

## 간장에서 분리한 *Bacillus licheniformis*가 생산하는 박테리오신의 특성 및 정제

정성엽<sup>1</sup> · 최정미<sup>1</sup> · 주우홍<sup>2</sup> · 서현효<sup>3</sup> · 나애실 · 조용권 · 문자영 · 하권철 · 백도현 · 강대옥\*

창원대학교 보건의과학과, <sup>1</sup>창원대학교 대학원 생명공학협동과정, <sup>2</sup>창원대학교 생물학과, <sup>3</sup>진주산업대학교 환경공학과

Received June 26, 2009 / Accepted July 17, 2009

**Characterization and Purification of the Bacteriocin Produced by *Bacillus licheniformis* Isolated from Soybean Sauce.** Sung-Sub Jung<sup>1</sup>, Jung-I Choi<sup>1</sup>, Woo-Hong Joo<sup>2</sup>, Hyun-Hyo Suh<sup>3</sup>, Ae-Sil Na, Yong-Kweon Cho, Ja-Young Moon, Kwon-Chul Ha, Do-Hyeon Paik and Dae-Ook Kang\*. *Department of Biochemistry and Health Science, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea, <sup>1</sup>Interdisciplinary Program in Biotechnology, Graduate School, Changwon National University, <sup>2</sup>Department of Biology, Changwon National University, <sup>3</sup>Department of Environmental Engineering, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea* - A bacteriocin-producing bacterium identified as *Bacillus licheniformis* was isolated from soybean sauce. Antibacterial activity was confirmed by paper disc diffusion method, using *Micrococcus luteus* as a test organism. The bacteriocin also showed antibacterial activities against *Bacillus sphaericus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Paenibacillus polymyxa*, and *Pediococcus dextrinicus*. Optimal culture conditions for the production of bacteriocin was attained by growing the cells in an MRS medium at a pH of 6.5~7.0 and a temperature of 37°C for 36~48 hr. Solvents such as chloroform, ethanol, acetone, and acetonitrile had little effect on bacteriocin activity. However, about 50% of bacteriocin activity diminished with treatment of methanol and isopropanol at the final concentration of 50% at 25°C for 1 hr. It was stable against a pH variation range from 3.0 and 7.0, but the activity reduced to 50% at a pH range from 9.0 to 11.0. It's activity was not affected by heat treatment at 100°C for 30 min and 50% of activity was retained after heat treatment at 100°C for 60 min, showing high thermostability. The bacteriocin was purified to a homogeneity through ammonium sulfate precipitation, SP-Sepharose ion-exchange chromatography, and reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC). The entire purification protocol led to a 75-fold increase in specific activity and a 13.5% yield of bacteriocin activity. The molecular weight of purified bacteriocin was estimated to be about 2.5 kDa by tricine-SDS-PAGE.

**Key words :** Bacteriocin, disc diffusion method, antibacterial spectrum, purification, stability, soybean sauce

### 서 론

박테리오신은 여러 종류의 미생물이 생산하는 천연의 단백질 또는 펩타이드계 항균 물질로서 일반적으로 특정 생육 환경에서 박테리오신 생산균과 다르거나 혹은 비슷한 미생물들의 생육을 저해할 목적으로 분비되는 것으로 알려져 있다[1,7,13].

일반적인 항생제와 박테리오신의 차이점은 첫째, 항생제는 2차 대사산물인데 반하여, 박테리오신은 자신의 유전자로부터 직접 생합성된다는 점에서 일반적인 항생물질과는 구분되는 천연의 항균성 단백질이다. 둘째, 항생제의 경우 사람에게 투여 시 체내 축적과 같은 부작용을 초래하지만 박테리오신은 천연의 항균성 단백질로서, 분자가 아미노산으로 구성되어 있기 때문에 일반적으로 인체에 섭취되면 소화기관의 단백질가수분해효소에 의해 쉽게 분해되어 인체에 무독

성이고 잔류성이 없을 뿐만 아니라, pH와 열에 대한 안정성이 높다. 이러한 측면에서 볼 때 박테리오신은 식품의 새로운 생물보존제로서, 식품의 제조공정 및 완제품 등에 응용되어 그 효용성이 크게 기대되고 있다[11].

최근 소비자들은 건강에 대한 관심의 증대로 화학합성 식품보존제에 대한 거부감으로 인하여 더 신선하고, 천연 그대로의 것 또한 화학방부제의 무 첨가 등을 추구하는 경향이 높으므로 무독성이며 잔류성이 없는 천연 항균성 단백질인 박테리오신은 식품 산업에 있어 최소의 열처리와 저온 유통으로 안전성을 확보할 수 있는 수단으로 인식되고 있다. 우리나라는 김치와 장류 등 전통적으로 자연 미생물을 이용한 발효식품이 풍부할 뿐만 아니라 이들 식품이 국민건강을 좌우하는 기초식품이라고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 새로운 박테리오신을 생산하는 세균을 분리하기 위한 목적으로 우리나라 고유의 전통 발효식품인 간장으로부터 박테리오신 생산균을 분리하고, 박테리오신 생산을 위한 이 균주의 배양조건 확인 및 분리균주가 생산하는 박테리오신의 물리·화학적 특성을 조사하고 정제한 후 tricine-SDS-PAGE로 분자량을 추정하였다.

### \*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3554, Fax : +82-55-213-3550

E-mail : dokang@changwon.ac.kr

## 재료 및 방법

### 간장에서 미생물의 분리

수집한 간장 시료를 멸균된 생리식염수에 10배씩 단계별로 연속 희석하여 *Lactobacilli* De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) 한천배지에 도말한 후 37°C에서 집락이 형성될 때까지 배양하였다. 나타난 집락을 형태학적 특성에 따라 일차적으로 분류하였다.

