

## *Dicyma* sp. YCH-370이 생산하는 효모세포벽 용해효소 II. 효소활성에 미치는 기질 효모의 배양조건 및 전처리 효과

정희철\* · 함병권 · 유주현\* · 배동훈

단국대학교 식품공학과 및 연세대학교 생물산업소재연구센터

\*연세대학교 생명공학과 및 생물산업소재연구센터

## Yeast Cell Wall Lytic Enzyme Produced by *Dicyma* sp. YCH-37 II. Effect of Culture Conditions and Pretreatment of Yeast on the Enzyme Activity

Hee-Chul Chung\*, Byoung-Kwon Hahm, Ju-Hyun Yu\* and Dong-Hoon Bai

Department of Food Engineering, Dankook University

and Bioproduct Research Center in Yonsei University

\*Department of Biotechnology and Bioproduct Research Center, Yonsei University

### Abstract

We examined some properties of yeast cell wall lytic enzyme produced by *Dicyma* sp. YCH-37. Several metal ions, reducing reagents, and chemical modifiers have little effects on the lytic activity, except guanidine-HCl. Yeast cells of early log phase were more susceptible to the enzyme than those of stationary phase, and heat-treated cells were more easily lysed than intact living ones. Yeast cells pretreated with organic solvents such as butanol and acetone were more susceptible to the enzyme than intact living ones. Yeast cells cultured in Yeast extract-Malt extract medium containing 0.5 M ammonium sulfate were easily lysed by the lytic enzyme, and yeast cells cultured without shaking were more easily lysed by the enzyme than those with shaking. When SDS,  $\beta$ -mercaptoethanol, Triton X-100, sodium sulfite, and KCl were added to enzyme reaction mixture each, lysis of yeast cells was more effective.

Key words: yeast cell wall lytic enzyme, *Dicyma* sp., susceptibility

### 서 론

효모는 인류가 가장 오래전부터 이용해왔던, 미생물공학을 발전시킨 미생물 중의 하나이며, 주로 알콜 발효에 이용될 뿐만 아니라 생물전환에도 이용되고 있다. 효모는 균체내 성분으로 비타민 B군류<sup>(1)</sup>, 보효소류와 여러 생리활성물질을 갖고 있으며<sup>(2)</sup>, 아미노산, 펩타이드 및 단백질 등의 함량이 다른 미생물에 비해 현저히 높은 것으로 밝혀졌고, 이들이 글루탐산을 포함하는 유리아미노산과 5'-monophosphonucleotide 등의 핵산물질로 분해되어 구수한 맛의 정미성분을 형성하기도 한다. 따라서 분쇄된 효모로부터 생산된 효모추출물은 미생물 생육배지 뿐만 아니라 식품공업

분야에서 천연조미료, 또는 영양제 등의 건강식품으로서 사용되고 있다. 또한 맥주제조공정 후의 폐효모를 이용한 효모추출물 생산도 이루어지고 있으며, 이들 맥주효모는 건강과 질병에 대하여 유용한 작용을 하는 것으로 알려져 있다<sup>(3)</sup>.

효모추출물의 제조방법은 자기소화법, 산,알칼리 분해법, plasmolysis, 기계적 분해법, 효소분해법 등 크게 다섯가지로 분류할 수 있다. 이중 자기소화법은 효모자체내에 존재하는 분해효소를 이용하여 효모의 세포벽을 분해하는 방법으로, 효모를 40~60°C로 유지시켜서 세포내 분해효소에 의해 효모세포벽이 분해되어 세포내 성분이 밖으로 추출되도록 하는 방법이다<sup>(4)</sup>. 이 방법에 의하여 자기소화온도, pH, 시간 등의 영향인자를 조절하여 효모현탁액으로부터 세포내 유용물질을 다량 추출할 수 있다. 추출된 효모추출물은 글루탐산의 함량이 높고 품질이 우수하나, 추출시

Corresponding author: Dong-Hoon Bai, Department of Food Engineering, Dankook University, Anseodong, Chunan 330-714, Chungnam, Korea

장시간이 요구되고 수율이 낮은 것이 단점이다. 한편, 효소분해법은 효모세포벽을 다른 미생물 유래의 효소를 이용하여 분해 및 용해시켜서 효모추출물을 제조하는 방법으로, 첨가된 효소들 그 자체가 단백질 원으로서 작용할 수 있고, 이들 효소들이 효모세포벽 이외의 효모세포내 물질들에는 그다지 영향을 주지 않기 때문에 최근 가장 활발히 연구되고 있는 방법이다.

