

RESEARCH NOTE

비병원성 야생효모 *Saccharomyces cerevisiae* WJSL 0113으로부터 항치매성 Butyrylcholinesterase 저해물질의 생산

한상민, 박선정, 장지은, 이종수^{*}
배재대학교 바이오의약학부

Production of an Anti-dementia Butyrylcholinesterase Inhibitor from Non-pathogenic Wild Yeast, *Saccharomyces cerevisiae* WJSL 0113

Sang-Min Han, Seon-Jeong Park, Ji-Eun Jang, and Jong-Soo Lee^{*}
Faculty of Biomedicine and Biotechnology, Paichai University, Daejeon 35345, Korea

^{*}Corresponding author: biotech8@pcu.ac.kr



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2021 March, 49(2): 243-248
<https://doi.org/10.4489/KJM.20210021>

Received: February 10, 2021

Revised: March 29, 2021

Accepted: April 20, 2021

© 2021 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT

In this study, screening of potent non-pathogenic wild yeast with high anti-dementia butyrylcholinesterase (BChE) inhibitory activity and production condition of a BChE inhibitor were described. Among 36 non-pathogenic wild yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* WJSL 0113 showed the highest BChE inhibitory activity of 85.2%. The specific BChE inhibitor was maximally produced when *S. cerevisiae* WJSL 0113 was cultured at 30°C for 48 h in a yeast extract-peptone-dextrose medium.

Keywords: Anti-dementia, Butyrylcholinesterase inhibitor, *Saccharomyces cerevisiae* WJSL 0113, Wild yeast

최근 급속한 고령사회 진입으로 고혈압, 당뇨, 비만 등 만성 소모성 질환자가 크게 증가하고 있고 특히 치매는 장, 단기 기억력 감소와 학습능력과 정보수집 능력 등의 상실에 의한 단독 생존력이 없어 사회복귀가 어렵고 경제적 부담이 큰 질환으로 최근 크게 증가하고 있어 국가책임제 등 사회적 관심이 높아지고 있다[1].

치매의 원인 질병으로는 알츠하이머병 등에 의한 퇴행성 질환, 알콜 중독 등의 독성물질과 갑상선 기능저하 등의 대사성 치매와 유전적 질환과 아밀로이드 단백질에 의한 혈관성 치매, 뇌종양 등의 다양한 질병들이 관여하는 것으로 알려져 있다. 이들 중 치료가 비교적 어려운 주원인으로는 β -secretase에 의하여 생성되는 아밀로이드 단백질 축적과 말초신경계와 중추 신경계에서 작용하는 신경전달 물질인 acetylcholine과 butyrylcholine 등이 각각 acetylcholinesterase (AChE)나 butyrylcholinesterase (BChE)에 의해 분해되어 이들이 손실됨으로 발병되는 것으로 알려져 있다[2-5].

Butyrylcholinesterase (EC;3.1.1.8)는 신경전달물질인 butyrylcholine과 acetylcholine들을 콜린과 아세테이트로 가수분해시키는 비특이성 cholinesterase로서 pseudocholinesterase 또는 혈청 cholinesterase로 알려져 있다[6]. 따라서 BChE는 AChE와 더불어 치매의 주요 원인 효소이며 이 효소의 저해물질은 항치매물질로서 의약품이나 건강소재로 매우 유용하게 활용될 수 있는 중요한 소재이다.

그러나, AChE 저해물질에 비하여 BChE 저해물질들에 관한 연구는 거의 실시되지 않았고 cholinesterase 저해물질을 기반으로 개발된 시판 항치매 물질들이 구토 등의 부작용과 대량생산에서의 어려움 등이 있으므로 비교적 영양요구 조건이 다른 미생물에 비하여 단순하고 대량 생산이 용이한 미생물 특히 값싼 배지로 대량배양이 용이한 버섯과 효모로부터 새로운 항치매성 건강 소재의 개발이 필요하다.

