

Penicillium oxalicum(HCLF-34)으로부터 남조세균 (*Anabaena cylindrica*) 분해효소의 분리 및 동정

현성희* · 이호용¹ · 최영길²

을지의과대학교 의예과, ¹상지대학교 생명과학과, ²한양대학교 자연과학대학 생명과학과

Penicillium oxalicum(HCLF-34)의 세포외 분비효소로부터 ultrafiltration, gel filtration chromatography와 anion exchange chromatography법을 이용하여 남조세균(*Anabaena cylindrica*) 분해효소를 분리하였다. 이 효소의 분자량은 약 22 kDa이며, renaturation SDS-PAGE에서 monomer로서 남조세균 분해 활성을 갖는다. 아미노산 서열은 N-말단부터 NH₂-Glu-Ser-Tyr-Ser-Ser-Asn-Ala-Ala-Gly-Ala-Val-Leu-Ile---, 13개의 아미노산을 분석하였으며, 분석된 아미노산의 homology를 조사한 결과 aspergillopepsin II precursor(acid protease A)와 13개의 아미노산 중 11개(84%)의 유사도를 나타내었고, acid proteinase EapC precursor과 13개 중 10개(81%)의 유사도를 나타내었다.

Key words □ acid proteinase, algal lytic enzyme, renaturation SDS-PAGE

서 론

일반적으로 미생물은 생장을 위하여 한 가지 이상의 세포벽 분해효소를 합성하는 것으로 알려져 있으며, 대개의 경우 세포벽 분해효소는 염기성 단백질(basic protein)이기 때문에 SDS를 처리하지 않으면 전기영동상 전개에 어려움이 있는 것으로 알려져 있다(19). 따라서 이들 효소의 특성을 규명하는데 있어서 renaturing SDS-PAGE는 매우 유용한 방법으로 알려져 있고(7), 실제로 많은 연구자들이 이 방법을 이용하여 세균 분해효소의 특성을 연구한 바 있다(2,23). 한편, 본 연구자들에 의해 분리 및 동정된(9,10,11) *Penicillium oxalicum*(HCLF-34)은 다른 감염성 진균들과 함께 농작물 중 옥수수, 고구마, 토마토 등에 병해를 일으키는 것으로 보고(21) 되었다. 현재 이러한 진균류의 특이적 방제 및 항 진균제에 대한 내성균의 출현을 억제하기 위하여 최근 진균만의 특성인 포자발아, 진균 세포벽 생합성 기작 및 식물세포벽 분해 효소의 활성에 대한 억제 물질의 개발 등에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다(15,24). 이러한 특성으로 농작물에 감염하는 진균류 중 *Penicillium* sp.들이 분비하는 chitinase, glycerol oxidase와 alpha-galactosidase(5), serine proteinase(26), xylanase(2), phospholipase B(14), beta-glucanase와 alkaline protease(1), thermostable acid protease(6) 등의 분리 및 특성에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 또한 *Penicillium* spp.는 autolysis를 일으키는 galactanase(17), beta-glucanase(4), chitinase(18) 등을 분비하는 것으로 알려져 있다. 그러나 진균류들이 분비하는 효소에 의한 남조세균 분해에 관

한 연구는 전무한 실정이다. 그러므로, 본 연구자들에 의해 분리된 *P. oxalicum*(HCLF-34)은 선행된 연구결과로부터 남조세균 분해 활성이 높고, 온도에 안정한 남조세균 분해효소를 세포외로 분비하는 것으로 밝혀졌으므로, 그 효소를 분리 및 정제하고, 특성을 밝힘으로서 남조세균의 대발생을 제어하는 효소의 개발에 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

