

## *Arthrobacter luteus*가 生産하는 酵母 細胞壁 溶解 促進因子的 精製 및 그 理化學的 性質

吳洪祿 · 相菌泰生\* · 下田忠久\* · 船津 勝\*\*

忠南大學校 畜産學科 · \*日本 九州大學 農藝化學科 · \*\*日本 熊本大學 應用微生物工學科  
(1983년 11월 11일 수리)

## Purification and Properties of the Factor from *Arthrobacter luteus*, Capable of Accelerating the Lysis of Yeast Cell Walls

Hong Rock Oh, Yasuo Aizono\*, Tadahisa Shimoda\* and Funatsu Masaru\*\*

Dept. of Animal science, Chungnam National University

\*Dept. of Agricultural Chemistry, Kyushu University, Fukuoka, Japan

\*\*Dept. of Applied Microbial Technology, The Kumamoto Institute of Technology,  
Kumamoto, Japan

(Received November 11, 1983)

### Abstract

The factor, which was capable of accelerating the yeast cell wall lysis of the zymolyase( $\beta$ -1, 3-glucanase), was purified to a homogeneous state from the protease fraction of the crude zymolyase by Sephadex G-75 gel filtration and preparative polyacrylamide gel disc electrophoresis.

The molecular weight of the purified factor was estimated to be 40,500 by SDS-polyacrylamide gel disc electrophoresis and its iso-electric point was pH 9.6.

The factor was found to be a basic protease consisted of single polypeptide chain with 395 amino acid residues and it showed the  $E_{280,cm}^{1\%}$  of 11.9 and the molecular extinction coefficient of  $4.83 \times 10^4$ , respectively.

### 序 論

著者 등은 현재 酵母 細胞壁 溶解酵素로 市販되고 있는 *Arthrobacter luteus* 由來의 zymolyase (endo- $\beta$ -1, 3-glucanase; EC 3.2.1.39)<sup>1,2)</sup>에 관한 일련의 연구 과정에서 zymolyase의 粗酵素 標品 中에 zymolyase의 *Saccharomyces sake'* 細胞壁에 대한 溶解活性을 촉진시키는 某種의 因子가 存在하고 있을 가능성에 착안, 前報<sup>3,4)</sup>의 實驗을 통하여 zymoly-

ase의 粗酵素로부터 溶解 促進因자를 檢索, 分離하고 동시에 促進因子가 protease 劃分(fraction)중에 存在함을 발견하였다.

따라서 本實驗에서는 溶解 促進因자의 精製를 究明하기 위하여 protease 劃分中의 促進因자를 分離, 精製함과 아울러 精製標品の 理化學的 性質을 調査, 그 結果를 報告한다.

## 材料 및 方法

### 1. 材 料

Zymolyase 粗酵素로서는 “Zymolyase-24,000”을, zymolyase의 部分 精製標品으로서는 前報<sup>4)</sup>에서 精製, 凍結乾燥된 L-c劃分(部分 精製된 lytic endo- $\beta$ -1,3-glucanase)을 사용하였다. 酵素의 基質로 使用된 *Sacch. sake* 細胞, casein 및 CM-pachyman 은 前報<sup>3,4)</sup>에 準하여 調製하였고, gel 濾過(filtration)에는 Pharmacia社製의 Sephadex G-75(medium)를 常法<sup>5)</sup>에 따라서 처리하여 사용하였다. 試料의 等電點 測定에는 LKB社製의 兩性擔體(carrier ampholyte)를, sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel disc 電氣泳動(SDS-PAGE)에 의한 分子量 측정에는 分子量 既知의 標識 蛋白質으로써 독일 Combithek社製의 cytochrome-c, lysozyme, chymotrypsinogen 및 albumin을, ricin과 그 subunit 그리고 hemoglobin( $\beta$ -chain)은 本研究室에서 調製한 것을 使用하였다.

### 2. 方 法

#### 1) 分析法

蛋白質의 濃度 測定은 波長 280nm에서의 紫外線 吸收法 및 Lowry 등<sup>6)</sup>의 方法에, 還元糖은 Imoto 등<sup>7)</sup>의 測定法에, 全糖은 페놀-황산법<sup>8)</sup>에 의하여 定量하였다. 아미노산의 組成은 日本電子 JLC-6AH型 아미노산 自動分析機를 使用, 常法<sup>9)</sup>에 따라서 試料를 酸加水分解하여 分析하였다.

