

효모의 세포벽에 대한 Glucanex[®] 200G의 영향

김 광 석 · 장 정 은 · † 윤 현 식

인하대학교 생물공학과

(접수 : 2004. 6. 7., 게재승인 : 2004. 8. 21.)

Effect of Glucanex[®] 200G on Yeast Cell Wall

Kwang Suk Kim, Cung Eun Chang, and Hyun Shik Yunt

Department of Biological Engineering, Incheon 402-751, Korea

(Received : 2004. 6. 7. Accepted : 2004. 8. 21.)

The cell wall of fifteen yeast strains were treated with Glucanex[®] 200G that contained mainly β 1,3-glucanase and some β 1,6-glucanase. In our previous study it was found that the yeasts that are more resistant to Glucanex[®] 200G treatment contained more β -glucan than the yeasts that are less resistant to Glucanex[®] 200G treatment. By measuring the resistance of cell wall to Glucanex[®] 200G, the relative content of β -glucan in yeast cell wall could be estimated. The resistance of cell wall to Glucanex[®] 200G was measured by counting viable cell number after reaction with and without Glucanex[®] 200G. The resistance of fifteen yeast strains to Glucanex[®] 200G were presented.

Key Words : Yeast, cell wall, Glucanex[®] 200G, β -glucan

서 론

나이에 따른 피부의 노화와 스트레스로부터 피부를 보호하여 자연스럽게 건강하며 보기 좋은 피부를 만들기 위한 노력이 계속되어 오고 있다. 최근에는 그 해결방법의 하나로 피부의 기능을 촉진시켜주며 외양을 좋게 하는 생리활성물질을 피부에 공급하는데 많은 관심이 모아지고 있다. 이러한 생리활성물질은 생리작용과 신진대사를 촉진하므로 인체의 노화를 방지하고 탄력 있는 건강한 피부를 유지하기 위하여 제약 및 화장품 산업에서 광범위하게 사용되고 있다.

피부 생리활성물질중의 하나인 β -glucan은 피부 노화 및 자외선으로부터의 손상을 회복시켜주는 중요한 천연화합물이며 귀리, 보리, 밀 및 미생물로부터 얻어진다. 곡물로부터 얻어지는 β -glucan의 D-glucopyranosyl unit는 β -(1→4) 및 β -(1→3) 결합으로 연결되어 있으며 인간의 중요한 영양소로 이용된다. 효모 또는 고등진균류로부터 얻어지는 β -glucan은 주로 선형인 β -(1→3) 결합으로 연결되어 있고 약간의 β -(1→6) 분기가 포함되어 있다. 특히 효모로부터 얻어지는 β -glucan은 효모 세포벽의 가장 풍부한 다당류로서

피부보호기능을 지니고 있는 생리활성물질중의 하나로 널리 알려져 있다. 또한 인체 내에서 macrophage를 활성화시켜 면역시스템을 강화시키는데 중요한 역할을 하는 물질로도 알려져 있으며(1), 경구투여도 가능하지만 피부에 국부투여 되었을 경우, 피부를 다시 젊어지게 하며 자외선으로 인한 피부의 손상을 방지 또는 치료하고 피부의 상처치료에도 크게 효과가 있다고 알려져 있다(2).

효모의 세포벽의 성분 및 구조는 배양액의 조성 및 세포의 성장에 따라 계속 변화한다(3). 일반적으로 효모의 세포벽은 전체 건조중량의 15-25%를 차지하며, 세포벽의 80~90%에 해당하는 다당류와 그 외 소량의 단백질과 지질로 구성되어 있다(4). 세포벽을 구성하는 다당류의 대부분이 glucan, mannan이며 소량의 chitin이 존재한다. 보통 세포벽의 약 50% 정도가 glucan이라고 볼 수 있으며 이는 효모의 species와 strain, 그리고 성장조건이나 세포벽의 준비 또는 분별 방법에 따라 영향을 받는 것으로 알려져 있다(5). 효모의 세포벽의 다당류에 관한 상업적인 관심이 점차적으로 증가하고 있으며 그 중 일부는 식품 가공시 증점제(thickening agent)로, 지방 대체물로 그리고 식이섬유원으로 이용되는데 집중되고 있다(6, 7). 그밖에 관심이 증가하는 응용 예는 효모의 세포벽의 glucan에 의한 면역시스템의 촉진(8), 혈청 콜레스테롤의 감소(9), 그리고 항종양활성(10)과 화장품 분야에의 적용(11)이다.

