

*Arthrobacter luteus*가 生産하는 酵母 細胞壁  
溶解 促進 酵素에 關한 研究

第 1 報 : Zymolyase 粗 酵素에 의한 酵母 細胞壁 溶解에 미치는 諸 因子의 影響

吳 洪 祿 · 下田忠久\* · 船 津 勝\*\*

忠南 大學校, 畜產 學科

(1979년 7월 30일 수리)

Studies on the Enzyme from *Arthrobacter luteus*  
Accelerating the Lysis of Yeast Cell Walls

I. Effects of Various Factors on the Lysis of Yeast Cell Walls  
by the Preparation of Crude Zymolyase

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

Department of Animal Science, Chungnam National University, Daejeon

(Received July 30, 1979)

Abstract

To detect proper lytic assay conditions of the crude zymolyase from *Arthrobacter luteus*, effects of the various factors involved in the lytic system of *Saccharomyces saké* cultured with shaking in the malt extracts medium were investigated. The results are summarized as follows :

1. The susceptibilities of viable cells of *S. saké* from logarithmic growth phase to the lytic enzyme were much greater than those of the cells in lag and stationary phases. The cells cultured for 18 hr were the most susceptible to the enzyme.
2. Lytic activity of the enzyme toward the viable cells of *S. saké* was very low. It was, however, enhanced 4 folds or more by the pretreatment of the cells with 0.05 M sodium sulfite.
3. Lytic activity of the enzyme toward commercial baker's yeast cells was negligible, and the effect of sodium sulfite on the lysis of the cells also was nothing but a little.
4. The lyophilized cells of the baker's yeast showed more susceptibility to the lytic enzyme than viable cells of the yeast. No definite effect of sodium sulfite on the lysis of the lyophilized cells, however, was observed either baker's yeast or *S. saké*.
5. It appeared that the relationship between the reaction rate and the enzyme concentration on the lysis of the yeast cell walls followed enzyme kinetic theory, but one between the reaction rate and concentration of the yeast cells as substrates showed different pattern from that in enzyme kinetic theory.
6. After the preparation of crude zymolyase was kept at 7°C for 10 days in the 0.05 M phosphate buffer, pH 7.5, the remaining lytic activity was about 80 %.

\* 日本 九州 大學 農藝 化學科

\* Department of Agricultural Chemistry, Kyushu University, Fukuoka, Japan

\*\* 日本 熊本 大學 應用 微生物 工學科

\*\* Department of Applied Microbial Technology, The Kumamoto Institute of Technology, Kumamoto, Japan

序 論

1910年代 Giaja<sup>(1)</sup>가 酵母 細胞壁 溶解에 달팽이 (Garden snail, *Helix pomatia*)의 消化液을 사용한 이래, 수 많은 酵母 細胞壁 溶解 酵素가 달팽이가 아닌 微生物로부터 分離되어 왔으나<sup>(2,3)</sup>, 그 중에서 현재 市販되고 있는 溶解 酵素劑는 Kitamura等<sup>(4)</sup>이 土壤 細菌 *Arthrobacter luteus*<sup>(5)</sup>에서 分離한 endo- $\beta$ -1,3-glucanase를 zymolyase라고 命名한 것과, Yamamoto等<sup>(6)</sup>의 kitalase(endo- $\beta$ -1,3-glucanase)가 알려지고 있다. 그 중에서 zymolyase의 酵母 細胞壁 溶解 機構는 單一의 酵素 作用에 의한 것으로 Kitamura等<sup>(7)</sup>이 報告한 바 있으나, *S. saké*에 대해서는 극히 미약한 溶解 活性을 보일뿐, 그 溶解에는  $\beta$ -mercaptoethanol, sodium sulfite 등의 SH 還元 試藥의 添加가 要求되었다. 이것은 *S. saké*의 溶解에 있어서는 zymolyase의 單獨 作用으로는 不充分하고, SH 還元 試藥과 같은 溶解 促進 作用을 가진 一種의 酵素나 因子가 必要로 함을 示唆했다. 따라서 著者等은 우선 zymolyase 粗 酵素 標品에 대해서 溶解 促進 因子의 混在 如否를 檢討한 結果 還元 試藥과 同一하게 zymolyase의 *S. saké* 細胞壁 溶解을 促進하는 未知의 因子가 從來의 zymolyase 粗 酵素 標品中에 미량 함유되어 있음을 발견하였다<sup>(8)</sup>.

