

## *Yarrowia lipolytica* TH65가 생산하는 Alkaline Proteinase의 정제 및 특성

유춘발\* · 김창화 · 진영호 · 진익렬<sup>1</sup>

대구대학교 공과대학 식품공학과, <sup>1</sup>경북대학교 자연대학 미생물학과

**Purification and Characteristics of the Extracellular Alkaline Proteinase by a Yeast *Yarrowia lipolytica* TH65.** Choon-Bal Yu\*, Chang-Hwa Kim, Young-Ho Jin and Ing-Nyol Jin<sup>1</sup>. Department of Food Technology, Taegu University, Kyungsan 713-714, Korea, <sup>1</sup>Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea. — An alkaline proteinase produced by *Yarrowia lipolytica* TH65 was purified by 40~65% ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose chromatography, and gel filtration with Sephadex G-100 and Sephadex G-75. The purified enzyme was shown as a single band on SDS-PAGE, and its molecular weight 31,500. Optimum temperature and pH were 40°C and 8.5~9.0, respectively, and the enzyme was stable below 40°C and in the pH range of 6~8. The enzyme was strongly inhibited by divalent ions, completely by PMSF, and partially by EDTA, EGTA, and phenanthroline. But the inhibitory effect in the presence of EDTA, EGTA and phenanthroline could be reversed by addition of Ca<sup>2+</sup>. Thus, these results indicated that the purified enzyme was an alkaline serine proteinase (E.C. 3.4.21.14).

Alkaline protease는 반응최적 pH가 알카리 영역인 효소로써 세균과 곰팡이 유래의 alkaline protease는 많이 알려져 있으나(1-3), 효모들의 경우는 대부분 acid protease의 분비에 대한 보고가 있고 alkaline protease의 분비는 *Yarrowia lipolytica* 만이 알려져 있다(4).

*Y. lipolytica*는 원래 *Candida* 속이었으나 mating type이 밝혀지면서 현재 Kreger-van Rij 분류법(5)은 *Saccharomycopsis* 속으로 임시적으로 분류하고 있고, Barnett 분류법(6)은 균사의 격막구조의 차이 때문에 *Yarrowia* 속으로 분리하여 분류하고 있다. *Y. lipolytica*의 균주들에 대한 보고로는 alkaline protease(7, 8), neutral protease(9), acid protease(10), peptide esterase(9), lipase(11), lipase activator(12), RNase(13), urease(6) 등의 분비에 대한 연구가 있었으며, 그 중 Mitsugi 등(8)은 *C. lipolytica* AJ4541을 이용하여 liter당 gram 수준의 alkaline protease 생산성을 보고하여 주목을 끌기도 하였다. 이 외에도 탄화수소를 이용한 SCP 생산(14), citric acid 등의 유기산 생산(15, 16), 대사조절(17) 등에 대하여 상당한 연구가 있었다.

본 연구에서는 전보(4)에서 분리동정한 효모 *Y. lipolytica* TH65에서 alkaline protease, cell-bound lipase, urease, RNase, citric acid의 생산능이 확인됨에 따라 이들중 효모에서 아직 보고가 드문 alkaline protease를 정제하고 정제효소의 특성에 대하여 조사하였다.

### 재료 및 방법

\*Corresponding author.

Key words: Yeast, *Yarrowia lipolytica*, protease, inhibition

### 사용균주 및 배양

사용균주는 실험실에서 분리보관하고 있는 *Yarrowia lipolytica* TH65이고(4), 효소생산을 위한 배양은 0.6% skim milk, 0.5% glucose, 0.2% yeast extract 조성(pH 9)의 최적배지를 사용하여 18°C에서 36시간 배양하였다.

### 효소활성도 측정

효소활성도는 Hammarsten casein이 가수분해되어 유리되는 tyrosine의 양을 275 nm에서 측정하는 방법(18)으로 정량하였으며, 정제효소의 저해제 영향등의 분석시에는 Casein-Folin법(19)을 병행하여 비교고찰하였다.

효소반응은 0.2M Glycine-NaOH 완충액(pH 9)에 용해시킨 0.6% Hammarsten casein 용액 0.5 ml에 0.05 ml의 효소액을 첨가하여 40°C에서 20분간 반응시켰다. 여기에 0.11M trichloroacetic acid, 0.22M sodium acetate, 0.33M acetic acid 조성의 반응정지액 0.5 ml를 가하고 미분해 casein을 침전시키기 위해 40°C에서 20분간 방치한 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 이때 효소활성도를 측정하기 위하여 상기의 원심분리 상등액을 275 nm에서 흡광도를 측정하거나, 상기의 원심분리 상등액 0.3 ml에 0.1 ml Folin-phenol 용액과 1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 첨가하여 40°C에서 20분간 발색시키고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성도(Unit)는 위의 조건에서 1분동안에 Hammarsten casein으로부터 1 µg의 tyrosine을 생성하는 효소의 양으로 하였다.

