

## 색소기질을 이용한 *Bacillus subtilis*의 $\beta$ -glucanase 정제

이성택·양진오·정안식  
한국과학기술대학 자연과학부

### Purification of $\beta$ -glucanase from *Bacillus subtilis* Using Chromogenic Substrate

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

**ABSTRACT:** *Bacillus subtilis* K-4-3, which produces considerable amount of  $\beta$ -glucanase was selected among extracellular  $\beta$ -glucanase-producing bacteria isolated from soil.  $\beta$ -glucanase was purified by ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-100 gel filtration and DEAE-sephacel ion exchange chromatography. The purified enzyme revealed a single band by polyacrylamide gel electrophoresis and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Its molecular weight was estimated to be 17000 dalton by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The optimum pH and temperature of the purified  $\beta$ -glucanase were 7.0 and 50°C, respectively. The enzyme was strongly inhibited by 1.0 mM of  $Fe^{3+}$ ; and activated by 1.0 mM of  $Li^{4+}$ . The absence of glucose after thin layer chromatography of reaction products revealed that the purified enzyme contains no cellobiase or laminarinbiase activity. The liberation of di, tri- and tetra-saccharide as reaction products can be explained by endoaction of the enzyme.

**KEY WORDS** □ *Bacillus subtilis* K-4-3,  $\beta$ -glucanase, chromogenic substrate

보리 등 곡류 그리고 일부 효모의 세포벽 구성물질의 하나인  $\beta$ -glucan을 분해하는 효소원으로 지금까지 알려진 것은 보리, 밀 (Bamforth and Martin, 1981; Woodward 등, 1982; Forrest and Wainwright, 1977) 그리고 세균으로서 *Bacillus*속 (Moscatelli 등, 1961) 곰팡이류로서는 *Aspergillus*속 등이 있다 (Ducro and Delecourt, 1972). 이러한  $\beta$ -glucan 분해효소는 맥주제조시 높은 점성으로 인한 여과과정의 난점을 해결하는데 이용되며 (Narzim, 1976) 세포벽 용해, spheroplast나 proptoplast 생성에도 관여한다고 알려져 있다 (Peberdy, 1979).  $\beta$ -glucan과 화학구조에서 유사한 기질인 cellulose, laminarin 등을 분해하는 효소에 관해서는 endo- $\beta$ -1, 4-glucanase (1, 4- $\beta$ -glucan 4-glucanohydrolase, E.C. 3.2.1.

4) 그리고 endo- $\beta$ -1, 3-glucanase (1, 3- $\beta$ -glucan glucanohydrolase, E.C. 3.2.1.39)가 주로 생성되고 있으며 (Yammamoto 등, 1981) 미생물의 경우에는 곰팡이, 효모, 세균 등에서 주로 -1, 3-glucanase ( $\beta$ -1, 3-glucan glucanohydrolase, E.C. 3.2.1.6)가 생산되고 있다 (Clarke and Stone, 1965; Cenamor 등, 1987; Kobayashi 등, 1974).

본 연구는  $\beta$ -glucanase의 산업적 이용 이외에도  $\beta$ -glucanase 특성과 이와 유사한 효소와의 기질특이성 및 세포융합 등에 관한 학문적 연구의 바탕을 마련함을 궁극의 목적으로 하고 있다. 이를 위하여 본보에서는 보리에서 추출된 순수한  $\beta$ -glucan에 색소와 가교제를 결합시킨 기질을 사용하여 공시균주인 *Bacillus subtilis* K-4-3가 생산하는 특이적이며 간편한 효소의 정제를 시도하

였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

본 실험에 사용된 균주는 전보(Yang 등, 1987)에서 분리·동정한 *Bacillus subtilis* K-4-3을 사용하였다.

### 시약

Sephadex G-100과 DEAE sephacel은 Pharmacia Fine Chemical Co.에서 구입하였고 protein molecular weight marker, bovine serum albumin, acrylamide, N, N'-methylene bisacrylamide, N, N, N', N'-tetramethylen diamine(TEMED) 등은 SIGMA Chemical Co.에서 구입하였다. 배지에 필요한 시약은 Difco제를 사용하였으며, 그외 시약은 시판 특급품을 사용하였다.