#### 2) 酵素活性的 測定 및 單位 表示法

Protease 活性,  $\beta$ -1,3-glucanase 活性 및 酵母 細胞壁 溶解活性은 前報<sup>3,4)</sup>에 準하였다. 단, 調製用 PAG-電氣泳動의 各 劃分은 pH 4.3에서 溶出되기 때문에 反應系의 pH를 일정하게 유지하기 위하여 磷酸緩衝液(pH 7.5) 및 glycine 緩衝液(pH 10.5)의 濃度를 0.2M까지 올려서 測定하였다.

細胞壁 溶解 促進因子의 促進活性은 다음과 같은 方法에 의하였다. 즉, L-c 劃分과 同量(0.05~0.2 ml)의 試料를 還元劑 亞硫酸소오다( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )를 加하지 않은 反應液에 同時에 加하여 溶解活性을 測定<sup>3)</sup>, 다음 式에 의하여 溶解 促進 比活性을 산출하였다.

$$S.A = \frac{AB - (A+B)}{Amg}$$

S.A: 酵母 細胞壁 溶解 促進 比活性

A: 溶解 促進因子 劃分의 溶解活性

B: L-c 劃分의 溶解活性

AB: A와 B를 동시에 反應시킨 경우의 溶解活性

Amg: 溶解 促進因子 劃分의 蛋白質量;

그러나 溶解 促進因子의 檢索 또는 크로마토그래피에 있어서의 溶解 促進活性의 추적에는 濁度の 감소율이나  $\Delta O.D._{800nm}$ 로써 促進活性을 나타내었다.

#### 3) 電氣泳動 및 紫外吸收 스펙트럼

分析用 PAG-電氣泳動 및 SDS-PAG 電氣泳動은 常法<sup>10)</sup>에 따라서 施行하였다.

調製用 PAG-電氣泳動은 Hashimoto 등<sup>11)</sup>이 考案, 製作한 泳動裝置를 利用하였다. 泳動用 gel은 分析用 gel 調製法에 準하여 7.5%의 分離gel (1.3×3cm) 및 2.5%의 농축 gel (1.3×1.5cm)을 調製하였고, 0.06M KOH-酢酸 緩衝液(pH 4.3)을 陰極槽에 0.35 M  $\beta$ -alanine-酢酸 緩衝液(pH 4.5)을 陽極槽에 加하여 190V, 18mA의 電流로써 泳動을 實施하였다. 또한 定量 펌프로써 40ml/hr의 流速으로 溶出을 시행하면서 2.9ml 씩 分取하였다.

等電點 電氣泳動은 LKB 8100-1型, 110ml column을 使用, 5~50%의 sorbitol 濃度勾配를 만들었고, Ampholine carrier ampholyte(pH 6~11)의 濃度는 0.8% 이었다. 泳動은 column 상단을 陽極으로 하여서 4°C에서 45時間, 約 1.5watt를 유지하면서 施行되었고, 泳動 終了後 1.6ml 씩 分取하여 280nm에서의 吸光度 및 pH를 測定하였다.

精製된 試料의 紫外吸收 스펙트럼은 Hitachi 124型 自記分光光度計를 使用하여 測定되었다.

#### 4) 放射活性的 測定

試料의 放射活性은 Aloka LSC-602型의 液體 scintillation counter에 의하여 측정하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 溶解 促進因子의 精製

#### 1) Sephadex G-75에 의한 gel 濾過

前報<sup>4)</sup>의 Biogel CM-30 이은 크로마토그래피에 의해서 얻어진 protease劃分中에 존재하는 溶解 促進因子를 精製하기 위해서 먼저 Sephadex G-75 gel 濾過를 實施하였다. 0.01M 磷酸緩衝液(pH 6.0)으로 前處理한 Sephadex G-75 Column(3×52cm)

에 限外濾過法에 의해서 濃縮된 protease 劃分 4.3ml (蛋白質質量 88mg)를 供與하였다.

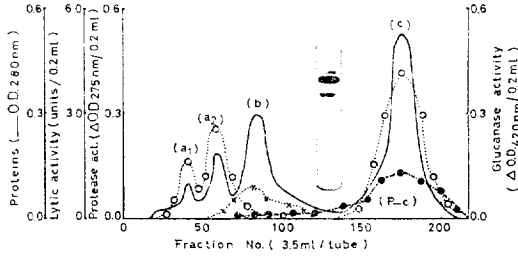


Fig. 1. Gel filtration of the protease fraction on Sephadex G-75

4.3ml of the protease fraction was applied to the column equilibrated with 0.01 M phosphate buffer, pH 6.0 and eluted with the same buffer.

\*, the pattern of polyacrylamide gel disc electrophoresis of the P-c fraction. —, proteins; -●---●-, lytic activity; ...○...○..., protease activity; ...×...×..., glucanase activity.

