

酵母細胞壁 溶解酵素의 미생물 生産

姜 淳 英 · 李 瑞 來 · 李 春 寧*

韓國原子力研究所 · *서울대학교 農科大學

(1977년 1월 31일 수리)

Microbial Production of Yeast Cell Wall Lytic Enzymes

by

Soon-Young Kang, Su-Rae Lee and Chun-Yung Lee*

Korea Atomic Energy Research Institute, Seoul and *Seoul National University, Suwon

(Received January 31, 1977)

Abstract

- 1) In order to obtain a microbial strain having a strong yeast cell wall lytic activity, about 156 isolates capable of forming clear zones on baker's yeast-peptone-bouillon agar plate were obtained from soil, mud and water samples and a strain K-42 with the highest lytic activity was identified as *Bacillus circulans*.
- 2) Effect of carbon sources on the lytic enzyme production by the K-42 strain was in the decreasing order of maltose > glucan > xylose > control in 2-day culture and of lactose > galactose > glucan > control in 3-day culture. Effect of inorganic nitrogen sources was in the decreasing order of ammonium acetate > sodium nitrate > control in 2-day culture and of ammonium chloride > ammonium oxalate > control in 3-day culture, whereas organic nitrogen sources except milk casein showed an increase in 2-day culture and a decrease in 3-day culture. Synergistic effect of carbon sources and nitrogen sources was not observed.
- 3) The enzyme production by the K-42 strain was greatly affected by pH change of the culture medium, thus a high lytic activity could be maintained by keeping the pH range of 7~8 and adding carbon or nitrogen sources.
- 4) Optimum conditions for the lytic activity of the K-42 strain were obtained at pH 7~8 and 60°C and the extent of hydrolysis toward heated yeast cell wall was 65%.

서 론

酵母細胞壁은 효모세포를 둘러싸고 있으며 그의 기계적인 堅固性과 화학적인 安定性으로 인하여 효모 고유의 형태를 주는 동시에 삼투압에 의한 균체 파열을 방지하여 생리적으로 활성있는 내부구조를 보호하는 역할을 담당하고 있다. 이러한 효모 세포벽을 용해

하는 효소에 대하여는 1914년 Giaja¹⁾가 달팽이(*Helix pomatia*)에서 분비되는 消化液에서 발견한 이래 여러 가지 관점에서 중요한 의의를 지니고 있으며 또한 연구되어 왔다.

첫째로는 식량난 해결을 위하여 최근 개발연구가 활발히 진행되고 있는 단세포 단백질인 효모세포로부터 영양食品 및 調味料 생산을 위한 공업적인 이용 가능성이 있다.²⁾ 둘째로는 효소분해의 特異性에 의한 다당류

및 세포벽 構造解明에의 이용이며⁸⁻⁷⁾, 세포로는 植物용
몬의 作用機作 해명에의 이용가능성이다.⁸⁾

세포벽 용해효소를 얻는 방법으로는 일찌기 Giaja에
의하여 달팽이의 소화액이 알려져 있으나 대량으로 구
득하기는 어렵다. 따라서 그 급원을 미생물에서 찾기
시작하였는데 현재까지 그 溶解能이 우수한 균주로 알
려진 것들로는, *Micrococcus* sp.,¹⁰⁾ *Pseudomonas* sp.,¹⁰⁾
*Bacillus circulans*¹⁰⁻¹²⁾, *Micromonospora chalcone*¹³⁾,
*Cytophaga johnsonii*¹⁴⁾, *Streptomyces albidoflavus*¹⁵⁾,
Streptomyces sp.^{11,16-18)}, *Sclerotinia libertiana*¹⁹⁾, *Rhi-*
zopus sp.²⁰⁾, *Coprinus*²¹⁾, *Trichoderma*²²⁾ 등이 있다.

효모세포벽 용해효소에 관한 여러 연구결과^{10,11,14,16,}
^{20,23-27)}에 의하면 (1) 효모세포벽의 용해는 여러 효소
의 복합작용으로 이루어지는데 주로 β-1,3-glucanase를
중심으로 β-1,6-glucanase, mannase, protease 및 phos-
phomannase등이 보조역할을 하며, alkali처리, 가열
처리, thiol처리도 그 보조역할을 할 수 있다. (2) 생
酵母의 세포벽 용해는 완전 분해가 불가능하다. (3) 효
모세포벽은 효모의 종류, 증식과정, 배지성분등에 의
해 그 조성 및 구조에 차이가 생기며 효소에 의한 용해
능에도 차이가 생긴다는 것이다.

이러한 세포벽에 대한 미생물학적인 기초연구에 비
하여 營養食品 및 調味料 생산에서의 효모의 공업적 이
용을 위한 연구보고는 그 수가 매우 적은 형편이며 연
구범위도 효모세포벽의 분해능이 높은 균주분리 및 배
양조건의 선정이라는 범위에서 벗어나지 못하고 있다.
그러나 국내에서는 이에 대한 연구를 전혀 찾아볼 수
없다.

