

Penicillium oxalicum(HCLF-34)으로부터 분리되는 *Anabaena cylindrica* 세포벽 분해효소의 특성

현성희* · 최영길¹

울지외과대학 의예과, ¹한양대학교 자연과학대학 생명과학과

Penicillium oxalicum(HCLF-34)으로부터 세포외로 분리되는 *Anabaena cylindrica* 분해 효소의 분자량은 renaturation SDS-PAGE에서 약 22 kDa로 확인되었으며, 분해 효소의 농축은 ultrafiltration cut off fraction 중 30-10 kDa 구간에서 수획하였다. 최적 활성조건의 측정 결과 적정 pH는 3.5-4.0, 적정반응 온도는 20°C, 그리고 온도 안정성은 4°C 이하에서 100% 이상, 20-90°C 범위에서는 50% 이상의 활성을 나타내었다. 금속이온 및 효소안정제의 영향에서는 Na⁺, K⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺의 양이온과 BSA는 효소의 활성을 촉진시키는 반면, Ca²⁺, Cu²⁺의 양이온과 EDTA, PMSF는 효소의 활성을 억제하는 작용을 하였다. 이러한 금속이온과 안정제의 영향에서 1가, 2가 양이온에 의해 활성이 증가하고, Fe³⁺, Ca²⁺, Cu²⁺의 양이온에 의해서는 활성이 감소하는 결과는 대부분의 세포벽 분해 효소가 갖는 특성과 유사한 결과였다. 분해효소는 *A. cylindrica*과 *Micrococcus luteus*의 세포벽을 기질로 사용한 효소의 활성 반응에서 반응 시작 후 1시간에서 5시간 사이에 반응 산물로 환원당의 양이 급격히 증가하였다.

Key words □ *Anabaena cylindrica*, cell wall lytic enzyme, glycosidase, optimum condition, renaturation SDS-PAGE

남조류는 세포벽 구조와 구성 성분에 있어서 gram-positive 세균의 특성을 가지며, 세포막 외부에 peptidoglycan을 주성분으로 하는 4개의 층(L_I, L_{II}, L_{III}, L_{IV})으로 이루어진 두꺼운 세포벽을 가진다. *Anabaena cylindrica*의 peptidoglycan 층은 기본적으로 N-acetylglucosamine(NAG)과 N-acetylmuramic acid(NAM)의 반복적인 단위가 짧은 펩티드로 연결되어 있으며, 세포 외부를 둘러싸는 두터운 sheath의 66%가 carbohydrates로서 glucose(47%), mannose(25%), xylose(21%)와 탄수화물(6%)의 순서로 구성되어 있다(19). 세균의 sheath는 세포막과 세포질을 외부환경으로부터 보호하는 기능을 가지며, 대부분의 세균은 세포 성장 및 분열을 위하여 한 종류 이상의 peptidoglycan 가수분해 효소를 합성하는 능력이 있고, 곰팡이도 발아시에 많은 종류의 가수분해 효소를 합성하는 것으로 알려져 있다(8). 현재까지 알려진 세포벽 분해효소는 peptidoglycan상의 그 작용 부위에 따라 N-acetylmuramoylhydrolases(transglycosylase), N-acetylglucosaminidases, N-acetylmuramyl-L-alanine amidases, endopeptidases 및 carboxypeptidases 등으로 구분된다(8). 이들 가수분해 효소들은 세포 자체의 분열이나 세포벽의 성장, 세포벽의 재생, 포자형성, 편모 형성 및 형질전환 등의 과정에서 중요한 역할을 수행하고, 한편 다른 종의 성장을 억제하거나 파괴하는 기능을 갖기도 한다(17).

