

Metarrizium anisopliae (Metschn.) Sorok이 생산하는 *Lactobacillus plantarum* 용균효소의 분리, 정제 및 특성

류기철 · 함병권 · 백운화¹ · 유주현 · 배동훈*²

연세대학교 식품생물공학과 및 생물산업소재연구센터

¹두산기술원, ²단국대학교 식품공학과 및 연세대학교 생물산업소재연구센터

Isolation, Purification, and Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lytic Enzyme Produced by *Metarrizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. Ky-Chul Ryou, Byoung-Kwon Hahm, Un-Wha Paik¹, Ju-Hyun Yu and Dong-Hoon Bai*². Department of Food and Biotechnology, and Bioproduct Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, ¹Doosan Technical Center, Yongin-gun, Kyonggi-do, 330-187, ²Department of Food Engineering, Dankook University, Chunan, 330-174, and Bioproduct Research Center, Yonsei University, Korea - To improve the preservation of Kimchi, we isolated *Lactobacillus plantarum* lytic enzyme-producing strain from soil, and the enzyme was purified and characterized. From the observation of cultural and morphological characteristics, the isolated strain was identified as *Metarrizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. The enzyme was purified to 75-folds with 40% yields through affinity adsorption and CM-Sephadex C-50 column chromatography. The optimum pH and temperature for lytic activity are 4.0 and 40°C, respectively, and the enzyme activity is stable between pH 3.0 and 9.0, and up to 50°C. The enzyme is a monomeric protein with molecular weight of 40,000 daltons by SDS-PAGE and gel filtration. The enzyme is endopeptidase which breaks the peptide linkage of *Lactobacillus plantarum* peptidoglycan. The lytic action spectra confirmed that *Leuconostoc mesenteroides*, a useful strain for the fermentation of Kimchi, is not lysed by the enzyme. The enzyme activity is inhibited by *N*-bromosuccinimide (NBS), which probably indicates the involvement of tryptophan residue in active site of the enzyme, and also inhibited by Ag⁺. The amino acid composition analysis showed that the enzyme contains more acidic amino acids than basic ones, and composition of alanine, glycine, proline and tyrosines was very high.

발효식품을 산업화시킬 때 중요한 것은 맛과 향, 또는 물성이 항상 일정하고 소비자가 요구하는 제품을 제조하여야 한다는 점이다. 이러한 문제는 원료 자체에 부착되어 있는 잡균을 제거한 후 목적하는 미생물만을 순수배양하여 발효시킴으로써 해결할 수 있다. 이러한 예는 탁주, 양주, 장류 등에서 볼 수 있으나(1), 이러한 방법은 식품의 물성, 맛 등을 변화시킬 가능성이 크기 때문에 사용에 있어서 유의하여야 한다.

김치발효시, 미생물의 구조변화를 보면 *Lactobacillus plantarum*이 성장하는 도중에 *Leuconostoc mesenteroides*가 출현한 다음 *Streptococcus faecalis*, *Pediococcus cerevisiae*, *Lactobacillus brevis* 등의 순서로 변화되고 있는 것으로 보고되고 있다(2). 이러한 개체군의 동적 변화는 환경적 변화에 따라서 상당한 차이가 생긴다. 김치의 미생물 군집발달은 gram 양성, 음성균과 효모 군집으로 구별되어 나타난다. 온도에 따라 양상은 매우 틀리며 일반적인 김치발효 온도인 15~25°C에서의 미생물 천이과정은 다음과 같다. 1) Gram 양성균 군집은 유산균으로서 상하층에서 일단 증식이 일어난 후

에는 소멸되며, 2) 김치의 풍미를 손상시키는 gram 음성균 군집은 하층에서 경시적으로 증감이 일어나는 파동적 증식이 일어나면서 후기에, 상층에는 새로운 gram 음성균과 효모군집의 발달이 계속 일어난다(2). 후자의 군집이 상층에서 발달될 때 pH는 3에서 8정도 까지 증가되면서 상층의 김치는 연부되기 시작하나 하층의 김치 상태는 변하지 않는다. 여기에 군집 발달 양상을 김치의 장기보존과 비교하여 볼 때 공기와 접촉되지 않는 하층의 김치는 gram 양성균 군집만이 발달한 후 소멸하고, 군집제어적으로 일어나는 pH와 총산도도 어느정도 유지되므로 만약 하층 김치 상태를 계속 유지할 수 있다면 김치의 장기저장을 해결할 수 있는 방법이라고 할 수 있으나 산도가 가식범위를 넘는다는 결점이 있다. 5~10°C의 저온에서 발효시키면, 김치의 미생물 군집발달은 상온발효시 김치용기의 하층발효에서 나타나는 미생물 군집의 양상과 gram 양성균집만이 증식하고 pH는 약 4정도가 되며 산도도 가식부위를 넘지 않는다. 그러나 이러한 저온발효는 상온발효기간보다 약 5배 정도 길어지는 단점이 있다(2).

세균 세포벽 용해효소는 peptidoglycan에 대한 높은 특이성으로 인해 그 반응생성물을 분석하여 세균 세포벽의 구조를 밝히는데 이용될 수 있으며, 미생물의 오

*Corresponding author.

Key words: *Metarrizium anisopliae* (Metschn.) Sorok, *Lactobacillus plantarum* lytic enzyme.

염으로부터 식품을 보호하는 식품보존제로서, 또한 세포내의 유용물질을 분리하고 연구하는데 이용될 수 있다(3). Yu 등은 호알칼리성 미생물이 생산하는 용균효소와 그 유전자에 관한 연구를 한 바 있으며, 그 결과 식중독 유발균 등의 각종 병원성 균에 대하여 용균활성이 있는 것으로 밝혀졌다(4-7).

본 연구에서는 이상의 문제점들을 해결하기 위한 방법의 하나로서, 김치의 상온발효시 하층의 산도를 증가시키는데 있어서 주된 역할을 하는 *Lactobacillus plantarum*에 대한 용균효소 생산균주를 탐색하여 그 효소를 정제하고 특성을 연구하였다.

재료 및 방법

효소생산 균주의 분리 및 동정

토양 1g을 생리식염수에 현탁하여 2시간 동안 방치 후, 그 상등액을 사멸 *Lactobacillus plantarum*이 0.5% (w/v)의 농도로 현탁되어 있는 고체배지(1.0% glucose, 2.0% sucrose, 1.0% soluble starch, 0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.1% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)에 도말하여 30°C에서 배양시키면서 균체주위의 투명환의 생성여부를 확인하였다. 분리한 균주를 상기의 배지에서 7일 동안 액체배양 후, 배양여액 1ml을 취하여 550 nm에서의 흡광도가 1.0이 되도록 *Lactobacillus plantarum* 현탁액에 첨가하여 30°C에서 3시간 동안 반응시키면서 흡광도의 감소여부를 확인하였다. 효소생산균주의 동정은 PDA(Difco)배지를 사용하여 30°C에서 포자가 충분히 형성되도록 배양한 후, 관찰되는 균주의 형상 및 포자의 색깔을 확인하고 균사의 격벽 유무 및 포자의 모양 등을 현미경으로 관찰하여 동정하였다.

기질균체의 제조 및 효소활성 측정법

기질로 사용한 *Lactobacillus plantarum*은 1.0% glucose, 0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.2% K_2HPO_4 , 0.1% $KH_2PO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% sodium acetate, 0.01% cysteine, pH 6.8 조성의 배지(8)를 사용하여 37°C에서 30시간 동안 정치배양한 후, 7,500×g(Hitachi 20 PR-52D)에서 10분간 원심분리하여 균체를 모은 다음, 0.9%(w/v) NaCl 용액으로 2회 세척하고 -20°C에서 보관하면서 효소활성 측정에 이용하였다. 용해효소의 활성측정은 Hayashi의 방법(8)을 변형하여 사용하였다. -20°C에 보관중인 기질을 37°C water bath에서 해동 후 550 nm에서의 흡광도가 1.0이 되도록 50 mM sodium acetate-acetic acid 완충액(pH 4.0)으로 조정하였다. 이 균체현탁액 2 ml에 효소액 100 μl를 첨가하여 40°C에서 30분간 반응시킨 다음 550 nm에서의 흡광도 감소를 측정하였다. 이때 효소활성도 1 unit는 1분 동안

550 nm에서의 흡광도를 0.001 감소시키는 효소의 양으로 정하였다.