이어서 同一한 緩衝液으로 溶出(10ml/hr), 3.5ml 씩 分取하여 分析, 그 結果를 Fig.1에 나타낸 바와 같이 카제인에 대한 protease活性은 a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub> 및 c劃分에, CM-pachyman에 대한 β-1,3-glucanase 活性은 주로 b劃分에 나타났으나, 효모 세포벽 溶解活性은 c劃分에서만 認定되었다. 그 후 상기의 磷酸 緩衝液으로 調製한 0.2M 乳糖溶液(pH 6.0)으로 溶出을 계속하였으나 蛋白質 및 酵素의 活性은 發見되지 않았다. 이 gel 濾過에 있어서 유일하게 溶解活性을 보여준 c劃分은 column의 bed volume(Vt)의 약 2배량의 緩衝液을 흘린 부근으로부터 溶出되기 시작하였다. 한편 본 실험에 있어서 蛋白質의 회수율은 89%이었고, protease, β-1,3- glucanase 및 효모 세포벽 溶解活性의 회수율은 각각 98, 87 및 87% 이었다.

2) 溶出된 劃分の 溶解 促進活性의 測定

앞에서의 gel 濾過에 의하여 효모 세포벽 溶解 促進인자를 포함하는 protease 劃分은 4개의 劃分으로 分劃되었기 때문에 zymolyase의 部分精製標品인 L-c劃分을 사용하여 溶解 促進活性의 정도를 조사하였다.

脫이온수에 透析시킨 각 劃分 0.2ml(O.D.<sub>280nm</sub> 0.1)와 동량의 L-c劃分 酵素液(O.D.<sub>280nm</sub> 0.1)을 반응액에 동시에 가하여 活性을 측정한 結果 Table 1에 나타낸 바와 같이 c劃分만이 促進活性이 認定

Table 1. Accelerating effect on the lysis of yeast cell walls between the fraction L-c\* and the other each fraction obtained from the gel filtration with Sephadex G-75

Reaction mixture containing 0.2ml (O.D. 0.1 at 280 nm) of the L-c and the same volume of the other each fraction was incubated at 25°C for 30 min. with shaking. The lytic activities were expressed as decrease % of the turbidity in O.D. at 800 nm.

Fraction	Reaction mixture	
	Sodium sulfite (mM)	Lytic activities (%)
L-c	50	56.5
L-c	0	6.0
L-c+a <sub>1</sub> +a <sub>2</sub>	0	6.0
L-c+a <sub>1</sub> +a <sub>2</sub> +b	0	10.3
L-c+c	0	65.7
c	0	11.3

\*, Yeast cell wall lytic endo-β-1,3-glucanase purified partially from crude zymolyase preparation, which was produced from *Arthrobacter luteus*.<sup>1)</sup>

되었다.

따라서 상기 1), 2)의 실험 결과, 溶解 促進인자를 포함하는 protease劃分으로부터 효모 세포의 溶解에 거의 관련하지 않는 두 종류의 protease劃分(a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>) 및 하나의 β-1,3-glucanase(b劃分)를 除去할 수 있었으며, 溶解 促進作用을 보여준 c劃分을 편의상 P-c (proteolytic fraction c)라 이르게하였다. 한편 P-c는 그 溶出像으로 보아서 zymolyase와 같이 강력하지는 않았으나 Sephadex G-75 gel(주로 α-1,6-glucan으로 구성된 dextran matrix)에 대한 親和性이 인정된다. 근래, protease의 단독작용으로 *Sacch. saké* 細胞가 溶解되었다고 보고한 바 있는 Obata 등<sup>12)</sup>도 protease의 Sephadex gel에 대한 親和性을 認定하고 있다. 이와 같이 多糖에 대한 親和性은 효모 세포벽 溶解 促進作用을 영위하는 데에 중요한 의미를 내포하고 있는 것으로 추정된다.

한편, P-c劃分の PAG-電氣泳動의 純度檢査에서는 Fig.1중에 삽입된 泳動像이 보여주는 바와 같이 메인 밴드의 後에 하나 씩의 희미한 밴드가 보이고 있어 P-c劃分은 아직도 3가지 이상의 성분을 함유하고 있음을 시사하였으므로 그 精製法을 檢討,

以下の 실험을 실시하였다.

