

Bacillus sp.로부터 분리 정제한 Cell Wall 분해효소의 반응특성

김태호 · 신우창 · 이동선 · 홍순덕*
경북대학교 자연과학대학 미생물학과

Mode of Action of the Purified Cell Wall Lytic Enzyme from *Bacillus* sp.

Tae-Ho Kim, Woo-Chang Shin, Dong-Sun Lee and Soon-Duck Hong*

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University,
Taegu 702-701, Korea

Abstract — An extracellular enzyme showing lytic activity on *E. coli* peptidoglycan had been isolated from *Bacillus* sp. BL-29. The lytic enzyme was purified to homogeneity by ion-exchange chromatography and gel filtration, with a recovery of 5%. The enzyme was monomeric and had an estimated molecular weight of 31,000 Da. The mode of action of the purified enzyme was also investigated. When the purified lytic enzyme was incubated with cell wall peptidoglycan, N-terminal amino groups were released without the release of reducing groups. The N-terminal amino acid released was identified as dinitrophenylalanine (DNP-alanine) by analysis of terminal amino acid by dinitrophenylation method. This result suggests that the lytic enzyme should be a kind of N-acetylmuramyl-L-alanine amidase.

용균현상은 항생물질, 단백질, 효소의 작용과 같은 다양한 과정에 의해서 일어난다(1, 2). 세균 세포벽 용해효소는 대부분의 경우 세균의 wall의 peptidoglycan을 가수분해시켜 용균현상을 일으키는 효소로서 많은 미생물들에 의해 생산된다(3, 4). 이러한 효소들은 자신의 cell wall 뿐만 아니라 다른 균의 cell wall에도 작용하는 autolysin, phage의 감염에 의해 세균에서 생산되는 virolysin(5), 세포외로 다량 분비되는 세포외 효소(6-8), spore의 발아시 활성화되는 sporelysin(9) 등이 있다. Autolysin은 cell wall의 순환(10), 세포의 분리(11), flagella의 합성(12)과 같은 중요한 생리현상에 관여한다고 알려져 있다. 용균효소는 peptidoglycan의 polysaccharide chain을 절단하는 N-acetylhexosamidase, N-acetylmuramic acid와 stem peptide의 L-alanine의 결합을 절단하는 N-acetylmuramyl-L-alanine amidase 그리고 stem peptide와 bridge peptide의 peptide 결합을 분해하는 endopeptidase로 대별된다(2). 용균효소는 세균 세포벽의 구조를 밝히는데 이용되며(2), 미생물에 의한 식품의 변질방지를 위해 사용될 뿐만 아니라(13, 14) 세포내 물

질을 분리하고 연구하는 데에도 이용될 수 있다(15). 본 연구실에서는 세균 세포벽의 용해효소를 세포외로 다량 분비하는 호알칼리성 세균을 분리하여 동정하고 그 효소의 생산 조건 및 효소적 특성에 대해서 보고한 바 있으며(16) 본 실험에서는 효소에 의한 cell wall의 분해양상 및 분해특성에 대해서 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용된 균주는 본 연구실에서 분리, 동정한 호알칼리성 *Bacillus* sp. BL-29를 사용하였으며(16), peptidoglycan 분리를 위한 균주는 *E. coli* KCTC 1682를 사용하였다.

효소의 생산 및 분리정제

효소정제를 위한 효소 생산배지는 2%(w/v) soluble starch, 0.5%(w/v) polypeptone, 0.5%(w/v) yeast extract, 0.1%(w/v) K_2HPO_4 , 0.02%(w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (w/v), 1%(w/v) Na_2CO_3 (pH 10.0)를 사용하여 30°C에서 36시간 배양하였으며 본 배양액을 10,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상침액을 조효소액으로 사용하였다.

Key words: *Bacillus* sp. lytic enzyme, N-acetylmuramyl-L-alanine amidase

*Corresponding author

Ammonium sulfate 침전 조효소액에 ammonium sulfate를 75% 되도록 서서히 첨가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 12,000 rpm으로 30분간 원심분리하였다. 이때 생긴 침전물을 소량의 50 mM sodium phosphate 완충액(pH 8.0)으로 용해시킨 다음 동일 완충액으로 투석하였다.

