

해양에서 분리한 *Bacillus subtilis* SH-10이 분비하는 용균효소의 정제 및 특성

진성현* · 정영기¹ · 류병호²

부산광역시 보건환경연구원, ¹동의대학교 미생물학과, ²경성대학교 식품공학과

Purification and Characterization of Bacteriolytic Enzyme Excreted by *Bacillus subtilis* SH-1 Isolated from Coastal Sea. Sung-Hyun Jin*, Young-Gee Jung¹ and Beung-Ho Ryu². Public Health and Environment Institute of Pusan, 613-104, Korea, ¹Department of Microbiology, Dong Eui University, Pusan, 614-010, Korea, ²Department of Food Microbiology and Technology, Kyung Sung University, Pusan, 608-736, Korea — The bacteriolytic enzyme produced from *Bacillus subtilis* SH-1 was purified and characterized, and its molecular weight was determined. The bacteriolytic enzyme activity was increased about 66.5 times via purification with recovery yield of 18.5%. The optimum pH and temperature of this enzyme were 9.0 and 50°C. The enzyme was stable within a pH range of 6.0~10.0 and unstable above 60°C. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 23,000 dalton in a form of monomer with no other subunits. Effect of the enzyme on the lysis of bacteria engaged in food posion was tested. The lysis degree was below 31% against Gram negative bacteria and above 48% in Gram positive bacteria. The values higher than 73% were obtained against *Vibrio* sp. and *Listeria* sp. As the turbidity of dissolved peptidoglycan decreases, the free amino group levels were increased. And, based on hydrolysis of casein, this enzyme was thought to be an endopeptidase.

용균효소(Bacteriolytic enzyme)는 동식물과 미생물에 의하여 분비되며 그 작용부위에 따라 종류가 다양하다. 이러한 용균효소의 작용 메카니즘에 대하여는 주로 Gram 양성균인 *Micrococcus lysodeikticus*와 *Staphylococcus aureus* 등 lysozyme에 대하여 감수성이 높은 균을 대상으로 하여 연구하였다(1).

세균의 세포벽은 몇 종류의 polymer로 되어 있으며 그 중 기본 구조체인 peptidoglycan은 Gram 양성 세균에서는 세포벽의 중요한 구성성분이며 건물량으로 50~90% 정도 들어 있다. 세포벽 중의 peptidoglycan 층은 여러 종류의 polysaccharide와 teichoic acid라 일컫는 polyphosphate로 된 고분자물질과 공유결합하고 있다(2, 3). 용균효소는 그 작용 부위에 따라 peptidoglycan의 glycan 부분에 작용하는 endo β -1, 4 N-acetyl hexosamidase, glycan 부분과 peptide 부분을 연결하는 N-acetyl muraminy L-alanine amidase 및 peptidoglycan의 peptide 결합에 작용하는 endopeptidase 등이 있다. 이 중 endo β -1, 4 N-acetyl hexosamidase는 달걀의 난백에서 분리된 lysozyme으로 이 효소는 세균 세포벽의 peptidoglycan의 N-acetyl muramic acid와 N-acetylglucosamine간의 β -1, 4 결합을 절단하는 특성을 가지고 있다(1).

한편 연안 해수 중의 용균효소 생산균은 종속 영양 세균 중의 24~50% 정도 존재하며, 동물 프랑크톤에서

분리된 종속 영양세균 중의 63~75% 정도가 용균효소 생산능력이 있는 것으로 알려져 있다(4). 해양환경에 있어서 용균효소 생산세균은 다른 미생물의 균체 및 세포벽을 분해하여 생산세균의 자기증식을 위한 영양원을 얻고, 다른 미생물의 증식을 억제하는 역할을 하고 있다. 용균효소는 세포벽의 구조인 peptidoglycan에 대한 기질 특이성이 있으므로 미생물의 분류에 큰 역할을 하였다. 또, 미생물의 오염을 방지하는 식품의 보존제로 사용되고 있고 dextran 등의 다당체와 포함시켜 유화제로서 식품 및 의약품에 널리 이용되고 있다(5-8). 현재 미생물에 의한 식품의 부패나 변질을 방지하기 위하여 화학 합성품인 보존료가 사용되고 있으나 보존료에 대한 식품 위생상 안전성이 문제되고 있으며 인체에 안전할 부패 미생물의 제거방법이 요구되고 있다. 이와 같은 관점에서 본 연구는 해양세균이 분비하는 용균효소를 이용하여 저온에서 보관되는 식품 및 어패류 등에 대한 보존료로서의 이용 가능성과 냉장보관시 저온에서도 생육하는 식중독균의 오염방지 및 어패류 섭취로 인한 *Vibrio*성 식중독 예방에 대한 이용 가능성을 찾고자 해양에서 분리한 용균활성이 우수한 균주인 *Bacillus subtilis* SH-1(9)이 분비하는 용균효소를 분리 정제하고 이의 특성에 관하여 고찰하고자 한다.

재료 및 방법

공시 균주

해양에서 분리된 *Bacillus subtilis* SH-1을 사용하였다(9).

*Corresponding author.

Key words: Bacteriolytic enzyme, *Bacillus subtilis*, endopeptidase

균의 배양 및 조효소액의 조제

효소생산용배지(glucose 1.0%, yeast extract 1.0%, NaCl 1.0%, K_2HPO_4 0.02%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002%, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.001%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0001%, pH 8.0) 125 ml를 500 ml 삼각 flask에 넣고 121°C에서 15분간 가압 살균한 다음 공시균주를 2백금이 접종하여 30°C로 18시간 진탕배양(Oscill. 70/stroke 7 cm/min)한 전배양액을 효소생산용배지에 1% 접종하여 전배양의 조건으로 28시간 동안 본배양을 행하였다. 본 배양액을 12,000×g에서 10분간 원심분리한 후 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

효소의 정제

Ammonium sulfate fractionation 조효소액에 75~90% 포화농도의 ammonium sulfate를 가해 침전 분리시킨 효소단백질을 소량의 0.05M acetate buffer(pH 6.0)에 용해하고 4°C에서 동일 완충액으로 36시간 투석하였다.

CM-cellulose column chromatography 0.05M acetate buffer(pH 6.0)로 충분히 평형화 시킨 CM-cellulose column(4.0×20 cm)에 투석된 조효소 단백질 용액을 흡착시키고 동일한 완충용액을 사용, 세척하였다. 용출은 1M NaCl 용액을 이용한 linear gradient로 실시하였으며 용출속도는 30 ml/hr, 분취량은 5 ml/tube 이었다.

Sephadex G-100 gel filtration chromatography 0.05M glycine-NaOH 완충액(pH 10.0)으로 평형화시킨 Sephadex G-100 gel filtration column(1.8×85 cm)에 CM-cellulose에서 얻은 활성분획액을 주입한 후 동일 완충액으로 22 ml/hr의 속도로 5.5 ml씩 분획하여 활성분획을 얻은 후 재차 같은 방법으로 2차 gel filtration chromatography를 행하였다.

