

Chitinase/ β -1,3-glucanase 활성 동시보유 벼잎단백질 분획의 성질

엄성연 · 김수일

서울대학교 농업생명과학대학 농화학과 및 농업생물신소재연구센터

초록 : 벼잎의 산성 buffer(pH 2.8) 추출 조효소는 5개의 전기영동 band들이 PR protein으로 알려진 chitinase와 β -1,3-glucanase의 효소활성을 보유하고 있는 것으로 나타났다. 조효소는 DEAE-cellulose 및 chitin affinity chromatography로 염기성 및 산성 효소군으로 분획되었으며, 이들은 두 효소활성 이외에도 lysozyme 활성을 보유하고 있었다. 분자량이 14.3~66.0 kd 범위인 이 두 효소군이 보유한 각 효소활성의 최적 pH와 온도를 조사해본 결과, β -1,3-glucanase는 각각 pH 5와 60°C로 동일하였으나, chitinase는 염기성 효소군에서 pH 4와 50°C, 산성 효소군에서는 pH 3와 60°C로 다르게 나타나서, 전기영동 양상과 더불어 서로 상이한 효소분획인 것으로 추정되었다(1993년 8월 30일 접수, 1993년 9월 8일 수리).

식물체내에서 병원균의 침입에 의해 유도되는 단백질인 pathogenesis-related (PR) protein¹⁻⁴⁾은 분자량이 25~40 kd인 저분자 단백질로, 미생물의 세포벽 구성성분인 chitin과 β -1,3-glucan을 가수분해하는 chitinase와 β -1,3-glucanase를 포함하고 있어 이들이 식물의 자체방어에 관련된다고 보고되고 있다.^{2,5-8)} 여러 식물에서 발견, 정제된 chitinase⁹⁾는 병원균의 침입⁹⁻¹¹⁾ 이외에도 환경 자극^{3,12-13)}에 의하여도 유도되며, 산성 및 염기성인 여러 가지 isozyme이 존재한다.^{10,14-16)} 또한 β -1,3-glucanase도 많은 식물체에서 여러가지 isozyme 형태로 존재함^{14-15,17-18)}이 밝혀졌고, 이들은 단독으로보다는 chitinase와는 협력작용으로 *in vitro*에서 곰팡이의 생육을 강력하게 저해한다고 보고되고 있다.¹⁹⁾ 이들 chitinase와 β -1,3-glucanase는 대부분 endo형 효소로서 물리화학적 성질은 비슷하나, 동일 식물에서 유래된 두 효소 간에는 면역학적 교차반응이 없으며, 또한 아미노산 서열도 유사성이 없어서 서로 다른 효소인 것으로 발표되고 있다.⁶⁾ 본 실험에서는 도열병에 감염된 벼잎으로부터 chitinase 및 β -1,3-glucanase 활성을 보유하고 있는 단백질분획을 확인하고 이들의 몇가지 성질을 알아보기로 하였다.

재료 및 방법

시료

1991년 7월 중순에 서울대학교 농업생명과학대학 도

열병 시험포장에서 채취한 도열병에 걸린 벼(낙동)의 잎을 증류수에 세척한 뒤 -20°C에서 냉동 보관하면서 시료로 사용하였다.

조효소의 추출

추출용액으로는 50 mM sodium citrate(pH 5.0) buffer 또는 acid extraction buffer(pH 2.8, 84 mM citrate-32 mM Na₂HPO₄-14 mM β -mercaptoethanol-6 mM ascorbic acid)⁴⁾를 사용하였다. 각 추출용액 150 ml에 벼 잎 30 g을 넣고 마쇄, 상징액을 분리한 후 ammonium sulfate를 60 또는 90%가 포화되게 첨가하여 얻은 침전물을 50 mM sodium citrate(pH 5.0) buffer에 녹인 후 동일 buffer에 투석하여 ammonium sulfate를 제거한 것을 조효소액으로 하였다.

