

Candida lipolytica FM5가 생산하는 균체외 단백분해효소의 특성

박미연 · 오은경* · 장동석
부경대학교 식품공학과, *국립부산수산진흥원

Characteristics of the Extracellular Proteolytic Enzyme Produced by *Candida lipolytica* FM5 Isolated from Mackerel (*Scomber japonicus*)

Mi-Yeon PARK, Eun-Gyong OH* and Dong-Suck CHANG

Department of Food Science & Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

*National Fisheries Research & Development Institute, Kijang County, Pusan 619-900, Korea

Candida lipolytica (*C. lipolytica*) FM5 was selected as one of the strong saprophytic yeasts isolated from mackerel (*Scomber japonicus*). The selected strain could produce extracellular proteolytic enzyme.

The effective medium for production of proteolytic enzyme by *C. lipolytica* FM5 was TPY broth containing Bacto-tryptone 0.5%, proteose peptone 0.5%, yeast extract 0.25%, NaCl 0.5% and CaCl₂ 0.2%. The pattern of proteolytic enzyme production by *C. lipolytica* FM5 was the almost same as that of growth curve of the strain. Namely, the enzyme production was begun from the early stage of exponential phase and it was reached the highest at the beginning of the stationary phase of the yeast growth.

The optimum temperature of the produced proteolytic enzyme was 35°C and its activity was not significantly changed by pH between 6.5~9.0 and also it was not significantly affected by several kinds of cations such as Ca²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺ and Mg²⁺ but it was affected negatively by some cations such as Zn²⁺, Mn²⁺ and K⁺.

Key words: *Candida lipolytica*, proteolytic enzyme, saprophytic yeast

서 론

어류를 비롯한 단백질식품의 부패는 주로 조직 중의 효소와 미생물이 분비하는 단백분해효소의 작용에 큰 영향을 받는다 (Chang and Lee, 1983; 박 등, 1995). 어류의 부패성 세균이 생산하는 단백분해 효소에 관한 연구 (Hamid et al., 1979; Sakada et al., 1977, 1978, 1980; Jeong, 1982; Cho, 1985) 및 어육과 장기에 분포하고 있는 단백분해효소에 의한 어육의 사후변화에 관한 연구보고 (Ueno et al., 1988; Nonaka, 1987; Haard, 1992; Pyeun et al., 1996)는 많다.

한편, 어류의 장기보존에는 세균보다 효모가 심각한 영향을 미칠수 있음에도 불구하고 (Eklund et al., 1966) 효모에 관한 연구는 충분치 되어 있지 않다.

효모에 의한 어류의 부패에 관한 연구는 어패류에서 분리된 효모flora에 관한 Phaff et al. (1978), Kobatake 와 Kurata (1980) 및 Kobatake et al. (1987a) 등의 연구가 있으며, 이들 효모가 생산하는 단백분해효소에 관해서는 어류에서 분리된 부패성 세균과 효모의 단백분해능과 지질분해능에 관해 비교조사한 간단한 연구 (Kobatake et al., 1987b) 외에는 전무한 실정이다.

이미 저자들은 고등어에서 분리된 부패성효모

Candida lipolytica (*C. lipolytica*) FM5와 대표적인 부패성 세균인 *Pseudomonas fluorescens*를 각각 어육에 접종하여 휘발성염기질소와 pH의 변화로써 부패력을 평가한 결과 두 미생물은 거의 대등한 속도로 어육의 부패를 진행시키는 것을 보고하였다 (Oh et al., 1998). 이 들 미생물에 의한 어육의 부패는 주로 단백분해효소와 지질분해효소의 작용에 의한 것으로 생각되고 있다 (Kobatake et al., 1987b) 따라서, 본 연구에서는 고등어에서 분리·동정한 부패성효모 *C. lipolytica* FM5가 생산하는 배양상청액 중의 단백분해성 효소의 특성을 검토한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 단백분해효소의 생산 및 활성측정

1) 효소생산을 위한 최적배지의 조성

TPY broth (Cho, 1984)를 기초로 하여 질소화합물, 포도당, 염화칼슘 등을 각각 농도별로 첨가하고, 고등어에서 분리한 부패성효모 *C. lipolytica* FM5 (Oh et al., 1998)를 접종하여 48시간 진탕배양 (25°C, 100 rpm)후 원심분리 (10,000 ×g, 4°C, 15 min)하여 상청액을 조효소액

으로 하고 단백분해활성을 측정하므로써 효소의 최적생산을 위한 배지조성을 검토하였다.

