

Bacillus sp. LM-80이 생산하는 *Lactobacillus plantarum* 용균 효소의 정제 및 효소 특성

마호우 · 신원철*
강원대학교 바이오 산업공학부

Purification and Enzyme Property of a Cell-Wall Lytic Enzyme Produced by *Bacillus* sp. LM-8 against *Lactobacillus plantarum*. Ma, Ho-Woo and Won-Cheol Shin*. School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea – Purification and characterization of enzyme property of a cell-wall lytic enzyme against *Lactobacillus plantarum* were carried out. Final specific activity of purified enzyme was 5.8 units/mg and purity of the enzyme was increased 8.3 fold compared with the enzyme activity in culture broth. The molecular weight of purified enzyme was estimated to be 60,000 kDa by gel filtration and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Optimal pH and temperature for the activity of this enzyme were 3.0 and 40°C, respectively. The cell-wall lytic enzyme activity was maintained at 30°C when treating the enzyme for 30 mins, whereas the activity was decreased to 80% of the maximum level at 40°C The enzyme activity exhibited good stability at the range of pH 4-7.

Key words: Cell-wall lytic enzyme, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus* sp.

미생물 세포벽을 분해시키는 효소는 눈물, 타액 및 난백 등에 존재한다고 보고된 이후 미생물에서도 존재함이 확인되었으며[3,18] 이 중에서 현재 공업적으로 이용되고 있는 용균 효소는 N-acetylmuramidase의 일종인 lysozyme이다[4]. Lysozyme은 현재 식품 보존제로서 이용되기도 하며 protoplast의 제조에도 이용되는 등 산업적 측면에서 매우 유용한 효소로 보고되었다[8,15,19,21]. 일반적인 그람 음성 세균과 *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Clostridium* 등과 같은 그람 양성 세균은 세포벽의 다당층에 지질이나 단백질 등이 결합되어 있기 때문에 난백 lysozyme에 대하여 저항성이 있는 것으로 알려져 미생물 유래의 용균 효소에 대한 연구가 진행되었다[5,14,18].

*Lactobacillus plantarum*은 그람 양성 세균으로써 김치나 소시지의 발효에 관여하는 중요한 균이고 치즈의 숙성이나 일반 식품의 초기 부패에도 관여하여 pH를 저하시키는 균이다. 따라서 이들 식품의 보존성을 향상시키기 위해서 보존료를 첨가하여 제품의 저장성 및 상품 가치를 향상시키려는 연구가 많이 진행되고 있다. 일반적으로 화학적 보존료는 안정성이 문제가 되는 반면 미생물 기원의 lysozyme은 천연물질이기 때문에 독성의 문제가 없고 대상으로 하는 미생물의 세포벽만 분해하며 그 자체가 단백질이므로 아미노산의 공급원으로도 이용될 수 있는 장점이 있다[5]. 국

내의 경우에는 lysozyme과 sodium ultraphosphate 첨가에 의한 분해 상승 또는 복합 효과를 규명하고자 하였고[13], 연제품 부패 세균에 대한 난백 lysozyme의 용균 효과와 sodium hexametaphosphate, sodium pyrophosphate와 난백 lysozyme을 병용 처리하였을 때의 용균 효과를 비교 검토하였으며 어묵, 튀김 어묵 및 게맛살에 첨가하여 보존성을 실험하였다[11]. 그러나, 그람 양성 세균에 이용되는 난백 lysozyme은 유산균에 대하여 용균 효과가 낮아서[6] 유산균 용균 효소를 생산하는 미생물을 찾고자 하는 연구가 외국에서는 활발히 진행되었으나 국내의 경우에는 난백 lysozyme을 이용한 연구 보고[5]만 있을 뿐 미생물 기원의 용균 효소에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 유산균을 효과적으로 용균시키는 미생물을 분리하여 용균 효소 생산에 있어서 최적 조건과 효소를 정제하여 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

균주 배양

전보에서[17] 분리한 균주인 *Bacillus* sp. LM-8을 효소 생산 배지에 백금으로 일회 접종하여 30°C, 120 rpm에서 24시간 동안 진탕 배양하였다.

