

Aspergillus sp. HCLF-4에 의해 생성되는 세균세포벽 분해효소의 특성

임진하 · 민병례¹ · 최영길*

한양대학교 생명과학과, ¹상명대학교 생물학과

Aspergillus sp. HCLF-4가 생성하는 세균 세포벽 분해효소의 특성을 규명하였다. 본 세포벽 분해 효소는 *Anabaena cylindrica* 세포벽 분해능을 보였다. 이 세포벽 분해 효소는 *Aspergillus* sp. HCLF-4를 기질성분으로 0.05% heat killed *Micrococcus luteus*가 포함된 PDB 배지에 키웠을 때 생성되는 inducible enzyme으로 분자량은 약 14.3 kDa 이었다. 본 세포벽 분해효소는 pH 3.0-4.0, 온도 30°C 조건에서 최고의 활성을 보였고 Mg²⁺, Mn²⁺의 2가 이온에서 분해 효소의 활성이 촉진되었다. 반면, 1가 양이온 Na⁺와 Li⁺, 2가 양이온 Ca²⁺와 Cu²⁺, 3가 양이온 Fe³⁺에서는 활성이 억제되었으며 EDTA와 PMSF 또한 분해 효소의 활성을 억제 시켰다. 이 효소는 N-acetylmuramyl-L-amidase 또는 endopeptidase와 같은 활성을 보였다.

Key word □ *Aspergillus* sp., cell wall lytic enzyme, inducible enzyme

세균세포벽 분해효소는 다양한 환경에 서식하는 여러 가지 미생물에서 발견되었다(13,26). 이 효소들은 세균 세포벽의 peptidoglycan 층의 구조적으로 중요한 linkage를 가수분해하는 능력이 있다(5,20). 대부분의 세균들은 세포 성장 및 분열을 위한 종류 이상의 peptidoglycan 가수분해 효소를 생성하며(24), 이 효소들은 peptidoglycan 상의 특정 linkage를 분해시키는 각각의 특이적 작용기작에 따라 N-acetylmuramoylhydrolases (transglycosylase), N-acetylglucosaminidases, N-acetylmuramyl-L-alanine amidases, endopeptidases 및 carboxypeptidases 등으로 구분된다(13). 곰팡이 역시 발아 시 galactosidase, endoglucanase, cellobiohydrolase, β -mannase 등 많은 종류의 가수분해 효소를 합성하는 것으로 알려져 있다(7,10,14,21).

이들 가수분해 효소들은 세포자체의 분열이나 세포벽의 성장, 세포벽의 재생, 포자형성, 편모 형성 및 형질전환 등의 과정에서 중요한 역할을 수행하는 한편 다른 종의 성장을 억제하거나 파괴하는 기능을 갖기도 한다(13). 세포벽 분해 효소들은 미생물의 세포벽 구조를 규명하고(12,16,20), 미생물의 포자형성 억제 연구(5,15)에 이용되어져 왔으며 세포질 분리를 위한 세포벽 제거 등에 연구되어져 왔다. 뿐만 아니라, 이 효소들은 수계에서 부영양화를 억제하는데 이용될 수 있다고 제안되었다(2,3). 이러한 이유로 세포벽 분해 효소들은 세포생물학, 생화학, 세균학 등 전통적인 생물학분야 뿐 아니라 분자 생물학, 환경미생물공학 등 현대 생물학 분야에 이르기까지 오래도록 흥미로운 주제로 관심을 받아 왔다.

본 연구에서는 현(4) 등에 의해 분리되었던 곰팡이 *Aspergillus* sp. HCLF-4가 생성하는 세균세포벽 분해효소를 발견하였다. 그리고 이 효소가 남조류(*Anabaena cylindrica*)의 세포벽 분해현상

이 있음을 확인하고 세포벽 분해효소의 부분적 특성을 규명함으로써 세포벽 분해 효소 연구의 다양한 재료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양조건

