

오골계 난백에서 분리한 Lysozyme의 항균작용*

오 흥 록·배 기 환*

충남대학교 농과대학 축산학과

*충남대학교 약학대학 약학과

(1987. 10. 20 접수)

The Antibacterial Activities of Lysozyme Isolated from the Egg White of Ogol Fowl

Hong-Rock Oh and Ki-Hwan Bae*

Dept. of Animal Sci., Chungnam National University

*Dept. of Pharmacy, Chungnam National University

(Received Oct. 20, 1987)

Abstract

A lysozyme is isolated and purified partially from the egg white of Korean native Ogol fowl (Natural monument No. 265) by the method of direct crystallization.

The bacteriolytic activities of 1% lysozyme against *Staphylococcus aureus* 57, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, and *Escherichia coli* NIHJ-JC2 was investigated with or without some other antibacterial materials in the nutrient broth culture.

According to the results, 1% lysozyme showed the appreciable bacteriolytic activities of about 12-16% to the almost of bacteria cultured.

The synergistic effect with the lysozyme and some antibacterial materials on the growth inhibition of the bacteria cultured exhibited higher in order of the 0.001% magnolol -22%, the 0.001% honokiol -14% against *S. aureus*, and of the 0.0005% erythromycin -29%, the honokiol -22%, the magnolol -17%, the 0.005% phospholipase -6% against *E. coli*. And that synergistic effect against *B. subtilis* showed a fairly high level of about 52% with the erythromycin but not any effect with others.

서 론

1909년 Laschtschenko¹⁾는 닭의 난백중에 *Bacillus subtilis*에 대한 용균성 물질의 존재를 시사한 바 있는데, Fleming(1922년)²⁾은 이것의 본체가 용균성의 효소상의 물질임을 밝히고 lysozyme 이라고 이름지었다.

Lysozyme의 용균작용은 균체의 세포벽을 구성하는 mucopolysaccharides의 dimer인 N-acetyl-muramic acid와 N-acetylglucosamine의 β -1,4-linkage의 가수분해에 의한 것으로 밝혀졌다.³⁾ 이후 많은 연구자들에 의하여 Gram 양성(+) 및 음성(-)의 세균들에 대한 항균작용이 보고되었다.^{4~7)}

* 본 연구는 한국과학재단의 차관연구비 지원에 의하여 수행된 실험결과 중의 일부임.

본 연구에서는 현재 시중에서 건강식품으로 관심이 높으며, 동의보감에도 그 약용적 효능이 인정되고 있는 우리나라 고유의 재래종 닭인 오골계(천연기념물 265호)의 난백에서 lysozyme을 분리하여 그 특성을 탐색하고자 하였다. 먼저, 본 실험에서는 분리된 lysozyme의 항균력을 우리 주변에서 흔히 접할 수 있는 몇 개의 gram 음·양성의 세균에 대하여 검토하였으며, 아울러 이미 알려진 몇 가지의 세균성식 억제물질, 항생제 및 식물에서 단리된 항균성 물질과 분리된 lysozyme과의 상호협동작용에 의한 항균력의 상승효과도 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시 약

Nutrient broth 및 BHI는 BBL Co., agar와 항생제인 erythromycin(E-6376, 95.1%) 및 phospholipase-D(90units/mg solid)는 Sigma Co., 그리고 glycine은 Junsei Co. (Japan)의 제품을 구입, 사용하였다.

한편, 복련과 식물 *Magnolia obovata*의 줄기에서 추출, 단리된 biphenyl 유도체의 일종인 magnolol과 honokiol은 당 실험실에서 조제된 것을 사용하였다.

2. 균 주

Gram 양성세균으로는 *Staphylococcus aureus* 57과 *Bacillus subtilis* ATCC 6633을, gram 음성세균으로는 *Escherichia coli* NIHJ-JC-2를 사용하였다.