2) 효소활성의 측정

효소활성의 측정은 dye release method (Little et al., 1979; Canhos, 1981)에 따라 측정하였다. 즉, 0.1 M Tris 완충용액 (pH 7.0) 9 ml에 조효소액 1 ml를 첨가하고 35°C에서 30분간 예열한 후, 불용성의 hide powder azure (HPA, Calbiochem U.S.A) 20 mg을 첨가하여 진탕배양기 (35°C, 100 rpm)에서 60분간 반응시킨 다음, 여과 (Toyo, No.5)하여 효소반응을 정지시킨 후 분광광도계를 써 흡광도 (595 nm)를 측정하였다.

2. 효소반응의 최적조건

1) pH

조효소의 작용최적 pH를 구하기 위하여 0.1 M 시트르산완충액 (pH 3.0~5.0), 0.1 M 인산완충액 (pH 6.0~7.5), 0.1 M Tris완충액 (pH 8.0~9.0), 그리고 0.1 M 탄산완충액 (pH 9.5~11.0)을 각각 사용하여 pH 3.0~11.0으로 조정된 각 완충액 9 ml에 효소액 1 ml를 첨가하여 1, 2)의 효소활성측정방법으로 35°C에서 측정하였다.

2) 온도

조효소액을 20~70°C로 조정된 0.1 M Tris (pH 8.0) 완충액 9 ml에 효소액을 각각 1 ml씩 가한 다음, 각 온도에서 1, 2)의 효소활성측정방법으로 측정하였다.

3) 금속이온의 영향

Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , K^{+} 등의 금속이온을 최종농도가 각각 4 mM이 되도록 효소반응액에 첨가하여 35°C, pH 8.0의 조건에서 1, 2)의 방법으로 효소활성을 측정하므로써 금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 검토하였다.

결과 및 고찰

1. 단백분해효소의 생산에 영향을 미치는 인자

1) 배지조성

효소의 생산은 배지조성 중의 질소화합물, 포도당, 염화칼슘 농도에 따라 크게 영향을 받으므로 TPY 배지 (tryptone 0.5%, peptone 0.5%, yeast extract 0.25%, glucose 0.1%, NaCl 0.5%)를 기초로 하여 이 들 성분의 첨가농도에 따른 단백분해 효소의 생산성을 비교검토하였다.

① 질소화합물의 영향

효소의 생산에 있어서 질소화합물은 특히 효소생산의 유도제가 될 수 있으므로 배지중의 질소화합물의 종류와

양이 효소생산에 미치는 영향을 검토한 결과를 Table 1에 나타내었다.

먼저, 각 종 질소화합물 1.0%를 단독으로 사용한 경우, proteose peptone이 가장 효과적이었으며, 다음이 tryptone, peptone, polypeptone의 순이었다. Casamino acid는 효소생산을 위한 질소원으로 적합하지 못한 것으로 나타났으며, proteose peptone 0.5%와 tryptone 0.5%를 병용하면 각각을 단독으로 첨가하였을 때 보다 효과적인 것으로 나타났다.

② 포도당의 영향

효소의 생산에 미치는 포도당의 영향을 조사하기 위하여 포도당을 0~1.0% 첨가하여 효소활성을 비교·검토한 결과를 Table 2에 나타내었다.

Table 1. Effects of nitrogenous compounds on the production of proteolytic enzyme by *Candida lipolytica* FM5 in TPTY broth medium

Concentration of Nitrogenous compounds (%)	Relative enzyme activity (%)*
Peptone	74.3
Tryptone	87.5
Polypeptone	62.9
Proteose peptone	97.5
Casamino acid	14.3
Peptone	40.3
tryptone	100.0
Proteose peptone	82.5
peptone	

*Enzyme activity was measured by HPA (hide powder azure) dye release method (Little et al., 1979; Canhos, 1981) at 595 nm.

Table 2. Effect of glucose on the production of proteolytic enzyme by *Candida lipolytica* FM5 in TPTY broth medium

Concentration of glucose (%)	Relative enzyme activity (%)
0.0	100
0.2	37
0.3	29
0.4	23
0.6	14
0.8	11
1.0	11

*Enzyme activity was measured by HPA (hide powder azure) dye release method (Little et al., 1979; Canhos, 1981) at 595 nm.

