

Extracellular Proteinase를 생산하는 효모의 분리동정과 효소의 생산

김창화 · 이태형 · 유춘발* · 진익렬¹

대구대학교 공과대학 식품공학과, ¹경북대학교 자연대학 미생물학과

Isolation, Identification and Production of a Yeast Producing an Extracellular Proteinase. Chang-Hwa Kim, Tae-Hyung Lee, Choon-Bal Yu* and Ingyol Jin¹. Department of Food Technology, Taegu University, Kyungsan 713-714, Korea, ¹Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea - A yeast strain TH65 producing a high level of proteinase under alkaline condition was isolated, and identified as *Yarrowia lipolytica* by morphological, physiological, and biochemical characteristics. In proteinase productivity, glycerol and glucose among tested carbon sources were very effective, and optimum concentration of glucose was 0.5%. Skim milk was found to be most effective nitrogen source in productivity, and its optimum concentration was 0.6%. But, cysteine, cystine and tryptophane decreased the proteinase productivity. Yeast extract was relatively effective at the range of 0.1~0.5%. The yeast showed maximum production of proteinase at 18°C, pH 9~11, and cultivation time of 36 hours.

세균을 비롯한 많은 미생물들과 동식물들의 proteinase가 오랫동안 연구되어 왔으나, 아직까지 효모의 세포외 protease에 대한 보고는 비교적 적은 편이다. Lodder 등(1)이 *Candida lipolytica*가 우유를 펩톤화시키는 능력이 있다고 한 이후, Ahearn 등(2), Ekland 등(3), Foda 등(4), Kamada 등(5)은 여러 효모를 대상으로 단백질 분해력에 대한 조사를 하였으며, Ahearn 등은 9속 20종의 효모에 대하여 casein, gelatin, albumin의 분해력을 비교한 결과 모든 기질에 분해력을 나타내는 균주는 *C. lipolytica* 뿐이라고 보고하였다. 효모의 protease에 대한 보고로는 *C. albicans*(6), *C. humicola*(7), *C. olea*(8), *Cryptococcus albidus*(9), *Rhodotorula glutinis*(10), *Saccharomycopsis fiburigela*(11), *Yarrowia lipolytica*(12-17) 등에 대한 연구가 있는 정도이고, 그 외 *Kluyveromyces*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces* 및 *Trichosporon* 속들에 포함된 일부 종들에서 caseinolytic activity가 관찰되었다는 보고(2, 5)는 있으나 구체적인 연구는 보이지 않는다.

현재까지 보고된 대부분의 효모들은 acid proteinase를 분비하는 것으로 알려져 있으며(5-12), 가공특성상 약산성 pH가 요구되는 알콜발효(18)나 유제품가공(9, 19) 등과 관련되어 많은 연구가 진행되었다. 그러나 효모의 alkaline proteinase에 대한 연구로는 *C. lipolytica*(14), *C. olea*(8), *Saccharomycopsis lipolytica*(16, 17)에 대한 보고가 있으나, 현재 이 3종들이 Barnett의 분류법(20)에서 모두 *Yarrowia lipolytica*로 간주됨에 따라 alkaline proteinase를 생산하는 효모는 아직 1종 뿐인 것으로 알려져 있다.

본 연구실에서는 효모의 산업적 응용을 목적으로 새로운 균주를 검색하던중 알칼리 영역에서도 casein 분해력을 보이는 효모를 분리하고, 분리균의 동정 및 효소생산조건에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

효모의 분리

경북 경산시 일원의 토양 및 농업용수와 하수시료 600여개로부터 1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% glucose 조성의 배지(YPD)를 이용하여 237주의 효모를 분리하였다. 분리효모를 1% skim milk, 0.2% glucose, 0.1% yeast extract, 0.1% KH₂PO₄, 0.01% CaCl₂·2H₂O, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 2% agar, pH 7.0 조성의 protease 생산배지에 접종하고 30°C에서 24~72시간 배양하여 colony 주변에 투명환을 나타내는 효모를 선별하였다. 선별한 13주의 균주중 알칼리 조건에서도 protease 생산능이 양호한 효모 TH65를 분리하였다.

동정

분리균주 TH65를 동정하기 위한 대조균주는 *Saccharomycopsis lipolytica* KCCM 12495(IFO 1548 및 NRRL YB-423과 동일균주) 및 *S. lipolytica* KCCM 35426(IFO 1658과 동일균주)을 사용하였으며, 분류방법은 Kreger-van Rij의 분류법(21)을 참고하고 Barnett의 분류법(20)에 준하여 동정하였다. 분리균은 동정을 하는 동안 주 1회씩 YPD 액체배지로 계대배양하였고, 접종할 균주는 보관균체를 Vegetable 8 액체배지(V8)(20)로 30°C에서 1일간의 배양을 3회 반복한 후 회수한 균체를 멸균식염수로 3회 세척하여 사용하였으며, 동정을 위한 배양은 분리균주와 대조균주를 동일 평판배지상에서 1~2주

*Corresponding author.

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

이상 배양후 비교하였고, 모든 결과는 2~3회 반복 확인하여 나타내었다.

배양

효소생산성을 조사하기 위하여 종배양은 보관중인 효모 1백금이를 취하여 5 ml의 YPD 액체배지에 접종하고 20°C에서 12시간 동안 110 stroke의 조건으로 진탕배양하였으며, 본배양은 0.6% skim milk, 0.5% glucose, 0.2% yeast extract 조성(pH 9)의 기본배지 50 ml를 250 ml용 삼각플라스크에 넣고 0.5 ml의 종배양액을 접종한 후 종배양과 동일한 조건으로 36시간 배양하였다.

균체량의 측정

균체량은 균체배양액의 10배 희석액을 600 nm에서 흡광도를 측정하여 건조균체량으로 환산하였으며, 흡광도 1은 배양액 1 ml당 건조균체량 0.72 mg에 상응한다. 건조균체량의 측정은 배양액 10 ml를 Whatman No. 2 여과지에서 감압여과시키고 동량의 증류수로 3회 세척한 후 105°C에서 건조하면서 측정된 양을 건조균체량으로 하였다.

