

유산균 용균 효소를 생산하는 미생물의 분리, 동정 및 배양조건

신원철* · 마호우

강원대학교 발효공학과 및 연세대학교 생물산업소재 연구센터

Isolation and Identification of a Lytic Enzyme Producing Microorganism against Lactic Acid Bacteria and Its Culture Conditions. Won-Cheol Shin* and Ho-Woo Ma. Department of Fermentation Engineering, Kangwon National University and Bioproducts Research Center of Yonsei University, Chunchon 200-701, Korea – Isolation, identification, and culture conditions of a lytic enzyme producing microorganism against *Lactobacillus plantarum* were investigated. The selected strain was gram-positive, rod ($0.7 \times 2.7 \mu\text{m}$ in size), and non-motile. The strain did not have any flagella and spores. According to its cultural and physiological characteristics, the strain was identified as *Bacillus* sp. The optimal pH and temperature for the production of lytic enzyme were 8.0 and 30°C, respectively. The maximum enzyme activity showed 1.5 units/ml in the medium composed of 1% peptone and 0.1% NaCl.

미생물 세포벽을 분해시키는 용균 효소는 눈물, 타액 및 난백 등에 존재한다고 보고된 이 후 미생물에도 존재함이 확인되었다(1, 2). 현재까지 알려진 미생물 세포벽 분해 효소는 peptidoglycan 층에 작용하는 기작에 따라 polysaccharide를 분해하는 glycosidase, peptide cross-link를 절단하는 endopeptidase, polysaccharide와 peptide와의 결합을 분해하는 acetylmuramyl-L-alanine amidase가 있다(3).

이러한 용균 효소들 중에서 lysozyme은 식품의 보존성을 향상시키는 효과가 있다고 보고되었으나(4-7) 일반적인 그램 음성 세균과 *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Clostridium* 등과 같은 그램 양성 세균은 세포벽의 다당층에 지질이나 단백질 등이 결합되어 있기 때문에 lysozyme에 저항성이 있는 것으로 알려져(1, 8, 9) 미생물 유래의 용균 효소에 대한 연구가 진행되었다. 또한 그램 양성 세균에 효과가 있는 lysozyme은 유산균에 대하여는 용균 효과가 낮아서 유산균 용균 효소에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 예를 들면 Mori 등(10)은 *Streptomyces*가 생산하는 hiochic 세균 용균 효소를 분리하였고 Hayashi 등(3, 11, 12)은 *Streptococcus faecalis* 용균 효소를 보고하였다. 또한 Hieda 등(13)은 *Lactobacillus* sp.에 용균 효과가 있는 미생물 용균 효소에 대하여 보고하였다.

따라서 본 연구는 식품의 초기 부패에 관여하여 pH를 저하시키는 *Lactobacillus plantarum*을 용균시키는 미생물을 토양으로부터 분리하여, 균주의 동정을 행하였고 효소 생산을 위한 배양 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

*Corresponding author.

Key words: Lytic enzyme, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus* sp.

생산 균주의 분리

춘천시 균교에서 채취한 토양을 멸균 증류수에 희석하고 nutrient broth(NB) 고체배지에 도말한 다음 30°C에서 2~3일간 배양하여 균주를 분리하였다.

분리한 균을 NB 액체배지에 백금이로 1회 접종하여 30°C에서 2~3일간 진탕 배양한 후 7000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 *Lactobacillus plantarum* 혼탁액이 1% 첨가된 agar plate에 paper disk 법으로 용균 활성을 위한 투명대의 형성 유무를 관찰하였다. 분리된 균주 중에서 가장 높은 용균 활성을 나타내는 균주를 선별하여 본 실험에 사용하였다.

생산 균주의 동정

분리 균주의 동정은 Microbiology a laboratory manual(14), Manual of methods for general bacteriology (15), Microbiological methods(16), Bergey's manual of determinative bacteriology(17) 및 Bergey's manual of systematic bacteriology 등(18)에 수록되어 있는 일반적인 세균 동정법에 따라 행하였다.

용균 활성 측정법

Hayashi 등(11, 12)과 Hieda 등(13)의 변법을 이용하여 다음과 같이 용균 활성을 측정하였다. MRS 배지에 (17) *L. plantarum*을 백금이로 일회 접종한 후 30°C에서 24시간동안 정치배양하였다. 배양액을 4000×g에서 20분간 원심분리한 후 0.05M phosphate buffer(pH 6.3)로 혼탁시켜 다시 원심분리하였다. 분리된 균체를 0.05M phosphate buffer(pH 6.3) 용액으로 희석하여 OD₆₆₀ 값이 1.0이 되도록 조절하여 기질로 이용하였다. 활성 측정은 기질 2 ml에 배양 상등액 2 ml를 넣고 반응 초기의 OD₆₆₀를 측정한 다음 45°C에서 10분간 반응시킨 후 OD₆₆₀를 측정하였다. 대조구는 기질 2 ml에 증류수

2 mL를 넣어 위의 방법과 동일하게 행하였다. 효소의 1 unit는 1분간에 흡광도가 0.001 감소하는 효소의 량으로 하였다.