사용 배지

효소 생산을 위한 배지 조성은 peptone 0.5%, beef extract 0.5%, NaCl 0.4%를 사용하였다.

*Corresponding author
Tel. 82-33-250-6274, Fax. 82-33-243-6350
E-mail: swonc@kangwon.ac.kr

용균 활성 측정법

Hideo 등[6]의 변법을 이용하여 다음과 같이 용균 활성을 측정하였다. MRS 배지에 [1] *L. plantarum*을 백균이로 1회 접종한 후 30°C에서 24시간 동안 정치 배양시켰다. 배양액을 4,000 × g에서 20분간 원심 분리한 후 상등액을 제거하고 0.05 M phosphate buffer(pH 6.3)로 현탁시켜 다시 원심 분리하였다. 분리된 균체를 0.05 M 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 OD₆₆₀을 측정한 다음 45°C에서 10분간 반응시킨 후 OD₆₆₀을 측정하였다. 대조구는 기질 2 ml에 증류수 2 ml를 넣고 위의 방법과 동일하게 행하였고 효소의 1 unit는 1분간에 흡광도가 0.001 감소하는 효소의 양으로 하였다.

효소의 정제

Acetone을 90% 가하여 4°C에서 침전시킨 후 7,000 × g에서 20분간 원심 분리를 행하여 침전물을 0.01 M potassium phosphate buffer(pH 7.0) 1 ml에 용해시켰다. 이 침전물을 DEAE cellulose(Sigma) column에 흡착시키고 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0) 용액으로 수세한 후 0.1 M의 NaCl 용액을 사용하여 linear gradient로 30 ml/hr의 유속으로 용출시켜 tube에 3 ml씩 분획한 후 단백질 농도와 용균 활성을 측정하였고 Sephadex G-100(Pharmacia)을 이용한 gel filtration을 행하였다.

분자량 측정

정제된 효소의 분자량은 Cooper[2], Janson과 Ryden [9], Scopes[16]의 방법에 따라 gel filtration을 행하여 측정하였다. Sephadex G-100을 0.01 M potassium phosphate buffer(pH 7.0) 용액으로 팽윤시킨 후 column(2.4 × 60 cm)에 표준 단백질과 정제 효소 단백질을 용액에 첨가하였다. 용출 용매는 0.01 M potassium phosphate buffer(pH 7.0) 용액을 사용하여 5 ml/hr의 용출 속도로 1 ml씩 분획하여 gel filtration을 행하였다. 표준 단백질로는 Sigma 회사 제품의 alcohol dehydrogenase(M.W. 150,000), carbonic anhydrase(M.W. 29,000)와 lysozyme(M.W. 14,300)을 사용하였다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis는 Laemmli와 Favre[12], Walker[20]의 방법에 따라 12.5% acrylamide gel을 조제하여 사용하였다. 표준 단백질로는 Sigma 회사 제품의 phosphorylase B(M.W. 97,400), bovine albumin (M.W. 66,000), carbonic anhydrase(M.W. 29,000)와 lysozyme (M.W. 14,300)을 사용하였고, 전기영동은 stacking gel까지는 20 mA로 행하였으며 이후에는 30 mA로 행하였다.

효소의 특성

pH, 온도 및 시간에 따른 영향. 효소 반응의 최적 pH를

검토하기 위하여 pH를 달리하여 45°C에서 10분 동안 반응시킨 후 용균 활성을 측정하였다. pH 2~5에서는 citric acid-Na₂HPO₄ 완충액을 pH 5~8에서는 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 완충액을 사용하였으며 pH 7~9에서는 Tris-HCl 완충액을 사용하였다. 온도에 의한 영향은 pH 7.0에서 반응 온도를 달리하여 10분 동안 반응시킨 후 용균 활성을 측정하였다. 반응의 최적 시간을 검토하기 위하여 기질에 효소액을 첨가하여 각각 반응 시간을 달리한 후 용균 활성을 측정하였다.