효소생산을 위한 균주의 배양

PDA(Difco) 사면배지에 본 균주를 접종하여 30°C에서 7일간 배양하여 포자가 충분히 형성되도록 하였다. 여기에 살균된 0.7% NaCl, 0.07% Tween 80 용액을 첨가한 다음 vortexing하여 포자현탁액을 제조하였다(9). 포자의 수는 2×10^5 CFU/ml가 되도록 하였다. 포자현탁액을 용균효소 탐색시 사용한 배지에 1.0%(v/v)가 되도록 접종하여 30°C에서 100시간 동안 400 rpm으로 회전진탕배양하였다.

효소의 분리 및 정제

기질균체인 *Lactobacillus plantarum*을 상기의 방법으로 배양하여 균체를 얻은 후 affinity adsorption을 행하였다. 효소생산균주의 배양상등액을 1.0 N HCl을 이용하여 pH 5.0으로 조절한 다음 배양액 내의 용균효소를 4°C에서 90분 동안 기질균체에 흡착시켰다. 흡착 후 원심분리하여 균체를 다시 분리하고 50 mM sodium acetate-acetic acid(pH 5.0) 완충액으로 세척한 후, 탈착액(50 mM Tris-HCl buffer containing 2.0 M NaCl, pH 7.0)에 현탁하여 4°C에서 90분 동안 반응시키며 효소를 탈착시켰다. Affinity adsorption을 거친 조효소액을 PEG 20,000으로 농축 후 10 mM phosphate 완충액(pH 7.5)으로 평형화시킨 CM-Sephadex C-50(Sigma Co.) 수지에 흡착시킨 다음, 0.0~1.0 M의 NaCl 농도 구배로 효소를 용출시켰다.

단백질 정량과 전기영동

단백질 농도는 UV-1201 UV-VIS Spectrophotometer DNA/Protein program pack(Shimadzu Co.)을 이용하여 측정하였다. 효소의 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)는 Laemmli의 방법(10)에 준하여 행하였다. 전기영동 gel은 12.5%를 사용하였고 10 mA에서 3~4시간 전기영동한 후, 0.05% Coomassie brilliant blue R-250(Sigma Co.)으로 염색하여 단백질 band를 확인하였다.

분자량 측정

효소의 분자량을 측정하기 위하여 FPLC용 Superose 12 column(Pharmacia Co.)을 이용하여(flow rate: 0.3 ml/min) native 효소의 분자량을 측정하였다. 각 표준 분자량 marker 단백질로는 bovine serum albumin(Mw. 66,000 Da.), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(Mw. 35,000 Da.), lysozyme(Mw. 14,300 Da.)을 사용하였다. 용출되는 시간에 대한 분자량과의 관계로부터 효소의 분자량을 산출하였다.

*Lactobacillus plantarum*으로부터 peptidoglycan의 분리

*Lactobacillus plantarum*의 세포벽 분리는 Watanabe의 방법(11)을 변형하여 사용하였다. 30시간 배양한 배양액으로부터 건조중량 10 g의 균체를 얻어 100 ml의 증류수에 현탁시키고 sonicator로 균체를 파괴시켰다. 파괴되지 않은 균체를 1,000×g에서 15분 동안 원심분리하여 제거한 다음 세포벽 물질을 16,000×g에서 30분 동안 원심분리하여 침전시킨 후, 증류수로 3회 세척하고 증류수에 현탁시켰다. 상온에서 70%(v/v) ethyl alcohol로 10분, 100°C에서 5%(v/v) TCA 용액으로 5분 동안 추출하고 원심분리하여 그 침전물을 증류수로 세척한 후 증류수에 투석하였다. 원심분리하여 peptidoglycan을 침전시키고 25 mg trypsin이 포함된 25 ml 50 mM phosphate 완충액(pH 7.0)에 현탁하여 37°C에서 20시간 동안 반응시켰다. 반응액을 원심분리하여 peptidoglycan을 침전시키고 증류수로 세척한 후 다시 증류수에 현탁시켰다. 이 현탁액을 100°C에서 10분 동안 가열처리한 후 원심분리하여 peptidoglycan을 침전시키고 증류수로 세척한 다음, -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

Free amino acid 및 환원당의 분석

상기의 방법으로 분리한 *Lactobacillus plantarum*의 peptidoglycan을 50 mM sodium acetate-acetic acid 완충액(pH 4.0)에 550 nm에서 흡광도가 0.7이 되도록 현탁하였다. 이 현탁액 7 ml에 정제된 효소 110 U(110 U/ml)를 첨가하여 40°C에서 반응시키면서 각 시간별로 1 ml씩 취하고 원심분리하여, 상등액 650 μl를 동결건조한 후 증류수 120 μl에 녹였다. 효소반응액 중에 존재하는 free amino group은 Ghuysen의 방법(12)을 변형하여 측정하였다. 위의 효소반응액 120 μl중 20 μl에 80 μl sodium borate reagent(1% Na₂B₄O₇·10H₂O, w/v)와 10 μl 0.1 M dinitrofluorobenzene(FDNB, Sigma Co.) 용액을 가해 즉시 60°C에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 냉각한 후 300 μl 4.0 N HCl을 첨가하여 100°C에서 2시간 가수분해시킨 다음, 420 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 glycine(0.0~2.0 μmole/ml)을 이용하여 작성하였다. 효소반응액 중에 존재하는 환원당은 DNS법(13)을 변형하여 측정하였다. 위의 효소반응액 120 μl 중 100 μl에 1 ml의 DNS reagent를 첨가해 100°C에서 10분간 반응시키고 즉시 냉각한 후 570 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 glucose(0.0~0.5 μmole/ml)를 이용하여 작성하였다.

아미노산의 조성분석

효소의 아미노산 조성을 알아보기 위하여 정제 효소액을 진공건조한 후 6.0 N HCl, 0.1% phenol을 가하여 105°C에서 24시간 동안 가수분해하였다. 가수분

해하여 얻어진 시료를 재건조시켜 PITC로 유도체화한 후 Waters Pico-Tag system을 이용하여 아미노산 분석을 행하였다. 각 표준아미노산은 Pierce제를 사용하였다.

결과 및 고찰

효소 생산균주의 분리 및 동정

기질균이 현탁되어 있는 agar plate를 상기의 방법으로 제조한 후, 1차, 2차 분리에서 대조구에 비하여 흡광도의 감소가 큰 균주를 선정하여 고체배지 상에서의 확인실험을 실시한 결과 Fig. 1과 같이 균체주위의 투명환을 확인하였다. 분리한 균주를 PDA 배지에서 생육시켰을 경우 연한 노란색의 균사가 자란 후 진한 녹색의 포자가 나타났으며, plate 뒷면은 갈색이었다(Data 제시하지 않음). 현미경으로 본 균주의 형태를 관찰한 결과, 균사는 격벽을 가지며 포자는 타원형이고, 특징적으로 양쪽 끝에 연결 부위로 추측되는 씨눈 모양의 형태가 관찰되었으며, 자실체는 가지고 있지 않았다(Fig. 2). 본 균주를 동정한 결과 본 균주는 *Metarrhizium anisopliae*(Metschn.) Sorok으로 동정되었다(14).

