

효모세포벽 분해효소 생산균의 分離, 同定 및 효소생산에 관한 연구

吳 萬 鎭 · 金 燦 祚

(충남대학교 농과대학)

(1977년 3월 3일 수리)

Studies on Isolation of a Lytic Fungi and Optimization of the Lytic Enzyme Production

Man-Jin Oh and Chan-Jo Kim

College of Agriculture, Chungnam National University

(Received March 3, 1977)

SUMMARY

A potent lytic strain was selected by an extensive screening test of microorganisms isolated from soils and sewages on the medium containing baker's yeast as a carbon source. This strain (M-10) was identified to a strain of *Humicola* sp. by the Genera of Fungi (Clements, 1964).

The strain was cultured on the basal medium composed of 2% of baker's yeast, 0.3% of K_2HPO_4 , 0.01% of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% of yeast extract in a shaking incubator. Cultural conditons for lytic enzyme production has been studied, and the results obtained were as follows:

1. The Optimal conditions for lytic enzyme production were: initial pH 5.5 to 6.0, temperature 33°C in shaking culture.
2. Among the various carbon sources, baker's yeast (4%) was the best for lytic enzyme production, increasing the level of activity eight times higher than when grown on glucose (1%).
3. The most effective concentration of K_2HPO_4 and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ in the basal medium for lytic enzyme production was 0.1% and 0.01% respectively.
4. When the strain was cultured under the optimal conditions, the production of lytic enzyme was maximized in 72 hours.

서 론

單細胞 蛋白質의 대량생산은 食糧難 타개책의 일환으로 중요한 연구과제로 되고 있으며 單細胞蛋白質 생산용 미생물은 효모 및 세균을 비롯하여 각종

의 곰팡이 chlorella 등 藻類와 그리고 原虫類가 포함되나 이들중 특히 효모가 주요대상으로 되어지고 있다.

효모의 세포벽은 glucan과 mannan이 단백질과 강한 결합^(1,2,3,4)을 하고 있어서 효모균체 성분의

소화율을 저하시키므로 이 세포벽 분해효소의 연구는 單細胞蛋白質의 이용면에서도 중요한 것이다.

이와같은 효소에 대한 연구는 Giaja⁽⁶⁾가 달팽이의 소화액에서 처음으로 시작하여 그후 여러 연구자들에 의하여 放線菌^(16,7), 擔子菌^(8,9,10,11), 糸狀菌^(12,13,14,15,16), 不完全菌類^(17,18)와 細菌類^(19,20,21,22) 등 미생물을 효소원으로 많은 연구가 이루어져 이들의 결과로 효모세포벽 분해효소는 β -1.3-glucanase를 주축으로 하여 기타 β -1.6-glucanase, mannanase, phosphomannase 및 protease 등의 복합제인 것으로 밝혀지고 또한 세포벽의 구조해명 및 효모 추출물의 제조와 單細胞蛋白質의 소화율증진 등에 이바지 하였다.

筆者 등은 식품공업에 이용성이 많은 효모세포벽 분해효소를 강하게 분비하는 菌株을 얻고자 土壤 및 下水 등에서 386株의 각종 미생물을 분리하여 강한 1菌株을 選拔 同定하고 아울러 그 효소 생산조건을 검토하여 결과를 얻으므로 여기에 보고하는 바이다.

실험 방법

1. 菌의 분리

sugimori 등⁽¹⁶⁾의 방법에 준하여 土壤 및 下水 등의 분리된 시료를 멸균수에 현탁시켜 baker's yeast 5%, NH_4Cl 0.3%, K_2HPO_4 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, yeast extract 0.1%, agar 2%, pH 6.0 組成의 분리용 평판배지에 塗抹한 다음 30°C에서 3일간 배양하여 효모溶解環이 보이는 colony에서 분리 하였다.