3) 調製用 PAG-電氣泳動

앞서의 gel 濾過 實驗에 의해 얻어진 P-c 劃分の凍結乾燥 標品 10mg을 脫이온수 1.2ml에 녹여 여기에 蔗糖 140mg과 0.48N KOH-酢酸緩衝液(pH 6.7) 0.2ml를 가하여 혼합한 뒤, 濃縮gel의 상단에 주입, gel化 고정시킨 다음 泳動을 개시하였다. 溶出되는 劃分の protease 活性의 測定에는 分取되는 劃分 0.5ml를 사용하여 카제인 反應液의 TCA(Trichloroacetic acid) 可溶性에 대한 O.D.<sub>275nm</sub>에서의 吸光度로 表示하였고, *Sacch. saké* 細胞에 대한 溶解 促進活性은 fraction collector로 分取되는 各 劃分 0.05ml 와 동량의 L-c 劃分(O.D.<sub>280nm</sub> 0.18)을 혼합하여 O.D.<sub>800nm</sub>에서의 反應液의 濁度の 減少되는 정도로 表示하여 그 結果를 Fig. 2에 나타내었다.

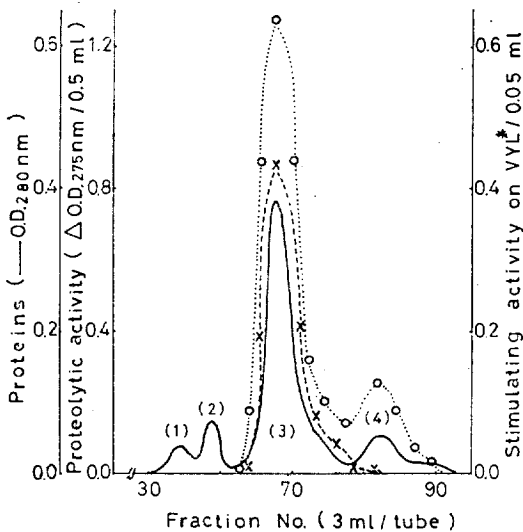


Fig. 2. Elution profile of the preparative polyacrylamide gel electrophoresis of the P-c. 10 mg of the fraction P-c was dissolved in 1.5 ml of 0.06 M KOH acetic acid buffer, pH 4.3 containing 10% sucrose. Electrophoresis was conducted with current of 18 mA, 190 V for 4 hours under cooling system and 3 ml was collected with a speed of 40 ml/h.

—, proteins; ...○..., proteolytic activity; ...×..., stimulating activity on VYL.

\*; viable yeast cell lysis

이 電氣泳動에서 P-c 劃分은 4개의 피이크로 劃分

되었으나, 카제인에 대한 protease 活性은 세번째 및 네번째 피이크에서 검출되었고, 특히 피이크 3은 蛋白質의 濃度, protease의 活性 및 溶解 促進活性이 세가지가 일치, 비례한 溶出像을 보여주는 데에 반하여, 피이크 4는 protease 活性만이 認定되었다.

이상의 結果는 P-c 劃分중에는 溶解 促進活性을 가진 protease와 가지지 못한 두가지 타입의 protease가 존재함을 나타냄과 동시에 問題의 溶解 促進作用은 피이크 3중의 protease의 작용에 의한 것으로 시사하는 것이다.

한편, 이 電氣泳動에 있어서 蛋白質의 回收率은 거의 100%였으며, 피이크 3은 출발 물질인 P-c 劃分の 약 75% 정도이었다.

(-)



(+)

Fig. 3. The pattern of electrophoresis of the purified protease on a polyacrylamide gel, pH 4.3.

4) 精製 溶解 促進劃分(피이크 3)의 均一性 檢定

調製用 PAG-電氣泳動에 의해서 얻어진 酵母 細胞壁 溶解 促進 劃分 피이크 3의 純度를 PAG-電氣泳動에 의하여 調査하였다. 피이크 3의 양단에는 피이크 2 및 4가 인접하고 있는 관계로 피이크 3을 다섯 구분(a~e)으로 수집하여 脫이온수에 충분히 透析한 후 凍結乾燥하였다. 各 試料의 약 70μg에 대하여 pH 4.3 및 pH 8.3에서 泳動을 실시한 결과, pH 8.3의 gel에서는 모든 試料는 移動하지 않고 원점에 머물러 蛋白質의 밴드(band)는 하나도 검출되지 않았으나, pH 4.3의 gel에서는 피이크 3의 c (Frac. No. 63~70) 區分에서만 Fig. 3이 보여주는 바와 같이 단일 밴드를 나타내었다. 한편, 앞서의 Fig. 1 중의 P-c 劃分の 泳動像에서는 3개의 밴드가 관찰되었으나, 調製用 PAG-電氣泳動의 실시 후 그 溶出像에 4개의 피이크가 출현한 것은 아마도 메인 밴드의 뒤쪽 밴드 단백질이 상기의 精製 過程중에 피이크 1과 2로 解離되었을 가능성이 추정되었다.

