

Chitooligosaccharides 처리에 의해 유도되는 chitinase, β -1,3-glucanase 활성 보유 벼 염기성 단백질 ICG의 분리 및 성질

엄성연 · 박희영 · 김수일*

서울대학교 농업생명과학대학 농화학과 및
농업생물신소재연구센터

초록 : 벼 세포 현탁배양액으로부터 chitooligosaccharides에 의해 유도된 염기성 단백질 ICG를 순수분리하였다. 본 단백질은 chitin과 laminarin을 가수분해하므로 chitinase와 β -1,3-glucanase 활성을 함께 보유하고 있는 것으로 나타났으며, 벼의 단백질 RCG-2²³⁾와는 달리 lysozyme 활성을 가지고 있지 않았다. 분자량이 52.53 kd인 본 효소의 chitinase 활성은 pH 5.0, 60°C, β -1,3-glucanase 활성은 pH 4.0, 40°C의 조건에서 최대로 나타났다. NAG₅에 대한 K_M 및 V_{max} 수치는 각각 0.474 mM, 2.997 nM/min., laminarin에 대한 것은 각각 1.004 mM, 0.739 nM/min.로 나타나, ICG는 RCG-2보다 높은 기질친화성을 가지고 있으며 chitin을 chitooligosaccharide로 분해하는 endo형 chitinase로 판명되었다(1993년 12월 4일 접수, 1994년 1월 10일 수리).

서 론

PR(pathogenesis-related) protein의 유도 및 합성^{1,2)}은, 병원성 미생물에 감염된 식물체에서 나타나는 자가방어 기작^{3,4)} 중 가장 대표적인 현상이다. PR protein은 담배 모자이크 바이러스에 감염된 담배에서 최초로 발견된 이래⁵⁾ 여러 종류의 고등식물에서 그 존재가 확인되고 있으며,²⁾ 이중 담배,⁶⁾ 오이,⁷⁾ 토마토,⁸⁾ 옥수수⁹⁾ 등에서 발견된 PR protein은, 병원성 곰팡이 세포벽의 주요구성물질이지만 식물체내에서는 거의 존재하지 않는 chitin이나 β -1,3-glucan을 가수분해해서 식물체 내에서의 병원성 미생물의 성장을 억제하는 chitinase 및 β -1,3-glucanase 활성¹⁰⁾을 보유하고 있다.

현재까지 다수의 식물에서 chitinase와 β -1,3-glucanase의 정제 및 특성연구들¹⁸⁾이 보고되고 있으며, 이중 일부 고등식물에서 추출한 효소들에게 chitin이나 β -1,3-glucan 이외의 다른 종류의 기질을 이용할 수 있는 bifunctionality¹⁹⁻²²⁾가 있는 것으로 발표되고 있다. 그러나 하나의 효소가 chitinase 및 β -1,3-glucanase 활성을 함께 보유하고 있다는 보고는, 최근 본 실험실에서 정제한

벼의 산성단백질인 RCG-2²³⁾ 이외에 아직까지 보고된 바 없다.

Chitinase와 β -1,3-glucanase는 다양한 비생물적 elicitor^{11,12)} 및 생물적 elicitor^{13,14)}에 의해 유도되는 단백질로서, 생물적 elicitor인 chitosan,¹⁵⁾ chitin,¹⁶⁾ chitooligosaccharide¹⁷⁾ 등 병원성 곰팡이의 세포벽 성분을 처리했을 때 두 효소의 mRNA 및 단백질들이 유도, 증가하는 현상이 보고되고 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾

본 연구에서는, 벼 세포현탁배양의 염기성 효소군으로부터 chitooligosaccharides의 처리에 의해 유도된 chitinase를 순수분리하고, bifunctionality 등 그 효소적 성질을 규명하였다.

재료 및 방법

염기성 단백질효소분획의 제조

Chitooligosaccharides 처리로 유도, 생산되는 벼 세포현탁배양의 염기성 단백질효소분획은 박 등¹⁷⁾의 방법에 따라 제조하였다. 즉, chitooligosaccharides로 처리한 벼 세포현탁배양액으로부터 70% ammonium sulfate로

Key words : Rice cell suspension culture, Chitinase, β -1,3-Glucanase, Bifunctional enzyme, Inducible enzyme, Chitooligosaccharides

*Corresponding author : S.-I. Kim.

