

## Lysozyme과 Glycine, Lysine 및 EDTA의 첨가가 *Lactobacillus plantarum*의 성장에 미치는 영향

이성기 · 김인호\* · 유익종\*

강원대학교 축산학과, \*한국식품개발연구원

### Effect of Lysozyme, Glycine, Lysine and EDTA on the Growth of *Lactobacillus plantarum*

Sung-Ki Lee, In-Ho Kim\* and Ick-Jong Yoo\*

Department of Animal Science, Kangwon National University

\*Korea Food Research Institute

#### Abstract

Effect of 200 ppm lysozyme, 0.1% glycine and 0.1% lysine on inhibition growth of *Lactobacillus plantarum* was investigated in MRS broth. All samples except control were effective in inhibiting the growth and especially the combination of lysozyme and glycine was observed to be highly effective. The mixture effect against microbial growth was increased as concentration of lysozyme with glycine or lysozyme with EDTA was respectively increased. *Lactobacillus plantarum* almost didn't grow in MRS broth containing lysozyme(>200 ppm) with glycine(>0.5%), or lysozyme(>200 ppm) with EDTA(>0.8 mM). It was found that the growth of *L. plantarum* could be extremely inhibited in 120 ppm lysozyme with at least 0.8 mM EDTA compared with control.

Key words: *Lactobacillus plantarum*, lysozyme, EDTA, glycine

## 서 론

Lysozyme은 동식물 조직에 소량씩 널리 분포되어 있는 용균성 효소로서 박테리아 세포벽의 주요 구성성분인 mucopolysaccharide의 N-acetylglucosamine과 muramic acid 사이에 연결되어 있는  $\beta$ -linkage를 가수분해시키는 효소이다. 따라서 그람양성균에 유리하며, virus 등에서도 불용성물질을 생성하여<sup>(1)</sup> 그 활성을 저하시키기도 한다. Yajima 등<sup>(2)</sup>에 의하면 산생성균 중 *Lactobacillus hiocchii*는 50~500 ppm의 lysozyme으로 그 생육이 억제되며, *Lactobacillus heterohiocchii*는 10 ppm, *Lactobacillus homohiocchii*는 20 ppm, *Lactobacillus fermenti*는 1 ppm, *Lactobacillus acidophilus*는 100 ppm의 lysozyme으로 성장이 억제된다고 하였다. 또한 POBB(butyl  $p$ -hydroxybenzoate)<sup>(3)</sup>, 아미노산<sup>(4)</sup>, EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)<sup>(5,6)</sup> 등 기타 보존제와의 병용은 lysozyme의 효과를 더욱 높일 수 있으며, 특히 아미노산류는 식품에 첨가시 안전상의 문제가 없기 때문에 glycine, threonine, lysine<sup>(7)</sup>의 사용이 고려되기도 하였다. *Bacillus subtilis*는 lysozyme 80 ppm과 glycine 0.4%에서 *Escheri-*

*chia coli* S-8은 lysozyme 80 ppm과 glycine 0.6%에서 그리고 *Staphylococcus aureus* 209-P는 lysozyme 80 ppm과 glycine 0.8%에서 미생물의 성장 억제효과가 확인되었다<sup>(8)</sup>.

Glycine는 케니실린과 같이 일부 세균의 세포벽 합성을 억제시키면서 스피로플라스트(spheroplast) 생성을 유도<sup>(9)</sup>하기 때문에 lysozyme이 세포벽을 분해할 때 가장 상승효과의 가능성이 있는 아미노산이며, EDTA도 금속이온의 봉쇄작용으로 lysozyme 등과 같이 작용하여 spheroplast 생성<sup>(10)</sup>을 유도할 수 있다는 점에서 식품에 적용하기 이전에 MRS 배지에 lysozyme과 함께 첨가하여 *Lactobacillus plantarum*의 성장에 미치는 영향을 고찰하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

Lysozyme(Canada Brookside社)은 순도 98% 이상의 등전점형 추출물을 사용하였고, 용균(lysis) 정도를 측정하기 위한 접종균으로는 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014를 MRS 배지에 배양하여 사용하였다. Glycine(Showa Denko社)는 순도 99% 이상의 제품을, L-lysine monohydrochloride는 미원 주식회사의 제품을 사용하였다.