본 저자들은 토양으로부터 효모세포벽 용해효소 생산균인 *Dicyma* sp. YCH-37 균주를 분리하여 효소를 정제한 후 그 특성을 검토하였다<sup>(4)</sup>. 따라서 본 연구에서는 본 균주가 생산하는 효모세포벽 용해효소의 효소활성에 미치는 인자 및 각종 조건에 따른 효모의 분해 민감도에 관하여 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 기질 효모의 조제

효모세포벽 용해효소를 생산하는 본 균주의 효소활성 측정을 위하여 기질 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 11290을 Yeast extract-Malt extract 배지 (1.0% glucose, 0.5% Bacto-peptone, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, pH 6.2)를 이용하여 30°C에서 24시간 진탕배양하였다. 균체 배양액을 6,000×g (Hitachi 20PR-52D, Rotor RPR12-2)에서 10분간 원심분리하여 균체를 모은 다음, 0.9% (w/v) NaCl 용액으로 2회 세척하고 -20°C에서 보관하면서 효소활성 측정에 이용하였고, 가열처리된 기질 효모는 100°C에서 30분간 방치 후 사용하였다.

### 효소활성 및 민감도 측정법

효모세포벽 용해효소의 활성측정은 Hayashi 등의 방법<sup>(5)</sup>을 변형하여 사용하였다. -20°C에 보관중인 기질을 100°C에서 30분간 방치한 후 660 nm에서 흡광도가 1.0이 되도록 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 균체를 현탁하였다. 이 균체현탁액 2 mL에 효소액 200 μL를 첨가하여 40°C에서 60분간 정치하여 반응시킨 다음, 660 nm에서의 흡광도 감소를 측정하였다. 이 때 효소활성도 1 U는 위의 조건에서 1분 동안 흡광도를 0.001 감소시키는 효소의 양으로 정하였다.

효모세포벽 용해효소에 대한 기질효모의 민감도 측정법은 Kaneko 등의 방법<sup>(6)</sup>을 변형하여 측정하였다. 효모현탁액 2 mL (pH 8.0, OD<sub>660</sub>=0.7)에 효소액 1 mL를 첨가하여 40°C에서 180분간 반응시킨 후 흡광도를 측정하여 다음과 같은 방법으로 결정하였다.

$$\text{Susceptibility (\%)} = \frac{\text{OD}_0 - \text{OD}_t}{\text{OD}_0} \times 100$$

여기서 OD<sub>0</sub>는 초기 흡광도이고 OD<sub>t</sub>는 반응 후의 흡광도이다.

### 금속이온, 화학수식제 및 환원제의 영향

효소활성에 대한 각종 금속이온, 화학수식제, 환원제 등의 영향을 알아보기 위하여 최종 농도가 1 mM 이 되도록 각각의 시약을 효소액(50 mM Glycine-NaOH 완충액, pH 9.0)에 첨가하였다. 그 후 30°C에서 30분간 방치한 다음 잔존활성을 측정하였다. 각 금속이온은 Junsei (Japan)사 제품을, 각 화학수식제 및 환원제는 Sigma (U.S.A.)사 제품을 사용하였다.

