

효모 세포벽 분해효소 생산균의 탐색 및 효소생산 최적조건의 조사

차성관* · 최혜숙¹ · 김왕준 · 윤석후 · 김영배¹

한국식품개발연구원, ¹고려대학교 식품공학과

Screening of Yeast Cell Wall Lytic Enzyme Producing Microorganisms and Optimization of Enzyme Production. Seong-Kwan Cha*, Hea-Suk Choi¹, Wang-June Kim, Suk-Hoo Yoon and Young-Bae Kim¹. Korea Food Research Institute, Baekhyun-dong, Bundang-ku, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea, ¹Department of Food Technology, Korea University, Seoul 136-701, Korea - Thousand actinomycetes and 50 soil samples were used for the isolation of microorganisms producing yeast cell wall lytic enzymes. Among 493 strains producing large clear zones on autolysed washed yeast (AWY), 117 strains were selected on living yeast cell agar plates. With the method of lytic activity, one strain (St-1702) was selected, which was temporarily identified as *Streptomyces eurythermus*. The optimal condition for enzyme production of this strain was partially determined as follows: incubation of the strain for 3 days at 30°C in the medium containing 2% freeze dried yeast cell, 1% glucose, 1% K₂HPO₄, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 0.5% peptone, and 0.2% (NH₄)₂CO₃ with pH 7.0. The protoplast formation of yeast by using the enzyme produced by this strain was compared with commercial enzymes.

효모는 미생물 군 중에서 인간이 상업적으로 개척하여 온 가장 중요한 미생물 중의 하나이다. 효모는 그 세포 자체로서 single cell protein 등과 같이 이용될 뿐만 아니라, 모든 주정발효의 주 역할을 차지하고 있고, 또한 여러가지 중요한 효소를 생산함으로써 산업에 이용되고 있다. 이러한 효모를 산업 균주로 이용하기 위해서 세포융합에 의한 균주 개량과 같은 기술이 중요한 기술로 사용되고 있다. 세포융합을 하기 위해서는 먼저 세포벽을 파괴시키고, 세포의 원형질체를 만들어야 하는데 지금까지 자낭포자 형성효모의 세포벽 파괴를 위한 효소는 1914년 Giaja가 달팽이에서 분리하는 소화액에서 효모의 rigid cell의 제거를 최초로 설명한 이후로 많은 연구가 진행되어 왔고 여러가지 자낭포자 효모의 세포벽 분해 효소를 생산하는 많은 미생물들이 탐색되어 보고되었다(1-3). 또한 이들 세포벽 분해 효소를 이용하여 자낭포자 효모 세포벽 구조는 상당한 정도 밝혀져 있고 몇 가지 세포벽 분해효소가 상품화되어 있는 실정이나(Zymolyase, Kitalase, Novozyme, etc.) 담자포자 형성효모의 세포벽 파괴를 위한 효소는 지금까지 몇 가지 문헌(4-6)에 의한 보고가 있을 뿐 아직까지 상품화는 되지 못하고 있는 실정이다. 본 연구는 효모 균주개량의 핵심기술인 세포융합 기술의 발전을 위해서 또한 경제적으로 중요한 담자효모를 산업 균주로 이용하기 위해서 담자효모의 세포벽 분해 효소 생산 미생물의 분리 및 동정실험을 실시하였고, 효소 생산 최적조건의 조사 그리고 세포벽 분해효소의 원형

질체 전환실험등을 실시하였기에 이에 대해서 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균원시료

우리 나라 해안지방의 토양으로부터 분리한 항생물질을 생산하는 방선균 1000여 균주와 남해안 지방에서 수집한 토양 50여점을 담자효모의 세포벽 분해효소 탐색을 위한 균원시료로 사용하였다.

시험균

세포벽 파괴효소 능력측정 시험 균으로는 다음과 같은 4종류의 효모를 사용하였다.

Rhodotorula glutinis ATCC 2527

Rhodospodidium toruloides ATCC 6987

Filobasidium capsuligenum KCTC 7102

Sporobolomyces salmonicolor KCTC 7113

효소생산 균주의 분리 및 1차 선별

효모의 세포벽분해 효소생산 우수균주의 분리를 위하여 방선균 균원시료는 아래와 같은 double layer agar plate 배지(1)에 plate 당 8균주씩 희석을 갖는 방식으로 접종하여 30°C에서 14일 배양 중 투명 환의 크기를 7일 간격으로 두 차례 측정하였고, 남해안 지방에서 수집한 토양시료 균원시료는 역시 double layer agar plate 배지에 희석법을 이용하여 도말 하였고, 30°C에서 14일 배양하여 투명 환의 크기가 비교적 큰 집락을 순수분리하여 1차적으로 우수균주를 선별하였다.

*Corresponding author.