Column chromatography

조효소액의 ion exchange chromatography는 50 mM Tris-HCl(pH 7.3) buffer에 평형시킨 DEAE-cellulose column(5.5×40 cm)을 사용하여 박 등²⁰⁾의 방법에 따라 행하였고, affinity chromatography는 Molano 등의 방법²¹⁾으로 제조한 regenerated chitin을 증류수에 현탁시킨 뒤 15×4 cm Büchner funnel에 균일하게 충전한 후 다음과 같이 행하였다. 50 mM sodium phosphate buffer(pH 5.0)에 평형시킨 효소액을 chitin funnel에 주입 후 증류수로 chitin에 흡착되지 않은 단백질을 제거하고 20 mM acetic

Key words : Rice leaves, chitinase, β -1,3-glucanase, basic and acidic fractions
Corresponding author : S. I. Kim.

acid(pH 3.2)와 50 mM sodium phosphate buffer(pH 8.0)의 순서로 chitin에 흡착된 단백질을 용출시켰다. 이때의 용출속도는 20 ml/min로 조절하였다.

각 분획의 280 nm에서의 흡광도와 chitinase 및 β -1,3-glucanase 활성을 측정하고 두 효소 활성이 있는 분획들을 모아 ultrafiltration으로 농축하여 다음 실험에 사용하였다.

전기영동 및 전기영동 gel 상 효소활성 band의 검정

Native-PAGE(non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis)은 10% acrylamide 농도에서 Tris-HCl buffer(pH 8.48) 및 Tris- H_3PO_4 buffer(pH 6.90)를 사용한 discontinuous system으로^{20,22)}하였다. SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)는 Laemmli의 방법²³⁾을 일부 수정한 0.1% SDS를 사용하여 행하였으며, 단백질 band는 Coomassie brilliant blue R-250을 사용하여 검출하였다.

Native-PAGE 및 SDS-PAGE gel상의 chitinase 효소 활성 band의 검출은 Trudel 등²⁴⁾의 방법을 일부 수정한 방법²⁰⁾으로 glycol chitin을 기질로 하여 이것이 분해된 위치를 Calcofluor white M2R로 염색하여 검출하였다. β -1,3-glucanase 효소활성은 Pan 등²⁵⁾ 방법을 사용한 것으로 laminarin을 분해시킨 후 TTC(2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride)로 발색하여 검출하였다.

효소활성 측정

Chitinase 활성은 regenerated chitin을 기질로 하여 Boller 등¹²⁾의 방법을 일부 수정한 박 등^{20,26)}의 방법을 사용하여 유리되는 NAG(*N*-acetylglucosamine)를 측정하였으며, β -1,3-glucanase 활성은 laminarin을 기질로 하여 효소에 의해 분해되어 생성되는 환원당량을 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid)로 측정하는 Finks 등²⁷⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. 효소 단위 1 unit는 각 실험반응조건에서 1분에 1 nmole의 NAG 및 환원당을 생산하는 효소량으로 하였다.²⁸⁾ 단지 lysozyme은 1분에 0.001의 흡광도 감소를 가져오는 효소량을 1 unit로 하였다.²⁸⁾

pH 및 온도에 따른 효소활성 변화는, pH는 2.3-8 범위에서 50 mM citric acid- Na_2HPO_4 (McIlvaine) buffer 및 sodium phosphate buffer를 이용하여 37°C에서 효소활성을 측정하였으며, 온도는 chitinase 경우 50 mM citric acid- Na_2HPO_4 (McIlvaine) buffer(pH 4.0)에서, β -1,3-glucanase는 pH 5.0인 동일 buffer에서 반응온도를 20~80°C로 각각 유지시키면서 효소활성을 측정하였다.

분석 방법

환원당은 glucose를 표준으로 DNS를 사용하는 방법²⁷⁾으로, 단백질은 bovine serum albumin을 표준으로 Lowry³⁰⁾ 및 BCA(bicinchoninic acid)방법³¹⁾으로 정량하였다.