또한, P-c 劃分中の 酵母 細胞壁 溶解 促進因子를 精製하기 위한 과정에서 CM-Sephadex c-50 및 DE AE-cellulose의 이온교환 크로마토그래피, apatite column에 의한 吸着 크로마토그래피 등에 의한 精製法도 調製用 PAG-電氣泳動法과 더불어 檢討되었으나 그 結果는 PAG-電氣泳動法에 미치지 못하였다.

*Crude Zymolyase*

—Dissolved in 0.01 M phosphate buffer, pH 6.0 and dialysed against the same buffer

*Biogel CM-30 chromatography*

—Column size, 4 x 60cm; equilibrated in 0.01 M phosphate buffer; eluted by stepwise method, 0.01 M(pH 6.5) and 0.025 M(pH 7.5) phosphate buffer.

*Protease fraction*

—Concentrated by ultrafiltration method

*Sephadex G-75 gel filtration*

—Column size, 3 x 52 cm, eluted with 0.01 M phosphate buffer (pH 6.0)

*Fraction P-c*

—Concentrated and dialyzed against deionized water, and lyophilized

*Preparative PAG-electrophoresis*

—pH 4.3, 7.5% gel and 1.3 x 3.0 cm column

*Purified protease*

Fig. 4. Flow diagram of an outline on the separation and purification of the proteolytic enzyme, which was capable of accelerating the yeast cell wall lysis of the zymolyase.

Table 2. Summary of the purification procedure of the proteolytic enzyme accelerating the yeast cell wall lysis of zymolyase

Steps	Vol. (ml)	Protein (mg)	Specific activity <sup>a)</sup>				Yield (%)	
			Protease	Glucanase	L. A <sup>b)</sup>	S. L. A <sup>c)</sup>	Protein	Protease
Crude zymolyase	440	17,000	13.7	119.1	2.9	—	100.00	100.0
Biogel CM-30	250	133	101.4	4.7	45.1	83	0.78	5.8
Sephadex G-75	170	73	150.0	0.0	63.1	332	0.43	4.7
Preparative disc <sup>d)</sup> electrophoresis	75	55	147.0	0.0	24.0	344	0.32	3.5

a) units per mg protein

b) lytic activity determined without reducing reagent

c) stimulating activity on the lysis of viable yeast cells by zymolyase

d) preparative polyacrylamide gel disc electrophoresis at pH 4.3

이상의 실험으로 電氣泳動의 분석에서 단일 밴드를 나타낸 피크 3의 c劃分을 分析用 PAG-電氣泳動의 으로 순수하게 정제된 단일 성분으로 인정, 凍結乾燥하여 酵母 細胞壁 溶解 促進因자의 精製標品으로 保管하였으며, 또한 이를 精製 protease라 이름하여 이후의 이화학적 성질 등의 조사에 사용되었다.

이상의 정제 과정과 그 개요를 Fig. 4와 Table 2에 표시하였다. 본 정제에 의하여 zymolyase의 *Sacch. sake'* 細胞에 대한 溶解作用을 促進하는 protease의 카제인에 대한 活性는 10배 이상으로 상승하였으며, 溶解 促進活性도 4배 이상으로 높아졌다.

2. SDS-PAG 電氣泳動에 의한 分子量 測定

精製된 protease의 分子量을 측정하기 위한 SDS-PAG 電氣泳動의 시료로서는 시료의 조제 과정 중에 酵素蛋白質이 自己消化에 의하여 분해되는 경향이 인정되므로 이러한 변화를 피하기 위하여 <sup>32</sup>P-DFD (diisopropylphosphofluoridate)에 의하여 <sup>32</sup>P-DIP (13)한 精製 protease를 使用하였다. 2%의 SDS에 용해된 시료를 환원제가 없는 조건 하에서 SDS化 시킨 후, 약 10μg의 시료를 gel column에 注入, 泳動을 실시한 결과 앞서의 Fig. 3과 같은 단일 밴드가 얻어졌다. 동일 시료 4본의 gel 이동도(0.430, 0.429, 0.429, 0.434)의 평균치는 0.431로써, 이 값과 동시에

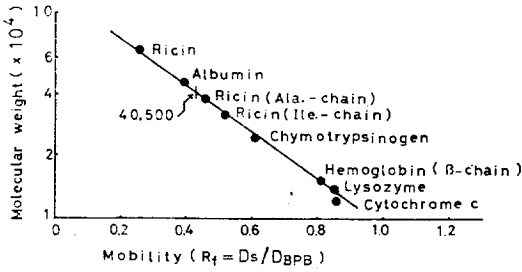


Fig. 5. Determination of molecular weight of the DIP-purified protease by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

The eight marker proteins used were ricin (65,000), ovalbumin (43,000), ricin Ala-chain (34,000), ricin Ile-chain (31,000), chymotrypsinogen (25,700), hemoglobin  $\beta$ -chain (15,500), lysozyme (14,300), cytochrome c (12,500). The arrows indicates the mobility of DIP-purified protease.

