

## 맥아와 *Bacillus subtilis* K-4-3의 $\beta$ -Glucan 분해 효소측정을 위한 새로운 색소기질

이성택

한국과학기술대학 자연과학부

### A New Coloured Substrate for the Determination of $\beta$ -Glucan Degrading Enzyme from Malt and *Bacillus subtilis* K-4-3

Lee, Sung-Taik

Department of Biology, Korea Institute of Technology, Taejon 302-338, Korea

Dye materials and cross linking agents were used for the determination of  $\beta$ -glucanase activities. The objective of this study was to prepare the blue coloured substrates which are sensitive, specific and simple for the determination of  $\beta$ -glucanase in malt and *Bacillus subtilis* K-4-3 enzymes. This method is based on the principle of measuring colorimetrically the split product of coloured and cross linked substrate. The best coupling of dye stuff of  $\beta$ -glucan was cibacron blue 3G-A and the colour released can suitably be measured at 623nm. Optimal concentration of dye and cross linking agents was 1.5g and 1.25ml under 0.1N NaOH. The sensitivity comparison proved that the stained  $\beta$ -glucan method is much more sensitive than the DNS method to determine reducing sugar released by the enzyme.

$\beta$ -Glucan은 밀, 보리 등의 곡류와 효모 등 미생물의 세포벽에 존재하는 물질로써 glucose가  $\beta$ -1, 4와  $\beta$ -1, 3의 glucoside 결합으로 연결된 고분자 탄수화물이다(1). 이러한  $\beta$ -glucan은 맥주제조 공정중에 높은 점성도로 인하여 여과과정을 지연시키며 다른 탄수화물과 단백질로 둘러싸고 있기 때문에 직접·간접으로 술의 품질과 안정성에 큰 영향을 미치고 있다(2).  $\beta$ -Glucan은 endo 및 exo- $\beta$ -glucanase에 의해 cellobiose, laminaribiose 및 포도당으로 분해되는 것으로 알려져있다(3, 4). 이중 endo형 효소는 점성도의 저하에 직접 영향을 미치므로 산업적으로 큰 관심의 대상이 되고있다.  $\beta$ -Glucan의 분해를 위해서는 미생물효소와 맥아자체내의 효소를 이용하고 있다. 지금까지 endo- $\beta$ -glucanase의 활성도 측정에 주로 사용한 점성도 측정방법이나 dinitrosalicylate (DNS) 방법은 예민하지 않거나 부정확하며 복잡하다는 단점이 있다.

미생물효소나 맥아효소의 생산을 위하여 적당한 균주, 맥아종류의 선택 및 효소 생산과정과 정제과

정의 연구에서 우선 중요한 것은 정확한 효소활성 측정방법이라 할 수 있다. Klein 등이  $\alpha$ -amylase의 활성도 측정에 색소와 접합된 전분을 변형된 기질로 사용하였으므로(5-10) 본 연구는 전분의 색소접합원리를  $\beta$ -glucan에 응용하여 간편하고 특이적인 효소 활성도 측정방법을 개발하기 위하여 시도하였다. 따라서  $\beta$ -glucan에 색소와 가교제(1,4-butandioldiglycidyl ether)를 접합시킨 기질을 제조하기 위한 최적조건을 조사하는 한편 맥아와 세균에서 각각 추출한 효소를 이용하여 새로운 기질로서의 사용가능성을 검토하였다.

#### 재료 및 방법

##### 시 약

$\beta$ -Glucan은 Novo Industry (Copenhagen, Denmark) 및 Biocon GmbH 제품(Kolbermoor, W. Germany)를, 색소로서 Cibacron blue 3G-A는 Ciba Geigy 제품(Basel, Switzerland)를 가교제(Cross lin-

king agent)로서 1,4-butanedioldiglycidyl ether는 Aldrich Chemical(St. Louis U.S.A.)제품을 각각 사용하였다.

