

Yarrowia lipolytica 504D의 Alkaline Proteinase 특성

김창화^{1,2} · 진익렬¹ · 유춘발^{2*}

¹경북대학교 미생물학과, ²대구대학교 식품공학과

Yarrowia lipolytica 504D가 생산하는 alkaline proteinase를 정제한 결과, 분자량은 32,000으로 나타났고, pH 9.5와 42°C에서 최적활성을 보였으며, pH 4-10의 범위와 45°C까지 비교적 안정한 것으로 나타났다. PMSF를 비롯하여 EDTA, EGTA, phenanthroline도 효소활성을 저해하여 정제효소가 serine proteinase인지 metal proteinase인지 불확실하였다. 그러나 28% 활성증가를 보인 Cu²⁺ 외에 Zn²⁺를 비롯한 대부분의 무기염들이 효소활성을 증가시키지 못하였고, 또한 EDTA의 첨가로 불활성화된 효소도 Ca²⁺ 염의 첨가로 활성이 복원되었다. 따라서 정제효소는 serine proteinase(E.C. 3.4.21.14)로 추정되었다.

KEY WORDS □ alkaline protease, yeast, *Yarrowia lipolytica*

Protease는 동식물을 비롯한 모든 생명체에 존재한다. Protease의 분류에는 많은 기준들이 제시되었는데 초기에는 분자량, 전하, 단백질 분해특성 등에 따라 분류(1)하기도 하였고, 효소의 작용 pH에 따라 분류(2)하기도 하였으나, 1960년 Hartley(3)가 활성부위의 아미노산의 조성에 따라 serine protease, cysteine protease, aspartic protease, metal protease의 4가지로 분류한 것이 오늘날 protease 명명법의 토대가 되었다(4). 미생물의 alkaline(serine) protease는 1973년 Horikoshi(5)가 *Bacillus* sp. No. 221(ATCC 21522)에서 분리 보고하여 처음으로 알려졌다. 현재 가장 대표적이라 할 수 있는 미생물성 alkaline proteinase는 *B. subtilis*가 생산하는 subtilisin이다(6). 효모의 alkaline proteinase는 Mitsugi 등(7)이 *Candida lipolytica*로부터 부분정제하여 보고한 이래로 아직까지 다른 종이나 다른 속의 효모에서 생산되었다는 보고는 없다. 그러나 효모는 세균이나 곰팡이에 비하여 비교적 위생학적 안전성이 높은 편이어서 효모 유래의 alkaline proteinase는 장유가공이나 아미노산 제조 등 다양한 식품공정에 효과적으로 이용할 수 있을 것이다(4). 그래서 본 연구에서는 새우젓으로부터 분리한 효모 *Y. lipolytica* 504D(8)의 alkaline proteinase에 대한 정제 및 정제효소의 특성에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양

새우젓으로부터 분리한 효모 *Yarrowia lipolytica* 504D를 사용하였다(8). 효소생산을 위한 배양은 1.2% casein, 0.2% glucose, 0.1% ammonium sulfate, 0.05% casamino acid, 0.16% yeast extract(pH 9.5) 조성의 배지 0.6 l를 5 l 삼각플라스크에 넣고 접종한 다음, 20°C에서 1분당 120 stroke의 조건으로 42시간 동안 진탕배양하였다.

Alkaline proteinase의 활성도 분석

Alkaline proteinase의 활성도는 Hammarsten casein으로부터 가수분해되어 유리되는 tyrosine에 상응하는 아미노산의 양을 275 nm로 정량하였다(9). 즉 0.6% Hammarsten casein 500 µl와 효소희석액 50 µl를 혼합한 반응액을 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 정지시킨 후, 잔류 casein을 제거시키기 위하여 45°C에서 20분간 침전물을 숙성시켰다. 이것을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 275 nm에서 흡광도를 측정하여 효소활성도로 하였다. 효소활성도(Unit)는 상기의 조건에서 1분 동안에 Hammarsten casein으로부터 1 µg의 tyrosine에 상응하는 아미노산을 생성하는 효소의 양으로 하였다.

단백질의 정량

Column chromatography에서 각 분획의 단백질의 함량은 275 nm의 흡광도로 정량하였고(9), 배양액과 조효소 염석액 등의 단백질 함량은 Lowry 등의 방법 (10)에 따라 정량하였으며, 표준단백질로는 bovine serum albumin(BSA)을 사용하였다.

