

UV-분광광도계를 이용한 새로운 Lysozyme의 효소반응 및 활성측정법 연구

김 운 수 · 김 용 욱 · 김 우 식*†

경희대학교 화학공학과, *재료과학연구소
(1998년 5월 7일 접수, 1998년 7월 30일 채택)

A New Method for Determination of Enzyme Reaction and Activity of Lysozyme with UV-Spectrophotometer

Woon-Soo Kim, Yong-Wook Kim, and Woo-Sik Kim*†

Department of Chemical Engineering, *Institute of Materials Science & Technology, Kyunghee University, Suwon 449-701, Korea
(Received May 7, 1998; accepted July 30, 1998)

요 약: Beer의 법칙을 이용하여 lysozyme-*M. lysodeikticus* cell의 용해반응속도 및 lysozyme의 활성을 측정할 수 있는 간단하고 새로운 실험방법을 제시하였다. *M. lysodeikticus* cell의 농도에 따라 용액의 UV 투과도를 측정하였으며 이것은 Beer의 법칙에 따르는 것으로 나타났다. 또한 용액 내의 lysozyme 농도 및 용해반응에 의해 생성되는 생성물은 UV 투과도에 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 실험적으로 증명되었다. 따라서 lysozyme의 용해반응이 진행되는 동안 용액 내에 존재하는 *M. lysodeikticus* cell의 농도는 UV-분광광도계를 이용하여 in-situ로 측정될 수 있었다. 이렇게 얻어진 *M. lysodeikticus* cell의 농도변화를 Michaelis-Menten식을 이용하여 lysozyme-*M. lysodeikticus* cell의 용해 반응속도 상수들을 결정하였다. 최대반응속도상수 k_3 은 약 0.1734 sec^{-1} 로 나타났으며 Michaelis-Menten 상수는 약 $9.83 \times 10^{-6} \text{ M}$ 으로 나타났다. Lysozyme의 용해반응속도가 활성에 의존하므로 이와 같은 측정을 통해 lysozyme의 활성도도 측정할 수 있었다.

Abstract: A simple and new experimental method for determination of lysozyme-*M. lysodeikticus* cell lysis reaction and lysozyme activity was suggested using Beer's law. The UV transmittance of the solution changed with the concentration of *M. lysodeikticus* and the relationship between the UV transmittance and *M. lysodeikticus* cell concentration followed Beer's Law. In addition, it was experimentally proven that the UV transmittance of the solution was not influenced by the lysozyme concentration and product of the lysis reaction. During the lysozyme-*M. lysodeikticus* cell lysis reaction, thus, *M. lysodeikticus* cell concentration in the solution could be measured in-situ by UV-spectrophotometer. By using these experimental data, kinetic parameters of the Michaelis-Menten equation for the lysozyme-*M. lysodeikticus* cell lysis reaction was simply determined. The maximum reaction rate constant (k_3) and Michaelis-Menten constant were 0.1734 sec^{-1} and $9.83 \times 10^{-6} \text{ M}$ respectively. The activity of the lysozyme could also be obtained with this experiment because the lysis reaction rate of the lysozyme depended on its activity.

Key words: Lysozyme, Enzyme Reaction, Activity, UV-Transmittance

1. 서 론

지난 수십여년간 생물공학과 유전공학이 기술적으로 진보함에 따라 유전학적으로 조작하거나 자연계에 널리 분포하고 있는 미생물을 이용하여 인류에게 유용한 효소와 같은 단백질 생산이 가능하게 되었다. 그리하여 현재 상업적인 제품으로 생산되고 있는 효소는 주로 공업용, 분식용 및 의약용으로 사용되는 고순도의 고부가가치 상품으로, 식품, 제지, 주류, 제약 및 의약산업분야에서 이러한 효소의 수요는 계속 증가하고 있다.

단백질 분리기술분야에서 공업 및 의약용으로 관심의 대상이 되고 있는 효소중 하나가 lysozyme이다. Lysozyme(EC 3.2.1.17)은 등전점이 pH 10.5-11인 강한 알칼리성 효소로 Muramidase에 속하는 N-acetylhexosaminidase이다. Lysozyme은 특별히 세균세포벽의 주요 구성성분인 peptidoglycan의 β -1,4 결합을 가수분해시켜 세포벽을 용해시키는 대표적인 용균효소 (bacteriolytic enzyme)이

다. Lysozyme은 또한 열에 안정하고 세균뿐만 아니라 바이러스의 세포벽을 용해시켜 미생물의 증식을 억제하는 항생작용을 가지고 있기 때문에 미생물의 오염을 방지하는 식품보존제, 유화제, 항생제 등과 같은 의약품이나 식품첨가제로 많이 이용되고 있다[1,2].

Lysozyme은 동물의 눈물, 혈장, 타액 및 양배추 등 자연계의 동식물 조직에 널리 분포되어 있지만 그 중에서도 특히, 계란 흰자위에 다량 포함되어 있다[3,4]. 이 때문에 주로 값이 싼 계란 흰자위에서 고부가가치의 lysozyme을 추출하여 효과적으로 활용하기 위한 분리 및 정제에 관한 연구가 단백질 침전법을 중심으로 활발히 진행되고 있다[5,6].

지금까지 lysozyme에 관한 연구에서 lysozyme의 효소활성은 대부분 lysozyme이 *Micrococcus lysodeikticus* cell에 대하여 선택적 반응성이 뛰어나 최대활성을 나타내는 특성을 이용하여 용해반응이 일어나는 동안 *M. lysodeikticus* cell의 세포벽이 가수분해될 때의 투과도 변화를 측정하여 결정하였다[7,8].