2. 菌株의 선정

1) 선정방법

선정배지⁽¹⁹⁾ (baker's yeast(wet) 5%, K_2HPO_4 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, yeast extract 0.1% pH 6.0)를 500ml 진탕 flask에 50ml씩 넣어 분리용 배지에서 2일간 전배양한 분리균주를 접종하고 30°C에서 3일간 110 oscills/min, stroke 5cm에서 진탕배양하여 원침한 후 상정액을 효소액으로 하여 그 lytic activity를 측정 비교하였다.

2) lytic activity의 측정

Yokotsuka 등⁽¹⁸⁾의 방법에 준하여 증류수 1에 baker's yeast(조홍표) 100g을 넣어 10분간 초음파(170watt, 20kc) 처리를 하여 현탁시켜 121°C에서 15분간 가열처리 하고 원침시켜 증류수로 3회 세척한 후 효모균체의 농도를 3%로 조정된 것을 基質로서 L형 시험관에 1ml, acetate buffer(pH 5.0)

2ml를 넣어 40°C의 진탕온수조에서 10분간 예열한 후 조효소액 1ml를 가하고 1시간 진탕반응시킨 다음 1M- NaCO_3 1ml를 가하여 효소반응을 정지시키고 원침하여 상정액중에 생성된 환원당을 Somogyi-Nelson법^(23,24)과 3,5-dinitro salicylic acid法⁽²⁵⁾에 의하여 정량하였다.

lytic activity의 1단위는 60분간 작용시킨 반응액 1ml 중에 생성된 glucose 1mg에 상당하는 환원당을 1단위로 하였다.

한편 효소생산조건 검토시에 탄소원 첨가의 영향은 상기 방법으로 측정이 곤란하므로 반응액을 Spectrophotometer(Hitachi Model 124)로 660nm에서 吸光度를 측정하여 효소반응에 의한 吸光度의 변화로서 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{lytic activity (T. R. R)} = \frac{do - dt}{do} \times 100$$

do : 반응전의 반응혼합물의 O. D값

dt : 반응후의 반응혼합물의 O. D값

[t : 60분]

3. 選定菌株의 同定

선정한 M-10菌株을 Clements⁽²⁶⁾의 The Genera of Fungi, Barnett 등⁽²⁷⁾의 Illustrated Genera of Imperfect Fungi, Ainsworth 등⁽²⁸⁾의 The Fungi에 의하여 同定하였다.

4. 효소생산조건

1) pH 및 온도

선정용 배지를 기본배지로 하여 이때를 pH 4.0-7.0까지 조절하고 선정균주를 접종하여 30°C에서 2~3일간 진탕배양하여 lytic activity를 측정하고 最適 pH로 조정된 배지를 사용하여 25~40°C에서 각각 배양한 것의 lytic activity를 측정하였다.

2) 炭素源의 영향

5% baker's yeast를 제외한 기본배지에 galactose를 비롯한 10종의 각종 炭素源을 1%씩 가하여 最適 pH 및 온도에서 배양하여 그 lytic activity를 측정 비교하고 또한 가장 효과적인 baker's yeast를 1~5%까지 가한 배지를 사용하여 baker's yeast의 最適농도를 검토하였다.

3) 窒素源의 영향

기본배지에 NH_4NO_3 를 비롯한 5종의 無機窒素源과 peptone를 비롯한 5종의 有機態窒素源을 각각 0.1%씩 가하고 배양하여 검토하였다.

4) K_2HPO_4 및 MgSO_4 의 영향

기본배지에 K_2HPO_4 를 0~0.5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 0~0.05%까지 각 농도로 가하고 배양하여 비교

검토하였다.

5) 배양시간

最適배지에 선정균을 접종하여 경시적으로 lytic activity를 측정하여 검토하였다.

결과 및 고찰

1. 菌株의 선정 및 동정

분리한 386菌株의 lytic activity를 측정하여 가장 강한 효소생성능이 있는 M-10 菌株를 선정하여 Barnett 등⁽²⁷⁾의 Illustrated Genera of Imperfect Fungi, Clements 등⁽²⁸⁾의 The Genera of Fungi 및 Ainsworth 등⁽²⁹⁾의 The Fungi에 의하여 검정한다 다음과 같다.

plasmodium : 인정되지 않음.

