

색소에 접합된 β -glucan을 이용한 β -glucan 분해효소 생산 균주의 분리 및 동정

양진오·정안식·이성택
한국과학기술대학 자연과학부

Isolation and Identification of β -glucan Degrading Enzyme Producing Bacterium Using coloured β -glucan

Yang, Jin-Oh, An-Sik Chung, and Sung-Talk Lee
Department of Biology, Korea Institute of Technology

ABSTRACT: A bacterium K-4-3, producing β -glucan hydrolyzing enzyme, was isolated from soil and identified to be *Bacillus subtilis* by its morphological and physiological characteristics. β -glucan was coloured using cibacron blue 3G-A and cross linked by the addition of 1,4-butanedioldiglycidyl ether. This substrate was used for the isolation of β -glucanase producing microorganism. The β -glucan hydrolyzing enzyme activity from isolated K-4-3 strain was also measured using the modified substrate. *Bacillus subtilis* K-4-3 produced the highest extracellular β -glucan hydrolyzing activity in the basal medium containing β -glucan as a carbon source, peptone and tryptone as a nitrogen source, and magnesium sulfate as an inorganic salt. The optimum temperature and initial pH for β -glucanase production by *Bacillus subtilis* K-4-3 were 37°C and pH6. The highest enzyme activity was obtained at the culture age of 54 hrs with rotary shaking at 37°C. The crude enzyme showed the highest activity at pH 7.5-8.0 and 65°C.

KEY WORDS □ modified β -glucan, β -glucanase, *Bacillus subtilis* K-4-3

β -glucan은 곡류(Warnwright and Forrest, 1977; Luchsinger, 1967; Ducroo and Delecourt, 1972; Kato 등 1981) 그리고 일부 효모나 곰팡이의 세포벽에 존재하는 물질로서(Phaff, 1963; Hori-koshi and Sakaguchi, 1958) glucose가 β -1.4와 β -1.3의 glucoside 결합으로 연결된 hemicel-lulose계의 고분자 탄수화물이다. 이러한 β -glucan은 맥주제조 공정중에 높은 점성도로 인하여 여과과정을 지연시키며 다른 탄수화물과 단백질 등을 둘러싸고 있기 때문에 분해효소의 작용을 방해하여 직접·간접으로 술의 생산에 큰 영향을 미치고 있다(Nazi, 1976) 보통 맥주의 생산에서 β -glucan으로 인한 여과과정의 난점을 *Bacillus subtilis*가 생산하는 endo- β -glucanase(cereflo 200L, Novo Industry)를 사용하여 해결하고 있다.

또한 β -glucanase는 효모의 세포벽을 분해하므로 효모의 spheroplast나 protoplast를 만드는데 이용된다.(Doi and Fukui, 1971; Mann, 등 1972) 일반적으로 곰팡이, 효모, 세균 등 많은 미생물에서(Yamamoto 등 1972; Clarke and Stone, 1965; Huotari 등 1967; Abd-El-Al and Phaff, 1969; Fleet and Phaff, 1974; Tanaka, Phaff, 1965) 발견되고 있는 β -glucanase를 본 연구실에서는 세포융합을 위한 세포벽 분해효소 그리고 산업적으로 이용되는 공업 효소로서의 사용 가능성을 연구하기 위하여 Barnes(1974) 등이 사용한 방법을 수정하여 실험하였다. 보리에서 직접 추출한 β -glucan(Biocon GmbH 제품)에 색소와 Cross linking agent를 결합시킨 기질을 새로운 효소 측정법으로 β -glucanase 생성 균주를 분리 동정하

는 한편 분리된 균주의 효소 생성을 위한 최적 조건을 검토해 보았다.

재료 및 방법

균 주

본 연구에 사용한 균주는 퇴비에서 분리한 *Bacillus* sp. K-4-3로 명명하였다.

