

*Arthrobacter luteus*가 생산하는 AL-Protease의 효모세포벽 용해 촉진작용

吳 洪 祿 · 船 津 勝*

忠南大學校 畜産學科 · 日本 熊本大學 應用微生物工學科*
(1985년 9월 11일 접수)

The Synergistic Action of the AL-Protease from *Arthrobacter luteus* on the Lysis of Yeast Cell Walls

Hong-Rock Oh and Masaru Funatsu*

Department of Animal Science, Chungnam National University,

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

(Received September 11, 1985)

Abstract

The yeast cell wall lytic action of the alkaline AL-protease, which was found out of the crude Zymolyase that a kind of yeast cell wall lytic endo- β -1,3-glucanase produced from *Arthrobacter luteus*, was investigated with the viable cells of *S. sake* and its cell wall preparation.

AL-protease on the lysis of the viable yeast cells showed very low activities with the alone, but the lytic activities were highly increased with the combination of AL-protease and Zymolyase. On the stepwise treatment of the viable yeast cells with AL-protease and Zymolyase, the cells were lysed highly only by the course having a treatment with Zymolyase after pretreatment with AL-protease. Thus synergistic action of AL-protease was not observed with any some commercial enzymes, known as a type of alkaline and serine protease such as AL-protease, and was also found to be affected greatly by the culture conditions and species of the yeast tested. AL-protease caused the release of some peptide and a lot of sugar from the cell wall preparation, but could not lysed the cell wall more than 66%. Whereas Zymolyase could lysed the cell walls almost completely with alone.

On the basis of these results, the synergistic action of AL-protease on the lysis of *S. sake* cells is hypothesized that at first AL-protease bind to the yeast cell surface layer consisting of mannan and protein, and then changes their conformation to facilitate the penetration of Zymolyase from the outside to the inside framework layer constituted of alkali insoluble β -1,3-glucan.

서 론

현재, 효모세포벽 용해효소로 널리 이용되고 있는 Zymolyase (endo- β -1,3-glucanase; EC 3.2.1.39)^{1,2)}의 조효소(crude enzyme preparation)는 *Saccharomyces sake* 세포에 대해서 아주 미약한 용해활성을 보

일 뿐, 그 충분한 용해에는 β -1,3-glucanase의 용해 작용 이외에 β -mercaptoethanol, sodium sulfite 등 SH 환원시약의 도움이 동시에 요구되었다.³⁾ 이것은 Zymolyase의 조효소중에는 SH 환원시약처럼 *S. sake* 세포에 대한 β -1,3-glucanase의 용해작용을 촉진하는 일종의 효소상 물질이 결여되어 있거나, 또는 극

히 미량 함유되어 있음을 시사하는 것으로 생각되었다.

사실, 효모세포벽은 β -1,3-glucan층을 기저 골격 구조로 하고, 상부에 mannan층, 그리고 단백질 등을 간질물질로 하는 이중구조 내지는 복합적인 구조로 형성되어 있는 것으로 알려져 왔으며,⁴⁾ 이를 뒷받침하는 2~3의 모델^{5,6,7)}도 제시되고 있다. 그러므로 효모세포벽을 효과적으로 용해시키는 데에는 β -1,3-glucanase의 단일 효소의 작용만으로는 불충분하다.

실제로, 저자 등은 Zymolyase에 관한 연구과정에서 Zymolyase fraction(yeast cell wall lytic β -1,3-glucanase)이 정제되어 감에 따라서, *S. sake* 세포에 대한 용해의 비활성도(specific activity)가 오히려 저하되는 결과로 미루어 보아 Zymolyase의 조효소중에는 Zymolyase의 용해활성을 촉진시키는 모종의 인자가 존재하고 있음을 추정할 수 있었다.

따라서, 저자 등은 Zymolyase 조효소중의 효모세포벽 용해 촉진인자를 검색, 분리, 정제하여 조사한 결과 분자량이 약 40,500 정도의 염기성 serine protease이었고, 아울러 그 이화학적, 효소학적 성질도 밝힌 바 있다.^{3,8-11)} 이와같이, *Arthrobacter luteus*로부터 생산된 Zymolyase의 조효소중에서 발견 분리된, 효모세포벽 용해 촉진성의 염기성 protease를 저자 등은 편의상 AL-protease로 이름지은바 있다.¹¹⁾

본 실험에서는 AL-protease가 Zymolyase와 어떻게 협동하여 효모세포벽의 용해를 촉진하게 되는가, 그 용해 촉진작용의 기전에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

1. 효소, 기질 및 시약

AL-protease와 Zymolyase는 전보¹⁰⁾의 실험에서 정제된 동결건조품을, trypsin(253 U/mg) 및 α -chymotrypsin(61 U/mg)은 Worthington Biochemical社製를, 그리고 Nagarse(subtilisin)는 나가세産業(오오사까)社製를 사용하였다.

