

Lactococcus sp. HY449가 생산하는 Bacteriocin의 정제

오세종 · 이상준¹ · 김경태 · 김상교* · 박연희² · 백영진

(주) 한국야쿠르트 중앙연구소, ¹청강문화산업대학 건강식품과학과, ²아주대학교 생물공학과

Purification and Partial Amino Acid Sequence of a Bacteriocin Produced by *Lactococcus* sp. HY 449. Oh, Sejong, Sang-Jun Lee¹, Gyung-Tae Kim, Sang-Kyo Kim*, Yun-Hee Park², and Young-Jin Baik. R & D Center, Korea Yakult Co. Ltd., ¹Dept. of Health Food Science, Chungkang College of Cultural Industries, ²Dept. of Biotechnology, A-Ju University - A bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY449, was purified by sequential purification steps such as *n*-propanol-acetone precipitation, ion-exchange chromatography using CM-Sepharose CL6B, gel filtration chromatography using Sephacryl HR100, and reverse-phase chromatography using Pro RPC HR 5/10. Reverse-phase chromatography, the final step of the purification, yielded a single symmetrical peak of bacteriocin activity. The purification resulted in a final yield of 3.25% and 413.5-fold increase of the specific activity of bacteriocin. The active fraction from reverse-phase chromatography was used for N-terminal amino acid analysis. The purified bacteriocin contained isoleucine, leucine, methionine, and glycine at but N-terminal end no aromatic amino acids. Calculation of the number of amino acid residues in the bacteriocin revealed that it is consisted of 32 residues, assuming the molecular weight of bacteriocin to be about 3.6 kDa. Edman degradation elucidated amino acid residues of the first four of the N-terminus to be NH₂-Ile-Leu-Pro-Gln.

Key words: Bacteriocin, *Lactococcus* sp. HY 449, purification, chromatography.

유산균이 생산하는 항균성 물질에는 젖산과 같은 유기산, 이산화탄소, diacetyl, hydrogen peroxide 그리고 bacteriocin을 들 수 있다. Tagg 등[21]과 Klaenhammer[9]는 bacteriocin을 생산균주와 근접한 species에 항균작용을 하는 단백질성 화합물로 정의하였으며 이는 유전학 및 생화학적 지식의 발전에 힘입어 bacteriocin의 특성이 명백히 설명된 것이었다. 그러나 몇몇 bacteriocin은 생산균과 좀 더 거리가 먼 박테리아종에게도 항균효과를 보여 이 정의에 적용되지 않는 예도 있는 것이 사실이다. 현재까지 다양한 원천에서부터 많은 수의 유산균 bacteriocin이 분리 동정되어 그 특성들이 규명되었고, 이중 일부는 실제적인 식품에서도 이용이 가능한 것으로 보고되었다[1,8,12,15].

Bacteriocin 중에서 가장 많이 연구되어온 nisin은 Class I에 속하며 *Lactococcus lactis*가 생산하는 대표적인 bacteriocin이다. Nisin은 34개의 amino acid로 이루어져 있으며 기존의 항생 peptide와 구별되는 lanthionine ring을 가지고 있고, 활성도에 있어서 다른 peptide에 비하여 약 1000배 정도의 강한 활성을 보인다. Nisin은 vancomycin 내성균주에 대한 대안으로 여겨지고 있는 유용한 bacteriocin이다[4]. 이러한 장점에도 불구하고 약산성, 혹은 중성의 pH에서 용해성이 낮고 phospholipid에 대한 흡착력이 있어 쉽게 불활

성화 된다는 것과, nisin에 저항성이 있는 미생물의 출현으로 그 응용 가능성이 제한되고 있는 실정이다. Nisin의 단점을 극복하기 위하여 *Pediococcus acidilactici*가 생산하는 pediocin PA-1, *Lactobacillus palnatrum*이 생산하는 plantaricin A등과 같은 class II bacteriocin들이 연구되어 왔다[3,15].

