

## *Yarrowia lipolytica* 504D의 Extracellular Alkaline Proteinase 생산성

유춘발<sup>†</sup> · 김창화 · 김태곤

대구대학교 식품공학과

### Production of the Extracellular Alkaline Proteinase by *Yarrowia lipolytica* 504D

YU Choon-Bal<sup>†</sup>, Chang-Hwa KIM and Tae-gon KIM

*Department of Food Science and Technology, Taegu University, Kyungsan 712-714, Korea.*

#### Abstract

Productivity of alkaline proteinase from *Yarrowia lipolytica* 504D was investigated. For the production of the enzyme, hemoglobin was the best nitrogen source, however, casein and skim milk were also good. All carbon sources inhibited strongly the productivity of the enzyme. Yeast extract increased the productivity of the enzyme to 220%, but almost mineral salts except monovalent ions decreased it. Based on these results, optimal medium was composed of 1.2% casein, 0.2% glucose, 0.16% yeast extract, and 0.1% ammonium sulfate. The best condition for the production of the enzyme was observed at pH 9 and 20°C for 42 hours.

*Key words* : *Yarrowia lipolytica*, alkaline protease, yeast.

#### 서 론

Alkaline proteinase는 산업전반에 걸쳐 다양하게 이용되고 있다. 제약에서는 소화제 등에 이용되고, 식품에서는 장유가공이나 아미노산 제조등에 이용되며, 그의 피혁가공과 효소세제에도 활용되고 있다<sup>1,2)</sup>. 특히 환경오염방지를 위한 세제의 주성분으로 계면활성제보다는 효소성분들의 비중이 증가되고 있으며, 이때 사용되어지는 protease로는 금속염에 의해서도 효소활성의 영향을 거의 받지 않는 alkaline proteinase가 주로 사용됨에 따라 세계적으로 그 수요는 점차 증대되고 있는 실정이다<sup>3)</sup>. 또한 과거에는 고온이나 강산 또는 강알칼리 등의 특수한 환경에 사용될 수 있는 효소

에 많은 관심이 모아졌으나 최근에는 산업의 다양화에 따라서 저온 또는 중온이나 중성같은 일반적인 환경에서도 높은 활성을 보이는 다양한 효소들이 요구되기도 한다. 본 연구에서는 자연계로부터 분리한 alkaline proteinase를 생산하는 효모 *Yarrowia lipolytica* 504D<sup>4)</sup>의 효소생산성을 검토하여 보고하고자 한다.

#### 재료 및 방법

##### 균주

새우젓으로부터 분리하여 보관중인 효모 *Yarrowia lipolytica* 504D를 사용하였다<sup>4)</sup>.

<sup>†</sup> Corresponding author

### 접종 및 배양

종배양은 보관중인 효모 1백금이를 취하여 4 ml의 V8 액체배지<sup>5)</sup>가 들어있는 시험관에 접종하고 20°C에서 1분당 120 stroke의 조건으로 12시간 동안 진탕배양하였다. 본 배양은 1.2% casein, 0.2% glucose, 0.1% ammonium sulfate, 0.05% casamino acid, 0.16% yeast extract 조성의 기본배지(pH 9) 50 ml를 250 ml용 삼각플라스크에 넣고 0.5 ml의 종배양액을 접종한 후 종배양과 동일한 조건으로 42시간 배양하였다.

### 최적배양온도의 조사

효소생산에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 8 ml의 배지(pH 9.5)를 'L'자형 시험관(vertical : 1.5×10 cm, horizontal : 1.5×15 cm)에 주입하고 Temperature gradient incubator를 이용하여 10-40°C의 범위로 42시간 배양하였다.

### 균체량의 측정

균체량은 균체배양액의 20배 희석액을 600 nm에서 흡광도를 측정하여 건조균체량으로 환산하였다. 흡광도 1은 배양액 1 ml당 건조균체량 0.486 mg에 상응한다. 건조균체량의 측정은 배양액 10 ml를 Whatman No.5 여과지에서 자연여과시키고 동량의 증류수로 3회 세척한 후 105°C(±1°C)에서 건조하면서 측정된 항량(constant weight)을 건조균체량으로 하였다.