Hydroxylapatite column chromatography 50 mM phosphate 완충액(pH 6.8)으로 평형시킨 hydroxylapatite column(1.4×8 cm)에 2차 Sephadex G-100 column에서 얻은 활성분획을 흡착시킨 후 동일 완충액으로 30 ml/hr의 속도로 0.3M phosphate 완충액(pH 6.8)으로 농도 gradient를 걸어주면서 한 시험관당 3 ml씩 분획하였다. 각 단계마다 전기영동(SDS-PAGE)을 실시하여 효소의 정제정도를 확인하였다.

세포벽 용해 활성의 측정

세포벽 용해 활성 측정을 위한 기질은 동결건조된 *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698(Sigma Co.)을 사용하였으며 세포벽 용해효소의 활성 측정은 Sugahara 등(10)의 방법을 따랐다. 즉, 기질로 사용된 동결건조 균체액(0.2 g dry cells/100 ml D.W)을 100°C에서 10분간 처리한 균액 1 ml와 0.05M Tris-HCl buffer(pH 7.0) 1 ml 및 bacteriolytic enzyme 1 ml를 혼합하여 35°C 항

온조에서 30분간 반응시킨 후 흡광도 감소를 570 nm에서 측정하였으며 이 때 효소 활성도 1 unit는 다음과 같은 식에 의해 30분간 570 nm에서의 흡광도를 1.0% 감소를 일으키게 하는 효소의 양으로 하였다.

$$\text{Bacteriolytic activity} = \frac{OD_{570}(\text{initial}) - OD_{570}(\text{final})}{OD_{570}(\text{initial})} \times 100$$

단백질 정량

단백질의 정량은 bovine serum albumin(Sigma Co.)을 표준물질로 하여 Bradford 방법(11)으로 정량하였으며 column 분획물은 280 nm에서 측정하여 단백질의 유무를 결정하였다.

분자량 측정

Laemmli의 방법(12)에 따라 12.5% gel을 사용하여 SDS-PAGE를 행하였다. 표준단백질로는 protein molecular weight standards, high range(GIBCO Co.)를 사용하여 분자량을 구하였다.

최적온도 및 열안정성

최적온도의 검토는 0.05M Tris-HCl 완충액 1 ml와 기질균체액 1 ml에 효소액 1 ml를 가하여 5~75°C 수욕조에서 30분간 반응시킨 후 상대활성도를 측정하여 최적온도를 결정하였으며, 열안정성 검토는 30~60°C까지 10°C 간격으로 가열처리하면서 경과시간에 따른 효소의 잔존 활성을 측정하여 결정하였다.

최적 pH 및 안정성

최적 pH 검토는 0.05M acetate(pH 4.0~6.0), 0.05M phosphate(pH 6.0~8.0), 0.05M Tris-HCl(pH 7.0~9.0), 0.05M glycine-NaOH(pH 9.0~11.0), 0.05M phosphate-NaOH(pH 11.0~12.0) buffer 용액에 *M. lysodeikticus* 동결건조 균체액을 0.1% 되게 현탁시켜 기질 용액을 만든 후 효소액 1 ml를 가해 35°C에서 30분간 반응시킨 후 상대 활성도를 측정하여 결정하였으며, pH 안정성은 위에서 조제된 기질용액에 효소액 1 ml를 가하여 5°C에서 24시간 방치한 후 잔존활성을 측정하여 결정하였다.

Bacteriolytic enzyme의 작용 spectrum

세균 세포벽 용해효소의 작용 spectrum을 알아보기 위하여 본 실험에 사용한 균주들을 trypticase soy broth (BBL)로 37°C, 18시간 진탕 배양한 후 8,000×g에서 10분간 원심분리하여 균체를 모음 다음 멸균 생리식염수로 2회 세척하고 이것을 0.05M Tris-HCl 완충액(pH 7.0)으로 O.D.₅₇₀=2.0으로 맞춘 각각의 생균체액 2 ml와 조효소액 1 ml를 혼합하여 35°C에서 30분간 반응시킨 후 570 nm에서 흡광도 감소를 %로 나타내었다. 또 동

일한 방법으로 모은 생균체액을 100°C 수욕조에 서 10 분간 가열한 균체액에 대해서도 조사하였다.

Peptidoglycan의 분리

세균 세포벽의 분리는 Watanabe와 Sato(13)의 방법에 따라 시행하였다. 즉, *M. lysodeikticus* ATCC 4698의 동결 건조 균체 2g을 100 ml의 멸균증류수에 현탁시키고 sonicator(Dyno-mill, Type KDL)로서 균체를 파괴시켰다. sonicator에서 파괴되지 않은 whole cell을 1,000×g에서 15분동안 원심분리하여 제거한 다음 세포벽 물질을 16,000×g에서 20분간 원심분리하여 침전시킨 후 멸균증류수로 3번 세척을 하고 다시 멸균증류수에 부유시켰다. 세포벽 성분중 peptidoglycan은 실온에서 75% ethanol로 10분동안, 5% TCA 용액으로 10분동안 끓는 물속에서 추출하여 세척한 후 50 mg trypsin이 포함된 0.05M Tris-HCl buffer(pH 7.0) 25 ml에 현탁시켜 37°C에서 20시간 배양하였다. 배양액을 다시 원심분리하여 peptidoglycan을 침전시키고 멸균증류수로 3번 세척을 한 후 0.05M Tris-HCl 완충액(pH 7.0)에 현탁시켰다.

Peptidoglycan의 분해산물 정량

세균 세포벽 용해효소의 작용에 따른 peptidoglycan의 분해산물의 정량은 Ghuysen 등(14)의 방법에 따라 1% K₂B₄O₇ 20 μl을 일정량의 효소반응액에 첨가한 후 FDNB(100% ethanol 10 ml에 fluorodinitrobenzene 150 μl을 가한 것임) 2 μl를 가해 즉시 40°C에서 30분간격으로 반응시키고 2N HCl 80 μl로 산성화 한 후 420 nm에서 yellow color를 흡광도로 측정하여 free amino group의 양으로 하였으며 표준곡선으로는 glycine을 0~0.2 μmole의 농도별로 같은 방법을 사용하여 측정하였다. Reducing sugar는 Somogi 방법(15)에 준하여 측정하였으며 표준곡선으로는 glucose를 0~0.2 μmole 농도별로 사용하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

Bacillus subtilis SH-1의 조효소액 10 l를 Table 1에

표시되어 있는 5단계의 정제과정을 거쳐 최종적으로 66.5배 정제된 용균효소를 얻었다. 이 때 수율은 18.5% 이었다.