Key words: Yeast cell wall lytic enzyme, *Streptomyces eurythermus*, optimization of enzyme production

Double Layer Agar Plate(DLAP) 배지(1)

Upper layer : Yeast(Autolyzed-Washed-Yeast; AWY), 1.0%; K₂HPO₄, 1.0%; MgSO₄·7H₂O, 0.01%; Agar, 2.0%; pH 7.0

Lower layer : K₂HPO₄, 1.0%; MgSO₄·7H₂O, 0.01%; Agar, 1.0%; pH 7.0

분리 선정된 균의 효소 생성배지는 Yeast(Freeze-Dried-Yeast; FDY), 2.0%; K₂HPO₄, 1.0%; MgSO₄·7H₂O, 0.01%; Glucose, 1.0%; Peptone, 0.5%; (NH₄)₂CO₃, 0.2%; pH 7.0으로 조성된 액체배지를 사용하였다.

2차 선별 1차 선별에 의하여 분리된 균들을 蓮尾 등(2)에 의한 생효모 한천배지를 이용하여 균을 접종하고, 30°C에서 10일간 배양하여 투명 환의 크기를 측정하였다.

3차 선별 2차 선별에 의하여 분리된 균주는 분리용 액체배지로 30°C의 진탕배양기에서 3일동안 배양하고, 그 여액에 대하여 다음과 같은 용해활성을 측정하였다.

용해활성 측정방법

용해활성 측정은 Yokotsuka 등(3)의 방법에 준하였고, 용해활성(lytic activity)는 다음과 같이 turbidity reduction rate를 이용하여 계산하였다. 효소 단위는 2시간 동안 흡광도를 10% 감소시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

$$\text{Lytic activity(LA)} = \frac{D_0 - D_t}{D_0 - D_e} \times 100$$

여기서, D₀ : 반응시간 0에서 반응 혼합물의 흡광도
 D_e : FDY(Freeze-Dried-Yeast) 현탁액 대신 증류수를 첨가한 반응혼합물의 흡광도
 D_t : 반응시간 t(120분)에서 반응 혼합물의 흡광도

균주의 동정

선발된 균주의 동정을 위하여 Shirling과 Gottlieb(7)의 실험방법에 따라 형태 및 생리·생화학적인 특성을 조사하였다. 추가로 API 20E 시스템을 이용하여 생화학적 성질들을 조사하였고, 균사 세포벽의 성분조사를 위하여 Lechevalier(8)의 실험방법에 따라 실험을 행하였다. 얻어진 실험결과들을 토대로 하여 Bergey' Manual(9)에 따라 균의 동정을 실시하였다.

효소의 생산조건 실험

균주를 이용한 담자포자 형성효모 세포벽 파괴효소 생산에 미치는 탄소원, 질소원 및 pH 값의 영향을 조사하기 위해서 효소 생산용 기본배지(yeast 2% ; K₂HPO₄ 1% ; MgSO₄·7H₂O 0.01% ; pH 7.0)에 각종 탄소원을 1%씩 그리고 각종 질소원을 0.2%씩 첨가한 배지를 조

제하고, 기본배지의 pH 값을 HCl과 NaOH 용액을 이용하여 pH 값 3에서부터 pH 값 12까지 조절한 배지를 각각 조제하였다. 준비된 배지에 기본배지에서 30°C에서 3일간 진탕배양된 St-1702 접종균주를 1%씩 접종하여 30°C에서 3일간 진탕배양 한 후 효소 활성을 측정하였다.

원형질체 형성 실험

선발된 효소 생산균주의 배양원액으로 네 종류의 담자포자 형성 효모들에 대한 원형질체(protoplast) 형성을 실험하기 위해서 YM 배지에서 15~18시간 배양한 네가지 효모배양액 10 ml을 Tris-HCl buffer(0.05M, pH 7.4)로 수차례 세척후, 0.6M KCl을 함유한 Tris-HCl buffer에 현탁 하였고, 1M 2-mercaptoethanol 0.2 ml을 첨가하여 30°C에서 15분간 전처리를 행한 후, 다시 buffer로 세척하여 효소액을 넣고 90분간 반응시켰다. 원형질체 형성 수율을 알아보기 위하여 Wilson(10)등의 방법에 의하여 형성된 원형질체를 증류수로 osmotic lysis를 시킨 후, 분광분석기 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Protoplast Yield(\%)} = \frac{A_{bo} - A_{bt}}{A_{bo}} \times 100$$

A_{bo} : 효소 처리전 세포 현탁액의 흡광도

A_{bt} : 효소 처리후 osmotic lysis 시킨 후 흡광도

결과 및 고찰**우수균주의 선정**

Double layer agar plate 배지를 이용한 균주의 1차 선별에서는 방선균류 1010개의 균주로부터 투명한 환의 크기가 4 mm 이상인 327개의 균주가 선발되었고, 토양 시료로부터는 166개의 균주가 선발되어 Table 1에서 보여주는 것과 같이 최종적으로 493개의 균주가 1차적으로 선발되었다. 또한 1차적으로 선발된 493개의 균주들을 대상으로 하여 생효모 한천 배지를 이용한 균주의 2차 선별에서는 투명한 환의 크기가 7 mm 이상인 117개의 균주가 선정되었다. 2차 선발된 117개의 균주를 대상으로 하여 실시된 용해활성 측정법을 이용한 균주의 3차 선별에서는 최종적으로 Table 1에 보여주는 것과 같이 용해활성도가 40~50 범위인 두 균주를 선발하였고 (St-1702, St-197), St-1702 균주를 계속적인 실험에 이용하였다.