3. Lysozyme의 분리·정제

한국토종 오골계(천연기념물 265호)의 난백 lysozyme은 충남 논산군 연산면의 연산오골계 농장으로부터 오전 산란의 신선란을 구입하여 직접결정법^{8,9)}의 반복에 의하여 분리·정제되었다. 즉, 난백 1ℓ을 호모게나이저로 충분히 교반시킨 다음, 식염 50g을 가하여 교반·용해시키고, 이어서 1N NaOH를 가하여 pH를 9.5로 조절하였다. 여기에 결정핵으로 따로 조제한 미량의 Lysozyme의 등전점 결정을 가하여 4℃에서 보존하면서 수시로 교반하여 결정의 석출을 촉진하였다. 석출된 조

결정의 침전물을 5,000rpm에서 10분간 원심분리하여 회수하였고, 다시 증류수에 현탁시켜 0.5N 초산용액으로 pH 4.5로 조절하여 lysozyme을 용해시켰다. pH 4.5의 조건하에서 불용성 부분을 원심분리로 제거한 다음, 알서와 같은 결정과 용해 및 재결정의 조작을 2회 더 반복하여 얻어진 3차 결정품을 투석·동결 건조하였다. Lysozyme의 3차 결정품은 전기영동적으로는 완전한 순품은 아니었으나, 본 실험을 시행하는 데 있어서 별다른 지장이 없을 정도로 거의 순품에 가까운 정제상태가 인정되었다. 한편, *Micrococcus lysodeikticus*(Sigma Co)의 동결건조 균체를 기질로 한 동결건조 lysozyme의 용균활성은 약 45,000 단위였다. 이상의 분리·정제에 관한 내용은 별도의 실험결과 중에서 보고될 예정이다.

4. 항균시험

각 공시 세균은 시험전에 BHI agar 배지에서 37℃로 24시간 배양시킨 후, Nutrient broth에 현탁시켜, 그 농도를 분광광도계로 540nm에서 10% 투과도를 갖도록 조절하였다. 이 균액 1ml에 Nutrient broth 99ml를 가하여 균일하게 혼합한 희석액을 시료로 사용하였다. 시료액 중의 lysozyme의 농도는 1%^{5,10)}로 하였고, glycine, erythromycin, magnolol, honokiol 및 phospholipase-D 등의 항균성 첨가물은 이들의 최소저지농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)¹⁰⁻¹²⁾를 2배로 희석한 농도, 즉 glycine은 1% erythromycin은 0.0005%, magnolol과 honokiol은 0.001%, 그리고 phospholipase는 0.005%로 하였다. 먼저, lysozyme과 각 항균성 첨가물의 단독작용에 의한 항균력을 조사한 뒤에, lysozyme과 첨가물을 1:1로 섞어 37℃에서 72시간 배양하면서 공시균의 증식속도를 1, 24, 48, 72시간의 간격으로 O. D. 540nm에서의 탁도변화를 측정하여, lysozyme의 항균력과 첨가물에 의한 항균력의 상승효과를 조사하였다. 협동작용에 의한 상승효과는 단독작용시에 얻어진 값(%)의 합과 협동작용시의 값(%) 사이의 차이로 표시하였다.

결과 및 고찰

1. *Staphylococcus aureus*에 대한 항균작용

널리 알려진 그램-양성의 식중독균 중에서 비교적 축산식품에서 문제시되는 *Staphylococcus aureus* 세포에 대한 lysozyme의 항균력, 그리고 lysozyme과 몇 가지의 항균성 첨가물과의 상호 협동작용에 의한 항균력의 상승효과를 검토하였다(Fig. 1, 2).