**색소기질의 제조**

1.0g의  $\beta$ -glucan을 증류수에 녹인 후 NaOH용액을 가하여 50 ml의 0.1 N NaOH용액을 조제하였다. 계속하여 1.5g cibacron blue 3G-A와 1.25 ml 1,4-butanedioldiglycidyl ether를 첨가하여 겔상태로 만들었다. 겔현탁액을 끓여  $\beta$ -glucan에 접합되지 않은 색소는 증류수로 세척하여 제거하였다. 위와같은 방법으로 제조한 색소접합기질은 반고체 상태로 간헐멸균하여 사용하였다.  $\beta$ -Glucan에 색소와 가교제의 접합원리는 Fig.1과 같다.

$\beta$ -Glucan은 알칼리조건에서 색소와 가교제는 ether 결합을 하게 된다. 가교제를 사용하여  $\beta$ -glucan이 물에 녹지않는 상태로 됨으로써  $\beta$ -glucan에 접합되지 않고 남은 색소를 제거시킬 수 있었으며 endo-형 효소에 특이한 기질을 제조하였다.

**효소액 조제**

효소원은 맥아와 토양에서 분리한 *Bacillus subtilis* K-4-3(11) 균주를 사용하였다. 맥아 효소액은 20g의 맥아분말을 100 ml의 증류수에 넣고 교반한 후 3000 rpm, 3분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였으며, 세균의 효소액은 *Bacillus subtilis* K-4-3 종균을 효소생상용 배지에 2%(v/v) 접종하여 일정시간 진탕배양한 배양액을 10,000×g (4°C) 5분간 원심분리하여 균체를 제거한 상등액을 조효소액으로 사용하였다(11).

**효소활성 측정**

변형된  $\beta$ -glucan을 25 mM Spørensen 완충액(pH 5.3)에 현탁시켜 0.4% 기질용액을 만든 후 3.8 ml를 취하여 조효소액 0.2 ml넣고 37°C에서 3분간 반응시켰다. 0.5 N NaOH 1 ml를 가하여 반응을 중지시킨 후 여과지(whatman No.1)로 여과한 다음 여과액을 분광분석기(DU-7 Beckman)로 623 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분해산물을 색소방법과 비교하기 위한 DNS방법은 Miller(12)의 방법에 준하였으며, 0.5%  $\beta$ -glucan용액 0.8 ml과 조효소액 0.2