따라서 본 연구는 주로 醱酵 및 食品공업에의 이용
가능성을 추구하기 위하여 효모세포벽의 溶解能이 높
은 세균류를 토양 및 下水에서 분리하여 선발, 동정하
고 이 선발된 菌株의 배양 적정조건 및 그 특성에 대
하여 검토하였으므로 이에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

1. 우수균주의 選拔 및 同定方法

1) 균분리 및 1차 선발

서울 및 경기지방에서 수집한 토양, 泥土 및 下水 등
67점에서 Yamamoto & Nagasaki²⁸⁾의 방법에 준하여 효
모세포벽 溶解活性이 있는 미생물을 1차선발하였다. 즉
시료 1g 또는 1ml를 시험관에 넣고 살균수 10ml를
가하여 흔들어 현탁액을 만든 후 peptone-bouillon-yeast
agar 배지(1% peptone, 1% beef extract, 2% baker's
yeast, 2% agar, pH 7.0)상에 백금이로 선을 그었다.

그후 30°C에서 2~3일 배양한 후, 투명하게 용해된 부
위를 형성한 聚落을 선발하였다. 이에서 다시 현탁액
을 만든 후 새로운 平板배지에서 용해활성을 가지는 외
관이 다른 취락을 각각 분리하였고, 선발하려는 균주
가 순수하게 될 때까지 연속적으로 희석분리를 5회 반
복하였다. 이와 같이 분리된 균주는 peptone-bouillon-
yeast agar 배지에 보존하면서 2주에 한번씩 繼代하였
다.

2) 2차 선발

1차 선발에 의하여 분리된 균주는 基本培地(2%
baker's yeast, 0.5% K₂HPO₄, 0.1% MgSO₄·7H₂O,
pH 7.0)로 30°C의 진탕배양기에서 2일간 배양하고, 여
과액에 대하여 용해활성을 측정하였다.

3) 우수균주의 同定

선발된 균주의 同定은 Bergey's Manual of Deter-
minative Bacteriology²⁹⁾와 The Genus Bacillus³⁰⁾에 준
하여 실시하였다.

2. 溶解活性의 측정방법

용해활성(LA)의 측정에는 Yokotsuka 등^{15,31)}의 방법
에 준하였다. 즉, 100 ml 삼각후라스크에서 M/15 phosphate
buffer (pH 7.0) 10 ml에 열처리 효모세포현탁액(파장
660 nm에서 흡광도 0.7로 조정) 2.5 ml를 혼합한 후, 배
양여액 2.5 ml를 첨가하여 37°C 水浴중에서 90분간 진
탕(60 rev/min)하면서 반응시켰다. 효소반응액에 대하
여 파장 660 nm에서의 흡광도를 spectronic-20 spectro-
photometer에 의하여 측정하고 다음과 같이 LA를 계산
하였다.

$$\text{Lytic activity (LA)} = \frac{do-dt}{do-dE} \times 100$$

여기서

do : 반응시간 0에서 반응혼합물의 흡광도

dt : 반응시간 t(90분)에서 반응혼합물의 흡광도

dE : 열처리효모 현탁액 대신에 물을 첨가한 반응
혼합물의 흡광도(이 반응 혼합물에서 시간적 변
화는 일반적으로 무시하여 측정)

LA는 40에 도달할때까지 효소량에 정비례하였고 그 이
상에서는 약간 떨어졌으나 실측치를 그대로 표현하였다.

3. 효소基質의 調製

1) 熱처리 酵母세포

열처리 효모세포 현탁액은 Yokotsuka 등³¹⁾의 방법
에 준하여 조제하였다. 즉, 제일표 baker's yeast 100 g을
물 1 L에 넣어 homogenizer(Virtis-45)로 현탁시킨 후
120°C에서 15분간 autoclave하였다. 이 열처리한 효모
를 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 침전물을 살균
수로 세번 세척하였다. 이상의 조제과정은 무균적으로

수행하였다.

2) 효모 glucan

효모 glucan의 조제는 Edwards 등³²⁾의 방법에 준하였다. 즉 baker's yeast(제일표) 6 kg에서 50 g의 정제 glucan을 얻었다.

4. 효소의 생산조건

Yamamoto & Nagasaki²⁸⁾의 방법에 준하였다. 즉 100 ml 삼각후라스크에 기본배지 20 ml를 넣고 살균한 후 선발균주를 한 백금이 접종하여 30°C의 항온진탕기 (80 rev/min)에서 배양하였다. 이 배양액을 8,000×G에서 10분간 원심분리한 후 상침액을 효소액으로 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 우수균주의 分離 및 同定

서울 및 경기지방에서 수집한 토양, 이토 및 하수등 67점의 시료로부터 yeast-peptone-bouillon agar 平板

Table 1. Lytic activity of isolates from nature

Range of lytic activity	Number of isolates
0~10	124
11~20	26
21~30	4
31~40	1
41~50	1
Total	156

Table 2. Morphological and cultural characteristics of the strain K-42

A. Morphological characters

1. Gram reaction: variable
2. Shape and size: rod, 0.9×3.5 μm
3. Motility: non-motile
4. Endospore: produced
5. Growth: aerobic

B. Cultural characters

1. Agar plate
 - a) Form: punctiform
 - b) Elevation: flat
 - c) Margin: erose
2. Agar stroke: echinulate
3. Agar stab: papillate
4. Broth culture: sediment

배지상에 투명하게 용해된 부위를 형성하는 156개의 균주를 1차 선발하였다. 이들 균주의 용해활성을 측정 한 결과는 Table 1과 같으며 그중 活性이 가장 큰 것으로 K-42균주를 최종 선발하였다.