남조류의 생장억제 또는 세포벽 분해에 관여하는 세균의 연구로 *Cellvibrio fulvus*(6)는 항생제 계통의 물질을 분비하는 것

으로 알려져 있으며, *Bdellovibrio bacteriovorus*(3)는 규명되지 않은 광합성 억제제를 분비하여 남조류의 생장을 억제하는 것으로 보고 하였다. *Flexibacter flexilis*(16)와 *Cyanophage* sp.(12)는 lysozyme 계통의 효소를 분비하여 남조류의 생장을 억제하는 것으로 주장되지만, 세포의 분비효소에 관한 연구가 이루어진 바는 없다. *Myxococcus xanthus*(20)는 세포의 분비물질이 남조류의 생장억제에 관여한다는 사실을 확인했을 뿐 그 분비물질의 특성에 대해서는 전혀 밝혀지지 않았다. 곰팡이의 남조류 생장억제 혹은 분해에 관한 연구로 *Acremonium* sp.(15)는 Cephalosporin-C 계통의 물질을 분비하여 남조류의 생장을 억제하는 것으로 알려져 있으나, 숙주세포와 혼합 배양시에만 분비하는 것으로 보고되었으며, 물질의 특성규명은 더 이상 진행되지 않았다.

본 저자들은 선행된 연구에서 남조류를 효과적으로 분해하는 *Penicillium oxalicum*(HCLF-34)을 분리 동정하였으며(9), 분리 곰팡이는 곰팡이 및 곰팡이 배양 상등액을 *Anabaena cylindrica* agar 배지의 접종 지역 주변에서 넓은 투명대를 형성하였고, *A. cylindrica*와의 혼합배양에서 숙주세포에 대한 생장억제 및 세포벽 분해활성이 관찰되었으며(10), 세포벽 분해효소에 대하여 민감하게 반응하는 것으로 알려진 *Micrococcus luteus* agar 배지에서도 투명대가 관찰된 것으로 미루어 단독 배양시에도 남조류 분해효소를 생산하는 것으로 관찰되었다. 그러므로 본 연구에서는 renaturation SDS-PAGE 방법을 이용하여 세포벽 분해 효소의 분리, 최적 활성 조건 및 *A. cylindrica*와 *M. luteus*의 세포벽 성분으로 구성된 기질용액에서 작용 위치와 특성을 규명하였다.

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 82-042-259-1074, Fax : 82-042-259-1047
E-mail : hyunsh@emc.eulji.ac.kr

재료 및 방법

분해 효소용액의 제조

세포의 분비 효소는 PDB배지 50 ml에서 먼저 배양한 *P. oxalicum*(HCLF-34)을 동일배지 1 l에 접종하여 대수 생장기까지 배양한 후 Whatman No. 1, 0.45 μ m, 0.2 μ m pore size의 membrane filter로 순차적으로 여과한 배양 상등액을 미세투과 장치(Amicon ultrafiltration unit)와 Diaflo PM 300, PM 100, PM 50, YM 30, YM 10, YM 3, YM 0.5 membrane filter를 이용하여 질소가스로 4.2 bar의 압력을 가하여 분자량별로 300, 100, 50, 30, 10, 3, 0.5 kDa이상의 세포의 분비 효소를 각 fraction별로 100 ml씩 분리 및 농축하였다. 세포내 효소는 상기의 배양액 1 l에서 얻어진 *P. oxalicum*(HCLF-34)에 500 ml의 20 mM Tris/HCl(pH 7.5) 완충용액을 첨가하여 ice bath를 장착한 bead beater에서 15초씩 10회 반복한 후 Whatman No. 1, 0.45 μ m, 0.2 μ m pore size의 membrane filter로 순차적으로 여과하였다. 각각의 세포내·외 효소용액에 1차적으로 20% ammonium sulfate를 넣어 4°C에서 2시간 동안 포화 시킨 후 다시 80% ammonium sulfate를 넣고 4°C에서 10시간 동안 포화 시켜 단백질을 침전시켰다. ammonium sulfate 처리 후 원심 분리(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 효소용액을 냉동건조기를 이용하여 농축하였다.

단백질 함량 측정

단백질 정량은 Lowry 방법(13)에 따랐으며, 표준 정량곡선을 작성하기 위해서 BSA(Sigma)를 사용하였다.