### 기질 효모의 배양조건에 따른 효모의 용균도

기질 효모인 *S. cerevisiae* KCCM 11290을 이용하여, 배양시간과 배양상태를 달리 하였을 때의 본 효소에 대한 용균정도를 검토하였다. 기질 효모를 배양시간을 달리하여 원심분리하여 수거한 후, 660 nm에서의 흡광도를 1.0이 되도록 현탁하였다. 이 현탁액 3 mL에 15 U의 효소액 300 μL를 첨가한 후, 40°C에서 반응시키면서 30분 간격으로 흡광도를 측정하였다. 또한, 정치배양한 효모와 진탕배양한 효모의 본 효소에 대한 용균도, 배지성분 중에 질소원으로서 ammonium sulfate를 최종농도 0.5 M로 첨가하였을 때 효모의 효소에 대한 용균도 등을 검토하였다.

### 반응조건 및 전처리의 영향

정지기까지 생육한 기질 효모를 증류수로 세척한 후 각각의 화학수식제가 함유된 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 현탁하여 효소와 반응시킨 후, 기질 효모의 민감도를 조사하였다. 또한, 정지기까지 생육한 기질효모를 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 현탁시키고 각 온도에서 60분간 전처리하여 실온으로 냉각한 후, 효소와 반응시켜 그 용균도를 조사하였다. 유기용매에 의한 영향을 알아보기 위해 정지기까지 생육한 균체를 acetone과 butanol에 각각 현탁시켜 30분간 방치 후 증류수로 수 회 세척하고, 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에 현탁하여 효소와 반응시켰다.

## 결과 및 고찰

### 금속이온, 화학수식제 및 환원제의 영향

효소활성에 대한 각종 금속이온, 화학수식제, 환원

**Table 1. Effect of metal ions on the lytic activity**

Metal ions (1 mM)	Relative activity (%)
None	100
AgNO <sub>3</sub>	94
CaCl <sub>2</sub>	98
CoCl <sub>2</sub>	81
CuSO <sub>4</sub>	85
FeSO <sub>4</sub>	99
MgSO <sub>4</sub>	100
MnSO <sub>4</sub>	92
NiCl <sub>2</sub>	73
NaCl	96
KCl	96
MgCl <sub>2</sub>	97
HgCl <sub>2</sub>	79
AlCl <sub>3</sub>	93
LiCl	91

**Table 2. Effect of reducing agents on the lytic activity**

Reducing agents	Concentration	Relative activity (%)
None		100
β-Mercaptoethanol	10 mM	96
Sodium thiosulfate	1 mM	100
Sodium sulfate	1 mM	102
Sodium citrate	1 mM	102
Cysteine	1 mM	103
L-Ascorbic acid	1 mM	100

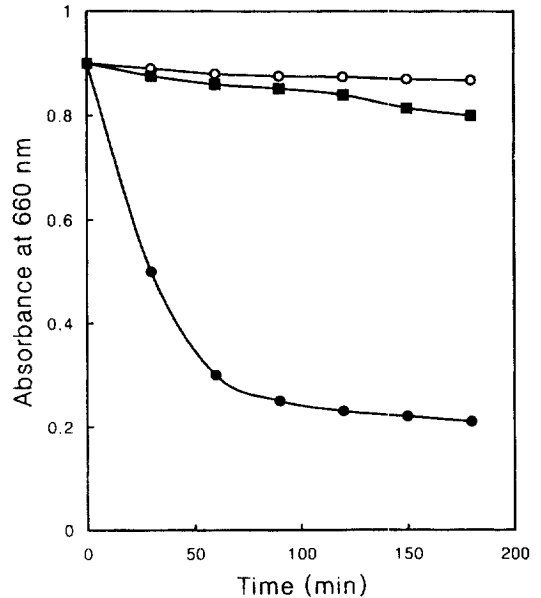
제 등의 영향을 알아보기 위하여 각종 물질을 최종농도가 각각 1 mM이 되도록 효소액에 첨가하여 30°C에서 30분간 방치한 후, 660 nm에서의 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 본 효소는 실험에 사용한 금속이온(Table 1), 환원제(Table 2)에 대해 대체로 안정한 것으로 나타났으며, guanidine-HCl을 제외한 여러 화학수식제에 대해 안정하였다(Table 3).