효소의 정제 정도 및 분자량

SDS-PAGE 전기영동을 통해 각 단계마다 시료의 정제 정도를 검정한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 정제효소는 2차 Sephadex G-100 column chromatography에서 효소가 완전히 정제되었음을 알 수 있었다. Fig. 2는 SDS-PAGE상의 단백질의 상대이동도와 분자량의 관계로, 본 효소단백질의 분자량은 23,000 dalton 이었다.

이는 *Streptomyces rutgersensis*(5), *Streptomyces erythraeus*(16)의 용균 효소의 분자량이 각각 22,000, 18,500으로 보고되고 있어 본 효소는 이와 비슷한 분자량을 나타내는 것을 알 수 있었다.

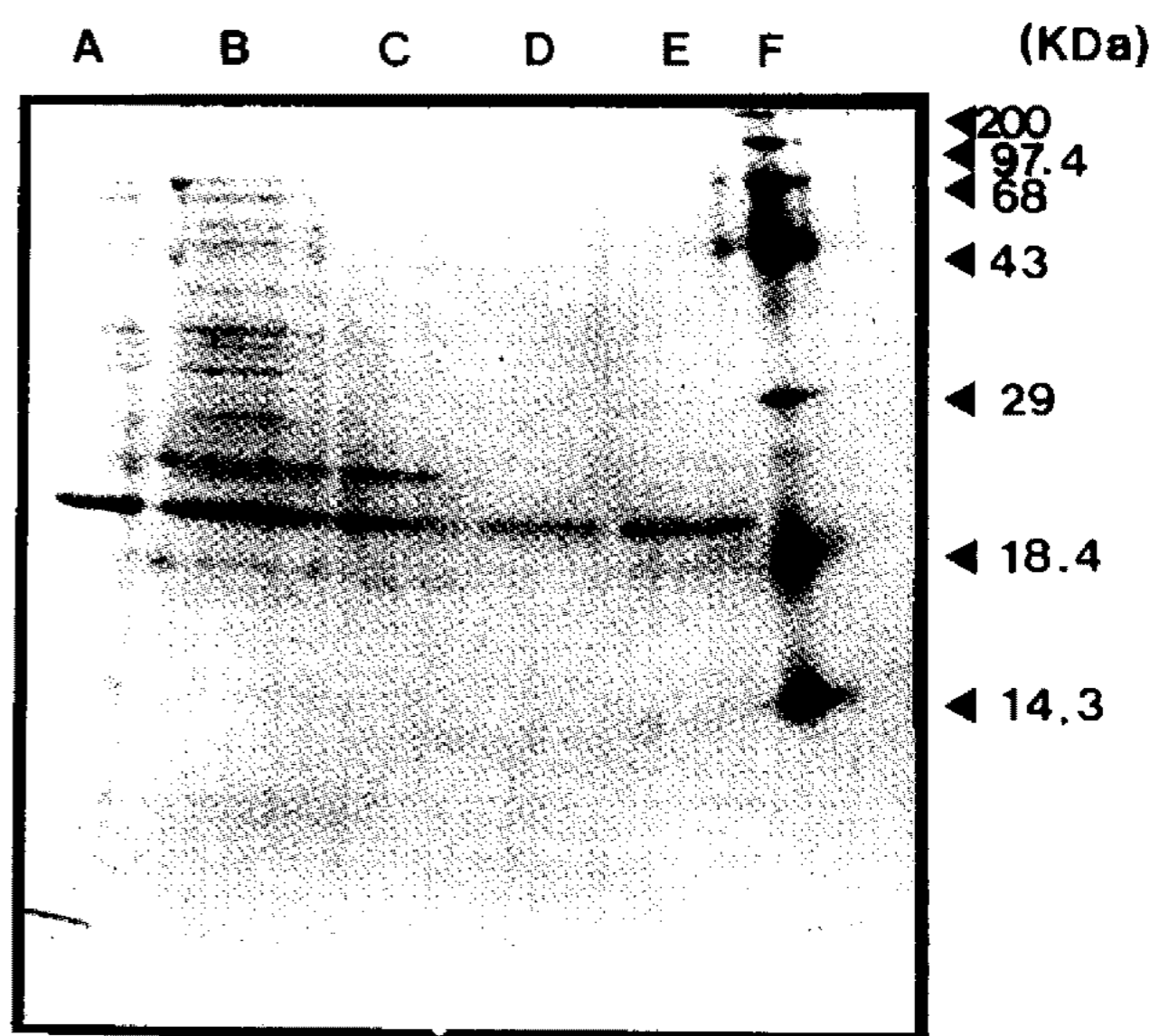


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of bacteriolytic enzyme.

- A: After (NH₄)₂SO₄ fractionation
- B: After CM-cellulose column chromatography
- C: After 1st Sephadex G-100 gel filtration
- D: After 2nd Sephadex G-100 gel filtration
- E: After hydroxylapatite column chromatography
- F: Standard protein molecular weight marker

Table 1. Purification of bacteriolytic enzyme produced by *Bacillus subtilis* SH-1

| Purification steps | Total protein (mg) | Total activity (U) | Specific activity (U/mg protein) | Yield (%) | Purification ratio |
|--|--------------------|--------------------|----------------------------------|-----------|--------------------|
| Culture supernatant | 81,388.0 | 880,000 | 10.8 | 100 | 1.0 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ (75~90%) | 7,327.0 | 662,000 | 90.4 | 75.2 | 8.4 |
| CM-Cellulose | 1,229.0 | 527,400 | 429.1 | 59.9 | 39.7 |
| 1st Sephadex G-100 | 342.7 | 222,640 | 649.7 | 25.3 | 60.2 |
| 2nd Sephadex G-100 | 251.0 | 176,880 | 704.7 | 20.1 | 65.3 |
| Hydroxylapatite | 226.8 | 162,800 | 717.8 | 18.5 | 66.5 |