분해 효소의 농축

세포외 분비 효소는 PDB배지 50 ml에서 전 배양한 *P. oxalicum* (HCLF-34)을 동일배지 1 l에 집중하여 대수 생장기까지 배양한 후 Whatman No 1, 0.45 μm, 0.2 μm pore size의 membrane filter로 순차적으로 여과한 배양 상등액을 미세투과장치(Amicon ultrafiltration unit)와 Diaflo PM 300, PM 100, PM 50, YM 30, YM 10, YM 3 membrane filter를 이용하여 질소가스로 4.2 bar의 압력을 가하여 분자량별로 300, 100, 50, 30, 10, 3 kDa이상의 세포외 분비 효소를 각 fraction별로 분획하였다. 100 ml 씩 분취 및 농축된 효소용액은 1차적으로 20% ammonium sulfate를 넣어 4°C에서 2시간 동안 포화 시킨 후 다시 80% ammonium sulfate를 넣고 4°C에서 10시간 동안 2차 포화 시켜 단백질을 침전시켰다. Ammonium sulfate 처리 후 원심분리(10,000×g, 20 min, 4°C)하여 얻은 침전물을 10 ml의 20 mM Tris/HCl(pH 7.5) 완충용액에 현탁하여 dialysis tube (Spectra/Por membrane tubing; Molecular weight cut off of 3,500 Dalton)에 넣고 2 l의 동일 완충용액으로 2회 삼투한 후 원심분리(10,000×g, 20 min, 4°C)하여 얻은 상등액을 냉동건조기(FD5508, Ilsin Engineering Co., Korea)를 이용하여 세포외 분비 효소를 얻었다. 세포내 효소는 상기의 배양액 1 l에서 얻

*To whom correspondence should be addressed
Tel: 042-259-1074, Fax: 042-259-1047
E-mail: hyunsh@emc.eulji.ac.kr

어진 *P. oxalicum*(HCLF-34)의 균체에 100 ml의 20 mM Tris/HCl(pH 7.5) 완충용액을 첨가하여 ice bath를 장착한 bead beater에서 15초씩 10회 반복 파쇄한 후 Whatman No 1, 0.45 μ m, 0.2 μ m pore size의 membrane filter로 순차적으로 여과하여 세포의 분비효소와 동일한 방법으로 세포내 효소를 준비하였다.

SDS PAGE 및 renaturing SDS PAGE

농축된 단백질의 분자량 분포를 확인하기 위하여 Hoefer사의 SE600 전기영동장치를 이용하여 Laemmli(1970)의 방법으로 진행하였다. 전기영동은 0.1% SDS를 함유하는 Tris-glycine 완충용액(0.02 M Tris, 0.192 M glycine, pH 8.3)을 사용하였으며, Stacking gel은 5% acrylamide, 0.133% bisacrylamide, 0.125 M Tris/HCl(pH 6.8), 0.1% SDS, 0.5% N,N,N',N'-tetramethylethylene-diamine(TEMED), 0.05% ammonium persulfate를 혼합하여 준비하였다. Separating gel은 13% acrylamide, 0.54% bisacrylamide, 0.375 M Tris/HCl(pH 8.8), 0.1% SDS, 0.0% TEMED, 0.05% ammonium persulfate를 혼합하여 이용하였고, sample loading buffer로는 0.0625 M Tris/HCl(pH 6.8), 1.0% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 0.04% bromophenol blue, 10% glycerol를 섞어 사용하였다. 전기영동은 4°C의 저온실에서 진행하였으며, stacking gel에서는 20 mA/cm²의 전류세기로, separating gel에서는 30 mA/cm²의 전류세기로 전개하였다. 전기영동 후 gel을 증류수로 2회 세척하고, Coomassie brilliant blue R-250(Bio-Rad)로 30°C 진탕 배양기에서 6시간 동안 염색 후 40% methanol/ 7% acetic acid로 2시간 동안 1차 탈염색하고, 5% methanol/ 7% acetic acid로 2차 탈염색하였다. 농축된 단백질 중 남조세균 분해 효소의 특성을 갖는 요소의 분자량을 확인하기 위하여 세포벽 분해효소에 대한 민감도가 높은 것으로 알려진 *M. luteus*를 기질로 하는 renaturing SDS-PAGE 방법(3, 7, 22)을 이용하여 남조세균 분해 효소를 탐색하고자 하였다. Separating gel에 0.4%의 냉동건조된 *M. luteus*(Sigma)를 첨가하여 사용하였으며, 전기영동 후 gel은 300 ml의 증류수(18M Ω , Milli-Q water)로 15분간씩 2회 세척한 후 150 ml의 renaturing buffer(0.1% Triton X-100, 10 mM MgCl₂/20 mM Tris/HCl, pH 4.5)에 넣어 37°C 진탕배양기에서 50 rpm으로 약 12시간 동안 반응시켰다.