효모의 세포벽을 β -glucanase로 처리할 경우 그 저항성은 세포벽의 주요 성분인 β -glucan의 양과 관련이 있으며, β

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Incheon 402-751, Korea

Tel : +82-32-860-7517, Fax : +82-32-872-4046

E-mail : hyunshik@inha.ac.kr

-glucanase를 주로 포함하는 Glucanex® 200G로 처리하였을 때 저항성이 높은 효모 균주는 상대적으로 β -glucan 함량이 높았다(12). 본 연구에서는 15 종류의 효모를 Glucanex® 200G로 처리한 후 생균수를 측정하여 상대적인 저항성을 비교하였다.

재료 및 방법

효모는 그 종류에 따라 세포벽에 각기 다른 composition으로 구성되어 있다. 본 연구에서는 여러 가지 종류의 효모를 구입하여 β -glucanase에 대한 저항성을 비교하였다. 본 실험에서는 한국 유전자은행 (KCTC)과 한국 미생물 보존 센터 (KCCM)에서 구입한 15종류의 효모 (*Pichia pastoris* (KCTC 7190), *Debarymyces occidentalis* var. *occidentalis* (KCTC 7196), *Pichia stiptis* (KCTC 7222), *Trigonopsis variabilis* (KCTC 7263), *Pichia jadinii* (KCTC 7293), *Pseudozyma tsukibaensis* (KCTC 7770), *Pachysolen tannophilus* (KCTC 7937), *Saccharomycopsis fibuligera* (KCTC 7939), *Saccharomyces cerevisiae* (KCCM 11304), *Schizosaccharomyces pombe* (KCCM 11527), *Zygosaccharomyces rouxii* (KCCM 12066), *Sporidiobolus ruinenii* (KCCM 34711), *Sporidiobolus pararoseus* (KCCM 50339), *Filibasidium capsuligenum* (KCCM 50499), *Geotrichum candidum* (KCCM 50656))를 이용하여 연구를 수행하였으며 이를 바탕으로 각 균주들을 Glucanex® 200G에 민감한 균주와 저항성을 가진 균주로 분리할 수 있었다. 효모는 shaking incubator (Vison Co., Korea)를 이용하여 200 rpm에서 각 균주의 최적 성장온도에서 배양하였다. Dw medium(13)을 사용하여 late

exponential phase까지 배양한 후 β 1,3-glucanase와 약간의 β 1,6-glucanase를 포함하는 Novozyme사의 Glucanex® 200G를 사용하여 반응시켰다. 효모는 10 mM citrate buffer (pH 5.0)로 2회 세척 후 1 OD₆₀₀의 효모 현탁액을 준비하여 실험을 수행하였다. Glucanex® 200G는 Novozyme사에서 제시한 일반 정량 (0.015 g/L)보다 10배, 100배, 1,000배 높은 농도를 사용하였고, control은 buffer만 포함한 것을 사용하였다. Buffer 또는 Glucanex® 200G로 처리한 균주를 30°C에서 5시간 동안 반응시킨 후 YM agar plate에서 생균수를 측정하였다. 효모의 β -glucanase에 대한 저항성은 control의 생균수와 Glucanex® 200G처리 후 생균수의 비로 정하였다.

결과 및 고찰

효모의 종류에 따라 세포벽의 composition이 다른 것으로 알려져 있으나 이에 대한 체계적인 연구는 아직 이루어지지 않고 있다. 효모 균주 중 많이 알려져 있는 *Saccharomyces cerevisiae*를 비롯하여 한국 유전자은행 (KCTC)과 한국 미생물 보존센터 (KCCM)에서 구입한 15종류의 균주의 β -glucanase에 대한 민감성 (저항성)을 조사하였다. 이전 연구 결과로부터 β -glucan의 함량이 높은 세포는 높은 농도의 β -glucanase 농도에서도 저항성을 가지므로 이를 바탕으로 여러 효모의 세포벽의 상대적인 β -glucan 함량을 추정할 수 있다.