효소활성도 측정

효소활성도는 Hammarsten casein에서 가수분해되어 유리되는 아미노산의 양을 275 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다(22). 효소반응은 0.2M glycine-NaOH buffer(pH 9)에 용해시킨 0.6% Hammarsten casein 용액 0.5 ml에 0.05 ml의 효소액을 첨가하여 40°C에서 20분간 반응시킨 후, 0.11M trichloroacetic acid, 0.22M

sodium acetate, 0.33M acetic acid 조성의 반응정지액 0.5 ml를 가하고 미분해 casein의 침전생성을 위해 40°C에서 20분간 방치하고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 275 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성도(Unit)는 위의 조건에서 1분동안에 Hammarsten casein으로부터 1 µg의 tyrosine에 해당하는 아미노산을 생성하는 효소의 양으로 하였다.

결과 및 고찰

균의 분리 및 동정

분리효모 237주를 대상으로 단백질 분해능이 있는 효모 13주를 선별한 후 알칼리 영역에서 활성이 우수한 TH65를 분리하였다. 분리균은 배양초기에는 구형 내지 장원형의 단세포형이었으나 배양시간이 경과할수록 격막이 뚜렷한 진균사를 형성하였고, 위균사의 형성은 관찰되지 않았다(Fig. 1a, Table 1). 자낭포자는 여러 배지에서 배양시간의 경과(3일 이상)에 따라 비교적 쉽게 형성되었고, 형성된 포자는 쉽게 유리되었으며, 균사의 중간이나 말단에 1~4개의 포자를 가진 자낭포자와 출아포자가 관찰되었다(Fig. 1a, b). 또한 발효성이 없었고, 대부분의 탄당류를 이용하지 못하였으나 citric acid를 비롯한 일부 유기산을 이용하였으며, nitrate 및 nitrite의 자화성은 없었다(Table 1). 이상의 결과들을 대조균주 *Saccharomycopsis lipolytica* KCCM 12495 및 KCCM 35426과 비교하면 일부 탄소원 자화성에서 약간씩 차이가 있었으나 그 외의 모든 특성에서 동일하였으며, 또한 Barnett 분류법(20)의 *Yarrowia lipolytica* 및 Kreger-van Rij 분류법(21)의 *Saccharomycopsis lipo-*

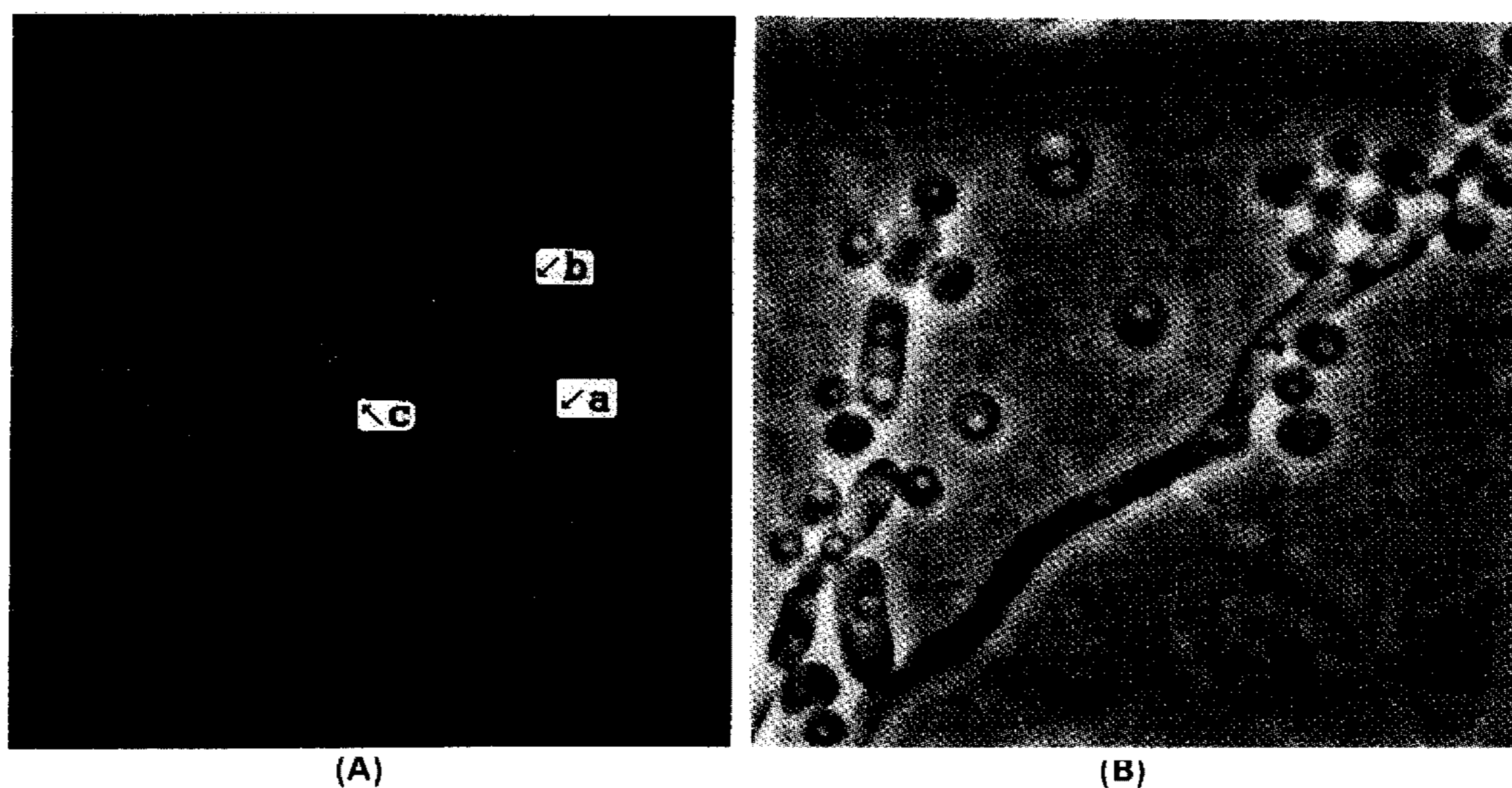


Fig. 1. Spores on mycelium (A) and liberated ascospores (B).

A. Ascospores are formed at the end of the hyphae (a) and on short side branches (b), and blastospores are arranged in verticils on the hyphae (c). The yeasts were cultured in YM medium for 3 days.

B. The liberated ascospores containing 1~4 asci. The yeasts were cultured on V8 agar medium for 1 week.

Table 1. Characteristics of the isolated yeast TH65 producing alkaline proteinase

Morphological characteristics

Cream-colored, moist, soft or tough, wrinkled, wavy and hilly colonies; abundant true mycelium (1.5~2×20~30 μm), none or rarely pseudomycelium; ascospores containing 1-4 ascospores are formed at the end of hyphae or on short side branches; blastospores are arranged in small chains or in verticils on the hyphae; a pellicle, a suspension, and a sediment are formed at stationary culture.

