

Lactococcus sp. 1112-1 균주가 생산하는 Bacteriocin의 정제 및 성질

최신양* · 이상호 · 이인선 · 유진영 · 정건섭 · 구영조

한국식품개발연구원 미생물연구실

Purification and Properties of Bacteriocin Produced by *Lactococcus* sp. 1112-1

Choi, Shin-Yang*, Sang-Ho Lee, In-Seon Lee, Jin-Young Yoo,
Kun-Sub Chung and Young-Jo Koo

Microbiology Laboratory, Korea Food Research Institute, Banwol, Kyounggi 445-820, Korea

Abstract — Purification of the bacteriocin from *Lactococcus* sp. 1112-1 was achieved by successive column chromatography on CM-Sephadex C-25 and Sephadex G-50, starting from cell disruption broth. 16.2% of the initial activity was recovered after this purification step and it was shown 123-fold increase in purification. Purified bacteriocin was shown a single band on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. This substance was rather stable at heat treatment and alkaline pH relatively. The residual antimicrobial activity was 38% when the bacteriocin was treated by heat at 100°C for 60 min. And 23% of the activity remained at pH 8.0 after standing for 48 hr. The amino acid composition of purified bacteriocin was made up 26 residues.

미생물이 생산하는 항균성물질은 대부분이 의약품으로 사용되며, 이 중 Penicillin 등과 같은 항생물질들은 면역학적 부작용이 있으나 이들과 다른 특성을 갖는 비교적 독성이 적고 식품과 함께 섭취할 경우 여러 단백분해효소에 의해 쉽게 분해될 수 있는 단백질 항균성물질인 bacteriocin이 있다. 젖산균 중 bacteriocin의 생산 및 특성에 관한 구체적인 연구가 많이 되어 있는 것은 Pediococci, Streptococci, Lactobacilli 및 *Leuconostoc* sp. 등이다.

Bacteriocin의 개발과 이용은 화학합성보존제의 대체라는 의미와 함께 소비자의 기피현상을 유발시키지 않고 식품의 효과적인 저장성 향상이라는 관점에서 중요하다 하겠다. 이와 같이 효율적인 식품보존방법의 개발이라는 측면에서 중요함에도 불구하고 국내의 bacteriocin에 대한 연구가 많지 않은 실정이다. 지금까지 국내에서 연구된 bacteriocin에 대한 연구현황을 보면 박 등(1)이 김치에서 생육저해작용을 하는

젖산균을 분리하여 여러 가지 균에 대한 저해양상을 조사하였으며, 계속된 연구에서 이 균(*Pediococcus* sp.)의 plasmid DNA를 분리한 바 있다(2). 한편, 정 등(3)은 *Lactobacillus acidophilus*의 bacteriocin 특성에 관하여 연구하였으며 유 등(4)은 *Streptococcus lactis* IFO 12007 균주의 nisin 생산 kinetics에 관한 연구결과를 보고하였다.

따라서 저자들은 식품보존제로서 이용 가능한 bacteriocin 생산 미생물을 자연계로부터 분리, 검색하여 우량균주를 선발, 발효조건, 균주의 생화학적 특성 및 항균 spectrum을 조사한 바 있으므로(5, 6), 본 연구에서는 선발균주로부터 항균성물질을 추출하여 정제한 후 물질의 몇 가지 성질을 조사하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용 미생물

본 연구에 사용된 미생물은 유 등(5)이 분리한 *Lactococcus* sp. 1112-1 균주를 사용하였으며 항균력 비

Key words: Bacteriocin, *Lactococcus* sp.

*Corresponding author

교를 위하여 사용된 피검미생물은 *Lactobacillus plantarum* IFO 3070(ATCC 8014)이었다.