시 약

새로운 효소 측정을 위한 색소기질의 제조에는 보리에서 직접 추출한 β -glucan(Biocon GmbH 제품), cibacron blue 3G-A(Hoechst AG 제품), 1,4-butanedioldiglycidyl ether(Aldrich chemicals 제품)를 사용하였으며 배지로 사용한 agar 및 nutrient broth는 Difco 제품을 사용하였고 동정용 시약은 Sigma 제품을 사용하였다.

색소기질 제조

β -glucan 1g을 45ml의 증류수에 녹인 후 1N NaOH 5ml, cibacron blue 3G-A 1.5g을 넣어 잘 저은 다음 1,4-butanedioldiglycidyl ether 1.25ml을 첨가하여 상온에서 48시간 방치시켜 gel 상태로 만들었다. 형성된 gel을 분쇄하여 β -glucan에 접합되지 않고 남은 색소를 증류수로 세척한 후 25mM phosphate buffer(pH 5.3)로 현탁시켜 색소기질 용액을 제조하였다.

β -glucanase 생성 균주의 분리 및 선별

본 실험에 사용된 토양시료는 한국과학기술대학, 동학사 주변의 퇴비, 논두렁 낙엽토, 냇가 주변, 들판에서 지표로부터 5cm 깊이에서 채취하였다. Johnson(1960) 방법에 따라 채취된 토양을 멸균된 생리 식염수 100ml에 현탁시켜 30°C에서 30분간 진탕배양(120 strokes/min) 시킨 다음 상등액을 희석하여 분리용 배지(colored β -glucan 0.2%, peptone 0.5%, beef extract 0.3%, agar 1.5%, pH 6.8)에 도달한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 배지상에 나타난 colony 주변에 직경 10mm 이상의 둥근 환을 만드는 균주를 1차 분리하였다. 1차 분리된 36/149 균주를 효소 생산용 배지(β -glucan 0.2%, peptone 0.5%, beef extract 0.3%, magnesium sulfate 0.02%, pH 6.8)를 사용하여 β -glucanase 생성을 검색, 효소 생성이 특히 우수한 K-4-3 균주를 공시균주로 선별하였다.

공시균주의 동정

공시균주로 사용한 K-4-3의 생리적, 형태적 성질의 검토는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(1986)와 Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria(1980)에 준하였다.

배양방법 및 조효소액 조제

500ml용 진탕 flask에 nutrient broth 200ml을 넣어 37°C에서 18시간 진탕배양(120 strokes/min) 시킨 종균을 효소 생산용 배지 200ml에 2%(v/v)집중하여 진탕배양 하였다. 일정시간 배양한 배양액을 10,000×g(4°C)에서 5분간 원심분리하여 균체를 제거한 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

β -glucanase 활성 측정

Barnes 등(1974)이 사용한 방법을 아래와 같이 수정하여 색소기질을 제조한 후 β -glucanase 활성 측정에 사용하였다. 준비된 색소기질 용액 4ml에 조효소액 0.5ml을 넣어 37°C에서 3분간 반응시켰으며 0.5N NaOH 1ml을 첨가하여 반응을 중지시킨 후 여과지(Whatman No. 1)로 여과한 다음 여과액을 분광분석기 DU-7(Beckman)로 620nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소단위는 효소액 1ml을 1분간 반응 시켰을 때 유리되는 색소 1 μ g을 1단위로 정하였다.

균체량 측정

비탁법: 배양액을 원심분리(10,000×g, 5 min.)하여 얻은 균체를 0.85% 생리 식염수로 씻어낸 후 동량의 생리 식염수에 균체를 현탁, 희석시켜 600nm에서 흡광도를 측정하였다.

건체량: 원심분리하여 얻은 균체를 80°C에서 12시간 이상 건조시킨 무게로 균체량을 측정하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 검색

채취된 토양시료로부터 β -glucanase 생성균의 분리를 행한 결과 Table 1과 같이 총분리균 149 균주중에서 색소기질 분해능이 둥근환의 직경으로 10mm 이상되는 36주를 분리하였다. Fig. 1의 A는 24시간 배양 후 colony 주변에 둥근환을 형성하는 β -glucan 분해균주로 선별된 경우이며 B는

Table 1. Occurrence of *β*-glucanase producing microorganism in soil.

