

Streptomyces sp. Y93430이 生産하는 齒面細菌膜 分解酵素의 精製와 特性

김성주* · 한홍근 · 윤정원
수원대학교 공과대학 유전공학과

Purification and Characterization of Degradative Enzyme of Dental Plaque from *Streptomyces* sp. Y9343. Seong-Joo Kim*, Hong-Keun Han and Jeong-Weon Yoon. Department of Genetic Engineering, College of Engineering, The University of Suwon, Suwon P.O. Box 77, 445-743, Korea - *Streptococcus mutans* has been implicated as primary causative agents of dental caries by insoluble glucan (IG) in human and experimental animals. An attempt was made to search for the α -1,3 glucanase that degrades IG produced by *S. mutans*. α -1,3 glucanase was detected in the culture supernatant of microorganisms, which are isolated from soils on agar medium containing IG as a sole carbon source. This *Streptomyces* sp. hydrolysed IG produced by immobilized *S. mutans* and was named as Y9343. This enzyme required α -1,3 glucan (IG) as an inducer. The optimum conditions for enzyme production were studied. The enzyme was purified by 30~70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, anion exchange chromatography on DEAE-cellulose and gel filtration on Sepadex G-75. The purified enzyme has a specific activity of 7840.0 U/mg protein giving 32.1-fold purification and final yield of 0.53%. The molecular weight was estimated to be about 22.5 kDa by SDS-PAGE. The optimum pH and temperature for enzyme reaction were 6.5 and 37°C, respectively and the enzyme was relatively stable at the temperature below 60°C. The activity of purified enzyme was enhanced by adding Co^{2+} , Mn^{2+} , and Mg^{2+} into the medium, whereas inhibited by adding Hg^{2+} , Zn^{2+} and SDS. The K_m and V_{max} value of α -1,3 glucanase for IG were estimated to be 2.50 mM and 0.0431 mM/min, respectively. The thin layer chromatographic analysis of hydrolysates from IG with α -1,3 glucanase showed that glucose was the main product of reaction. This enzyme activity was about 14 times higher than marketing dextranase as preventive agent against artificial dental caries by *S. mutans* in TH medium including 5% sucrose after 30 minutes.

치아우식증은 현재 전세계적으로 가장 널리 만연하고 있는 문화병의 하나로 선진국은 물론, 우리나라의 경우도 그 이환율이 점진적으로 상승하는 추세이며, 사람의 치아를 상실하는 원인 중 87.6%를 차지하는 병으로서 치주병과 함께 치학의 2대 질환이 되고 있다. 이 질환은 소득 수준이 높아짐에 따라 간식류 및 당류섭취의 증가에 의해 점차 늘어나는 추세에 있으므로 그 효과적인 관리 대책이 시급하며 일상생활과 매우 밀접하게 연관되어 있음에도 불구하고 그 실체에 대해서는 의외로 잘 알려져 있지 않은 실정이다.

최근에 의학의 방향이 치료보다는 예방 측면의 중요성이 대두됨에 따라, 치아우식증도 발생기작에 관한 기초적인 연구 및 치아우식증예방제의 개발에 관한 연구가 활발히 진행되어 예방치학 분야의 발전이 기대되고 있다 (1-3).

치아우식증예방제는 치면세균막 억제제(4, 5) 및 형성된 치면세균막 분해효소에 의한 개발 방법이 주로 연구되어 왔다(6-9).

불용성 glucan을 분해하는 α -1,3 glucanase(EC 3.2.1.59)는 충치발생을 억제할 수 있다고 생각하였으며(10, 11), 이 밖에도 많은 종류의 endo-glucanase와 exo-glucanase

가 밝혀졌지만(12, 13) 아직까지 *Streptococcus mutans*가 만들어낸 불용성 glucan을 탁월하게 분해시키는 glucanase는 없었고, 특히 동물실험에서는 거의 효과를 보지 못했다(14-16). 이것은 아마도 glucanase의 탐색에 사용된 기질이 *Aspergillus species*에서 얻은 Pseudonigran(α -1,3), Nigran(α -1,3, α -1,4)(8, 17), 또는 식물에 존재하는 α -1,3 glucan(18, 19), *Leuconostoc mesenteroides*에서 얻은 dextran(9), *Streptococcus bovis*의 배양액에서 ethanol 침전으로 얻은 dextran(20) 등만을 사용하였기 때문에 *S. mutans*의 불용성 glucan에 대한 기질특이성이 있는 효소는 아닌 것으로 여겨졌다.

그러므로 본 연구에서는 역가가 높고 안정성이 있는 새로운 α -1,3 glucanase를 분리하는 균주를 탐색하기 위하여 *S. mutans*로 부터 세포고정화방법으로 제조된 불용성 glucan을 제조한 후, 이 불용성 glucan을 분해할 수 있는 α -1,3 glucanase를 분리하는 새로운 미생물을 분리하고, 이 효소의 추출, 정제, 특성 및 대량 생산하는 조건의 확립을 시도하였다.

실험재료 및 방법

사용균주의 분리 및 선정

불용성 glucan(IG)을 제조하기 위하여 사용된 균주는 *Streptococcus mutans* ATCC 25175로 serotype C를 사

*Corresponding author.

Key words: α -1,3 glucanase, insoluble glucan (IG), dental caries

용하였으며, TH(Todd Hewitt ; Difco) 배지에서 37°C로 배양한 후, 10% glycerol를 첨가하여 -20°C에서 보관하였다. 균주는 약 2일간 5% sucrose TH 배지에서 배양하여 사용하였다. 또한 연구대상 미생물은 전국 각지에서 미경작지의 지표면 2~5 cm 깊이로 토양을 채취하여 탐색하였다. 토양의 방선균 분리용 배지는 Actinomyces isolation agar 배지(soluble starch 1%, ammonium sulfate 0.2%, magnesium sulfate 0.1%, potassium phosphate(dibasic) 0.1%, sodium chloride 0.1%, calcium carbonate 0.3%, pH 7.0)를 사용하였으며, 나타난 single colony를 액체배지(saccharose 0.2%, yeast extract 0.5%, polypeptone 0.5%, KH₂PO₄ 0.5%, Na₂HPO₄·12H₂O 0.5%, Gerber vegetable juice(GV_s) 2.0%(orV₈), pH 7.0)에서 활성화 시킨 후, Bennet agar 사면 배지(glucose 10.0 g, peptone 2.0 g, beef extract 1.0 g, yeast extract 1.0 g, agar 20.0 g, nystatin 5 µg/ml, distilled water 1.0 L, pH 7.3)에 계대 배양하여 4°C로 보관하였다. α-1,3 glucanase 분비 균주 분리용 배지로는 불용성 glucan을 유일한 탄소원으로 하는 Czapeck-dox 배지(IG 5.0 g, NaNO₃ 0.3%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, KCl 0.05%, FeSO₄·7H₂O 0.001%, agar 1.5%, final pH 6.5)를 사용하였으며, 효소 생산용 배지는 최적 효소생산 조건이 결정된 배지를 사용하였다(21). 고정화에 의한 불용성 glucan의 생산에 사용된 배지는 합성배지인 TH 배지를 사용하였다.