종균 배양

분리된 균주를 NB 액체배지에 백금이로 일회 접종한 후 37°C에서 1일간 진탕 배양시킨 것을 종균으로 사용하였다.

효소 생산 조건검토

시간의 영향 NB 액체배지에 종균 배양액 0.1%(v/v)를 접종한 후 37°C에서 진탕 배양하면서 12시간 간격으로 배양액을 취하여 효소의 활성을 측정하였다.

온도의 영향 NB 액체배지에 종균 배양액 0.1%(v/v)을 접종하고 온도를 달리하여 일정시간 배양시킨 후 효소의 활성을 측정하였다.

초기 pH의 영향 초기 pH가 각각 다른 NB 액체배지에 종균 배양액 0.1%(v/v)를 접종하고 일정시간 배양시킨 후 효소의 활성을 측정하였다.

배지 조성의 영향 NB 액체 배지를 기본으로 하여 각종 탄소원 1%(w/v), 질소원 1%(w/v), 무기염류 0.1%(w/v)를 첨가하여 종균 배양액 0.1%(v/v)를 접종하고 일정시간 배양시킨 후 효소의 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

생산 균주의 분리

토양으로부터 미생물을 분리한 후 액체 배양하여

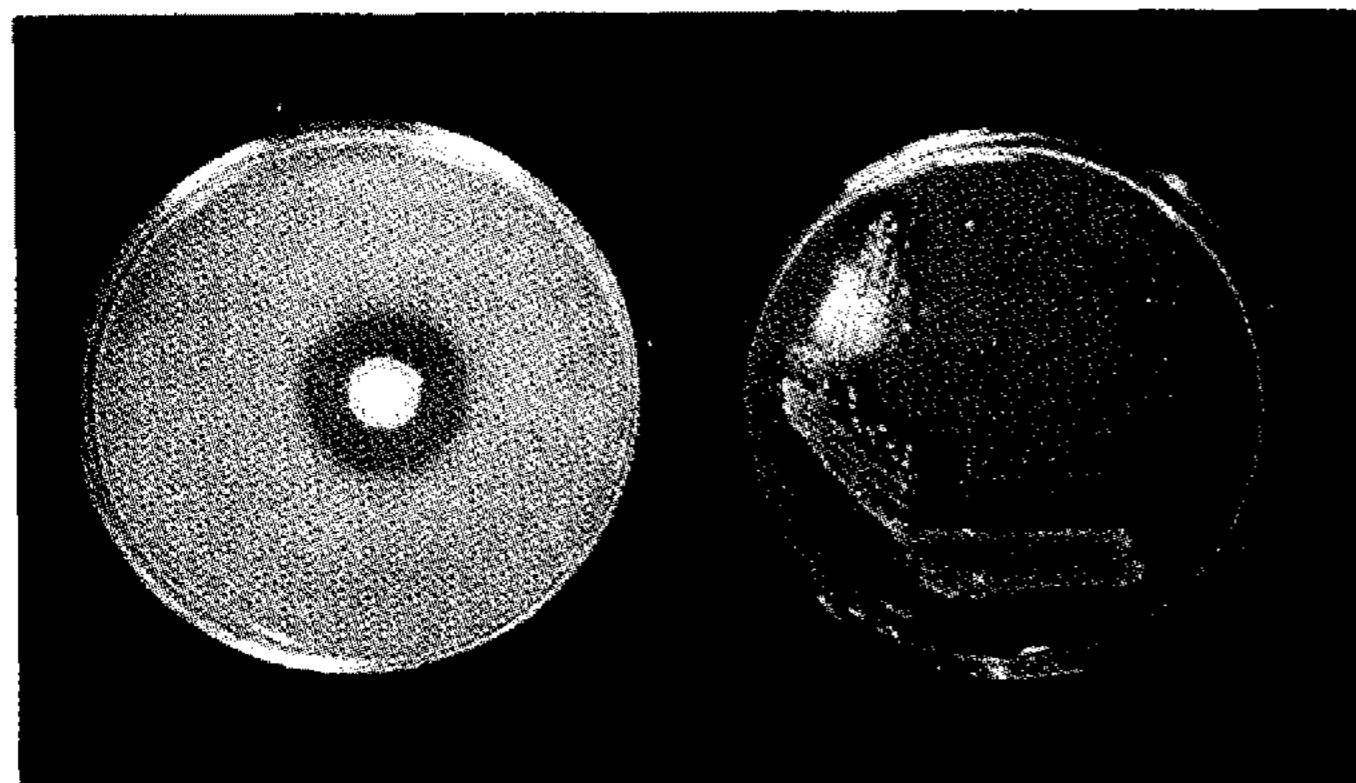


Fig. 1. Clear zone formation by strain LM-8.