DEAE-Cellulose column chromatography 투석액을 50 mM sodium phosphate 완충액(pH 8.0)으로 평형화시킨 column(3.5×4.0 cm)에 주입하고 동일 완충액으로 비흡착 단백질을 제거한 다음 1M NaCl을 포함한 완충액으로 용출시켰다. 이때 용출속도는 시간당 60 ml였고 7 ml씩 분획하였다.

CM-Sephadex A-50 chromatography 위의 활성분획을 모아 50 mM sodium acetate 완충액(pH 6.0)으로 평형화 한 column(2.7×30 cm)에 주입하고 1M NaCl을 포함한 완충액으로 용출하였다. 이때 용출속도는 시간당 60 ml였고 7 ml씩 분획하였다.

Sephadex G-75 column chromatography 위에서 효소 활성분획을 모아 농축한 것을 50 mM sodium phosphate 완충액(pH 8.0)으로 평형화 한 column(2.5×53 cm)에 주입하여 시간당 30 ml의 유속으로 5.5 ml씩 분획하여 정제하였다.

전기영동 및 분자량 측정

SDS-Polyacrylamide gel 전기영동은 12.5% polyacrylamide gel을 사용하였으며(17), Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 isopropanol 10%, acetic acid 10%(v/v)의 혼합용액으로 탈색하여 band를 확인하였다. 분자량의 측정에는 SDS-PAGE 상에서 시료단백질의 이동도를 표준단백질의 이동도와 비교하여 측정하였고, native protein의 분자량 측정에는 sephadex G-100 column(1.7×53 cm)을 사용하였다.

Peptidoglycan의 분리

Peptidoglycan의 분리는 Potvin 등(18)의 방법에 준하여 행하였다. 즉, 대수기 말기의 균체를 7,000 g에서 15분간(4°C) 원심분리하여 모은 다음 균체를 25 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충액으로 현탁하여 4°C에서 30분간 washing 한 후 집균하였다. 집균한 균체를 80 ml의 4%(w/v) SDS 용액으로 현탁하고 상온에서 90분간 진탕반응시킨 후 5분간 sonication 하였다. Sonication 한 추출물을 100°C에서 15분간 열처리한 후 12,000 g에서 원심분리하여 침전물을 모은 후 0.1%(w/v) Triton X-100 용액으로 재현탁하여 상온에서 30분간 진탕배양하고 다시 원심분리하여 세포벽 성분을 침전시켰다. 침전된 세포벽을 80 ml의 살균증류

수로 수회 세척하여 정제된 peptidoglycan으로 사용하였다.

효소활성의 측정

세균 세포벽용해 효소의 활성은 Kiyoshi Hayashi의 방법(19)을 변형하여 사용하였다. 동결건조한 *E. coli* 균체 또는 순수분리된 peptidoglycan을 50 mM glycine-NaOH 완충액(pH 10.0)으로 현탁하여 660 nm에서의 흡광도가 1.0이 되게 조절한 후 이 균체액 2 ml에 효소액 0.1 ml를 가하여 45°C에서 10분간 반응시킨 후 660 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다. 효소활성도 1 unit는 1분동안 660 nm에서의 흡광도를 0.001 감소하게 하는 효소의 양으로 나타내었다.

유리아미노산 및 환원당의 정량

효소의 작용에 따른 peptidoglycan 분해산물 중 유리아미노기의 정량은 Ghuysen 등의 방법(20)을 사용하였으며, 환원당의 정량은 Thompson-Shockman의 방법(21)을 사용하였다.

N-말단 아미노산의 결정

세포벽 분해효소에 의해 분해되어 유리되어 나오는 peptidoglycan의 N-말단 아미노산을 결정하기 위해 Ghuysen의 dinitrophenylation 방법(20)을 사용하였다. 즉 효소에 의해 분해된 peptidoglycan을 진공건조한 후 300 μ l의 1%(w/v) Na₂B₄O₇로 현탁시킨 다음 60 μ l의 0.1M FDNB(2,4-dinitro-fluorobenzene)을 가해 60°C에서 30분 반응시켰다. 생성된 노란색 반응물에 180 μ l의 conc. HCl을 가해 acidification한 후 free amino acid의 DNP 유도체들을 ethyl ether로 3번 추출하였다. 남아있는 ether를 37°C 항온수조에서 제거시킨 후 수용층의 DNP-peptide를 밀폐된 용기에서 질소가스로 치환한 다음 110°C에서 16시간 동안 가수분해시켰다. 가수분해물을 ether로 수회 추출하여 진공건조한 후 소량의 0.01N NH₃ 용액에 녹여 TLC를 행하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

