheol Kim* and Hae-Choon Chang†

Dept. of Food and Nutrition, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

*Dept. of Food Engineering, Mokpo National University, Chonnam 534-729, Korea

Abstract

Two species of antimicrobial agent producing bacteria and one sensitive strain were isolated from soil. Those were identified as *B. subtilis*, *B. licheniformis*, and *Curtobacterium* sp. by morphological, biochemical, physiological and chemotaxonomic characteristics. These were designated as *B. subtilis* cx1, *B. licheniformis* cy2 and *Curtobacterium* sp. cf3, respectively. Antimicrobial agent produced by *B. subtilis* cx1 showed high antibacterial activity against gram-positive bacteria including of *B. subtilis*, *Curtobacterium* sp., *L. mesenteroids*, *Staphy. aureus*, *S. faecalis* and even gram-negative bacteria, *P. aeruginosa*. Antimicrobial agent from *B. licheniformis* cy2 showed slightly lower antimicrobial activity than that from *B. subtilis* cx1. These two strains showed maximum production of antimicrobial agents at 30°C for 9~21hr cultivation. *Curtobacterium* sp. cf3 showed more sensitive activity than a sensitive strain of *B. subtilis* ATCC 6633 which was same genus or species with the *B. subtilis* cx1 and *B. subtilis* cy2, when the antimicrobial agent producing strains, *B. subtilis* cx1 and *B. subtilis* cy2, were directly applied onto these sensitive lawns.

Key words: antimicrobial agent, isolation, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Curtobacterium* sp.

서 론

일반적으로 토양이나 수생환경에서 수많은 그람양성균이 분리될 수 있으며 이러한 분포는 이들이 다른 미생물에 대해 우선적으로 생존할 수 있는 어떤 특정 대사산물을 광범위하게 생산하기 때문이라고 여겨진다. 처음에는 이러한 물질들을 이차대사산물이라고 칭하였으나, 이차대사산물은 생산균주의 생존에 절대적인 것으로 여겨지기 때문에 최근에 와서는 이러한 물질을 'special metabolites'라고 칭하고 있다(1). 이 특정대사산물의 기능은 다른 미생물을 죽이거나 성장을 저해하기 때문에 이 물질은 주로 의학적으로 이용되고 있으며, 그 외의 용도로 가축의 증식촉진 보존제, 식물병원균퇴치 및 생물학적 식품보존제로 이용되고 있다. 특히 식품의 생물학적인 보존방법(biological preservation)

에 대한 필요성이 대두되면서, 항균성 미생물이나 이들이 생산하는 항균성(bactericidal), 정균성(bacteriostatic) 대사산물을 천연 식품 보존제(biopreserve) 내지는 발효식품 등에서 생물제어제(bioregulator)로 그 효용이 크게 기대되고 있다(2,3). 미생물이 생산하는 천연 항균성 단백질은(antimicrobial agent)은 저분자의 peptide나 protein으로 이루어져있으며, 일반적으로 생산하는 세균과 형태학적·계통학적으로 유사한 균종에 대하여 살균(bactericidal)이나 정균(bacteriostatic) 활성을 갖는 것이 특징이다(1,3-5). 최근까지 가장 활발하게 연구되고 있는 항균물질은 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*가 생산하는 nisin으로 그 안전성이 입증되었고, 항생제 내성세균이 문제되고 있는 발효식품에 있어서는 가장 적합한 식품 첨가제로서의 그 가치를 인정받아 이미 유럽 및 미국에서 널리 사용되어지고 있다(6,7).

† To whom all correspondence should be addressed

그러나 식품산업에서 nisin은 응용가능범위가 한정되어 있다는 문제점(중성이나 그 이상의 pH에서 활성저하)을 갖고 있다(8). 지금까지 bacteriocin을 생성하는 균주에 대한 보고가 다수임에도 불구하고 대부분의 경우 특정한 몇몇 균주에만 저해능을 나타내는 좁은 항균 작용범위 때문에 학문적인 연구를 통한 산업적 응용에 한계를 나타내고 있다(5,9). 그러므로 반드시 다양한 작용범위를 갖는 보다 다양한 항균물질을 생산하는 균주들의 screening과 그 대사산물들의 특성규명이 이루어져야 그 응용범위 역시 넓어질 것이다. 꼭 유산균에서 국한되어서 뿐만 아니라, 식품의 제반 특성을 고려하여 광범위하게 식품에서 이용될 수 있는 생물학적인 보존제로 개발할 수 있는 새로운 미생물 및 그 대사산물에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

본 연구에서는 항균활성이 뛰어나고 보다 광범위한 항균 spectrum을 가지며 그 특성이 안정한 새로운 항균물질 생산균주와 함께 항균물질 생산균주에 가장 민감하게 반응하는 균주를 동시에 분리하여, 분리균주들의 형태학적 특징, 배양학적, 생리학적 특성을 검토하고, 본 항균물질의 항균범위 및 최적 활성 생육시기를 조사하였다.