Renaturation SDS PAGE를 이용한 분자량 측정

농축한 단백질 중 남조류 분해 효소의 특성을 갖는 단백질의 분자량을 확인하기 위하여 *Micrococcus. luteus*를 기질로 하는 renaturation SDS-PAGE 방법(2, 14)을 이용하였다. Separating gel에 세포벽 분해효소에 민감한 것으로 알려진 *M. luteus* (Sigma)를 0.4%의 농도로 첨가하여 사용하였으며, 전기영동 후 gel은 300 ml의 증류수(18M Ω Milli-Q water)로 15분간씩 2회 세척한 후 150 ml의 renaturation buffer(0.1% Triton X-100, 10 mM MgCl₂/20 mM Tris/HCl, pH 4.5)에 넣어 37°C 진탕 배양기에서 50 rpm으로 12시간 동안 반응시켰다.

기질의 준비

대수 생장기의 *A. cylindrica*와 *M. luteus*세포를 원심분리(10,000×g, 4°C, 20 min)하여 세포를 수확한 후 증류수로 2회 세척하여 냉동건조 하였다. 세포 건조중량 2 g을 200 ml의 4% SDS용액에 현탁하여 30분간 끓이고, 30,000×g로 20분간 원심분리하여 침전물을 수확하였다. 이 과정을 2회 반복하고, SDS를 제거하기 위하여 400 ml의 끓는 증류수에 현탁하여 원심분리하는 과

정을 5회 반복하여 얻어진 세포침전물(crude cell wall extract)을 다시 냉동건조하여 -20°C에서 보관하면서 사용하였다(7). 실험군과 대조군 각각의 시험관에 *A. cylindrica*와 *M. luteus*세포의 세포벽 성분을 A₆₆₀에서 1.8-2.0 정도 되게 각각 20 mM Tris/HCl 완충용액(pH 7.5)에 희석하여 기질 용액을 준비하였다.

적정 pH의 측정

준비된 *A. cylindrica*와 *M. luteus*의 기질용액을 Britton-Robinson 완충용액(1)으로 제조된 pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 시험관에 1 ml씩 첨가하였고, 실험군의 시험관에는 농축된 남조류 분해 효소의 최종 단백질 농도가 80 μ g/ml이 되게 1 ml씩 첨가하고 대조군 시험관에는 동량의 멸균 증류수를 첨가하였다. 각각의 시험관은 25°C 진탕배양기(150 rpm)에서 20분간 반응시킨 후 A₆₆₀에서 반응 전후의 흡광도 변화를 대조군과 비교하였다. 측정 이외의 시간은 모두 ice bath에서 정치시켰다. 효소 활성도 1 unit는 1분간 흡광도를 0.001 하락시키는 효소의 양으로 환산하였다(4, 11).

적정 온도의 측정

준비된 *A. cylindrica*와 *M. luteus*의 기질용액을 A₆₆₀에서 1.8-2.0 정도 되게 20 mM Tris/HCl(pH 7.5) 완충용액에 현탁하고 2 ml씩을 시험관에 나누고, 안(1)의 방법으로 *A. cylindrica*의 반응 시험관에는 pH 3.5의 Britton-Robinson 완충용액을 1 ml씩 첨가하고, *M. luteus*의 반응 시험관에는 pH 4.0의 Britton-Robinson 완충용액을 1 ml씩 첨가하였다. 실험군에는 준비된 남조류 분해 효소를 최종 단백질 농도가 80 μ g/ml이 되게 1 ml씩 첨가하고 다른 시험관에는 동량의 멸균 증류수를 1 ml씩 첨가하여 대조군으로 이용하였다. 2개씩의 시험관을 각각 0, 4, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C의 배양기에 20분간 반응시킨 후 ice bath에서 반응을 정지시키고 A₆₆₀에서 반응 전후의 흡광도 변화를 대조군과 비교하였다.

금속이온과 효소안정제의 영향

준비된 *A. cylindrica*와 *M. luteus*의 기질용액을 A₆₆₀에서 1.8-2.0 정도 되게 20 mM Tris/HCl(pH 7.5) 완충용액에 현탁하여 2 ml씩을 시험관에 나누고, 안(1)의 방법으로 *A. cylindrica*의 반응 시험관에는 pH 3.5의 Britton-Robinson 완충용액을 첨가하고, *M. luteus*의 반응 시험관에는 pH 4.5의 Britton-Robinson 완충용액을 각각 1 ml씩 첨가하였다. 각각의 시험관에 금속이온과 효소안정제를 농도별(최종농도)로 1 ml씩 첨가한 후 실험군에는 남조류 분해 효소를 최종 단백질 농도가 80 μ g/ml이 되게 1 ml씩 첨가하고 다른 시험관에는 동량의 멸균 증류수를 1 ml씩 첨가하여 대조군으로 이용하였다. 각각의 시험관은 37°C 진탕 배양기(150 rpm)에서 20분간 반응시킨 후 A₆₆₀에서 반응 전후의 흡광도 변화를 대조군과 비교하였다. 측정 이외의 시간은 ice bath에서 정치시켰다.