그러나 이러한 lysozyme 활성측정법은 단순히 투과도의 변화속도만을 이용하여 활성을 측정하고 있다. 그래서 첫째, 초기투과도의 변화가 민감하여 정확한 기울기를 결정하기 힘들고, 둘째 투과

† 주 저자 (e-mail: wskim@nms.kyunghec.ac.kr)

도 변화가 동일하다 하더라도 투과도 변화구간에 따라서 *M. lysodeikticus* cell의 농도변화율이 달라지지만 이를 무시하고 있기 때문에 이에 대한 개선이 요구되고 있다[9-11].

이에 본 연구에서는 lysozyme과 *M. lysodeikticus* cell의 용해반응에서 *M. lysodeikticus* cell의 가수분해시 나타나는 투과도 변화에 영향을 미칠 수 있는 인자들을 조사하여 반응기내의 *M. lysodeikticus* cell의 농도와 투과도의 상관관계를 수학적으로 모델링하였다. 그리고 이러한 수학적 표현으로부터 UV 분광광도계를 이용하여 Michaelis-Menten kinetics 연구를 수행하여 투과도만으로 lysozyme의 농도를 측정하고 분석할 수 있는 개선된 lysozyme 활성측정법을 제안하였다.

2. 이 론

Lysozyme과 *M. lysodeikticus* cell의 용해반응은 대표적인 단일 기질-효소반응으로, 그 반응속도식은 식 (1)과 같이 Michaelis-Menten 식으로 표현할 수 있다. 이때 Lysozyme의 활성은 용해반응이 진행되는 동안 세포벽의 가수분해에 따른 *M. lysodeikticus* cell의 농도변화를 투과도 변화로 측정한다[1,7,12,13].

$$r = -\frac{dC_S}{dt} = \frac{r_{\max} C_S}{K_M + C_S} \quad (1)$$

Michaelis-Menten 식의 K_M , r_{\max} 값은 실험을 통해서 얻어지지만, 매우 난해하기 때문에 일반적으로 Michaelis-Menten 식을 선형화시켜서 구한다. 그리고 그중 가장 많이 이용되는 방법이 Lineweaver-Burk plot이다. Lineweaver-Burk plot은 Michaelis-Menten 식의 역을 취해서 선형화 시키는 방법으로 그래프상의 기울기와 절편 값으로 K_M , r_{\max} 를 구한다.

용해반응이 진행되는 동안 반응기내의 투과도 변화에 영향을 미칠 수 있는 인자로는 크게 식 (2)와 같이 *M. lysodeikticus* cell(C_S), lysozyme(C_E), 용해반응 생성물(C_P), 중간체(C_{ES})의 농도를 들 수 있다.

$$Tr = f(C_S, C_E, C_{ES}, C_P) \quad (2)$$

만약 용해반응이 일어나는 동안 투과도의 변화가 단지 C_S 에만 크게 의존하고 C_E , C_{ES} , C_P 의 영향은 무시할 수 있다고 가정한다면 식 (3)과 같이 Beer의 법칙을 이용하여 반응기내의 *M. lysodeikticus* cell의 투과도 변화(Tr)는 농도(C_S)만의 함수로 나타낼 수 있다[14,15].

$$Tr = Tr_0 \exp(-abC_S) \quad (3)$$

이러한 Tr 과 C_S 의 관계식을 식 (1)에 대입하면 lysozyme의 효소활성은 식 (4)와 같이 변형된 Michaelis-Menten 식으로 나타낼 수 있고, 용해반응 중 측정되는 투과도의 변화만으로 초기반응속도에서 직접 구할 수 있다.

$$r = -\frac{d(\ln Tr)}{dt} = \frac{r_{\max} \ln\left(\frac{Tr}{Tr_0}\right)}{K_M + a \ln\left(\frac{Tr}{Tr_0}\right)} \quad (4)$$

여기서 a 는 상수로 $-\frac{1}{ab}$ 을 나타내며, 식 (4)로 표현되는 변형된 Michaelis-Menten 식을 Lineweaver-Burk plot으로 선형화시키면 그래프상의 기울기와 절편 값으로 최대반응속도(r_{\max})와 Michaelis-Menten 상수(K_M)를 구할 수 있다.

$$-\left[\frac{d(\ln Tr)}{dt}\right]^{-1} = \frac{K_M}{r_{\max}} \frac{1}{\ln\left(\frac{Tr}{Tr_0}\right)} + \frac{a}{r_{\max}} \quad (5)$$

만약 용해반응 초기에 *M. lysodeikticus* cell의 농도를 일정하게 해주면 C_S 는 식 (6)과 같이 Tr 에 관한 역함수로 나타낼 수 있고, 실험을 통해서 주어지는 상수 값이 된다. 또한 식 (5)를 이용하면 K_M 과 k_3 도 그래프로 구할 수 있는 상수가 되기 때문에 용해반응 속도는 식 (7)과 같이 간단히 C_{EO} 만의 함수로도 나타낼 수 있다.

$$C_S = f^{-1}(Tr) \quad (6)$$

$$r = \frac{k_3 f^{-1}(Tr)}{K_M + f^{-1}(Tr)} C_{EO} = A C_{EO} \quad (7)$$

따라서 lysozyme-*M. lysodeikticus* cell의 용해반응으로 나타나는 *M. lysodeikticus* cell의 투과도 변화로부터 정확한 용해반응속도를 측정하고, 이를 다시 Michaelis-Menten kinetics로 해석한 후 속도매개변수 K_M 과 r_{\max} 를 구하여 용해반응속도와 lysozyme 농도의 관계를 알아내면, 일정한 *M. lysodeikticus* cell 농도에서 얻어진 *M. lysodeikticus* cell의 투과도 변화로부터 일정농도 범위 내에서 lysozyme의 농도를 정확하고 손쉽게 구할 수 있게 된다.