재료 및 방법

항균물질 생산균주 및 감수성 균주의 분리

토양으로부터 채취한 시료를 LB(Bacto-tryptone, 10g; Yeast extract, 5g; NaCl, 5g per liter), 2XYT (Bacto-tryptone, 16g; Yeast extract, 10g; NaCl, 5g per liter), MRS(Bacto proteose peptone No. 3, 10g; Bacto beef extract, 10g; Yeast extract, 5g; Bacto dextrose, 20g; Tween 80, 1g; Ammonium citrate, 2g; Sodium acetate, 5g; Magnesium sulfate, 0.1g; Manganese sulfate, 0.05g; Dipotassium phosphate, 2g)의 액체배지 5ml에 현탁한 후, 300 μ l를 취하여 각각의 5ml 액체배지에 접종하고 30°C에서 24시간동안 진탕배양시켰다. LB, 2XYT, MRS 배지에서 배양시킨 균주를 각각의 고체배지에 도말하여 30°C와 37°C에서 24시간 평판배양하면서, 상호간에 항균 또는 정균하는 미생물들과 그들에 대해 감수성을 나타내는 균주를 분리하였다.

분리균주의 동정

상기의 방법에 의하여 선택된 항균물질 생성균 및 감수성 균주를 동정하기 위하여 gram염색과 현미경 관찰 등을 수행한 후, KIST 유전자 은행에서 1) 형태적 관찰,

2) 세포지방산 분석, 3) 생리·생화학적 특성분석을 통한 동정실험을 의뢰하였다.

항균물질의 bioassay

분리균주의 항균물질 생성능 실험은 균체를 직접 가하는 direct method와 배양상징액이나 부분정제된 배양액을 paper disk에 가하는 paper disk method 등의 3가지 방법에 의하여 시행하였다. 1) Direct method는 하룻밤 전배양된 감수성 균주(분리된 감수성 균주 f와 공시균주 *B. subtilis* ATCC 6633)를 새로운 배지에서 3시간 정도 배양하여 대수기 초기상태의 세포로 준비하여 LB 평판 배지에 도말하고 여기에 항균물질 생성균주를 백금이를 사용하여 그어주어 30°C에서 24시간 배양하여 지시균주에 대한 저지환을 측정하였다. 2) LB 액체 배지에서 분리된 항균물질 생성균주를 30°C에서 하룻밤 배양한 후 4°C에서 24시간 보관한 후, 4°C에서 원심분리(2,800 \times g, 15 min)하여 얻은 상징액을 0.45 μ m membrane filter(Millipore)로 제균하여 준비된 항균물질이나 3) 이 상징액을 acetone을 사용하여 부분정제한 항균물질을 8mm직경의 paper disk에 100 μ l씩 일정하게 가하는 paper disk method를 사용하였다. 지시균주의 도말은 direct method와 동일한 방법으로 시행하였으며 지시균주에 대한 생육저지환을 검토하여 항균생성력의 여부를 관찰하였다.

항균물질의 부분정제

항균물질 생성균주로부터 항균물질의 부분정제 과정을 Fig. 1에 간략히 도식화하였다. 분리된 균주들을 30°C에서 12시간 전배양한 후 250ml LB 액체배지에 1%의 전배양액을 접종하고, 다시 15시간 동안 본배양하여 4°C에서 24시간 보관하였다. 4°C에서 24시간 냉장 보관된 본배양액을 원심분리(2,800 \times g, 15 min, 4°C)하여 균체를 제거하고, 회수한 상징액을 membrane filter (0.45 μ m pore size, Millipore)로 제균하였다. 회수한 상징액은 -20°C에서 냉각된 acetone을 75% (v/v)첨가한 후, 원심분리(11,000 \times g, 15 min, 4°C)하여 분획침전시킨 후 농축물을 제조하였다. 진공펌프로 침전물에 잔존하는 소량의 acetone을 완전히 제거한 후, 침전물을 적당량의 10mM phosphate(pH 7.0) 완충용액에 녹여서 조항균물질로 사용하였다. 이와 동시에 분리균주의 본배양액을 원심분리(2,800 \times g 15 min, 4°C)하고 얻어진 상징액을 methanol과 3차 증류수로 미리 soaking된 소수성 column인 Sep-pak(Waters Co. Massachusetts)에 흡착시킨 후 3차 증류수로 씻어낸 후 acetonitrile로

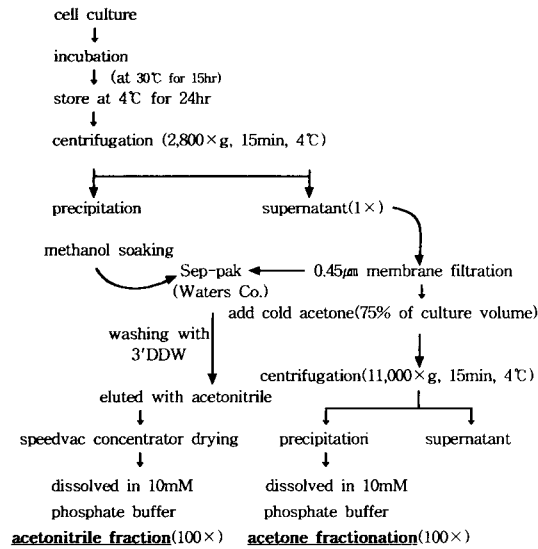


Fig. 1. Preparation of acetone and acetonitrile fractions of antimicrobial agents from cell cultures.

