

호알칼리성, 고온성 *Bacillus* sp. TA-11에 대한 오골계 난백 Lysozyme의 용균특성

이성훈 · 조창호* · 안용근** · 이종수⁺

배재대학교 유전공학과, *배재대학교 물리학과, **충청전문대학 식품영양과

Characteristics of the Egg White Lysozymes from Ogol Fowl and Fowl for the Lysis of an Alkalophilic and Thermophilic *Bacillus* sp. TA-11

Sung-Hun Yi, Chang-Ho Cho*, Young-Geun Ann** and Jong-Soo Lee⁺

Dept. of Genetic Engineering, * Physics, Pai-Chai University, Taejeon 302-735, Korea

** Dept. of Food Nutrition, Chungcheong Junior College, Cheongwon 363-890, Korea

Abstract

Lytic activities of the egg white lysozyme from Korea-native Ogol fowl and a fowl against the alkalophilic and thermophilic *Bacillus* sp. TA-11 were investigated and compared. Lytic activity of the Ogol fowl lysozyme for *Bacillus* sp. TA-11 was the highest for the cell of post-logarithm phase and optimum concentration of the lysozyme was 0.25%. Optimum reaction pH and temperature were 4.5 and 35°C, respectively. Lytic activity of egg white lysozyme from fowl for *Bacillus* sp. TA-11 was the highest for the cell of stationary phase and optimum concentration of the lysozyme was 0.5%. Optimum reaction pH and temperature were 5.5 and 40°C, respectively.

Key words : lysozyme, Ogol fowl

서 론

계란에는 conalbumin, avidin과 lysozyme 등의 용균성 물질이 함유되어 있다. 이 가운데 난백 lysozyme (*N*-acetylmuramidase; endolysin; endo- β -*N*-acetylmuramide glycanhydrolase ; EC 3.2.1.27)은 세균 세포벽의 주성분인 peptidoglycan의 *N*-acetylmuramyl- β -1,4-glycoside 결합을 가수분해하는 효소로, 오래 전부터 많이 연구되어 작용 메커니즘과 성질 등이 대부분 밝혀졌다. Lysozyme은⁽¹⁾, 화학 방부제를 대신하는 식품 보존료로서의 가능성 등이 검토되어 왔다⁽²⁻⁶⁾. 그러나 난백 lysozyme은 주로 그람양성세균을 용균시키고, 감수성의 변화가 크며, lysozyme 내성 변이균주가 출현하는 등의 문제가 있기 때문에 용균 스펙트럼이 넓고 용균활성이 높은 lysozyme이 필요하다^(3,7). 또 주 공급원이 가금류로 한정되어 있어서 대량생산에 어려움이 있다. 재래종 오골계는 가금류인 닭에 속하면

서도 생존력과 번식력이 약하여 사육지역이 한정되어 있고, 약용과 식용 등 용도가 단순하므로 대량번식 방법과 새로운 용도를 개발해야 한다^(3,4).

필자 등은 연구가 빈약한 오골계 난백 lysozyme을 직접 결정법으로 추출, 정제하여 *Staphylococcus aureus* phage-29에 대한 용균성을 조사한 결과, 대수기 중기의 세포에 대하여 lysozyme을 0.05%로 30°C에서 30분간 처리하였을 때 가장 효과가 좋고⁽⁸⁾, 생우유, 어묵 및 소시지 등에 보존효과가 있다는 결과를 보고한 바 있다⁽⁶⁾. 또, 오골계 난백 lysozyme 과 물과의 혼합물에서의 임계현상 등에 대한 결과도 보고하였다⁽⁹⁾.

본 연구는 각종 세균에 대한 오골계 난백 lysozyme 과 일반 난백 lysozyme의 용균성을 조사 비교한 결과로, 작용메커니즘을 해석하고, 식품 보존료 등의 새로운 용도를 개발할 목적으로 각종 세균에 대한 용균성을 검토하여 β -galactosidase와 galacto-oligosaccharide를 강력하게 생성하는 호알칼리성, 고온성 *Bacillus* sp.