포화침전물을 분리한 후 pH 8.9로 평형시킨 DEAE-cellulose column chromatography를 통과시켜 흡착되지 않은 분획을 염기성 단백질효소분획으로 하였다.

Butyl-Toyopearl column chromatography

30% ammonium sulfate가 포함된 20 mM sodium acetate(pH 5.0) buffer에 평형시킨 butyl-Toyopearl resin을 2.5×20 cm glass column에 균일하게 충전하고, 동일 buffer 용액에 녹인 염기성 단백질효소분획을 column에 주입한 후 5 ml/10 min. 속도로 resin에 흡착되지 않은 단백질을 용출시켰다. 이후, ammonium sulfate가 포함되지 않은 동일 buffer를 사용하여 30%에서 0% ammonium sulfate 농도까지 직선상의 농도구배 방법으로 resin에 흡착된 단백질을 순차적으로 용출하였다. 각 분획의 280 nm에서의 흡광도와 chitinase 및 β -1,3-glucanase 활성을 측정하고 두 효소활성이 있는 분획을 모아 증류수에서 투석, 냉동건조하였다.

단백질의 gel slicing에 의한 분리

Butyl-Toyopearl chromatography에 의하여 분리된 BT-11, BT-12 분획을 native-PAGE한 후 나타난 각 단백질 band의 분리는 엄 등²⁴⁾의 방법에 따랐다.

전기영동 및 전기영동 gel상 효소활성 band의 검정

Native-PAGE(non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis) 및 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 방법과 native-PAGE gel상 chitinase 효소활성 band의 검출방법은 엄 등²⁴⁾의 방법에 따라 행하였다.

효소활성 측정

Chitinase 활성은 Hsu 등²⁵⁾의 방법에 따라 제조한 colloidal chitin을 기질로 한 박 등¹⁷⁾의 방법을 사용하였고, β -1,3-glucanase 활성은 laminarin을 기질로 한 Fink 등²⁶⁾의 방법을, lysozyme 활성은 *Micrococcus lysodeikticus* 세포벽을 기질로 한 Martin 등²⁷⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. 효소 단위 1 unit는 각 실험반응조건에서 1분에 1 nmole의 환원당 및 NAG(*N*-acetylglucosamine)를 생산하는 효소량으로 하였다. 단, Lysozyme의 경우 1분에 0.001의 흡광도 감소를 가져오는 효소량을 1 unit로 하였다. 효소의 비활성도 측정을 위한 단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준으로 BCA(bicinchoninic acid) 방법²⁸⁾을 사용하였다.

pH 및 온도에 따른 효소활성 변화는, pH는 2.3~8.0 범위에서 50 mM Clark and Lubs solution(pH 2.3), citric

acid- Na_2HPO_4 (McIlvaine) buffer(pH 3~7) 및 sodium phosphate buffer(pH 8)를 이용하여 37°C 에서 효소활성을 측정하였으며, 온도는 50 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에서 반응온도를 20~80°C 로 각각 유지시키면서 효소 활성을 측정하였다.

K_M 및 V_{max}

Chitinase 및 β -1,3-glucanase의 K_M 및 V_{max} 의 측정은, chitinase의 경우 0.05~1.0 mM 농도의 NAG₅를, β -1,3-glucanase는 0.05~1.0 mM 농도의 laminarin을 이용하여 각 기질농도 별로 37°C 에서 3시간 동안 반응시켜 초기 속도를 구한 뒤, 이로부터 각각 K_M , V_{max} 값을 구하였다. 이때 NAG₅의 분자량은 1034.0으로, laminarin의 평균 분자량은 Wong 등의 기준²⁹⁾에 따라 중합도가 20인 것으로 하여 3300으로 계산하였다.

Chitinase의 작용양상

Chitinase의 작용양상은 NAG dimer-hexamer을 기질로 한 효소반응물을 시료로 하여 이를 점적한 silica gel plate를 propanol : distilled water : ammonia water = 70 : 30 : 1(v/v)의 전개용매³⁰⁾로 2중전개 후 *O*-aminophenol reagent로 검정하였다.