### Alkaline proteinase의 분석

효소활성도는 Hammarsten casein으로부터 가수분해되어 유리되는 tyrosine에 상응하는 아미노산의 양을 275 nm로 정량하였다<sup>6, 7)</sup>. 즉 500 μl의 0.6% Hammarsten casein(0.1M Tris-HCl buffer, pH 9.5)에 조효소액 50 μl(배양 상등액의 5배 희석액)를 첨가하여 45°C에서 20분간 반응시키고, 550 μl의 반응정지액(0.11 M trichloroacetic acid, 0.22 M sodium acetate, 0.33 M acetic acid)을 첨가하여 반응을 정지시킨후, 잔류 casein을 침전제거시키기 위하여 45°C에서 20분간 방치하였다. 이것을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 275 nm에서 흡광도를 측정하여 효소활성도로 하였다. 효소활성도(Unit)는 위의 조건에서 1분동안에 Hammarsten casein으로부터 1μg의

tyrosine에 상응하는 아미노산을 생성하는 효소의 양으로 하였으며, 이때 흡광도 1은 0.808 unit에 상응한다.

### Casein의 정량

배양액의 casein 농도는 배양상등액에 상기의 효소반응 정지액을 첨가하여 침전된 단백질을 정량하였다. 즉 배양상등액 10 ml에 효소반응 정지액 5 ml를 첨가시키고 상온에서 30분간 방치하였다. 생성된 casein 침전물은 미리 항량을 측정된 여과지(Wattman No.5)에 자연여과시킨 후 105°C(±1/1°C)에서 건조하면서 항량(constant weight)을 측정하였다.

### Glucose의 정량

배양액의 glucose 농도는 DNS 법<sup>8)</sup>으로 정량하였다. 먼저 원심분리한 0.1-0.01 ml의 배양상등액을 증류수로 총 0.9 ml가 되게 보충하고 0.1 ml의 DNS(dinitrosalicylic acid) 용액을 첨가하여 끓는 물에 10분간 증탕하여 발색하였다. 발색된 반응액을 5배 희석하고 546 nm에서 흡광도를 측정 후 미리 작성한 glucose 표준곡선으로부터 glucose 농도를 환산하여 정량하였다.

## 결과 및 고찰

### 질소원에 의한 생산성

기본배지에 casein을 대신하여 1%의 각종 질소원을 첨가하여 효소생산성을 조사하였다. 그 결과, 첨가한 질소원들중에는 1%의 hemoglobin이 가장 우수하였고, 1% casein과 skim milk도 비교적 좋은 결과를 보였으나, 단백질의 가수분해물들인 peptone, soytone, tryptone, casamino acid는 5-32%의 낮은 생산성을 보였다(Table 1). 이러한 결과는 김 등<sup>9)</sup>이 skim milk에서 가장 좋은 결과를 얻었다는 보고와, 김 등<sup>9)</sup>과 강 등<sup>10)</sup>이 pepton이 casein에 비하여 각각 83%와 70%의 비교적 높은 생산성을 보였다는 보고하여 동일한 종임에도 불구하고 균주에 따라서 효소 생산특성의 차이를 보였다.

질소원중에서 가장 효과를 보인 hemoglobin은 배양액이 흑갈색이기 때문에 실험에 곤란한 점이 있어서 본 실험의 효소유도원으로는 casein을 사용하였다. 그래서 casein의 농도에 대한 생산성을 조사한 결과는 1.2%에서 가장 좋은 효과를 보였다(Fig. 1).

Table 1. Effect of nitrogen sources on the production of the alkaline proteinase.

