

적색효모 세포벽용해효소의 기질특이성에 관한 연구

이 태 호

부산대학교 자연과학대학 미생물학과
(1982년 8월 27일 수리)

Studies on Substrate Specificities of the Enzymes Lytic to the Cell Wall of Red Yeasts

Tae Ho Lee

Department of Microbiology, College of Natural Science, Busan National University, Busan, Korea
(Received August 27, 1982)

Abstract

The enzymes lytic to red yeast cell wall, which were produced by *Penicillium lilacinum* ATCC 36010 and *Bacillus pumilus* No 41, hydrolyzed an extracellular mannan from *Rhodotorula glutinis* IFO 0695. Mannan was arranged with β -1,3 and β -1,4 linkages alternatively.

Using this mannan, substrate specificities of these enzymes were investigated. The one from *Pen. lilacinum* was a unique mannanase which hydrolyzed β -1,3 mannoside bond and the other from *B. pumilus* was a new type of mannanase which cleaved β -1,4 mannoside bond with requirement of the existence of β -1,3 linkage on the reducing side.

Both enzymes released two kinds of oligosaccharide from mannan, respectively. However, the enzyme from *Pen. lilacinum* produced tetrasaccharide and disaccharide and one of them, tetrasaccharide, was hydrolyzed to disaccharide further. The one from *B. pumilus* released tetrasaccharide and hexasaccharide from mannan finally.

서 론

효모의 세포벽 구조에 관한 연구는 *Saccharomyces*속 및 그 近縁菌을 중심으로 하여 주로 진행되어 왔으며 그 미세구조가 상당한 정도 까지 밝혀져 있다. 이와같은 효모의 세포벽은 glucan, mannan, 단백질, 지질로 구성되어 있으며^{1,2} 그 중, glucan은 β -1,6 glucoside 결합을 한 비수용성 다당으로³ 세포의 골격성분을 차지하며

mannan은 세포벽의 내측에서 β -1,6 결합의 주쇄에 α -1,2, α -1,3결합의 측쇄가 결합한 다당이다.⁴ 이와같은 세포벽다당의 구조를 해명함에 있어서 화학적 방법과 더불어 세포벽 용해효소, β -1,3glucanase와 phosphomannanase가 차지한 비중은 대단히 크다 하겠다. 그러나 *Saccharomyces*속 효모를 용해하는 β -1,3glucanase는 *Saccharomyces*속 외에 *Candida*, *Schizosaccharomyces*, *Endomycopsis*, *Hansenula*, *Debar-*

yomyces, *Pichia*, *Endomyces*, *Kloekera* 속 등 거의 대부분의 효모를 용해하나 carotenoid계 색소를 생성하는 소위 적색효모라고 불리워지는 *Rhodotorula* 속 및 *Sporobolomyces* 속 효모에는 전혀 작용하지 않는 것으로 보아 세포벽 다당의 구조에 차이가 있는 것으로 판단되었다. 이와같은 적색효모는 유지생산성 효모로서, 또는 각종 효소의 생산균으로서 응용 미생물학상 중요한 위치를 차지하는 효모균으로 취급되어 왔으나, 이 효모균의 세포벽에 관한 연구는 거의 전무한 상태였으며, 특히, 세포벽 용해효소의 개발이 종래 여러번 시도되어 왔음에도 불구하고 적당한 효소를 발견하지 못한채 현재에 이르고 있는 실정이다. 따라서, 이들 효모의 세포벽구조의 해명을 위해서는 적색효모를 특이적으로 용해하는 효소의 존재가 필수조건이라고 생각하였으며 이를 개발함에 의해 세포의 융합 등에 의한 효모의 육종학상 또는 효모의 생리학적 연구에 큰 의의가 있을 것으로 생각하게 되었다.

이와같은 관점에서부터 출발하여 村尾, 李 등은 적색효모의 생균을 특이적으로 용해하는 효소생산균을 토양으로부터 검색한 결과, *Pen. lilacinum* ATCC 36010⁹⁾과 *B. pumilus* No. 41^{6,7)}을 분리하여 이들의 생산효소를 정제했으며 화학적 및 물리화학적성질은 이미 밝혔다. 양 효모균효소는 protease와의 공동작용에 의해 생효모를 높은 수율로 protoplast화 한다는 것이 전자현미경에 의해 확인되었으며⁸⁾, 세포벽의 골격성분이 glucomannan의 일종이라는 것을 밝히는 데에도 크게 기여했다. 또한 효모의 세포벽에서는 현재까지 발견되지 않던 galactofuranose를 함유한 fucogalactomannan을 분리 정제하여 그 구조를 결정했으며⁹⁾ 세포벽에서의 이들 다당의 극재성도 아울러 밝혔다.