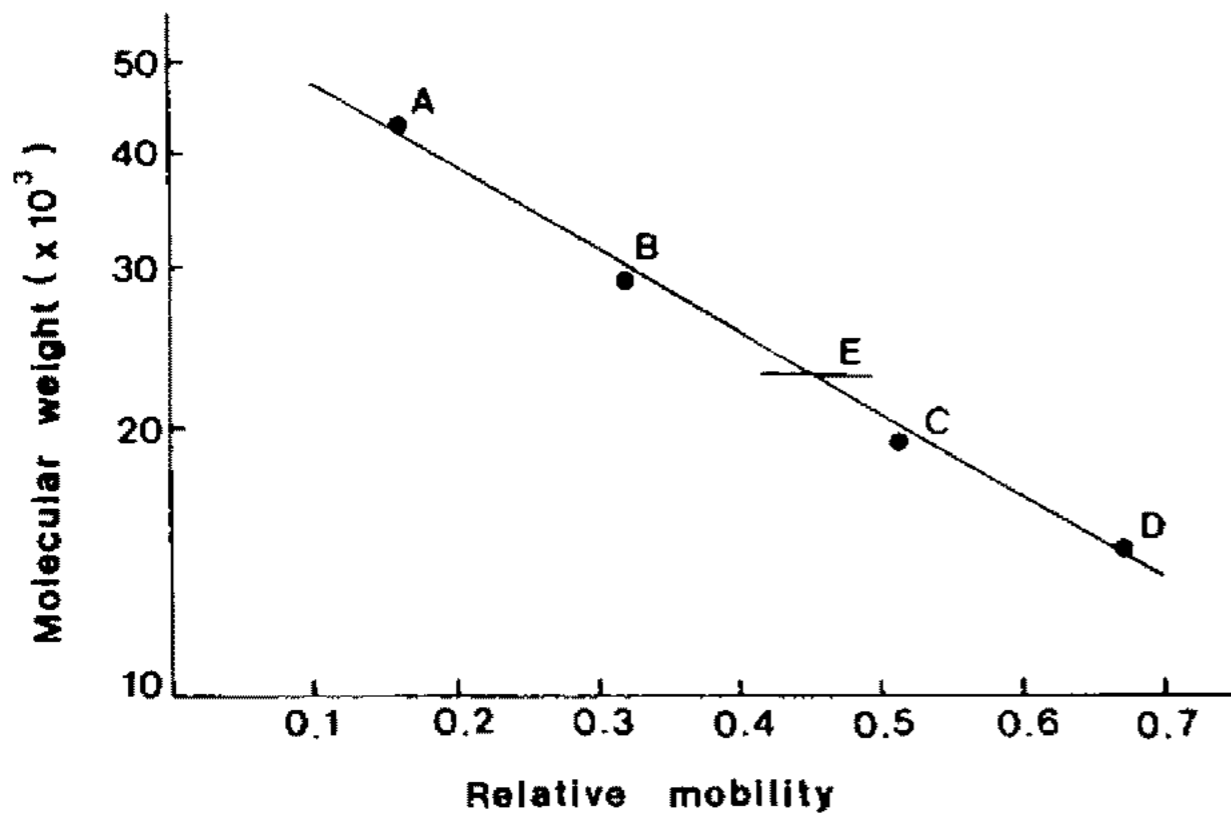


Fig. 2. Molecular weight estimation of bacteriolytic enzyme from *Bacillus subtilis* SH-1 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

- A: Ovalbumin 43 KDa
- B: Carbonic anhydrase 29 KDa
- C: β -Lactoglobulin 18.4 KDa
- D: Lysozyme 14.3 KDa
- E: Bacteriolytic enzyme of *Bacillus subtilis* SH-1

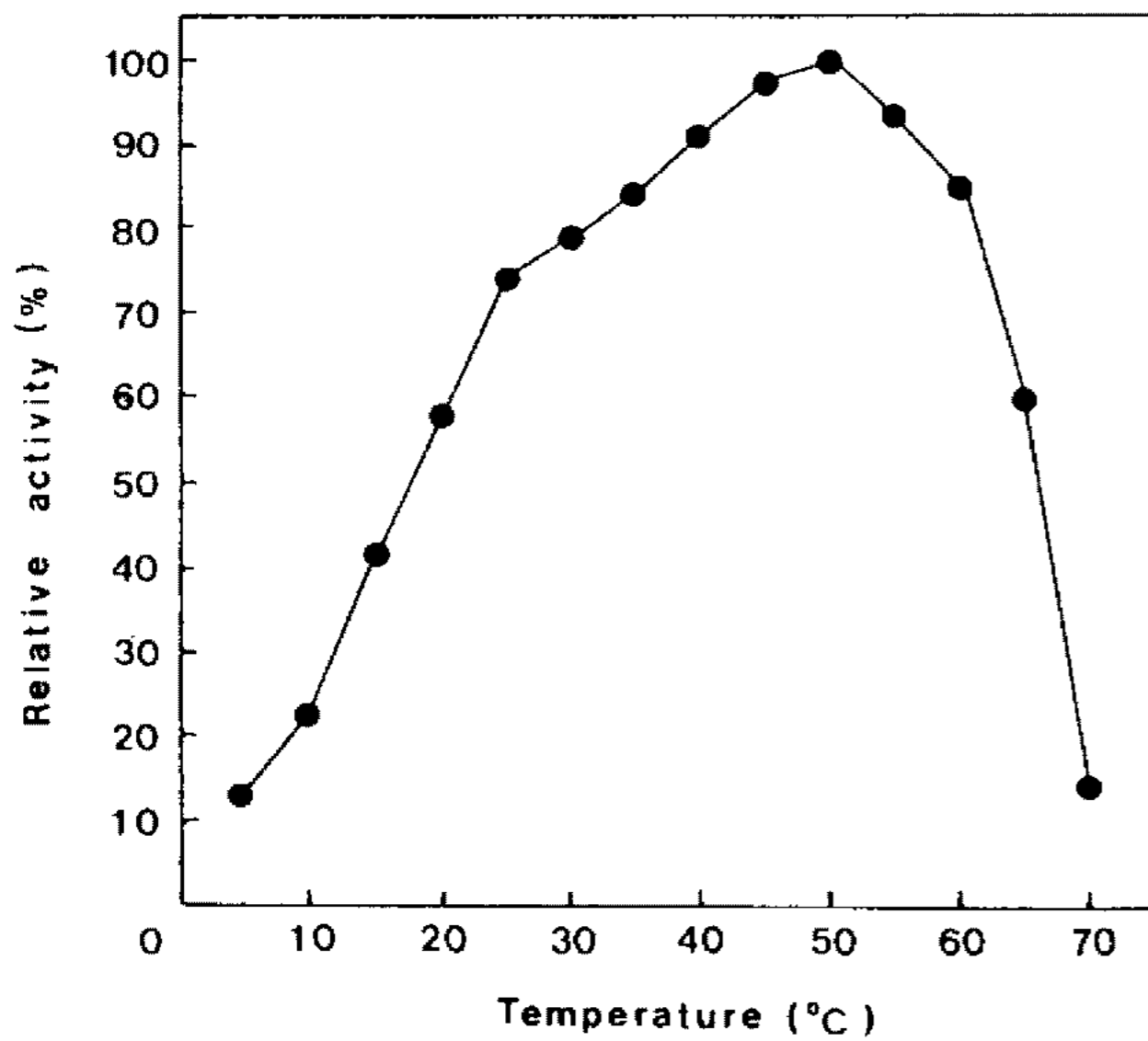


Fig. 3. Effect of temperature on the bacteriolytic activity of the enzyme produced by *Bacillus subtilis* SH-1. The reaction was carried out at various temperatures in 0.05M Tris-HCl buffer (pH 7.0) for 30 min.

