

# 구강점막 표면 잔존타액 및 Hydroxyapatite 표면 Lysozyme 활성화에 관한 연구

서울대학교 치과대학 구강내과 · 진단학 교실, 경희대학교 치과대학 구강내과학 교실\*

고홍섭 · 이선경 · 홍정표\*

## I. 서 론

구강건조증의 발현과 비자극성 전타액 분비율 감소와의 상관 관계는 잘 알려져 있지만,<sup>1)</sup> 구강건조감의 심각도와 타액분비율의 감소 정도 사이에 뚜렷한 비례 관계를 보이지 않으며,<sup>2,4)</sup> 구강건조감의 발현은 점막표면의 불충분한 wetting과 더욱 밀접한 관련성이 있는 것으로 인식되고 있다.<sup>5,6)</sup> 잔존타액은 연하작용 후 구강점막 표면에 잔존하는 타액을 일컫는 것으로 잔존타액은 구강점막 표면에 습윤막을 형성하고, 점막 방어막으로 작용하며, 유효작용에 관계하고, 그 주요 구성 성분인 타액단백질은 미생물의 구강점막 표면에서의 집락에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.<sup>7-9)</sup>

잔존타액의 중요 성분이 타액단백질이라는 사실을 고려해 볼 때, 점막 습윤도와 점막표면 잔존타액의 단백질 농도와의 상관 관계를 추정해 볼 수 있으며, 정상인을 대상으로 한 연구에서 양쪽 사이에 역의 상관 관계가 있음을 보고한 바 있다.<sup>10)</sup> 또, 정상인과 구강건조증 환자를 대상으로 한 비교 연구에서, 구강건조증 환자가 낮은 점막습윤도를 보이는 반면 높은 단백질 농도를 보이고, 그 정도가 전타액 분비율의 감소가 심할수록 더욱 뚜렷하였다는 사실을 볼 때, 단백질 농도의 증가는 잔존타액량의 감소와 관련이 있다는 사실을 보고하였다.<sup>11)</sup> 이와 같이 잔존타액은 전타액 분비율의 감소에 따라 어느 정도의 감소를 보이지만, 잔

존타액에 존재하는 단백질의 수분 저장소로서의 역할은 점막표면이 완전히 건조해지는 것을 방지하는 역할을 할 것으로 추측된다. 하지만 잔존타액의 생물학적 기능에 관한 연구는 미미하고, 그 기능에 중요한 역할을 담당하는 단백질의 구성에 관한 연구는 전무한 실정이다. 이는 타액의 구성이 개인차가 크고, 타액단백질이 다기능성이며 여유 기능을 보유하고 있어 특정 물질의 일부 증가나 감소가 임상적으로 뚜렷한 의미를 가지지 못할 수도 있다는 한계 때문이기도 하지만,<sup>12)</sup> 실험을 위한 충분한 검체 채취의 어려움도 이유가 될 수 있을 것이다.

구강점막 표면과 함께 구강에 존재하는 또 다른 표면인 치아표면도 항상 타액단백질로 구성된 법랑질 피막 (enamel pellicle) 으로 덮여있다. 법랑질 피막은 잔존타액이 구강점막에 제공하는 여러 기능을 치아 표면에 제공할 뿐만 아니라, 치아표면의 재석회화 과정에도 중요한 역할을 한다.<sup>13)</sup> 법랑질 피막의 주요 성분 중 타액에서 유래된 효소로는  $\alpha$ -amylase,<sup>14,15)</sup> lysozyme,<sup>14)</sup> salivary peroxidase<sup>16)</sup>가 있으며, 이들 효소는 치아 표면에서도 활성을 유지하는 것으로 알려져 있다. 치아표면과 같은 고체면 (solid surface) 에서 단백질의 구조적 변화 (conformational change) 는 잘 알려져 있으며,<sup>17)</sup> 이는 단백질의 기능에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 고체표면에서 타액단백질의 구조적 변화나 이에 따르는 기능의 변화에 대해서는 proline-rich proteins (PRPs),<sup>18,19)</sup>  $\alpha$ -amylase,<sup>15)</sup>

\*본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (00-PJ1-PG1-CH10-0002).

statherin<sup>20)</sup>의 경우에 보고된 바 있으며, 타액에 존재하는 주요 비면역글로블린 항균물질에 대해서는 정보가 부족하다.