온도 안정성

준비된 남조류 분해 효소를 20 mM Tris/HCl(pH 7.5) 완충용

액에 용해(80 µg/ml)시켜 시험관에 각각 1 ml씩 분주하고 안(1)의 방법으로 -20, 4, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C의 조건에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 모든 시험관을 상온에서 15분간 방치한 후 기질용액을 2 ml씩 첨가하고, *A. cylindrica*의 반응 시험관에는 pH 3.5의 Britton-Robinson 완충용액을 *M. luteus*의 반응 시험관에는 pH 4.5의 Britton-Robinson 완충용액을 각각 1 ml씩 첨가하였다. 대조군은 효소용액 대신 멸균 증류수를 같은 조건으로 반응시켰으며, 각각의 시험관을 37°C 진탕 배양기(150 rpm)에서 20분간 반응시킨 후 A₆₆₀에서 반응 전후의 흡광도 변화를 비교하였다. 측정 이외의 시간은 ice bath에서 정지시켰다.

남조류 분해 효소의 세포벽 작용 위치

Penicillium oxalicum(HCLF-34)이 세포외로 분비하는 남조류 분해 효소가 *A. cylindrica*와 *M. luteus*세포를 구성하는 peptidoglycan에서의 작용 부위를 확인하기 위하여 각 세포벽 물질에 농축한 효소를 처리하여 적정 온도와 pH 조건에서 반응시키면서 시간 변화에 따른 환원당(reducing sugar)과 유리아미노기(free amino group)의 양적 변화를 측정하였다.

기질의 준비 및 전처리

준비된 *A. cylindrica*의 기질용액을 2개의 삼각 플라스크에 Britton-Robinson 완충용액(pH 3.5)에 5 mg/ml되게 준비하고, *M. luteus*의 기질용액은 Britton-Robinson 완충용액(pH 4.5)에 5 mg/ml되게 각각 8 ml씩 준비하였다. 준비된 기질용액에 농축 단백질을 20 mM Tris/HCl(pH 7.5) 완충용액에 용해시켜 단백질 최종농도가 45 µg/ml정도 되게 2 ml를 첨가하고 다른 1개의 플라스크에는 멸균된 증류수 2 ml를 첨가하여 대조군으로 사용하였다. 각각의 반응액을 37°C 진탕배양기(150 rpm)에서 배양하면서 2시간 간격으로 0.5 ml씩 취하고, 2.5 ml의 뜨거운 증류수를 첨가하여 반응을 정지시켰다. A₆₆₀에서 흡광도(Pharmacia LKB, Biochrom 4060) 변화를 측정하고 12,000×g, 20°C의 조건에서 10분간 원심분리 하였다.

환원당의 정량

환원당의 농도는 Thompson과 Shockman의 방법(23)으로 정량하였다. 기질의 전처리 과정에서 2시간 간격으로 회수하여 원심분리한 상등액 1 ml에 0.05 % potassium ferricyanide 1 ml과 carbonate cyanide reagent(sodium carbonate 5.3 g, KCN 0.65 g/1 l D.W.) 1 ml을 혼합하여 100°C에서 15분간 가열한다. ice bath에서 5분간 시험관을 식힌 후 0.1 N H₂SO₄용액 2.5 ml을 첨가하여 혼합하고 실온에서 2,000×g의 속도로 원심분리한다. 상등액 2.5 ml에 color reagent(ferric ammonium sulfate 15 g, SDS 3 g, carbowax 20 M 10 g/1 l of 0.05 N H₂SO₄) 1 ml을 첨가하여 5 분간 실온에서 방치한 후 A₇₀₀의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 환원당 정량을 위한 standard curve는 glucose(Sigma)를 사용하였다.

