

## 양식넙치로부터의 Lysozyme 정제와 어류병원성 세균에 대한 정균작용

김진우, 박수일\*, 전세규\*

국립수산진흥원 병리과, \*부산수산대학교 어병학과

넙치의 혈청, 채포점액 및 각 조직으로부터 lysozyme의 분리와 정제를 Chitin-coated Cellulose column 크로마토그래피를 사용하여 분리하였다. 15% SDS-PAGE의 전기 영동상을 조사한 결과 넙치의 신장, 유문수, 아가미 점액 및 혈청으로부터 분리된 lysozyme은 동일한 분자량(약 14000)을 나타내었다. 넙치의 방어기작으로서 lysozyme의 역할을 밝히기 위해 그람양성 세균 2주, 그람음성 세균 5주에 대하여 넙치 신장 유래 lysozyme의 정균작용을 조사한 결과 그람 양성 2주 그람 음성 세균 2주에 대하여 정균작용을 나타내었다. 이것은 넙치 유래의 lysozyme은 그람 양성 세균뿐만 아니라 그람 음성 세균에 대해서는 생체 방어 작용을 수행하는 것으로 고려된다.

Key Words : Chitin-coated cellulose, SDS-PAGE, Antibacterial activity

Lysozyme은 자연계 넓게 분포하는 효소로서 세균 세포벽 성분중의 peptidoglycan의  $\beta$ -1, 4-glycoside결합을 가수분해하여 세균, 특히 세포벽의 주성분이 peptidoglycan인 그람 양성세균을 용해시키는 것으로 알려져 있다. 이외에도 읍소닌, 항바이러스, 항암작용 등에도 관여를 함으로서 고등동물의 방어기작에 주요한 역할을 하는 것으로 보고 되었다(Jolles and Jolles, 1984). 하등동물에 속하는 어류의 경우 고등동물에 비하여 항체의 유전자수가 적기 때문에 항체의 class 및 그 종류가 적어(Ellis, 1982; Tonegawa, 1983; Matsunaga, 1985) 항체가 주축이 되는 면역반응 만으로는 충분한 방어기작을 유지하기가 어렵다. 따라서 효소 등에 의한 비특이 방어기작들이 이를 보완하여 주는 것으로 생각되어 지는데, 그 중 대표적인 것으로 lysozyme을 들 수 있다. 실제 여러 종류의 어류에서부터 lysozyme을 분리하였다는 보고들이 있으며(Fange *et al.*, 1976; Grinde *et al.*, 1988; Lie *et al.*, 1989) 어류의 lysozyme이 여러종류의 물고기의 세균성 병원체에 대하여 정균효과가 있다는 보고도 있다(Grinde, 1989).

따라서 본 논문에서는 넙치의 비특이적 방어작용에

대한 연구의 일환으로서 넙치의 혈청, 아가미 점액 및 여러 장기중에 존재하는 lysozyme을 분리하고, 또 그 물질이 어류병원성 세균에 대한 정균작용을 조사하였다.

### 재료 및 방법

실험에 사용된 넙치 *Paralichthys olivaceus*(300~400g)는 국립수산진흥원에서 사육중인 넙치를 사용했고, 실험기간중 수온은 18~26°C의 범위였다. 넙치로부터 lysozyme의 분리는 chitin-coated cellulose(CC-cellulose)를 사용하여 Imoto와 Yagishita(1973)의 방법에 따라 행하였다. 먼저 lysozyme의 흡착제로 사용할 CC-cellulose의 제조는 다음과 같이 하였다. 계의 겹질에서 정제한 chitin(Sigma, USA) 5g을 42% (w/v) NaOH용액 50ml에 넣고 34°C에서 3시간동안 반응시켰다. 여과를 하여 NaOH용액을 제거한 후 남은 alkaline chitin에 3.5배량의 잘게 부순 얼음을 첨가하였다. 세게 흔들어 얼음을 다 녹인 후 cellulose powder(Sigma, USA) 5g을 넣고 섞었다. 여기에 차가운 증류수 80ml를 넣어 잘 섞은 다음

2M 빙초산 300ml를 첨가하였다. 이와같은 과정을 거쳐 제조된 CC-cellulose를 차가운 증류수로 여러번 세척을 한후 실험에 사용할때까지 증류수에서 냉장보관하였다. 이 CC-cellulose column을 사용한 lysozyme의 분리는 다음과 같은 과정으로 행하였다(Fig. 1). 즉, 넙치의 각 조직으로부터 시료를 취하여 1M NaCl을 함유한 0.005 M Sorensen 인산완충액(pH 8.0)을 시료무게의 5 배량을 첨가하여 glass homogenizer로 균질화 시켰다. 원심 분리하여 그 상층액을 CC-cellulose와 혼합하여 lysoz-