*S. sake*세포는 전보³⁾에 준하여 조제하였고, *S. carlsbergensis*는 아사히 맥주 후꾸오가 공장에서 제공받았으며 *S. cerevisiae*는 일본 Orient사제의 압착 효모를 이용하였다. *S. sake*의 세포벽은 Northcote 등¹²⁾ 및 Furuya 등¹³⁾의 방법에 따라서 조제하였다 (그림 1).

TLCK(tosyllysinechloromethyl ketone), TPCK(tosylphenylalanylchloromethyl ketone)와 DFP(diisopropylphosphorofluoridate)는 Sigma사제를 각각 메타놀과 50 mM의 인산완충액(pH 7.0), 그리고 isopropanol을 용매로 하여 10 mM 용액으로 조제하였다.

2. 일반분석법

전당은 페놀-황산법,¹⁴⁾ 환원당은 Imoto 등의 방법¹⁵⁾, 단백질은 Lowry법에 의하여 측정하였고, ninhydrin 반응은 Yemm-Cocking법¹⁷⁾에 의하였다.

3. 효소활성 측정법

효모세포 및 동결건조된 효모세포벽(분말)에 대한

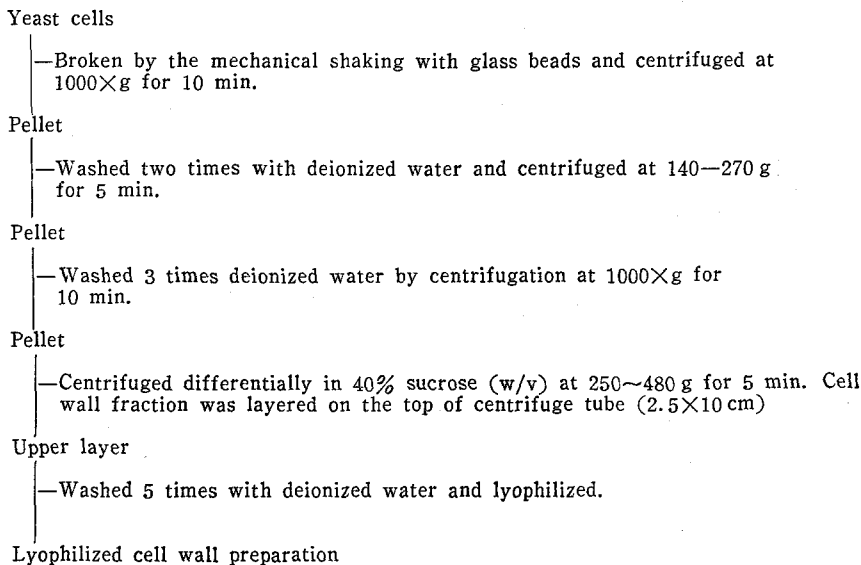


Fig. 1. Preparative procedures of the cell wall from *S. sake*

용해활성은 진보³⁾에 준하여 측정하였고, 그 결과는 효모세포는 O. D. 800 nm 에서, 효모세포벽은 O. D. 660 nm 에서의 탁도의 감소율로 표시하였다. 다만, 동일시료에 대한 2 단계 반응을 실시할 경우에는 전처리 반응이 끝난 즉시 반응액을 빙수중에서 4~5°C 정도로 냉장처리하거나, 소정의 저해제를 반응액중의 최종농도가 1 mM 되게 주입하여 효소활성을 억제시켰다. 이어서, 원심분리로 기질을 회수하고, 회수된 기질을 탈이온수로 3 회 반복하여 세척한 다음, 완충액을 가하여 전과 동일한 반응액을 조성하였고. 여기에 필요한 효소를 가하여 다음의 반응을 실시하였다.

Invertase의 활성은 0.5 M 초산나트륨 완충액 (pH 4.7)으로 조제한 5% sucrose용액 2 ml 에 효소액 0.2 ml 를 가하여, β -1,3-glucanase활성의 측정법³⁾에 준하여 측정하였다.

