

내염성 효모의 분리 및 세포외 Protease의 생산

정 승 찬 · 현 광 옥 · 김 재 호 · †이 종 수
배재대학교 유전공학과 · 생물의학 연구센터
(접수 : 2001. 2. 28., 게재승인 : 2001. 4. 19.)

Isolation of a Halotolerant Yeast and the Production of Extracellular Protease

Seung-Chan Jeong, Kwang-Wook Hyun, Jae-Ho Kim, and Jong-Soo Lee†
Department of Genetic Engineering and Bio-Med RRC, Paichai University, Taejon 302-735, Korea
(Received : 2001. 2. 28., Accepted : 2001. 4. 19.)

A halotolerant and extracellular protease-producing yeast was isolated from traditional *Meju* and identified as a strain of *Hansenular polymorpha* by investigating its microbiological characteristics. The optimum pH, temperature and NaCl concentration required for the growth of *Hansenular polymorpha* S-9 were found to be pH 6.0, 30°C and 0.5 M, respectively. Extracellular protease was produced maximally at 10 U mL⁻¹ when *Hansenular polymorpha* S-9 was grown on the medium containing 1.0% beef extract and 0.1 M NaCl for 12 hr at 30°C. About 13% of the angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity was shown in the hydrolysates which were obtained from the digestion of soybean protein (6 mg) for 6 hr at 30°C by the crude enzyme (1 U).

Key Words : halotolerant yeast, extracellular protease, ACE inhibitory activity

서 론

일반 미생물이 생산하는 효소는 염에 의하여 비교적 쉽게 실활 되는데 비하여 내염성 또는 호염성 미생물이 생산하는 효소는 일반적으로 내염성이므로 효소생산 공정에서 잡균의 오염을 줄일 수 있고 장류와 같은 염장 단백질식품의 숙성을 촉진시키는 잇점이 있다(1).

호염성균 중에서 protease를 생산하는 균들은 *Halobacterium salinarium*, *Bacillus sp.*, *Halobacterium halobium*, *Halobacterium sp.*, *Halomonas sp.* ES10 등의 세균이 알려져 있고 이들이 생산하는 protease의 성질도 대부분 밝혀졌다(2,3). 그러나 효모에서는 *Saccharomycopsis lipolytica*와 일부 재래식 메주 효모에서 균체의 protease를 생산한다는 연구가 있을 뿐이고(4,5), 호염성(또는 내염성) 효모로 *Zygosaccharomyces rouxii*를 비롯한 몇몇 균주만이 알려져 있을 뿐 이들의 식품용 균체의 효소생산에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았다.

한편 최근 단백질이 protease에 의해 분해되어 생성되는 가수분해물들이 고혈압 예방과 항암효과 등이 있다는 연구결과가 발표되면서 이들에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다

(6-8). 일반적으로 산 또는 알칼리에 의한 단백질의 가수분해는 이취발생과 맛의 변화 등을 수반하는 문제점이 있으나 효소에 의한 가수분해는 반응이 비교적 온화한 조건에서 진행되므로 영양성분의 파괴나 냄새, 맛 등의 변화가 거의 일어나지 않으므로 제품의 품질저하를 방지할 수 있는 잇점이 있어(9), 식품이나 제약산업에서 매우 유리하다.

대두 단백질을 이용하는 전통 장류의 대표적인 생리기능은 고혈압 예방과 항암효과이며 특히 고혈압 예방효과는 대두 단백질의 가수분해물인 저분자 펩타이드가 angiotensin 전환 효소(ACE)의 활성을 저해하기 때문인 것으로 보고되어 있다(10). 그러나 장류의 담금 및 숙성시는 NaCl 농도가 높으므로 내염성 protease만이 이들 ACE저해 펩타이드 생산에 관여할 것으로 추정된다.

따라서 본 연구에서는 내염성 효모가 생산하는 protease를 장류 발효산업과 고부가가치의 생리기능성 펩타이드 생산 등에 응용하기 위하여 재래식 메주와 천연물로부터 분리된 내염성 효모들 중 세포외 protease를 강력하게 생산하는 효모를 선정하여 동정하였고 효소 생산조건으로 배지조성 및 배양방법 등을 검토하였다. 또한 시험균주가 생산하는 protease로 대두 단백질을 처리하여 얻은 가수분해물들의 ACE저해활성을 측정하였다.

