

내염성 효모의 분리 및 세포외 protease의 생산

정승찬, 현광욱, 김재호, 이종수

배재대학교 유전공학과 · 생물의약 연구센터(RRC)

전화(042) 520-5388, FAX(042)520-5388

Abstract

A halotolerant and extracellular protease producing yeast was isolated from traditional *Meju* and identified as a strain of *Hansenular sp.* S-9 by investigation of its microbiological characteristics. The optimum pH, temperature and NaCl concentration for growth of *Hansenular sp.* S-9 were pH 7.5, 30°C and 0.5M, respectively. The protease production from *Hansenular sp.* S-9 was maximized when it was grown on BD medium containing 1.0% beef extract, 1.0% glucose and 0.5M NaCl for 72 h at 30°C.

서론

일반 미생물이 생산하는 효소는 염에 쉽게 실활 되는데 비하여 내염성 미생물의 효소는 내염성 또는 호염성의 특징이 있기 때문에 효소생산 공정에서 잡균의 오염을 줄일 수 있고 장류와 같은 염장 단백질식품의 숙성 등에도 이점이 있다¹⁾.

Protease를 생산하는 호염성 균으로는 *Halobacterium salinarium*, *Bacillus sp.*, *Halobacterium halobium*, *Halobacterium sp.*, *Halomonas sp.* ES10 등의 세균들이 주로 알려져 있고 이들이 생산하는 protease의 효소 성질도 대부분 밝혀졌다²⁾. 그러나 호염성(또는 내염성) 효모로서는 *Zygosaccharomyces rouxii*를 비롯한 몇몇 균주가 알려져 있고 이들의 식품용 균체의 효소생산에 관한 연구는 많이 이루어지지 않았다.

따라서 본 연구에서는 내염성 효모가 생산하는 protease를 장류 발효산업 등에 응용하기 위하여 재래식 메주에서 분리된 내염성 효모 중 균체의 protease를 강력하게 생산하는 효모를 선정하여 동정하고 이 균의 생리적 특성을 조사하였으며 효소 생산조건으로 배지 조성 및 배양방법 등을 검토하였다.

재료 및 방법

내염성 효모의 선별 및 동정

필자 등³⁾이 전국 각지에서 수집된 메주에서 분리한 효모들과 자연계에서 분리한 내염성

효모들 중 2M NaCl이 함유된 YM배지에서 생육이 양호한 효모들을 1차선별하고 이들 중 skim milk 배지에서 Clear zone을 형성하는 효모들을 2차 선별한 다음 protease 활성을 측정하여 제일 강한 효소를 생산하는 균주를 시험균주로 최종 선정하였다. 선정균주의 형태학적 및 생리생화학적 특성 등을 효모의 분류동정법⁴⁾에 따라 조사한 후 Lodder의 The yeast, a taxonomic study⁵⁾로 동정하였다.

Protease의 활성 측정

Protease 활성은 안¹⁾과 이²⁾의 방법으로 casein을 기질로 하여 측정하였으며 효소단위는 표준조건하에서 1분에 1 μ g tyrosine 상당량의 folin 발색성 비단백성 물질을 생성하는 것을 1 unit로 하였다.

Protease의 생산조건

효소생산에 미치는 영향으로 질소원, NaCl농도, 배지의 초기 pH와 배양온도 및 배양시간과 배양방법 등을 검토하였다.^{1,2)}

결과 및 고찰

내염성 효모의 선별, 동정 및 특성

재래식 메주에서 분리한 147주의 효모 중 2.0M NaCl이 함유되어 있는 YM배지에서 생육하는 15균주와 자연계에서 분리한 10주의 내염성 효모에서 세포의 protease를 강력히 생산하는 S-9균주를 시험 균주로 최종 선정하였다. 선정 균주 S-9의 형태적, 배양학적 및 생리 생화학적 특성과 당 이용성(발효성) 등을 조사한 결과 *Hansenula sp.* S-9로 추정되었고 현재 종까지의 동정이 진행되고 있다 (Table 1,2). 또한 시험 균주는 1M NaCl에서 생육이 왕성하였고 2M NaCl 함유배지에서도 생육하였으며 pH 7.5와 30°C에서 가장 잘 생육하였다.