Corresponding author: Sung-Ki Lee, Department of Animal Science, Kangwon National University, Hyojadong, Kangwon 200-701, Korea

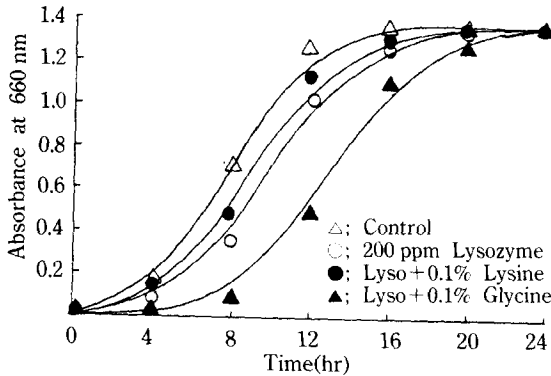


Fig. 1. Effect of lysozyme, glycine and lysine on the growth of *Lactobacillus plantarum* in MRS broth, measured by absorbance during 20 hr at 32°C

방법

*Lactobacillus plantarum*을 접종한 MRS 배지에 200 ppm의 lysozyme, 200 ppm의 lysozyme에 0.1%의 glycine 또는 0.1%의 lysine을 첨가하여 32°C에서 24시간 동안 시간별 성장정도를 660 nm에서 흡광도로 측정하였다.

EDTA의 효과도 대조구, 120 ppm lysozyme 첨가구, 10 mM EDTA 첨가구, 그리고 120 ppm lysozyme에 0.1, 1, 10 mM의 EDTA를 혼합 첨가한 시험구를 glycine의 경우와 같은 방법으로 36시간 동안 배양하면서 흡광도를 측정하여 접종균의 성장정도를 판별하였다.

Lysozyme과 glycine이나 EDTA의 농도별 조합에 따른 *L. plantarum*의 성장억제에 상승 또는 병용효과가 있는지 여부를 구명하는 실험을 실시하였다. Lysozyme 0, 40, 80, 120, 200 ppm에 glycine 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0 %와 EDTA 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2 mM를 농도별 각각 혼합하여 MRS 배지내에 첨가하고 32°C에서 12시간까지 접종균을 배양시킨 후 성장 억제효과를 측정하였다. 농도별 병용에 따른 성장 억제효과는 대조구의 최대 흡광도를 기준으로 혼합첨가구에 *L. plantarum*의 성장둔화에 따른 흡광도값을 백분율(%)로 계산하였다. 이때 *L. plantarum*의 접종량은 약  $10^5$  cfu/ml이었으며, MRS 배지의 pH는 6.5로 균일화 하였다.

결과 및 고찰

MRS 배지에 *L. plantarum*을 접종하고, 200 ppm lysozyme, 200 ppm lysozyme과 0.1% glycine 및 0.1% lysine을 혼합, 첨가한 후 660 nm에서의 흡광도(O.D.)로 접종균의 성장 정도를 대조구와 비교하여 나타낸 것은 Fig. 1과 같다. 흡광도는 배양 초기부터 시간이 지남에 따라 첨가구별 차이는 있었지만 모두 증가하였다. 대조구에서 흡광도는 배양 후 4시간부터 12시간 사이에서 급격히 증가하였으며, 16시간 만에 흡광도가 최대에 도달함으로써 660 nm에서는 빛이 더 이상 투과할 수 없을

Table 1. Mixture effect of lysozyme and glycine on inhibition(%) of *Lactobacillus plantarum* growth after 12 hr at 32°C

Lysozyme (ppm)	Glycine(%)					
	0	0.1	0.2	0.3	0.5	1.0
0	0	1	1	4	15	50
40	1	2	2	8	20	84
80	4	4	4	15	44	100
120	15	29	34	48	77	100
200	30	62	77	82	100	100