Fermentation: None

Assimilation

	TH65	SL1	SL2		TH65	SL1	SL2
D-Galactose	-	W	-	D-Mannitol	W	+	+
L-Sorbose	-	D	D	Galactitol	-	-	-
D-Ribose	-	D	D	myo-Inositol	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	D-Glucono-1,5-lacton	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-	5-Keto-D-gluconate	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	D-Gluconic acid	+	+	ND
L-Rhamnose	-	-	-	D-Glucuronic acid	-	-	-
Sucrose	-	-	-	DL-Lactic acid	+	W	D
Maltose	-	-	-	Succinic acid	+	+	+
α,α-Trehalose	-	-	-	Citric acid	+	W	-
Cellobiose	-	-	-	Methanol	-	-	-
Salicin	-	-	-	Ethanol	+	+	+
Arbutin	NC	NC	NC	Nitrate	-	-	-
Melibiose	-	-	-	Nitrite	-	-	-
Lactose	-	-	-	Ethylamine	+	+	+
Raffinose	-	-	-	L-Lysine	+	+	+
Melezitose	-	-	-	Cadaverine	+	+	+
Inulin	-	-	-	Creatine	-	-	-
Starch	-	-	-	Creatinine	-	-	-
Glycerol	+	+	+	At 35 °C	W	W	W
Erythritol	+	+	+	At 37 °C	-	-	-
Ribitol	-	-	-	At 0.01% cyclohexamide	+	+	+
Xylitol	-	-	-	At 0.1% cyclohexamide	+	+	+
L-Arabinitol	-	-	-	40% D-Glucose	D	D	D
D-Glucitol	+	+	+	50% D-Glucose	-	-	-
Additional Characteristics							
Diazonium Blue B	-	-	-	Urease activity	+	+	+
Starch formation	-	-	-	Gelatine liquefaction	+	+	+
Ester production	-	ND	ND	Splitting of bovine fat	+	+	+
Acetic acid production	-	ND	ND	RNase activity	+	ND	ND
Citric acid production	+	ND	ND				

+: Positive; -: Negative; W: Weak; D: Positive response delayed over 7 days; NC: Not Clear, ND: Not Determined, TH65: isolated yeast; SL1: *S. lipolytica* KCCM 12495; SL2: *S. lipolytica* KCCM 35426.

*lytica*에 제시된 자료와 비교할 때 mannitol을 제외한 조사된 모든 결과에서 동일한 것으로 나타났다. 따라서 분리균은 Barnett 분류법에 준하여 *Yarrowia lipolytica* TH65로 동정하였다.

효소생산성

탄소원의 영향 기본배지에 glucose 대신 각종 탄소원을 1% 농도로 첨가하여 효소생산성을 조사한 결과

(Table 2), glycerol과 glucose가 비교적 우수한 결과를 보임에 따라 *S. lipolytica* 37-1의 neutral protease(13)가 glycerol과 glucose에 의해 억제된다는 보고와 상이하였다. 또한 glucose 농도에 따른 영향을 조사한 결과 (Fig. 2), 0.5%에서 가장 좋았는데 이러한 결과는 *C. lipolytica* SKD7001의 alkaline protease(17)가 glucose의 농도 5%에서 최고생산성을 보인다는 보고와 상이하였다.

Table 2. Effect of carbon sources on the production of proteinase

Carbon sources (1%)	Specific Activity (Unit)	Relative Activity (%)
None	10.72	100
Glycerol	13.56	127
Fructose	12.65	118
Glucose	12.86	120

Basal medium was composed of 0.6% skim milk, 0.2% yeast extract at pH 9. The yeasts in 50 ml of media in a 250 ml Erlenmeyer flask were grown at 30°C for 36 hours.