미생물 배양

Merck사의 MRS broth를 membrane filter(0.45 μ m pore size)로 제균하여 미리 멸균한 시험관에 5 ml씩 분주하고 *Lactococcus* sp. 1112-1 보관균주를 접종 후 12시간 배양하여 재활성시키고 주발효액의 5%되게 접종하였다. 배양장치는 New Brunswick사의 Multigen fermentor(working vol. 1 liter)를 이용하여 3N KOH(Fluka) 용액으로 pH를 조절하고, 200 rpm으로 교반하면서 배양하였다.

항균력의 측정방법

항균력은 Tramer와 Fowler(7)의 방법을 수정하여 측정하였으며 이 때 nisin(Aplin & Barret Co., 10^6 IU/g)을 표준비교물질로 사용하였다.

단백질농도의 측정

단백질의 농도는 Lowry 등(8)의 방법으로 측정하였으며, 표준단백질로는 nisin을 사용하였다. 또한 column chromatography상의 각 분획은 분광광도계(Spectronic 21, Bausch & Lomb)를 이용하여 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 단백질농도를 표시하였다.

Bacteriocin 정제

모든 실험조작은 4±1°C에서 행하였다. 얻어진 배양액은 진한 염산으로 pH 2.0이 되도록 조절한 후 100°C에서 5분간 중탕시켜 세포를 파괴한 다음 10,242×g에서 10분간 원심분리(Sorvall RC-28S Supraspeed Centrifuge, DuPont Instruments, USA)하여 얻은 상등액에 1 volume의 methanol을 가하여 침전물을 분리, 제거한 다음 4 volume의 acetone을 가하여 다시 침전물을 제거하고 3 volume의 acetone을 가하여 생성된 침전물을 원심분리하여 얻은 다음 freeze dryer(Leybold-Heraeus GT2, Germany)를 이용, 동결건조시킨 후 다음 시험에 사용하였다.

Ion exchange column chromatography

양이온교환수지인 CM-sephadex C-25(Pharmacia Fine Chem., AB.)을 사용하여 column에 충전(2.8×

16 cm)시킨 다음 50 mM acetate buffer(pH 5.0)로 평형화시키고 동결건조시킨 유기용매추출물을 동일한 완충액에 녹여 column에 채웠다. 용출은 NaCl농도 구배를 0~1.0%의 linear gradient 방법으로 동일완충액으로 하였으며 이 때 유속은 20 ml/hr로 조절하였다.

Gel filtration

Gel filtration은 ion exchange column chromatography상에서 얻은 활성분획을 동결건조시켜 농축한 다음 50 mM acetate buffer(pH 5.0)에 하룻밤 투석시켜 사용하였다. 충전 gel(1.2×40 cm)은 Sephadex G-50(Pharmacia Fine Chem., AB.)을 사용하여 동일완충액으로 용출시켰으며 유속이 13 ml/hr되게 조절하였다. Gel filtration에서 나타난 활성분획을 모아 동결건조시킨 다음 이것을 정제항균물질로 하였다.

전기영동

전기영동은 Laemmli 방법(9)을 변형하여 사용하였으며 이 때 사용한 gel은 SDS-polyacrylamide gel로써 0.1% SDS를 포함하는 10%에서 1%까지의 polyacrylamide 농도구배로 제조하였다. 전기영동이 끝난 gel은 미량의 단백질농도도 검출할 수 있는 Silver stain method(10)을 이용하여 염색하였다. 염색에 사용된 시약은 Silver stain Kit No. AG-25(Sigma Chem. Co., USA)를 이용하였다. 염색이 끝난 gel은 polaroid camera로 사진을 찍고 50°C의 항온기에서 건조시켰다.

안정성

정제한 항균물질을 증류수에 녹인 다음(20 mg/ml) 4°C, 30°C, 50°C, 70°C, 100°C의 각 온도에서 60분간 열처리하여 냉각시키고 항균력을 측정하여 열에 대한 안정성을 검토하였으며 HCl과 NaOH로 미리 조절한 각 pH별 용액(pH 2.0, 4.0, 6.0, 7.0, 8.0, 10.0)에 항균물질은 녹인 다음(20 mg/ml) 4°C와 25°C에서 48시간 동안 방치한 후 항균력을 측정하여 pH에 대한 안정성을 검토하였다.