이어서 이 未知의 溶解 促進 因子를 그 粗 酵素 標品中으로부터 分離, 精製해서 그 本體를 究明하고, 同時에 그 溶解 促進 機構를 解明하기 위해서는 먼저 이 實驗 目的에 適合한 酵母 細胞壁 溶解 活性 測定法을 確立하기 위한 檢討가 先行 되어야 하였다. 從來 Phaff等<sup>(9)</sup>은 酵母 細胞壁 溶解 酵素의 精製 過程에 溶解 活性 測定上에서의 하자로 말미암아 追跡中이었던 溶解 酵素의 精製에 失敗 하였음을 報告하고 있다. 따라서, 適合한 溶解 活性 測定法의 確立은 未知의 溶解 促進 因子를 失手없이 檢索, 追跡하기 위한 필요 불가결한 수단이라 하겠다.

일반으로, 酵母 細胞壁 溶解 酵素에 대한 各種 酵母의 溶解 感受性은 菌種, 菌株 및 培地의 組成과 培養 條件等 生體를 둘러싼 複雜한 要因에 의해서 影響을 받는다<sup>(10)</sup>. 從來, 이에 관한 報告<sup>(11,12)</sup>가 있으나 그 實驗 條件과 狀況이 각기 相違한 뿐 아니라, 酵母 細胞壁 溶解에 미치는 諸 因子의 影響을 體系的으로 檢討한 實驗 報告는 接할 수 없었다. 따라서 本 實驗에서는 從來에 研究, 檢討가 不充分한 面을 中心으로 溶解 活性 測定에 있어서 適合한 條件을 檢出하기 위해서 zymolyase 粗 酵素의 酵母 細胞壁 溶解에 관여하고 있는 諸 因子에 관해서 檢討 하였다.

材料 및 方法

菌株 및 培養

*S. saké* kyokai 7號는九州大學 農學部 醱酵化學 研究室로부터 分讓 받았다. 啤 酵母는 市中 壓搾 酵母(*S. cerevisiae*, 日本 Orient Ferment. Co., Ltd.)製를 使用 하였다. 培地는 精製 malt extracts 粉을 水道水에 10% (w/v)가 되도록 溶解시켜 (pH 5.2) 調製했다. 멸균한 후 菌株를 接種하여 30°C에서 水平 振盪(120 r.p.m.) 培養하였다. 增殖한 酵母 細胞를 遠心 分離法으로 回收해서, 脫 이온水로 水洗한 다음, 脫 이온水中에 懸탁하여 凍結 乾燥 또는 그대로 1°C로 保存하면서 適量씩 實驗에 供與했다.

Zymolyase 粗 酵素

*Arthrobacter luteus*가 生産하는 zymolyase 5,000 또는 24,000은 日本 Kirin 麥酒 株式會社 總合 研究所로부터 提供 받았다.

振盪管 및 振盪器

酵母 細胞壁 溶解 活性 測定에는 一般의 I型(1.5×11 cm) 試驗管을 振盪管으로, 그리고 振盪器로는 恒溫 水槽中에 附着된 水平 往復式 振盪器(180 r.p.m.)를 使用하였다.

溶解 活性 測定法

0.05 M phosphate buffer(pH 7.5)中에 酵母 細胞를 懸탁시키고, 여기에 同 buffer 2.5 ml과 還元劑 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 溶液(pH 7.5) 0.5 ml(還元劑 未使用시는 同 buffer 0.5 ml)를 차례로 振盪管에 넣고 미리 反應 溫度로 맞춘 다음, 0.5 ml의 酵素液을 加하여, 25°C에서 일정 시간동안 振盪하면서 反應시켰다. 한편 酵素液 또는 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 溶液 대신에 上記 buffer를 加한 試驗區를 設定하여 對照 實驗으로 했다. 反應후, 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液 0.5 ml를 加하여 反應을 終止시킨 다음 試驗管 mixer를 利用하여 反應액에 存在하는 酵母 細胞와 溶解 殘渣를 잘 懸탁시켰다. 이어서, 反應 前後에 있어서의 反應液의 濁度의 變化를 波長 620 nm에서 吸光度를 測定하여, 다음 式에 의해서 反應系의 濁度 減少를 算出했다.

$$\text{濁度減少율} = \frac{\text{對照의 } Abs_{800nm} - \text{反應液의 } Abs_{800nm}}{\text{對照의 最初 } Abs_{800nm}} \times 100$$

한편 溶解 活性 單位(unit)는 120分 反應에서 反應系의 濁度를 30% 減少시키는 酵素量을 1單位(unit)로 定했다.