Gel filtration chromatography

농축된 효소를 14 mg/ml의 농도로 20 mM Tris/HCl(pH 7.5) 완충용액에 용해시켜 원심분리(12,000 \times g, 10 min, 4°C)하여 상등액을 효소 분리에 사용하였다. 분석기기는 Pharmacia FPLC system(Pharmacia LKB · Controller LCC-500, Pump P-500, Monitor UV-M)을 사용하였으며, 분석 조건은 flow rate: 0.3 ml/min, column temperature: 4°C, buffer: 20 mM Tris/HCl(pH 7.5), loading: 500 μ l이고, column은 Superdex HR-75 (Pharmacia) gel filtration column을 사용하여 분리하였다. 분리한 효소 fractions은 0.2% *M. luteus*를 포함하는 agar plate에 점적하여 lytic activity를 1차 확인하고, renaturation SDS-PAGE

로 분석하였다.

Mono-Q anion exchange chromatography

Gel filtration chromatography에서 얻어진 fractions을 *M. luteus* agar plate에 점적시켜 lytic zone을 형성하는 fraction을 선별하여, 최종 단백질 농도 0.8 mg/ml로 20 mM Tris/HCl(pH 7.5) 완충용액에 용해시켜 원심분리(12,000 \times g, 10 min, 4°C)하여 상등액을 효소 분리에 사용하였다. 단백질을 column에 흡착시키기 위하여 20 mM Tris/HCl(pH 7.5) 완충용액을 사용하였고, 흡착된 단백질의 분리는 0~1 M NaCl(20 mM Tris/HCl, pH 7.5) 완충용액을 gradient로 사용하였다. 분석기기는 Pharmacia FPLC system(Pharmacia LKB · Controller LCC-500, Pump P-500, Monitor UV-M)을 사용하였으며, 분석 조건은 flow rate: 1 ml/min, column temperature: 4°C, loading: 500 μ l이고, column은 mono-Q(Pharmacia) anion exchange column을 사용하여 분리하였다. 분리 및 정제의 결과는 renaturation SDS-PAGE로 분석하였다.

Amino acid 서열분석 및 동정

Mono-Q anion exchange chromatography에서 얻어진 fraction을 SDS-PAGE 한 후, gel을 blotting buffer인 25 mM Tris buffer(192 mM glycine in 20% methanol, pH 8.5)에 5분 동안 세척하고, PVDF membrane(BIO-RAD, Sequi-Blot TMPVDF membrane, 0.2 μ m, polyvinylidene fluoride)은 실험전에 100% methanol에서 2~3 초간 세척한 후, 증류수(18 Ω , Milli-Q H₂O)로 세척하고 Towbin transfer buffer에서 보관하였다. Gel은 blotting paper(BIO-RAD)와 PVDF membrane사이에 넣고, blotting 장치(BIO-RAD, Trans-Blot Cell)에서 10 V로 30분 동안 transfer 하였다. Blotting이 끝난 후 PVDF membrane은 3차 증류수로 세척하여 0.1% Ponceau S(Sigma) solution으로 2분간 염색한 후 3차 증류수로 탈색시키고, 자연건조시켜 -20°C에서 보관하였다. Electroblothing한 PVDF membrane상에서의 band를 10 \times 3 mm 크기로 잘라내어, 분석은 PTH analysis(program O3RPTH)를 장착한 Applied Biosystems model 470 sequenator를 사용하였으며, PTH 유도체는 reverse-phase HPLC(Brownlee C-18 column, 220 \times 2.1 mm)를 사용하여 Edman reaction 방법으로 측정하였다.