Ammonium sulfate 침전에서 얻은 투석액을 DEAE-Cellulose와 CM-Sephadex A-50을 순차적으로 통과하여 얻은 활성분획을 농축하여 Sephadex G-75와 G-100으로 Gel 여과하였다. 이 과정에서 얻은 활성분획을 모아 투석하여 정제효소로 사용하였다. 이와 같은 과정을 통해 얻은 효소의 정제 여부를 확인하기

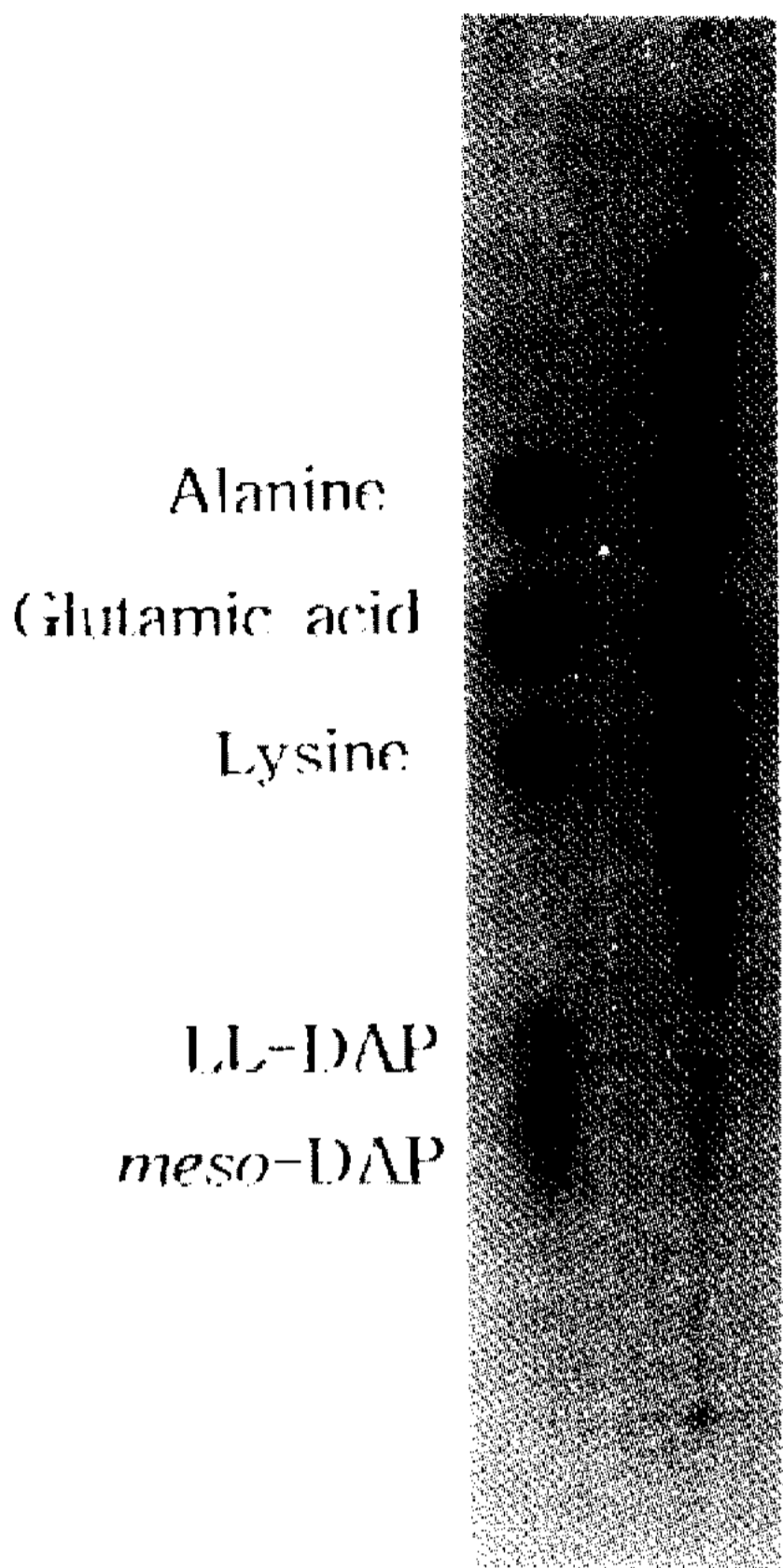


Fig. 4. Thin layer chromatography of cell wall amino acids.
 A: Standard amino acids, B: HCl-hydrolyzate of peptidoglycan