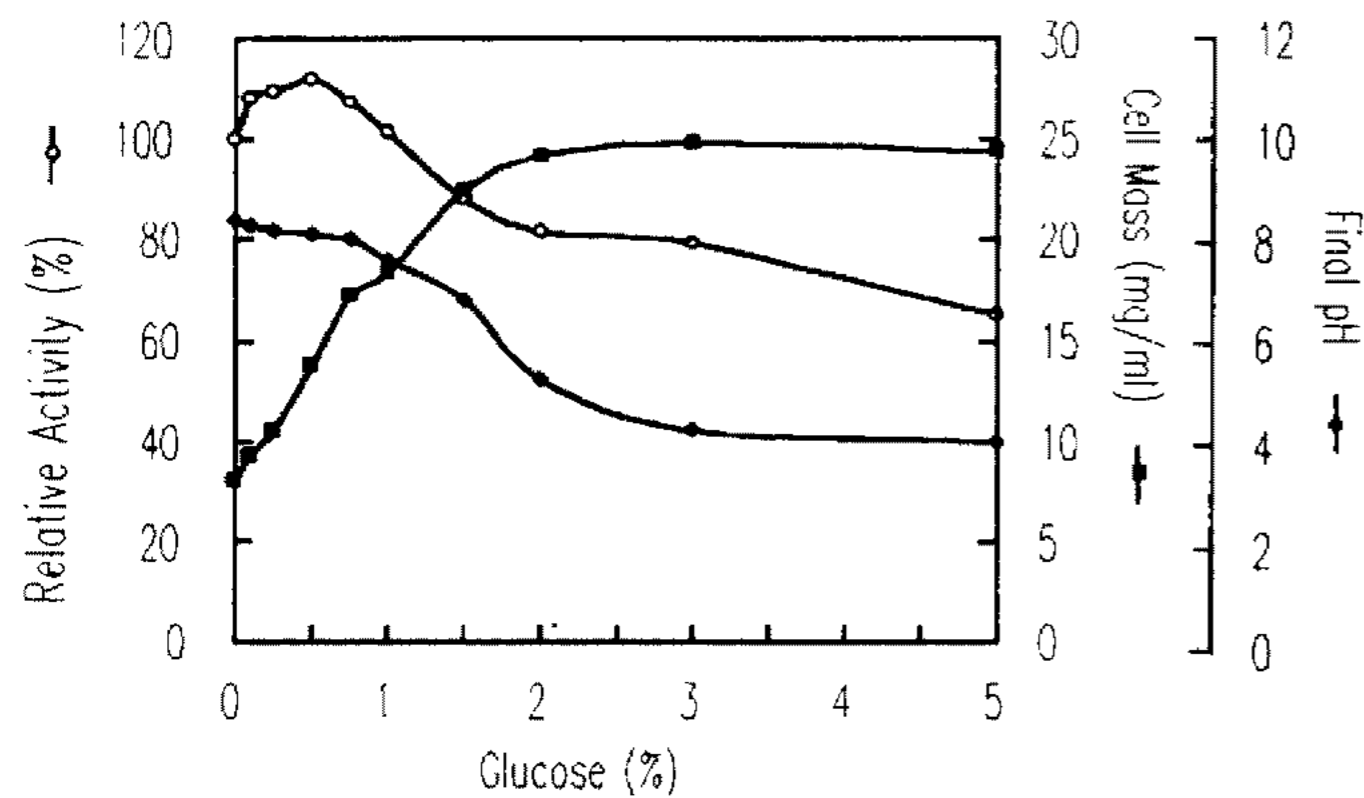


Fig. 2. Effect of glucose on the production of the proteinase. Basal medium was composed of 0.6% skim milk and 0.2% yeast extract at pH 9.

질소원의 영향 기본배지에 skim milk 대신 각종 질소원을 첨가 배양한 결과, skim milk가 효소유도에 가장 효과적이었으며(Table 3), skim milk 농도에 대한 영향을 조사한 결과는 0.6%에서 가장 좋았다(Fig. 3). 그러나 skim milk가 첨가된 배지에 ammonium sulfate를 첨가하면 효소생산성이 약간 감소되었는데 이러한 결과는 Ogrydziak 등(15)의 보고와 유사하였다. Yeast extract의 영향을 조사하기 위하여 기본배지에 yeast extract 농도를 다양하게 조절하여 효소생산성을 조사한 결과, 0.1~0.5%의 넓은 범위에서 비교적 양호하였다(Fig. 4).

아미노산의 영향 protease 합성은 최종산물인 아미노산에 의해 유도되거나 또는 catabolite repression을 받으며(23), 그 중 cystein 등은 *E. coli*에서 threonine deaminase의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있다(24). 본 효모에서도 아미노산의 영향을 조사하고자 기본배지에 25종의 아미노산을 각각 5 mM 농도로 첨가하여 배양한 결과, cystine, cysteine 및 tryptophane은 효소생산성을 감소시켰는데 이러한 원인에 대해서는 앞으로 더 조사해 볼 가치가 있다고 생각된다(Table 4).

무기염과 인산염의 영향 기본배지에 1 mM 농도의 각종 무기염을 첨가하여 배양한 결과, 대부분의 무기

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

Nitrogen sources	Specific Activity (Unit)	Relative Activity (%)
None	0.62	5
1% Skim milk	12.26	100
1% Casein	10.21	83
1% Peptone	10.51	86
1% Yeast extract	8.34	68
0.5% Urea	3.48	28
0.5% AS	0.49	0
1% Skim milk + 0.5% AS	9.92	81
1% Skim milk + 0.1% AS	10.34	84

Basal medium was composed of 0.5% glucose, 0.2% yeast extract at pH 9. The activity with skim milk was set at 100%. AS: Ammonium sulfate.

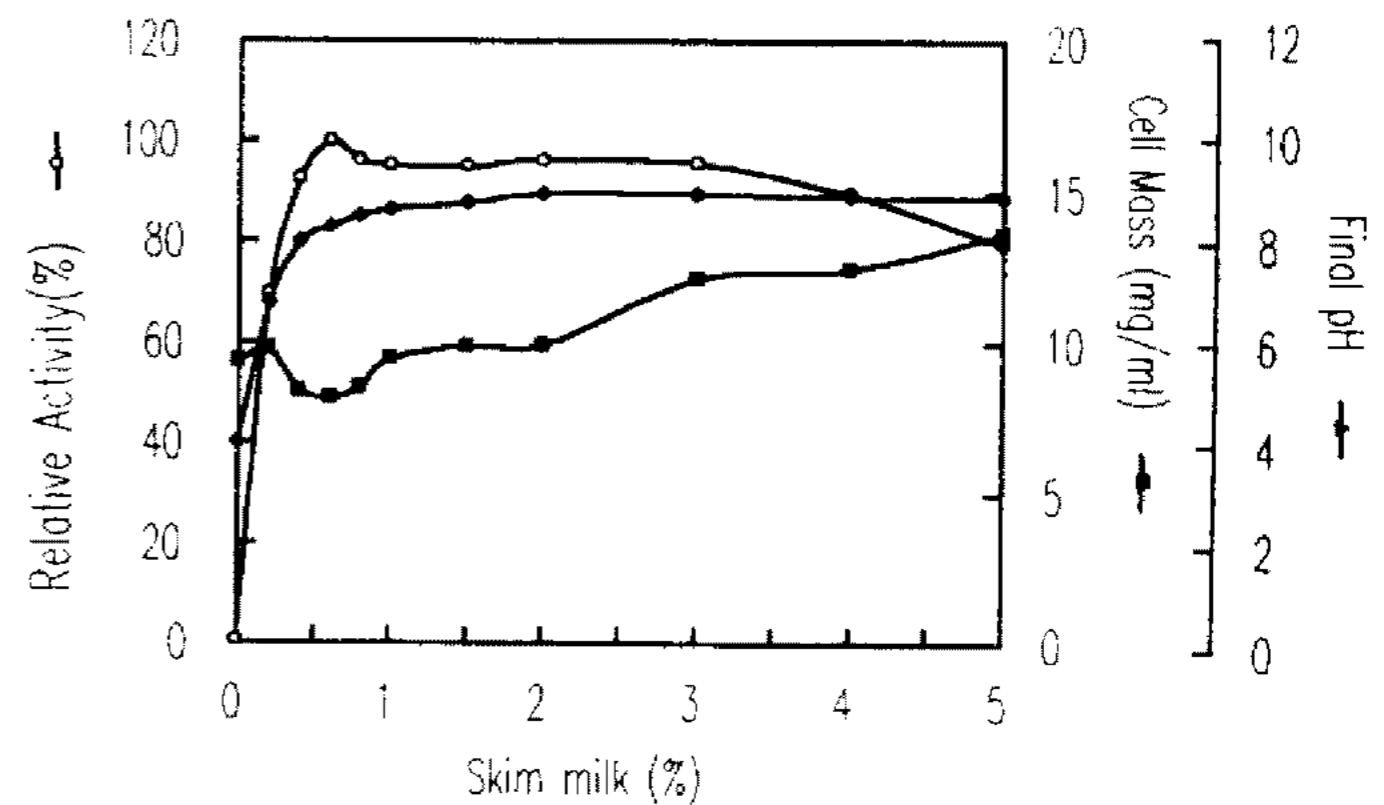


Fig. 3. Effect of skim milk on the production of the proteinase.

