

## Purification and Characterization of the Bacteriocin Produced by *Lactococcus* sp. KD 28 Isolated from Kimchi

Ji-Young Lee<sup>2</sup>, Nack-Shick Choi<sup>1</sup>, Sung-Sik Chun<sup>3</sup>, Ja-Young Moon<sup>1</sup> and Dae-Ook Kang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Health Science, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea

<sup>2</sup>Interdisciplinary Program in Biotechnology, Graduate School, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea

<sup>3</sup>Department of Medical Food, International University of Korea, Jinju 660-759, Korea

Received December 23, 2014 / Revised February 25, 2015 / Accepted February 25, 2015

The bacterial strain isolated from Kimchi showed antibacterial activity against *Micrococcus luteus* IAM 1056. The selected strain was identified as *Lactococcus lactis* by 16S rRNA nucleotide sequence analysis and named as *Lactococcus* sp. KD 28. The treatment of culture supernatant with proteinase K removed antibacterial activity, indicating its proteinaceous nature, a bacteriocin. This bacteriocin was sensitive to hydrolytic enzymes such as  $\alpha$ -chymotrypsin, trypsin, proteinase K, lipase,  $\alpha$ -amylase and subtilisin A. The bacteriocin was highly thermostable and resistant to heating at 80°C for up to an hour but 50 % of the total activity was remained at 100°C for 30 min. The pH range from 2.0 to 8.0 had no effect on bacteriocin activity and it was not affected by solvents such as acetonitrile, isopropanol, methanol, chloroform and acetone up to 50% concentration. The bacteriocin showed antibacterial activity against *M. luteus* IAM 1056, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* KCTC 1058, *Enterococcus faecium* KCTC 3095, *Bacillus cereus* KCTC 1013, *B. subtilis* KCTC 1023, *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* KCTC 3444, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* KCTC 1916, *B. megaterium* KCTC 1098 and *B. sphaericus* KCTC 1184. The bacteriocin was purified through ammonium sulfate concentration, SP-Sepharose chromatography and RP-HPLC. The molecular weight was estimated to be about 3.4 kDa by tricine-SDS-PAGE analysis.

**Key words** : Bacteriocin, HPLC, *Lactococcus* sp., purification, well diffusion method

### 서 론

박테리옌신은 미생물에 대한 경쟁적인 생육 저해제로서 펩타이드 또는 단백질로 구성된 항균성 물질로 치즈 및 유제품 특히 발효 식품 등에서 분리한 다양한 미생물로부터 생산된다 [2, 4, 34]. 특히 유산균(lactic acid bacteria)은 식품의 발효에 중요한 역할을 하며 다양한 항균물질을 생산하는 것으로 알려져 있다[15, 21, 25]. 유산균이 생산하는 박테리옌신은 세포표면의 특정 혹은 비 특정 수용체에 부착하여 항균작용을 나타내며 표적세포의 세포막 투과성을 변화시켜 막 수송을 방해하거나 proton motive force에 영향을 줌으로써 에너지 생산과 단백질이나 핵산의 합성을 저해하는 것으로 알려져 있다[1, 16, 17, 19]. 유산균은 김치 발효에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 다양한 항균물질을 생산하는 것으로 알려져 있고 다양한 발효식품을 안정시키기 위한 중요한 후보로 대두되고 있다[5,

13]. 박테리옌신은 균체 표면에 있는 특이적인 수용체에 흡착 후 세포막의 수송단백질과 결합하여 세포의 DNA나 리보솜을 파괴하여 세포를 사멸시키거나 박테리옌신 분자가 trans-membrane helix를 형성한 뒤 세포막의 수송단백질과 결합한 후에 단백질 분자의 기질 특이성을 파괴하고 세포 내 성분을 유출시켜서 세포의 에너지 대사와 생리적 기능을 상실시키는 것으로 알려져 있다[2, 33, 34].

박테리옌신은 항생제와 달리 단백질로 구성되어 인체에 들어오게 되면 소화 기관 내에서 단백질 가수분해효소에 의해 쉽게 분해되어 인체에 무독성이고 잔류성이 없다[17]. 또한 항생제는 2차 대사산물인데 비해 박테리옌신은 자기 자신의 유전자로부터 생합성 되어 분자생물학적으로 다양한 응용이 가능하며 또한 다양한 식품 내 존재하는 포자형성균, 병원성 및 부패 균의 성장을 억제함으로써 천연 식품보존제 개발에 관련된 연구들이 증가되고 있는 추세이다[10, 16, 26, 34, 35].

*L. lactis*가 생산하는 nisin은 34개의 아미노산으로 이루어져 있으며 기존의 펩타이드와 구별되는 lanthionine 고리구조를 가지며 다른 펩타이드에 비해 1,000배 이상의 강한 활성을 보이며 vancomycin 내성 균주 대체에 대한 대안으로 알려져 있는 대표적인 박테리옌신이다[3, 8, 9, 18, 30]. Nisin은 여러 나라에서 많이 사용하고 있는데 이는 1995년 WHO에 식품보존제로 승인된 이후로 치즈산업이나 통조림산업에서 식품보존

#### \*Corresponding author

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

E-mail : dokang@changwon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

제로 사용하고 있으나 그람 양성균에는 항균활성이 있는데 비해 음성균에 대해서 제한적인 항균활성을 나타내고, pH에 의존적이며 phospholipid에 대한 흡착력이 있어 쉽게 활성이 떨어지는 단점이 있다[6, 13, 31]. 김치는 살균처리 없이 저온에서 유통되어 *L. monocytogenes*에 감염될 위험이 있으며, 이 외에도 유통되는 과정에서 환경적인 요인으로 인하여 유해 미생물에 의한 오염, 과도한 발효로 인한 산패 균의 생육으로 인해 품질이 저하뿐만 아니라 상업용 김치에 대한 수요가 증가하면서 천연 식품 첨가물에 대한 소비자들의 선호도가 증가되었다[10, 15, 34].