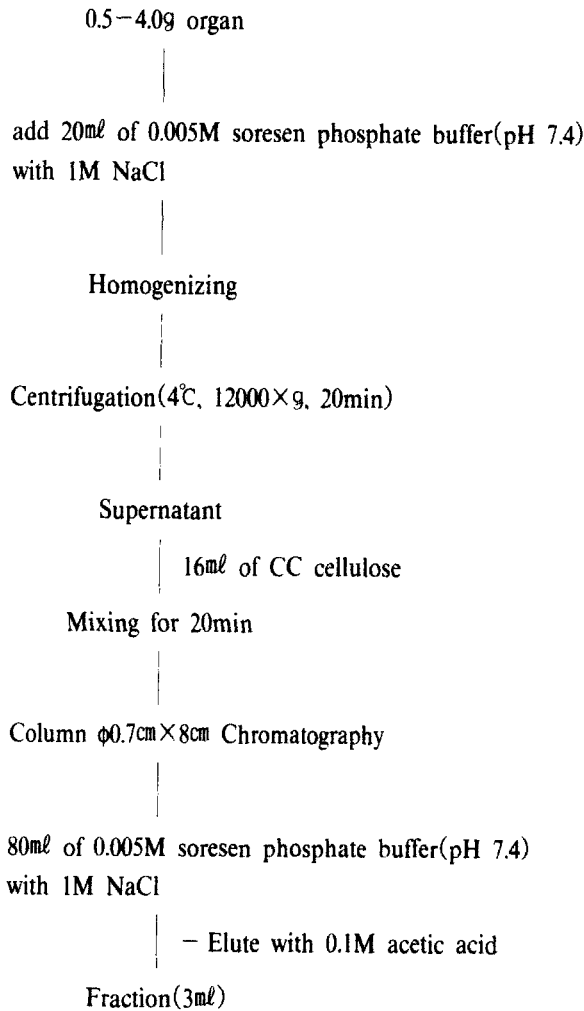


Fig. 1. Scheme of isolation of lysozyme from flounder organs

yme을 CC-cellulose에 흡착시켰다. 흡착되지 않은 물질들을 다량의 0.005M Sorensen의 인산완충액으로 씻어 내어 용출되는 분획의 OD<sub>280</sub>값이 0이 되었을 때 0.1M acetic acid로 용출시킨후 각 용출분획의 OD<sub>280</sub>값과 *Micrococcus lysodeikticus* 건조균체(Sigma Co)를 사용한 활성을 측정했다.

넙치의 각 조직에서 추출하여 정제한 lysozyme들의 정제정도와 각각의 분자량을 알아보기 위하여 Laemmli (1970)의 방법에 따라 전기영동을 하였다. 먼저 CC-cellulose분획중 용균활성이 있는 부분을 모아 증류수에 투석시킨 후 polyethylene glycol을 사용하여 농축을 시킨 다음 15% SDS-polyacrylamide gel(SDS-PAGE) 상에서 150V에서 5시간동안 전기영동을 하였다. Gel상의 단백질들은 coomassie blue로 염색을 한 후 methyl alcohol : acetic acid(7.5% : 5%)로 탈색을 하여 관찰하였다.

넙치 신장으로부터 분리한 lysozyme의 병원성 세균에 대한 정균작용을 조사하기 위하여 여러종류의 세균들을 접종한 각각의 0.5% NaCl을 함유한 nutrient broth에 lysozyme을 첨가한 후 각 세균들의 성장정도를 알아보았다. 이 실험에 사용한 세균들은 그람 음성세균으로서 *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas hydrophilla*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas fluorescense* 그리고 *Escherichia coli* 등이었고 그람 양성 세균들로는 *Micrococcus leteus*와 *Staphylococcus epidermis* 등이었다. 이들 세균들을 nutrient broth 접종하여 35°C에서 16시간 배양하여 활성화시킨 후 각각 0.5ml씩을 취하여 새로이 준비한 nutrient broth 10ml에 접종하였다. 이와같은 것을 두개씩 준비하여 하나는 대조구로서 0.005M Sorensen 인산완충용액 0.5ml을 넣었고 나머지 하나에는 동일 완충용액에 0.05 mg/ml 농도를 들어 있는 lysozyme 0.5ml를 첨가하였다. 이들 각각을 35°C에서 진탕 배양을 하면서 일정시간마다 시료를 취하여 흡광도(OD<sub>530</sub>)을 측정하였다.