결과 및 고찰

1. *S. sake*세포에 대한 AL-protease의 용해 촉진작용

전보¹¹⁾의 실험에서 열기성 protease로 밝혀진 AL-protease가 Zymolyase와 어떻게 협동하여 *S. sake* 세

포벽의 용해를 촉진하게 되는지, 그 촉진작용의 기전 구성을 달리하는 여러가지 반응액 (Table 1의 A)과, 2 단계에 걸친 반응실험 (Table 1의 B)을 통하여 검토하였다.

즉, AL-protease 12 μ g 과 Zymolyase 12 μ g 의 어느 한쪽이나, 또는 양 효소가 모두 함유된 반응액 (50 mM 인산완충액, pH 7.5)을 25°C에서 30분간 반응시킨 결과는 Table 1의 A 와 같았고, 반응시간을 15분간씩 2 단계로 구분하여 반응시킨 결과는 Table 1의 B 와 같았다.

먼저, A 실험에 있어서는 AL-protease나, Zymolyase 또는 아황산나트륨의 단독작용만으로는 지극히 미약한 용해도를 보여 주었으나, 이들이 복합된 반응액에 있어서는 (Zymolyase+Na₂SO₃) < (AL-protease+Zymolyase) < (AL-protease+Zymolyase+Na₂SO₃)의 순서로 점점 높은 용해활성을 나타내었다. 그러나, AL-protease와 아황산나트륨의 복합작용에 의한 효과는 인정되지 않았다. 이것은, serine type protease의 일종으로 밝혀진¹¹⁾ AL-protease와 SH-환원제인 아황산나트륨의 효모세포벽에 대한 작용양식은 서로 다르겠으나, 그 작용범위는 양자 모두 세포벽의 표층부인 단백질에 국한되기 때문에, 이들의 작용에 의한 표층부 구조의 변화만으로는 세

Table 1. Synergistic effect between AL-protease and Zymolyase on the lysis of *S. sake* cells

After pretreatment in the phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) with AL-protease (12 μ g) or Zymolyase (12 μ g) for 15 minutes at 25°C, yeast cells were washed centrifugically 3 times with distilled water. That yeast cells were subsequently resuspended in the reaction mixture containing AL-protease and/or Zymolyase and they were then incubated with gentle shaking under same conditions as pretreatment except the reaction time in the treatment of A was 30 min.

	Enzymes		Na ₂ SO ₃ (mM)	Lytic activity(%)*
	Pretreatment	Treatment		
A	None	AL-protease	0	3
	None	AL-protease	50	5
	None	AL-protease+Zymolyase	0	49
	None	AL-protease+Zymolyase	50	54
	None	Zymolyase	0	2
	None	Zymolyase	50	38
B	AL-protease	None	0	16
	None	AL-protease	0	12
	Zymolyase	None	0	5
	None	Zymolyase	0	15
	AL-protease	Zymolyase	0	62
	Zymolyase	AL-protease	0	28

*; % decrease in turbidity of the yeast cell suspension in O. D. at 800 nm

포의 용해를 유발시키기 어렵다는 사실을 시사하는 것으로 생각된다.

다음, B 실험에 있어서는 효모세포에 AL-protease 이어서 Zymolyase의 순서로 반응시켰을 경우에는 62%의 용해도가 얻어 졌으나 반응 순서를 역순으로 하였을 때, 그 용해도는 전자의 절반 수준에도 미치지 못하였다. 이와같이, Zymolyase, 그리고 AL-protease의 순서로 작용시켰을 때 세포의 용해도가 부진한 것은, Zymolyase(endo- β -1,3-glucanase)의 작용 표적으로서 세포벽의 골격구조를 구축하고 있는 알카리 불용성 β -1,3-glucan층이 세포벽의 표층 구조물인 mannan-protein, 그리고 알카리 가용성 glucan (β -1,3 및 β -1,6-glucan)에 의해서 가리워져, Zymolyase와의 접촉이 불가능하였기 때문으로 생각된다. 여기서, 그나마 28% 정도의 용해도가 측정된 것은 아직 확실하지 않으나, Zymolyase가 세포벽의 표층 성분중 알카리 가용성 β -1,3-glucan에 작용하여 개설한 제한된 경로를 통하여, 알카리 불용성 glucan의 골격구조에 부분적인 변화를 가할 수 있었고, 이어서 AL-protease의 작용에 의해서 세포벽의 표층구조가 크게 붕괴됨으로써, 불충분하나마 세포가 용해될 수 있는 여건이 조성되었기 때문으로 추정된다. 또한, B 실험에서는 양 효소들의 단독작용만으로도 A 실험에 비하여 높은 수준의 용해도가 얻어 졌으며 특히 Zymolyase는 그 반응 시기에 따라서 효모세포에 대한 용해활성도에 상당한 차이가 인정되었다. 이러한 현상들은 반응과정중에 기질을 회수하고, 세척하기 위한 원심분리 조작이 세포에 가한 충격으로 세포벽의 표층구조가 어느 정도 취약화되었기 때