인체 타액에 존재하는 여러 단백질 중 lysozyme은 타액뿐만 아니라 눈물, 호흡기 및 생식기 분비액 등 다양한 생물학적 분비액에 존재하는 비면역글로블린 항균물질이다.<sup>21)</sup> Lysozyme의 항균기능은 효소로서의 활성 (muramidase activity) 뿐만 아니라 cationic한 성질 및 삼차원적인 구조에 의존하는 것으로 알려져 있다.<sup>22, 23)</sup> 이와 같이 lysozyme은 기능적으로 중요한 반면, lysozyme의 효소활성을 분석하기는 비교적 간단하여, 잔존타액의 조성 및 치아표면에서 기능에 관한 연구의 시작점으로서 좋은 대상으로 생각되어진다.

본 연구의 목적은 잔존타액내 lysozyme의 활성을 전타액이나 개별타액선 타액과 비교하고, hydroxyapatite (HA) 표면에서의 lysozyme의 활성을 조사하는데 있다.

## II. 연구재료 및 연구방법

### 1. 전타액 및 개별타액선 타액의 채취

연구대상은 37세의 건강한 성인 남자를 대상으로 하였다. 모든 타액검체의 채취는 오전 9시에서 11시 사이에 시행하였고, 연구대상으로 하여금 채취 최소 2시간 전부터 음식물 섭취 및 양치질을 금하게 하였다. 전타액은 비자극시(안정시)와 자극시에 모두 채취하였다. 비자극시는 spitting 법<sup>24)</sup>에 의해 약 10분간 채취하였으며, 자극시는 약 1 g의 gum base를 자극원으로 하여 약 10 분간 채취하였다. 개별타액선 타액은 이하선, 악하선-설하선 모두 자극상태에서 채취하였다. 이하선 타액은 Stensen 도관 출구에 Lashley cup을 부착하여 채취하였고, 악하선-설하선 혼합타액은 Block and Brottman<sup>25)</sup>에 의해 기술된 바와 같이 고무 인상재를 이용하여 만든 채취기를 이용하여 채취하였다. 이때 자극원으로는 혀의 측면에 30초 간격으로 2% citric acid를 면봉을 사용하여 도포하였다. 자극시 분비되는 타액검체 채취의 경우 자극시작 후 최초 2분 동안 분비되는 타액은 버리고, 이후 약 10분동안 채취하였다. 타액채취 동안 시간을 측정하여 분비율 (ml/min)을 계산하였다. 모든 타액은 차게한 15 mL 멸균튜브를 이용하여 채취하였고, PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride)와 sodium azide를 최종 농도

가 각각 1.0 mM과 0.02%가 되게 추가한 다음, 3,500 xg로 10 분 동안 4°C에서 원심분리후 상층액을 총단백질량 측정과 lysozyme 활성 실험에 이용하였다.

### 2. 잔존타액의 채취

잔존타액은 비자극성 전타액 채취후, 자극성 전타액 채취전에 채취하였다. 입안을 증류수로 헹구고 5 분동안 안정 상태로 있는 다음, 힘을 주어 입안의 타액을 연하하게 하였다. 이후 소독한 금속 spatula를 이용하여 양쪽 협점막을, 한쪽에 3 - 4회씩 수평으로 약한 힘을 사용하여 넓게 훑어가면서 채취하였다. 채취한 잔존타액을 4°C에서 원심분리하여 상층액을 취하고 이를 부착완충액 (adsorption buffer: 50 mM KCl, 1.0 mM KPO<sub>4</sub>, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, pH 6.5)<sup>26)</sup>에 10배로 희석하여 실험에 이용하였다.

### 3. Hydroxyapatite (HA) 표면에서 lysozyme 활성

HA 표면에서의 실험에서는 hen egg-white lysozyme (HEWL, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 과 비자극성 전타액을 lysozyme의 제공원으로 이용하였다. 이때 HEWL은 부착완충액으로 1.0 mg/mL로 만든 용액을 사용하였으며, 10 mg의 HA beads (Macro-prep, HA type I, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)와 300  $\mu$ L의 전타액이나 500  $\mu$ L의 HEWL 용액을 37°C에서 30분 동안 incubation시켜 단백질을 부착시킨 다음, 상층액을 새로운 tube에 옮기고, HA beads는 부착완충액으로 3회 세척하고, 100  $\mu$ L부착완충액으로 resuspend 시킨 다음 lysozyme 활성과 총단백질량을 측정하였다.