Table 1. Morphological properties of strain LM-8

Shape	Middle rod
Cell size	0.7×2.7 μm
Motility	Non motile
Flagella	Not found
Spore	Not found
Gram stain	Positive

상등액의 용균 활성을 검토하였다.

Fig. 1에는 분리균 중에서 가장 활성이 좋은 균주의 용균 활성을 검토한 결과이다. 분리균 500여주 중에서 가장 활성이 좋은 균주를 LM-8로 명명하고 이 후의 실험에 사용하였다.

생산 균주의 동정

형태학적 특성 토양으로부터 분리된 LM-8 균주는 Table 1에 나타낸 바와 같이 Gram 양성이었고, 포자와 편모는 존재하지 않았다. 또한 LM-8 균주의 전자현미경 사진은 Fig. 2와 같다.

배양학적 특성 LM-8 균주의 배양학적 특성은 Table 2와 같다. Nutrient 한천 평판배지에서의 colony 형태는 불규칙하였고, 색깔은 흰색이었으며 표면은 거칠른 상태이었다. NB 액체배지에서 생육은 좋았고 pellicle은 형성하지 않았으며 균체의 침전 현상이 있었다.

생리학적 특성 LM-8 균주의 생리학적 특성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 생육온도 범위는 15~45°C 이었고, 생육 pH 범위는 pH 4~10이었다. 또한 염농도가 7%까지 생육이 가능하였으며, catalase 양성, oxidase 양성 및 starch, casein, esculin 분해능이 있었다. 또한 당의 이용성과 발효성을 검토한 결과(Table 4), ce-

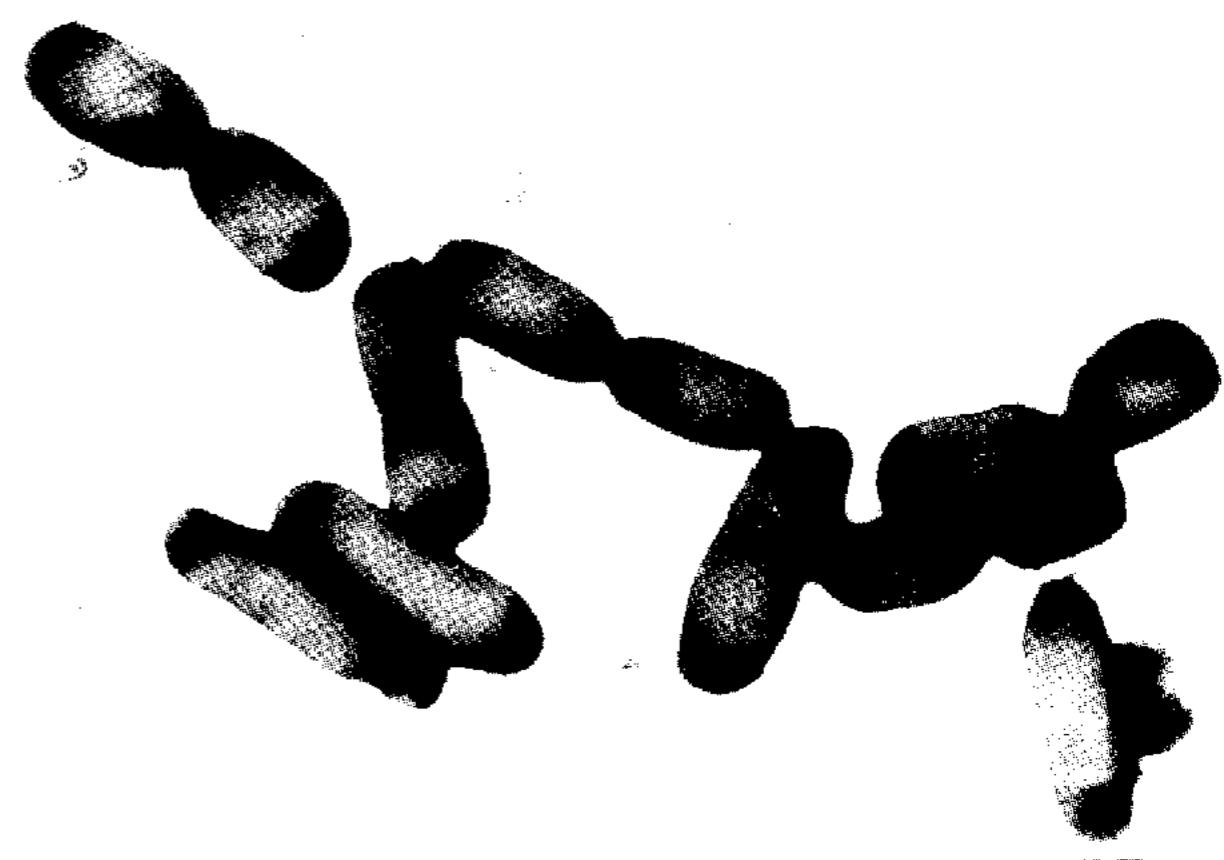


Fig. 2. Electron micrograph of strain LM-8.
TEM: phosphotungstate negative staining
Bar represents 1 μm.