효소의 분리 및 정제

본 균주가 생산하는 효소를 분리, 정제하기 위하여 균주를 상기의 방법으로 배양하였으며, affinity adsorption, CM-Sephadex C-50 column chromatography를 행하였다. 용균효소가 기질 세균에 강하게 결합하는 성질(15)을 이용하여 affinity adsorption을 행하였다. 본 효소의 기질균체에 대한 흡착, 탈착 조건을 결정하기 위하여 예비실험을 실시한 결과, pH 5.0에서, 그리고 낮은 이온강도일수록 흡착이 잘 되었으며, pH 7.0에서, 그리고 이온강도가 높을수록 탈착이 잘 되었다(Data

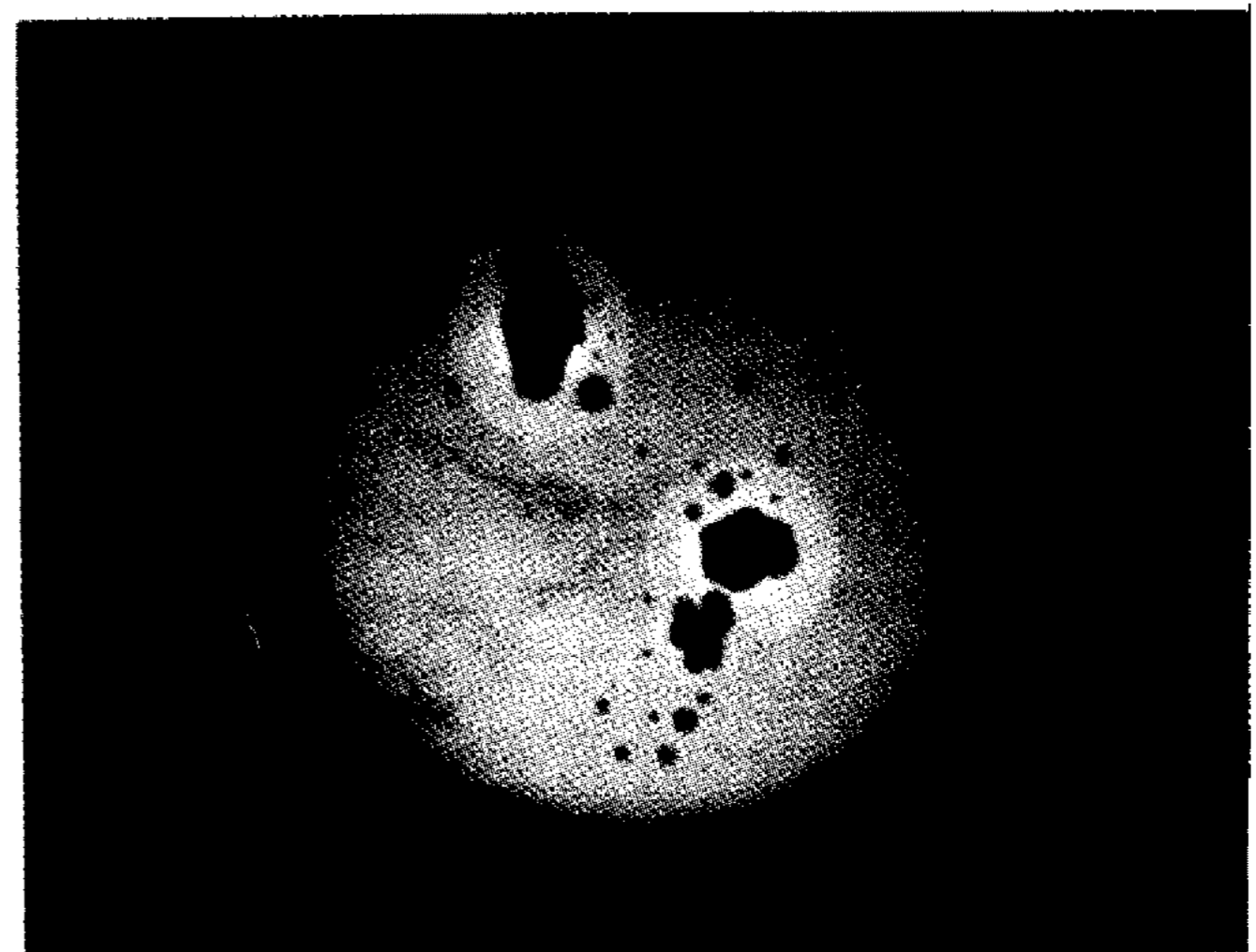


Fig. 1. Lysis of *Lactobacillus plantarum* by *Metarrhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok on agar plate.

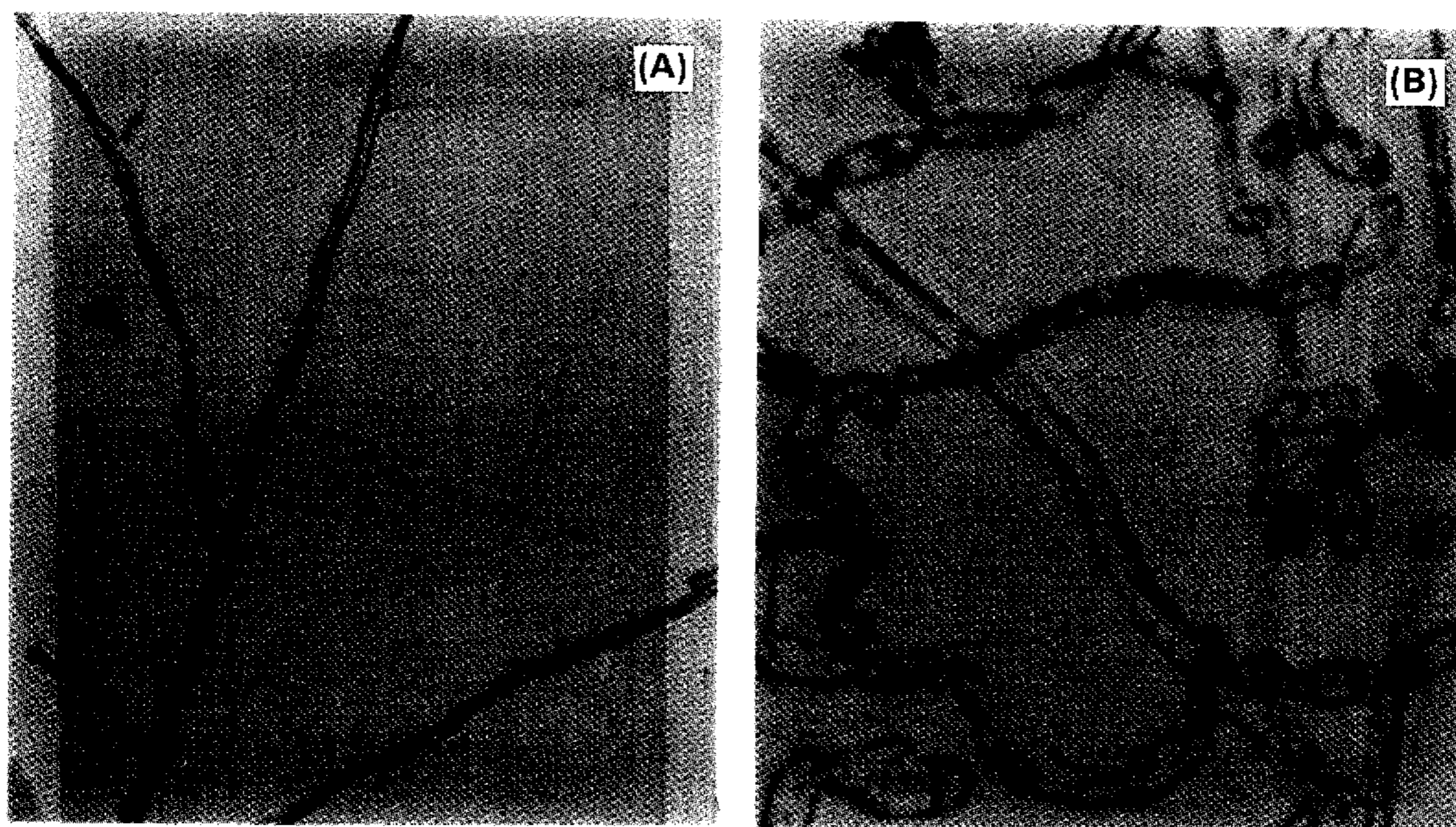


Fig. 2. Microscopic photograph of *Metarrhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. A, $\times 400$; B, $\times 1,000$.