선발균주의 동정

선발된 균주들의 동정은 Bergy's manual determinative bacteriology(22)에 따라 형태적, 배양적, 생리적인 특성을 조사하였고, 균사 세포벽성분은 Lechevalier 방법(23)을, 특성조사는 International Streptomyces Project (ISP) 방법을 따랐다.

사용시약

Soluble starch, dextran(MW. 70,000), sucrose, ammonium persulfate, acrylamide, N, N'-methylene-bisacrylamide, TEMED는 Sigma 사, 그리고 TH medium는 Difco사 제품을 사용하였으며, 그 밖의 모든 시약은 특급시약으로 실험에 사용하였다. TLC plate는 silica gel-coated TLC plate Kiesel gel 60, Merck사 제품, Sephadex G-75, DEAE-cellulose는 Sigma사, dextranase는 국내 효소치약에 사용되는 것을 이용하였다.

불용성 glucan의 제조

윤등(24) 방법으로 *S. mutans*를 polyacrylamide에 고정화 시킨 cube를 5% sucrose TH 배지 1L에 넣고, 삼각플라스크에서 37°C로 48시간 동안 배양하였다. 침전된 불용성 glucan을 7,000×g에서 20분 동안 원심분리하여 모은 다음, 증류수로 3번 세척한 후, 동결건조(LABCON

Co., USA)시켜 보관하였다.

배양방법

분리된 방선균들을 불용성 glucan을 유일한 탄소원으로 하는 변형된 Czapeck-dox 한천배지상에 백금선으로 3점 접종하여 30°C에서 3일간 배양하였다. 배양 후 형성되는 투명환(clear zone)의 직경을 측정하여 비교적 크게 형성된 colony를 선별하여 액체 배양하였다. 선별된 균을 10 ml의 Dextarch(25) 액체배지(soluble starch 1.000%, IG 0.500%, polypeptone 0.500%, yeast extract 0.100%, K₂HPO₄ 0.400%, MgSO₄ 0.020%, KCl 0.020%, Fe₂O₄·7H₂O 0.001%, final pH 6.5)에 접종하였다. 30°C에서 180 rpm의 조건으로 24시간 동안 진탕배양하여 활성화 시킨 후, 500 ml 삼각 플라스크에 100 ml의 Dextarch 액체배지에 전배양액 1 ml 접종하여, 30°C에서 5일간 180 rpm으로 진탕배양하였다.

조효소액의 제조

토양에서 부터 분리한 *Streptomyces* sp. Y9343 배양액 1,000 ml을 4°C, 7,000 g에서 20분 원심분리한 후 상등액에 황산암모늄을 가하여 30%까지 포화시키고 2시간 방치한 후 원심분리(7,000×g, 30 min)하여 침전물을 제거하고 상등액을 취하였다. 그 상등액에 다시 황산암모늄을 가하여 70%까지 포화시키고 하룻밤 방치한 후 원심분리(7,000×g, 30 min)하여 얻은 침전물을 0.05M sodium phosphate 완충용액(pH 6.5)에 용해시켜 황산암모늄분획액을 얻었다. 이 용액을 cellulose dialysis tubing(cellulose tubing, Sigma No. 250-7U)에 넣어 동일한 완충용액으로 12시간 씩 교반하면서 3회에 걸쳐 4°C에서 투석하여 조효소액을 얻었다.

DEAE-cellulose column chromatography

충진된 DEAE-cellulose column(2.8×30 cm)을 0.05M sodium phosphate 완충용액(pH 7.5)로 평형화 시켜 사용하였다. 조효소액을 column에 주입하고, 0.05M sodium phosphate 완충용액(pH 6.5)으로 세척한 후 동일한 완충용액에 0.0~2.0M NaCl을 첨가하여 linear gradient elution을 행하였다. 이 때의 유속은 15 ml/hr로 행하였으며, 분획당 5 ml 씩 받은 후 활성분획을 모아서 PEG 6,000으로 농축하였다.

Gel filtration chromatography

Sephadex G-75를 column(2.5×60 cm)에 충전시키고, 0.05M sodium phosphate 완충용액으로 평형화 시키고, DEAE-cellulose chromatography의 활성분획만 농축시킨 시료를 주입한 후 동일 완충용액으로 용출시켰다. 이 때의 유속은 15 ml/hr로 하였으며, 5 ml 씩 분획하였다.

α-1,3 glucanase 활성 측정

첫 번째 방법으로는 Baily 등(20)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, 0.5% insoluble glucan 2.0 ml, 0.2M sodium phosphate 완충용액(pH 6.5) 2.3 ml, 2% sodium azide 0.05 ml를 취하여 37°C에서 10분간 예열하였다. 이어 0.2 ml의 효소액을 가하여 반응시키고 100°C에서 중탕하여 반응을 정지 시켰다. 이 반응물을 액체혼합기를 이용하여 일정 시간 동안 섞어준 후 흡광광도계(Hitachi 200-20)를 이용하여 불용성 glucan이 분해되는 정도(혼탁도)를 550 nm에서 측정하였다. 두 번째 효소 활성 측정 방법으로는 glucose를 표준물질로 하여 DNS 방법(26)을 사용하여 효소에 의해서 불용성 glucane이 분해된 환원당 정량을 하였다. 이 때 효소 활성도는 37°C, pH 6.5 조건 하에서 불용성 glucan으로 부터 glucose 1 µg/min로 생성할 때 1 unit로 정의하였다.

분자량 측정

10% Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)는 Laemmli 방법(27)으로 실시하였으며, 전기영동을 실온에서 20 mA로 전개시켰다. 50% trichloroacetic acid(w/v)에 0.1% Coomassie brilliant blue(w/v)를 녹인 용액으로 염색하였으며, 7% acetic acid(w/v)로 탈색시켰다. SDS-PAGE를 통해 α-1,3 glucanase가 정제되었는지 확인하였으며, 표준단백질과 Rf 값을 비교하여 분자량을 결정하였다.

단백질 정량

Bovine serum albumin(Sigma Chem. Co.)를 표준단백질로 하여 Lowry등(28)의 방법으로 측정하였으며, 효소 정제 과정중의 column에서 분리되는 단백질 농도는 UV 흡광광도계를 이용하여 280 nm의 흡광도로서 측정하였다.

결과 및 고찰

α-1,3 glucanase 분비균주의 분리 및 동정

토양에서 분리한 방선균 중에서 α-1,3 glucanase를 분비하는 새로운 균주들을 Czapek-dox 한천배지상에서 colony의 성장대 및 균이 분비하는 α-1,3 glucanase에 의해 colony 주위에 형성되는 투명환의 크기가 큰 것을 찾아서 α-1,3 glucanase 분비 균주를 탐색하였다. Fig. 1과 같이 방선균 Y9343은 다른 균에 비하여 투명환이 크게 형성되는 것을 볼 수 있었다.