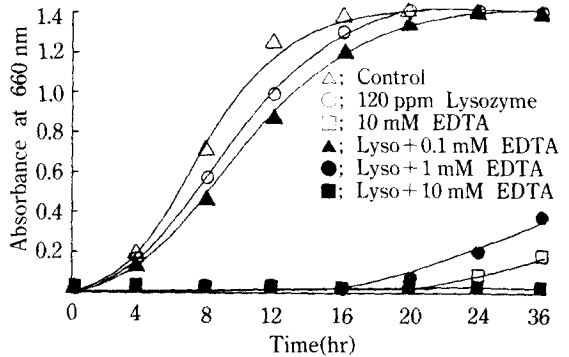


Fig. 2. Effect of lysozyme and EDTA on the lysis of growing cells of *Lactobacillus plantarum* in MRS broth, measured by absorbance during 36 hr at 32°C

정도로 균이 성장하였음을 나타내었다. 이에 반하여 200 ppm lysozyme과 0.1% glycine 혼합첨가구는 배양 후 8시간까지도 거의 흡광도가 증가하지 않아 접종균의 성장에 상당한 초기 억제효과가 있었다. 0.1% lysine 첨가구는 대조구에 비해 초기 억제력이 약간 있었으나 Chassy와 Giuffrida(1980)<sup>(7)</sup>의 lysine이 그람양성균에 대해 lysozyme과 함께 용균촉진효과가 있었다는 보고에는 다소 미흡한 것으로 나타났다. 이와 같이 lysozyme과 glycine 혼합첨가구가 lysozyme 단독첨가구보다 균의 성장 억제효과가 더 큰 것은 glycine이 세포벽 합성을 억제시키고, 일부 용해시키기 때문에 lysozyme의 역할 정도가 상승되었음을 시사한다.

Lysozyme과 glycine의 상승 또는 병용효과를 확인하기 위하여 Table 1과 같이 lysozyme 0, 40, 80, 120, 200 ppm과 glycine 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0%를 각각 조합하여 MRS 배지에서 32°C, 12시간 배양시켰다. MRS 배지의 흡광도로 660 nm에서 측정된 결과, lysozyme 및 glycine의 농도가 각각 증가할수록 그 조합에 의한 상승 또는 병용효과도 현저히 증가하였으며, 배지내에 lysozyme이 200 ppm 존재시에는 0.5% 이상의 glycine으로, 1.0% glycine 존재시에는 80 ppm 이상의 lysozyme으로 100% 억제효과가 있었다.

Lysozyme과 EDTA의 상호작용에 의한 *L. plantarum*

**Table 2. Mixture effect of lysozyme and EDTA on inhibition(%) of *Lactobacillus plantarum* growth after 12 hr at 32°C**

Lysozyme (ppm)	EDTA(mM)				
	0	0.2	0.4	0.8	1.2
0	0	14	82	92	100
40	0	18	85	94	100
80	5	20	85	94	100
120	14	35	90	97	100
200	45	58	92	100	100

의 성장 억제효과를 고찰하기 위하여 120 ppm lysozyme에 0.1, 1, 10 mM의 EDTA를 혼합첨가하여 120 ppm lysozyme 및 10 mM EDTA 단독첨가 경우와 비교하였다 (Fig. 2). 그 결과 lysozyme 단독첨가구보다 EDTA 혼합첨가구에서 균의 성장 억제효과가 향상됨을 알 수 있었다. 즉 대조구와 120 ppm lysozyme 첨가구에서는 약 16시간만에 흡광도가 최대치를 나타내었으나, 120 ppm lysozyme과 0.1 mM EDTA 혼합첨가구에서는 20시간에 흡광도가 최대치를 보여 lysozyme 단독첨가구보다 균의 성장속도가 4시간 정도 지연되었다. EDTA의 농도를 1 mM 또는 10 mM로 높여 120 ppm lysozyme에 첨가하면 배양기간이 24시간 이상 경과하여도 흡광도가 증가하지 않았으며, 특히 120 ppm lysozyme과 10 mM EDTA 첨가구는 36시간이 지나도 흡광도가 증가하지 않아 집중균 성장 억제효과가 높았다.