용출시켰다. Acetonitrile에 녹아있는 분획은 Speedvac concentrator(RVT400-120, Savant Inc. NY, USA)을 이용하여 acetonitrile 용매를 감압하에 제거하고, 다시 10mM(pH 7.0) phosphate 완충용액에 적정농도로 녹여서 사용하였다.

항균 spectrum 검사

분리된 균주의 배양액으로부터 자기 다른 유기용매인 acetone과 acetonitrile을 사용하여 각각 부분정제된 항균물질을 이용하여 측정하였다. 항균활성 측정용 공시균주인 *B. subtilis* ATCC 6633, *Staphy. aureus* ATCC 29213, *S. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922를 포함하여 총 11종의 균주들에 대하여 일정량의 부분정제된 항균물질을 paper disk법을 이용하여 disk 주위의 저지환의 생성유무와 지름(mm)을 반복 측정하여 각 피검균에 대한 항균 spectrum을 검색하였다.

생육시기에 따른 항균활성

항균물질을 생산하는 분리균주의 생육시기에 따른 항균활성을 조사하기 위하여 30°C에서 24시간 동안 진탕배양한 분리균주를 50ml의 LB 액체배지에 1% 접종한 후, 3시간 간격으로 24시간 동안 600nm에서 생육곡선을 측정하였다. 각 배양시간에 따른 항균물질 생성능은 감수성 균주로는 *B. subtilis* ATCC 6633를 사용하였으며 acetone을 이용하여 부분정제한 항균물질을 paper

disk법을 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

항균물질 생산균주 및 감수성 균주의 분리

토양에서부터 시료를 채취하여 LB, MRS, 2XYT의 broth에 현탁시킨 후 24시간 진탕 배양시키고 각각의 평판배지위에 도말하여 30°C, 37°C에서 24, 48, 그리고 72시간 배양하였다. 그 결과 37°C보다는 30°C에서 항균물질 생산균주가 더 많이 관찰되었고, 30°C에서 24시간 배양한 LB 평판배지상에서 항균 또는 정균하는 2종의 미생물과 이에 민감하게 반응하는 1종의 감수성 균주를 최종적으로 분리할 수 있었다. 그리고 이들 분리균주는 동정하기 전까지 편의상 항균물질 생산균주는 x, y 그리고, 이에 대해 감수성을 나타내는 균주는 f라 칭하였다.

분리균의 동정

항균물질을 생산하는 분리균 2종(x와 y)과 이에 민감하게 반응하는 1종(f)의 감수성 균주의 형태학적, 배양학적 및 생화학적 제반 특성을 조사하여 분류학상의 위치를 검토한 결과는 다음과 같다. 분리균주 x와 y는 끝이 둥근 간균으로 포자를 형성하는 그람양성균이며, f균주는 생장초기에는 약간 구부러진 형태의 단간균이었다가 후기에는 coccobacilli형태로 나타나는 불규칙성을 갖은 그람양성 간균이었다(Table 1). 본 분리균주 x, y와 f를 LB배지상에서 배양하면서 형성된 colony의 특징에 대하여 조사한 결과는 Table 2와 같다. 분리균주 x는 colony가 둥근형이었고 wetted하며 중앙부가 볼록한 convex형이었으며 colony 색깔은 우유색이었고 불투명하였다. 분리균주 y는 x와 거의 비슷하였으나 x에 비해 colony의 중앙부가 볼록한 대신 평면으로 되어있고 표면은 거칠게 나타났다. f는 하나의 colony로 정확하게 구분되어 나타나지 않았고 표면에는 잔털이 돋은 듯한 형으로 넓게 퍼져서 나타났으며 colony 색깔은 아이보리색으로 역시 불투명 하였다. 분리균주들은 세포지방산 분석(Table 3)과 배양학적 특성(Table 4)과 생리학적 생화학적 특성으로 metabolic fingerprint (Biolog) (Table 5)를 분석에 의해 항균물질을 생산하는 균주(x와 y)는 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*이며, 이 항균물질에 대하여 민감하게 반응하는 감수성 균주(f)는 *Curtobacterium* sp.로 동정되었다. 따라서 항균물질 생산균주는 *B. subtilis* cx1와 *B. licheniformis* cy2로, 감수성 균주는 *Curtobacterium* sp. cf3로 각각 명명하였다.