효소 생산조건

Protease 생산에 미치는 질소원의 영향을 검토한 결과 beef extract가 효소생산에 제일 적합하였고 효소생산 최적농도는 1.0%이었다 (Table 3, 4). 또한 1.0% beef extract와 1% glucose 및 0.5M NaCl를 함유한 BD배지의 초기 pH를 8.0으로 조정하고 30°C에서 72시간 배양하였을 때 가장 많은 효소가 생산되었다.

요약

내염성이며 세포의 protease를 강력하게 생산하는 효모를 재래식 메주효모들과 자연계에서 분리된 내염성 효모들 가운데서 선별하여 *Hansenula sp.* S-9으로 동정하였다.

S-9균주는 30°C, pH 7.5, 0.5M NaCl을 함유한 배지에서 잘 생육하였고 1.0% beef extract와 1% glucose 및 0.5M NaCl를 함유한 BD배지에서 30°C로 72시간 배양하였을 때 가장 많은 효소가 생산되었다.

참고 문헌

1. 안영성, 고도 호염성 *Halobacterium sp.* 가 생산하는 Protease의 특성.(1990). 충남대 대학원 석사학위 논문 P2-3
2. 이재숙. *Halobacterium sp. ES10*이 생산하는 알칼리성 Protease의 효소학적 및 생화학적 특성(1944) 충남대 대학원 박사학위 논문 P1-2
3. 이종수, 이성훈, 권수진, 안철, 유진영. 재래식 메주로부터 효모의 분리, 동정 및 배양조건 (1997). 한국 산업미생물 학회지, 25:453-441
4. 長谷川武治, 微生物の分類と同定(1984) 學會出版 Center, pp153-254. 東京
5. Kreger - van Fij. The Yeast, a taxonomic study.(3rd ed.) Elsevier Sci., Amsterdam.

Table 1. Microbiological characteristics of the S-9 strain.

Classification	Characteristics
Cell shape	Spherical
Cell size	5.0×3.7 μ m
Vegetative reproduction	Budding
Ascospore	1-4(G) ¹⁾
Pseudomycelium	+
Growth: 50% glucose/YEA	+
20%(5%) NaCl/YEPD	-(+)
1% acetic acid	-
Pigment(red-pink)	-
Vitamin free medium	+
Growth in media: YM(color ²⁾ ,ring/sedim)	+(C,++/+)
Malt extract	+
YEPD	+
Osmotolerant medium ³⁾	+
Wickerham synthetic	+
Growth temp(°C)	20 °C~30 °C (opt.temp;30 °C)
Growth pH	pH3.0~7.5 (opt.pH;6.0~7.5)
Resistance: Cycloheximide(100ppm/1000ppm)	+/+
Ethanol(5%/10%)	+/+
Urease activity	-
Assimilation of nitrate	+
TTC colorization test	White

¹⁾G; Global ²⁾C; Cream ³⁾Osmotolerant medium: yeast ext. 0.3%,
Bacto-peptone 0.5%, dextrose 10%, malt ext. 0.3%, NaCl 2.0%(pH 5.0).

Table 2. Assimilation and fermentability of carbon sources by the S-9 strain.

Carbon source	Assimilation*	Fermentability
Glucose	+	+
Galactose	-	-
Sucrose	+	-
Lactose	-	-
Maltose	-	-
Raffinose	-	-
Soluble starch	-	-
Xylose	-	-
Ribose	+	-
Sorbitol	+	-
Inositol	-	-
Inulin	+	-

* + ; good and - ; not assimilable or fermentable

Table 3. Effect of nitrogen sources on the production of protease.

Nitrogen sources*	Activity (Units/ml)
Yesat extract	-
Peptone	3.7
Urea	3.6
Beef extract	7.8
NaNO ₃	-
KNO ₃	0.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.3
(NH ₄)H ₂ PO ₄	0.4
NH ₄ Cl	-
NH ₄ NO ₃	2.5
Gelatin	0.6
Casamino acid	1.9

* The concentration of nitrogen sources added was 1%.

Table 4. Effect of beef extract concentration on the production of protease.

Beef extract conc. (%)	Activity(Units/ml)
0.1	1.1
0.3	2.8
0.5	2.8
0.8	5.0
1.0	7.1
2.0	7.3