†Corresponding Author : Department of Genetic Engineering,
Paichai University, Doma-2 dong, Taejon 302-735, Korea
Tel & Fax : 82-42-520-5388
E-mail : biotech8@mail.paichai.ac.kr

재료 및 방법

내염성 효모의 선별 및 동정

필자 등(11)이 전국 각지에서 수집된 메주에서 분리한 효모들과 자연계에서 분리한 내염성 효모들 중 2 M NaCl이 함유된 YM배지에서 생육이 양호한 효모들을 1차 선별하고 이들 중 skim milk 배지에서 투명환(clear zone)을 형성하는 효모들을 세포외 protease 생산균주로 2차 선별한 다음 이들의 protease 활성을 측정하여 활성이 제일 강한 효소를 생산하는 균주를 시험균주로 최종 선정하였다.

또한, 선정균주의 형태학적 및 생리 생화학적 특성 등을 효모의 분류동정법(12)에 따라 조사한 후 Lodder의 The Yeast, a taxonomic study(13)로 동정하였다.

Protease의 활성 측정

0.5 M NaHCO₃-NaOH 완충액 (pH 10.0)에 녹인 0.6% casein용액 2.5 mL에 조효소액 0.5 mL을 가하여 30°C에서 10분간 반응시킨 후 TCA 혼합액(50% TCA 36 mL, 1 M CH₃COONa 220 mL, 1 M CH₃COOH 330 mL)의 혼합액에 증류수를 가하여 1ℓ로 함) 2.5 mL을 가하여 상온에서 20분간 방치한 다음 5000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하였다. 이 상등액 1 mL에 0.55 M Na₂CO₃ 2.5 mL과 1 N folin 시약 0.5 mL를 가하여 38°C에서 30분간 발색시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정 하였고 효소단위는 표준조건하에서 1분에 1 μg tyrosine 상당량의 folin 발색성 비단백성 물질을 생성하는 것을 1 unit로 하였다.(2,3)

Protease의 생산조건

효소생산에 미치는 영향으로 질소원, 탄소원, NaCl 농도, 배지의 초기 pH와 배양온도 및 배양시간과 배양방법 등을 검토 하였다.(2,3)

Angiotensin-converting enzyme(ACE)저해 활성 측정

대두 단백질 가수분해물의 ACE저해 활성은 Cushman(14) 등의 방법을 일부 변형시켜 다음과 같이 측정하였다.

대두분말에서 물로 추출한 단백질 6 mg을 0.5 M NaHCO₃-NaOH 완충액 (pH10.0) 4 mL에 녹인 후 효소생산 최적 조건으로 생산된 효소액(1U) 1 mL을 첨가하여 30°C에서 6시간~24시간 가수분해 시켰다. 각각의 가수분해액 50 μL에 rabbit lung에서 추출한 ACE액(100 mU/mL) 150 mL와 100 mM sodium borate buffer(pH8.3) 100 mL을 혼합하여 37°C의 water bath에서 5분간 방치한 후 기질용액(Hippuric acid-Histidine-Leucine 6.5 mM을 300 mM NaCl이 함유되어 있는 pH 8.3 의 100 mM borate 완충용액에 녹인 것) 50 μL를 넣고 30분간 반응시킨 다음 1 N HCl 250 μL를 가하여 반응을 정지 시켰다. 이 반응정지액에 1 mL ethyl acetate를 가하여 1분간 진탕시킨 후 3000 rpm에서 15분간 원심분리한 다음 상등액 800 μL를 취해서 3시간 감압농축 하였다. 농축 시료에 100 mM sodium borate buffer(pH 8.3) 1 mL를 첨가하고 228 nm에서 흡광도를 측정하여 반응액 중의 hippuric acid를 정량한 후 가수분해액을 첨가하지 않은 것을 대조구로 하여 저해율을 다음과 같이 구하였다(15).

$$* \text{저해율}(\%) = \frac{C-T}{C-B} \times 100$$

C = 시료 대신 증류수 첨가시의 흡광도

T = 시료 첨가시의 흡광도

B = 기질을 뺀 반응액 자체의 흡광도

결과 및 고찰

내염성 효모의 선별, 동정 및 특성

재래식 메주에서 분리한 147주의 효모 중 2.0 M NaCl이 함유되어 있는 YM 배지에서 생육하는 15 균주와 자연계에서 분리한 10주의 내염성 효모들에 대하여 protease 활성을 측정한 결과 재래식 메주에서 분리한 S-9 균주가 세포외 protease를 강력히 생산하여 시험 균주로 최종 선정하였다.