문이며, Zymolyase는 그 성질상 어떤 형태든 표층구조가 취약화된 다음에 반응시킴이 세포의 용해에 효과적임을 시사하는 것이었다.

이상과 같은 실험결과와, 이미 알려진 효모세포벽의 구조로부터 다음과 같은 용해양식이 추정되었다. 즉, AL-protease가 먼저 효모세포벽의 표층을 구축하고 있는 mannan-protein층에 작용하여 단백질을 endo형으로 개열시키고, 이에 의해서 외부로부터 효모세포벽의 골격구조를 구축하고 있는 알카리 불용성 glucan층에 도달할 수 있는 통로가 형성된다. 이어서, 효모 glucan에 특이성을 가진 Zymolyase가 그 통로를 통하여 glucan층에 접촉, glucan을 가수분해함으로써 효모세포의 용해가 유발된다.

2. *S. sake* 세포벽 標品에 대한 AL-protease의 용해작용

전항의 실험에 의하여 AL-protease의 효모세포벽 용해촉진에 대한 대체적인 기전을 추정하였으나, 본 실험에서는 생세포(intact cell)로부터 분리 조제된 세포벽 標品을 이용하여, 그 용해촉진의 양식을 보다 자세히 알고저 하였다. 즉, 세포벽 標品 5mg을 포함하는 반응액에 효소 20 μ g씩을 5시간마다 주입하면서 15시간까지 반응시켜, 그 결과를 생세포를 대상으로 한 전항의 실험결과와 비교 검토하였다.

그 결과(Table 2), AL-protease, Zymolyase, 그리고 아황산나트륨의 복합작용에 의한 용해활성은 전항의 실험에서와 같이(Zymolyase+Na₂SO₃) < (AL-protease+Zymolyase) < (AL-protease+Zymolyase+Na₂SO₃)의 순서로 점점 높고 빠른 반응속도를 나타

Table 2. Synergistic effect between AL-protease and Zymolyase on the lysis of the yeast cell wall preparation

The yeast cell wall preparation (5 mg), isolated from *S. sake* and lyophilized was suspended in the 50 mM phosphate buffer (pH 7.5), and they were incubated with AL-protease (20 μ g) and/or Zymolyase (20 μ g) for indicated time in table at 25°C with shaking.

Enzymes	Reaction mixtures		Lytic activities(%)*							
	Na ₂ SO ₃ (mM)		0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	5.0	10.0	15.0**
AL-protease	0		22	31	39	47	58	66	66	66
AL-protease	50		27	37	49	64	69	71	71	71
AL-protease+Zymolyase	0		53	82	99	99	99	99	99	99
AL-protease+Zymolyase	50		75	92	99	99	99	99	99	99
Zymolyase	0		11	21	29	36	52	70	99	99
Zymolyase	50		16	31	47	60	80	99	99	99
None	50		3	5	8	12	21	32	40	41

*; % decrease in turbidity of the yeast cell suspension in O. D. at 800 nm

**; reaction time(hr)

내었는데 1.5 시간 경에는 (AL-protease+Zymolyase +Na₂SO₃)와 (AL-protease+Zymolyase)의 반응액이 그리고 5시간 경에는 (Zymolyase+Na₂SO₃)의 반응액마저 완전히 투명하게 용해(99%)되었으나, AL-protease와 Na₂SO₃에 의해 복합작용의 상승효과는 미미하였다.

