

*Fusarium moniliforme*이 生産하는 酵母細胞壁 分解酵素의 特性

張判植 · 朴官和 · 李啓瑚

서울대학교 農科大學 食品工學科
(1986년 9월 12일 수리)

Characterization of yeast cell wall lytic enzyme from *Fusarium moniliforme*

Phan-Sik Chang, Kwan-Hwa Park and Ke-Ho Lee

Department of Food Sci. & Tech., College of Agri.,
Seoul National University, Suwon 170, Korea
(Received September 12, 1986)

Yeast cell wall lytic enzyme was purified from *Fusarium moniliforme* by ammonium sulfate fractionation and gel column chromatography. The lytic activity was found to consist of three enzyme activities which were resolved on Sephadex G-100. The first peak on chromatogram exhibited proteolytic, lytic and laminarinase activities, and the second had both lytic and laminarinase activities, whereas the third peak was shown to contain lytic activity only. Three enzyme activities showed the synergistic effect and reducing agents accelerated the yeast cell wall lysis. This indicates that lytic, proteolytic and laminarinase activity acted cooperatively in the lysis of intact cells. Tannic acid precipitate of crude enzyme constituted of three enzyme activities had a high lytic activity on viable yeast cell and has proved useful in yeast protoplast formation.

酵母의 細胞壁은 여러 酵素들의 複合的인 作用에 依하여 分解되어지며⁽¹⁻⁶⁾, 특히 β -1,3-glucanase를 중심으로 하여 β -1,6-glucanase, mannanase, phosphomannanase 및 protease 등이 그 보조역할을 한다고 알려졌다.

한편 alkali 처리, 가열 또는 thiol을 처리하였을 때에도 分解作用이 있으며 또한 酵母細胞壁은 酵母의 種類, 增殖過程, 培地成分 등에 依하여 그 組成 및 構造가 달라지기 때문에 酵素에 의한 分解能에도 차이가 생길 뿐만 아니라 生酵母의 細胞壁은 完全히 分解되기는 어렵다고 報告되었다^(7-9,20).

酵母細胞壁 分解酵素를 分泌하는 微生物로는 *Micrococcus* sp.⁽¹⁾, *Pseudomonas* sp.⁽¹⁾, *Bacillus circulans*^(7,8), *Micromonospora chalcone*⁽²⁾, *Cytophaga johnsonii*⁽⁹⁾, *Streptomyces albidoflavus*⁽¹⁰⁾, *Streptomyces* sp.^(7,11), *Sclerotiana libertiana*⁽¹⁾, *Rhizo-*

pus sp.⁽¹²⁾, *Corpius*⁽¹³⁾, *Trichoderma*⁽¹⁴⁾ 등이 알려져 있으나 이들 酵素의 精製 및 그 特性에 관하여 밝혀진 것이 많지 않다. 한편 *Fusarium moniliforme*이 生産하는 酵素는 強力한 Cellulase를 分泌한다고 알려져 있고 그 特性이 보고되어 있다⁽¹⁵⁾. 그러나 酵母細胞壁 分解酵素에 대한 特性은 밝혀져 있지 않은 실정이다.

現在 商業화된 細胞壁 分解酵素 (Zymolyase, Snail enzyme, Cellulysin)는 力価는 우수하나 細胞壁을 分解하는 정도가 적당하지 못하여 分解된 細胞의 再生能力이 不良한 것으로 알려졌다.

따라서 本 研究은 酵母의 細胞壁을 分解하는 酵素를 *Fusarium moniliforme*으로부터 生産하고 分離, 精製하여 그 特性을 검토하였고 proteolytic activity, mannanase 및 laminarinase 등의 複合的 作用에 대하여 研究하였다.

材料 및 方法

菌株

本 實驗에 使用한 菌株로는 서울대학교 食品工學科內에 保管중인 *Fusarium moniliforme* 및 *Saccharomyces cerevisiae*로서 15일에 한번씩 MY-medium에 계대이식하고 4 °C에서 保管하면서 使用하였다.

기질의 調製

*Saccharomyces cerevisiae*를 agar가 包含되지 않은 MY-medium에서 9時間 동안 培養시킨後 6,000 rpm에서 15分間 遠心分離하고 침전물을 殺菌수로 2回 세척하였다.