본 연구에서 곰팡이 *Aspergillus* sp. HCLF-4는 potato dextrose broth (PDB) (Difco, U.S.A)와 1.8%의 agar를 첨가하여 만든 potato dextrose agar (PDA) 배지에서 27°C를 유지하며 배양하였다. 세균세포벽 분해효소를 생성하도록 할 때에는 heat killed *M. luteus* cell ATCC 4698 (Sigma, U.S.A.)을 포함한 PDB 또는 PDA 배지에서 동일 조건으로 배양하였다. 남조류(*Anabaena cylindrica* M-1)는 일본 동경대 부설 Institute of Applied Microbiology (IAM) culture collection에서 제공받은 것을 사용하였으며 BG-11 배지(NaNO₃ 1.5 g, K₂HPO₄ 0.04 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.075 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.036 g, EDTA disodium 0.001 g, Na₂CO₃ 0.02 g, H₃BO₃ 2.86 mg, ZnSO₄ · 7H₂O 0.222 mg, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.39 mg, CuSO₄ · 5H₂O 0.079 mg, Co(NO₃)₂ · 6H₂O 0.0494 mg/l)에서 온도 28°C, 빛의 양 200 Lux의 cool white fluorescence light 조류배양기(Sanyo, growth cabinet)에서 배양하였다.

분해효소의 준비

PDB 배지에 0.05% heat killed *M. luteus* ATCC 4698를 첨가하여 HCLF-4를 27°C, 7일 동안 배양 후 배양 상등액을 Whatman No. 2 paper, 0.45 μ m, 0.22 μ m pore size membrane에 차례로 여과시켰다. 그리고 나서 최종 여과액을 ultrafiltration kit (Amicon Diaflo)를 이용하여 처음 배양상등액의 1/10로 농축하였다. 이때 membrane은 YM-3 (Diaflo, exclusion size 3,000 MW)를 사용하였다. 이렇게 얻은 농축액에 일차적으로 50% 포

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: (02) 2290-0952, Fax: (02) 2293-9230
E-mail: ykchoi@email.hanyang.ac.kr

화 ammonium sulfate를 넣고 4°C에서 2시간 동안 섞어준 후 다시 80% 포화 ammonium sulfate를 넣고 4°C에서 12시간동안 섞어주며 단백질을 침전시켰다. 그 후 원심 분리하여(10000×g, 20 min, 4°C) 얻은 침전단백질을 10 ml Tris-HCl (20 mM, pH 8.0) 완충용액에 현탁하여 dialysis tube (Spectra/Por membrane tubing MWCO; 3500 Dalton)에 넣어 동일 완충 용액 2 l 에 6 시간씩 2회 삼투하여 세포외 효소를 얻었다.

세포내 효소를 얻기 위해 앞선 단계의 Whatman No. 2 paper 에 걸러진 세포를 50 ml Tris-HCl (20 mM, pH 8.0) 완충용액에 현탁한 후에 지름 0.1 mm 의 bead-beater (Biospec products) 로 3분 간격으로 10회 30초간 세포를 파쇄한 후 Whatman No. 2 paper, 0.45 μm, 0.22 μm pore size membrane에 차례로 여과하였다. 그 이후에도 세포외 효소를 얻을 때의 과정을 동일하게 시행하여 세포내 효소를 얻었다.

단백질 정량

Lowry의 방법으로 bovine serum albumin을 표준단백질로 이용하여 정량 하였다(20).

세포벽 분해 현상 확인

세포벽 분해 현상의 관찰은 다음과 같이 수행하였다. PDA에 0.2% heat killed *M. luteus*를 첨가하여 균한 배지에 HCLF-4를 접종하고 27°C 배양기에서 5일 이상 배양하며 곰팡이 colony 주변에 투명대가 나타나는가를 관찰하였다. 그리고 *A. cylindrica* 배양액 4 ml 에 HCLF-4 배양 상등액에서 분리한 세포의 효소액 1 ml (20 μg/ml)을 혼합하여 6시간동안 28°C, 200 Lux의 조류배양기에서 반응시킨 후 효소액 대신 1 ml 증류수를 넣고 같은 조건에서 6시간 동안 반응시킨 *A. cylindrica*와 함께 1000× 배율의 광학현미경(Zeiss, Japan)으로 비교 관찰하였다.