최적 온도 및 pH

효소활성의 최적온도를 알아보기 위해 5~70°C의 범위에서 5°C 간격으로 30분간 반응시켜 효소활성을 측정 한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 50°C 부근에서 본 효소는 최대 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 *Streptomyces griseus*가 생산하는 세포벽 용균효소가 50°C, *Streptomyces rutgersensis*가 생산하는 용균 효소가 48°C가 최적 온도라고 보고한 결과와 일치하였다(5, 16). 효소활성에 미치는 최적 pH는 Fig. 4와 같이 pH 9.0에서 최적 활성을 보였으며 pH 10.0 이상 부터는 활성이 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 *St-*

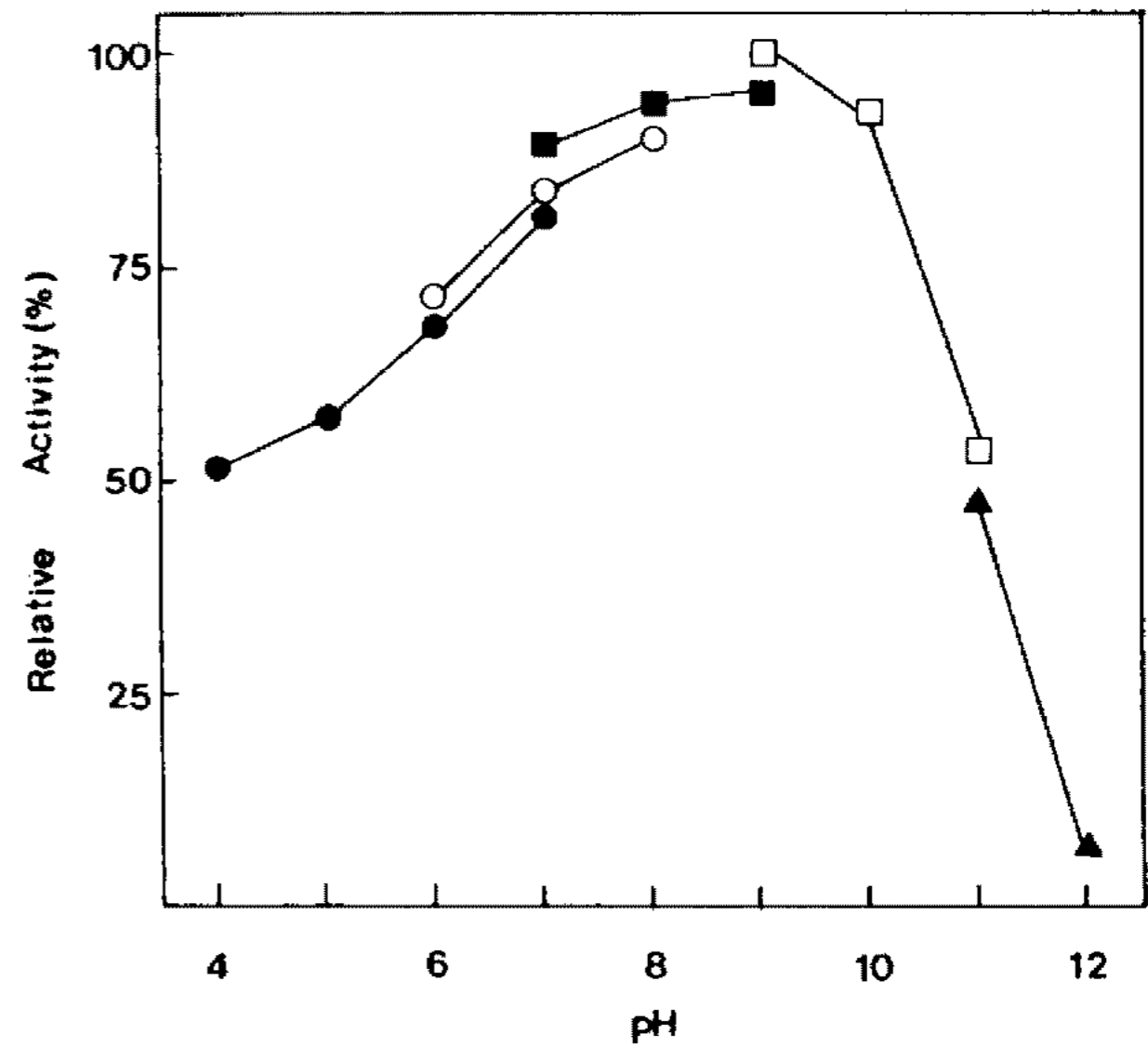


Fig. 4. Effect of pH on the activity of bacteriolytic enzyme of *Bacillus subtilis* SH-1.

- : 0.05M acetate, ○-○: 0.05M phosphate, ■-■: 0.05 M Tris-HCl, □-□: 0.05M glycine-NaOH, ▲-▲: 0.05M phosphate-NaOH

*reptomycetes rutgersensis*의 경우 최적 pH는 6.0, *Bacillus* R-4의 경우 최적 pH가 7.0~7.8이라고 보고된 결과 (5, 18)와 비교해 볼 때, 본 실험에서 사용한 균주가 분비하는 효소는 다소 높은 pH에서 효소활성이 좋은 것을 알 수 있었다.

열안정성 및 pH 안정성

효소의 열안정성을 조사하기 위해 0.05M Tris-HCl buffer(pH 7.0)에서 30°C에서 60°C까지 10°C 간격으로 가열처리하면서 경과시간에 따른 효소의 잔존활성을 측정 한 결과는 Fig. 5와 같다. 본 효소는 30°C에서 40분 가열하여도 잔존활성을 그대로 유지하여 30°C 이하의 온도에서는 안정하나 40°C에서는 20분 가열로 최초 활성의 40%가 감소되었으며 60°C에서는 10분 가열하였을 때 최초 활성의 90%가 감소되었고 20분 가열하였을 때는 거의 실활되었다. Fig. 6은 pH 변화에 따른 효소의 안정성을 조사하기 위하여 pH 4.0~12.0 사이의 각 pH에 따른 완충용액을 만들고 효소액 1ml를 가하여 5°C에서 24시간 방치한 후 잔존활성을 측정 한 결과이며, pH 6.0~10.0까지 잔존활성이 90% 이상이 있으므로 이 pH 범위에서는 안정한 효소임을 알 수 있었다. *Streptomyces rutgerensis*의 경우 pH 4.0~7.0의 범위에서 안정하다고 하였으며(5), *Bacillus* R-4의 경우에는 pH 7.0~9.0이라고 보고한 결과와 다소 비슷하였다(18).

