

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

第2報 : Crude Zymolyase 標品中으로부터 酵母 細胞壁 溶解 促進 因子의  
分離 및 Sephadex G-75 Gel에 의한 Zymolyase의 部分 精製

吳 洪祿·下田 忠久\*·船津 勝\*\*

忠南大學校 畜産學科

(1980년 7월 28일 수리)

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

### II. Separation of the Factor Accelerating the Lysis of Yeast Cell Walls from the Preparation of Crude Zymolyase and Partial Purification of the Zymolyase with the Sephadex G-75 Gel

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

Department of Animal Science, Chungnam National University, Daejeon 300-01

(Received July 28, 1980)

#### Abstract

A series of experiment were carried out to separate the factor accelerating the lysis of cell wall of *Saccharomyces sake* from the preparation of crude zymolyase obtained from *Arthrobacter luteus*.

An attempt was also made to purify the enzyme which is essential for the study on the separation of the factor. The results are summarized as follows:

1. Crude zymolyase was fractionated 5 peaks (A~E) containing three peaks (A~C) passed through the column by the chromatography on Biogel CM-30.
2. Among the five peaks, peak E (protease fraction) was found to contain the factor accelerating the lytic activity of the zymolyase.
3. L-c fraction purified in almost free form from the nonlytic  $\beta$ -1,3-glucanase, protease and inert protein by the affinity adsorption chromatography with Sephadex G-75 gel was obtained from zymolyase fraction (peak D). When it was subjected to polyacrylamide gel disc electrophoresis, only one clear protein band was observed at pH 4.3, but still detected two or more band at pH 8.3.

\*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

4. However, L-c fraction revealed only the substrate specificity of  $\beta$ -1,3-glucanase to the glucan among the polysaccharide components of yeast cell walls.

## 序 論

이미 前報<sup>(1)</sup>에서 서술한 바와 같이 현재 酵母 細胞壁 溶解酵素로 널리 市販되고 있는 zymolyase(endo- $\beta$ -1,3-glucanase; EC 3.2.1.39)<sup>(2,3)</sup>의 粗 酵素는 *Saccharomyces saké* 細胞에 대해서 아주 미약한 溶解 活性을 보일 뿐, 그 충분한 溶解에는  $\beta$ -1,3-glucanase의 溶解作用 이외에  $\beta$ -mercaptoethanol, sodium sulfite 등 -SH 還元 試藥의 도움이 동시에 요구되었다. 이것은 粗 zymolyase中에 SH 還元 試藥처럼 *Saccharomyces saké* 細胞에 대한  $\beta$ -1,3-glucanase의 溶解作用을 促進하는 一種의 酵素와 같은 物質이 결여되어 있거나, 또는 극히 微量 含有되어 있음을 示唆하는 것으로 생각되었다.

土壤 細菌의 一種인 *Arthrobacter luteus*로부터 zymolyase를 分離한 바 있는 Kitamura 등<sup>(4)</sup>은 Biogel CM-100 이온交換 管 크로마토그래피에 의해서 zymolyase를 精製하고 있으나, 그 過程에서 特記할 만한 하자가 發見되지 않았음에도 불구하고 酵母 細胞壁 溶解 活性의 回收率은 約 50%에 불과하였다. 그 원인으로 크로마토그래피의 進行 도중에 발생하는 酵素 活性의 자연적 손실도 어느 정도는 고려될 수 있을 것이다. 그러나 그 回收率의 不良한 정도로 미루어 볼 때, 粗 zymolyase 中에 存在하고 있었던 某種의 溶解 促進 物質이 크로마토그래피에 의해서 酵母 細胞壁 溶解에 있어서 主力 酵素로 간주되고 있는 zymolyase<sup>(5)</sup>로부터 分離, 除去되었기 때문에 그 溶解 活性의 回收率이 크게 저하했을 것으로 著者 등은 分析하였다.

실제로 著者 등은 zymolyase에 관한 일련의 研究 過程에서 zymolyase fraction이 精製되어 감에 따라서 *Saccharomyces saké* 細胞에 대한 溶解의 比 活性도가 오히려 저하되어 가는 사실을 경험하였다. 著者 등은 이 點에 注目, 이를 앞서 記述한 몇가지 사항과 연관시켜 檢討한 결과, 粗 zymolyase의 標品中에 존재에는 알려지지 않았던 酵母 細胞壁 溶解促進因子가 存在함을 確信하게 되었다. 따라서 本 實驗에서는 먼저 粗 zymolyase의 標品부터 溶解 促進 因子의 檢索, 分離를 시도하였다. 동시에 檢索, 分離된 促進 因子를 精製하여 그 本體 및 促進作用의 機轉 등을 究明하기 위해서는 무엇보다도 우선 促進作用의 對象이 되는 zymolyase의 精製도 併行하여야 할 필요성이 있

다. 純도가 높은 zymolyase를 使用하지 않고서는 明快的한 實驗 結果를 기대할 수 없기 때문이다. 따라서 zymolyase의 精製法을 多角度로 檢討한 結果, 從來에는 이 酵素의 精製法으로 採擇된 바 없었던 Sephadex gel에 의한 affinity adsorption chromatography의 有効성이 認定되므로 本 實驗에서는 이 方法에 의한 zymolyase의 部分 精製도 實施하여 그 結果를 보고하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 酵素 및 基質

Zymolyase의 粗標品으로써 zymolyase-5,000을 日本麒麟麥酒株式會社 總合研究所로부터 提供받았다.