Fig. 1에서 보는 바와 같이 공시균주에 대한 lysozyme의 증식억제효과는 완만하고 미약하였으며, 배양 72시간에 약 16%의 억제효과를 보였다. 한편, 본 실험에 사용한 항균성 첨가물 중 erythromycin은 가장 높은 증식억제효과(72시간 배양에 약 33%)를 보였으나, phospholipase는 그 억제효과를 인정하기 어려웠고, 나머지 첨가물들은 미약하나마 억제작용이 관찰되었다. 여기에서 phospholipase의 증식억제작용이 인정되지 않은 것은 그램양성균의 세포벽의 기초 골격구조¹³⁾가 peptido-glycan으로 구성되어 있기 때문에 phospholipase의 단독작용만으로는 골격구조에 변화를 가할 수 없었기 때문인 것으로 생각된다. 반면에, lysozyme은 그 단독작용만으로도 용균작용에 의한 증식억제효과를 나타낼 수 있었던 것은

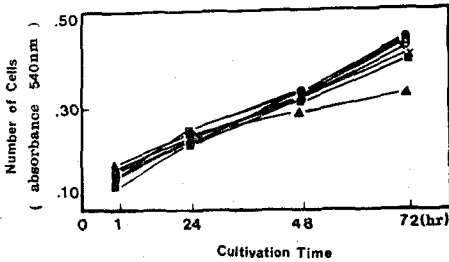


Fig. 1. Bacteriolytic action of lysozyme, glycine, erythromycin, magnolol, honokiol and phospholipase-D against *Staphylococcus aureus* 57.

- : Control
- : 1% Lysozyme
- ×: 1% Glycine
- ▲: 0.0005% Erythromycin
- △: 0.001% Magnolol
- : 0.001% Honokiol
- : 0.005% Phospholipase-D

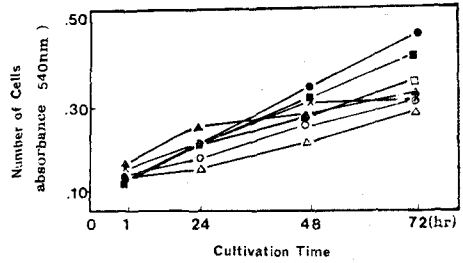


Fig. 2. Bacteriolytic action of lysozyme and its synergists against *Staphylococcus aureus* 57.

- : Control
- : 1% Lysozyme
- ×: 1% Lysozyme+1% Glycine
- ▲: 1% Lysozyme+0.0005% Erythromycin
- △: 1% Lysozyme+0.001% Magnolol
- : 1% Lysozyme+0.001% Honokiol
- : 1% Lysozyme+0.005% Phospholipase-D

골격구조인 peptido-glycan층에 작용하여 기초구조의 일부 성분인 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine의 β -1.4-결합을 가수분해하여 기본구조에 손상을 주어 세포의 붕괴를 유발시키기 때문인 것으로 추정된다. Glycine의 항균작용은 glycine이 세균의 peptido-glycan층의 생합성을 저해¹⁴⁾하기 때문인 것으로 알려져 있으며, erythromycin은 물론 honokiol, magnolol¹⁵⁻¹⁸⁾도 항생물질과 같은 억제작용을 가진 것으로 생각된다.

Fig. 2는 공시균에 대한 lysozyme과 첨가물의 협동작용에 의한 증식억제상의 상승효과를 검토한 실험결과로, magnolol, honokiol, phospholipase 및 glycine은 각각 22, 14, 11, 9% (표1 참조)의 상승효과를 보였으나, erythromycin은 상승효과는 물론 상가작용의 정도에도 미치지 못하였다. 이는 공시균에 대한 lysozyme과 erythromycin의 작용양식이 유사하게 중복되어 반응속도가 느린 어느 한쪽의 기능은 발휘되지 못하기 때문인 것으로 추정된다.