온도 및 pH의 변화에 따른 효소의 안정성. 효소액을 각각 온도를 달리하여 30분간 처리한 후 10분 동안 반응시켜 잔존 용균 활성을 측정하였다. pH에 대한 안정성을 검토하기 위하여 실온에서 pH를 달리하여 60분간 처리한 후 10분 동안 반응시켜 잔존 용균 활성을 측정하였다. pH 2~5에서는 citric acid-Na₂HPO₄ 완충액을 pH 5~8에서는 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 완충액을 사용하였으며 pH 7~9에서는 Tris-HCl 완충액을 사용하였다.

금속 이온의 영향. 기질 용액에 여러 가지 금속 이온을 1 mM되게 첨가하여 45°C에서 10분 동안 반응시킨 후 용균 활성을 측정하였다.

활성제의 영향. 기질에 활성제를 0.1%(w/v)되게 첨가하여 45°C에서 10분 동안 반응시킨 후 용균 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

Acetone으로 침전시킨 결과 acetone 80% 포화도에서 비활성도가 1.3 units/mg protein으로 가장 좋았다. 침전시킨 조효소액의 DEAE cellulose chromatography를 행한 결과 (Fig. 1), fraction No. 30~40에서 용균 활성이 나타났으며

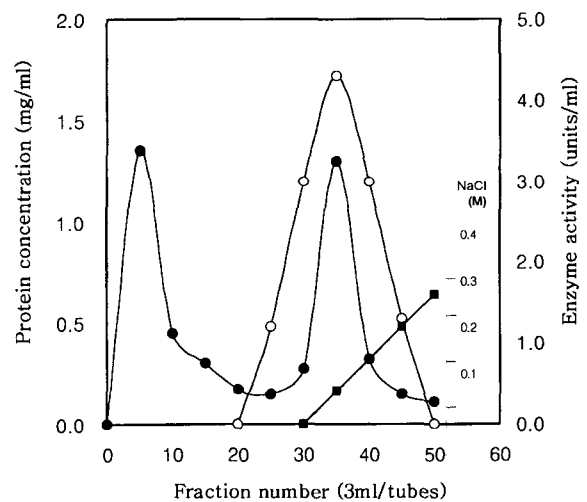


Fig. 1. Elution profile of the lytic enzyme on DEAE cellulose column chromatography.

●, Protein concentration; ○, Lytic enzyme activity; ■, NaCl gradient

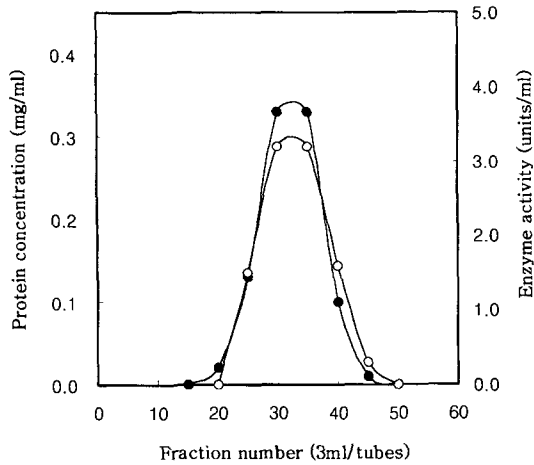


Fig. 2. Elution profile of the lytic enzyme on Sephadex G-100 column chromatography.

●, Protein concentration; ○, Lytic enzyme activity

비활성도는 3.2 units/mg protein이었다. 효소 활성이 있는 분획을 모아 Sephadex G-100을 이용하여 gel filtration한 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 fraction No. 20~40에서 단일 단백질 peak를 나타내었다. 이상의 정제 과정을 Table 1에 나타내었으며 *Bacillus* sp. 균주 배양액으로부터 용균 효소를 정제한 결과, 비활성도는 5.8 units/mg protein이었고 수율은 30%, 정제도는 8.3배이었다.