3. 실 험

3.1. 용액조제

Lysozyme 표준용액은 계란 흰자위에서 추출한 분자량 14,300의 lysozyme(SIGMA, L-6876, USA)을 사용하여 *M. lysodeikticus* cell의 농도가 과잉으로 유지될 수 있도록 lysozyme 용액의 초기농도를 2-10 mg/L로 조제하였다[12]. 그리고 *M. lysodeikticus* cell 현탁액은 동결 건조된 *M. lysodeikticus* cell(SIGMA, M-3770, USA)을 사용하여 초기농도를 100-500 mg/L로 조제하였으며, 이때 *M. lysodeikticus* cell 현탁액은 *M. lysodeikticus* cell을 평형에 도달시켜 재현성을 높이기 위해서 6시간 동안 교반을 실시한 후 사용하였다.

Lysozyme은 pH 3.5-7에서 최고의 활성도를 나타내는데, *M. lysodeikticus* cell과의 용해반응에 있어서는 상온인 경우에 pH 5-7에서 최대인 것으로 알려져 있다. 이 때문에 lysozyme의 활성 측정은 주로 이 범위에서 실시된다. 본 연구에서는 건조분말상태의 pH 7.2 phosphate buffer(SIGMA, P-3288, USA)를 3차 증류수에 용해시켜 1/15 M의 phosphate buffer 용액을 조제하여 lysozyme과 *M. lysodeikticus* cell의 용매로 사용하였다. 용매조제 후 최종 pH를 측정된 결과 pH 7을 나타내었으며, pH 7의 lysozyme 용액과 *M. lysodeikticus* cell 현탁액으로 용해반응을 실시하여 lysozyme이 최대활성도를 나타내도록 하였다. 그리고 lysozyme의 효소활성도를 향상시키기 위하여 0.3 M NaCl 용액(富田, 日本)을 사용하였으며, 용매는 3차 증류수를 사용하였다.

3.2. Lysozyme의 효소활성측정

본 연구에서는 Perry등이 제안한 방법[17]을 이용하여 lysozyme의 활성을 초기용해반응속도로 측정하였다. Lysozyme-*M. lysodeikticus* cell의 용해반응은 상온에서 *M. lysodeikticus* cell 현탁액 4.5 mL, NaCl 용액 1.5 mL, 그리고 lysozyme 표준용액 3 mL를 각각 순서대로 지름 1 cm의 UV-visible 분광광도계 cuvette내에 투입하여 실시하였다.

Lysozyme의 활성은 이 혼합물을 손으로 순간적으로 혼합한 후, UV-visible 분광광도계(MILTON ROY, SPECTRONIC 20, USA)

Table 1. Transmittance of Pure Lysozyme Solution at Various Concentration

C_{EO} (mg/L)	1	5	10	100
Tr (%)	100	100	100	100

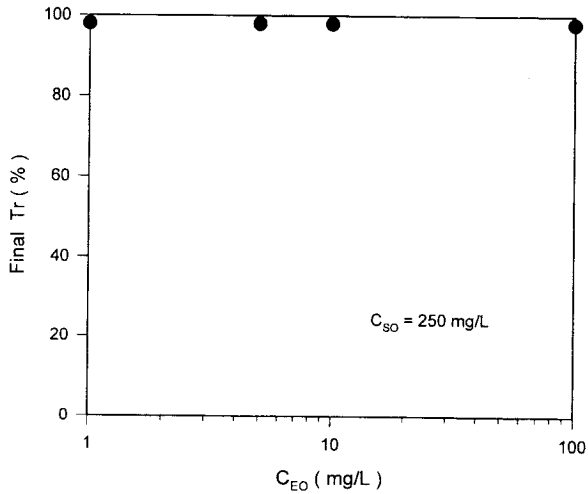


Figure 1. Transmittance of final lysis product solution at various lysozyme concentration.

를 사용하여 540 nm에서 투과도 변화를 10초 간격으로 3분 동안 측정하여 결정하였다.

Lysozyme-*M. lysodeikticus* cell의 용해반응 중, 분광광도계 cuvette내에서 *M. lysodeikticus* cell 현탁액과 NaCl 용액의 농도는 각각 50~250 mg/L, 0.05 M이었다. 본 연구에서 초기 lysozyme 농도(C_{EO})는 분광광도계 cuvette내에 투입되기 전의 농도, 초기 *M. lysodeikticus* cell 농도(C_{SO})는 cuvette내에 투입되었을 때의 농도로 각각 정의하였다.

4. 결과 및 고찰

4.1. C_E , C_P , C_{ES} 가 투과도에 미치는 영향

Lysozyme-*M. lysodeikticus* cell의 용해반응이 진행되는 동안에 반응기내의 탁도에 영향을 미칠 수 있는 인자로는 크게 *M. lysodeikticus* cell(C_S), lysozyme(C_E), 용해반응 생성물(C_P), 중간체(C_{ES})의 농도로 나타낼 수 있다. 이러한 인자들 중 C_E , C_P 및 C_{ES} 가 용해반응 중 투과도(Tr)에 미치는 영향을 고려해 반응기내의 *M. lysodeikticus* cell의 농도와 투과도와 상관관계를 수학적으로 모델링하기 위하여 1~100 mg/L의 lysozyme 용액과 50~250 mg/L의 *M. lysodeikticus* cell 현탁액을 조제하여 용해반응을 실시하였다.