### 박테리옌 생산균의 선정 및 활성조사

일차적으로 분리한 균주를 5 ml의 MRS 액체배지에서 37°C에서 24시간 배양하여 원심분리로 상등액을 회수하였다. 상등액의 항균활성을 검증하기 위해 paper disc method [3]를 사용하였다. 0.5% yeast extract가 함유된 2.0% agar plate 위에 30°C에서 15시간 배양한 *Micrococcus luteus* 배양액을 0.8% 한천을 함유한 enriched nutrient broth (NB) soft agar에 1% 접종하고 여기에 1 M phosphate buffer (pH 7.0)를 1/10 부피로 첨가 및 혼합하여 plate당 10 ml 씩 분주하여 test plate를 제조하였다. 분리 균주의 배양 상등액을 paper disc (Toyo, 8 mm)에 30 µl 씩 loading하여 UV로 10분간 조사한 후, test plate 위에 paper disc를 올려 30°C에서 24시간 배양하여 paper disc 주위의 지시균주에 대한 저해환의 생성유무를 관찰하였다. 저해환을 생성하는 균주들의 박테리옌 확인은 상등액을 proteinase K로 처리하여 항균활성이 사라지는지 여부로 하였다. 박테리옌 역가는 activity unit (AU)로 표기하였고 상등액을 순차적으로 2배씩 희석하여 저해환을 형성하는 최대 희석배수의 역수를 취하고, 이 값에 1 ml에 대해서 환산해 주는 환산계수를 곱하여 AU/ml로 나타내었다[15,19].

### 박테리옌 생산 균주의 동정

박테리옌 생산균주의 생화학적 특성을 조사하기 위해 API 50 CHB kit(Bio-Merieux, France)를 이용하여 당 발효 및 이용성을 확인하였으며[8,9], 유전학적 동정을 위해서 16S rRNA의 염기서열을 분석한 후, 염기서열을 기초로 하여 분자계통학적 분류도 병행하였다.

### 박테리옌 생산균주의 배양조건

#### 배양온도의 영향

분리균주를 25°C, 30°C, 37°C에서 50 ml의 MRS 액체배지에서 48시간 배양하면서 4시간 간격으로 분리균주의 생육과 박테리옌 역가에 미치는 영향을 조사하였다[14,19]. 600 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 균주의 생육도를 조사하였다.

#### 초기 pH의 영향

MRS 액체배지 초기 pH를 5.0, 6.0, 7.0 및 8.0로 보정하여 37°C에서 48시간 배양하면서 4시간 간격으로 분리균주의 생육도와 박테리옌 역가에 미치는 영향을 조사하였다

[14,19].

### 항균 스펙트럼

박테리옌의 항균 스펙트럼은 paper disc method를 사용하여 확인하였다. *Bacillus* sp. *Paenibacillus polymyxa*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Lactobacillus* sp., *Pediococcus dextrinicus* 및 *Xanthomonas* sp. 등을 시험균주로 사용하여 저해환의 형성 유무를 조사하였다[2,18].

### 항균물질의 안정성

#### 열안정성

열에 대한 박테리옌의 안정성을 조사하기 위하여 배양 상등액을 20, 40, 60, 80 및 100°C에서 각각 30 또는 60분간 열처리한 후 잔존하는 박테리옌의 항균활성을 측정하였다[2,8].

#### pH 내성

pH에 대한 박테리옌의 안정성을 조사하기 위하여 pH 3.0 (0.1 M citrate buffer), pH 5.0 (0.1 M acetate buffer), pH 7.0 (0.1 M phosphate buffer), pH 9.0 (0.1 M borate buffer) 및 pH 11.0 (0.1 M carbonate buffer)의 완충용액과 배양 상등액을 1:1로 혼합하여 24시간 상온에서 반응시킨 후 잔존하는 박테리옌의 항균활성을 측정하였다[2,8].

#### 유기용매 내성

Chloroform, isopropanol, methanol, ethanol, acetone 및 acetonitrile 등을 배양 상등액과 같은 부피 비율로 혼합(1:1)하여 용매의 최종 농도를 50%로 맞추고 상온에서 1시간 배양한 후, 잔존하는 박테리옌의 항균활성을 측정함으로써 여러 유기용매에 대한 박테리옌의 안정성을 조사하였다[2,8].

#### 가수분해효소에 대한 내성

단백질, 탄수화물 및 지질 가수분해효소 등을 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 제조사의 지침에 따라 사용하였다. Lipase (4307 U/mg)와 trypsin (13,500 U/mg)은 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5),  $\alpha$ -chymotrypsin (83.9 U/mg)과, carboxypeptidase A (73 U/mg)는 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), pepsin (3.280 U/mg)은 10 mM citrate (pH 6.0),  $\alpha$ -amylase (519 U/mg)는 0.1 M sodium phosphate (pH 7.0)에 그리고 proteinase K (30 U/mg)는 0.01 M Tris-HCl (pH 7.9), 0.005 M EDTA 및 0.5% SDS 완충액에서 20 mg/ml가 되도록 준비하였다. 배양 상등액에 준비된 각종 효소를 2 mg/ml의 농도로 첨가하고 37°C에서 150분간 그리고 proteinase K는 45°C에서 12시간 반응시켰다. 남아있는 박테리옌 활성은 *M. luteus*에 대한 저해환의 직경을 측정하였다. 또한 동일한 조건에서 효소액만을 처리하지 않은 것을 음성 대조구로 사용하였다[2,8,12,20].

황산암모늄 침전법에 의한 시료의 농축

박테리옌 생성 균주의 배양 상등액 480 ml에 천천히 교반 하면서 황산암모늄을 첨가하여 75%로 포화시킨 후 4°C에서 2~3시간 염석하여 원심분리(12,000× g, 25 min, 4°C)하였다. 침전물만을 회수하여 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) 40 ml에 녹이고, MWCO가 1000인 투석막(Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA)을 사용하여 4°C에서 동일한 buffer 2 l에서 하룻밤 투석시켜 항균활성을 확인 하였다[12,13,15,18].