酵素의 分解力価 測定

分解力価 (Lytic Activity; L. A.)는 Yokotsuka 등의 方法⁽¹⁶⁾에 準하여 測定하였는 바, 예열한 1/15 M-phosphate buffer (pH 7.5) 5 ml에 酵母細胞 현탁액 (파장 660 nm에서 吸光度 0.7로 조정) 3 ml를 混合한後, 酵素液 1 ml를 添加하여 37°C 항온수조에서 120分間 진탕 (60 rev./min.)하면서 反應시켰으며 파장 660 nm에서의 吸光度를 測定하고 다음과 같이 L. A. 를 계산하였다.

$$L. A. = \frac{d_0 - d_t}{d_0 - d_f} \times 100$$

여기서,

d_0 ; 反應時間 0에서 反應混合물의 吸光度.

d_t ; 反應時間 t에서 反應混合물의 吸光度.

d_f ; 酵母細胞 현탁액 대신 증류수를 添加한 反應混合물의 吸光度.

한편, 酵素力価의 上乘效果 및 환원제에 의한 影響을 검토할 때에는 glucose-DNS法⁽¹⁷⁾에 準하였다.

Laminarinase力価 測定

1/15 M-phosphate buffer (pH 7.5) 용액에 laminarin을 0.3%되게 녹인後 0.5 ml를 取해서 기질용액으로 使用하였으며, 여기에 酵素液 0.5 ml를 添加한後 37°C에서 120分間 反應시켰다. 이 反應液에 DNS 용액 3 ml를 添加하여 酵素反應을 中止시키고 가열하여 발색시킨後 파장 550 nm에서 吸光度를 測定하였다.

酵素力価 1 unit는 反應液 1 ml당 1分間에 glucose 1 μmole에 상응하는 환원당을 生成시키는 酵素量으로 하였다.

蛋白質 分解力価 測定

casein 1.2 g과 5 N-NaOH 0.5 ml를 증류수 100 ml에 混合한後 90°C에서 15分間 가열하여 녹인後 냉각시킨 다음 1/15 M-phosphate buffer (pH 7.5)

로 2배 희석하여 기질용액으로 하였다. Activator溶液은 0.02M-EDTA를 함유하는 1/15 M-phosphate buffer (pH 7.5)에 0.08 M-NaCN을 添加하여 使用直前に 만들어 使用하였다.

酵素液 1 ml에 activator용액 0.4 ml를 添加하여 10分間 방치한後 기질용액 5 ml와 混合하여 37°C에서 교반하면서 30分間 反應시켰다.

이 反應液에 10% TCA溶液 5 ml를 添加하여 酵素反應을 中止시키고 37°C에서 20分間 계속하여 침전시킨後 여과시켰다. 이 여과액의 吸光度를 파장 660 nm에서 測定하였다.

酵素의 抽出, 分離 및 粗精製

*Fusarium moniliforme*을 Baker's yeast medium에서 7日間 培養시킨後 gauze로 濾過시킨 다음 4°C, 6,000 rpm에서 15分間 遠心分離한後 상등액에 (NH₄)₂SO₄를 加하여 75%되게 포화시킨後 침전물을 회수하였다.

以上の 方法에 依하여 얻어진 酵素液을 탈염 및 농축하여 1/15 M-phosphate buffer (pH 7.5)로 미리 평형시켜 놓은 Sephadex G-100 column (2.5×90cm)에 流速 15 ml/hr의 速度로 통과시켰다.

Tannic acid 침전

농축하여 얻은 酵素液을 Tannic acid 침전 방법⁽¹⁸⁾에 의하여 분말효소를 얻었다.

以上과 같은 精製過程은 Fig. 1과 같다.

Protoplast 조제

Maraz 등의 方法⁽¹⁹⁾에 準하였으며 *Saccharomyces cerevisiae*를 8~9時間 동안 培養한 다음 酵素濃度

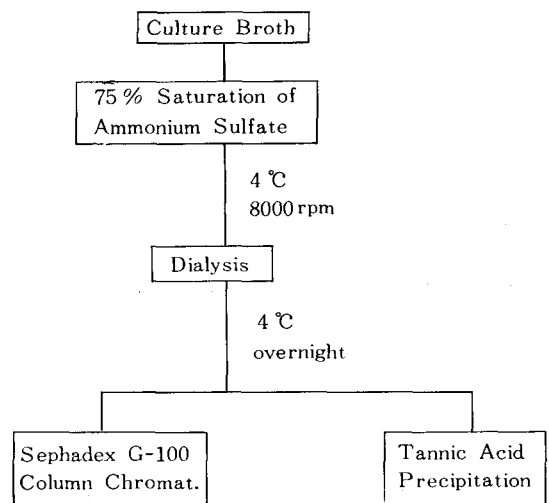


Fig. 1. Purification diagram of yeast cell wall lytic enzyme from *Fusarium moniliforme*.