선정 균주 S-9의 형태학적, 배양학적 및 생리 생화학적 특성과 당 이용성(발효성) 등을 조사한 결과 Table 1, 2와 같이 S-9 균주는 구형으로 포자와 의균사를 형성하였고 질산염을 자화시켰으며 urease 활성은 없었다. 또한 cycloheximide에 대하여 1000 ppm까지도 내성이 있었고, 오직 glucose만을 발효시켰으며 sucrose, starch, melezitose, erythritol 등을 자화시켰다. 이상의 특성을 종합하여 The Yeast, a taxonomic study로 동정한 결과 시험균주는 *Hansenula polymorpha*로 추정되었다.

한편 시험 균주의 생육 최적 NaCl 농도는 0.5 M이었고 NaCl 2.5 M까지 생육하였다. 이러한 시험 균주의 NaCl 내성은 *Halomonas sp.* ES10의 4 M(3)과 *Halobacterium sp.* H5-2의 5 M(2)보다 낮은 내성이었다. 또한 시험 균주는 20°C~35°C, pH 3.0~7.5 범위에서 생육하였고 생육 최적 온도와 pH는 각각 30°C, 6.0이었다.

Protease 생산조건

Protease 생산에 미치는 질소원과 탄소원의 영향을 검토한 결과 질소원은 beef extract가 효소생산에 제일 적합하였고 beef extract의 효소생산 최적농도는 1.0%이었다(Table 3, Figure 1). 이는 *S. lipolytica*에 의한 균체의 protease생산의 경우 2% casein이 우수하였고(4), 호염성 세균인 *Halobacterium sp.*의 경우 0.4% yeast extract, 1.5% gelatin이 우수하였다는 보고(2)와는 다른 결과이었다.

또한, 1% beef extract와 0.1 M NaCl을 함유한 배지(이하, beef extract-NaCl 배지라함)를 이용하여 효소생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사한 결과 다른 호염성 세균이나 *S. lipolytica*의 protease 생산과는 달리 각종 탄소원을 첨가하여도 효소생산은 증가되지 않았다(date not shown).

한편, beef extract-NaCl 배지를 이용하여 효소생산에 미치는 배지의 초기 pH와 배양온도의 영향을 조사한 결과 효소생산 최적 pH는 8.0, 배양온도는 30°C이었다. 이러한 protease 생산 최적 pH는 *S. lipolytica*의 protease 생산 최적 pH인 9.8(4)보다는 낮았고 호염성 세균인 *Halobacterium sp.*의 protease 생산 최적 pH 7.0(2)보다는 높았으나 *Halomonas sp.* ES10의 pH 6.5~9.0(3)과는 유사한 결과이었다. 또한, 효소생산 최적 배양온도도 다른 호염성균(2~4)의 효소생산 최적 배양온도보다 높았다.

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

Classification	Characteristics
Cell shape	Spherical
Cell size	5.0×3.7 μm
Vegetative reproduction	Budding
Ascospore	1-4(G) ¹⁾
Pseudomycelium	+
Growth: 50% glucose/YEA ²⁾	+
2.5 M(3.0 M) NaCl in YEPD ³⁾	+(-)
	(0.5 M NaCl optimal)
1% acetic acid	-
Pigment(red-pink)	-
Vitamin free medium	+
Growth in media: YM ⁴⁾ (color, ring/sedim)	+(C ⁵⁾ , +++)
Malt extract	+
YEPD	+
Osmotolerant medium ⁶⁾	+
Growth temperature(°C)	20°C~3°C (30°C optimal)
Growth pH	3.0~7.5 (pH 6.0 optimal)
Resistance: Cycloheximide(100 ppm/1000 ppm)	+/+
Ethanol(5%/10%)	+/+
Urease activity	-
Assimilation of nitrate	+
TTC colorization test	White

¹⁾Global ²⁾Yeast extract agar ³⁾Yeast extract peptone dextrose ⁴⁾Yeast extracts malt extracts ⁵⁾Cream ⁶⁾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	+	-

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

Nitrogen sources*	Growth	Activity (Units/mL)
Yeast extracts	2.78	-
Peptone	1.20	3.7
Urea	0.05	3.6
Beef extract	1.61	6.8
NaNO ₃	1.35	-
KNO ₃	1.51	0.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.73	3.3
(NH ₄)H ₂ PO ₄	1.31	0.4
NH ₄ Cl	1.60	-
NH ₄ NO ₃	1.19	2.5
Gelatin	1.52	0.6
Casamino acid	1.35	1.9

* Organic nitrogen sources and inorganic nitrogen sources were added to 0.5% and 0.1% in basal medium containing 1% glucose and 0.1M NaCl, respectively. Cultivation was carried out for 2d at 30°C.