### 結 果

#### 酵母細胞의 生育期에 의한 影響

酵母細胞의 生育期(年齡)가 溶解 感受性에 미치는 影響을 檢討 하기 위해서 다음과 같은 實驗을 實施했다. 即, 斜面 培養한 *S. sake* 菌株을 1 白金耳식 名 麥芽汁 培地에 移植, 培養 開始 후 9時間에서 48時間까지 一定한 時間 간격으로 나누어 振盪 培養했다. 培養 終了 後, 바로 培養液의 濁度를 波長 800 nm에서 吸光度를 測定하여, 酵母細胞數의 指標로 삼았다. 한편 濁度 測定 후 培養 液中的 酵母細胞는 즉시 冷却, 回收하였다. 溶解 感受性은 粗酵素 2單位를 使用해서 測定했다. 그 結果 Fig. 1과 같이 *S. sake* 細胞의 增殖은 培養 開始 후 12時間까지는 遲滯期(lag phase), 24時間까지는 對數期, 그리고 48時間 以後부터는 定常期의 增殖 曲線을 보여 주었다. *S. sake* 細胞의 溶解 感受性은 培養 18

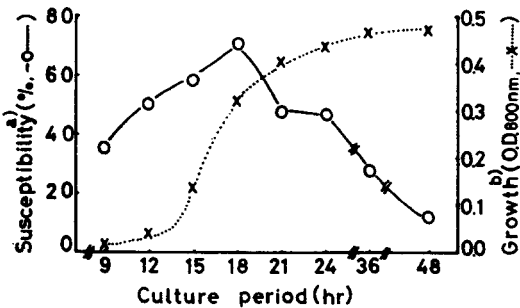


Fig. 1. Effect of growth phase on susceptibility of *S. sake* yeast cells to the lytic enzyme  
 a. % decrease in Abs. at 800 nm of the reaction mixture  
 b. Increase in Abs. at 800 nm of the culture

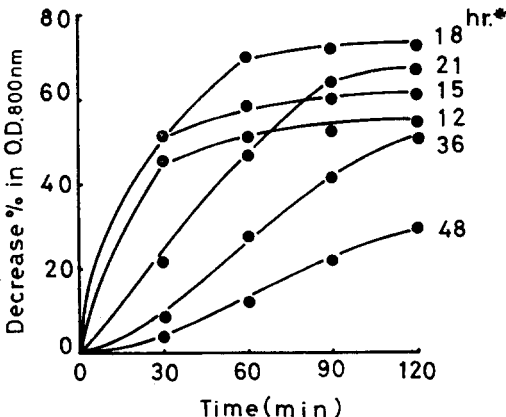


Fig. 2. Time course of lysis of *S. sake* yeast cells cultured during various periods  
 \* Cultivation time of the yeast

時間에서 最高에 達하였고, 그 후는 점차로 低下해서 培養 48時間째의 細胞는 18時間째의 細胞에 比해서 約 1/4程度의 溶解 感受性에 지나지 않았다. 即 生育 初期의 細胞 및 定常期의 細胞는 溶解 酵素에 의해서 溶解 되기 어려웠다.

다음, 各 生育期 細胞의 溶解 速度를 粗酵素 2單位를 使用해서 測定한 結果 Fig. 2에서와 같이 對數期의 細胞는 溶解 速度가 빠르나, 定常期의 細胞는 그 培養 時間이 길어 질수록 溶解 速度가 완만했다. 여기에서 特 히 18時間 培養의 細胞는 그 溶解 速度도 빠른 뿐 아니라, 溶解度도 가장 높았다. 따라서 以後의 實驗에서는 同一한 條件으로 18時間 培養시킨 *S. sake* 細胞를 溶解 活性 測定에 使用하기로 했다.

#### 還元劑 亞硫酸 소-다에 의한 影響

##### 가. 亞硫酸 소-다의 濃度

一般으로,  $\beta$ -mercaptoethanol 등 SH 還元 試藥은 酵母 細胞의 溶解 感受性을 向上 시키는 것으로 알려지고 있다(13,14). 本 實驗에서는 粗酵素 2單位를 使用해서 還元劑 亞硫酸 소-다의 各種 濃度가 溶解 感受性에 미치는 影響을 檢討했다. 그 結果, Fig. 3-A에서 보여주고 있는 바와 같이 還元劑 未處理 試驗區에서는 2時間의 反應에 있어서도 20 %의 濁度 減少에 지나지 않았으나, 處理區에서는 還元劑의 濃度가 0.05 M까지는 그 濃度에 比例해서 溶解 感受性은 增加 되었다. 그러나 0.15 M 以上の 濃度에서는 오히려 低下했다. 따라서 以後의 實驗에서는 還元劑의 最終 濃度가 0.05 M가 되도록 反應液을 調製해서 溶解 活性을 測定했다.