포도당을 전혀 첨가하지 않았을 때 효소의 활성이 가장 우수하였으며 포도당을 0.2%만 첨가하여도 상대적 활성이 무려 63%나 감소하였으며 첨가농도가 증가할수록 효소활성이 점차적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 현상은 일정량 이상의 포도당 존재하에서 효소의 생산이 억제되는 catabolite repression 현상때문으로 생각된다. 세균의 경우, 이 현상은 cAMP (cyclic Adenosine monophosphate) 함량과 직접적인 관계가 있다는 것이 많은 연구자들에 의하여 보고된 바 있으나 (Watson, 1968; Daniel and Danchin, 1986), 효모의 경우 일부 연구자들은 cAMP 함량과 직접적인 관계가 있다고 보고하기도 하지만 (Van wijk, 1971) 대부분의 연구자들은 catabolite repression 현상은 cAMP 함량과 직접적인 관계가 없다고 보고 (Montenecourt, 1973; Matsumoto et al., 1982; Eraso and Gancedo, 1984; Tani et al., 1985) 하고 있어, 앞으로 효모균체내에서 일어나는 catabolite repression 현상의 원인 기구에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 하겠다.

③ 염화칼슘의 영향

염화칼슘의 농도를 0~0.3%까지 첨가하여 효소활성의 변화를 조사한 결과 0.2% 첨가하였을 때 효소활성이 가장 높은 것으로 나타났다 (Table 3).

따라서, C. lipolytica FM5로부터 단백질분해효소를 생산하기 위한 최적배지로서 Bacto-tryptone과 proteose peptone을 각각 0.5%, yeast extract 0.25%, 염화나트륨 0.5% 그리고 염화칼슘 0.2%의 조성으로 이루어진 TPPY broth (Table 4)가 효과적인 것으로 생각하여 이하의 실험에 사용하였다.

한편, Jeong (1982)은 우령행이에서 분리된 Flavobacterium속과 Bacillus속이 생산하는 단백질분해효소의 생산에 가장 효과적인 질소원은 Bacto-tryptone이며 염화칼슘 0.15%를 첨가하면 생산성이 더욱 증가하는 것으로 보고하였다. Cho (1985)는 정어리에서 분리된 Pseudomonas 101이 생산하는 단백질분해효소는 포도당의 첨가에 의해 생산이 억제되며 염화나트륨과 염화칼슘을 각각 0.5%, 0.2% 첨가하면 효과적인 것으로 보고한 바 있다.

따라서, 질소원의 종류, 포도당, 염화칼슘 등은 효소의 생산에 영향을 미치며 생산균주에 따라 최적 농도는 차이가 있음을 알 수 있었다.

2) 균의 생육에 따른 효소생산

C. lipolytica FM5를 TPPY broth에 접종하여 25°C, 100 rpm으로 조정된 진탕배양기 (Lab-Line Instruments Inc. Model 3595)에서 일정시간 배양하면서 균의 증식에 따른 효소의 생성을 측정하여 Fig. 1에 나타내었다.

Table 3. Effect of calcium chloride on the production of proteolytic enzyme by Candida lipolytica FM5 in TPPY broth medium

Concentration of calcium chloride (%)	Relative enzyme activity (%)
0.00	91
0.05	94
0.10	86
0.15	83
0.20	100
0.25	87
0.30	81

*Enzyme activity was measured by HPA (hide powder azure) dye release method (Little et al., 1979; Canhos, 1981) at 595 nm.

Table 4. Composition of TPPY broth medium for the production of proteolytic enzyme by Candida lipolytica FM5

Bacto-tryptone	5.0 g
Proteose peptone	5.0 g
Yeast extract	2.5 g
Sodium chloride	5.0 g
CaCl ₂	2.0 g
Distilled water	1,000 ml

TPPY means Tryptone-Proteose Peptone-Yeast extract-broth medium.

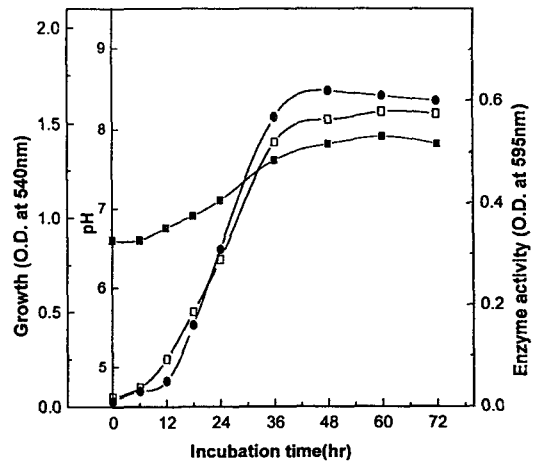


Fig. 1. Changes of cell growth, pH, and the proteolytic activity of crude enzyme by Candida lipolytica FM5 in TPPY broth medium during the shaking culture at 25°C. □-□; cell growth, ■-■; pH, ●-●; proteolytic enzyme activity.