결 과

분해 효소의 분자량 결정

Ultra-filtration membrane을 이용하여 분자량별로 농축한 단백질은 SDS-PAGE(Plate 1)에서 분자량에 따라 동일한 band들이 모든 fraction에서 관찰되었다. 이 band는 특히 YM 50, YM 30, YM 10 fractions에서 가장 많은 양이 나타났고, PM 300과 세포내 단백질 fractions에서는 거의 확인 되지 않았다. Renaturation SDS-PAGE(Fig. 1)에서는 효소의 활성을 높이기 위해 renaturation buffer의 pH를 *P. oxalicum*(HCLF-34)의 최적 조건인 4.5로 조절하여 사용하였으며, 모든 fractions에서 동일한

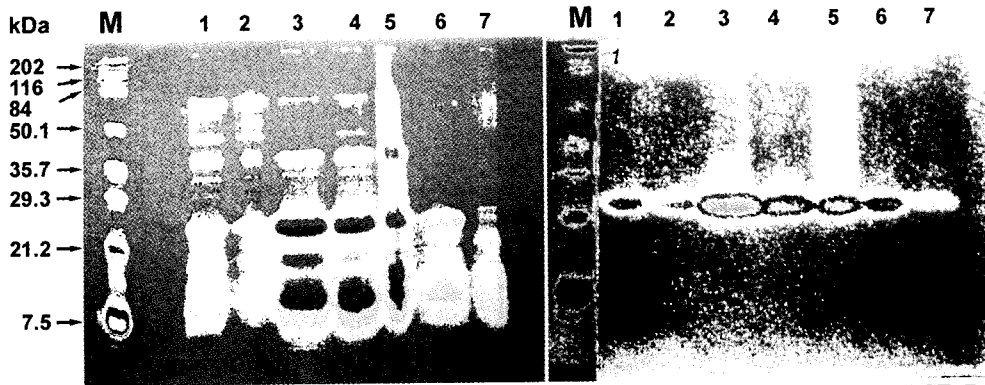


Fig. 1. Disc gel electrophoresis patterns of extra and intra cellular enzyme from *P. oxalicum*(HCLF-34). A; SDS-PAGE, B; Renaturation SDS-PAGE, showing renaturable proteins that digest *Micrococcus. luteus* vegetative cells. Lanes : M, Marker proteins; 1, cut off extracellular enzyme by PM 300 ultrafiltration membrane; 2, PM 100; 3, PM 50; 4, YM 30; 5, YM 10; 6, YM 3; 7, intracellular enzyme.

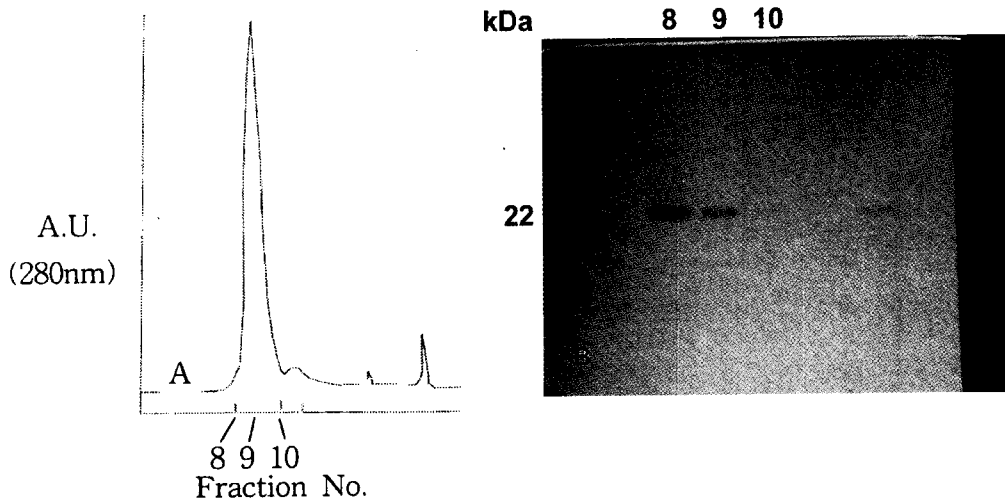


Fig. 2. Profiles of gel filtration chromatography fractions of ultrafiltration (YM 50-YM 10) and renaturation SDS-PAGE. A, Chromatography profiles; B, Renatur-ing SDS-PAGE. Lanes : M, Marker proteins; 8-10, fraction numbers.

위치에서 효소활성 bands를 확인되었고, SDS-PAGE에서와 같이 Rf값에 의한 분자량은 약 22 kDa이었다. 모든 fractions에서 나타난 lytic band중 YM50, YM30, YM10 fractions에서 가장 높은 효소활성 bands가 관찰되었다.