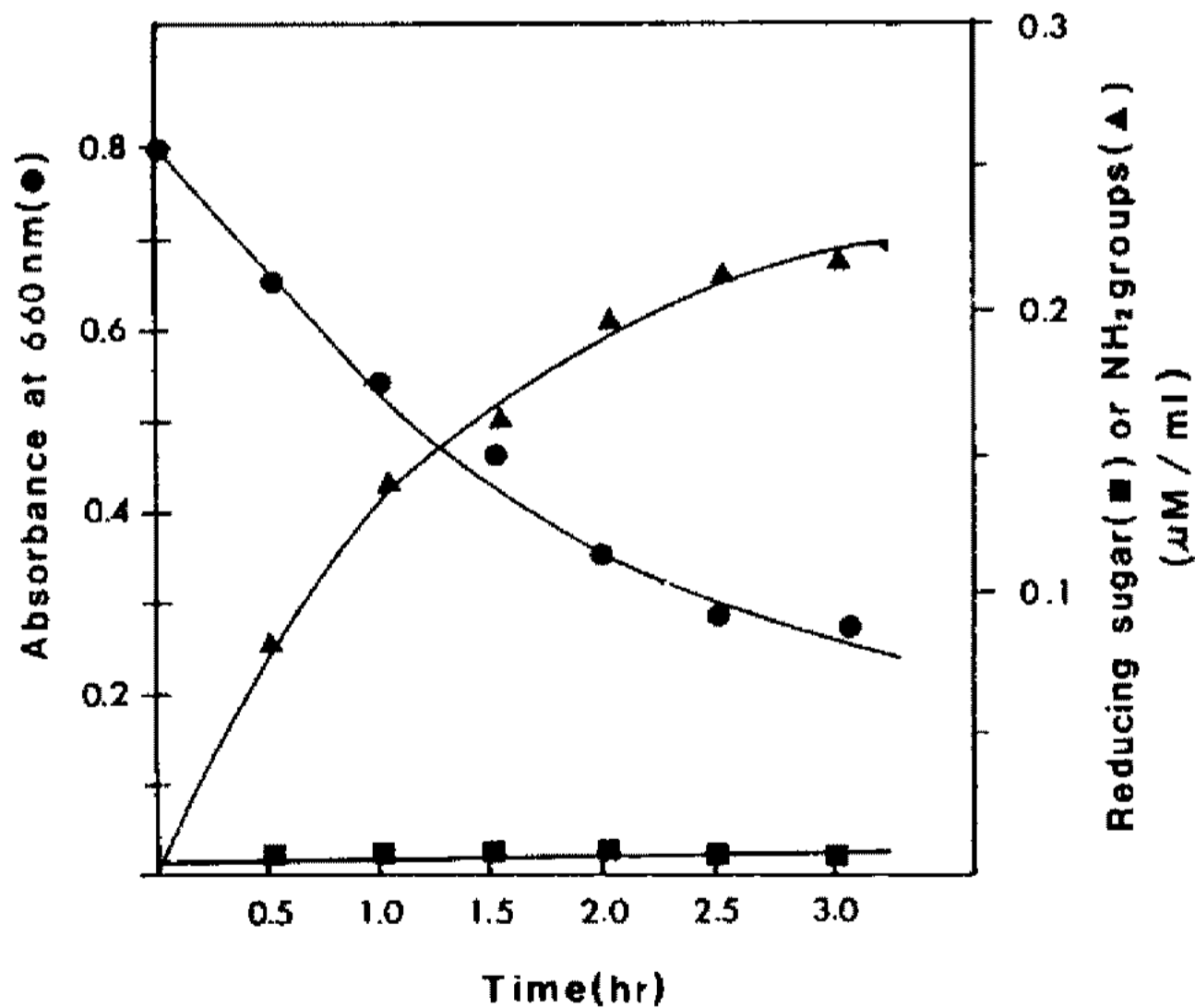


Fig. 5. Digestion of purified cell wall of *E. coli* by purified lytic enzyme of *Bacillus* sp. BL-29.
 Purified cell walls were suspended in 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 10.0) at OD₆₆₀=0.8. To 4 ml of cell wall suspension purified lytic enzyme was added, and samples were removed at various intervals for determination of turbidity at 660 nm (●), release of reducing groups (■) and free amino groups (▲).