Table 1. Morphological characteristics of isolated microorganisms; x, y and f

Characteristics	x	y	f
Gram stain	+	+	+
Morphology(size, μm)	rod 0.8-1.0 \times 2.0-4.0	rod 0.8-1.0 \times 2.0-3.0	curved rod(variable to growth state)
Sporangium	not swollen	not swollen	-
Spore shape	ellipsoidal	ellipsoidal	-
Spore location	central to subterminal	central to subterminal	

Table 2. Cultural characteristics of isolated microorganisms; x, y and f

Characteristics	x	y	f
Colony	circular, convex	circular, plate	
Colony surface	smooth	rough	
Colony color	milky color	milky color	ivory color
Colony opacity	opaque	opaque	opaque

Table 3. Composition of cellular fatty acid of isolated microorganisms; x, y and f

Contents	x	y	f
C15:0 anteiso	42.2%	39.1%	54.9%
C15:0 iso	26.6%	29.6%	3.0%
C17:0 iso	9.9%	13.7%	-
C17:0 anteiso	8.6%	7.0%	28.8%
C16:0 iso	3.7%	3.2%	6.2%
C16:0	2.4%	3.1%	-
C18:1 w7c/w9t/w12t	-	-	7.2%

Table 4. Biochemical and physiology characteristics isolated microorganisms; x, y and f

Characteristics	x	y	f
Catalase	+	+	+
Voges-Prokauer test	+	+	-
Acid from	D-glucose	+	+
	L-Arabinose	+	v
	D-xylose	+	+
	D-Mannitol	+	+
Hydrolysis of casein	+	+	+
Hydrolysis of starch	+	+	+
Nitrate reduced to nitrate	+	+	+
Formation of indole	-	-	-
Growth at pH	6.8(nutrient broth)	+	+
	5.7(SDA)	+	+
Growth in NaCl	2%	+	+
	5%	+	+
	7%	+	+
	10%	+	+
Growth at temperature	30°C	+	+
	37°C	+	+
	45°C	+	-
	50°C	+	-
	55°C	-	-

+: positive, -: negative, v: various

의 항균물질 생산능의 검증은 항균활성 측정용 공시균 주인 *B. subtilis* ATCC 6633과 분리된 감수성 균주 *Curtobacterium* sp. cf3를 이용하여 시행하였다. Fig. 2에서는 두 개의 감수성 균주(*B. subtilis* ATCC 6633, *Curtobacterium* sp. cf3)를 각각 LB평판배지에 도달한 후, 1) direct method로 항균물질 생산 균체를 직접 접종한

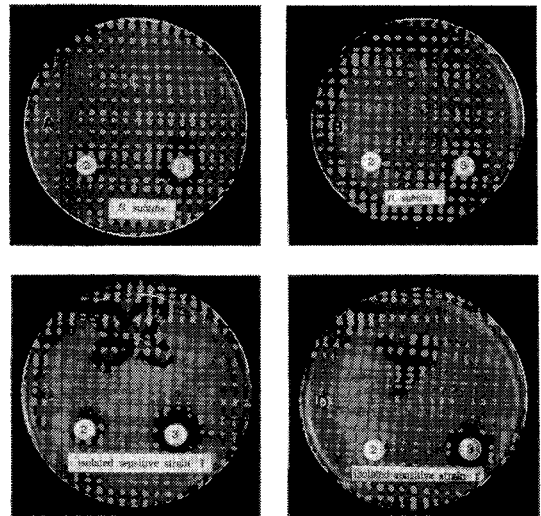


Fig. 2. Antimicrobial activity of *B. subtilis* cx1 and *B. licheniformis* cy2 against *B. subtilis* and *Curtobacterium* sp. cf3.

Plate A: producer strain, *B. subtilis* cx1; sensitive strain, *B. subtilis*.

Plate B: producer strain, *B. licheniformis* cy2; sensitive strain, *B. subtilis*.

Plate C: producer strain, *B. subtilis* cx1; sensitive strain, *Curtobacterium* sp. cf3.

Plate D: producer strain, *B. licheniformis* cy2; sensitive strain, *Curtobacterium* sp. cf3.

1: Producer strain was directly applied onto sensitive strain.

2: Cell free culture extract.

3: Partial purified antimicrobial agent.