### 단백질의 정량

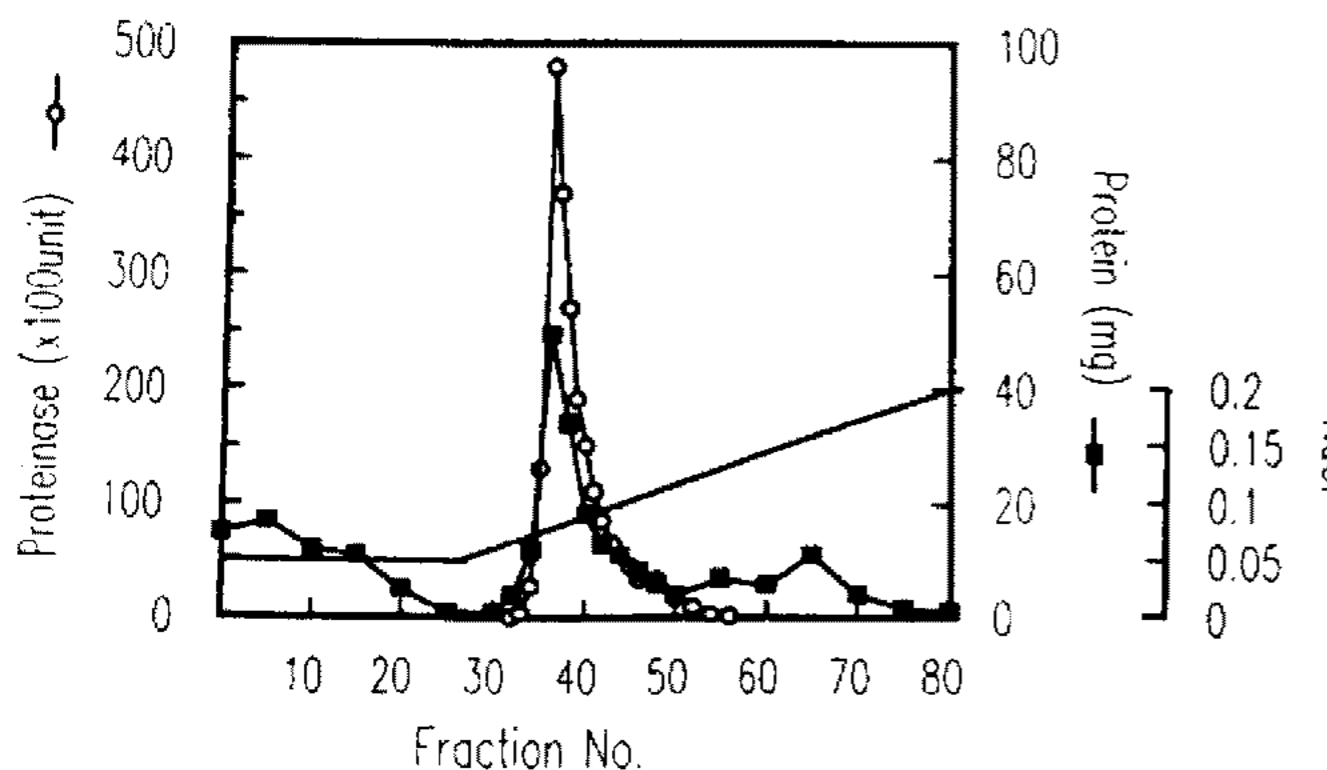
Column chromatography에서 단백질 함량은 275 nm의 흡광도로 정량하였고(18), 그밖의 단백질 함량은 Lowry 등의 방법(20)에 따라 정량하였으며, 표준단백질로는 bovine serum albumin(BSA)을 사용하였다.

**효소의 정제**

최적배지에서 배양한 배양액 1l를 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액 720 ml를 40~65% ammonium sulfate로 분획한 후 단백질성 물질을 회수하여 2l의 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 8)으로 6차례 교환하면서 투석하였다. 투석액에 존재하는 색소성 물질을 제거하기 위하여 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)으로 평형화시킨 DEAE-cellulose mini-column(2.2×5 cm)에 통과시켰다. 전처리한 조효소액을 DEAE-cellulose column(2.2×31 cm, 10 mM Tris-HCl 완충액, pH 8.5)에 흡착시키고 0.05M NaCl이 포함된 Tris-HCl 완충액으로 세척한 후, 0.05~0.2M NaCl의 농도구배로 용출시키면서 시간당 23 ml의 유속으로 5.7 ml씩 분획하였다. 효소활성 분획을 ultrafiltration(YM10 filter, Amicon Co.)으로 농축한 후 Sephadex G-100 column(1.2×110 cm, 10 mM Tris-HCl 완충액, pH 8)을 사용하여 시간당 5.4 ml의 유속으로 3.6 ml씩 용출시켰으며, 다시 효소활성 분획을 ultrafiltration으로 농축한 후 Sephadex G-75 column(1.2×95 cm, 10 mM Tris-HCl 완충액, pH 8)을 사용하여 시간당 4.9 ml의 유속으로 2.1 ml씩 분획하여 정제하였다. 정제한 효소는 SDS-PAGE를 이용하여 순도 및 분자량을 확인하였다.

**전기영동**

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)는 0.5% SDS가 포함된 10% polyacrylamide gel을 사용하였으며, 전기영동후 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하고, 7% acetic acid-5% methanol 조성의 용액으로 탈색하였다(21).