Table 1에 나타난 것처럼 효소농도를 정량보다 100배 높게 처리한 후 생균수와 buffer로만 처리한 후의 생균수의 비율인 V100/T를 %로 환산한 것을 보면 100%에 근접하는 균주와

Table 1. β -Glucanase resistance of various yeast strains

Yeast strains	Control cell count (T) (CFU/ml)	Viable cell count after enzyme treatment			Viable cell count. Control cell count		
		10 fold (V10) (CFU/ml)	100 fold (V100) (CFU/ml)	1000 fold (V1000) (CFU/ml)	V10/T (%)	V100/T (%)	V1000/T (%)
<i>Pichia pastoris</i>	1.50×10^8	5.38×10^7	1.40×10^6		36	0.93	
<i>Debarymyces occidentalis</i> var. <i>occidentalis</i>	1.40×10^7	1.20×10^7	6.90×10^6		86	49.29	
<i>Pichia stiptis</i>	1.40×10^8	6.80×10^7	2.80×10^4		49	0.02	
<i>Trigonopsis variabilis</i>	4.10×10^7	5.60×10^7	6.24×10^7	2.20×10^6	137	152.20	5.37
<i>Pichia jadinii</i>	4.87×10^7	3.03×10^7	6.60×10^4		62	0.14	
<i>Pseudozyma tsukibaensis</i>	1.80×10^7	2.10×10^7	4.40×10^6		117	24.44	
<i>Pachysolen tannophilus</i>	6.50×10^7	6.00×10^7	2.46×10^7	1.00×10^5	92	37.85	
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	3.95×10^7	2.04×10^7	3.98×10^5		52	1.01	0.06
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.50×10^7	2.05×10^7	3.16×10^4		59	0.90	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1.29×10^7	1.47×10^7	1.10×10^6	1.30×10^5	114	8.53	1.01
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1.04×10^7	1.70×10^6	3.30×10^6	7.00×10^4	16	31.73	0.67
<i>Sporidiobolus ruinenii</i>	1.00×10^7	4.00×10^6	5.50×10^6		40	55.00	
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	1.00×10^6	4.00×10^6	1.20×10^6		400	120.00	
<i>Filibasidium capsuligenum</i>	2.30×10^7	2.40×10^7			104	0.00	
<i>Geotrichum candidum</i>	3.20×10^6	2.70×10^6	1.20×10^5	7.00×10^4	84	3.75	2.19

T: control

V10: treated with 10 times concentrated enzyme concentration compared to the normal enzyme concentration

V100: treated with 100 times concentrated enzyme concentration compared to the normal enzyme concentration

V1000: treated with 1,000 times concentrated enzyme concentration compared to the normal enzyme concentration

0%에 근접하는 균주가 있다. 이 비율이 0%에 근접하는 것은 β -glucanase에 비교적 민감한 (β -glucanase sensitive) 균주이며, 100% 이상인 균주는 β -glucanase에 대한 저항성이 비교적 높은 (β -glucanase resistant) 균주이다. 1 OD₆₀₀의 효모 농도를 유지하여 enzyme activity test를 실시하였으며 희석 과정에서 1,000배 농도의 Glucanex[®] 200G를 가한 경우는 colony가 발견이 안 되는 경우도 있으므로 모든 균주의 colony가 발견된 100배 농도의 Glucanex[®] 200G를 가한 경우인 V100/T에서의 비율을 선별 기준으로 삼았으며 V1000/T와 V10/T의 경우는 V100/T에서 유사한 비율을 보인 균주를 비교할 경우 사용하였다.

15개의 균주중 *Trigonopsis variabilis*, *Sporidiobolus pararoseus*는 비교적 높은 저항성을 나타내었으며 *Pichia stiptis*, *Filibasidium capsuligenum*은 낮은 저항성을 나타내었다. Glucanex[®] 200G에 대한 저항성이 β -glucan의 함량과 연관되어 있으므로 *Trigonopsis variabilis*, *Sporidiobolus pararoseus* (V100/T 비율은 각각 152.2, 120)는 *Pichia stiptis*, *Filibasidium capsuligenum* (V100/T 비율은 각각 0.02, 0) 보다 β -glucan의 함량이 높을 것으로 사료된다. 본 실험에 사용된 Glucanex[®] 200G에는 β 1,3-glucanase가 주로 포함되어 있으며 약간의 β 1,6-glucanase도 포함되어 있다. 효모균주 및 배양 조건에 따라 β 1,3-glucan의 함량과 β 1,6-glucan의 함량에 다소 차이는 있을 수 있지만, 매우 높은 농도의 β -glucanase을 가하여 반응을 시켰기 때문에 Glucanex[®] 200G에 대한 저항성은 효모 세포벽 내의 β -glucan의 상대적 함량을 나타낸다고 할 수 있다.