결과 및 고찰

ICG 단백질의 순수분리

염기성 효소분획 FA는 10% gel PAGE에서 7개 이상의 주 단백질 band들을 포함하고 있었으며(Fig. 1-A), 비활성도가 29.96 unit/mg protein인 chitinase 및 1.43 unit/mg protein인 β -1,3-glucanase 활성을 보유하고 있었다(Table 1).

FA 분획은 butyl-Toyopearl chromatography에 의해 12개의 단백질 peak로 분리되었으며, 이중 11, 12번째 peak인 BT-11, BT-12에서만 chitinase와 β -1,3-glucanase 효소활성이 함께 검출되었다(Fig. 2). Congo red를 tracking dye로 이용하여 전기영동의 이동거리를 증대시킨 10% PAGE로 BT-11, BT-12 분획을 분석한 결과, BT-11 분획에 유도된 chitinase인 ICG가 존재하며, BT-12 분획에는 chitoooligosaccharides에 의해 유도되기 전에 이미 존재하고 있는 구성chitinase효소들이 분포하는 것으로 나타났다(Fig. 1-A, B). SDS-PAGE 결과, BT-12 분획은 22.7, 41.5, 66.0 kd의 단백질을 포함하고 있었으며, BT-11 분획은 상기 단백질 이외에도 52.5 kd의 단백질을 더 가지고 있었다(Fig. 1-C). 유도생산된 ICG 단백질을 순수분리하기 위해 BT-11분획을 10% polyacrylamide

gel을 사용하여 전기영동한 gel을 band에 따라 자르고 단백질을 추출하였다. 추출한 ICG는 native PAGE 및 SDS-PAGE에서 모두 단일 band를 나타내어서 순수하게

분리되었음을 확인할 수 있었으며, 분자량은 52.53 Kd로 나타났다(Fig. 3-A, B, C). ICG는 chitinase 및 β -1,3-glucanase 활성을 함께 보유하고 있었으며, 두 효소의 비활성도는 각각 397.74 unit/mg protein, 2.28 unit/mg protein이어서, chitinase의 경우 조효소보다 27.28배, β -1,3-glucanase는 2.51배가 정제된 것으로 나타났다. 또한, ICG의 chitinase대 β -1,3-glucanase 비활성도비율은 174.45 이므로 본 효소는 β -1,3-glucanase 활성보다 chitinase활성을 다량 보유하는 것으로 나타났다(Table 1).

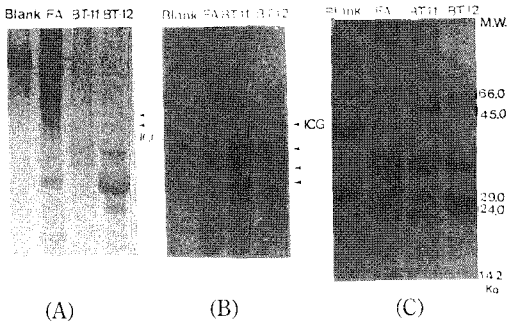


Fig. 1. Electropherograms of blank extract and fractions isolated by DEAE-cellulose chromatography and butyl-Toyopearl chromatography.

A: Protein bands stained with Coomassie brilliant blue in native-PAGE. Blank; Crude enzyme from rice cell suspension culture without the treatment of chitooligosaccharides mixture, FA; Fractions on DEAE-cellulose chromatography, BT-11,BT-12; Fractions on butyl-Toyopearl chromatography, Arrow indicates induced protein.

B: Chitinase activity bands stained with Calcofluor white M2R in native PAGE. ICG; basic inducible enzyme possessing chitinase/ β -1,3-glucanase activity, Arrows indicate chitinase activity.

C: Protein bands stained with Coomassie brilliant blue in SDS-PAGE.

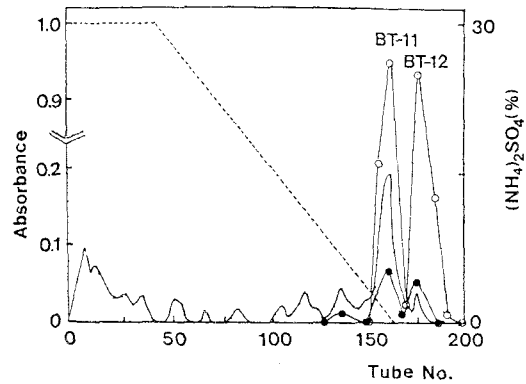


Fig. 2. Butyl-Toyopearl chromatography of FA fraction isolated by DEAE-cellulose chromatography.