Sample for isolation	No. of colonies on isolation medium	No. of colonies forming clear zone of over 10mm
Fallen leaves	31	19
Ditch of stream	43	5
Compost	22	1
Mud puddle	24	3
Levee, soil	0	0
Rice field, soil	29	8
Total	149	36

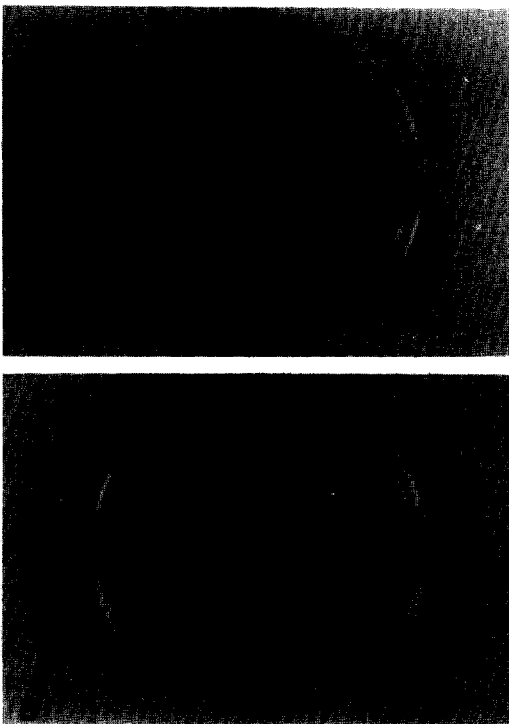


Fig. 1. Comparison of agar plate with and without *β*-glucanase producing colonies.

- A: The formation of clear zone on isolation medium with modified *β*-glucan by *β*-glucanase producing colonies
- B: The growth of microorganism on isolation medium with modified *β*-glucan without enzyme production.

다만 colony만을 형성한 경우로서 색소기질의 첨가로 인하여 *β*-glucanase의 생성유무를 매우 뚜렷하게 판별할 수 있었다. 토양에서 분리된 균 36

주를 효소 생산용 배지에 한 백금이씩 접종하여 37°C에서 48시간 배양하였다. 각 균주의 조효소액을 얻어 색소기질을 이용한 방법으로 *β*-glucanase의 효소 활성을 측정된 결과 동학사 부근 퇴비에서 분리된 균주 K-4-3가 다른 분리 균주에 비해 월등히 우수하였으므로 K-4-3 균주를 본 연구의 공시균으로 선정하였다.

공시균의 동정

분리균 K-4-3의 형태적, 생리적 특성을 검토한 결과 nutrient broth에서 생육이 왕성하였고 Gram 양성, 내열성 포자형성, 막대형의 세균으로서 (Fig. 2) Catalase 양성, Oxidase 음성인 점으로 미루어 *Bacillus* sp.로 판명되었으며 Table 2와 같은 결과로 미루어 보아 공시균은 *Bacillus subtilis*로 잠정적으로 동정하였다.

배양온도와 초기 pH의 영향

Bacillus subtilis K-4-3을 20°C~60°C 사이에서 배양하여 *β*-glucanase의 활성을 측정된 결과 37°C와 40°C에서 각각 최고의 효소 생성과 생육을 나타내었다 (Fig. 3). 초기 pH에 따른 영향을 Fig. 4에서와 같이 pH 4~8 사이에서 검토한 결과 균체의 생육과 *β*-glucanase의 생성은 초기 pH 6에서 가장 높았던 점으로 보아 효소 생성 최적조건은 초기 pH 6 부근임을 알 수 있었다.