한편, 단독작용에서는 아무런 억제작용이 인정되지 않았던 phospholipase가 lysozyme과의 협동작용에서 11%의 상승효과를 나타낸 것은, 공시균의 세포벽의 구조 중 특수구조층(non-peptidoglycan)인 lipoteichoic acid 부분에 phospholipase가 작용하여 약하게나마 변화를 주었고, 이러한

Table 1. The inhibition effects of the lysozyme from ogol fowl egg-white on the growth rate of some bacterias with or without antibacterial effectors (unit: %)*

Combination of antibacterial effectors	Micro-organisms		
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Lysozyme(L)	16	12	16
Glycine(C)	12	21	22
(L)+(C)	37	18	24
Synergistic effect**	9	0	0
Erythromycin(E)	33	6	9
(L)+(E)	33	70	54
Synergistic effect	0	52	29
Magnolol(M)	7	18	3
(L)+(M)	45	26	36
Synergistic effect	22	0	17
Honokiol(H)	8	18	7
(L)+(H)	38	20	45
Synergistic effect	14	0	22
Phospholipase(P)	0	2	6
(L)+(P)	27	15	28
Synergistic effect	11	1	6

*: Inhibition effect(I.E, %) = $100 - \frac{\text{absorbance at 540nm of samples}}{\text{absorbance at 540nm of control}} \times 100$

** : Synergistic effect(%) = I.E of (lysozyme + effector) - (I.E of lysozyme + I.E of effector)

변화로 인해서 lysozyme이 보다 손쉽게 광범위하게 골격구조층에 접하여 세포벽의 용해를 촉진시킬 수 있는 여건이 조성되었기 때문인 것으로 생각된다.

또한, 이상의 실험결과(Fig. 1, 2)와 뒤에 제시된 Table 1의 결과에서 미생물에서 생산된 erythromycin과 식물에서 추출된 magnolol 및 honokiol에 있어서 공시균주에 대한 lysozyme과의 협동작용의 상승효과에 뚜렷한 차이를 보인 것은 양자 사이에 공시균주에 대한 작용기전이 다르기 때문인 것으로 생각된다.

2. *Bacillus subtilis*에 대한 항균작용

그람-양성균 중 *Bacillus subtilis*는 세포생물학이나, 유전자공학의 좋은 재료로 널리 사용되

고 있다. 따라서 본 균주에 대한 lysozyme의 항균성 및 Fig. 2의 실험에서와 동일하게 기존의 항생제 및 항균성 물질과의 작용에 의한 증식억제의 상승효과를 검토하여 Fig. 3, 4에 제시하였다.

단독작용(Fig. 3)에 있어서 각 시료들은 배양 24~48시간 사이에 억제효과가 높았으나, 그 이후에는 감소하였다. Fig. 3과 Table 1에서 보는 바와 같이 배양 72시간의 경우 본 공시균에 대한 magnolol과 honokiol의 억제작용은 *S. aureus* (Fig. 1)에 대한 결과에 비해서 약 2.5배 정도, glycine은 약 2배 정도 증가하였으나, erythromycin은 반대로 1/5~6 정도로 감소하였다. 이러한 현상은 전향에서도 언급한 바와 같이 항균성 물질들의 세균에 대한 작용기전이 다르고, 같은 그람양성 세균에 속할지라도 균종과 균주에 따

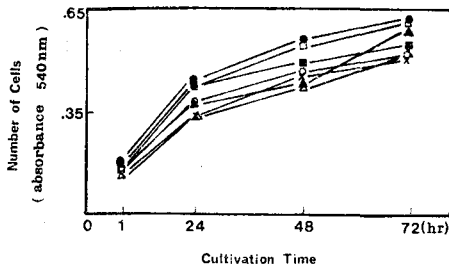


Fig. 3. Bacteriolytic action of lysozyme, glycine, erythromycin, magnolol, honokiol and phospholipase-D against *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

- : Control
- : 1% Lysozyme
- ×: 1% Glycine
- ▲: 0.0005% Erythromycin
- △: 0.001% Magnolol
- : 0.001% Honokiol
- : 0.005% Phospholipase-D