분리 선발된 균주의 형태, 배양 및 생리적 특성은 Table 2, 3과 같다. 즉 Gram variable의 운동성이 없는桿菌으로서 포자를 형성하였고 호기적인 조건에서만 생장하며 catalase 생성 및 기타 생리적 특성으로 보아 *Bacillus circulans*로 同定하였다.

2. 효소의 生産條件

1) 배양일수의 영향

배양 일수에 따른 효소의 생성량을 알아보기 위해 선발된 두 균주 K-35, K-42를 6일간 배양 일수를 달리하여 LA를 측정 한 결과는 Fig. 1과 같다. 이에서 보는 바와 같이 배양 2~3일만에 최대를 나타내었고, 그 후부터는 감소하는 경향을 보였다. 특히 균주 K-42의 LA가 균주 K-35보다 월등하여 이 균주만을 동정하였으며 다음의 실험도 이 균주에 국한하였다. 균주 K-42의 LA와 pH는 배양 2일과 3일에 뚜렷한 차이를 보이므로 모든 조건은 2일과 3일을 기준으로 하여 동시에 비교 검토하였다. 이 기간중 LA의 변화는 2일째 최대로 되고, 3일째 급격히 감소하는데, pH가 상당한 영향을 미치는 것으로 생각되므로 효소활성 또는 생성과 균체 증식에 미치는 pH의 영향을 검토할 필요가 있다.

Yokotsuka 등³¹⁾이 선발한 균주의 LA를 보면 배양 2일

Table 3. Physiological characteristics of the strain K-42

Catalase: produced
Starch: hydrolyzed
Acid from glucose: positive
arabinose: positive
mannitol: positive
xylose: positive
Growth in anaerobic agar: no growth
Growth with 7% NaCl: growth
Voges-Proskauer test: negative
Methyl red test: negative
NO ₃ ⁻ to NO ₂ ⁻ : produced
Dihydroxy acetone: not produced
Phenylalanine deaminase: not produced
H ₂ S from ISI agar: not produced
Indole: not produced
Growth at 65°C: no growth

제 *Streptomyces achromogenes*는 60, *Gliocladium virens*는 48, *Trichoderma viride*는 30으로 최대를 나타내었다. 그리고 田端¹⁵이 선발한 *Streptomyces albidoflavus* 균주는 배양 3일째 LA 50으로 최대를 나타내었다. 이에 대하여 선발된 K-42균주는 기본배지에서도 배양 2

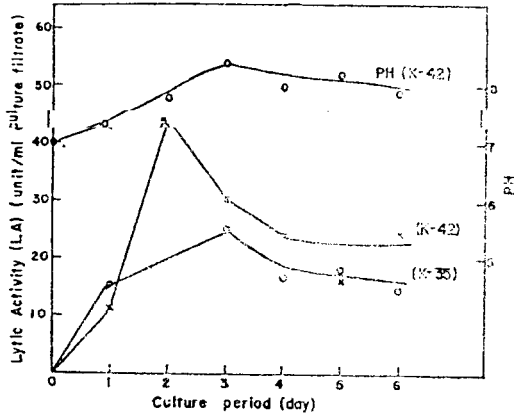


Fig. 1. Time courses of lytic enzyme production by two selected strains in a basal medium at 30°C.

Table 4. Effect of carbon sources on the lytic enzyme production and final pH by K-42 strain

Carbon source	Concn in medium (%)	2 days		3 days	
		LA	Final pH	LA	Final pH
Control	0	36	7.7	20	8.5
Maltose	1	56	6.8	38	7.2
Glucan	1	53	7.4	47	7.2
Glucan	0.2	33	7.4	48	7.5
Xylose	1	49	6.9	42	6.6
Starch	1	44	6.7	39	7.3
Rhamnose	1	42	6.8	9	5.6
Sucrose	1	40	6.9	30	5.9
Ribose	1	36	6.7	42	7.2
Lactose	1	32	7.0	48	6.4
Galactose	1	30	7.2	48	6.6
Starch	0.2	29	7.1	47	7.5
Sorbitol	1	24	5.9	46	6.8
Mannitol	1	19	5.4	9	5.4
Glucose	1	8	5.8	4	5.5
Mannose	1	0	6.1	0	5.4
Fructose	1	10	5.7	7	6.6

Basal medium: 2 g baker's yeast, 0.5 g K₂HPO₄, 0.1 g MgSO₄ · 7H₂O, per 100 ml water (pH 7.0). Culture: at 30°C.

일째 LA 44로서 비교적 효소 역가가 높은 균주라 하겠다.