유리 아미노기의 정량

유리 아미노기의 농도는 Ghuysen 등(5)의 방법으로 정량하였다. 기질의 전처리 과정에서 2시간 간격으로 회수하여 원심분리한 상등액 0.9 ml에 0.1 ml의 10% K₂B₄O₇ 용액과 4 µl의 FDNB (fluorodinitrobenzene) reagent를 첨가하여 잘 섞고 60°C 항온 수조에서 30분간 방치한다. 2 N HCl 0.1 ml을 첨가한 후 A₄₂₀의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 유리 아미노기의 정량을 위한 standard curve는 glycine(Sigma)을 사용하였다.

결과 및 고찰

분해효소의 분자량 측정

Penicillium oxalicum(HCLF-34)로부터 추출한 세포내·외의 단백질을 SDS PAGE 및 renaturation PAGE를 실시한 결과 (Fig. 1) 약 22 kDa의 남조류 분해 단백질을 확인하였으며, renaturation PAGE에서 *Penicillium oxalicum*(HCLF-34)은 남조류 분해 단백질을 세포외로 분비하는 것으로 확인되었다. 이 단백질은 ultrafiltration fraction 중 0.5-300 kDa의 cut off에서 모두 확인되었으나, 50, 30 및 10 kDa의 cut off fraction에서 많은 양이 확인되었다. Ultra-filtration membrane을 이용하여 분자량별로 농축한 단백질은 SDS-PAGE에서 분자량에 따라 정확하게 분리되지는 않았으며, 동일한 band들이 여러 fraction에서 관찰되었다. Rf값에 의한 분자량 약 22 kDa의 단백질이 모든

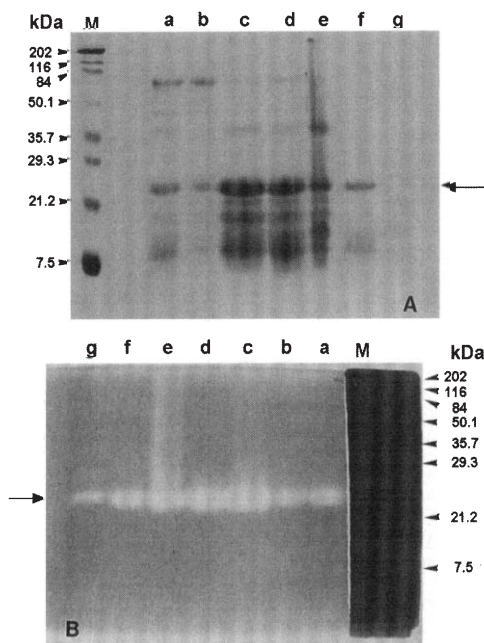


Fig. 1. Cell wall lytic enzyme pattern of total soluble protein in extracellular and intracellular extract of *Penicillium oxalicum* (HCLF-34). A, SDS-PAGE; B, renaturation SDS-PAGE. Lane M, molecular weight maker; a, cut off extracellular enzyme by 300 kDa ultrafiltration membrane; b, 100 kDa; c, 50 kDa; d, 30 kDa; e, 10 kDa; f, 3 kDa; g, intracellular enzyme.

fraction에서 관찰되었으며, YM 50, YM 30, YM 10 fractions에서 가장 많은 양이 나타났고, PM 300과 endo-enzyme fraction에서는 거의 확인 되지 않았다. 분리 단백질 중 세포벽 분해 효소를 확인하기 위해 세포벽 분해 효소에 민감하게 반응하는 것으로 알려진 *M. luteus*를 기질로 사용한 renaturation SDS-PAGE(22)에서는 효소의 활성을 극대화 하기 위하여 효소의 최적 활성 pH 측정 실험 결과와 같이 denaturation buffer의 pH를 4.0으로 조절하여 사용하였으며, 모든 fraction에서 동일한 위치에서 효소 활성 band를 확인하였고, SDS-PAGE에서와 같이 Rf값에 의한 분자량은 약 22 kDa이었다. 이러한 결과는 *Aspergillus niger*가 분비하는 약 20 kDa의 aspergillopepsin II의 분자량과 유사하였고, 다른 곰팡이에서 분비되는 acid protein (35-40 kDa) family보다는 약 15 kDa이 작은 효소로 판단된다(21).