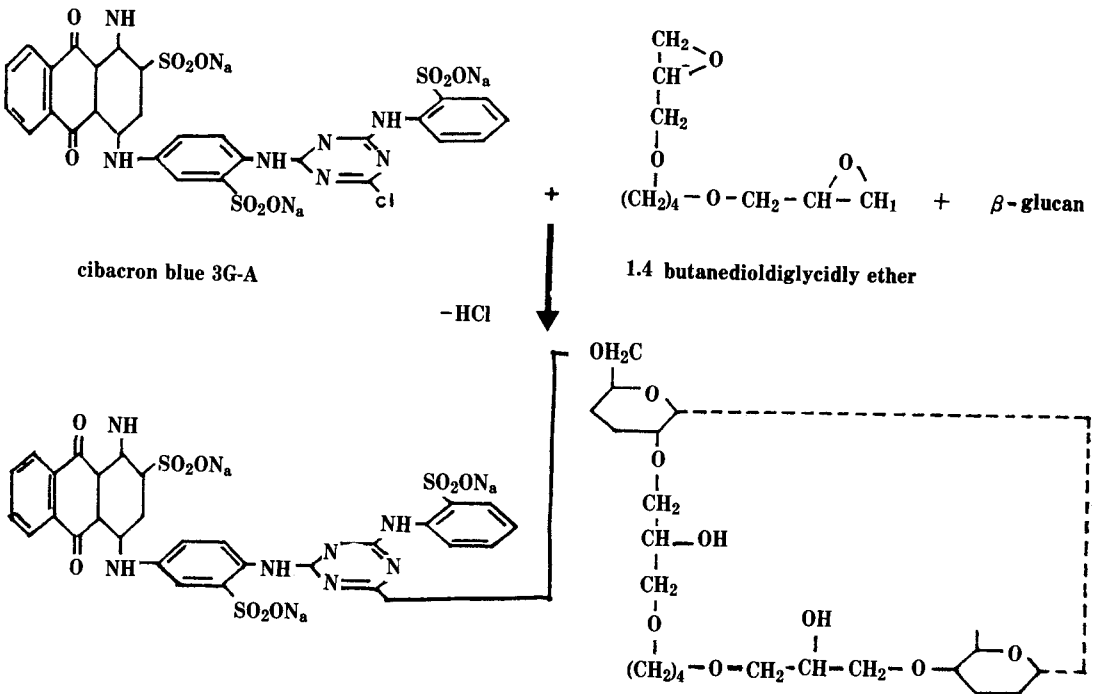


Fig. 1. Dyeing and cross linking of  $\beta$ -glucan.  $\beta$ -glucan dyed with cibacronblue 3G-A and cross-linked with 1,4-butandioldiglycidyl ether.

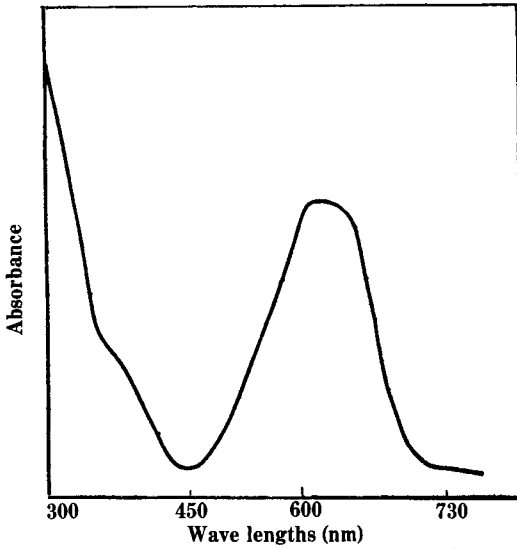


Fig. 2. Absorption spectrum of cibacron blue 3G-A.

ml를 넣고 37°C에서 3분간 반응시켰다.

**결과 및 고찰**

**색소의 흡수스펙트럼**

색소의  $\beta$ -glucan에의 접합원리는 Babson(13)의 cellulose 염색법 원리를 변형한 것으로 cibacron blue 3G-A의 흡수스펙트럼은 Fig. 2와 같다. 최대흡수대는 600~630 nm 범위를 나타냈으므로 623 nm를 선정하여 효소활성 측정에 사용하였다.

**변형기질로서의  $\beta$ -glucan 선택**

보리에서 직접 추출한 Biocon과 Novo 회사제품인  $\beta$ -glucan의 변형기질로서의 사용가능성을 검토하기 위하여 맥아효소에 반응시켜 효소활성을 조사하였다 (Table 1). 두 회사제품의  $\beta$ -glucan은 만족할 만한 효소활성을 보였으며 두 제품간의 효소활성 차이는 거의 없었다. 지금까지 endo- $\beta$ -glucanase의 측정에 간혹 사용한 CMC(carboxymethyl cellulose), laminarin 등의 인공적기질이 부적당한 것은 이들은 endo- $\beta$ -1, 4와 endo- $\beta$ -1, 3 glucanase중 하나만을 위한 기질인 반면 endo- $\beta$ -glucanase는 glucose가  $\beta$ -1, 4와  $\beta$ -1, 3의 형태로 결합된 기질을 분해하는 효소이기 때문이다. 또한 산업체에서 직접 사용할 수 있는 효소의 활성도 측정을 위해서는 가능한 한 인공적 기질보다는 직접 보리나 밀에서 추출한  $\beta$ -glucan이어야 이상적이라 할 수 있다. 그러나 직

Table 1. Comparison of property of Biocon-and Novo- $\beta$ -glucan by enzyme reaction.