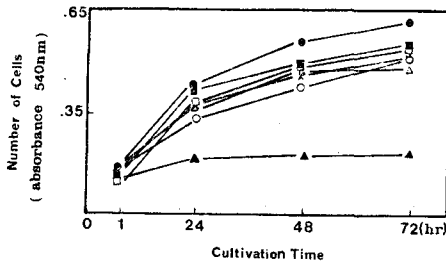


Fig. 4. Bacteriolytic action of lysozyme and its synergists against *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

- : Control
- : 1% Lysozyme
- ×: 1% Lysozyme+1% Glycine
- ▲: 1% Lysozyme+0.0005% Erythromycin
- △: 1% Lysozyme+0.001% Magnolol
- : 1% Lysozyme+0.001% Monokiol
- : 1% Lysozyme+0.005% Phopholipase-D

라서 항균성 물질에 대한 감수성이 다르기 때문인 것으로 추정된다. 항균성 물질들에 대한 세균들의 감수성의 차이는 우선 세포벽구조상의 미묘한 차이나 변화로부터 유래하는 것으로 생각된다.¹⁹⁾

Fig. 4에서는 lysozyme과 항균성 물질들간의 협동작용에 의한 세균증식의 억제효과를 나타내고

있는데, Fig. 3의 단독작용의 경우와는 상반되는 결과를 보여 주고 있다(Table 1 참조). 즉 단독 작용시에는 지극히 미약하였던 erythromycin의 억제작용이 매우 신속하고도 그 정도가 52%에 달하는 비약적인 상승효과를 나타낸 반면, glycine과 magnolol 및 honokiol은 전혀 상승효과가 인정되지 못하였다. Phospholipase 역시 상승효과는 거의 없었다. 이상의 결과는 항균성 물질 중 glycine, magnolol 및 honokiol의 그람-양성 세균에 대한 항균적인 작용양식이 기존의 미생물 유래의 항생물질인 erythromycin과는 다르다는 사실을 시사하는 것으로 생각된다. erythromycin이 *S. aureus*의 경우(Fig. 2, Table 1 참조)와는 달리 본 공사균에 대하여 현저한 상승효과를 나타낸 원인은 아직 확실히 알 수 없지만, 그 상승효과의 폭이 큰 점으로 미루어 볼 때, 앞으로 좀더 연구하여 실용의 가능성을 검토할 필요가 있다고 생각된다.

3. *Escherichia coli*에 대한 항균력

식품위생에 있어서 세균오염도의 지표적인 균이며, 미생물학 및 세포유전학의 훌륭한 연구재료로 널리 이용되고 있는 그람-음성균의 대표적인 균인 대장균을 택하여 lysozyme의 항균시험을 앞서와 같이 실시하였다(Fig. 5, 6).

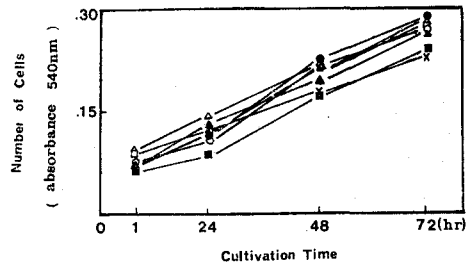


Fig. 5. Bacteriolytic action of lysozyme, glycine, erythromycin, magnolol, honokiol and phospholipase-D against *Escherichia coli* NIHJ-JC2.

- : Control
- : 1% Lysozyme
- ×: 1% Glycine
- ▲: 0.0005% Erythromycin
- △: 0.001% Magnolol
- : 0.001% Honokiol
- : 0.005% Phopholipase-D

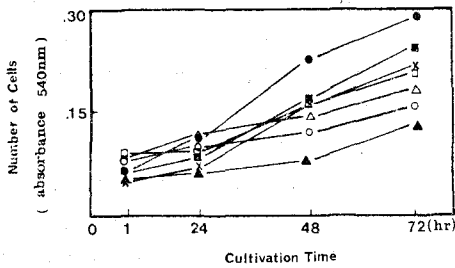


Fig. 6. Bacteriolytic action of lysozyme and its synergists against *Escherichia coli* NIJH-JC2.