Basal medium was composed of 0.5% glucose and 0.2% yeast extract at pH 9.

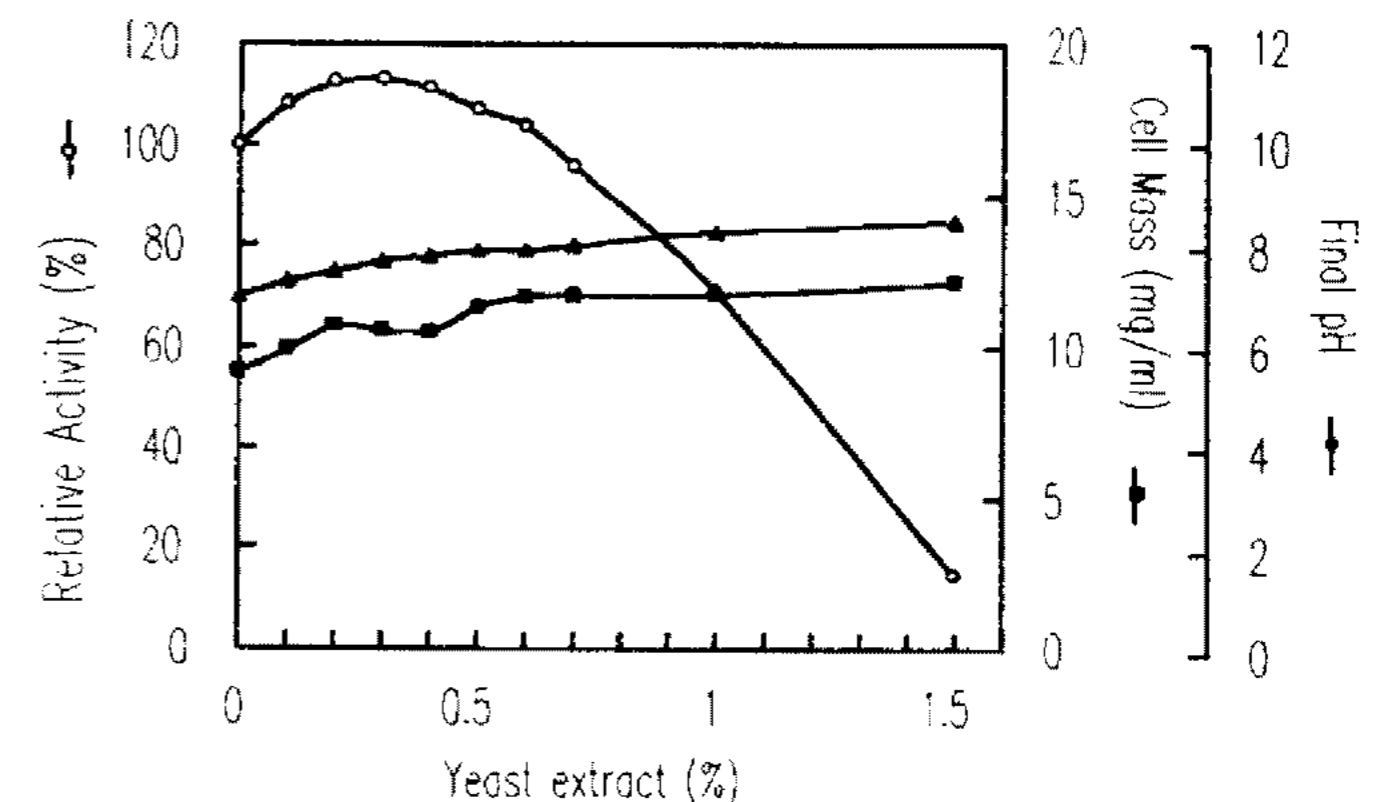


Fig. 4. Effect of yeast extract on the production of the proteinase.

Basal medium was composed of 0.6% skim milk and 0.5% glucose at pH 9.

염이 본 효소의 생산에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Table 5). 또한 기본배지에 10 mM 농도의 각

Table 4. Effect of amino acids on the production of proteinase

Amino acids (5 mM)	Specific Activity (Unit)	Relative Activity (%)
None	11.98	100
Glycine	12.99	108
Valine	15.13	126
Leucine	14.87	124
Isoleucine	14.71	123
Norvaline	9.79	82
Norleucine	14.16	118
Serine	13.16	110
Phenylalanine	11.04	92
Asparagine	13.86	116
Glutamine	14.02	117
Lysine	12.69	106
Arginine	12.03	100
Threonine	12.73	106
Cysteine	3.38	28
Cystine	1.17	10
Tyrosine	10.83	90
Tryptophane	4.93	41
Proline	14.97	125
Glutamic acid	15.22	127
DOPA	12.73	106
Alanine	13.82	115
Histidine	12.56	105
Methionine	11.14	93
Hydroxyproline	13.19	110
Citrulline	9.60	80
Aspartic acid	11.84	99

Basal medium was composed of 0.6% skim milk, 0.5% glucose, 0.2% yeast extract (pH 9). DOPA: Dihydroxyphenylalanine.

Table 5. Effect of mineral sources on the production of proteinase

Mineral sources (1 mM)	Specific Activity (Unit)	Relative Activity (%)
None	13.22	100
LiCl	12.81	97
KCl	13.41	101
NaCl	12.98	98
CaCl ₂	12.57	95
FeCl ₂	13.01	98
MgCl ₂	13.30	101
MnCl ₂	13.15	100
ZnCl ₂	13.14	99
AlCl ₃	13.09	99
FeCl ₃	13.51	102

Basal medium was composed of 0.6% skim milk, 0.5% glucose, 0.2% yeast extract at pH 9.

Table 6. Effect of phosphate salts on the production of proteinase

Phosphate salts (10 mM)	Specific Activity (Unit)	Relative Activity (%)
None	14.02	100
HPO ₃	9.38	67
NH ₄ H ₂ PO ₄	10.57	75
(NH ₄) ₂ HPO ₄	10.74	77
Ca(HPO ₄) ₂	10.64	76
CaHPO ₄	11.51	82
KH ₂ PO ₄	11.50	82
K ₂ HPO ₄	11.41	81
NaH ₂ PO ₄	11.13	79
Na ₂ HPO ₄	10.84	77

Basal medium was composed of 0.6% skim milk, 0.5% glucose, 0.2% yeast extract at pH 9.