본 균주의 형태적 특성을 조사한 결과, 나선형의 smooth형 표면을 갖고 있었고 기균사는 gray 계열의 색을 나타내고 포자는 회백색의 원통형이었다. 배양적 특성은 Table 1과 같이 tyrosine agar(ISP 7) 배지를 제외하고는 기균사의 생육과 포자의 형성이 양호했으며 전체적으로 회색을 나타내었고 glycerol-asparagine agar (ISP 5) 배지에서는 파란색을 나타냈다. 한편, 생리적

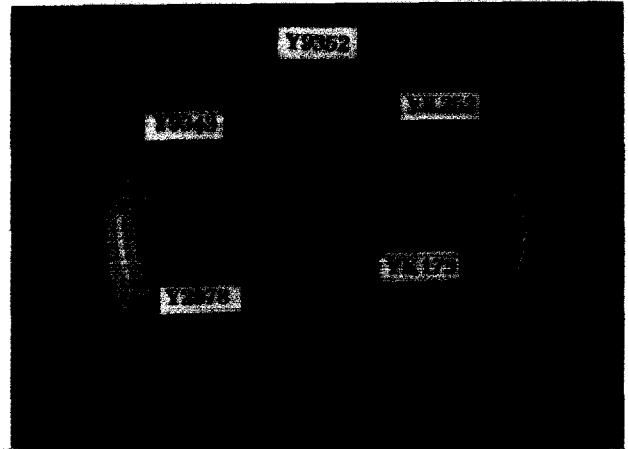


Fig. 1. The growth of α-1,3 glucanase producing microorganisms on agar plate containing α-1,3 glucan as a sole carbon source.

Table 1. Cultural characteristics of the Streptomyces sp. Y9343

Agar medium	Growth	Aerial mycelium	Reverse side	Soluble pigment
ISP 2	good	grey	light red	-
ISP 3	good	grey	orange	-
ISP 4	good	grey	orange	-
ISP 5	modulate	light blue	blue	-
ISP 6	good	grey	blue	-
ISP 7	scant	grey	none	-

특성을 TLC로 DAP를 분리해 본 결과 L,L-DAP로 확인되므로 Streptomyces속에 속하였다. 세포벽을 가수분해한 후에 당성분을 TLC로 분석한 결과 arabinose, galactose 및 modurose 등의 특정당이 검출되지 않았으므로 Joseph 등(29) 방법에 따라 Pattern C로 분리되어 Streptomyces속으로 확인되었다.

이상과 같이 본균주의 형태적, 배양적 및 생리적 특성과 당의 이용성등을 토대로 ISP 분류 Key와 방선균 분류기준(30)과 비교 검토하여 Streptomyces sp. Y9343 이라 명명하였다.

효소의 정제

황산암모늄 염석 Streptomyces sp. Y9343 배양액 1,000 ml을 염석하여 얻어진 조효소액의 비활성은 289.7 U/mg protein으로써 배양상등액의 244.2 U/mg protein 비활성보다 Table 2에서 나타난 바와 같이 1.2배 증가하였다.

DEAE-cellulose 이온 교환 크로마토그래피 투석한 조효소액을 DEAE-cellulose column(2.8×30 cm)을 사용하여 정제한 결과(Fig. 2), 미흡착 분획인 fraction number 10~29에서 효소의 활성을 나타내었으며, 이 때 비활성은 3054.5 U/mg protein으로 12.5배 증가하였으며, 단백질 회수율은 2.53%이었다(Table 2).

Table 2. Summary of purification of α -1,3 glucanase from *Streptomyces* sp. Y9343

Step	Total protein ^a (mg)	Total activity (unit ^b)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	423.55	103420	244.2	100.00	1.0
30~70% (NH ₄) ₂ SO ₄ Saturation	163.13	47250	289.7	38.50	1.2
DEAE-Cellulose chromatography	10.73	32760	3054.5	2.53	12.5
Sephadex G-75gel filtration	2.25	17640	7840.0	0.53	32.1

^aProtein concentration determined by the method of Lowery *et al.* with bovine serum albumin as a standard.

^bOne unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme which would liberate reducing sugar equivalent to 1 μ g glucose per min under standard assay condition.

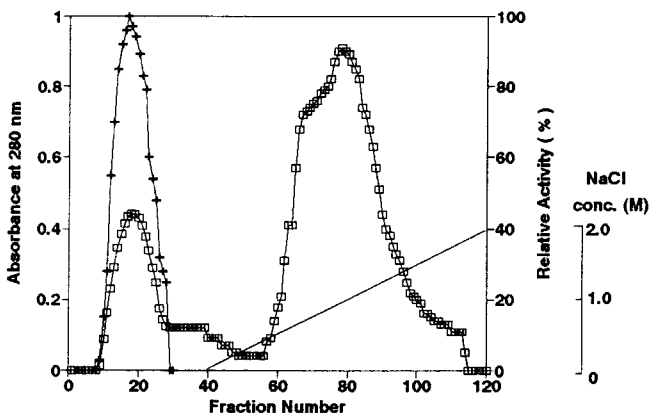


Fig. 2. DEAE-cellulose column chromatography of α -1,3 glucanase from *Streptomyces* sp. Y9343.

-□- Protein, -○- Activity

Column size: 2.8×30 cm, Flow rate: 15 ml/hr., Fraction: 5 ml/fraction

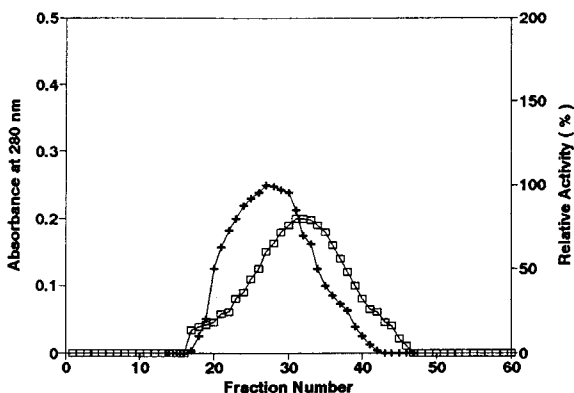


Fig. 3. Sephadex G-75 gel filtration chromatography of α -1,3 glucanase from *Streptomyces* sp. Y9343.