따라서 필자 등은 균류로부터 새로운 항치매성 건강소재를 개발하여 이들을 건강식품 및 의약품산업에 응용할 목적으로 전보에서 항치매성 AChE 저해활성이 우수한 흑타리버섯[7]과 야생 효모로 *Saccharomyces cerevisiae* WJSL 0113를 선발하여[8] 저해물질 생산 조건과 균학적 특성을 조사하여 보고하였다.

본 연구에서는 대전광역시 대전천에서 분리한 98종의 야생효모들 중 비병원성 효모들을 대상으로 이들의 무세포 추출물을 제조한 후 BChE 저해활성을 조사하여 우수 효모를 선발하였고 대조 균주들로 시판 주류 양조에 이용되고 있는 *Saccharomyces cerevisiae* 2종의 효모들과 식용 버섯들의 무세포추출물과 물 추출물들을 각각 제조하여 이들의 BChE 저해활성을 측정하여 비교하였다. 또한 선발효모를 이용한 BChE 저해물질의 생산 최적조건으로 저해활성에 미치는 배양 온도 및 배양 시간 등의 영향을 검토하였다.

대전광역시 대전천 주변의 물과 토양에서 분리, 동정한 야생효모들 중 선별한 비병원성 야생 효모들을 yeast extract-peptone-dextrose (YPD) 배지에 접종하여 30°C에서 3일 배양한 후 세포를 파쇄한 다음 원심분리하여 얻은 상등액을 무세포추출물로 제조하고 이들의 BChE 저해활성을 측정 한 결과는 Table 1과 같다.

실험에 사용한 비병원성 야생효모들 중 *S. cerevisiae* WJSL0113의 무세포추출물이 85.2%의 가장 높은 BChE 저해활성을 보였고 *Pichia membranifaciens* WJSL0177 균주는 15.2%, *Wickerhamomyces anomalus* WJSL0120은 12.3%를 보였다. 그러나 나머지 균주들은 없거나 10% 미만의 낮은 저해활성을 보였다. 따라서 이들 비병원성 야생효모들 중 BChE 저해활성이 85.2%로 가장 높았던 *S. cerevisiae* WJSL0113균주를 항치매성 건강소재 생산을 위한 우수 균주로 최종 선발하였다.

한편, 대조(비교) 균주들로 시판 주류제조용 *S. cerevisiae*들에 대하여[9,10] 이들을 YPD 배지에서 30°C로 3일간 배양한 후 각각의 무세포추출물들을 제조하여 이들의 BChE 저해활성을 측정 한 결과는 Table 1과 같다. 시판 주류용 *S. cerevisiae* 효모들 중에서는 Fermivin이 5.8%의 저해활성

Table 1. Butyrylcholinesterase inhibitory activities of non-pathogenic wild yeasts from Daejeoncheon of Daejeon city in Korea.