- : Control
- : 1% Lysozyme
- ×: 1% Lysozyme+1% Glycine
- ▲: 1% Lysozyme+0.0005% Erythromycin
- △: 1% Lysozyme+0.001% Magnolol
- : 1% Lysozyme+0.001% Honokiol
- : 1% Lysozyme+0.005% Phospholipase-D

그 결과 Fig. 5와 Table 1에서 보는 바와 같이 lysozyme을 비롯한 모든 항균성 물질들은 그 단독작용으로도 어느 정도의 증식억제효과가 인정되었다. 이 중에서 erythromycin, magnolol, honokiol의 억제효과가 대체로 미약(3~9%)한 사실은 알려지고 있는 바와 같이, 이들 물질들이 성질상 그래프-양성균에는 효과적¹²⁾이나 그래프-음성균에는 그렇치 못하기 때문인 것으로 생각되며, phospholipase의 경우, 앞서의 두 그래프-양성균에 비하여 단독의 효소작용만으로도 어느 정도(약 6%)의 억제효과가 인정된 것은 그래프-음성균의 세포벽의 구조 중 2중외막층(bilayer outer membrane)의 성분중에 lipo-polysaccharide와 인지질이 많아 이 성분들의 분해에 의해서 어느 정도의 용균현상이 유도되었기 때문인 것으로 생각되었다.

한편, lysozyme에는 대체로 그래프-양성균들이 높은 감수성을 보이는 것으로 알려지고¹⁹⁾ 있으나, 본 실험에서는 음·양성균간에 별다른 차이를 보이지 않았다.

이에 관련된 종래의 보고^{4,20)}에서도 lysozyme은 *E. coli*에 대하여서도 어느 정도의 용균활성을 나타내는 것으로 인정되고 있다.

Fig. 6은 lysozyme과 항균성 물질들과의 협동작용에 의한 억제효과를 나타낸 것으로, erythromycin, honokiol, magnolol, phospholipase의 순으로 억제효과가 높았다. 그러나, 단독작용으로는

가장 높은 억제효과(약 22%)를 보였던 glycine에는 전혀 상승작용이 인정되지 않았다. 본 실험에서 glycine은 lysozyme과의 협동작용에서 *S. aureus*에만 상승효과가 있었을 뿐, *B. subtilis*와 *E. coli*에 대하여는 상가수준에도 미치지 못하였다.

이상의 실험결과에서, 공시균에 대한 lysozyme 증식억제효과는 그 단독작용만으로는 상당히 높은 수준의 농도에도 불구하고 대체로 미약(약 16% 이내)하였다. 그러나, 본 실험에서 사용한 항균성 물질들과의 협동작용에 의해서 현저히 억제효과가 상승되었는데, 그 결과를 종합하여 Table 1에 나타내었다.

*S. aureus*의 경우 lysozyme은 magnolol과의 조합에서 그 억제의 상승효과가 가장 높았고, *B. subtilis*의 경우, lysozyme은 유일하게도 erythromycin과의 조합에서만 그 상승효과가 지대하였고, *E. coli*에 대해서도 역시 erythromycin과의 조합이 가장 상승효과가 높았다. Lysozyme은 *Micrococcus lysodeikticus*에는 높은 용균활력을 나타내므로, 앞으로 lysozyme을 실용적인 면에 사용하기 위해서는 적어도 *M. lysodeikticus* 정도로 lysozyme의 용균작용을 상승시킬 수 있는 유용한 보완물질의 탐색·개발이 요구된다.