Fig. 1에 나타난 바와 같이 균의 증식은 배양후 10시간째부터 시작되어 배양 48시간에는 정상기에 도달하였다. 이와 더불어 단백분해효소의 생성은 균의 증식과 거의 유사한 폭으로 증가하여 균의 생육이 최대에 도달한 48시간째에 효소의 생성도 최대에 도달하였고 그 이후부터는 거의 일정하게 유지되었다.

한편, Cho (1985)의 연구보고에 의하면 *Pseudomonas* 101이 생산하는 단백분해효소는 균체증식이 시작된 약 10시간 후부터 효소가 생성되는 것으로 보고하였다.

이상의 결과로 미루어 본 균주의 단백분해효소의 생성은 증식관련형이며 균주에 따라 효소생성 시기는 차이가 있음을 알 수 있었다.

2. 단백분해효소의 특성

1) 최적 pH

C. lipolytica FM5가 생산한 단백분해효소의 활성은 pH 8.0에서 효소의 활성이 가장 높게 나타났으며 pH 6.5~9.0의 비교적 넓은 범위에서 효소의 활성이 거의 변화가 없어 효소활성의 pH범위는 상당히 넓은 것을 알 수 있었다. 그러나 pH 5.5와 pH 10.0에서는 상대적 활성이 각각 20%와 30%로 급격히 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 2).

2) 최적온도

20~70°C의 온도범위에서 효소 활성을 측정한 결과 *C. lipolytica* FM5가 생산한 단백분해효소의 반응최적온도는 35°C였으며, 30°C와 40°C에서는 상대적 활성이 각각

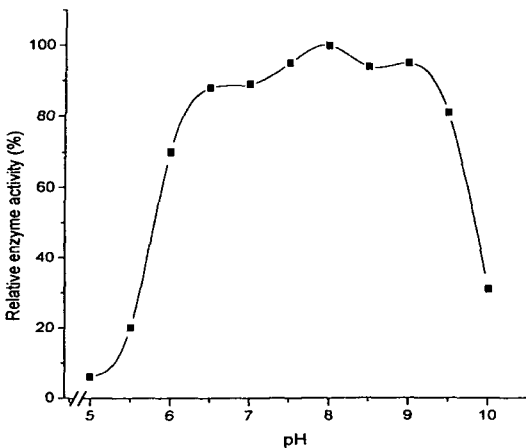


Fig. 2. Effects of pH on the proteolytic activity of the crude enzyme produced by *Candida lipolytica* FM5 in TPPY broth medium.

Enzyme activity was measured by HPA (hide powder azure) dye release method (Little et al., 1979; Canhos, 1981) at 595 nm.

50%와 62%를 나타내어 효소활성은 온도변화에 상당한 영향을 받는 것으로 나타났다 (Fig. 3).

3) 금속이온에 의한 영향

C. lipolytica FM5가 생산한 단백분해효소의 활성은 Ca^{2+} 을 농도별 (0~10 mM)로 첨가하여도 효소의 상대적인 활성에는 큰 변화가 없었다. 다른 금속이온들에 의한 영향을 검토하기 위하여 상대적 활성이 가장 높게 나타난 4 mM의 농도에서 각 금속이온들의 영향을 측정된 결과 Cu^{2+} 에 의해서는 효소의 활성이 오히려 23%정도 상승하였으며 Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} 등의 금속이온은 효소의 활성에 큰 영향을 미치지 않았으나 Zn^{2+} , Mn^{2+} , K^{+} 등에 의해서는 약간의 저해를 받는 것으로 나타났다 (Table 5).