배양시간에 따른 영향

Nutrient broth에서 18시간 배양한 공시균주를 효소생산용 배지에 2% (v/v) 되게 접종하여 균체의 생육과 배양시간에 따른 효소의 생성을 비교하였다 (Fig. 5). 이 결과 균체의 생육은 배양시간 18

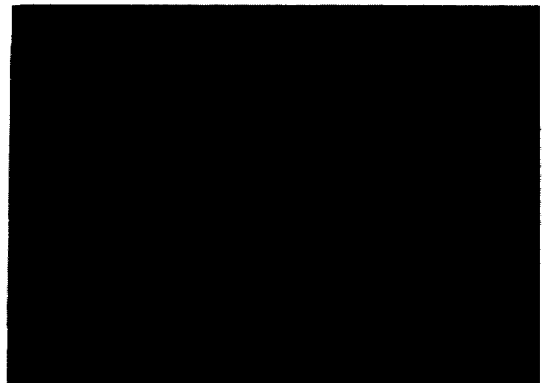


Fig. 2. Photomicrographs of isolates K-4-3 strain grown in nutrient broth.

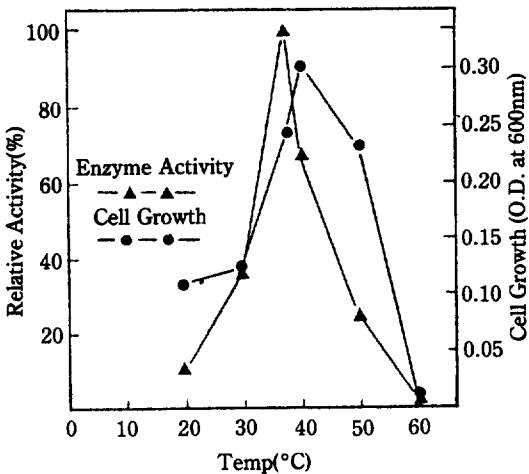
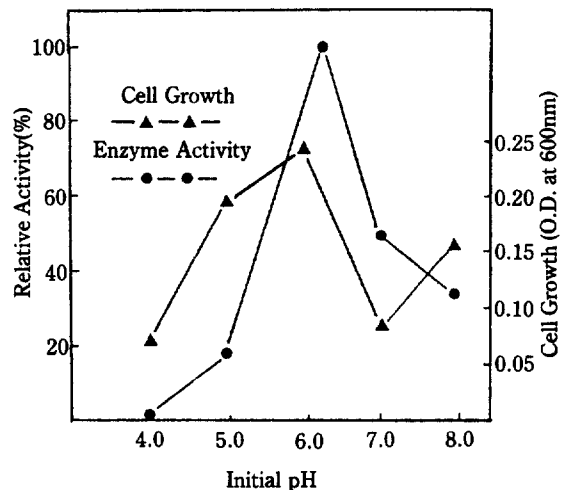
Table 2. Morphological and physiological characteristics of the isolates K-4-3

Shape	Rod	Oxidase	-
Cell size	1 × (3~4) μm	Catalase	+
Gram staining	positive	Voges-proskauer test	+
Spore	endo spore forming	Methyl red test	-
Acid from		Indol production	-
-D(+) glucose	+	Urea test	-
-L(+) arabinose	+	Nitrate reduction	+
-D(+) xylose	+	Egg yolk lecithinase	-
-D(-) mannitol	+		
OF test	F	Anaerobic growth	-
Starch hydrolysis	+	Growth with lysozyme present	+
Gelatin hydrolysis	+		
Casein hydrolysis	+		
Production of hydroxyacetone	+	Growth in sodium chloride	
Deamination of phenylalanine	-	2%	+
		5%	+
		7%	+
		10%	-
Utilization of citrate	+	Growth at pH	
Degradation of tyrosine	-	6.8	+
		5.7	+

+ : positive

- : negative

F : fermentative

**Fig. 3.** Effect of incubation temperature on cell growth and β -glucanase production by isolates K-4-3.**Fig. 4.** Effect of initial pH on cell growth and β -glucanase production by isolates K-4-3.