##### 나. *S. sake*와 市中 啤酒의 生細胞의 溶解 感受性

Zymolyase 粗酵素 1單位를 使用해서, 上記 生細胞의

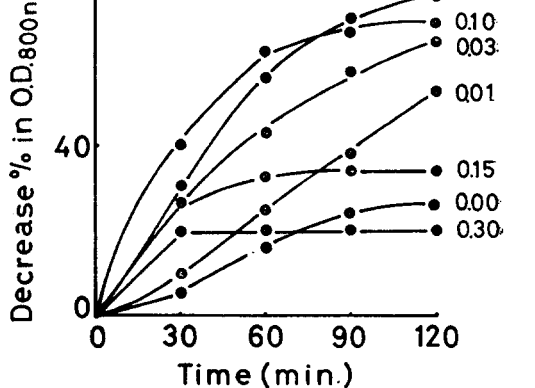


Fig. 3-A. The effects of various concentration of sodium sulfite in the reaction mixture on lysis of *S. sake* yeast cells  
 \*: Mol. concentration of  $\text{Na}_2\text{SO}_3$

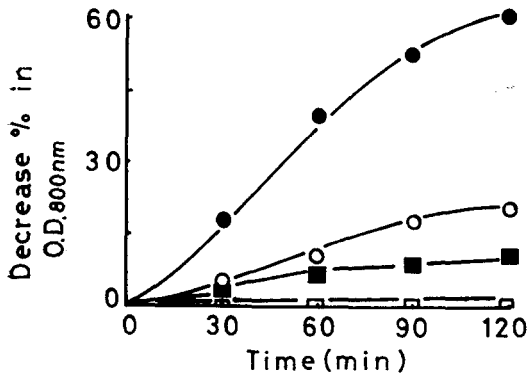


Fig. 3-B. The effects of sodium sulfite on the lysis of *S. sake* and baker's yeast

- : *S. sake* treated with 0.05 M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$
- : *S. sake* not treated with 0.05 M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$
- : Commercial baker's yeast treated with 0.05 M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$
- : Commercial baker's yeast not treated with 0.05 M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$

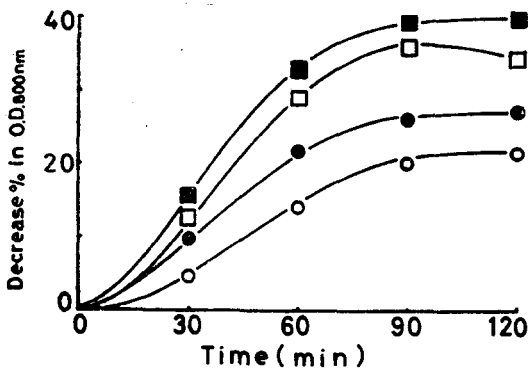


Fig. 3-C. The effects of sodium sulfite on the lysis of lyophilized *S. sake* and commercial baker's yeast

- : *S. sake* treated with 0.05 M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$
- : *S. sake* not treated with 0.05 M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$
- : Comm. baker's yeast treated with 0.05 M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$
- : Commercial baker's yeast not treated with 0.05 M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$

溶解 感受性を 調査하여 그 結果를 Fig. 3-B에 提示했다. 먼저 *S. sake* 細胞의 경우, 還元劑 亞硫酸 소-다의 無處理區에 있어서 그 溶解 感受성은 대단히 낮았으나, 還元劑의 處理區에서는 60分 反應에서 그 溶解 感受성은 無處理區에 比해서 約 4배 增加했다. 그러나 빵 酵母의 경우, 그 溶解 感受성은 매우 낮았고, 還元劑의 處

理에 의해서도 별다른 增加의 傾向을 보여주지 못했다.

#### 다. 凍結 乾燥 酵母의 溶解 感受性

*S. sake* 酵母 및 빵 酵母의 凍結 乾燥 細胞에 대한 溶解 感受성을 zymolyase 1單位를 使用해서 檢討했다. 凍結 乾燥 細胞를 phosphate buffer에 再현탁 시킨 후 溶解 感受성을 測定하여 그 結果를 Fig. 3-C에 提示했다. 兩 酵母는 生細胞의 경우와는 달리 還元劑의 無處理區에서도 상당히 높은 溶解 感受성을 보인 반면에 還元劑의 處理에 의한 溶解 感受성의 增加는 극히 微弱하였다. 또한 兩 凍結 乾燥 酵母中 빵 酵母 쪽이 높은 溶解 感受성을 보여 주었으나, 그 溶解는 120分間의 反應에서도 40%에 不치는 程度였다. 以上の 結果로부터 還元劑 亞硫酸 소-다의 處理에 가장 敏感한 溶解 感受성을 보인 *S. sake*의 生細胞가 溶解 活性의 測定에 適合함이 認定 되었다.