-□- Protein, -○- Activity

Column size: 2.5×60 cm, Flow rate: 15 ml/hr., Fraction: 5 ml/fraction

Sephadex G-75 겔 여과 크로마토그래피 농축된 효소활성분획은 gel filtration을 행한 결과, 주로 앞부분 분획에서 효소의 활성을 나타내었으며(Fig. 3), 이 때 비활성은 7840.0 U/mg으로 32.1배 증가하였으며 0.53%의

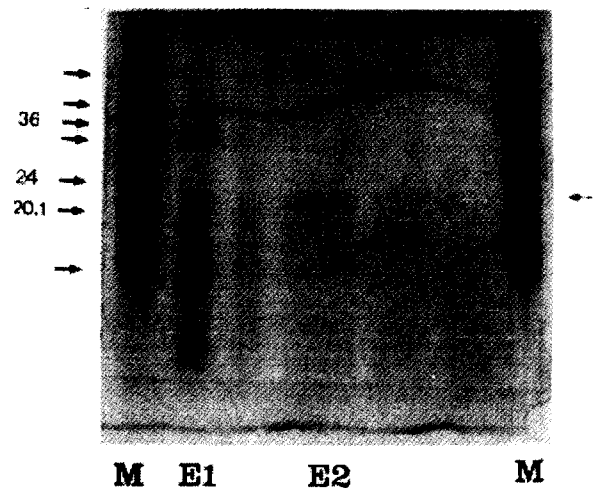


Fig. 4. Identification of purified of α -1,3 glucanase from *Streptomyces* sp. Y9343 by SDS-PAGE.

The reference proteins are

1. 66 kD: Bovine albumin
2. 45 kD: Egg albumin
3. 36 kD: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
4. 29 kD: Carbonic anhydrase
5. 24 kD: Trypsinogen
6. 20.1 kD: Trypsin inhibitor
7. 14.2 kD: α -lactalbumin

E1: Precipitate by 30~70% (NH₄)₂SO₄

E2: α -1,3 glucanase after Sephadex G-75 filtration

수율을 보였다(Table 2). 이와 같은 연속적 column chromatography에 의해 정제한 α -1,3 glucanase의 순도를 알아보기 위하여 10% SDS-PAGE를 행한 결과(Fig. 4), 단일 밴드임을 확인하였으나, subunit가 한개인 지는 확인되지 않았다.

분자량 측정

정제된 α -1,3 glucanase의 분자량을 측정하기 위해 Laemmli 방법(27)에 의한 SDS-PAGE를 이용하여 표준 단백질과 분자량을 비교한 결과(Fig. 5), *Streptomyces* sp. Y9343의 α -1,3 glucanase의 분자량은 22.5 kDa이었다. 이는 Imai 등(15)의 *Streptomyces* sp KI-8이 생산하는 α -1,3 glucanase의 분자량이 78 kDa, Hasegawa 등(12)의

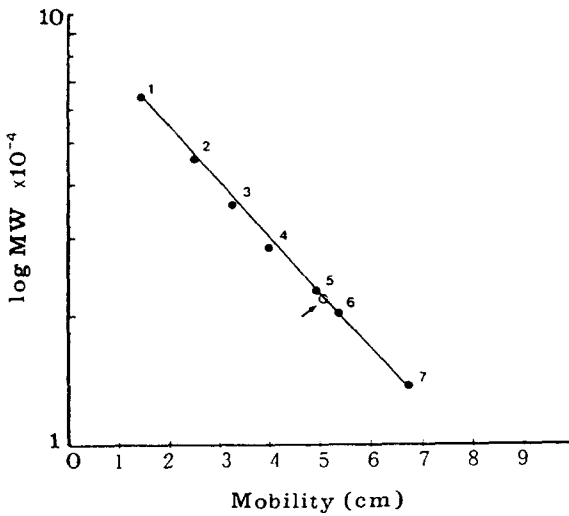


Fig. 5. Determination of the molecular weight of α -1,3 glucanase by SDS-PAGE (10%).

The reference proteins are

1. 66 kD: Bovine albumin
2. 45 kD: Egg albumin
3. 36 kD: Glycerdehyde-3-phosphate dehydrogenase
4. 29 kD: Carbonic anhydrogenase
5. 24 kD: Trysinogen
6. 20.1 kD: Trypsin inhibitor
7. 14.2 kD: α -lactalbunin

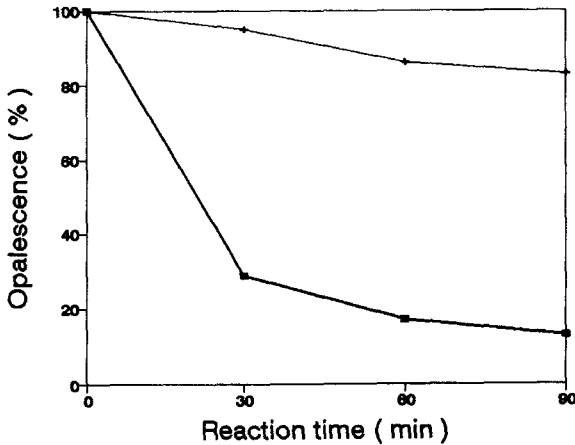


Fig. 6. Loss of opalescence of α -1,3 glucanase and insoluble glucan solution.

-■- α -1,3 glucanase, -+- Dextranase

47 kDa과는 분자량에서 큰 차이를 보였다.

α -1,3 glucanase의 활성

정제된 α -1,3 glucanase는 30분 경과 후 약 71%의 불용성 glucan을 분해하였고 60분 경과 후에는 약 83%의 불용성 glucan을 분해하였다. 한편, 시판 dextranase(L사)는 효소의 역가가 30분 경과 후 약 5%의 불용성 glucan을 60분 경과 후에는 약 14% 만의 IG를 분해하는데 그쳤다

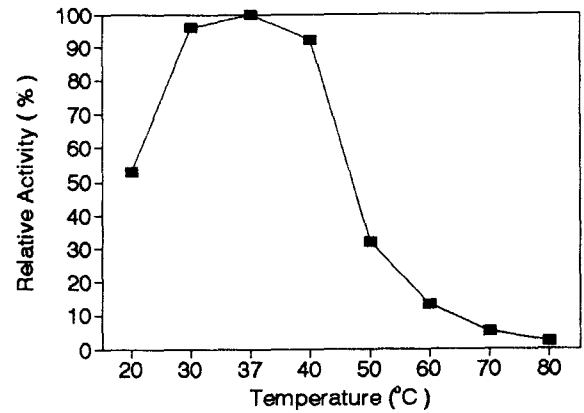


Fig. 7. Effect of temperature on the activity of α -1,3 glucanase from *Streptomyces* sp. Y9343.

(Fig. 6). 또한 Sun 등(31)의 24시간, Zonneveld 등(19)의 3시간의 활성도 측정시간보다 효소의 활성 측정시간을 30~60분 내로 단축하였으며, 이는 효소의 활성이 그만큼 높았기 때문이라고 여겨진다. 정제된 α -1,3 glucanase의 비활성은 7840.0 U/mg이었고 조효소보다 32.1배 증가하였다(Table 2). 효소의 정제도는 Hasegawa 등(12)의 *Trichoderma viride*에서 생산되는 α -1,3 glucanase의 63배의 정제도 보다는 다소 낮았으나, Walker 등(32)의 14.4배 보다는 높았다.