분리 균주의 동정

분리균주 St-1702를 Bennet agar 배지에서 2주 이상 평판 배양과 slide 배양을 행하면서 spore chain을 광학 현미경과 전자 현미경으로 관찰한 결과, Fig. 1과 같이 spore chain은 spiral 형이었으며, spore surface는

smooth type이었으나 비늘과 같은 결조직을 보여 주었다. Shirling과 Gottlieb(7)의 여러가지 방선균용 배지에 균을 접종하고, 2주간 배양 후 균의 생육도, colony 모양, 균사의 색상 및 수용성 색소 등을 조사한 결과는 Table 2와 같았다. Oatmeal agar 배지를 제외하고 대부분의 배지에서 균의 생육은 양호하였으며, 포자의 형성도 양호하였고, 기균사의 색상은 3~4일은 흰색을 보이다가 7일 이후부터는 회색 및 검은색을 나타냈다. 분리된 균주의 분류학적 위치를 조사하기 위하여 Lechevalier (8)의 방법에 의하여 균사 세포벽의 성분조사를 실시한 결과, diaminopimelic acid(DAP)가 L,L 형이었으며, 단

당류 중 arabinose, galactose, xylose 등이 존재하지 않은 것으로 미루어 보아 St-1702 균주가 cell wall type I인 *Streptomyces* sp.임을 알 수 있었다. Table 3에서는

Table 1. Microorganisms producing cell wall lytic enzyme on basidiosporogenous yeast.

Primary screening		Secondary screening		Tertiary screening	
Range of clear zone	No. of isolate	Range of clear zone	No. of isolate	Range of L.A.*	No. of isolate
-	136	-	5	0~10	5
0	101	0	141	11~20	82
+	446	+	34	21~30	20
++	(291)	++	196	31~40	8
+++	(36)	+++	(117)	41~50	(2)
from soil	(166)				
Final No. of isolate	(493)	Final No. of isolate	(117)	Final No. of isolate	(2)

-: No colony
 0: No clear zone
 +: Clear zone with diameter of 1~3 mm
 ++: Clear zone with diameter of 4~6 mm
 +++: Clear zone with diameter of ≥7 mm
 *: Lytic activity

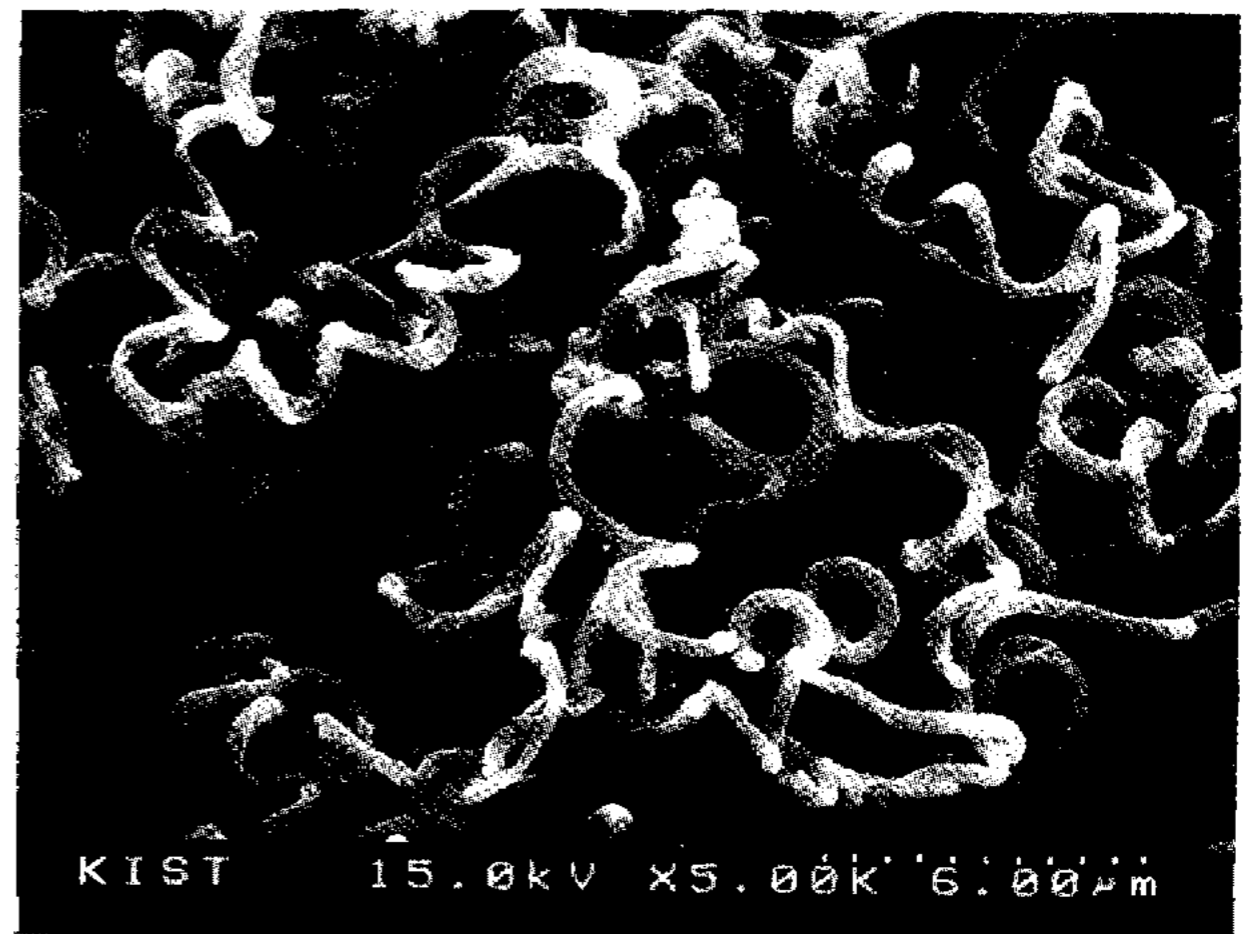
Table 2. Cultural characteristics of the strain St-1702.