Mycelium : 격막이 있고 잘 발육함,

zygospore and ascus : 형성하지 않음.

conidiophore : 대부분 단독이고 드물게 분지하고 일반적으로 길고 드물게 짧은 것도 있으며 담갈색으로 착색함.

stroma : 형성하지 않음.

conidia : 균사의 선단에 형성하고 꼬이지 않으며 구형이며 단독으로 존재하고 담갈색으로 착색함.

이상의 결과로 선정된 M-10 菌株는 *Humicola* sp.로 同定되었다.

2. 효소생산 조건

1) pH

기본배지를 pH 4.0~7.0까지 0.5의 차를 두어 조제하고 선정균을 접종하여 30°C에서 2~3일간

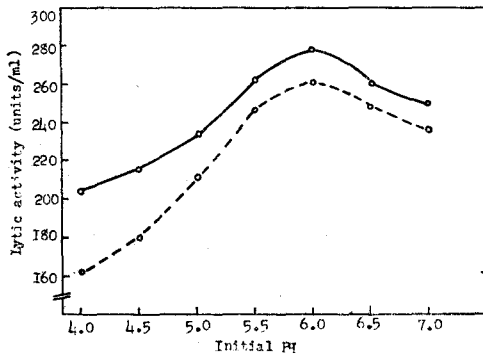


Fig. 1. Effect of intial pH of medium on lytic enzyme production. Basal medium was composed 5% of baker's yeast, 0.3% of K_2HPO_4 , 0.01% of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% of yeast extract and the strain was cultured at 30°C, for 48hrs (O---O), 72hrs (O--O) with 1100scills./min. in the shaking incubator.

배양하면서 lytic activity를 측정한 결과는 그림 1과 같다.

그림 1에서와 같이 효소생성에 가장 효과적인 배지의 초발 pH는 5.5~6.0이었다.

Yamamoto 등⁽²⁹⁾은 *Alternnaria solani*의 효소생성 최적 pH는 6.5이고 배양 4일째에 효소의 생산이 최고에 달하였다고 하였으며 Kazaki⁽³⁰⁾는 *Thermopolyspore* sp.의 최적 pH는 7.4, Yamamoto 등⁽¹⁴⁾은 *Rhizopus* sp.의 최적 pH를 6.0이었다고 보고하였다.

이들의 결과로 미루어 미생물에 의한 세포벽 분해효소는 中性부근에서 잘 생성되어지는 것 같다.

2) 온 도

선정균의 lytic enzyme생성 최적온도는 그림 2에 표시한 바와같이 30~33°C이었다.

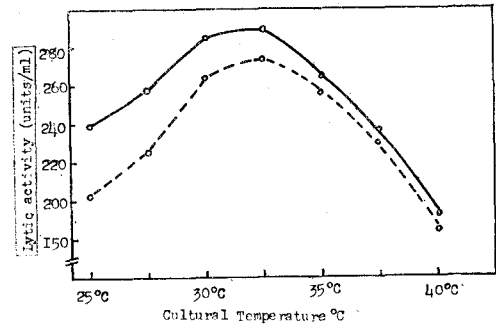


Fig. 2. Effect of cultural temperature on lytic enzyme production. Basal medium was composed as Fig 1 and the strain Cultured for 48hrs (O---O), 72hrs (O--O) with 110 oscills./min. in the shaking incubator.

이 결과는 Yokotsbka 등⁽¹⁸⁾이 *Trichoderma viride*의 효소생산 적은 30°C Yamamoto 등⁽²⁹⁾이 *Altermaria solani*와 *Rhizopus* sp.의 생산적온을 각각 30°C라고한 보고에 비하여 약간 높은 것이었다.

3) 배지의 조성

(1) 炭素源

선정균의 lytic enzyme생성에 미치는 炭素源의 효과를 검토하기 위하여 기본배지조성중 baker's yeast를 1%의 각종 炭素源으로 대체하여 배양한 결과는 그림 3에 표시한 바와같다.