α -1,3 glucanase의 특성

본 균주가 생산하는 α -1,3 glucanase의 최적반응온도를 측정한 결과, 30~40°C에서 효소의 높은 활성을 나타내었으며 37°C에서 최적활성을 보였다(Fig. 7). 이는 Tsunoda 등(13)이 보고한 *Cladosporium resinae*에서 분리한 α -1,3 glucanase의 최적온도 30°C와 Zonneveld 등(19)이 보고한 *Aspergillus nidulans*에서 분리한 α -1,3 glucanase, Inoue 등(33)의 *Streptomyces*로 부터 분리한 불용성다당 분해효소(water insoluble polyglucan hydrolase)의 최적온도가 37°C라는 보고와 일치하였다. 그리고 Hasegawa 등(12)의 *Trichoderma viride*에서 분리한 α -1,3 glucanase의 최적온도 50°C보다는 낮았다.

최적반응 pH를 측정한 결과 pH 6.5에서 효소의 최적 pH를 나타내었다(Fig. 8). 또한 pH 6.0~7.0에서도 90% 이상의 효소활성을 보였으며 알카리에 비하여 산성에서 비교적 효소의 활성이 높았다. 이는 Inoue 등(33)의 *Streptomyces*로 부터 분리한 불용성다당 분해효소의 최적 pH가 pH 7.0이었다는 보고와 유사하였으나, Sun 등(31)의 pH 5.0~5.5, Tsunoda 등(13)의 pH 4.5, Zonneveld 등(19)의 pH 5.0~6.2, Hasegawa(12) 등의 pH 4.5에서의 최대 활성과는 다르게 나타났다.

열에 대한 안정성 조사하기 위하여 20~80°C까지 각각의 온도에서 30분간 열처리 시킨 후 그 잔존활성을 측정한 결과, 40°C까지 100%의 활성을 유지하였고 60°C에

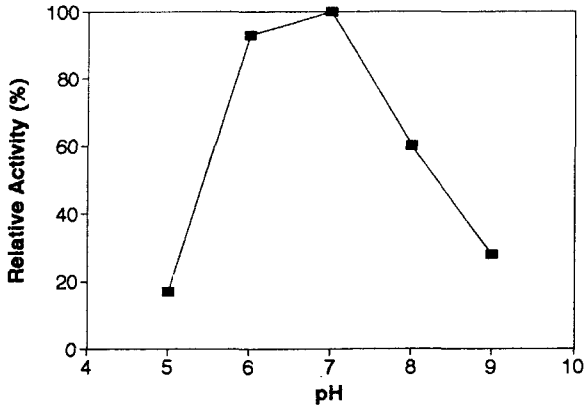


Fig. 8. Effect of pH on the activity of α -1,3 glucanase. Enzyme activity was measured at 37°C, 30 mins in various pH ranges.

pH 5.0: 0.05M sodium acetate buffer
 pH 6.0~7.0: 0.05M sodium phosphate buffer
 pH 8.0~9.0: 0.05M Tris buffer

Table 3. Effects of metal ions on the activity of α -1,3 glucanase from *Streptomyces* sp. Y9343.

Ion	Metal	Relative activity (%)
Control	--	100.0
Mn ²⁺	MnSO ₄ ·H ₂ O	169.7
K ⁺	K ₂ SO ₄	133.3
Ca ²⁺	CaCO ₃	133.3
Co ²⁺	CoSO ₄ ·7H ₂ O	181.8
Cu ²⁺	CuSO ₄ ·5H ₂ O	109.1
Mg ²⁺	MgSO ₄ ·7H ₂ O	139.4
Fe ²⁺	FeSO ₄ ·7H ₂ O	118.2
Na ⁺	NaCl	133.3
Ba ²⁺	BaCl ₂ ·2H ₂ O	133.3
Zn ²⁺	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	87.9
Hg ²⁺	HgCl ₂	6.7

The reaction mixture, consisted of 0.2 ml enzyme solution and 0.2 ml metal ion solution (10 mM), was incubated at 37°C for 1 hour and the residual activities were assayed.

서도 80%의 효소활성을 유지하였다. 그러나 70°C에서는 급격히 활성이 감소되어 약 30%의 활성만 유지되었다. 이는 Tsunoda 등(13)이 보고한 *Cladosporium resinae*에서 분리한 α -1,3 glucanase가 47°C까지 안정성을 유지하였다는 것보다도 열에 대한 안정성이 높았다. 그러므로 본 효소가 세척제등 산업적으로 이용되어질 경우 열에 의한 효소활성의 저해는 크게 우려되지 않을 것이라고 사료된다.

각종 금속이온의 영향

본 균주가 생산하는 α -1,3 glucanase 의 효소활성에

Table 4. Effect of various cocentrations of metal ions on the activity of α -1,3 glucanase from *Streptomyces* sp. Y9343

CONC.	Relative activity (%)		
	Co ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺
0	100.00	100.00	100.00
0.2 mM	102.70	97.30	94.59
0.4 mM	181.82	169.70	139.39
0.8 mM	118.91	116.22	108.10
2.0 mM	110.81	62.16	113.51
4.0 mM	108.10	8.11	113.51

Table 5. Effect of various detergents on α -1,3 glucanase activity from *Streptomyces* sp. Y9343

Detergent	Relative activity (%)
none	100.00
1% SDS	19.67
2% SDS	17.78
5% SDS	16.67
1% Tween 20	75.67
2% Tween 20	72.34
5% Tween 20	70.25

미치는 각종 금속이온의 영향을 검토하기 위하여 pH 7.0 인 증류수에 10 mM의 각종 금속이온 용액을 제조한 후, 이 용액 0.2 ml에 같은 양의 정제된 효소액을 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 방치한 다음, 효소활성을 측정하였다(Table 3). 그 결과, 본 효소는 Co²⁺, Mn²⁺ 등에 의하여 각각 181.8%, 169.7%의 활성이 가장 많이 촉진되었으며 K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺ 등에 의해서는 활성이 다소 증대되었으나, Cu²⁺, Zn²⁺ 등에 의하여 활성이 저해되었으며, Hg²⁺에 의해서는 급격한 활성저해가 관찰되었다. 이는 Hasegawa 등(12)이 보고한 *Trichoderma viride*에서 분리한 α -1,3 glucanase가 Co²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ 등에 의해서 활성이 촉진되며 Zn²⁺, Hg²⁺ 등에 의해 활성 저해 작용을 받는다고 한 것과 유사하였다. 또한 금속이온의 영향은 효소반응 초기속도를 크게 증진시키는 것으로 나타났다.

금속이온의 농도에 의한 효소활성에 미치는 영향을 30 분간 반응 후 측정된 결과, 10 mM일 때 Co²⁺가 181.82%, Mn²⁺이 169.70% 그리고, Mg²⁺가 139.39%로 최적이온 농도를 나타냈으며, 높은 농도에서는 오히려 활성이 저하되는 것을 알 수 있었다(Table 4).