항균물질의 bioassay

분리된 균주 *B. subtilis* cx1과 *B. licheniformis* cy2

Table 5. Metabolic fingerprint of isolated microorganisms: x, y and f

Metabolic characteristics	x	y	f	Metabolic characteristics	x	y	f
Water	-	-	-	D-Tagatose	v	-	-
α -Cyclodextrin	+	+	-	D-Trehalose	+	+	v
β -Cyclodextrin	+	+	v	Turanose	+	+	+
Dextrin	+	+	+	Xylitol	v	-	+
Glycogen	+	+	+	D-Xylose	+	+	+
Inuline	v	+	-	Acetic acid	-	-	+
Mannan	+	v	-	α -Hydroxybutyric acid	v	+	+
Tween 40	+	-	+	β -Hydroxybutyric acid	v	-	+
Tween 80	v	-	+	γ -Hydroxybutyric acid	v	-	+
N-Acetyl-D-glucosamine	+	+	+	p-Hydroxyphenyl acetic acid	v	-	+
N-Acetyl-D-mannosamine	+	+	v	α -Keto-glutaric acid	v	+	+
Amygdalin	+	+	+	α -Keto-valeric acid	v	-	v
L-Arabinose	+	+	v	Lactamide	-	-	-
D-Arabitol	v	-	v	D-Lactic acid methyl ester	v	-	-
Arbutin	+	+	+	L-Lactic acid	+	-	-
Cellobiose	+	+	v	D-Malic acid	v	-	-
D-Fructose	+	+	+	L-Malic acid	+	-	-
L-Fucose	v	-	-	Methyl pyruvate	+	+	-
D-Galactose	+	+	+	Mono-methyl succinate	v	-	-
D-Galacturonic acid	v	-	-	Propionic acid	-	-	+
Gentiobiose	+	+	+	Pyruvic acid	+	+	+
D-Gluconic acid	+	+	+	Succinamic acid	v	-	+
α -D-Glucose	+	+	+	Succinic acid	v	-	v
m-Inositol	v	v	+	N-Acetyl-L-glutamic acid	+	+	+
α -D-Lactose	v	-	-	Alaninamide	-	-	-
Lactulose	+	-	-	D-Alanine	-	+	-
Maltose	+	+	+	L-Alanine	-	-	v
Maltotriose	+	+	+	L-Alanyl-glycine	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	L-Asparagine	-	-	v
D-Mannose	+	+	+	L-Glutamic acid	-	-	-
D-Melezitose	+	+	+	Glycyl-L-Glutamic acid	-	-	-
D-Melibiose	+	+	+	L-Pyroglutamic acid	-	-	-
α -Methyl-D-galactoside	+	-	+	L-Serine	-	-	+
β -Methyl-D-galactoside	v	-	+	Putrescine	-	-	v
3-Methyl Glucose	+	+	+	2,3-Butanediol	-	v	v
α -Methyl-D-glucose	+	-	+	Glycerol	-	-	+
β -Methyl-D-glucose	v	+	-	Adenosine	-	-	-
α -Methyl-D-mannoside	-	-	-	2'-Deoxy adenosine	-	v	-
Palatinose	+	+	+	Inosine	-	+	-
D-Psicose	+	+	+	Thymidine	-	-	v
D-Raffinose	+	+	+	Uridine	-	-	+
L-Rhamnose	+	-	+	Adenosine-5'-monophosphate	-	-	-
D-Ribose	+	+	+	Thymidine-5'-monophosphate	-	-	-
Salicin	+	+	+	Uridine-5' monophosphate	-	-	-
Sedoheptulosan	v	+	+	Fructose-6-phosphate	-	+	+
D-Sorbitol	+	+	+	Glucose-1-phosphate	-	-	+
Stachyose	+	+	+	Glucose-6-phosphate	-	v	+
Sucrose	+	+	+	D-L- α -Glycerol phosphate	-	-	+

+: positive, -: negative, v: various

경우와, 2) *B. subtilis* cx1과 *B. licheniformis* cy2 균체 배양액에서 균체를 제거한 배양 상정액 그리고 3) 이 상정액을 acetonitrile을 사용하여 부분정제한 항균물질을 paper disk method를 사용하여 *B. subtilis* cx1과 *B. licheniformis* cy2의 항균물질 생산능을 각각 비교하였다.

B. subtilis ATCC 6633을 감수성 균주로 사용한 경우, 항균물질의 생산능 검증은 전술한 3가지 방법 모두에서 증명까지 일치하는 *B. subtilis* cx1이 *B. licheniformis* cy2보다 더 높은 항균활성을 나타내었다(Fig. 2-A and B). 이는 미생물이 생산하는 항균물질인 박테리옌은

서로 근연관계가 높은 미생물에 보다 더 효과적으로 작용한다는 보고(1,3,4,10,11)와 일치하는 결과이다. *B. subtilis* cx1은 direct method로 균체를 직접 접종하여 감수성 균주와 함께 배양한 경우보다 제균된 배양액을 감수성 균주인 *B. subtilis* ATCC 6633에 paper disk method로 가한 경우에서 더 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 2-A).

Curtobacterium sp. cf3를 감수성 균주로 사용한 경우에도 전체적으로 *B. subtilis* cx1이 *B. licheniformis* cy2보다 더 높은 항균활성을 나타내었다(Fig. 2-C and D). *B. subtilis* cx1과 *B. licheniformis* cy2의 균체를 직접 가한 경우에는 모두 맑은 저지환이 확실히 형성되는 것에 반해 제균된 배양 상정액을 가한 경우에는 이와 같이 저지환이 형성되지 못하였다(Fig. 2-C and D-1, 2). 그러나 감수성 균주인 *B. subtilis* ATCC 6633과 *Curtobacterium* sp. cf3에 대하여 항균물질 생성균인 *B. subtilis* cx1과 *B. licheniformis* cy2 배양액을 부분정제하여 농축하여 항균활성을 측정된 경우에는 모두 뚜렷한 생육저지환을 나타내어 두 감수성 균간의 민감도 차이는 거의 없었다(Fig. 2-A, B, C and D-3).