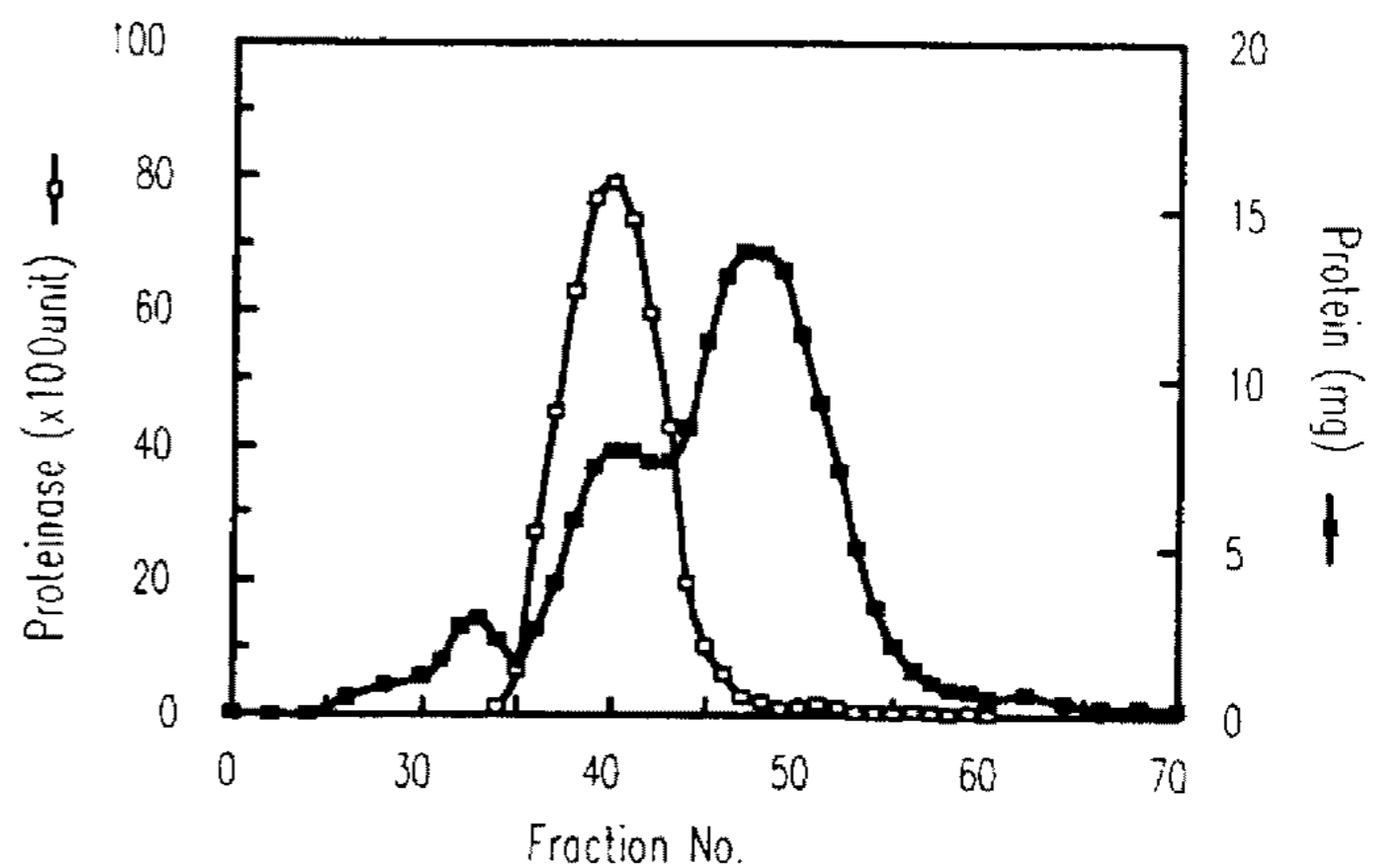
**Fig. 1. Chromatogram of the *Y. lipolytica* TH65 proteinase on DEAE-cellulose.**

The column (2.2×31 cm) was eluted with 0.05~0.2M NaCl containing 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) at a flow rate of 23 ml/hr; Fractions of 5.7 ml were collected.