Table 2. Cultural characteristics of strain LM-8

Form	Irregular
Surface	Rough
Edge	Undulate
Elevation	Flat
Opacity	Opaque
Color	White
Brilliancy	No
Nutrient broth (30°C, 1~2 days); Growth abundant, turbid and sediment	

Table 3. Physiological properties of strain LM-8

Temperature range for growth	15~45°C
pH range for growth	4~10
NaCl tolerance for growth	<7%
Catalase	+
Oxidase	+
Lecithinase	-
Lipase (Tween 80)	-
β-Galactosidase	+
Arginine dihydrolase	+
Phenylalaninedeaminase	-
Hydrolysis of: Starch	+
Casein	+
Cellulose	-
Esculin	+
Indole production	-
H ₂ S production	+
Levan formation from sucrose	+
NH ₃ production from peptone	+
NH ₃ production from arginine	+
Gelatin liquefaction	+
Utilization of citrate	-
Methyl red test	-
Voges-Proskauer reaction	+
Nitrate reduction	+
Denitrification	-
Action on milk: Coagulation	-
Peptonization	+
Hemolysis, human blood	+
O-F test	Fermentative

llulose와 inositol은 이용하지 못하였으나, 나머지 다른 당들은 전부 이용하였고, 발효성은 mannose를 비롯한 일부 당으로부터 산은 생성되었지만 가스는 모든 당으로부터 생성되지 않았다.

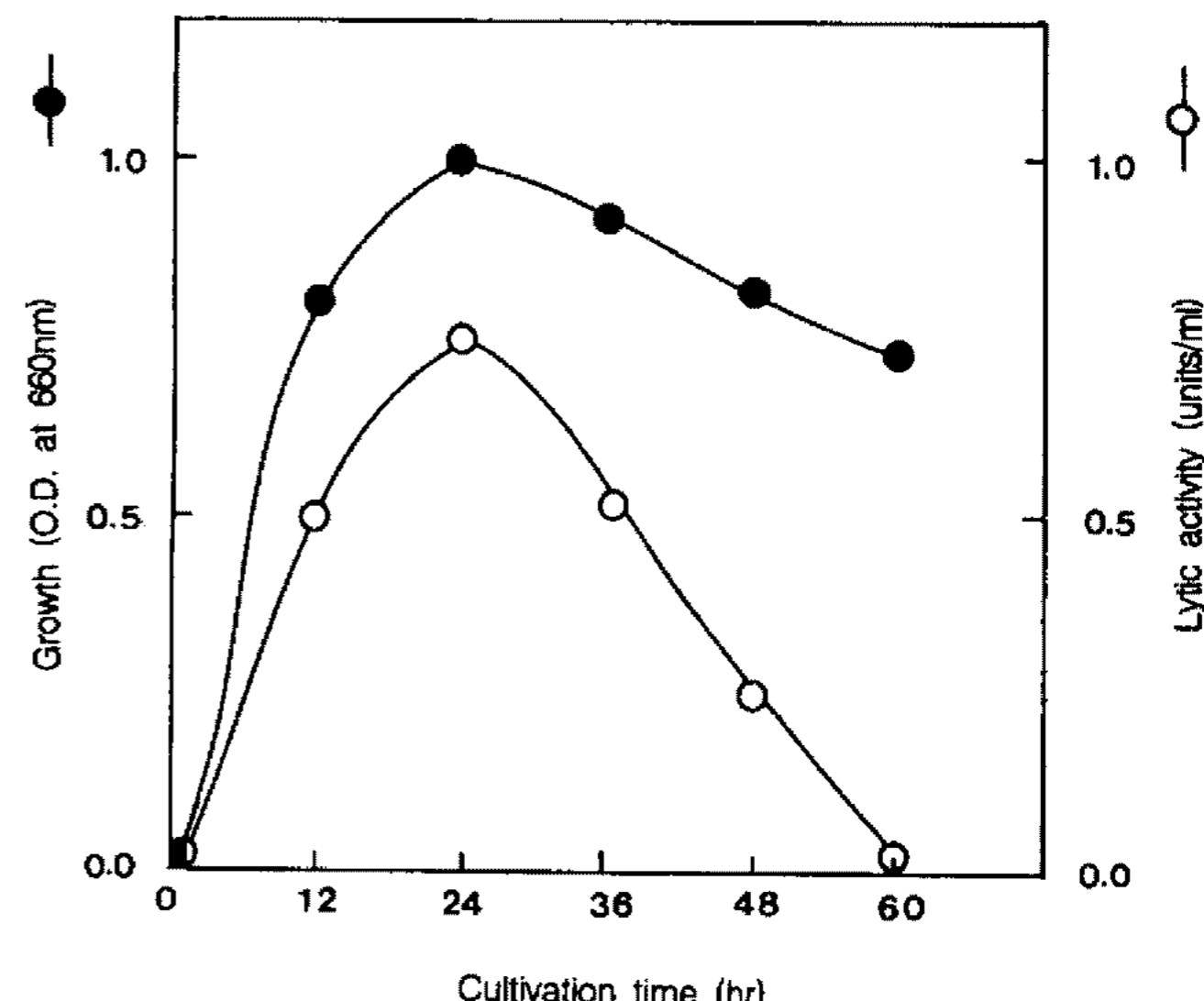
이상과 같은 LM-8 균주의 형태학적 특성, 배양학적 특성 및 생리학적 특성을 검토하여 본 결과, *Bacillus* 속으로 판단되어 LM-8 균주를 *Bacillus* sp. LM-8로 명명하였다.