따라서 본 연구에서는 김치 내에서 미생물의 생육을 조절하고 김치의 저장성과 안전성을 향상시키고자 김치로부터 박테리옌을 생산하는 유산균을 분리하고 황산암모늄 침전법, 이온교환 크로마토그래피, SDS-PAGE를 이용하여 정제한 후 박테리옌의 분자량 및 그 특성을 확인하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 미생물의 분리

전통발효식품에서 박테리옌을 생산하는 유산균을 분리하고 박테리옌을 정제하고 특성을 조사하기 위해 일차적으로 창원시 가정집에서 배추김치를 수집하였다. 김치국물을 멸균된 생리식염수에 10<sup>-1</sup>~10<sup>-5</sup> 희석하여 *Lactobacilli* De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) 고체 배지에 도말한 후 37°C에서 배양하고 나타난 집락의 형태학적 특성에 근거하여 분리주를 선정하였다. 선정된 균주를 4 ml의 MRS 액체배지 37°C에서 하룻밤 배양하고 원심분리한 후 상등액을 회수하여 항균활성 확인에 사용하였다[14, 20].

#### 항균활성의 검증

배양 상등액의 항균활성을 검증을 위해서 well diffusion method [30]를 사용하였다. 지시균(indicator)인 *M. luteus* IAM 1056 배양액을 1% 농도로 접종하고 0.1 M potassium phosphate (pH 7.0) 완충액을 함유한 enriched nutrient broth (ENB, 1.25% brain heart infusion, 0.55% nutrient broth, 0.25% yeast extract) soft agar (0.8% agar) 10 ml를 ENB 고체 배지에 증충하여 test plate를 제조하였다[8, 13, 28]. 분리주의 배양 상등액을 50 µl 씩 well에 넣고 무균대에서 30분간 건조한 후 30°C에서 18시간 배양하여 well 주위에 생육 저해환의 유무를 관찰하였다[32]. 단백질성 항균물질인 박테리옌을 탐색하기 위한 일환으로 배양 상등액을 proteinase K를 처리할 경우 항균활성이 사라지는 시료를 2차 선정하였다. 박테리옌 역가는 arbitrary unit (AU)로 표기하였고 상등액을 2배씩 희석하여 저해환을 형성하는 최대 희석배수의 역수를 취한 값을 AU로 정의하였고 시료 1 ml에 대해서 환산해 주는 환산 계수를 곱하여 AU/ml로 나타내었다[11].

#### 선정균의 동정

분리주의 분자계통학적 동정을 위해 primer로 27F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG)와 1492R (GGT TAC CTT GTT ACG ACT T)를 사용하였고, PCR 조건은 95°C에서 15분 처리 후, 95°C에서 20초, 50°C에서 40초, 72°C에서 90초로 구성된 PCR cycle을 30회 반복하고, 72°C에서 5분간 반응시켰다. 증폭된 PCR 산물은 Wizard SV Gel and clean-up system (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과는 GenBank의 ribosomal DNA sequence Date base와 비교하였으며, 염기서열의 상동성은 Clustal X 2.0 software, DNADIST 프로그램 및 MEGA 5.0 프로그램을 이용하여 phylogenetic tree analysis를 수행하여 확인하였다[2, 14].

#### 항균 스펙트럼

박테리옌의 항균 스펙트럼은 well diffusion method [21]를 사용하여 조사하였다. *M. luteus* IAM 1056, *B. megaterium* KCTC 1098, *B. subtilis* KCTC 1023, *B. cereus* KCTC 1013, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* KCTC 3444, *X. citri* KCTC 2499 등(Table 1)을 시험균주로 사용하여 저해환의 지름을 측정하였다[20].

#### 분리주의 배양학적 특성

분리주 *L. sp.* KD28을 100 ml MRS 액체배지에서 25°C, 30°C 및 37°C, 200 rpm에서 48시간 배양하면서 6시간 마다 배양액을 회수하여 600 nm에서 흡광도를 재어 세포생장을 측정하였다. 나머지 배양액을 원심분리하여 얻은 배양 상등액의 *M. luteus* IAM 1056에 대한 항균활성을 well diffusion method으로 측정하였다[11].

#### 박테리옌의 특성조사

##### 열안정성

박테리옌의 열안정성을 조사하기 위하여 배양 상등액을

Table 1. Antibacterial spectrum of bacteriocin produced by *L. sp.* KD 28

| Test microorganisms   | Activity (mm) |
|---|---------------|
| <i>Micrococcus luteus</i> IAM 1056                              | 23            |
| <i>Xanthomonas citri</i> KCTC 2499                              | -             |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> KCTC 1058 | 11            |
| <i>Enterococcus faecium</i> KCTC 3095                           | 15            |
| <i>Salmonella typhimurium</i> KCTC 1926                         | -             |
| <i>Escherichia coli</i> KCTC 1041                               | -             |
| <i>Bacillus cereus</i> KCTC 1013                                | 10            |
| <i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1023                              | 8             |
| <i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> KCTC 3444       | 13            |
| <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> KCTC 1916     | 16            |
| <i>Bacillus megaterium</i> KCTC 1098                            | 17            |
| <i>Bacillus sphaericus</i> KCTC 1184                            | 13            |

\*The diameter of well is 6 mm.

20°C, 40°C, 60°C, 80°C 및 100°C에서 1시간 배양하면서 10분 간격으로 잔존하는 박테리오신의 항균활성을 측정하였다[20].

### pH 내성

pH에 대한 박테리오신의 안정성을 조사하기 위하여 pH 2.0 (0.1 M citrate buffer), pH 4.0 (0.1 M acetate buffer), pH 6.0 (0.1 M phosphate buffer), pH 8.0 (0.1 M tris buffer), pH 10.0 (0.1 M carbonate buffer) 및 pH 12.0 (0.1 M phosphate buffer) 의 완충용액과 배양 상등액을 부피비 1:1로 혼합하고 상온에서 24시간 반응시킨 후 잔존하는 박테리오신의 항균활성을 측정하였다.