한편, Fig. 1~6에서 보는 바와 같이 주로 배양 1시간에서 24시간 사이에 있어서 일부 시료가 control보다 높은 탁도를 보인 것은 첨가물을 용해한 용매, 그리고 배양 초기에 있어서 항균성 물질과 세포 사이의 상호작용으로 인한 일시적인 현상으로, 이러한 사실은 다른 실험보고^{5,20)}에서도 엿볼 수 있다.

요 약

한국 재래종 오골계(천연기념물 265호)의 난백으로부터 직접결정법에 의하여 lysozyme을 분리하였다.

분리된 1% lysozyme의 *Staphylococcus aureus* 57, *Bacillus subtilis* ATCC 6633과 *Escherichia coli* NIJH-JC2에 대한 항균력을 육즙 배지 속에서 lysozyme 단독으로, 또는 몇 개의 항균성 물질들과 조합하여 배양한 후 측정하였다.

그 결과, 1% lysozyme은 공시된 모든 세균에 대하여 뚜렷한 세균의 증식억제효과(약 12~16%

를 나타내었고, 항균성 물질들과 조합하여 측정 한 증식억제상의 상승효과는 *S. aureus*에 대해서는 0.001% magnolol과 0.001% honokiol과의 조합에서 높았고(각각 22%와 14%), *E. coli*에 대해서는 0.0005% erythromycin, honokiol, magnolol 그리고 phospholipase(0.005%)의 순(각각 상승효과 26, 22, 17, 6%)으로 나타났다. 그러나, *B. subtilis*에 대해서는 오직 erythromycin과의 조합에서만 상승효과가 관찰되었고, 그 수준(52%)도 매우 높았다.

參 考 文 獻

1. P. Laschtschenko: *Z. Hyg. Infektionskrankh.*, **64**, 419(1909).
2. A. Fleming: *Proc. Roy. Soc., B.* **93**, 306 (1922).
3. L.R. Berger and K.S. Weiser: *B.B.A.*, **26**, 517(1959).
4. R.G. Peterson and S.E. Hartsell: *J. Infection Disease*, **76**, 75(1955).
5. A. Akashi: *Shokueishi (JPN)*, **9**(3), 224 (1968).
6. J.E. Findley and J.M. Akagi: *J. of Bacteriology*, **96**(4), 1427(1968).
7. T.E. Miller: *J. of Bacteriology*, **98**(3), 949 (1969).
8. G. Alderton and H.L. Fevold: *J. Biol. Chem.*, **164**, 1(1946).
9. G. Alderton: *Biochemical Preparation*, **1**, 67(1950).
10. K. Komagata, H. Ogawa, K. Fukushima, and T. Ito: *Shokueishi (JPN)*, **9**(4), 289 (1968).
11. K. Bae, B. Yoo, M. Lee, and W. Seo: *Arch. Pharm. Res.*, **8**(2), 85(1985).
12. V. Lorian: *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 2nd ed., Williams and Wilkins, p. 125(1986).
13. K.H. Schleifer and O. Kandler: *Bacteriol. Rev.*, **36**, 407(1972).
14. K. Sato, K. Maruyama and S. Shimizu: *Agric. Biol. Chem.*, **48**(7), 1745(1984).
15. T. Namba, M. Tsunozuka, K. Bae and M. Hattori: *Shoyakugaku Zasshi* **35**, 295(1981)
16. T. Namba, M. Hattori, M. Tsunozuka, T. Yamagishi and K. Konishi: *Shoyakugaku Zasshi*, **36**, 222(1982).
17. T. Namba, M. Tsunozuka, M. Hattori, S. Kodata and T. Kikuchi: *Proc. Sym. Wakan-Yaku*, **15**, 179(1982).
18. B. Yoo, G. Rhee, M. Lee, S. Ryu and K. Bae: *Chungnam J. of Sci.*, **8**, 207(1981).
19. M. Funats: *Bacteriolytic Enzyme.*, Kodansya-Scientific Tokyo, p.14~(1977).
20. K. Akashi: *Shokueishi (JPN)*, **6**(6), 543 (1965).