TA-11^(10,11)에 대한 용균성을 발견하고, 이 균에 대한 두 lysozyme의 용균조건을 비교한 결과이다.

재료 및 방법

1. 시험균주

Bacillus sp. TA-11은 필자 등이 β -galactosidase 생산 균주로 토양에서 분리하여 동정한 균^(10,11)으로 50°C, 1.5% lactose와 0.6% yeast extract를 함유한 LY배지⁽¹⁰⁾에서 잘 생육하는 호알칼리성 고온성균이다.

2. 난백 lysozyme의 추출 및 정제

충남 논산군 연산면의 오골계농장에서 오전 산란한 오골계 신선란과, 대전근교 양계장에서 오전 산란한 일반 신선란을 구입하여 Fig. 1과 같은 직접결정법^(8,12)으로 난백 lysozyme을 정제하였다. 정제 lysozyme의 *Micrococcus lysodeiticus*에 대한 용균활성은 18,500 U/mg, 일반 난백 lysozyme의 용균활성은 16,810 U/mg이었다.

3. 용균활성 측정

Weaver 등⁽¹³⁾과 Miller⁽¹⁴⁾의 방법에 따라 시험 균주를 lactose-yeast extract broth(1.5% lactose, 0.6% yeast extract, 0.15% K₂HPO₄, pH 9.5)에 접종하여 50°C에서 24시간 정지 배양한 후 8,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 세포를 회수한 다음 50mM 초산완충용액(pH 5.0)에 현탁시켰다. 여기에 제균여과후 lysozyme용액을 0.05% 첨가하여 30°C에서 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 용균활성은 용균에 의한 세포현탁액의 탁도 감소, 즉 540nm에서의 반응전 흡광도와 반응후 흡광도와의 차로 하였다.

Egg

↓ break

Egg white

↓ homogenize and adjust to pH 9.5 with 5% NaCl, add seed and storage for 3 days at 45°C

Crystalline product

↓ centrifuge(8000rpm, 1hr)

Precipitate(A)

↓ dissolve(acetate buffer, pH 4.5) and centrifuge

Supernatant(B)

↓ adjust to pH 9.5 with 5% NaCl and centrifuge

Two times repeat from A to B

↓ evaporate and lyophilize

Purified lysozyme

Fig. 1. Extraction and purification of egg white lysozymes from Ogol fowl and fowl by the direct crystallization method.

결과 및 고찰

1. 세균에 대한 난백 lysozyme의 용균성

*Bacillus*균을 포함한 몇 종의 세균에 대한 오골계 난백 lysozyme과 일반 난백 lysozyme의 용균성을 조사한 결과 Table 1과 같이 호알칼리성, 고온성 *Bacillus* sp. TA-11에 대하여 용균성이 있었고 나머지 균들에 대해서는 용균성이 없었다.

이 결과는 오골계 난백 lysozyme이 *S. aureus* phage-29와 *B. subtilis* ATCC 6633에 대하여 용균성을 나타냈다는 오 등⁽⁸⁾의 결과와 다르다.

일반적으로 난백 lysozyme은 그람 양성균에 특이적으로 용균작용을 하고^(1,3) 그람음성균에 대하여도 일부

Table 1. Lytic activities of egg white lysozymes from Ogol fowl and fowl

Strain	Gram stain	Growth*	
		Ogol fowl	fowl
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 65389	+	++	+
<i>Escherichia coli</i> MC1061	-	+	+
<i>Bacillus</i> sp. TA-11	+	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> CAM 11038	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> KCCM 11579	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i> KCCM 11880	-	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 13130	-	+	+
<i>Lactobacillus delbruchii</i>	+	++	+

* Growth was investigated after incubation for 3 days at 37°C (50°C for *Bacillus* sp TA-11) on a Nutrient broth plate contained 0.05% lysozyme. + growth, - no growth

작용한다⁽²⁾. 또한 lysozyme을 비롯한 세포벽 분해효소의 용균성은 속과 종이 같은 균이라도 배양온도와 시간, pH 및 각종 첨가제 등에 따라 세포벽 성분과 구조가 달라지므로 균주간에 차이가 나타난다.^(15,16)

2. *Bacillus* sp.TA-11의 배양시간에 대한 영향

Bacillus sp. TA-11의 배양시간에 따른 오골계 난백 lysozyme의 용균활성은 18시간 정지 배양하여 회수한 대수기 후기의 세포에 대하여 가장 높았고 일반 난백 lysozyme은 24시간 배양한 정지기 세포에 대하여 용균활성이 높았다(Fig. 2).

