

한국환자유래의 녹농균 90-2-2205로부터 S형 Pyocin의 정제 및 특성

김란숙 · 이정미 · 김병오 · 박영덕 · 진익렬*
경북대학교 자연과학대학 미생물학과

Purification and Characterization of the S-type Pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* 90-2-2205 Isolated from Korean Patients

Kim, Ran-Sook, Jung-Mi Lee, Byung-O Kim,
Young-Duck Park and Ingyol Jin*

Department of Microbiology, College of Natural Sciences
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Abstract — The s-type pyocin was purified from the lysate of the mitomycin C-induced *Pseudomonas aeruginosa* 90-2-2205 cells by the order of ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephadex A-50 chromatography and Sephadex G-200 gel filtration. The purity was confirmed by the polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of the purified pyocin was estimated 180,000 by gel filtration. The pyocin was analyzed to be a complex of some polypeptides by the SDS-PAGE. The pyocin was stable by heat treatment and at pH 6~7.5 by adding 10% gelatin and 0.2 M NaCl to the 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5). Its killing action against the sensitive cells was assumably a single hit process.

Bacteriocin은 같은 종 혹은 극히 근연종 중에서 특이적인 receptor을 가진 균만을 죽이는 단백질의 일종(1)으로서, 모든 균이 생산할 수 없고 bacteriocin-encoding plasmid나 유전자를 가진 균이 특정 상태에서 생육정지, 용균됨으로써 생성된다. Bacteriocin 생성균은 그 bacteriocin에 대해 immunity를 가지며, 생성된 bacteriocin은 그 종류에 따라 다른 receptor에 흡착하여 cell membrane, rRNA 또는 ribosome의 작용을 저해하거나, peptidoglycan, lipid, DNA의 합성을 저해(2)하는 등의 각기 다른 작용으로 target cell을 죽인다. Bradley(3)는 bacteriocin을 trypsin 감수성이고 열에 안정한 저분자의 bacteriocin과 trypsin 저항성이고 열에 불안정한 고분자 bacteriocin으로 분류하였다.

녹농균 *Pseudomonas aeruginosa*는 병원내 환자의 집단감염 등 임상적인 관심으로부터 phage나 pyocin 감수성, 생산성에 대한 분류가 행해져 있고, 그 대부

분은 pyocin을 생산하는데, 녹농균 *Pseudomonas aeruginosa*가 생산하는 bacteriocin을 pyocin이라 하며, 이것은 R형, F형, S형 등으로 분류(4)되는데, R형과 F형 pyocin은 trypsin 저항성이고 열에 불안정한 고분자물질로서, 피검균 target cell의 membrane permeability에 영향을 준다. 그리고 phage의 꼬리모양 구조로써 혈청학적으로 근연인 phage가 있는 것으로 보아서 defective phage, 혹은 phage의 조상형과 같은 것으로 생각되어진다(5-9). 그리고 S형 pyocin은 trypsin 감수성이고 열에 안정한 저분자이며, 피검균의 인지질 합성을 저해하고, DNase나 RNase의 활성을 가지고 있으며 구조가 간단하다(5).

한편 최근 우리나라에선 이들 bacteriocin이 단백질이므로 효소에 의해 쉽게 분해될 수 있다는 안정성의 관점에서 일반적인 화학합성보존제의 대체가능성과 식품의 효과적 저장성 향상에 대한 중요성을 강조한 연구보고가 있었다(17, 18).

저자들은 대구와 서울 등지의 종합병원의 환자로부터 분리동정되어 분양받은 녹농균중, S형 pyocin 생성균을 선별할 수 있었고, pyocin 생성을 유도하면

Key words: S-type pyocin, single hit process mitomycin C, *Pseudomonas aeruginosa*

*Corresponding author

서 그의 배양조건을 조사한 바 있는데 (11), 이 균이 생성한 s형 pyocin을 정제하여 pyocin의 여러 성질을 검토한 바를 보고한다.

재료 및 방법

사용 균주, 배지 및 배양

서울과 대구에 있는 종합병원의 환자에서 채취하여 녹농균 *Pseudomonas aeruginosa*로 동정된 균주를 연세대 의대 임상병리학실, 경북대 의대 미생물학실 및 KIST유전자은행실로부터 분양받아, 그 중 s형 pyocin 생성균주로 선별한 *P. aeruginosa* 90-2-2205를 mitomycin C로 유도하여, 생성된 pyocin을 정제했다. 이때의 배지조성, 배양방법 및 유도생성방법 등은 전술한 바(11)와 같았다.

균의 생육도 측정

균의 생육도는 Spectrophotometer로써 600 nm에서의 흡광도로 나타내었다.

Pyocin의 항균 활성 측정

Pyocin의 항균 활성은 전술한 바(11)와 같이, Critical dilution 방법(10)으로 측정하였다.

단백질 정량

단백질은 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry 등(13)의 방법에 따라 540 nm에서 비색정량하였으며, 정제과정중의 단백질량은 280 nm에서 흡광도로써 나타내었다.

Pyocin의 정제

위에서 말한 것과 같이 유도배양, 전처리로 얻은 상등액에 ammonium sulfate를 첨가하여 40%로 포화시킨 후, 원심분리(12,000 rpm, 20분)한 침전물을 10 mM Tris-Cl buffer(pH 7.5)로 용해하여 투석시킨 후 다음과 같이 column chromatography를 행했다. 투석한 pyocin을 10 mM Tris-Cl buffer(pH 7.5)로 평형화시킨 DEAE-Sephadex A-50 column(2×30 cm)에 흡착시키고, 0 M~0.6 M NaCl의 linear gradient 방법으로써 동일 완충액으로 15 ml/hr의 속도로 용출, 6 ml씩 분획했다. 활성분획을 모아, 동결건조농축한 후, Sephadex G-200 column(1.5×40 cm)을 사용하여 0.25 M NaCl이 함유된 10 mM Tris-Cl(pH 7.5) buffer로 3.5 ml씩 용출분획시켰으며, 유속은 6 ml/hr되게

조절했다. 여기서 얻은 활성분획은 투석 뒤, 동결건조농축하여 위와 동일한 column, 완충액 및 유속으로 2차 gel filtration하였다.

전기영동

정제된 pyocin의 순도를 검정하기 위하여 Laemmli의 방법(16)에 따라 10% polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동한 다음, Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 10% methanol, 7% acetic acid의 용액으로 탈색하여 나타나는 band를 분석했다.

분자량 측정

Native 상태의 pyocin 분자량 결정은 Sephadex G-200 column(1.5×65 cm)으로 gel filtration에 의하여 결정하였다(14). 이때 0.25 M NaCl이 함유된 10 mM Tris-Cl buffer로 유속 6 ml/hr으로 용출시켰으며, 표준단백질로는 Boehringer 제품의 albumin from hen egg(MW 45,000), albumin from bovine serum(MW 68,000), aldolase(MW 158,000), catalase(MW 240,000)을 사용하였다. 그리고 pyocin의 subunit 유무는 Laemmli의 방법(16)에 따라 0.4% SDS가 포함된 12.5% SDS polyacrylamide gel 전기영동으로 결정하였고 이때 표준단백질로는 Pharmacia 제품 phosphorylase b(MW 94,000), albumin(MW 67,000), ovalbumin(MW 43,000), carbonic anhydrase(MW 30,000), trypsin inhibitor(MW 21,000), α -lactalbumin(MW 14,400)을 사용하였다.