#### 용균도에 대한 효모배양조건의 영향

기질 효모를 배양시간에 따라 8시간, 16시간, 24시간, 48시간 배양하여 원심분리하여 수거한 후, 각 기질효모에 대한 용균도를 조사하였다. 그 결과 기질효모를 약 8시간 배양시키지는 최대 약 40%까지, 16시간 배양시키지는 80%까지 용균이 가능하였다(Fig. 1).

**Table 3. Effect of chemicals on the lytic activity**

Chemicals	Concentration	Relative activity (%)
None		100
EDTA	1 mM	96
SDS	0.1%	83
Urea	3 M	88
Sodium azide	1 mM	94
Guanidine-HCl	3 M	0

**Fig. 1. Effect of culture time of yeast on the yeast cell wall lytic activity.** ○—○: control, ●—●: 8 hr culture, ■—■: 16 hr culture.

이러한 결과는 현재까지 발견된 효모세포벽 분해효소들이 대수증식기의 효모를 잘 용균시킨다는 보고와 일치하였다<sup>(6,7)</sup>. 이는 효모배양초기 및 대수증식기에 효모세포벽의 맨 바깥층에 존재하는 mannan층이 완전히 형성되지 않아서 효소의 기질로의 접근이 용이하기 때문인 것으로 생각되었다<sup>(8)</sup>.

효모를 20시간 정치배양하여 회수한 후, 같은 조건에서 20시간 진탕배양한 효모와 본 효소에 대한 용균도를 검토하였다(Fig. 2). 그 결과 정치배양한 효모는 진탕배양한 효모보다 용이하게 용균되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Monreal 등<sup>(9)</sup>이 보고한 바와 같이 통기배양시에 효모세포벽 성분중 mannan의 함량이 glucan함량보다 현저히 많아지기 때문인 것으로 생각되었다.

또한 배지 성분중에 질소원으로 ammonium sulfate (0.5 M)를 첨가하였을 때 효모의 효소에 대한 용균도가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 3). 이는 Kitamura 등<sup>(10)</sup>이 배지성분중에 ammonium sulfate를 첨가하여 배양하게 되면 효모의 민감도가 증가한다는 보고와 일치하였다.

#### 용균도에 대한 효모 전처리 효과

열처리의 영향: 정지기까지 생육한 기질 효모를 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 현탁시키고 각 온

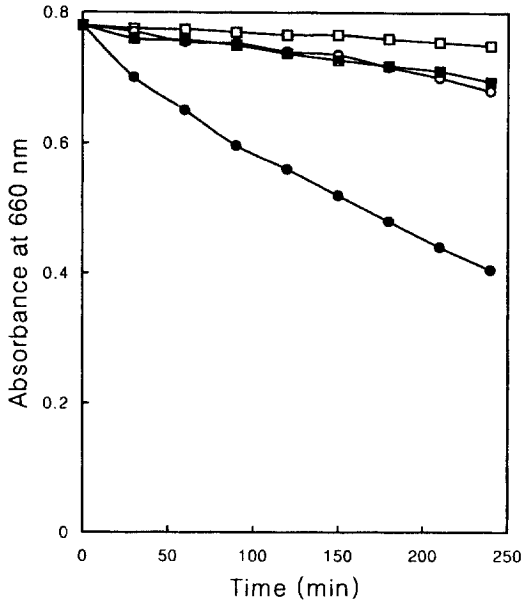


Fig. 2. Effect of stationary and shaking cultures of yeast on the yeast cell wall lytic activity. Open symbols represent controls, and closed symbols represent enzyme reactions. ○—○, ●—●: stationary culture, □—□, ■—■: shaking culture.