Agar medium	Growth*	Aerial mycellium	Reversed color	Soluble pigment
Yeast-Malt extract	++	Pale-Yellow	Pale-Yellow	None
Oatmeal	±	Pale-Yellow	Pale-Yellow	None
Inorganic Salt-starch	++	Dark-Grey	Grey	None
Glycerol-asparagine	+++	Dark-Grey	Black-Green	Dark-Green
Bennet's	+++	Dark-Grey	Black-Green	Dark-Green
Tyrosine	+++	Dark-Grey	Black-Green	Dark-Green
Peptone-iron	++	Grey	Grey	None
Nutrient agar	+++	Grey	Dark-Green	None
Czapek's(Sucrose-Nitrate)	++	White-Grey	White-Grey	None
Glucose-asparagine	++	Grey	Grey	None
PDA(Potato-Dextrose Agar)	+++	Grey	Black	None
Standard Plate Count	+++	Grey	Black-Green	None

*Growth: +, Poor; ++, Moderate; +++, Excellent



(A) Spore surface



(B) Spore chain

Fig. 1. Morphological characteristic of *Streptomyces* sp. St-1702.

Streptomyces St-1702의 생리 생화학적 특성들의 조사 결과와 *Streptomyces eurythermus*의 문헌에 의한 특성들을 비교하여 보여주고 있다. Table 3에서 볼 수 있는 것과 같이 탄소원으로 L-rhamnose의 이용성 이외에는 모든 특성들의 조사에 있어서, St-1702 균주는 문헌에 의한 *Streptomyces eurythermus*의 특성들과 일치되는 결과를 보여주고 있다. 이러한 성질들 이외에 St-1702 균주의 최적 성장온도는 27~35°C이었고, 최적

Table 3. Comparison of physiological and biochemical characteristics of selected strain St-1702 with literature.

Test	St-1702	<i>St. eurythermus</i> (6)
Soluble pigment	+	+
Aerial mass color	black	black
Spore chain	spiral	spiral
Spore surface	smooth	smooth
Utilization of carbon compounds		
D-Glucose	+	+
D-Xylose	+	+
L-Arabinose	+	+
L-Rhamnose	+	-
D-Fructose	+	+
D-Galactose	+	+
Raffinose	+	+
D-Mannitol	+	+
<i>i</i> -Inositol	-	-
Salicin	-	-
Sucrose	+	+
Urease production	+	
Indole production	-	
Nitrate production	+	
H ₂ S production	+	
Streptomycin	inhibition	inhibition
NaCl tolerance	7%, but 10%	7%, but 10%

성장 pH는 8.0이었다. 또한, St-1702 균주는 cellulose 분해능을 가지고 있었고, starch, gelatin과 casein을 가수분해시키는 성질을 가지고 있었다.