시료와 더불어泳動시킨分子量 既知의 marker 蛋白質(標準蛋白質)의 이동도로부터 작성한 標準曲線 (Fig.5)에 의거 산출한 본 효소의分子量은 약 40,500으로 밝혀졌다. 한편, S-S結合의 환원시약인 dithiothreitol의 존재하(0.1M)에서 SDS화 시킨 상기 시료의 電氣泳動도 앞서의泳動과 同一한泳動 패턴을 나타내었다. 이는 본 효소가 S-S結合을 가진 복수의 polypeptide chain으로 구성된 것이 아니라 단일의 polypeptide chain으로 구성되어 있음을 시사하는 것으로 추정되었다. 또한 앞서도 기술한 바와 같이 본 protease의 凍結乾燥 標品은 分析用 PAG-電氣泳動에서는 단일의 밴드를 나타냈음에도 불구하고 SDS-PAG 電氣泳動에서는 몇개의 밴드가 觀察되었는데, 이는 1% SDS를 함유한 0.1M 磷酸緩衝液(pH 7.5) 중에서의 SDS화 과정 중 酵素蛋白質이 自己消化를 일으킨 結果로 추정되었다. 따라서 分子量 측정을 위한 SDS-PAG 電氣泳動 및 等電點 측정을 위한 Ampholine-電氣泳動에 있어서는  $^{32}\text{P}$ -DFD의 化學修飾에 의하여 酵素活性이 완전히 阻害된  $^{32}\text{P}$ -DIP-精製 protease를 사용하였다.

3. Ampholine-電氣泳動에 의한 等電點 測定

앞서와 같이 DIP화 시킨 精製 protease 0.79mg을 使用하여 측정한 等電點은 pH 9.6이었다. 즉 Fig.6 이 보여주는 바와 같이  $^{32}\text{P}$ 의 放射活性과 蛋白質의 溶出位置로부터 구한  $^{32}\text{P}$ -DIP 精製 protease의 等電點은 pH 9.6으로, 이는 본 酵素가 鹽基性 蛋白質임을 시사하는 것이다. 한편, 본 실험에서 측정한 放射活性의 회수율은 약 96%이었다.

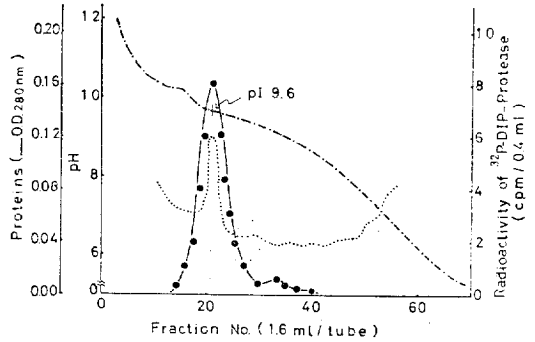


Fig. 6. The ampholine iso-electrophoretic pattern of the P-DIP-protease

0.79 mg of  $^{32}\text{P}$ -DIP- protease was applied to the column(capacity, 110 ml) of 0.8% ampholyte (pH 6–11), and electrophoresis was conducted at 4°C for 45 h with a current of 1.5 watt. ...., proteins;-----, pH;—●—●—, radioactivity of P-DIP-protease

4. 精製 protease의 分光學的 調査

1) 吸光係數 및 分子吸光係數

精製된 protease 溶液의 농도를 spectrometer의 吸光度로부터 간단히 求하기 위하여 精製 protease 溶液의 波長 280nm에서의 吸光도와 蛋白質 重量과의 관계 즉 吸光係數를 조사하였다.

精製 protease를 증류수에 72時間 2~5°C에서 透析한 후 millipore膜을 통과시켜 溶液中の 不溶物과 塵埃를 제거하였다. 이어서 collodion bag을 사용하여 농축, 凍結乾燥하였다. 乾燥된 試料를  $\text{P}_2\text{O}_5$ 을 充填한 Abderhalden氏 건조장치에 넣어 真空 펌프에 의한 減압하에서 2일간(35°C) 건조시켜 얻어진 시료 3mg 전후를 恒量으로 調整한 試料瓶에 取하여 microchemical balance로 稱량한 후, 여기에 5ml의 脫이온수를 가하여 溶解, 280nm에서의 吸光도를 측정하였다. 精製 protease 1% 溶液의 光幅 1cm에서의 吸光係數 ( $E_{280,1\%}^{1\text{cm}}$ )를 5點 시료의 平均치로부터 구하여  $11.91 \pm 0.069$ 의 값을 얻었다.