결 과

조효소의 추출

pH 5.0 및 pH 3.0인 두 가지 buffer를 사용하여 효소를 추출한 후 각 추출액을 60 또는 90% ammonium sulfate 포화시켜 얻은 조효소의 chitinase 비교활성을 조사한 결과, pH 5.0에서 추출된 조효소는 60, 90% ammonium sulfate 포화 침전시 비교활성도가 각각 1.84, 0.93 unit/mg protein인데 비하여 pH 3.0의 조효소는 각각 4.1 및 4.2 unit/mg protein로서 pH 5.0에서 추출한 것 보다 2~4 배 이상 높았다. 또한 pH 3.0에서는 ammonium sulfate 포화도에 따른 차이가 발견되지 않았다. 따라서 β -1,3-glucanase 효소활성은 측정하지 않았으나 chitinase 비교활성을 기준으로 할때, 조효소 제조는 pH 3.0인 산성 buffer, 60% ammonium sulfate 포화조건에서 보다 효과적이었으므로 이후에는 이 방법으로 계속 실험하였다. 실제로 van Loon 등⁴⁾은 PR-protein의 추출이 염기성 보다 산성인 조건에서 추출하는 것이 효과적이며 또한 침입한 미생물의 효소는 이러한 조건에서는 추출되지 않는다고 보고하고 있다. 본 조효소는 chitinase 활성이 외에도 β -1,3-glucanase 활성도 가지고 있었으며, 그 비활성도는 100 unit/mg protein이었다(Table 1).

조효소의 전기영동 양상 및 전기영동 gel 상 효소 활성

Table 1. Purification table of basic and acidic chitinase/ β -1,3-glucanase fractions

Fraction		Total activity (unit)	Total proteins (mg)	Specific activity (unit/mg)
Crude*	G	204677	204	100
	C	836.4		4.1
DA-1*	G	11183	102	110
	C	329.46		3.23
DA-2	G	7164	57	126
	C	367		6.44
CB	G	139.34	10.05	13.86
	C	56.06		5.88
CC*	G	4309.2	14.34	300.50
	C	174.38		12.16

C : Chitinase Activity G : β -1,3-Glucanase Activity

* Lysozyme Activity (specific activity)

Crude : 2.1 DA-1 (Basic) : 5.0 CC (Acidic) : 0.8

Native-PAGE에서 이 조효소는 13개의 단백질 band를 나타내었으며(Fig. 1), 이들의 chitinase 및 β -1,3-glucanase 활성을 검토해 본 결과, chitinase는 5·6·9·10·12·13번 band에서, β -1,3-glucanase는 2·3·6·7·9·10·12·13번 band에서 검출되었다(Fig. 1). 따라서 chitinase 및 β -1,3-glucanase 활성을 가지고 있는 band는 모두 5개로 6·9·10·12·13번 band였으며, chitinase 활성만 보유한 것은 5번 band, β -1,3-glucanase 활성만 가지고 있는 것은 2·3·7번 band이었다.

Chromatography에 의한 분획

Chitinase와 β -1,3-glucanase 활성을 같이 보유하고 있는 조효소는 DEAE-cellulose column에 흡착되지 않는 DA-1 분획과 DEAE-cellulose에 흡착된 후 NaCl 용액에 의해 용출되는 DA-2 분획으로 분리되었으며, 두 peak

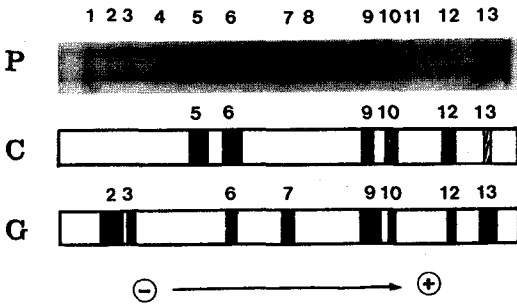


Fig. 1. Native PAGE pattern of crude enzyme from rice leaves P, Protein bands (stained with Coomassie brilliant blue); C, Chitinase activity band (stained with Calcofluor white M2R²⁴); G, β -1,3-glucanase activity band (stained with TTC²⁵)