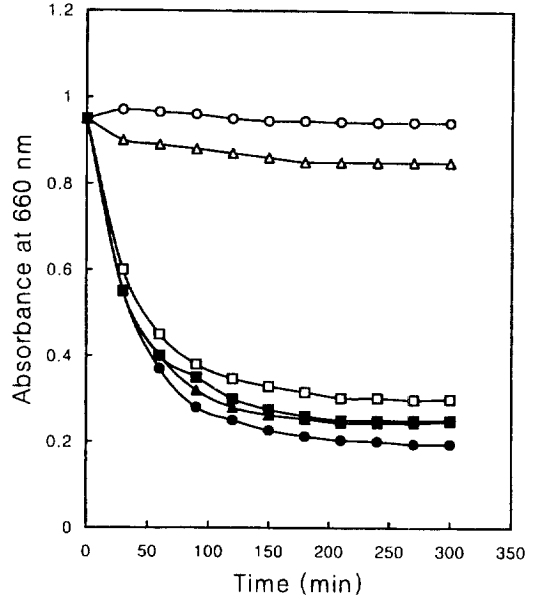


Fig. 4. Effect of preheating of yeast on the yeast cell wall lytic activity. ○—○: control, △—△: 50°C, ▲—▲: 60°C, ●—●: 80°C, ■—■: 100°C, □—□: autoclaved.

도에서 60분간 전처리한 후, 실온으로 냉각하여 효소와 반응시켰다. 그 결과 Fig. 4에서와 같이 전처리된

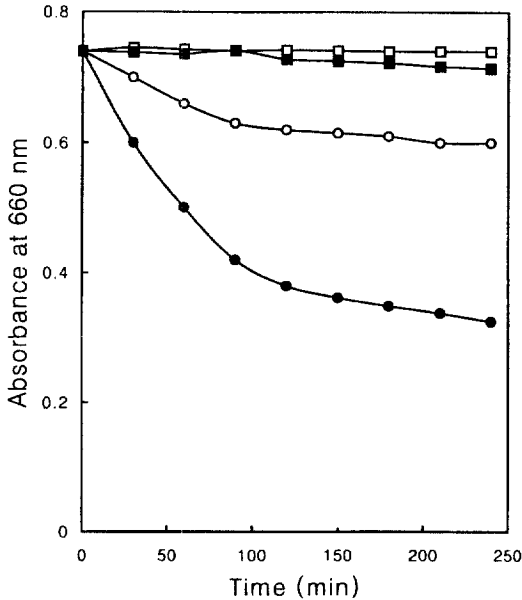


Fig. 3. Effect of ammonium sulfate in culture medium of yeast on the yeast cell lytic activity. Open symbols represent controls, and closed symbols represent enzyme reactions. ○—○, ●—●: with 0.5 M ammonium sulfate, □—□, ■—■: without ammonium sulfate.

지 않은 생효모의 경우는 용균도가 미미하였으며, 50°C에서 전처리 하였을 경우는 다소 용균되기는 하였으나 용균효과가 크게 상승하지는 못하였고, 60°C 이상에서 전처리 하였을 경우는 용균효과가 상당히 증가하였다. 80°C에서 전처리 하였을 때 가장 효과가 좋았으며 100°C에서 처리하거나 가압증기살균된 균주는 오히려 80°C에서 처리했을 때보다 용균도가 낮았다. 이는 너무 고온 처리를 하게 되면 균체간의 응고가 일어나 효소와 기질간의 복합체 형성이 용이하지 못하기 때문인 것으로 생각된다. 실제로 현미경으로 관찰한 결과 효모균체들이 고온처리에 의해 서로 응집되어 있는 것을 확인할 수 있었다(data not shown). 열처리된 효모균체가 세포벽 용해효소에 의해 분해되는 이유는 효모세포벽내의 다당류층들의 치밀한 구조가 열처리에 의해 느슨하게 되어, 효소가 세포벽 안쪽의 glucan층으로의 접근이 용이하기 때문인 것으로 생각된다. 80°C에서 시간별로 전처리 하였을때의 용균도는 Fig. 5에 나타난 바와 같이 전처리 시간이 증가할수록 용균효과가 증가함을 확인할 수 있었다.