—, Absorbance at 280 nm; ○—○, Absorbance at 585 nm (chitinase activity); ●—●, Absorbance at 500 nm (β -1,3-glucanase activity); ----, Concentration gradient of ammonium sulfate.

Table 1. Purification tabel of basic inducible chitinase/ β -1,3-glucanase

Fraction		Total Activities (unit)	Total Proteins (mg)	Specific Activity (unit/mg)	Activity Ratio (C/G)	Protein Yield (%)	Activity Yield (%)	Purification Fold
Crude	G	185.64	204	0.91	16.02	100	100	1.00
	C	2974.32		14.58			100	
FA	G	138.71	97	1.43	20.52	47.55	74.72	1.57
	C	2906.12		29.96			97.71	2.05
BT-11	G	5.42	3.15	1.72	56.08	1.54	2.29	1.89
	C	303.82		96.45			10.21	6.62
BT-12	G	5.51	3.28	1.68	57.31	1.61	2.97	1.85
	C	315.80		96.28			10.62	6.60
ICG	G	0.36	0.16	2.28	174.45	0.08	0.19	2.51
	C	63.64		397.74			2.14	27.28

C: Chitinase activity, G: β -1,3-glucanase activity Crude, Crude enzyme treated with chitooligosaccharides mixture; FA, DEAE-cellulose resin nonbinding protein; BT-11,12, Butyl-Toyopearl resin binding protein; ICG, Inducible chitinase / β -1,3-glucanase.

*In vitro*에서 chitinase와 β -1,3-glucanase 효소의 병원성 미생물에 대한 성장저해를 실험한 결과, 효소를 각각 단독 처리할 때보다 두 효소를 동시 처리하였을 때 성장저해가 더 크게 나타나는 현상이 보고되고 있다.³¹⁾ 따라서, 두 효소활성이 함께 존재하는 ICG는 다양한 병원성 미생물에 대하여 강한 항균활성을 나타낼 것으로 추정할 수 있으며, ICG가 chitooligosaccharide에 의하여 유도된 점이 이러한 추정을 뒷받침하는 것으로 보인다.

Chitinase와 β -1,3-glucanase는 식물체내에서의 위치에 따라 그들의 기능에 차이가 생기는 것으로 알려져 있는데,³²⁾ 식물의 세포외 공간에 위치하는 경우 침입한 병원성 곰팡이의 세포벽을 가수분해하는 등 병원균의 침입에 직접 대응하며, 액포에 존재하는 경우는 세포외로 분비되는 경로 또는 식물세포가 병원균 침입에 대한 과민반응으로 파괴될 때 다량 방출되어 병원균을 저해한다. Chitooligosaccharides에 의해 유도되어 세포외로 분비되는 ICG의 경우, 구성효소가 생산한 병원균 세포벽의 가수분해물에 의해 유도되어 세포외로 분비된 후 병원균의 침입에 직접 작용하는 것으로 추정된다.

다음 실험에서는 ICG를 양적으로 분리, 그 효소적 특성들을 조사하였다.

ICG의 효소적 특성

최적활성 pH 및 온도

ICG의 pH 및 온도에 따른 두 효소활성의 변화를 조사하였다. Chitinase는 pH 5.0에서, β -1,3-glucanase는 pH 4.0에서 활성이 제일 높게 나타났다(Fig. 4-A). Chiti-

nase 활성은 pH 2.3~8.0 전 범위에서 최대 활성의 40% 이상을 보여주고 있어 비교적 넓은 pH 범위에서 안정한 반면, β -1,3-glucanase 활성은 pH 2.3~5.0 범위에서 최대 활성의 85% 이상의 높은 활성이 나타나지만 pH 6.0 이상의 pH 조건에서는 효소활성이 전혀 나타나지 않는, pH에 매우 민감한 반응을 보였다(Fig. 4-A).

본 효소는 염기성 효소임에도 불구하고 산성 pH에서 높은 효소활성을 보이는데, 이는 본 실험에서 염기성 및 산성 효소군의 분류기준을 pI가 아닌 전기영동상의 이동도와 ion exchange chromatography 양상으로 택하였기 때문으로 이러한 현상이 가능한 것으로 생각된다.