#### 酵素 濃度 및 酵母 濃度の 影響

一般으로, 酵素 反應의 速度에는 酵素 濃度, 基質 濃度 및 pH, 이온 強度 그리고 作用 溫度等 여러가지의 環境 因子가 影響을 미치고 있다. 따라서 本 實驗에서는 *S. sake* 細胞의 溶解에 미치는 zymolyase 粗酵素 및 酵母 細胞의 濃도에 의한 影響을 調査하였다.

#### 가. 酵素 濃度の 影響

一定한 濃度の 酵母 細胞 현탁액에 여러가지 濃度(活性 單位)의 zymolyase 粗酵素를 加한 후, 細胞 溶解의 經時的 變化를 測定한 結果, Fig. 4의 A와 같이 溶解 活性은 短時間에서는 酵素 濃도에 比例 하였으나, 長時間의 反應에서는 酵素量에 不拘하고 一定한 水準에 達하는 傾向을 나타냈다. 即, 反應 速度는 時間과 더불어 低下되어, 長時間의 反應에서는 生成物(濁度)의 減少 또는 反應液 中の 細胞 內溶物의 增加)을 測定하여도 酵素 濃도를 알 수 없는 狀態가 되었다.

다음 上記의 酵素 反應에서 各 反應 時間에 대한 外觀上의 溶解 速度를 求해서, 그것을 酵素 單位에 대해서 圖示한 結果, Fig. 4의 B와 같았다. 即  $t_1$ (30分 反應)에서는 2單位의 酵素 濃도까지는 溶解 速度가 完全히 酵素 濃도에 比例했으나, 그 以上の 濃도에서는 溶解 速度는 一定하게 되었고, 더욱 反應이 進行되면 溶解 速度는 低下했다. 이어서  $t_1$  曲線의 接線으로부터 反應 時間  $t_0$ 에 있어서의 速度 即, 溶解의 初期 速度는 完全하게 酵素 濃도에 比例하고 있음이 觀察 되었다.

#### 나. 酵母 濃度の 影響

酵母 細胞의 溶解에 미치는 基質 濃度の 影響을 檢討했다. 各種 濃度(Abs<sub>800nm</sub> 0.2~0.8)의 酵母 細胞 懸濁液에 1單位의 粗酵素를 加해서, 各 反應 時間( $t_1 \sim t_4$ )에 있어서의 溶解를 測定한 結果, Fig. 5와 같이 어머

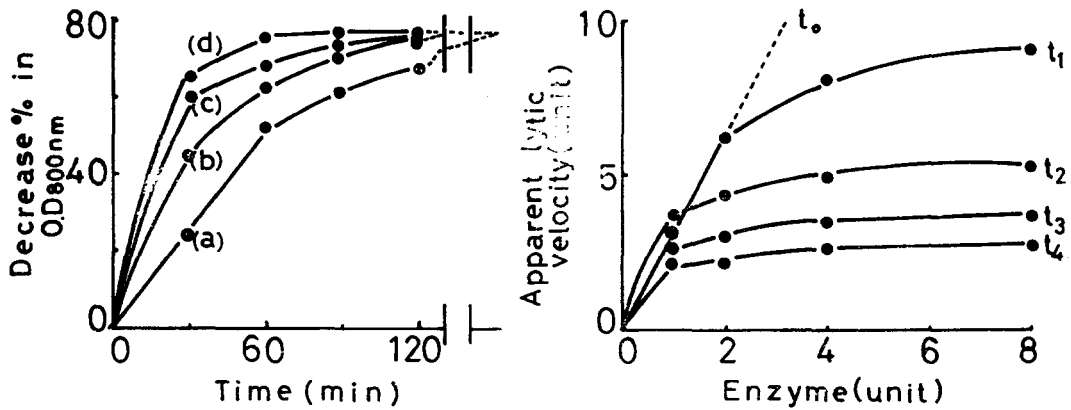


Fig. 4. The effects of the lytic enzyme concentration on the lysis of *S. sake* yeast cells

- A. The relationship between enzyme unit and reaction time. (a), (b), (c) and (d) indicate 1, 2, 3 and 4 units respectively.
- B. The relationship between enzyme unit and lytic velocity. Reaction time (min):  $t_1$ , 30;  $t_2$ , 60;  $t_3$ , 90;  $t_4$ , 120