**결과 및 고찰**

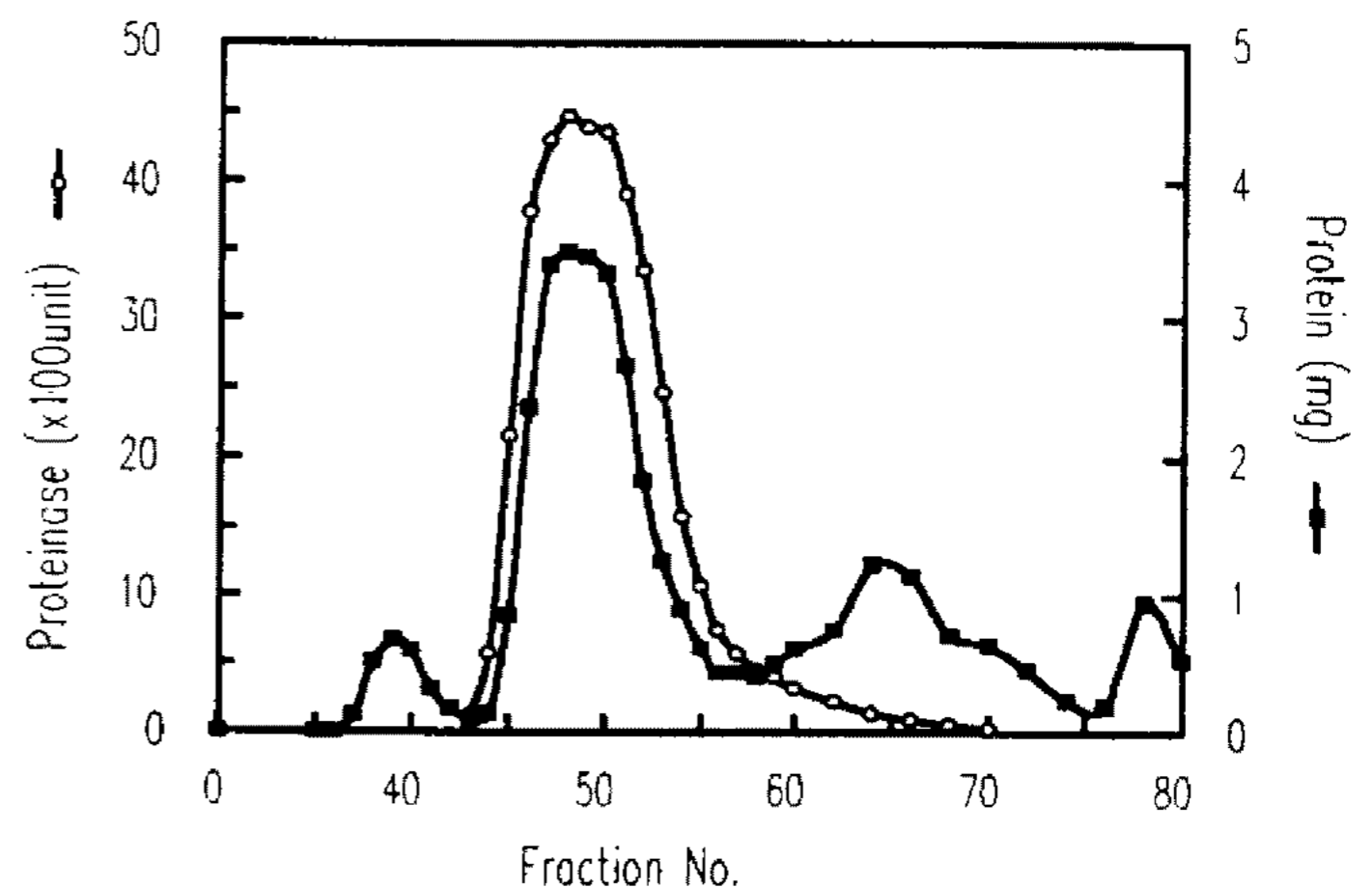
**효소의 정제**

배양액 1l로부터 얻은 상등액 720 ml를 염석 및 투석한 후 DEAE-cellulose column에 흡착 및 용출시킨 결과 34~52번에서 효소활성 peak가 나타났으며(Fig. 1), 비교적 효소활성이 높은 35~41번 분획 40 ml를 회수하여 ultrafiltration(YM10 filter)으로 2.7 ml로 농축하였다. 농축액을 Sephadex G-100 column에서 용출시키고 효소활성을 보인 35~48번 분획중 36~43번 분획 28.8 ml를 ultrafiltration으로 3.1 ml로 농축한 후, 다시 Sephadex G-75 column에서 용출시켜 단백질 peak와 효소활성 peak가 일치하는 45~54번 분획 21 ml를 회수하였다(Fig. 3). 회수한 효소를 SDS-PAGE로 순도를 조사한 결과 Fig. 4에 나타난 바와 같이 단일



**Fig. 2. Gel filtration of the *Y. lipolytica* TH65 proteinase on Sephadex G-100.**

The column (1.2×110 cm) was eluted with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8) at a flow rate of 5.4 ml/hr; Fractions of 3.6 ml were collected.



**Fig. 3. Second Gel filtration of the *Y. lipolytica* TH65 proteinase on Sephadex G-75.**

The column (1.2×95 cm) was eluted with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8) at a flow rate of 4.9 ml/hr; Fractions of 2.1 ml were collected.

Table 1. Summary of purification

Purification Steps	Volume (ml)	Total activity (Unit)	Total protein (mg)	Specific activity (Unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Supernatant of culture	720	200,160	1,845	108	1.0	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation	65	108,570	536	203	1.9	54
DEAE-cellulose	39.9	168,300	218	352	3.3	38
YM10 Ultrafiltration	2.7	659,100	158	417	3.8	33
Sephadex G-100	28.8	428,700	47	912	8.4	21
YM10 Ultrafiltration	3.1	398,200	36	995	9.2	18
Sephadex G-75	21	337,400	17	1,618	15.1	14