정제를 위한 배양액의 전처리

잔류 casein의 분해

배양액에 잔류하는 미분해 casein을 배양액중의 proteinase로 분해하여 제거하고자 배양 상등액을 40°C에서 1시간 이상 방치하였다.

염석특성 조사

Eppendorf tube에 0.5 ml의 배양 상등액을 넣고, 1 ml에 상응하는 다양한 포화도의 ammonium sulfate를 첨가한 다음, 증류수로 총량이 1 ml가 되게 보충하고 진탕하여 완전히 녹였다. 이것을 냉장고에 1시간 동안 방치하고 원심분리하여 상등액에 잔존하는 효소활성을 측정하였다.

투석 및 ultrafiltration

염석하여 회수한 침전물을 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH

*To whom correspondence should be addressed

8.73)으로 투석하였다. 그 다음 투석액을 XM50 filter(Amicon)로 한외여과(ultrafiltration)후 여과액을 회수하고, 다시 PM 10 filter로 한외여과후 농축액을 회수하여 정제를 위한 조효소액으로 사용하였다.

Column chromatography

전처리하여 얻은 조효소액을 Bio-Rad사의 Econo System을 이용하여 Sephadex G-75 gel filtration(1×100 cm, 9.3 ml/h, 2 ml/fraction, 15 mM Tris-HCl, pH 8.73), DEAE-Sephacel ion exchanger chromatography(1.5×38 cm, 12 ml/h, 3 ml/fraction, 10 mM Tris-HCl, pH 8.73), Sephadex G-50 gel filtration(1×100 cm, 13.6 ml/h, 2 ml/fraction, 10 mM Tris-HCl, pH 8.73)으로 정제하였고, 최종적으로 FPLC(Bio-Logic Workstation System, Bio-Rad)를 이용하여 Q2-anion column(1×5 cm, 1 ml/h, 1 ml/fraction, 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.73)으로 정제하였다.

효소의 순도 및 분자량의 확인

Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Laemmli 등의 방법(11)에 따라 진행하였다. Gel은 0.5% SDS가 포함된 8% polyacrylamide gel을 사용하였고, 전기영동후 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하였으며, 1 l의 10% acetic acid-10% methanol 조성의 용액으로 40℃에서 1시간 동안 30 strokes/min으로 진탕하면서 탈색하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

전처리

배양액 600 ml를 원심분리하여 약 530 ml의 상등액을 회수하였다. 이때 상등액에 존재하는 효소단백질의 ammonium sulfate에 의한 염색특성을 조사한 결과, 45-52.5% 포화도 범위에서 아주 선택적으로 침전되는 것으로 나타났다(Fig. 1). 그래서 배양상등액 500 ml를 45% 포화도의 염으로 1차 염색후 원심분리하여 상등액을 회수한 다음, 52.5% 포화도에 상응하는 염의 추가로 2차 염색하여 원심분리 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물은 다시 투석하여 조효소액 33 ml를 얻었으며, 이것을 XM50과 PM10 filter를 이용한 2단계 한외여과로 농축하여 정제에 사용하였다.

Column chromatography

농축한 조효소액을 Sephadex G-75 gel filtration에서 효소

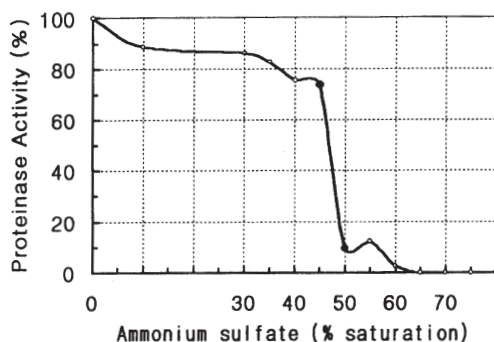


Fig. 1. Profile of salting-out by the saturation of ammonium sulfate.

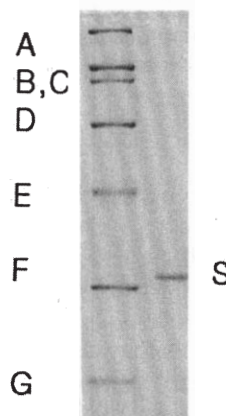


Fig. 2. SDS PAGE.

A: Myosin 200,000; B: β -galactosidase 116,400; C: phosphorylase b 97,400; D: serum albumin 66,200; E: ovalbumin 45,000; F: carbonic anhydrase 31,000; G: trypsin inhibitor 21,500; S: the purified samples.