효소를 부가하여 660 nm에서의 흡광도가 0.8이 되게 한 후 45°C에서 반응시켰다(8). 반응의 개시와 함께 30분 간격으로 반응액을 일정량 취해 660 nm에서의 흡광도 감소, free amino group과 reducing sugar의 양을 앞의 방법에 의해 측정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 반응시간이 경과함에 따라 660 nm에서 cell wall 흡광도는 감소하는 반면, free amino group은 증가하였으나 reducing sugar의 양은 거의 변화하지 않았다. 만약 본 효소가 muramidase 혹은 glucosaminidase라면 reducing sugar의 양이 증가할 것이며, amidase 혹은 endopeptidase라면 amino group이 증가할 것이다. 따라서 본 효소는 amidase이거나 endopeptidase임을 알 수 있었다. 또한, 세포벽 용해효소의 작용에 의해 유리되어 나오는 N-말단 아미노기를 결정하기 위하여 0.1N FDNB로 dinitrophenylation시킨후 thin layer chromatography에 의해 dinitrophenylated 아미노산을 확인하였다. 그 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 유리된 아미노산은 dinitrophenyl-

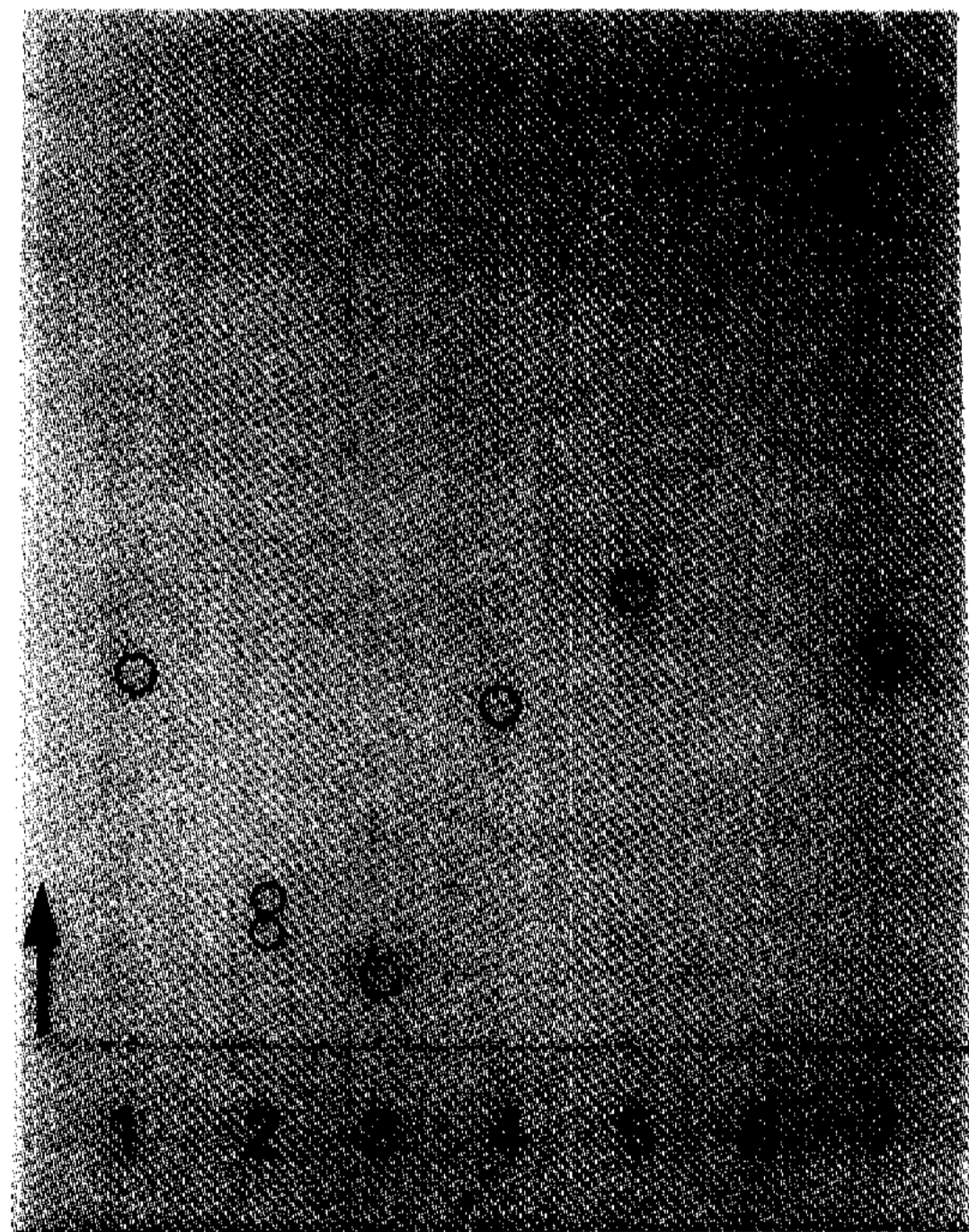


Fig. 6. Identification of DNP-amino acids by silica gel thin-layer chromatography.