이 결과는 오 등⁽⁸⁾의 오골계 난백 lysozyme의 *S. aureus* phage-29에 대한 용균활성이 24시간 배양한 대수기 중기의 세포에서 제일 높았으며 이는 대수기 중기에는 세포의 증식이 왕성하므로 세포벽의 구조가 분열증식에 적합한 유연구조를 갖기 때문이라고 하는 결과와는 상이하였다.

3. *Bacillus* sp. TA-11에 대한 lysozyme의 농도

Bacillus sp. TA-11를 18시간 배양한 세포를 기질로 오골계 난백 lysozyme과 일반 난백 lysozyme의 농도별 용균활성을 측정 한 결과, 오골계 lysozyme은 0.25%, 일반 난백 lysozyme은 0.50%로 처리하였을 경우 용균활성이 가장 높았다(Fig. 3).

이 결과는 *Proteus vulgaris*와 대장균에 대한 난백 lysozyme의 용균성이 0.05%에서 가장 높다는 Akashi⁽²⁾의 보고와, 오골계 난백 lysozyme의 *S. aureus*에

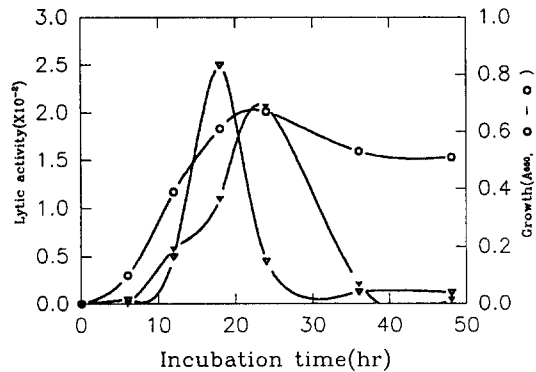


Fig. 2. Effect of incubation time of *Bacillus* sp. TA-11 on the lytic activity of Ogol fowl lysozyme (△-△) and fowl lysozyme (▼-▼). After the incubation for each period, the cells were suspended in a 50mM sodium acetate buffer(pH 5.0) then treated with 0.05% of lysozyme for 30min at 40°C.

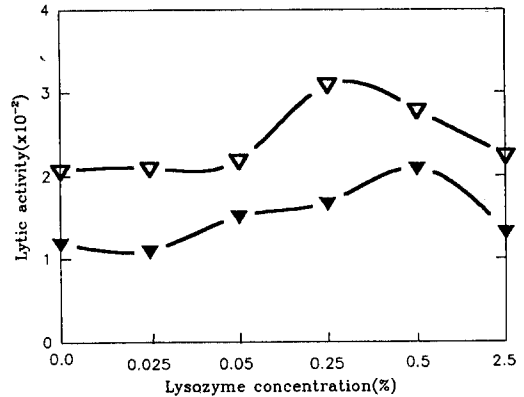


Fig. 3. Effect of the lysozyme concentration on the lytic activity of Ogol fowl lysozyme (△-△) and fowl lysozyme (▼-▼) for *Bacillus* sp. TA-11. The strain was cultured for 18 hrs or 24 hrs for the treatment with Ogol fowl lysozyme or fowl lysozyme, respectively.

대한 용균성이 0.05%에서 가장 높다는 오 등⁽⁸⁾의 보고 및 *M. lysodeiticus*에 대한 용균성 실험결과보다 농도가 높다. 이와 같이 최적 lysozyme의 농도가 차이 나는 것은 균체 기질의 복잡한 구조 때문⁽⁸⁾으로 생각된다.

4. *Bacillus* sp. TA11에 대한 lysozyme의 작용 pH

Bacillus sp. TA-11를 기질로 난백 lysozyme을 가하여 용균활성에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과, 오골계 난백 lysozyme은 pH 4.5에서, 일반 난백 lysozyme은 pH 5.5에서 용균 활성이 가장 높았다(Fig. 4).