본 연구는 세포벽의 glucomannan을 특이적으로 분해하여 생효모의 protoplast화를 가능케 하는 양 효소의 기질특이성을 조사하여 이들 효소가 현재까지 발견되지 않은 새로운성질의 mannanase 라는 것을 밝힌 경위에 대해 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

효소의 정제

Pen. lilacinum ATCC 36010과 *B. pumilus* No. 41가 생산하는 적색효모 용균효소는 전보의^{5,6)} 방법에 따라 정제하였으며, Disc 전기영동상 단일한 효소를 사용하였다.

효소의 활성측정

0.1M 초산완충액 0.5ml에 0.3% 기질용액 0.5 ml, 효소액 10 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 이때 *Bacillus* 생산효소는 pH5.5, *Penicillium* 생산효소는 pH4.5에서 측정하였다. 반응종료액에는 銅시약 1ml씩을 가하여 반응을 정지시킨 후 Somogyi-Nelson법에¹⁰⁾에 의해 환원당을 발색 정량하였다.

각종 다당의 분리정제

미생물기원의 다당은 Fukugawa 등의 방법에¹¹⁾에 의해 배양하였으며, 이들의 정제는 Gorin 등의 방법¹²⁾에 따라 Fehling시약을 사용하여 정제 하였다. *Discorea batatas* (*Decneforma Tsukune*) 유래의 mannan은 Misaki 등의 방법에¹³⁾에 의해 분리정제하였다. Wood Tsuga 유래의 glucomannan은 Timel의 방법에¹⁴⁾에 의해 정제 하였다. 백합의 glucomannan은 일본 岐阜대학의 Kato 박사로부터 제공받았다. Konjac 유래의 glucomannan은 일본 大阪시립대학 Yamamoto 박사로부터 입수하였다. Loscut bean의 galactomannan은 Sigma Chemical Co., Ltd.로부터 구입 하였다.

다당의 효소분해

Rhodotorula glutinis IFO 0698 유래의 mannan을 0.01M의 초산완충액 (pH 5.5 및 pH 4.5)에 용해한 후 각 효소를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5 시간 분해하였다. 분해액은 감압농축하여 paper chromatography한 후 paper의 양단을 발색시켜 각 spot에 해당하는 부분을 잘라 증류수로 추출하

여 정제 oligo당으로 사용하였다.

결 과

Paper Chromatography

효소분해물을 감압농축하여 Whatman 3MM여지를 사용하여 상승법에 의해 전개하였으며 전개용매는 butanol-pyridine-water (6 : 4 : 3)을 사용하였다. 당의 검출에는 Alkaline-AgNO₃시약을 사용하였다.

Methylation

다당 또는 oligo당 약 2mg을 dimethyl sulfoxide에 용해 후 Hakomori 법에¹⁵⁾ 의해 methyl화하였다. 이들 methyl화당은 전보의 방법에^{8,16)} 따라 분석하였다.

중합도 측정

다당 및 oligo당의 중합도는 Yamaguchi 등의 방법에¹⁷⁾ 따라 측정하였다.

각종 다당의 효소분해

양 효소는 적색효모 세포벽의 glucomannan부분을 특이적으로 분해하나 이는 비수용성 물질이며 더우기 복잡한 구조를 가지고 있기 때문에 효소의 기질특이성을 조사하기에는 부적합하다. 따라서, 이 효소의 기질로 기대되는 각종 다당을 수집 또는 분리정제 하였다. 이들 각종 다당에 대한 양 효소의 분해정도는 Table 1에 표시한 것과 같다. 이들 양효소는 미생물 기원의 다당은 잘 분해하나 식물기원의 다당에는 전혀 작용하지 않았다. 미생물 다당중에서도, 특히, *Rh. glutinis* IFO 0695가 생산하는 세포의 mannan이 양 효소의 작용을 가장 잘 받아 기질로서는 가장 적합하다는 것이 밝혀졌다. 따라서 이 mannan을 효소의 기질 특이성을 밝히기 위한 기질로 사용할려면, 먼저 그 구조를 검토해야 되기 때문에, 우선 이 mannan의 optical rotation을 Jasco社製 DIP-SL형 Polarimeter로