분해효소의 확인 및 분자량 결정

분해효소의 확인 및 분자량 결정을 위해 renaturing SDS-PAGE 를 수행하였다(6,11). Laemmli의 완충용액을 이용하여(19), 0.35% heat killed *M. luteus* ATCC 4698을 첨가한 12% polyacrylamide gel에서 Hoefer 사의 SE600 전기영동장치로 4°C 의 저온실에서 수행하였다. 본 효소와 molecular mass size marker를 전기영동한 후 효소부분의 gel만 잘라 300 ml 의 증류수(18 MΩ, Milli-Q water)로 15분씩 2회 세척한 후 150 ml 의 renaturing buffer (0.1% Triton X-100, 10 mM MgCl₂/20 mM Phosphate Buffer pH 7.0)에 넣어 37°C 진탕 배양기에서 50 rpm 으로 12시간 동안 반응시켜 sample 단백질을 재활성화시켜 gel 상에 뚜명한 band가 생기는지 관찰하였다. molecular mass size marker를 전기영동한 gel은 7% acetic acid 용액에 보관하였다가 효소의 renaturing 후 비교하였다.

분자량 결정을 위한 molecular mass size marker로 myosin (205 kDa), β-galactosidase (121 kDa), bovine serum albumin (70 kDa), ovalbumin (52.4 kDa), carbonic anhydrase (34.9 kDa), soybean trypsin inhibitor (29.1 kDa), lysozyme (20.3 kDa), aprotinin (6.9 kDa) (Bio-Rad, prestained SDS-PAGE standards)

을 사용하였으며, 결과는 Image Analyzer (Bio-Rad, Quantity One 4.0.3) 로 분석하였다.

생장곡선의 변화

250 ml flask에 100 ml의 PDB를 담은 것과 0.05% heat killed *M. luteus* ATCC 4698 (Sigma, U.S.A)을 포함한 100 ml PDB를 담은 것 10개씩을 준비하고 각각에 동량의 HCLF-4를 접종 후 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 24, 28일에 0.45 μm pore size membrane 에 여과하여 건조시킨 후 균체의 건조중량을 측정하였다.

분해효소 활성의 최적조건

적정 온도

20 mM Tris-HCl (pH7.0)에 A660에서 1.2의 흡광도가 되도록 heat killed *M. luteus*를 넣어 준비한다. 이렇게 준비한 기질 용액 2 ml과 효소용액 1 ml (20 μg/ml)을 혼합한 것을 각각 4, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C에서 20분간 반응시킨 후 spectrophotometer (Hewlett Packard, HP845×UV-Visible System, U.S.A.)로 흡광도 변화를 측정하였다.

적정 pH

평균증류수에 A660에서 2.4의 흡광도가 되도록 heat killed *M. luteus*를 넣어 준비하고, Britton-Robinson buffer(1)를 pH 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 및 7.0 으로 준비해 두었다. 그리고 나서 기질 용액 1 ml 과 각 pH의 Britton-Robinson buffer 1 ml 씩을 혼합하고, 효소용액 1 ml (20 μg/ml)을 넣어 30°C에서 20분간 반응시킨 후 흡광도 변화를 측정하였다.

Chemical factor의 영향

Britton-Robinson 완충용액(pH 3.0)에 A660에서 1.2의 흡광도가 되도록 heat killed *M. luteus*를 넣어 준비한 기질 용액 1.8 ml에 금속이온과 화학 물질(Table 1)을 농도별(최종농도)로 0.2 ml 씩 넣은 후 효소용액 1 ml (20 μg/ml)을 첨가하여 30°C에서

Table 1. Effects of various metal ions and chemicals on the cell wall lytic enzyme

Reagent	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control		100
NaCl	10	81.6
LiCl	10	84.9
MgCl ₂	10	107.9
CaCl ₂	10	90.9
MnCl ₂	10	105.5
CuCl ₂	10	83.2
FeCl ₃	10	0.0
PMSF	0.1	65.1
EDTA	10	80.0

20분간 반응시킨 후 흡광도 변화를 측정하였다.