가 200 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록添加하였으며 Dithiothreitol (10 mM) 과 함께 $\frac{1}{15}$ M-phosphate buffer (pH 7.5) 에 녹여 使用하였다(이때 안정제로서 0.55M-KCl 함유).

酵素反應은 진탕식 항온수조에서 60分間, 37°C 에서 行하였다.

結果 및 考察

酵素의 生産

Ammonium nitrate를 0.2% 되게 기본배지에添加한 다음 *Fusarium moniliforme* 을 8日間 진탕배양하면서 細胞壁 分解力価를 경시적으로 測定한 결과 Fig. 2 와 같이 배양 6~7日만에 最大의 力価를 나타내었다.

한편 증류수를 使用한 培地の pH는 培養 5日 및 6日째 다소 감소하는데 $\frac{1}{15}$ M-phosphate buffer (pH 7.5) 를 使用하여 pH를 7.5로 조절하고 培養 日數에 따른 酵素力価를 測定한 결과, 증류수를 사용하였을 때에 比하여 酵素力価가 增加하였다(Fig. 2). 또한 0 time에서도 lytic activity를 나타내는 것은 종배양(본배양의 5% 규모)에서 본배양으로 접종시킬 때의 종배양 접종에 의한 효과인 것으로 추측되었다.

Fusarium moniliforme 酵母細胞壁 分解酵素의 分離 및 精製

(NH₄)₂SO₄ 침전 및 Sephadex G-100 column chromatography를 통하여 酵素를 分離한 결과는 Fig. 3 에서와 같이 세개의 peak(p-1, 2, 3)를 보였다.

첫번째 peak (No. 20-24)는 proteolytic, lytic ac-

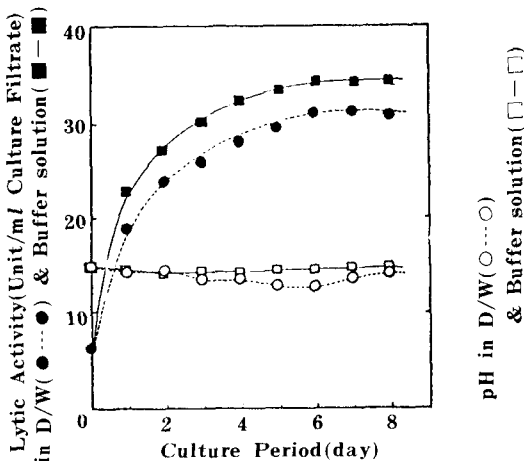


Fig. 2. Time courses of lytic enzyme production by *F. moniliforme* in a D/W and buffer medium at 30 °C.

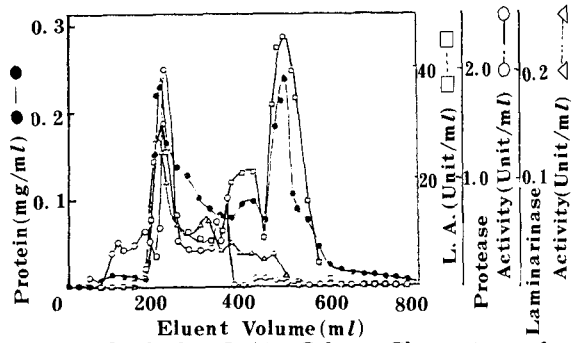


Fig. 3. Sephadex G-100 Column Chromatography column size; 2.5 × 90 cm. elution velocity; 15 ml/hr.

tivity 및 laminarin 分解力価를 보였으며 특히 protease 및 laminarinase activity가 상대적으로 높았다. 두번째 peak (No. 35-42)는 lytic activity와 laminarin 分解力価를 同時에 가지고 있었으며, 세번째 peak (No. 47-53)는 lytic activity만을 가지고 있었다.

酵素力価의 上乘效果 및 還元劑에 의한 影響

첫번째, 두번째 및 세번째 peak를 단독으로 作用시키고 또한 합하여 酵素力価를 測定한 결과는 Fig. 4 와 같다.