Pyocin의 항균작용방법

피검균의 생육에 미치는 pyocin의 영향을 조사하기 위하여 피검균을 log phase까지 nutrient broth(NB) 배지에 배양한 뒤, 정제된 pyocin(160 units/ml)을 첨가하여 흡광도를 시간별로 재었다. 각기 다른 농도(32, 160, 400, 500 units/ml)의 pyocin이 피검균의 생존에 미치는 영향을 조사하기 위하여 피검균을 집균하여 DBS로 2번 씻은 다음, NB에 균체를 10^8 cells/ml의 농도로 희석하여 각기 다른 농도의 pyocin을 첨가하여 37°C 에서 배양하였다. 일정시간 간격으로 sample을 고체배지 위에 도말하여 하루 배양한 뒤, 균수를 세었다(7, 12).

결과 및 고찰

Pyocin의 정제

Table 1. Purification of the pyocin 90-2-2205

Purification Steps	Volume (ml)	Total activity (Unit)	Total protein (mg)	Specific activity (Unit/mg protein)	Yield (%)	Purification fold
Mitomycin C-induced lysate	2×10^3	4.4×10^5	366	1.2×10^3	100	1.0
40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	12	4.4×10^5	44	1.0×10^4	100	8.3
DEAE-Sephadex A-50	10	7.2×10^4	4	1.8×10^4	16.4	15
Sephadex G-200 (first)	5	6.8×10^4	3.5	2.0×10^4	15.4	16.6
Sephadex G-200 (second)	10	3.5×10^4	1.6	2.2×10^4	7.9	18

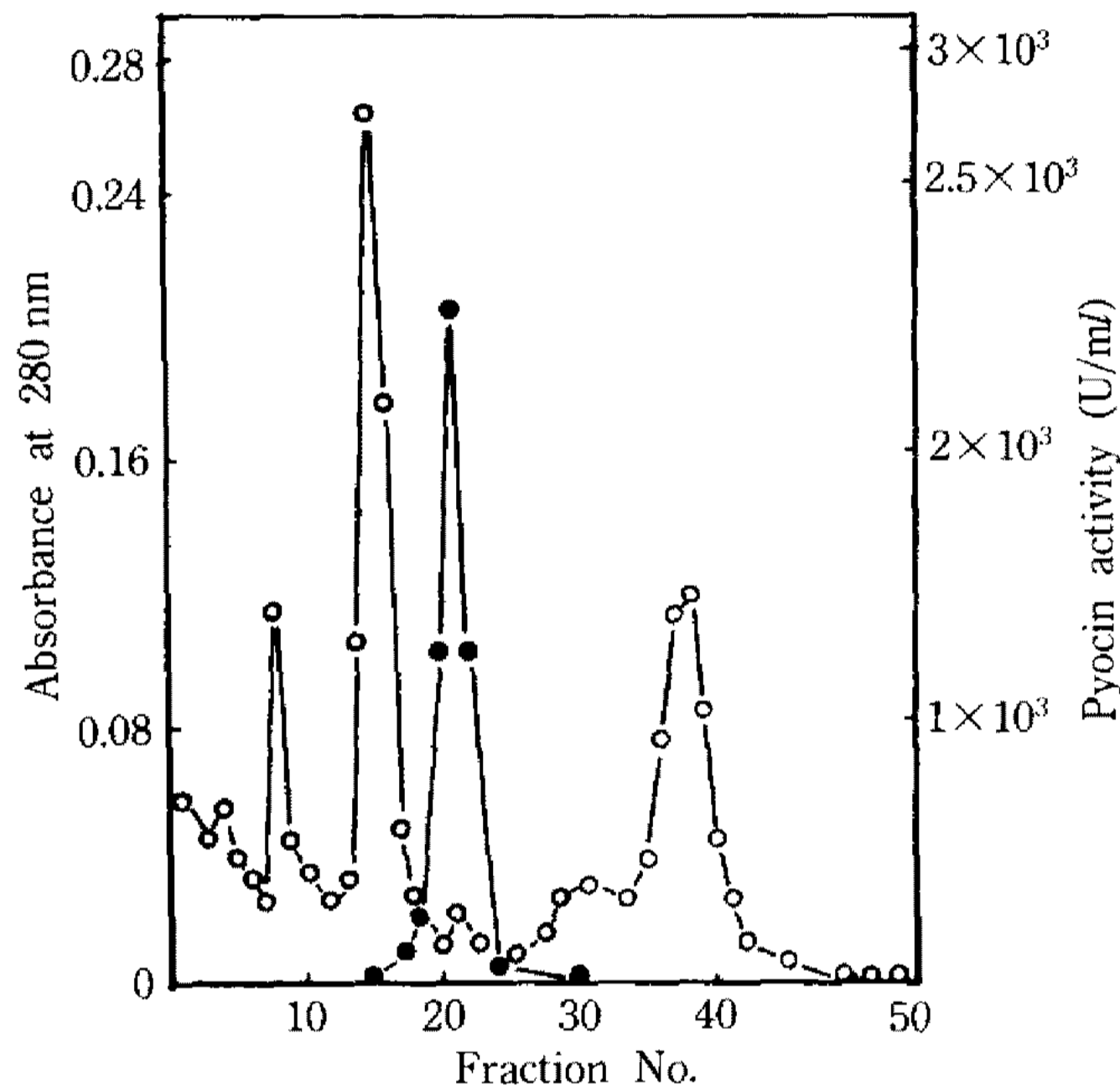


Fig. 1. 2nd gel filtration of pyocin on Sephadex G-200 column.

Elution was carried out with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 0.25 M NaCl.

○, OD₂₈₀; ●, pyocin activity

Pyocin 생성을 위한 최적배지, 조건에서 균주를 배양하여 mitomycin C(2 µg/ml)으로 pyocin 생성을 유도한 다음(11), 그 용균액을 40% 포화 ammonium sulfate로 분별침전함으로써 pyocin을 거의 100% 회수할 수 있었다(Table 1). 이를 DEAE-Sephadex A-50 column chromatography로 정제한 결과, 활성분획 50~90번에서 유효 peak를 얻었으며, 이를 동결건조 농축한 뒤, 0.25 M NaCl이 포함된 10 mM Tris-Cl(pH 7.5) buffer로 평형화된 Sephadex G-200 column에 gel filtration한 결과, 활성부분은 6~14분획에서 나타났다. 이것을 10mM Tris-Cl(pH 7.5) 완충액으로 투석한 뒤, 농축하여 상기 동일한 column으로 재여과한 결과, Fig. 1과 같이 활성부분은 분획 16~26번