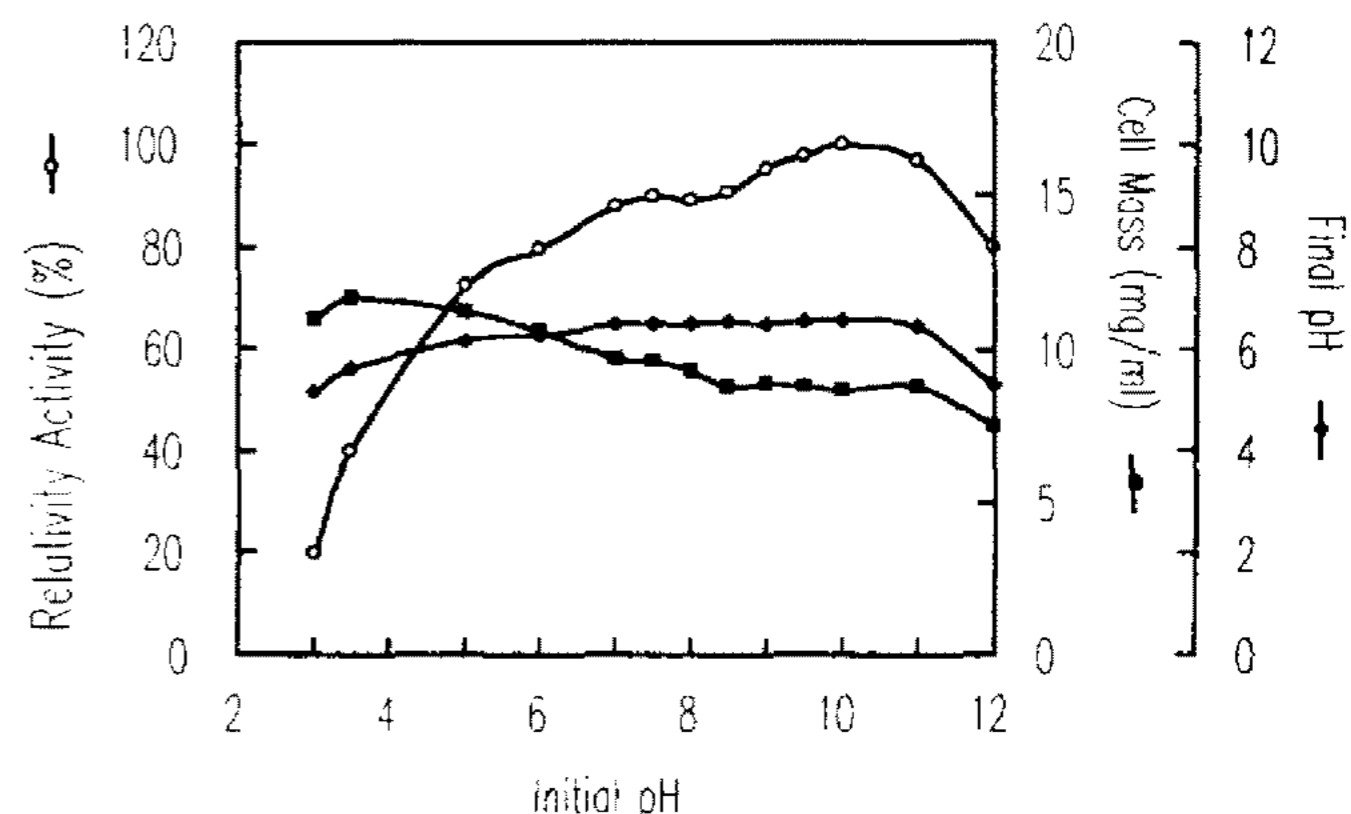


Fig. 5. Effect of initial pH on the proteinase production. Cultivations were carried out for 36 h at 18°C in the medium containing 0.6% skim milk, 0.5% glucose, and 0.2% yeast extract.

중 인산염을 첨가하여 배양한 결과는 영향이 없거나 약간 감소하는 경향을 보였다(Table 6).

배양초기 pH의 영향 이상의 결과로 알게된 0.6% skim milk, 0.5% glucose, 0.2% yeast extract 조성의 효소생산용 최적배지를 pH 3~12 범위로 조절하여 배양한 결과, 균체생육은 pH 3~5에서 가장 좋았으나 효소생산은 pH 9~11에서 가장 좋았다(Fig. 5).

배양온도의 영향 상기의 효소생산용 최적배지(pH 10)를 L자형 시험관(15×1.5 cm)에 8 ml씩 주입하고 Temperature gradient incubator(TN-3, Toyo Kagaku Sangyo Co.)를 이용하여 10~36°C 범위로 36시간 배양한 결과 효소생산성 및 균체생육은 18°C에서 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 6). 이러한 결과는 *C. lipolytica* SKD7001의 alkaline protease(17) 생산에서 균체량이 15°C에서 제일 높았다고 한 사실과 유사하였으나 효소생산성이 25°C에서 제일 높았다는 사실과는 상이하였다.