Gel filtration chromatography

Elution은 28개의 튜브에 분당 1 ml씩 elution하였고, 4개의 peaks들이 관찰되었으며, elution time 8-10분 사이에 가장 큰 peak를 형성하였으며, 16~17, 21분에 각각 peak를 형성하였다 (Plate 2). 28개의 elution fractions에서 lytic activity를 나타내는 fractions를 찾기 위해 0.4% *M. luteus*를 포함하는 agar plate에 지름 5 mm의 멸균된 Whatman No. 1 filter paper를 부착시키고, 각 fraction에서 10 µl씩 점적하여 25°C 항온 배양기에서 12 시간 동안 배양한 결과 fraction 8, 9, 10번에서 높은 activity가 관찰되었고, fraction 11~13번에서 중등도의 activity가 관찰되었으며, fraction 16~17번에서 약한 activity, 그리고 fraction 21번에서는 lytic activity가 관찰되지 않았다. Renaturation SDS-PAGE는 fraction 8번과 9번에서 뚜렷한 lytic

band를 관찰하였다(Fig. 2).

Mono Q anion exchange chromatography

Gel filtration chromatography fraction 중 8번 fraction을 사용하여 23개의 튜브에 분당 1 ml씩 elution하였고, 4개의 peaks들이 fraction time 7~11분 사이에 관찰되었으며, 8분에 가장 큰 peak를 형성하였다(Plate 3). 전체 23개의 fraction tubes에서 lytic activity를 나타내는 fractions를 찾기 위해 0.4% *M. luteus*를 포함하는 agar plate에 지름 5 mm의 멸균된 Whatman No. 1 filter paper를 부착시키고, 각 fraction에서 10 µl씩 점적한 결과, fraction 8번에서 강한 lytic activity가 관찰되었고, 9번에서 약한 lytic activity가 관찰되었다. Renaturation SDS-PAGE는 fraction 8번에서 뚜렷한 lytic band가 관찰되었다(Fig. 3).

Amino acid 서열분석 및 동정

효소의 분리정제 과정에서 시행한 SDS-PAGE와 renaturation SDS-PAGE의 결과로 남조세균 분해 활성을 갖는 *P. oxalicum* (HCLF-34)로부터 분리되는 세포외 단백질은 약 22 kDa의 단백질

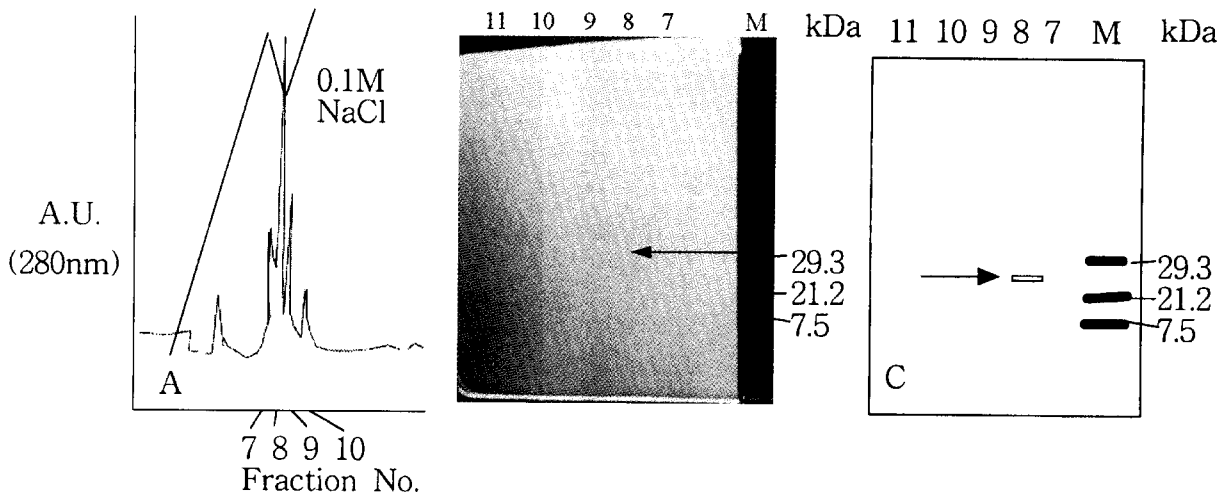


Fig. 3. Profiles of mono-Q anion exchange chromatography and renaturation SDS-PAGE. A; Chromatography profiles, B; Renaturing SDS-AGE gel. Lanes : M, Marker proteins; 7-11, fraction numbers, C; Schematic diagram of B.