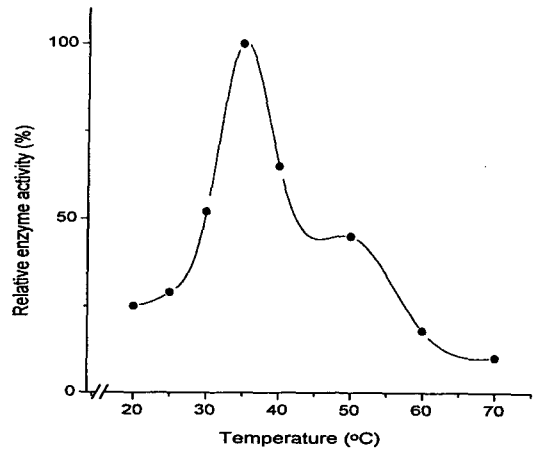


Fig. 3. Effects of temperature on the proteolytic activity of crude enzyme produced by *Candida lipolytica* FM5 in TPPY broth medium. Enzyme activity was measured by HPA (hide powder azure) dye release method (Little et al., 1979; Canhos, 1981) at 595 nm.

Table 5. Effect of cations on the proteolytic activity of crude enzyme produced by *Candida lipolytica* FM5

Cations ($4 \times 10^{-3} M$)	Relative enzyme activity (%)
none	100
Ca^{2+}	100
Cu^{2+}	123
Zn^{2+}	83
Fe^{2+}	86
Mn^{2+}	80
Mg^{2+}	91
K^{+}	74

*Enzyme activity was measured by HPA (hide powder azure) dye release method (Little et al., 1979; Canhos, 1981) at 595 nm.

한편, Cho (1985)는 정어리에서 분리된 *Pseudomonas* 101이 생산하는 단백질분해효소는 pH 7.0, 35°C에서 최고의 활성을 나타내었다고 보고하였으며 Jeong (1982)은 우렁쟁이에서 분리된 *Flavobacterium*속과 *Bacillus*속의 세균이 생산하는 단백질분해효소의 최적조건은 각각 pH 8.4, 60°C와 pH 8.0, 45°C였다고 보고하고 있어 분리원에 따라서 단백질분해효소의 특성도 다양함을 알 수 있었다. 특히 *Pseudomonas* 101의 단백질분해효소 (Cho, 1985)와 Chang and Lee (1983)가 시판냉동식품으로부터 분리한 *Streptococcus*속이 생산하는 단백질분해효소는 metal-chelator sensitive protease로 보고되었다.

이상 *C. lipolytica* FM5가 생산하는 단백질분해효소의 효소생산을 위한 배양조건, 효소활성의 최적온도, 최적 pH 등은 Chang and Lee (1983)나 Cho (1985)가 보고한 세균 protease와 아주 유사하나, 효소활성은 금속이온에 의한 영향을 크게 받지 않는 것으로 나타났다.

요 약

1. *C. lipolytica* FM5로부터 단백질분해 효소를 생산하기 위한 배지로는 Bacto-tryptone 0.5%, proteose peptone 0.5%, yeast extract 0.25%, NaCl 0.5%, 그리고 CaCl₂ 0.2%인 TPPY broth가 가장 효과적이었다.

2. 단백질분해효소의 생성은 *C. lipolytica* FM5의 증식과 거의 일치하는 증식관련형으로서 균의 생육이 최대에 도달한 배양 48시간째에 효소의 생성량도 최대치를 나타내었다.

3. 효소반응의 최적온도는 35°C였으며, pH 6.5~9.0의 범위에서 효소활성은 거의 변화가 없었다.

4. Ca²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺ 등의 금속이온은 효소활성에 큰 영향을 미치지 않았으나 Zn²⁺, Mn²⁺, K⁺ 등은 효소활성을 다소 저해하였다.