Nitrogen	Sources	Enzyme (Unit)	Productivity (%)	Final pH	Cell Mass (mg/ml)
None		0.15	3	6.7	1.368
Albumin	(0.5%)	4.01	74	8.6	4.045
	(1.0%)	3.19	59	8.4	4.559
Gelatin	(0.5%)	0.58	11	8.5	3.434
	(1.0%)	0.50	8	8.5	3.754
Hemoglobin	(0.5%)	5.52	102	8.3	4.346
	(1.0%)	6.63	122	8.6	6.266
Casein	(0.5%)	5.11	94	8.5	3.996
	(1.0%) <sup>(1)</sup>	5.42	100	8.4	4.171
Skimmilk	(0.5%)	2.72	50	8.5	3.783
	(1.0%)	5.14	95	8.5	4.685
Casamino acid	(1%)	0.27	5	7.6	2.377
Peptone	(0.5%)	0.89	16	8.6	3.414
	(1.0%)	0.98	18	8.6	4.569
Tryptone	(0.5%)	1.71	32	8.6	4.210
	(1.0%)	1.31	24	8.5	4.937
Soytone	(0.5%)	0.64	12	8.6	3.133
	(1.0%)	1.31	24	8.6	4.666
Urea	(1%)	0.88	16	6.7	1.707
Ammonium Sulfate	(1%)	0.43	8	6.1	1.668
Yeast extract	(1%)	0.16	3	6.9	1.872

<sup>(1)</sup> 1% casein is set at 100% as control for the production of the proteinase. Basal medium was composed of 0.2% glucose and 0.16% yeast extract. The yeasts were cultured for 42 h at 20°C and pH 9.

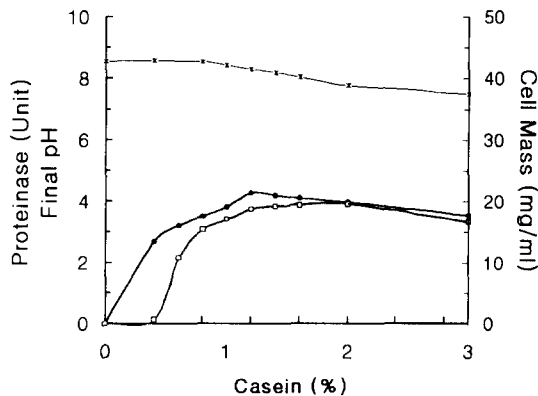


Fig. 1. Effect of casein on the production of the alkaline proteinase.

The yeasts were cultured in the medium containing of 0.2% glucisem 0.1% ammonium sulfate, 0.16% yeast extract, and 0.05% casamino acid at pH 9.5 and 20°C for 42 h.

탄소원에 의한 생산성

기본배지에 glucose를 대신하여 본 효모가 이용할 수 있는 각종 탄소원<sup>(11)</sup>을 첨가하여 효소생산성을 조사하였다. 그 결과, 모든 탄소원들은 균체량의 증가에도 불구하고 대조구에 비하여 11-45%의 생산성을 보여 효소생산을 상당히 저해하는 것을 알 수 있었다(Table 2). 김 등<sup>9)</sup>은 fructose, glucose, glycerol이 생산성을 18-27% 증가시켰다고 보고하였고, 강 등<sup>10)</sup>은 glycerol, glucose, fructose가 34-83% 증가시켰다고 보고하여 본 효모의 생산특성과 전혀 다른 것을 알 수 있었다.

Yeast extract에 의한 생산성

거의 대부분의 효모들은 생육인자로써 비타민류를 절대적으로 요구하며, 이러한 특성들은 효모의 분류동정 기준에 이용되기도 한다. 그래서 생육인자들을 비교적 많이 함유하고 있는 yeast extract가 효소의 생산성에 미치는 영향을 조사한 결과, 0.16-0.20%에서 비교적 양호한 결과를 보였다(Fig. 2).

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

Carbon Sources (1%)	Enzyme Productivity (Unit)	(%)	Final pH	Cell Mass (mg/ml)
Control	1.97	100	8.1	3.932
Ethanol	0.22	11	5.1	6.621
Glycerol	0.37	19	3.3	6.705
Glucose	0.89	45	4.5	8.188
Fructose	0.10	5	5.2	7.432

Basal medium was composed of 1.2% casein, 0.1% ammonium sulfate, 0.05% casamino acid, and 0.16% yeast extract. The yeasts were cultured for 42 hours at 20°C and pH 9.5.