	NOVO- $\beta$ -glucan	Biocon- $\beta$ -glucan
Abs. (623 nm)	0.634	0.625
	0.674	0.617
	0.619	0.570
	0.630	0.627
	0.662	0.627
X (Mean)	0.644	0.613
s (Standard deviation)	0.023	0.024

접 추출하는 방법이 표준화 되어있지 않고 매우 복잡한 과정을 거쳐야 하므로 상품화된 순수한  $\beta$ -glucan을 선택함이 중요하다고 하겠다.

**NaOH용액 농도의 영향**

변형기질 조제시 NaOH용액 농도에 따른 맥아효소 활성은 Fig. 3과 같다. NaOH용액 농도가 0.1 N에서 0.2 N로 증가함에 따라 효소활성은 감소하였으므로 본 실험에서는 0.1 N NaOH 농도로 변형기질을 조제하였다. Babson 등은(12) 1.0 N의 NaOH용액 조건에서 reacton red 2B라는 색소를 접합시켰을 때 효소활성이 높았다고 보고하였다. 그러나  $\beta$ -glucan의 경우 1.0 N NaOH용액의 알카리조건에서는 색소접합 후 cross linking agent와 접합이 원활치 않아 gel

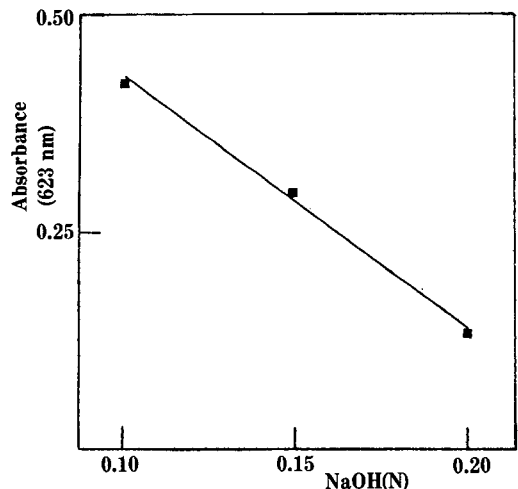


Fig. 3. Effect of sodium hydroxide concentration used when modified  $\beta$ -glucan was prepared on the activities of enzymes.

형성이 불량하였다. 이와같이 NaOH 농도에 따라 색소기질의 gel 상태와 효소의 활성도에 크게 영향을 미침을 알 수 있었다.

**가교제 양의 영향**

Fig. 4와 같이  $\beta$ -glucan에 접합되는 1,4-butanedioldiglycidyl ether의 양이 많을수록 맥아 효소 활성도는 감소하였다.

생성된 gel 상태와 효소활성을 비교해 본 결과 1.25 ml의 1,4-butanedioldiglycidyl ether 양이 최적임을 알 수 있었다.  $\beta$ -Glucan에 색소와 cross linking agent를 접합시켰을 때  $\beta$ -glucan은 수불용성이 되는데 이것은 아마  $\beta$ -glucan의 OH-group이 cross linking agent와 ether 결합을 함으로써 극성이 감소되기 때문인 것으로 사료된다. John(14) 등은 ether 결합에 의해 접합된 기질은 exo-형 효소작용을 받지 않는다고 보고하였다.

**변형기질의 열처리 효과**

변형된 기질 조제시 열처리시간에 따른 맥아효소 활성은 Table 2와 같다.

변형된 색소기질은 끓인 시간이 경과함에 따라 효소활성은 증가하였으며 90분 처리시 가장 높은 효소활성을 나타내었다. *Bacillus subtilis* K-4-3 효소의 농도와 변형기질의 끓임 유무에 따른 효소활성도의