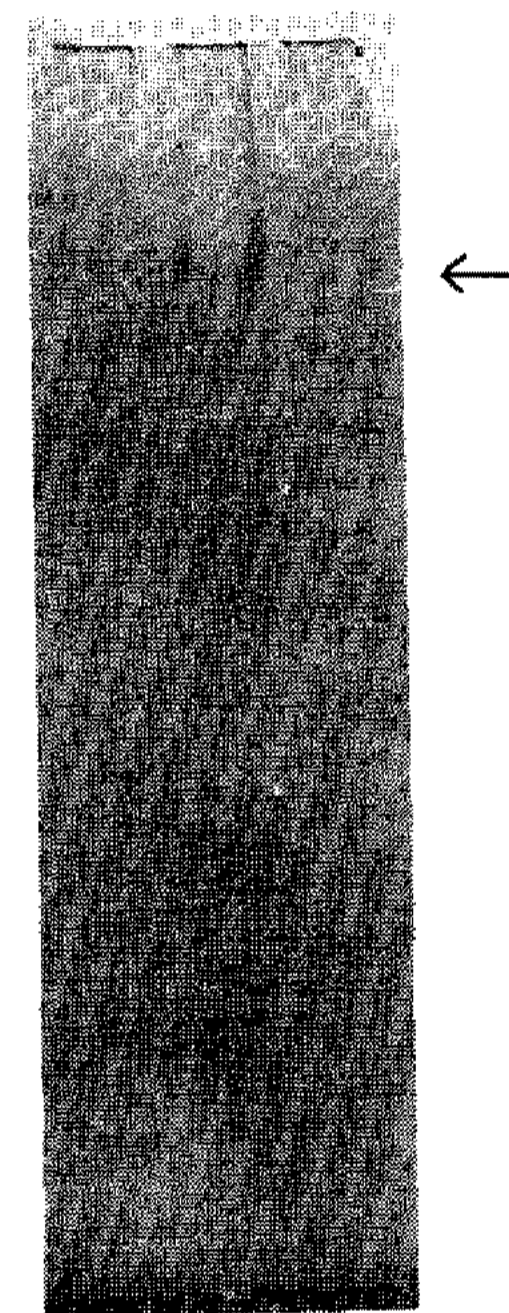


Fig. 2. Native PAGE pattern of the pyocin purified by the 2nd Sephadex G-200 gel chromatography.

에서 나타났다. 이때 활성부분은 순수한 pyocin인 것으로 순도가 검정되었으며(Fig. 2), 이 활성부분을 회수하여 여러 특성검토에 사용하였다.

이렇게 순수정제된 pyocin은 18배 수율로 정제되었으며, 수율은 7.9%이었다(Table 1). 이 결과는 Sano (15) 등의 pyocin AP41 정제에서 128배의 활성을 얻은 것에 비하면 낮은 수율이었다.

Pyocin의 성질

분자량 측정 : 순수정제된 pyocin의 분자량은 purified pyocin과 size marker를 동시에 gel filtration하여 상대적 mobility를 측정된 결과, Fig. 3과 같이 180,000으로 확인되었으며, Ohkawa 등(12)이 보고한 pyocin S2의 분자량 72,000, Sano 등(15)이 보고한 pyocin AP41의 분자량 9,000, Ito 등(5)이 보고한 pyocin S1의

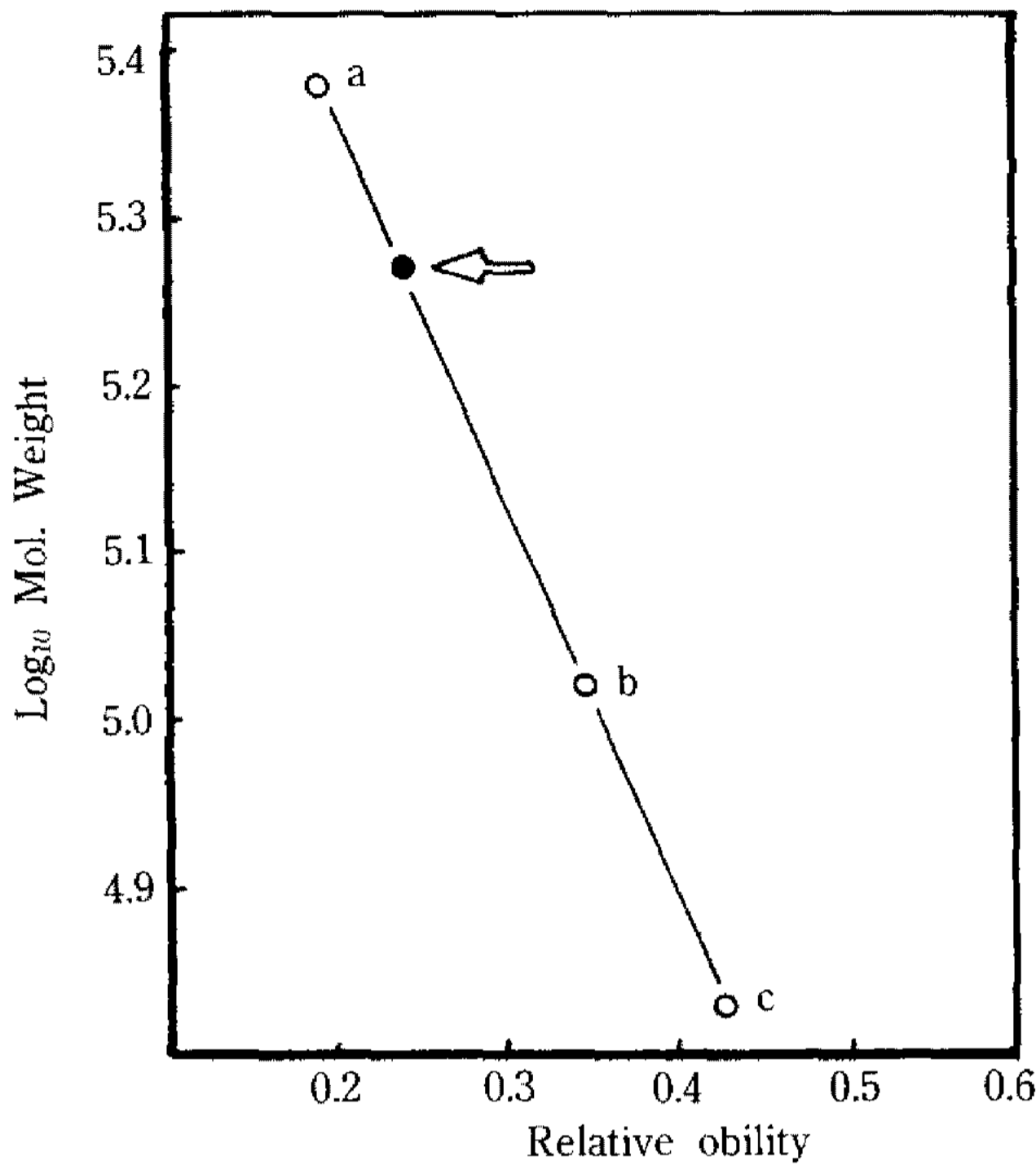


Fig. 3. Determination of molecular weight of the purified pyocin by Sephadex G-200 gel chromatography. Molecular weight standard markers: a, catalase 240,000; b, aldolase 158,000; c, albumin 68,000