| No. | Strains | Isolated No. | Butyrylcholinesterase inhibitory activity (%) ^a | Remarks |
|--|--|--------------|--|---------|
| 1 | <i>Aureobasidium pullulans</i> | WJSL0121 | n.d ^b | |
| 2 | <i>Candida glabrata</i> | WJSL0143 | n.d | |
| 3 | <i>Candida catenulata</i> | WJSL0001 | n.d | |
| 4 | <i>Candida intermedia</i> | WJSL0144 | 4.0 | |
| | | WJSL0043 | n.d | |
| 5 | <i>Candida pseudolambica</i> | WJSL0125 | 6.4 | |
| 6 | <i>Candida sake</i> | WJSL0051 | 4.9 | |
| | | WJSL0094 | n.d | |
| | | WJSL0095 | 2.8 | |
| 7 | <i>Candida tropicalis</i> | WJSL0005 | 4.7 | |
| 8 | <i>Candida vartiovaarae</i> | WJSL0098 | 1.8 | |
| | | WJSL0100 | 1.7 | |
| | | WJSL0101 | 1.7 | |
| 9 | <i>Cryptococcus flavescens</i> | WJSL0131 | n.d | |
| 10 | <i>Cryptococcus magnus</i> | WJSL0132 | 2.1 | |
| 11 | <i>Debaryomyces hansenii</i> | WJSL0106 | n.d | |
| 12 | <i>Debaryomyces udonii</i> | WJSL0006 | n.d | |
| 13 | <i>Debaryomyces vindobonensis</i> | WJSL0162 | 1.3 | |
| 14 | <i>Filobasidium magnum</i> | WJSL0165 | n.d | |
| 15 | <i>Geotrichum fragrans</i> | WJSL0166 | n.d | |
| 16 | <i>Hanseniaspora uvarum</i> | WJSL0007 | n.d | |
| 17 | <i>Kazachstania telluris</i> | WJSL0136 | 3.5 | |
| 18 | <i>Kluyveromyces marxianus</i> | WJSL0009 | n.d | |
| 19 | <i>Lachancea thermotolerans</i> | WJSL0107 | 7.1 | |
| 20 | <i>Leucosporidium golubevii</i> | WJSL0108 | n.d | |
| 21 | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | WJSL0012 | n.d | |
| 22 | <i>Naganishia globosa</i> | WJSL0171 | n.d | |
| 23 | <i>Papiliotrema flavescens</i> | WJSL0109 | 2.6 | |
| 24 | <i>Papiliotrema laurentii</i> | WJSL0110 | n.d | |
| 25 | <i>Pichia membranifaciens</i> | WJSL0177 | 15.2 | |
| 26 | <i>Rhodospiridium diobovatum</i> | WJSL0137 | n.d | |
| 27 | <i>Rhodotorula glutinis</i> | WJSL0111 | n.d | |
| 28 | <i>Rhodotorula ingeniosa</i> | WJSL0139 | 1.9 | |
| 29 | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | WJSL0112 | n.d | |
| 30 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | WJSL0113 | 85.2 | |
| 31 | <i>Sampaiozyma ingeniosa</i> | WJSL0114 | n.d | |
| 32 | <i>Torulaspora delbruecki</i> | WJSL0117 | n.d | |
| 33 | <i>Trichosporon coremiiforme</i> | WJSL0018 | 3.5 | |
| 34 | <i>Ustilentyloma graminis</i> | WJSL0118 | n.d | |
| | | WJSL0119 | n.d | |
| 35 | <i>Wickerhamomyces anomalus</i> | WJSL0120 | 12.3 | |
| 36 | <i>Williopsis</i> sp. | WJSL0189 | n.d | |
| Commercial alcohol fermentation yeasts | | | | |
| | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (La Parisienne) | | n.d | Control |
| | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Fermivin) | | 5.8 | |
| | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (SAF INSTANT) | | n.d | |
| Commercial edible mushrooms | | | | |
| | <i>Pleurotus ostreatus</i> (Heuktari) (Water extracts) | | 21.3 ^c | Control |
| | <i>Pleurotus nebrodensis</i> (Water extracts) | | 15.2 | |
| | <i>Pholiota adipose</i> (Water extracts) | | 42.7 | |

^a Incubation: 30°C, 24 hr, ^b Not detected, ^c Water extracts at 30°C for 24 hr.

을 보였을 뿐 La-parisienne과 SAF INSTANT 효모 등은 활성을 나타내지 않았고 이들 활성 모두 본 연구에서 선발한 야생효모 *S. cerevisiae* WJSL0113 균주의 85.2% 보다 매우 낮은 활성이었다. 이와 같이, 야생효모 형태의 *S. cerevisiae* WJSL0113와 시판 *S. cerevisiae* 들 간에 활성이 크게 차이나는 것은 실험에 사용한 시판 효모들이 에탄올 생산 효모들로서의 주요 기능에 맞게 배양된 형태의 효모이기 때문인 것으로 추정된다.

또한, 선발 효모의 저해활성은 대조구의 시판 식용버섯들 중 활성이 높았던 검은비늘버섯 물 추출물의 42.7%와 느타리(품종명: 흑타리)의 21.3% 보다도 약 2-4배 더 높은 저해활성이었다 (Table 1).