농축없이 균배양액에서 제균만을 행한 상정액과 direct method로 균체를 직접 접종하여 감수성 균주와 함께 배양하여 항균활성을 비교하였을 때 *B. subtilis* ATCC 6633을 감수성 균주로 사용한 경우와 *Curtobacterium*을 사용한 경우가 각기 다른 결과를 나타냈다. 즉 *B. subtilis* cx1을 농축없이 제균한 배양상정액을 가한 경우에는 *Curtobacterium* sp. cf3에서 보다 감수성 균주인 *B. subtilis* ATCC 6633에 대하여 더 높은 활성을 나

타내었다(Fig. 2-A-1, 2). 그러나 생균을 직접 가한 경우에는 *B. subtilis* ATCC 6633에서 보다 *Curtobacterium* sp. cf3에 대하여 *B. subtilis* cx1과 *B. licheniformis* cy2가 모두 더 높은 생육저지활성을 보였다(Fig. 2-C and D-1, 2). 특히나 *Curtobacterium* sp. cf3는 *B. subtilis* cx1이나 *B. licheniformis* cy2와는 속·종명이 완전히 다른데도 항균물질 생산균주(*B. subtilis* cx1)를 직접 감수성 균주에 가한 경우에는 종명이 같은 *B. subtilis* ATCC 6633에서 보다 더 민감한 결과를 나타내는 현상이 무엇 때문에 발생하는지는 앞으로의 실험을 통하여 규명하여야 할 것이다. 향후의 이러한 실험에 의하여 본 항균물질 생성과 작용기작 및 생산능을 향상시킬 수 있는 방법을 제시할 수 있을 것이다.

항균 spectrum 조사

B. subtilis cx1과 *B. licheniformis* cy2가 생산하는 항균물질을 acetone과 acetonitrile로 각각 부분정제한 농축물을 이용하여 각각의 항균활성을 조사하였다(Table 6). 항균활성은 *B. subtilis*, *Curtobacterium* sp., *Staphy. aureus*, *S. faecalis*, *L. mesenteroides*와 같은 그람양성균에서 활성이 잘 나타났으며, 그람음성균인 *P. aeruginosa*에 대해서도 약하게 그 활성을 나타내었다. 박테리오신 억제범위에 대한 보고 중 *B. cereus*가 생산하는 박테리오신은 *B. cereus*에만 국한된 좁은 항균범위를 갖는가 하면(12) *B. thuringiensis* subsp. *tochi-giensis*로부터 분리한 tochicin(13)도 *B. thuringiensis*에만 높은 항균력을 갖는 것으로 보고되었다. 이와 같이 기존의 보고들에서는 항균물질을 생산하는 균주는 자기와 같은 속·종에서 가장 높은 항균 또는 정균활성

Table 6. Inhibition spectrum of antimicrobial agent from *B. subtilis* cx1 and *B. licheniformis* cy2 by two different partial purification

Indicator strains	Acetone fractionation		Acetonitrile fractionation	
	<i>B.subtilis</i> cx1	<i>B.licheniformis</i> cy2	<i>B.subtilis</i> cx1	<i>B.licheniformis</i> cy2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+++	+++	+++	+++
<i>Curtobacterium</i> sp.cf3	+++	+++	+++	+++
<i>Leuconostoc mesenteriodes</i> KCTC 1628	-	-	+++	+++
<i>Micrococcus luters</i> ATCC 9341	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	+	-	+++	++
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	-	-	-	-
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	+++	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+	-	++	+
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19430	-	-	-	-

Clear zone of inhibition diameter 1.6~1.7cm : +++
 A little turbidity zone of inhibition diameter 1.6~1.7cm : ++
 A lot of turbidity zone of inhibition diameter 1.6~1.7cm : +
 No clear zone : -

을 보이는 것에 비하여, *B. subtilis*와 *B. licheniformis*로 규명된 본 균주는 이들 균주가 생산하는 항균물질이 *B. subtilis*에서 높은 활성을 나타내었을 뿐 아니라 이와는 완전히 속명조차도 다른 *Curtobacterium* sp.에서도 높은 활성을 나타내었다. 또한 그람양성균에서 뿐만 아니라 그 역가가 다소 약하기는 하나 그람음성균인 *P. aeruginosa*에서도 그 항균활성을 나타내어 본 연구에서의 *B. subtilis* cx1과 *B. licheniformis* cy2가 생산하는 항균물질은 기존에 보고된 다른 *Bacillus*로부터의 항균물질에 비해 상대적으로 비교적 광범위한 항균활성을 나타내는 것으로 보여진다. 또한 추출방법에 있어서는 acetone 침전에 의한 방법보다는 Sep-pak에 흡착 후 acetonitrile을 이용하여 추출하는 방법이 보다 더 효과적인 항균물질 추출방법임을 알 수 있었다.