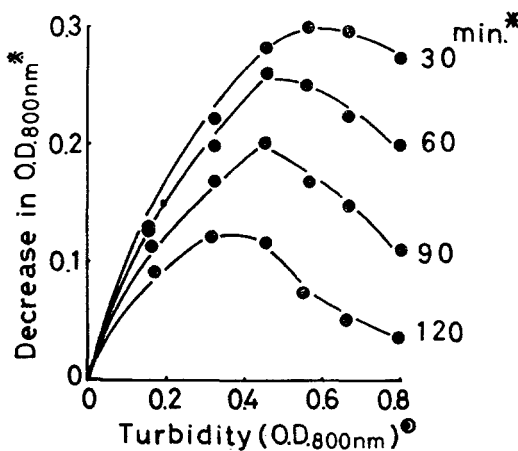


Fig. 5. The relationship between substrate concentration and lytic velocity on lysis of the yeast by the lytic enzyme

\*: Reaction time

한 반응 시간에 있어서도 반응계의濁도가  $Abs_{800nm}$ 의吸光度로 0.45~0.5 정도 일때 最大의溶解度가 얻어졌고, 그 이상의濃度에서는  $t_1$ 을 除外하면 酵母濃度の增加와 더불어 그溶解度는 減少하는 傾向을 나타냈다. 即 基質의 低濃度에서는 基質濃度는 反應速度에 큰 影響을 미치고 있으나, 高濃度에서는 전혀 影響을 미치지 못하고 一定値에 達했다가 오히려 減少하는 傾向을 나타냈다. 以上の 實驗 結果, 反應계의 酵母細胞의 濃度는  $Abs_{800nm}$  0.5로 調節했으며, 酵素濃度와 反應 時間에 있어서는, 보다 初期 速度 反應에 가까운 結果를 얻기 위해서 可能한 粗酵素 1~2單位와 30分

以內的 反應이 바람직하다는 事實이 確認되었다.

低溫 保存의 影響

Zymolyase 粗酵素 標品中으로부터 未知의 溶解 促進因자와 zymolyase를 分離하여 兩者를 精製하는 過程에 있어서는, 그 粗酵素 溶液을 長時間 低溫으로 維持해야만 하는 것이 豫想 되었기 때문에, zymolyase 粗酵素的 溶解 活性에 미치는 低溫 保存의 影響을 調査했다. 即 0.05 M phosphate buffer (pH 7.5)로 調製한 粗酵素 溶液(2 unit)을 約 7°C의 冷藏庫에 保存하면서 溶解 活性의 經時的 變化를 測定하였다. 그 結果 Fig. 6에서 보는 바와 같이, 保存 3日 만에 約 20%의 活性이 감소되었으나, 3日부터 10日까지는 安定한 상태이었고, 그 以後부터 活性은 서서히 減少하였다. 그러나, 保存 18日까지 約 70%의 活性을 維持하는 것으로 보아, 低溫 保存에 의한 溶解 活性의 低下는 比較的 적은 것으로 나타났다.

한편, 保存 期間中의 微生物의 汚染, 繁殖에 의한 影

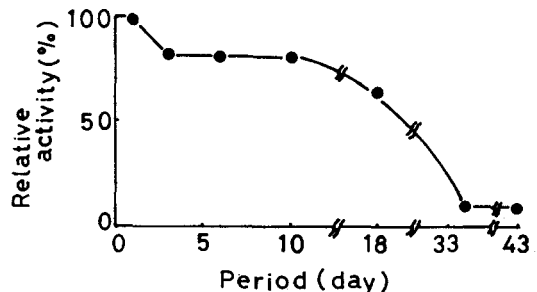


Fig. 6. Stability of the lytic activity of the crude zymolyase on storage at pH 7.5, 7°C

嚮을 除去하기 위해서, sodium azide (NaN<sub>3</sub>) 溶液을 添加 (0.02%)한 酵素 溶液에 대해서도 同一한 實驗을 實施 하였으나, NaN<sub>3</sub> 溶液 添加에 의한 影響은 전혀 認定되지 않은 것으로 보아 保存 期間中 酵素 活性의 低下에 微生物이 關與했을 可能性은 극히 희박하였다.