효소 생산 조건검토

배양 시간에 따른 영향 NB 배지에서 배양 시간에 따른 *Bacillus* sp. LM-8 균주의 생육과 용균 효소 생산을 검토한 결과는 Fig. 3과 같다. 균체의 생육 및 용균 효소의 생산은 24시간에서 약 0.75 units/ml로 최대를 나타내었으며 이 후부터는 점차적으로 감소하였다. Hayashi 등(11)과 Yokogawa 등(19)은 방선균에서 48시간과 80시간, Jung 등(20)은 호알칼리성 *Bacillus* sp.는 36시간에서 용균 효소 활성이 가장 높다고 보고하였다. 배양시간에 따른 효소 생산에 있어서 *Bacillus* sp. LM-8 균주는 위의 균주들보다 빠르다는 것을 알 수 있었다.

Table 4. Utilization and fermentation of sugars by strain LM-8

Sugar	Utilization	Fermentation	
		Acid	Gas
Arabinose	+	-	-
Cellobiose	+	-	-
Cellulose	-	-	-
Dextrin	+	-	-
Fructose	+	-	-
Galactose	+	-	-
Glucose	+	-	-
Glycerol	+	-	-
Inositol	-	-	-
Inulin	+	-	-
Lactose	+	-	-
Maltose	+	-	-
Mannitol	+	+	-
Mannose	+	+	-
Raffinose	+	+	-
Soluble starch	+	-	-
Sorbitol	+	+	-
Sucrose	+	+	-
Xylose	+	-	-

Fig. 3. Profiles of the lytic enzyme production by *Bacillus* sp. LM-8 during cultivation.

배양 온도의 영향 용균 효소 생산에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과(Fig. 4) 용균 효소의 생산은 30°C에서 약 1.0 units/ml로 최대를 나타내었다. 이러한 결과는 Murao와 Takahara(9)가 연구한 *Bacillus subtilis*, Hayashi 등(11)과 Yokogawa 등(19)이 발표한 *Streptomyces* sp., Jung 등(20)이 보고한 호알칼리성 *Bacillus* sp.의 최적 생산 온도와 유사한 결과를 나타내었다.