전보[6]에서 보고된 바와 같이 유제품에서 분리한 *Lactococcus* sp. HY 449를 M17-glucose broth에서 배양한 상등액은, 대수증식기와 정지기 사이의 *Lactobacillus fermentum* IFO 3023의 증식을 강하게 억제하였으며, 배양 상등액을 중화시킨 경우뿐만 아니라 catalase 및 열처리를 하였을 때에도 항균활성이 소실되지 않았다. 다만 protease에 의하여 활성이 소실되는 것으로 나타나 전형적인 bacteriocin의 특성을 나타내었다. *Lactococcus* sp. HY 449가 생산하는 bacteriocin의 항균 활성 범위를 조사하여 본 결과 그림양성균에 대하여 넓은 항균력을 나타냈으며, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescence*와 같은 일부 그람음성균에 대해서도 항균력을 나타내었다. 또 *Staphylococcus aureus*와 *Staphylococcus epidermidis* 및 *Listeria monocytogenes*와 같은 병원성 미생물에 대해서도 항균활성을 보여 매우 넓은 항균 범위를 나타내었다.

따라서 본 연구는 *Lactococcus* sp. HY 449가 생산하는 bacteriocin을 유기용매 침전, ion-exchange chromatography, gel-filtration chromatography 및 reverse-phase chromatography 등을 사용하여 순수하게 정제한 후 bacteriocin의 분자량 및 아미노산 조성 등을 조사하였다.

*Corresponding author
Tel. 031-286-9600, Fax. 031-286-9601
E-mail: skkim@institute.yakult.co.kr

재료 및 방법

Bacteriocin 생산 균주의 배양

Lactococcus sp. HY449를 M17-glucose 배지에서 16시간 간격으로 2회 계대 배양 후 사용하였다. 발효기는 Biostat ER 10(B. Brown, Germany)을 사용하였고 100 rpm으로 교반하면서 32°C에서 16시간까지 배양하여 정제용 시료로 사용하였으며, bacteriocin의 활성 평가는 전보[7]의 방법으로 다음과 실시하였다.

2배 희석(two-fold dilution)된 bacteriocin 시료액 100 ml에 지시균이 접종된(1×10^7 /ml) MRS broth 200 ml를 첨가하여 37°C에서 6시간 배양한 후 ELISA reader (Titertek multiskan, Labsystem, Finland)를 사용하여 620 nm에서 OD를 측정하였다. 이때 bacteriocin 대신 멸균 증류수를 사용한 것을 대조구로 하여 대조구의 50%에 해당하는 흡광도 값을 나타내는 희석배수에 200을 곱한 값을 bacteriocin unit(BU)로 표시 하였다.

n-Propanol 추출과 acetone 침전

Lactococcus sp. HY 449 배양액에 10% HCl 용액으로 pH를 2.0으로 조정된 후 4°C에서 하룻밤 정치하면서 세포 벽에 붙어 있는 bacteriocin을 분리시켰다. 이를 10,000×g에서 20분간 원심분리 (Sorvall RC-28S Superspeed Centrifuge, Dupont, USA)하여 얻은 상등액에 1 liter당 n-propanol 100 ml와 300 g의 NaCl를 첨가해 층 분리를 만든 후 상층의 bacteriocin 용액만 취하였다. 이 용액을 1,500×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액에 3 volume의 cold acetone을 가해 bacteriocin을 침전, 분리한 후 동결건조하여 다음 단계의 정제 시료로 사용하였다.

Ion-exchange chromatography

동결건조된 bacteriocin을 20 mM sodium citrate 완충액(pH 4.0)에 녹여 동일 완충액에서 하룻밤 투석 (MWCO 2,000, Spectra Por) 한 후 같은 완충액으로 평형화된 CM-Sepharose CL6B column(2.6×40cm)에 주입하였다. 용출은 1.0 M NaCl linear gradient 방법으로 동일 완충용액으로 하였으며, 유속은 24 ml/hr로 조절하였고 214 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 농도로 표시하였다.

Gel-filtration chromatography

Ion exchange chromatography에서 얻은 활성 분획을 20 mM sodium citrate 완충액에 투석(MWCO, 2,000)시켜 동결 건조한 bacteriocin을 동일 완충용액에 녹여 Sephacryl HR 100(Pharmacia, Sweden)을 충전한 column(2.6×100 cm)에 주입하였다. 150 mM NaCl를 함유한 pH 4.0의 sodium citrate 완충액을 사용하여 12 ml/hr 속도로 용출하였으며 214 nm에서 검출하였다.