### 유기용매 내성

Chloroform, isopropanol, methanol, ethanol, acetone 및 acetonitrile 등을 분리주, *L. sp.* KD 28의 배양 상등액과 부피 1:1의 비율로 혼합하여 용매의 최종 농도를 50%로 맞추었다. 상온에서 24시간 배양한 후, 유기용매에 대한 잔존하는 박테리오신의 항균 활성을 측정하였다[20].

### 가수분해효소에 대한 내성

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사의 lipase (4,307 U/mg)와 trypsin (13,500U/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 2.0),  $\alpha$ -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 등의 반응액에서 각 효소의 최종 2 mg/ml 되게 첨가하고 37°C에서 4시간 그리고 proteinase K는 45°C에서 12시간 반응시켰다. 남아있는 박테리오신 활성은 *M. luteus* IAM 1056에 대한 저해환의 크기를 측정하였다. 또한 음성대조구로는 동일한 조건하에서 시료대신 멸균수를 첨가한 것을 사용하였다[12, 20].

### 황산암모늄 침전법에 의한 농축

*L. sp.* KD 28균주의 배양 상등액 500 ml을 65%의 황산암모늄으로 포화시킨 후 4°C에서 3시간 교반한 후 원심분리(15,000 rpm, 25 min, 4°C)하였다. 침전물을 회수하여 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) 40 ml에 녹이고, MWCO가 1,000인 투석막(Spectrum Laboratories, Houston, TX, USA)을 사용하여 하룻밤 투석한 후 항균활성을 측정하였다[14, 20].

### 양이온교환크로마토그래피 및 역상 HPLC를 이용한 정제

황산암모늄 침전법으로 농축한 시료를 하룻밤 동안 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)로 평형화시킨 양이온 교환수지 SP-Sepharose column에 주입하고 동일한 완충액으로 세척하였다. 0~1.0 M NaCl gradient를 걸어주어 이온교환체에 결합한 단백질을 용출하면서 분획을 2 ml씩 받고 이를 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지시균인 *M. luteus* IAM 1056

에 항균활성이 있는 분획을 합치고 증류수에서 투석을 한 다음 동결건조로 농축하였다.

동결 건조한 분리주를 0.45  $\mu$ m 여과지를 통해 여과한 후 buffer A (0.1% TFA in HPLC grade water) 용액으로 평형화시킨 C18 column (Agilent Eclipse XDB-C18)을 사용하여 분리하였다. 시료 주입 후 10분간 100% buffer A로 세척한 후 50분간 buffer B (100% acetonitrile/0.1% TFA)를 0~100% 농도구배를 걸어주고 그 다음 10분간은 100% buffer B로 세척하였다. 1.0 ml/min의 유속으로 흘러주었고 각 peak 별로 회수한 1 ml 분획의 박테리오신 활성을 조사하여 활성이 있는 분획을 합치고 농축한 후 1차 HPLC와 같은 조건으로 2차 HPLC를 실시하여 박테리오신을 정제하였다.

### Tricine SDS-PAGE 전기영동

정제한 박테리오신의 순도와 분자량을 추정하기 위해 Schagger와 Von Jagow [26, 27]의 방법으로 tricine SDS-PAGE를 실시하였다. 정제한 시료를 tricine sample buffer와 1:1의 부피비로 혼합하여 80°C에서 3분간 가열하였다. 16.5% polyacrylamide gel에서 100 V에서 2시간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 종료된 후 유리판으로부터 gel을 분리하여 하나는 polypeptide fixative solution (40% methanol, 10% acetic acid)에 30분간 담근 후 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 24시간 탈색하였다. 나머지 gel은 3차 증류수를 30분마다 교체하면서 5회 세척하였다. 세척한 gel을 petri dish에 넣고 UV를 10분간 조사시킨 후 1% *M. luteus* IAM 1056가 접종된 ENB soft agar를 증충 하여 30°C에서 18시간 배양하여 항균활성을 확인하였다 [24].

## 결과 및 고찰

### 미생물의 분리 및 항균활성 검증

MRS 고체배지에 생성된 형태학적인 특징에 따라 16주를 분리하여 4 ml의 MRS 액체배지에서 37°C에서 하룻밤 배양하여 회수한 배양 상등액을 well diffusion method [29]으로 항균활성을 나타내는 시료를 일차적으로 선별하였다. 이 중에서 상대적인 항균 범위가 넓고 가수분해 효소인 proteinase K를 처리했을 때 항균 활성이 상실되는 단백질성 항균물질이 생산하는 분리주를 최종적으로 선별하였다. 선정한 분리주의 주사전자현미경 사진을 Fig. 1에 나타내었으며 이 균주는 전형적인 구균임을 알 수 있었다.

### 선정균의 동정

선정균의 16S rRNA 염기서열을 분석하고 Blast search로 검색한 결과 *L. lactis* 종과 99%의 상동성을 보여 *L. sp.* KD

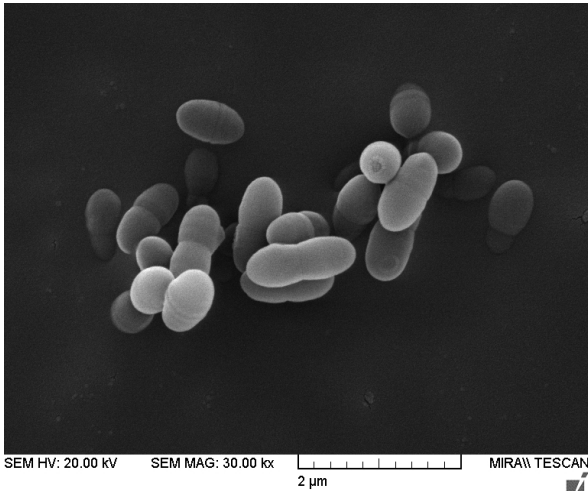


Fig. 1. Scanning electron micrograph of bacterial isolate from Kimchi.

