

β -1, 3-Glucanase 생성균의 분리 및 효소 생성 조건

정기택 · 방광웅 · 송형익 · 김재근 · 유대식*

경북대학교 식품가공학과 *계명대학교 생물학과

Isolation of β -1, 3-Glucanase Producing Strain and Cultural Conditions of Its Enzyme Production**Chung, K.T., K.W. Bang, H.I. Song, J.K. Kim, and T.S. Yu***

Dept. of Food Technology, Kyungpook National University, Taegu 635, Korea

*Dept. of Biology, Keimyung University, Taegu 636, Korea

Abstract: The bacteria, which were capable of producing β -1, 3-glucanase inducibly by utilizing cell wall of *Aspergillus fumigatus* as a sole carbon source, were isolated from soil in the campus of Kyungpook National University. Among them, the strain which produced the enzyme excellently was selected and identified to be *Pseudomonas stutzeri* KF 13 by morphological, cultural and physiological examination. The optimal conditions for the enzyme production from *Pseudomonas stutzeri* KF 13 were investigated. The enzyme production was reached maximum state when the broth cultured for 72hr at 30°C. And the enzyme showed the highest activity in the medium containing 3.5% cell wall as an inducer, 15% yeast autolysate as a nitrogen source and 0.05% MnSO₄ at pH 7.5.

Key words: β -1, 3-Glucanase, *Pseudomonas stutzeri* KF 13, Cell wall.

β -1, 3-glucanase (β -1, 3-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.6)는 1959년 Reese 등에 의하여 처음 보고된 이래 곰팡이, 효모, 세균 등 많은 미생물에서 발견되고 있다 (Clarke and Stone, 1965; Abd-El-Al and Phaff, 1968, 1969; Notario 등, 1976; Horikoshi 등, 1963).

본 효소는 algae, 콩, 발아중의 곡류, almond kernel, 곰팡이 및 효모 등의 세포벽에 존재하는 β -1, 3-glucan의 β -1, 3-glucoside 결합을 선택적으로 분해하는 가수분해 효소로서 (Whistler and Smart, 1953; Manners 등, 1973; Misaki 등, 1968; 丸尾文治 등, 1983), 미생물의 세포벽이나 laminarin, pachyman 등과 같은 β -1, 3-glucan을 첨가함으로써 효소생성이 유

도되는 유도효소이다 (Tanaka 등, 1974; Kobayashi 등, 1974).

특히 β -1, 3-glucanase는 효모의 spheroplast 생성, 세포벽의 용해에 관계하며, 단독으로 또는 chitinase와 혼용하여 곰팡이의 세포벽 용해에도 관여하고 있다 (Mann 등, 1972; Tanaka and Phaff, 1965; Fleet and Phaff, 1974; Tanaka 등, 1974; Kobayashi 등, 1974; Skujins 등, 1965). 그러나 곰팡이의 세포벽 구조는 효모와는 다소 차이가 있고, intact cell은 용해하기 어려운 점 등 곰팡이의 세포벽 용해에는 아직도 많은 문제점을 안고 있다.

이에 곰팡이 *Aspergillus fumigatus*의 세포벽을 용해시키는 세균을 토양에서 선택적으로

분리하고, 그 중에서 β -1,3-glucanase의 활성이 강한 1주를 선별하여 동정하고, 이 세균이 생성하는 β -1,3-glucanase의 최적 생성조건을 검토하였다.

재료 및 방법

공시균주

효소 생성용으로 사용된 균주는 토양에서 분리한 strain KF 13이었으며, 효소 생성에 대한 inducer로서의 세포벽 생산을 위하여 *Aspergillus fumigatus* IFO 5840을 계명대학교 미생물학연구실에서 분양받아 사용하였다.

배지

본 실험에 사용한 배지조성은 Table 1과 같다.

*Asp. fumigatus*의 균체 생산용 배지는 상법에 따라 조제한 맥아배지로서 당도 10° Brix, pH 5.5 되게 조절하여 사용하였다.