Reverse-phase chromatography

Gel-filtration chromatography에서 얻은 활성 분획을 동결 건조하여 Pro RPC HR 5/10 (Pharmacia, Sweden) column에 주입하였다. 용출 용매 mobile phase는 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)를 함유한 HPLC급 H₂O이고 gradient buffer는 0.1% TFA를 함유한 acetonitrile을 사용하였다. 검출은 214 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Tricine-SDS 전기 영동

Schägger와 Jagow의 방법[19]으로 제조된 10-20% tricine-gradient gel(Novex, Invitrogen Corporation, CA, USA)을 이용하여 수행하였다. 전기영동은 125V(constant), 80 mA의 조건으로 60분간 실시하였다. 전기영동이 끝난 후에 gel을 질단하여 일부는 0.1% coomassie brilliant R250(Bio-Rad, CA, USA)에 의해 염색한 다음 methanol:acetic acid:water (3:1:6) 용액으로 탈색 하였다. 나머지 일부는 증류수로 3시간 투석시킨 후 지시균이 접종된 soft MRS agar를 중층하여 bacteriocin의 활성을 평가하였다.

아미노산 조성 및 아미노산 서열 분석

Reverse-phase chromatography를 이용해 분리 정제된 bacteriocin의 아미노산 조성은 PicoTag(TM) column(0.5×300 mm)을 사용하여 HPLC로 분석하였고 기기 사양과 분석조건은 Table 1과 같다. 정제된 시료 10 µg를 취하여 건조시킨 후 6N HCl를 가하여 110°C에서 24시간 동안 진공 상태에서 가수분해 시켰으며, tryptophan의 경우는 Swadesh 등[20]의 방법을 이용하였고, cysteine은 Matsubara와 Sasaki[11]의 방법에 따라 처리하였다. PITC(phenylisothiocyanate)와 반응시켜 유도체를 만든 다음 한외여과(0.22 µm)하여 column에 주입하였다.

아미노산 서열분석은 Edman 방법을 사용하여 단백질을 분해한 후 protein sequencer(Applied Biosystems Inc., CA, USA)로 분석하였다.

결 과

n-Propanol 추출과 acetone 침전

M17-glucose 배지에서 32°C, 16시간 발효기에서 배양한 다음 bacteriocin의 활성을 평가한 결과, 상등액의 역가는 8,742 BU(bacteriocin unit)/ml 이었고, Amicon YM 1(MWCO 1000, Spectrum, USA)으로 한외여과를 실시한 경우에는 15,000 BU/ml, Amicon PM 30(MWCO 30,000)의 경우는 12,000 BU/ml의 활성을 보였으며, 60% 포화 (NH₄)₂SO₄로 침전시켰을 때는 10,000 BU/ml의 활성을 보였다(data were not shown). 그러나 한외여과의 경우 시간이 많이 소요될 뿐만 아니라 모든 큰 분자들이 retentate에 잔류되어 농축의 의미밖에 없었다. 또 acetone을 이용한 침전물에서는 활성

Table 1. Conditions of HPLC for the analysis of amino acid composition

Column	: PicoTag(TM), 0.5 × 300 mm
Oven temp.	: 46°C
Detector	: 254 nm in PDA
Solvent	: A: 4mM Na-acetate/0.1% TFA/6% CH ₃ CN, pH 5.0 B: 60% CH ₃ CN
Elution	: linear gradient of solvent B(0-100%)
Flow rate	: 1.0 ml/min
Injection vol.	: sample-20 µl/standard-4 µl

이 대부분 나타나지 않았으므로 *n*-propanol을 이용한 방법을 사용하기로 하였다.

n-Propanol로 추출한 후 acetone 침전을 하였을 때 bacteriocin의 총 역가는 11,292,114 BU로 나타났으며 비활성은 13.4배 증가하였다. Cold acetone을 처리하여 원심분리하였을 때 배양액 단백질의 95%가 이행한 상등액에는 bacteriocin의 활성이 없었고, 5%가 이행한 침전물에 71.8%의 활성이 유지되었다(Table 2).

Ion-exchange chromatography

Bacteriocin의 pH 안정성을 고려하고 예비적으로 흡착실험을 한 결과 용출 완충용액은 pH 4.0 sodium citrate buffer, 충전제는 양이온 교환수지인 CM-Sephacryl CL6B가 선택되었다. Acetone 침전물을 용출 완충용액에 녹여 CM-Sephacryl CL6B에 흡착시킨 후 1M NaCl로 용출시켰을 때의 크로마토그램은 Fig. 1과 같다. 흡착되지 않은 단백질을 같은 buffer로 충분히 씻어 내린 후 1M NaCl로 농도 구배를 주면서 용출액의 OD_{214nm}를 측정하였을 때 I 과 II, 2개의 peak가 나타났으며, 각 분획마다 spot-on-the-lawn assay[1]를 하여 peak II가 활성을 나타내는 peak임을 알 수 있었다. 최대 활성을 나타내는 분획은 65번 fraction이며 활성은 622 BU/ml 이었고 0.4~0.45 M NaCl 농도에서 용출되었다. 비활성은 70.7배 증가하였고 회수율은 35.3%였다.