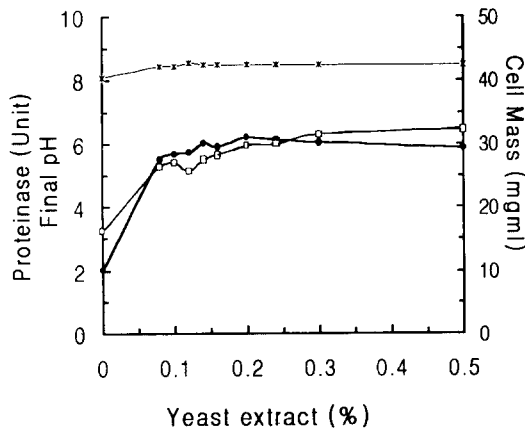


Fig. 2. Effect of yeast extract on the production of the alkaline proteinase

The yeasts were cultured in the medium containing of 0.2% casein, 0.2% glucose, 0.1% ammonium sulfate, and 0.05% casamino acid at pH 9.5 20°C for 42h.

무기염에 의한 생산성

무기염에 의한 효소생산성을 조사한 결과는 K<sup>+</sup>와 Na<sup>+</sup>의 1가 무기염만이 약간의 효과를 보이는 것으로 나타났다. 그러나 2가와 3가 무기염은 효소생산성을 증가시키지 못하거나 감소시켰으며, 특히 일반적인 metalloproteinase의 금속성분인 Zn<sup>2+</sup>는 효소생산을 완전히 저해시켰다(Table

3). 김 등<sup>9)</sup>은 대부분의 무기염이 효소생산에 거의 영향이 없다고하여 본 효모의 효소생산 특성과 다른 것으로 나타났다.

초기배양 pH에 의한 alkaline proteinase의 생산성

지금까지 실험에서 얻어진 화학적 인자들에 의해 얻어진 결과를 조합하여 조성의 효소생산용 최적배지를 구성하고, 이것을 토대로 pH, 온도 및 시간에 따른 효소 생산성을 조사하였다.

먼저 초기배양 pH에 의한 효소 생산성을 조사한 결과, pH 8.5-10의 알카리 환경에서 비교적 양호한 생산성을 보이는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이러한 결과는 김 등<sup>9)</sup>과 강 등<sup>10)</sup>의 보고와 일치하는 것으로 나타남에 따라 alkaline proteinase는 역시 알카리 환경에서 높은 생산성을 보임을 알 수 있었다.

배양온도에 의한 생산성

배양온도에 의한 효소의 생산성을 조사한 결과, 20°C에서 가장 높은 생산성을 보이는 것으로 나타나 김 등<sup>9)</sup>이 18°C에서 비교적 높은 생산성을 보였다는 보고와 유사하였다(Fig. 4). 그러나 강 등<sup>10)</sup>이 15°C에서 높은 생산성을 보였

Table 3. Effect of mineral salts on the production of the alkaline proteinase.

Mineral Salts (1mM)	Enzyme Productivity (Unit)	(%)	Final pH	Cell Mass (mg/ml)
Control	2.04	100	8.1	4.052
KCl	2.62	128	8.1	4.784
NaCl	2.56	125	8.1	4.021
CaCl <sub>2</sub>	2.25	110	8.1	3.753
FeCl <sub>2</sub>	2.25	110	8.1	4.433
MgCl <sub>2</sub>	1.72	84	8.3	3.732
MnCl <sub>2</sub>	1.52	75	7.8	3.784
ZnCl <sub>2</sub>	0.17	8	7.6	2.124
FeCl <sub>3</sub>	0.00	0	8.7	0.742

Basal meduma was composed of 1.2% casein, 0.2% glucose, 0.1% ammonium sulfate, 0.05% casamino acid, and 0.16% yeast extract. The yeasts were cultured for 42 hours at 20°C at pH 9.5.

다는 보고와 약간의 차이를 보였고, 특히 남극에서 분리된 저온성 효모인 *Candida humicola*<sup>11)</sup>의 acid protease가 4℃ 및 12℃에서 양호하게 생산되었으나 22℃에서 급격히 감소되는 것으로 나타난 점에서 본 효모와 대조를 보였다.