### 배양방법 및 조효소액 조제

500 ml용 진탕 flask에 nutrient broth 200 ml을 넣어 살균 후 37°C에서 18시간 진탕배양(120 strokes/min)하였다. 5l용 발효조(Shin Young Co)에 효소생산용 배지(peptone 0.5%, beef extract 0.3%, soluble starch 0.5%, magnesium sulfate 0.02%)를 멸균한 뒤 종균 배양액을 10% 접종하여 배양온도 37°C, 배지의 pH(upper pH 7.0, Lower pH 6.5), 통기량 0.5l/min, 교반속도 150 rpm으로하여 배양중 일정한 발효조 작동조건을 유지하였다. 일정시간 배양한 배양액을 10,000×g(4°C)에서 5분간 원심분리하여 균체를 제거한 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

### 색소기질제조

전보(Lee, 1988)에서 기술한 바와 같이  $\beta$ -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  $\beta$ -glucan에 접합되지 않고 남은 색소를 증류수로 세척한 후 25mM phosphate buffer(pH 5.3)로

현탁시켜 색소기질을 제조하였다.

### 효소활성 측정

$\beta$ -glucanase의 활성은 준비된 색소기질용액 4 ml에 효소액 0.5 ml을 넣어 37°C에서 일정시간 반응시켰으며 0.5N NaOH 1 ml을 가하여 반응을 중지시킨 후 여과지(whatman No. 1)로 여과한 다음 여과액을 분광분석기 DU-7(Beckman)로 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성의 단위는 효소액 1 ml을 1분간 반응시켰을 때 유리되는 색소 1  $\mu$ g을 1 unit로 정하였다.

### 단백질 정량

Bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry 등(1957)의 방법으로 정량하였고 column에서 분리 용출한 각 분획단백질의 상대적인 양은 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정하였다.

### 전기영동

Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)는 Davis(1964)의 방법에 따라 12.5% acrylamide 농도를 실시하였고 분자량 측정을 위한 SDS-PAGE는 9%의 acrylamide 농도로 Weber and Osborn(1969)의 방법에 따라 표준단백질의 상대적 이동도와 대수값의 표준직선을 작성하고 이직선을 이용하여 효소분자량을 산출하였다.

### 균체량 측정

배양액을 10,000×g(4°C)에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 제거하고 얻은 균체를 0.95% 생리 식염수로 씻어내고 동량의 식염수를 균체에 현탁·희석시켜 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 효소분해산물의 thin layer chromatography (TLC)

정제된 효소를 색소기질과 반응시켜 끓는 물에서 10분간 중탕시켜 반응을 정지시켰다. 그리고 반응물을 Sil G60 TLC plate(20×20 cm, 0.25 mm thickness)위에 spotting하여 dichloromethane : acetic acid : methanol : water(50 : 25 : 15 : 10) 전개용매로 전개한 다음 발색제로 2g diphenylamin, 2ml aniline 그리고 10ml의 85% phosphoric acid를 methanol로 100 ml를 채워 분무시켜 열을 가하여 발색시키고 표준당용액의 Rf값과 비교하여 분해된 당류를 확인하였다.

### 결과 및 고찰

#### 발효조를 이용한 효소생산 및 균체증식의 경시적 변화

효소생산을 증가시키기 위하여 일정한 발효조 작동조건을 유지하고 균체의 증식과 배양시간에 따른 효소의 생산을 조사하였다(Fig. 1). 발효조에서 균체의 증식은 배양 15시간 이후부터 급격한 증식을 보여 21시간 전후에서 최대증식을 나타내었으며 그 후에는 감소하였다.  $\beta$ -glucanase 생산은 균체의 증식과 더불어 생성되기 시작하여 균체가 감소하는 시기인 배양 27시간을 전후로하여 최대의 효소생산을 보였다.

한편 배양기간중  $\beta$ -glucanase 생산을 높이기 위하여 배양액의 pH를 조절(Lower pH 6.5, Upper pH 7.0)한 결과 전보(Yang 등, 1987)에서와 같이 배양중에 pH를 조절하지 않았던 플라스크내의 배양보다 배양시간을 반으로 단축하였고 높은 역가의 조효소액을 얻을 수 있었다.

#### 효소정제

발효조에서 얻은 배양액에서 균체를 제거한 상등액 1600 ml를 균체의 조효소액으로 사용하였고 0~5°C의 저온조건에서 효소를 정제하였다.

**Ammonium sulfate fractionation**: 균체를 제거한 상등액 1600 ml에 ammonium sulfate를 30~90% 포화시킨 후 원심분리(10,000×g, 20 min)하여 상등액을 버리고 침전물을 20 mM phosphate buffer(pH 6.5) 25 ml에 용해시킨 다음 50배량의 같은 완충용액에 하룻밤 투석하였다.