유기용매 처리의 영향: 정지기까지 생육한 기질 효모를 각각 acetone과 butanol에 현탁시켜 30분간 방치 후 증류수로 세척하고, 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에 현탁하여 효소와 반응시켰다. Fig. 6에 나타난 결과와 같이 acetone이나 butanol 처리를 한 경우 용

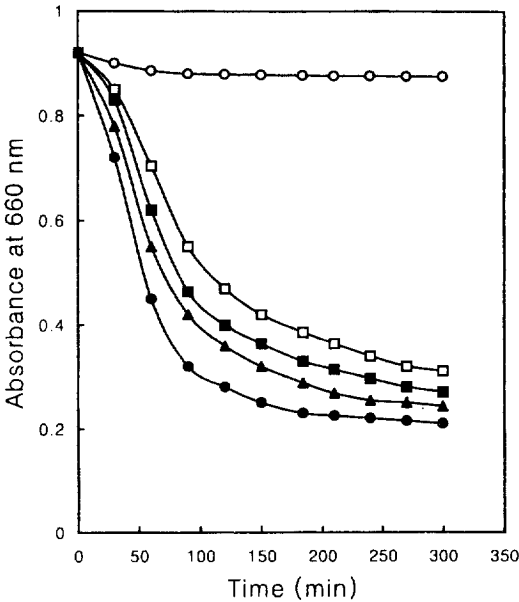


Fig. 5. Effect of preheating time of yeast at 80°C on the yeast cell wall lytic activity. ○—○: control, □—□: 15 min, ■—■: 30 min, ▲—▲: 45 min, ●—●: 60 min.

균도가 상당히 증가함을 알 수 있었다. Acetone은 세균세포벽의 지방성분에 대한 추출용매로서의 역할을 함으로써 용균효소의 반응을 돕는 것으로 알려져 있

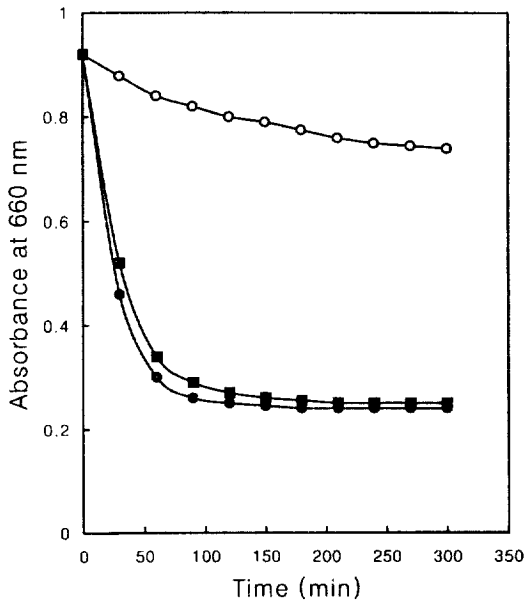


Fig. 6. Effect of pretreatment of yeast by organic solvents on the yeast cell wall lytic activity. ○—○: control, ●—●: butanol, ■—■: acetone.

Table 4. Effect of various chemicals on the susceptibility

Chemicals	Concentration	Susceptibility (%)
None		10
β-Mercaptoethanol	40 mM	20
SDS	0.4%	60
EDTA	3 mM	10
Tween 20	0.5%	10
Tween 80	0.5%	10
Triton X-100	0.5%	75
Potassium chloride	1 M	20
Sodium sulfite	0.25 M	50

으며<sup>(11)</sup>, 효모세포벽내에는 8.5% 정도의 lipid가 존재하므로 같은 효과에 의해 효소와 기질과의 접근을 용이하게 하여 용균도가 증가한 것으로 생각된다. Butanol은 lipophilic한 성질과 hydrophilic한 성질을 함께 가지고 있어서 일종의 detergent로서 작용한다. 따라서 butanol처리시 효모세포벽내에 존재하는 지방성분에 작용하여 세포벽 구조를 변화시킴으로써 효소작용이 용이하게 된 것으로 생각된다.