먼저 C_E 가 투과도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1~100 mg/L의 순수한 lysozyme 용액만의 투과도를 측정하였다. 그리고 lysozyme과 *M. lysodeikticus* cell의 초기농도변화에 따른 반응기내의 C_P 와 C_{ES} 가 투과도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1~100 mg/L의 lysozyme 용액과 250 mg/L의 *M. lysodeikticus* cell 현탁액의 용해반응과 10 mg/L의 lysozyme용액과 50~250 mg/L의 *M. lysodeikticus* cell 현탁액의 용해반응을 각각 실시하여 투과도의 변화를 측정하였다. 그 결과를 Table 1과 Figure 1, 2에 각각 나타내었다.

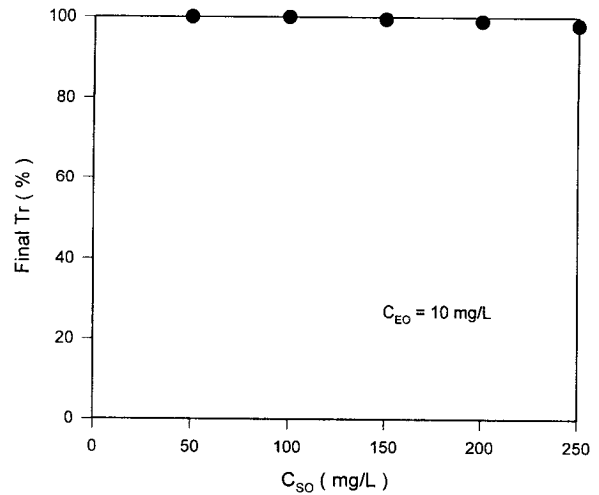


Figure 2. Transmittance of final lysis product solution at various *M. lysodeikticus* cell concentration.

먼저 Table 1에 나타난 것처럼 순수한 lysozyme 용액의 농도(C_E)가 투과도에 미치는 영향을 살펴보면 순수한 lysozyme 용액의 투과도는 lysozyme의 농도와 관계없이 모두 100%를 나타내어 용해반응 중 투과도에 미치는 영향은 나타나지 않음을 알 수 있었다. 그리고 Figure 1, 2는 lysozyme과 *M. lysodeikticus* cell의 초기농도를 달리하여 용해반응을 실시한 후 반응이 종결된 이후의 최종 투과도를 측정하여 C_P 와 C_{ES} 가 투과도에 미치는 영향을 알아본 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 용해반응이 종료된 후의 최종 투과도는 lysozyme과 *M. lysodeikticus* cell의 초기농도와 관계없이 모두 98%이상으로 나타나 lysozyme이 *M. lysodeikticus* cell에 대해서 활성도가 우수함을 확인할 수 있었다[7].

이를 통하여 lysozyme-*M. lysodeikticus* cell의 용해반응에서 반응기내의 C_E , C_P 및 C_{ES} 가 용해반응 중 투과도에 미치는 영향은 무시할 수 있고, 오직 반응기내에 존재하는 *M. lysodeikticus* cell의 농도(C_S)변화가 투과도변화로 나타남을 알 수 있었다.

따라서 본 연구에서는 C_E , C_{ES} 및 C_P 의 투과도에 미치는 영향을 배제할 수 있으므로 C_S 만을 이용하여 *M. lysodeikticus* cell의 투과도와 농도의 관계를 수학적인 함수로 모델링하였다.

4.2. *M. lysodeikticus* cell의 C_S 와 Tr의 관계

Lysozyme-*M. lysodeikticus* cell의 용해반응 중 C_E , C_{ES} 및 C_P 가 투과도에 미치는 영향은 배제할 수 있기 때문에 반응기내의 투과도는 단순히 *M. lysodeikticus* cell의 농도에만 의존한다. 이 때문에 용해반응 중 C_S 와 Tr의 관계를 특정한 과정에서 용질의 농도와 투과도의 관계를 나타내는 Beer의 법칙에 적용시켜 식 (3)과 같이 수학적으로 간단히 모델링할 수 있었다. 이에 본 연구에서는 C_S 와 Tr의 관계가 실제로 Beer의 법칙으로 표현가능한지의 여부를 알아보기 위하여 *M. lysodeikticus* cell 현탁액의 농도를 0~500 mg/L로 조제하여 *M. lysodeikticus* cell 현탁액만의 C_S 에 대한 Tr를 측정하였다. Figure 3에 측정된 결과를 식 (3)의 Beer의 법칙으로 선형화시켜 나타내었다.

그림에서 보는 것처럼 *M. lysodeikticus* cell 현탁액의 농도가 300 mg/L이하에서는 C_S 와 Tr의 관계가 Beer의 법칙으로 정확하게 표현되었다. 그러나 C_S 가 400 mg/L이상으로 증가하면서 오차가 다소 나타났다.

Lysozyme-*M. lysodeikticus* cell의 용해반응을 이용한 lysozyme의 활성측정법에서 사용되는 *M. lysodeikticus* cell의 기준농도, 즉

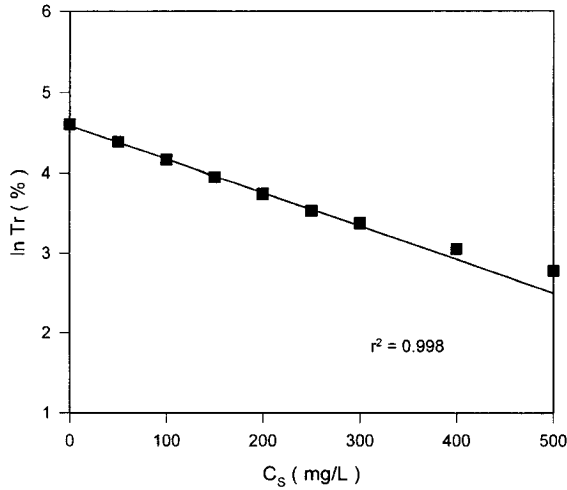


Figure 3. Variation of transmittance of *M. lysodeikticus* cell suspension with the concentration.