*Asp. fumigatus*의 세포벽 생산을 위하여 맥아배지 100ml를 500ml 진탕 flask에 분주하여 사면배지로부터 1백금이의 포자를 접종하고 30°C에서 36시간 진탕배양(120 strokes/min)하여 생산된 균체는 7,000rpm(Hitachi 20 PR-52D, Japan)에서 10분간 원심분리하여 집균하

고, 생리 식염수로 2회 세척한 후 0.1M 인산 완충액(pH 7.5)으로 약 20w/v·%되게 균체를 현탁시켜 Sonic-oscillator(Lab-Line, USA)로 120Hz에서 1시간 세포를 파쇄하였다. 이어서 10,000rpm에서 20분간 원심분리한 침전물을 0.1% Tween 80과 EDTA를 함유한 0.1M 인산 완충액으로 1회 세척한 후 12,000rpm에서 40분간 원심분리하여 배지용 세포벽으로 사용하였다(Tanaka 등, 1970).

Yeast autolysate는 시판 압착효모(오뚜기 식품)를 구입하여 멸균수와 등량(w/v) 혼합하고 소량의 toluene을 가하여 55°C에서 3일간 autolysis시킨 후 5,000rpm에서 원심분리하여 그 상등액으로 하였다.

β -1,3-glucanase 생성균의 분리

본 실험에 사용된 토양시료는 대구근교, 마산, 경북대학교 구내 등지에서 채취하였다.

채취된 토양은 Johnson 등의 방법(1960)에 준하여 멸균된 생리 식염수에 50배로 희석하여 30°C에서 30분간 진탕(120 strokes/min)시킨 후 그 상등액을 Table 1의 분리용 배지로 미리 준비한 한천평판에 도말하고 30°C에서 24~72시간 배양하여 Fig. 1과 같이 colony주변에 둥근 환이 나타나는 균을 β -1,3-glucanase 생성균으로 선별하였다. 선별된 균을 다시 회선법으로 순수분리하여 Table 1의 보존용 배지에 접종하고 계대배양하면서 5°C에서 보존하

Table 1. Composition of the media.

Medium for isolation	
Cell wall	1.0%
K ₂ HPO ₄	1.0%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01%
Agar	2.0%
pH 8.0	
Medium for stock culture	
Cell wall	0.5%
Yeast autolysate	2.0% (v/v)
Glucose	0.1%
KH ₂ PO ₄	1.36%
Agar	2.0%
pH 7.5	
Medium for enzyme production	
Cell wall	3.5%
Yeast autolysate	15% (v/v)
MnSO ₄	0.05%
in 0.1M phosphate buffer (pH 7.5)	

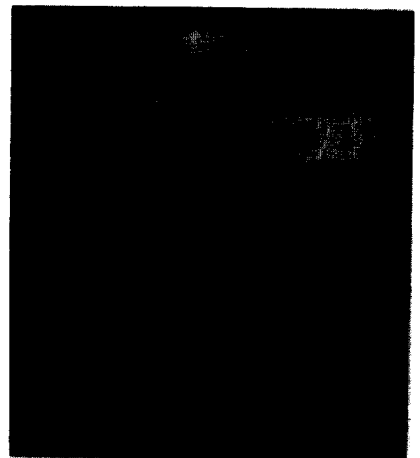


Fig. 1. Growth of the isolated strain KF 13 on agar plate.

였다.

분리용 배지는 곰팡이의 번식을 막고 환을 형성하는 균의 구별을 용이하게 하기 위하여 pH를 8.0으로 조절하였다.

분리균의 동정

분리균은 長谷川의 방법 (1975)에 의하여 형태학적 성질 및 생리학적 성질을 검토한 것을 기초로하여 Palleroni 등 (1970)과 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8판 (Buchanan and Gibbons, 1974)에 따라 분류, 동정하였다.