Detergent의 영향

Detergent가 본효소 활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 SDS와 Tween 20을 각각 1, 2, 5% 되게 0.5 ml 효소액에 동량 첨가시키고 30°C에서 30분간 전처리한 후 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 농도에 관계없이 SDS가 약 83%, Tween 20에 의해서 약 27%의 활성저해가 관

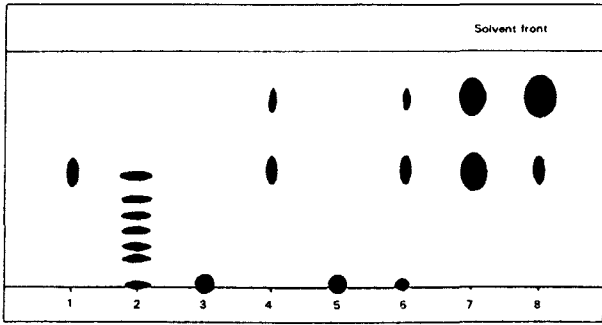


Fig. 9. TLC chromatogram of hydrolysates from insoluble glucan with α -1,3 glucanase from *Streptomyces* sp. Y9343 according to the reaction time.

1. Glucose
 2. Hydrolysis of soluble starch by α -amylase
 3. Insoluble glucan (IG)
 4. Hydrolysis of IG by conc. HCl
 5. IG + α -1,3 glucanase after zero time
 6. IG + α -1,3 glucanase after 40 times
 7. IG + α -1,3 glucanase after 120 times
 8. IG + α -1,3 glucanase after 1 day
- Silica gel-coated TLC plate (Kiesel60, Merck, Sweden)
 Development solvent: n-butanol:acetic acid:water [30:10:10, (v/v/v)]
 Location solution: 30% H₂SO₄

찰되었다(Table 5). 그러므로 본 효소는 SDS에 의해 강하게 활성이 저해되나, Tween 20에는 크게 영향을 받지 않으므로 이 효소를 구강용품에 사용할 경우 Tween 20을 detergent로서 사용하는 것이 효과적이라고 사료된다. 이는 Takeuchi 등(34)이 보고한 *Streptomyces nigrifaciens* ISP 5071로부터 분리한 α -1,3 glucanohydrolase가 SDS에 의하여 강하게 활성을 저해받고 Tween 80에 의해 영향을 받지 않는다는 보고와 유사하였다.

불용성 glucan 가수분해 산물의 TLC 분석

5% 불용성 glucan 기질 용액 5 ml에 조효소액 0.5 ml을 가하고 37°C에서 0분, 40분, 120분, 24시간 반응시킨 후 끓는 물에서 10분간 가열하여 반응을 정지시킨 다음 TLC를 이용하여 그 성분을 분석하였다(Fig. 9). 그 결과, 시간이 지날수록 glucose의 양은 증가되어 지다가 어느 정도의 시간이 경과되 감소되는 것과 glucose 위치 부분보다 윗 부분의 분해산물이 증가되어 나타나는 것이 관찰되어 졌는데, 이는 glucose가 계속 산화되어 유기산 등이 나타나는 것으로 여겨져 IG의 분해대사 과정이 더욱 연구되어야 한다고 사료된다.

탄소원이 효소활성과 수율에 미치는 영향

효소생산 및 활성에 미치는 탄소원의 영향을 알아보기 위하여 Dextarch 액체 배지조성 중에서 탄소원을 1% (w/v)의 starch, glucose, IG로 하였고, inducer로써 IG

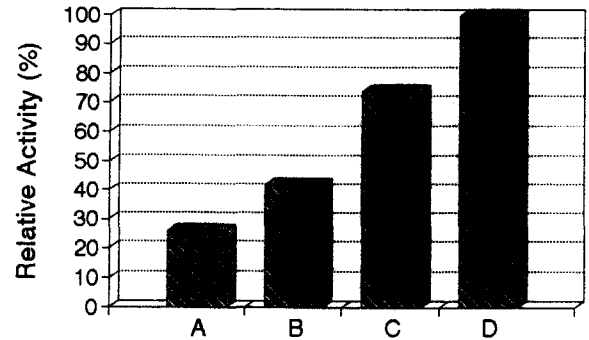


Fig. 10. Effect of various carbon source on the activity of α -1,3 glucanase from *Streptomyces* sp. Y9343.

A: Starch (1%), B: Glucose (1%), C: Insoluble glucan (1%), D: A (1%) + C (0.5%)

0.5%(w/v)를 1% starch 배지에 첨가하여 실험하였다. 탄소원의 종류를 다르게 하여 첨가한 후 제조된 1L의 Dextarch 액체배지에 활성화 시킨 균을 10⁻²배 접종한 후 30°C에서 5일간 진탕배양하여 효소생산과 활성에 미치는 영향을 검토하였다. Starch, glucose, IG을 각각 탄소원으로 사용하였을 때보다 1% soluble starch와 inducer로써 0.5% IG을 함께 첨가하였을 때에 효소활성이 가장 증대되었다(Fig. 10). 따라서 이 균주는 IG만이 탄소원으로 존재할 경우에는 균체의 증식이 적어 분비되어지는 효소의 양도 그 만큼 적게되었고 효소의 활성도 감소되었다고 생각되었다. 그러나 1% soluble starch와 inducer로써 0.5% IG을 함께 첨가하였을 때에는 균체가 starch를 먼저 분해하여 균체량을 증가시키고 나서 starch가 고갈되면 IG를 이용하게 되므로 효소의 분비양과 활성이 증대되는 것으로 여겨졌다. 이는 Imai 등(15)의 *Streptomyces* sp KI-8로부터 분리한 α -1,3 glucanase의 생산 조건에서 탄소원의 major linkage가 α -1,3일 경우에는 α -1,3 glucanase 생성에 inducer로 작용하여 안정된 효소의 분비를 나타낸다고 하는 보고와 유사하였다.

α -1,3 glucanase의 반응속도론(V_{max} , K_m)

불용성 glucan의 농도에 따른 *Streptomyces* sp. Y9343 이 생산한 α -1,3 glucanase의 Michaelis 정수(K_m)와 V_{max} 를 Lineweaver-Burk의 작도법으로 구한 결과, 이 α -1,3 glucanase의 불용성 glucan에 대한 K_m 값은 2.50 mM이었고, V_{max} 는 0.0431 mM/min이었다(Fig. 11). 이는 Hasegawa 등(12)이 보고한 *Trichoderma viride*에서 분리한 α -1,3 glucanase의 K_m 값 4.06 × 10⁻²M과 Tsunoda 등(13)의 α -1,3 glucanase의 K_m 값은 13.0 mM이라는 보고보다 낮아서 본 효소는 IG에 친화력이 높고 활성이 큰 효소임이 밝혀졌다.