이 결과는 오 등⁽⁸⁾이 오골계 난백 lysozyme의 *S. aureus* phage-29에 대한 용균성이 pH 4.5에서 가장 높다고 보고한 결과와 유사하였으나, 일반 난백 lysozyme의 작용 최적 pH인 6.0~8.0 보다 산성이다.

5. *Bacillus* sp. TA-11에 대한 lysozyme의 작용 온도

Bacillus sp. TA-11를 기질로 난백 lysozyme의 용균활성에 미치는 반응온도의 영향은 Fig. 5와 같이 오골계 난백 lysozyme은 35°C에서 용균활성이 가장 높았다. 25°C와 45°C에서는 활성이 거의 없었으나 일반 난백 lysozyme은 오골계 lysozyme 보다 다소 높은 40°C에서 용균활성이 가장 높았다.

이는 오골계 난백 lysozyme의 *S. aureus* phage-29에 대한 용균활성이 30°C에서 가장 높았고 35°C에서도 비교적 높았다는 오 등의 결과⁽⁸⁾와 유사하다.

위와 같은 두 lysozyme의 *Bacillus* sp. TA-11에 대

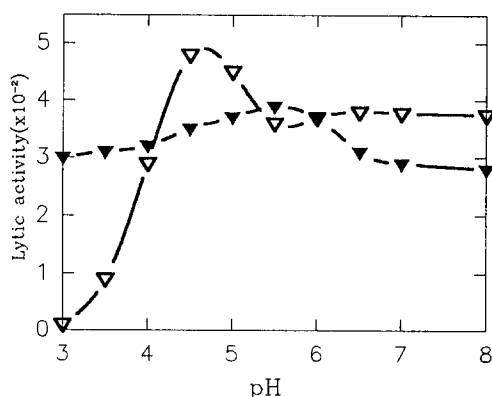


Fig. 4. Effect of pH on the lytic activity for *Bacillus* sp. TA-11 of Ogol fowl lysozyme (▽-▽) and fowl lysozyme (▼-▼). After the strain was cultured for 18 hrs 24 hrs at 50°C, respectively, the cell were suspended in various buffer, then treated with 0.25% Ogol fowl and 0.5% fowl lysozyme at 40°C.

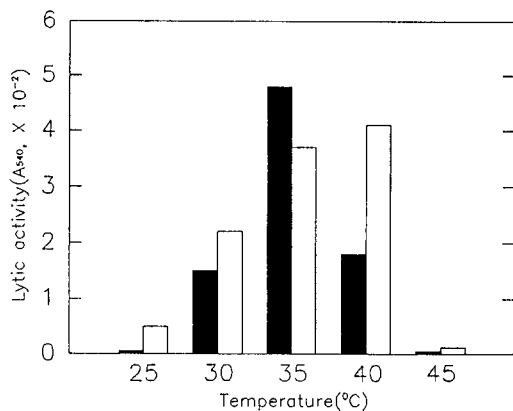


Fig. 5. Effect of temperature on the lytic activity for *Bacillus* sp. TA-11. of Ogol fowl lysozyme (■) and fowl lysozyme (□). The strain was cultured for 18hrs and 24 hrs at 50°C. cell were suspended the cell in a 50mM sodium acetate buffer (pH 4.5, 5.5) and then treated with 0.25% of Ogol fowl lysozyme, respectively and 0.5% of fowl lysozyme for 30 min at various temperature.

한 용균성을 일반 세균에 대한 결과⁽⁸⁾와 비교하여 볼 때 lysozyme의 반응 온도와 처리시간 및 세포농도 등은 비슷하였으나 작용최적 lysozyme 농도는 5~10배 높았고, 반응 pH는 4.5와 5.5로서 산성쪽이었고, 대수기 후기와 정지기의 세포에 대하여 감수성이 컸던 점 등에 차이가 있다. 또한 본 시험균주에 대한 오골계 난백

lysozyme과 일반 난백 lysozyme의 반응최적 온도, 처리시간, 세포농도와 성장시기 등은 비슷하였으나, 반응 최적 pH와 lysozyme의 농도에서는 다소 차이가 났다.