Gel-filtration chromatography

Ion-exchange chromatography에서 얻은 fraction no. 62

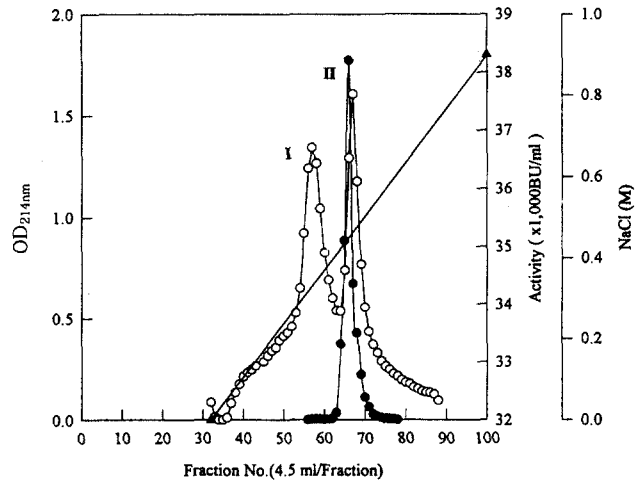


Fig. 1. Elution profile of crude bacteriocin on CM sephacryl CL6B column chromatography.

○—, O.D_{214nm}, —▲—, NaCl gradient; —●—, Bacteriocin activity.

-70의 활성 분획을 증류수에 하룻동안 투석(MWCO 1,000)한 후 동결 건조한 시료로부터, bacteriocin 이외의 단백질을 제거하기 위해 Sephacryl HR 100이 충전된 low pressure gel filtration을 한 결과는 Fig. 2와 같다. A와 B의 2개의 peak로 분리되었는데 peak A 부분이 bacteriocin 활성을 나타내었다. 이 단계로 정제도는 112배로 증가하였지만 활성 회수율은 7.3%로 급격하게 떨어져 낮은 정제효율을 나타냈었다.

Reverse-phase chromatography

Gel-filtration column을 거친 활성 분획을 동결건조한 후 0.1% TFA H₂O에 녹여 ProRPC 5/10 column에 주입 후, 100% acetonitrile을 사용하여 농도 구배를 주면서 용출시킨 결과는 Fig. 3과 같다. 중간에 폭넓게 나타나는 peak는 활성이 없는 물질이었고 35% acetonitrile에서 나타나는 peak가 bacteriocin 분획임을 확인할 수 있었으며 이들의 비율은 77:23으로 나타났다. 최종적으로 정제된 bacteriocin을 냉동건조시킨 후 냉동 보관하면서 전기영동과 아미노산 분석 및 아미노산 서열분석 시료로 사용하였다.

이상의 정제과정으로 3.25%의 회수율을 얻었으며, 비활성 413.5 배인 25,600,000 B.U/mg의 순수한 bacteriocin

Table 2. Purification of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY 449

Sample	Total protein (mg)	Total activity (BU)	Specific activity (BU/mg)	Yield (%)	Fold recovery
Culture supernatant	254.26	15,735,600	61,912	100.0	1.0
<i>n</i> -Propanol precipitate	13.56	11,292,114	832,753	71.8	13.4
Ion exchange column extract	1.27	5,560,627	4,378,446	35.3	70.7
Gel filtrated extract	0.17	1,152,000	6,939,759	7.3	112.0
RP-C ₁₈ extract	0.02	512,000	25,600,000	3.3	413.5

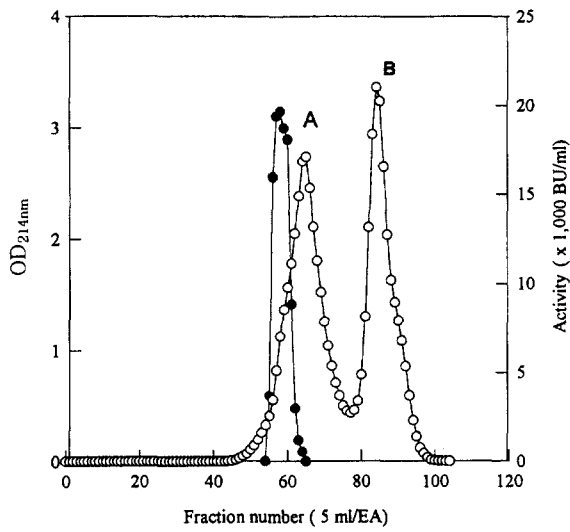


Fig. 2. Elution profile of partially purified bacteriocin on Sephacryl HR 100 column chromatography. -○-, O.D_{214nm}; -●-, Bacteriocin activity.