또한, AL-protease, Zymolyase, 그리고 아황산나트륨의 단독작용에 의해서도 반응 15시간 경에는 각각 66, 99, 그리고 41%의 용해활성을 보여 주었다. 여기에서, AL-protease의 반응속도는 Zymolyase 보다 빠르지만, 그 용해활성은 66%에 그치고 있으며, 이에 비해서 Zymolyase의 반응속도는 느리지만, 종국적으로는 세포벽을 거의 완벽하게 용해(99%)시키고 있었다. 아황산나트륨도 AL-protease와 비슷하게 그 용해도는 41% 정도에서 더 이상 진전하지 못하였다.

이상과 같은 효모세포벽 標品에 대한 실험결과는 효모세포(intact cell)에 대한 결과와 다른 양상을 보이고 있으나, 이것은 효모세포벽이 원형질체(proto-plast)를 둘러싸고 있을 때와, 원형질체로부터 유리된 상태로 있을 때의 구조적인 존재상태의 당연한 차이라고 생각된다. 즉, 세포로부터 유리된 세포벽은 내외의 구분이 없게 되므로, Zymolyase는 AL-protease의 도움이 없이도 바로 알카리 불용성의 glucan층에 접하게 되어, 효모세포의 골격구조를 가수분해 할 수 있게 된다. 본 실험에서, Zymolyase가 AL-protease만큼 세포벽의 용해속도가 빠르지 못한 것은 세포벽이 알카리 불용성의 glucan이란 강인한 제질로 골격을 구성하고 있기 때문일 것이다. 이에 비해서, AL-protease는 mannan-protein과 알카리 가용성 glucan의 네트워크로 형성된 보다 유연한 구조물에 작용하여 비교적 용이하게 세포벽의 용해를 유발시키고 있다. 그러나, AL-protease의 작용결

과가 세포벽의 골격구조의 변화에 미치는 직, 간접적인 영향은 한정되어 있기 때문인지, AL-protease를 장시간 반응시켜도, 세포벽의 용해도는 66% 정도에서 더 이상 진전되지 못하였다. 이에 비해서, Zymolyase는 그 용해속도는 느리지만, 반응시간이 경과함에 따라서 세포벽을 거의 완전하게 용해시키고 있는데, 이것은 Zymolyase의 작용으로 세포벽의 골격구조인 glucan층이 서서히 붕괴되고, 이로 인해서 mannan-protein 및 알카리 가용성 glucan으로 구성되는 비골격적 구조도 지지 기반을 상실한 불안정한 상태에서 가용화가 촉진되어, 세포벽 전체가 용해되는 것으로 추정된다. 또한, 아황산나트륨은 단백질의 분자구조중에서 S-S결합(disulfide bond)만을 환원, 개열시키고 있기 때문에 용해속도도 느리고, 최종 용해도도 41% 정도에 그치고 있다.

이밖에, 본 실험에서 세포벽의 標品이 생세포에 비해서 높은 용해 감수성을 보인 것은 이미 언급한 이유 이외에, 세포벽 표품의 조제과정에서 가한 물리적인 충격 등의 원인으로, 세포벽의 구조가 어느 정도 취약화되었기 때문으로 추정된다.

이상의 효모세포벽 標品을 이용한 실험의 결과는, *S. sake*세포의 용해에 있어서 AL-protease는 세포벽의 mannan-protein층에 작용하여 세포벽의 용해를 촉진시키는 일차적인 역할을 수행하고, 이어서 Zymolyase(β -1, 3-glucanase)가 세포벽의 골격구조인 glucan을 가수분해하여 완전히 용해에 이르게 된다는 전항의 실험결과를 뒷받침하는 것으로 생각된다.

3. AL-protease작용에 의한 세포벽 분해물의 일반분석

본 실험에서는, 전항 (Table 2)에서와 같이 *S. sake*세포벽 標品에 AL-protease를 장시간 작용시켜, 세포벽으로부터 유리되어 나오는 분해물의 분석에 의

Table 3. Analysis of the hydrozates released from the yeast cell wall preparation by AL-protease

The reaction mixture (5 ml) consisting of 5mg cell wall preparation, 83 μ g AL-protease and 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) was incubated with gentle shaking for 5 hr. at 25°C.

Analysis items	Control	Reaction mixture
Turbidity (O. D. 660 nm, %)	100	36
Total sugar (μ g)	200	2500
Reducing sugar (μ g)	50	230
Protein (μ g)	±	23
Ninhydrin reaction (O. D 570 nm)	0.3	0.9
Invertase activity	±	+

하여, 세포벽에 대한 AL-protease의 작용양식을 검토하였다. 즉, 세포벽 標品 5 mg과 AL-protease 83 μg 을 사용하여 25°C에서 5 시간 반응시켜 분석한 결과를 Table 3에 나타내었다.