분자량의 측정

표준 단백질을 이용하여 분자량을 측정한 결과 정제 효소의 분자량은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 60,000 kDa 정도로 추정되었다. 또한 표준 단백질로 phosphorylase B, bovine albumin, trypsinogen과 lysozyme을 사용하여 효소의 분자량을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 행하여 측정하여 본 결과(Fig. 4) 60,000 kDa으로 추정되었다. Murao와 Takahara[14]가 보고한 용균 효소의 분자량이 29,000 kDa이었고, Jung 등[10]이 보고한 효소는 27,000 kDa이었으나 본 효소는 이들 효소 보다 분자량이 큰 것으로 나타났다.

효소의 특성

pH에 따른 영향. pH에 대한 효소 활성도를 조사한 결과

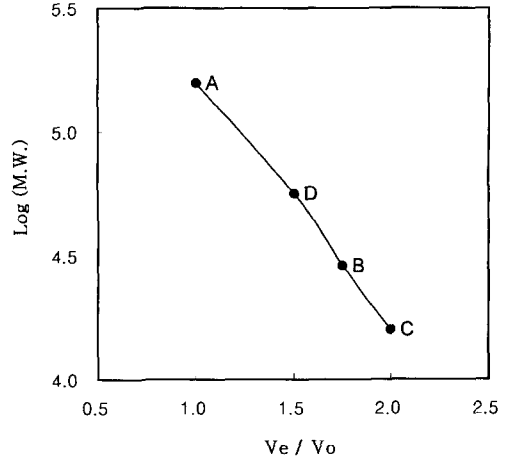


Fig. 3. Molecular weight determination of the purified lytic enzyme by gel filtration on Sephadex G-100.

A: Alcohol dehydrogenase (M.W. 150,000), B: Carbonic anhydrase (M.W. 29,000), C: Lysozyme (M.W. 14,400), D: Purified lytic-enzyme

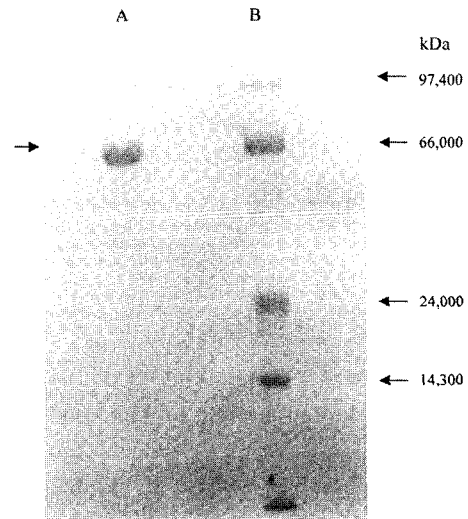


Fig. 4. Patterns of purified lytic enzyme on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

A: Purified lytic enzyme, B: Phosphorylase B, bovine albumin, trypsinogen and lysozyme (M.W. 97,000-14,300 kDa)

는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 pH 3.0에서 효소 활성이 최대를 나타내었다. Hayashi 등[4]은 *Streptomyces rutgersensis*가 생산하는 용균 효소의 반응 최적 pH가 6.0이라고 보고하였고

Table 1. Summary of purification of the lytic enzyme

| Purification step | Total volume (ml) | Total activity (units) | Total protein (mg) | Specific activity (units/mg protein) | Yield (%) | Purification (folds) |
|-------------------------|-------------------|------------------------|--------------------|--------------------------------------|-----------|----------------------|
| Culture broth | 1,000 | 1,750 | 2,500 | 0.7 | 100 | 1.0 |
| 80% Acetone precipitate | 100 | 720 | 550 | 1.3 | 41 | 1.8 |
| DEAE cellulose | 30 | 600 | 82 | 3.2 | 34 | 4.5 |
| Sephadex G-100 | 20 | 540 | 75 | 5.8 | 30 | 8.3 |

Jung 등[10]은 Alkalophilic *Bacillus* sp.는 최적 pH가 6.5라고 보고하였는데 본 효소는 이들 효소보다 낮은 pH를 나타내어 산성 조건에서 활성이 좋다는 것을 알 수 있었다.