각 peak를 단독으로 처리하였을 때에 比하여 세계의 peak부분을 酵素蛋白質의 同量(1.0 mg/ml)比로

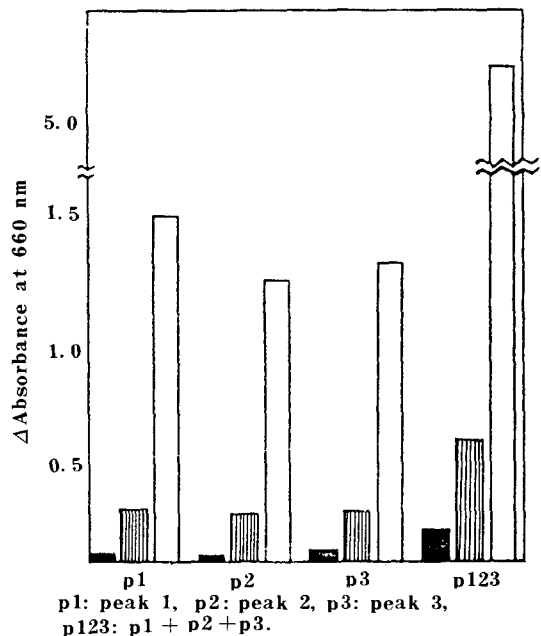


Fig. 4. Lytic activity of Peak 1, 2 and 3.

- : Enzyme without reducing agent
- : Enzyme with 10mM β-mercaptoethanol
- ▨: Enzyme with 10mM dithiothreitol

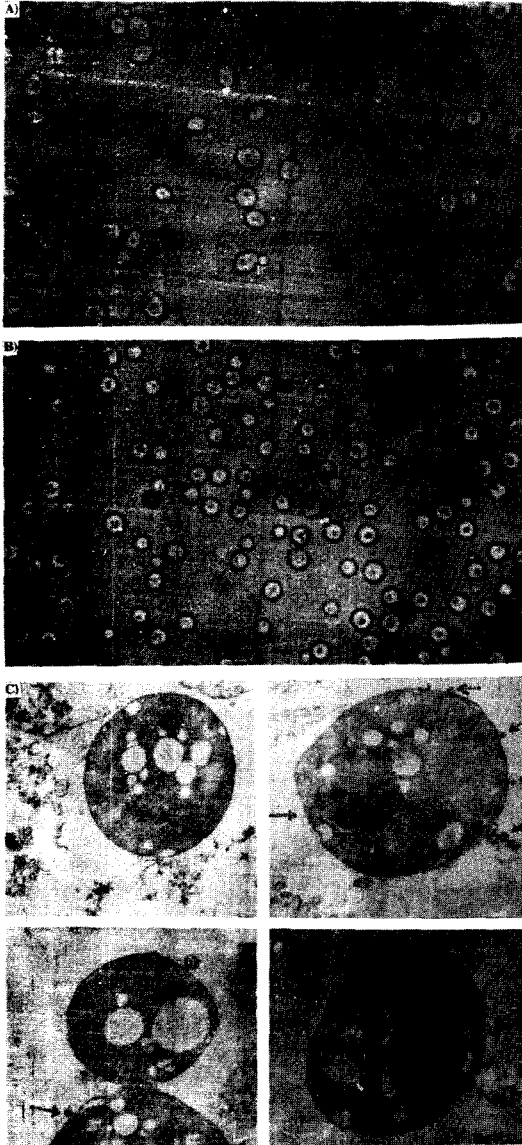


Fig. 5(A). *Saccharomyces cerevisiae*; Intact cells ($\times 800$)

Fig. 5(B). Protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* treated with *Fusarium moniliforme* lytic enzyme at 35°C , 90 min. ($\times 800$).

Fig. 5(C). Transmission electron microscopic observation of protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* ($\times 5300$) PCB: Peripheral cytoplasmic bodies (arrow)

혼합하였을 때 훨씬 높은 효능을 보였다. 이는 각 효소의 작용이 서로 상승작용을 한다고 생각 된다. 또한 환원제로서는 β -Mercaptoethanol (10mM) 및

Dithiothreitol (10 mM) 을 사용하여 효소 효능에 미치는 영향을 검토한 바, 효모 세포벽의 분해가 현저하게 증가되었다.

以上的 결과와 Kitamura⁽²⁰⁾ 吳等⁽²¹⁾의 報告와 종합하여 보면,

Protease가 mannan과 단백질로 構成되는 세포벽 표층부에 作用한 後 lytic enzyme 및 laminarinase가 노출된 glucan층에 접촉, glucan을 分解하므로써 효모 세포의 分解가 일어나기 시작하는 것으로 추측할 수 있었다.