조효소액의 조제

효소생성을 위하여 효소 생성용 배지 100 ml를 500 ml 진탕 flask에 넣고 한천 사면으로부터 1 백금이의 균을 접종하여 30°C에서 24시간 중균배양한 후, 이 중균배양액 1 ml를 효소 생성용 배지 100 ml를 넣은 500 ml 진탕 flask에 접종하여 30°C에서 72시간 진탕배양하였다.

배양액은 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 제거한 후 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

β -1, 3-glucanase의 활성측정

효소활성은 기질로 사용한 laminarin (Sigma, Code No. L-9634)에서 유리되는 포도당의 량을 3,5-dinitrosalicylic acid 비색법 (Summers and Somers, 1949)으로 측정하였다.

반응액의 조성은 0.1 M succinate buffer (pH 5.8) 1.0 ml, laminarin (6 mg/ml) 0.5 ml, 효소액 0.5 ml로서 45°C에서 5분간 반응시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선에 의하여 포도당의 량으로 환산하였다.

결과 및 고찰

β -1, 3-glucanase 생성균의 분리

경북대학교 구내 토양으로부터 *Asp. fumigatus*의 세포벽을 탄소원으로 이용하여 β -1, 3-glucanase를 유도적으로 생성하는 균을 분리하고, 그 중 효소 생성능이 우수한 1주 (KF 13)를 선별하여 공시균으로 하였다 (Table 2).

β -1, 3-glucanase 생성균의 동정

공시균 (KF 13)의 형태적, 배양적 및 생리적

Table 2. Screened strains producing β -1, 3-glucanase.

Strains	Glucose (μ g/ml)
KF 3-5	35
KF 4-1	30
KF 5-6	39
KF 5-6-2	45
KF 7-8	25
KF 13	67
KF 14-4-1	43
KF 15-2-5	51

The bacteria were cultured in the medium for enzyme production for 72hr at 30°C on the shaker.

특성과 당류 자화성 등의 균학적 성질을 검토한 결과는 Table 3, Table 4와 같으며, 공시균은 간균으로 액체 영양배지에서 생육이 왕성하며, Gram염색 반응에서 음성을 나타내고, 반 운동 배지에서 운동성을 나타내었다.

분리당시의 균은 집락이 투명했으나 계대배양함에 따라 점차 투명도가 사라졌으며, 점성을 나타내는 점, 질산염을 강하게 환원시키고, 전분과 Tween 80은 분해하나 gelatin은 분해하지 못하였고, oxidase와 catalase 양성인 점 등으로 미루어 공시균은 *Pseudomonas stutzeri*, 혹은 유연균으로 동정하였다.

β -1, 3-glucanase의 생성조건

배양온도 및 배양시간의 영향

효소생성에 미치는 배양온도 및 배양시간의 영향을 조사하기 위하여 효소 생성용 배지 100 ml를 500 ml 진탕 flask에 넣고 30°C에서 24시간 중균배양하고, 이 중균배양액 1 ml를 새로

Table 3. Morphological and cultural characteristics of the isolated strain KF 13

Form	rod
Motility	motile
Gram staining	negative
Nutrient broth	not membranous, sediment
Nutrient agar	irregular, flat and auriculate
Koser's citrate agar	no growth
Opt. temperature	35°C
Opt. pH	pH 7.2