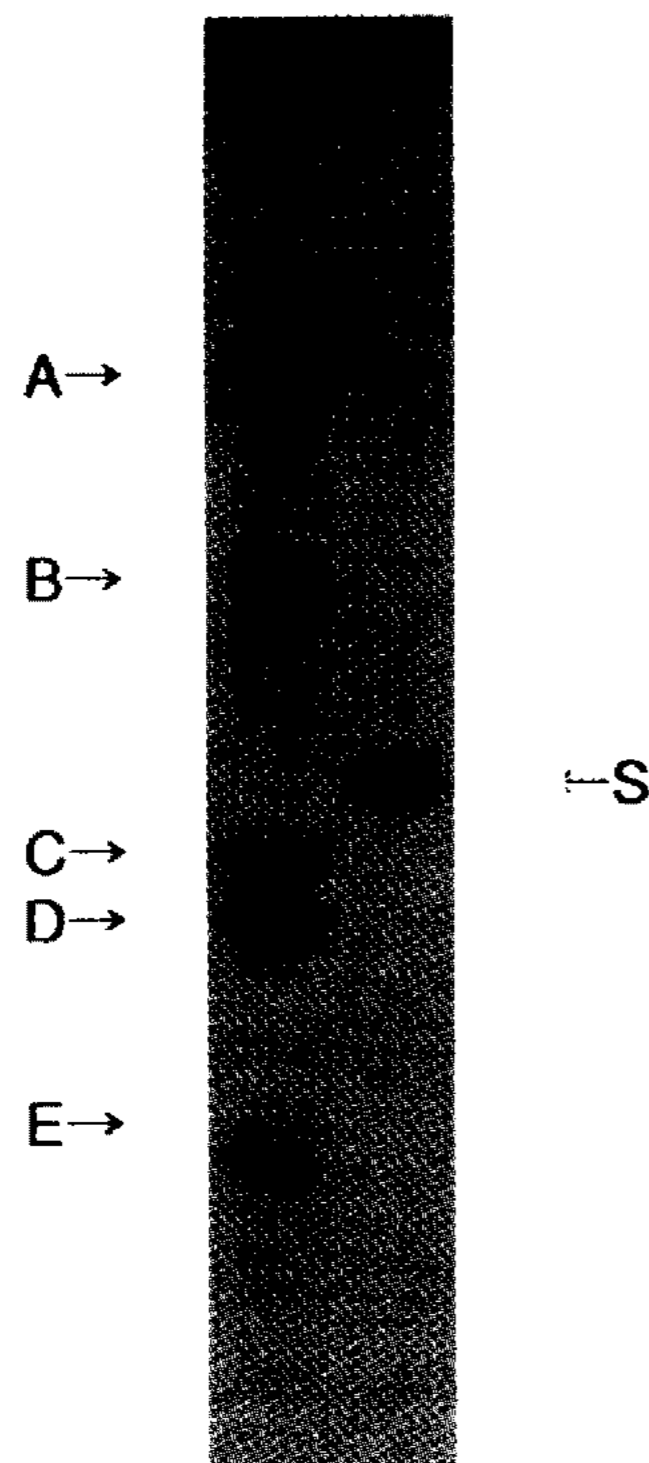


Fig. 4. SDS-PAGE of the purified proteinase

A: Bovine albumin (66,000), B: Egg albumin (45,000), C: Glyceraldehyde-3-phosphate (36,000), D: Trypsinogen (24,000), E: Trypsin inhibitor (20,100), S: Sample

band로 나타나 정제된 것으로 생각되며, 수율은 14% 이고 15배 정제되었다(Table 1).

#### 정제효소의 특성

**효소 분자량** SDS-PAGE에 따라 분자량을 측정된 결과, 31,500 정도였으며(Fig. 4), 이러한 결과는 North (22)가 언급한 대부분의 fungal serine proteinase가 18,500~35,000 범위의 저분자량이라는 사실과 일치하였다. 또한 *Saccharomycopsis lipolytica* CX161-1B의 alkaline protease(7)가 27,000~30,000, acid protease(10) I 28,000, II 32,000, III 36,000과 유사하였으나, *S. lipolytica* 37-1의 neutral protease(9)가 38,500, *Candida albicans*의 acid protease(23)가 45,000이란 사실과는 상