이온교환크로마토그래피

황산암모늄 침전법으로 농축한 시료를 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)로 평형화시킨 SP-Sepharose 칼럼에 주입하고 동일한 완충액으로 세척하였다. NaCl 농도구배를 0~1.0 M로 걸어주어 이온교환체에 결합한 단백질을 용출하여 분획을 2.5 ml씩 받았다. 항균활성이 있는 분획을 합치고 증류수에서 투석을 행하여 NaCl을 제거한 후 동결건조로 농축하였다[9,12,13,15,18].

역상 HPLC

동결건조한 시료를 1 ml의 3차 증류수(0.1% TFA)에 녹이고 0.45 μm 여과지를 통해 여과한 후 buffer A (0.1% TFA in HPLC grade water) 용액으로 평형화시킨 C18 칼럼에 주입하여 역상 HPLC로 분리하였다. 시료 주입 후에는 5분간 100% buffer A로 세척하였고, 다음 20분간 buffer B (80% acetonitrile/0.1% TFA)를 0~100%까지 linear gradient, 그리고 그 다음 5분간은 100% Buffer B로 용출시켰다. 유속은 2.0 ml/min로 유지하였고, 각 peak 별로 회수한 분획의 박테리옌 활성을 조사하였고 박테리옌 활성이 있는 분획을 모아서 용매를 증발시킨 후 50 mM 인산 완충액(pH 6.0)에 용해시켰다[12].

Tricine SDS-PAGE 전기영동

정제한 박테리옌의 순도와 분자량을 추정하기 위해 tricine SDS-PAGE를 실시하였다[20,24]. 정제한 시료를 tricine sample buffer와 1:1의 부피 비율로 혼합하여 95°C에서 3분간 가열하였다. 4~20% gradient polyacrylamide gel에서 125 V로 2시간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 종료된 후 유리판으로부터 gel을 분리하여 하나는 polypeptide fixative solution (40% methanol, 10% acetic acid)에 30분간 담근 후에 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 2시간 염색한 후 methanol:acetic acid:water (1:1:8, v:v:v) 용액으로 2시간 탈색하였다. 단백질 표준물질로는 Bio-Rad사의 polypeptide SDS-PAGE molecular weight standards marker를 사용하였다. 나머지 gel은 증류수를 30분마다 교체하면서 5회 세척하였다. 세척한 gel을 petri dish에 넣고 UV를 10분간 조사시킨 후 *M. luteus*가 접종된 NB soft agar를 중층하여 30°C

에서 24시간 배양하여 항균활성을 확인하였다.

결과 및 고찰

박테리옌 생성 균주의 탐색 및 선별

MRS 고체배지에 생성된 집락의 모양과 크기 등 형태학적인 특징에 따라 상이한 30주를 분리하여 5 ml의 MRS 액체배지에서 37°C에서 24시간 배양하여 회수한 배양 상등액을 대상으로 paper disc법으로 항균활성을 나타내는 시료 5주를 일차적으로 선별하였다. 이 중 항균범위가 상대적으로 넓으며 proteinase K를 처리할 경우 항균활성이 상실되는 단백질성 항균물질인 박테리옌을 생산하는 한 균주를 최종적으로 선별하였다.

박테리옌 생산 균주의 동정

API 50 kit를 이용하여 탄소원으로 당이나 당유도체의 이용성의 결과를 API 50 kit 제조사의 지침에 따라 on line으로 입력하고 분석하여 생화학적인 동정을 행한 결과, 분리균주는 99.9%의 유의성으로 *Bacillus licheniformis* 균주로 확인되었으며, 차 순위로 0.1%의 유의성으로 *Bacillus pumilus*로 동정되었다(Table 1). 또한 16S rRNA의 염기서열을 분석한 결과도 분

Table 1. Biochemical identification of a bacterial isolate by carbon source utilization pattern

Carbohydrate	Isolate #28	Carbohydrate	Isolate #28
Control	-	Esculin	+
Glycerol	+	salicin	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	-
Ribose	+	Melibiose	-
D-xylose	+	Sucrose	+
L-xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	-
Methyl-b-d-xylopyranside	-	Melezitose	-
Galactose	+	Raffinose	-
Glucose	+	Starch	+
Fructose	+	Glycogen	-
Mannose	+	Xylitol	-
Sorbose	-	Gentiobiose	+
Rhamnose	-	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	+
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	+	L-Fucose	-
Methyl-α, D-mannopyranside	-	D-Arabitol	-
Methyl-α, D-glucoside	+	L-Arabitol	-
N-Acethyl-glucosamine	+	Gluconate	+
Amygdaline	+	2-keto-Gluconate	-
Arbutine	+	5-keto-Gluconate	-

Date obtained by API CHB kit, + :positive, - :negative

리주가 *B. licheniformis*로 나타났다(Data not shown).

박테리옌 생산균주의 배양조건

온도의 영향

분리균주의 생육온도가 세포생장과 박테리옌 생산에 미치는 영향을 조사한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 25°C에서 48시간 배양하는 동안 항균활성은 전혀 나타나지 않았다. 30°C에서 배양하였을 때에는 36시간 이후부터 항균활성이 나타나기 시작하여 48시간 때 최대 박테리옌 역가를 나타내었다. 37°C에서 배양 하였을 때는 배양 후 36시간 만에 264 AU/ml

로 가장 높은 박테리옌 역가를 나타내었으며, 이후 48시간 까지 계속 유지되었다. 이상에서 박테리옌 최적 생산온도는 37°C, 그리고 배양시간은 36시간 이상임을 알 수 있었다.