2) 당류 첨가의 영향

당류는 미생물에 의한 세포벽 용해효소의 생산에 있어서 탄소원으로뿐만 아니라 inducer로서 사용될 수 있다는 것이 추정되고 있다. 따라서 15종의 탄수화물을 기본 배지에 첨가하여 2일과 3일간 배양했을 때 LA와 배지의 최종 pH를 보면 Table 4와 같다. LA에 있어서 배양 2일째 다당류와 이당류는 기본 배지인 control보다 증가를 보였고, 단당류는 오히려 상당한 감소를 보였다. 이는 K-42균주가 단당류에서 배양중 유기산은 생성하므로 pH가 감소한 결과 lytic enzyme의 생성이 억제된 것으로 추측된다. 3일째에도 역시 pH 5.4~6.0을 갖는 당류에서 상당한 LA의 감소를 나타내었다. 즉 K-42균주는 배양 2일째는 maltose, glucan, xylose 등의 순으로 3일째에는 lactose, galactose, glucan의 순으로 2당류 및 다당류의 첨가가 높은 LA를 나타내었는데 이것은 2당류 및 다당류들이 K-42균주 배양시 pH의 변화가 적어 pH 6.4~7.4를 유지하므로 높은 LA를 갖지 않나 추측된다(단 sucrose만 제외). 또 glucan과 전분의 농도를 달리하여 검토한 결과 큰 차이는 없었다.

한편 田端^{15,24}에 의하면 *Streptomyces albidoflavus*는 탄소원을 첨가하던 균체증식에는 유효하지만 효소의 생성에는 거의 효과가 없다고 보고하였는데 위의 당류들의 첨가로起因된 pH의 변화로 효소환성에 영향을 미치는 외에도 균체 증식에 영향을 주어 균체증식 부진으로 인한 효소생성의 감소라고도 추측된다. 그리하여 기본 배지에서 단당류 첨가인 경우 pH의 급격한 감소로 인하여 LA가 거의 없었으므로 기본 배지에서 물대신 M/15 phosphate buffer(pH 7.0)로 대체하여 단당류의 영향을 본 결과는 Table 5와 같다. 이에서 보는 바와 같이 단당류에서 pH를 임의로 조절하여 주면 control

Table 5. Effect of carbon sources on the lytic enzyme production and final pH by K-42 strain as grown in media with or without M/15 phosphate buffer (pH 7.0)

Carbon source	Concn in medium (%)	With buffer		Without buffer	
		LA	Final pH	LA	Final pH
Control	—	49	7.3	43	7.7
Glucose	1	43	6.0	8	5.8
Mannose	1	45	7.1	0	6.1
Fructose	1	48	7.1	7	5.6

Culture medium: the basal medium was made in water or M/15 phosphate buffer (pH 7.0). Culture: 2 days at 30°C.

과 비슷한 LA를 갖고 control보다 훨씬 낮게 계속 유지할 수 있었다. 이 결과는 田端 등^{15,24)}의 보고와 일치함을 알 수 있다.

3) 무기질소원 첨가의 영향

기본배지에 0.2%의 8가지 무기질소원을 첨가하여 2일과 3일간 배양하였을 때 LA와 최종 pH는 Table 6과 같다. 배양 2일째를 보면 ammonium acetate와 sodium nitrate는 control보다 높은 LA를 보여 주었으나 배양 3일째에는 pH의 증가와 함께 LA의 상당한 감소를 보여 주었다. Ammonium chloride, ammonium oxalate와 ammonium sulfate등은 배양 2일째는 control보다 낮은 LA를 보여 주었으나 배양 3일째 LA의 급격한 증가를 보여주었다. 이것은 무기질소원의 첨가로 기인되는 pH의 변화로 효소생성에 영향을 미친 것으로 생각된다. 그러나 urea는 sodium nitrate와 비슷한 pH를 유지하고 있으나 LA는 훨씬 뒤떨어졌다. 그리하여 기본배지에 몰대신 M/15 phosphate buffer(pH 7.0)로 pH를 조절하고 2일째 LA가 높았던 ammonium acetate, sodium nitrate를 선정하여 그 효과를 본 결과는 Table 7과 같다. 이에서 보여주는 바와 같이 LA는 2일째보다 오히려 3일째 약간 증가하였다. 그러므로 배양액을 pH 7로 조절하여 준다면 높은 LA를 거의 그대로 일정기간 유지할 수 있을 것으로 생각된다. 이상의 결과들은 田端 등¹⁵⁾의 실험 결과와 거의 일치함을 보여주었다.

4) 유기질소원 첨가의 영향

기본배지에 0.1%의 7가지 유기질소원을 첨가하여 2일과 3일간 배양하였을 때의 LA 및 최종 pH는 Table 8과 같다. 배양 2일째는 milk casein을 제외한 모든 유기질소원은 control보다 높은 LA를 보여주었다. 이는

milk casein만이 다른 유기질소원보다 훨씬 낮은 최종 pH를 나타냈기 때문이 아닌가 생각된다. 배양 3일째를 보면 모든 유기질소원이 control보다 높거나 또는 같은 pH를 갖고 LA도 급격한 감소를 보여주었다. 이것은 유기질소원 첨가 또는 기본 배지에서 기인되는 pH의 변화가 효소 생성에 영향을 미친 것으로 생각된다. 그러므로 기본배지의 몰대신 M/15 phosphate buffer(pH 7.0)로 pH를 조절하여 배양 2일째 LA가 높은 유기질소원인 tryptone과 peptone을 선정하여 효과를 본 결과는 Table 9와 같다.