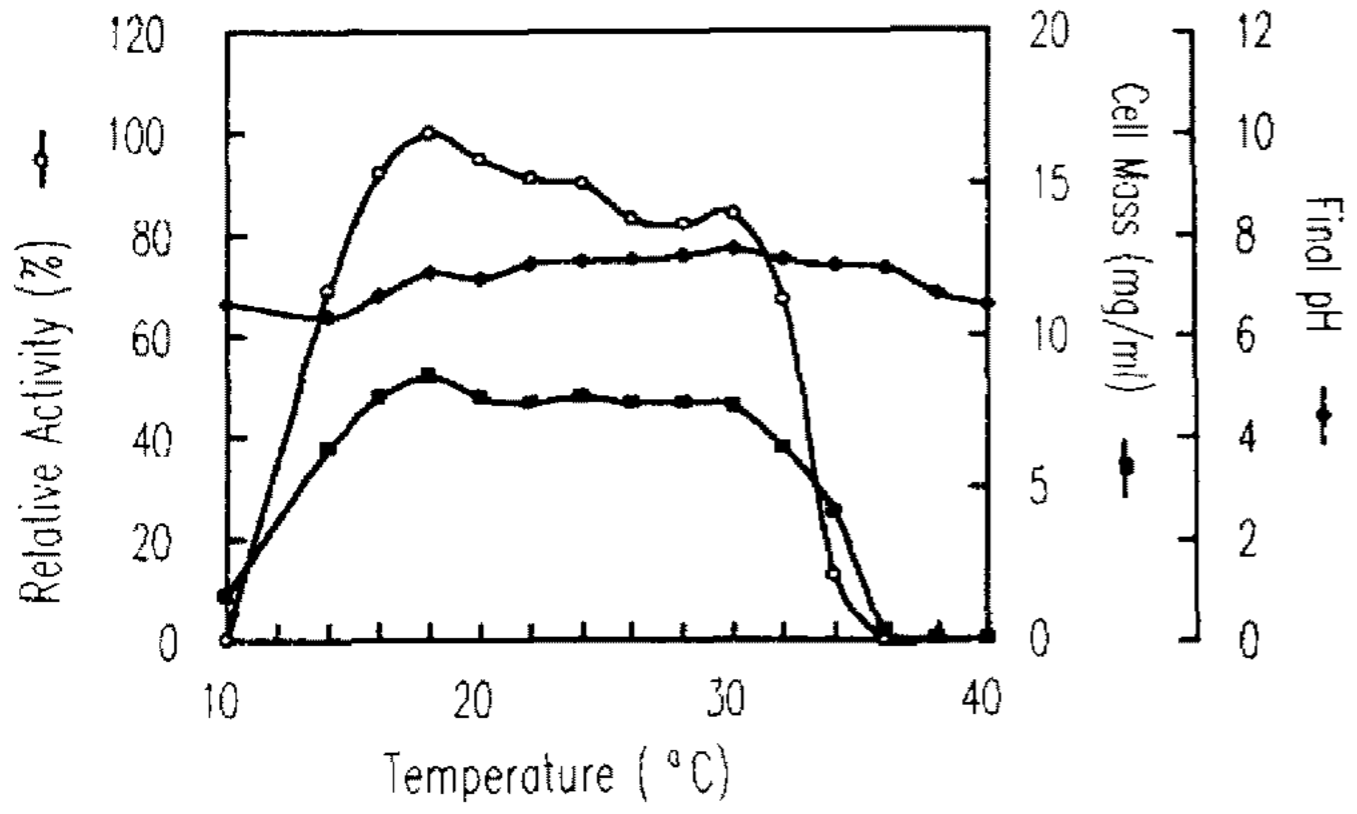


Fig. 6. Effect of temperature on the proteinase production. The yeasts were cultured in 8 ml of the media containing 0.6% skim milk, 0.5% glucose, and 0.2% yeast extract at pH 9 for 36 h in a L-shape tube with temperature gradient incubator.

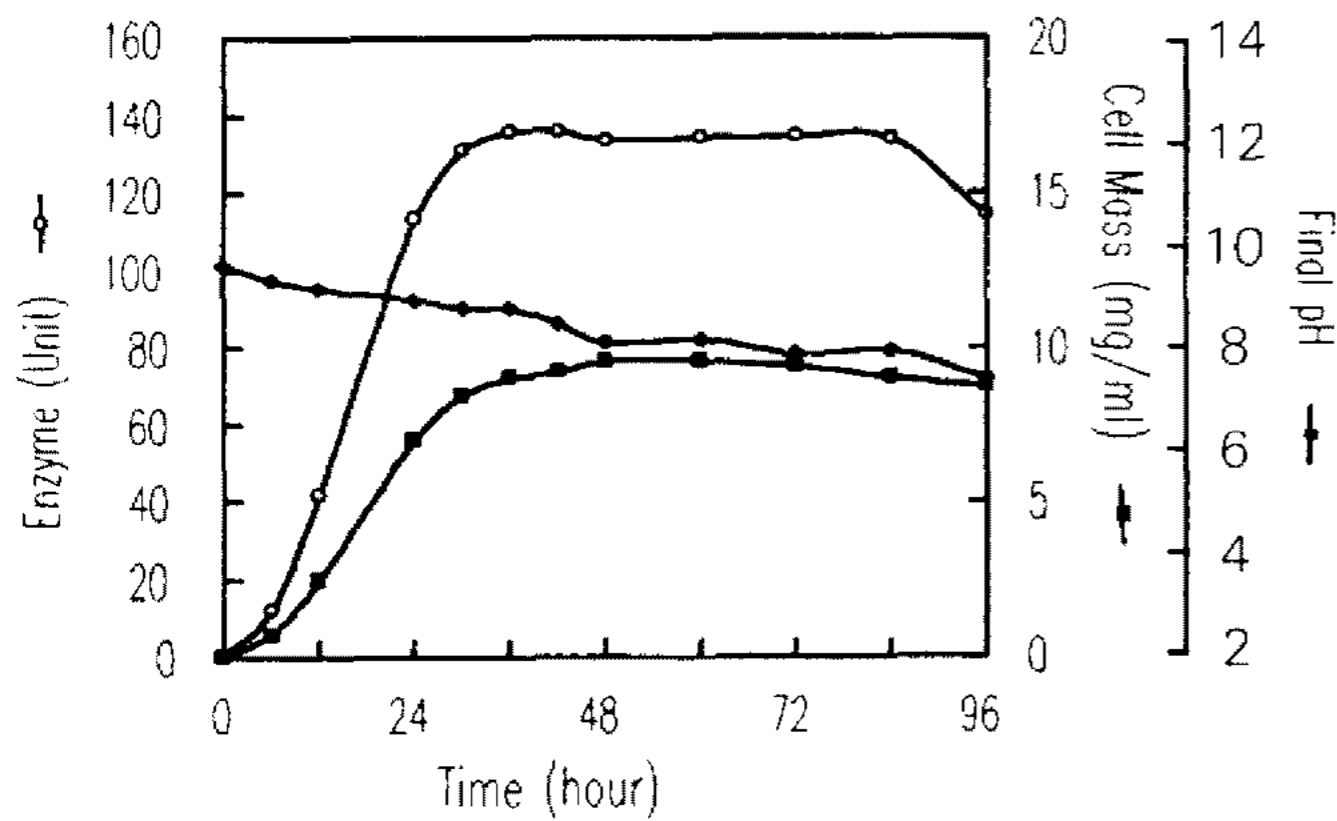


Fig. 7. Time course on the proteinase production. Cultivations was carried out in 1 l of the enzyme production medium in a 2 l Jar-fermentor with 20°C for 5 days.