초기 pH의 영향

배지의 초기 pH에 따른 세포생장과 박테리옌 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 2). 초기 pH 5.0에서는 균체증식 및 박테리옌의 활성이 나타나지 않았다. pH 6.0에서는 배양 12시간부터 서서히 균이 증식되기 시작하였으며, 박테리옌 역가는 배양 44시간 이후 132 AU/ml로 최대를 나타내었다. pH 7.0과 8.0의 MRS 액체 배지에서는 거의 유사한 증식을

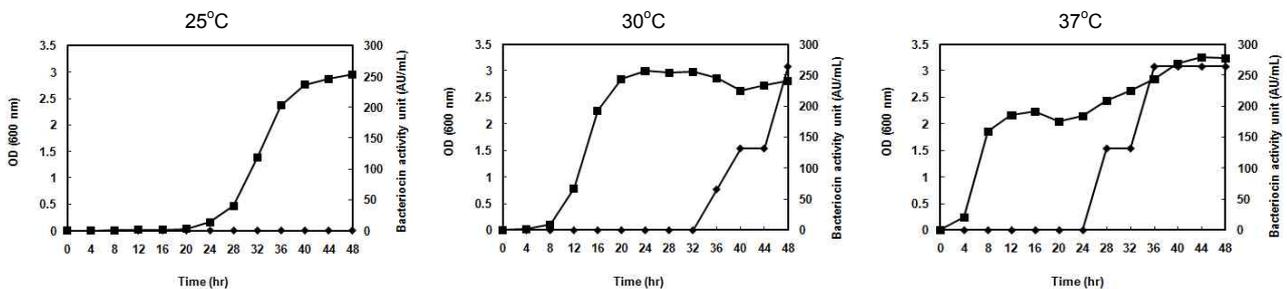


Fig. 1. Cell growth and bacteriocin production of a bacterial isolate in MRS broth at different temperatures. One milliliter of culture was sampled at 4 hr interval. Optical density at 600 nm was measured and the rest was centrifuged to recover supernatant from cell culture. The symbols: -■-, cell growth; -◆-, bacteriocin activity unit (AU/ml).

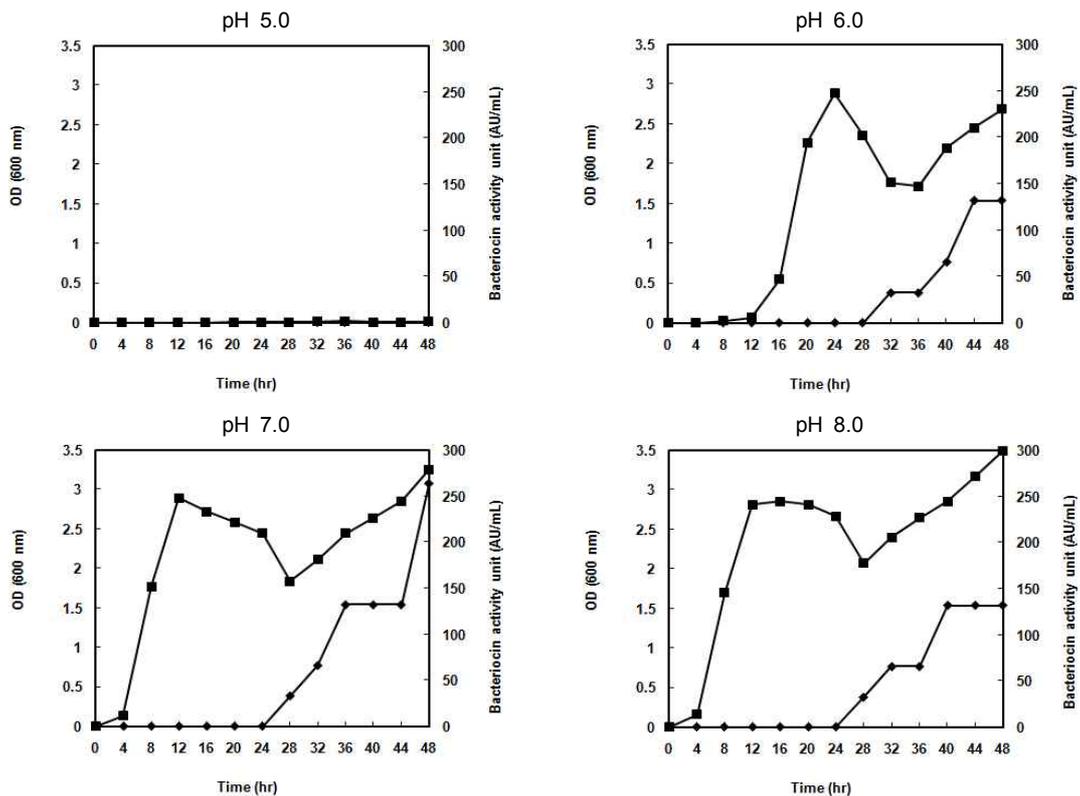


Fig. 2. Cell growth and bacteriocin production of a bacterial isolate in MRS broth at different pH. The isolated strain was cultured at 37°C and bacteriocin activity was determined by critical dilution method with *M. luteus*. The symbols: -■-, cell growth; -◆-, bacteriocin activity unit (AU/ml).

나타내었고, pH 8.0에서의 가장 높은 박테리오신 역가는 132 AU/ml로, pH 7.0에서 역가의 약 50% 수준을 나타내었다. 따라서 분리균주의 박테리오신 생산을 위한 배지의 최적 초기 pH는 7.0임을 확인하였다.

**항균 스펙트럼**

각종 세균에 대한 항균활성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 분리주가 생산하는 박테리오신은 *Bacillus sphaericus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Micrococcus luteus*, *Paenibacillus polymyxa* 및 *Pediococcus dextrinicus* 등 주로 그람 양성균에 대해서 항균활성을 나타내었으나 대장균(*E. coli*)과 같은 그람 음성균에는 항균활성이 없었다.

**열 안정성**

항균물질을 20~100°C 범위에서 일정 시간 배양하여 열 안정성을 조사하였다(Table 3).