이에서 보는 바와 같이 2일째 phosphate buffer 용액으로 된 기본배지에서 질소원을 첨가하지 않은 배지보다 tryptone을 첨가한 배지가 약간의 LA의 증가를 보여주었고 3일째 배양에는 peptone을 첨가한 배지가 약간 증가를 보여 주었으나 배양액의 pH조절로 인하여 두 종류 모두가 3일째에도 급격한 LA의 감소가 없이

Table 7. Effect of inorganic nitrogen sources on the lytic enzyme production and final pH by K-42 strain as grown in media with M/15 phosphate buffer (pH 7.0)

Nitrogen source	Concn in medium (%)	2 days		3 days	
		LA	Final pH	LA	Final pH
Sodium nitrate	0.2	40	7.2	45	7.4
Ammonium acetate	0.2	50	7.9	40	8.0
Control with buffer	—	44	7.3	46	7.4
Control without buffer	—	40	7.8	21	8.2

Culture medium : the same as in Table 5.

Culture : at 30°C.

Table 6. Effect of inorganic nitrogen sources on the lytic enzyme production and final pH by K-42 strain

Nitrogen sources	Concn in medium (%)	2 days		3 days	
		LA	Final pH	LA	Final pH
Control	—	36	7.7	20	8.5
Ammonium acetate	0.2	47	8.2	14	8.8
Sodium nitrate	0.2	45	7.7	25	8.4
Urea	0.2	33	7.9	19	8.6
Ammonium nitrate	0.2	25	7.6	40	7.6
Ammonium chloride	0.2	11	6.7	46	7.2
Ammonium oxalate	0.2	9	6.8	41	7.6
Ammonium sulfate	0.2	3	6.8	42	7.6
Ammonium tartarate	0.2	—	—	26	8.6

Basal medium: the same as in Table 4.

Culture : at 30°C.

Table 8. Effect of organic nitrogen sources on the lytic enzyme production and final pH by K-42 strain

Nitrogen source	Concn in medium (%)	2 days		3 days	
		LA	Final pH	LA	Final pH
Control	—	36	7.7	20	8.5
Tryptone	0.1	56	7.9	20	8.6
Casitone	0.1	54	8.0	15	8.8
Peptone	0.1	54	7.7	22	8.4
Malt extract	0.1	46	7.6	10	8.8
Yeast extract	0.1	41	7.6	16	8.8
Nutrient broth	0.1	39	7.7	28	8.2
Milk casein	0.1	7	7.1	23	8.4

Basal medium: the same as in Table 4.

Culture: at 30°C.

Table 9. Effect of organic nitrogen sources on the lytic enzyme production and final pH by K-42 strain as grown in media with M/15 phosphate buffer (pH 7.0)

Nitrogen source	Concn in medium (%)	2 days		3 days	
		LA	Final pH	LA	Final pH
Tryptone	0.1	54	7.5	47	7.6
Peptone	0.1	44	7.3	54	7.5
Control with buffer	—	44	7.3	46	7.4
Control without buffer	—	40	7.8	21	8.2

Culture medium: the same as in Table 5.
Culture: at 30°C.

2일째와 같이 높은 LA를 계속 유지하였다. 그러므로 tryptone, casitone, peptone 등은 LA 증가에 영향을 준다고 결론지을 수 있다. 이것은 田端 등¹⁵⁾의 보고에서와 같이 peptone, casitone 등은 효모세포벽 용해 효소에 inducer로서 작용한다는 결론과 비슷한 결과라 할 수 있다.

5) 당류 및 질소원의 配合 첨가의 영향

무기질소원으로 sodium nitrate는 ammonium acetate와 함께 가장 양호한 것으로 이는 배지에 적당한 pH유지에 공헌하는 것이 아닌가 생각된다. 그래서 배양 2일째 LA가 높았던 당류인 maltose를 각각의 농도별로 배합 첨가하여 相乘 효과를 본 결과 Table 10에서와 같이 각각 단독으로 작용할 때보다 훨씬 낮은 LA를 얻었으며 오히려 효소 생산은 고농도 maltose에 의해서 阻害됨을 보았다. 따라서 최대 활성을 갖는 sodium nitrate의 농도는 0.2%가 단독으로 첨가될 때이다. 이러한 현상은 田端 등¹⁵⁾이 sodium nitrate와 glucose의 상승 효과를 본 것과 일치하고 있다.

기본배지에 control보다 LA가 높았던 당류와 유기질

소원 또는 무기질소원을 동시에 첨가하여 배양 일수에 따른 상승 효과의 여부를 검토한 결과는 Table 11과 같다. 즉 2일 배양에서 LA가 가장 높았던 1% maltose에 0.2% sodium nitrate, 0.1% tryptone 또는 0.1% peptone을 각각 배합 첨가하여 배양 2일과 3일의 상승 효과를 본 바 오히려 각각이 첨가되었을 때보다 낮은 LA를 나타내었다. 또 배양 3일째 가장 높았던 당류도 1% lactose와 무기질소원으로 0.2% ammonium chloride를 동시에 첨가했을 때 역시 같은 결과를 보여주었다. 또한 3일 배양시 배양액의 pH가 높은 유기질소원인 peptone, tryptone과 무기질소원인 ammonium sulfate, sodium nitrate가 첨가된 배양액에 3일 배양시 pH가 낮은 당류원인 glucose를 조합적으로 첨가하여 pH와 LA의 상승 효과를 보았던 바 glucose 단독 첨가시의 pH와 같은 범위를 그대로 유지하여 LA도 거의 없었다.