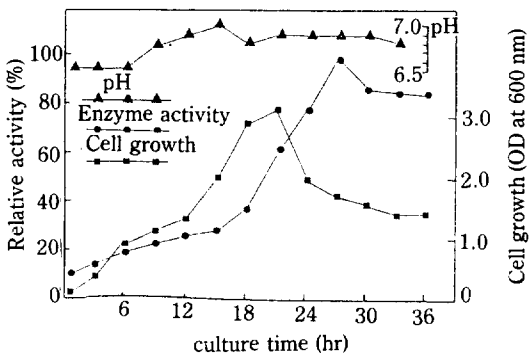


Fig. 1.  $\beta$ -glucanase production and cell growth during cultivation of *Bacillus subtilis* K-4-3.

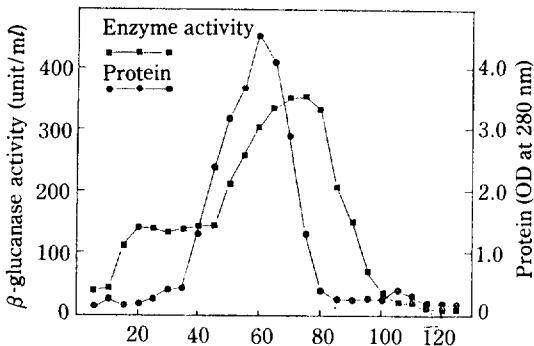


Fig. 2. Elution pattern of  $\beta$ -glucanase on a Sephadex G-100.

Fractions (3 ml per tube) were collected at a flow rate of 15 ml per hr. The fractions from No. 45 to No. 75 were pooled.

이 결과로 비활성 13 unit/mg이었던 상등액이 39.2 unit/mg인 효소액이 되었으며 이때 효소의 회수율은 14.7%이었다.

**Sephadex G-100 gel filtration**: 투석한 효소액을 Sephadex G-100 column(2.6×100 cm)에 주입하고 20 mM phosphate buffer(pH 6.5)를 사용하여 유속 15 ml/hr로 3 ml씩 분획하여 gel 여과를 하였다(Fig. 2).

Gel 여과한 효소용출액의  $\beta$ -glucanase 비활성은 140 unit/mg이었고 회수율은 5.1%이었다.

**DEAE-Sephacel ion exchange chromatography**: Gel 여과에서 얻은 효소액 75 ml를 ultrafiltration 과정으로 농축시켜 미리 20 mM phosphate buffer(pH 6.5)로 평형시킨 DEAE-Sephacel column(1.6×15 cm)에 흡착시켰다. 같은 완충용액 100 ml로 column을 세척한 후 동일한 완충용액 100 ml과 0.3 M NaCl를 함유한 같은 완충용액 100 ml과의 linear gradient로 용출시켰다(Fig. 3).

20 ml/hr 유속에서 4 ml씩 분획하여  $\beta$ -glucanase 활성이 있는 용출액을 25 ml를 얻었다. 효소용출액의 비활성은 205.7 unit/mg이었고 회수율은 4.2%이었다.

이상의 각 정제과정의 결과를 표 1에 요약하였으며 정제공정을 거쳐서 얻은 정제  $\beta$ -glucanase는 Fig. 4와 같이 disc polyacamide gel electrophoresis에서 단일 band를 나타냄으로 정제되었음

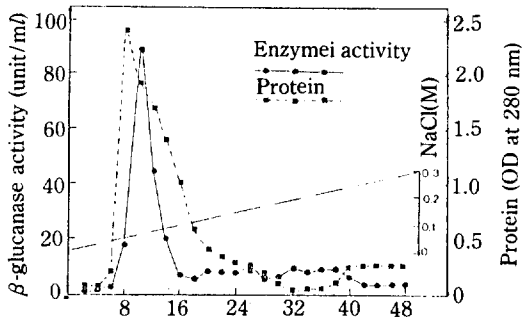


Fig. 3. DEAE-Sephacel ion exchange chromatography of  $\beta$ -glucanase.

Fractions (4 ml per tube) were collected at a flow rate of 20 ml per hr. The fractions from No. 8 to No. 14 were collected.

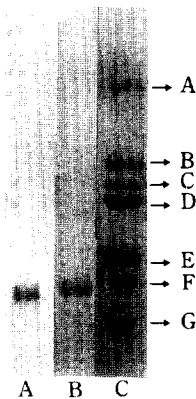


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of  $\beta$ -glucanase in absence (lane A) or presence (lane B and C) of sodium dodecyl sulfate

Lane A and B are the purified  $\beta$ -glucanase. Lane C is the standard proteins.