 After dinitrophenylation and acid hydrolysis, DNP-amino acids were extracted by diethylether and analysed by chromatography. The plate was first developed solvent A (n-butanol-1% ammonia) at room temperature, and after drying it was developed with solvent B (chloroform-methanol-acetic acid; 85:14:1) at 4°C. Lanes 1, DNP-alanine; 2, DNP-DAP; 3, DNP-glutamic acid; 4, DNP-glycine; 5, DNP-lysine; 6, only purified cell wall from *E. coli* (KCTC 1682); 7, Lytic enzyme plus purified cell wall

alanine(DNP-alanine)으로 확인되었다. 따라서 본 효소는 N-acetylmuramyl-L-alanine amidase임을 확인할 수 있었다. *Bacillus* 속에서 밝혀진 N-acetylmuramyl-L-alanine amidase로는 *Bacillus licheniformis*에서 분자량 29 kDa(*cwlM*)과 41 kDa(*cwlL*)의 두종이 알려져 있으며, *B. subtilis*에서는 분자량 약 52 kDa(*cwlB*)과 30 kDa(*cwlA*)의 두종이 중요한 autolysin으로 알려져 있으며 유전자의 클로닝과 염기배열 결정 및 효소의 성질이 구명되어 있다(23-25). 본 실험실에서는 본 효소의 유전자가 클로닝되어 염기배열결정이 완결단계에 있으며 결과를 바탕으로 상기 효소와의 homology 등을 비교분석할 예정이다.