그림 3에서 보는바와 같이 lytic enzyme 생성에 있어서 炭素源은 baker's yeast가 가장 적당하였고, glucose가 β -1.3-linkage로된 laminarin도 좋았으며 dextrin과 fructose가 그 다음이고 pentose를 비롯한 기타의 糖類도 현저히 저하되었다.

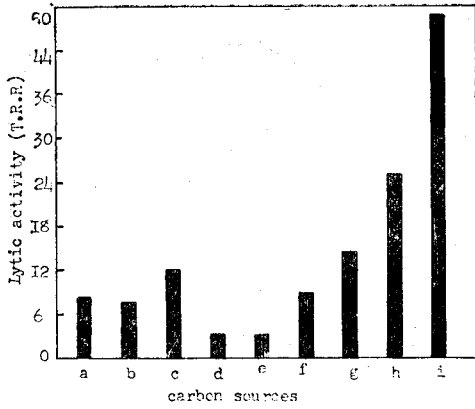


Fig. 3. Effect of carbon sources on lytic enzyme production.

Basal medium was composed 0.3% of K_2HPO_4 , 0.01% of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% of yeast extract and the strain was cultured as Fig. 1.

a : galactose, b : glucose, c : fructose, d : arabinose e : xylose, f : maltose, g : lactose, h : laminarin, i : baker's yeast.

또한 본 실험에서 가장 효과적인 baker's의 첨가농도를 검토한 결과는 그림 4와 같으며 약 4%의 첨가에서 lytic enzyme 생산이 가장 양호하였다.

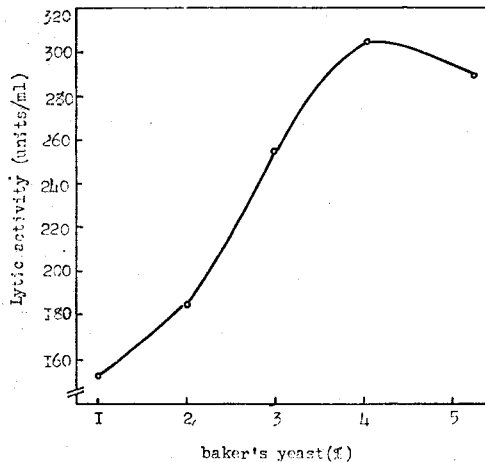


Fig. 4. Effect of the amount of baker's yeast (wet) added to basal medium on lytic enzyme production. Basal medium was composed as Fig. 3 and the strain was cultured under the same conditions.

Graham 등⁽²⁰⁾은 YNB배지에 炭素源은 baker's yeast, laminarin 및 putsulam 등을 사용할때 *Bacillus circulans*의 lytic enzyme생성이 유도되며

mannitol를 0.1%~0.5% 첨가하면 무첨가구에 비하여 1.5~3배정도 효소생성이 증가되며, 單糖類를 사용할때는 1/10~1/20정도 감소된다고 하였다.

또한 Okazaki 등⁽³⁰⁾은 *candida* sp. 균체를 함유시킨 배지에 高溫性 *Actinomycetes*를 배양하여 lytic enzyme를 생산시킬때 그 배지에 glucose를 첨가하면 효소생성이 상당히 저하된다고 하였다.

Yamamoto 등⁽³¹⁾도 *Flavobacterium domitor*의 효소생성에 있어서 peptone bouillon 배지에 yeast glucan이나 baker's yeast를 첨가하면 5~6배의 효소생성이 증가되나 baker's yeast를 첨가한 배지에 glucose를 다시 첨가하면 상당히 저하된다고 하였으며 *Rhizopus* sp.⁽¹⁴⁾의 효소생성에서는 baker's yeast 첨가구는 manitol 첨가구에 비하여 20배정도 증가되고 baker's yeast는 4%가 가장 양호하였다고 하였다.

필자들의 결과는 Yamamoto 등⁽¹⁴⁾의 결과와 비슷하였다.