a 41 P P Y I P G S D K E I L K L N G T T N E E Y S S N W A G A V L I G D G Y T K V T
 b 45 T N S E G V A I D A A E S R N D T T N V E Y S S N W A G A V L I G S G Y K S V T
 c (1) · E S Y S S N A A G A V L I · (13)

Fig. 4. Homology search of 13 amino acids of algal lytic enzyme(22 kDa) from *Pericillium oxalicum* (HCLF-34). a; aspergillopepsin II precursor, b; acid proteinase eapC precursor, c; isolated protein in this work, E S Y S S N A A G A V L I; homology region.

질이였으며, PVDF membrane에 blotting하여 아미노산 서열을 분석한 결과 N-말단부터 13개의 아미노산을 분석하였다(Fig. 4). 분석한 13개의 아미노산 서열은 미국 NIH의 gene bank인 blastp로 homology를 조사한 결과 aspergillopepsin II precursor(acid protease A)와 13개의 아미노산 중 11개(84%)의 유사도를 나타내었고, acid proteinase eapC precursor과 13개 중 10개(81%)의 유사도를 나타내었다(Fig. 4).

고찰

남조세균의 생장을 억제하는 세균은 많은 연구자들(8, 20)에 의해 진행되고 있으나, 효소의 특성에 관한 연구와 세포외로 분비되는 효소에 의한 남조세균의 세포벽을 분해하는 세균에 대한 보고는 미비하며, 특히 곰팡이(16)에 대한 연구는 전무한 실정이다. 본 연구에서 Ultra-filtration membrane을 이용하여 분자량별로 농축한 단백질은 *M. luteus*를 기질로 이용한 renaturation SDS-PAGE(Fig. 1)와 남조세균 세포벽 분해실험(9,10,11)에서 효소 활성을 나타내는 약 22 kDa의 단량체 단백질이었다. 효소의 활성을 극대화 하기 renaturation buffer의 pH를 *P. oxalicum*(HCLF-34)의 최적 성장 조건인 4.5로 조절할 결과 이전에 보고된 pH 7.2(25)의 renaturation buffer보다 좋은 해상력을 나타내었다(Fig. 1,2,3). *P. oxalicum*은 주로 β -glucanase (17,4), chitinase(18), alkaline protease(1), thermos-table acid protease(6) 등을 분비하는 것으로 알려져 있으며, 본 연구에서 분리 및 정제한 남조세균 분해 효소는 N-말단으로부터 13개의 아미노산 서열(NH₂-Glu-Ser-Tyr-Ser-Ser-Asn-Ala-Gly-Ala-Val-Leu-Ile-)을 갖는 것으로 분석되었으며, 아미노산 서열의

유사도를 검색한 결과 aspergillopepsin II precursor(12)의 60~72번 아미노산과 84%(11/13)의 유사도를 나타내었으며, acid proteinase eapC precursor(13)의 66~76번 아미노산과 81%(10/13)의 유사도를 나타내었다(Fig. 4). Aspergillopepsin II precursor와 acid proteinase eapC는 acid proteinase계통의 물질로서 chesses 제조과정시 우유를 응결시키는 aspartic proteinase의 일종이며, 상품명은 proctase로 부른다(13). Aspergillopepsin II precursor는 *Aspergillus niger*에서 분비되며, aspartic acid proteinase family에 속하면서 여러 가지 다른 특징을 갖는다. 전통적인 pepsin type acid 혹은 aspartic proteinase와 달리 분자량은 약 20 kDa 이며, 282개의 아미노산으로 구성된 전효소이고, N-말단에 59개의 preprosequence를 갖으며, 39개의 아미노산으로 구성된 light chain과 173개의 아미노산으로 구성된 heavy chain의 두가지 mature form을 형성하고, light chain과 heavy chain사이에 11개의 intervening sequence를 갖는다(12). 본 연구에서 분리한 효소와의 유사도는 mature form인 light chain의 N-말단과 11개의 아미노산 서열이 일치하였다. Acid proteinase eapC precursor는 밤나무 부패 곰팡이인 *Cryphonectria parasitica*가 분비하는 269개의 아미노산으로 구성된 전효소이고, N-말단에 63개의 preprosequence를 갖으며, 206개의 아미노산으로 구성된 mature form을 형성한다(13). 본 연구에서 분리한 효소와의 유사도는 mature form의 N-말단부터 10개의 아미노산 homology를 나타내었다. 비교된 단백질의 preprosequence는 세포 내부에서 형성된 미성숙 단계의 단백질로서 세포 외로 분비된 형태는 mature type의 단백질이다. 그러므로, 본 연구에서 분리한 단백질은 세포외 분비 형태로서 mature type 단백질의 아미노 말단과 유사도를 나타내었다.