그 결과, 세포벽에 다량의 AL-protease를 작용시켰음에도, 그 용해도는 전항의 실험결과와 비슷한 64% 정도를 나타내었고, 유리된 단백질량은 23 μg 이었으며, ninhydrin 양성물질은 control에 비하여 3 배 가까이 증가하였다. Invertase 활성은 control이나, 시료구 모두 저극히 미약하였으나, 전당(total sugar) 및 환원당은 control에 비하여 시료구의 농도가 각각 12.5 배 및 4.6 배 정도로 높았다.

이상의 결과로부터 AL-protease는 *S. sake* 세포벽에 작용하여 세포벽으로부터 일정량의 단백질과 더불어 상당량의 당을 유리시키고 있음을 알 수 있다. 이와같이, 세포벽으로부터 당이 유리되는 현상은 이 단계에서는 확실치 않으나, 이를 세포벽의 구조와 연관시켜 검토하여 본다면, AL-protease가 세포벽의 조제과정에서 구조적으로 취약화된 mannan-protein-alkali soluble glucan의 네트워크 구조중 단백질의 부분을 가수분해 하게 되면, 이로 인해서 단백질과 결합하고 있던 당의 구조에 변화가 일어나, 당의 일부가 가용화하기 때문일 것으로 추정된다. 또한, AL-protease의 작용으로 세포벽으로부터 유리된 단백질이 분자구조중에 당을 함유하는 당단백질일 가능성은 본 실험에서는 확인되지 않았다.

한편, 효모세포벽을 구성하고 있는 당류에 대한

AL-protease의 효소적 작용은 전보¹¹⁾의 실험에 의하여 부정되고 있으므로, AL-protease가 세포벽중의 당에 직접 작용하여, 세포벽으로부터 당의 일부가 유리될 가능성은 희박하다고 생각된다.

4. 시판 염기성 Protease에 의한 용해 촉진 작용의 검토

전보¹⁰⁾의 실험에 의하여 AL-protease는 pH 9.6 부근에 등전점을 가진 염기성 protease로 밝혀지고 있으므로 염기성 protease로 밝혀지고 있으므로, 염기성 protease인 trypsin, chymotrypsin, 및 Nagarse를 대상으로 AL-protease와 같은 효모세포벽에 대한 용해촉진작용의 유무를 검토하였다. 즉, 각 protease 100 μg 을 사용하여 30 분간 반응시켜, 각각의 저해제로 5 분간 처리한 다음, Zymolyase 20 μg 을 가하여 15 분간 반응시켰다. 그 결과(Table 4), 본 실험에 사용된 그 어떠한 protease도 AL-protease와 같은 효모세포벽 용해 촉진작용은 인정되지 않았다. 따라서, *S. sake*의 세포벽 용해를 촉진하는 AL-protease는 보통의 protease와는 달리, 효모세포벽의 단백질에 기질 특이성을 나타내는 특이한 protease의 일종으로 생각된다.

5. 몇 가지 효모세포들에 대한 용해 촉진작용의 검토

효모세포벽의 용해 감수성은 균종, 배양조건 등에

Table 4. Synergistic effect between Zymolyase and some commercial alkaline protease on lysis of *S. sake* cells

After pretreatment in the phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) with protease (100 μg) described in table for 30 minutes at 25°C, the reaction mixture was incubated with inhibitors for 5 minutes. The yeast cells in that mixture were subsequently washed centrifugically 3 times with distilled water, and they were then treated with Zymolyase (20 μg) for 15 minutes under the same conditions as pretreatment.

Pretreatment enzymes	Inhibitors	Treatment enzymes	Lytic activity*
Trypsin	None	None	0%
Trypsin	TLCK	Zymolyase	3
Chymotrypsin	None	None	0
Chymotrypsin	TPCK	Zymolyase	2
Nagarse	None	None	0
Nagarse	DFP	Zymolyase	3
AL-protease	None	None	4
AL-protease	DFP	Zymolyase	62

*, % decrease in turbidity of the yeast cell suspension in O. D. 800 nm

Abbreviation: TLCK, tosyllysinechloromethyl ketone; TPCK, tosylphenylalanylchloromethyl ketone; DEP, diisopropylphosphorofluoridate

Table 5. Synergistic effect between AL-protease and Zymolyase on the lysis of various yeast cells

The yeast cells suspended in the phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) containing AL-protease (12 μ g) and/or Zymolyase (12 μ g) were incubated with shaking for 60 minutes at 25°C.