또한 상기의 측정치와 분자량 40,500의 수치로부터 分子吸光係數  $\epsilon_{280}(\text{mole/l})$ 을 계산하여  $4.83 \times 10^4$ 의 값을 얻었다.

2) 紫外吸收 스펙트럼(spectrum)

精製 protease 水溶液의 吸收스펙트럼을 波長 340~240nm의 범위에서 측정한 결과, Fig.7에서 보는 바와 같이 280nm에서 吸收極大, 250nm에서 吸收極

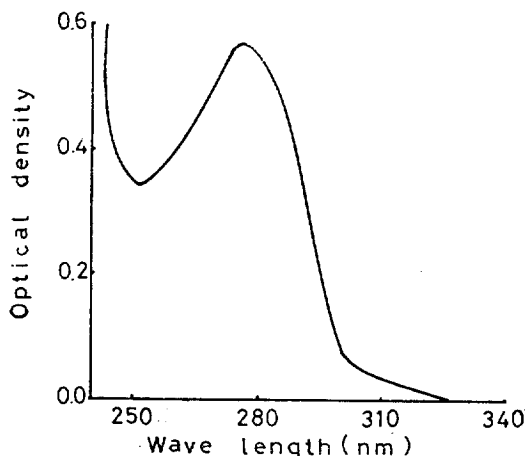


Fig. 7. Ultra-violet absorption spectrum of the purified protease

Table 3. Amino acid composition of the purified protease (P-P)

81.6  $\mu\text{g}$  of purified protease (molecular weight; 40,500) was hydrolyzed with 6 N HCl at 105°C in vacuum sealed tube and analyzed with 0.8 X 65 cm column.

Amino acids	Estimated value ( $\mu\text{ moles} \times 10^2$ )			Corrected value ( $\times 10^2$ )		Amino acid per mole of P-P moles	Number of residues
	24 h*	48 h*	72 h*	$\mu\text{ moles}$	$\mu\text{g}$		
Lys	1.94	2.02	1.99	1.98	254.2	12.69	13
His	0.41	0.42	0.40	0.41	56.2	2.62	3
Arg	2.78	3.03	2.87	2.85	445.1	18.23	18
Asp	6.66	6.62	6.59	6.62	762.1	42.37	42
Thr	3.72	3.64	3.62	3.66	370.0	23.41	23
Ser	5.65	5.36	5.34	5.85	509.3	37.43	37
Glu	3.41	3.42	3.51	3.45	445.0	22.05	22
Pro	1.98	1.98	2.01	1.99	193.2	12.73	13
Gly	10.36	10.43	10.34	10.38	592.0	66.39	66
Ala	8.42	8.42	8.42	8.42	598.4	53.87	54
Cys	1.08	1.18	1.18	1.18	262.3	7.55	8
Val	5.68	5.96	5.90	5.85	579.6	37.41	37
Met	0.33	0.29	0.29	0.36	47.2	2.30	2
Ile	1.46	1.60	1.66	1.66	187.8	10.62	11
Leu	3.09	3.23	3.17	3.16	357.9	20.24	20
Tyr	1.15	1.14	1.11	1.13	184.9	7.25	7
Phe	1.56	1.54	1.53	1.54	227.1	9.87	10
2Trp**				1.38	256.5	8.81	9

\*, Hydrolyzed time

\*\* , Trp. was estimated by ultraviolet absorption method.

### 5. 아미노산 組成의 分析

精製 protease 254 $\mu\text{g}$ 을 함유하는 세게 시료를 前處理한 후 105°C에서 24, 48, 78시간 燻산 가수분해하여 얻어진 酸가수분해물에 pH 2.2의 0.2M 시트르산 緩衝液 2.5ml를 가하여 0.8ml는 鹽基性 아미노

소를 나타내는 蛋白質 特有的 吸收스펙트럼이 관찰되었다.

그러나, O.D. 280nm/O.D. 260nm의 비는 1.37을 나타내 核酸 등이 雜質으로써 함유하고 있을 可能性이 예상되었다. 따라서 RNA는 Mejbaum法<sup>14)</sup>, DNA는 Burton의 變法<sup>15)</sup>, 으로 精製 protease(260 $\mu\text{g}$ )중의 RNA 및 DNA의 殘在 여부를 조사한 결과 어느 것도 檢출되지 않았다.

또한, 本酵素(640 $\mu\text{g}$ )中의 糖의 含量을 포도당과 만노스의 양으로써 측정, 산출한 결과 각각, 0.8%와 0.5% 이하의 값을 나타내, 本 酵素中에 糖의 殘基가 結合하고 있을 可能性은 매우 稀박한 것으로 판단되었다.