아미노산 분석

정제 항균물질 200 mg에 6N HCl 20 ml를 가하여 ampoule에 넣고 nitrogen gas로 치환시키면서 seal-

ing한 다음 110°C에서 24시간 가수분해시켰다. 가수분해된 물질은 증류수를 100 ml씩 3회 가하여 감압 건조시켜 염산을 제거한 다음 0.2 N의 citrate buffer (pH 2.2) 5 ml에 녹여 membrane filter(0.22 μm pore size)를 통과시킨 후 아미노산 자동분석기(LKB 4151 automatic amino acid analyzer, Alpha plus)에 주입하였다. 각 아미노산의 확인은 표준아미노산 혼합액과 머무름시간을 비교하여 실시하였으며 정량은 외부표준물질법으로 하였다.

결과 및 고찰

Bacteriocin의 정제

유기용매로 추출하여 동결건조시켜 놓은 항균물질을 분리정제하기 위하여 양이온교환수지인 CM-sephadex C-25 column chromatography를 행하였다. 그 결과 Fig. 1에 나타난 바와 같이 *Lactococcus* sp. 1112-1가 생산하는 항균성물질은 0.4~0.7 M NaCl 농도구배에서 활성을 나타내었으며, 분획번호 36번부

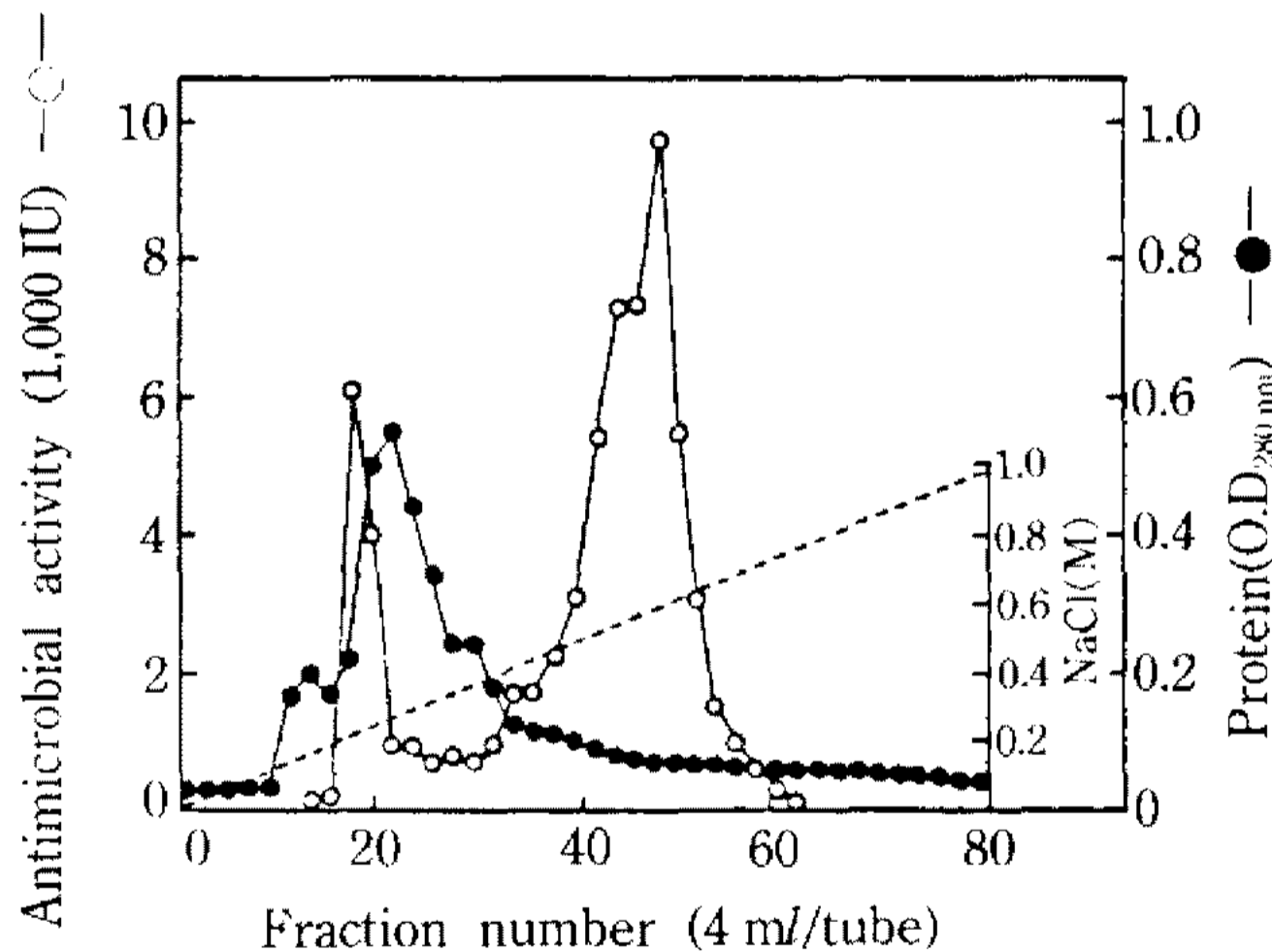


Fig. 1. Elution profile of purified bacteriocin on CM-sephadex C-25 column chromatography.

터 54번까지를 모아 동결건조시켜 농축한 다음 50 mM acetate buffer(pH 5.0)에 투석시킨 뒤 Sephadex G-50 gel filtration을 행하였다. Gel filtration을 행한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 *Lactococcus* sp. 1112-1가 생산하는 항균물질은 gel filtration상에서 순수하게 분리정제됨을 알았다.

이상의 bacteriocin 정제결과를 요약하면 Table 1과 같다. *Lactococcus* sp. 1112-1이 생산하는 항균성물질의 정제정도는 HCl-Heat 처리에 의한 세포파괴에 비하여 비활성이 123배 증가하였으며 최종 수율은 16.2% 이었다.

전기영동

정제과정에서 얻어진 항균물질의 순도를 검정하기 위하여 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis를 행한 결과 Fig. 3과 같았다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 *Lactococcus* sp. 1112-1 균주가 생산하는 항균물질은