Table 2. Susceptibility of the bacteriocin to hydrolytic enzymes

| Enzyme             | Activity |
|--------------------|----------|
| Proteinase K       | -        |
| Trypsin            | +        |
| α-Chymotrypsin     | -        |
| Pepsin             | +        |
| α-Amylase          | -        |
| Carbocypeptidase A | -        |
| Subtilisin A       | +        |
| Lipase             | -        |

28로 명명하였다(Fig. 2).

**항균 스펙트럼**

분리주가 생산하는 박테리옌은 *M. luteus* IAM 1056, *B. megaterium* KCTC 1098, *B. subtilis* KCTC 1023, *B. cereus* KCTC 1013, *L. ivanovii* subsp. *Ivanovii* KCTC 3444 and *X. citri* KCTC 2499 주로 그람 양성균에 대해서 항균활성을 나타냈다(Table 1). 그람 음성균에서는 항균활성을 나타내지 않았는데 이는 젖산균이 생산하는 박테리옌은 proton motive force을 붕괴

시켜 세균의 성장을 억제하는데, 외막이 존재하는 그람 음성균에는 작용하지 못하는 것과 일치한다[15, 29].

**분리주의 배양학적 특성**

분리주의 생육온도가 세포생장과 박테리옌 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 온도별 세포생장의 경우 37°C에서 유도기가 없이 상대적으로 빨리 자라기 시작하였으나 30°C와 25°C에서는 6시간과 12시간의 유도기를 거친 후 자라기 시작하였다. 배양온도가 낮을수록 즉시 자라지 못하고 긴 유도기가 필요한 것으로 나타났으나 배양 후 24시간 이후는 배양온도에 상관없이 유사한 생육곡선을 보였다(Fig. 3A). 박테리옌 활성을 보면 25°C에서는 24시간, 30°C에서는 12시간, 37°C에서는 6시간 이후부터 항균활성을 나타내기 시작하여 배양시간이 경과함에 따라 항균활성이 증가하여 30시간부터 최대의 항균활성을 나타내었다(Fig. 3B).

**박테리옌의 특성조사**

**열 안정성**

항균물질을 20°C~100°C범위에서 60분 동안 배양하여 열 안정성을 조사한 결과 20°C~80°C에서 60분간 처리부터 항균활성이 감소하기 시작하여 30분간 처리시 50%의 항균활성을 나타내었고 50분간 처리할 경우 항균활성이 완전히 사라졌다(Fig. 4). 이를 토대로 분리주가 생산하는 박테리옌은 비교적 열에 안정함을 알 수 있었다. 미생물로부터의 항균물질은 저분자의 펩타이드로써 일반적으로 열에 안정한 것으로 알려져 있다. 그 예로써 *L. acidophilus*가 생산하는 lactacin B는 120°C에서 60분간 열처리 하여도 그 활성에는 변화가 없었으며 *L. plantarum* LPC10의 plantaricin S도 100°C에서 각각 60분과 30분 열처리 시 안정하여 내열성이 크게 나타났다[31].

반면, 열에 안정하지 못한 항균물질에 대한 보고서로는 *L. helveticus* 균주로부터 helveticin V-1829는 60°C에서 불활성 되기 시작하여 100°C에서는 30분 안에 활성을 잃어 온도에 민감한 것으로 보고되었다[36]. 그리고 *B. subtilis* cx1으로부터의 항균물질을 50°C에서 1시간 안에 항균활성이 완전히 상실된다는 것으로 미루어 보아 열에 대한 안정성이 매우 낮음을

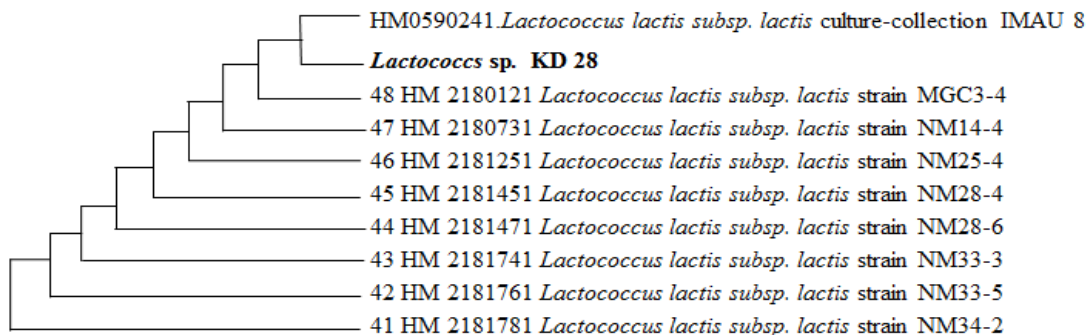


Fig. 2. Construction of phylogenetic tree of the selected isolate.