산분석에, 0.8ml는 中, 酸性 아미노산 분석에 사용하였다. 이 분석 시료 0.8ml중에는 精製 protease 標品 81.6 $\mu\text{g}$ 이 함유되어 있다. 단일 column(0.8X 65cm)의 크로마토그래피로부터 각 시료의 아미노산 含量( $\mu\text{ mole}$ )을 계산하여 평균치를 산출, 각각의 아미노산의 補正值로 하였다. 한편 serine과 methio-

nine은 酸加水分解 0時間에로의 外挿值을 측정치로 하였고 tryptophan은 紫外吸收法<sup>16)</sup>에 의하여 측정하였다. 각 아미노산의 補正值와 본 효소의 분자량 40,500으로부터 각 아미노산 殘基의 mole數를 산출하여 아미노산 殘基 個數를 결정하였다. 그 結果 Table 3에서 보는 바와 같이 본 효소의 아미노산 殘基數는 395個로 밝혀졌다.

그러나 본 효소는 크로마토그래피에 있어서나 電氣泳動의으로 鹽基性 蛋白質의 성질을 나타냈으나, 아미노산의 分析值에 있어서는 酸性 아미노산에 비하여 鹽基性 아미노산의 含量이 부족하였다.

이는, 본 酵素蛋白質의 分子에 있어서 酸性 아미노산인 aspartic acid와 glutamic acid의 상당량이 아미드의 형태인 asparagine과 glutamine으로 존재하기 때문인지 그 원인은 아직 검토중에 있다.

이상의 실험결과로 zymolyase의 *Sacch. sake'* 細胞의 溶解作用을 促進시키는 zymolyase 粗酵素 標品中의 某種의 因子는 PAG-電氣泳動의으로 均一하게 정제되었고, 그 정제는 395個의 아미노산 殘基로 구성되는 分子量 약 40,500의 단일 polypeptide로된 鹽基性 protease임이 밝혀졌다.

## 要 約

zymolyase( $\beta$ -1,3-glucanase)의 酵母 細胞壁에 대한 溶解作用을 促進시키는 因子를 zymolyase의 粗酵素로부터 分離하여 Sephadex G-75 gel 濾過 및 調製用 PAG-電氣泳動法에 의하여 電氣泳動의으로 均一하게 精製하였다.

SDS-PAG 電氣泳動法에 의하여 측정된 精製 因子의 分子量은 40,500이었고, 等電點은 pH 9.6이었다. 精製된 促進因子는 395個의 아미노산 殘基로 構成되는 單一 polypeptide의 鹽基性 protease임이 밝혀졌으며, 이 protease의 吸光係數( $E_{280,cm}^{1\%}$ )는 11.9, 分子吸光係數( $E_{280,mole/l}$ )는  $4.83 \times 10^4$ 이었다.

## 謝 辭

本 研究의 遂行에 있어서 多量의 zymolyase 粗酵素 標準品을 提供하여 준 日本 麒麟麥酒株式會社 總合研究所(高崎) 諸位께 깊이 感謝한다.

## 文 獻

1. Kitamura, K., Kaneko, T. and Yamamoto, Y.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **20**, 323(1974)
2. Feeney, R.E. and Whitaker, J.R.: *Food Proteins*(A.C.S., Washington), 244(1977)
3. 吳洪祿. 下田忠久. 船津 勝: 韓國食品科學會誌, **11**, 242(1979)
4. 吳洪祿. 下田忠久. 船津 勝: 韓國食品科學會誌, **12**, 254(1980)
5. John, R.: *Method in Enzymology*. Vol.22 (Academic Press, New York and London), 287(1971)
6. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
7. Imoto, T. and Yagishita, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1154(1971)
8. Hodge, J.E. and Hofreiter, B.T.: *Method in Carbohydrate Chemistry*(Academic Press, New York), Vol.1, 330(1962)
9. 高橋 札子: 生化學實驗講座, 蛋白質化學Ⅱ, 日本生化學會編(東京化學同人, 東京), 5(1976)
10. 林 健志, 大場義樹: 蛋白質·酵素·核酸(東京), **17**, 304(1972)
11. Hashimoto, S. and Funatsu, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 635(1976)
12. Obata, T., Iwata, H. and Namba, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2387(1977)
13. 吳洪祿. 相菌泰生. 船津 勝: 韓國食品科學會誌, **16**, 投稿豫定(1984)
14. Mejsbaum, W.: *Z. Physiol. Chem.*, **258**, 117(1939)
15. Burton, K.: *Biochem. J.*, **62**, 315(1956)
16. 高橋 札子: 生化學實驗講座, 蛋白質化學Ⅱ, 日本生化學會編(東京化學同人, 東京), 104(1976)