선발 균주인 *S. cerevisiae*는 이미 오래전부터 전통 발효주와 빵 효모로 널리 이용되고 있을 뿐만 아니라 분자 생물학적 연구의 숙주로 이용되고 있는 GRAS 균주이다. 지금까지 필자 등에 의하여 *S. cerevisiae*의 항고혈압활성 등 생리활성 물질 생산이 보고[11,12] 되었으나 항치매성 BChE 저해 물질 생산은 본 논문이 처음 보고이고 따라서 배양이 용이하고 비교적 단시간에 대량 배양이 가능한 효모로부터 고부가가치의 항치매성 건강소재 생산에 매우 유용할 것으로 사료된다.

최종 선발된 *S. cerevisiae* WJSL0113로부터 BChE 저해물질을 대량 생산하기 위한 최적 배양조건으로 배지의 종류와 배양온도 및 배양시간 등의 영향을 검토하였다. *S. cerevisiae* WJSL0113를 YPD, yeast extract-malt extract (YM), potato-dextrose (PD) 배지에 접종한 후 30°C에서 24시간 배양하여 얻은 무세포 추출물들의 BChE 저해활성을 측정한 결과 YPD 배지에서 배양하였을 때 균 생육이 제일 좋았고(A_{660} : 2.4), BChE 저해활성이 86.2%로 가장 높았다. YM 배지에서도 균 생육(A_{660} : 2.1)과 저해활성(83.1%)이 높았으나 PD배지에서는 저해활성이 63.7%로 YPD와 YM배지에서 배양하였을 때 보다 매우 낮았다(data not shown).

선발 균주인 *S. cerevisiae* WJSL0113를 YPD 배지에 접종하여 15°C에서 40°C까지 일정 온도에서 24시간씩 배양한 후 BChE 저해활성들을 측정한 결과 Table 2와 같이 30°C에서 배양하였을 때 균 생육이 가장 좋았고 BChE 저해활성도 87.6%로 가장 높았다. 20°C와 40°C에서 생육은 30°C보다 미약하였으나 각각 76.8%와 69.5%의 비교적 높은 저해활성을 보였다. 또한, 15°C와 45°C에서는 균 생육이 미약하였고 저해활성도 각각 23.5%와 4.5%로 매우 낮았다.

S. cerevisiae WJSL0113를 YPD배지에 접종하여 30°C에서 6시간에서 72시간까지 일정 시간씩 배양하여 얻은 무세포추출물들의 BChE 저해활성을 측정한 결과 Fig. 1과 같다. 배양시간이 경과

Table 2. Effect of cultural temperature on the butyrylcholinesterase inhibitory activities of *Saccharomyces cerevisiae* WJSL0113.

| Temperature (°C) | Growth (A_{660}) | Butyrylcholinesterase inhibitory activities (%) |
|------------------|----------------------|---|
| 15 | 0.41 | 23.5 |
| 20 | 1.63 | 76.8 |
| 30 | 2.40 | 87.6 |
| 40 | 1.35 | 69.5 |
| 45 | 0.21 | 4.5 |

함에 따라 BChE 저해활성이 증가하여 48시간 배양 후 얻은 무세포추출물의 BChE 저해활성이 89.1%로 가장 높은 저해활성을 보였고 배양 72시간에 82.3%로 낮아졌다.

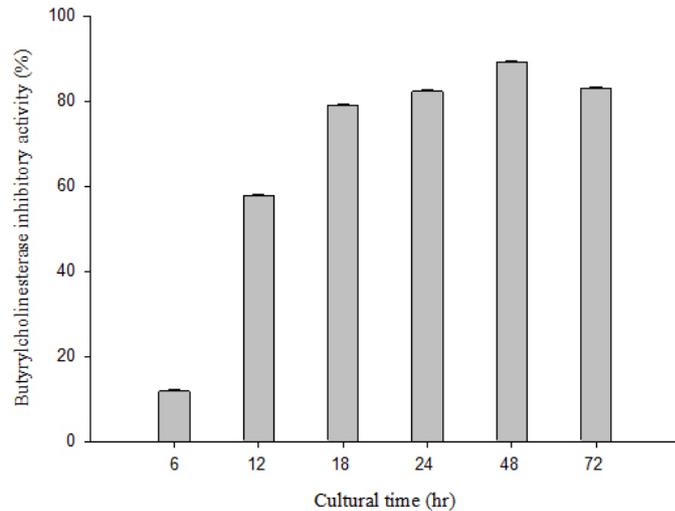


Fig. 1. Effect of cultural time on the butyrylcholinesterase inhibitory activities of *Saccharomyces cerevisiae* WJSL0113.