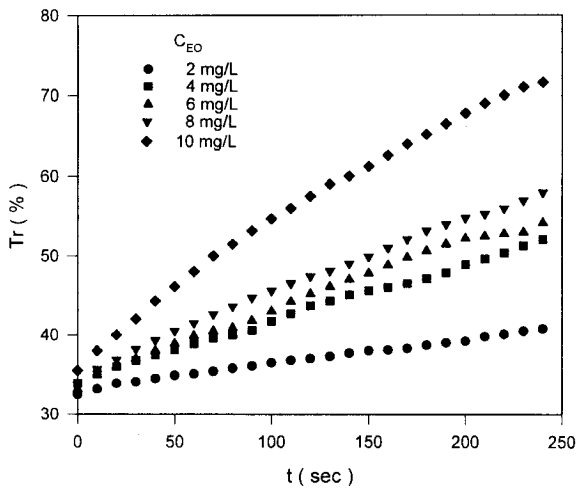


Figure 4. Variation of *M. lysodeikticus* cell suspension transmittance during lysis reaction at various C_{EO} (at $C_{S0} = 250$ mg/L).

반응기에서 용해반응이 일어나기 전의 초기농도는 250 mg/L이다. 따라서 Figure 3의 결과를 보면 C_S 의 기준농도구간에 포함되는 300 mg/L 이하에서는 C_S 와 Tr 의 관계를 Beer의 법칙에 적용시켜 수학적인 모델식으로 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

이 때문에 본 연구에서는 반응기내에서 *M. lysodeikticus* cell의 농도를 250 mg/L 이하로 유지시켜 용해반응을 실시하였고, 이 법칙을 이용하여 용해반응동안 측정되는 *M. lysodeikticus* cell의 투과도 변화를 농도변화로 전환하였다. 그리고 0~500 mg/L까지 나타낸 Figure 3의 실험 결과 중 Beer의 법칙으로 표현 가능한 농도 범위인 0~300 mg/L까지의 기울기를 흡수능(absorptivity)으로 사용하였으며, Figure 3의 기울기에서 구한 흡수능, a 는 4.31×10^{-3} L/mg-cm이었다. Figure 3에 표시된 표준편차(r^2 , standard deviation)는 0~300 mg/L에서의 투과도 변화를 선형화 시켰을 때의 편차 값이다.

이러한 C_S 와 Tr 의 모델식을 실제로 lysozyme-*M. lysodeikticus* cell의 용해반응에 적용시키기 위하여, 2~10mg/L의 lysozyme 용액과 50~250 mg/L의 *M. lysodeikticus* cell 현탁액을 용해반응시켜 Tr 의 변화를 측정하였다. 그 중에서 2~10 mg/L의 lysozyme

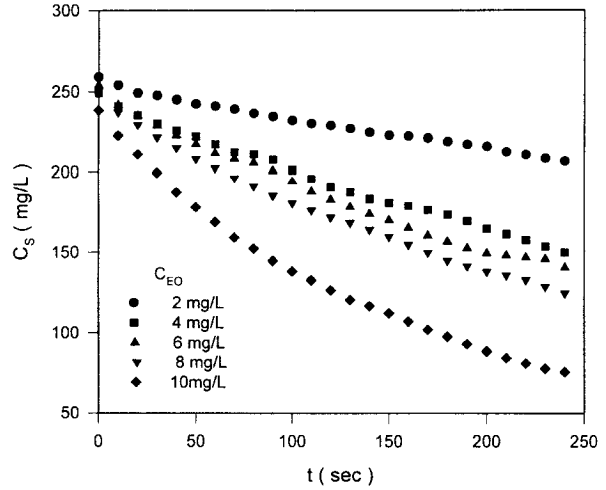


Figure 5. Variation of *M. lysodeikticus* cell suspension concentration during lysis reaction at various C_{EO} (at $C_{S0} = 250$ mg/L).

Table 2. Comparison of r_1 with r_2 at Constant C_{S0} of 250 mg/L

C_{EO} (mg/L)	r_1 (dTr/dt)	r_2 (dCs/dt)	r_1/r_2
2	0.049	0.340	0.14
4	0.089	0.577	0.15
6	0.116	0.755	0.15
8	0.137	0.871	0.16
10	0.216	1.260	0.17

용액과 250 mg/L의 *M. lysodeikticus* cell 현탁액을 각각 용해반응시켰을 때 용해반응시간에 따른 투과도 변화를 Figure 4, 식 (3)으로 제시된 Beer의 법칙을 이용하여 투과도 변화를 농도변화로 전환한 결과를 Figure 5에 각각 나타내었다.

그림에서 보는 바와 같이 전체적으로 C_E 와 C_S 가 증가함에 따라서 Tr 의 증가속도와 C_S 의 감소속도가 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 C_E 와 C_S 의 농도차이에 의한 lysozyme의 용해반응속도차이에 기인한 것으로 용해반응속도는 lysozyme과 *M. lysodeikticus* cell의 초기농도에 의해 결정되는 것을 확인할 수 있었다.

그리고 Table 2에는 C_S 와 Tr 의 관계를 고려하지 않고 단지 투과도의 변화만으로 lysozyme의 활성을 측정할 기존의 활성측정법과 C_S 와 Tr 의 관계를 고려하여 lysozyme의 활성을 측정할 본 연구에서의 결과를 서로 비교하여 각 방법의 정확성의 차이를 살펴 보았다. Table 2에 나타난 초기반응속도는 Figure 4와 5에서 0~40초 동안의 Tr 과 C_S 의 변화로부터 각각 측정된 결과이다.