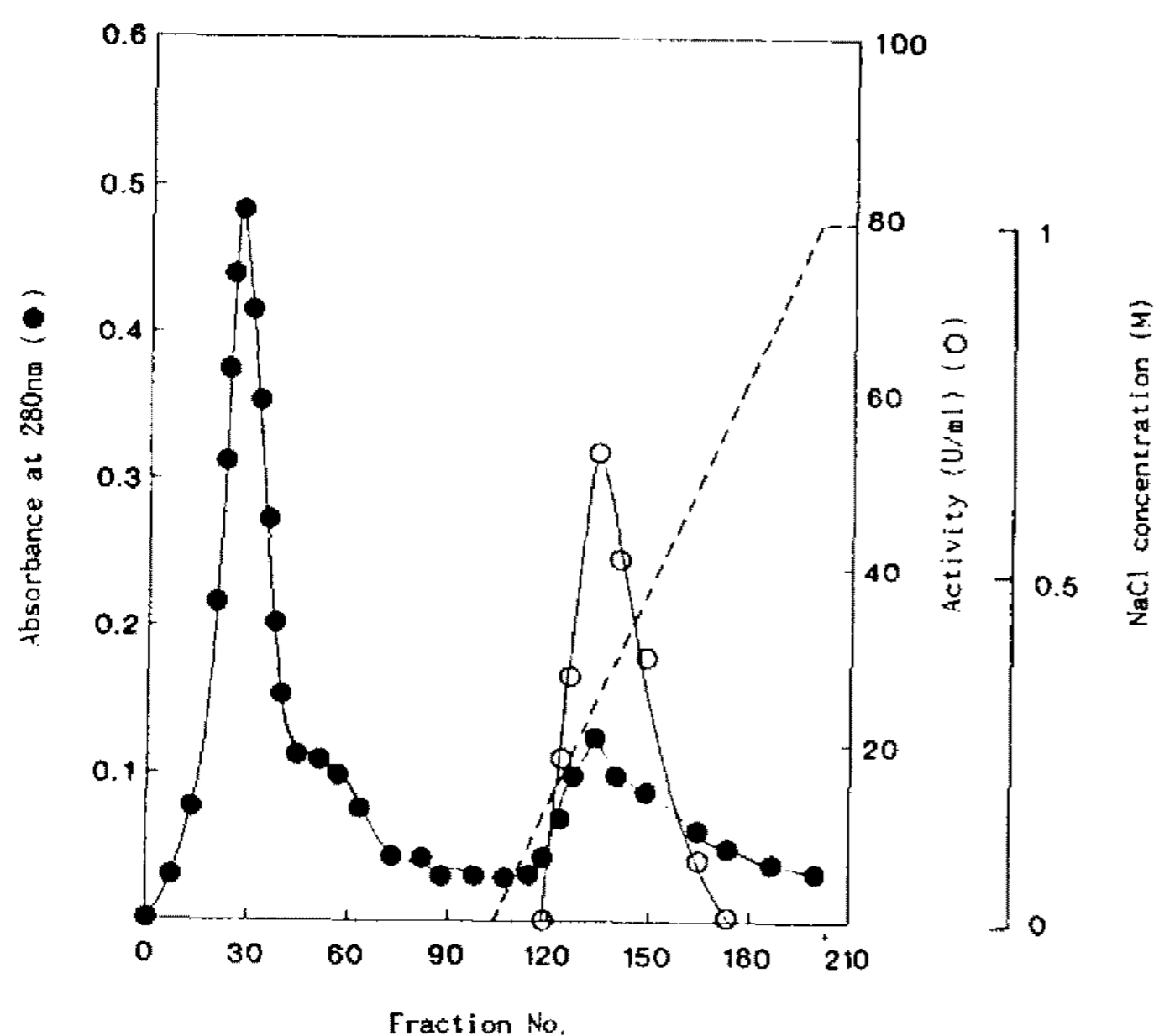


Fig. 3. Column chromatogram of *Lactobacillus plantarum* lytic enzyme on CM-Sephadex C-50. Column measured 5.5×12 cm. The flow rate was 20 ml/hr and 10 ml/fraction was collected.

제시하지 않음). 정제과정 초기에, 기질균체인 *Lactobacillus plantarum*을 2.0 M NaCl로 세척하였는데 이는 용균효소를 기질과 탈착시킬 때 2.0 M NaCl을 사용하기 때문에 삼투압에 의해서 용출될 수 있는 세포내 물질을 미리 용출시키기 위해서이다. 용균효소와 기질의 흡착을 막는 2.0 M NaCl의 제거를 위하여 기질균체를 50 mM sodium acetate-acetic acid 완충액(pH 5.0)으로 충분히 세척한 후, 미리 pH 5.0으로 조절한 배양상등액과 혼합하여 용균효소와 기질을 흡착시켰다. 이때 기질균체의

용균을 막기 위하여 4°C 에서 반응시켰다. 원심분리하여 기질-효소 복합체를 침전시킨 후, 기질에 묻어있을 불순물의 제거를 위하여 pH 5.0 완충액으로 세척하고 2.0 M NaCl이 녹아있는 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)에 현탁하여 용균효소를 기질에서 탈착시켰다. Affinity adsorption을 거친 조효소액을 10 mM phosphate 완충액(pH 7.5)에 투석한 후, 동일 완충액으로 평형화시킨 CM-Sephadex C-50에 흡착시키고 0.0~1.0 M NaCl 농도 구배로 용출시켰다(Fig. 3). 정제과정을 거친 최종 단백질량, 비활성도, 정제도, 수율은 각각 17.6 mg, 367.5 U/mg, 75배, 40%였다(Table 1).

효소의 순도검정 및 분자량 측정

정제과정 중 효소의 순도검정을 위하여 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 행하였다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 분자량 40,000 daltons의 위치에서 단일 단백질 band를 확인할 수 있었다. 효소의 분자량은 FPLC용 Superose 12 column을 이용하여 측정하였으며, 용출되는 시간에 대한 분자량과의 관계로부터 본 효소는 40,000 daltons의 분자량을 가지는 것으로 확인되었다(Fig. 5). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)와 gel filtration으로부터 본 효소는 40,000 daltons의 monomer임을 알 수 있었다.

효소활성의 최적 pH 및 안정성

효소반응에 있어서 최적 pH를 알아보기 위해 50 mM sodium acetate-acetic acid 완충액(pH 3.0~7.0), 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0~9.0), 50 mM glycine-NaOH 완충액(pH 9.0~12.0)에 균체를 550 nm에서의 흡광도가

Table 1. Purification of the lytic enzyme.