Table 1. Hydrolysis of Various Mannans by Cell Wall Lytic Enzymes

Mannan	Origin	Dominent linkage	O. D. at 500nm	
			<i>Penicillium</i> enzyme	<i>Bacillus</i> enzyme
Mannan	<i>Dioscorea batatas</i>	β -1, 4	0	0
Glucomannan	Lilly	β -1, 4	0	0
Glucomannan	Wood (<i>Tsuga</i>)	β -1, 4	0	0
Glucomannan	Konjac	β -1, 4	0	0
Galactomannan	Loscut bean	β -1, 4	0	0
Mannan	<i>S. cerevisiae</i>	α -1, 6	0	0
Fucogalactomannan	<i>Rh. glutinis</i> AJ 4859	α -1, 2	0.02	0.01
Galactomannan	<i>Rh. glutinis</i> IFO 0880		0.73	0.31
Mannan	<i>Rh. glutinis</i> IFO 0695		1.15	0.60
Mannan	<i>Rh. glutinis</i> IFO 0871		0.95	0.44
Cell Wall	<i>Rh. glutinis</i> K-24		0.25	0.11

The reaction mixture, composed of 0.5ml of acetate buffer, pH 5.5 for *Bacillus* enzyme and pH 4.5 for *Penicillium* enzyme, 0.5ml of 0.3% substrate solution, and 10 μ l of enzyme solution, was incubated at 37°C for 5 hr for *Bacillus* enzyme and for 30min for *Penicillium* enzyme. Reducing power was determined by the Somogyi-Nelson method.

측정한다 $[\alpha]_D^{20} - 82^\circ$ 가 얻어져 본 다당의 결합 양식이 β 인 것을 알 수 있었다. 다음으로 다당을 Hakomori법에¹⁵ 의해 methyl화 하여 methanolization한 후, GLC로 분석한 결과, methyl 2, 4, 6-tri-O-methyl mannoside와 methyl 2, 3, 6-tri-O-methyl mannoside의 두 peak가 1:1의 비율로 검출되었으며 또 Smith degradation에 의한 생성물을 완전가수분해후 GLC 분석한 결과 erythritol과 mannose가 1:1의 비율로 검출되었고, mild酸 가수분해에 의해서는 O- β -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-erythritol이 검출되었다. 따라서 본 다당의 구조는 β -1,3과 β -1,4결합이 교대로 연결되어 있는 직쇄상의 다당인 것으로 밝혀졌다. 그외에 본 다당의 중합도(degree of polymerization)는 650 인 것으로 나타났다.

Rh. glutinis IFO 0695 mannan의 효소분해

mannan 150mg을 0.01M 초산완충액에 용해한 후 효소 각 1mg씩을 첨가하여 37°C에서 반응시켰다. 효소분해에 의해 유리되는 환원당은 적당한 간격을 두고 시료를 채취하여 Somogyi-Nelson 법에¹⁰ 의해 환원력을 측정함으로써 정량하였다. 결과는 Fig. 1에 표시한 것과 같이 환원력은 반응 약 3시간 후에 거의 최고치에 달하였으며 그 이후 일정치를 나타냈다. 이때의 분해한도는 mannose의 양으로 표시하여 *Bacillus* 효소가 약 12%, *Penicillium*효소가 약 37%에 달

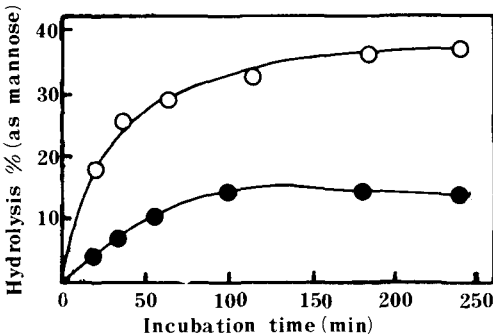


Fig 1. Time Course of the Hydrolysis of Mannan by the Enzymes of *Pen. lilacinum* and *B. pumilus*.

○—○ *Penicillium* enzyme
●—● *Bacillus* enzyme

하였으며 *Bacillus* 효소 쪽이 보다 큰 oligo당을 생성한다는 것을 알 수 있었다.