참 고 문 헌

- Canhos, V. P. 1981. Microorganisms isolated from sand filtered bay water and the proteolytic activity of a *Flavobacterium* isolated. Ph. D. Thesis p. 15~30. Oregon State University, Corvallis, Oregon 97331, U.S.A.
- Chang D. S. and J. S. Lee. 1983. Characterization of Proteolytic *Streptococcus* sp. Isolated from Market Foods. J. Kor. Fish. Soc., 16 (3), 225~230 (in Korean).
- Cho H. R. 1985. The studies on the extracellular protease produced by *Pseudomonas* Fu101 isolated from intestine of Sardine (*Sardinops melanosticta*). Pukyong National University. M.S. Thesis. pp. 1~48 (in Korean).
- Daniel J., and A. Danchin. 1986. 2-ketoglutarate as a possible regulatory metabolite involved cyclic AMP dependent catabolite repression in *Escherichia coli* K12. Biochemie., 68, 303~310.
- Eklund, M. W., J. Spinelli, D. Miyauchi and J. Dassow. 1966. Development of yeast on irradiated pacific crab meat. J. Food Sci., 31, 424~431.
- Eraso P., and J. M. Gancedo. 1984. Catabolite repression in yeasts is not associated with low levels of c-AMP., Eur. J. Biochem., 41, 195~198.
- Haard, N. F. 1992. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. J. Aqua. Food Produc. Tech., 1, 17~31.
- Hamid, A. T. Sakada and D. Kakimoto. 1979. Microflora in the alimentary tract of Gray Mullet-IV. Estimation of enzymic activities of the intestinal bacteria. Bull. Japan. Soc. Sic. Fish., 45 (1), 99~106.
- Jeong, I. C. 1982. Microfloral Distribution and Their Extracellular Protease Activity of Sea Squirt, *Halocynthia rotetzi* (Drasche). Pukyong National University. M.S. Thesis. pp. 1~42 (in Korean).
- Kobatake M and H. Kurata. 1980. Yeast Contamination of Chilled Raw Seafoods. J. Food Hyg. Soc. Japan, 21 (3), 197~206.
- Kobatake M, Y. Tonogai, K. Kobayashi and Y. Ito. 1987a. Comparison of Spoilage Degree of Seafoods Inoculated with Yeasts or Bacteria Singly. J. Food Hyg. Soc. Japan, 28 (1), 19~29.
- Kobatake M, Y. Tonogai and Y. Ito. 1987b. Proteolytic and Lipolytic Activities of Bacteria Isolated from Spoiled Seafoods. J. Food Hyg. Soc. Japan, 28 (1), 30~35.
- Little, J. E., R. E. Sjogren and R. R. Carson. 1979. Measurement of proteolysis in natural waters. Appl. and Environ. Microbiol. 37, 900~908.
- Matsumoto K, I. Uno, A. Toh-E, T. Ishikawa, and Y. Oshima. 1982. Cyclic-AMP may not be involved in catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence from mutants capable of utilizing it as adenine source. J. Bacteriol., 150 (1), 277~285.
- Montenecourt B. S., S. C. Kuo, and J. O. Lampen. 1973. *Saccharomyces* mutants with invertase formation resistant to repression by hexoses. J. Bacteriol., 114, 233~238.
- Nonaka, J. 1987. Objective of fishery processing and characteristics fo fishery raw materials. In "Seafood materials for utilization". Koseisha Koseigaku, Tokyo, Japan, 9~15 (in Japanese).
- Oh, E. K., M. Y. Park and D. S. Chang. 1998. Characteristics of Proteolytic Yeasts Isolated from Mackerel (*Scomber japonicus*). J. Kor. Fish. Soc., submitted (in Korean)

- Phaff, H. J., W. Miller, and E. M. Mrak. 1978. Yeast spoilage of foods and fermentation processes. In the life of yeasts, 2nd ed. revised and enlarged. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts and London, England, pp. 224~237.
- Pyeun, J. H., D. S. Lee, D. S. Kim and M. S. Heu. 1996. Activity Screening of the Proteolytic Enzymes Responsible for Post-mortem Degradation of Fish Tissues. J. Korean Fish. Soc. 29 (3), 296~308 (in Korean).
- Sakada, T., K. Ueda and D. Kakimoto. 1977. Studies on the proteases of marine bacteria. Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ. 26, 63~78.
- Sakada, T., M. Nakaji and D. Kakimoto. 1978. Microflora in the digestive tract of marine fish. Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ. 27, 65~78.
- Sakada, T., J. Okabayashi and D. Kakimoto. 1980. Variations in the intestinal microflora of *Tilapia* reared in fresh and sea water. Bull. Japan. Soc. Fish., 46 (3), 313~317.
- Tani Y., Y. Sakai and H. Yamada. 1985. Isolation and characterization of a mutant of a methanol yeast, *Candida boidinii* S2, with higher formaldehyde productivity. Agric. Biol. Chem., 49 (9), 2699~2706.
- Ueno, R., K. Sakanaka, S. Ikeda and Y. Horoguchi. 1988. Purification of pepstatin insensitive protease from madkerel white muscle. Nippon Suisan gakkaiishi, 54, 691~697.
- Van wijk R., and M. Koniji. 1971. Cyclic 3', 5'-AMP in *Saccharomyces carlsbergensis* under various conditions of catabolite repression. FEBS Letters, 13, 184~186.
- Watson J. D. 1968. Biological moleculaire du gene, Ediscience, Paris, 395~404.
- 박영호 · 장동석 · 김선봉. 1995. 수산가공이용학. 형설출판사. pp. 372~375.

1998년 2월 6일 접수

1998년 8월 26일 수리