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
Culture supernatant	16116.7	3301.5	4.9	1	
Affinity adsorption	9576.7	72.2	132.6	59	27
CM-Sephadex C-50 column chromatography	6466.0	17.6	367.5	40	75

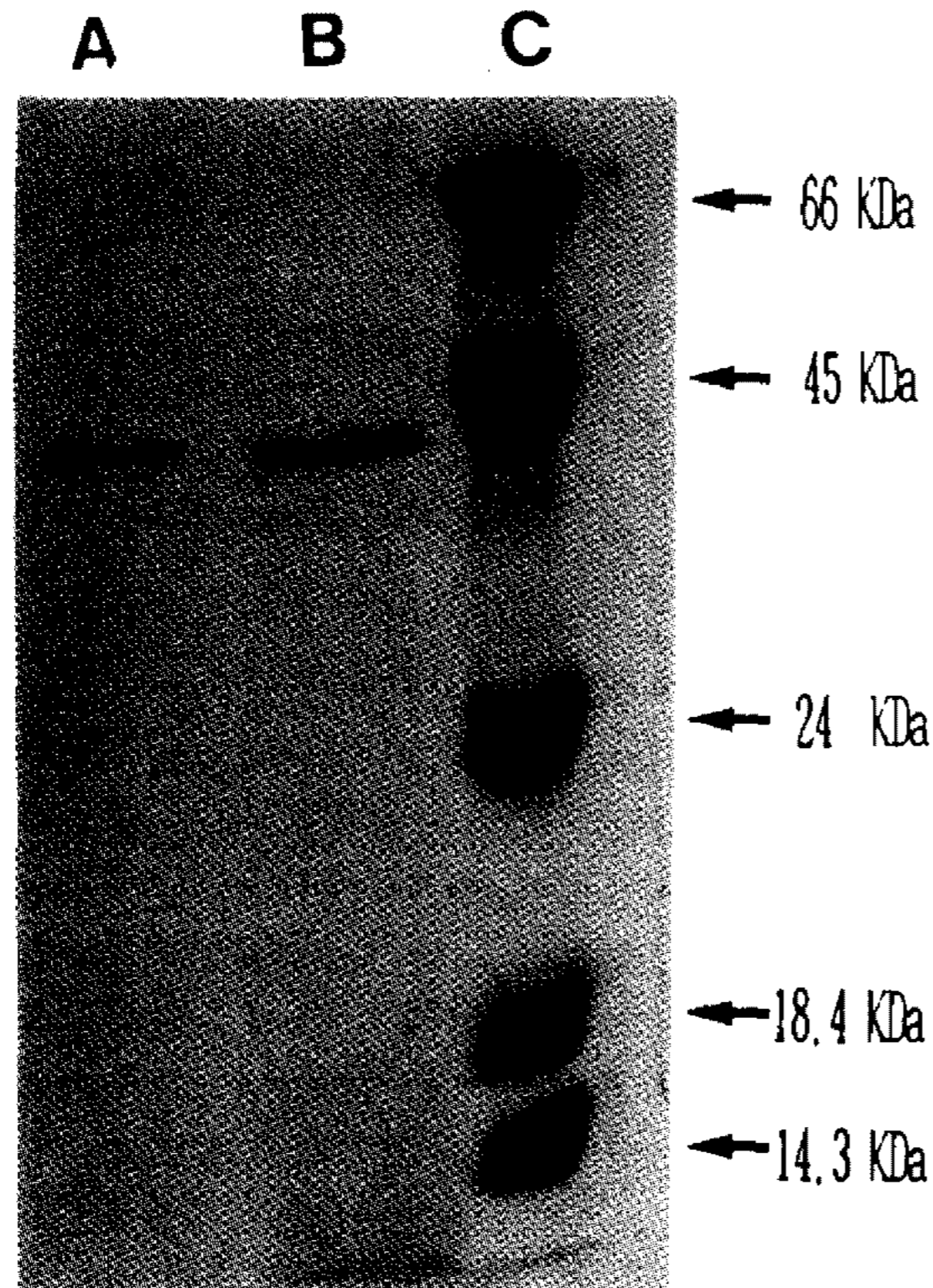


Fig. 4. SDS-PAGE of *Lactobacillus plantarum* lytic enzyme. A, after CM-Sephadex C-50 column chromatography; B, after affinity adsorption; C, molecular weight markers.

1.0이 되도록 현탁시킨 후, 효소액 100 μ l를 가해 40°C에서 30분간 반응시키면서 효소활성을 측정하였다. 그 결과 본 효소는 pH 4.0에서 최적 활성을 나타내었다 (Fig. 6, A). 효소의 pH 안정성을 검토하기 위하여 상기의 각 pH별 완충액에 효소용액을 가해 4°C에서 30시간 방치한 후 효소의 잔존활성을 측정하는 결과, Fig. 6, B에 나타난 바와 같이 pH 3.0~9.0 범위에서 안정하였다. 효소의 이러한 성질은 실제 김치로의 적용에 있어서 유용한 성질이라고 할 수 있다.

효소활성의 최적온도 및 안정성

효소활성의 최적온도를 알아보기 위하여 15~80°C 범위에서 효소활성을 측정하였으며, 효소활성의 최적온도는 40°C였다(Fig. 7, A). 효소의 열 안정성을 조사하기 위하여 각 온도별로 30분간 처리한 후 잔존활성을 측정하였다. 본 효소는 50°C까지는 안정성을 유지하였으나 60°C 이상에서는 급격한 활성의 감소를 나타내

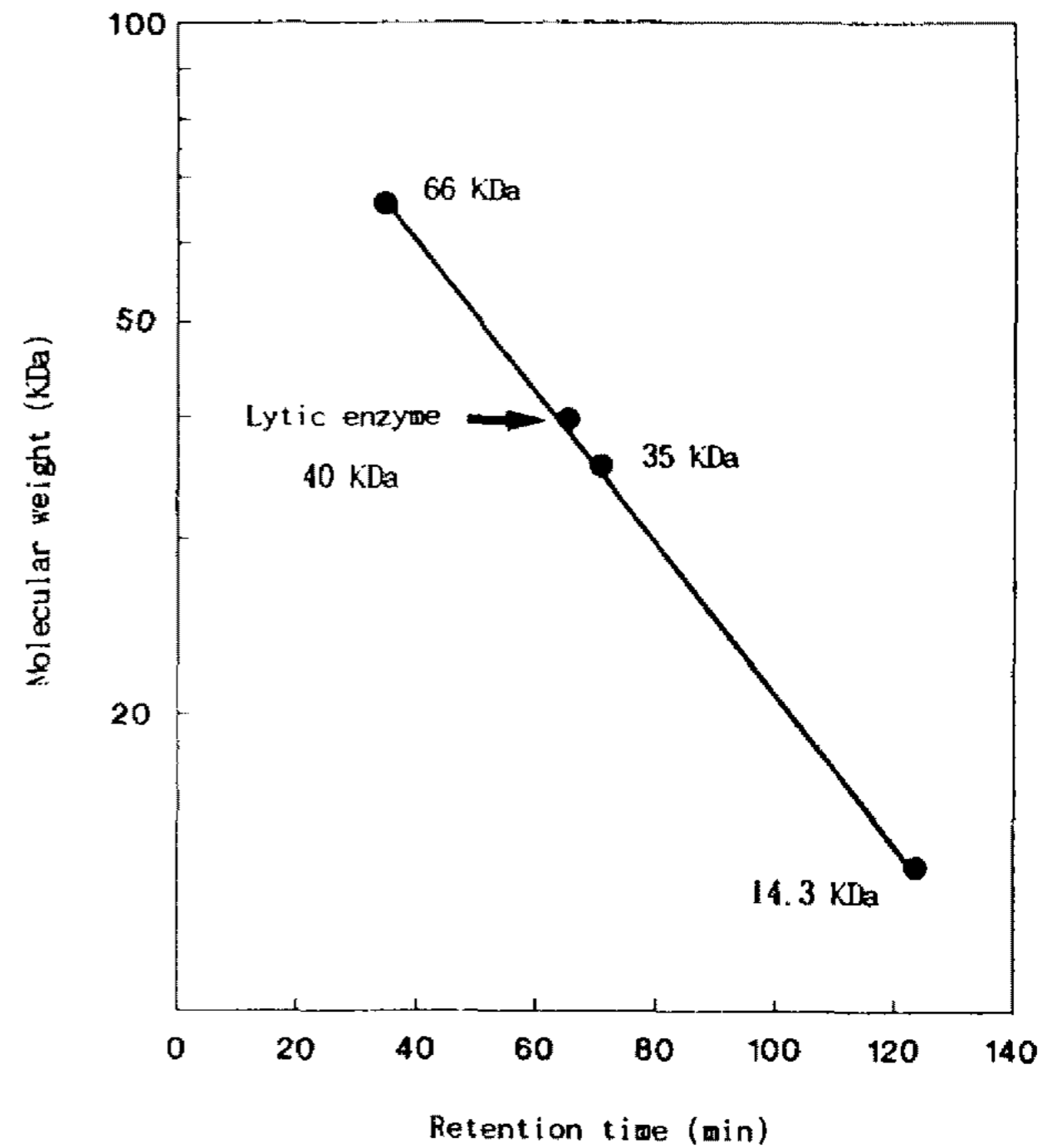


Fig. 5. Molecular weight determination of *Lactobacillus plantarum* lytic enzyme by gel filtration.