이와같은 반응에 의해 생성된 효소분해 물은 (반응 5시간) 농축후 PPC로 3회 다중 전개하여 oligo당을 분리정제 하였다. Table 2에 나타난 것과 같이 양효소는 각각 두 종류의 oligo당을 생성하며 mannan 100g에 대하여 *Penicillium*효소는 57mg의 disaccharide(P I)와 22mg의 tetrasaccharide(P II)를 *Bacillus* 효소는 38mg의 tetrasaccharide(B I)와 29mg의 hexasaccharide(B II)를 각각 생성 하였다.

Table 2. Yield and the Degree of Polymerization of Oligosaccharides Obtained from Enzymatic Degradation of Mannan

Oligosaccharides	Yield* (mg)	Degree of polymerization
P I	57	2
P II	22	4
B I	38	4
B II	29	6

* Yield is mg per 100mg of mannan.

P I and P II are di- and tetrasaccharide released from mannan by *Penicillium* enzyme. B I and B II are tetra- and hexasaccharide released from mannan by *Bacillus* enzyme.

각 Oligo당의 구조

각 oligo당을 Hakomori법에¹⁵ 의해 methyl화하여 methanolization한 후 GLC로 분석하였다. 결과를 Fig. 2에 표시하였다. 우선 P I oligo당은 두개의 peak가 검출되어, peak a는 methyl 2, 3, 4, 6-tetra-O-methyl mannoside, peak c는 methyl 2, 3, 6-tri-O-methyl mannoside에 해당하는 것으로 나타났으며 peak의 면적비는 1:1이었다. 따라서 P I의 구조는 O- β -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-mannose로 동정하였다.

P II oligo당의 GLC에서는 세개의 peak가 검출되어 peak a는 methyl 2, 3, 4, 6-tetra-O-methyl mannoside, peak b는 methyl 2, 4, 6-tri-O-methyl mannoside, peak c는 methyl 2, 3, 6-tri-O-

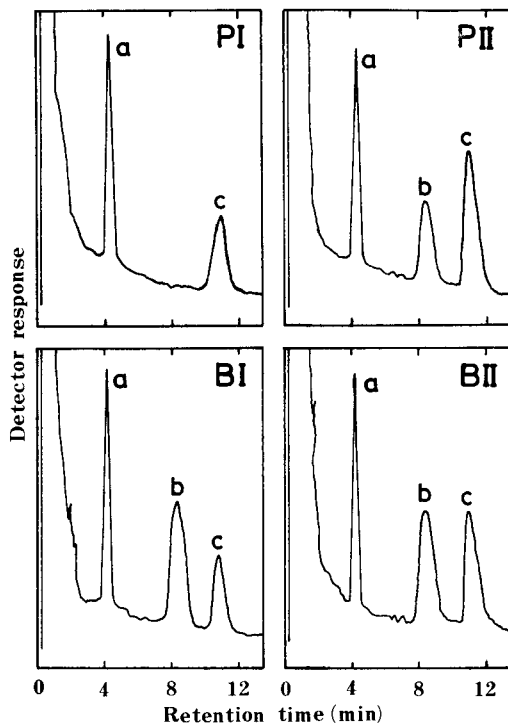


Fig 2. Gas Chromatograms of the Methanolyzate of Permethylated Oligosaccharides Derived from the Enzymatic Hydrolysis of Mannan from *Rh. glutinis*.

Methanolyzate was dissolved in methanol and analyzed using a column of 2% neopentylglycosuccinate. Separation was performed isothermally at 160°C. PI, P II, BI, and BII indicate the same as that in Table 2. [a: methyl 2, 3, 4, 6-tetra-O-methyl mannoside, [b: methyl 2, 4, 6-tri-O-methyl mannoside, [c: methyl 2, 3, 6-tri-O-methyl mannoside.

-methyl mannoside로 동정되었다. 이들 세 peak의 면적비는 1:1:2이었다. 따라서 P II의 구조는 O-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-O-β-D-mannopyranosyl-(1→3)-O-β-D-manno-pyrano-syl-(1→4)-D-mannose인 것으로 밝혀졌다.

이상과 같은 결과로부터 *Penicillium* 효소는 mannan의 β-1,3 결합을 가수분해한다는 것을 알 수 있다.