생육시기에 따른 항균물질의 활성

분리균주를 30°C에서 24시간 동안 진탕배양하여 매

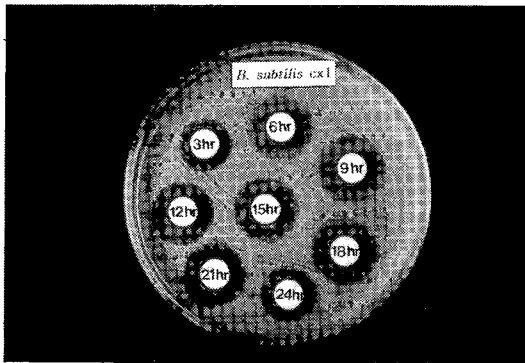
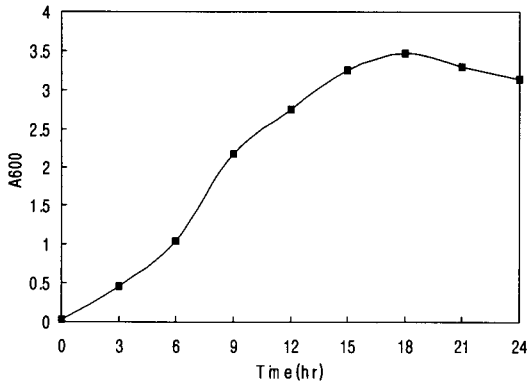


Fig. 3. Growth and production of antimicrobial agent by *B. subtilis* cx1.

Cx1 was cultivated for 24hr at 30°C (Top). Antimicrobial activity was assayed with every 3hr culture samples. *B. subtilis* was used as a sensitive strain (Bottom).

3시간마다 흡광도와 항균활성의 변화를 조사하였다 (Fig. 3, 4). *B. subtilis* cx1은 *B. licheniformis* cy2에 비하여 빠른 균 성장을 나타내었으며 생육 12시간에서 15시간 사이에 정지기에 이르렀다. 항균활성은 생육 3시간부터 전구간에 걸쳐 나타났으며, 대수기 말기부분에 해당하는 9시간부터 정지기인 18시간까지 최대의 활성을 나타내다가 21시간 이후부터는 항균활성이 약간씩 감소하였다 (Fig. 3).

B. licheniformis cy2는 배양 15시간쯤에 생육정지기에 이르렀다. 생육초기에는 항균활성을 나타내지 않았으나, 대수기 중반에 이르는 12시간 때에는 희미한 생육저지환을 나타내기 시작하였고, 정지기에 이르는 생육 15시간부터 21시간까지는 뚜렷한 생육저지환을 나타내어 강한 항균활성을 나타내었다. 생육 24시간부터는 항균활성이 조금 감소하기 시작하였다.

본 결과에 따르면 *B. subtilis* cx1으로부터의 항균물질은 항균활성의 정도 차이는 있으나 생육초기부터 시

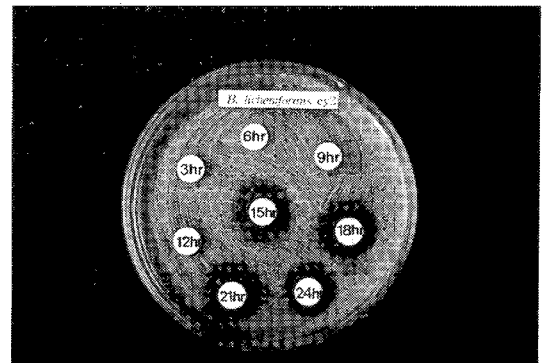
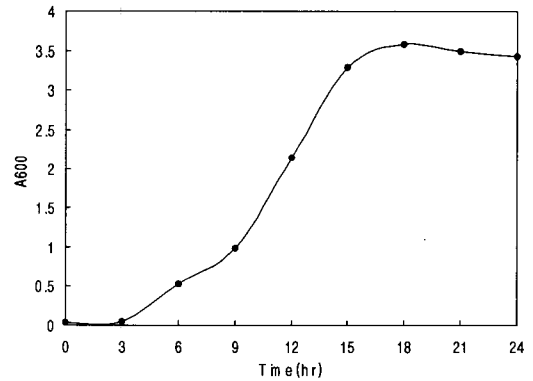


Fig. 4. Growth and production of antimicrobial agent by *B. licheniformis* cy2.

Cy2 was cultivated for 24hr at 30°C (Top). Antimicrobial activity was assayed with every 3hr culture samples. *B. subtilis* was used as a sensitive strain (Bottom).