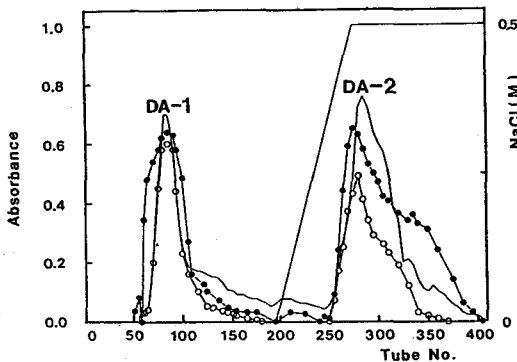


Fig. 2. DEAE-cellulose chromatography of crude enzyme from rice leaves —, Absorbance at 280 nm; ○—○, Absorbance at 585 nm (chitinase activity); ●—●, Absorbance at 500 nm (β -1,3-glucanase activity)

모두에서 chitinase와 β -1,3-glucanase 활성이 검출되었다(Fig. 2).

전기영동 결과 DA-1은 1부터 8번까지, DA-2는 9번부터 13번까지의 band를 주로 포함하고 있었으며(Fig. 4. A), pH 8.48에서 전기영동한 것을 감안하여 DA-1 분획을 염기성 효소군, DA-2 분획을 산성 효소군으로 분류하였다. 산성 효소군에서 두 효소의 비활성도가 더 높았으나(Table 1), 일부 염기성분획의 단백질을 포함하고 있어(Fig. 4. A), 이들을 제거하기 위하여 DA-2 분획을 chitin affinity chromatography로 정제하였다. CA·CB·CC 세 분획 중 CB와 CC에서 두 효소활성이 검출되었으며(Fig. 3), CB는 5~8번 band를, CC는 9~13번 band를 포함하고 있어 산성 효소군이 보다 순수하게 분리되었다(Fig. 4. A). 따라서 1~8번 band를 포함한 DA-1 분획을 염기성효소군으로, 9~13번 band를 포함한 CC 분획을 산성효소군으로 분류하고 그 효소적인 성질을 조사하였다. SDS-PAGE 결과, 산성 및 염기성 효소군은 14.3~66.0 kd의 분자량 범위에 분포하며(Fig. 4. B a), 이중 chitinase 활성은 22.0~42.9 kd에 존재하였다(Fig. 4. B b).

최적 pH

β -1,3-glucanase의 최적 활성 pH는 5로서 염기성 및 산성 효소군에서 동일한 것으로 나타났으나, chitinase의 경우에는 최적 활성 pH가 염기성 효소군의 경우는 4, 산성 효소군은 3으로 서로 상이하였다(Fig. 5). 또한 pH에 따른 효소 활성변화를 보면 β -1,3-glucanase는 pH 3~8의 범위에서 75% 이상의 높은 활성을 나타내고 있으나, chitinase는 pH 4.5~5.5의 범위에서만 80% 이상의 활성을 보이고 pH 7 이상의 조건에서는 활성이 급속도로 감소

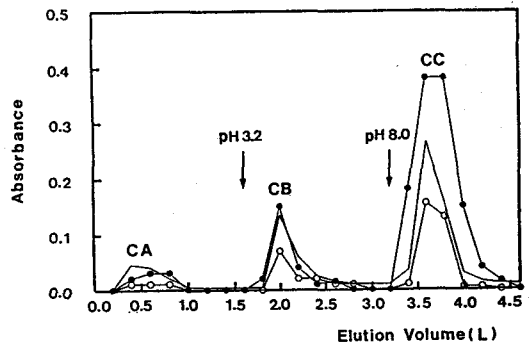


Fig. 3. Chitin affinity chromatography of DA-2 fraction isolated by DEAE-Cellulose ion exchange chromatography —, Absorbance at 280 nm; ○—○, Absorbance at 585 nm (chitinase activity); ●—●, Absorbance at 500 nm (β -1,3-glucanase activity)

하였으며, 이러한 활성 감소현상은 특히 산성 효소군에서 크게 나타났다(Fig. 5).