## 결 과

넙치 신장 추출액을 CC-cellulose column 크로마토그

라피에 용출시킨 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 0.1M 초산을 투여직후 OD 280nm에서 흡수치를 나타내기 시작했고 분획물의 *M. lysodeikticus*에서 용균활성은 분획물의 흡광치와 거의 일치하였다(Fig. 2).

넙치 혈청, 아가미 점액, 유문수, 신장을 동일한 방법으로 용출시킨 후 Polyethylene glycol로 농축하여 15% 불연속 SDS-PAGE에도 혈청, 아가미점액, 신장에서 분자량 약 14000. 유문수에서도 몇개의 밴드가 나타났으나 분자량 약 14000의 물질 검출되었다.

넙치의 신장에서 분리한 lysozyme의 병원성 세균에 대한 정균작용을 조사한 결과 Fig. 4과 같았다. 실험에 사용한 7종류의 세균 모두에 대하여 정균효과를 보였으나 특히 *M. luteuse*에 대하여는 매우 높은 정균효과를 나타내었고, 이외에도 *A. hydrophyla*, *P. fluorescense* 그리고 *S. epidermis* 등의 세균들에 대하여도 높은 정균효과를 나타내었다. 접종후 시간별로 정균효과를 보면 5시간째 측정하였을 때까지는 실험에 사용한 세균 거의 모두에서 매우 높은 정균효과가 관찰되어 *A. hydrophyla*와 *M.*

*luteuse*의 경우에는 세균들이 거의 성장하지 못하였고 다른 세균들도 성장 억제정도가 매우 심하였다. 그러나 14시간째 측정하였을 때는 비록 어느정도의 정균효과는 남아 있었지만 5시간째에 관찰되었던 것에 비하여 그 정도가 미약하였다.

## 고 찰

넙치의 신장, 아가미, 유문수 그리고 혈액 추출하여 순수 분리한 lysozyme들의 크기를 비교한 결과 모두 14000정도로 동일 하였으며 이것은 계란의 lysozyme과 같은 크기 이었다. 이와같이 넙치에서 추출한 lysozyme이 *Micrococcus lysodeikticus*를 용해 시키고 그 크기가 14000정도인 것으로부터 이 효소는 Salton(1957)과 Jolles(1969)등이 제안한 "true lysozyme"에 속한다고 할 수 있다. 넙치에 한종류의 lysozyme만 존재한다는 사실은 coho 연어와 Atlantic 연어의 경우(Lie et al., 1989; Yousif et al., 1991)와 일치하는 것이다. 그러나 무지개

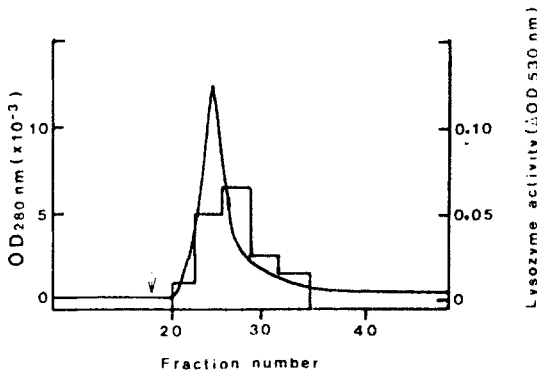


Fig. 2. Chromatography of chitin coated cellulose of flounder kidney extract. Fractions(3ml) were eluted at 1ml/min from a column(0.7×8cm), with 0.1M phosphate buffer(pH 8.0) containing 1M NaCl and then with 0.1M acetic acid. Arrow indicates the point of eluant change. The histogram indicates fractions containing lysozyme.

Fig. 3. SDS-PAGE patterns of flounder organs (fraction with lytic activity against *M. lysodeikticus* eluted from CC-cellulose) polyacrylamide gel stained with commassie blue. a; kidney, b; pyloric caecum, c; gill, d; bio-Rad low molecular weight standard, e; serum