20°C~80°C에서 60분간, 100°C에서 30분간 처리할 경우 항균활성이 유지되었으나 100°C에서 60분간 처리 시에는 50%의 항균활성을 나타내었다. 이를 토대로 분리균주가 생산하는 박테리오신은 비교적 열에 안정함을 알 수 있었다. *Lactobacillus acidophilus*가 생산하는 lactacin B의 경우 120°C에서 60분 동안 열처리에도 안정하였으며[21], *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* S50가 생산하는 박테리오신의 경우는 100°C에서 각각 60분과 30분 열처리 시에도 활성을 유지하였으며[6], *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*의 경우 90°C에서 30분간 열처리 시에도 안정하는 등 내열성이 높은 박테리오신이 있는 반면에 *Lactobacillus helveticus* 균주가 생산하는 helveticin V-1829는 60°C에서 불활성화되기 시작하여 100°C에서는 30분

Table 2. Antibacterial spectrum of bacteriocin produced by an isolate

Test microorganisms	Inhibition
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1013	-
<i>Bacillus megaterium</i> KCTC 1098	-
<i>Bacillus sphaericus</i> KCTC 1184	+
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1023	-
<i>Enterococcus faecium</i> KCTC 3095	-
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> KCTC 3188	+
<i>Lactobacillus lactis</i> KCTC 1058	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3099	+
<i>Lactobacillus vaginalis</i> KCTC 3515	-
<i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 3444	-
<i>Micrococcus luteus</i> IAM 1056	+
<i>Paenibacillus polymyxa</i> KCTC 1099	+
<i>Pediococcus dextrinicus</i> KCTC 3506	+
<i>Xanthomonas sp.</i>	-

+: inhibition, -: no inhibition

Table 3. Stability of bacteriocin against solvents, pH and heat treatments

Treatment	Residual activity (AU/ml)
Control	264
Solvent <sup>1)</sup>	
Ethanol	264
Acetonitrile	264
Acetone	264
Chloroform	264
Methanol	132
Isopropanol	132
pH change <sup>2)</sup>	
pH 3	264
pH 5	264
pH 7	264
pH 9	132
pH 11	132
Heat treatment	
20°C, 30 min	264
20°C, 60 min	264
40°C, 30 min	264
40°C, 60 min	264
60°C, 30 min	264
60°C, 60 min	264
80°C, 30 min	264
80°C, 60 min	264
100°C, 30 min	264
100°C, 60 min	132

<sup>1)</sup>Final concentration of solvent was 50% (v/v).

<sup>2)</sup>No pH treatment; 264 AU/ml. Bacteriocin samples were treated with buffers at each pH, 25°C for 24 hr.

안에 활성을 대부분 상실하였으며[23] *Lactobacillus acidophilus* AC1가 생산하는 항균물질은 분자량이 5,200의 저분자의 단백질로서 실온이나 냉장온도에서는 안정하나 50°C 열처리에서는 20분 안에 항균활성의 대부분이 상실됨이 보고되었다[16].

**유기용매에 대한 내성**

유기용매에 대한 내성의 경우 50%(v/v)의 acetone, acetonitrile, chloroform 및 ethanol 등에 대해서는 매우 안정하였으나, isopropanol과 methanol 등을 최종 농도 50%(v/v) 처리할 경우 항균활성이 각각 50%로 감소하였다(Table 3). 따라서 시험한 용매 중 methanol과 isopropanol을 제외한 용매에 대해서는 안정하였으나 methanol과 isopropanol은 박테리오신의 항균활성을 감소시켜 HPLC를 통한 박테리오신의 정제용 용매로는 부적합함을 알 수 있었다.

**pH에 대한 내성**

pH가 박테리오신의 항균활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 시료를 pH 3.0에서 pH 11.0의 범위에 해당되는 완충액을

사용하여 상온에서 24시간 배양한 후 잔존활성을 측정된 결과를 Table 3에 나타내었다. pH 7.0까지의 영역에서 항균활성을 유지하여 안정하다는 것을 알 수 있었다. 대부분의 유산균이 생산하는 박테리오킨은 낮은 pH에서 활성을 보이거나, 매우 국한된 범위의 pH에서만 안정한 것으로 알려져 있는데, 그 예로 *L. plantarum* C-11이 생산하는 plantaricin A는 pH 4.0~6.5 사이의 범위에서만 활성을 유지하였으며[5], nisin의 경우에도 pH 2.0에서의 활성을 유지하지만 pH 8.0~12.0에서는 활성이 감소하는 것으로 보여 알칼리 영역에서는 활성이 감소하는 것으로 보고되었다[14]. 이에 반해 *Bacillus cereus*가 생산하는 항균물질의 경우 pH 3.0~12.0까지에서 항균활성을 갖고 있는 것도 보고되었다[17]. 그리고 pH에 의하여 항균물질이 활성을 상실하는 이유는 pH가 높을 경우 hydroxides ions, deprotonated amines, deprotonated hydroxyl group과 같은 nucleophile은 dehydro residue와 반응하여 분자 간 혹은 분자 내 cross-linkage를 형성 하여 화학적 변형을 일으키기 때문인 것으로 보고되었다[14,22]. 본 연구에서 분리균주로부터 생산되는 박테리오킨은 pH 3.0~11.0에 이르는 거의 전 pH 영역에서 20시간 이상 처리하여도 그 활성을 완전히 잃지 않아 비교적 넓은 pH범위 내에서 안정함을 알 수 있었다.

가수분해효소에 대한 내성

부분 정제한 박테리오킨 용액에 여러 종류의 가수분해효소

Table 4. Susceptibility of the bacteriocin activity to hydrolytic enzymes

Enzyme	Activity
Control (no-enzyme)	+++
Proteinase K	-
Trypsin	+++
$\alpha$ -Chymotrypsin	+++
Pepsin	+++
$\alpha$ -Amylase	+++
Carboxypeptidase A	+++
Lipase	++

*M. luteus* was used as an indicator. Degree of clear zone by growth inhibition; +++: 1.7~1.8 cm, ++: 1.5~1.6 cm, +: 1.3~1.4 cm, -: no clear zone.