고찰

최적 활성 온도

20~80°C 범위에서 활성을 조사한 결과, β -1,3-glucanase는 최적 온도가 60°C 로서 혐기성 및 산성 효소군에서 동일하게 나타났으나, chitinase는 혐기성 효소군이 50°C, 산성 효소군이 60°C 로 최적 온도가 다르게 나타났다(Fig. 6). 80% 이상의 효소 활성을 보이는 온도 범위는, chitinase의 경우 혐기성 및 산성효소군 모두 35~65°C 이나, β -1,3-glucanase에서 혐기성효소군은 35~65°C, 산성 효소군은 20~65°C 로 나타났고, 특히 산성 효소군은 20°C 에서도 85% 이상의 높은 활성을 보유하고 있어 혐기성 효소군과 상이한 결과를 보였다. 한편, 두 효소활성 모두 70°C 이상에서 급속히 활성을 상실하였다(Fig. 6).

Lysozyme 활성

조효소 및 혐기성, 산성 효소군의 lysozyme 비교활성도는 각각 2.1, 5.0, 0.8 unit/mg protein이었다(Table 1).

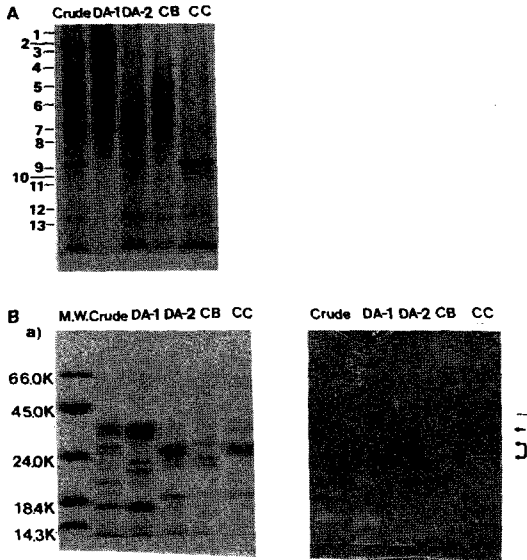


Fig. 4. Electrophoresis patterns of fractions separated by DEAE-Cellulose and chitin affinity chromatography A, Native PAGE, protein bands (stained with Coomassie brilliant blue), Crude, Crude enzyme from rice leaves; DA-1,2, Fractions on DEAE-cellulose chromatography; CB, CC, Fractions on chitin affinity chromatography; B, SDS-PAGE, a) Protein bands (stained with Coomassie brilliant blue); b) Chitinase activity bands (stained with Calcofluor white M2R²⁴); Arrows indicate chitinase activity.

Chitinase와 β -1,3-glucanase는 병원성 미생물이 식물에 침입하였을 때 유도되는 PR protein으로, *in vitro*에서 두 효소의 병원성 미생물에 대한 성장저해 실험결과 단독 처리시 보다는 두 효소를 동시 처리하였을때 성장저해가 더 크게 나타나서 상승 효과가 있음이 보고되었다.^{5,6,19} 식물에서 발견되는, chitin을 분해하는 chitinase 및 laminarin을 기질로 하는 β -1,3-glucanase는, 일부 식물에서 다른 화합물도 기질로 사용하는 bifunctionality가 있는 경우가 발표되고 있는데, chitinase의 경우 lysozyme^{4,12,14,15,28,32,33} phenylalanine ammonia lyase,³⁴ α -amylase inhibitor³⁵로서의 기능을 같이 보유 하는 것으로 보고

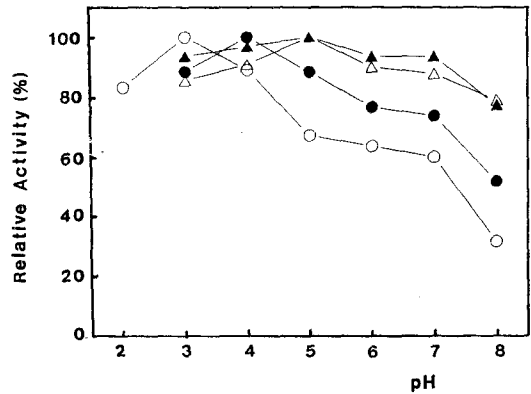


Fig. 5. Effect of pH on the activity of basic and acidic chitinase/ β -1,3-glucanase fractions ●—●, Basic chitinase; ○—○, Acidic chitinase; ▲—▲, Basic β -1,3-glucanase; △—△, Acidic β -1,3-glucanase