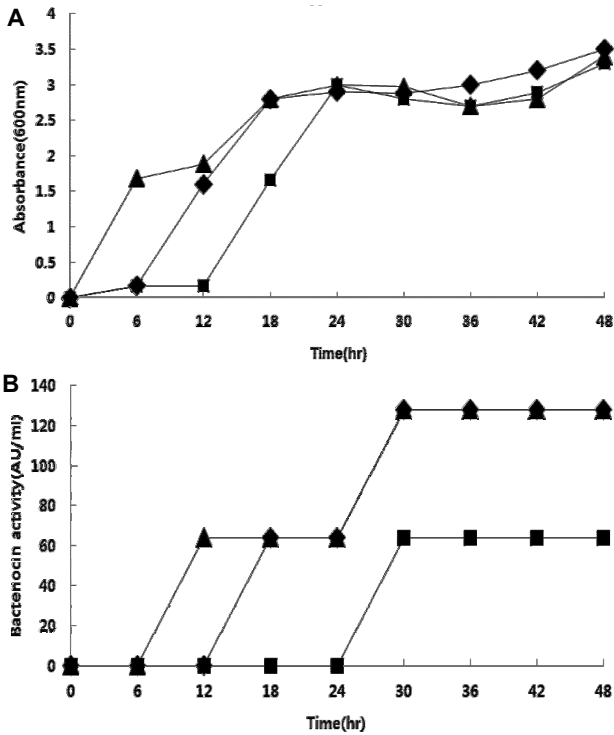


Fig. 3. Cell growth and bacteriocin activity grown at different temperature. The bacterial strain, *L. sp* KD 28 was cultivated in 100 ml of MRS broth at 37°C, 200 rpm for 48 h. Three milliliters of culture were sampled every 6 h. Optical density at 600 nm was measured (A) and culture supernatant was recovered by centrifugation and used for determining bacteriocin activity by well diffusion method (B). The symbols: -■-, 25°C; -◆-, 30°C; -▲-, 37°C.

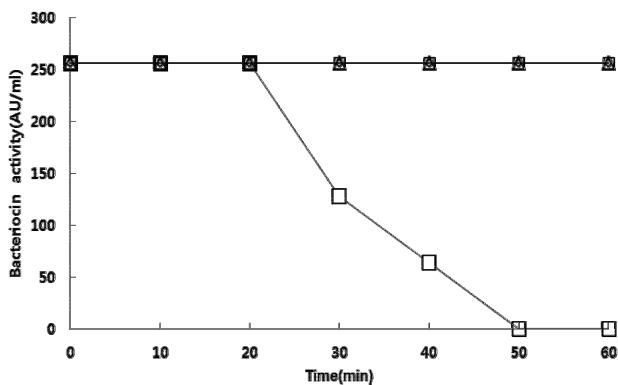


Fig. 4. The effect of heat treatment on bacteriocin activity. Culture supernatant was incubated at indicated temperatures for 60 min and 0.1 ml of sample was taken at the interval of 10 min and then residual activity (AU/ml) was determined by 2-fold dilution and well diffusion method. The symbols: - \* -, 20°C; -○-, 40°C; -◇-, 60°C; -△-, 80°C; -□-, 100°C.

알 수가 있다[16].

Table 3. Effect of organic solvents on the bacteriocin activity

| Solvents     | Residual activity (AU/ml) |
|--------------|---------------------------|
| No solvent   | 264                       |
| Acetone      | 264                       |
| Acetonitrile | 264                       |
| Chloroform   | 264                       |
| Ethanol      | 264                       |
| Isopropanol  | 264                       |
| Methanol     | 264                       |

\*Final concentration of solvent was 50% (v/v).

### 유기용매 내성

유기용매에 대한 내성의 경우 50%(v/v)의 acetone, acetonitrile, chloroform, ethanol, isopropanol과 methanol 등에 모두 안정성을 보였으며 HPLC 기기분석 시 용매의 선택에 참고하였다(Table 3).

### pH 내성

pH가 박테리오신의 항균활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 시료를 pH 2.0에서 pH 12.0 범위에 해당되는 완충용액과 시료의 부피를 1:1로 혼합한 후 상온에서 24시간 배양한 후 잔존활성을 측정된 결과를 나타내었다(Fig. 5). pH 8.0까지의 영역에서 항균활성을 유지하여 안정하다는 것을 알 수 있었다. 대부분의 유산균이 생산하는 박테리오신은 낮은 pH에서 활성을 보이거나, 매우 좁은 범위의 pH에서만 안정한 것으로 알려져 있다. 그 예로 *L. plantarum* C-11이 생산하는 plantaricin A는 pH 4.0~6.5 사이의 범위에서만 활성을 유지하였고, nisin의 경우에도 pH 2.0에서의 활성을 유지하지만 pH 8.0~12.0의 알칼리 영역에서는 활성이 감소하는 것으로 보고되었다[7]. pH가 높을 경우에 hydroxides ions, deprotonated amines, deprotonated hydroxyl group과 같은 nucleophile은 dehydro residue와 반응하여 분자 간 혹은 분자 내 cross-linkage를 형성하여 화학적 변형을 일으키거나 cofactor 때문이라 사료된다[21].

### 가수분해효소에 대한 내성

부분 정제한 박테리오신 용액에 여러 종류의 가수분해효소

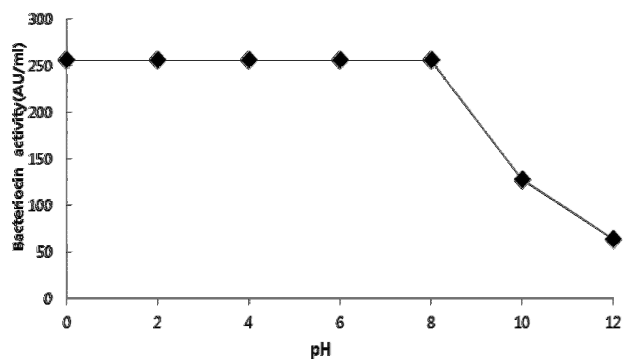


Fig. 5. Effect of pH on the bacteriocin activity.

를 2 mg/ml의 농도가 되도록 첨가하여 반응시킨 후 항균물질의 활성을 측정된 결과, proteinase K에 의해서는 항균활성이 완전히 소실되어 항균 활성물질이 단백질성 물질인 박테리오킴을 확인할 수 있었다(Table 2). 일부 단백질 분해효소에 의해 활성이 소실되지 않은 것은 리신, 아르기닌, 페닐알라닌, 타이로신, 카르복실기 c-말단, 등과 같은 특이적인 절단부위가 없거나 반응시킨 효소농도의 문제로 추정된다[14]. 단백질 가수분해효소인 lipase, carboxypeptidase A 및 proteinase K에 의해서는 박테리오킴의 활성이 제거됨으로써 단백질성 물질임을 확인할 수 있었다. 단백질분해효소에 대한 감수성은 class II 박테리오킴의 전형적인 성질이다[17].