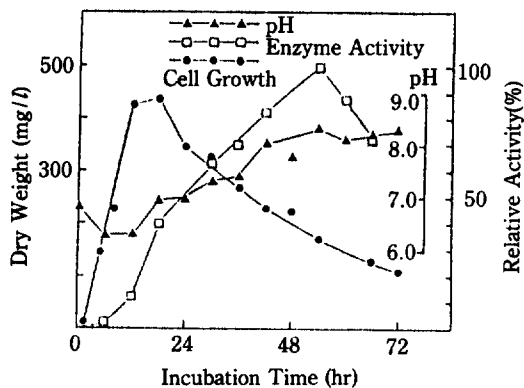


Fig. 5. *β*-glucanase production and growth of *Bacillus subtilis* K-4-3.

시간 전후에서 이미 정지기에 이르렀으며 이에 비해 *β*-glucanase 생성은 균체가 사멸기에 이르렀을 때에도 계속 증가되어 배양 54시간 정도 경과했을 때 최고를 보인뒤 점차 감소하였다. 이와같은 현상은 균체내에 존재하는 효소가 사멸기에 이르러 균체의 자가소화에 의해 방출되기 때문에 효소의 생성이 증가되는 것으로 사려되었다.

탄소원의 영향

각종 탄소원 1%(w/v)을 포함하는 기본배지 (KH₂PO₄ 0.5%, K₂HPO₄ 0.3%, (NH₄)₂HPO₄ 0.1%, KCl 0.01%, CaCl₂·2H₂O 0.02%, pH 6.8)를 사용 *β*-glucanase 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사한 결과 Table 3과 같이 *β*-glucan 이외에는 potato starch, soluble starch 및 galactose, pectin, Na-CMC 순으로 효소 생성을 보인 반면 균이 쉽게 이용할 수 있는 glucose 등에서는 현저한 저해현상을 나타내는 것으로 보아 catabolite repression을 받음을 알 수 있었다. 그러나 *β*-glucan을 첨가하였을 때 가장 높은 효소 생성을 나타내고 있어 K-4-3 균주에 의한 *β*-glucanase 생성은 *β*-glucan에 의해 유도됨을 알 수 있었다.

질소원의 영향

질소원에 따른 *β*-glucanase 생성의 영향을 조사하기 위하여 Table 4와 같이 각종 질소원(무기 질소원 0.1%, 유기질소원 0.5%)을 첨가하여 효소의 생성을 검토하였다. 효소 생성은 거대분자인 casein, skim milk, soybean flour보다 한단계

Table 3. Effects of carbon sources on *β*-glucanase production

Carbon Source	Enzyme Activity(unit/ml)
Soluble <i>β</i> -glucan*	620
Na-CMC *	273
CMC *	176
Chitin *	160
Soluble starch	366
Potato starch	426
Rice starch	256
Pectin *	306
Dextrin	243
Maltotriose	136
Cellobiose	20
Maltose	20
Sucrose	20.3
Lactose	200
Glucose	30
Fructose	13.3
Galactose	320
Xylose	63.3

The concentration of each carbon source was 1% while that of *Na-CMC, CMC, Chitin, Pectin or *β*-glucan was 0.5%

Table 4. Effects of nitrogen sources on *β*-glucanase production

Nitrogen Source	Enzyme Activity(unit/ml)
Ammonium Sulfate	580
Ammonium Chloride	213.3
Ammonium Phosphate	200
Ammonium Nitrate	263.3
Potassium Nitrate	53.3
Sodium Nitrate	63.3
Sodium Nitrite	10
Casein	900
Skim Milk	800
Yeast Extract	850
Peptone	920
Tryptone	960
Soybean Flour	900
Arginine	186.6
Glycine	273.3
Proline	166.6

Table 5. Effect of inorganic salt on β -glucanase production

inorganic salt	Enzyme Activity(unit / ml)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	280
KCl	100
NaCl	126.6
CoCl_2	30
CdCl_2	30
SnCl_2	16.6
$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	566.6
FeSO_4	266.6
ZnSO_4	453.3
MnSO_4	346.6
HgNO_3	13.3
AgNO_3	3.3