(2) 窒素源

질소원의 효과를 검토하기 위하여 기본배지중에 질소의 농도가 0.1%되도록 각종 질소원을 첨가하여 효소생성에 미치는 영향을 검토한 결과는 그림 5에 표시한 바와같다.

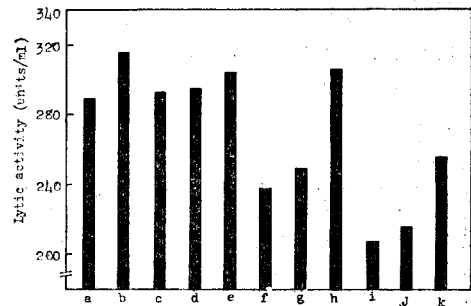


Fig. 5. Effect of nitrogen sources on lytic enzyme production. Basal medium was composed the same as Fig. 1 and the strain was cultured under the same conditions.

a : Control, b : NH_4NO_3 , c : NH_4Cl , d : $(NH_4)_2SO_4$, e : $(NH_4)_2HPO_4$, f : $(NH_2)_2CO$, g : $NaNO_3$, h : peptone, i : milk casein, j : nutrient broth, k : malt extract.

그림 5에서와 같이 첨가구는 대조구에 비하여 효소생성이 비슷하거나 다소 증가함을 볼 수 있고 硝酸態질소 첨가구는 감소됨을 보였다.

有機態질소에 있어서는 peptone 첨가구에서 증가

를 보였으나 기타 구에서는 균체 발육은 왕성하나 효소생성은 낮았으며 有機態질소와 無機態질소를 병용하여도 효소생성에는 효과를 볼 수 없었다.

한편 Yamamoto 등⁽³¹⁾은 *Flavobacterium dormitator*의 lytic enzyme 생성에서 peptone과 bouillon 등은 효과가 없고 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 은 오히려 심한 감소를 보여 탄소원이나 질소원으로서 baker's yeast만으로 족하다고 하였다. 姜⁽³²⁾은 *Bacillus circulans*의 효소생산에서 NH_4Cl , NH_4NO_3 및 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 첨가구는 2배 이상의 증가를 보이고 有機態질소는 nutrient broth가 가장 양호하고 urea, ammonium acetate 및 malt extract 등은 현저히 저하시킨다고 하였다.

(3) K_2HPO_4 및 MgSO_4 의 효과

K_2HPO_4 및 MgSO_4 를 뺀 기본배지에 K_2HPO_4 와 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 농도를 각각 달리첨가하여 K 및 Mg鹽의 lytic enzyme 생산에 미치는 효과를 검토한 결과는 그림 6 및 7과 같다.

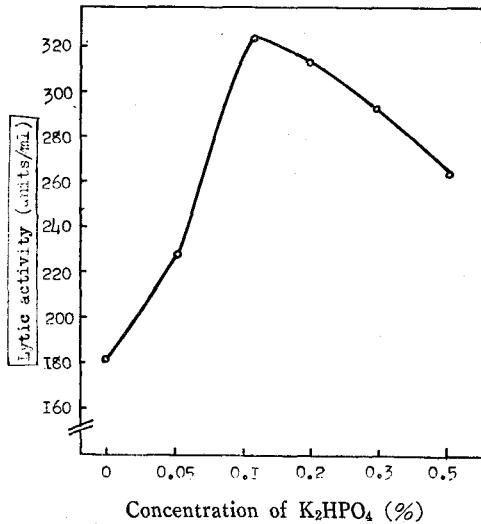


Fig. 6. Effect of the concentration of K_2HPO_4 on lytic enzyme production.

Basal medium was composed 5% of baker's yeast, 0.01% of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% of yeast extract and the strain was cultured at 30°C for 72hrs in the shaking incubator.