Protoplast 調製

Fusarium moniliforme 으로부터 調整제한 효모 세포벽 分解 효소를 사용하여 protoplast 를 조제하고 현미경으로 검경한 결과는 Fig. 5 (A), (B) 와 같았다.

(A)에서는 효모의 모양이 卵形임에 비하여 (B)에서는 원형의 protoplast가 보이고 ghost에 해당되는 것도 보였으며 protoplast 수율은 99.2% 정도였다.

한편, 전자현미경으로 검경한 결과는 Fig. 5 (C) 와 같다.

PCB(Peripheral Cytoplasmic Bodies)가 노출되어 있는 것으로 보아 protoplast 임을 확인할 수 있었다. 또한 출아과정중에 있는 효모의 protoplast도 관찰할 수 있었다.

要 約

Fusarium moniliforme 으로부터 효모 세포벽 分解 효소를 生産하고 分離, 精製하여 효소 특성 및 protoplast 제조 실험을 하였다.

Ammonium nitrate를 0.2% 添加한 Baker's yeast 培地에서 7日間 振盪培養으로 효소를 生産한 後 Ammonium sulfate로 分割하고 Sephadex(G-100) column chromatography하여 세개의 peak를 얻었다. 첫번째 peak는 proteolytic, lytic activity 및 laminarin 分解 효능을 보였으며, 두번째 peak는 lytic activity와 laminarin 分解 효능을 同時에 가지고 있었으며, 세번째 peak는 lytic activity만을 가지고 있었다.

分離된 세개의 peak를 混合하였을 때 個個의 peak보다 훨씬 높은 효능을 나타내어 上乘 효과를 보였고 또한 還元劑에 의한 효소 효능의 上乘 효과도 있었다. protoplast 수율은 99.2% 정도였다.

謝 辭

本 研究는 한국과학재단 차관 연구비로 수행되었음.

참고문헌

1. Satomura, Y., M. Ono and J. Fukumoto: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **24**, 317 (1960).
2. Monreal, J., F. De Uruburu and J.R. Villanueva: *J. Bacteriol.*, **94**, 241 (1967).
3. Sugimoto, H.: *Agri. Biol. Chem.*, **31**, 111 (1967).
4. Anderson, F.B. and J.W. Millbank: *Biochemistry J.*, **99**, 682 (1966).
5. Svihla, G., F. Schlenk and J.L. Dainko: *J. Bacteriol.*, **82**, 808 (1961).
6. Yamamoto, S. and S. Nakasaki: *J. Ferment. Technol.*, **50**, 131 (1972).
7. Tanaka, H. and H.J. Phaff: *J. Bacteriol.*, **89**, 1570 (1965).
8. Mc Lellan, W.L., L.E. Mc Daniel and J.C. Lampen: *J. Bacteriol.*, **102**, 261 (1970).
9. Bacon, J.S.D., B.D. Miline, I.F. Tayler and D.M. Nebley: *Biochemistry J.*, **95**, 28 (1965).
10. 田端司郎, 照井堯造: *醱酵工学雑誌*, **40**, 366 (1962).
11. Mendoza, C.G. and J.R. Villanueva: *Nature*, **195**, 1326 (1962).
12. 黒田彰夫: *醱酵工学雑誌(日本)*, **46**, 926 (1968).
13. 川合正允: *醱酵工学雑誌(日本)*, **48**, 395, 295, 405 (1970).
14. 外山信男: *醱酵工学雑誌(日本)*, **46**, 626 (1968).
15. Cho, Y.K. and K.H. Park: *J. Korean Agr. Chem. Soc.*, **29**, 44 (1986).
16. Yokotsuka, K., S. Goto, I. Yokotsuka and T. Kushida: *J. Ferment. Technol.*, **52**, 701 (1974).
17. G.L. Miller: *Anal. Chem.*, **13**, 426 (1959).
18. Park K.H. and P.S. Chang: *Agri. Res. Seoul Nat. Univ.* **10**(1) Supplement, 123 (1985).
19. A. Maraz: "Protoplasts-Applications in Microbial Genetics" Chap. 7.
20. Oh, H.R. and M. Funatsu: *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **14**, 401 (1985).
21. Kitamura, K.: *Agri. Biol. Chem.*, **46**, 963 (1982).