酵母 細胞는 *Saccharomyces saké* 7號를 前報<sup>(1)</sup>와 同一한 方法으로 調製하였다. Protease 活性 測定에는 Merk社製의 Hammarstein casein을,  $\beta$ -1,3-glucanase의 活性 測定에는 carboxymethyl化한 pachyman(CM-pachyman)을 사용하였다. 伏苓(*Poria cocos* Wolf)으로부터의 CM-pachyman 調製法을 Fig. 1에 提示하였다. 各 多糖類 加水分解酵素의 基質中에 酵母 glucan은 市販의 啤 酵母(Orient Ferment. Co. Ltd. Japan)로부터 Peat 등<sup>(6)</sup>의 方法에 準해서 調製하였고, chitin은 精製된 새우의 chitin으로부터 Senzu<sup>(7)</sup>의 方法에 의하여 glycol化한 glycol chitin을 調製하여 使用하였다. 또한 酵母 mannan은 東京化成工業株式會社로부터 購入하였고, luteose는 *Penicillium aculeatum* var. *apiculatum* IFO 5,730으로부터 Nakamura<sup>(8)</sup>의 方法에 의해서 調製된 것을, 그리고 酵母 phosphomannan은 *Hansenula capsulata*의 細胞壁으로부터 Jeanes 등<sup>(9)</sup>의 方法에 의해서 調製된 것을 各 各 Hiraiishi 博士와 Nagasaki 博士로부터 提供받았다.

### 이온 交換體 및 Gel

陽 이온 交換體로써 Bio-Rad社製의 Biogel CM-30을, gel로써 Pharmacia社製의 Sephadex G-75(medium)를 使用하였다.

### 蛋白質 및 還元糖의 濃度 測定法

蛋白質의 濃度 測定은 波長 280 nm에서의 紫外 吸收法 및 Lowry 등<sup>(10)</sup>의 方法을 利用하였다. 還元糖은 Park-Johnson法<sup>(11)</sup>의 간편법인 Schales法<sup>(12)</sup>을 다시 改良한 Imoto 등<sup>(13)</sup>의 測定法에 의해서 定量하였다.

即, 試料 2.2 ml에 1.5 mM의 ferricyanide液 3 ml

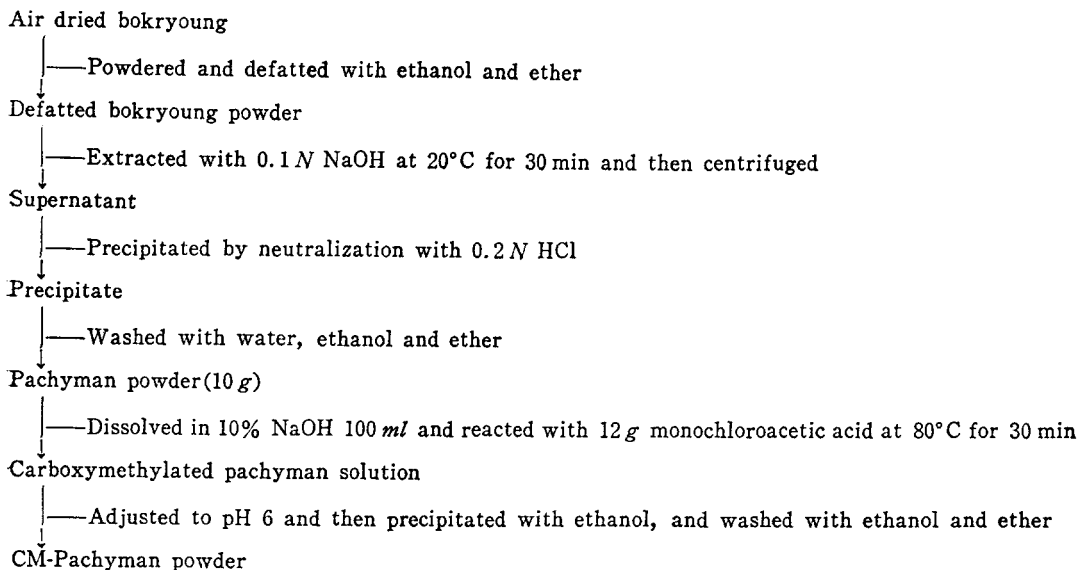


Fig. 1. Procedure for carboxymethylation of pachyman prepared from *Bokryoung*

을 加하여 15分間 煮沸시킨 후, 냉각하여 波長 420 nm 에서의 吸光度를 測定하였다. 還元糖 量은 glucose와 mannose를 標準 物質로 하여 작성한 檢量 曲線으로부터 算出하였다.

酵素 活性 測定法

가. 酵母 細胞에 대한 溶解 活性

前報<sup>(1)</sup>와 同一한 方法으로 測定하였다.