- A ; Albumin, Bovine (M.W 6,000)
- B ; Albumin, Egg (M.W 45,000)
- C ; Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (M.W 36,000)
- D ; Carboric Anhydrase (M.W 29,000)
- E ; Trypsinogen (M.W 24,000)
- F ; Trysin Inhibitor (M.W 20,100)
- G ;  $\alpha$ -Lactalbumin (M.W 14,200)

을 확인할 수 있었다.

**정제효소의 일반적 성질**

앞에서와 같은 과정에 의해 정제된 균체의  $\beta$ -glucanase 중 효소활성이 높았던 DEAE-Sephacel column에서 용출된 효소액을 사용하여 정제효소의 일반적 특성을 검토하였다.

**효소의 열안정성 :** 효소를 0°C에서 80°C까지 각 온도에서 30분간 유지시킨 후 37°C에서 3분간 반응시켜 잔존활성을 측정하였다(Fig. 5). 실험결과 본 효소는 50°C부근까지는 대체로 안정하였으나 그 이상의 온도에서는 급격히 실활되었다.

**효소활성의 최적 pH의 최적온도 :** 본 효소에 대한 pH의 영향을 조사하기 위하여 원충용액을 pH

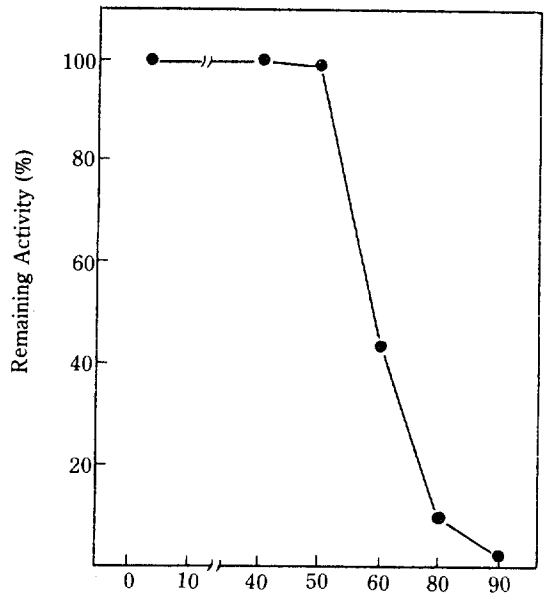
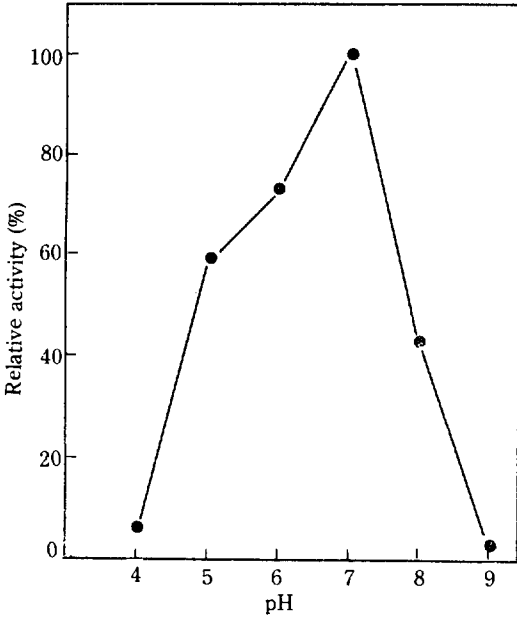


Fig. 5. Effect of temperature on the stability of  $\beta$ -glucanase.

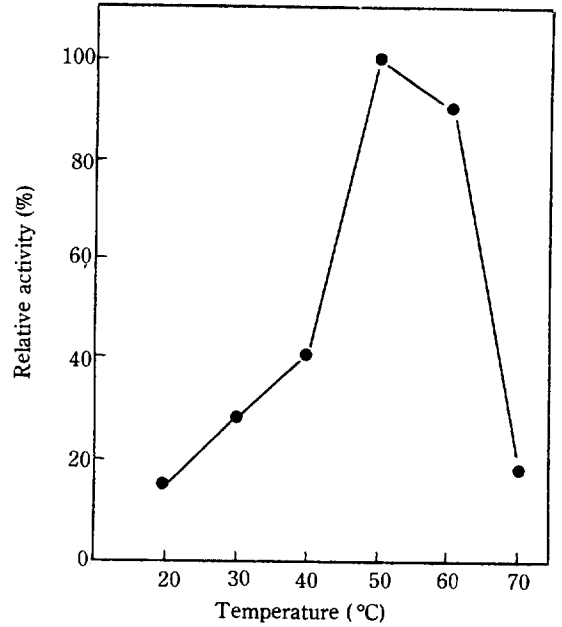
The remaining activity was assayed at 37°C under standard assay condition after the enzyme had been preincubated for 30 min. at various temperature.