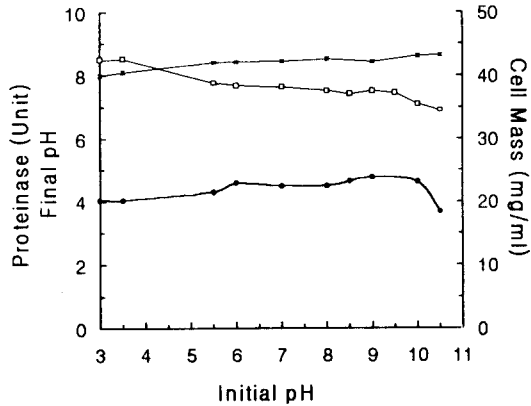


Fig. 3. Effect of initial pH on the production of the alkaline proteinase

The yeasts were cultured in the medium containing of 1.2% casein, 0.2% glucose, 0.1% ammonium sulfate, 0.16% yeast extract, and 0.05% casamino acid at 20℃ for 42 h.

배양시간에 따른 생산성

최적배지 2ℓ를 5ℓ용 jar fermentor에 넣고 종배양액 20 ml를 접종하여 20℃에서 배양하였다. 그 결과, 효소생산성은 42 시간경에 가장 높은 것으로 나타나 김 등<sup>9)</sup>과 강 등<sup>10)</sup>이 36 시간경에 최고의 생산성을 보였다는 보고와는 유사하였으나, Mitsugi 등<sup>12)</sup>이 *C. lipolytica* AJ4541의 protease가 25 시간, Murao 등<sup>13)</sup>이 *Rhodotorula glutinis* K-24의 acid protease가 72 시간경에 최고의 생산성을 보였다는 보고와는 많이 다른 것으로 나타났다(Fig. 5). 배양시간이 지남에 따라 배양액중의 효소 생산성은 상당히 감소되는 결과를 보였는데, 駒形 등<sup>10)</sup>은 *C. lipolytica*를 장시간 배양하면 배양액중의 protease 활성이 급격히 감소한다고 하여 본 연구도 그와 유사한 결과를 보였다.

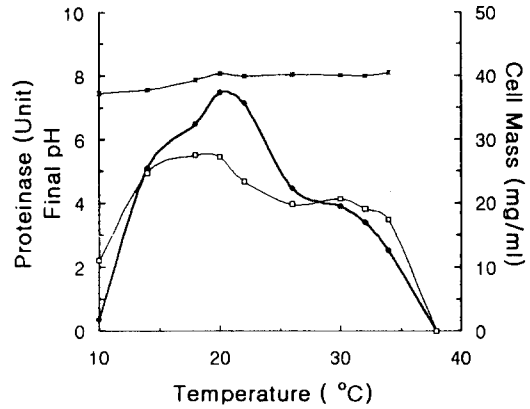


Fig. 4. Effect of temperature on the production of the alkaline proteinase  
The yeasts were cultured in the medium containing of 1.2% casein, 0.2% glucose, 0.1% ammonium sulfate, 0.16% yeast extract, and 0.05% casamino acid at pH 9.5 for 42 h.

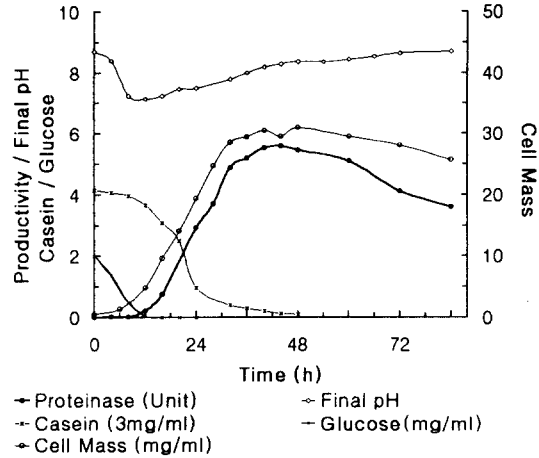


Fig. 5. Time course on the production of the alkaline proteinase by *Y. lipolytica* 504D  
Optimal medium for the production of the alkaline proteinase was composed of 1.2% casein, 0.2% glucose, 0.1% ammonium sulfate, 0.16% yeast extract, 0.1% casamino acid at pH 9.5. Cultivation was carried out in 3ℓ of the medium in a 5ℓ Jar fermentor at 20℃.