그림 6 및 7에서와 같이 本菌의 lytic enzyme 생산에 있어서 K_2HPO_4 와 MgSO_4 의 첨가는 효과적이었으며 특히 K_2HPO_4 는 0.1%, MgSO_4 는 0.01%의 첨가에서 가장 효과적이었다. 아울러 Ca, Fe, Cu, Al 및 Zn 등의 黃酸鹽을 사용하여 이들의 영향을 검토한 바 모두 효소생산이 감소되는 결과가

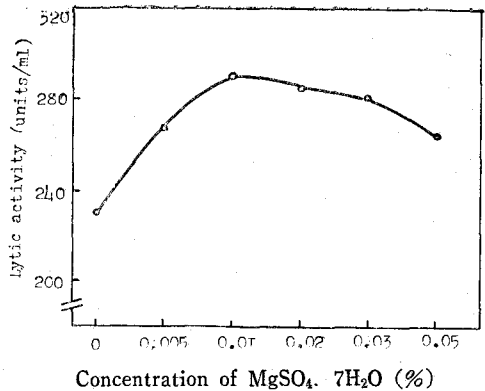


Fig. 7. Effect of the concentration of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on lytic enzyme production. Basal medium was composed 5% of baker's yeast, 0.3% of K_2HPO_4 0.1% of yeast extract and the strain was cultured at 30°C for 72hrs in the shaking incubator

었다.

한편 Yamamoto 등⁽³¹⁾은 *Flavobacterium dormitator*의 β -1,3-glucanase 생산에서 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01% K_2HPO_4 0.1%의 첨가 효과를 인정하고 기타 무기염류의 효과는 없었다고 하였으며 姜⁽³²⁾은 *Bacillus circulans*의 효소생산에서 MgSO_4 의 첨가는 효과적이었으나 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 및 NiSO_4 등은 감소시켰다고 하였다.

筆者 등의 시험에서 K_2HPO_4 의 효과는 Yamamoto 등⁽³¹⁾의 보고와 그리고 MgSO_4 의 효과는 姜⁽³²⁾의

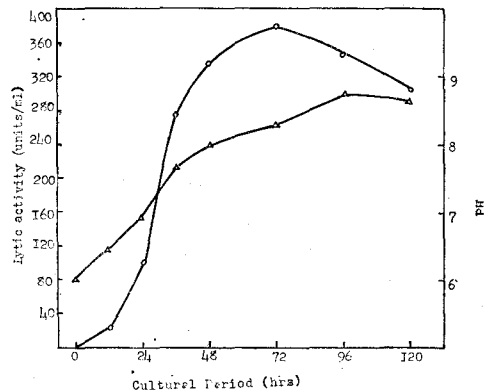


Fig. 8. Time course of lytic enzyme production in a culture of the selected strain (M-10).

The medium used to grow the M-10 strain contained 4% of baker's yeast, 0.1% of NH_4NO_3 , 0.1% of K_2HPO_4 , 0.01% of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1% of yeast extract.

보고와 같은 경향이었으나 기타 염류의 영향에 있어서는 다른 결과를 보였다.

(4) 배양시간

이상의 실험결과로 선정균의 lytic enzyme 생산에 적당했다고 인정된 배지(baker's yeast 4%, NH_4NO_3 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, yeast extract 0.1%, pH 6.0)를 사용하여 33°C에서 120시간 진탕배양하면서 경시적으로 효소의 생산과 pH를 측정할 결과는 그림 8과 같다.

본균의 lytic enzyme 생산은 72시간에 최고에 달하였으며 배양액의 pH는 점차로 Alkali성으로 변화하여 배양 120시간경에는 9.0정도로 되었다.

Yamamoto 등⁽²⁰⁾은 *Alternaria* sp.는 5일, 川 嶋⁽⁸³⁾은 *coprinills* sp.는 50시간 姜⁽³²⁾은 *Bacillus circulans*는 48시간에 각각 효소생산이 최고에 달하였다고 보고하였다.