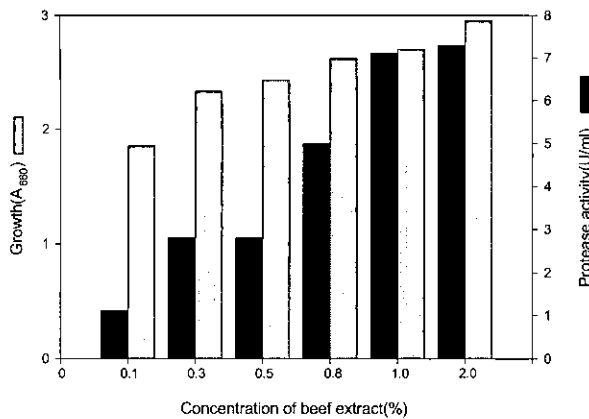


Figure 1. Effect of concentration of beef extract on the production of protease. The cultivation was carried out at 30°C for 2 d after various concentration of yeast extracts were added in the basal medium.

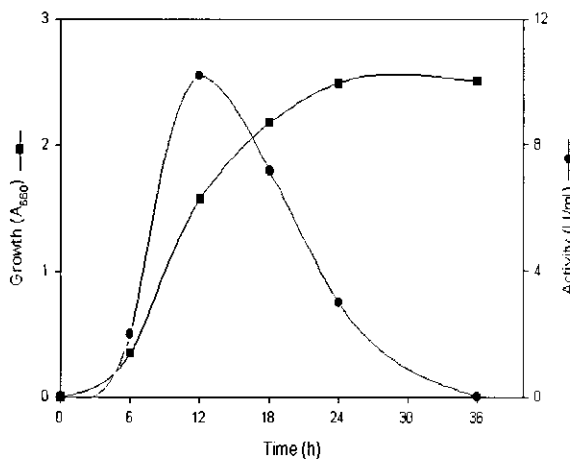


Figure 2. Effect of culture time on the production of protease. Cultivation was carried out in the medium containing 1.0% yeast extract and 0.1 M NaCl at 30°C.

효소 생산에 미치는 배양시간의 영향을 조사한 결과 beef extract-NaCl 배지의 pH를 8.0으로 조정하고 30°C에서 12시간 배양했을 때 10 U/mL의 가장 많은 효소가 생산되었다(Figure 2). 비록 시험 균주의 효소 생산량이 *S. lipolytica*(4)나 다른 호염성 세균(2,3)보다 낮지만 효소 생산 최적 배양시간은 *S. lipolytica*의 36시간(4), 호염성 세균인 *Halobacterium sp.*의 108시간 보다 훨씬 짧아서 산업용 효소생산에 유리할 것으로 생각된다.

Protease를 이용한 ACE 저해물질 생산

대두 분말로부터 제조된 대두 단백질을 재료 및 방법에 기술한 대로 6시간, 12시간, 24시간 각각 반응시킨 후 이들 가수분해물들의 ACE 저해활성을 측정하였다(Table 4).

대두 단백질을 6시간 가수분해시킨 후 얻은 생성물에서 약 13%의 ACE 저해활성을 보여 protease로 처리하지 않은 대두 단백질의 ACE 저해활성(6.0%)보다 약 2배 이상 높았고 가수분해 시간을 12시간 또는 24시간까지 길게 하여도 ACE 저해활성은 더 이상 증가하지 않았다. 이는 서 등(10)의 보고와 같이 6시간에 ACE 저해 펩타이드가 대부분 생성되었고 생성

Table 4. Angiotensin-converting enzyme(ACE) inhibitory activity of various hydrolysates from digestion of soybean protein by crude protease

	Hydrolysates*			
	Control	6 h	12 h	24 h
ACE inhibitory activity(%)	6.0	12.6	11.9	11.7

* Hydrolysates were obtained from digestion of soybean protein(6 mg) at 30°C by the crude protease(1U) for indicated time.

된 펩타이드가 가수분해시간이 지속되어도 분해되지 않기 때문인 것으로 생각된다.