## Purification and antibacterial effect of lysozyme from flounder

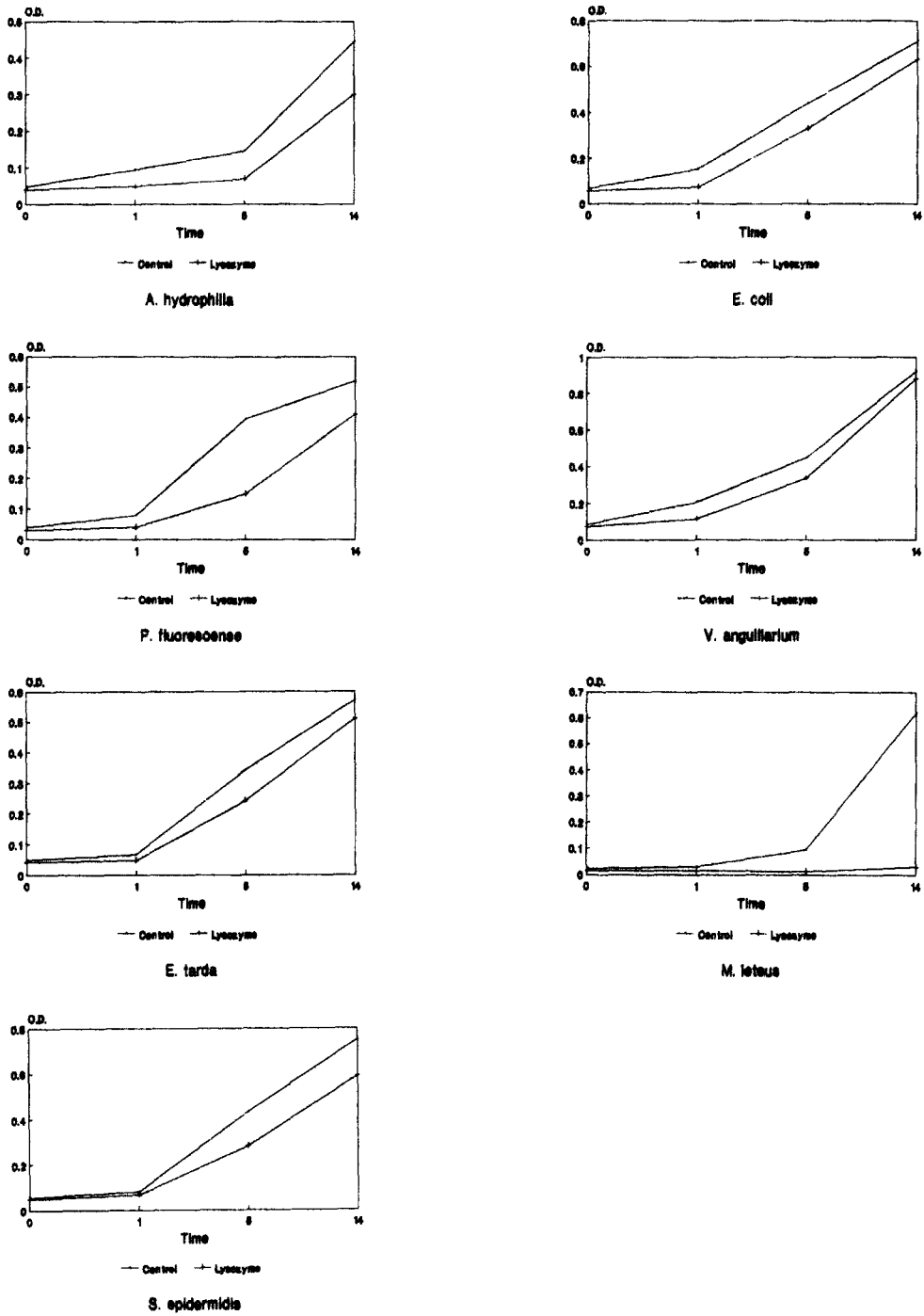


Fig. 4. Bacteriostatic effect of flounder lysozyme on seven strains of bacterial pathogens. The bacteria was inoculated in the absence.

송어는 분자량 14500과 23000정도의 두종류 lysozyme을 지니는 것으로 보고되어(Yousif *et al.*, 1991) 넙치에서도 본 논문에서 밝혀낸 분자량 14000인 것 이외의 lysozyme이 존재할 가능성을 제시하여 준다. 만약 넙치내에 용균활성이 다른 두종류 이상의 lysozyme들이 존재한다고 했을 때 본 실험에서는 용균활성이 높은 것만 관찰하고 활성이 낮은 것들은 관찰하지 못하였을 가능성도 있다. 실제 lysozyme에 대하여 많은 연구가 되어 있는 포유류와 조류의 경우 여러 종류의 lysozyme들이 있는 것으로 밝혀져 있고, 넙치를 비롯한 다른 어종들도 연구가 더 많이 진행되면 두 종류 이상의 lysozyme들이 발견될 가능성이 있다. 여하튼 본 논문의 결과로부터 넙치의 여러 조직들에 분자량 14000의 lysozyme이 존재하며 만약 다른 종류의 lysozyme이 존재한다면 분자량 14000의 lysozyme이 높은 용균활성을 지니는 것으로 생각된다.