요 약

Bacillus sp. TA-11에 대한 오골계 난백 lysozyme과 일반 난백 lysozyme의 용균성을 비교분석하였다. 오골계 난백 lysozyme의 용균활성은 *Bacillus* sp. TA-11를 50°C에서 18시간 '정지배양한 대수기 후기의 세포에 대하여 가장 높았고, lysozyme의 농도는 0.25%가 최적이었다. 또한 lysozyme의 최적반응 pH와 온도는 각각 4.5와 35°C였다. 일반 난백 lysozyme의 용균활성은 시험균주를 24시간 배양한 정지기의 세포에 대하여 가장 높았고 lysozyme의 최적 농도는 0.5%였으며 반응 최적 pH와 온도는 각각 5.5과 40°C이었다.

참고문헌

1. Imoto, T. : Vertebrate Lysozyme, The Enzyme, Vol. 7. AP. New York. p. 665(1972).
2. Akashi, A. : Lytic action of egg white lysozyme on the microorganism contaminating foods, *Shokueishi* (Japan), 6(6), 543(1965).
3. Funatsu, M. and Tsuru, D. : Bacteriolytic Enzyme, Kodansya Sci. Tokyo. p. 1, 34, 227(1977).
4. 한성욱, 장규섭, 이규승, 김덕환 : 연산 오골계의 보호육성을 위한 육종 및 식품개발 연구, 충청남도 용역 연구 보고서(1986).
5. Hughey, V. L. and Johnson, E. L. : Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involve in food spoilage and food borne disease, *Appl. Envir. Microbiol.*, 53(9), 2165(1987).
6. 이종수, 최영준, 김나미, 안용근, 오홍록 : 오골계 난백 lysozyme이 몇가지 동물성 식품의 보존에 미치는 영향, *배재대 자연과학 논문집*, 7, 53(1995).
7. Peterson, R. G. and Hartstell, S. E. : The lysozyme spectrum of the gram negative bacteria, *J. Infect. Disease*, 96, 75(1955).
8. 오홍록, 이종수, 김찬조 : *Staphylococcus aureus* phage type 29에 대한 오골계 난백 lysozyme의 용균성, *충남대 농업기술 연구소 논문집*, 14, 286(1987).
9. 조창호, 서영석, 이종수, 김세창 : 두 종류 섞임체 단백질-물의 임계현상, *새물리*, 36(2), 119(1996).
10. 최영준, 이종수 : 호알칼리성, 고온성 *Bacillus* sp. TA-11에 의한 β -galactosidase의 생산, *한국 생물공학회지*, 9, 400(1994).
11. Choi, Y. J., Kim, I. H., Lee, B. H. and Lee, J. S. : Purification and characterization of β -galactosidase from alkalophilic and thermophilic *Bacillus* sp. TA-11, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 22, 191(1995).
12. Alderton, G. and Fevold, H. L. : Direct crystallization of lysozyme from egg white and some crystal-

- line salts of lysozyme, *J. Biol. Chem.*, **164**, 1(1946).
13. Weaver, G. L. and Kroger, M. : Deaminated chitin affinity chromatography : A method for the isolation, purification and concentration of lysozyme, *J. Food Sci.*, **42**, 1084(1977).
 14. Miller, T. E. : Killing and lysis of gram negative bacteria through the synergistic effect of hydrogen peroxide, ascorbic acid, and lysozyme, *J. Bacteriol.*, **98**, 949(1969).
 15. 吳洪祿, 下田忠久, 船律勝 : *A. luteus*가 생산하는 효모세포벽 용해 촉진 효소에 관한 연구 (I), *한국 식품과학회지*, **11**, 242(1979).
 16. 정창기, 이종수, 김찬조 : Zymolyase-20T에 대한 *Sacch. cerevisiae* D-71과 *Zygosacch. rouxii* SR-S의 감수성, *한국 산업미생물학회지*, **16**, 136(1988).
-

(1996년 11월 28일 접수)