Table 1. Purification of  $\beta$ -glucanase from *Bacillus subtilis* K-4-3

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Fold of purification
Culture supernatant	26,720	346,720	13	100	1
Ammonium sulfate (30-90%)	1,300	51,000	39.2	14.7	3
Sephadex G-100	127.5	17,850	140	5.1	10.8
DEAE-Sephacel	70	14,400	205.7	4.2	15.8



**Fig. 6.** Effect of pH on the *β*-glucanase activity. Buffers used were 50mM citrate buffer for pH 4.0 to 5.8, 50mM phosphate buffer for pH 5.8 to 8.0, and 50mM Tris-HCl buffer for pH 8.0 to 9.0



**Fig. 7.** Effect of temperature on the *β*-glucanase activity.

4.0에서 pH9.0까지 조정하여 *β*-glucanase 활성을 측정 한 결과는 Fig. 6와 같다.

본 효소는 pH6.0과 7.0사이에서 높은 효소활성을 나타내었으며 최적 pH는 7.0부근임을 알 수 있었다. 효소활성의 최적온도를 검토한 결과(Fig. 7) 50°C까지는 온도의 상승에 따라 효소의 활성도는 증가하였으나 그 이상의 온도에서는 감소하여 60°C 이상에서는 효소활성이 급격히 실패되었다.

**금속이온의 영향:** 여러가지 금속이온을 1.0 mM 첨가했을 때 금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 검토한 결과 본 효소는 Mg<sup>2+</sup>에 의해서는 거의 영향을 받지 않았으며 Fe<sup>3+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Sn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 등의 몇가지 금속이온에 의해서는 저해를 받았고 Li<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> 등에 의해서는 약간 활성화되었다(Table 2).

**분자량 결정:** DEAE-Sephacel ion exchange chromatography에 의해서 정제된 *β*-glucanase의 분자량은 분자량이 잘 알려진 몇가지 표준단백질을 사용하여 SDS PAGE 전기영동으로 측정하였다. Fig. 4에서와 같이 PAGE 및 SDS PAGE에서 단일 단백질 band를 나타내어 순도를 확인하

**Table 2.** Effect of metal ion on the *β*-glucanase activity

Metalic compounds (mM)	Relative activity (%)
LiCl	116
CdCl <sub>2</sub>	89
CoCl <sub>2</sub>	114
SnCl <sub>2</sub>	75
KCl	108
NaCl	111
FeCl	33
MgSO <sub>4</sub>	103
ZnSO <sub>4</sub>	111
CaSO <sub>4</sub>	89
CuSO <sub>4</sub>	78
MnSO <sub>4</sub>	89
AgNO <sub>3</sub>	44
None	100

였으며 그 분자량은 17,000으로 추정되었다.

**TLC:** 4 ml의 *β*-glucan이 정제된 *β*-glucanase 0.5ml를 37°C에서 반응시켜 TLC에 의해서 시간에 따른 분해산물을 조사하였다. Fig. 8에서와 같이 12시간의 반응후 2탄당으로 추정되는 분해산물이 나타나기 시작하였다. 또한

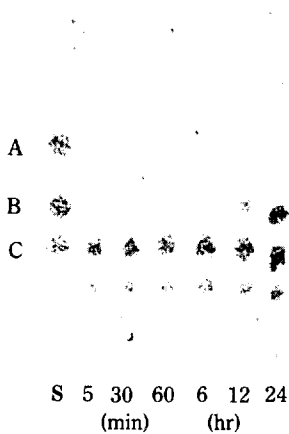


Fig. 8. Thin-layer chromatogram of  $\beta$ -glucan hydrolyzates.