**양이온 교환크로마토그래피 및 역상 HPLC 이용한 정제**

분리주를 MRS 액체배지에서 30°C, 48시간 배양한 후 원심 분리하여 얻은 배양 상등액의 박테리오킴 활성은 256 AU/ml 이었고, 황산암모늄 침전법으로 정제된 박테리오킴 활성은 1,280 AU/ml로 활성을 나타내었다. 분리주가 생산하는 박테리오킴을 정제하기 위하여 배양 상등액 중의 단백질을 황산암모늄 침전법으로 농축시킨 후 이온교환 크로마토그래피와 역상 HPLC를 실시하여 정제를 시도한 결과는 Table 4와 같다.

황산암모늄 침전법으로 농축한 시료를 column에 통과시킨 후 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) 천천히 흘려준 후에 NaCl gradient를 걸어 주어 column에 결합된 단백질을 완전히 용출시킨 결과를 *M. luteus* IAM 1056에 대한 생육저해 여부를 조사한 결과 분획 중 85~102번째 분획에서 항균활성이 나타났다. 항균활성 분획을 투석 및 동결 건조 시킨 후에 3차 증류수에 용해시켜 RP-HPLC를 통해 정제를 하였는데 C18 column에서 박테리오킴의 정제는 2번 실시하였고 이 때의 크로마토그램은 Fig. 6와 같다. C18 column으로 분석한 결과 단일 peak로 확인되었고 peak가 나타난 분획을 회수하여 tricine-SDS-PAGE 전기영동에 사용하였다.

**Tricine SDS-PAGE 전기영동**

RP-HPLC를 통해 최종 정제된 박테리오킴의 분자량을 알아보기 위하여 tricine SDS-PAGE 전기영동을 실시한 결과 Fig. 7과 같다. 정제된 박테리오킴은 단일 밴드를 나타내었고 분자량 표준 marker(Bio-Rad)와 비교한 결과 약 3.4 kDa인 분자량을 가지는 것으로 추정되었다. 또한 항균활성을 알아보기 위하여 전기영동 한 gel을 멸균된 3차 증류수로 30분간 5회 세척한 후 *M. luteus* IAM 1056가 접종된 ENB soft agar를 증충

Table 4. Purification of bacitracin from culture supernatant of *L. sp.* KD 28

| Purification step           | Volume (ml) | Total protein (mg) | Activity (AU/ml) | Total activity (AU) | Specific activity (AU/mg) | Purification fold | Yield (%) |
|-----------------------------|-------------|--------------------|------------------|---------------------|---------------------------|-------------------|-----------|
| Culture supernatant         | 500         | 20                 | 256              | 128,000             | 6,400                     | 1                 | 100       |
| Ammonium sulfate            | 50          | 1.6                | 1,280            | 64,000              | 40,000                    | 6.25              | 50        |
| Ion exchange chromatography | 40          | 0.8                | 640              | 25,600              | 32,000                    | 5                 | 20        |
| HPLC                        | 1           | 0.01               | 5,120            | 5,120               | 512,000                   | 80                | 4         |

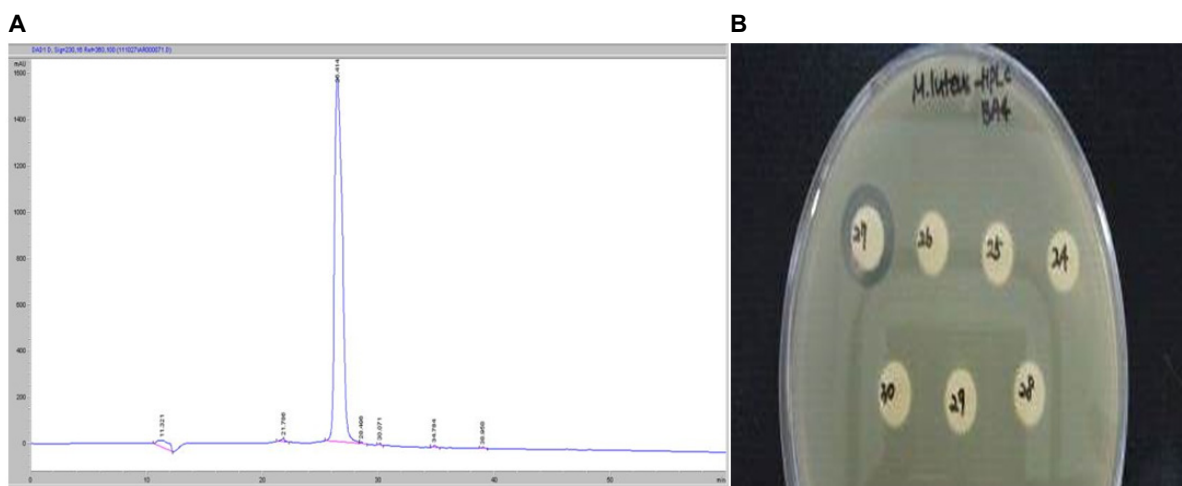


Fig. 6. HPLC Chromatogram and confirmation of antibacterial activity. The active fractions from SP-Sepharose column chromatography were dialyzed and freeze-dried. Dissolved concentrate was applied to reverse phase HPLC using Agilent Eclipse XDB-C18 column (A). After washing with buffer A at the flow rate of 1.0 ml/min, acetonitrile concentration gradient from 0 to 100% was applied to the column. Each 1.0 ml of eluate was collected and bacteriocin activity of each fraction was determined using the well diffusion method (B).