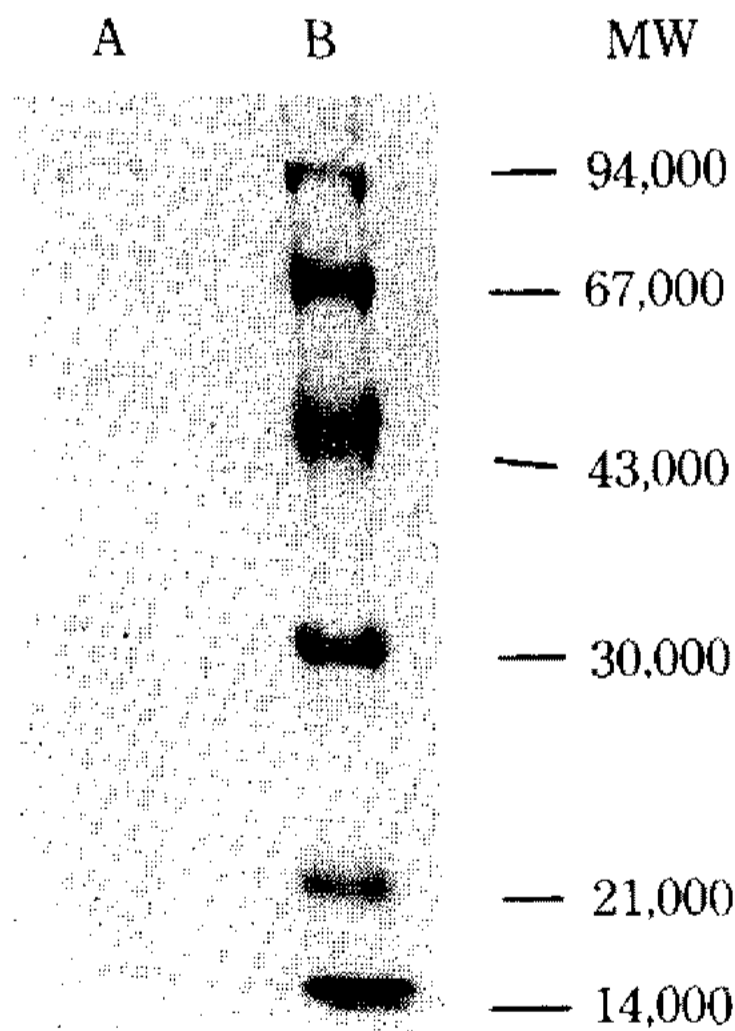


Fig. 4. SDS-PAGE patterns of pyocin. lane A, pyocin; lane B, molecular weight of size markers.

분자량 100,000보다는 다소 큰 분자로 추정되었다. SDS polyacrylamide gel 전기영동을 실시한 결과, Fig. 4와 같이 90-2-2205 균주가 생성하는 s형의 subunit로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 이는 Sano 등의 pyocin AP41의 경우와 유사했다(15).

Pyocin의 온도 및 pH 안정성: 정제한 pyocin의

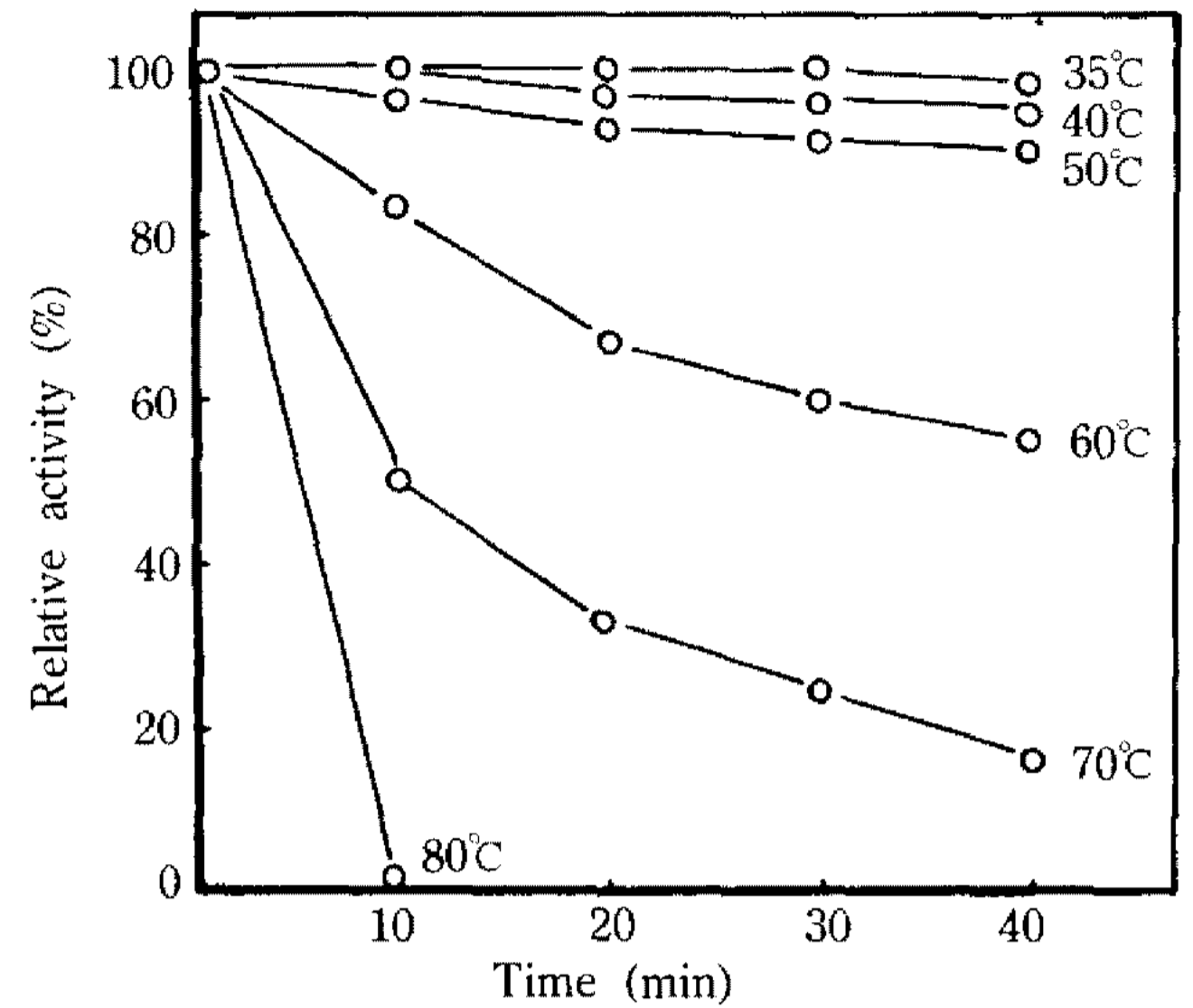


Fig. 5. Thermal stability of pyocin. The pyocin was preincubated in the dilution buffer (11) containing 0.1% gelatin and 0.25 M NaCl at given temperature for various lengths of times and the residual activity was determined.