작하여 생육 전구간에서 안정되게 분비되는 물질임을 알 수 있었다. 이에 반해 *B. licheniformis* cy2로부터의 항균물질은 대수기 말기에 분비되는 물질임을 알 수 있었다. 보고에 의하면(14) 많은 항균물질들은(special metabolites) 영양원이 고갈된 상태에서 생산되며 그렇기 때문에 일반적으로 생육시기별로 보면 정지기 때 축적된다고 한다. 본 실험에서의 결과 역시 *B. subtilis* cx1 과 *B. licheniformis* cy2 두 균주 모두 정지기에 해당하는 시기에 최대의 활성을 나타내었다. 다만 *B. subtilis* cx1의 경우는 배지 내 영양원이 충분한 생육초기부터 항균활성이 나타나는 것으로 보아 이 균에서는 영양원의 고갈(nutritional stress)과 함께 *B. subtilis* cx1으로부터 생산된 항균물질에 대한 감수성 균주(*B. subtilis* 6633)의 높은 민감도에 의한 영향으로 사료된다.

요 약

항균활성을 갖는 2개의 균주와 이 두 균주에 대해 감수성을 나타내는 1개의 균주를 토양으로부터 분리하였다. 분리된 이 균들은 형태학적, 생화학적, 생리학적 특성 및 화학적 분류 특성에 의하여 *B. subtilis*, *B. licheniformis* 그리고 *Curtobacterium* sp.으로 동정되었다. 본 실험에서 이들은 각각 *B. subtilis* cx1, *B. licheniformis* cy2 그리고 *Curtobacterium* sp. cf3라고 명명하였다. *B. subtilis* cx1이 생산하는 항균물질은 그 활성이 비교적 높아 그람양성균인 *B. subtilis*, *Curtobacterium* sp., *L. mesenteroids*, *Staphy. aureus*, *S. faecalis* 뿐만 아니라, 다소 그 활성이 약하지만 그람음성균인 *P. aeruginosa*에 대해서도 항균력을 나타내었다. *B. licheniformis* cy2도 *B. subtilis* cx1보다 그 항균활성이 전체적으로 약간 약한 것으로 나타났으나 항균spectrum은 *B. subtilis* cx1과 동일하였다. 분리된 이들 두 균주들은 30°C에서 9~21시간 배양했을 때 최대 항균활성을 나타내었다. 분리된 감수성 균주인 *Curtobacterium* sp. cf3는 분리된 항균물질 생산균주인 *B. subtilis* cx1과 *B. licheniformis* cy2를 생균 상태로 직접 감수성 균주가 도달된 평판배지에 가했을 경우에 속이나 중명이 같은 감수성 균주인 *B. subtilis* ATCC 6633에서 보다 더 높은 감수성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 조선대학교 교내 학술 연구 조성비에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Bennett, J. W. and Bentley, R. : What's in a name-microbial secondary metabolites. *Adv. Appl. Microbiol.*, **34**, 1-28(1989)
2. Daba, H., Pandian, S. and Gosserin, J. F. : Detection and activity of bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroids*. *Appl. Environ. Micro.*, **57**, 3450-3455 (1993)
3. Montivile, T. J. and Kaiser, A. L. : Antimicrobial proteins: Classification, nomenclature, diversity, and relationship to bacteriocins. In "*Bacteriocins of lactic acid bacteria*" Hoover, D. G. and Steenson, L. R.(eds.), Academic Press, INC, pp.1-17(1993)
4. Melissa, C. J. and Todd, R. K. : Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.*, **167**, 439-446 (1986)
5. Ralph, W. J. and Tagg, J. R. : Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, **59**, 171-200(1995)
6. Daeschel, M. A. : Antimicrobial substance from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology.*, **2**, 164-166(1989)
7. Deles-Broughton, J. : Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.*, **44**, 100-113(1990)
8. Schillinger, U., Geisen, R. and Holzapfel, W. H. : Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Sci. & Technol.*, **7**, 158-164(1996)
9. Daeschel, M. A. : Application and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in food and beverage. In "*Bacteriocins of lactic acid bacteria*" Hoover, D. G. and L. R. Steenson(eds.), Academic Press, INC, pp.63-91(1993)
10. Daw, M. A. and Falkiner, F. R. : Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron.*, **27**, 467-479(1996)
11. Klaenhammer, T. R. : Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochem.*, **70**, 337-349(1988)
12. Naclerio, G. and Ricca, E. : Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Micro.*, **59**, 4313-4316(1993)
13. Paik, H. D., Bae, S. S., Park, S. H. and Pan, J. G. : Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*. *J. Ind. Micro & Biotec.*, **19**, 294-298 (1997)
14. Zuber, P., Nakano, M. M. and Marahiel, M. A. : Peptide antibiotics. In "*Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics*" Abraham, L. Sonenshein, J. A., Hoch, R. L. (eds.), American Society for Microbiology, pp.897-916 (1993)