효소의 생산조건 조사

St-1702 균주를 이용한 담자포자 형성효모 세포벽 파괴효소 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위해서 실시된 실험결과는 Table 4에서 보여주는 것과 같다. 기본배지에 glucose를 탄소원으로 첨가하였을 때 *Rhodotorula glutinis* 그리고 *Sporobolomyces salmonicolor*의 시험균에 대한 용해활성도는 탄소원을 첨가하지 않은 비교 균에 비하여 두배 내지 세배 증가된 용해 활성도를 보여주고 있다. *F. capsuligenum* 시험균에 있어서는 탄소원을 첨가하지 않은 비교 균에 있어서 의외로 높은 용해 활성도를 보여 주었으나 탄소원을 첨가한 구에서는 glucose를 첨가하였을 때 가장 높은 활성을 보여 주었고, *Rhodsp. toruloides* 시험균에 있어서는 탄소원을 첨가하지 않은 비교 균에 있어서 이미 높은 효소활성을 보여 주었으나 sucrose, lactose, galactose, glucose 그리고 cellobiose 첨가시 용해활성의 상승이 있음을 Table 4에서 볼 수가 있다.

질소원이 세포벽 분해효소 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시된 실험결과는 Table 5에서 보여주는 것과 같다. 4가지 시험균 중에서 *Rh. glutinis* 그리고 *Rhodsp. toruloides* 시험균에 대해서는 기본배지에 질소원으로 peptone을 첨가 하였을 때 가장 높은 세포벽 용해 활성도를 보여 주었고, *F. capsuligenum* 시험균에 있어서는 peptone과 (NH₄)₂CO₃와 같은 질소원을 첨가 하였을 때 가장 높은 효소 활성을 보여 주었다. *Sporobolomyces salmonicolor* 시험균에 대한 효소 활성은 질소원으로 (NH₄)₂CO₃를 첨가 하였을 때 가장 높은 용해 활성도를 보여주고 있음을 Table 5에서 알 수가 있다.

St-1702 균주를 이용한 담자포자 형성효모 세포벽

Table 4. Effect of carbon sources on the enzyme production of the strain St-1702.

Carbon source	Lytic activity (%) on test organism				Final pH-value of media
	<i>Rh. glutinis</i>	<i>Rhodsp. toruloides</i>	<i>F. capsuligenum</i>	<i>Sp. salmonicolor</i>	
D-Glucose	100	89	79	100	7.0
D-Galactose	32	93	63	74	6.9
Sucrose	51	100	5	75	7.4
Xylose	40	81	26	50	6.9
D-Raffinose	27	81	5	10	7.3
Cellobiose	47	88	5	30	6.6
Dextrin	75	81	5	8	7.1
Lactose	40	94	16	17	6.9
α -L-Rhamnose	87	81	5	85	7.0
None	64	81	100	30	7.3

Basal medium; Yeast 2%, K₂HPO₄ 1%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, pH 7.0

Table 5. Effect of nitrogen sources on the enzyme production of the strain St-1702.

Nitrogen source	Lytic activity (%) on test organism				Final pH-value of media
	<i>Rh. glutinis</i>	<i>Rhodsp. toruloides</i>	<i>F. capsuligenum</i>	<i>Sp. salmonicolor</i>	
Beef-extract	98	70	40	50	7.9
Meat-extract	42	46	37	2	7.6
Peptone	100	100	100	50	7.5
Yeast-extract	93	76	10	64	7.7
Tryptone	49	7	63	72	7.7
NH ₄ NO ₃	35	54	70	21	6.8
(NH ₄) ₂ SO ₄	30	35	57	12	6.7
CH ₃ COONH ₄	26	79	57	25	8.8
(NH ₄) ₂ CO ₃	79	39	100	100	8.6
None	47	76	33	56	7.8

Basal medium; Yeast 2%, K₂HPO₄ 1%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, Glucose 1%, pH 7.0