Bacteriolytic enzyme의 작용 spectrum

미생물의 오염으로 인한 저온 보관 식품류 등에 대한 보존료로서의 가능성을 검토하기 위해 식중독의 원인 균을 주 대상으로 본 bacteriolytic enzyme에 대한

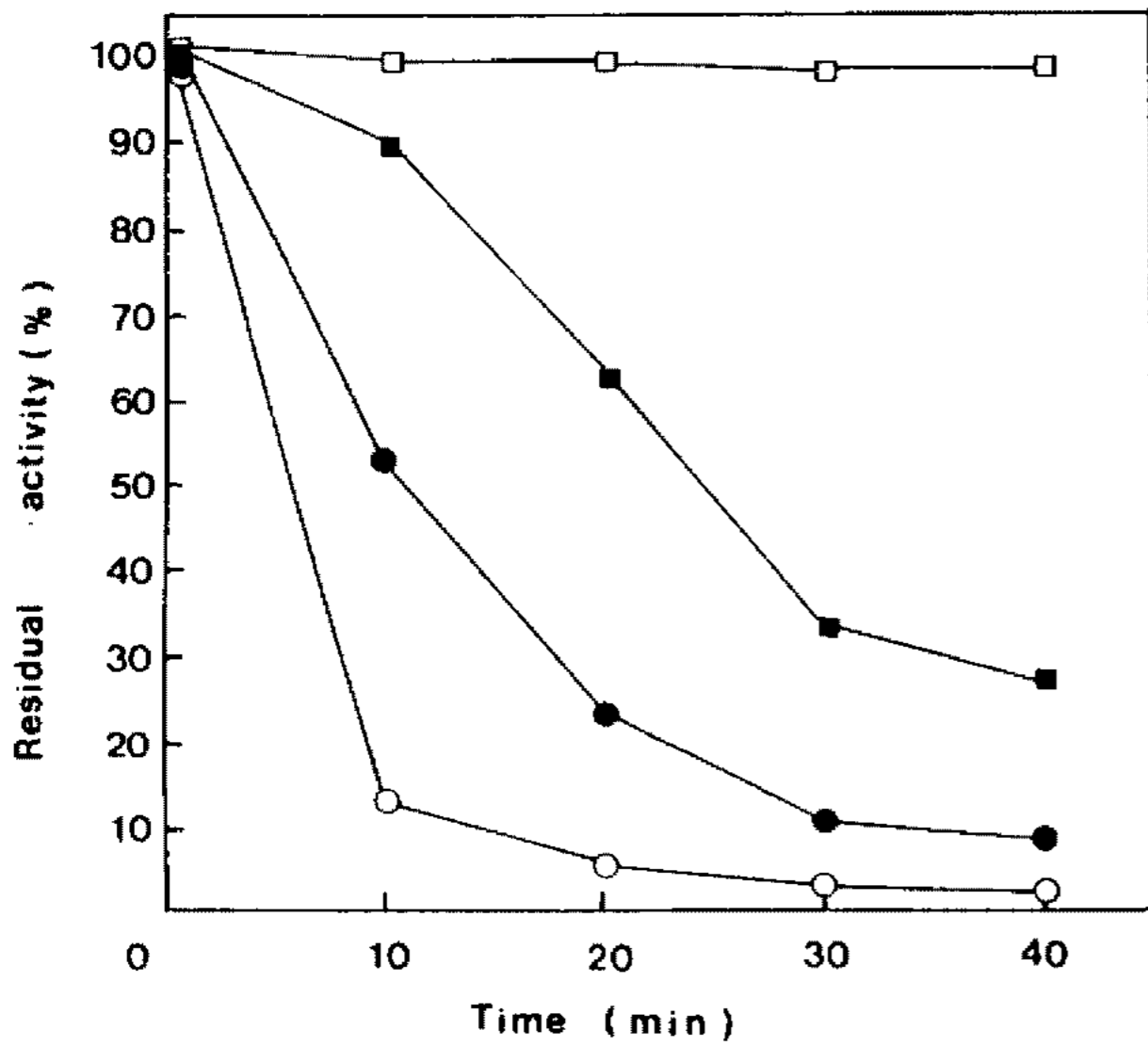


Fig. 5. Thermal stability of bacteriolytic enzyme of *Bacillus subtilis* SH-1.