## 考 察

現在 酵母 細胞壁 溶解 活性의 反應系에 있어서 基質로써 使用되고 있는 酵母 細胞를 代替할 수 있는 可溶性의 基質은 아직 發見되지 않고 있다. 때문에 그 反應系에는 恒常 一定한 條件下에서 調製한 新鮮한 酵母 細胞를 使用하고 있다. 酵素 活性의 測定에 均一系를 形成할 수 있는 酵母의 生細胞를 使用하지 않을 수 없다는 것은 그 만큼 많은 問題點을 內包하고 있음을 意味한다. 따라서 本 實驗에서는 zymolyase 粗酵素 諸 因子에 關해서 檢討하여 最適에 가까운 溶解 活性 測定系의 確立에 努力하였다.

酵母 細胞壁 溶解 活性 測定에는 一般으로 濁度 變化 測定法이 사용되고 있다. 이 方法에는 直接 溶解法<sup>(15)</sup>과 浸透壓 쇼크 溶解法等<sup>(16,17)</sup>이 알려져 있고, 本 研究에서는 보다 一般的인 方法인 直接 溶解法에 의해서 反應 前後의 濁度 變化를 測定하였다.

대체로, 溶解 酵素에 대한 酵母 細胞의 溶解 感受性은 對數 增殖期의 細胞 일수록 높고, 定常期의 細胞 일수록 낮은 것으로 알려져 있다<sup>(9,10,13)</sup>. 本 實驗에 있어서도 對數 增殖期에 屬하는 18時間 培養의 細胞가 가장 높은 溶解 感受性을 나타냈고, 對數 初期 및 定常期의 細胞는 낮은 感受性을 나타냈다. 이것은 細胞 分裂이 現저한 對數 增殖期에 있어서는 젊은 細胞가 많고, 이 젊은 細胞는 늙은 細胞에 비해서 溶解되기 쉬운 細胞壁 構造를 가지고 있음을 示唆하였다. 從來 細胞壁 構成 物質중 mannan의 合成은 細胞 分裂의 사이클을 통해서 거의 一定한 水準을 維持하고 있으나, 可溶性 glucan 및 蛋白質은 주로 分裂 사이클의 初期에, 不溶性 glucan은 後期에 合成되고 있다고 알려져 있다<sup>(17)</sup>. 이것으로부터, 젊은 酵母 細胞는 細胞壁의 骨格을 構成하고 있는 不溶性 glucan層의 形成이 아직 不充分하기 때문에 溶解 酵素의 分解 作用에 의해서 보다 쉽게 溶解되는 것으로 생각 되었다.

Zymolyase 粗酵素 標品은 還元劑 亞硫酸 쇼크의 溶解 促進 作用이 없이는 *S. sake*의 生細胞에 대해서 대단히 낮은 溶解 活性을 나타냈으나, 還元劑의 存在下에서 그 溶解 活性은 약 4배 이상 上昇했다. 이는 *S. sake* 細胞의 溶解에는 적어도 2種類 以上の 酵素 作用이 必

要함을 示唆함과 同時에, zymolyase 粗酵素 標品中에는 亞硫酸 쇼크와 같은 溶解 促進 物質의 含量이 지극히 小量임을 暗示했다. 亞硫酸 쇼크는 反應液에서의 最終 濃도가 0.05~0.1 M의 範圍일 때는 溶解 促進的으로 作用했으나, 0.15 M 以上の 濃도에서는 溶解를 抑制하는 方向으로 作用하였다. 이것은 高濃도의 亞硫酸 쇼크에 의해서 酵素 作用이 抑制되었거나, 또는 反應系 鹽濃度의 上昇에 의해서 酵母 細胞에 賦與되는 浸透壓 쇼크의 影響이 減少된 結果로 보여진다.

한편 凍結 乾燥 細胞의 溶解 感受性은 生細胞와는 다른 패턴을 나타냈으나, 이는 凍結 乾燥에 의해서 酵母 細胞의 壁 成分間의 網目 構造에 物理的 變化가 생긴 結果로 推定된다.

*S. sake* 細胞에 대한 溶解 速度와 zymolyase 粗酵素 濃도와의 關係는 酵素 反應 速度論에 準하는 傾向을 보여 주었으나, 溶解 速度와 酵母 濃도와의 關係에 있어서는 그것과는 약간 다른 樣狀을 보여 주었다. 그러나 前述한 바와 같이, 酵母 細胞의 生體에는 그것을 둘러싸고 있는 複雜한 可變性的 因子가 수 없이 存在하고 있으며, 또 振盪 反應中에 있어서 不均一系를 形成하고 있는 酵母 細胞의 懸濁系로부터 派生되는 影響도 豫想되므로, 上記 酵素 反應 速度論의 解析은 매우 어려울 것으로 생각 되었다.

