J. Fd Hyg. Safety 14(3), 233-237 (1999)

Lactobacillus sp. GM7311이 생산하는 박테리오신의 부분정제

강지희 · 이선희 · 강선모 · 윤지혜 · 이명숙†
부경대학교 미생물학과

Partial Purification of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus* sp. GM7311

Ji-Hee Kang, Sun-Hee Lee, Sun-Mo Kang, Ji-Hye Yoon and Myung-Suk Lee†
Dept. of Microbiology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

ABSTRACT – The bacteriocin produced by *Lactobacillus* sp. GM7311 was purified by sequential steps including n-propanol/acetone treatment, CM-cellulose chromatography, and gel filtration on Sephacryl HR-100. The relative activity of bacteriocin increased 493-fold after final purification step with a recovery of 8.3%. Two protein bands of ca. 8,200 and 2,500 were detected by SDS-PAGE of bacteriocin purified through CM-cellulose and sephacryl HR-100 chromatography and both of them had bacteriocin activity.

Key words □ Bacteriocin, Lactobacillus sp. GM7311, Purification

젖산균으로부터 생산되는 박테리오신은 최근 몇 년간 여러 각도에서 연구가 활발히 진행되어 왔다. 그러나 그 중, 분자적 구조가 밝혀진 경우는 일부분이며, 대부분은 정제 단계에서 야기되는 몇 가지 문제점들 때문에 정확한 분자적 구조의 판명이 이루어지지 못하고 있다.

박테리오신 정제시 어려움은 첫째, 젖산균의 전체 배양액양에 비해 박테리오신의 생성량이 상대적으로 적고, 둘째, 젖산균 증식 배지내에는 박테리오신과 비슷한 분자량을 가진 peptide성 물질이 많아 이들이 정제 방해 물질로 작용하며, 셋째, 박테리오신의 활성이나 단백질 정량에 있어서 규정화된 측정 방법이 없다는 점 등이다.[1]

지금까지 알려진 박테리오신 정제 단계는 균체 제거를 위한 원심분리로부터 시작하는데, 이 때 균체의 세포벽에 흡착되어 있는 박테리오신을 유리시키기 위해 pH 처리나 열처리를 이용하는 방법도 사용되고 있다.[2,3] 그리고 1차 정제과정은 원심분리한 상등액을 $(NH_4)_2SO_4$나 유기용매 처리하여 침전시키는 방법이 주로 이용되며, 원심분리 상등액의 pH 조절을 통해 생산균주의 세포벽에 다시 흡착시킨 후 조건을 재변화시켜 유리시키기도 한다.[4] 이 방법은 특이성이 강해 한 번에 순수한 박테리오신을 얻어낼 수 있다. 또한 chromatofocusing이나 ultrafiltration을 이용하는 방법들도 연구되고 있으며,[5-8] 정제 방해 물질을 제거한 modified medium을 사용하여 효율을 높이기도 한다.[9]

본 연구에서는 시판되고 있는 유제품으로부터 분리한[10] *Lactobacillus* sp. GM7311이 생산하는 박테리오신을 유기용매 처리한후 ion-exchange chromatography와 gel filtration, 그리고 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 부분 정제한 결과를 보고하고자 한다.

†Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

박테리오신 생산 균주의 배양

Lactobacillus sp. GM7311을 MRS broth(pH 6.0)를 이용해 37°C, 24시간 배양한 후 원심분리(6,640×g, 5분)하여 그 상등액을 정제 시료로 사용하였다.

n-propanol 추출과 acetone 처리

원심분리하여 얻은 상등액에 1 *l*당 1/10 volume의 n-propanol과 30%(v/w)의 NaCl을 첨가해 층 분리한 다음 하층액을 취하였다. 여기에 3배의 cold acetone을 가해 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 원심분리(1,660×g, 10분)하여 상등액을 분리했다. 이 상등액을 모아 rotary evaporator (EYELA N-1, Japan)를 이용해 acetone을 제거한 후 증류

수에 대해 투석(MWCO 1,000, Spectra Por)하여 감압농축시킨 것을 다음 단계의 정제 시료로 사용하였다.