효모의 세포벽을 β -glucanase 처리할 경우 그 저항성은 세포벽의 주요 성분인 β -glucan의 양과 관련이 있으며, 이전 연구 결과(12)에서 β -glucanase를 주로 포함되어있는 Glucanex[®] 200G로 처리하였을 때 저항성이 높을수록 세포벽의 β -glucan의 함량이 높은 것으로 나타났다. 따라서 본 실험 결과 β -glucanase에 비교적 높은 저항성을 보이는 균주인 *Trigonopsis variabilis*, *Sporidiobolus pararoseus*는 낮은 저항성을 보인 *Pichia stiptis*, *Filibasidium capsuligenum*보다 세포벽 내 β -glucan 함량이 높을 것으로 사료된다.

요 약

효모의 종류에 따라 세포벽의 composition이 다른 것으로 알려져 있으나 이에 대한 체계적인 연구는 아직 이루어지지 않고 있다. 본 연구에서는 한국 유전자은행 (KCTC)과 한국 미생물 보존센터 (KCCM)에서 구입한 15종류의 효모를 Glucanex[®] 200G로 처리한 후 생균수를 측정하여 상대적인 저항성을 비교하였다. 그 결과 *Trigonopsis variabilis*나 *Sporidiobolus pararoseus*는 β -glucanase에 대한 저항성이 높았으며 *Pichia stiptis*나 *Filibasidium capsuligenum*은 β -glucanase에 대한 저항성이 낮았다. β -glucan의 함량이 높은 세포는 높은 농도의 β -glucanase 농도에서도 저항성을 가지므로 이를 바탕으로 여러 효모의 세포벽의 상대적인 β -glucan 함량을 추정할 수 있다.

감 사

본 연구는 한국과학재단의 2002-2003 목적기초연구사업 지역대학우수과학자 지원연구 (과제번호: R05-2002-000-01073-0)의 지원으로 이루어 졌으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Adachi, T., N. Ohno, M. Ohsawa, S. Okinawa, and T. Yacomae (1990), Macrophage activation *in vitro* by chemically cross-linked β -(1 \rightarrow 3)-glucans, *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 988-992.
- Whistler, R. L., A., Bushway, P. P. Singh, W. Nakahara, and R. Tokuzen (1978), Noncytotoxic, antitumor polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **32**, 235-275.
- Klis, F. M. (1994), Cell wall assembly in yeast, *Yeast* **10**, 851-869.
- Fleet, G. H. (1991), Cell walls, *The Yeast*, **4**, A. H. Rose and J. S. Harrison, Eds., 199-277, Academic Press, London.
- Masako, O. (1998), The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation, *Micron*. **29**, 207-223.
- Dziezak, J. D. (1987), Yeasts and yeast derivatives, *Appl. Food Technol.* **41**, 122-125.
- Seeley, R. D. (1977), Fractionation and utilization of baker's yeasts, *NBAA Tech. Q.* **14**, 35-39.
- Jamas, S., J. Easson, D. Davidson, and G. R. Ostroff (1996), US patent 5,532,223
- Robbins, E. A. and R. D. Seeley (1977), Cholesterol lowering effect of dietary yeast and yeast fractions, *J. Food. Sci.* **42**, 694-698.
- Bohn, J. A. and J. N. Be Miller (1995), (1 \rightarrow 3)-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships, *Carbohydr. Polym.* **28**, 3-14.
- Donzis, R. A. (1996), US Patent 5,576,015
- Kim, K. S., J. E. Chang, and H. S. Yun (2004), Estimation of soluble β -glucan content of yeast cell wall by the sensitivity to Glucanex 200G treatment, *Enzyme Microbial Technol.* **35**, 672-677.
- Fiechter, A., G. F. Fuhrmann, and O. Kappeli (1981), Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells, *Advances in Microbial Physiology* **22**, A. H. Rose and J. G. Morris, Eds., 123-183, Academic Press, New York.