적요

본 연구에서는 진균류 유래의 새로운 항치매성 BChE저해물질을 생산할 목적으로 대전광역시 하천에서 분리하여 선별한 비병원성 야생효모들의 무세포추출물들을 제조하여 이들의 BChE 저해활성 측정하였다. 비병원성 야생효모들 중 *S. cerevisiae* WJSL0113의 무세포추출물이 85.2%의 BChE 저해활성을 보여 최종 선발하였다. 선발 균주의 BChE 저해활성은 시판 주류용 *S. cerevisiae* 과 식용 버섯들의 추출물보다 높은 저해활성을 보였고 선발 균주인 *S. cerevisiae* WJSL0113을 30°C에서 48시간 배양하였을 때 가장 높은 항치매성 BChE 저해활성을 보였다.

REFERENCES

1. Lee DH, Lee DH, Lee JS. Characterization of a new antidementia β -secretase inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae*. *Enz Microbiol Technol* 2007;42:83-8.
2. Lee DH, Lee JS, Yi SH, Lee JS. Production of the acetylcholinesterase inhibitor from *Yarrowia lipolytica* S-3. *Mycobiology* 2008;35:102-5.
3. Lee DH, Lee DH, Lee JS. Characterization of a new antidementia β -secretase inhibitory peptide from *Rubus coreanus*. *Food Sci Biotechnol* 2008;17:489-94.

4. Lee EN, Song JH, Lee JS. Screening of a potent antidementia acetylcholinesterase inhibitor-containing fruits and optimal extraction conditions. *Korean J Food & Nutr* 2010;23:318-23.
5. Lee SR, Kang HW, Kim ST, Lyu YS. The effects of anti-alzheimer in pCT105-induced neuroblastoma cell lines by radix polygalae and rhizoma acori graminei mixture extract. *J Physiol & Pathol Korean Med* 2003;17:1037-49.
6. Hwang JS, Im SB, Lee II, Kim TR, Kim DO. Effects of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* ripe fruits on protection of neuronal PC-12 cells and cholinesterase inhibition. *Korean J Food Sci Technol* 2016;48:86-91.
7. Han SM, Kim JY, Lee JS. Production of anti-dementia acetylcholinesterase inhibitor from *Pleurotus ostreatus* (Heuktari) and inhibitory effect on PC12 neuron apoptosis. *Kor J Mycol* 2019;47:337-46.
8. Kim JY, Lee SY, Han SM, Lee JS. Production of anti-dementia acetylcholinesterase inhibitors from the wild yeasts *Saccharomyces cerevisiae* WJSL0113 and *Wickerhamomyces anomalus* JSF0128. *Kor J Mycol* 2018;46:447-57.
9. Bae SM, Han SM, Choi JM, Lee JS, Kim HK. Manufacturing of Korean traditional rice wine, Makgeolli, supplemented with strawberry and its physicochemical and microbial properties during fermentation. *Kor J Mycol* 2016;44:307-13.
10. Shin JW, Kim YH, Kim JH, Na KC, Lee JS. Manufacture of pear marc nuruk by *Aspergillus oryzae* and characteristics of makgeolli fermentation. *Kor J Mycol* 2013;41:255-60.
11. Jeong SC, Lee DH, Lee JS. Production and characterization of an anti-angiogenic agent from *Saccharomyces cerevisiae* K-7. *J Microbiol Biotechnol* 2006;16:1904-11.
12. Kim JH, Lee DH, Jeong SC, Chung KS, Lee JS. Characterization of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol Biotechnol* 2004;14:1318-23.