Ion-exchange chromatography

감압농축시킨 박테리오신을 20 mM sodium phosphate buffer(pH 5.7)로 평형화시킨 CM-cellulose column(2.6×40 cm)에 주입하였다. 용출은 1.0 M NaCl이 첨가된 동일 완충용액을 이용한 linear gradient방법을 사용했다. 유속은 24 ml/hr로 조절하였고 용출액의흡광도는 214 nm에서 측정하였으며, 활성을 함께 측정하였다.

Gel filtration

Ion-exchange chromatography에서 얻은 활성 fraction을 역시 20 mM sodium phosphate buffer(pH 5.7)로 평형화시킨 Sephacryl HR-100 column(1.6×100 cm)에 주입하였다. 동일 완충액을 사용하여 12 ml/hr의 유속으로 용출하였으며, 용출액의 흡광도는역시 214 nm에서 검출하였고 동시에 각 분획의 활성도 측정하였다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

SDS-polyacrylamide gel 조성은 Ito et al.[11]의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉 resolving gel은 19.3% acrylamide, 0.074% N, N-metylene-bisacrylamide, 0.33M Tris/HCl, 3.0M urea 및 0.1% SDS의 조성으로 하였으며, stacking gel은 5% acrylamide, 0.13% N, N′-metylene-bisacrylamide, 0.0625M Tris/HCl(pH 6.8), 3.0M urea 및 0.1% SDS의 조성으로 하였다. Sample buffer는 2배 농도의 0.125M Tris/HCl(pH 6.8), 4% SDS, 2% glycerol, 1% β-mercaptoethanol이었으며, sample buffer와 시료를 1:1로 희석하여 bromophenol blue를 소량 첨가한 후 3분간 중탕하여 사용하였다. Electrophoresis는 BioRad Mini Gel (USA)을 사용하여 실행하였으며, bromophenol blue가 stacking gel을 완전히 빠져나올 때까지는 100V로, resolving gel로 들어간 후부터는 250V로 실행하였다.

단백질 band는 coomassie brillient blue로 염색하여 확인하였으며, 박테리오신 확인은 Joerger et al.[12]의 방법을 변형하여 다음과 같이 실험하였다. 즉, coomassie brillient blue로 염색하지 않은 band 부분을 잘라내어 tryptic soy broth(TSB)에 넣고 4℃, 하룻밤동안 방치하여 활성이 TSB 내로 용출되도록 하였다. 여기에 Proteus mirabilis를 접종하여 다시 6시간, 37℃에서 배양한 후 620 nm에서 흡광도를 측정하여 항균력을 나타내었다.

항균력 측정과 단백질 정량

박테리오신의 항균력은 microdilution method(Toba et al., 1991)를 이용하여 측정하였으며, 단백질정량은 Lowry et al.[14]의 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

n-propanol 추출과 acetone 처리

Lactobacillus sp. GM7311을 MRS broth(pH 6.0)에 24시간 배양한 후 원심분리하여 얻은 상등액의 전체 활성은 145,500 BU/ml였다. 그러나 n-propanol로 분획한 후 acetone을 처리했을 때는 회수율이 저조하여 48.0%의 회수율을 나타내었고, 이에 따라 전체 활성이 크게 감소하였으나. 비활성은 2.8배 증가하였다.

최 등[2]은 methanol과 acetone의 유기용매로 박테리오신을 추출하여 52.3%의 회수율을 보였으며, Pulusani et al.[15]도 50% 회수율을 얻었다고 보고하였다. 한편 Muriana and Klaenhammer[16]는 $(NH_4)_2SO_4$로 침전시킨 후 원심분리할 때 상등액 위에 부유하는 surface pellicle층에 많은 양의 박테리오신이 포함된 것을 관찰하고 이 층으로부터 박테리오신을 회수하여 정제했다고 보고한 바 있다. van Laack et al.[17]은 이러한 현상이 MRS broth내에 포함되어 있는 tween 80이 침전을 방해하기 때문이라고 하여, tween 80을 제외한 modified medium에 젖산균을 배양한 다음 이를 정제하였다.