이상과 같은 결과로 본 연구에서 *P. oxalicum*(HCLF-34)으로부터 분리한 남조세균 분해 효소는 renaturation SDS-PAGE의 결과로부터 monomer로서 효소 활성을 갖는 acid proteinase계통의 단백질로 확인되었고, *Penicillium* spp.에서 아미노산 서열이 보고된바 없는 acid proteinase 계통의 효소로 판단된다. 앞으로 분자생물학적 연구방법을 이용하여 효소의 전체 아미노산 서열 또는 DNA서열을 밝힘으로서 남조세균 대발생의 생물학적 제어 방법 개발에 대한 기초자료를 제공하게 되었다.

참고문헌

1. Abbas, C.A., S. Groves, and J.E. Gander. 1989. Isolation, purification, and properties of *Penicillium charlesii* alkaline protease *J. Bacteriol.* 171, 5630-5637.
2. Belancic, A., J. Scarpa, A. Peirano, R. Diaz, J. Steiner, and J. Eyzaguirre. 1995. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes, *Abstr. J. Biotechnol.* 15, 71-79.
3. Buist, G., J. Kok, K.J. Leenhouts, M. Dabrowska, G. Venema, and A.J. Haandrikman. 1995. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation *J. Bacteriol.* 177, 1554-1563.
4. Copa-Patino, J.L., F. Reyes, and M.I. Perez-Leblic. 1989. Purification and properties of a 1,3-beta-glucanase from *Penicillium oxalicum* autolysates *FEMS Microbiol. Lett.* 53, 285-291.
5. Dey, P.M., S. Patel, and M.D. Brownleader. 1993. Induction of alpha-galactosidase in *Penicillium ochrochloron* by guar gum, *Abstr. Biotechnol. Appl. Biochem.* 17, 361-371.
6. Emi, S., D.V. Myers, and G.A. Jacobucci. 1976. Purification and properties of the thermostable acid protease of *Penicillium duponti* *Biochemistry* 24, 842-848.
7. Foster, S.J. 1992. Analysis of the autolysins of *Bacillus subtilis* 168 during vegetative growth and differentiation by using renaturing polyacrylamide gel electrophoresis *J. Bacteriol.* 174, 464-470.
8. Fraleigh, P.C. and J.C. Burnham. 1988. Myxococcal predation on cyanobacterial populations: Nutrient effects *Limnol.* 33, 476-483.
9. Hyun, S.H., J.Y. Soung, and Y.K. Choi. 1997. Isolation and Identification of Fungi that Inhibiting the Growth of Cyanobacteria *Korean J. Environ. Biol.* 15(2), 185-193.
10. Hyun, S.H. and Y.K. Choi. 1998. Lysis of *Anabaena cylindrica* by Extracellular Enzymes of *Penicillium oxalicum* (HCLF-34) *Korean J. Environ. Biol.* 16(2), 157-167.
11. Hyun, S.H. and Y.K. Choi. 1999. Characteristics of the cell wall lytic enzyme of *Anabaena cylindrica* from *Penicillium oxalicum* (HCLF-34) *Korean J. Microbiol.* 35(3), 231-236.
12. Inoue, H., T. Kimura, O. Makabe, and K. Takahashi. 1991. The gene and deduced protein sequences of the zymogen of *Aspergillus niger* acid proteinase A *J. Biol. Chem.* 266, 19484-91489.
13. Jara, P., S. Gilbert, P. Delmas, J.C. Guillemot, M. Kaghad, P. Ferrara, and G. Loison. 1996. Cloning and characterization of the eapB and eapC genes of *Cryphonectria parasitica* encoding two new acid proteinases, and disruption of eapC *Mol. Gen. Genet.* 250, 97-105.
14. Okumura, T., S. Kimura, and K. Saito. 1980. A novel purification procedure for *Penicillium notatum* phospholipase B and evidence for a modification of phospholipase B activity by the action of an endogenous protease *Biochim. Biophys. Acta.* 22, 264-273.
15. Omura, S. 1992. Trends in the search for bioactive microbial metabolites *J. Indust. Microbiol.* 10, 135-156.