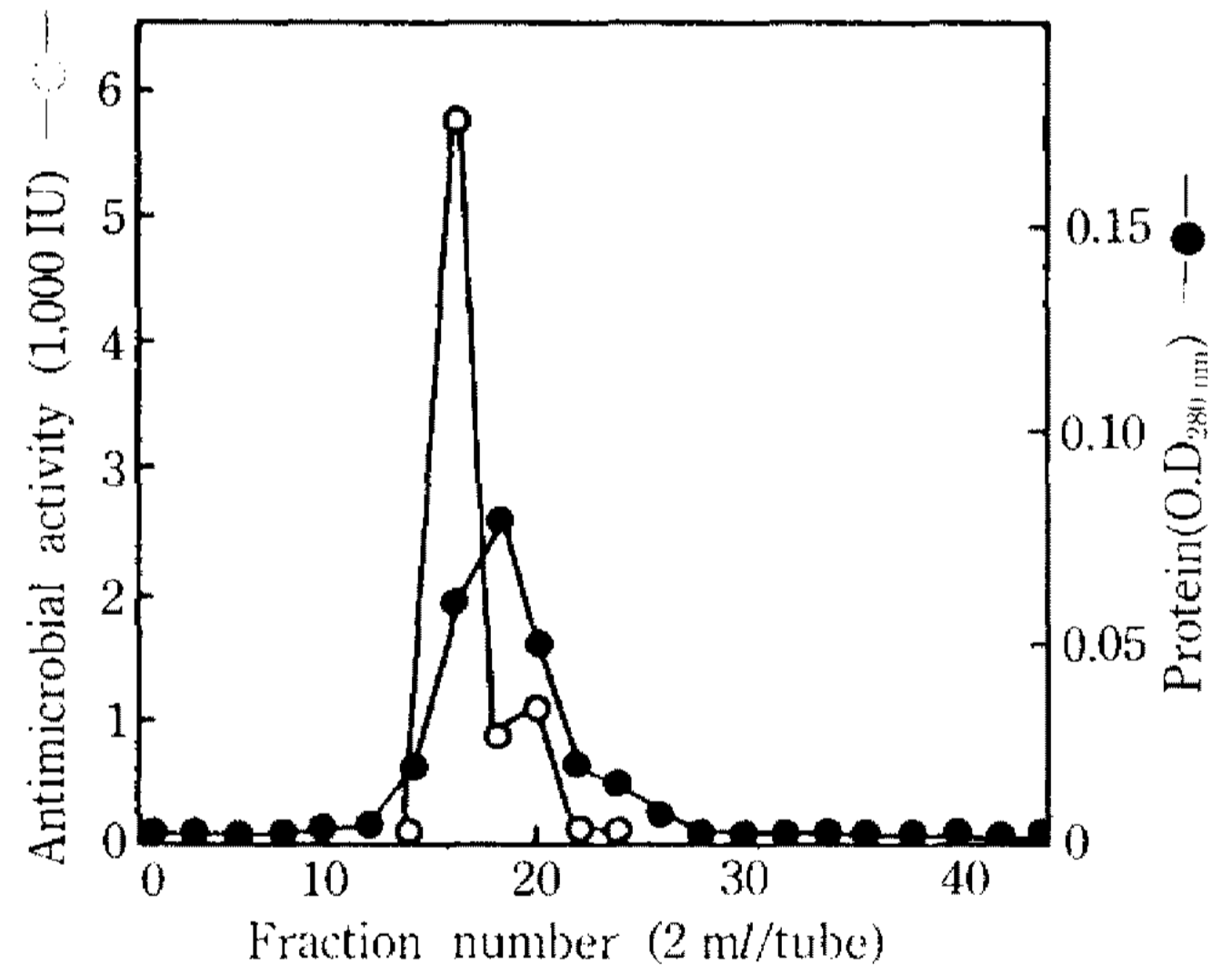


Fig. 2. Elution profile of purified bacteriocin on Sephadex G-50 gel filtration.

Table 1. Purification of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. 1112-1

Purification step	Total activity(IU)	Total protein(mg)	Specific activity(IU/mg)	Fold of purity	Yield (%)
HCl-Heat treatment	2,169,480	20,149	107.7	1.0	100
Acetone ppt.	1,135,360	641.3	1,770.0	16.4	52.3
Ion exchange	499,610	33.7	14,825.0	137.6	23.0
CM-sephadex C-25					
Gel filtration	352,119	26.6	13,228.0	123	16.2
Sephadex G-50					



Fig. 3. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of purified bacteriocin after silver stained.

Lane B, purified bacteriocin; lane N, standard nisin (Nisaplin, Aplin & Barret Co.); lane M, molecular weight markers (LKB Pharmacia 80-1129-83:16950, 14400, 8160, 6210 and 2510 daltons)

단일 band를 보이므로(Lane B) 본 실험에서 사용한 CM-sephadex C-25 ion exchange column chromatography와 Sephadex G-50 gel filtration의 정제과정을 거치면서 순수하게 정제됨을 알 수 있었다.