### 4. 총단백질량의 측정

총단백질량은 검체를 acid hydrolysis 시킨 후 ninhydrin 법<sup>27)</sup>을 이용하여 측정하였다. 이때 표준용액으로는 glycine 용액을 사용하였다. 검체마다 2회 측정후 평균값을 취하였으며 이를 3회 반복하였다.

### 5. Lysozyme 활성 측정

Lysozyme 활성은 *Micrococcus lysodeikticus*의 혼탁도 변화를 이용하여 측정하였다.<sup>28)</sup> 각종 타액 검

체를 부착완충액과 같은 비율로 희석한 용액 100  $\mu$ L 를 OD<sub>450nm</sub> = 0.65 - 0.70으로 맞춘 *M. lysodeikticus* substrate (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액에 첨가한 후 검체내에 존재하는 lysozyme이 substrate를 degradation 함에 따라 혼탁도가 감소되는 정도를 10분동안 측정하였고, 그 활성을 다음 수식에 의해 구하였다. 잔존타액의 경우에는 부착완충액에 10배 희석한 용액을 검체로 이용하였다. 이때 blank로는 타액검체 대신에 부착완충액 100  $\mu$ L를 사용하였다. HA beads 검체의 경우에는 타액이나 HEWL 대신 부착완충액만을 부착시킨 HA beads를 blank로 이용하였다. 검체마다 2회 측정한 후 평균값을 취하였으며, 이를 3회 반복하였다. Lysozyme 활성은 총단백질량 그리고 타액분비율을 기준으로 각각 환산하였다.

Units/mL Lysozyme activity =

$$\frac{(\Delta A_{450nm}/min \text{ Test} - \Delta A_{450nm}/min \text{ Blank}) (df)}{(0.001) (0.1)}$$

df: dilution factor

### 5. 단백질 전기영동

전기영동은 일반적으로 널리 시행되는 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis) 법<sup>29)</sup>을 Hoefer SE 280 Tall Mighty

**Table 1.** The secretion rates of saliva samples and collection volume of residual saliva

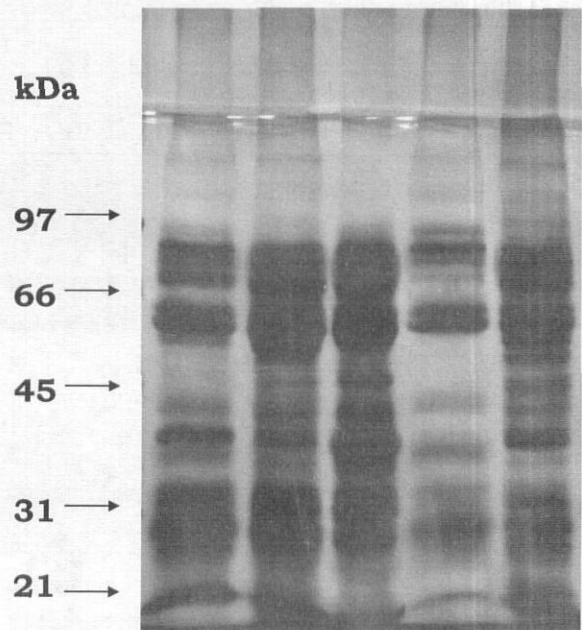
N = 3	Flow rate (mL/min)
Unstimulated whole saliva	0.80 ± 0.07
Stimulated whole saliva	1.62 ± 0.14
N = 3	Flow rate (mL/min/gland)
Stimulated parotid saliva	0.25 ± 0.02
Stimulated submandibular-sublingual saliva	0.68 ± 0.05
N = 3	Collection volume ( $\mu$ L)
Residual saliva	28.3 ± 2.9

Small Electrophoresis unit(Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA)를 이용하여 시행하였다. 10% gel이 사용되었으며, molecular weight marker로 low- molecular-weight protein standard (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 사용하였다. 전기영동후 gel을 silver 염색시켰다.