나. Protease 活性

Hagiwara法<sup>(14)</sup>에 準해서 測定하였다. 即, 0.9% casein 溶液(pH 10.0, 0.05 M glycine 완충액으로 調製) 5 ml에 酵素液 1 ml를 加하여 30°C에서 60分間 反應시킨 후, 0.44 M trichloroacetic acid 5 ml를 加하여 室溫에서 30分 이상 放置, 濾過시킨 뒤, 波長 275 nm에서 濾液의 吸光度를 測定하였다. 그 活性의 表示에는 對照 試驗區의 吸光度와의 差異 即 ΔO.D. 275nm 또는 活性 單位(Unit)를 利用하였다. 1 活性 單位는 反應 濾液의 ΔO.D. 275nm를 tyrosine量으로 換算하여, 1分間에 1 μg의 tyrosine을 生成하는 酵素의 量으로 定하였다.

다. β-1,3-glucanase 活性 測定法

0.05 M phosphate buffer(pH 7.5)로 調製한 0.1% CM-pachyman 溶液 2 ml에 酵素液 0.2 ml를 加하여 30°C에서 30分間 反應시킨 후 反應液中の 還元糖을 定量하였다. 그 活性의 表示에는 對照 試驗區의 吸光度와의 差異 即 ΔO.D. 420nm 또는 1分間에 1 μg의 還元糖을 生成하는 酵素量을 1單位로 하는 酵素 活性 單位로 表示하였다.

라. 多糖類 分解 試驗

上述의 β-1,3-glucanase 活性 測定法에 準해서 實施하였다. 단 不溶性 基質인 pachyman과 酵母 glucan은 0.05 M phosphate液(pH 7.5) 中에 0.1%(w/v) 현탁액을 만들어 約 5°C에서 12時間 程度 膨潤시킨 후 反應시켰다. 反應 終了 후 反應液을 濾過하여 그 濾液中の 還元糖을 測定하였다.

試料의 透析 및 濃縮

透析膜으로써 visking tube #18/32를 使用하였다. 透析은 試料의 約 50倍 以上の 透析 外液中(2~4°C)에서 그 外液을 數回 바꾸어 가면서 攪拌 實施되었다. 蛋白質 溶液의 濃縮은 Amicon社製의 ultrafiltration 裝置를 使用하여 질소가스로 加壓하면서 低溫(0~1°C)에서 實施되었다.

電氣 泳動法

精製된 zymolyase fraction의 純度を 調査하기 위하여 polyacrylamide gel disc 電氣 泳動을 實施하였다. 即, 7.5%의 gel을 調製하여 pH 8.3 및 4.3에서 gel (斷面積 0.2 cm<sup>2</sup>)當 30 mA의 電流를 흘려 보내면서 泳動을 實施, marker 色素가 4 cm 移動한 時點에서 泳動을 完了하였다. 泳動 후 amide black 10 B로 30分 以上 各 gel을 染色한 뒤에 7% 酢酸液으로 脫色하였다.