Table 2에 나타난 바와 같이 Tr 과 C_S 의 기울기로부터 얻어진 초기반응속도를 각각 비교해 보면, *M. lysodeikticus* cell의 C_S 와 Tr 의 관계를 고려하지 않고 단순히 Tr 의 변화속도로만 얻어진 초기용해반응속도는 C_S 의 변화로 얻어지는 반응속도에 비해 14~17%정도로 대단히 낮게 나타났다. 이와 같이 Tr 의 변화로만 얻어진 용해반응속도가 낮게 나타나는 이유는 *M. lysodeikticus* cell의 투과도와 농도의 관계를 고려하지 못한 결과로, Tr 의 변화로만 나타내는 용해반응속도는 실제 반응속도보다 낮은 반응속도를 나타내기 때문에 정확성이 결여되어 용해반응속도를 표현하는데 문제가 있었다.

따라서 lysozyme-*M. lysodeikticus* cell의 용해반응으로 lysozyme

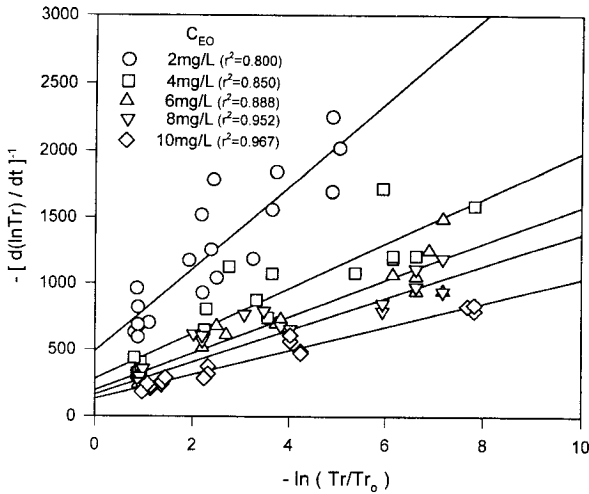


Figure 6. Modified Lineweaver-Burk plot at various initial concentration of lysozyme.

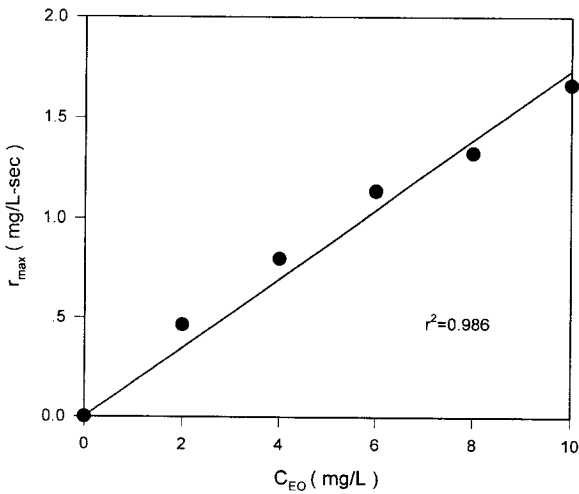


Figure 7. Relationship between maximum reaction rate and initial concentration of lysozyme.

의 활성을 정확하게 측정하기 위해서는 반드시 C_S 와 Tr 의 관계를 고려하여 용해반응속도를 구해야 함을 알 수 있었다.

4.3. Michaelis-Menten kinetics

Lysozyme-*M. lysodeikticus* cell 용해반응속도는 Beer의 법칙을 이용하면 기질로 이용되는 *M. lysodeikticus* cell의 농도변화를 투과도의 변화로부터 알 수 있기 때문에 식 (4)와 같이 변형된 Michaelis-Menten 식으로 표현할 수 있다. 이때 반응속도식은 반응시간에 대한 투과도의 변화를 용해반응시간 t 에 대하여 직접 미분하여 구할 수 있다. 실제로 Lysozyme-*M. lysodeikticus* cell의 용해반응을 실시한 후 이러한 Beer의 법칙을 이용한 C_S 와 Tr 의 관계식으로 얻어진 용해반응속도식을 사용하여 최대반응속도(r_{max})와 Michaelis-Menten 상수(K_M)를 구하기 위해 변형된 Michaelis-Menten 식을 Lineweaver-Burk plot으로 선형화 시킨 결과는 Figure 6과 같다. 그리고 Figure 6의 기울기, 절편에서 얻어진 r_{max} 와 K_M 를 C_{EO} 변화에 대해서 다시 나타내면 Figure 7, 8과 같다.

Figure 6에서 보는 바와 같이 용해반응속도는 C_{EO} 와 C_{S0} 가 큰

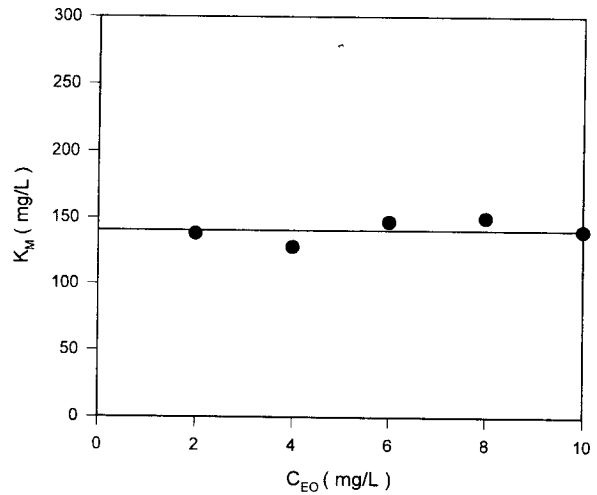


Figure 8. Relationship between Michaelis-Menten constant and initial concentration of lysozyme.