### III. 연구성적

Table 1은 3회에 걸쳐 측정한 타액분비율을 나타낸 표이다. 모든 타액분비율은 정상분비율 범위였고, 연구내용 및 방법에서 기술한 방법으로 잔존타액을 약 30  $\mu$ L 정도 채취할 수 있었다.

Table 2는 타액 mL 당 존재하는 lysozyme 활성과 총단백질량을 나타낸 것이다. Lysozyme 활성은 잔존타액, 비자극성 전타액, 자극성 약하선-설하선 타액, 자극성 이하선 타액, 자극성 전타액 순이었다. 총단백



**Fig. 1.** 10% SDS-PAGE of saliva samples (each 30  $\mu$ g). Lane 1. Unstimulated whole saliva; Lane 2. Stimulated whole saliva; Lane 3. Stimulated parotid saliva; Lane 4. Stimulated submandibular-sublingual saliva; Lane 5. Residual saliva. The protein profile of residual saliva differed from other kinds of saliva samples. The gel was silver-stained.



Table 2. The lysozyme activity (per volume of saliva) of human saliva

N = 3	Unstimulated whole saliva	Stimulated whole saliva	Stimulated parotid saliva	Stimulated submandibular-sublingual saliva	Residual saliva
Lysozyme activity (units/mL)	770.1 ± 71.4	462.3 ± 61.9	640.1 ± 52.1	702.9 ± 2.7	810.0 ± 304.4
Protein concentration (μg/mL)	695.3 ± 19.7	1137.7 ± 258.1	2551.2 ± 536.7	676.1 ± 36.5	2058.2 ± 137.2
Ratio (units/μg)	1.16 ± 0.24	0.42 ± 0.08	0.26 ± 0.04	1.07 ± 0.22	0.39 ± 1.15

Table 3. The lysozyme activity (per secretion time) of human saliva

N = 3	Unstimulated whole saliva	Stimulated whole saliva	Stimulated parotid saliva	Stimulated submandibular-sublingual saliva	
Lysozyme activity (units/min)	614.0 ± 95.6	752.3 ± 144.9	Lysozyme activity (units/min/gland)	162.7 ± 22.2	478.0 ± 33.7
Protein amounts (μg/min)	552.1 ± 172.9	1837.1 ± 426.7	Protein amounts (μg/min)	653.1 ± 181.4	462.8 ± 113.8
Ratio (units/μg)	1.16 ± 0.24	0.42 ± 0.08	Ratio (units/μg)	0.26 ± 0.04	1.07 ± 0.22

질량은 자극성 이하선 타액, 잔존타액, 자극성 전타액, 비자극성 전타액, 자극성 악하선-설하선 타액 순이었다. 총단백질당 존재하는 lysozyme 활성은 비자극성 전타액, 자극성 악하선-설하선 타액, 자극성 전타액, 잔존타액, 자극성 이하선 타액 순이었으며, 비자극성 전타액이 자극성 전타액 보다, 자극성 악하선-설하선 타액이 자극성 이하선 타액보다 뚜렷히 높은 수치를 보였다.

하지만 분당 분비되는 타액을 기준으로 하여 보면 (Table 3), 자극성 악하선-설하선 타액의 lysozyme 활성은 자극성 이하선 타액에 비해 뚜렷히 높은 수치를 보였으며, 자극성 전타액이 비자극성 전타액에 비해 높은 lysozyme 활성을 보였다.

SDS-PAGE에서 잔존타액의 band pattern은 자극성 전타액과 유사하게 보이지만, stacking gel 부분과 94 kDa 이상의 고분자량 부분의 뚜렷한 증가 양상을 볼 수 있으며, 45 kDa 근처의 band 양상도 다른 타액 검체와 차이점을 보였다 (Fig. 1).

같은 양의 HA beads에 부착하는 타액단백질량에

비해 HEWL은 매우 적은 양만 부착하였으며, 이러한 양상은 oversaturation 농도에서도 유사하였다. 그리고 용액상태에서의 lysozyme 활성에 비해 고체표면에서의 lysozyme 활성은 뚜렷히 감소되는 양상을 보였다 (Table 4).