結 果

Biogel CM-30 이온 交換 管 크로마토그래피

Biogel CM-30 이온 交換 管 크로마토그래피에 의하여 粗 zymolyase中の zymolyase(lytic β-1,3-gluca-

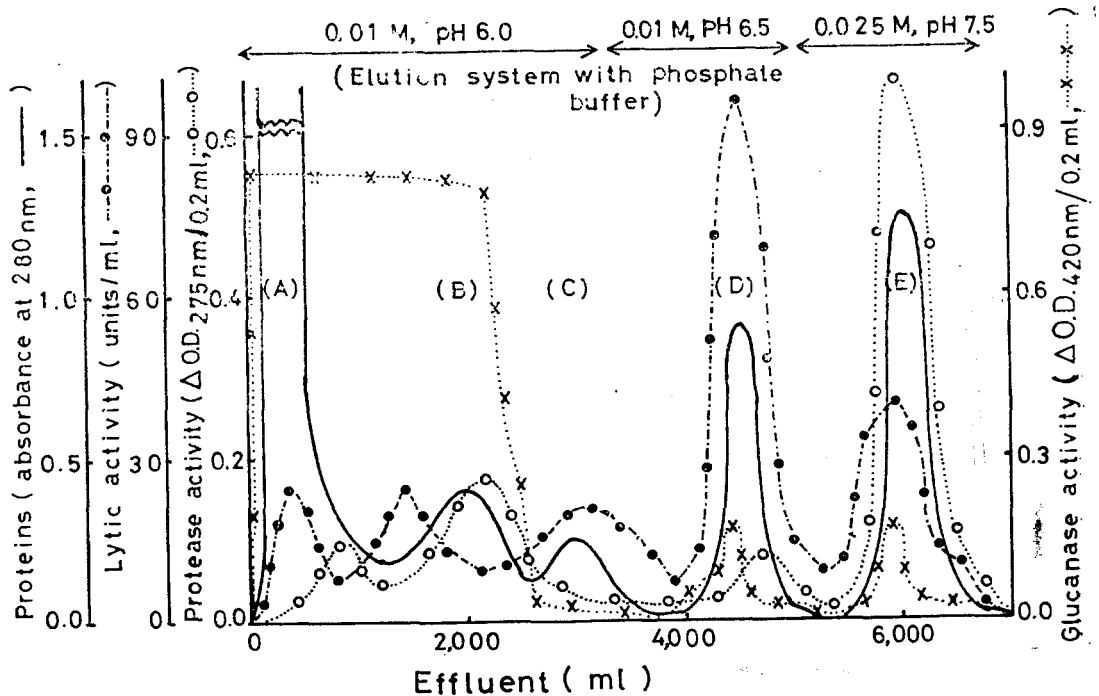


Fig. 2. Chromatogram of the crude zymolyase from a column of Biogel CM-30

The sample was applied to a Biogel CM-30 column (4×60 cm) equilibrated with 0.01 M phosphate buffer, pH 6.0, and 10 ml were collected. The enzyme was eluted by the step method with 0.01 M phosphate buffer, pH 6.5 and 0.025 M buffer, pH 7.5.

nase) fraction과 溶解 促進 因子의 分離를 시도하여 보았다.

常法<sup>(15)</sup>에 의해서 活性化되고, 0.01 M 磷酸 완충액 (pH 6.0)로 充分히 平衡化시킨 Biogel CM-30 column (4×60 cm)에 同一한 완충액으로 透析, 平衡化시킨 粗 zymolyase液(蛋白質 17g)을 試料로 供與하였다. 이어서 同一한 완충액으로 上記 管에 結合하지 못한 試料를 充分히 流出시킨 다음, 管에 結合된 試料의 溶出은 pH 6.5, 0.01 M의 磷酸 완충액 그리고 pH 7.5, 0.025 M의 同 완충액 順으로 實施하였다. 이어서 10 ml씩 分取된 各 溶出區에 對한 酵母 細胞壁 溶解 活性 (0.05 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 反應液 使用), protease 活性 그리고 β-1,3-glucanase 活性를 調査하였다. 그 結果 Fig. 2에 提示된 바와 같이 粗 zymolyase는 A에서 E까지의 다섯 파크로 分離되었으나, 그 중에서 pH 6.5, 0.01 M 磷酸 완충액으로 溶出된 피크 D는 매우 높은 溶解 活性를 보여주었다. 이 피크는 그 크로마토그래피의 舉動 및 酵素 活性의 樣狀으로 미루어 볼 때, zymolyase를 含有하는 것으로 推定되었기 때문에 zymolyase fraction으로 이름지었다. 이어서 pH 7.5, 0.025 M 磷酸 완충액으로 溶出된 피크 E는 높은 prote-

ase 活性를 보임과 同時에 微弱한 溶解 活性과 β-1,3-glucanase 活性도 나타내었다. 이와 같이 피크 E는 protease外에 上記 두 種類의 酵素 活性도 認定되고 있으나, 편의상 protease fraction으로 이름지었다.

한편, 이 크로마토그래피에 있어서 蛋白質의 回收率은 98.6%였고, protease, β-1,3-glucanase 및 溶解 活性의 回收率은 각각 84.5%, 100% 그리고 38.3%이었다.

溶解 促進 因子의 檢索

上述한 바와 같이 粗 zymolyase는 Biogel CM-30 크로마토그래피에 의해서 zymolyase fraction외에 protease fraction을 비롯한 4個의 획분으로 分劃되었기 때문에 이들 획분中에 zymolyase의 酵母 細胞壁에 對한 溶解 作用을 促進시키는 因子의 存在 如否를 調査 하였다.

各 획분의 試料 0.2 ml(O.D.<sub>280nm</sub> 0.1)와 zymolyase fraction 0.2 ml(O.D.<sub>280nm</sub> 0.1)을 還元劑 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>를 添加한 또는 添加하지 않은 反應液에 同時에 加하여 溶解 活性의 上昇 程度를 比較, 檢討하였다. 그 結果, Table 1이 보여 주는 바와 같이 피크 D(zymolyase fraction)는 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>의 存在下에서는 42%의 溶解 活性

Table 1. Acceleration effect between zymolyase fraction (D) and the other fractions(A,B,C and E) on the lysis of *Saccharomyces saké* yeast cells

Reaction mixture		Lytic* activity	Reaction mixture		Lytic* activity
Fraction	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>		Fraction	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	
	(mM)	(%)		(mM)	(%)
A	50	1.0	D	0	4.0
B	50	10.7	D+A	0	4.0
C	50	7.4	D+B	0	4.7
D	50	42.0	D+C	0	4.2
E	50	11.2	D+A-C	0	9.5
			D+E	0	38.0

\*Decrease % in O.D. at 800 nm

을 보이고 있으나, 非 存在下에서는 4%에 不過하였다. 그러나 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>의 非 存在下에서도 피크 E (protease fraction)液을 反應液에 添加하므로써 피크 D의 溶解 活性은 38%까지 上昇하였다. 反面에 피크 E 以外의 피크에서는 zymolyase fraction의 溶解 活性을 上昇시키는 促進 效果는 認定되지 않았다. 따라서 檢索中에 있는 酵母 細胞壁 溶解 促進 因子는 粗 zymolyase中의 zymolyase fraction을 비롯한 다른 획분으로부터 크로마토그래피에 의해서 分離되어 protease

fraction中에 存在하고 있는 事實이 確認되었다.