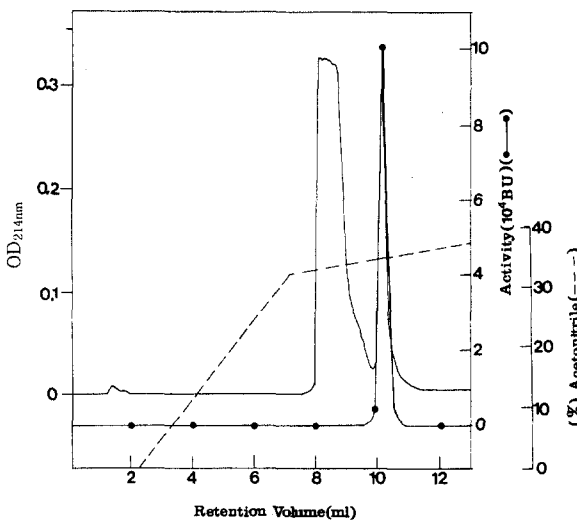


Fig. 3. Elution of semi-purified bacteriocin from a Pro RPC 5/10 reversephase column.

을 얻을 수 있었다(Table 2).

Reverse-phase chromatography에서 정제된 bacteriocin을 pH 7.0 phosphate 완충용액에 녹여 analytical HPLC chromatography를 수행한 결과 단 한개의 peak가 검출되어 정제가 잘 되었음을 알 수 있었다(Fig. 4).

Tricine-SDS 전기영동

Reverse-phase chromatography까지의 정제과정을 통한 bacteriocin의 정제 정도를 알아 보기 위하여 전기영동을 실시하였다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이 정제된 bacteriocin은 단일 밴드를 나타내어 순수한 형태로 정제되었음을 알 수

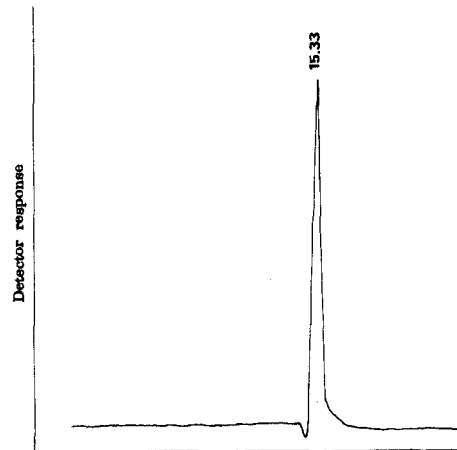


Fig. 4. Reverse-phase chromatography of purified bacteriocin using Protein-Pak 125 column. Elution with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 0.7 ml/min.

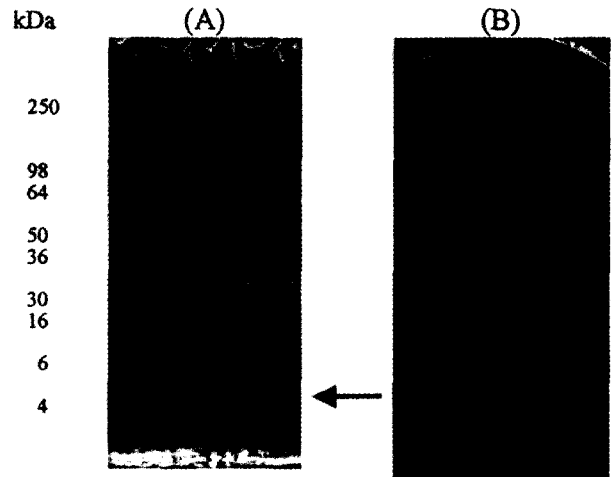


Fig. 5. Tricine-SDS-PAGE and detection of antimicrobial activity of the purified *Lactococcus* sp. HY 449 bacteriocin. (A) Gel stained with Coomassie blue stain. Lane 1, low molecular mass protein standards (Novex, USA); lane 2, purified bacteriocin. (B) Gel overlaid with cells of *Lactobacillus fermentum* IFO 3023 inoculated in MRS soft agar.