□-□: 30°C, ■-■: 40°C, ●-●: 50°C, ○-○: 60°C

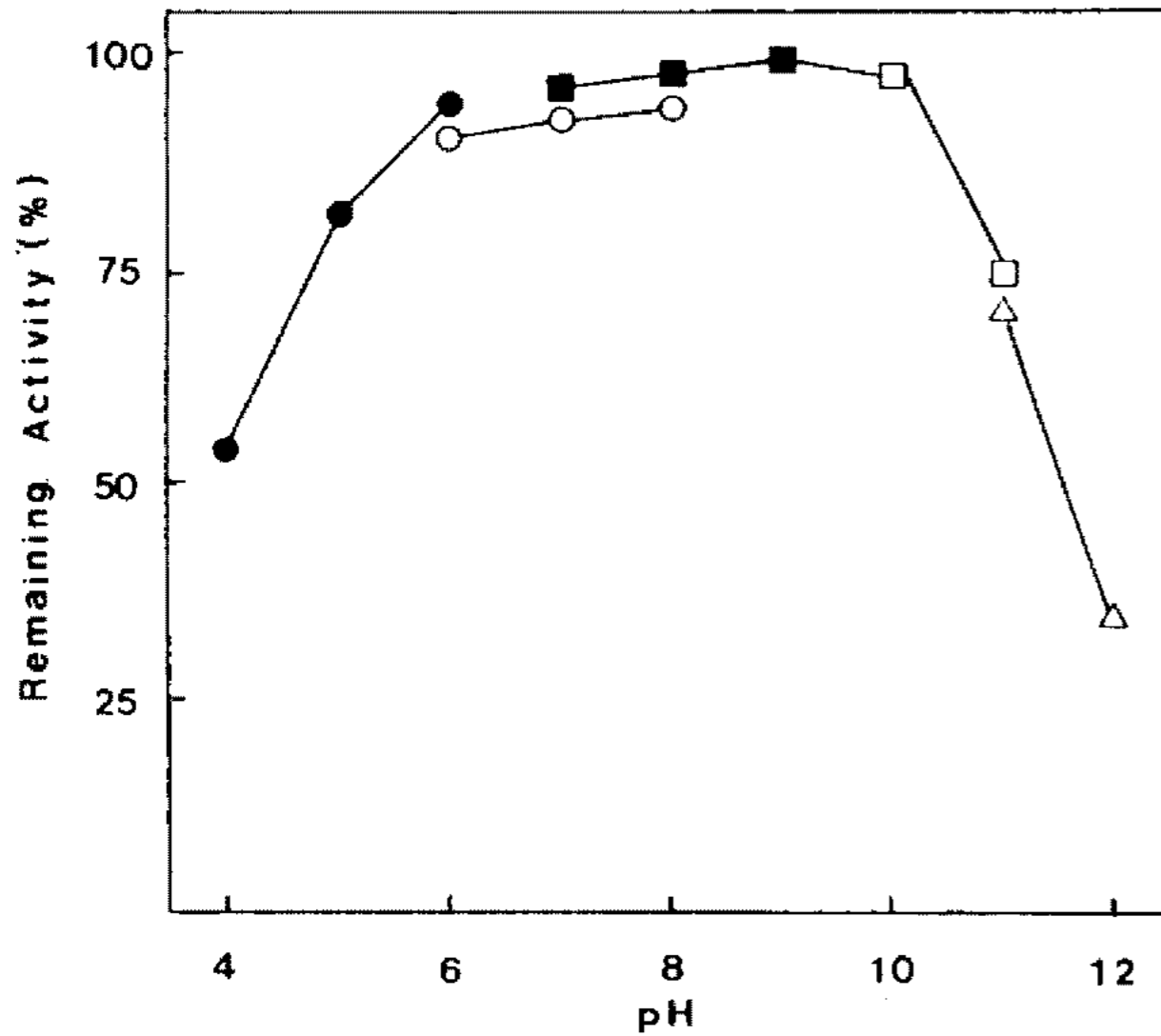


Fig. 6. pH stability of bacteriolytic enzyme of *Bacillus subtilis* SH-1.

Residual enzyme activity was measured after store at 5°C for 24 hours in a given buffer solution.

●-●: 0.05M acetate, ○-○: 0.05M phosphate, ■-■: 0.05 M Tris-HCl, □-□: 0.05M Glycine-NaOH, △-△: 0.05M phosphate-NaOH

cell의 용해율을 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이 Gram 음성균의 대부분의 균주에 대해서는 lysis 정도가 거의 나타나지 않았으나 가열 사 세포에서는 lysis의 효과가 있었다. 그리고 Gram 양성균의 경우에는 생세포 및 가열 사세포에서 lysis가 48% 이상으로 나타났으나 *Staphylococcus aureus*에 대해서는 cell의 용해가 일어나지 않았다.

한편, 생선어패류 섭취로 인한 식중독 원인균의 해양 유래 세균인 *Vibrio* sp.의 균주에 대해서는 73% 이상의

Table 2. Bacteriolytic action spectra of *Bacillus subtilis* SH-1 bacteriolytic enzyme

| Strain | Lysis % | |
|--|--------------|-------------------|
| | Living cells | Heat-killed cells |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 19215 | 0 | 60.3 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047 | 16.6 | 62.9 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> ATCC 12885 | 0 | 10.0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 6.0 | 50.2 |
| <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380 | 31.0 | 51.0 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 | 0 | 38.4 |
| <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 6750 | 0 | 33.9 |
| <i>Salmonella thompson</i> ATCC 10256 | 9.2 | 24.5 |
| <i>Shigella flexneri</i> ATCC 9473 | 2.8 | 35.1 |
| <i>Vibrio cholera</i> non 01 ATCC 25872 | 73.9 | 73.2 |
| <i>Vibrio vulnificus</i> | 79.0 | 79.3 |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 27519 | 74.2 | 73.6 |
| <i>Vibrio alginolyticus</i> | 95.3 | 94.2 |
| <i>Vibrio damsela</i> | 82.9 | 89.0 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115 | 78.3 | 82.0 |
| <i>Listeria ivanovi</i> ATCC 19119 | 73.3 | 72.9 |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | 53.1 | 52.0 |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 | 48.2 | 49.0 |
| <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21037 | 42.1 | 43.7 |
| <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 25848 | 70.9 | 71.4 |
| <i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10240 | 51.4 | 73.9 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 0 | 4.1 |
| <i>Micrococcus lysodeikticus</i> ATCC 4698 | 87.3 | 88.0 |

lysis 효과가 있었으며 또한 임신부에 있어서 유산의 원인이 되는 *Listeria monocytogenes*에 대해서도 cell의 78%가 용해되었다. 따라서 본 용균효소는 생선어패류 및 저온에서 유통되는 식품류 등에 대한 보존료로서의 활용가치가 매우 높은 것으로 사료되었다.

Peptidoglycan 분해산물의 변화

본 효소의 세균 세포벽에 대한 작용부위를 조사하기 위하여 *Micrococcus lysodeikticus*의 cell로부터 peptidoglycan을 분리하였다. 분리된 peptidoglycan 용액(O.D.₅₇₀ = 1.5) 15 ml와 효소액 5 ml를 혼합하여 40°C에서 반응시키면서 30분 간격으로 570 nm에서의 흡광도와 reducing sugar 및 amino group 등을 측정하여 Fig. 7에서 보는 바와 같이 570 nm에서의 흡광도가 감소함에 따라 free amino group은 증가하는 반면 reducing sugar의 생성은 거의 없었다. Reducing sugar가 반응 전에 비해 증가하면 N-acetylmuramic acid와 N-acetyl glucosamine의 β-1,4 결합이 가수분해된 것이며, free amino group이 증가하면 peptidoglycan의 가교결합이 절단된 것이다(17).