열안정성

정제한 항균물질의 열에 대한 안정성을 보기 위하여 항균물질을 증류수에 녹인 다음(20 mg/ml) 4°C, 30°C, 50°C, 70°C, 100°C의 각 온도에서 60분간 열처리하여 냉각시키고 항균력을 측정하여 결과를 Table 2에 나타내었다. 정제항균물질은 4°C에서 60분간 처리하였을 때에 비하여 70°C에서는 24%, 100°C에서는 62%의 활성손실을 보여주었다. 이러한 결과로부터 *Streptococcus thermophilus*가 생산하는 항균물질을 100°C에서 60분간 열처리시 항균력이 소실되는 것(11), *Streptococcus faecalis*가 생산하는 항균물질은 70°C에서 50%의 활성손실을, 80°C에서는 완전한 활성손실을 보이는 것(15), *Lactobacillus helveticus*가 생산하는 항균물질 Helveticin J는 100°C에서 60분간 열처리할 때 93% 이상의 활성이 소실됨을 보이는 것(13)과 비교할 때 100°C 열처리에서도 38%의 잔존활성을 나타낸

Table 2. Effect of heat treatment on the antimicrobial activity of purified bacteriocin from *Lactococcus* sp. 1112-1^a

Treatment (°C)	Clear zone size (mm ²) ^b	Relative activity (%)
4	250.4	100
30	219.8	87.8
50	212.4	84.8
70	190.7	76.2
100	95.8	38.3

^aPurified bacteriocin was treated at each temperature for 60 min.

^bClear zone size=Total clear zone size—paper disc size.

Table 3. pH stability on the antimicrobial activity of purified bacteriocin from *Lactococcus* sp. 1112-1^a

pH	Clear zone size (mm ²) ^b		Relative activity (%)	
	4°C	25°C	4°C	25°C
2.0	246.7	208.9	100	84.7
4.0	201.6	150.1	81.7	60.8
6.0	201.6	119.0	81.7	48.2
7.0	201.6	122.1	81.7	49.5
8.0	219.8	79.5	89.1	32.2
10.0	187.4	93.1	76.0	37.7

^aPurified bacteriocin was treated at each pH for 48 hr.

^bClear zone size=Total clear zone size—paper disc size.

것은 비교적 열에 안정한 물질로 생각되었다.

pH 안정성

정제한 항균물질의 pH에 대한 안정성을 검토한 결과 Table 3과 같았다. *Lactococcus* sp. 1112-1 균주가 생산하는 항균물질은 4°C에서 48시간 방치 후 pH 8.0 이하의 범위에서는 항균력을 80% 이상 유지하였으나 25°C에서 48시간 방치한 후에는 pH 4.0에서 40% 정도의 항균력소실을 보였으며, 점차 alkaline 쪽으로 가면서 심한 항균력소실을 보여주었다. 이러한 결과는 *Streptococcus faecalis*가 생산하는 항균물질이 37°C에서 pH 7.2까지는 초기활성을 유지하다가 basic pH에서는 점차 소실되며(15), Group B *Streptococcus*가 생산하는 Streptocin B₁은 pH 2.0~6.5에서 안정하였으나 alkaline쪽에서는 불안정함을 보인 것과 같은

경향으로 나타내었다(16). 또한 *Lactobacillus bulgaricus*가 생산하는 bulgarican은 4°C와 25°C 모두 pH 6.0 이상에서 항균력을 소실한다고 보고하였으며(17) *Pediococcus acidilactici*로부터 분리한 bacteriocin은 pH 9.0 이후에서는 항균력을 상실하였다고 한다(14). 그러나 이들 bacteriocin과 본 실험에서의 결과를 비교하면 모두 pH 2.0 부근에서 안정한 공통점을 갖고 있는 것으로 나타났다.

아미노산 조성

정제한 bacteriocin의 아미노산 조성을 알아보기 위하여 6N HCl을 가하여 110°C에서 24시간 가수분해시키고 증류수를 가하여 감압건조시키면서 염산을 제거한 다음 0.2N의 citrate buffer(pH 2.2) 5 ml에

녹여 membrane filter를 통과시킨 후 아미노산 분석을 행한 결과 Table 4와 같았다. Table 4에 나타낸 바와 같이 *Lactococcus* sp. 1112-1 균주가 생산하는 bacteriocin은 전체 26개의 아미노산잔기로 구성되어 있음이 밝혀졌으며 nisin, diplococcin 및 subtilin의 아미노산구성과는 상이함을 보였고 특히 이들에 비해 histidine의 함량이 월등히 많은 점이 특이하였다.