있었다. 분자량 표준시료와 비교한 결과 약 4 kDa 이하의 분자량을 가지는 것으로 추정할 수 있었다. 또한 전기영동한 gel 위에 지시균을 접종한 soft agar를 중층하여 bacteriocin의 활성을 조사한 결과 위의 band와 일치하는 곳에 강한 억제환이 생겨 bacteriocin임을 확인할 수 있었다.

아미노산 조성 및 서열분석

Table 3은 정제된 bacteriocin의 아미노산 분석 크로마토그램과 조성을 나타낸 것이다. isoleucine, leucine, methionine, glycine, lysine 등이 다른 아미노산에 비하여 많았다. Ile, Gly, Met, Leu, Lys 등의 아미노산이 많이

Table 3. Amino acid composition of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY 449

Amino acid	Result (pmol)	Mol %	Residue
CYA*	33.49	2.90	1.0 (1)
ASX**	57.25	4.96	1.73 (2)
GLX**	54.17	4.70	1.6 (2)
SER	62.40	5.41	1.9 (2)
GLY	147.08	12.75	4.4 (4)
HIS	57.87	5.02	1.74 (2)
ARG	15.02	1.30	0.4 (0)
THR	15.51	1.34	0.4 (0)
ALA	65.75	7.44	2.0 (2)
PRO	62.51	5.42	1.9 (2)
TYR	5.05	0.44	0.15 (0)
VAL	53.38	4.63	1.6 (2.0)
MET	124.80	10.82	3.7 (4)
ILE	154.24	13.57	4.6 (5)
LEU	106.00	9.19	3.2 (3)
PHE	11.77	1.02	0.4 (0)
TRP	3.35	0.29	0.1 (0)
LYS	103.63	8.99	3.1 (3)

*CYA means the sum of cysteic acid & oxidized cystine.

**ASX, GLX mean the sum of Asparagine & Aspartic acid and Glutamine & Glutamic acid, respectively Each number is expressed as pmol per 20 μ l injection vol.

있고 대부분이 소수성 아미노산인 것도 이 bacteriocin의 작용특성과 연관지어 생각하여 볼 필요가 있을 것으로 생각되었다. N-말단 아미노산 서열은 최초의 4개 아미노산만 판독되었으며 5번째부터는 blocking되어 분석하지 못하였다. 최초 4개의 아미노산 서열은 NH₂-Ile-Leu-Pro-Gln로 나타났다.

고 찰

Bacteriocin의 정제단계는 우선 배양액의 균체를 제거하기 위하여 주로 원심분리를 사용하며, 생산 균체의 세포벽에 흡착되어 있는 bacteriocin을 유리시키기 위하여 pH를 조정하고 열처리를 하는 등의 전처리를 하는 경우도 있다. 1차 정제과정으로는 원심분리 상등액(cell-free supernatant, CFS)에 (NH₄)₂SO₄를 첨가하여 salting-out 시키는 방법과 methanol, propanol, acetone 등의 유기용매를 처리하는 방법이 주로 사용되고 있으며, 요즘에는 다양한 크기의 membrane을 이용하여 한외여과를 실시하기도 한다[5]. 또한 CFS의 pH를 조정하여 생산균주의 세포벽에 역으로 흡착시킨 후 다시 조건을 변화시켜 유리시키는 방법[22]도 있는데, 이 방법은 특이성이 강해 한번에 아주 순수한 bacteriocin을 얻을 수 있는 방법이다. 이후는 bacteriocin의 종류와 특성에 따라 ion-exchange, gel-filtration 및 reverse-phase column 등을 사용하여 순수하게 정제할 수 있다.

Choi 등[2]은 methanol과 acetone 등의 유기용매로 bacteriocin을 추출하여 52.3%의 회수율을 얻었으며, Pulusani 등[18]도 50%의 회수율을 얻었다고 보고한 바 있다. Ammonium sulfate로 침전시킨 경우 상등액 위에 부유하는 부분에 많은 양의 bacteriocin이 포함되어 유실될 수 있는데, Muriana와 Klaenhammer[14]도 이와 같은 현상을 관찰하고 원심분리 후 상등액의 부유물질로부터 bacteriocin을 회수하였다고 보고하였다.