이와 같은 결과는 田端 등^{15,24)}이 *Streptomyces albidoflavus*에서 inducer의 효과가 있는 당류(효모 glucan, mannan, xylan)의 組合에 의한 inducer 효과의 증대에 관하여 검토하였지만, 효모세포벽 용해 효소 활성의 증대는 보이지 않았으며 또 탄소원(당류)과 질소원의 조합에서도 상승 효과는 보이지 않았다. 그러한 inducer를 단독으로 가한 배양 여액으로 조합하여 반응시켜도 효모세포벽 용해 효소의 활성은 거의 보이지 않았다고 보고하였다. 이는 본 실험과 일치하는 결과이다.

6) 배지중 pH 조절의 영향

실험 1)~5)에서 배지중 pH의 변화가 LA의 생산에 미치는 영향이 큰 인자임을 확인하고 배지의 pH를 Table 12와 같이 조절하면서 배양일수에 따른 LA 및 pH변화를 측정할 결과는 Fig. 2와 같다. 배지 I은 배양후 2일째 가장 높은 LA를 갖고 3일째부터 급격한 감소를 보여주었으며 배지 II는 pH를 조절한 결과 배양

Table 10. Combined effect of maltose and sodium nitrate on the lytic enzyme production and final pH by K-42 strain

Concn of sodium nitrate (%)	Concn of Maltose (%)							
	0		1		2		3	
	LA	Final pH	LA	Final pH	LA	Final pH	LA	Final pH
0	40	7.6	56	6.8	—	—	—	—
0.2	47	7.5	47	8.0	34	7.4	42	7.4
0.5	43	7.4	39	7.3	36	6.4	25	6.7
1.0	46	7.4	36	6.5	38	6.8	29	6.6

Basal medium: the same as in Table 4.
Culture: 2 days at 30°C.

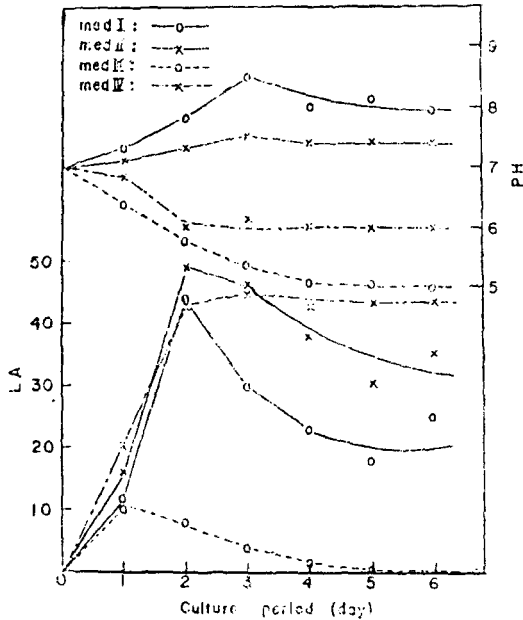


Fig. 2. Effect of the pH of culture media on the production of lytic enzyme by K-42 strain

2일째는 배지 I 보다 큰 LA를 가지며 3일째까지도 거의 비슷한 LA를 유지하다가 3일째 이후부터 감소하였다. 이는 효소 생산에 영향을 미치는 pH를 어느 정도까지 조절했기 때문이라 생각된다. 또 배지 III은 glucose의 첨가로 인한 유기산등의 생성으로 배양 일수에 따라 pH가 저하됨과 비례하여 LA도 감소되었다. 그러나 배지 IV는 glucose를 첨가하였지만 pH를 조절해준 결과 배지 III에서는 pH 5까지 감소되었지만 배지 IV는 pH 6까지 조절되며 그 LA도 상당한 증가를 가져왔다. 또 배지 IV는 배지 I, II와 달리 3일 이후에도 LA가 떨어지지 않고 계속해서 유지되었다. 이것은 glucose첨가가 pH의 저하로 효소활성에는 영향을 미치지만 좋은 영양원이 되어 세균의 증식력이 감소되지 않고 계속 유지되기 때문에 어느 수준까지 LA는 계속해서 감소되지 않고 유지된다고 생각된다. 이와같은 이유로 균주 K-42는 배양중 pH 7~8을 계속 유지시켜 준다면 기본배지의 사용만으로도 높은 LA를 갖는 효소액을 얻을 수 있다고 생각된다.

Table 11. Combined effect of nitrogen and carbon sources on the lytic enzyme production and final pH by K-42 strain

Nitrogen+carbon sources	2 days		3 days	
	LA	Final pH	LA	Final pH
Control	40	7.6	21	8.2
0.2% sodium nitrate+1% maltose	29	7.0	45	7.9
0.1% tryptone+1% maltose	23	6.8	36	7.4
0.1% peptone+1% maltose	31	6.8	40	7.4
0.2% ammonium chloride+1% lactose	4	6.7	7	6.7
0.1% peptone+1% glucose	4	6.0	9	6.0
0.1% tryptone+1% glucose	4	6.0	0	6.0
0.2% ammonium acetate+1% glucose	8	6.1	5	6.0
0.2% sodium nitrate+1% glucose	6	6.0	10	5.9

Basal medium: the same as in Table 4.