Sephadex G 75 gel에 의한 affinity adsorption chromatography

前述한 바와 같이 Biogel CM-30 이온 交換 크로마토그래피에 의해서 粗 zymolyase中의 zymolyase fraction과 protease fraction이 대부분의 不純 蛋白質로부터 分離됨과 同時에 檢索中인 溶解 促進 因子가 protease fraction 中에 存在하고 있음이 判明되었다. 그런데 序論에서도 언급한 바와 같이 zymolyase는 酵母

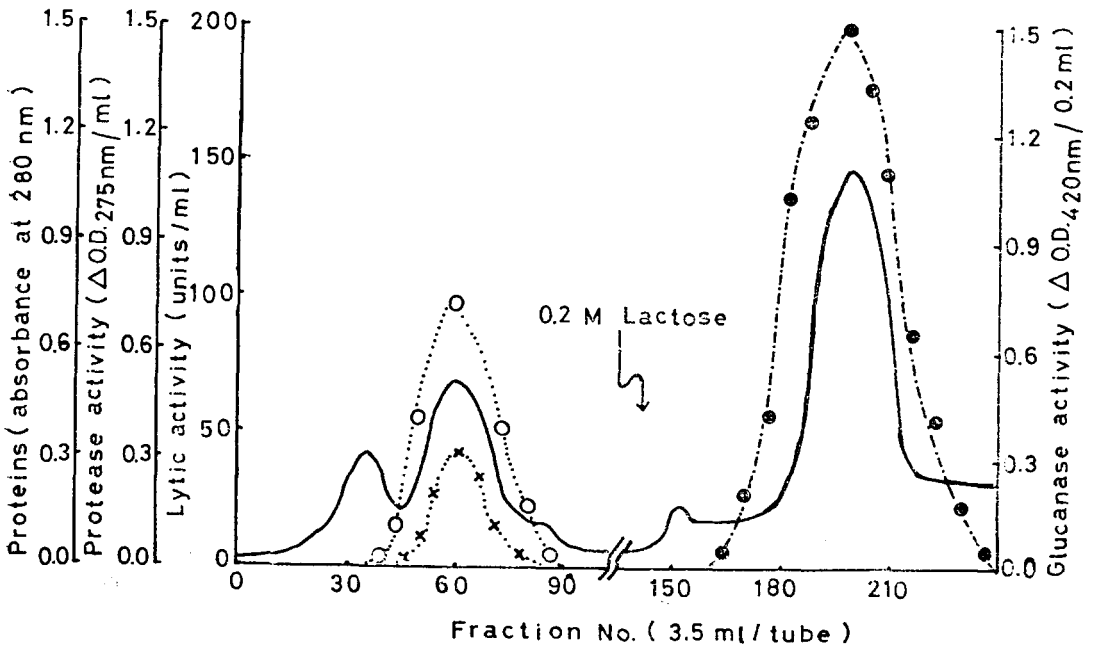


Fig. 3 Affinity adsorption chromatogram of the zymolyase fraction from a column of Sephadex G-75. 4.5ml of concentrated zymolyase fraction was applied to the Column(3×35cm) equilibrated with 0.01M phosphate buffer, pH 6.0, and the enzyme was eluted with 0.2M lactose in that buffer. Proteins, —; Protease activity, ...○...○...; lytic activity, ----●----●----; Glucanase activity, ...×...×....

細胞壁 溶解에 있어서 溶解 促進 因子와 相互 不可欠한 關係에 있기 때문에, protease fraction 中의 溶解 促進 因子를 追跡, 精製하고, 그 特性 等を 究明하는 데에 있어서 zymolyase의 使用은 不可避하다. 따라서 여기에 使用되는 zymolyase는 單一 成分으로 精製되었거나, 적어도 上記한 研究를 遂行하는 데에 지장이 없는 것으로 認定할 수 있을 程度까지 精製되지 않으면 아니된다. 고로 今번에는 앞의 實驗에서 적어도 세 種類 以上の 酵素가 混在하고 있을 것으로 觀察된 zymolyase fraction에 對한 精製를 實施하였다.

zymolyase는 그 分子量이 約 21,000으로 報告<sup>(2)</sup>되었고, Sephadex gel에 對해서 親和性을 가지고 있음이 著者 等の 豫備 實驗 段階에서 밝혀졌기 때문에 Sephadex G-75 gel에 의한 affinity adsorption chromatography를 다음과 같이 實施하였다.

0.01 M 磷酸완충액(pH 6.0)에 의해서 平衡化 된 Sephadex G-75 管(3×35 cm)에 앞의 實驗에서 얻어진 zymolyase fraction 4.5 ml(蛋白質 58 mg)을 試料로 供與하였다. 上記 완충액으로 非 吸着 試料를 充分히 씻어 낸 다음, 吸着된 試料를 0.2 M lactose를 含有하는 同一한 완충액으로 溶出하여 그 패턴을 Fig. 3에 提示하였다. 非 吸着 試料는 本 實驗에서 調査하였던 그 어느 酵素 活性도 認定되지 않는 a와, 溶解 活性은 認定되지 않으나 protease 및 β-1,3-glucanase의 活性을 보인 b의 두 피크로 分割되었다. 이어서 0.2 M lactose 溶液에 의해서 溶出된 피크 c는 매우 높은 溶解 活性을 보인 반면에, protease 및 β-1,3-glucanase의 活性은 認定되지 않았다. 따라서 c 피크를 L-c fraction(lytic fraction c)이라 이름지었고, 透析에 의하여 糖 및 鹽類를 排除한 다음에 濃縮, 凍結乾燥 하였다.