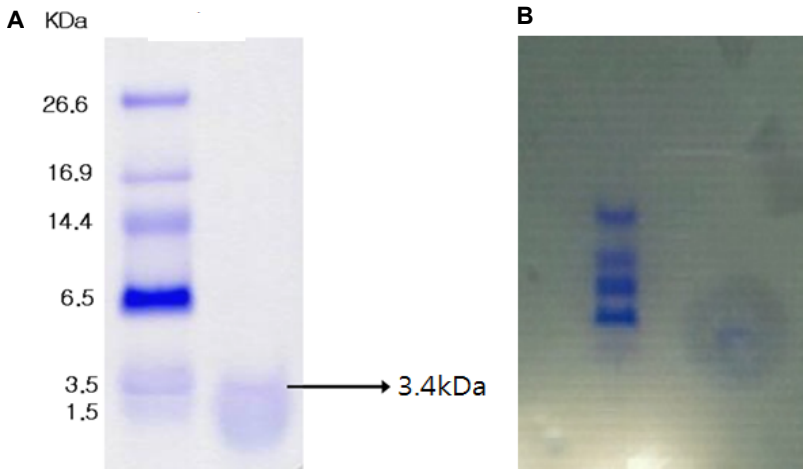


Fig. 7. Tricine-SDS-PAGE and activity detection of purified bacteriocin. Gel stained with Coomassie brilliant blue (A). Gel overlaid with ENB soft agar containing 1% of *M. luteus* IAM 1056 (B). Lane 1: polypeptide SDS-PAGE standards marker, lane 2: purified bacteriocin.

하여 박테리오신의 활성을 조사한 결과 염색한 gel의 밴드와 일치하는 곳에 저해환이 생겨 박테리오신임을 확인할 수 있었다. 본 실험에서 분리된 박테리오신은 분자량이 적은 펩타이드에 속하며 소수성 아미노산으로 구성되어 있을 것으로 추정된다. Class IIa 박테리오신의 분자량이 12 kDa 이하이며 3~5 kDa 범위에 속하며 *Listeria*를 강하게 저해하지 못한다는 이전의 논문과 연관시켜 보았을 때 본 연구에서 정제한 박테리오신은 Class IIa 그룹에 속한다는 것을 알 수 있었다[2, 24, 25]. 또한 gel에 나타난 밴드가 확산되는 현상 또한 박테리오신 분자가 강한 소수성에 기인하고 다수의 항균성 펩타이드들과 지시균 세포막과의 상호작용과 관계된 사실을 뒷받침한다[10, 12]. 한국고유의 전통식품인 김치에서 분리한 젖산균인 박테리오신은 비교적 항균범위가 넓고 식품에서 발생하기 쉬운 병원성 미생물에서 저해효과를 보이고 있으므로 앞으로 추가 연구를 통해 무독, 무해의 천연 식품 보존제로서의 응용이 기대된다.

### 감사의 글

이 논문은 2013~2014년도 창원대학교 연구비 및 중소기업청 2013년도 산학연공동기술개발사업(No.C0147509) 그리고 (재)발효미생물산업진흥원의 2014년도 지역농식품선도클러스터육성사업의 지원에 의하여 연구되었음.

### References

- Atrih, A., Rekhif, N., Michel, M. and Lefebvre, G. 1993. Detection of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different foods. *Microbios* **75**, 117-223.
- Ahn, J. E., Kim, J. K., Lee, H. R., Eom, H. J. and Han, N. S. 2012. Isolation and characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* B16 from Kimchi. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 721-726.
- Buchman, G. W., Banerjee, S. and Hansen, J. N. 1988. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.* **263**, 16260-16266.
- Cho, J. S., Jung, S. T., Kim, Y. M. and Chun, U. H. 1994. Detection of the bacteriocin from lactic acid involved in Kimchi fermentation. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 700-706.
- Choi, E. M., Kim, Y. H., Park, S. J., Kim, Y. M. and Kim, S. K. 2004. Characterization of bacteriocin iacticin YH-10, produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* YH-10 isolated from Kimchi. *J. Life Sci.* **14**, 683-688.
- Choi, S. Y. and Bouchat, L. R. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocin of *pediococcus acidilactici* M during fermentation of Kimchi. *Food Microbiol.* **11**, 301-307
- Daeschel, M. A. and Mckenney, M. C. 1990. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *Food Microbiol.* **7**, 91-98.
- Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* **44**, 100-117.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J. and Hugenholtz, J. 1996. Application of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**, 193-202,
- Deraz, S. F., Karlsson, E. N., Hedstrom, M., Andersson, M. M. and Mattiasson, B. 2005. Purification and characterization of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *J. Biotechnol.* **117**, 343-354.
- Elegado, F. B., Kim, W. J. and Kwon, D. Y. 1997. Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, Pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici* M. *Int. J. Food Microbiol.* **37**, 1-11.
- Ennahar, S., Sachihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 2000. Class IIa bacteriocins : biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 85-106.
- Granger, M., Todorov, S. D., Matthew, M. K. A. and Dicks, L. M. T. 2005. Growth of *Enterococcus mundtii* ST15 in medium filtrate and purification of bacteriocin ST15 by cation-exchange chromatography. *J. Basic Microbiol.* **45**, 419-425.
- Jung, S. Y., Choi, J. I., Joo, W. H., Suh, H. H., Na, A. S.,