Reaction mixture		Lytic activity(%)*			
Enzymes	Na ₂ SO ₃ (mM)	<i>S. sake</i>		Brewery yeast**	Baker's yeast**
		Shaking culture	Stationary culture		
AL-protease	0	8	6	3	0
AL-protease	50	11	8	4	0
AL-protease+Zymolyase	0	68	19	32	0
Zymolyase	0	3	2	0	0
Zymolyase	50	60	8	0	0

*; % decrease in turbidity of the yeast cell suspension in O. D. 800 nm

**; *Saccharomyces carlsbergensis*

***; Commercial baker's yeast, *S. cerevisiae*

의해서 달라지고 있음이 알려지고⁴⁾ 있으므로, 정치 및 진탕배양한 *S. sake* 맥주 및 빵 효모세포에 대한 AL-protease의 용해 촉진작용을 검토하였다. 즉, AL-protease 12 μ g 과 Zymolyase 12 μ g 을 사용하여, 60 분간 반응시켜 용해활성을 측정하였다.

그 결과 (Table 5), AL-protease나, Zymolyase의 단독작용만으로는 그 어떤 효모세포에 대해서도 앞의 실험 (Table 1)에서와 같이 그 용해활성은 미약하였으나, AL-protease와 Zymolyase의 복합작용에 의해서 그 활성은 Zymolyase와 아황산나트륨에 의한 경우 이상으로 상승하였다. 그러나, AL-protease와 아황산나트륨의 복합작용에 의한 용해활성의 상승효과는 인정되지 않았다. 또한, 맥주효모에 있어서는 Zymolyase와 아황산나트륨의 복합작용에 의해서도 인정되지 않았던 용해활성이, AL-protease와 Zymolyase의 복합작용에 의해서 32%까지 상승하였다. 한편, 같은 *S. sake* 세포라도 정치배양한 세포의 용해 감수성은 대단히 낮았으며, 빵효모의 세포는 어느 경우에도 용해되지 않았다.

이상의 실험결과로부터, 효모세포벽에 대한 AL-protease 및 Zymolyase의 용해작용은 효모의 종 특성 및 배양조건 등에 의하여 형성되는 세포의 용해 감수성에 의하여 좌우되고 있으며, 이러한 현상은 결국 효모세포벽 구조의 다양성 및 가변성으로부터 초래되는 것으로 추정된다. 또한, 맥주 효모에 대한 AL-protease와 아황산나트륨 사이의 용해 촉진능의 분명한 차이는 이미 앞에서(1, 2항) 지적한 바와 같이, 효모세포벽에 대한 두 물질의 작용양식이 서로 다르며, 아울러 본 실험에서 사용한 세포들의 세포벽내 구조가 서로 다를 것을 시사하는 것이었다.

한편, AL-protease에 대한 별도의 실험¹⁸⁾에서, 정제된 AL-protease fraction에 대하여 수종의 인공 peptide를 기질로 한 peptidase의 활성 유무를 조사하였으나, peptidase의 활성은 인정되지 않았다. 이것은 AL-protease가 세포벽의 단백질에 대하여 endo type으로 작용할 가능성을 시사하는 것으로 생각되었다.

이상의 실험결과와 Lampen⁵⁾의 효모세포벽 모델을 참고로 하여, AL-protease의 용해 촉진작용에 의하여 유발되는 *S. sake* 세포의 용해기전을 다음과 같이 추론하였다. 즉, 분자량 약 4만¹⁰⁾의 AL-protease가 표층구조인 mannan-protein-alkali soluble glucan층에 작용하여, 단백질의 polypeptide chain을 endo type으로 절단하며, 이에 의해서 형성된 통로를 이용하여 분자량 약 2만의 Zymolyase가 노출된 glucan층에 접촉, glucan을 가수분해 하므로써 효모 세포의 용해가 발생하기 시작한다.

이상에 걸친 저자 등의 AL-protease에 관한 실험 결과는, 역시 효모세포벽의 용해를 촉진하는 것으로 보고된 Obata¹⁹⁾의 protease 및 Kitamura²⁰⁾의 Zymolyase B에 관한 실험결과와 대체로 일치하는 경향을 보였다. 이러한 현상은 효모세포벽에 작용하는 미생물 기원의 열기성 Protease들의 공통된 속성인지도 모른다.