본 실험에서 ion-exchange column을 사용하여 정제한 결과 회수율은 35.5%로 나타났는데, 이러한 결과는 *Lactococcus* sp. 1112-1의 bacteriocin을 CM-sephadex C-25를 사용하여 얻은 23% 보다도 높게 나타났고[2], Lyon과 Glatz[10]가 propionicin PLG-1 정제시 보였던 12% 보다도 훨씬 높은 회수율을 보였다.

Piard 등[17]도 lacticin 481 정제과정에서 lipophilic 담체인 LH60 (LKB-Pharmacia)을 사용하여 gel-filtration을 실시하였을 때 3.2%의 활성만이 회수되는 문제를 경험하였다. 이들은 이러한 문제가 lipophilic 담체와 bacteriocin 사이의 hydrophobic interaction 때문일 것으로 추측하여, 이를 해결할 목적으로 이동상으로서 0.1% TFA에 2-propanol의 농도를 다양하게 하여 수행하였으나 회수율을 증진시키지 못하였다. 이 결과로부터 bacteriocin의 낮은 회수율의 원인이 담체와 bacteriocin 간의 hydrophobic interaction의 결과는 아닐 것으로 보고한 바 있다.

Muriana와 Klaenhammer[14]는 (NH₄)₂SO₄ 침전, gel filtration, HPLC 정제과정을 통하여 lacticin F의 비활성을 474 배로 증가시켰으며, Mørtvedt 등[13]은 *L. sake* L 45가 생산하는 bacteriocin인 lacticin S를 ion-exchange, hydrophobic interaction, reverse-phase 및 gel-filtration column으로 정제한 결과, 비활성이 약 40,000배로 매우 높은 정제 효율을 보고하였다. Piard 등[17]도 lacticin 481을 ammonium sulfate 침전과 gel-filtration, preparative 및 analytical reverse-phase HPLC의 순으로 정제하였으며, ammonium sulfate 침전으로 455배, 전체 정제과정을 통해 비활성을 107,506배로 증가시킬 수 있었다고 보고하였다.

본 실험에서 전기영동을 수행한 결과 단일밴드를 확인할 수 있었고, 동일한 위치에서 항균활성이 나타난 것으로 보아 본 bacteriocin은 한 개의 peptide 또는 protein으로 구성되어 있을 것으로 생각되었다. 그러나 lacticin 481의 경우 SDS-PAGE로 전개시켰을 때 1.7 kDa의 위치에 lacticin 활성을 가지는 단일 밴드를 얻을 수 있었으며, 3.4 kDa의 dimer도 활성을 나타냈다고 하였다. 또한 Joerger와 Klaenhammer[5]는 *Lactobacillus helveticus* 481이 생산하는 helveticin J의 정제 방법과 특성에 관하여 연구하고, 배양 상등액에 대해 한외여과 처리를 하여 본 결과 이 bacteriocin은 분자량이 300,000이상인 aggregate 형태로 존재하였으나, Sephadex chromatography로 정제한 bacteriocin

을 SDS-PAGE 한 결과 분자량이 37,000으로 나타났으며 이 부분이 bacteriocin의 활성도 가지고 있었다고 하였다. 이러한 현상은 bacteriocin의 conformation 및 작용 특성과 관련이 있는 것으로 생각된다고 보고하였다.

Bacteriocin의 정제는 많은 시행착오를 거치면서 정립되어 왔는데, Oh 등[15,16]은 class II에 속하는 bacteriocin을 hydrophobic interaction column을 사용하여 손쉽게 분리할 수 있었다. 결국 bacteriocin의 종류와 특성에 따라 다양한 정제방법이 사용되어야 하며, 정제를 위한 목적도 명확히 해야만 보다 올바른 정제방법을 정립할 수 있을 것이다.

본 bacteriocin은 전기영동의 상대 이동도를 통하여 계산한 결과 분자량 약 4 kDa 이하의 작은 peptide로 추정되었다. 아미노산 조성을 분석해본 결과 Ile, Leu, Met, Gly, Lys 등이 다른 아미노산에 비하여 많은 나타났으며, 이들의 대부분이 소수성 아미노산인 것도 bacteriocin의 작용특성과 연관이 있어 생각하여 볼 필요가 있을 것이다. 아미노산 조성을 근거로 하여 분자량을 추정해본 결과, 본 bacteriocin은 32개의 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량은 3.6 kDa로 계산되었다. 또한 N-말단 아미노산 서열의 결과 4개의 아미노산만 판독되었는데 이는 NH₂-Ile-Leu-Pro-Gln 인 것으로 확인되어 nisin은 아닌 것으로 확인되었다.