Lysozyme은 세균성 감염에 대한 어류의 비특이적 방어체계의 주요한 요소로 주장되어 왔다(Fange *et al.*, 1976; Lindsay, 1986). 따라서 넙치의 lysozyme도 비특이적 방어작용을 한다고 가정하였을 때 여러종류의 병원성 세균들에 대하여 어떠한 작용을 하는지 정균효과를 통하여 알아 보았다. 그 결과 실험에 사용한 모든 세균들에 대하여 정균 효과가 있었는데 특히 *M. luteuse*, *A. hydrophyla*, *P. fluorescens* 그리고 *S. epidermis* 등에 대하여 높은 정균효과를 보였으나, *E. coli*, *E. tarda*, *V. anguillarum*에 대해서는 정균효과가 미약하였다. 그러나 실제 생체내에서는 lysozyme이 보체나 식세포 등과 협력하여 훨씬 높은 용균효과를 보일 것이므로 본 실험 결과보다 더 많은 종류의 세균을 훨씬 더 효과적으로 용해시킬 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Ellis, A. E. : Differences between the immune mechanisms of fish and higher vertebrates. In *Microbial Diseases of fish*, ed. by R. J. Kobert, pp. 1~29. Academic Press, London, 1982.
- Fange, R., Lundblad, G. and Lind, L. : Lysozyme and chitinase in the blood and lymphomyeloid tissues of marine fish. *Mar. Biol.* 36 : 277~282, 1976.
- Grinde, B. : Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial against fish pathogens. *Natural of Fish Diseases* 12 : 95~104, 1989.
- Grinde, B. : The complement lysozyme sequence in immune bacteriolysis. *Immunology* 16 : 463~471, 1989.
- Grinde, B., Jolles, J. and Jolles, P. : Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout(*Salmo gairdneri*). *Eur. J. Biochem.* 173 : 269~273, 1988.
- Imoto, T. and Yagishita, K. : Chitin coated cellulose as an adsorbent of lysozyme-like enzymes. Preparation and properties. *Agric. biol. Chem.* 37 : 465~470, 1973.
- Jolles, p. and Jolles, J. : What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol. Biochem.* 63 : 165~189, 1984.
- Jolles, P. : Lysozymes a chapter of molecular biology. *Angew. Chem. int. Ed. Engl.* 8 : 227~239, 1969.
- Lie, O., Evensen, O., Sorensen, A. and Froysadal, E. : Study on lysozyme activity in some fish species. *Diseases of Aquatic Organisms* 6 : 1~5, 1989.
- Lie, O., Evensen, O., Sorensen, A. and Froysadal, E. : Study on lysozyme activity in some fish species. *Diseases of Aquatic Organisms* 6 : 1~5, 1989.
- Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assemble of the head of bacteriophage T4. *Nature, Lond.* 227 : 680~685, 1970.
- Lindsay, G. J. H. : The significance of chitinolytic enzymes and lysozyme in rainbow trout *Salmo gairdneri* defence. *Aquaculture* 51 : 169~173, 1986.
- Salton, M. R. J. : The properties of lysozyme and its action on microorganisms. *Bact. Rev.* 21 : 82~99,

1957.  
Yousif, A. N., Albright, L. J. and Evelyn, T. P. :  
Occurrence of lysozyme in the eggs of coho salmon

*Oncorhynchus kisutch*. *Dis. aquat. Org.* 10 : 45~49,  
1991.

---

## Purification and antibacterial effect of lysozyme from flounder, *Paralichthys olivaceus*

Jin-Woo Kim, Soo-Il Park\* and Seh-Kyu Chun\*

*Pathology Division National Fisheries Research and Development Agency, Kyong Nam 626—  
900, Korea and \*Department of Fish Pathology, National Fisheries University of Pusan 608—  
737, Korea*

Lysozymes were isolated and purified from various organs of cultured flounder by using chitin-coated cellulose column chromatography. The molecular weights of them were compared with each other in 15% SDS-PAGE gels. The result showed that all lysozymes isolated from various organs of flounder had the same molecular weight of about 14000. To clarify the role of lysozyme as a body defence, the antibacterial activities of flounder lysozyme on seven bacterial pathogens, five Gram-negative and two Gram-positive species, were investigated. The lysozyme had substantial antibacterial activity on four strains, two Gram-negative and two Gram-positive species. These suggest that flounder lysozyme plays a role in body defence against both Gram-negative and Gram-positive bacterial pathogens.