경우에 크게 나타나 lysozyme의 용해반응속도는 lysozyme과 *M. lysodeikticus* cell의 초기농도에 의해 결정되는 것을 알 수 있었다. 그리고 Figure 7에서 보는 바와 같이 C_{EO} 가 증가함에 따라 r_{max} 는 직선관계로 증가하고 있는데 이는 최대 용해반응속도 r_{max} 가 일정 온도에서 k_3 에 관계없이 C_{EO} 에만 비례하고 있음을 나타낸다[12,18]. 이때 C_{EO} 와 r_{max} 의 직선식의 기울기에서 구한 반응속도상수 k_3 은 약 0.1734 sec^{-1} 로 나타났다.

일반적으로 K_M 값은 효소의 기질에 대한 친화력을 나타내는 지표이다. 보통 K_M 값이 작으면 효소와 기질사이의 친화력이 크다는 것을 의미하는데, 친화력이 우수한 효소-기질반응에 있어서 K_M 값은 10^{-1} - 10^{-6} M으로 매우 작은 값이다[19,20].

Figure 8에 나타난 바와 같이 lysozyme의 K_M 은 C_{EO} 와 무관하게 약 9.83×10^{-6} M(140.6 mg/L)으로 나타나 *M. lysodeikticus* cell에 대한 lysozyme의 친화력이 우수함을 확인하였다.

그리고 Michaelis-Menten 상수 K_M 을 구성하는 각 속도상수 k_1 , k_2 , k_3 의 크기를 비교해보면 식 (8)과 같다. 이때 k_3 은 속도율속단 계로 무시할 수 있기 때문에 K_M 은 간단히 k_1 과 k_2 로만 표시할 수 있다. 본 연구에서 k_1 과 k_2 의 관계는 k_1 이 k_2 에 비해 약 100,000배가 크게 나타나 Lysozyme-*M. lysodeikticus* cell의 용해반응속도는 정반응이 대단히 우세하고, 이 때문에 *M. lysodeikticus* cell에 대한 lysozyme의 친화력이 우수하게 나타남을 알 수 있었다.

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \approx \frac{k_2}{k_1} = 9.83 \times 10^{-6} \text{ M} \quad (8)$$

4.4. 상수 A의 이론치와 실험치의 비교

본 연구에서 얻어진 Michaelis-Menten kinetics 결과(K_M , k_3)를 식 (7)에 대입하고, lysozyme의 농도분석에 이용되는 *M. lysodeikticus* cell의 초기농도를 250mg/L로 일정하게 한 후, 용해반응속도와 lysozyme의 초기농도의 관계를 나타내는 상수 A를 구한 결과, A는 약 $1.11 \times 10^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 로 나타났다.

이 이론값을 실제 실험으로 얻어진 결과와 비교하여 lysozyme 농도분석에 응용여부를 알아보기 위하여 실제 lysozyme-*M. lysodeikticus* cell의 용해반응에서 얻어진 용해반응속도와 lysozyme의 초기농도와와의 관계를 Figure 9에 나타내었다.

Figure 9에서 보는 것처럼 실험으로 구한 lysozyme의 초기농도와 용해반응속도의 관계는 최소자승법(least-squares method)으로

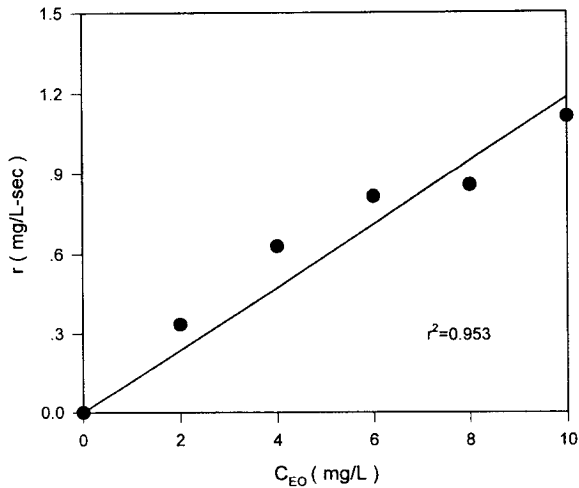


Figure 9. Relationship between initial reaction rate and initial concentration of lysozyme at C_{SO} of 250 mg/L.

분석한 결과, 1차식의 나타났고, 용해반응속도는 *M. lysodeikticus* cell의 농도가 일정한 경우에는 lysozyme의 초기농도에 의존함을 확인하였다.

Figure 9의 기울기로부터 계산된 상수 A는 $1.18 \times 10^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 로 이론적인 계산 값과 거의 일치하였고 이 상수값을 이용하여 lysozyme의 농도는 *M. lysodeikticus* cell의 투과도의 변화로부터 구해지는 lysozyme의 초기 용해반응속도식으로부터 쉽게 구할 수 있었다.

5. 결 론

본 연구에서는 계란 흰자위 lysozyme을 중심으로 기존의 *M. lysodeikticus* cell의 용해반응에 의한 투과도 변화로만 측정하던 lysozyme 활성측정법을 개선하고자 Beer의 법칙으로 *M. lysodeikticus* cell의 투과도 변화를 농도변화로 전환시켜서 투과도 변화만으로 lysozyme의 농도를 측정하고 분석할 수 있는 개선된 lysozyme 활성측정법을 제안하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1) Lysozyme-*M. lysodeikticus* cell의 용해반응에서 반응기내의 lysozyme, 용해반응 생성물, 중간체의 농도가 용해반응 중 투과도에 미치는 영향은 무시할 수 있었고, 오직 반응기내에 존재하는 *M. lysodeikticus* cell의 농도변화만이 투과도의 변화로 나타났다.