효소활성이 최대로 나타나는 최적온도는, chitinase의 경우 60°C, β -1,3-glucanase는 37°C 로서, pH에 대한 영향과 마찬가지로 서로 상이한 조건에서 각 효소의 최대활성이 나타났다(Fig. 4.B). Chitinase 활성은 20°C 에서

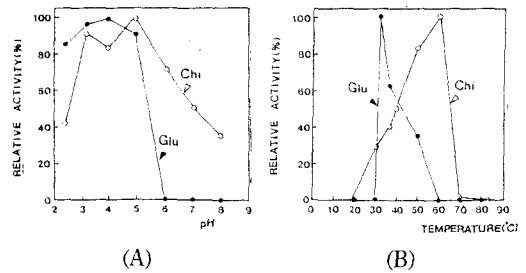


Fig. 4. Effect of pH and temperature on the chitinase/ β -1,3-glucanase activity of ICG.

A: Effect of pH on the chitinase/ β -1,3-glucanase activity of ICG.
 B: Effect of temperature on the chitinase/ β -1,3-glucanase activity of ICG. Chi; chitinase activity, Glu; β -1,3-glucanase activity.

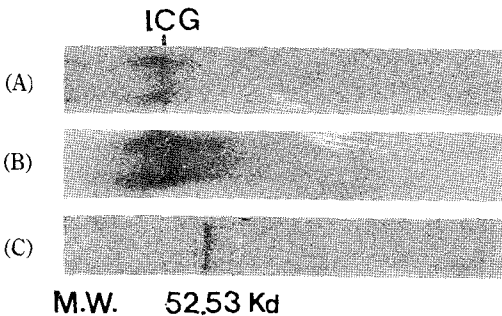


Fig. 3. Electropherograms of ICG isolated by gel slicing.

A: Protein bands stained with Coomassie brilliant blue in Native-PAGE. ICG; Fraction on gel slicing.
 B: Chitinase activity bands in stained with Calcofluor white M2R in native-PAGE.
 C: Protein bands stained with Coomassie brilliant blue in SDS-PAGE.

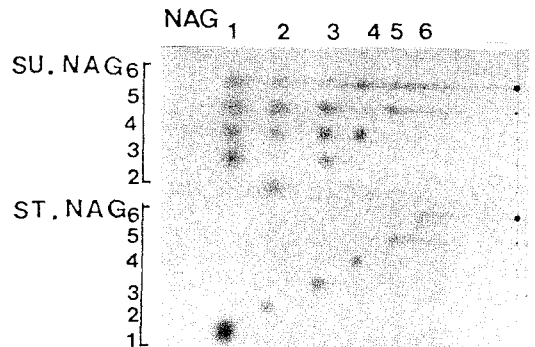


Fig. 5. Thin layer chromatograms of the hydrolysis products of NAG oligomers by ICG as chitinase. NAG₁₋₆, (NAG)₁-(NAG)₆; su, enzyme hydrolysates of NAG oligomers; st, standards of NAG oligomers.

최적활성 온도인 60°C 까지 효소활성이 증가하나, 70°C 이상에서는 급속도로 효소활성이 감소하여 80°C 에서는 활성이 전혀 나타나지 않았다. β -1,3-glucanase 활성은 chitinase 활성보다 온도에 더욱 민감한 반응을 보여서, 37~50°C 온도 범위에서만 효소활성이 나타났다(Fig. 4 B).

따라서, 실험결과를 종합해 보았을 때 ICG의 β -1,3-glucanase 활성은 chitinase 활성보다 pH 및 온도에 매우 민감한 것으로 나타났다.

K_M 및 V_{max}

ICG의 chitinase 활성 K_M 및 V_{max} 값은 NAG₅를 이용하여 구한 결과 각각 0.474 mM, 2.997 nM/min.이었고, laminarin을 기질로 한 β -1,3-glucanase 활성 K_M 은 1.004 mM, V_{max} 는 0.739 nM/min.이었다. 따라서, ICG는 벼잎에서 분리한 RCG-2₂₀보다 두 기질에 대하여 10배 이상 강한 친화성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 또한, chitin 및 β -1,3-glucan 기질에 대한 상대 친화성을 알아본 결과, RCG-2는 β -1,3-glucan에 대한 친화성이 높게 나타난 반면, ICG는 chitin에 대한 친화성이 높은 것으로 나타나서, 두 효소가 서로 다른 것으로 나타났다.