배양시간이 경과함에 따라 배지에 첨가된 casein(1.2%)의 분해도를 분석한 결과, 배양 8-24시간경에는 비교적 급격히 분해되었고, 배양 24-48시간경에는 비교적 완만히 분해되는 경향을 보였다. 또한 배지에 첨가된 glucose(0.2%)의 농도를 분석한 결과, 배양 12시간경에 거의 측정되지 않은 것으로 보아 glucose는 배양초기에 완전히 소모되는 것으로 나타났다.

## 요 약

*Yarrowia lipolytica* 504D의 alkaline proteinase 생산성을 조사한 결과, 질소원으로 hemoglobin이 가장 우수하였고, casein과 skim milk도 좋은 효과를 보였으나, 탄소원들은 모두 효소생산성을 상당히 감소시키는 것으로 나타났다. Yeast extract는 0.16%에서 비교적 높은 생산성을 보였으나, 1g 양이온을 제외한 대부분의 무기염은 효소생산성을 증가시키지 못하였다. 이상의 화학적 인자들에 의한 결과를 토대로 casein 1.2%, glucose 0.2%, yeast extract 0.16%, ammonium sulfate 0.1% 조성의 최적배지를 구성하여 생산성을 조사한 결과, pH 9와 20°C 및 42시간의 배양에서 가장 높은 생산성을 보였다.

## 감사의 글

이 연구는 1997년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

1. 貝沼圭二, 佐佐木, 日高秀昌: 食品バイオテクノロジー, 酵素利用の現状と展望, Pp.54-62. 明文書房. 東京(1988).
2. 一島英治: プロテア-ゼと食品加工. In 一島英治(編著), プロテア-ゼ. Pp.291-318. 1983. 學會出版センター. 東京.
3. Priest, F. G.: Enzymes, Extracellular. In J. Lederberg (ed) *Encyclopedia of microbiology*. Vol. 2. Pp.81-93, Academic press. London(1992).
4. 김창화, 진익렬, 유춘발. Alkaline Proteinase를 생산하는 *Yarrowia lipolytica* 504D의 분리동정. 미생물학회지. 심사중(1998).
5. Barnett J. A., R. W. Payne, and D. Yarrow: *Yeasts, Characteristics and identification*, pp.528-725. Cambridge University, Cambridge(1983).
6. 萩原文二, 米谷隆, 赤堀四郎. 酵素研究法, P.237. 第2卷, 朝倉書店, 東京(1956).
7. Rick W. and Wolf-Peter Fritsch: Pepsin, In Bergmeyer H.U.(ed.), *Methods of enzymatic analysis*, Vol. 2, pp.1046-1053. Academic press, New York(1974).
8. Bernfeld P.: Amylase,  $\alpha$  and  $\beta$ . In Colowich S.P. and Kaplan N.O.(ed.), *Method in enzymology*. Vol. 1, P. 149. Academic press, New York(1955).
9. 김창화, 이태형, 유춘발, 진익렬: Extracellular proteinase를 생산하는 효모의 분리동정과 효소의 생산. 한국산업미생물학회지, 24, 452-458(1996).
10. 강국희, 배인휴, 이춘화: *Saccharomycopsis lipolytica*의 균체의 protease에 관한 연구: 효소의 생산조건. 한국산업미생물학회지, 15, 279-285(1987).
11. Ray M. K., K. Uma Devi, G. Seshu Kumar, and S. Shivaji: Extracellular protease from the antarctic yeast *Candida humicola*, *Appl. Env. Microbiol.*, 53, 495-499(1992).
12. Mitsugi K., T. Takami, S. Tobe, M. Kimura, T. Nakase, and K. Komagata: Extracellular production of yeast protease. *Agric. Biol. Chem.* 35, 1633-1635 (1971).
13. Murao S., M. Kamada, T. Nakase, and S. Ogura: 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(1972).