한편 *Baullus* 효소의 분해산물인 BI oligo당의 GLC에서는 세개의 peak가 검출되어 peak a는 methyl 2, 3, 4, 6-tetra-O-methyl mannoside, peak b는 methyl 2, 4, 6-tri-O-methyl mannoside, peak c는 methyl 2, 3, 6-tri-O-methyl-mannoside로 동정되었다. 각 peak의 면적비는 1:2:1이었다. 따라서 BI다당의 구조는 O-β-D-mannopyranosyl-(1→3)O-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-O-β-D-mannopyranosyl-(1→3)-D-mannose로 결정하였다.

한편 B II oligo당의 GLC에서는 BI처럼 역시 세개의 peak가 나타났으며 retention time도 일치하여 BI과 같은결합으로부터 유래한 peak로 동정되었으나 peak의 면적비는 1:3:2로 차이를 보였다. 따라서 B II oligo당의 구조는 O-β-D-mannopyranosyl-(1→3)O-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-O-β-D-mannopyranosyl-(1→3)O-β-D-mannopyranosyl-(1→4)-O-β-D-mannopyranosyl-(1→3)-D-mannose로 결정하였다. 이상의 결과는 *Bacillus* 효소가 mannose의 β-1,4 결합을 가수분해하여 4 당 또는 6 당을 유리하는 endotype의 β-1,4 mannanase의 일종이라는 것을 시사한다.

각 효소에 의한 mannan의 최종분해산물

mannan의 효소분해에 의해 얻어진 oligo당이 그 효소의 최종생성물인지 아니면 더 분해가 가능한지의 여부를 결정하기 위해 다음의 실험을 행하였다.

mannan의 효소분해에 의해 얻어진 네 종류의 oligo당에 각 효소를 첨가하여 철저히 분해시켰다. 즉, 약 1mg의 oligo당을 각 효소의 최적 pH의 완충액에 용해한후 50 μg의 효소를 첨가하여 toluene 존재하에 37°C, 24시간 가수분해를 행한후 농축하여 PPC에 의해 확인하였다.

Fig. 3에 나타난것 처럼 *Bacillus* 효소에 의해서는 네종류의 oligo당 전부가 전혀 분해되지 않았으나 *Penicillium* 효소에 의해서는 P II (tetrasaccharide)가 분해되어 2 당을 생성하였으며 BI (tetrasaccharide)의 경우에는 분해력은 약하나 단당과 3 당을 생성하였고, B II (hexa-

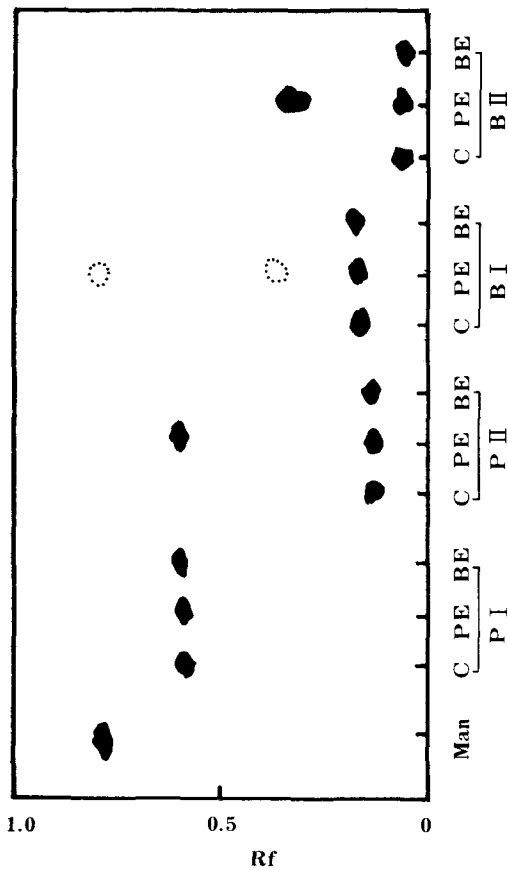


Fig 3. Paper Chromatogram of Enzymatic Hydrolyzate of Oligosaccharides Derived from Mannan by the Lytic Enzymes from *B. pumilus* and *Pen. lilacinum*.