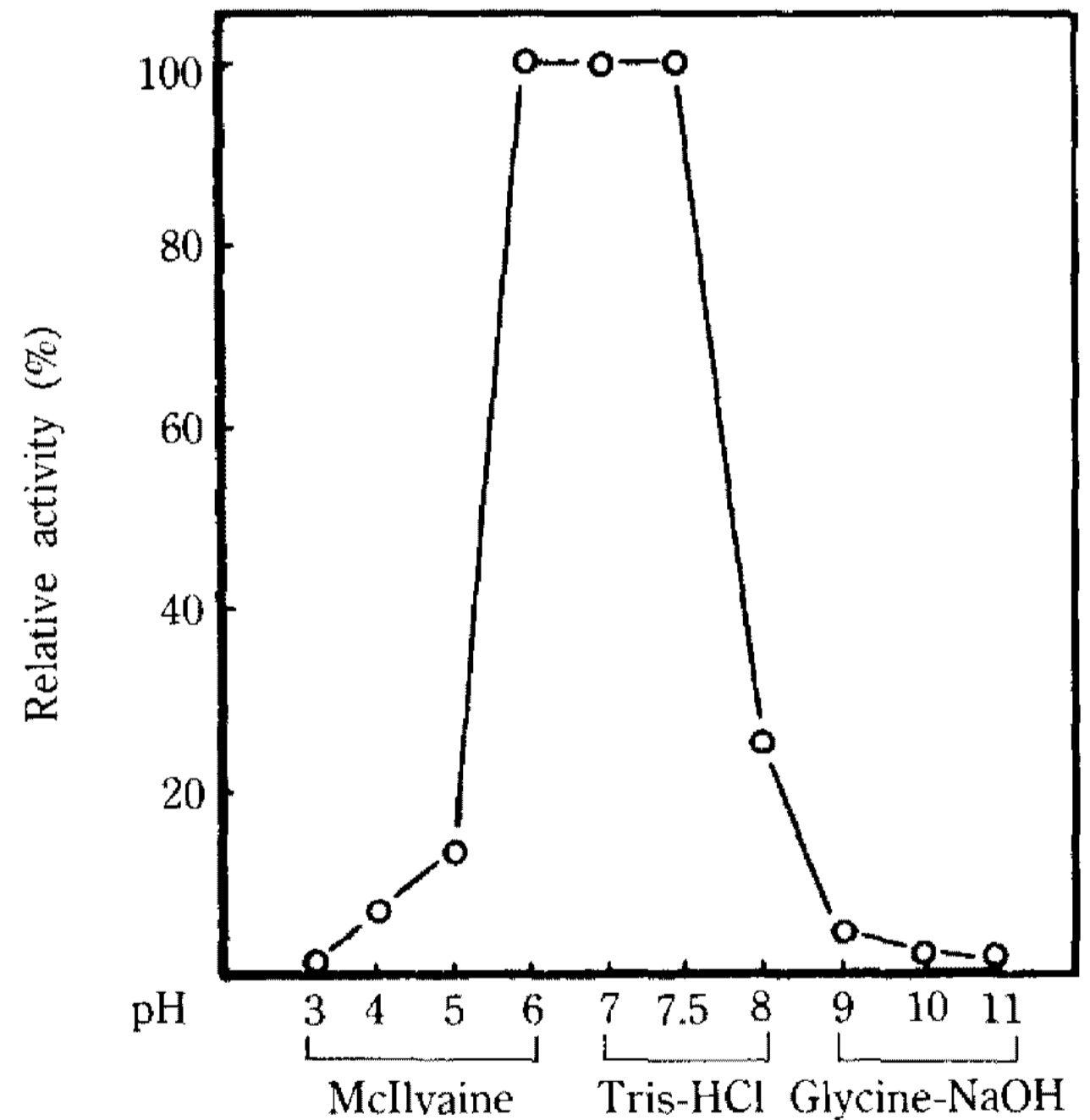


Fig. 6. pH stability of pyocin. After incubation in the corresponding buffer (0.02 M) containing 0.01% gelatin and 0.25 M at 37°C for 3 hr, the activity was assayed.

열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 pyocin을 항균력 측정용 희석 buffer(12, DBS)에 첨가한 후, 각각의 온도에서 시간에 따른 잔존항균활성을 측정 한 결과, Fig. 5과 같이 30~50°C에서는 안정하였고, 60~70°C에서 다소 활성이 떨어졌으며, 80°C에서 10분간 처

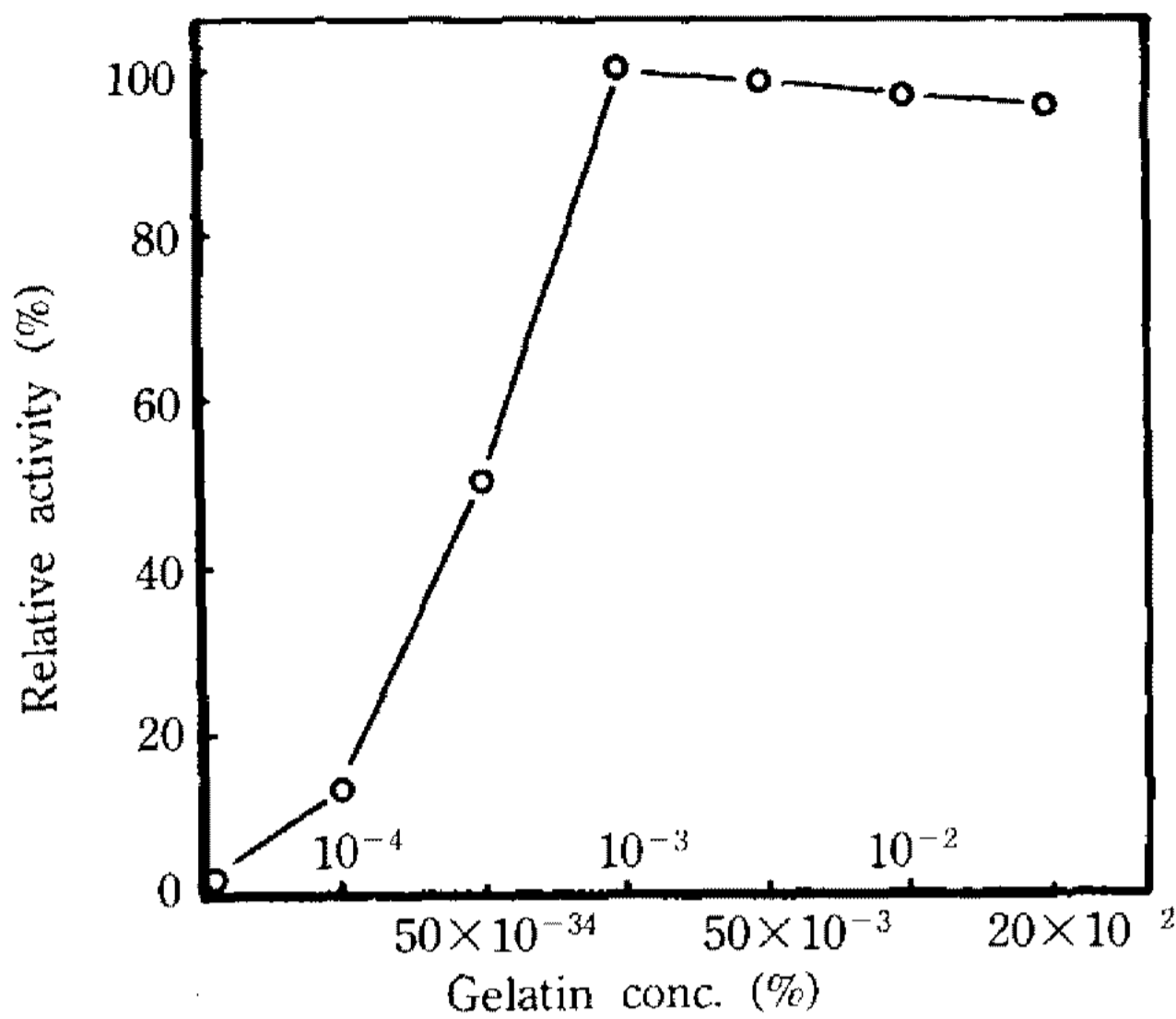


Fig. 7. Effect of gelatin on the pyocin stability. After incubation in the dilution buffer (11) containing gelatin of various concentration at 37°C for 3 hr, the activity was assayed.