기질 특이성

전처리

Britton-Robinson 완충용액(pH 3.0)에 heat killed *M. luteus* ATCC 4698 를 2 mg/ml 되게 넣어 8 ml 씩 2개의 cap tube에 준비하였다. 이중 하나엔 준비한 효소 2 ml (20 µg/ml)을 첨가하고 다른 하나엔 멸균 증류수 2 ml 첨가하여 대조군으로 사용하였다. 각각의 반응액을 30°C 진탕 배양기에서 배양하면서 30분 간격으로 1 ml 씩 취하고 3 ml의 뜨거운 증류수를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이중 1 ml은 A660에서 흡광도를 측정하고 나머지는 100°C에 10분간 끓인 후 12000×g, 20°C 조건에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 환원당 정량과 유리 아미노기 정량에 사용하였다.

환원당과 유리아미노산의 정량

환원당의 농도는 Thompson과 Shockman의 방법으로(26) 유리 아미노산은 Ghuysen 등의 방법으로 정량 하였다(13). 정량을 위한 standard curve는 각각 glucose와 glycine을 이용하였다.

결과 및 고찰

세포벽 분해 현상의 관찰

세포벽 분해효소에 민감하게 반응하는 것으로 알려진 heat killed *M. luteus* cell을 포함한 PDA배지 상에서 HCLF-4를 배양하며 colony 주변에 투명대를 관찰하였다. 5일 이후부터 희미하게 colony 주변에 투명대가 관찰되기 시작했으며 10일 이후 투명환이 뚜렷이 나타났다(Fig. 1). 분리된 효소를 *A. cylindrica*에 처리하고 반응 6시간 후에 증류수를 넣은 대조군과 비교 관찰한 결과, 증류수와 반응시킨 대조군은 별다른 변화를 보이지 않았으나, 효소를 첨가한 *A. cylindrica*에서는 세포들이 심한 손상을 받아 분절되고 용균된 잔해들을 현미경상으로 관찰 할 수 있었다(Fig. 2). 이는 HCLF-4가 분비하는 효소가 *A. cylindrica* 세포벽 분해능이 있음을 입증할 수 있는데, 이와 같이 한 종이 분비하는

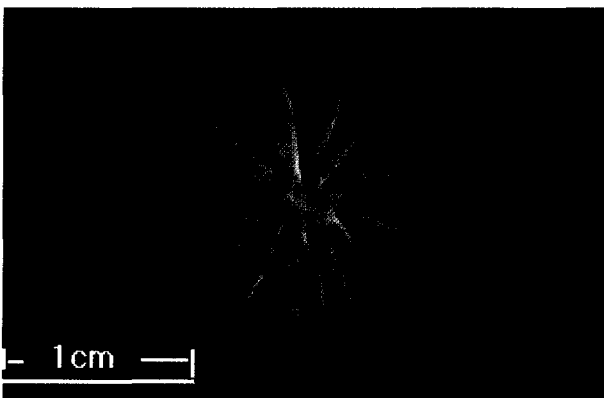


Fig. 1. Clear zone formation on heat killed *M. luteus* (0.2%) agar plate.

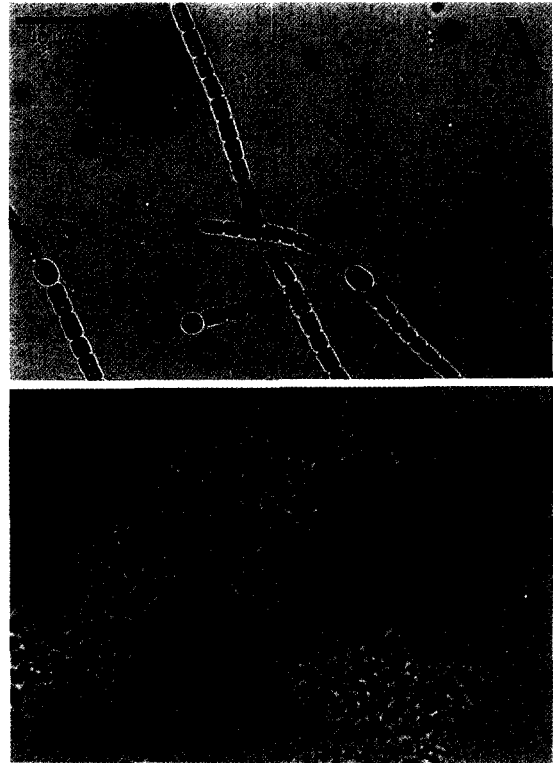


Fig. 2. Light microscopy (Zeiss, × 1000); Lysis of *A. cylindrica* by cell wall lytic enzyme A: Control , B; Treated cells during 6 hours by cell wall lytic enzyme.