온도에 따른 영향. 효소의 최적 반응 온도는 Fig. 6에서

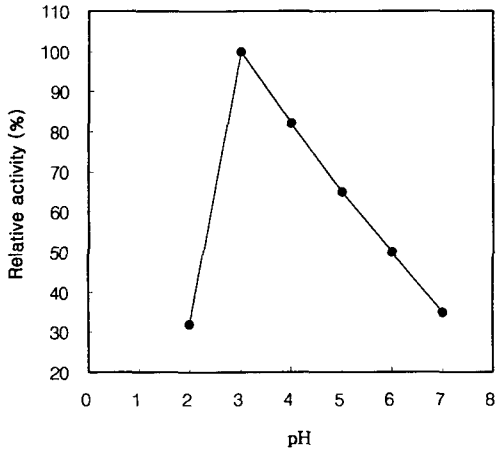


Fig. 5. Effect of pH on the lytic activity.

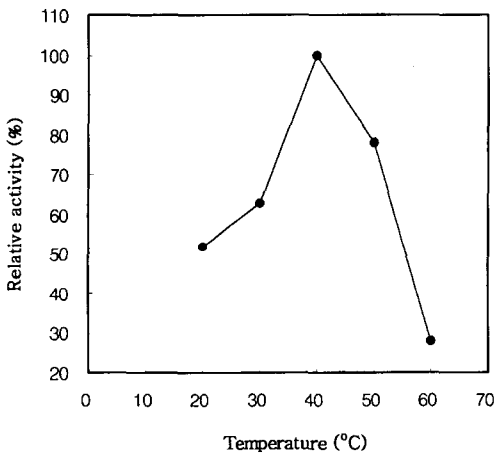


Fig. 6. Effect of temperature on the lytic activity.

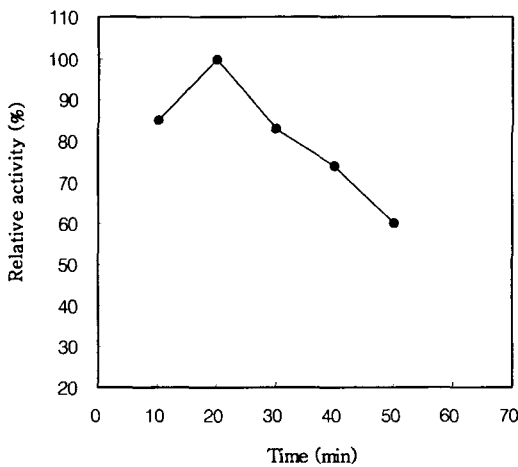


Fig. 7. Effect of reaction time on the lytic activity.

보는 바와 같이 40°C이었다. Yokogawa 등[22]은 *Streptomyces globisporus*의 용균 효소의 반응 최적 온도가 60°C라고 보고하였으며 Jung 등[10]은 Alkalophilic *Bacillus* sp.의 용균 효소의 반응 최적 온도는 50°C라고 하였는데 본 효소는 이들 효소보다 낮은 온도에서 활성이 높게 나타났다.

시간에 따른 영향 효소. 활성에 미치는 반응 시간의 영향을 검토한 결과, Fig. 7과 같이 이 효소의 반응 최적 시간은 20분이었다.

효소의 안정성

온도에 따른 영향. 효소의 온도에 대한 안정성을 검토한 결과, 30°C까지는 안정하였으나 40°C에서 30분 동안 처리하였을 때 80%의 활성을 나타내었고 그 이상의 온도에서는 급격히 감소하였다(Fig. 8). Yokogawa 등[22]은 *Streptomyces globisporus*의 용균 효소가 30°C 이하에서는 안정하였으나 70°C에서는 실활된다고 보고하였는데 이러한 결과는 본 효소의 온도의 안정성과 유사함을 알 수 있었다.

pH에 따른 영향. 효소의 pH에 대한 안정성은 Fig. 9와

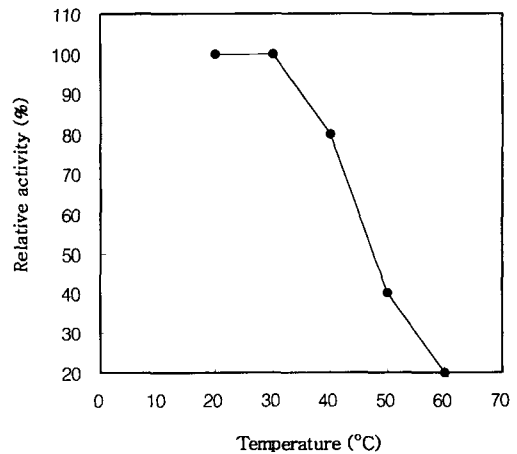


Fig. 8. Effect of temperature on the stability of the lytic activity.