Lysozyme 활성

ICG는 *M. lysodeikticus* 세포벽을 분해하지 못하여서 lysozyme 활성을 보유하지 않는 것으로 나타났다. 대부분의 식물 chitinase는 lysozyme 활성을 함께 보유하고 있는 것으로 보고되었으며,^{33,34} 벼잎의 RCG-2도 두 효소활성이 외에도 lysozyme 활성을 보유하고 있다.²⁹ ICG는 lysozyme 활성을 보유하고 있지는 않았지만, RCG-2보다 강한 chitin 및 β -1,3-glucan 친화성을 가지고 있어 RCG-2보다 강한 항균활성을 지니고 있을 것으로 추측된다.

Chitinase의 작용양상

ICG는 NAG₂로부터 NAG₆까지의 chitooligosaccharide 기질 중 NAG₂를 분해하지 않았으며 NAG₃는 주로 NAG와 NAG₂, NAG₄는 NAG₂, NAG₅는 NAG₂와 NAG₃, NAG₆는 NAG₂와 NAG₄로 각각 분해함을 TLC 실험결과 확인할 수 있었다(Fig. 5).

ICG는 NAG₂를 분해하지 않으므로, chitobiase 활성 및 exochitinase 활성을 보유하고 있지 않음을 확인할 수 있었으며, NAG₂ 이상의 chitooligosaccharide들이 주요 분해산물로 관찰되었으므로, 본 효소는 endo형으로 chitin에 작용함을 알 수 있었다.

지금까지 알려진 대부분의 식물 chitinase들은 endo-

chitinase³⁵인 반면, 미생물이 생산하는 chitinase는 chitin으로부터 NAG를 생산하는 exo형 chitinase³⁶로 작용하는데, Yamada 등³⁷이 chitooligosaccharide elicitor의 중합도별 chitinase 유도경향을 조사한 결과, NAG₆ 이상 중합도의 chitooligosaccharide일수록 다량의 효소를 빠른 속도로 유도시키는 것으로 나타났다. 따라서, 병원성 미생물 세포벽으로부터 중합도가 높은 chitooligosaccharide를 생산할 수 있는 식물 endochitinase가 NAG를 생산하는 미생물 exochitinase보다 다량의 chitinase를 유도, 생산시켜 병원성 미생물의 감염에 효과적으로 대응할 수 있는 것으로 추정할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 1991년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 지원 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며 또한 한국과학재단 지정 농업생물신소재연구센터의 부분 지원을 받았기에 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. van Loon, L. C.: Plant Mol. Biol., 4:111(1985)
2. Bowles, D. J.: Annu. Rev. Biochem., 59: 873(1990)
3. Boller, T.: In 'Plant-microbe interactions: molecular and genetic perspectives', Kosuge, T. and Nester, E. W. (ed), 1st, Ed., Vol. 2, Chap. 5, McGraw-Hill, Inc., New York, U.S.A.(1987)
4. Vinhyasekaran, P.: In 'Physiology of disease resistance in plants' Vol. 1, 2, Chap. 1, 2, CRC Press, Inc., Florida, U.S.A.(1989)
5. van Loon, L. C. and van Kammen, A.: Virology, 40: 199(1970)
6. Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P. and Fritig, B.: EMBO journal, 6: 3209(1987)
7. M traux, J. P., Streit, L. and Staub, TH.: Physiol. Mol. Plant Pathol., 33: 1(1988)
8. Joosten, M. H. A. J. and De wit, P. J. M.: Plant Physiol., 89: 945(1989)
9. Nasser, W., De tapia, M., Kauffmann, S., Montasser-Kouhsari, S. and Burkard, G.: Plant Mol. Biol., 11: 529(1988)
10. Boller, T.: In 'Oxford surveys of plant molecular and cell biology', Mifflin, B. J.(ed), Vol. 5, p.145, Oxford University Press, Oxford, Great Britain (1988)
11. Koga, D., Nomura, Y., Tabata, H., Ide, A. and Nakamura, Y.: Biosci. Biotech. Biochem., 56: 1331(1992)
12. Williams, K. J. and Leung, D. W. M.: Plant Cell,