용균도에 대한 화학수식제의 영향: 정지기까지 생육한 기질 효모를 증류수로 세척한 후 각각의 화학수식제가 함유된 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 현탁

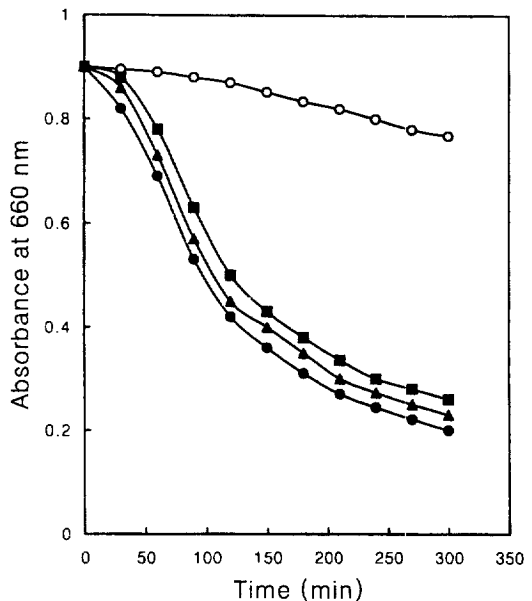


Fig. 7. Effect of Triton X-100 on the yeast cell wall lytic activity. ○—○: control (only 0.5% Triton X-100 added), ▲—▲: 0.1%, ●—●: 0.5%, ■—■: 1.0%. Control group was the result of the incubation of yeast cells at 40°C in the presence of 0.5% of Triton X-100 without the enzyme.

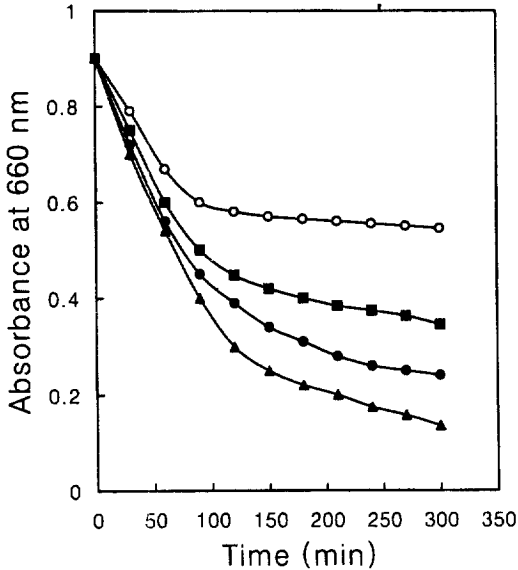


Fig. 8. Effect of SDS on the yeast cell wall lytic activity. ○—○: control (only 0.4% SDS added), ▲—▲: 0.1%, ●—●: 0.5%, ■—■: 1.0%. Control group was the result of the incubation of yeast cells at 40°C in the presence of 0.4% of SDS without the enzyme.

하여 효소와 반응시켰다. 그 결과는 Table 4에 나타내었다. Triton X-100, SDS,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  등을 반응액에 첨가하였을 때 기질 효모의 용균도는 증가하였으며, 그 중  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ 의 첨가는 효모세포벽내에 존재하는 disulfide 결합을 -SSO<sub>3</sub>- 형태로 변환시켜 효소-기질 복합체 형성을 용이하게 하여 용균도가 증가되는 것으로 보고되고 있다<sup>(12)</sup>. Triton X-100과 SDS를 0.1% (w/v), 0.5% (w/v), 1.0% (w/v)의 농도별로 첨가하였을 때의 결과는 Fig. 7, 8에 나타내었다. Triton X-100을 효소반응액에 0.1%의 농도로 첨가하였을 경우보다는 0.5%의 농도로 첨가하였을 때 용해도는 증가하였으며, 1.0%의 농도로 첨가하였을 경우는 오히려 용해활성이 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 7). SDS를 첨가하여 반응시키게 되면 효소를 첨가하지 않은 경우에도 효모세포가 용균됨을 확인할 수 있었다. SDS 존재하에서의 효소반응의 경우 0.1% SDS의 농도하에서 효모세포의 용해도는 크게 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 효소의 활성이 저해되는 현상을 확인할 수 있었다(Fig. 8). Triton X-100이나 SDS같은 화학수식제도 acetone이나 butanol 등의 유기용매의 경우와 같이 기질 효모의 세포벽에 존재하는 지방성분에 작용하여 효모세포가 더 잘 용균되도록 하는 것으로 추측되었다. 그러나, 그 농도가 높아짐에 따라 효소자체에 영향을 미쳐 효소활성

의 저해를 초래하는 것으로 생각된다.