각종 다당류 분해도

IG을 비롯하여 raw starch, soluble starch, dextran

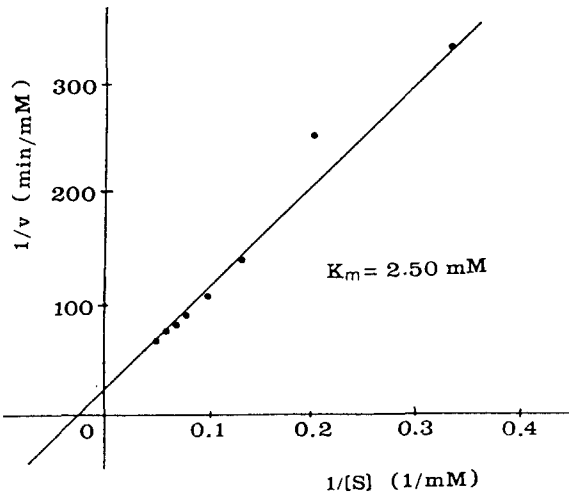


Fig. 11. Lineweaver-Burk plot on the reaction rate of the α -1,3 glucanase.
 α -1,3 glucanase concentration: 1.0, 1.7, 2.5, 3.4, 4.2, 5.0, 5.8, 6.7, mM
 Temperature: 30°C, Time: 30 mins, pH: 6.5

Table 6. Substrate specificity of α -1,3 glucanase from *Streptomyces* sp. Y9343

Enzyme	Substrate	Relative activity (%)
α -1,3 glucanase	IG	73.0
	Raw starch	16.1
	Soluble starch	100.0
	Dextran T-10	34.2
α -amylase	IG	15.1
	Raw starch	71.5
	Soluble starch	100.0
	Dextran T-10	13.6
Dextranase	IG	14.0
	Dextran T-10	100.0

IG: Insoluble glucan

T-10(M.W. 70,000)등 각종 glucose 중합체의 분해정도를 pH 6.5, 37°C에서 30분간 α -1,3 glucanase와 반응 후 α -1,3 glucanase의 다당류 분해도를 조사하였다. 그 결과 soluble starch와 IG에는 100%, 73%의 높은 분해력을 보였으나 나머지 기질에 대해서는 낮은 분해력을 보였으며, α -1,4 결합의 starch를 완전 분해하는 것은 α -1,3 glucanase의 특성(12)인 것과 잘 일치 하였다(Table 6). 한편, α -amylase에 의한 IG 및 dextran T-10의 분해도는 각각 15% 및 14% 정도로 매우 낮았으나, soluble starch와 raw starch의 분해력은 매우 높았고, 시판 dextranase는 IG를 14% 만을 분해 했으나 dextran T-10은 완전 분해됨을 나타내어, α -1,3 결합이 주된 결합인 IG, α -1,4

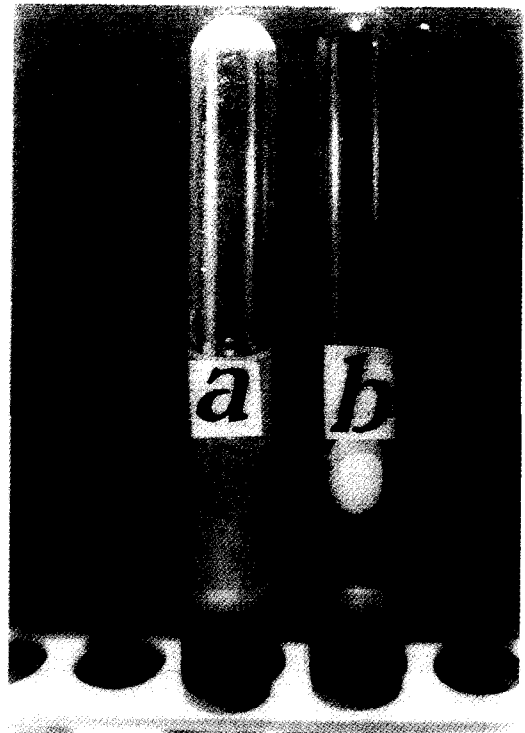


Fig. 12. Effect of α -1,3 glucanase on adhesive glucan from *S. mutans*.
 a: Adhesive glucan on glass tube wall by incubation in TH medium with 5% sucrose at 37°C
 b: Treatment of α -1,3 glucanase from *Streptomyces* sp. Y9343 in tube a after 3 hours, 37°C

결합과 α -1,6 결합이 혼합된 raw starch, α -1,4 결합이 주된 결합인 soluble starch 및 α -1,6 결합이 주된 결합인 dextran T-10에 대한 각각의 효소들의 기질특이성이 다르다는 것을 나타내었다. 따라서 이 α -1,3 glucanase는 충치의 주요 원인균인 *S. mutans*가 생성하여 초기 충치의 원인이 되는 IG을 분해하는 능력이 탁월하므로, 동물 및 임상 실험을 계속하여 세치제 또는 식품 등에 첨가하여 치아우식예방에 효과가 뛰어난 구강환경위생 용품을 개발할 수 있다고 기대된다.

인조 치면세균막 분해도

*S. mutans*를 5% sucrose가 함유된 TH 배지에 100 μ l (10 cells/ml)를 접종하여 12시간 배양시켜 시험관 벽에 *S. mutans*와 불용성 glucan의 복합체인 인조 치면세균막을 형성 시킨 후, 이 plaque를 증류수로 2회 세척하였다. 여기에 *Streptomyces* sp. Y9343에서 추출한 1 ml α -1,3 glucanase(2,200 unit)와 2 ml 0.05M sodium phosphate 완충용액(pH 6.5)을 처리한 결과, 2시간 후에 Fig. 12와 같이 시험관벽에 부착된 치면세균막이 완전히 분해되어 투명하게 된 것을 보여주고 있다. 이것은 Takehara 등(16)이 *Streptomyces chartreusis* strain F2에서 얻은 endo- α -glucanase가 cell-free GTase에 의하여 형

성된 glass film을 제거시키지 못하고 glucan film의 형성만을 억제한 결과와는 다르게 나타났다.

요 약

치면세균막을 제거하거나 형성을 억제하여 치아우식증 예방제를 개발할 목적으로 α -1,3 glucanase를 분리하는 새로운 균주로 부터 분리 정제하여 그 특성을 조사하였다. 불용성 glucan을 유일탄소원으로 하는 agar plate를 제조하여 토양으로 부터 α -1,3 glucanase 분리균주를 탐색한 결과 *Streptomyces* sp. Y9343을 얻었다. 액체배양시 최적 효소생산조건은 탄소원으로 1% soluble starch와 inducer로 0.5% insoluble glucan을 첨가하였을 때 가장 효율적이었다. α -1,3 glucanase는 황산암모늄 염석, DEAE-Cellulose 이온교환 크로마토그래피, Sephadex G-75 겔 여과 등에 의하여 32.1배까지 정제되었고 수율은 0.53%이었으며, 이 때의 활성도는 7840.0 U/mg protein이었다. 정제된 α -1,3 glucanase를 SDS-PAGE로 분석한 결과, 단일체임을 확인하였으며, 이 때 분자량은 22,500이었다. 효소의 최적 pH는 6.5이었다. 효소의 최적온도는 37°C이었고, 열에 대한 안정성은 70°C 이상에서 40%~60%의 효소활성이 상실함을 보였다. Detergent의 영향은 SDS에 의해 83%, Tween 20에 의해서는 약 27% 정도의 활성저해를 받았다. 효소활성의 금속이온에 의한 영향은 Co^{2+} , Mn^{2+} 에 의해 각각 81.8, 69.7%의 활성의 증가를 보였고 이들의 최적농도는 10 mM이었으며, 반면에 Hg^{2+} 에 의해서는 93.9%의 효소활성의 저해를 나타내었다. 또한 효소반응 초기속도(30분 이내)에 금속이온에 의한 영향이 큰 것으로 나타났다. α -1,3 glucanase의 불용성 glucan에 대한 K_m 값은 2.50 mM이었고, V_{max} 는 0.0431 mM/min이었다. α -1,3 glucanase의 기질특이성을 조사한 결과, 반응 30분 후 IG와 soluble starch에는 각각 73, 100%의 높은 분해력을 보였으며, raw starch, dextran T-10에 대해서는 낮은 분해력을 보였다. 한편, 인조치면세균막을 *S. mutans*로부터 시험관 벽에 제조한 후, α -1,3 glucanase를 처리한 결과 2시간 이내에 완전히 분해 제거되는 것을 알 수 있어 강력한 치아우식예방제로 개발될 수 있음을 보여 주었다.