요 약

효모세포벽 용해효소의 일종인 Zymolyase(endo- β -1, 3-glucanase)와 더불어 *Arthrobacter luteus*로부터 생산되었고, 또한 Zymolyase의 조효소중에서 발

견된 바 있는 염기성 AL-protease의 효모세포벽 용해작용을 *S. sake*의 생세포와 그 세포벽 標品을 사용하여 조사하였다.

AL-protease의 효모 생세포에 대한 용해활성은 그 단독작용만으로는 저극히 미약하였으나, Zymolyase와의 복합작용에 의해서 용해활성은 고도로 상승하였다. 효모생세포를 AL-protease와 Zymolyase로써 단계적인 처리를 할 경우, 효모세포는 AL-protease로 전처리된 뒤에 Zymolyase로 처리되는 처리 순서에 한하여 효과적으로 용해되었다. 이러한 AL-protease의 촉진적 작용은 AL-protease처럼 염기성이고 serine protease로 알려진 몇가지 시판의 효소들 중에서는 발견되지 않았으며, 또한 AL-protease의 이러한 작용은 실험에 사용된 효모들의 배양조건 및 균종에 따라서 커다란 영향을 받는 것으로 밝혀졌다. AL-protease는 효모세포벽 標品으로부터 일정량의 peptide와 상당량의 당을 유리시키고 있으나, 그 세포벽을 66% 이상은 용해시키지 못하였다. 반면에, Zymolyase는 그 단독작용만으로도 효모세포벽을 거의 완전히 용해시킬 수 있었다.

이상의 실험결과를 기초로 하여, *S. sake* 세포벽의 용해에 있어서 AL-protease의 효소적 작용은, 먼저 AL-protease가 mannan과 단백질로 구성되는 세포벽 표층부에 결합하고, 이어서 그들의 구조를 변화시킴으로써, Zymolyase를 세포벽의 외부로부터 알카리 불용성 glucan으로 구축되고 있는 세포벽 내부의 골격구조로까지의 침투를 촉진시키는 것으로 추론되었다.

문 헌

1. Kitamura, K., T. Kaneko, and Y. Yamamoto: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **145**(1), 402(1971)
2. Kitamura, K., T. Kaneko, and Y. Yamamoto: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **20**, 323(1974)
3. 吳洪祿 · 下田忠久 · 船津勝 : 한국식품과학회지, **11**(4), 242(1979)
4. 富永嘉男 · 長崎 龜 : 溶菌酵素, 船津勝, 鶴大典 編著, (講談社, 東京), 152(1977)
5. Lampen, J. O.: *Antonie van Leeuwenhoek*, **34**, 1(1968)
6. Kiddy, D. K. and R. Davies: *J. Gen. Microbiol.*, **61**, 327(1970)
7. Obata, T., H. Iwata, and Y. Namba: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2387(1977)
8. Funatsu, M., H. Oh, Y. Aizono, and T. Shimoda: *Agric. Biol. Chem.*, **42**(10), 1975(1978)
9. 吳洪祿 · 下田忠久 · 船津勝 : 한국식품과학회지, **12**(4), 254(1980)
10. 吳洪祿 · 相菌泰生 · 下田忠久 · 船津勝 : 한국영양식량학회지, **12**(4), 387(1983)
11. 吳洪祿, 相菌泰生, 船津勝 : 한국영양식량학회지, **13**(2), 193(1984)
12. Sentandreu, R. and D. H. Northcote: *Biochem. J.*, **115**, 231(1969)
13. Furuya, A. and Y. Ikeda: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **6**, 49(1960)
14. Hodge, J. E. and B. T. Hofreiter: In "Method in Carbohydrate Chemistry", ed. R. L. Whistler and M. L. Wolfrom, Academic Press, New York, **1**, 330(1962)
15. Imoto, T. and K. Yagishita: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1154(1971)
16. Lowry, O. H., A. L. Fart, N. J. Rosebrough and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
17. Yemm, E. W. and E. C. Cocking: *Analyst*, **80**, 209(1955)
18. 吳洪祿 : 未發表 資料
19. Obata, T., K. Fujioka, S. Hara, and Y. Namba: *Agric. Biol. Chem.*, **41**(4), 671(1977)
20. Kitamura, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**(4), 963(1982)