요 약

호알카리성 *Bacillus* sp. BL-29가 세포외로 강력히 분비하는 세균 세포벽 분해효소의 작용기작을 알기 위하여 본균의 배양액으로 부터 ammonium sulfate 침전, 이온교환수지 및 겔 여과를 통하여 정제도 63 배의 순수한 효소를 얻었다. 이 효소의 분자량은 약 31,000 Da으로 추정되었다. 정제된 *E. coli* peptidoglycan과 정제효소와의 반응 생성물에 대해 reducing sugar 및 free amino group을 정량한 결과 reducing sugar는 유리하지 않고 free amino group을 유리하는 것으로 밝혀졌으며, dinitrophenylation 법으로 분해 위치를 결정한 결과 N-acetylmuramic acid와 L-alanine과의 결합을 분해하는 것으로 밝혀졌다. 따라서 본 효소는 N-acetylmuramyl-L-alanine amidase로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 1995년도 교육부 학술연구조성비(유전공학연구)로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Stolp, H. and M.P. Starr. 1965. Bacteriolysis. *Ann. Rev.* **19**: 79-104.
2. Ghuysen, J.M. 1968. Use of bacteriolytic enzyme in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriol. Rev.* **32**: 425-464.
3. Strominger, J.L. and J.M. Ghuysen. 1967. Mechanism of enzymatic bacteriolysis. *Science* **156**: 213-221.
4. Salton, M.R.J. 1955. Isolation of *Streptomyces* spp. capable of decomposing preparations of cell walls from various microorganisms and a comparison of their lytic activities with those of certain actinomycetes and myxobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **12**: 25-30.
5. Diaz, E., R. Lopez, and J.L. Garcia. 1992. Ej-1, a Temperate Bacteriophage of *Streptococcus pneumoniae* with a Myoviridae Morphotype. *J. Bacteriol.* **174**(17): 5516-5525.
6. Croux, C., B. Canard, G. Goma, and P. Soucaille. 1992. Purification and Characterization of an Extracellular Muramidase of *Clostridium* acetylated Peptidoglycan. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(4): 1075-1081.
7. Huff, E., C.S. Silverman, N.J. Adams, and W.S. Awkard. 1970. Extracellular cell wall lytic enzyme from *Staphylococcus aureus*: purification and partial characterization. *J. Bacteriol.* **103**(3): 761-9.
8. Jung, M.H., I.S. Kong, D.H. Bai, and J.H. Yu. 1991. Purification and characterization of a bacteriolytic enzyme from Alkalophilic *Bacillus* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* **1**(2): 102-110.
9. Guinand, M., G. Michel, and D.J. Tipper. 1974. Appearance of gamma-D-glutamyl-(L) meso-diaminopimealate peptidoglycan hydrolase during sporulation in *Bacillus sphaericus*. *J. Bacteriol.* **120** (1): 173-84.
10. Kochs, A.L. and R.J. Doyle. 1985. Inside-to-outside growth and turnover of the cell wall of gram-positive rods. *J. Theor. Biol.* **117**: 137-157.
11. Fein, J.E. and H.J. Rogers. 1976. Autolytic enzyme-deficient mutants of *Bacillus subtilis* 168. *J. Bacteriol.* **127**: 1427-1442.
12. Rogers, H.J., H.R. Perkins, and J.B. Ward. 1980. Cell walls and membranes. Chapman and Hall, London.
13. Banks, J.G., R.G. Board, and N.H. Sparks. 1986. Natural antimicrobial systems and their potential in food preservation in the future. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **8**: 103-147.
14. Hughey, V.L. and E.A. Johnson. 1987. Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2165-2170.
15. Jolles, P. and J. Jolles. 1984. What is new in lysozyme research. *Mol. Cell. Biochem.* **63**: 165-189.
16. Kim, T.H., D.S. Lee, and S.D. Hong. 1995. Purification and characterization of a cell wall hydrolyzing enzyme produced by an alkalophilic *Bacillus* sp. BL-29. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**(4): 206-212.
17. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
18. Potvin, C., D. Leclerc, G. Tremblay, A. Asselin,

- and G. Bellemare. 1988. Cloning, sequencing and expression of a *Bacillus* bacteriolytic enzyme in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **214**: 241-248.
19. Hayashi, K. and T. Kasumi. 1981. Purification and characterization of the lytic enzyme produced by *Streptomyces rutgersensis* H-46. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 2289-2300.
20. Ghuysen, J.M., D.J. Tipper, and J.L. Strominger. 1968. Enzymes that degrade bacterial cell walls. *Methods Enzymol.* **8**: 685-699.
21. Thompson, J.S. and G.D. Shockman. 1968. A modification of the Park and Johnson reducing sugar determination suitable for the assay of insoluble materials: its application to bacterial cell walls. *Anal. Biochem.* **22**: 260-268.
22. Oda, Y., R. Nakayama, A. Kuroda, and J. Sekiguchi. 1993. Molecular cloning, sequence analysis, and characterization of a new cell wall hydrolase, *cwlL*, of *Bacillus licheniformis*. *Mol. Gen. Genet.* **241** (3-4): 380-8.
23. Kuroda, A. and J. Sekiguchi. 1991. Molecular cloning and sequencing of a major *Bacillus subtilis* autolysin gene. *J. Bacteriol.* **173**(22): 7304-7312.
24. Kuroda, A. and J. Sekiguchi. 1990. Cloning, sequencing and genetic mapping of a *Bacillus subtilis* cell wall hydrolase gene. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2209-2216.
25. Kuroda, A., M. Imazeki, and J. Sekiguchi. 1991. Purification and characterization of a cell wall hydrolase encoded by the *cwlA* gene of *Bacillus subtilis*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **65**(1): 9-13.
26. 진성현, 박응열, 류병호. 1995. 해양에서 분리한 *Bacillus subtilis* SH-1이 분비하는 용균효소의 정제 및 특성. *생물산업* **8**(1): 133.
27. Yanai, A., K. Kato, T. Beppu, and K. Arima. 1976. Bacteriophage-induced lytic enzyme with hydrolyzes L-alanine-D-glutamic acid peptide bond in peptidoglycan. *Bioch. Biophys. Commu.* **68**: 1146-1152.
28. Goodfellow, M. and D.E. Minnikin. 1985. *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Academic press.

(Received 6 September 1995)