本 粗酵素의 溶解 活性은 低溫 保存 3日째에서 約 20% 程度 喪失되었으나, 그 以後 부터는 長期間에 걸쳐서 活性의 低下는 認定되지 않았다. 保存 初期에 있어서의 活性의 急激한 低下의 原因은 아직 確實하지 않으나, 粗酵素 標品中에는 溶解 活性에 關與하는 여러 成分이 存在하여, 그 중에서 어느 成分의 活性이 低溫 保存中에 쉽사리 喪失되는 데에서 發生하는 것으로 생각 되었다.

## 要 約

*Arthrobacter leuteus*로부터 分離한 zymolyase 粗酵素 標品の 酵母 細胞壁에 대한 溶解 活性을 測定함에 있어서, 보다 適合한 條件을 찾기 위해서, 麥芽汁 培地에서, 振盪 培養한 *S. sake*의 溶解에 關與하는 諸 因子의 影響을 檢討하였다.

1. 本 溶解 酵素에 대한 *S. sake* 生細胞의 溶解 感受性은 對數 增殖期의 細胞는 높았고, 遲滯期 및 定常期의 細胞는 낮았다. 그 중에서 特히 18時間 培養된 細胞는 가장 높은 溶解 感受性을 보였다.

2. 本 溶解 酵素는 *S. sake*의 生細胞에 대해서 아주 낮은 溶解 活性을 나타냈으나, 酵母 細胞를 亞硫酸

소-다(0.05 M)로 前處理하므로써 그 溶解 活性은 4倍 以上으로 增加되었다.

3. 市中の 啤 酵母에 대한 本 溶解 酵素의 活性은 지극히 微弱하였고, 亞硫酸 소-다의 效果도 약하였다.

4. 凍結 乾燥시킨 啤 酵母의 細胞는 生細胞의 경우보다 높은 溶解 感受性을 보였다. 그러나 凍結 乾燥 細胞의 경우, *S. sake*나 啤 酵母의 그 어느 細胞도 亞硫酸 소-다에 의한 溶解 感受性의 影響은 認定되지 않았다.

5. 酵母 細胞壁 溶解에 있어서, 그 反應 速度와 粗酵素의 濃度와의 關係는 酵素 反應 速度論에 準하는 傾向을 보이는 것 같았으나, 反應 速度와 酵母 細胞의 濃度와의 關係는 酵素 反應 速度論과는 다른 패턴을 보여 주었다.

6. 0.05 M phosphate buffer (pH 7.5)에 溶解 시킨 zymolyase 粗酵素 標品을 7°C에서 10日間 保存 시킨 結果, 溶解 活性의 殘存율은 約 80 %였다.

—◇—  
謝 辭

本 研究 遂行에 있어서 多量의 粗 zymolyase 標品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 감사한다.

文 獻

1. Giaja, J., Séanc, C. R. : *Soc. Biol.*, 77, 2 (1914)
2. Rose, A. H., Harrison, J. S.(Ed.): *The Yeast*, Acad. Press, London, 2, p.135 (1970).

3. Fneeey, R. E., and Whitaker, J. R. (Ed.): *Food Protein*, A.C.S., Washington, p.244 (1977)
4. Kitamura, K., Kaneko, T. and Yamamoto, Y. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 20, 323 (1974)
5. Kaneko, T., Kitamura, K. and Yamamoto, Y. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 15, 317 (1969)
6. 小林岑右, 三輪 端, 山本晋平, 長崎龜 : 日本 農藝 化學會 大會 講演 要旨集 p.90, (1978)
7. 金子龍彦, 北村勲平, 山本 康, 黑澤信子 : 麒麟 紀要, 23, 93 (1974)
8. Funatsu, M., Oh, H., Aizono, Y. and Shimoda, T. : *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1975 (1978)
9. Fleet, G. H. and Phaff, H. J. : *J. Bacteriol.*, 119, 207 (1974)
10. 船津勝, 鶴大典 : 溶菌 酵素, 講談社, 東京 p.152 (1952)
11. Kitamura, K., Kaneko, T. and Yamamoto, Y. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 18, 57 (1972)
12. Kaneko, T., Kitamura, K. and Yamamoto Y. : *Agric. Biol. Chem.*, 37, 2295 (1973)
13. 山本康 : 化學と生物, 13, 410 (1975)
14. Obata, T., Fujioka, K., Hara, S. and Namba, Y. : *Agric. Biol. Chem.*, 41, 671 (1977)
15. Furuya, A. and Ikeda, Y. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 6, 40 (1960)
16. Nagasaki, S., Neuman, N. P., Anow, P., Schnable, L. D. and Lampen, J. O. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 25, 158 (1966)
17. 林部正也 : 化學と生物, 13, 410 (1975)