66 kDa, bovine serum albumin; 35 kDa, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; 14.3 kDa, lysozyme.

었다(Fig. 7, B).

효소의 작용기작

본 효소의 *Lactobacillus plantarum* 세포벽에 대한 용해부위를 검토하기 위하여 기질균체인 *Lactobacillus plantarum*의 peptidoglycan을 분리한 후 효소액과 반응시키면서 free amino group과 환원당을 정량하고 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Fig. 8에 나타난 것과 같이 효소반응이 진행되면서 550 nm에서의 흡광도의 감소와 더불어 free amino group이 약 20배 정도 증가한 반면, 환원당의 증가는 약 2배 정도로 미미하였다. 세포벽 용해효소가 작용한 세포벽 반응물을 분석하여 환원당이 반응전에 비하여 증가하면 glycosidic linkage를 절단하는 당 분해효소로, free amino group이 증가하면 세포벽 내의 peptide를 절단하는 단백질 분해효소로 간주한다. 본 효소는 효소반응이 진행됨에 따라 free amino group이 증가하는 것으로부터 peptidoglycan의 peptide linkage를 절단하는 endopepti-

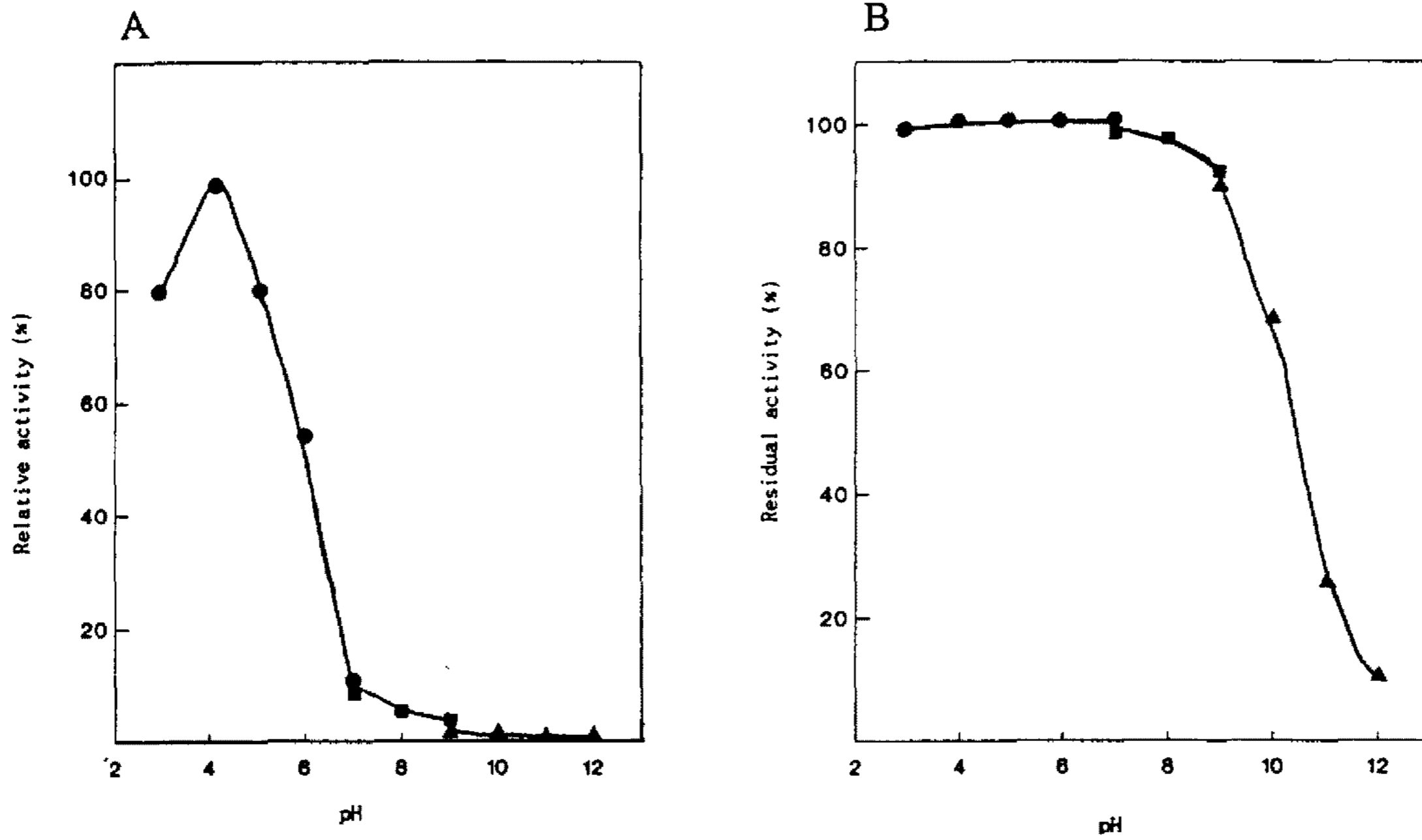


Fig. 6. Effect of pH on *Lactobacillus plantarum* lytic activity (A) and stability (B). ●, 50 mM sodium acetate-acetic acid buffer (pH 3.0~7.0); ■, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0~9.0); ▲, 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 9.0~12.0).