초기 pH의 영향 용균 효소 생산에 미치는 초기

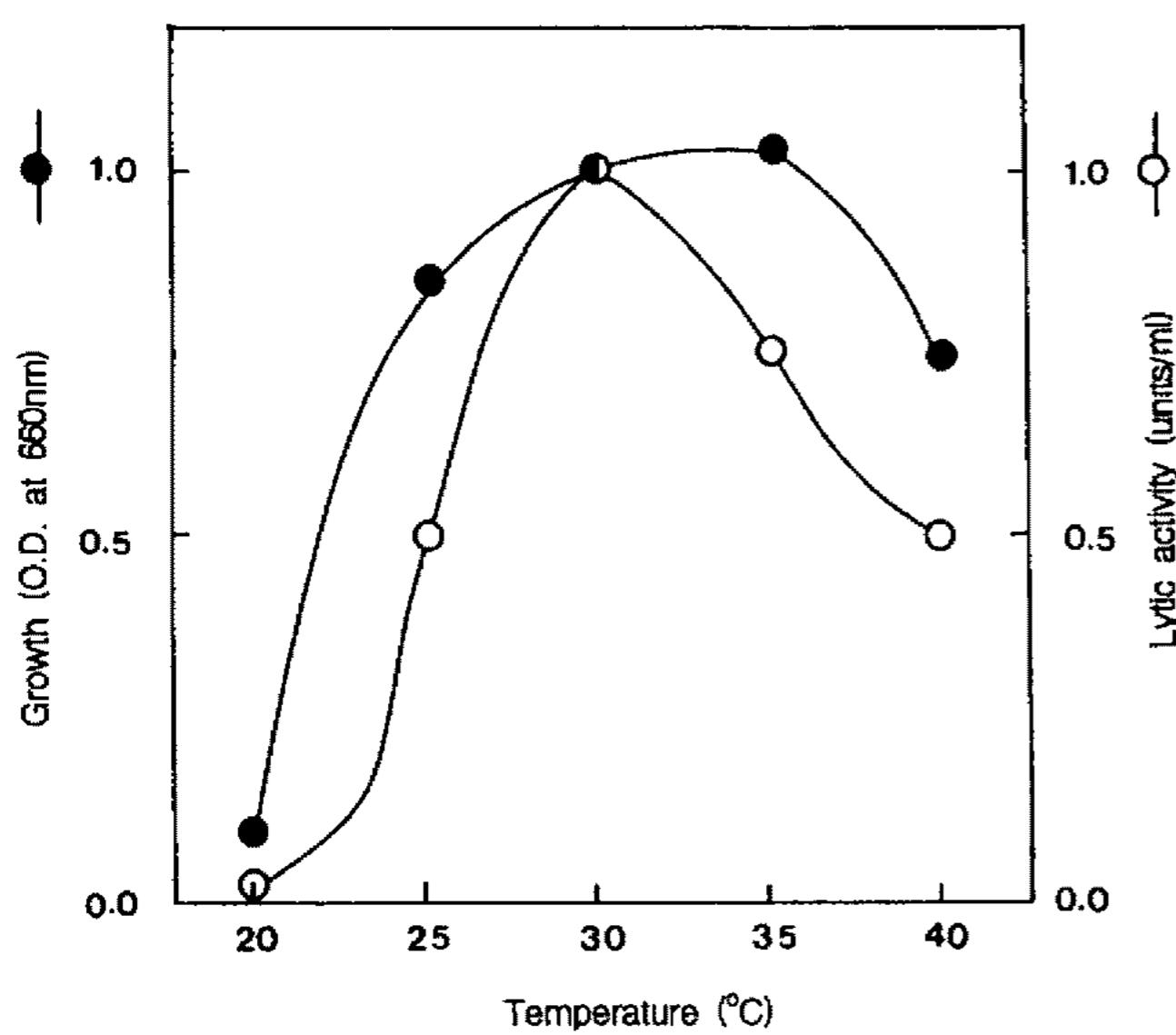


Fig. 4. Effect of temperature on the lytic enzyme production by *Bacillus* sp. LM-8.