한편, 本 크로마토그래피에 있어서 蛋白質의 回收率은 約 70%이었고, protease, β-1,3-glucanase 및 溶

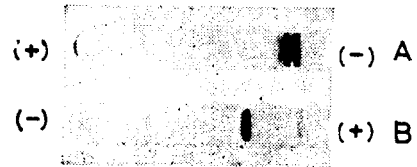


Fig. 4. Pattern of the polyacrylamide gel disc Electrophoresis of fraction L-c A, pH 8.3 gel; B, pH 4.3 gel

解 活性의 回收率은 각각 93%, 91%, 78%이었다.

L-c fraction의 純度 檢定

L-c fraction의 純度를 polyacrylamide gel disc 電氣 泳動에 의해서 調査하였다. 그 結果, Fig. 4에서 보여 주는 바와 같이 pH 8.3 gel에서는 주로 두 個의 밴드가 檢出되었으나, pH 4.3 gel에서는 單一 밴드만이 檢出되어 L-c fraction은 Sephadex를 이용한 크로마토그래피에 의해서 상당히 精製되어 있음이 確認되었다.

L-c fraction의 基質 特異性

L-c fraction에는 protease 및 β-1,3-glucanase의 活性은 認定되지 않고, 오직 強한 溶解 活性만이 認定되었으나, 앞의 pH 8.3 gel의 電氣 泳動에서는 2개의 뚜렷한 밴드가 確認되었다. 따라서 本 實驗을 통해서 L-c fraction 中에 β-1,3-glucanase와 더불어 存在할 만한 多糖類 分解 酵素의 活性을 檢出, 確認코져 하였다.

L-c fraction의 凍結 乾燥 標品 50 μg을 使用하여 各種 多糖類 基質에 對하여 0~120分間 反應시켜, 酵素 活性의 發現을 經時的으로 追跡하였다. 한편 脫 이온 水로 透析한 粗 zymolyase(24,000 units) 93 μg을 使用하여 比較 實驗을 實施하였다. 그 結果, Table 2에 提示된 바와 같이 粗 zymolyase는 酵母 glucan, pachyman, CM-pachyman 및 glycol chitin에 對한 酵素

Table 2. Substrate specificities of crude zymolyase and fraction L-c\*

Substrates	Main linkage type	Hydrolysis	
		Crude zymolyase	Fraction L-c
Yeast glucan	β-1,3-, β-1,6-	+	+
Pachyman	β-1,3-	+	-
CM-Pachyman	β-1,3-	+	±
Luteose	β-1,6-	-	-
Glycol chitin	β-1,4-	+	-
Yeast mannan	α-1,6-, α-1,2-, α-1,3-	-	-
Yeast phosphomannan	α-1,2-P-α-1,6-	-	-

\*Zymolyase fraction purified partially by affinity adsorption chromatography on Sephadex G-75

活性이 認定되었으나, L-c fraction은 오직 酵母 glucan 에만 높은 酵素 活性이 認定되었다. 이로써 L-c fraction은 酵母 細胞壁을 構成하고 있는 主要한 多糖類<sup>(5, 16, 17)</sup> 基質 中 酵母 細胞壁으로부터 調製한 glucan에만 特異적으로 作用하고 있음이 確認되었다.

이상의 結果, 本 L-c fraction의 凍結 乾燥 標品은 溶解 促進 因子에 關한 各種 實驗에 使用하여도 그 實驗을 원만히 遂行하는 데에 지장이 없을 程度로 精製 되었다고 判斷되었다. 따라서 이를 zymolyase의 部分 精製 標品으로 하여 以後의 實驗에 供與하였다.

### 考 察

著者 등은 zymolyase에 關한 일련의 研究過程에서 粗 zymolyase의 標品中에 zymolyase의 *Saccharomyces sake* 細胞에 대한 溶解能을 促進시키는 某種의 促進 因子가 zymolyase와 더불어 存在하고 있을 可能性에 着眼하게 되었다. 따라서 本 實驗에서는 粗 zymolyase로부터 溶解 促進 因子의 存在를 檢索, 確認 하여 그 物質을 粗 zymolyase中의 다른 成分으로부터 分離함과 同時에, 促進 因子에 關한 研究를 進行시키는 데에 不可欠한 zymolyase fraction의 精製도 實施 하였다.