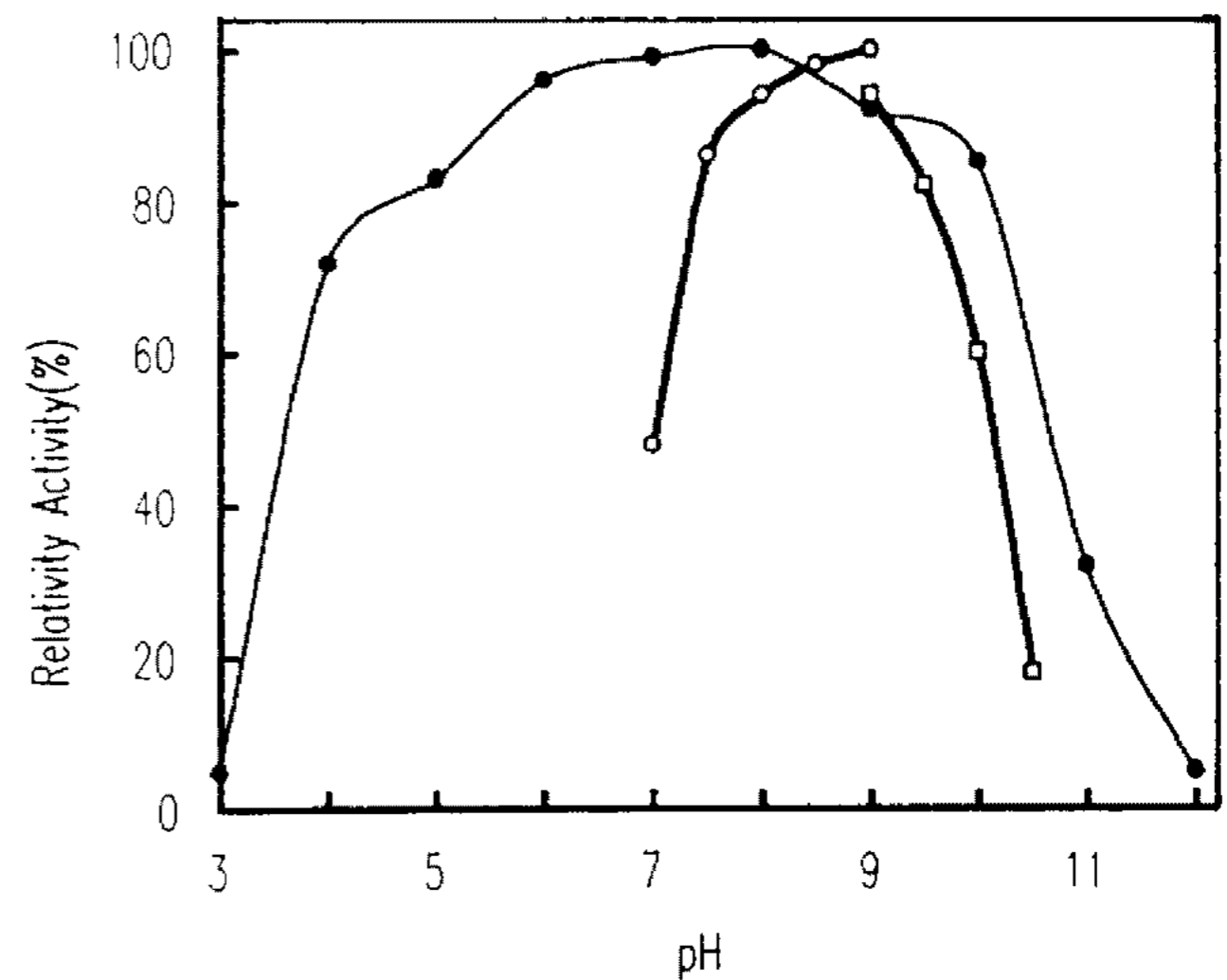


Fig. 5. Effect of pH on the activity and stability of the purified proteinase.

-○- 0.2M Tris-HCl buffer, -□- 0.5M Borate-NaOH buffer, -●- Enzyme stability

이하였다.

**pH의 영향** 효소의 최적 pH를 조사한 결과, pH 8.5~9에서 최적활성을 보였으며(Fig. 5), *C. olea* 148의 alkaline protease(24)가 pH 8~9, *S. lipolytica* CX161-1B의 alkaline protease(7)가 pH 9~10에서 최적활성을 보인 결과와 유사하였다(Fig. 5). pH 안정성을 조사하기 위하여 효소액을 pH 3~12까지 조절하여 4°C에서 24시간 방치한 후 잔존활성을 측정된 결과, 중성부위에서 대체로 안정하였다(Fig. 5).

**온도의 영향** 반응액의 pH를 9로 조절하고 각 온도에서 반응시킨 결과, 40°C에서 최적활성을 보였다(Fig. 6). *S. lipolytica* CX161-1B의 alkaline protease(7)가 40°C, *S. lipolytica* CX161-1B의 acid protease(10)가 42°C, *C. olea* 148의 alkaline protease(24)가 40°C, *Cryptococcus albidus* var. *aerius*의 acid protease(25)가 45°C에서 최적활성을 나타낸 결과와 유사하였으나, *Rhodotolula glutinis* K-24의 acid protease(26)의 60°C에서 최적활성을 나타낸 결과와는 상이하였다. 또한 온도안정성을 조사하기 위하여 10~60°C에서 1시간 방