남조류 분해 효소의 최적 활성 조건

Penicillium oxalicum(HCLF-34)이 세포외로 분비하는 남조류 분해 효소의 최적 활성 조건은 적정 pH, 적정 온도, 금속이온 및 효소 안정제의 영향 및 온도 안정성 등을 이용하여 조사하였다. 적정 pH는 *A. cylindrica*를 기질로 사용한 경우 pH 3.5에서 가장 높은 활성을 나타내었고, *M. luteus*를 기질로 사용한 경우 pH 4에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 2). 이러한 결과는 곰팡이의 배양시 secondary metabolite로 수소이온 농도를 낮게 하는 물질을 분비함으로써 배양 환경이 초기 pH 5.5 내외에

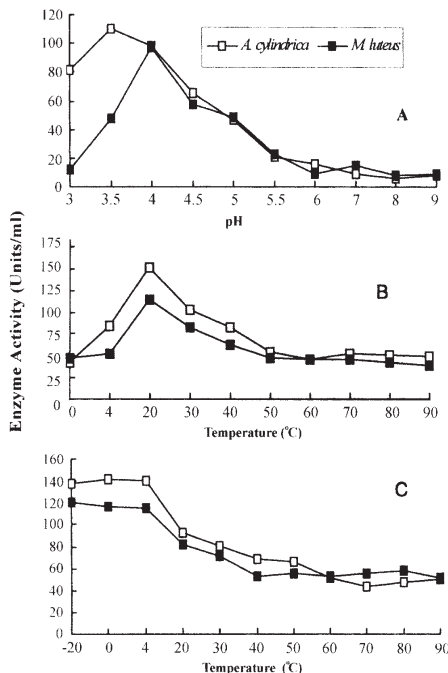


Fig. 2. Optimal condition for the cell wall lytic activity of extracellular enzyme of *Penicillium oxalicum*(HCLF-34). A, optimum pH; B, optimum temperature; C, temperature stability.

Table 1. Variability of enzyme activity; Effects of various metal ions and chemicals on the cell wall lytic enzyme

Reagent(concentration)	Relative activity (%)	
	<i>A. cylindrica</i>	<i>M. luteus</i>
Control	100	100
NaCl(10 mM)	127	74
KCl(10 mM)	78	62
LiCl(10 mM)	26	9
BaCl ₂ (10 mM)	82	30
MgCl ₂ (10 mM)	72	46
CaCl ₂ (10 mM)	11	8
MnCl ₂ (10 mM)	54	21
FeCl ₂ (10 mM)	14	66
CuCl ₂ (10 mM)	16	27
PMSF(0.1 mM)	65	58
EDTA(10 mM)	43	18
BSA(0.4 mg/ml)	110	115

서 대수생장기에 도달하면 pH 2 내외를 유지하므로 생산 분비되는 효소가 비교적 낮은 수소이온 농도에서 높은 활성을 나타내는 것으로 판단된다(15, 21). 적정 반응 온도는 *A. cylindrica*를 기질로 사용한 경우 20°C에서 높은 활성을 나타내었고, *M. luteus*를 기질로 사용한 실험에서도 20°C에서 높은 활성을 나타내었다(Fig. 2). 효소의 온도 안정성은 *A. cylindrica*를 기질로 사용한 경우와 *M. luteus*를 기질로 사용한 경우 모두 -20~4°C 범위에서 높은 활성(4, 11)을 유지하였으며, 20~90°C 범위에서도 50%의 활성이 관찰되었다(Fig. 2). 안(1)의 방법에 따라 일반적으로 효소의 활성도에 영향을 나타내는 것으로 알려진 금속이온 및 효소 안정제의 영향은 *A. cylindrica*를 기질로 사용한 경우 Na⁺, K⁺, Li⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺의 양이온과 BSA는 효소의 활성을 촉진시키는 반면, Ca²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺의 양이온과 PMSF, EDTA는 효소의 활성을 억제하는 작용을 하였다(Table 1). 한편, *M. luteus*를 기질로 사용한 경우 Na⁺, K⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Fe³⁺의 양이온과 BSA는 효소의 활성을 촉진시키고, Li⁺, Ca²⁺, Cu²⁺의 양이온과 PMSF, EDTA는 효소의 활성을 억제하는 작용을 하였다(Table 1). 이러한 금속이온과 안정제의 영향에서 1가, 2가 양이온에 의해 활성이 증가하고, Fe³⁺, Ca²⁺, Cu²⁺의 양이온에 의해서는 활성이 감소하는 결과는 현재까지 알려진 세포벽 분해 효소가 갖는 특성(14, 18)과 유사한 결과였다.