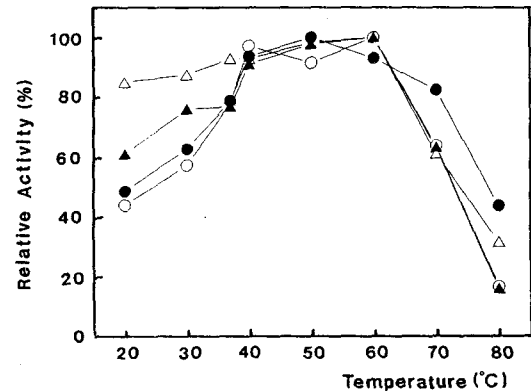


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of basic and acidic chitinase/ β -1,3-glucanase fractions ●—●, Basic chitinase; ○—○, Acidic chitinase; ▲—▲, Basic β -1,3-glucanase; △—△, Acidic β -1,3-glucanase

되고 있고, β -1,3-glucanase는 glucosidase^{36,37)} 활성을 같이 나타내는 것으로 보고되고 있다. 그러나 병원성 미생물의 생육을 효과적으로 저해할 수 있는 두 효소, 즉 chitinase 및 β -1,3-glucanase 활성을 한 효소가 보유하고 있다는 것은 아직 보고되어 있지 않다.

본 실험에 분리한 벼잎 산성 buffer 추출 조효소는, 전기영동상 5종의 단일 단백질 band가 chitinase 및 β -1,3-glucanase 활성을 함께 보유하고 있었으며, 이들은 DEAE-cellulose 및 chitin affinity chromatography에 의하여 염기성 및 산성 효소군으로 분류될 수 있었다. 이러한 결과는 벼잎에 chitinase와 β -1,3-glucanase 활성을 동시에 보유하는 bifunctionality가 있는 효소가 존재할 수 있음을 시사하고 있으나, 이는 각 단백질을 순수 분리한 후 그들의 성질을 규명한 후에야 확인할 수 있을 것이며, 이러한 연구 결과는 다음 논문에 발표할 예정이다.

감사의 글

이 논문은 한국과학재단 지정 농업생물신소재 연구센터의 부분적 지원을 받았기에 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Anderson, A. J.: In 'Plant-Microbe Interactions: Molecular and Genetic Perspectives', Kosuge, T. and Nester, E. W.(ed), Vol. 3, Chap. 5, McGraw-Hill, Inc., New York, U. S. A.(1989)
2. Bowles, D. J.: Annu. Rev. Biochem., 59 : 873(1990)
3. Jung, J.-L., Fritig, B. and Hahne, G.: Plant Physiol., 101 : 873(1993)
4. van Loon, L. C.: Plant Mol. Biol., 4 : 111(1985)
5. Boller, T.: In 'Plant-Microbe Interactions: Molecular and Genetic Perspectives', Kosuge, T. and Nester, E. W.(ed), 1st, Ed., Vol. 2, Chap. 5, McGraw-Hill, Inc., New York, U.S.A.(1987)
6. Boller, T.: In 'Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology', Mifflin, B. J.(ed), Vol 5, p. 145, Oxford University Press, Oxford, Great Britain (1988)
7. Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielson, K. K., Rasmussen, U. and Vad, K.: Plant J., 3 : 31(1993)
8. Flach, J., Pilet, P. E. and Jollés, P.: Experientia, 48 : 701(1992)
9. Joosten, M. H. A. J. and De wit, P. J. M.: Plant Physiol., 89 : 945(1989).