S; standard mixture; A, Glucose; B, cellobiose + Laminarinbiose; C, maltotriose

## 적 요

토양에서 분리 동정한 *Bacillus subtilis* K-4-3를  $\beta$ -glucanase 생산을 위하여 발효조를 사용한 결과 flask내 배양보다 배양 시간을 단축하였고 높은 역가의 조효소액을 얻을 수 있었다. 배양여액으로부터 균체의  $\beta$ -glucanase는 색소에 결합된 변형기질을 이용하여 ammonium sulfate, fractionation Sephadex G-100 gel filtration, DEAE-Sphacel ion exchange chromatography의 순으로 정제하였으며, 정제효소는 15배로 정제되어 비활성이 25.7 unit/mg이었으며, 수율은 4.2%이었다. 본 효소의 일반적 특성을 검토한 결과 정제효소는 50°C에서 최적반응을 나타내었고 그 활성은 50°C에서 30분간 열처리에도 안정하였다. 효소의 최적 pH는 7.0 부근이었고 금속이온의 영향으로는  $Fe^{3+}$ 에 의해 강하게 저해받았고  $Li^+$ 에 의해 약간 활성화되었다. 분자량은 SDS 전기영동에 의해 17,000으로 추정되었으며 monomer였다. 또한 본 효소에 의한 분해산물을 TLC로 관찰한 결과 2탄당, 3탄당 및 4탄당으로 추정되는 분해산물을 얻을 수 있었으나 최종산물인 glucose는 얻을 수 없었다.

## REFERENCES

- Bamforth, C.W. and H.L. Martin, 1983. The degradation of  $\beta$ -glucan during malting and mashing; The role of  $\beta$ -glucanase. *J. Inst. Brew.* **89**, 303-307.
- Clarke, A.E. and B.A. Stone, 1965.  $\beta$ -glucanhydrolase from *Aspergillus niger*. Isolation of a 1,4- $\beta$ -glucanhydrolase and some properties of the 1,3- $\beta$ -glucanhydrolase components. *Biochem. J.* **96**, 793-801.
- Cenamor, R., M. Molina, J. Galdona, M. Sanchez and C. Nombela, 1987. Production and secretion of *Saccharomyces cerevisiae*  $\beta$ -glucanase; Difference between protoplast and periplasmic enzymes. *J. General. Microbiol.* **113**, 619-628.
- Davis, B.J., 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
- Ducro, P., and R. Delecourt, 1972. Enzymatic hydrolysis of barley  $\beta$ -glucan, wallerstein Laboratory communications vol XXXV, 1118.
- Forrest, I.S., and T. Wainwright, 1977. The mode of binding of  $\beta$ -glucans and pentosan in barley endosperm cell wall. *J. Inst. Brew.* **83**, 279-286.
- Kobayashi, Y., H. Tanaka and N. Ogasawara, 1974. Multiple  $\beta$ -1,3 glucanase in the lytic enzyme complex of *Bacillus circulans* WL-12. *Agr. Biol. Chem.* **38**, 959-965.

8. Lee, S.-T., 1988. A new coloured substrate for the determination of  $\beta$ -glucan degrading enzyme from malt and *Bacillus subtilis* K-4-3. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**, 79-84.
9. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough., A.L. Farr, and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
10. Mann, J.W., C.E. Heintz and J.D. Macmillan, 1972. Yeast spheroplasts formed by cell wall degrading enzymes from *Oerskovia* sp. *J. Bacteriol.* **111**, 821-824.
11. Moscatelli, E.A., Ham, E.A and E.L. Rickes, 1961. Enzymatic properties of a  $\beta$ -glucan from *Bacillus subtilis*. *The J. of Biol. Chem.* **236**, 2858-2862.
12. Narziß, L., 1976. Die Technologie der Malzbereitung, (6. Auflage). F. Enke Verlag Stuttgart.
13. Peberdy, J.F. 1979. Fungal protoplast; Isolation, reversion and fusion. *Annu. Rev. Microbiol.* **33**: 21-39.
14. Weber, K and M. Osborn, 1969. The reliability of molecular weight determinations by dedocyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.
15. Woodward, J.R., F.J. Morgan and G.B. Fincher, 1982. Amino acid sequence homology in two 1,3: 1,4- $\beta$ -glucan endohydrolases from germination barley. *Febs Letters.* **132**, 198-200.
16. Yamamoto, S., H. Mori and S. Nagasaki, 1981. Action pattern and active site of endo  $\beta$ -1,3-glucanase IV from *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae* FA-5. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 2695-2703.
17. Yang, J.-O., A.-S. Chung, and S.-T. Lee, 1987. Isolation and identification of  $\beta$ -glucan degrading enzyme producing bacterium using coloured  $\beta$ -glucan. *Kor. J. Microbiol.* **25**, 339-345.

(Received July 14, 1988)