Ion-exchange chromatography

Acetone처리액을 모아서 CM-cellulose column(2.6×

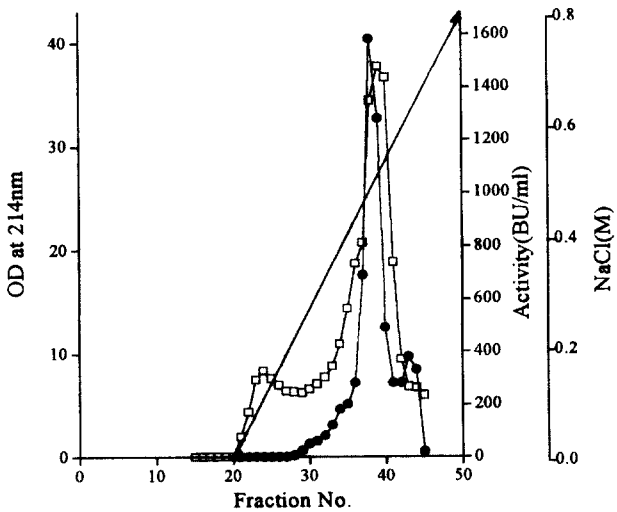

Fig. 1. Elution profil of crude bacteriocin on CM-cellulose column chromatography, -□-OD, -●-Activity, -▲-NaCl gradient.

40 cm)에 주입시킨 후 1.0M NaCl을 이용해 용출시킨 크로마토그램은 Fig. 1과 같다.

214 nm에서 흡광도를 측정하였으며 각 fraction별로 활성을 측정했을 때, 최대 활성을 나타내는 fraction은 38번이었으며 활성은 1,580 BU/m*l*였다. 그러나 실제 다음 정제 단계에 사용된 fraction은 39번이었는데 이는 38번과 비교해 활성차이가 크지 않고 단백질량도 훨씬 적어 비활성 증가율이 컸기 때문이다. Fraction 39번의 활성은 1,280 BU/m*l* 이며, 비활성은 88.2배 증가하였고 회수율은 22.0%였다.

Gel filtration

Ion-exchange chromatography로 얻은 활성 fraction을 모아 Sephacryl HR-100에 주입해서 gel filtration시켜 박테리오신 이외의 단백질을 제거했다(Fig. 2). Peak는 서로 분리되지 않은 채 A와 B의 두 개가 나타났으나, peak A의 앞쪽 부분에서 1,950 BU/mℓ의 박테리오신 활성을 나타냈다. 이상의 bacteriocin 정제 결과를 요약하여 Table 1에 나타내었다. n-propanol과 acteone등의 유기용매 처리단계에서는 비활성의 증가가 크지 않았으나 gel filtraion단계에서는 박테리오신 활성이 크게 증가하여 비활성은 493.3배의 증가를 보였으며 최종회수율은 8.3%였다.

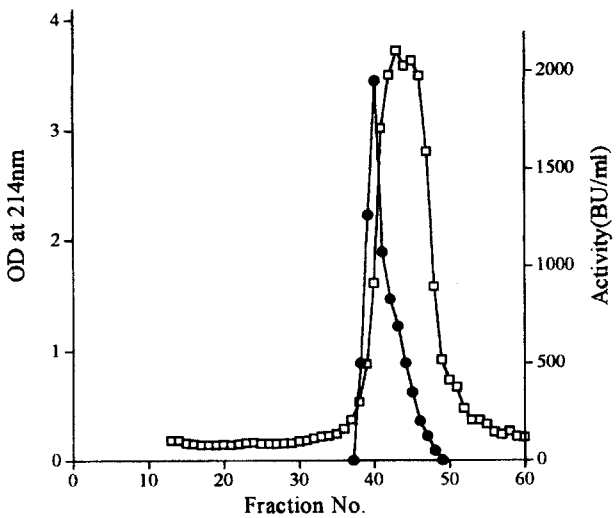

Fig. 2. Elution profile of patially purified bacteriocin with Sephacryl HR 100 column chromatography, ⊟ OD, ● Activity.