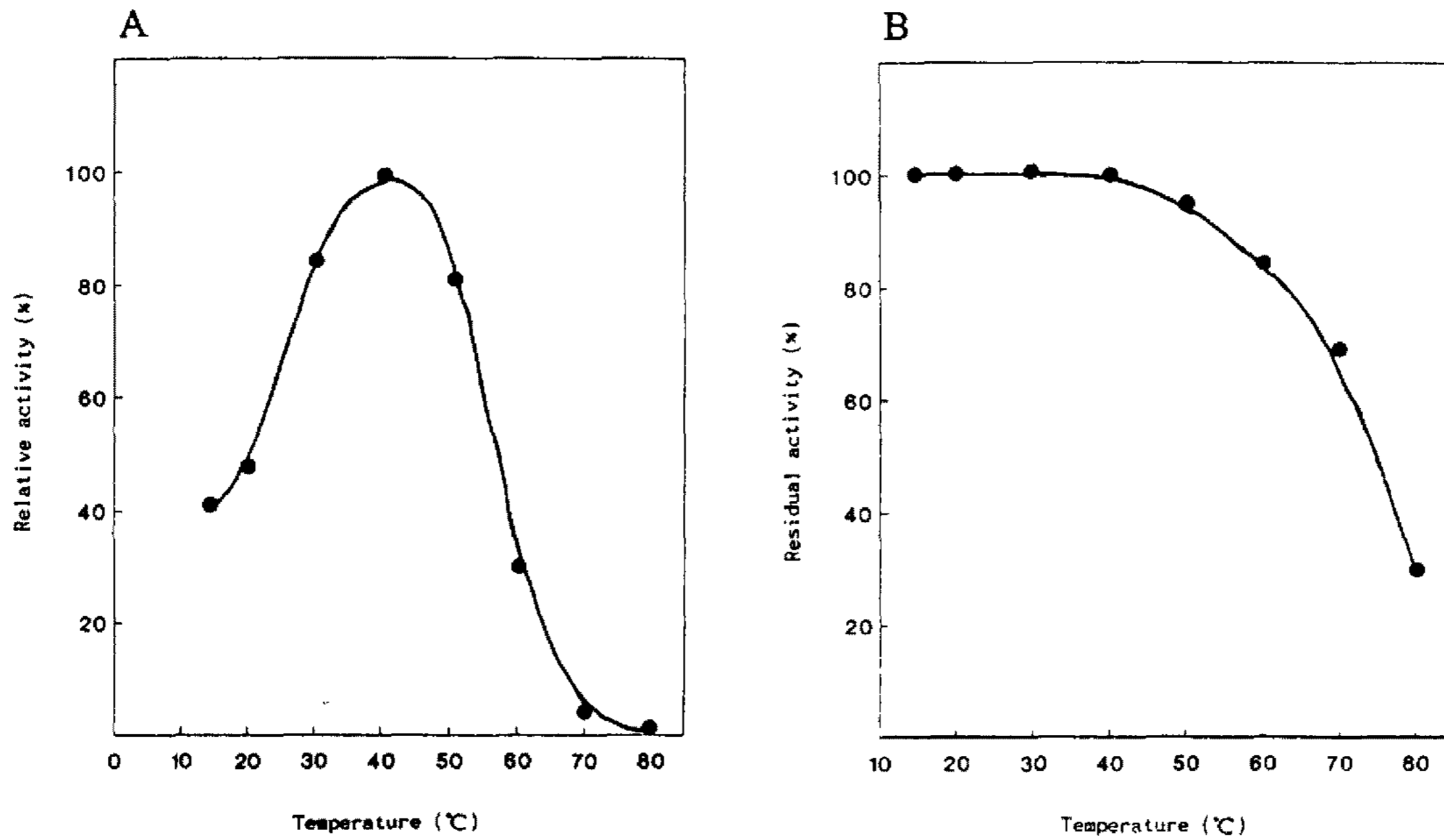


Fig. 7. Effect of temperature on *Lactobacillus plantarum* lytic activity (A) and stability (B).

dase임을 알 수 있었다. 미량의 환원당의 증가는 반응 조건이 pH 4.0이므로 산성조건에서의 당의 가수분해 결과로 추측된다.

효소의 작용 spectrum

본 효소의 용균 spectrum을 알아보기 위하여 각 균주들을 정지기까지 배양하여 균체를 분리하였다. 생리 식염수로 각 균체를 세척한 후 50 mM sodium acetate-acetic acid 완충액(pH 4.0)으로 550 nm에서의 흡광도가 1.0이 되도록 현탁한 다음, 효소액 100 μ l를 첨가하여

40°C에서 30분간 반응시켰다. *Lactobacillus plantarum*의 용균정도를 100%로 하여 각 균주의 용균정도를 나타낸 결과는 Table 2와 같다. 본 효소는 광범위한 spectrum을 나타내고 있지는 않았으나, 김치발효시 유용균인 *Leuconostoc mesenteroides*에 대해서는 용균활성이 거의 나타나지 않았다.

효소활성에 미치는 각종 금속이온, 화학수식제 및 환원제의 영향

효소활성에 대한 각종 금속이온, 화학수식제 및 환

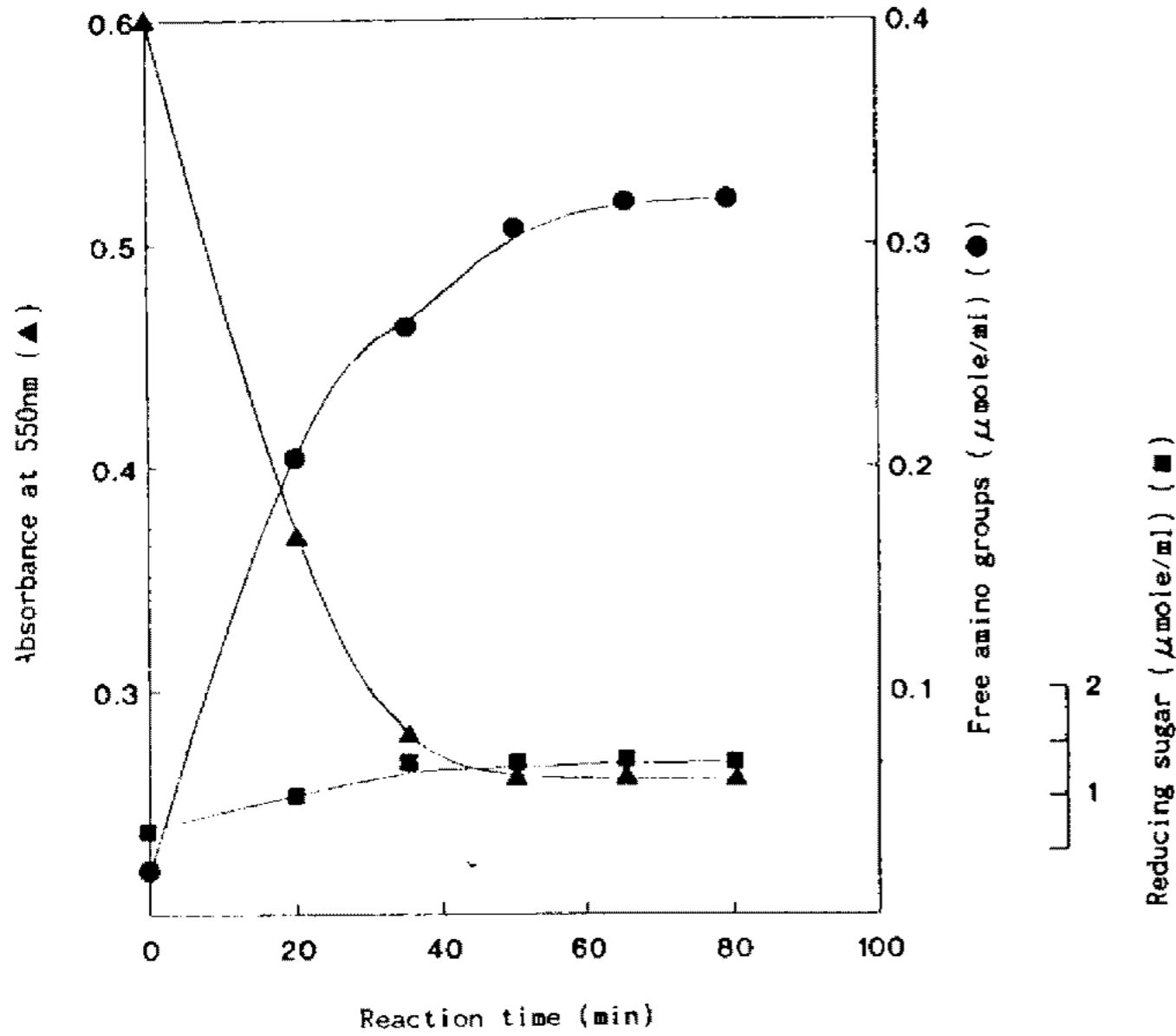


Fig. 8. Release of DNP-amino groups upon digestion of *Lactobacillus plantarum* peptidoglycan by the enzyme

Table 2. Lytic action spectra.

Strain	KCCM No.	Lysis (%)
1. Yeast		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11290	0
<i>Candida albicans</i>	11282	0
2. Bacteria		
1) Gram negative		
<i>Proteus vulgaris</i>	11906	0
<i>Proteus vulgaris</i>	11758	64
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11649	10
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	12208	0
<i>Escherichia coli</i>	11967	0
<i>Escherichia coli</i>	11587	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	11863	25
<i>Serratia marcescens</i>	21204	53
<i>Azotobacter vinelandii</i>	32407	42
2) Gram positive		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	11322	100
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	11324	17
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	12030	0
<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	11945	0
<i>Brevibacterium</i> sp.	11946	0
<i>Bacillus megaterium</i>	32320	11
<i>Bacillus polymyxa</i>	35411	86
<i>Staphylococcus aureus</i>	12256	0
<i>Streptococcus faecalis</i>	11814	0

원제의 영향을 알아보기 위하여 각각을 최종 농도가 5 mM이 되도록 효소액에 첨가하여 30°C에서 30분간 방치한 후 잔존활성을 측정하였다. 금속이온의 경우 Ag^+ , Fe^{2+} , Pb^{2+} 에 의해 저해를 받아 각각 0, 57, 67%의

Table 3. Effect of metals on lytic activity.