Culture supernatant was mixed with enzyme solutions at a final concentration of 2 mg/ml.

Table 5. Purification of the bacteriocin

Purification step	Total activity (AU)	Total protein (mg)	Specific activity (AU/mg)	Yield (%)	Purification fold
Cell-free supernatant	31,680	261.8	121	100	1
Ammonium sulfate precipitation	26,400	108.8	242.6	83.3	2
Ion exchange chromatography	7,920	4.4	1800	25	14.9
HPLC	4,266	0.47	9076.6	13.5	75

를 2 mg/ml의 농도가 되도록 첨가하여 반응시킨 후 항균물질의 잔존활성을 측정된 결과, proteinase K에 의해서는 항균활성이 완전히 소실되어 항균 활성물질이 단백질성 물질 즉 박테리오킨임을 확인할 수 있었다(Table 4). 일부 단백질 분해효소에 의해 활성이 소실되지 않은 것은 리신, 아르기닌, 페닐알라닌, 타이로신, 카르복실기 c-말단, 등과 같은 특이적인 절단 부위가 없거나 반응시킨 효소농도의 문제로 추정되며, lipase를 2 mg/ml의 농도로 처리했을 때 활성의 일부를 잃어 지질성 물질이 항균활성에 관여하는 것으로 추정된다.  $\alpha$ -Amylase는 활성에 전혀 영향을 주지 않았으므로 탄수화물 부분이 박테리오킨 분자 내에는 없거나 활성과는 무관한 것으로 생각된다. 본 실험결과와 같이 박테리오킨 중 다른 단백질분해효소(trypsin, chymotrypsin 등)에는 안정하고 proteinase K에만 항균활성이 소실되는 경우도 보고되었는데, 그 예로 *Bacillus thuringiensis subsp. tochiensis* HD868 와 *Bacillus thuringiensis* BMG 1.7의 경우에서도 같은 결과를 볼 수 있었다[4,18]. 미생물이 생산하는 항균물질인 박테리오킨의 가장 큰 의의는 단백질이나 펩타이드 물질로 이루어져 인체의 소화기관내에의 단백질분해효소에 의해 분해됨으로써 인체에 무독성이고 잔류성이 없다는 것이다. 이러한 특징은 다른 미생물 유래의 항생제와 달리 식품에서의 생물학적인 보존제 뿐만 아니라 가축의 질병예방용 사료 첨가제 그리고 농작물 무독성 생체농약으로 개발에 관심이 모아지고 있다[1,2,14].

박테리오킨의 정제

분리균주를 MRS 액체배지에서 37°C, 36시간 배양한 후 원심분리하여 얻은 배양상등액의 박테리오킨 활성은 66 AU/ml 이었고, 황산암모늄 침전법으로 부분 정제한 박테리오킨 활성은 528 AU/ml으로 나타나 배양 상등액에 비해 약 8배 증가되었고 회수율은 약 83%였다. 분리균주가 생산하는 박테리오킨을 정제하기 위하여 배양 상등액 중의 단백질을 황산암모늄 침전법으로 농축시킨 후 이온교환 크로마토그래피와 역상 HPLC를 순차적으로 실시하여 정제를 시도한 결과는 Table 5와 같다.

황산암모늄 침전법으로 농축한 시료를 양이온 교환수지인 SP-Sepharose를 사용하여 이온교환크로마토그래피를 실시하였다(Fig. 3). 황산암모늄 분획을 칼럼에 통과시킨 후 칼럼의 5배의 부피에 해당하는 50 mM sodium phosphate buffer

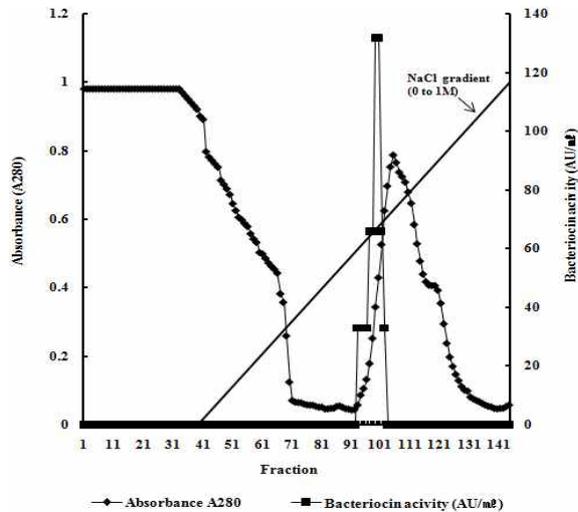


Fig. 3. Elution profile of the bacteriocin on SP-Sepharose cation exchange chromatography. Concentrated culture supernatant was loaded on to SP-Sepharose column and eluted with NaCl gradient from 0 to 1.0 M in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0). The bacteriocin activity of each fraction (2.5 ml) was determined using the paper disc method and active fractions were pooled for further step. The symbols: -◆-, absorbance at 280 nm; -■-, bacteriocin activity unit (AU/ml).

(pH 6.0)를 흘려주어 수지에 흡착되지 않는 물질들의 세척을 먼저 실시하였는데 이들은 항균활성을 가진 봉우리와는 완전히 분리되었다. 이후에 NaCl 농도구배(0에서 1.0 M)에 의해 칼럼으로부터 결합된 단백질을 용출시켰다. 용출된 분획들에 대해 *M. luteus*에 대한 생육저해 여부를 조사한 결과, 최대 활성을 나타내는 분획은 99, 100번이었으며, 용출된 분획 중 93~102번째 분획에서 항균활성이 나타났다. 박테리오신의 활성을 보이는 분획들만 모아 투석 및 동결 건조하여 이후 실험에 사용하였다.