남조류 분해 효소의 세포벽 작용 위치

Penicillium oxalicum(HCLF-34)이 세포외로 분비하는 세포벽 분해 효소는 *A. cylindrica* cell wall extract를 기질로 사용한 경우 Fig. 3에서와 같이 반응 시작 후 4째 시간에 환원당의 양이 급격히 증가하였으며, 유리 아미노기의 양은 거의 변화가 없었다. *M. luteus* cell wall extract를 기질로 사용한 경우 반응 시작 후 2~3시간 사이에 환원당의 양이 크게 증가하였으며, 유리 아미노기의 양은 거의 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 3). 세포벽은 세균을 환경으로부터 보호하는 역할 뿐 아니라 성장하기 위

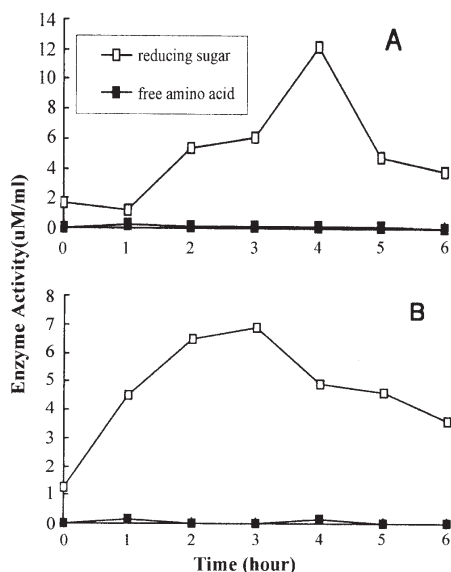


Fig. 3. Activities of extracellular enzyme from *Penicillium oxalicum* (HCLF-34) against cell wall extracts from *Anabaena cylindrica* (A) and *Micrococcus luteus* (B).

해서 세포벽의 분해 합성이 반복되어진다. 이와 같이 세포벽 성분을 가수분해하는 효소들은 크게 glyco-sidase와 peptidase로 나뉘어지며(23), 다른 세균집단의 용균 및 virulence에도 관여하는 것으로 알려져 있다(18). 따라서, 본 연구에서 분리한 세포벽 분해 효소는 *Anabaena cylindrica*의 cell wall 구성성분 중 glycosidic bond를 분해하는 muramidase 또는 glucosaminidase와 같이 환원당을 유리시키는 glycosidase 계통의 효소인 것으로 판단된다(22, 23).