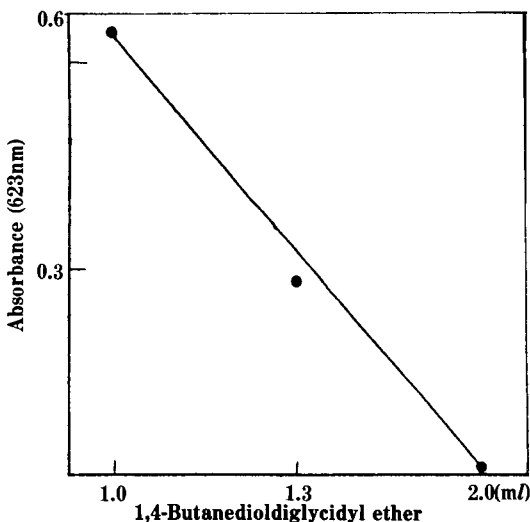


Fig. 4. Effect of cross linking agent (1,4-butanedioldiglycidyl ether) concentration used when modified  $\beta$ -glucan was prepared on the activities of enzymes.

Table 2. Effect of boiling of modified  $\beta$ -glucan on enzyme activity.

(min)	0	30	60	90	120
Abs. (623 nm)	0.233	0.272	0.333	0.382	0.406
	0.253	0.273	0.357	0.378	0.380
	0.213	0.261	0.353	0.399	0.366
	0.228	0.230	0.354	0.395	0.327
	0.228	0.236	0.355	0.404	0.338
X (Mean)	0.23	0.25	0.35	0.39	0.36
s (Standard deviation)	0.014	0.020	0.010	0.011	0.032
v (Variance coefficient)	6.2	7.9	2.8	2.9	8.9

관계를 조사한 결과 끓이지 않은 경우보다 90분간 끓인 경우가 더 직선적인 관계가 있음을 알 수 있었다(Fig. 5).

**pH에 대한 안정성**

일반적으로 변형기질은 높은 pH에 불안정함을 나

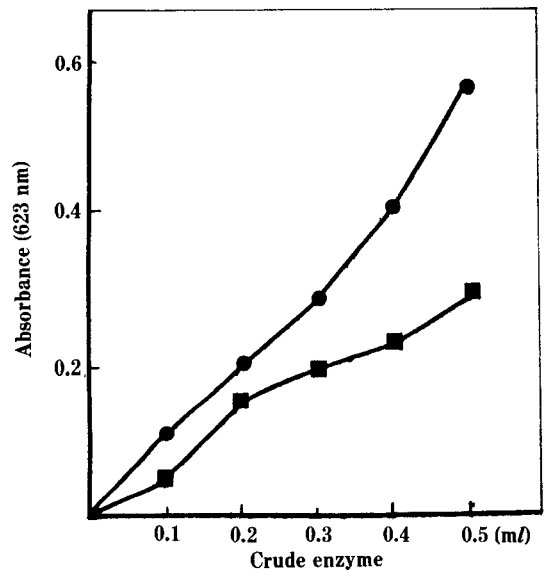


Fig. 5. Determination of bacterial  $\beta$ -glucanase with blue- $\beta$ -glucan.

●: with heating the substrate suspension in boiling water.

■: without heating the substrate suspension in boiling water.

reaction time 3 min.

incubation temperature 37°C.

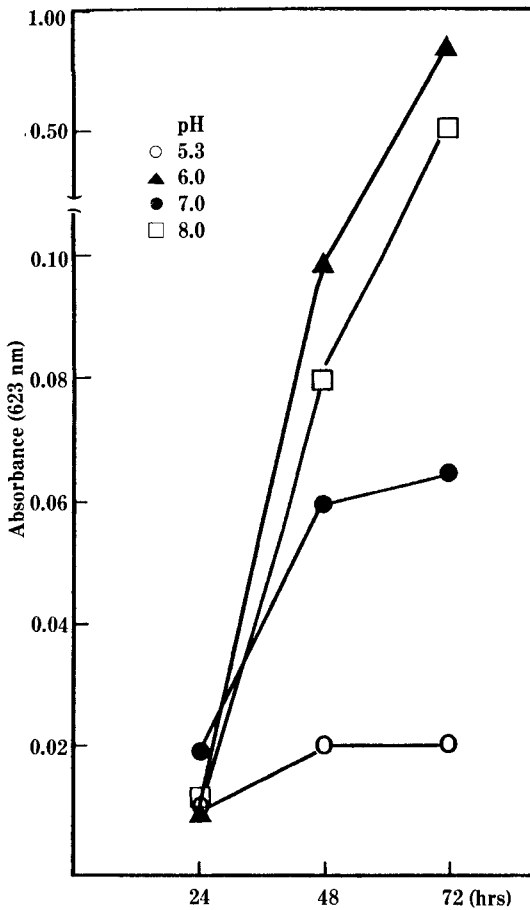


Fig. 6. Effect of pH on the substrate stability.