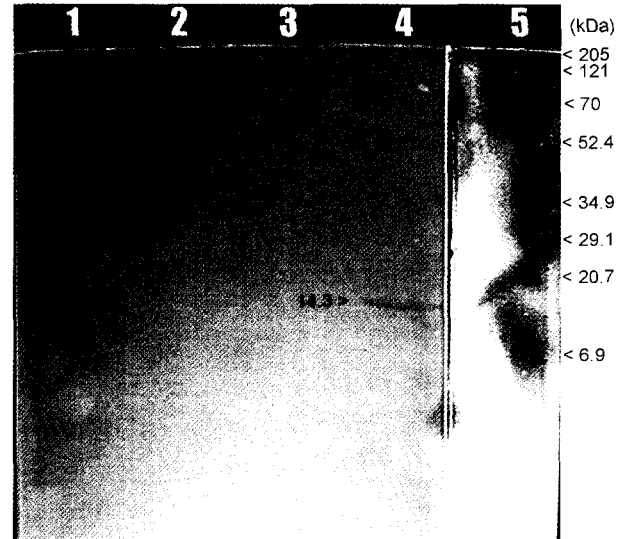


Fig. 3. Determination of cell wall lytic enzyme by renaturing SDS-PAGE. Lane 1, Intracellular protein of the HCLF-4 which was grown in a PDB media; 2, Intracellular protein of the HCLF-4 which was grown in a PDB media containing 0.05% heat killed *M. luteus* cells; 3, Extracellular protein of the HCLF-4 which was grown in a PDB media; 4, Extracellular protein of the HCLF-4 which was grown in a PDB media containing 0.05% heat killed *M. luteus* cells; 5, Protein molecular weight marker (Bio-Rad, Prestained SDS-PAGE standards, broad range, Cat. No.161-00318).

세포벽 분해 효소가 다른 종의 세포벽을 분해하는 예는 세균과 곰팡이 등 다양한 미생물에서 알려져 있다(3,8,23).

Renaturing SDS-PAGE를 이용한 세포벽 분해효소의 확인 및 분자량 결정

Renaturing SDS-PAGE 방법을 이용해 확인한 결과, heat killed *M. luteus* cell을 포함하여 배양한 HCLF-4의 세포의 효소에서만 세포벽 분해효소가 확인되었을 뿐, 순수배양한 HCLF-4의 세포 내의 효소와 heat killed *M. luteus* cell을 포함하여 배양한 HCLF-4의 세포내 효소에서는 세포벽 분해 활성을 가지는 band는 발견되지 않았다. 이결과로 본 세포벽 분해효소가 heat killed *M. luteus* 와 같은 세포벽 성분의 기질을 넣고 배양했을 때 유도되는 inducible enzyme라는 사실을 알 수 있다(Fig. 3). 식물 병원성 곰팡이의 세포벽을 분해시킴으로서 항진균 능력을 보이는 것으로 알려진 *Trichoderma* sp. 에서도 곰팡이의 세포벽 성분인 chitin이 cellulase 유도물질로 작용한다는 것이 보고되어 있다(8). 한편, 세포벽 분해효소의 분자량은 약 14.3 kDa 으로 확인되었다(Fig. 3).