16. Redhead, K. and S.J.L. Wright. 1978. Isolation and properties of fungi that lyse blue-green algae *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 962-969.
17. Reyes, F., C. Alfonso, M.J. Martinez, A. Prieto, F. Santamar, and J.A. Leal. 1992. Purification of a new galactanase from *Penicillium oxalicum* catalysing the hydrolysis of beta-(1-5)-galactofuran linkages *Biochem. J.* 281, 657-660.
18. Rodriguez, J., J. L. Copa-Patino, and M.I. Perez-Leblic. 1995. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium oxalicum* autolysates *Let. Appl. Microbiol.* 20, 46-49.
19. Rogers, H.J., H.R. Perkins, and J.B. Ward. 1980. *Microbial Cell Walls and Membranes*, p. 437-456. Chapman & Hall, London.
20. Sallal, A.K.J. 1994. Lysis of cyanobacteria with *Flexibacter* spp. isolated from domestic sewage *Microbios.* 77, 57-67.
21. Shah, D.M., C.M.T. Rommens, and R.N. Beachy. 1995. Resistance to diseases and in transgenic plants: progress and applications to agriculture *Trends Biotech.* 13, 362-368.
22. Sugai, M., H. Koike, Y.M. Hong, Y. Miyake, R. Nogami, and H. Suginaka. 1989. Purification of a 51 kDa endo-β-N-acetylglucosaminidase from *Staphylococcus aureus* *FEMS Microbiol. Lett.* 61, 267-272.
23. Sugai, M., T. Akiyama, H. Komatsuzawa, Y. Miyake, and H. Suginaka. 1990. Characterization of sodium dodecyl sulfate-stable *Staphylococcus aureus* bacteriolytic enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis *J. Bacteriol.* 172, 6494-6498.
24. Taft, C.S., C.S. Enderlin, and C.P. Selitrennikoff. 1994. A high throughput *in vitro* assay for fungal (1,3)beta-glucan synthase inhibitors *J. Antibiot.* 47, 1001-1009.
25. Watt, S.R. and A.J. Clarke. 1994. Initial characterization of two extracellular autolysins from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 *J. Bacteriol.* 176, 4784-4789.
26. Yamamoto, N., K. Matsumoto, Y. Yamagata, K. Hirano, and E. Ichishima. 1993. A heat-labile serine proteinase from *Penicillium citrinum* *Abstr. Phytochem.* 32, 1393-1397.

(Received January 21, 2000/Accepted February 22, 2000)

ABSTRACT : Isolation, Purification, and Characterization of the Lytic Enzyme of *Anabaena cylindrica* by *Penicillium oxalicum* (HCLF-34)

Soung-Hee Hyun*, **Ho-Yong Lee,¹** and **Young-Keel Choi²**(*Department of Premedicine, Eulji University School of Medicine, Taejon 302-112, ¹Department of Biological Science, Sangji University, Wonju 220-702, ²Department of Life Science, Hanyang University, Seoul 133-791)

Algal lytic enzyme, an extracellular enzyme, was purified from the culture filtrate of *Penicillium oxalicum* (HCLF-34) by ultrafiltration, gel filtration chromatography, and anion exchange chromatography. The enzyme has a molecular mass of approximately 22 kDa, and it is a monomer by renaturation SDS-PAGE. The amino acid sequences of the enzyme was revealed to be NH₂-Glu-Ser-Tyr-Ser-Ser-Asn-Ala-Ala-Gly-Ala-Val-Leu-Ile---, had about 84% identity with the mature light chain of aspergillopepsin II precursor and 81% identity with the mature protein of the acid proteinase EapC precursor.