적 요

효모세포벽 분해효소를 생산하는 386株의 미생물을 분리하여 그중 강한 1株를 선발 同定하고 선정균의 효소생산조건을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 선정할 M-10 strain은 *Humicola* sp.로 同定되었다.
2. 선정균의 효소생성은 pH 6.0 33°C에서 가장 양호하였다.
3. 탄소원으로서는 baker's yeast 4%가 lytic enzyme 생산에 가장 좋았고 기타 laminarin과 dextrin 등이 효과적이었으며 질소원도 peptone이 다소 효과적이거나 baker's yeast로서 족하였다.
4. 효소생산에 K_2HPO_4 0.1%와 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%의 첨가가 가장 효과적이고 기타 염류의 첨가는 효과가 없었다.
5. 선정할 배지조성에서 72시간 진탕배양으로 최고에 달하였다.

참 고 문 헌

1. W. J. Nickerson: Bacteriological review. 27, 305(1963).
2. 林部正也: 化學と生物, 13, 410(1975).
3. 熊谷和榮子, 育藤和夫, 秋山裕一: 日農化, 43, 813(1969).
4. Bacon; Biochemistry J., 65, 28(1965).
5. GiaJa J; CR Society Biol. Press. 77, 2(1914).
6. 古屋晃, 池田庸之助: 日農化, 34, 33(1960).

7. 古屋晃, 池田庸之助: 日農化, 34, 38(1960).
8. 馬田三夫, 平緒一曉, 木村義夫, 野田國彦: 日農化. 44, 393(1970)
9. Ibid; 日農化. 45, 360(1971)
10. Ibid; 日農化. 45, 369(1971)
11. 川合正允: 日農化. 47, 473(1973)
12. 岡崎博司, 飯塚廣: 日農化. 45, 461(1971)
13. Yukoshibata and Takashi Fukimbasa; J. Ferment. Techn. 50, 388(1972)
14. Shimpei Yamamoto, Juichi Fuku Yama and Susumu Nagasaki; Agr. Biol. Chem. 38, 329 (1974)
15. Motoo Arai, Ryohei Yamamoto and Sawao Murao; Agr. Biol. Chem. 40, 27(1976)
16. Tsunetake Sugimori, Yoshihiro Uchide and Yoji Tsukada; Agr. Biol. Chem. 36, 669 (1972)
17. Yuko Shibata and Takashi Fukimbara; J. Ferment. Techn. 51, 216(1973)
18. Koko Koko Yokotsuka, Shojigoto Isami; Yokotsuka and Tadae Kushida; J. Ferment. Techn. 52, 701(1974)
19. 山本晋平, 長崎龜, J.O. 란판: J. Ferment. Techn. 49, 338(1971)
20. H.F. Graham and Herman J. Phaff; J. of Bacteriology. 119, 207(1974)
21. 高山健郎, 宇田川清, 阿部重雄: 日農化. 34, 652(1960)
22. Shimpei Yamamoto and Susumu Nagasaki; J. Ferment. Techn. 50, 117(1972)
23. Norton nelson; J. Biol. Chem. 153, 375 (1944)
24. J.P. Maris, J.L. Dewit and G.V. Quicke; Anal. Biochem. 15, 373(1966)
25. G.L. Miller, R. Blum, W.E. Glennon and Ann L. Burton's Analytical Biochem. 2, 127 (1960)
26. F.E. Clements and C.L. Shear; The genera of fungi. Hanferpflb. Co. (1964)
27. H.L. Barnett and B.B. Hunter; Illustrated genera of imperfect fungi, Burgess Pub. Co. (1972)
28. G.C. Ainsworth; The fungi, Academicpress, Vol TVA, 456(1973)
29. Susumu Yamamoto, Joshiro Yadomae and

- Toshi Miyazaki; J. Ferment. Techn. 52, 706
(1974)
30. Hiroshi Okazaki; J. Ferment. Techn. 30, 405
(1972)
31. Shimpei Yamamoto and Susumu Nagasaki;
J. Ferment. Techn. 50, 127(1972)
32. 姜淳英 : 서울대학교 석사학위논문 미발표(1976)
33. 川合正允 : 日農化. 48, 295(1970)