이온교환크로마토그래피에서 얻은 항균활성 분획을 투석 및 동결건조시킨 후 3차 증류수에 용해시켜 역상 HPLC를 통해 박테리오신을 정제하였다. C18 column에서 박테리오신의 분리는 한번 행해졌고 이때의 크로마토그램은 Fig. 4A와 같다. Retention time (RT)이 서로 다른 7개의 주요한 peak가 나타났다. 각 peak 별로 분획을 회수하여 *M. luteus*에 대한 생육저해 여부를 조사하였다. 회수한 7개의 분획 중 RT가 약 18.5분인 6번 분획에서만 항균활성이 나타났다(Fig. 4B). 위 실험결과와 재현성 확인을 위하여 2차, 3차 실험을 실시하여 동일한 결과를 얻었다[22]. 이렇게 정제된 박테리오신의 최종 상대비활성 (specific activity)은 배양 상등액보다 약 75배 증가하였고, 회수율은 13.5%였다.

Tricine SDS-PAGE 전기영동

역상 HPLC를 통해 최종적으로 정제된 박테리오신의 분자

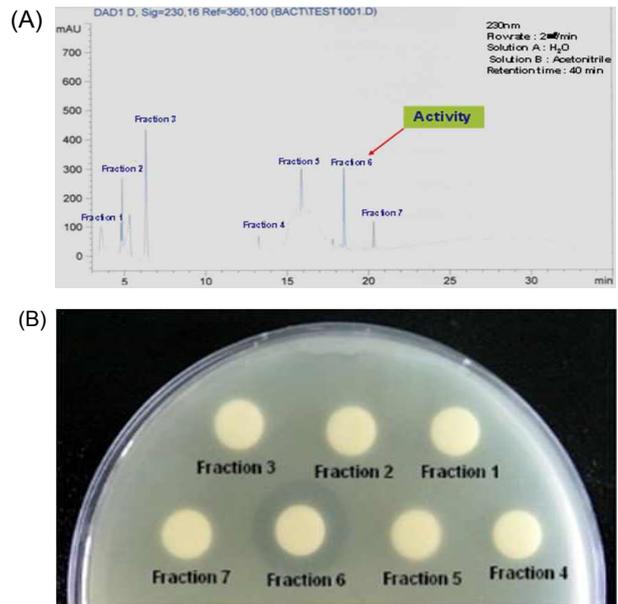


Fig. 4. Elution profile of the bacteriocin on C18 reverse-phase HPLC. The active fractions from SP-Sepharose column chromatography were dialyzed and freeze-dried. Dissolved concentrate was applied to reverse phase HPLC using C18 column. Elution was carried out with a linear gradient from 0 to 80% acetonitrile/0.1% TFA solution. The bacteriocin activity of each fraction was determined using the paper disc method.

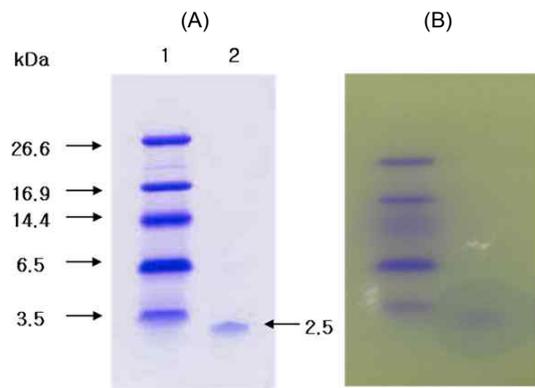


Fig. 5. Tricine SDS-PAGE and detection of antibacterial activity of the purified bacteriocin. (A) Gel stained with Coomassie brilliant blue. Lane 1, polypeptide SDS-PAGE molecular weight standard markers; lane 2, purified bacteriocin. (B) Gel overlaid with NB soft agar containing 1% of *Micrococcus luteus*.

량을 추정하기 위하여 전기영동을 실시하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 정제된 박테리오신은 단일밴드를 나타내어 순수한 형태로 정제되었음을 알 수 있었다. 분자량 표준시료와 비교한 결과 약 2.5 kDa인 분자량을 가지는 것으로 추정할 수 있었다. 또한 전기 영동한 겔을 증류수로 30분간 5회 세척한 후 *M. luteus*가 접종된 NB soft agar를 중층하여 박테리오

신의 활성을 조사한 결과 위의 염색한 겔의 band와 일치하는 곳에 강한 억제환이 생겨 박테리오신임을 확인할 수 있었다. 기존의 보고된 *B. licheniformis*로부터의 항균물질인 박테리오신의 분자량이 subunit 별로 240, 335, 380 kDa인데 비하여 그 단위 분자량이 2.5 kDa으로 훨씬 작음을 알 수 있었으며 구조적인 분석은 하지 않아 알 수 없으나 기존의 박테리오신과는 다른 구조일 것으로 생각된다[2,14]. 따라서 아미노말단의 아미노산서열과 같은 추가적인 연구의 수행이 필요할 것으로 판단된다.