SDS-PAGE

Gel filtration까지의 정제 과정을 통해 얻은 박테리오신의 정제도를 알아보기 위해 SDS-PAGE를 실시한 결과, Fig. 3(a)에서 보듯이 정제된 박테리오신은 뚜렷한 2개의 band를 나타내었으며 각각의 분자량은 약 8,200과 2,500이었다.

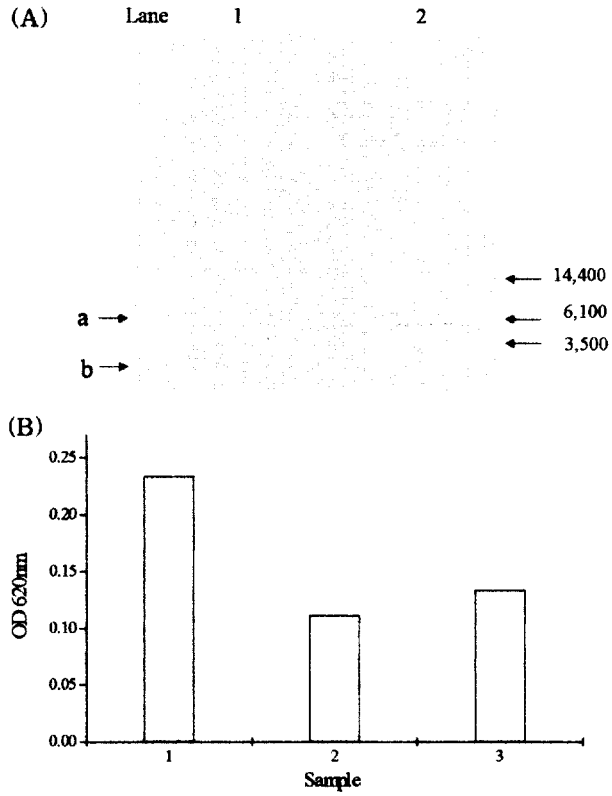

Fig. 3. (A) SDS-PAGE of partially purified bacteriocin. Lane 1, purified bacteriocin; lane 2, molecular weight markers(Low-range protein MW markers, Promega) (B) Growth inhibition of P. mirabilis by bacteriocin eluted from the slices of a complementary polyacrylamide gel. 1, control(buffer only) ; 2, band of (A) ; 3, band b of (A)

Table 1. Purification of bacteriocin produced by *Lactobacillus* sp. GM7311

Purification step	Total Protein(mg)	Total Activity(BU)	Specific Activity(BU/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude supernatant	6,014	145,500	24.2	100	1
Acetone ppt.	1,031	69,867	67.8	48.0	2.8
CM-cellulose	15	32,010	2,134	22.0	88.2
Sephacryl HR-100	1.0	12,076	11,938	8.3	493.3

그러나 2개의 band를 분리하여 각각의 박테리오신 활성을 조사하였을 때, Fig. 3(b)에서 보듯이 두 band 모두 활성을 가지는 것으로 나타나 2개의 band가 나타난 것은 정제가 완전히 이루어지지 못했음이 아니라 *Lactobacillus* sp. GM7311은 비슷한 특징을 가지는 2가지 성분의 박테리오신을 생산한다는 가능성을 보여주었는데, Jimenez-diaz et al.[18]도 green olive fermentation으로부터 분리한 *Lactobacillus plantarum* LPCO 10이 분자량에서 차이를 보이는 plantaricins S와 T의 2가지 박테리오신을 생성한다고 보고한 바 있다.

국문 요약

Lactobacillus sp. GM7311을 MRS broth에 배양하여 배양 상등액으로부터 n-propanol/acetone처리, ion-exchange chromatography, gel filtration 및 SDS-PAGE를 이용해 박테리오신을 부분 정제하였다. 정제 과정중 가장 큰 문제점은 n-propanol과 acetone 등의 유기용매 처리 단계에서의 급격한 활성 감소로서 회수율은 48.0%를 나타내었다. 그러나 이후 CM-cellulose를 통한 ion-exchagne chromatography와 Sephacryl HR-100에 의한 gel filtration 과정을 거치면서 활성이 크게 증가하여, 비활성뿐만 아니라 정제도에서도 493배의 증가를 얻을 수 있었으며 최종 회수율은 8.3%였다. SDS-PAGE로 정제도를 확인했을 때 분자량 약 8,200과 2,500의 2개의 band를 관찰할 수 있었으며, 2개의 band를 각각 나누어 활성을 측정한 결과 두 부분 모두 활성이 있는 것으로 나타나 *Lactobacillus* sp. GM 7311이 2가지 성분의 박테리오신을 생산하는 것으로 추정할 수 있었다.