타내었다. 25mM Sørensen 완충액의 pH에 따른 변형된 색소기질의 안정성을 조사한 결과는 Fig. 6과 같다.

pH 5.3 Sørensen 완충액의 경우 72시간까지 실온에 방치할 경우 안정성을 유지하였으나 pH 7.0과 pH 8.0은 불안정성을 보였다. 그 원인은 pH가 높아짐에 따라 변형된 기질이 완충용액에서 용해도가 높아지는 것인지 아니면 OH-group과 공유결합된 색소가 유리되는 지는 더 검토해 보아야 할 과제이다.

**변형기질농도의 영향**

색소에 접합된 변형기질을 25mM Sørensen (pH 5.3) 완충액으로 0.4%의 기질현탁액을 만든 후 0.5 ml의 *Bacillus subtilis* K-4-3 조효소액에 기질현탁액을 농도별로 반응시켜 효소활성을 조사한 결과는 Fig. 7과 같다. 3.5 ml 기질현탁액 농도에서 포화상

태임을 알 수 있었다. 이러한 결과로 보아 *Bacillus subtilis* K-4-3의 효소액에 3.5 ml 이상의 변형된 기질을 반응시켜 효소활성도를 측정할 수 있다는 결과를 얻었다.

**색소방법과 DNS 방법의 비교**

색소에 접합된 변형된 기질로 효소활성을 측정하는 방법과 일반적으로 통용되는 DNS 방법을 반응시

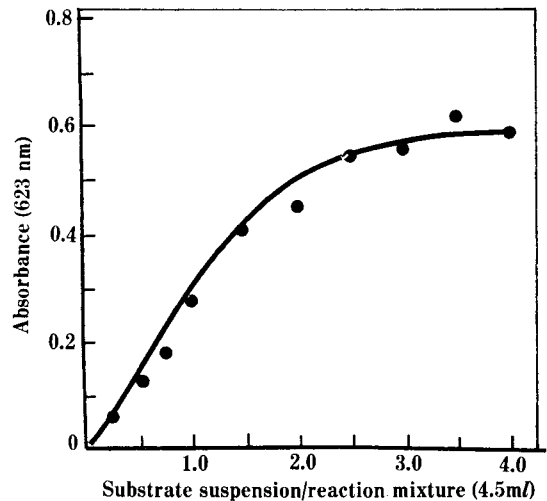


Fig. 7. Determination of substrate saturation curve. (*Bacillus subtilis* K-4-3)

The reactions were performed at 37 °C for a period of 3 min.

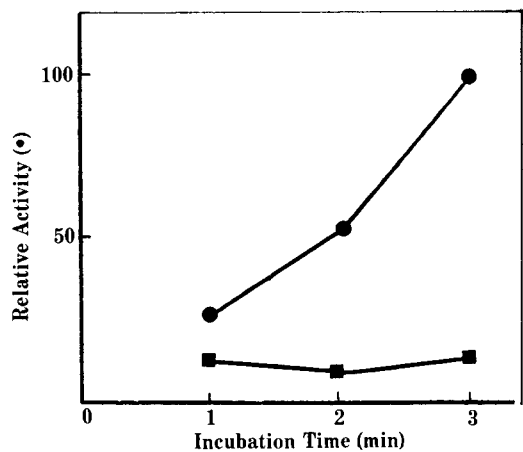


Fig. 8. Comparison of colour and DNS method for the determination of  $\beta$ -glucan degrading enzyme (*Bacillus subtilis* K-4-3).