활성 분획 9-20번을 회수하였고, DEAE-sephacel ion exchanger에서 NaCl의 3단계 농도구배(0-50 mM, 50-150 mM, 150-250 mM)로 용출시켜 활성분획 61-66번을 회수하였으며, Sephadex G-50 gel filtration하여 활성분획 26-29번을 회수하였다. 회수한 용액을 다시 FPLC의 Q-column으로 정제하여 SDS-PAGE로 순도를 조사한 결과는 단일밴드로 나타나 순수하게 정제된 것으로 사료되었으며(Fig. 2), 수율은 14.6%로 15.1배 정제되었다(Table 1).

Table 1. Summary of purification steps

Steps	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (Unit)	Specific activity (Unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture	500	2,131.0	45,800	21.5	1.0	100.0
Ammonium sulfate	33	923.0	31,200	33.8	1.6	68.1
Sephadex G-75	36	281.8	25,860	92.0	4.3	56.5
DEAE-Sephacel	21	77.6	17,900	230.7	10.7	39.0
Sephadex G-50	8	29.6	8,160	275.6	12.8	17.8
FPLC with Q2	16	21.7	6,840	315.2	14.6	15.1

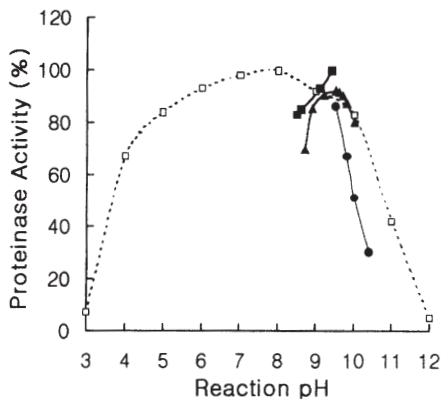


Fig. 3. Effect of pH of the purified proteinase. Activities in 0.1 M Tris-HCl buffer (■), 0.1 M ammonia buffer (▲), and 0.1 M glycine buffer (●); Stability (□).

정제효소의 특성

효소 분자량

SDS-PAGE에 의한 분자량 측정 결과(Fig. 2), 32,000 정도로 나타남에 따라 North(12)가 대부분의 fungal serine proteinase는 18,500-35,000 범위의 저분자량이라고 언급한 사실과 일치하였다. 이러한 결과는 *Y. lipolytica* TH65의 alkaline proteinase(13)가 31,500, *S. lipolytica* CX161-1B(현재 *Y. lipolytica*로 재명명)의 alkaline protease(14)가 27,000-30,000이라는 보고와 유사하였으나, *S. lipolytica* 37-1의 neutral protease(15)가 38,500, *S. lipolytica* CX161-1B의 acid protease(16) I 28,000, II 32,000, III 36,000이라는 보고와는 다른 것으로 나타났다.

pH의 영향

최적 pH를 조사한 결과, pH 9-9.5에서 최적활성을 보여 본 효소가 생산하는 효소는 alkaline proteinase임을 알 수 있었다(Fig. 3). 이러한 결과는 *Y. lipolytica* TH65의 alkaline proteinase(13)가 8.5-9, *Candida olea* 148(현재 *Y. lipolytica*

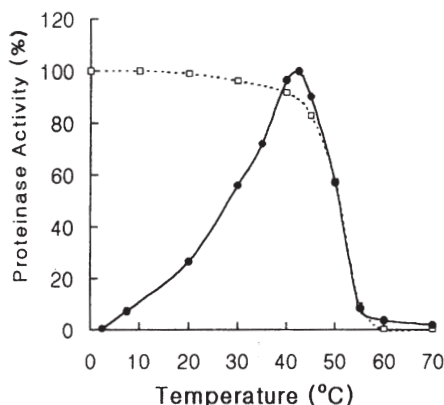


Fig. 4. Effect of temperature. Activity (●) and stability (□).

로 재명명)의 alkaline protease(17)가 pH 8-9, *S. lipolytica* CX161-1B의 alkaline protease(14)가 pH 9-10에서 최적활성을 보인 결과와 유사하였다. 또한 pH 안정성을 조사한 결과, pH 4-10의 비교적 넓은 범위에서 대체로 안정하였다(Fig. 3).