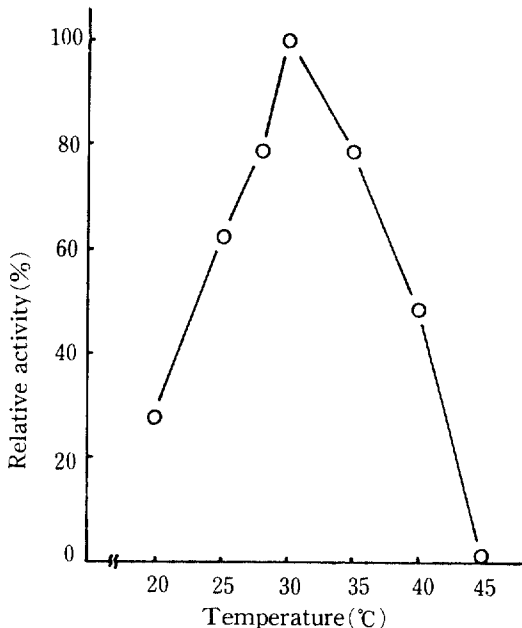
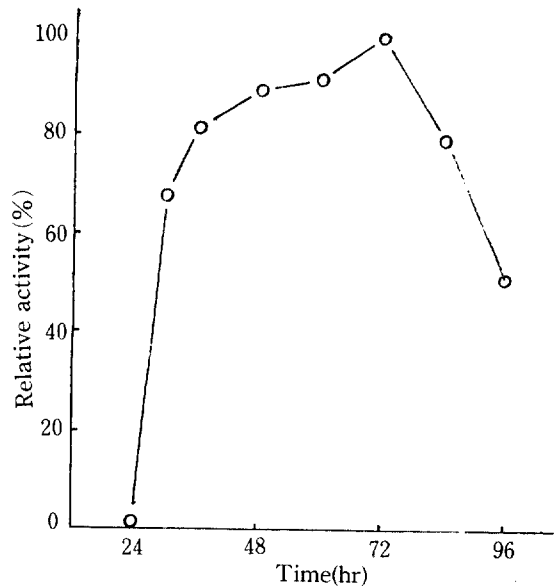
Table 4. Physiological characteristics of the isolated strain KF 13.

Assimilation			
Starch	+	Galactose	-
Dextrin	+	Glucose	+
Mannose	+	Maltose	+
Inositol	-	Xylose	d
Levulose	+	Sucrose	d
Arabinose	d	Raffinose	d
Sorbitol	-	Cellobiose	+
Lactose	-		
Gelatin hydrolysis			-
Starch hydrolysis			+
Tween-80 hydrolysis			+
Nitrate reduction			+
OF-test		oxidative	
MR-test			-
VP-test			-
Indole production			-
Oxidase			+
Catalase			+

+, positive; -, negative; d, weakly utilized.

이 준비한 배지 100ml 에 접종하고 각 온도별, 시간별로 배양하였다.

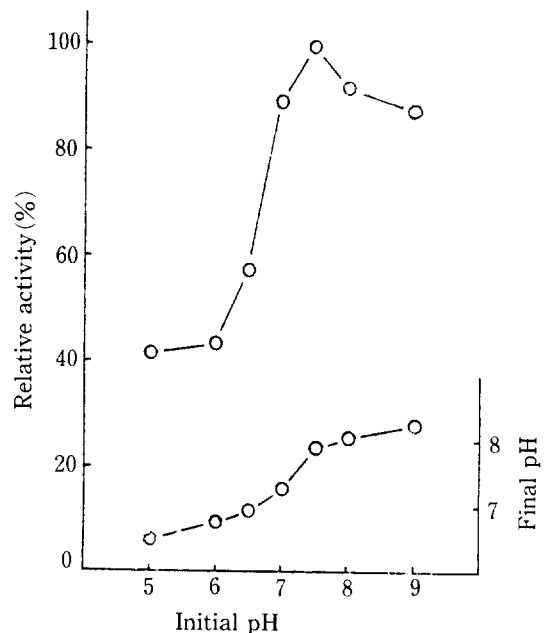
그 결과 30°C 에서 효소생성이 가장 우수하였고, 24시간 진탕배양으로 효소생성이 시작되어

**Fig. 2.** Effect of cultural temperature on the enzyme formation.**Fig. 3.** Time course on the enzyme formation.

배양 72시간만에 효소생성이 최대에 달했으며, 그 이후로는 활성이 급격히 감소하였다 (Fig. 2, 3).