한편 전보(9)에서 *Bacillus subtilis* SH-1은 casein을

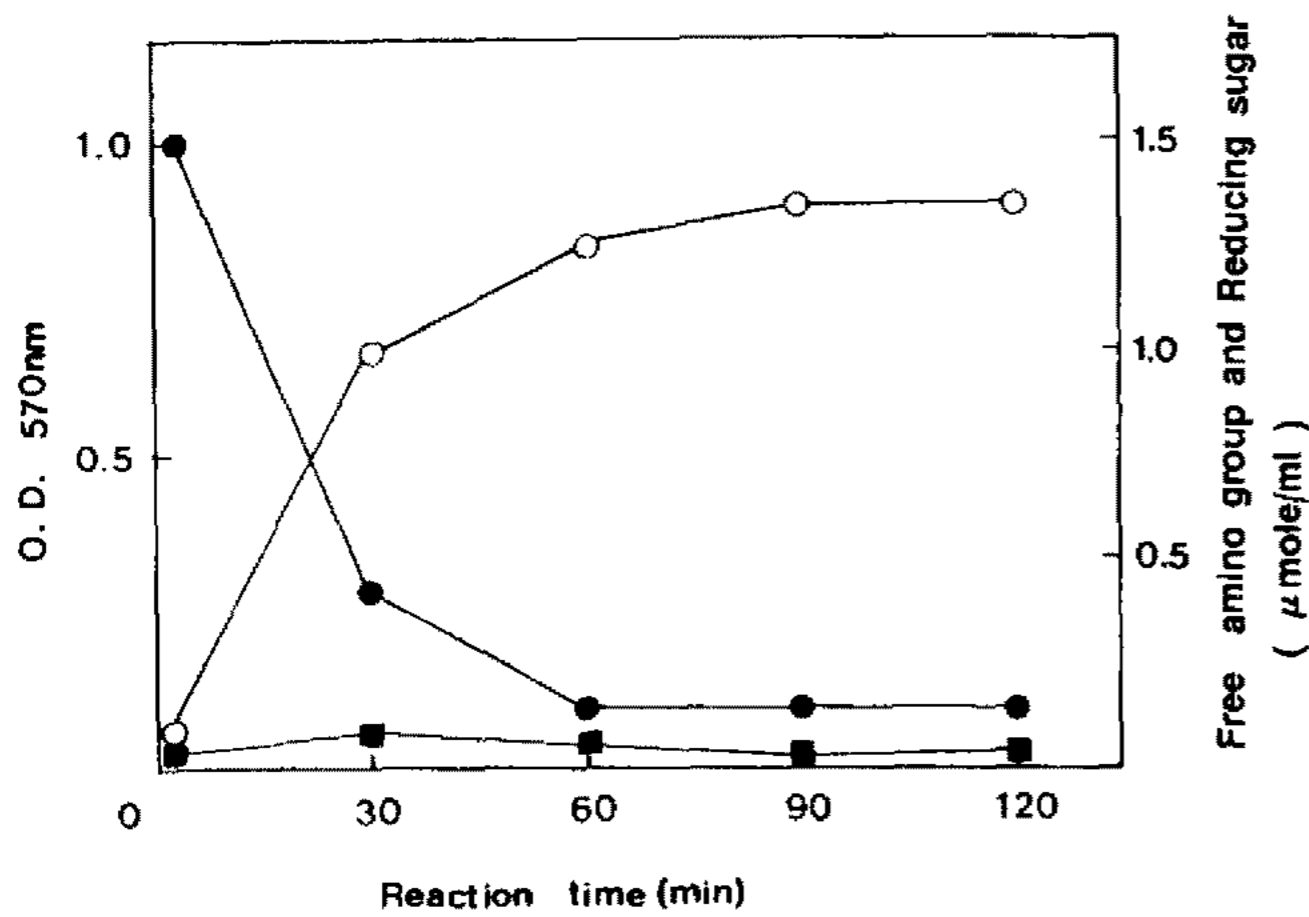


Fig. 7. Digestion of *Micrococcus lysodeikticus* cell wall by bacteriolytic enzyme.

●-●: turbidity, ○-○: amino group, ■-■: reducing sugar

가수분해 하는 것으로 나타나 protease 활성이 있음을 알 수 있어, 위의 결과와 더불어 본 효소는 peptidoglycan의 peptide bond를 절단하는 endopeptidase로 추정되었다.

요 약

용균활성이 우수한 균주를 사용하여 균주가 생산하는 용균효소를 분리 정제하고 그 특성을 검토하였다. *Bacillus subtilis* SH-1이 생산하는 효소의 정제는 최적 조건에서 얻은 배양액의 상침액을 황산암모늄 침전, CM-cellulose 및 Sephadex G-100에 의한 gel 여과 및 hydroxylapatite column chromatography를 행하였을 때 본 효소는 약 66.5배로 정제되었으며 회수율은 18.5%였다. 본 효소의 최적 pH는 9.0, 최적온도는 50°C이었고, pH는 6.0~10.0 범위에서 안정하였으며 열 안정성은 30°C 이하에서는 안정하나 60°C에서는 완전 실활되었다. 본 효소의 분자량은 23,000 dalton으로, 단일효소 단백질이었다. 식중독의 원인균을 주 대상으로 용균효소에 대한 cell의 용해율을 조사한 결과 대부분의 Gram 음성균에 대해서는 용해율이 31% 이하였으며 Gram 양성균에 대해서는 cell의 용해율이 48% 이상으로 나타났다. 특히 *Vibrio* sp.와 *Listeria* sp. 균주에 대한 용해율은 73% 이상이었다. Peptidoglycan 분해산물의 측정 결과 탁도가 감소됨에 따라 free amino group이 유리되어 나왔으며 casein의 가수분해능이 있는 것으로 보아 본 효소는 endopeptidase로 추정되었다.

참고문헌

- Ghuysen, J.M. 1968. Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriol. Rev.* **32**: 425-464.
- Roger, Y.S., A.A. Edward, and J. Ingraham. 1976. *The*

Microbial World. Pp. 119-153. 4th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

- Joklik, W.K., H.P. Willett, and D.B. Amos. 1980. *Zinsser Microbiology*. Pp. 106-134. 17th ed. Appleton Century Crofts.
- 菅原 庸. 1992. 海洋環境における溶菌酵素生産菌. *化学と生物* **28**: 771-773.
- Hayashi, K., T. Kasumi, N. Kubo, and N. Tsumura. Purification and characterization of the lytic enzyme produced by *Streptomyces rutgersensis* H-46. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 2289-2300.
- 赤司 景. 1970. サラミソ-セジの保存性に對する卵白リゾチムの効果. *日畜會報* **41**: 143-150.
- Nakamura, S., A. Kato, and K. Kobayashi. 1990. Novel bifunctional lysozyme-dextran conjugate that acts on both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 3057-3059.
- Kato, A., Y. Sasaki, R. Furuka, and K. Kobayashi. 1990. Functional protein-polysaccharide conjugate prepared by controlled dry-heating of ovalbumin-dextran mixtures high frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplast by plasmid DNA. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 107-112.
- 진성현, 류병호. 1995. 해양에서 용균효소를 분리하는 균주의 분리와 동정. *산업미생물학회지* **23**: 580-587.
- Sugahara, I., L.R. Berger, T. Kimura, and K. Hayashi. 1988. Effect of temperature and pressure on the lytic and autolytic activities of *Bacillus* sp. V37 isolated from coastal regions. *Nippon Suisan Gakkaishi* **54**: 861-867.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Watanabe, H. and T. Sato. 1981. Properties and lytic action of the P2-2 enzyme capable of lysing cells of *Micrococcus radiodurans*. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 1215-1221.
- Ghuysen, J.M., D.J. Tipper, and J.L. Strominger. 1966. *Methods in Enzymology* **53**: 685-699.
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23.
- Morita, T., S. Hara, and Y. Matsushima. 1978. Purification and characterization of lysozyme produced by *Streptomyces erythraeus*. *J. Biochem.* **83**: 893-903.
- Yoshimoto, T. and D. Tsuru. 1972. Studies on bacteriolytic enzyme II, Purification and some properties of two types of staphylolytic enzymes from *Streptomyces griseus*. *J. Biochem.* **72**: 379-390.
- Tsujisaka, Y., Y. Tominaga, and M. Iwai. 1973. Taxonomic characters and culture conditions of a bacterium which produces a lytic enzyme on *Rhizopus* cell wall. *Agr. Biol. Chem.* **37**: 2517-2525.

(Received 20 December 1995)