## 요 약

수집한 간장시료에서 형태학적인 특성에 따라 상이한 30주의 미생물을 분리하고 MRS 액체배지에서 37°C, 24시간 배양한 후 회수한 배양 상등액 중 paper disc법으로 항균활성이 있는 것을 일차 선별하여 proteinase K 처리에 의해 항균활성이 사라지는 시료 하나를 최종적으로 선별하였다. 선별한 분리주를 생화학적 분류와 분자계통학적 분류를 통해 동정한 결과 *B. licheniformis*로 나타났다. 이 균주의 생장온도와 배지의 초기 pH에 따른 세포생장 및 박테리오신 활성을 조사한 결과 배양온도는 37°C, 배지의 초기 pH는 7.0에서 박테리오신의 활성이 가장 높게 나타났다. *B. licheniformis*가 생산하는 박테리오신은 *Bacillus sphaericus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Micrococcus luteus*, *Paenibacillus polymyxa* 및 *Pediococcus dextrinicus* 등에 대해서 항균활성을 보였으며, pH 3.0~11.0에 이르는 거의 전 pH 영역에서 20시간 이상 처리하여도 그 항균활성을 완전히 잃지 않아 비교적 넓은 pH 범위 내에서 안정함을 알 수 있었다. Acetone, acetonitrile, chloroform, ethanol 처리 및 20~100°C에서 60분간 가열 시에도 높은 항균활성을 유지하였다. 여러 가수분해효소에 대한 내성을 조사한 결과 trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, pepsin,  $\alpha$ -amylase 및 carboxypeptidase A 등은 항균활성에 영향을 주지 않았으나 lipase는 항균활성을 약간 감소시켰으며 proteinase K는 항균활성을 완전히 사라지게 하였다. 75% 황산암모늄 침전, 양이온교환크로마토그래피, 역상 HPLC 등의 과정을 통해 정제된 박테리오신의 상대비활성(specific activity)은 배양상등액에서 보다 약 75배 증가하였고 회수율은 13.5%였다. 역상 HPLC를 통해서 정제된 박테리오신의 분자량을 tricine SDS-PAGE을 통해서 확인한 결과 약 2.5 kDa으로 나타났으며 염색 시 단일 band로 나타나 순수하게 정제되었음을 확인하였다.

## References

1. Biswas, S. R. and M. C. Johnson, and B. Roy. 1991. Influence of growth condition on the production of a bacteriocin, pediocin AcH by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1265-1267.

2. Chang, J. Y., H. H. Lee, I. C. Kim, and H. C. Chang. 2001. Characterization of bacteriocin produced by *Bacillus licheniformis* cy2. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 410-414.
3. Cho, J. S., S. J. Jung, Y. M. Kim, and U. H. Chun. 1994. Detection of the bacteriocin from lactic acid bacteria involved in kimchi fermentation. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 700-706.
4. Cherif, A. H. Ouzari, D. Daffonchio, H. Cherif, K. B. Slama, A. Hassen, S. Jaoua, and A. Boudabous. 2001. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**, 243-247.
5. Daeschel, M. A. and M. C. Mckenney. 1990. Bactericidal activity of *Lactobacillus plantarum* C11. *Food Microbiol.* **7**, 91-98.
6. Kojic, M., J. Svircevic, and A. Banna. 1991. Bacteriocin producing strain of *Lactococcus lactis* subsp *diacitilactis* S50. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1853-1837.
7. Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol.* **12**, 39-86.
8. Kim, H. T., J. Y. Park, G. G. Lee, and J. H. Kim. 2003. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain from Kimchi. *Food Sci. Biotechnol.* **12**, 166-170.
9. Kim, H. T., J. Y. Park, G. G. Lee, and J. H. Kim. 2004. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain from Kimchi. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 560-565.
10. Lee, N. K., H. W. Kim, H. I. Chang, C. W. Yun, S. W. Kim, C. W. Kang, and H. D. Paik. 2006. Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* NK81 isolated from Jeotgal, a Korean fermented food. *Food Sci. Biotechnology* **15**, 227-213.
11. Lee, H. J., C. S. Park, Y. J. Joo, S. H. Kim, J. H. Yoon, Y. H. Park, I. K. Hwang, J. S. Ahn, and T. I. Mheen. 1999. Identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 282-291.
12. Lee, H. J., Y. J. Joo, C. S. Park, S. H. Kim, I. K. Hwang, J. S. Ahn, and T. I. Mheen. 1999. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* H-559 isolated from Kimchi. *J. Biosciengen and Bioengineering* **88**, 153-159.
13. Lim, S. M. and D. S. Im. 2007. Bactericidal effect of bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* K11 isolated from Dongchimi on *Escherichia coli* O157. *J. Food Hyg. Safety* **22**, 151-158.
14. Liu, W. and J. N. Hansen. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2551-2558
15. Lee, J. G., Go. J. Lee, and S. M. Lim. 2005. Partial purification of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* MJ-14 isolated from Meju. *J. Food Hyg. Safety* **20**, 211-216.
16. Mehta, A. M. K. A. Patel, and P. J. Dave. 1983. Purification and properties of the inhibitory protein isolated from *Lactobacillus acidophilus* AC1. *Microbios.* **38**, 78-81.
17. Naclerio, G. E. Ricca, M. Sacco, and De. M. Felice. 1993. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 4313-4316
18. Paik, H. D. S. S. Bae, S. H. Park, and J. G. Pan. 1997.

- Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp *tochigiensis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 294-298.
19. Paik, H. D., K. M. Koo, J. G. Kim, and N. K. Lee. 2003. Optimization for lactacin SA72 production by *Lactococcus lactis* SA72 isolated from Jeotgal. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 46-50.
  20. Paik, H. D. 1996. Bacteriocins: assay, biochemistry, and mode of action. *J. Food Sci. Nutr.* **1**, 269-277.
  21. Susan, F. B. and T. R. Klaenhamer. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1801-1815.
  22. Sahl, H. G. 1991. Pore formation in bacterial membranes by cationic lantibiotics, pp.347-358, In Jung, G. and H. G. Sahl (eds.), *Nisin and Novel Lantibiotics*. ESCOM Science Publishers B.V., Leiden.
  23. Vaughan, E. E. C. Daly, and G. F. Fitzgerald. 1992. Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 299-308.
  24. Yang, E. J., J. Y. Chang, H. J. Lee, J. H. Kim, D. K. Chung, J. H. Lee, and H. C. Chang. 2002. Characterization of the antagonistic activity against *Lactobacillus plantarum* and induction of bacteriocin production. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 311-318.