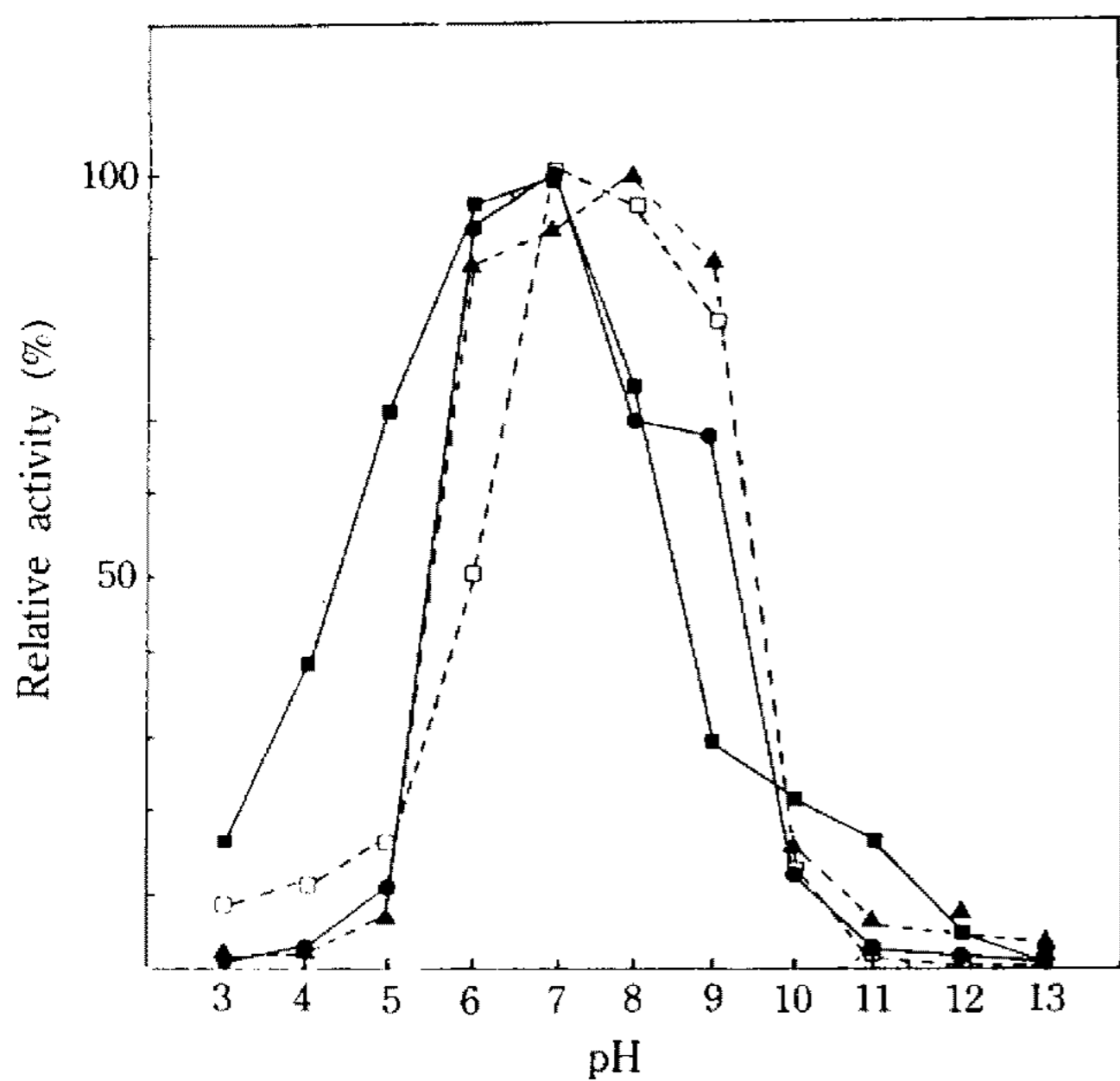


Fig. 2. Effect of initial pH-value of media on the basidiospore yeast cell wall lytic enzyme production.

- ; Lytic enzyme action on *Rh. glutinis*.
- ; Lytic enzyme action on *Rhodsp. toruloides*.
- ▲-▲; Lytic enzyme action on *F. capsuligenum*.
- ; Lytic enzyme action on *Sp. salmonicolor*.

분해효소 생산에 미치는 pH 값의 영향을 조사하기 위하여 실시한 실험에서 4가지 시험균에 대한 효소활성을 측정된 실험 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 배지의 초기 pH 값이 5에서부터 9까지의 범위에서 4가지 시험균에 대한 일반적인 효소활성을 보여 주었는데, 시험균 *Rh. glutinis*에 대하여 활성을 나타내는 최적 pH 값은 pH 6~8 범위이었고, *Rhodsp. toruloides* 시험균에 대한 최적 pH 값은 pH 6~7, 그리고 *F. capsuligenum* 및 *Sp. salmonicolor* 시험균에 대한 최적 pH 값은 각각 pH 7~9과 pH 7~8 범위이었다.

이상과 같은 효소 생산에 미치는 탄소원, 질소원 그

Table 6. Selected medium and culture condition for the production of cell wall lytic enzyme.

Medium	Yeast (FDY)*	2.0%
	K ₂ HPO ₄	1.0
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
	Glucose	1.0
	Peptone	0.5
	(NH ₄) ₂ CO ₃	0.2
Initial pH		7.0
Temperature		30°C
Culture;	50 and in 250 ml Erlenmeyer flask	
Agitation;	Controlled environment incubation shaker at 110 rpm	

*FDY: Freeze-Dried-Yeast

리고 pH 값의 영향을 조사한 결과, St-1702 균주를 이용한 담자포자 형성효모 세포벽 파괴효소 생산 최적 배지가 Table 6과 같이 freeze dried yeast 2%, glucose 1%, K₂HPO₄ 1%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, peptone 0.5%, (NH₄)₂CO₃ 0.2%, 초기 pH 값 7.0의 배지로 선정되었으며, Table 6과 같이 선정된 효소 생산 최적 배지 및 배양방법은 이후의 모든 효소의 분리 및 특성조사 연구에 사용되는 효소를 생산하는 배지로서 이용되었다.