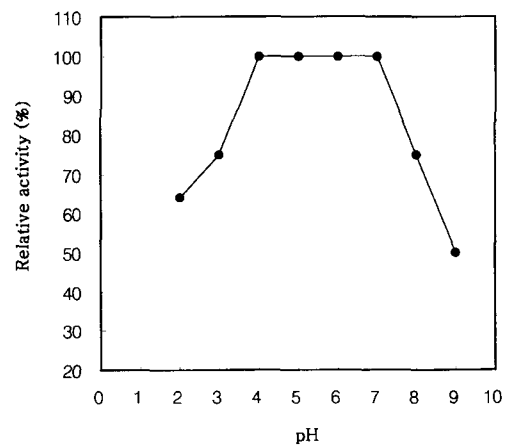


Fig. 9. Effect of pH on the stability of the lytic activity.

Table 2. Effect of various metal ions on the lytic activity

| Metal ion (1 mM) | Relative activity (%) |
|------------------|-----------------------|
| None | 100 |
| Mg ²⁺ | 75 |
| Ba ²⁺ | 75 |
| Mn ²⁺ | 100 |
| Pb ²⁺ | 75 |
| Ca ²⁺ | 100 |
| Fe ²⁺ | 25 |
| Co ²⁺ | 83 |
| Ag ⁺ | 100 |
| Cu ²⁺ | 50 |
| Hg ²⁺ | 50 |
| Zn ²⁺ | 133 |
| K ⁺ | 116 |
| Na ⁺ | 116 |

Table 3. Effect of various reagents on the lytic activity

| Reagents (0.1%) | Relative activity (%) |
|-----------------|-----------------------|
| None | 100 |
| Acetic acid | 100 |
| Lactic acid | 75 |
| Glycine | 100 |
| EDTA | 118 |

같이 pH 4~7 범위에서 안정하였다. pH 3에서는 17%가 실패되었으며 pH 8에서도 17%가 실패되었다. Hayashi 등 [4]은 *Streptomyces rutgersensis*가 생산하는 용균 효소는 pH 4~7 범위에서 안정하였다고 보고하였는데 본 효소의 pH 안정성과 일치하였다.

금속 이온에 따른 영향. 금속 이온의 효소 활성에 대한 효과는 Table 2에 나타낸 것과 같이 Zn²⁺, K⁺, Na⁺ 등의 이온에 의해서 약간 활성화되었으나 Mn²⁺, Ca²⁺ 등의 이온에 의해서는 영향을 받지 않았고 Fe²⁺, Hg²⁺, Cu²⁺ 등의 이온에 의해서 저해를 받았다. Hayashi 등[5]은 *Streptomyces rutgersensis*가 생산하는 N-acetylmuramidase는 Li⁺, Na⁺, K⁺ 등의 이온에 의해서 영향을 받지 않았으며 Hg²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺ 등의 이온에 대해서는 활성이 저해된다고 보고하였다.

활성제에 따른 영향. Table 3에 나타낸 바와 같이 용균 효소는 EDTA에 의해서 활성이 증가되었으나 glycine, acetic acid 등에 의해서는 변화가 없었고 lactic acid에 의해서는 활성이 저해되는 경향을 나타내었다. Hayashi 등[5]은 acetic acid, lactic acid 등에 의해서 활성이 증가하였으나 EDTA에 의해서는 활성에 영향을 받지 않는다고 보고하였고 Hughey 등[7,8]은 난백 lysozyme은 EDTA에 의해서 활성이 증가된다고 보고하였는데 이러한 결과는 본 효소의 활성 증가와 유사함을 알 수 있었다.