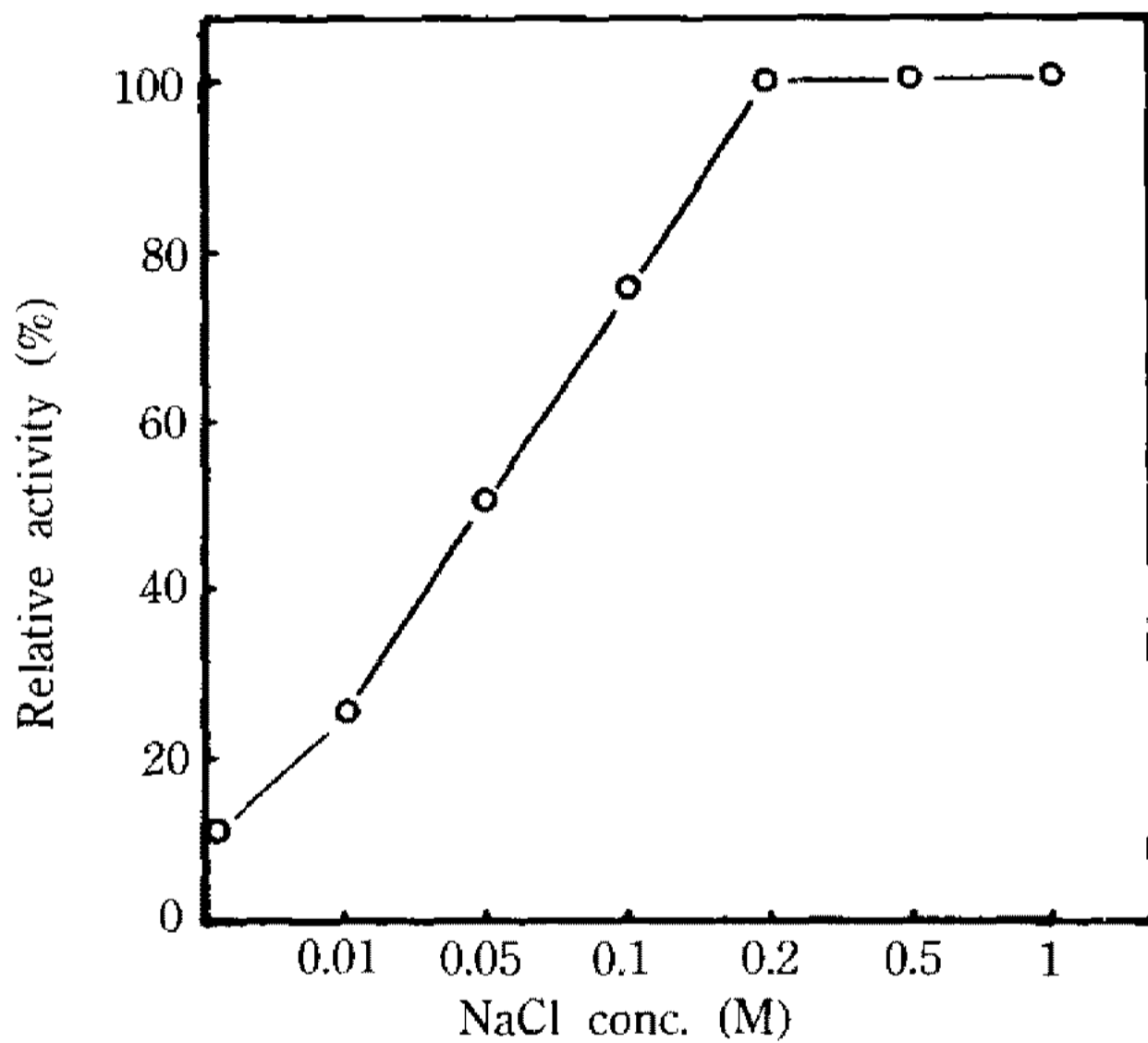


Fig. 8. Effect of NaCl on the pyocin stability. The pyocin was incubated in the dilution buffer (11) containing 0.01% gelatin and 0.25 M NaCl for 37°C for 6 hr, and the activity was determined.

리시 활성이 나타나지 않았다.

한편 DBS내에 각기 다른 pH를 나타내는 buffer를 첨가하여 37°C 에서 6시간 동안 pyocin을 처리하여 잔존항균활성을 측정 한 결과, Fig. 6과 같이 pH 6~7.5 까지의 범위에서 안정하였으며 pH 3 이하와 pH 11 이상에서는 활성이 나타나지 않았다.

Pyocin의 안정성에 대한 gelatin과 NaCl의 영향: 정제과정 및 활성조사시 희석에 의해 pyocin의 활성이 많이 떨어졌다. 그래서 10 mM Tris-Cl(pH 7.5) buf-