#### IV. 총괄 및 고찰

구강건조증의 발현에 전타액량의 감소와 함께 소타액선 분비타액이나 잔존타액의 중요성은 이미 알려져 있으며,<sup>5,6)</sup> 타액조성의 변화도 일부분의 역할을 할 것으로 추측된다.<sup>1)</sup> 특히 소타액선 분비타액이나 잔존타액은 채취의 어려움 때문에 활발한 연구가 힘들었으나, 최근 Periotron의 도움으로 이에 대한 신뢰도 있는 연구 결과가 보고되고 있다.<sup>5,10,11,30,31)</sup> 본 연구 결과에서 협점막 잔존타액의 단백질 농도는 약 2.0 mg/mL으로 Sialopaper를 이용하여 채취한 후 elution하는 방법을 사용했던 이전 연구<sup>10,11)</sup>에 비해 현저하게 낮은 수치를 보여주었지만, 여전히 비자극

**Table 4.** Human salivary and egg-white lysozyme activity on HA beads

Unstimulated whole saliva (N =3)	Clarified whole saliva	Hydroxyapatite
Lysozyme activity (units)	186.6 ± 25.2	2.3 ± 1.5
Total protein amount (μg)	214.4 ± 9.6	55.2 ± 26.0
Ratio (units / μg)	0.87 ± 0.09	0.04 ± 0.03
Hen egg-white lysozyme (N = 3)	Lysozyme solution	Hydroxyapatite
Lysozyme activity (units)	20570 ± 4000	3.6 ± 1.1
Total protein amount (μg)	486.7 ± 85.7	1.7 ± 0.6
Ratio (units / μg)	42.5 ± 5.4	2.2 ± 0.6

성이나 자극성 전타액 단백질 농도에 비해 뚜렷히 높은 수치를 보여주었다. 이는 채취 방법에 따른 차이가 가장 큰 요인일 것으로 생각되지만 분석 방법에 따른 차이도 어느 정도 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 그리고 잔존타액내 존재하는 lysozyme 활성도 상당히 높은 수치를 보여주어 점막표면에 잔존하는 타액에 높은 농도의 항균물질 존재 가능성을 암시해 주었다. 그러므로 점막을 보호하는 잔존타액의 기능을 이해하기 위해 잔존타액내에 존재하는 다른 항균성 단백질에 대한 정보가 필요할 뿐만 아니라, 잔존타액내 존재하는 단백질이 미생물의 부착을 위한 수용기나 국소약물전달의 표적물질로 이용될 수 있다는 점을 고려해 볼 때 여러 비항균성 단백질에 대한 추가적인 정보도 중요할 것이다.

특히 전기영동 결과에서 암시하는 바와 같이 큰 분자량을 가진 mucin과 같은 물질이 잔존타액내에 많이 존재할 가능성은 이들 물질과 복합체를 형성할 수 있는 것으로 알려진 lysozyme, cystatins, IgA, α-amylase, PRPs, statherin, histatins, lactoferrin 등과 같은 물질<sup>32,33)</sup>이 점막표면에 고농도로 존재할 가능성을 암시해 주는 것으로 이에 대한 정확한 정보는 구강점막표면에서의 방어 및 면역 기전을 이해하는

데 필수적이다.

Lysozyme 활성은 자극성 전타액에 비해 비자극성 전타액에서, 이하선 타액에 비해 악하선-설하선 타액에서 높게 나타났으며 이는 이전의 보고들과 유사하였다.<sup>34)</sup> 특히 분비율을 기준으로 하여 볼 때 자극시에는 악하선-설하선 타액이 주로 lysozyme을 구강조직에 공급하여 주고 있었으며, 총단백질당 lysozyme 활성이 이하선 타액에 비해 뚜렷히 높은 수치를 보여 주어 구강조직의 부위에 따른 lysozyme 활성 차이도 있을 것으로 추정되었다.

Lysozyme은 HA 표면에 낮은 친화도를 보였고, HA 표면에서의 lysozyme 활성은 용액상태에서의 활성과 비교해 볼 때 상당히 감소된 양상을 보였다. 전타액과 HEWL에서 같은 양상을 보였으며, 이는 lysozyme의 conformation이 고체 표면에서 변화하여 기능의 감소를 가져오는 것으로 설명될 수 있을 것이다.