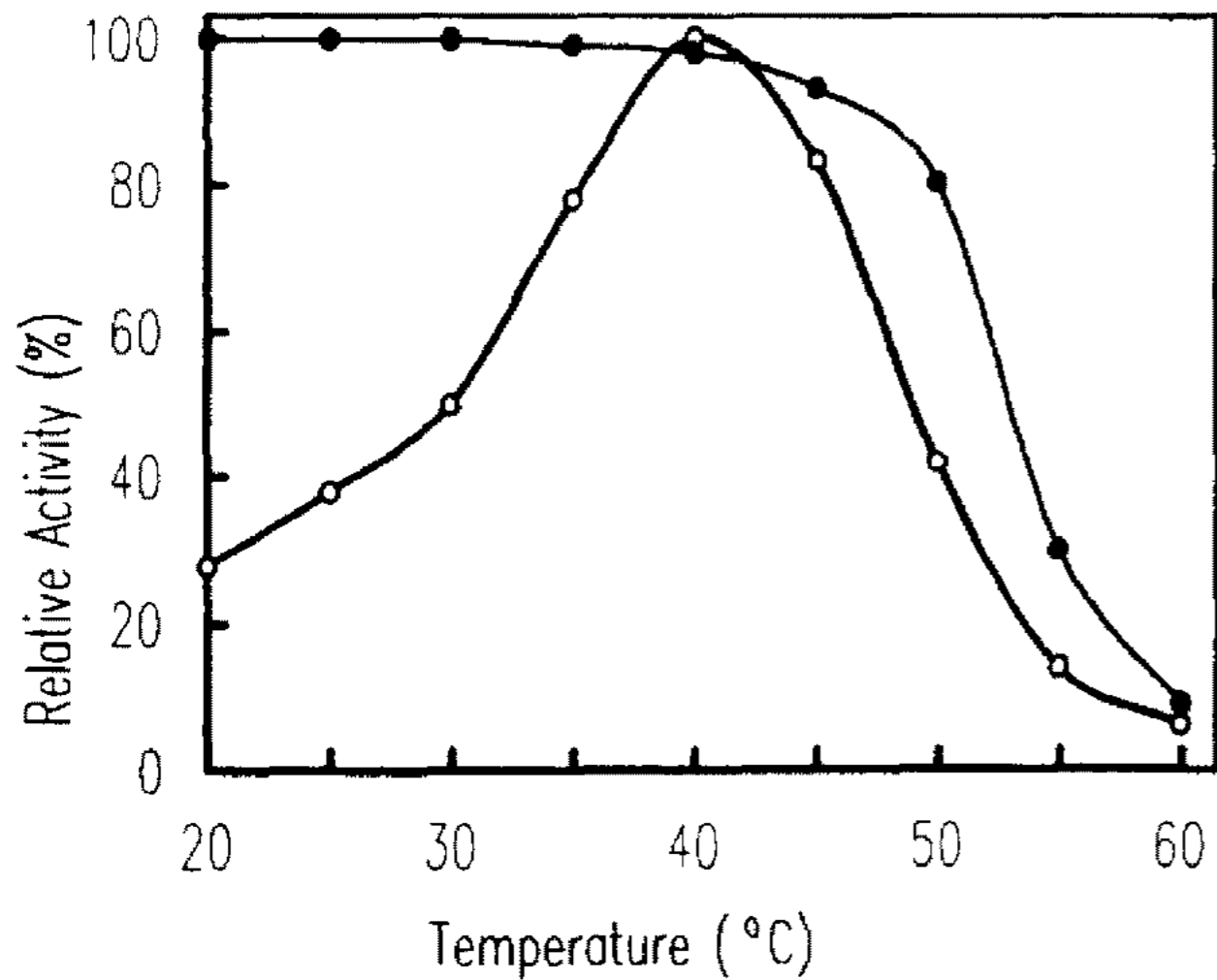


Fig. 6. Effect of temperature on the activity and stability of the purified proteinase. -○- Enzyme activity, -●- Enzyme stability

Table 2. Effect of metal ions on the proteinase activity of *Y. lipolytica* TH65

Metal ions (%)	Relative Activity (%)	
	1 mM	5 mM
None	100.0	100.0
LiCl	99.8	95.7
NaCl	98.4	94.2
BaCl <sub>2</sub>	68.0	39.8
CaCl <sub>2</sub>	84.1	47.7
CoCl <sub>2</sub>	72.0	17.1
FeCl <sub>2</sub>	78.9	34.5
HgCl <sub>2</sub>	11.0	9.0
MgCl <sub>2</sub>	81.2	55.5
MnCl <sub>2</sub>	71.0	24.0
ZnCl <sub>2</sub>	26.7	12.7
AlCl <sub>3</sub>	97.0	92.5

치한 효소액의 잔존활성을 측정한 결과, 45°C까지 비교적 안정한 것으로 나타났다(Fig. 6).

**무기염의 영향** 1 mM 농도에서는 Hg<sup>2+</sup>와 Zn<sup>2+</sup>만이 뚜렷한 저해를 보였으나, 5 mM 농도에서는 Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Al<sup>3+</sup>을 제외한 모든 2가 무기이온들에 의해서 심한 저해를 보였다(Table 2). *S. lipolytica* 37-1의 neutral protease(9)는 Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>에 의해, *C. olea* 148의 alkaline protease(24)는 Ca<sup>2+</sup>에 의해 활성이 증가된다고 보고하고 있어 본 조사와 차이를 보였다.

**저해제의 영향** 저해제의 영향을 조사한 결과 PMSF에 의해 저해되고 DTT에 의해 저해되지 않는 것으로 보아 활성부위에 serine 잔기를 가지나 thiol 그룹은 없는 것으로 생각되며, 5 mM phenanthrolin에서도 59% 정도 활성이 남아 있는 것으로 보아 Zn<sup>2+</sup> 요구성이 아닌 것으로 생각된다(Table 3). 또한 EDTA와

Table 3. Effect of inhibitors on the proteinase activity of *Y. lipolytica* TH65

Inhibitors	Relative Activity (%)		
	0.5 mM	1 mM	5 mM
Control	100	100	100
PMSF	-	7	1
DTT	-	107	97
β-Mercaptoethanol	-	103	96
KSCN	-	104	95
Phenanthrolin	-	124	59
Phenanthrolin with 5 mM Ca <sup>2+</sup>	NC	NC	102
EDTA	38	32	22
EDTA with 5 mM Ca <sup>2+</sup>	74	NC	NC
EGTA	49	35	29
EGTA with 5 mM Ca <sup>2+</sup>	81	NC	NC

All enzymes were preincubated with inhibitors for 30 min at 25°C, and the enzymes treated with metal chelating agents were preincubated again after addition of Ca salt for 30 min. Concentrated solutions of inhibitors were prepared as PMSF in propanol and phenanthrolin in ethanol. DTT: Dithiothreitol; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; EGTA: Ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid; PMSF: Phenylmethylsulphonyl fluoride. NC: Not Clear.

EGTA에 의해 부분적으로 저해되었으나, 저해제의 10배 농도에 상당하는 Ca<sup>2+</sup>을 다시 첨가시킬 경우 모두 효소활성이 많이 복원되는 것으로 나타나 metalloenzyme가 아닌 것으로 추정되었다. Ogrydziak 등(7)은 *S. lipolytica* CX161-1B의 serine protease가 metalloprotease는 아니라고 하였고, 강 등(27)도 *S. lipolytica* SKD 7005의 serine protease가 metalloprotease일 가능성은 불확실하다 하였으며, 본 조사에서도 metalloprotease가 아닌 것으로 나타났다. 이상의 결과로 보아 본 효소가 생산하는 protease는 alkaline serine proteinase(E.C. 3.4.21.14)로 생각된다.

요 약

최적조건에서 생산한 효소를 40~65% ammonium sulfate 분획, DEAE cellulose chromatography, Sephadex G-100과 Sephadex G-75 gel filtration을 이용하여 수율 14%, 15배 정제하였다. 정제효소의 분자량을 SDS-PAGE로 측정한 결과 31,500 정도였고, 최적온도와 최적 pH는 각각 40°C와 8.5~9.0이었다. 대부분의 2가 금속이온은 효소활성을 저해하였으며, 특히 Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> 등은 강하게 저해하였다. PMSF는 효소활성을 완전히 저해시켰으며, EDTA, EGTA 및 phenanthro-

lin은 부분적으로 저해시켰으나  $Ca^{2+}$ 을 첨가하면 모두 효소활성이 복원되는 것으로 나타나 metalloprotease는 아닌 것으로 생각되었다. 이상의 결과로 보아 본 효모 *Yarrowia lipolytica* TH65가 생산하는 효소는 alkaline serine proteinase로 생각된다.