Metal (5 mM)	Relative activity (%)
None	100
$MgSO_4$	101
$AgNO_3$	0
$NaCl$	99
$CaCl_2$	101
$FeSO_4$	57
$MnSO_4$	108
$Pb(CH_3COO)_2 \cdot Pb(OH)_2$	67
$CuSO_4$	101
$CoCl_2$	107
KCl	101
$AlCl_3$	102

Table 4. Effect of chemical modifiers on lytic activity.

Chemical modifiers (5 mM)	Relative activity (%)
None	100
Iodoacetate	101
NEM ^a	99
pCMB ^b	94
DTNB ^c	96
H_2O_2	101
DEP ^d	103
Hydroxylamine	98
PMSF ^e	101
Phenylglyoxal	99
NBS ^f	0
I_2	100

^aNEM : N-ethylmaleimide.

^bpCMB : p-Chloromercuribenzoate.

^cDTNB : 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid).

^dDEP : Diethylpyrocarbonate.

^ePMSF : Phenylmethanesulfonyl fluoride.

^fNBS : N-Bromosuccinimide.

잔존활성을 나타내었다(Table 3). Ag^+ 은 단백질의 sulfhydryl group(-SH)에 작용하는 것으로 알려져 있으며 또한 단백질 자체를 cross linking시킴으로써 불활성화된 dimer를 형성시키는 것으로 알려져 있다. 화학수식제의 경우 대부분의 화학수식제는 효소활성에 영향을 미치지 못하였고, N-bromosuccinimide(NBS)에 의해서 효소활성이 완전히 저해되었다. 이것으로부터 본 효소의 활성화에는 tryptophan residue가 관여하는 것으로 확인되었다(Table 4). 각종 환원제에 의해서는 효소활성이 거의 저해되지 않았다 (Table 5).

효소의 아미노산 조성분석

효소의 아미노산 조성분석의 결과는 Table 6에 나타내었다. 본 효소는 aspartic acid, glutamic acid와 같은

Table 5. Effect of reducing reagents on lytic activity.

Reducing reagents (5 mM)	Relative activity (%)
None	100
β -Mercaptoethanol	98
Na-thiosulfate	102
Na-sulfate	100
Na-citrate	101
Cysteine	100
L-Ascorbic acid	96

Table 6. Amino acid composition of the lytic enzyme.

Amino acids	Composition	
	Mole percent (%)	Number of residue
Ala	12.4	40
Arg	3.1	10
Asx	11.0	36
Cys	N.D.*	N.D.*
Glx	5.9	19
Gly	11.7	38
His	2.2	7
Ile	3.1	10
Leu	4.6	15
Lys	0.6	2
Met	3.1	10
Phe	1.2	4
Pro	9.6	31
Ser	8.0	26
Thr	7.1	23
Trp	N.D.*	N.D.*
Tyr	10.2	33
Val	6.2	20
Total	100.0	324

*N.D. : Not determined.

산성 아미노산이 lysine, arginine, histidine과 같은 염기성 아미노산에 비해 함량이 높았으며, alanine, glycine, proline, tyrosine의 함량 또한 매우 높았다.

요 약

김치저장성을 향상시키기 위하여, *Lactobacillus plantarum* 용균효소 생산균주를 토양으로부터 분리한 후 그 효소를 정제하고 특성을 살펴보았다. 본 균주의 배양학적 및 형태학적 특성 등을 검토한 결과 *Metarrisium anisopliae*(Metschn.) Sorok으로 동정되었으며, 본 효소는 affinity adsorption, CM-Sephadex C-50 column chromatography를 통하여 40%의 수율과 75배의 정제도로 정제되었다. 효소활성의 최적 pH와 온도는 각각 4.0,

40°C였으며, pH 3.0~9.0, 60°C까지 효소의 안정성이 유지되었다. SDS-PAGE 및 gel filtration으로부터 본 효소의 분자량은 40,000 daltons인 monomeric protein임을 확인하였다. 본 효소는 *Lactobacillus plantarum* 세포벽 peptidoglycan의 peptide linkage를 절단하는 endopeptidase였으며, 용균 spectrum으로부터 김치발효시 유용균인 *Leuconostoc mesenteroides*에 대해서는 활성을 거의 나타내지 않음을 확인할 수 있었다. 본 효소의 활성은 Ag^+ , N-bromosuccinimide(NBS)에 의해서 완전히 저해되었으며, NBS에 의해서 활성이 저해된다는 사실로부터 본 효소는 활성에 tryptophan residue가 관여하는 것으로 확인되었다. 본 효소는 산성 아미노산의 함량이 염기성 아미노산의 함량에 비하여 높았으며, alanine, glycine, proline, tyrosine의 함량 또한 매우 높았다.

감사의 글

본 연구의 수행에 있어서 연구비를 지원해 주신 두산기술원과 군주동정을 해 주신 Mr. Toru Hasegawa, Mr. Tadayoshi Ito께 감사드립니다.

참고문헌

1. 유주현. 1989. 발효공학. 개문사.
2. 한홍희. 1991. 김치의 유산균 생태. 미생물과 산업. 17: 68-75.
3. 김옥성, 유주현. 1991. 호알칼리성 *Bacillus* sp.가 생산하는 용균효소에 의한 *E. coli* 세포벽 용해에 관한 연구. 연세대학교 대학원 석사학위 논문.
4. Jung, M.H., I.S. Kong, D.H. Bai and J.H. Yu. 1991. Purification and characterization of bacteriolytic enzyme from alkalophilic *Bacillus* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* 1: 102-110.
5. Jung, M.H., H.K. Park, D.H. Bai and J.H. Yu. 1992. Cloning and expression in *Escherichia coli* of bacteriolytic enzyme gene from alkalophilic *Bacillus* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2: 161-165.
6. Jung, M.H., S.H. Ohk, D.Y. Yum, I.S. Kong, D.H. Bai and J.H. Yu. 1993. Nucleotide sequence of a bacteriolytic enzyme gene from alkalophilic *Bacillus* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* 3: 73-77.
7. 옥승호, 유주현. 1993. Alkalophilic *Bacillus* sp. YJ-451이 생산하는 새로운 bacteriolytic enzyme에 의한 식품보존. 연세대학교 대학원 석사학위 논문.
8. 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.
9. Kanatani, K., H. Miura, M. Sakamoto and M. Oshimura. 1989. Protoplast formation and regeneration of *Lactobacillus plantarum*. *Agric. Biol. Chem.* 53: 1185-1187.
10. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat.*

- ture* **227**: 680-685.
11. Watanabe, H. and T. Sato. 1981. Properties and lytic action of the P2-2 enzyme capable of lysing cells of *Micrococcus radiodurans*. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 1215-1221.
 12. Ghuysen, J.M., D.J. Tipper and J.L. Strominger. 1966. Enzymes that degrade bacterial cell walls. *Methods in Enzymol.* **53**: 685-699.
 13. Summer, J.B. and G.F. Somers. 1949. Carbohydrates in laboratory experiments in biological chemistry, Academic Press, New York.
 14. Domsch *et al.* 1980. Compendium of soil fungi. pp. 413-415. Academic press. London.
 15. Grant, W.D., L.L. Rhodes, B.A. Prosser and R.A. Asher. 1986. Production of bacteriolytic enzymes and degradation of bacteria by filamentous fungi. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 2353-2358.

(Received 7 October, 1996)