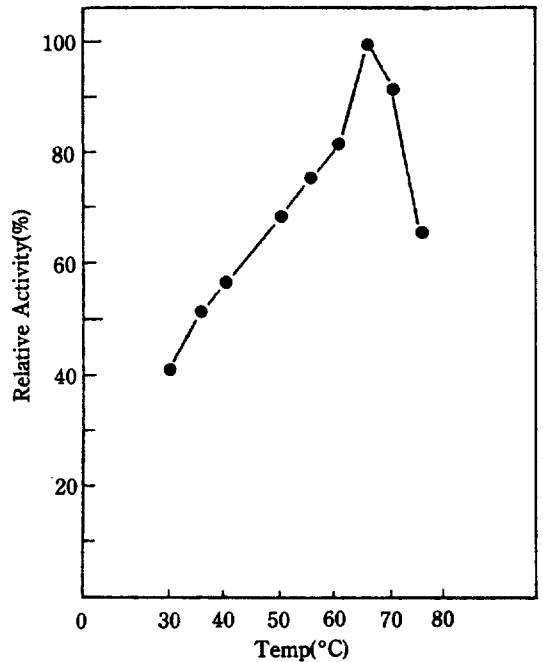
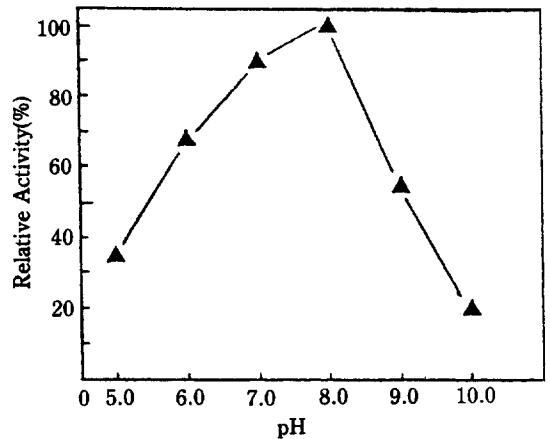
처리과정을 거친 tryptone과 peptone을 질소원으로 사용하였을 경우 효소 생성에 뛰어난 효과를 보였다. 전반적으로 무기질소원보다 유기질소원에 의한 효소 생성이 우수한 편이었으며 세포에 의해 쉽게 흡수될 수 있는 아미노산이 첨가되었을 때 효소 생성이 억제됨을 알 수 있었다.

무기염류의 영향

Starch 1%, pepton 0.5%의 C/N율을 나타내는 배지에 각종 무기염류를 0.02% 첨가하여 효소 생성에 미치는 영향을 검토하였다(Table 5). 효소 생성에 미치는 각종 무기염류의 영향을 조사한 결과 Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Hg^+ 의 중금속염에 의해 효소 생성이 현저하게 저해되었다. 반면 Zn^{2+} , Mn^{2+} 에 의해 높은 효소 생성을 보였으며 특히 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 는 β -glucanase를 효과적으로 생산하는 무기염류임을 확인하였다.

효소 활성에 미치는 온도 및 pH의 영향

효소 생성을 위한 배지에서 얻은 조효소액을 $30^\circ\text{C} \sim 80^\circ\text{C}$ 까지 각 온도에서 3분간 반응시켜 효소 활성을 측정된 결과 $55^\circ\text{C} \sim 70^\circ\text{C}$ 에서 높은 효소 활성을 보였으며 65°C 에서 최적인 내열성 효소임을 알 수 있었다(Fig. 6). 따라서 본 연구결과 *Bacillus* 속으로 동정된 K-4-3 토양 분리균은 앞으로 산업적 응용에 매우 가치있는 균주라고 판단된다. 조효소의 최적 pH 조건을 조사하기 위하여 기

**Fig. 6.** Effect of temperature on extracellular β -glucanase.**Fig. 7.** Effect of pH on extracellular β -glucanase activity.