요 약

Lactococcus sp. 1112-1 균주가 생산하는 bacteriocin을 정제하고 특성을 조사하였다. CM-sephadex ion exchange column chromatography, Sephadex G-50 gel filtration, SDS-PAGE를 행함으로써 수율 16.2%,

Table 4. Amino acid composition of purified bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. 1112-1

Amino acid	Residues per mol	Most probable residues per mol			
		Purified bacteriocin	Diplococcin*	Nisin*	Subtilin*
Aspartic acid	0.8	1	4	1	1
Threonine	0.4		2		
Serine	0.8	1	5	1	
Glutamic acid	0.9	1	6		3
Proline	0.7	1	3	1	1
Glycine	1.4	1	9	3	2
Alanine	0.8	1	4	2	1
Cysteine	0.2				
Valine	0.4		3	1	1
Methionine	0.8	1	1	2	
Isoleucine	0.6	1	1	3	1
Leucine	0.6	1	3	2	4
Tyrosine	0.2		1		
Phenylalanine	0.3		1		1
Histidine	12.7	13	1	2	
Lysine	2.8	3	3	3	3
Arginine	1.1	1	2		
Tryptophan			1		1
Ornithine			1		
Lanthionine			1	1	
β-Methyl lanthionine			4	4	
Dehydrobutyrine			1	1	
Dehydroalanine			2	2	
Σ residues		26	51	29	27
Mol. wt.		2,800	5,300	3,350	3,320

*Data from Davey (12)

정제도 123배의 단일물질을 얻었다. 이 물질은 열에 비교적 안정하여 100°C에서 60분간 열처리할 때 38%의 잔존활성을 유지하였으며 pH에 대한 안정성은 산성쪽에서 안정하였으며 알카리쪽에서는 비교적 불안정하여 pH 8.0에서 48시간 처리시 77%의 활성을 소실하였다. 이 물질은 26개의 아미노산 잔기를 이루고 있었다.

참고문헌

1. 박연희, 권정주, 조도현, 김수일: 한국농화학회지, **26**, 35 (1983)
2. 박연희, 류욱상, 조도현: 한국농화학회지, **31**, 33 (1988)
3. 정영건, 안장연, 권오진, 강주희: 한국산업미생물학회지, **17**, 94 (1989)
4. 유진영, 최신양, 진영옥, 구영조, 정건섭: 한국산업미생물학회지, **17**, 504 (1989)
5. 유진영, 이인선, 정건섭, 남영중: 한국산업미생물학회지, **19**, 8 (1991)
6. 유진영, 이인선, 정건섭, 최신양, 구영조: 한국산업미생물학회지, 투고중 (1991)
7. Tramer, J. and G.G. Fowler: *J. Sci. Food Agric.*, **15**, 522 (1964)
8. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
9. Laemmli, U.K.: *Nature(Lond.)*, **227**, 680 (1970)
10. Heukeshoven, J. and R. Dernick: *Electrophoresis*, **6**, 103 (1985)
11. Pulusani, S.R., D.R. Rao and G.R. Sunki: *J. Food Sci.*, **44**, 575 (1979)
12. Davey, G.P. and B.C. Richardson: *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 84 (1981)
13. Joerger, M.C. and T.R. Klaenhammer: *J. Bacteriol.*, **167**, 439 (1986)
14. Bhunia, A.K., M.C. Johnson and B. Ray: *J. Appl. Bacteriol.*, **65**, 261 (1988)
15. Galvez, A., M. Maqueda, E. Valdivia, A. Quesada and E. Montoya: *Can. J. Microbiol.*, **32**, 765 (1986)
16. Tagg, J.R., A.S. Dajani and L.W. Wannamaker: *Bacteriol. Rev.*, **40**, 722 (1976)
17. Reddy, G.V., K.M. Shahani, B.A. Friend and R.C. Chandra: *Cultured Dairy Products J.*, **18**, 15 (1983)

(Received April 10, 1991)