따라서 *Lactococcus* sp. HY 449가 생산하는 bacteriocin은 신규 bacteriocin으로 생각되어, 본 연구자들은 락토바이오신(lactobiocin)으로 명명하였고, 현재 이에 대한 응용 연구가 진행중에 있다.

요 약

Lactococcus sp. HY 449균주를 M17-glucose broth에 배양하여 배양 상등액으로부터 propanol-actone 침전, ion-exchange chromatography, gel-filtration chromatography 및 reverse-phase chromatography 등을 통하여 비활성 25,600,000 BU/mg인 순수한 bacteriocin을 정제하였다.

정제 과정 중에서 ion-exchange chromatography 단계에서는 35.3%의 회수율을 나타내었으나, gel-filtration chromatography 단계에서는 회수율이 7.3%로 감소하였다. Reverse-phase chromatography에서는 3.3%의 회수율을 보였고 활성도는 413.5배로 증가하였다. Tricine-SDS 전기영동 결과 bacteriocin은 단일밴드로 나타났으며, N-말단 아미노산 서열 분석을 수행 한 결과 NH₂-Ile-Leu-Pro-Gln로 확인되었다. 아미노산조성 분석결과를 바탕으로 분자량을 예측한 결과, 본 bacteriocin은 32개의 아미노산으로 이루어져 있으며 분자량은 3.6 kDa인 것으로 추정되었다.

REFERENCES

1. Ahn, C. and M. E. Stiles. 1990. Antibacterial activity of lactic

- acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. *J. Appl. Bacteriol.* **69**: 302-310.
2. 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. Microbial. Biotechnol.* **19**: 209-214.
3. Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* **43**: 164-167.
4. Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* **44**: 100-117.
5. Joerger, M. C. and T. R. Klaenhammer. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* **167**: 439-446.
6. Kim, S. K., S. J. Lee, Y. J. Baek, and Y. H. Park. 1994. Isolation of bacteriocin-producing *Lactococcus* sp. HY 449 and its antimicrobial characteristics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 259-265.
7. Kim, S. K., S. J. Oh, S. J. Lee, Y. J. Baek, and Y. H. Park. 1994. Optimizing conditions for the growth and bacteriocin production of *Lactococcus* sp. HY 449 using response surface methodology. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 522-530.
8. Kim, W. J. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria: Their potentials as food biopreservative. *Food Rev. Intl.* **9**: 299-313.
9. Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 9-86.
10. Lyon, W. J. and B. A. Glatz. 1993. Isolation and purification of propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by a strain of *Propionibacterium thoenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 83-88.
11. Matsubara, H. and R. M. Sasaki. 1969. High recovery of tryptophan from acid hydrolysates of proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **35**: 175-181.
12. Montville, T. J. and A. L. Kaiser. 1993. Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity, and relationship to bacteriocins, p. 1-22. In D. G. Hoover and L. R. Steenson (ed.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Academic Press, New York.
13. Mørtvedt, C. I., J. Missen-Meyer, K. Sletten, and I. F. Nes. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1829-1835.
14. Muriana, P. M. and T. R. Klaenhammer. 1991. Purification and partial characterization of Lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 114-121.
15. Oh, S. 2001. Characteristics of class II bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J. Kor. Dairy Technol. & Sci.* vol 19 (in printing).
16. Oh, S., S. Kim, and R. W. Worobo. 2000. Characterization and purification of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 30SC: Human isolate for potential use as a pro-

- biotic strains. *J. Dairy Sci.* **83**: 2747–2752.
17. Piard, J. C., P. M. Muriana, M. J. Desmazeaud, and T. R. Klaenhammer. 1992. Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 279–284
 18. Pulusani, S. R., K. R. Rao, and G. R. Sunki. 1979. Antimicrobial activity of lactic cultures: partial purification and characterization of antimicrobial compound(s) produced by *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sci.* **44**: 575–578.
 19. Schägger, H. and G. V. Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368–379.
 20. Swadesh, J. K., T. W. Thannhauser, and H.A. Scheraga. 1984. Sodium sulfate as an antioxidant in the acid hydrolysis of bovine pancreatic ribonuclease A. *Anal. Biochem.* **141**: 397–401.
 21. Tagg, J. R., A. S. Dajani, and L. W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**: 722–756.
 22. Yang, R., M.C. Johnson, and B. Rayvel. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocin from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3355–3359.

(Received Jun. 25, 2001/Accepted Sep. 5, 2001)