한편 이 결과를 직접 비교하기는 어렵지만 대두 단백질을 protease로 2시간 처리하여 얻은 가수분해물의 혈압강하 효과가 약 90%이었다는 서 등(10)의 결과와는 상이 하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 시험 균주가 메주에서 분리된, 내염성 효모이고 대두 추출물 등 천연배지에서 잘 생육하며 세포외로 강력하게 protease를 생성하므로 이 효모를 스타터로 또는 이 균이 생성하는 내염성 protease를 정제하여 장류의 제조나 숙성공정에 사용함으로써 장류의 고혈압 예방 효과를 더욱 향상시킬 수 있을 것이고 나아가 고부가가치의 기능성 장류 생산에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각한다.

요 약

내염성이며 세포외 protease를 강력하게 생산하는 효모를 재래식 메주효모들과 자연계에서 분리된 내염성 효모들 가운데서 선별하여 *Hansenula polymorpha*로 동정하였다. *Hansenula polymorpha* S-9은 30°C, pH 6.0, 0.5 M NaCl을 함유한 YM 배지에서 잘 생육하였고 이 균을 1.0% beef extract와 0.1 M NaCl을 함유한 Beef extract 배지에 접종하여 30°C로 12시간 배양하였을 때 가장 많은 mL당 10 U의 효소가 생산되었다. 이와 같이 생산된 Protease(1U)를 대두 단백질(6 mg)에 첨가하여 30°C에서 6시간 가수분해시킨 후 얻은 생성물에서 약 13%의 angiotensin 전환효소(ACE) 저해활성을 보였다.

REFERENCES

- Kim, J. B. (1994), Enzymes and its application from extremophile, *Biotechnology News*, 1, 38-46.
- Ahn, Y. S. (1990), Properties of protease producing by the extreme halophile, *Halobacterium sp.*, M. S. Thesis, Dept. of Food Science and Technology, Chungnam National University, Taejeon.
- Lee, J. S (1994), Enzymatic and biochemical properties of alkaline protease produced by *Halomonas sp. ES10*. Ph.D. Dissertation, Dept. of Food Science and Technology, Chungnam National University, Taejeon.
- Kang, K. H., I. H. Bae, and C. H. Lee (1987), Studies on extracellular protease from *Saccharomycopsis lipolytica* -Conditions of Enzyme Production-, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 15(4), 279-285.
- Lee, J. S., S. H. Yi, S. J. Kwon, C. Ahn, and J. Y. Yoo (1997), Enzyme activities and physiological functionality

- of yeasts from traditional *Meju*, *Kor. J. Appl. Microbiol. biotechnol.*, 25(5), 448-453.
6. Lee, Y. S., T. Noguchi, and H. Naito (1983), Intestinal absorption of calcium in rats given diet containing casein or amino acid mixture ; the role of casein phosphopeptide, *Br. J. Nutr.*, 49, 67-70.
 7. Maruyama, S., K. Nagagomi, N. Tomizuka, and H. Suzuki (1985), Angiotensin I converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. I I . isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and ileum of rats, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1405-1410.
 8. Yashiro, A., S. Oda, and M. Sugano (1985), Hypocholesterolemic effect of soybean in rats and mice after peptide digestion, *J. Nutr.*, 115, 1325-1329.
 9. Sohn, K. H. and H. J. Lee (1988), Bitter peptide derived from α - and β - casein digested with alkaline protease from *Bacillus subtilis*, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 20, 659-664.
 10. Suh, H. J., Y. S. Kim, S. H. Chung, Y. S. Kim, and S. D. Lee (1996), Functionality and inhibitory effect of soybean hydrolysate on angiotensin converting enzyme, *Kor. J. Food & Nutrition.*, 9(2), 67-175.
 11. Lee, J. S., S. H. Yi, S. J. Kwon, C. Ahn, and J. Y. Yoo (1997), Isolation, identification and cultural conditions of yeasts from traditional *Meju*, *Kor. J. Appl. Microbiol. biotechnol.*, 25, 453-441.
 12. Hasegawa, T. (1984), Taxonomy and Identification of Microorganism, p.153-254. Hakhae Pub. Center, Tokyo.
 13. Kreger-van Fij. The Yeast, a taxonomic study. (3rd ed.) Elsevier Sci., Amsterdam.
 14. Cushman D. W. and H. S. Cheung. (1971), Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20, 1637-1648
 15. Kim, J. H., S. H. Lee, N. M. Kim, S. Y. Choi, J. Y. Yoo, and J. S. Lee (2000), Manufacture and Physiological Functionality of Korean traditional Liguors by using Dandelion (*Taraxacum Platycarpum*), *Kor. J. Biotech. Bioeng.*, 28, 367-371