Culture: at 30°C.

Table 12. Composition of culture media

Culture medium	Constituents
Medium I	2 g baker's yeast, 0.5 g K ₂ HPO ₄ 0.1 g MgSO ₄ · 7H ₂ O per 100 ml water (pH 7.0)
Medium II	2 g baker's yeast, 0.5 g K ₂ HPO ₄ 0.1 g MgSO ₄ · 7H ₂ O per 100 ml M/15 phosphate buffer soln (pH 7.0)
Medium III	2 g baker's yeast, 0.5 g K ₂ HPO ₄ , 1 g glucose 0.1 g MgSO ₄ · 7H ₂ O per 100 ml water (pH 7.0)
Medium IV	2 g baker's yeast, 0.5 g K ₂ HPO ₄ , 1 g glucose 0.1 g MgSO ₄ · 7H ₂ O per 100 ml M/15 phosphate buffer soln (pH 7.0)

3. 효소의 作用條件

1) 효소 작용에 미치는 pH의 영향

선발된 우수균주 K-42가 생성한 효소의 작용 최적 pH를 알아보기 위하여 각각 다른 pH에서 효소작용을 시켜 LA를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 여기서 pH 5.3과 5.7은 M/15 citrate phosphate buffer, pH 6.4~8.0은 M/15 phosphate buffer, pH 8.0과 9.0은 M/15 boric acid-borax buffer를 사용하였다. 즉 2일 배양한 배양액(pH 7.7) 2.5 ml와, pH가 다른 buffer solution 10 ml를 열처리 효모현탁액 2.5 ml에 넣어 반응시켰으며 각 효소 반응액의 pH를 실측하여 표현하였다. 이 효소의 작용 최적 pH는 7~8에 있었고 pH 6 이하와 pH 8

이상에서는 LA의 급격한 감소가 있었다.

일반적으로 효도 세포벽 용해효소의 작용 최적 pH는 그 기원에 따라 다른 바, 보리 4.6~5.0, 달팽이 소화액 5.0~5.5, 세균 5.8~6.6, 사상균 4.5, 근핵균 3.5~5.0으로 보고되어 산성으로 치우쳐 있으나 본 균주는 중성에서 활성이 최적임을 보여주었다.

2) 효소작용에 미치는 온도의 영향

선발된 균주 K-42가 생성한 효소를 각기 다른 온도에서 작용시켰을 때의 LA는 Fig. 4와 같다. 효소작용의 최적온도는 60°C부근으로서 이보다 높은 온도에서는 급격한 감소를 가져왔는 바 이는 효소의 변성에 의한 것이라 생각된다.

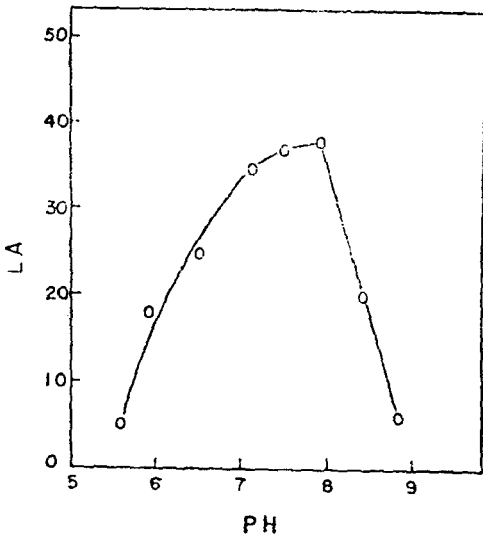


Fig. 3. Effect of pH on the lytic activity.

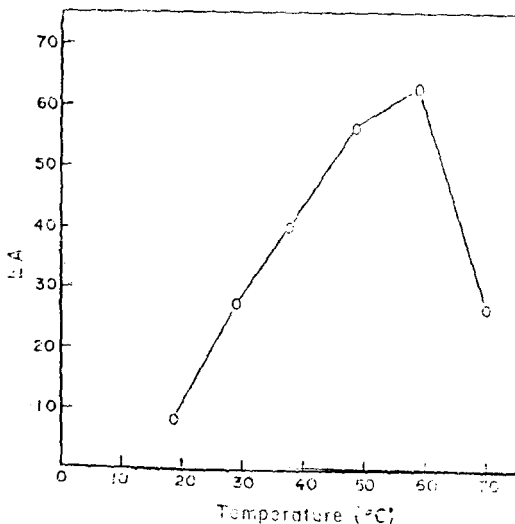


Fig. 4. Effect of temperature on the lytic activity.

요 약

1) 酵母細胞壁 溶解活性이 큰 미생물을 얻기 위하여 baker's yeast-peptone-bouillon agar 平板배지에서 투명하게 용해된 부위를 형성하는 菌株를 서울 및 경기지방의 토양 및 下水시료에서 156개 분리하였고 이들중 活性이 가장 큰 菌株로 K-42를 선발하여 *Bacillus circulans*로 同定하였다.