집중균 생육 억제에 대하여 lysozyme과 EDTA를 각 농도별 조합으로 배지에 첨가하였을 때 상승 또는 병용효과는 Table 2와 같다. Lysozyme 120 ppm 이상의 농도에 EDTA 0.4 mM 이상의 농도를 MRS 배지에 첨가하면 배양 12시간에 90% 이상의 억제효과가, lysozyme 200 ppm 이상과 EDTA 0.8 mM 이상이면 100% 억제효과가 인정되었다. 그런데 EDTA 1.2 mM 첨가시 lysozyme의 농도에 관계없이 100% 억제효과를 나타내는 것으로 보아 lysozyme과 EDTA의 상승 또는 병용효과뿐 아니라 EDTA 단독효과도 강력한 것으로 나타났다. EDTA가 용균을 촉진시키나 lysozyme의 역가증진에는 영향을 미치지 못한다고 Parry<sup>(5)</sup> 등, Vakil<sup>(6)</sup> 등이 연구한 바 있으나 본 실험에서도 EDTA에 의한 *L. plantarum*의 성장억제에 대한 상승 또는 병용효과를 확신할 수 있었다. 이것은 EDTA 자체로도 금속이온의 봉쇄작용에 의해 박테리아 세포벽을 부분적으로 파괴시킬 수 있기 때문에 lysozyme의 용균작용이 더 용이할 수 있으리라 사료되었다.

## 요 약

MRS 배지에 *Lactobacillus plantarum*을 접종하고 200 ppm lysozyme에 0.1% glycine 또는 0.1% lysine을 단독 및 혼합 첨가하여 균의 성장 억제효과를 조사하였다. 각 첨가구 모두 대조구에 비하여 집중균 성장 억제효과가 높았으며, 특히 lysozyme과 glycine 혼합첨가구는 그 효과가 현저하므로 각각을 농도별로 조합첨가하였을 때 상승 또는 병용효과가 있었다. Lysozyme과 glycine 각각의 농도가 증가할수록 성장 억제효과는 증가하였으며, lysozyme 200 ppm 이상과 glycine 0.5% 이상의 조합에서는 100% 성장 억제효과를 나타내었다. 또한 배지에 120 ppm lysozyme과 0.1, 1, 10 mM의 EDTA를 단독 및 혼합첨가하고 균의 성장 억제효과를 조사하였으며, 모든 첨가구에서 대조구보다 높은 억제효과를 나타내었고, 120 ppm 이상의 lysozyme과 0.8 mM 이상의 EDTA 혼합첨가구에서는 97% 억제효과가 인정되었다.

## 문 헌

- Haseelberger, F.X.: The cell lysis of microorganism. In *Uses of Enzymes and Immobilized Enzymes*, Nelsonhall Inc. Publishers Chicago, p.128(1978)
- Yajima, M., Hidaka, Y., and Matsuoka, Y.: Studies on egg white lysozyme as a preservative of sake(II). *J. Ferment. Technol.*, **49**, 693(1971)
- Yajima, M., Hidaka, Y., Ota, R., Hara, K. and Matsuoka, Y.: Sake preservation. *Japanese patent*, 1972, 7357(1972)
- Igarashi, H., and Zaima, H.: Seafood preservation. *Japanese patent*, 1971, 19576(1971)
- Parry, R.M., Chandan, R.C., and Shahani, K.M.: A rapid and sensitive assay of muramidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **119**, 384(1969)
- Vakil, J.R., Parry, R.M., Chandan, R.C., and Shahani, K.M.: Susceptibility of several microorganisms to milk lysozymes. *J. Dairy. Sci.*, **52**, 1192(1969)
- Chassy, B.M., and Giuffrida, A.: Method for the lysis of gram-positive, asporogenous bacteria with lysozyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 153(1980)
- Yashidake, S. and Sinichiro, A.: Use of egg white lysozyme in the food industry. *New Food Inc.*, **19**, 17(1977)
- Komagata, K., Ogawa, M., Fukushima, K., and Ito, T.: Inhibitory effect of glycine on microorganisms. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **9**, 289(1968)
- Singleton, P., and Stainsbury, D.: Sphaeroplast. In *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology.*, The Bath Press Ltd., Bath, Avon, p.826(1987)

(1991년 4월 26일 접수)