粗 zymolyase는 Biogel CM-30 이온 交換 크로마토 그래프에 의해서 다섯의 피크로 分劃되었다. 그 중 D 피크는 pH 6.0의 Biogel CM-30 column에 吸着되어 pH 6.5 以上에서 溶出되는 획분으로써, 다른 획분에 비해서 매우 強한 溶解 活性을 보여주었다. 이 結果는 *Arthrobacter luteus*의 培養液으로부터 zymolyase를 分離, 精製한 바 있는 Kitamura 등<sup>(2)</sup>의 實驗 結果와도 잘 一致하는 것으로써, 이 피크 D 중에 zymolyase가 含有되어 있을 것으로 推定되었다. 또한 zymolyase fraction (Peak D)은 溶出 완충액의 이온 強度는 變換 없이 단지 완충액의 pH를 0.5 以上 높여 주는 것만으로 이온 交換體로부터 解離되는 것으로 보아, zymolyase는 Biogel CM-30의 陽 이온 交換體에 弱하게 結合되어 있으며, 따라서 그 表面 電荷는 비교적 弱한 陽 이온을 띠고 있을 것으로 推定되었다.

한편, 溶出 완충액의 pH를 6.5에서 7.5까지, mole 濃도를 0.01에서 0.025까지 높여 줌으로써 上記 column 으로부터 溶출된 唯一한 피크인 E (protease fraction) 중에 檢索하고 있는 溶解 促進 因子가 存在하고 있음이 明白하게 確認되었다. 即, protease fraction의 促進 作用에 의해서 zymolyase fraction의 溶解 活性은 反應液에 還元劑  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ 를 添加했을 때와 거의 같은 水準인 約 10倍 程度까지 上昇하였다. 이와 같은 溶解

促進 因子의 存在는 zymolyase를 分離, 精製한 바 있는 Kitamura 등<sup>(2, 4, 17)</sup>의 研究 報告에서는 發見되지 않았다. 또한 이 溶解 促進 因子가 含有된 protease fraction은 그 溶出 條件으로 보아 zymolyase보다는 비교적 높은 陽 이온의 帶電體일 것으로 생각되었다. protease fraction은 casein에 대한 protease 活性 以外에도  $\beta$ -1, 3-glucanase와 酵母 細胞壁 溶解 活性이 아울러 檢出되었다. 때문에 促進 因子의 本體가 從來에 報告<sup>(5, 16, 19)</sup>된 바와 같은 一種의 酵素狀 物質인지, 아니면 이제까지 알려진 바 없는 第三의 物質인지, 그리고 溶解 促進 作用이 單一種의 成分에 의한 것인지 또는 複數 成分의 協同作用에 의한 것인지를 究明하기 위해서는 앞으로의 實驗을 통해서 protease fraction 中의 溶解 促進 因子를 追跡, 精製하여 나가야 할 것이다.

Biogel CM-30 이온 交換 크로마토그래피에 있어서 蛋白質, protease 및  $\beta$ -1, 3-glucanase 活性의 回收率은 85% 以上 100%까지를 보인 反面에, 溶解 活性의 回收率만은 40%를 下回하였다. 前報<sup>(1)</sup>에서 살펴 본 바와 같이 크로마토그래피에 있어서 zymolyase의 溶解 活性의 損失은 低溫에 있어서는 約 20% 以上을 上回하지 않을 것으로 생각되므로, 이는 주로 zymolyase와 溶解 促進 因子가 서로 分離되었기 때문인 것으로 推定되었다.

Biogel CM-30 이온 交換 크로마토그래피에 의해서 分劃된 zymolyase fraction (Peak D)은 계속하여 Sephadex G-75 gel을 使用한 affinity adsorption chromatography에 의해서 精製되었다. 이 크로마토그래피에 의해서 zymolyase fraction으로부터 酵母 細胞 非 溶解性의  $\beta$ -1, 3-glucanase, protease 및 不純 蛋白質은 除去되었으나, 溶解 活性 物質은 Sephadex G-75의 dextran matrix ( $\alpha$ -1, 6-glucan)에 吸着되어 0.2 M lactose 溶液에 의해서 遊離, 回收되었다. 最近 酵母 細胞壁 溶解 酵素의 研究過程에서 溶解 酵素의 Sephadex gel에 대한 親和性을 示唆한 報告<sup>(20)</sup>는 있었으나, affinity adsorption chromatography의 可能性을 檢討한 報告는 接할 수 없었다. 이 方法은 精製의 初期 段階에 있어서 酵母 細胞壁 溶解 活性 物質을 기타 酵素類 및 不純 蛋白質로부터 分離하는 데에 있어서 대단히 有效하고 간편한 手段으로 생각되었다.

zymolyase fraction의 部分 精製品 L-c fraction은 酵母 細胞壁을 構成하고 있는 多糖類 基質 中 酵母 glucan에만 基質 特異性을 나타내었다. 이는 Kitamura 등<sup>(2)</sup>의 報告와도 잘 一致하는 事實이다. 이미 Kitamura 등<sup>(2)</sup>에 의해서 zymolyase는  $\beta$ -1, 3-glucanase임이 밝혀졌으나, 酵母 glucan은  $\beta$ -1, 3- 結合 樣式以

외에  $\beta$ -1, 6-結合 樣式도 含有하고 있다는 事實, 그리고 L-c fraction이 아직 disc 電氣 泳動의 으로 單一 成分이 아닌 點으로 미루어 보아, L-c fraction中에 酵母 細胞壁의  $\beta$ -1, 6-glucoside에 作用하는  $\beta$ -1, 6-glucanase가 存在할 可能性에 特히 注目하였으나, L-c fraction의  $\beta$ -1, 6-glucan에 대한 酵素 活性은 전혀 認定되지 않았다. 따라서 凍結 乾燥된 L-c fraction은 아직 電氣 泳動의 으로 均一한 狀態는 아닐지라도, 酵母 細胞壁 溶解 活性 및 酵母 細胞壁 glucan에 대한 分解 活性 以外的 酵素 活性은 거의 認定되지 않으므로 以後의 溶解促進因자의 精製를 비롯한 各種 實驗에 zymolyase의 部分 精製 標品으로서 供與하여도 무방하다고 判斷되었다.