참고문헌

1. 안용근. 1994. 효소 단백질 정제법, 양서각, pp. 35-53.
2. 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.
3. Burnham, J.C., T. Stetak, and G. Locher. 1976. Extracellular lysis of the blue-green algae *Phormidium luridum* by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J. Phycol.* **12**, 306-313.
4. Foster, S.J. 1991. Cloning, expression, sequence analysis and biochemical characterization of an autolytic amidase of *Bacillus subtilis* 168 trpC2. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1987-1998.
5. Ghuysen, J.M., D.J. Tipper, and J.L. Strominger. 1966. Enzymes that degrade bacterial cell walls. *Methods in Enzymol.* **8**, 685-699.
6. Granhall, V. and B. Berg. 1972. Antimicrobial effects of Cellvibrio on blue-green algae. *Arch. Microbiol.* **84**, 234-242.
7. Hancock, I.C. 1994. Analysis of cell wall constituents of Gram-positive bacteria. In: M. Goodfellow and A. G. O'Donnell (eds.), *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. John Wiley and Sons, Ltd. pp. 77-98.
8. Holtje, J.V. and E. Tuomanen. 1991. The murein hydrolases of *Escherichia coli*: properties functions and impact on the course of infections *in vivo*. *J. Gene. Microbiol.* **137**, 441-454.
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. Kawamura, T. and G.D. Shockman. 1983. Purification and some properties of the endogenous, autolytic N-acetylmuramolyohydrolase of *Streptococcus faecium*, a bacterial glycoenzyme. *J. Biol. Chem.* **258**, 9514-9521.
12. Kim, M. and Y.G. Choi. 1994. A new *Synechococcus* cyanophage from a reservoir in Korea. *Virol.* **204**, 338-342.
13. Lowry, O.N., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 256-260.
14. Østlie, H.M., G. Vegarud, and T. Langsrud. 1995. Autolysis of lactococci: Detection of lytic enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis and characterization in buffer systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(10), 3598-3603.
15. Redhead, K. and S.J.L. Wright. 1978. Isolation and properties of fungi that lyse blue-green algae. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 962-969.
16. Sallal, A.K.J. 1994. Lysis of cyanobacteria with *Flexibacter* spp. isolated from domestic sewage. *Microbios.* **77**, 57-67.
17. Shockman, G.D. and J.V. Holtje. 1994. Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases, p. 131-166. In: J. M. Ghuysen and R. Hakenbeck (eds.), *Bacterial Cell Wall*. Elsevier Science B. V., Amsterdam.
18. Smith, T.J. and S.J. Foster. 1995. Characterization of the involvement of two compensatory autolysins in the mother cell lysis during sporulation of *Bacillus subtilis* strain 168. *J. Bacteriol.* **177**, 3855-3862.
19. Stanier, G. 1988. Fine structure of cyanobacteria. *Methods in Enzymol.* **167**, 157-172.
20. Stewart, J.R. and R.M. Brown. 1971. Algicidal non-fruiting myxobacteria with high G+C ratios. *Archiv für Mikrobiologie* **80**, 176-190.
21. Takahashi, K., J. Inoue, K. Sakai, T. Kohama, S. Kitahara, K. Takishima, M. Tanji, S.B.P. Athauda, T. Takahashi, H. Akanuma, G. Mamiya, and M. Yamasaki. 1991. The primary structure of *Aspergillus niger* acid proteinase A. *J. Biol. Chem.* **266**, 19489-19483.
22. Takamoto, S., K. Yamada, and Y. Ezura. 1994. Production of bacteriolytic enzymes during the growth of a marine bacterium *Alteromonas* sp. No. 8-R. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **40**, 499-508.
23. Thompson J.S. and G.D. Shockman. 1968. A modification of the Park and Johnson reducing sugar determination suitable for the assay of insoluble materials: Its application to bacterial cell walls. *Analytical biochemistry* **22**, 260-268.

(Received August 23, 1999/Accepted September 6, 1999)

ABSTRACT: Characteristics of the Cell Wall Lytic Enzyme of *Anabaena cylindrica* from *Penicillium oxalicum*(HCLF-34)

Soung-Hee Hyun* and Yong-Keel Choi¹ (Department of Premedicine, Eul-Ji Medical College, Taejon 301-112 and ¹Department of Life Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea)

The fungus(*Penicillium oxalicum*; HCLF-34) secreted the cyanobacteria lytic enzyme which had a molecular weight of about 22 kDa, a optimum temperature of 20°C, a optimum pH of 3.5, and a temperature-stable up to 50°C. The chemical ions such as sodium, potassium, barium, magnesium, and mangan ions appeared positive activity, but calcium, iron, copper ions, EDTA, and PMSF displayed negative activity; this results were the same as the characteritics of other cell wall lytic enzymes. This extracellular enzyme showed lytic activity against SDS-insoluble peptidoglycan of *Anabaena cylindrica*. The cell wall lytic enzyme of *Penicillium oxalicum*(HCLF-34) seemed to be glycosidase-like enzyme in the fact that the concentration of reducing sugar was increased when the peptidoglycan of *Anabaena cylindrica* and *Micrococcus luteus* reacted with this enzyme