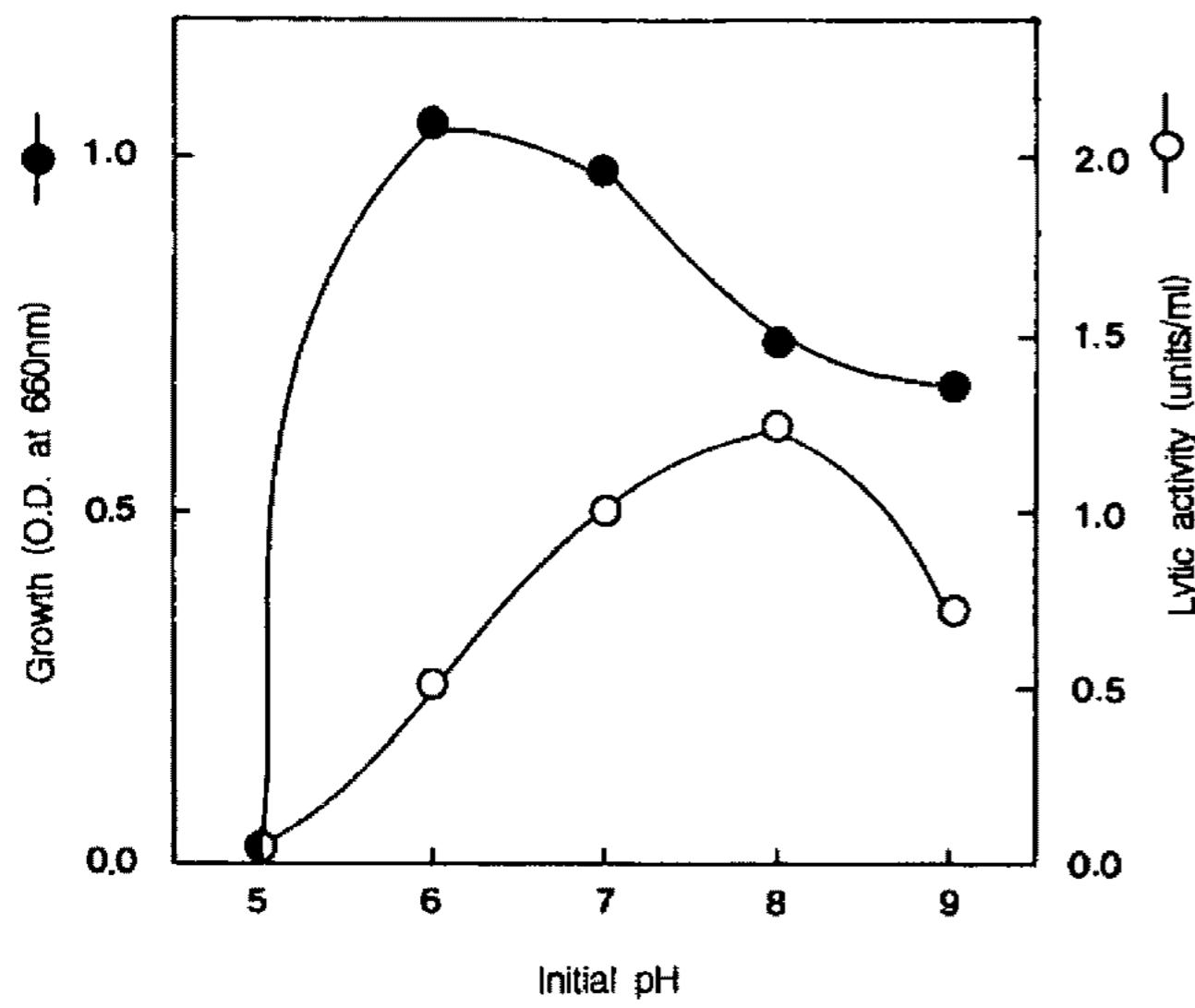


Fig. 5. Effect of initial pH on the lytic enzyme production by *Bacillus* sp. LM-8.

pH의 영향을 검토한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 초기 pH를 5에서 9까지 변화시켜 검토한 결과, 용균 효소의 생산은 초기 pH가 8일 때 약 1.25 units/ml로 최대를 나타내었다. Yokogawa 등(19)은 pH 6.0~7.0에서 용균 효소 생산이 좋았다고 보고하였고 Jung 등(20)은 호알칼리성 *Bacillus* sp.의 경우 pH 10.2에서 용균 효소 생산이 좋았다고 보고하였으나, 분리 균주 *Bacillus* sp. LM-8은 약알칼리에서 용균 효소의 생산이 좋았다.

배지 조성의 영향 용균 효소 생산에 미치는 배지 조성의 영향을 검토한 결과는 Table 5와 같다. 각종 탄소원의 경우 용균 효소의 생산에 큰 영향이 없었다. Hayashi 등(11)은 *Streptomyces* sp.에서 최적 탄소원으로 glucose가 적당하다고 보고하였고, Hidea 등(13)은 *Aspergillus cellulosa*e의 용균 효소 생산에 xylose가 가장

Table 5. Effect of medium composition on the growth and lytic enzyme production by *Bacillus* sp. LM-8

Component	Lytic enzyme activity (units/ml)	Cell growth (OD ₆₆₀)
Carbon source (1%, w/v)		
Control	1.25	0.70
Fructose	0.50	0.49
Galactose	0.75	0.66
Glucose	0.25	0.34
Lactose	1.00	0.77
Maltose	0.50	0.54
Mannitol	0.50	0.44
Mannose	0.25	0.50
Soluble starch	0.25	0.88
Sorbitol	0.50	0.31
Xylose	0.50	1.10
Nitrogen source (1%, w/v)		
Control	0.25	0.30
Beef extract	0.75	1.10
Corn steep solid	0.25	—
Malt extract	0.50	0.18
Peptone	0.90	1.10
Soybean meal	0.50	—
Tryptone	0.50	1.10
Yeast extract	0.25	1.50
Mineral source (1%, w/v)		
Control	1.25	0.86
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.00	0.80
NaCl	1.50	0.95
KCl	1.25	0.90
KH ₂ PO ₄	1.25	0.87
K ₂ SO ₄	1.25	0.85
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.00	1.00

좋다고 보고하였다. 또한 Yokogawa 등(19)은 *Streptomyces globisporus*는 dextrin, Jung 등(20)은 호알칼리성 *Bacillus* sp.는 soluble starch에서 용균 효소 생산이 높다고 보고하였는데 분리 균주 *Bacillus* sp. LM-8과는 커다란 차이가 있었다.

용균 효소의 생산에 미치는 각종 질소원의 영향을 검토한 결과 peptone을 첨가하였을 때 용균 효소 생산이 가장 좋았으나 NB 배지만을 사용한 대조구보다 약간 낮았다. Hidea 등(13)은 meat extract와 yeast extract가 좋다고 보고하였으며 Yokogawa 등(19)은 soybean meal 및 polypeptone이 용균 효소 생산에 적합하다고 보고하였다.

용균 효소의 생산에 미치는 각종 무기염류의 영향을 검토한 결과 NaCl을 첨가하였을 때 용균 효소의 생산이 높게 나타났다. Yokogawa 등(19)은 *Streptomyces globis-*

*porus*에서 NaCl과 MgSO₄·7H₂O을 첨가하였을 때 용균 효소의 생산이 높다고 보고하였는데 본 연구에서는 NaCl만을 첨가하여도 약 1.5 units/ml로 효소 생산이 좋았다.