2) 菌株 K-42에 의한 효모세포벽 용해효소의 생산을 보면 당류 첨가의 경우 배양 2일째에는 maltose>glucan>xylose>control의 순으로, 3일째에는 lactose>galactose>glucan>control의 순으로 나타났다. 무기 질소원의 경우는 배양 2일째 ammonium acetat>sodium nitrate>control의 순으로, 3일째는 ammonium chloride>ammonium oxalate>control의 순으로 나타났으며 milk casein을 제외한 거의 모든 유기질소원은 배양 2일째 活性의 증가를 보였으나 3일째는 모두 감소하였다. 당류와 질소원의 배합첨가는 상승효과가 없었다.

3) 효소생산에 미치는 당류와 질소원의 첨가 효과는 배양기간 중 pH의 변화와 깊은 관계가 있었는 바 배양 중 pH 7~8을 계속 유지시켜 주면서 당류 또는 질소원을 첨가하면 높은 活性을 상당기간 계속 유지할 수 있었다.

4) K-42 菌株가 分泌하는 細胞壁 용해효소의 作用最適 조건은 pH 7~8, 60°C이었고 熱處理 효도세포벽의 용해율은 65%이었다.

참 고 문 헌

- 1) Giaja, J : *C. R. Soc. Biol. Paris*, 77, 2 (1914).
- 2) 里村幸男, 江崎淳子 : *發酵協會誌(日本)*, 22, 8 (1963).

- 3) 北原増雄, 竹内良光: 日本農藝化學會誌, 35, 468 & 474 (1961).
- 4) Bouveng, H. O. and Lindberg, B.: *Advan. Carbohydrate Chem.*, 15, 86 (1960).
- 5) Beattie, A., Hirst, E. L. and Percival, E.: *Biochem. J.*, 79, 531 (1961).
- 6) Parrish, F. W., Persin, A. S. and Rees, R. T.: *Can. J. Chem.*, 38, 2094(1960).
- 7) Horikoshi, K. and Arima, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, 57, 392 (1962).
- 8) Masuda, Y. and Wada, S.: *Bot. Mag. Tokyo.*, 80, 100 (1967).
- 9) 岡部重雄, 古屋晃: 日本特許公報, 昭 36-174 (1961).
- 10) Nagasakis, S., Neumann, N. P., Arnow, P., Schnable, L. D. and Lampen, J. O.: *Biochem. Biophys. Soc. Japan*, 24, 317 (1960).
- 11) Tanaka, H. and Phaff, H. J.: *J. Bacteriol.*, 89, 1570 (1965).
- 12) McLellan, W. L., McDaniel, L. E. and Lampen, J. O.: *J. Bacteriol.*, 102, 261 (1970).
- 13) Monreal, J., De Uruburu, F. and Villanueva, J. R.: *J. Bacteriol.*, 94, 241 (1967).
- 14) Bacon, J. S. D., Milne, B. D., Taylor I. F. and Webley, D. M.: *Biochem. J.*, 95, 28 (1965).
- 15) 田端司郎, 照井堯造: 醱酵工學雜誌(日本) 40, 366 (1962).
- 16) Mendoza, C. G., and Villanueva, J. R.: *Nature.*, 195, 1326 (1962).
- 17) Fruya, A. and Ikeda, Y.: *J. Gen. Appl. Microbiol. (Tokyo)*, 6, 40 (1960).
- 18) Hughes, D. E. and Brit, J.: *Exptl. Pathol.*, 32, 97 (1951).
- 19) Satomura, Y., Ono, M. and Fukumoto, J.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 24, 317 (1960).
- 20) 黒田彰夫, 徳丸陽子, 大和田式子: 醱酵工學雜誌(日本), 46, 926 & 930 (1968).
- 21) 川合正允: 醱酵工學雜誌(日本), 48, 295, 397, 405 (1970).
- 22) 外山信男, 小川喜八郎: 醱酵工學雜誌(日本), 46, 626 (1968).
- 23) Sugimoto, H.: *Agr. Biol. Chem.*, 31, 111 (1967).
- 24) 田端司郎, 照井堯造: 醱酵工學雜誌(日本), 41, 390 (1963).
- 25) Anderson, F. B. and Millbank, J. W.: *Biochem. J.*, 99, 682 (1966).
- 26) Svihla, G., Schlenk, F. and Dainko, J. L.: *J. Bacteriol.*, 82, 808 (1961).
- 27) Yamamoto, S. and Nagasaki, S.: *J. Ferment. Technol.*, 50, 131 (1972).
- 28) Yamamoto, S. and Nagasaki, S.: *J. Ferment. Technol.*, 50, 117 (1972).
- 29) Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1974).
- 30) Gorden, R. E., Haynes, W. C. and Dang, C. H.: *The Genus Bacillus*, Agriculture Handbook No. 427.
- 31) Yokotsuka, K., Goto, S., Yokotsuka, I. and Kushida, T.: *J. Ferment. Technol.*, 52, 701 (1974).
- 32) Whistler, R. L. (Ed): *Methods in Carbohydrate Chemistry* Vol. V (1965), Academic Press.