10. Legrand, M., Kauffman, S., Geoffroy, P. and Fritig, B.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84 : 6750(1987)
11. van Loon, L. C. and Gerritsen, Y. A. M. and Ritter, C. E.: Plant Mol. Biol., 9 : 593(1987)
12. Boller, T., Gehri, A., Mauch, F. and Vögeli, U. Planta, 157 : 22(1983)
13. Kurosaki, F., Tashiro, N. and Nishi, A.: Phytochemistry, 28 : 2989(1989)
14. Kombrink, E., Schrö, M. and Hahlbrock, K.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85 : 782(1988)
15. Mauch, F., Hadwiger, L. A. and Boller, T.: Plant Physiol., 87 : 325(1988)
16. Nasser, W., De tepia, M., Kauffmann, S., Montasser-Kouhsari, S. and Burkard, G.: Plant Molecular Biology, 11 : 529(1988)
17. Hrmova, M. and Fincher, G. B.: Biochem. J., 289 : 453(1993)
18. Kauffman, S., Legrand, M., Geoffroy, P. Fritig, B.: EMBO journal, 6 : 3209(1987)
19. Mauch, F., Mauch-mani, B. and Boller, T.: Plant Physiol., 88 : 936(1988)
20. 박희영, 김수일: 한국농화학회지 36 : 1(1993)
21. Molano, J., Duran, A. and Cabib, E.: Anal. Biochem., 83 : 656(1979)
22. Davis, B. J.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 121 : 404(1964)
23. Laemmli, U. K.: Nature, 227 : 680(1970)
24. Trudel, J. and Asselin, A.: Anal. Biochem., 178 : 362(1989)
25. Pan, S. Q., Ye, X. S. and Kc, J.: Anal. Biochem., 182 : 136(1989)
26. Ressig, J. L., Strominger, J. L. and Leloir, L. F.: J. Biol. Chem., 217 : 959(1955)
27. Fink, W., Liefland, M. and Mendgen, K.: Plant physiol., 88 : 270(1988)
28. Martin, M. N.: Plant physiol., 95 : 469(1991)
29. Wadsworth, S. A. and Zikakis, J. P.: J. Agric. Food Chem., 32 : 1284(1984)
30. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: J. Biol. Chem., 193 : 265(1951)
31. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, B. J., Olson, B. J. and Klenk, D. C.: Anal. Biochem., 150 : 76(1985)
32. Jacobson, S., Mikkelsen, J. D. and Hejgaard, J.: Physiologia Plantarum, 79 : 554(1990)
33. Roberts, W. K. and Selitrennikoff, C. P.: J. Gen. Microbiol., 134 : 169(1988)
34. Kurosaki, F., Tashiro, N. and Nishi, A.: Physiol. Mol. Plant Pathol., 31 : 201(1987)
35. Ary, M. B., Richardson, M. and Shewry, P. R.: Bio-

- chim. Biophys. Acta., 993 : 260(1989)
36. Cline, K. and Albersheim, P.: Plant Physiol., 68 : 207(1981)
37. Labrador, E. and Nevins, D. J.: Physiologia Plantarum, 77 : 479(1989)
38. Ham, K. S., Kauffmann, S., Albersheim, P. and Davill, A. G.: Molecular Plant-Microbe Interactions, 4 : 545(1991)
39. Swegle, M., Kramer, K. J. and Muthukrishnan, S.: Plant Physiol., 99 : 1009(1992)
40. Verburg, J. G. and Huynh, Q. K.: Plant Physiol., 95 : 450(1991)
41. Vinhyasekaran, P.: In 'Physiology of Disease Resistance in Plants', Vol. 1,2, Chap. 1,2, CRC Press Inc., Florida, U.S.A.(1989)
42. Yamagami, T. and Funatsu, G.: Biotech. Biochem. 57 : 643(1993)
39. Swegle, M., Kramer, K. J. and Muthukrishnan, S.:

Extraction and fractionation of proteins having both chitinase and β -1,3-glucanase activities from rice leaves

Sung-Yon Uhm and Su-II Kim (Department of Agricultural Chemistry and Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

Abstract : Five electrophoretic bands of crude enzyme extracted from rice leaves were found to possess both chitinase and β -1,3-glucanase activities. These chitinase/ β -1,3-glucanases were resolved into acidic and basic fractions of protein by DEAE-cellulose and chitin affinity column chromatography. The optimal pH and temperature for β -1,3-glucanase activity of two fractions were in the same extent as pH 5 and 60°C, whereas those for chitinase activity differed from one another; pH 3 and 60°C for the acidic and pH 4 and 50°C for the basic fraction, respectively. In addition, lysozyme activity was found in both fractions.