초기 pH의 영향

효소생성에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 0.1M인산 완충액을 pH별로 조제하

**Fig. 4.** Effect of initial pH on the enzyme formation.

여 각기 다른 pH의 완충액에 Table 1에서 명기한 효소 생성용 배지의 조성으로 배지를 조제한 후 증균 배양액 1 ml 를 접종하여 30°C 에서 72시간 배양하였다.

그 결과 배지의 초기 pH가 7.5일때 효소활성이 최대에 달했으며 이때 배양액의 pH는 7.9 였다(Fig. 4).

탄소원의 영향

각종 탄소원이 효소 생성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 5와 같은데, β -1, 3-glucanase는 빵 효모보다 *Asp. fumigatus* 세포벽에 의해 특이적으로 유도됨을 알 수 있고, 그때 *Asp. fumigatus* 세포벽의 최적농도는 3.5% 였다(Fig. 5).

질소원의 영향

효소생성에 미치는 각종 질소원의 영향을 조

Table 5. Effect of various carbon sources on the enzyme formation.

Carbon sources (0.5%)	Glucose (μ g/ml)
Saccharide	
Dextrose	18.0
Maltose	6.5
Inositol	11.0
Xylose	15.0
Cellulose	14.5
CMC*	12.0
Sucrose	7.9
Dextrin	8.0
Soluble starch	4.5
Lactose	8.0
Organic acid	
Malate	1.9
Oxalate	1.0
Succinate	1.5
Phthalate	1.3
Citrate	1.5
Pyruvate	1.5
Alcohol	
Glycerin	2.0
Cell wall**	
Baker's yeast	3.5
<i>A. fumigatus</i>	48.0

*Carboxymethylcellulose, ** 1.0% (w/v).

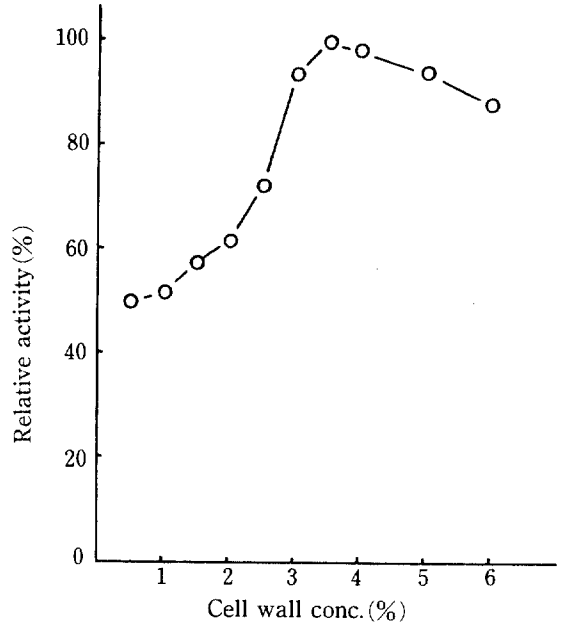


Fig. 5. Effect of concentration of cell wall on the enzyme formation.

사한 결과를 Table 6에 나타내었는데, $NH_4H_2PO_4$ 와 $(NH_4)_2SO_4$ 가 25mM 농도에서 다소의 효과가 있었으나 yeast autolysate에는 미치지 못하였으며, 효소생성이 최대에 달하는 yeast autolysate의 최적농도는 15%였다(Fig. 6).

Table 6. Effect of various nitrogen sources on the enzyme formation.

Nitrogen sources (25mM)	Glucose (μ g/ml)
Inorganic nitrogen	
NH_4Cl	7.0
KNO_3	0.7
$NaNO_3$	1.0
$NH_4H_2PO_4$	11.0
$(NH_4)_2HPO_4$	9.0
$(NH_4)_2SO_4$	13.0
Urea	1.7
Organic nitrogen	
Peptone*	1.0
Yeast extract*	2.3
Yeast autolysate**	38.7

*0.1% (w/v), ** 10% (v/v).