## V. 결 론

잔존타액은 전타액 비해 상대적으로 높은 총단백질 농도와 lysozyme 활성을 보였으며, 이는 점막표면의 수분유지와 방어에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 또, lysozyme은 hydroxyapatite 표면에서 활성의 감소를 보였다. 본 연구는 잔존타액 조성에 대한 최초의 보고로서, 향후 잔존타액내에 존재하는 다양한 항균성, 비항균성 단백질의 조성에 대한 추가적인 연구가 필수적이다.

## 참 고 문 헌

1. Sreebny, L.M., Broich, G.: Xerostomia (Dry mouth). In: Sreebny, L.M. ed., The salivary system, CRC Press Inc., 1987, Boca Raton, pp. 179-202.
2. von Knorring, L., Mornstad, H.: Qualitative changes in saliva composition after short-term administration of imipramine and zimelidine in healthy volunteers. Scand J Dent Res 1981;89:313-320.
3. Spielman, A., Ben-Aryeh, H., Gutman, D., Szargel, R., Deutsch, E.: Xerostomia - diagnosis and treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1981;51:144-147.
4. Donatsky, O., Johnsen, T., Holmstrup, P., Bertram, U.: Effect of "Saliment" on parotid salivary gland secretion and on xerostomia caused by Sjögren's syndrome. Scand J Dent Res 1982;90:157-162.
5. DiSabato-Mordarski, T., Kleinberg, I.: Measurement

- and comparison of the residual saliva on various oral mucosal and dentition surfaces in humans. *Arch Oral Biol* 1996;41:655-665.
6. Wolff, M., Kleinberg, I.: Oral mucosal wetness in hypo- and normosalivators. *Arch Oral Biol* 1998;43:455-462.
  7. Gibbons, R.J., Qureshi, J.V.: Selective binding of blood group-reactive salivary mucins by *Streptococcus mutans* and other oral organisms. *Infect Immun* 1978;22:665-671.
  8. Tabak, L.A., Levine, M.J., Mandel, I.D., Ellison, S.A.: Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol* 1982;11:1-17.
  9. Hatton, M.N., Loomis, R.E., Levine, M.J., Tabak, L.A.: Masticatory lubrication. The role of carbohydrate in the lubricating property of a salivary glycoprotein-albumin complex. *Biochem J* 1985;230:817-820.
  10. Won, S., Kho, H., Kim, Y., Chung, S., Lee, S.: Analysis of residual saliva and minor salivary gland secretions. *Arch Oral Biol* 2001;46:619-624.
  11. Lee, S.K., Lee, S.W., Chung, S.C., Kim, Y.K., Kho, H.S.: Analysis of residual saliva and minor salivary gland secretions in patients with dry mouth. *Arch Oral Biol* 2002;47:637-641.
  12. Levine, M.J.: Development of artificial salivas. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:279-286.
  13. Scannapieco, F.A.: Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med* 1994;5:203-248.
  14. Rölla, G., Ciardi, J.E., Bowen, W.H.: Identification of IgA, IgG, lysozyme, albumin,  $\alpha$ -amylase and glucosyltransferase in the protein layer adsorbed to hydroxyapatite from whole saliva. *Scand J Dent Res* 1983;91:186-190.
  15. Vacca-Smith, A.M., Venkitaraman, A.R., Quivey, R.G., Bowen, W.H.: Interactions of streptococcal glucosyltransferases with  $\alpha$ -amylase and starch on the surface of saliva-coated hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 1996a;41:291-298.
  16. Tenovuo, J., Kurkijärvi, K.: Immobilized lactoperoxidase as a biologically active and stable form of an antimicrobial enzyme. *Arch Oral Biol* 1981;26:309-314.
  17. Sandwick, T.K., Schray, K.J.: Conformational states of enzymes bound to surfaces. *J Coll Interface Sci* 1988;121:1-12.
  18. Gibbons, R.J., Hay, D.I.: Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatitic surfaces. *Infect Immun* 1988;56:439-445.
  19. Gibbons, R.J., Hay, D.I., Schlesinger, D.H.: Delineation of a segment of absorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of *Streptococcus gordonii* to apatite surfaces. *Infect Immun* 1991;59:2948-2954.
  20. Stayton, P.S., Drobny, G.P., Shaw, W.J., Long, J.R., Gilbert, M.: Molecular recognition at the protein-hydroxyapatite interface. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:370-376.
  21. Jolles, P., Jolles, J.: What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol Cell Biochem* 1984;63:165-189.
  22. Laible, N.J., Germaine, G.R.: Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides. *Infect Immun* 1985;48:720-728.
  23. Ibrahim, H.R., Matsuzaki, T., Aoki, T.: Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS Letters* 2001;506:27-32.
  24. Birkhed, D., Heintze, U.: Salivary secretion rate, buffer capacity, and pH. In: Tenovuo, J.O., ed. *Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology*. Vol I. CRC Press Inc., 1989, Boca Raton, pp. 25-73.
  25. Block, P.L., Brottman, S.: A method of submaxillary saliva collection without cannulization. *N Y State Dent J* 1962;28:116-118.
  26. Clark, W.B., Bammann, L.L., Gibbons, R.J.: Comparative estimates of bacterial affinities and adsorption sites on hydroxyapatite surfaces. *Infect Immun* 1978;19:846-853.
  27. Moore, S.: Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. *J Biol Chem* 1968;243:6281-6283.
  28. Grossowicz, N., Ariel, M.: Methods for determination of lysozyme activity. *Methods Biochem Anal* 1983;29:435-446.
  29. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
  30. Shern, R.J., Fox, P.C., Cain, J.L., Li, S.-H.: A method for measuring the flow of saliva from the minor salivary glands. *J Dent Res* 1990;69:1146-1149.
  31. Shern, R.J., Guckes, A.D., Li, S.-H.: A method for measuring secretions from the palatal minor salivary glands. *J Prosthet Dent* 1993;69:624-629.
  32. Iontcheva, I., Oppenheim, F.G., Troxler, R.F.: Human

- salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins. *J Dent Res* 1997;76:734-743.
33. Soares, R.V., Siqueira, C.C., Bruno, L.S., Oppenheim, F.G., Offner, G.D., Troxler, R.F.: MG2 and lactoferrin form a heterotypic complex in salivary secretions. *J Dent Res* 2003;82:471-475.
34. Tenovuo, J.: Nonimmunoglobulin defense factors in human saliva. In: Tenovuo, J.O., ed. *Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology*. Vol II. CRC Press Inc., 1989, Boca Raton, pp. 55-91.

---

**Corresponding author:** Hong-Seop Kho, *Assistant Professor, Department of Oral Medicine & Oral Diagnosis, College of Dentistry, Seoul National University, 28 Yonkeun-Dong, Chongro-Ku, Seoul 110-749, Korea*

- ABSTRACT -

## A Study on Lysozyme Activity of Residual Saliva and on the Surface of Hydroxyapatite beads

Hong-Seop Kho, D.D.S., M.S.D., Ph.D., Sun-Kyung Lee, D.D.S., M.S.D., Ph.D.,  
Jung-Pyo Hong, D.M.D., M.S.D., Ph.D.

*Dept. of Oral Medicine & Oral Diagnosis, College of Dentistry, Seoul National University*  
*Dept. of Oral Medicine, College of Dentistry, Kyung Hee University\**

The residual saliva has been known to be important for the maintenance of oral mucosal wetness. Salivary proteins of the oral mucosal film function as a moisture retainer and a protective barrier. Enamel pellicles, derived from saliva, play a significant role in the maintenance and microbial colonization of tooth surfaces. The purpose of this study was to report lysozyme activity of residual saliva and to compare its activity with those of other kinds of saliva, and to investigate the activity of adsorbed lysozyme on the surface of hydroxyapatite. The stimulated and unstimulated whole saliva, stimulated parotid and submandibular-sublingual saliva, and residual saliva on buccal mucosa were collected from a healthy subject. For the investigation of adsorbed lysozyme, hen egg-white lysozyme and unstimulated whole saliva were used as sources of lysozyme. The total protein concentration of all salivary samples was determined using the ninhydrin assay following acid hydrolysis. The lysozyme activity was determined by the turbidimetric method with *Micrococcus lysodeikticus*. The residual saliva showed higher protein concentration and higher lysozyme activity compared to whole saliva. The residual saliva has more high-molecular-weight proteins compared to other kinds of saliva. The lysozyme displayed decreased activity on the surface of hydroxyapatite. Future additional studies on the composition and activity of both antimicrobial and non-antimicrobial salivary proteins in residual saliva and enamel pellicle are essential.

---

**Keywords** : Residual saliva; Hydroxyapatite, Lysozyme