### 참고문헌

- Matsubara, H., C.B. Kasper, D.M. Brown, and E.L. Smith. 1965. Subtilisin BPN', I. Physical properties and amino acid composition. *J. Biol. Chem.* **240**: 1125-1130.
- Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* No. 221. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 1407-1414.
- Bergkvist, R. 1963. The proteolytic enzymes of *Aspergillus oryzae*. II Properties of the proteolytic enzymes. *Acta Chem. Scand.* **17**: 1541-1551.
- 김창화, 이태형, 유춘발, 진익렬. 1996. Extracellular Proteinase를 생산하는 효모의 분리동정과 효소의 생산. 산업미생물학회지. Submitted.
- Kreger-van Rij N.J.W. 1984. *The Yeasts: a Taxonomic Study*. Pp. 399-413. 3rd ed. Elsevier science Publishers B.V., Amsterdam.
- Barnett, J.A., R.W. Payne, and D. Yarrow. 1983. *Yeasts: Characteristics and Identification*. Pp. 528 and Pp. 542-725. Cambridge University, Cambridge.
- Ogrydziak, D.M. and S.J. Scharf. 1982. Alkaline extracellular protease produced by *Saccharomycopsis lipolytica*. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 1225-1234.
- Mitsugi, K., T. Takami, S. Tobe, M. Kimura, T. Nakase, and K. Komagata. 1971. Extracellular production of yeast protease. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 1633-1635.
- Abdelal, A.T.H., E.H. Kennedy, and D.G. Ahearn. 1977. Purification and characterization of a neutral protease from *Saccharomycopsis lipolytica*. *J. Bacteriol.* **130**: 1125-1129.
- Yamada, T. and D.M. Ogrydziak. 1983. Extracellular acid proteases produced by *Saccharomycopsis lipolytica*. *J. Bacteriol.* **154**: 23-31.
- Ota, Y. and K. Yamada. 1970. Lipase from *Candida paralipolytica*, IV. Purification, some properties and modification of the purified enzyme with the concentrated solution of sodium chloride. *Agric. Biol. Chem.* **34**: 1368-1374.
- Ota, Y., K. Yoshioka, and Y. Minoda. 1793. Demonstration of the lipid lipase activators produced by *Candida paralipolytica*. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 2879-2883.
- Cheng, Suk-Chun and D.M. Ogrydziak. 1986. Extracellular RNase produced by *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* **168**: 581-589.
- Dostálek, M., V. Munk, and O. Volfová. 1968. Cultivation of the yeast *C. lipolytica* on hydrocarbons, I. Degradation of *n*-alkanes in batch fermentation of gas oil. *Biotechnol. Bioeng.* **10**: 33-43.
- Tsugawa, R., T. Nakase, T. Kobayashi, K. Yamashita, and S. Okumura. 1969. Fermentation of *n*-paraffins by yeast, I. Fermentative production of  $\alpha$ -Ketoglutaric acid by *C. lipolytica*. *Agric. Biol. Chem.* **33**: 158-167.
- Finogenova, T.V., N.V. Shishkanova, and I.A. Kataeva. 1988. Comparative study of *Candida lipolytica* with differing ability to produce citrate. *Mikrobiologiya.* **58**: 387-392.
- Ermakova, I.T., V.I. Illarionova, O.F. Mel'nikova, N.V. Shishkanova, and T.V. Finogenova. 1985. Activity of the enzymes of the tricarboxylic acid cycle and the anaplerotic pathways in various strains of *Candida lipolytica* growing on glucose and hexadecane. *Mikrobiologiya.* **54**: 735-739.
- Rick, W. and Wolf-Peter Fritsch. 1974. Pepsin, Pp. 1046-1053. In Bergmeyer H.U. (ed.), *Methods of enzymatic analysis*, Vol. 2, Academic press, New York.
- 萩原文二, 米谷隆, 赤堀四郎. 1956. 酵素研究法, Pp. 237. 第2卷, 朝倉書店, 東京.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Smith, B.J. 1984. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, Pp. 41-55. In Walker J.M. (ed.), *Methods in molecular biology*, Vol. 1, Humana Press, New Jersey.
- North, M.J. 1982. Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms, Pp. 308-313. In *Microbiological reviews*, Vol. 46.3, American Society for Microbiology.
- Rüchel, R. 1981. Properties of a purified proteinase from the yeast *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **659**: 99-113.
- Nelson, G. and T.W. Young. 1987. Extracellular acid and alkaline proteases from *Candida olea*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1461-1469.
- Alessandro, M. and F. Federico. 1980. Partial purification and characterization of a yeast extracellular acid protease. *J. Dairy Sci.* **63**: 1397-1402.
- Kamada, M., K. Oda, and S. Murao. 1972. Extracellular protease of yeasts, III. Purification of the extracellular acid protease of *Rhodotorula glutinis* K-24 and its general properties. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 1095-1101.
- 배인휴, 강국희. 1987. *Saccharomycopsis lipolytica*의 균체의 protease에 관한 연구: 효소의 정제 및 특성. 산업미생물학회지 **15**: 286-293.

(Received 9 February 1996)