효소생성곡선

선정된 효소생산 최적배지를 이용하여 배양 시간에 따른 4가지 시험균에 대한 세포벽 분해효소의 활성을 알아보기 위해서 효소 생산용 배지(Table 6)에 St-1702 균주를 접종한 후 30°C에서 5일간 진탕배양 하면서 각각의 효소 활성을 조사해 본 결과는 Fig. 3에서 보여주는 것과 같다. 4가지 시험균 효모에 대한 세포벽 분해효소 활성은 배양시작 후 30~36시간 사이에 효소활성이 급격히 증가하는 양상을 보여주었으며, 각각의 최적 활성 범위는 *Rh. glutinis*, *Rhodsp. toruloides*, *F. capsuli-*

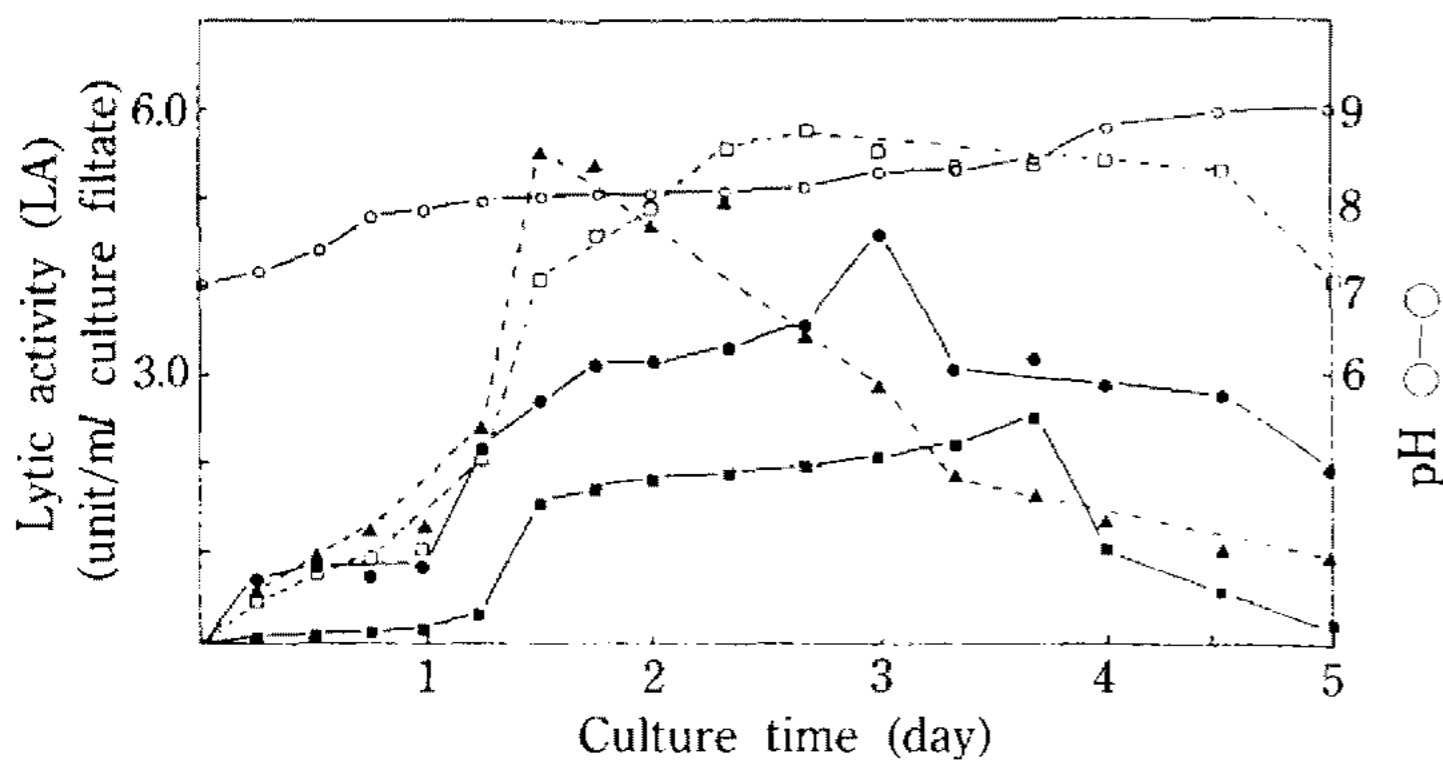


Fig. 3. Cultivation course of lytic enzyme production of St-1702 strain in selected medium on basidiosporogenous yeasts.

- ; Lytic enzyme action on *Rh. glutinis*.
- ; Lytic enzyme action on *Rhodsp. toruloides*.
- ▲-▲; Lytic enzyme action on *F. capsuligenum*.
- ; Lytic enzyme action on *Sp. salmonicolor*.