## 요 약

*Dicyma* sp. YCH-37이 생산하는 효모세포벽 용해효소의 성질을 검토한 결과, 각종 환원제와 금속이온에 대체로 안정하였고, guanidine-HCl을 제외한 여러 화학수식제에 대해서도 안정하였다. 배양시간, 전처리 및 배양조건에 따른 영향을 검토한 결과, 정지기 및 사멸기에 있는 효모보다는 대수증식기의 효모, 그리고 생효모에 비해 열처리된 효모가 더 잘 용균되었다. Butanol, acetone 등의 유기용매로 처리된 효모가 그렇지 않은 효모보다 용균도가 좋았으며, 0.5 M ammonium sulfate가 함유된 Yeast extract-Malt extract 배지에서 생육한 효모, 그리고 진탕배양한 효모보다 정지배양한 효모가 용균효소에 의해 더 잘 용균되었다. SDS, Triton X-100,  $\beta$ -mercaptoethanol, potassium chloride, sodium sulfite 등의 화학수식제를 효소반응액에 첨가하였을 때 기질 효모는 더 잘 용균되었다.

## 감사의 글

이 연구는 연세대학교 생물산업소재연구센터의 연구비 지원에 의해 수행된 결과입니다.

## 문 헌

1. Kratochvilova, A.K.: *Yeast and Yeast-like Organisms*. Ellis Horwood, p.391 (1990)
2. Henry, J.P.: Amino acid composition of yeast grown different spent sulfite liquors. *J. Agric. Food Chem.*, **13**, 34 (1965)
3. Lee, S.K., Park, K.H., Pek, U.H. and Yu, J.H.: Production of brewer's yeast extract by enzymatic method. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 276 (1993)
4. Chung, H.C., Hahm, B.K., Bai, D.H., Hasegawa, T. and Yu, J.H.: The yeast cell wall lytic enzyme produced by *Dicyma* sp. YCH-37. I. Isolation of the strain and purification of the enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 445 (1996)
5. Hayashi, K., Kasumi, T., Kubo, N. and Tsumura, N.: Purification and characterization of the lytic enzyme produced by *Streptomyces rutgersensis* H-46. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2289 (1981)
6. Kaneko, T., Kitamura, K. and Yamamoto, Y.: Susceptibilities of yeast to yeast cell wall lytic enzyme of *Arthrobacter luteus*. *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2295 (1973)
7. Sugimori, T., Uchida, Y. and Tsukada, Y.: Distribution of cell wall lytic activity among microorganisms. *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 669 (1972)

8. Monreal, J., Uruburu, F. De and Villanueva, J.R.: Lytic action of  $\beta$  (1-3)-glucanase on yeast cells. *J. Bacteriol.*, **94**, 241 (1967)
  9. Mcmurrough, I. and Rose, A.H.: Effect of growth rate and substrate limitation on the composition and structure of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, **105**, 189 (1967)
  10. Kitamura, K. and Tanabe, K.: Effect of culture medium on susceptibility of yeast cells to zymolyase. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 553 (1982)
  11. Martha, W., Susan, B., Rosemary, F.B. and Elizabeth, S. O.: *The Merck Index*, 10th ed., Merck & Co., Inc., p.57 (1983)
  12. Kitamura, K. and Yamamoto, Y.: Lysis of yeast cells showing low susceptibility to zymolyase. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1761 (1981)
- 
- (1997년 6월 3일 접수)