참고 문헌

1. Carolissen-Mackey, V., Arendse, G. and Hastings, J.W.: Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. Inter. *J. Food Microbiol.*, **34**, 1-16 (1997).
2. 최신양, 이상호, 이인선, 유진영, 정건섭, 구영조: *Lactococcus* sp. 1112-1균주가 생산하는 bacteriocin의 정제 및 성질. 한국산업미생물학회지, **19**, 209-214 (1991).
3. 김상교, 이상준, 백영진, 박연희: *Lactococcus* sp. HY449가 생산하는 bacteriocin의 *Lactobacillus fermentum* IFO 3023에 대한 억제작용. 한국산업미생물학회지, **22**, 266-270(1994).
4. Yang, R., Johnson, M.C. and Ray, B.: Novel method to extract large amounts of bacteriocin from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3355-3359 (1992).
5. Hechard, Y., Derijard, B., Letellier, F. and Cenatiempo, Y.: Characterization and purification of mensentericin Y-105, an anti-Listeria bacteriocin from Leuconostoc mensenteroides. *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 2725-2731 (1992).
6. Loyola-Rodriguez, J.P., Morisaki, I., Kitamura, K. and Hamada, S.: Purification and properties of extracellular mutacin, a bacteriocin from Streptococcus sobrinus. *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 269-274 (1992).
7. Barefoot, S.F., Chen, Y., Hughes, T.A., Bodine, A.B., Schearer, M.Y. and Hughes, M.D.: Identification and purification of a protein that induces production of the Lactobacillus acidophilus bacteriocin Lactain B. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3522-3528 (1994).
8. Kato, T., Matsuda, T., Ogawa, E., Ogawa, H., Kato, H., Doi, U. and Nakamura, R.: Plantaricin-149, a bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum NRIC149. *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 277-282 (1994).
9. Kawai, Y., Saito, T. Toba, T., Samant, S.K. and Itoh, T.: Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin(Gassericin A) from *Lactobacillus* gasseri LA39. Biosci. BioTech. Biochem., **58**, 1218-1221 (1994).
10. 이명숙, 장동석, 강지희: *Lactobacillus* sp. GM7311에 의한 박테리오신의 생산 조건. 한국수산학회지, **30**, 834-841(1997).
11. Ito, K., Date, T. and Wickner, W.: Synthesis, assembly into the cytoplasmic membrane and proteolytic processing of the precursor of coliphage M13 coat protein. *J. Biol. Chem.*, **255**, 2123-2130 (1980).
12. Jorger, M.C. and Klaenhammer, T.R.: Chacterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.*, **167**, 439-446 (1986).
13. Toba, T., Samant, S.K and Itoh, T.: Assay system for detecting bacteriocin in microdilution wells. Lett. *Appl. microbiol.*, **13**, 102-104 (1991).
14. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Ferr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurment with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
15. Pulusani, S.R., Rao, K.R. and Sunki, G.R.: Antimicrobial activity of lactic cultures: partial purification

and characterization of antimicrobial compound(s) produced by Streptococcus thermophilus. I. *Food Sci.*, **44**. 575-578 (1979).

16. Muriana, P.M. and Klaenhammer, T.R.: Purification and partial characterization of Lactacin F, a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus 11088. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 114-121 (1991).
17. van Laack, R.L.J.M., Schillinger, V. and Holzapfel, W.H.: Characterization and partial purification of a bacteriocin produced by Leuconostoc carnosum LA 44A. Inter. *J. Food Microbiol.*, **16**, 183-195 (1992).
18. Jimenez-diaz, R., Rios-Sanchez, R.M., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J.L. and Piard, J.C.: Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1416-1424 (1993).