Man : mannose, C : control (nontreated), PE : hydrolyzate by the enzyme of *Penicillium*, BE : hydrolyzate by the enzyme of *Bacillus*. P I, P II, B I, and B II indicate the same as that in Table 2.

saccharide)의 경우에는 빠른속도로 3당을 생성하였다. 따라서 *Bacillus* 효소는 mannan에 작용하여 최종적으로 4당 또는 6당을 생성하는 효소인 것으로 나타났다. 한편 *Penicillium* 효소는 mannan을 2당 또는 4당의 단위로 분해하나 최종적으로는 2당까지 분해한다는 것을 알 수 있었다. 그러나 4당(BI)의 경우 양쪽말단

이 β -1,4 결합의 경우에는 단당의 생성도 가능하였다.

반응속도 측정

양 효소의 mannan 및 oligo당에 대한 반응속도를 Lineweaver-Burk plot에 의해 구했다. Table 3에 표시한 것과 같이 *Penicillium* 효소의 mannan에 대한 K_m 치가 *Bacillus* 효소보다 낮게 나타나 보다 친화성이 높다는 것을 보여 주었다. 한편 각 oligo당에 대한 *Penicillium* 효소의 작용은 B II (hexasaccharide)에 가장 높은 친화성을 나타냈다.

Table 3. Estimation of K_m and V_{max} of the Two Lytic Enzymes on Mannan and Oligosaccharides

Substrate	<i>Penicillium</i> enzyme		<i>Bacillus</i> enzyme	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
Mannan	0.0124%	1.7×10^{-2}	0.0282%	8.3×10^{-3}
P II	0.80mM	2.2×10^{-4}	-	-
B I	0.67mM	1.1×10^{-4}	-	-
B II	0.23mM	1.3×10^{-2}	-	-

P II, B I, and B II indicate the same as that in Table 2.

고 찰

적색효모 세포벽의 구조를 밝히기 위한 연구의 일환으로 그 세포벽을 특이적으로 분해하는 효소생산균을 자연계로부터 분리하여 두 종류의 효소를 정제했다.^{5,6} 이들 효소는 세포벽의 골격성분인 glucomannan(세포벽 성분의 55% 이상을 차지함)을 분해하여 여러 종류의 oligo당을 생성하며 protease와의 공동작용에 의해 생 효모를 protoplast화 한다는 사실을 밝혔다.⁹ 세포벽 glucomannan의 구조는 세포벽으로부터 이들 효소에 의해 유리되는 oligo당의 구조 및 비율에 근거를 두어 그 개략을 밝힌바 있으나,¹⁶ 이들 효소의 기질특이성이 확실치 않아 그의 미세구조는 불명의 상태로 남아 있었다. 보다 상세한 세포벽다당의 구조를 밝히기 위해서는 이

참 고 문 헌

- 1) Nickerson, W. J.: *Bacteriol. Rev.*, **27**, 305 (1963).
- 2) Northcote, D. H. and R. W. Horne: *Biochem. J.*, **51**, 232 (1952).
- 3) Misaki, A., J. Johnson, J. S. Kirkwood, J. V. Scaletti and F. Smith: *Carbohydr. Res.*, **6**, 150 (1968).
- 4) Kocourek, J. and C. E. Ballou: *J. Bacteriol.*, **100**, 1175 (1969).
- 5) Murao, S., R. Yamamoto and M. Arai: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 123 (1976).
- 6) Murao, S., T. H. Lee and M. Arai: *J. Ferment. Technol.*, **56**, 472 (1978).
- 7) Lee, T. H., M. Arai and S. Murao: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 32 (1979).
- 8) Lee, T. H., M. Arai and S. Murao: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2343 (1981).
- 9) Lee, T. H., M. Arai and S. Murao: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1301 (1981).
- 10) Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1950).
- 11) Fukagawa, K., H. Yamaguchi, D. Yonezawa and S. Murao: *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **47**, 651 (1973).
- 12) Gorin, P. A., H. Horitsu and J. Horitsu and J. F. T. Spencer: *Can. J. Biochem.*, **43**, 950 (1965).
- 13) Misaki, A., T. Ito and T. Harada: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 716 (1972).
- 14) Timell, T. E.: *Tappi*, **44**, 88 (1961).
- 15) Hakomori, S.: *J. Biochem.* **55**, 205 (1964).
- 16) Arai, M., T. H. Lee and S. Murao: *Current Microbiol.*, **1**, 185 (1978).
- 17) Yomaguchi, H. and K. Makino: *J. Biochem.*, **81**, 563 (1977).