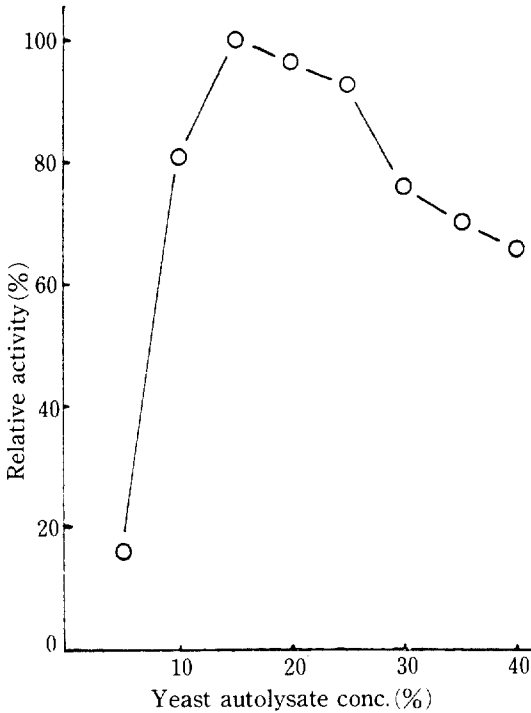


Fig. 6. Effect of concentration of yeast autolysate on the enzyme formation.

금속염의 영향

효소생성에 미치는 각종 금속염의 영향을 조사한 결과는 Table 7 과 같은데, Al³⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Hg²⁺에 의하여 효소생성이 다소 저해되었으며, Mn²⁺에 의하여 특이적으로 효소생성이 촉진되었는데, MnSO₄의 농도가 0.05% 일 때 효소생성이 최대에 달했다(Table 8).

Table 7. Effect of various metallic compounds on the enzyme formation.

Metalic compounds (0.05%)	Glucose (μg/ml)
MnSO ₄	57.2
MnCl ₂	53.5
Ba(OH) ₂ ·8H ₂ O	47.0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	45.0
FeCl ₃ ·6H ₂ O	41.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	40.3
FeCl ₂ ·nH ₂ O	38.6
CaCl ₂ ·nH ₂ O	33.8
Al ₂ (SO ₄) ₃	29.3
ZnCl ₂	23.7
CoCl ₂	10.5
HgCl ₂	1.5
None	48.0

Table 8. Effect of concentration of MnSO₄ on the enzyme formation.

MnSO ₄ (%)	Relative activity (%)
None	100.0
0.001	101.4
0.005	105.5
0.01	113.7
0.03	116.4
0.05	137.0
0.07	90.4
0.1	87.7
0.5	82.2
1.0	30.8

적 요

경북대학교 구내 토양으로부터 *Aspergillus fumigatus*의 세포벽을 탄소원으로 이용하여 β-1, 3-glucanase를 유도적으로 생성하는 균을 분리하고, 그 중 효소생성능이 우수한 1주를 선별하여 형태, 배양 및 생리학적 성질을 검토한 결과 *Pseudomonas stutzeri* KF 13으로 동정하였다. *P. stutzeri* KF 13의 효소생성에 대한 최적조건을 검토한 바, 30°C에서 24시간 진탕배양으로 효소생성이 시작되어 배양 72시간 만에 효소생성이 최대에 달했으며, 배지의 초기 pH가 7.5일 때 최대활성을 나타내었다. 또한 inducer로서의 *Asp. fumigatus* 세포벽의 농도를 3.5%, 질소원으로서 yeast autolysate를 15%, MnSO₄를 0.05% 첨가하여 배양했을 때 효소생성이 최대에 달했다.