요 약

Lactobacillus plantarum 용균 효소를 생산하는 균주를 배양하여 생산된 효소를 정제한 결과 비활성도가 5.8 units/mg protein 이었고 정제도 8.3배, 수율은 30%이었다. 정제 효소의 분자량은 gel filtration과 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 측정된 결과 60,000 kDa 이었다. 용균 효소의 최적 반응 시간은 20분이었으며 최적 온도는 40°C, 최적 pH는 3.0이었다. 온도 안정성은 각 온도에서 30분간 처리하였을 때 30°C까지는 안정하였으나 40°C에서는 80% 활성을 나타내었다. 효소의 pH 안정성은 실온에서 1시간 처리하였을 때 pH 4~7에서 안정성을 나타내었다.

REFERENCES

- Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Pp. 529-550. 8th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Cooper, T. G. 1977. *The Tools of Biochemistry*, p. 169-193. A Wiley-Interscience. Publication, New York.
- Funatsu, M. and D. Tsuru. 1977. *Youkin kousou (lytic enzyme)*. Koudansha Co. Tokyo Japan.
- 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.
- 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.* **39**: 2305-2316.
- Hideo, M., I. Morishima, and T. Ueno. 1991. Lytic enzyme for lactic acid bacteria produced by *Aspergillus cellulosa*. *J. Ferment. Technol.* **69**: 75-82.
- Hunghy, 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.
- Hunghy, V. L., P. A. Wilger, and E. A. Johnson. 1989. Antimicrobial activity of hen egg white lysozyme against *Listeria monocytogenes* scott in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 631-638.
- Janson, J. C. and L. Ryden. 1989. *Protein Purification*, Pp. 63-106. VCH Publishers, New York.
- 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.
- Kim, Y. M., B. H. Lee, S. H. Lee, I. S. Shin, and T. S. Lee. 1988. The preservative effect of egg white lysozyme added surumi products. *Bull. Korean. Fish. Soc.* **21**: 269-275.
- Laemmli, U. K. and M. Favre. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **80**: 575-599.
- Lee, S. K., S. P. Hong, Y. B. Kim, S. Y. Choi, and I. J. Yoo. 1991. Effect of lysozyme and sodium ultraphosphate on the lysis of *L. plantarum*. *Korean J. Anim. Sci.* **33**: 73-77.

14. Murao, S. and Y. Takahara. 1974. Enzyme lytic against *Pseudomonas aeruginosa* produced by *Bacillus subtilis* YT-26. *Agric. Biol. Chem.* **39**: 2305–2316.
15. Samuelson, K. J., J. H. Rupnow, and G. W. Froning. 1985. The effect of lysozyme and ethylenediaminetetraacetic acid on *Samonella* on broiler parts. *Poultry Science.* **64**: 1488–1490.
16. Scopes, R. K. 1987. *Protein purification*, p. 186–198. Springer-Verlag, New York.
17. Shin, W. C. and H. W. Ma. 1996. Isolation and identification of a lytic enzyme producing microorganism against lactic acid bacteria and its culture condition. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 299–303.
18. Strominger, J. L. and J. M. Ghuysen. 1967. Mechanism of enzymatic bacteriolysis. *Science.* **156**: 213–221.
19. Uchida, M., S. Yokomura, and G. Nagahama. 1972. Studies on *Lactobacilli* isolation from mirin liquor. *J. Ferment. Technol.* **50**: 292–297.
20. Walker, J. M. 1984. *Protein*, Pp. 41-55. Humana Press. Clifton, New Jersey.
21. Yajima, M., Y. Hidaka, and Y. Matsuoka. 1968. Studies on egg white lysozyme as a preservative of sake. *J. Ferment. Technol.* **46**: 782–788.
22. Yokogawa, K., S. Kawata, and Y. Yoshimura. 1973. Lytic enzyme from *Streptomyces globisporus*. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 799–808.

(Received Oct. 27, 2001/Accepted Jan. 18, 2002)