배양시간에 따른 효소생산성 효소생산용 최적배지 1l를 2l용 jar fermentor에 넣고 종배양액 10 ml를 접종하여 18°C에서 배양하여 배양한 결과, 효소생산성은 36시간경에 가장 높았다(Fig. 7). 이러한 결과는 *C. lipolytica* SKD7001의 protease(17)가 36시간, *C. lipolytica* AJ4541의 protease(14)가 25시간에 최고생산성을 보인 점과는 유사하였으나, *Rhodotorula glutinis* K-24의 acid protease가 72시간(10)에 최고생산성을 보인 점과는 많이 달랐으며, 강 등(17)은 *C. lipolytica*의 protease는 장시간 배양하면 배양액중의 효소활성이 감소한다고 하였는데 본 효모도 그와 동일한 현상으로 생각된다.

요 약

토양 및 농업용수와 하수 등으로부터 분리한 237주의 효모를 대상으로 단백질 분해력이 있는 효모 13주를 분리한 후, 알칼리 조건에서 활성이 우수한 효모 TH65의 형태학적 및 생리생화학적 특성을 조사하고, 그 결

과를 *Saccharomycopsis lipolytica* KCCM 12495 및 *S. lipolytica* KCCM 35426와 비교한 바, 발효성이 없고 대부분의 당류와 nitrate를 이용하지 못하는 등 대조 균주와 거의 동일한 특성을 보임에 따라 분리균주를 *Yarrowia lipolytica* TH65로 동정하였다. 분리효모의 protease 생산성을 조사한 결과, 탄소원으로는 glycerol과 glucose가 좋았고, glucose 농도는 0.5%가 적당하였다. 질소원으로는 0.6% skim milk에서 가장 많은 효소가 유도되었고, 아미노산에 의한 영향을 조사한 결과는 cysteine, cystine 및 tryptophane에 의해 효소생산성이 감소되는 것으로 나타났다. Yeast extract 농도의 영향을 조사한 결과는 0.1~0.5%에서 양호하였으나, 첨가된 대부분의 무기염과 인산염은 효소생산성을 증가시키지 못하는 것으로 나타났다. 배양초기 pH는 9~11에서 가장 좋았고, 배양온도는 18°C에서 가장 좋았으며, 배양시간에 따른 효소생산성은 36시간에서 최고치를 나타내었다.

참고문헌

1. Lodder J. and N.J.W. Kreger-van Rij. 1952. *The yeasts*, Pp. 713. 2nd ed. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
2. Ahearn D.G., S.P. Meyers, and R.A. Nichols. 1968. Extracellular proteinases of yeasts and yeastlike fungi. *Appl. Microbiol.* **16**: 1370-1374.
3. Ekland M.W., J. Spinelli, D. Hiyauchi, and H. Groninger. 1965. Characterisation of yeasts isolated from Pacific crab meat. *Appl. Microbiol.* **13**: 985-990.
4. Foda M.S. and B.S.M. El-Din. 1979. Distribution of extracellular proteolytic activity among various yeasts. *Zentralblatt Für Bakteriologie* **134**: 89-93.
5. Kamada M., K. Maeyama, T. Koyama, and S. Murao. 1972. Studies on the extracellular protease of yeasts. II. Distribution of extracellular protease producing yeasts. *Nippon Nogeigagaku Kaishi* **46**: 171-175.
6. Remold H., H. Fasold, and F. Staib. 1968. Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **167**: 399-406.
7. Ray M.K., K.U. Devi, G.S. Kumar, and S. Shivaji. 1992. Extracellular protease from the antarctic yeast *Candida humicola*. *Appl. Env. Microbiol.* **53**: 495-499.
8. Nelson G. and T.W. Young. 1987. Extracellular acid and alkaline proteases from *Candida olea*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1461-1469.
9. Alessandro M. and F. Federico. 1980. Partial purification and characterization of a yeast extracellular acid protease. *J. Dairy Sci.* **63**: 1397-1402.
10. Murao S., M. Kamada, T. Nakase, and S. Ogura. 1972. Studies on the extracellular protease of yeasts. I. The identification of the yeast No. K-24 and the production of acid protease. *Nippon Nogeigagaku Kaishi* **46**: 167-170.
11. Yamashita I., D. Hirata, and M. Machida. 1986. Clo-

- ning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of the secretable acid protease gene from *Saccharomycopsis fibuligera*. *Agric. Biol. Chem.* **40**: 1087-1092.
12. Yamada T. and D.M. Ogrzydziak. 1983. Extracellular acid proteases produced by *Saccharomycopsis lipolytica*. *J. Bacteriol.* **154**: 23-31.
 13. 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.
 14. Mitsugi K., T. Takami, S. Tobe, M. Kimura, T. Nakase, and K. Komagata. 1971. Extracellular production of yeast protease. *Agric. Biol. Chem.* **33**: 1633-1635.
 15. Ogrzydziak D.M., A.L. Demain, and S.R. Tannenbaum. 1977. Regulation of extracellular protease production of *Candida lipolytica*. *Biochim. et Biophys. acta.* **497**: 525-538.
 16. Ogrzydziak D.M. and S.J. Scharf. 1982. Alkaline extracellular protease produced by *Saccharomycopsis lipolytica*. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 1225-1234.
 17. 강국희, 배인휴, 이춘화. 1987. *Saccharomycopsis lipolytica*의 균체의 protease에 관한 연구: 효소의 생산조건. *한국산업미생물학회지* **15**: 279-285.
 18. Bilinski C.A., I. Russell, and G.G. Stewart. 1987. Applicability of yeast extracellular proteinases in brewing; physiological and biochemical aspects. *Appl. Env. Microbiol.* **53**: 495-499.
 19. Woods F.C. and J.E. Kinsella. 1980. Isolation and properties of proteases from *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Food Biochem.* **45**: 79-98.
 20. Barnett J.A., R.W. Payne, and D. Yarrow. 1983. *Yeasts; Characteristics and identification*, Pp. 528, Pp. 542-725. Cambridge University, Cambridge.
 21. Kreger-van Rij N.J.W. 1984. *The yeast, a taxonomic study*, Pp. 399-413. 3rd ed. Elsevier science Publishers B.V., Amsterdam.
 22. Rick W. and W.P. Fritsch. 1974. Pepsin, Pp. 1046-1053. In Bergmeyer H.U. (ed.), *Methods of enzymatic analysis*, Vol. 2, Academic press, New York.
 23. Glenn A.R. 1976. Production of extracellular proteins by bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **30**: 41-62.
 24. Harris C.L. 1981. Cystein and growth inhibition of *Escherichia coli*: Threonine deaminase as the target enzyme. *J. Bacteriol.* **145**: 1031-1035.

(Received 4 February 1996)