질용액의 pH 범위를 5~10까지 조절한 후 β -glucanase의 활성을 측정된 결과 Fig. 7과 같이 pH 7.5~8.0 사이에서 최적임을 알 수 있었으며 pH 6.0 이하와 pH 9 이상에서는 급격한 감소를 보였다.

적 요

본 연구에서는 보리에서 직접 추출한 순수한 β -glucan에 색소와 cross-linking agent를 접합시킨 기질을 사용함으로써 쉽고 뚜렷하게 우수한 효소 생성균을 분리할 수 있었으며 그 중 β -glucanase 생성능이 우수한 1주를 선별하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(1986)와 Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria(1980)에 의해 동정한 결과 *Bacillus subtilis*로 잠정적으로 동정하였다. *Bacillus subtilis* K-4-3의 효소 생성에 미치는 배양조건을 실험한 결과 탄소원으로는 β -glucan, 질소원으로는 peptone, tryptone, 무기염류는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 였으며 배양온도는 37°C, 초기 pH6 부근에서 높은 효소 활성을 보였다. 이러한 β -glucanase의 활성은 pH7.5~8.0, 온도 65°C에서 최대 활성을 나타내었다.

REFERENCES

1. 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.
2. 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. *J. Biochem.* **96**, 793-801.
3. Ducroo, P., and R. Delecourt, 1972. Enzymatic hydrolysis of barley β -glucans. *Wall. Lab. Comm.* **35**, 219-228.
4. Doi, K., A. Doi, and T. Fukuyi, 1971. Action of two glucanase produced by *Arthro bacter* in spheroplast formation from bakers' yeast. *J. Biochem.* **70**, 711-714.
5. Huotari, F.J., T.E. Nelson, F. Smith, and S. Kirkwood, 1967. Purification of an exo- β -D (-3) glucanase from *Basidiomycetes* species QM 806. *J. Biol. Chem.* **243**, 952-956.
6. Fleet, G.H., Fleet and H.J. Phaff 1974. Lysis of yeast cell walls: Glucanase from *Bacillus circulans* WL-12. *J. Bacteriol.* **119**, 207-219.
7. Horikoshi, K., and K. Sakaguchi, 1958. Studies on autolysis of *Aspergillus oryzae*. The lytic phenomenon of *Aspergillus oryzae* caused by *Bacillus circulans*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **4**, 1-11.
8. Tanaka, H., and H.J. Phaff, 1965. Enzymatic hydrolysis of yeast cell walls. *J. Bacteriol.* **89**, 1570-1580.
9. John G. Holt. Noel R. Krieg, 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (1st ed.) Williams and Wilkins Co., Baltimore.
10. Jean F. Mac Faddin, 1980. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. (2nd ed.). Williams and Wilkins Co., Baltimore.
11. Kato, Y., K. Iki, and K. Matsuda, 1981. Cell wall polysaccharides of immature barley plants. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 2737-2744.
12. Mann, J.W., C.E. Heintz, and J.D. Macmillan, 1972. Yeast spheroplasts formed by cell wall degrading enzymes from *Derskovia* sp. *J. Bacteriol.* **111**, 821-824.
13. Narziβ, L. 1976. Die Technologie der Malzbereitung, (6. Auflage). F. Enke Verlag Stuttgart.
14. Phaff, H.J., 1963. Cell wall of yeasts. *Ann. Rev. Microbiol.* **17**, 15-30.
15. Yamamoto, S., T. Shiraishi, and S. Nagasaki, 1972. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 1802.
16. Burnes, W.C., and A.B. Blakeney. Rydal-mere, 1974. Determination of cereal α -amylase using a commercially available dye-labeled substrate. *Die Starke.* **26**, 193-197.
17. Wainwright, T., and I.S. Forrest, 1977. The mode of β -glucan pentosans in barley endosperm cell walls. *J. Inst. Brew.* **83**, 279-286.

(Received Oct. 19, 1987)