분해효소의 최적 활성 조건

HCLF-4가 분비하는 세포벽 분해효소는 pH 3.0~4.0, 30°C의 조건에서 최고의 활성을 나타내었다(Fig. 4). 그리고 이 범위를 벗어난 조건에서는 활성이 50%이하로 감소하였다. Chemical factor의 영향으로는 Mg²⁺, Mn²⁺의 2가 이온에 의해 분해효소의 활성이 촉진되었다. 반면, Na⁺, Li⁺의 1가 양이온, Ca²⁺, Cu²⁺의

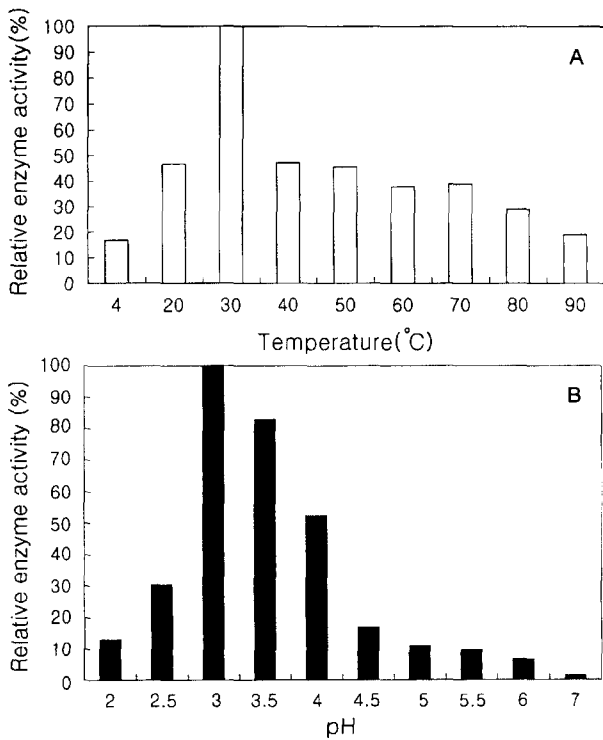


Fig. 4. Optimal temperature (A) and pH (B) for the cell wall lytic activity of extracellular enzyme of *Aspergillus* sp. HCLF-4.

2가 양이온, Fe³⁺ 3가 양이온에 의해서는 활성이 억제되었다. EDTA, PMSF 도 분해효소의 활성을 억제 시켰다. 특히 Fe³⁺는 분해 활성을 완전히(100%) 억제 시켰으며 PMSF도 35%에 달하는 높은 억제작용을 보였다(Table 1). 이런 결과는 몇몇 *Pseudomonas aeruginosa* 에서 발견된 autolysin의 일종인 amidase에서의 chemical factor의 영향과 유사하였다(14,27).

세포벽 분해효소의 특성

HCLF-4가 분비하는 세포벽 분해효소의 세포벽 작용위치를 알아보기 위해서 분해산물을 측정된 결과, 유리 아미노산의 양은 세포벽 성분의 분해정도와 비례하여 증가였다. 이에 반해서 환원 당 양의 변화는 큰 차이가 없었다. 유리아미노산 양의 증가는 세포벽 분해정도와 유사하게 반응 1 시간 이내에 진행되었다(Fig. 5). 이와 같은 결과는 분비효소가 N-acetylmuramyl-L-alanine amidase, endopeptidase와 같은 peptidase의 일종임을 시사한다(13,26). 대부분의 세포벽 분해 효소들은 자신들의 세포분열 및 성장을 위해 분비된다고 알려져 있다(17,22,24). 그러나 본 분해

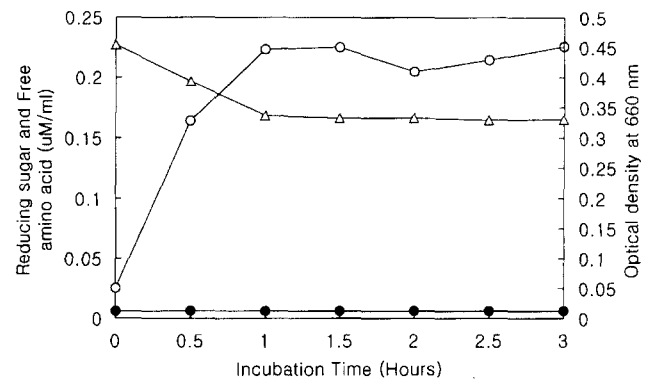


Fig. 5. The hydrolyzed compounds released from *M. luteus* cell wall with extracellular enzymes of *Aspergillus* sp. HCLF-4. The time course of absorbency during the digestion of the heat killed *M. luteus* cell wall by extracellular enzymes of *Aspergillus* sp. HCLF-4 is also shown. ○, Free amino acid; ●, Reducing sugar; △, Cell wall turbidity.