- Cho, Y. K., Moon, J. Y., Ha, K. C., Paik, D. H. and Kang, D. O. 2009. Characterization and purification of the bacteriocin produced by *Bacillus licheniformis* isolated from soybean sauce. *J. Life Sci.* **19**, 994-1002.
15. Kim, D. S. 2002. Characterization of the bacteriocin from *Lactobacillus* sp. Oh-B3. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 184-188.
16. Kim, S. I., Chang, J. Y., Kim I. C. 2001. Characterization of bacteriocin from *Bacillus subtilis* cx1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 50-55.
17. Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol.* **12**, 39-86.
18. Kuipers, O. P., Rollema, H. S., Yap, W. M. G., Boot, H. J., Siezen, R. J. and DeVos, W. M. 1992. Engineering dehydrated amino acid residues in the antimicrobial peptide nisin. *J. Biol. Chem.* **267**, 24340-24346.
19. Shin, M. S., Han, S. K., Ryu, J. S. and Lee, W. K. 2008. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* K23-2 isolated from Kimchi. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 331-339.
20. Lee, H. J., Joo, Y. J., Park, C. S., Kim, S. H., Hwang, I. K., Ahn, J. S. and Mheen, T. I. 1999. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* H-559 isolated from Kimchi. *J. Biosci. Bioeng.* **88**, 153-159.
21. Liu, W. and Hansen, J. N. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2551-2558.
22. Xiraphi, N., Georgalaki, M., Rantsiou, K., Cocolin, L., Tsakalidou, E. and Drosinos, E. H. 2008. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Meat Sci.* **80**, 194-220.
23. Oh, S. J., Kim, S. H., Ko, Y., Sim, J. H., Kim, K. S., Lee, S. H., Park, S. S. and Kim, Y. J. 2006. Effect of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY 449 on skin-inflammatory bacteria. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 1184-1190.
24. Singh, P. K., Chittipurna, A., Sharma, V., Paril, P. B. and Suresh K. 2012. Identification, purification and characterization of Laterosporulin, a Novel Bacteriocin Produced by *Brevibacillus* sp. strain Gl-9. *PLoS One* **7**, e31498.
25. Satish Kumar, R. and Arul, V. 2009. Purification and characterization of phocaecin PI80: an anti-listerial bacteriocin produced by *Streptococcus phocae* PI80 isolated from the gut of *penaeus indicus* (Indian White Shrimp). *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 1393-1400.
26. Schagger, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **1**, 16-22.
27. Schagger, H. and Von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.
28. Schilliger, U. and Lucker, F. K. 1989. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1901-1906.
29. Senbagam, D., Gurusamy, R. and Senthilkumar, B. 2013. Physical chemical and biological characterization of a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* NS02. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **6**, 934-941.
30. Severina, E., Severin, A. and Tomasz, A. 1998. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**, 341-347
31. Susan, F. B. and Klaenhamer, T. R. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1801-1815
32. Tagg, J. R. and McGiven, A. R. 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.* **21**, 943.
33. Tagg, J. R., Adnan, A. S. and Wanna Marker, L. W. 1976. Bacteriocin of Gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**, 722-756.
34. Tahiri, I., Desbiens, M., Benech, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Thibault, S., Ouellet, D. and Fliss, I. 2004. Purification, characterization and amino acid sequencing of divergcin M35: a novel class IIa bacteriocin produced *carnobacterium divergens* M35. *Int. J. Food Microbiol.* **97**, 123-136.
35. Toshihide, K., Tadao, S., Yasushi, K., Junko, U. and Takatoshi, I. 1997. Production, purification and characterization of reuterin 6, a bacteriocin with lytic activity produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. *Int. J. Food Microbiol.* **34**, 145-156.
36. Yamamoto, Y., Togawa, Y., Shimosaka, M. and Okazaki, M. 2003. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5746-5753.
37. Vaughan, E. E., Daly, C. and Fitzgerald, G. F. 1992. Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 299-308



### 초록 : 김치에서 분리한 *Lactococcus lactis*가 생산하는 박테리오신의 정제 및 특성

이지영<sup>2</sup> · 최낙식<sup>1</sup> · 전성식<sup>3</sup> · 문자영<sup>1</sup> · 강대욱<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>창원대학교 보건위생학과, <sup>2</sup>창원대학교 대학원 생명공학협동과정, <sup>3</sup>한국국제대학교 식품의약학과)

김치로부터 분리한 *L. sp.* KD 28은 펩타이드성 항균물질인 박테리오신을 생산하였다. 이 박테리오신은  $\alpha$ -chymotrypsin, proteinase K, lipase,  $\alpha$ -amylase, carboxypeptidase A 효소에 대해서 매우 민감한 반응을 보였다. 낮은 pH 2.0에서 약 염기성의 pH 8.0까지는 항균활성을 온전히 유지하였으나 pH 8.0 이상에서는 항균활성이 감소하기 시작하여 pH 12.0에서는 25%로 감소하였다. *L. sp.* KD 28는 16S rRNA 분자계통학적 분석을 한 결과 *L. lactis*와 99% 상동성을 보였다. 또한 김치에서 분리한 *L. sp.* KD 28이 생산하는 박테리오신은 acetonitrile, isopropanol, methanol, chloroform 및 acetone 등의 유기용매 최종 농도 50%에서 항균활성은 영향을 받지 않았다. 열 안정성의 경우 80°C까지 한 시간의 열처리에 안정하였으나 100°C에서는 20분 이상의 열처리에 의해 항균활성이 감소하여 50분간 열처리할 경우 항균활성이 나타나지 않았다. 또한 이 박테리오신은 그람 음성보다는 양성 세균인 *M. luteus* IAM 1056, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* KCTC 1058, *E. faecium* KCTC 3095, *B. cereus* KCTC 1013, *B. subtilis* KCTC 1023, *S. aureus* subsp. *aureus* KCTC 1916, *B. megaterium* KCTC 1098, *B. sphaericus* KCTC 1184 및 *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* KCTC 3444 등에 대해서 항균활성을 보였다. 박테리오신을 SP-Sepharose 이온교환크로마토그래피로 부분 정제한 후 RP-HPLC를 통해서 최종적으로 정제하여 tricine-SDS-PAGE를 통해 분자량을 확인한 결과 약 3.4 kDa로 나타났다.