- Tissue and Organ Culture, 32 : 193(1993)
13. Schr der, M., Hahlbrock, K., and Kombrink, E.: The Plant J., 2 : 161(1992)
 14. Kurosaki, F., Tashiro, N. and Nishi, A.: Physiol. Mol. Plant Pathol., 31 : 211(1987)
 15. Koga, D., Hirada, T., Sueshige, N., Tanaka, S. and Ide, A.: Biosci. Biotech. Biochem., 56 : 280(1992)
 16. Chang, M. M., Hadwiger, L. A. and Horovitz, D.: Plant Mol. Biol., 20 : 609(1992)
 17. 박희영, 김수일: 한국농화 학회지 36 : 1(1993)
 18. Boller, T., Gehri, A., Mauch, F. and V geli, U.: Planta, 157 : 22(1983)
 19. Mauch, F., Hadwiger, L. A. and Boller, T.: Plant Physiol., 87 : 325(1988)
 20. Roberts, W. K. and Selitrennikoff, C. P.: J. Gen. Microbiol., 134 : 169(1988)
 21. Ary, M. B., Richardson, M. and Shewry, P. R.: Biochim. Biophys. Acta., 993 : 260(1989)
 22. Cline, K. and Albersheim, P.: Plant Physiol., 68 : 207(1981)
 23. 엄성연, 김수일: 한국농화학회지 36 : 370(1993)
 24. 엄성연, 김수일: 한국농화학회지 37 : 인쇄 중(1994)
 25. Hsu, S. C. and Lockwood, J. L.: Appl. Microbiol. 29 : 422(1975)
 26. Fink, W., Liefeland, M. and Mendgen, K.: Plant physiol., 88 : 270(1988)
 27. Martin, M. N.: Plant physiol., 95 : 469(1991)
 28. Smith, P. K., Krohn, R. L., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, B. J., Olson, B. J. and Klenk, D. C.: Anal. Biochem., 150 : 76(1985)
 29. Wong, Y. and Maclachlan, G. A.: Biochem. Acta, 571 : 256(1979)
 30. Krebs, K. G., Heusser, D. and Wimmer, H.: In 'Thin-layer chromatography', Stahl, E. (ed), 2nd, Ed., p. 832, Springer-Verlag, New York, U. S. A. (1966)
 31. Mauch, F., Mauch-mani, B. and Boller, T.: Plant Physiol., 88 : 936(1988)
 32. Mauch, F. and Staehelin, L. A.: The Plant Cell, 1 : 447(1989)
 33. Jacobson, S., Mikkelson, J. D. and Hejgaard, J.: Physiologia Plantarum, 79 : 554(1990)
 34. van Loon, L. C.: In 'Plant-microbe interactions: molecular and genetic perspectives', Kosuge, T. and Nester, E. W. (ed), 1st, Ed., Vol. 3, Chap. 8, McGraw-Hill, Inc., New York, U. S. A.(1987)
 35. Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelson, J. D., Nielson, K. K., Rasmussen, U. and Vad, K.: Plant J., 3 : 31(1993)
 36. Flach, J., Pilet, P. E. and Jollès, P.: Experientia, 48 : 701(1992)
 37. Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O. and Akatsuka, T.: Biosci. Biotech. Biochem., 57 : 405(1993)

Purification and properties of a basic inducible protein, ICG with chitinase and β -1,3-glucanase activities from rice cell suspension culture media treated with chitooligosaccharides

Sung-Yon Um, Hee-Young Park and Su-Il Kim* (Department of Agricultural Chemistry and Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

Abstract : A basic inducible protein, ICG, containing chitinase and β -1,3-glucanase activity concomittantly was purified from cell suspension culture media of rice after the treatment of chitooligosaccharides. The isolated ICG enzyme gave a single band on native and SDS polyacrylamide gel electrophoresis and its molecular weight was estimated to be 52.53 kd. The optimal temperature and optimal pH of both enzyme activities in ICG were 60°C, pH 6.0 for chitinase activity and 37°C, pH 4.0 for β -1,3-glucanase activity. K_M and V_{max} values for chitinase were 0.474 mM, 2.997 nM/min., and those for β -1,3-glucanase were 1.004 mM·0.739 nM/min. respectively. TLC analysis of the chitooligosaccharide hydrolysates with ICG enzyme indicated that ICG acts as endochitinase.