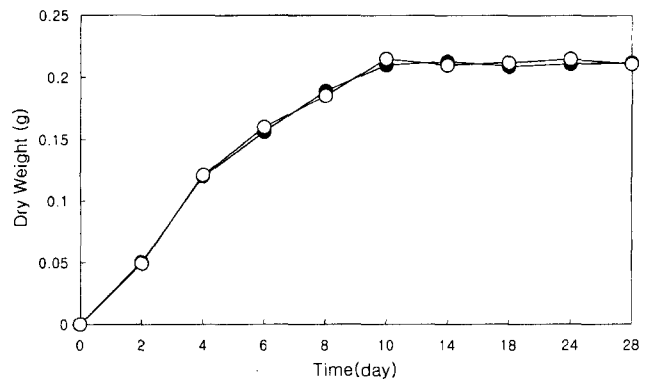


Fig. 6. The growth curve of *Aspergillus* sp. HCLF-4. ○, On PDB media; ●, On PDB media supplied with 0.05% heat killed *M. luteus* cells.

효소는 단독 배양 시에는 생성되지 않았으며 기질을 넣어 분해 효소가 생성될 때의 HCLF-4의 성장곡선 측정 결과를 단독 배양 시의 성장곡선과의 비교한 결과 큰 변화가 없는 것으로 미루어 보아(Fig. 6) peptidoglycan 기질 성분이 효소생성의 유도체로 작용하고 분비된 효소는 기질성분을 분해시킬 뿐 곰팡이 자체의 세포분열이나 성장에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 사료 된다.