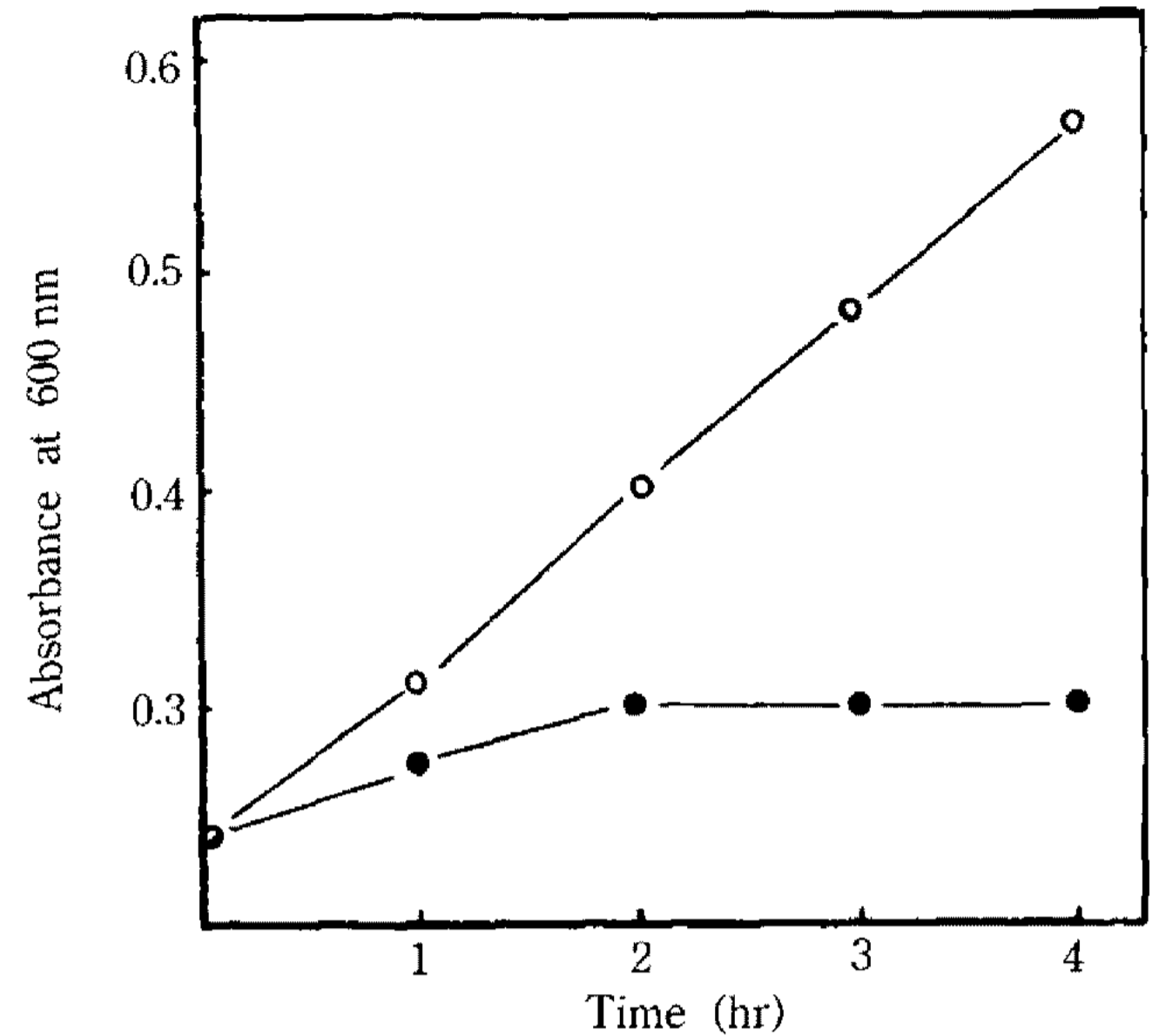


Fig. 9. Action pattern of pyocin against the sensitive cells expressed with the absorbance at 600 nm. The sensitivity of cell aliquots taken at given intervals expressed as the absorbance at 600 nm: ○, control with no treatment of pyocin; ●, sensitive cells (1.0×10^8 /ml) were exposed to pyocin with addition of pyocin (160 U/ml).

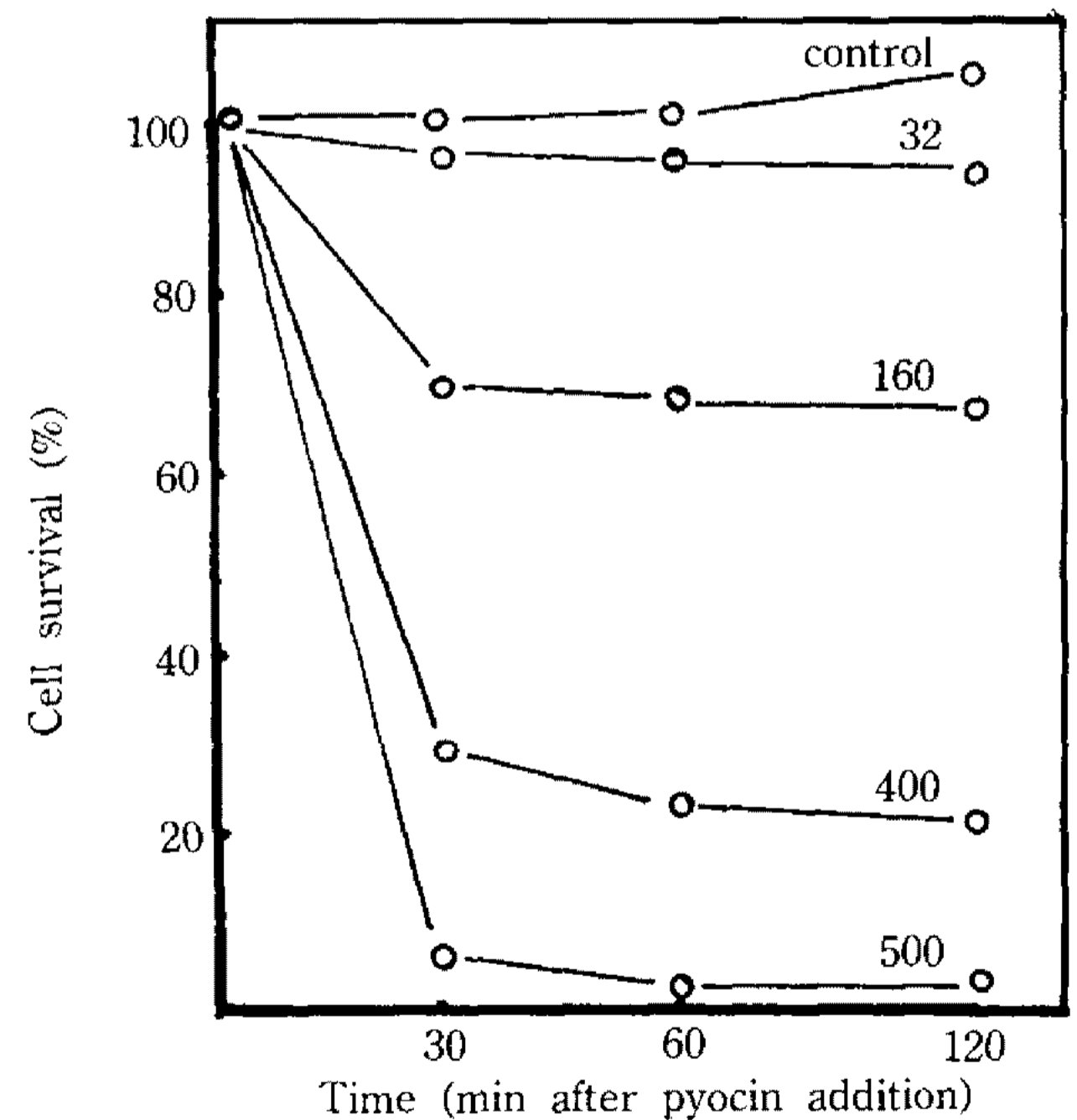


Fig. 10. Growth of sensitive cells (1.0×10^8) exposed to various amount of pyocin.

Survival of pyocin-treated cells taken at intervals indicated were determined as the absorbance at 600 nm.

fer내에 gelatin과 NaCl을 농도별로 첨가하여 정제한 pyocin을 37°C 에서 3시간 처리한 다음, 잔존항균활성을 조사한 결과, Fig. 7, 8과 같이 gelatin은 $10^{-3}\%$, NaCl은 0.2 M 농도 이상 첨가했을 때 안정하였다.