온도의 영향

정제효소의 최적온도를 조사한 결과는 42°C에서 최적활성을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 4). *Y. lipolytica* TH65의 alkaline proteinase(13)가 40°C, *S. lipolytica* CX161-1B의 alkaline protease(14)가 40°C, *S. lipolytica* CX161-1B의 acid protease(16)가 42°C, *C. olea* 148의 alkaline protease(17)가 40°C에서 최적활성을 보인 것으로 보고되어 본 효소와 유사하였으나, *Rhodotulula glutinis* K-24의 acid protease(18)가 60°C에서 최적활성을 나타낸 결과와는 차이를 보였다.

온도안정성을 조사하기 위하여 10-60°C에서 1시간 동안 방치한 효소액의 잔존활성을 측정된 결과, 45°C까지 비교적 안정한 것으로 나타났으나, 50°C 이상에서는 활성이 급격히 감소하였다(Fig. 4).

무기염과 저해제의 영향

정제효소의 2가 무기염에 대한 반응을 조사한 결과, Cu^{2+} 를 제외한 대부분의 금속이 효소활성에 아무런 영향을 주지 못하는 것으로 관찰되었다(Table 2). Zn^{2+} 는 효소활성을 감소시키는 것으로 나타났고, 일반적으로 proteinase의 안정성에 관여하는 것으로 알려진 Ca^{2+} 은 아무런 영향을 주지 않았으며, 또한 Cu^{2+} 는 단지 28%의 활성증가만을 보였다. 이러한 결과는 *C. olea* 148의 alkaline protease(17)가 Ca^{2+} 에 의해서, *S. lipolytica* 37-1의 neutral protease(15)가 Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} 에 의해서 활성이 증가된다는 보고와 많은 차이를 보였다.

Table 2. Effect of mineral salts and inhibitors on the activity of the alkaline proteinase

Minerals and inhibitors (1 mM)	Relative activity (%)
Control	100
CaCl_2	99
CuCl_2	128
FeCl_2	83
MgCl_2	92
MnCl_2	85
ZnCl_2	60
PCMB	99
PMSF	2
DTT	102
β -Mercaptoethanol	106
Phenanthroline	1
EDTA	2
EDTA with 5 mM Ca	17
EGTA	1

* All enzymes were preincubated with inhibitors for 30 min at 25°C, and the enzyme treated with EDTA was preincubated again after the addition of Ca salt for 30 min.

*DTT: Dithiothreitol, PMSF: Phenylmethylsulphonyl fluoride, EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, EGTA: Ethyleneglycol-bis (β -amino ethylether) N,N,N',N'-tetraacetic acid.

*Concentrated solutions of inhibitors were prepared in propanol for PMSF and ethanol for phenanthroline.

정제효소의 저해제에 대한 영향을 조사한 결과, dithiothreitol(DTT)에 의해 저해되지 않는 것으로 보아서 활성부위에 thiol 그룹은 없고, phenylmethylsulphonyl fluoride(PMSF)에 의해 저해되는 것으로 보아서 serine 잔기의 존재를 추정할 수 있었다(Table 2). 그러나 metal chelator로서 EDTA, EGTA, phenanthroline이 효소를 완전히 실패시킴으로써 활성부위에 metal이 존재할 가능성도 시사하였다. 그래서 EDTA를 처리한 효소액에 다시 Ca^{2+} 를 첨가하여 반응시킨 결과는 17%의 활성복원율을 보이는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 이미 Ogrydziak 등(14)과 유 등(13)도 보고한 바 있으나 아직 그 기작은 밝혀져 있지 않은 상태이며, 앞으로 더 연구해 볼 필요성이 있을 것으로 생각된다.

정제효소의 저해특성에 따른 고찰

정제효소의 무기염과 저해제의 영향에 대한 실험결과를 종합적으로 검토하여 보았다. EDTA, EGTA, phenanthroline은 효소활성을 저해하여 metallo-proteinase의 가능성을 시사하였으나 EDTA가 첨가된 반응액에 Ca^{2+} 의 첨가로 활성이 복원되었고, 또한 Cu^{2+} 를 제외한 대부분의 금속이 효소활성을 저해하였으며, 특히 일반적인 metallo-proteinase의 주성분으로 알려진 Zn^{2+} 에 의해서도 40%의 저해현상을 보였다. 한편 정제효소는 serine proteinase임을 시사하는 PMSF에 의해서 완전한 저해를 받았는데, 효소 활성부위에 serine 잔기가 존재할 경우 serine 잔기의 활성화를 위하여 알칼리 pH가 요구된다. 그런데 이미 Fig. 3에서 정제효소의 최적 pH가 9-9.5의 알칼리 영역이라고 언급한 바 있으므로 효소 활성부위에 serine 잔기가 있는 것으로 보여진다. 따라서 이상의 결과로부터 우리는 본 효소가 생산하는 extracellular alkaline proteinase를 serine proteinase(E.C. 3.2.21.14)로 추정하였다.