참고문헌

1. 안용근. 1994. 효소 단백질 정제법. 양서각. pp. 35-53.
2. 안준익, 김철호, 최영길. 1997. *Moraxella* sp. CK-1의 세포외 autolysin의 특성. 한국미생물학회지 33, 15-21.
3. 현성희, 최영길. 1999. *Penicillium oxalicum*(HCLF-34)으로부터 분비되는 *Anabaena cylindrica* 세포벽 분해효소의 특성. 한국미생물학회지 35, 231-236.
4. 현성희, 성주연, 최영길. 1997. 시안세균 성장 억제 곰팡이의 분리 및 동정. 한국환경생물학회지 5, 185-193.
5. Banks, J.G., R.G. Board, and N.H. Sparks. 1986. Natural antimicrobial systems and their potential in food preservation in the future. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 8, 103-147.
6. Buist, G., J. Kok, K.J. Leenhouts, M.D. Abrowska, G. Venema, and A.J. Haandrikman. 1995. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a mulamidase needed for cell separation. *J. Bacteriol.* 177, 1554-1563.
7. de la Cruz J. and A. Llobell. 1999. Purification and properties of a basic endo- α -1,6-glucanase(BGN16.1) from the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum*. *Eur. J. Biochem.* 274, 145-151.
8. de la Cruz J., M. Rey, J.M. Lora, A. Hidalgo-Gallego, F. Dominguez, J.A. Pintor-Toro, A. Llobell, and T. Benitez. 1993. Carbon source control on α -glucanases, chitinase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Arch. Microbiol.* 159, 316-322.
9. Dolinger, D.L., L. Daneo-moore, and G.D. Shockman. 1989. The second peptidoglycan hydrolase of *Streptococcus faecium* ATCC 9790 covalently binds penicillin. *J. Bacteriol.* 171, 4355-4361.
10. El-Shafei H.A. 1997. Influence of l-sorbose and the cell-wall-lytic *Micrococcus* sp. on the major polymers of *Aspergillus fumigatus*. *Polymer Degradation and Stability* 57, 151-156.
11. Foster, S.J. 1992. Analysis of the autolysis of *Bacillus subtilis* 168 during vegetative growth and differentiation by using renaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 174, 1619-1625.
12. Ghuysen, J.M. 1968. Use of bacteriolytic enzyme in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriol. Rev.* 32, 423-464.
13. Ghuysen, J.M., D.J. Tipper, and J.L. Strominger. 1966. Enzymes that degrade bacterial cell wall. *Method. in Enzymol.* 8, 685-659.
14. Gilad Bernadsky, T.J. Beveridge, and A.J. Clarke. 1994. Analysis of the sodium dodecyl sulfate-srable peptidoglycan autolysins of select gram-negative pathogens by using renaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 176, 5225-5232.
15. Hughey, V.L. and E.A. Johnson. 1987. Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. *App. Environ. Microbiol.* 53, 2165-2170.
16. Inone, M., S. Hamada, S. Kotani, and K. Kato. 1979. Enzymic lysis and structure of the cell walls of the oral *Streptococcus mutans* BH1. *Arch. Oral. Biol.* 24, 529-537
17. Jung, M.H., S. Kong, D.H. Bai, and J.H. Yu. 1991. Purification and characterization of a bacteriolytic enzyme from *Alkalophilic Bacillus* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* 1, 102-110
18. Kim, C.H., Y.K. Choi, and B.R. Min. 1997. Lysis of *Anabaena cylindrica*(Cyanobacterium) cell wall by extracellular enzyme of *Moraxella* sp. CK-1. *Kor. J. Environ. Biol.* 15, 89-97
19. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)* 227, 680-685
20. Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 275-275
21. Luonteri E., E. Alatalo, M. Siika-aho, M. Penttila, and M. Trnkanen. 1998. α -Galactosidases of *Penicillium simplicissimum*: production, purification characterization of the gene encoding AGLI. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28, 179-188
22. Ohn, T.B., C.H. Kim, B.R. Min, and Y.K. Choi. 1997. Cloning and expression of a gene encoding *Moraxella* sp. CK-1 autolysin. *Mole. and Cell.* 7, 367-373
23. Salton, M.R.J. 1955. Isolation of *Streptomyces* spp. capable of decomposing preparations of cell walls from various microorganisms and a comparison of their lytic activities with those of certain actinomycetes and myxobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 12, 25-30
24. Shockman, G.D., T. Kawamura, J.F. Barrett, and D.L. Dolinger. 1985. The autolytic peptidoglycan hydrolases *Streptococcus faecium*. *Ann. Inst. Pasteur. Microbiol.* 136, 63-66
25. Takahashi, K., J. Inoue, K. Sakai, T. Kohama, S. Kitahara, K. Takishima, M. Tanji, S.B.P. Athauda, T. Takahashi, H. Akanuma, G. Mamiya, and M. Yamasaki. 1991. The primary structure of *Aspergillus niger* acid proteinase A. *J. Biol. Chem.* 266, 19483-19489
26. Thompson J.S. and G.D. Shockman. 1968. A modification of the Park and Johnson reducing sugar determination suitable for the assay of insoluble materials: Its application to bacterial cell walls. *Anal. biochem.* 22, 270-278
27. Watt S.R. and A.J. Clarke. 1994. Initial characterization of two extracellular autolysins from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 176, 4784-4789

(Received February 1, 2001/Accepted March 5, 2001)

ABSTRACT: Characterization of the Bacterial Cell Wall Lytic Enzyme Produced by *Aspergillus* sp. HCLF-4

Jin-Ha Yim, Byung-Re Min¹ and Yong-Keel Choi*(Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, ¹Department of Biology, Sangmyong University, Seoul 110-743, Korea)

In this study, we have isolated bacterial cell wall lytic enzyme in the culture supernatant of *Aspergillus* sp. HCLF-4. This hydrolase showed cell wall lytic activity against *Anabaena cylindrica*. The extracellular enzyme was produced by *Aspergillus* sp. HCLF-4 when it was grown in a PDB media containing 0.05% heat killed *Micrococcus luteus* cells. The molecular weight of lytic enzyme was about 14.3 kDa. The optimal pH and temperature for the activity of this enzyme were 3.0~4.0 and 30°C, respectively. This hydrolase activity was reduced by Na⁺, Li⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, EDTA, and PMSF, whereas it was increased by Mg²⁺, Mn²⁺. The enzyme has N-acetylmuramyl-L-amidase or endopeptidase activity.