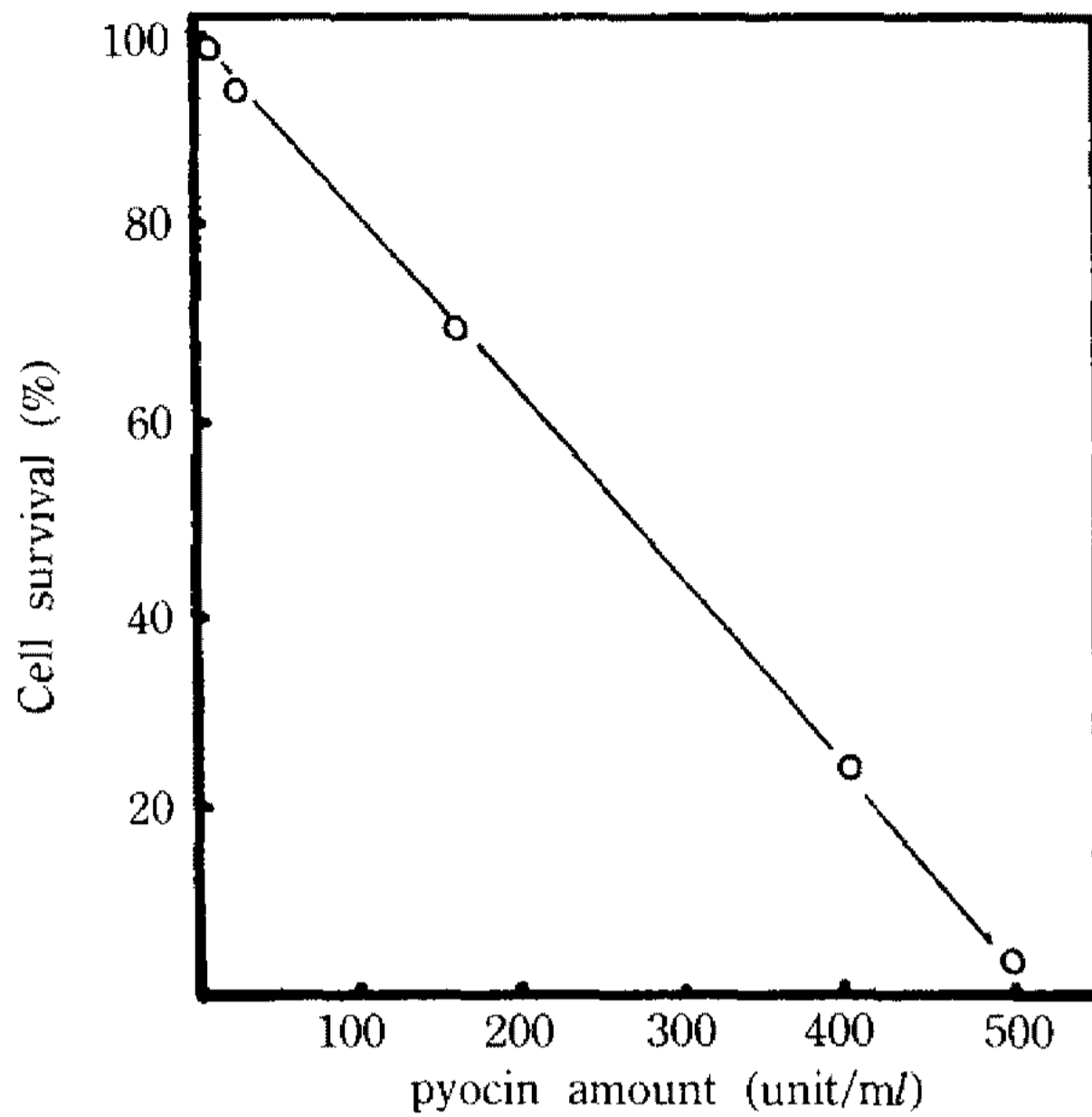


Fig. 11. Relations of the survival number of pyocin-treated cells and the amounts of pyocin.

그래서 정제과정중엔 0.25 M NaCl을 buffer에 첨가하였고, 투석시에도 염을 완전히 제거하지 않았다. 그리고 pyocin 활성조사시 희석 buffer에 10⁻²% gelatin과 0.25 M NaCl을 첨가하여 pyocin을 안정화시켰다.

Pyocin의 항균작용 방법

피검균의 생육에 미치는 pyocin의 영향을 조사한 결과, Fig. 9와 같이 피검균이 용균되지 않고 pyocin 첨가 2시간 후부터 균의 생육이 완전히 정지되었다. 그리고 pyocin의 농도에 따른 피검균의 생존율을 조사한 결과, Fig. 10과 같이 각 농도별 pyocin 처리 30분까지 급격히 균의 수가 줄어들다가 그 이후에는 균의 수가 거의 일정하였고, pyocin의 농도와 생존율의 관계는 Fig. 11과 같이 반비례하였다. 이로써 이 s형 pyocin 90-2-2205는 phage나 pyocin S2(12) 및 R(7)의 경우처럼 single hit 방식으로 하나의 pyocin이 하나의 피검균에만 작용함을 추정할 수 있었다.

요 약

전보(11)에서 이미 선별한 s형 pyocin 생성 *Pseudomonas aeruginosa* 90-2-2205 균주를 최적생성조건에서 mitomycin C(2 µg/ml)을 사용하여 pyocin 생성을 유도한 다음, 그의 용균액은 염석, DEAE-Sephadex A-50 흡착, Sephadex G-200 gel 여과과정을 거쳐

정제하였고, polyacrylamide gel 전기영동에서 단일 band를 확인하였다. 그리고 SDS-polyacrylamide gel 전기영동의 결과, 정제된 pyocin이 몇개의 subunit로 구성되어 있음을 추측할 수 있었고, 분자량은 Sephadex G-200 gel 여과를 통하여 180,000으로 추정됐다. Pyocin의 성질을 조사한 결과, pH 6~7.5, 온도 70°C 까지 안정하였고, pyocin 안정화에 10⁻³% gelatin과 0.2 M NaCl을 최소한 필요로 하였다. 그리고 하나의 pyocin이 다른 bacteriocin이나 phage처럼 하나의 피검균에만 single-hit 방식으로 작용하는 듯 하였다.

참고문헌

1. Foulds, J. 1972. Purification and partial characterization of a bacteriocin from *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **110**: 1001-1009.
2. Reeves, P. 1972. Mode of action. Pp. 46-80. In *The Bacteriocins*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
3. Bradley, D.E. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* **31**: 230-314.
4. Holloway, B.W. and V. Krishnapillai. 1975. Bacteriophages and bacteriocins, Pp. 99-132. In *Genetics and Biochemistry of Pseudomonas*, John Wiley, London.
5. Ito, S., M. Kageyama and F. Egami. 1970. Isolation and characterization of pyocin from several strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **16**: 205-214.
6. Kageyama, M. 1964. Studies of a pyocin. I. Physical and chemical properties. *J. Biochem. (Tokyo)*. **55**: 49-53.
7. Kageyama, M., T. Shinomiya, Y. Aihara and M. Kobayashi. 1979. Characterization of a bacteriophage related to R-type pyocins. *J. Virol.* **32**: 951-957.
8. Kuroda, K. and M. Kageyama. 1979. Biochemical properties of a new flexuous bacteriocin, pyocin F1, produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem. (Tokyo)*. **85**: 7-19.
9. Kuroda, K., R. Kageyama and M. Kageyama. 1983. Isolation and characterization of a new bacteriophage, KF1, immunologically cross reactive with F-type pyocins. *J. Biochem. (Tokyo)*. **93**: 61-71.
10. Govan, J.R.W. 1978. Pyocin typing of *Pseudomonas aeruginosa*. In *Methods in microbiology*. Academic Press. Vol. 10. Pp. 61-91.
11. Kim, R.-S. 1991. A dissertation for the Master

- degree of Science at Kyungpook National University. Purification and properties of the s-type pyocin from *Pseudomonas aeruginosa* 90-2-2205.
12. Ohkawa, I., M. Kageyama and F. Egami. 1973. Purification and properties of pyocin S2. *J. Biochem.* **73**: 281-289.
 13. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randell. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
 14. Andrews, P. 1964. The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weight over a wide range. *Biochem. J.* **96**: 595-606.
 15. Sano, Y. and M. Kageyama. 1981. Purification and properties of an S-type pyocin, pyocin AP41. *J. Bacteriol.* **146**: 733-739.
 16. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
 17. Yoo, J.Y., I.S. Lee, K.S. Chung and Y.J. Nam. 1991. Isolation properties of bacteriocin-producing microorganisms. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 8-13.
 18. Choi, S.Y., S.H. Lee, I.S. Lee, J.Y. Yoo, K.S. Chung and Y.J. Koo. 1991. Purification and properties of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. 1112-1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 209-214.

(Received February 8, 1993)