Table 7. Comparison of protoplast yield (%) between the selected culture broth and the commercial products.

Enzyme	Protoplast yield (%) on test organism			
	<i>Rh. glutinis</i>	<i>Rhodsp. toruloides</i>	<i>F. capsuligenum</i>	<i>Sp. salmonicolor</i>
Culture broth	46	59	100	46
Novozyme	10	9	94	15
Lycozyme	20	5	80	2
Lysozyme	40	0	3	23
Zymolyase	20	14	80	12

genum, *Sp. salmonicolor*의 순으로 72시간, 88시간, 36시간, 40시간이었으며, 특히 *Sp. salmonicolor* 대해서는 36시간 이후부터 108시간까지 지속적인 효소활성을 보여 주었다. 효소생산 배지의 pH 값은 pH 값 7에서 9까지 상승하였고, 일반적으로 pH 값 8 부근에서 가장 높은 효소 활성을 보여 주었다(Fig. 3 참조).

효소에 의한 원형질체 형성

선발된 효소 생산균주의 배양원액과 시판되고 있는 4가지 효모 세포벽 분해효소(Novozym 234 ; Lycozyme, Kyowa Lot 105 ; Lysozyme, Sigma 6876 ; Zymolyase 20T, Seikagaku Code N01120491)를 가지고 네 종류의 담자포자 형성 효모들에 대한 원형질체 형성을 실험을 실시한 결과는 Table 7에서 보여주는 것과 같다. 4가지 시판 효소들은 0.6 mg/ml의 농도로 증류수로 희석하여 배양원액과 비교 하였다. 선발된 효소 생산균주 St-1702를 선정된 효소생산 최적배지에 키운 배양원액은 시판되고 있는 4가지 세포벽 분해효소에 비하여 제일 높은 원형질체 형성률을 나타내고 있음을 Table 7에서 볼 수가 있다.

요 약

담자효모 세포벽을 분해하는 효소 생산균의 탐색을 위하여 50여 토양시료와 방선균 1000여개의 미생물을 가지고 3차에 걸친 탐색작업을 실시한 결과 1차적으로 autolysed washed yeast 배지 위에서의 투명한 생성 크기로 493개 균주를 선발하였으며, 이 균주들을 2차적으로 생효모 한천배지 위에서의 투명한 생성 크기로 117개 균주를 선발 하였다. 선발된 균주들을 가지고 용해활성도의 측정방법을 이용하여 최종적으로 St-1702 균주가 선발되었고, St-1702 균주는 동정 실험결과 잠정적으로 *Streptomyces eurythermus* 또는 그 유연균으로 동정되어졌다. St-1702 균주를 이용하여 효소생산 최적조건을 조사한 결과 최적배지 및 배양조건은 다음과 같았다 : freeze dried yeast 2%, glucose 1%, K_2HPO_4 1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%, peptone 0.5%, $(NH_4)_2CO_3$ 0.2%, 초기 pH 값 7.0의 배지 및 30°C에서 3일간 배양. 최적배지에서 선발균주를 배양한 배양액을 이용하여 담자효모들의 원형질체 형성 실험을 한 결과 시중에서 구입된 효모 세포벽 분해 효소들보다 더 높은 원형질체 형성률을 보여 주었다.

참고문헌

1. Tanaka, H. and H.J. Phaff. 1965. Enzymatic hydrolysis of yeast cell walls. I. Isolation of wall decomposing organisms and separation and purification of lytic enzymes. *J. Bacteriol.* **89**: 1570-1580.
2. 蓮尾徹夫, 藤川栽昭, 山本奈美, 齋藤和夫, 參沼誠. 1974. 活性汚泥油出液中의 酵母溶解菌 増殖 促進物質. *釀協* **79**: 517-522.
3. Yokotsuka, K., S. Goto, I. Yokotsuka and T. Kushida. 1974. Isolation and identification of microorganisms capable of lysing yeast cells. *J. Ferment. Technol.* **52**: 701-705.
4. Murano S., R. Yamamoto and M. Arai. 1976. Isolation and identification of red yeast cell wall lytic enzyme producing microorganism. *Agr. Biol. Chem.* **40**: 23-26.
5. Murano S., T.H. Lee and M. Arai. 1978. Identification of a bacterium which produced cell wall lytic enzyme for red yeast and purification of the enzyme. *J. Ferment. Technol.* **56**: 472-476.
6. 이태호. 1982. 적색효모 세포벽 용해효소의 기질 특이성에 관한 연구. *한국산업미생물학회지* **10**: 245-252.
7. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1974. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313.
8. Lechevalier, M.P. 1988. *J. Lab. Clin. Med.* **71**: 934.
9. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Pp. 764-765. 8th ed. The Williams Wilkins Co., U.S.A.
10. Wilson, J.J., G.G. Khachatourians and W.M. Ingledew. 1982. *Molec. Gen. Genet.* **186**: 95.

(Received 1 December 1995)