참고문헌

1. Neurath, H. 1989. The diversity of proteolytic enzymes, p. 1-13. In R.J. Beynon and J.S. Bond (ed.), *Proteolytic enzymes, a practical approach*. IRL press, Oxford.
2. Nunokawa, Y., Y. Namba, and S. Watanabe. 1961. A study of the rice Koji protease. *J. Soc. Brew.* **53**, 930-933.
3. Hartley, B.S. 1960. *Annu. Rev. Biochem.* **29**, 45-72.
4. 一島英治. 1983. 프로테아제 연구小史, p. 1-12. In 一島英治 (編著), 프로테아제. 學會出版センター. 東京.
5. Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms: Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* No. 221. *Agric. Biol. Chem.* **35**, 1407-1414.
6. Hamamoto, T. and K. Horikoshi. 1992. Alkaliphiles. p. 81-87. In J. Lederberg (ed.), *Encyclopedia of microbiology*. Vol. 1. Academic press, London.
7. Mitsugi, K., T. Takami, S. Tobe, M. Kimura, T. Nakase, and K. Komagata. 1971. Extracellular production of yeast protease. *Agric. Biol. Chem.* **35**, 1633-1635.
8. 김창화, 진익렬, 유춘발. 1998. Alkaline Proteinase를 생산하는 *Yarrowia lipolytica* 504D의 분리 동정. 미생물학회지 **34**, 75-81.
9. Rick, W. and Wolf-Peter Fritsch. 1974. Pepsin, p. 1046-1053. In Bergmeyer H.U. (ed), *Methods of enzymatic analysis*, Vol. 2. Academic press, New York.
10. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
11. Smith, B.J. 1984. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, p. 41-55. In J.M. Walkek (ed), *Methods in molecular biology*, Vol. 1. Humana Press, New Jersey.
12. North, M.J. 1982. Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. *Microbiological reviews* **46**, 308-313.
13. 유춘발, 김창화, 진영호, 진익렬. 1996. *Yarrowia lipolytica* TH65가 생산하는 alkaline proteinase의 정제 및 특성. 한국산업미생물학회지 **24**, 316-320.
14. Ogrydziak, D.M. and S.J. Scharf. 1982. Alkaline extracellular protease produced by *Saccharomycopsis lipolytica*. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 1225-1234.
15. Abdelal, A.T.H., E.H. Kennedy, and D.G. Ahearn. 1977. Purification and characterization of a neutral protease from *Saccharomycopsis lipolytica*. *J. Bacteriol.* **130**, 1125-1129.
16. Yamada, T. and D.M. Ogrydziak. 1983. Extracellular acid proteases produced by *Saccharomycopsis lipolytica*. *J. Bacteriol.* **154**, 23-31.
17. Nelson, G. and T.W. Young. 1987. Extracellular acid and alkaline proteases from *Candida olea*. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 1461-1469.
18. Kamada, M., K. Maeyama, T. Koyama, and S. Murao. 1972. Studies on the extracellular protease of yeasts: II. Distribution of extracellular protease producing yeasts. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **46**, 171-175.

(Received May 20, 1998/Accepted August 21, 1998)

ABSTRACT: An alkaline proteinase produced by *Yarrowia lipolytica* 504D

Kim Chang-Hwa^{1,2}, Ingyol Jin¹ and Choon-Bal Yu^{2*} (¹Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea, ²Department of Food Science and Technology, Taegu University, Kyungsan 712-710, Korea)

An alkaline proteinase secreted from *Yarrowia lipolytica* 504D was purified by salting-out and column chromatography. The molecular weight of the purified enzyme was about 32,000 Da estimated by SDS-PAGE. The optimal condition for the activity of the enzyme was at pH 9.5 and 42°C. The enzyme was stable up to 45°C and at the range of pH 4-10. Because the enzyme was inhibited by PMSF as well as EDTA, EGTA, and phenanthroline, it is uncertain whether the enzyme is serine proteinase or metalloproteinase. However, almost all metal salts tested did not increase the enzyme activity, and Ca salt restored the activity of the enzyme inactivated by EDTA. Therefore, the purified enzyme seems to be an serine proteinase (E.C. 3.4.21.14).