참고문헌

1. 長谷川 武治, 1975. 微生物の分類と同定. 学会出版 センター, 203-245.
2. 丸尾文治, 田宮信雄, 1983. 酵素ハンドブック. 朝倉書店, 東京, 495-496.
3. Abd-El-Al, A.T.H. and H.J. Phaff, 1968. Exo-β-glucanases in yeast. *Bio-*

- chem. J.* **109**, 347-360.
4. Abd-El-Al, A.T.H. and H.J. Phaff, 1969. Purification and properties of endo- β -glucanase in the yeast *Hanseniaspora valbyensis*. *Can. J. Microbiol.* **15**, 697-701.
 5. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons, 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (8th ed.). Williams and Wilkins Co., Baltimore.
 6. Clarke, A.E. and B.A. Stone, 1965. β -glucan hydrolase from *Aspergillus niger*. Isolation of a 1,4- β -glucan hydrolase and some properties of the 1,3- β -glucan hydrolase components. *Biochem. J.* **96**, 793-801.
 7. Fleet, G.H. and H.J. Phaff, 1974. Lysis of yeast cell walls. Glucanases from *Bacillus circulans* WL 12. *J. Bacteriol.* **119**, 207-219.
 8. Horikoshi, F., H. Koffler and K. Arima, 1963. Purification and properties of β -1,3-glucanase from the "lytic enzyme" of *Bacillus circulans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **73**, 268-275.
 9. Johnson *et al.*, 1960. *Methods for studying soil microflora plant disease relationships*. Burgess Publishing Co.
 10. Kobayashi, Y., H. Tanaka and N. Ogasawara, 1974. Purification and properties of F-Ia, a β -1,3-glucanase which is highly lytic toward the cell walls of *Piricularia oryzae* P2. *Agr. Biol. Chem.* **38**, 973-978.
 11. Mann, J.W., C.E. Heintz and J.D. Macmillan, 1972. Yeast spheroplasts formed by cell wall degrading enzymes from *Oerskovia* spp. *J. Bacteriol.* **111**, 821-824.
 12. Manners, D.J., A.J. Masson and J.C. Patterson, 1973. The structure of a β -1,3-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem. J.* **135**, 19-30.
 13. Misaki, A., J. Johnson, S. Kirkwood, J. V. Scaletti and F. Smith, 1968. Structure of the cell-wall glucan of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Carbohydr. Res.* **6**, 150-164.
 14. Notario, V., T.G. Villa and J.R. Villanueva, 1976. Purification of an exo- β -glucanase from cell free extracts of *Candida utilis*. *Biochem. J.* **159**, 555-562.
 15. Palleroni, N.J., M. Doudoroff, R.Y. Stanier, R.E. Solanes and M. Mandel, 1970. Taxonomy of the aerobic Pseudomonads: the properties of the *Pseudomonas stutzeri* group. *J. Gen. Microbiol.* **60**, 215-231.
 16. Reese, B.T. and M. Mandels, 1959. β -1,3-glucanase in fungi. *Can. J. Microbiol.* **5**, 173-185.
 17. Skujins, J.J., M.J. Potgieter and M. Alexander, 1965. Dissolution of fungal cell walls by a *Streptomyces* chitinase and β -1,3-glucanase. *Arch. Biochem. Biophys.* **111**, 358-364.
 18. Sumner, J.B. and G.F. Somers, 1949. *Laboratory experiments in biological chemistry*. Academic Press, New York, 38-39.
 19. Tanaka, H. and H.J. Phaff, 1965. Enzymic hydrolysis of yeast cell walls. I. Isolation of wall-decomposing organisms and separation and purification of lytic enzymes. *J. Bacteriol.* **89**, 1570-1580.
 20. Tanaka, H., N. Ogasawara, T. Nakajima and K. Tamari, 1970. Cell walls of *Piricularia oryzae*. I. Selective enzymolysis of *Piricularia oryzae* walls by wall lytic enzymes of *Bacillus circulans* WL 12. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **16**, 39-60.
 21. Tanaka, H., Y. Kobayashi and N. Ogasawara, 1974. Concerted inductions of the multiple β -1,3-glucanases in *Bacillus circulans* WL 12 in response to three different substrates. *Agr. Biol. Chem.* **38**, 967-972.
 22. Whistler, R.L. and C.L. Smart, 1953. *Polysaccharide Chemistry*. Academic Press, New York, 350.

(Received May 21, 1986)