2) *M. lysodeikticus* cell의 투과도와 농도와의 관계는 Beer의 법칙으로 수학적인 모델식으로 나타낼 수 있었는데, 이 모델식을 이용하여 *M. lysodeikticus* cell의 투과도 변화를 농도변화로 전환시킬 수 있었다. 그리고 *M. lysodeikticus* cell의 투과도와 농도와의 관계를 고려하지 않고 단순히 투과도 변화속도만으로 얻어진 초기반응속도만 얻어진 초기 용해반응속도는 두 가지의 관계를 고려한 것에 비해 대단히 낮게 나타나 정확성이 결여됐다.

3) Lysozyme-*M. lysodeikticus* cell의 용해반응에서 최대용해반응속도는 k_3 에 관계없이 C_{E0} 에만 비례하였고, 반응속도상수 k_3 은 약 0.1734 sec^{-1} 로 나타났다. 또한 Michaelis-Menten 상수는 C_{E0} 와 무관하게 약 $9.83 \times 10^{-6} \text{ M}$ 으로 나타났고, k_1 이 k_2 에 비해 약 100,000배가 커서 *M. lysodeikticus* cell에 대한 lysozyme의 친화력이 우수하게 나타났다.

4) Lysozyme의 활성을 이용하여 lysozyme의 농도를 측정하기 위한 상수 A는 이론치와 실험치가 거의 일치하였고 이 상수 값을

이용하여 lysozyme의 농도는 *M. lysodeikticus* cell의 투과도의 변화로부터 구해지는 lysozyme의 초기 용해반응속도식으로부터 쉽게 구할 수 있었다.

감 사

본 연구는 한국과학재단의 핵심전문연구(과제번호 951-1103-047-1과 961-1107-044-2)의 지원을 받아 수행하였으며, 이에 감사드립니다.

사용 기 호

A	: Constant in equation (7) [sec^{-1}]
a	: Absorptivity [L/mg-cm]
b	: Optical path in centimeters [cm]
C_E	: Lysozyme concentration [mg/L]
C_{E0}	: Initial lysozyme concentration [mg/L]
C_{ES}	: Lysozyme- <i>M. lysodeikticus</i> cell complex concentration [mg/L]
C_P	: Lysis product concentration [mg/L]
C_S	: <i>M. lysodeikticus</i> cell concentration [mg/L]
C_{SO}	: Initial <i>M. lysodeikticus</i> cell concentration [mg/L]
K_M	: Michaelis-Menten constant [mg/L, mol/L]
k_1, k_2, k_3	: Lysis reaction rate constant $k_1=k_2$ [L/mg-sec], k_3 [sec^{-1}]
r	: Lysis reaction rate [mg/L-sec] $r_1(=dTr/dt)$ [%/sec], $r_2(=dC_S/dt)$ [mg/L-sec]
r_{max}	: Maximum lysis reaction rate, k_3C_{E0} [mg/L-sec]
Tr	: Transmittance [%]
Tr_0	: Initial transmittance [%]
t	: Lysis reaction time [sec]

그리스 문자

α	: Constant, $-\frac{1}{ab}$ [mg/L]
----------	------------------------------------

참 고 문 헌

- 류병호, *생물화학*, 9, 54(1995).
- J. Xia, P. L. Dubin, Y. Kim, B. B. Muhoberac and V. J. Klimkowski, *J. Phys. Chem.*, 97, 4528(1993).
- M. Chen and S. Rohani, *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 63(1992).
- W. J. Stadelman and O. J. Cotterill, "EGG SCIENCE & TECHNOLOGY", 2nd ed., 74, AVI, Connecticut(1977).
- Y.-C. Shih, J. M. Prausnitz and H. W. Blanch, *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 1155(1992).
- A. G. Bozzano and C. E. Glatz, *J. Memb. Sci.*, 55, 181(1991).
- V. A. Proctor and F. E. Cunningham, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 26, 359(1988).
- E. Li-Chan, S. Nakai, J. Sim, D. B. Bragg and K. V. Lo, *J. Food Sci.*, 51, 1032(1986).
- R. D. Galyean and O. J. Cotterill, *J. Food Sci.*, 46, 1827(1981).
- P. D'Orazio, M. E. Meyerhoff and G. A. Rechnitz, *Anal. Chem.*, 50, 1531(1978).
- J. M. Fernandez-sousa, R. Perez-castells and R. Rodriguez,

- Biochimica et Biophysica Acta*, **523**, 430(1978).
12. J. E. Bailey and D. F. Ollis, "Biochemical Engineering Fundamentals", 2nd ed., 745, McGraw-Hill, New York(1986).
 13. A. R. Schulz, "Enzyme Kinetics", Cambridge University Press, New York, 9(1994).
 14. D. A. Skoog and J. J. Leary, "Principles of Instrumental Analysis", Saunders College Publishing, New York, 126(1992).
 15. G. J. Shugar and J. T. Ballinger, "Chemical Technicians' Ready Reference Handbook", 3rd ed., McGraw-Hill, New York, 720(1990).
 16. N. Bernard, C. Jolivalet and J. Schwartzentruber, *Biotechnol. Bioeng.*, **49**, 405(1996).
 17. R. M. Parry, Jr., R. C. Chandan and K. M. Shahani, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **119**, 384(1965).
 18. 김승욱, 이진석, 정용섭, 조영일, 홍석인 공역, "생물화학공학", 회중당, 서울, 8(1994).
 19. A. Townshend, "Encyclopedia of Analytical Science", 1175, Academic Press, London(1995).
 20. H. Sahn, "Biotechnology", 67, VCH, California(1993).