### 要 約

著者 등은 *Arthrobacter luteus*로부터 分離된 zymolyase(endo- $\beta$ -1, 3-glucanase)에 關한 일련의 研究 過程에서 粗 zymolyase의 標品中에 zymolyase의 *Saccharomyces sake* 細胞壁에 대한 溶解 活性을 促進시키는 因자의 存在를 發見하였다. 따라서 粗 zymolyase中의 그 促進 因자를 分離함과 同時에 促進 因子에 關한 研究를 進行함에 있어서 不可欠한 zymolyase의 精製도 아울러 試圖하였다. 그 結果는 다음과 같다.

1. 粗 zymolyase는 Biogel CM-30 이온 交換 크로마토그래피에 의해서 column을 그대로 通過한 세 개의 피크를 包含한 다섯 개의 피크(A~E)로 分割되었다.

2. 다섯 개의 피크 중에서 pH 7.5, 0.025 M 磷酸 완충액으로 溶出된 피크 E(protease fraction)만이 zymolyase fraction의 溶解 活性을 約 10배까지 上昇시키는 溶解 促進 效果가 認定되었다. 따라서 檢索코져하는 溶解 促進 因子는 protease fraction 중에 存在함이 確認되었다.

3. Sephadex G-75 gel를 使用한 affinity adsorption chromatograph에 의해서 zymolyase fraction(peak D)으로부터 非溶解性  $\beta$ -1, 3-glucanase, protease 및 不活性 蛋白質이 排除된 L-c fraction이 얻어졌다. Polyacrylamide gel disc 電氣 泳動에서 L-c fraction은 pH 4.3 gel에서는 明確한 單一의 蛋白質 밴드를 보여주었으나, pH 8.3 gel에서는 아적도 두 개 以上の 밴드가 檢出되었다.

4. 그러나 L-c fraction은 酵母 細胞壁의 多糖類 成分中에서 오직 glucan에 대한  $\beta$ -1, 3-glucanase의 基質 特異性만을 나타내었다. 따라서 L-c fraction을 zy-

molyase의 部分 精製 標品으로써 溶解 促進 因子에 關한 研究에 提供하고자 凍結 乾燥하였다.

### 謝 意

本 研究 遂行에 있어서 多量の 粗 zymolyase 標品을 提供하여 준 日本 麒麟麥酒株式會社 總合研究所 그리고 貴重한 多糖類 基質을 提供하여 준 Nagasaki 및 Hiraishi 博士께 깊이 감사한다.

### 文 獻

1. 吳洪祿, 下田忠久, 船津勝: 한국식품과학회지, 11(4), 242 (1979)
2. Kitamura, K., Kaneko, T. and Yamamoto, Y.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 20, 323 (1979)
3. Feeney, R. E. and Whitaker, J. R. (Ed.): *Food Protein*, A.C.S., Washington, p.244 (1977)
4. Kaneko, T., Kitamura, K. and Yamamoto, Y.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 15, 317 (1969)
5. 船津勝, 鶴大典 編: 溶菌 酵素, 講談社, 東京, p.152 (1977)
6. Peat, S., Whelan, W. J. and Edwards, T. E.: *J. Chem. Society*, 3862 (1958)
7. Senzu, R. and Okimasu, S.: *J. Agr. Chem. Soc. (Japan)*, 23, 437 (1950)
8. Nakamura, N. and Tanabe, O.: *Agric. Biol. Chem.*, 27, 80 (1963)
9. Jeanes, A. and Watson, P. R.: *Can. J. Chem.*, 40, 1318 (1962)
10. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
11. Park, J. T. and Johnson, J.: *J. Biol. Chem.*, 181, 149 (1949)
12. Schales, O. and Schales, S. S.: *Arch. Biochem.*, 8, 285 (1945)
13. Imoto, T. and Yagishita, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 35, 1154 (1971)
14. 赤堀四郎 編: 酵素 研究法 II, 朝倉書店, 東京, p.237 (1956)
15. 船津軍喜: 化學と生物, 7, 292 (1969)
16. Rose, A. H. and Harrison, J. S.: *The Yeast*, Acad. Press, London, vol.2, p.135 (1970)
17. 山本 康: 化學と生物, 10, 709 (1972)



18. William, L., McLellan, J. R. and Lampen, J. O.: *J. Bacteriol.*, **95**, 967 (1967)
19. Mann, J. W., Heitz, C. E. and MacMillan, J. O.: *J. Bacteriol.*, **111**, 821 (1972)
20. 北村勲平, 金子龍彦, 山本康: 麒麟紀要, **22**, 155 (1971)