● : colour method Abs. at 623 nm  
 ■ : DNS method Abs. at 546 nm

간에 따라  $\beta$ -glucan 효소활성을 비교 조사한 결과는 Fig. 8과 같다.

Fig. 8과 같이 *Bacillus subtilis* K-4-3에서 추출한 효소액의 활성 측정결과 색소방법은 DNS 방법에 비하여 직선에 가까운 증가율을 보여 예민성 정확성을 증명할 수 있었다.

이러한 색소방법의 원리는 변형된 색소기질이 효소와 반응하여 저분자 수용성물질이 생성되는데 색소에 접합된 저분자물질은 효소활성에 따라 색깔의 강약을 나타내는 것으로 이를 분광분석기로 측정한다. 그러므로 색소방법의 원리를 이용하여 여러 우수균주 및 효소탐색 등에 적용할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 변형기질에 대한 효소의 정확한 작용기작에 관해서는 더 연구하여야 할 과제이다.

## 요 약

$\beta$ -Glucan 분해효소의 간편하며 예민한 활성도 측정방법으로  $\beta$ -glucan에 색소와 cross linking agent를 접합시키는 변형기질 제조시 영향을 미치는 조건을 조사하고 맥아와 세균의  $\beta$ -glucan 분해효소 측정에 적용시켜 활성도를 측정한 결과는 다음과 같다. 1.0g  $\beta$ -glucan은 0.1N NaOH용액에서 색소 cibacron blue 3G-A 1.5g과 cross linking agent인 1,4-butanedioldiglycidyl ether 1.25ml을 90분간 끓여서 색소 접합기질로 제조하였을 때  $\beta$ -glucanase 활성도 측정에 최적조건이었다. 변형기질은 pH 5.3에서 안정성을 보였으며 *Bacillus subtilis* K-4-3에서 추출한 효소액에 변형기질을 반응시켰을 때 간편하고 정확한 효소활성 측정이 가능하였다. 또한 색소방법을 DNS 방법과 비교한 결과 색소방법이  $\beta$ -glucan 분해효소 측정에 적당한 방법이었음이 입증되었다.

## 사 사

본 연구의 일부는 한국과학재단의 연구비로 수행되었으며 이에 깊은 감사를 드립니다.

## 참고문헌

1. Ducroo, P und Delecourt, R.: *Wall. Lab. Comm.* **35**, 219 (1972).
2. Schur, F. and Pfenninger, H.: *Schwz. Brauere;-Rdsch.* **89**, 17 (1986).
3. Preece, I.A. and Ashworth, A.S.: *J. Inst. Brew.* **56**, 40 (1950).
4. Narzi  $\beta$ , L.: *Die Technologie der Malzbereitung*, F. Enke Verlag Stuttgart, 6. Auflage. 20 (1976).
5. Klein, B. Foreman, J.A. and Searcy, R.L.: *Clinical Chemistry.* **16**, 32 (1970).
6. Basbson, F. Tenney, S.A. and Magraw R.E.: *Clinical Chemistry.* **16**, 39 (1970).
7. Rinderknecht, H. Wilding, P. and Haverback, B.J.: *Experimentia.* **23**, 805 (1967).
8. Dellweg, H. Baerwald, G. und Gilde, W.: *Mschr. F. Brauerei.* **23**, 152 (1970).
9. Regula, E. Kahn, M. und Wassermann, L.: *Lebensm.-wiss.  $\mu$ . Technol.* **7**, 57 (1974).
10. Linko, M., walliander, P. and Zitting, A.: *Suomen Kemistilehti.* **43**, 387 (1970)K
11. 양진오, 정안식, 이성택: 한국미생물학회지, **25**(4), 339(1987).
12. Miller, G.L.: *Anal. Chem.* **31**, 426 (1959).
13. Babson, A.L.: *French Pat.* **150**, 8496 (1967).
14. John, M., Schmidt, J., and Dellweg, H.: *Mschr. f. Brauerei.* **28**, 14 (1975).

(Received January 27, 1988)