요 약

토양으로부터 *Lactobacillus plantarum*에 대하여 용균 활성이 있는 미생물을 분리하여 동정 및 배양 조건을 검토하였다.

용균 활성이 있는 분리 균주는 Gram 양성으로 포자와 편모는 존재하지 않았다. 분리 균주의 배양학적 특성은 colony 형태가 불규칙하였고 색깔은 흰색이었으며 표면은 거칠른 상태이었다.

그 외 생리학적 특성으로는 생육온도 범위가 15~45°C, 생육 pH 범위는 4~10이었다. 또한 염농도가 7% 까지 생육이 가능하였고 catalase, oxidase 양성 및 starch, casein, esculin 분해능이 있었다. 이상의 결과와 당이용성과 당발효성을 검토한 결과로부터 분리 균주는 *Bacillus* sp.로 동정되어 *Bacillus* sp. LM-8로 명명하였다.

Bacillus sp. LM-8을 이용한 용균 효소의 생산은 NB 배지에서 초기 pH 8, 30°C에서 24시간 배양하였을 때 약 1.25 units/ml를 나타내었다. 또한 배지조성 검토 결과 당은 용균 효소 생산에 커다란 영향이 없었고 peptone 1.0%, NaCl 0.1%에서 약 1.5 units/ml의 용균 효소 생산을 나타내었다.

감사의 말

본 연구는 연세대학교 생물산업소재연구센터의 연구비 지원(1994년)에 의해 수행된 결과입니다.

참고문헌

1. Strominger, J.L. and J.M. Ghysen. 1967. Mechanism of enzymatic bacteriolysis. *Science* **156**: 213-221.
2. Funatsu, M. and D. Tsuru. 1977. Youkin kouso (lytic enzyme). Koudansha Co. Tokyo Japan.
3. Hayashi, K., T. Kasumi, N. Kubo, and N. Tsumura. 1984. Properties of N-acetylmuramidase from *Streptomyces rutgersensis* H-46. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 465-471.
4. Samuelson K.J., J.H. Rupnow, and G.W. Froning. 1985. The effect of lysozyme and ethylenediaminetetraacetic acid on *Salmonella* on broiler parts. *Poultry Science* **64**: 1488-1490.
5. Yajima, M., Y. Hidaka, and Y. Matsuoka. 1968. Stu-

- dies on egg white lysozyme as a preservative of sake. *J. Ferment. Technol.* **46**: 782-788.
6. Uchida, M., S. Yokomura, and G. Nagahama. 1972. Studies on *Lactobacilli* isolated from mirin liquor. *J. Ferment. Technol.* **50**: 292-297.
7. Hughey, V.L., P.A. Wilger, and E.A. Johnson. 1989. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme against *Listeria monocytogenes* scott A in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 631-638.
8. Hayashi, K., T. Kasumi, N. Kubo, K. Haraguchi, and N. Tsumura. 1989. Effects of N-acetylmuramidase from *Streptomyces rutgersensis* H-46 as a food preservative. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 3173-3177.
9. Murao, S. and Y. Takahara. 1974. Enzyme lytic against *Pseudomonas aeruginosa* produced by *Bacillus subtilis* YT-26. *Agric. Biol. Chem.* **39**: 2305-2316.
10. Mori, H., T. Iwamoto, T. Sasaki, and M. Inaoka. 1972. Purification and some properties of enzymes from the *Streptomyces* LA-7 strain lysing hiochic bacteria. *J. Ferment. Technol.* **50**: 458-464.
11. Hayashi, K., A. Seino, T. Kasumi, N. Kubo, and N. Tsumura. 1981. Bacteriolytic enzyme produced by *Streptomyces* sp. *J. Ferment. Technol.* **59**: 319-323.
12. Hayashi, K., T. Kasumi, N. Kubo, and N. Tsumura. 1981. Purification and characterization of the lytic enzyme produced by *Streptomyces rutgersensis* H-46. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 2289-2300.
13. Hieda, M., I. Morishima, and T. Ueno. 1991. Lytic enzyme for lactic acid bacteria produced by *Aspergillus cellulosa*. *J. Ferment. Technol.* **69**: 75-82.
14. Cappuccino, J.G. and N. Sherman. 1975. Microbiology a laboratory manual. Benjamin and Cummings, California.
15. Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, and G.B. Phillips. 1981. Manual of methods for general bacteriology. Pp. 410-441. American Society for Microbiology, Washington.
16. Collins, C.H. and Lyne, P.M. 1976. Microbiological methods. Pp. 169-180. Butterworths, London.
17. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbison. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. Pp. 529-550. Williams and Wilkins, Baltimore.
18. Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore.
19. Yokogawa, K., S. Kawata, and Y. Yoshimura. 1973. Lytic enzyme from *Streptomyces globisporus*. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 799-808.
20. 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. Biotech.* **1**: 102-110.

(Received 30 September 1995)