참고문헌

1. Okami, Y., O. Takasi and O. Yoshiro. 1982. The structure of Ribocitrin and its structure-activity relationship in the inhibition of dextransucrase of *Streptococcus mutans* E 49. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 2449-2456.
2. Nagada, K. and T. Akira. 1982. The effects of daily mouth rinsing with galactose on dental plaque formation. *일본구강위생학잡지* **32**: 104-107.
3. Hunter, L. and M. Addy. 1987. Chlorohexidine gluconate mouthwash in the management minor aphthous

- ulceration. *Brit. Dent. J.* **162**: 106-110.
4. Okami, Y. and M. Takashio. 1982. Screening of a dextransucrase inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1457-1464.
5. T. Koga. 1974. Effect of a glucosyltransferase inhibitor on glucan synthesis and cellular adherence of *Streptococcus mutans*. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 882-886.
6. Bowen, W.H. 1971. The effect of dextranase on caries activity in monkeys (*Macaca*). *Br. Dent. J.* **131**: 445-449.
7. Caldwell, R.C., C.H.J. Sandham, W.Y. Mann, S.B. Finn and A.J. Formicola. 1971. The effect of a dextranase mouthwash on dental plaque in young adults and children. *J. Am. Dent. Assoc.* **82**: 124-131.
8. Ebisu, S., K. Kato, S. Kotari and A. Misaki. 1975. Isolation and purification of flavobacterium α -1,3 glucanase hydrolizing, insoluble, sticky glucan of *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **124**: 1489-1501.
9. Hattori, A. and K. Ishibashj. 1981. Screening of dextranase producing microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 2347-2349.
10. Bowen, W.H. 1969. Effects of dextranase on cariogenic and non-cariogenic dextrans. *Brit. Dent. J.* **124**: 347-349.
11. Fitzgerald, R.J., D.M. Spinell and T.H. Stoudt. 1968. Enzymatic removal of artificial plaque. *Arch. Oral Biol.* **13**: 125-128.
12. Hasegawa, S. and J.H. Nordin. 1969. Purification and properties of an endo- α -D-(1-3)-glucanase from *Trichoderma viride*. *J. Biochem.* **224**: 5460-5470.
13. Tsunoda, A., Y. Sakano and T. Kobayashi. 1978. Purification and properties of an Exo- α -1,3-glucanase from *Cladosporium resinae*. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 1045-1053.
14. Guggenheim, B., B. Regolati and H.R. Muhlemann. 1972. Caries and plaque inhibition by mutanase in rats. *Caries Res.* **6**: 289-297.
15. Imai, K., T. Kikuta, M. Kobayashi and K. Matsuda. 1977. An α -1,3-glucanase from *Streptomyces* sp. KI-8 production and purification. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 1339-1346.
16. Takehara, T. and M. Inoue. 1981. Inhibitory effects of endo- α -1,3-glucanase on glucan film formation and glucan synthesis by the glucosyltransferase of the oral bacterium *Streptococcus mutans*. *Archs. Oral. Biol.* **26**: 217-222.
17. Nordin, J.H. and K.K. Tung. 1968. Structure of the tetrasaccharide produced by the hydrolysis of Nigeran by the enzyme mycodextranase. *Biochim. Biophys. Acta.* **158**: 154-156.
18. Bacon, J.S.D. D. Jones, V.C. Farnen and D.M. Webley. 1968. The occurrence of α -1,3 glucan in *Cryptococcus*, *Schizosaccharomyces* and polyporus species and its hydrolysis by a *Streptomyces* culture filtrate lysing cell walls of *Cryptococcus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **158**: 313-315.
19. Zonneveld, B.J.M. 1971. A new type of enzyme, an exospilting α -1,3 glucanase from non-induced cultures of *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **258**: 541-547.
20. Bailey, R.W. and R.T.J. Clarke. 1958. A Bacterial dextranase. *J. Biochem.* **72**: 49-54.
21. 김성주. 1993. *Streptomyces* sp. SW403이 생산하는 齒面

- 細菌膜 分解酵素의 精製와 特性. 수원대학교 석사학위 졸업논문. 21-25.
22. Buchman, R.E. and K.K. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed., The Williams Wilkins Co. Baltimore, U.S.A.
 23. Lechevalier, M.P. and Lechevahier. 1970. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**: 435.
 24. Yoon, J.W., H.S. Cho, S.J. Kim and H.S. Moon. 1992. Study on the mass production of insoluble glucan by immobilization of *S. mutans*. *J. Korea Acad. Dent. Health* **16**: 392-399.
 25. 윤정원, 조효상, 허태련. 1993. 치면세균막 분해효소인 α -1,3 glucanase를 생산하는 미생물의 분리 및 효소 특성. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 263-268.
 26. Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
 27. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. **227**: 680-685.
 28. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.I. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265.
 29. Joseph, I.S. and G.D. Roberts. 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin layer chromatography. *Appl. Microbiol.* **28**: 226-231.
 30. Williams, S.T. and M.E. Sharpe. 1989. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 4, Williams & Wilkins.
 31. Sun Jinwu, Cheng Xiulan, Yan Zizheng, Zhu Meifang and Zhang Shuzheng. 1988. Screening of Dextranase producing strains and comparison of their enzymatic properties. *Acta. Microbiologica. Sinica.* **28**: 45-55.
 32. Walker, G.J., M.D. Hare and J.G.M. Jones. 1982. Effect of variation in growth conditions on endo-dextranase production by *Streptococcus mutans*. *Carbohydr. Res.* **107**: 111-122.
 33. Inoue, M., T. Egami, K. Yokogawa, H. Kotami and T. Morioka. 1975. Isolation, Identification and some cultural conditions of *Streptomyces* species that produced water-insoluble polyglucan hydrolase. *Agric. Biol. Chem.* **39**: 1391-1400.
 34. Takeuchi S. 1976. Degradative enzymes of insoluble glucans produced by *Streptococcus mutans*. *日齒周誌* **18**: 32-41.

(Received 14 September 1995)