

RESEARCH ARTICLE

비병원성 야생효모 *Candida oleophila* WP5-19-1로부터 장내유용세균 유해 효소 β -glucuronidase 저해제의 생산 및 특성

박선정, 이종수*
배재대학교 바이오의약학부

Production and Characterization of the Beneficial β -glucuronidase Inhibitor from non pathogenic wild yeast, *Candida oleophila* WP5-19-1, and its effects on gut microbes

Seon-Jeong Park, and Jong-Soo Lee*

Department of Biomedicine and Biotechnology, Paichai University, Daejeon 35345, Korea.

*Corresponding author: biotech8@pcu.ac.kr

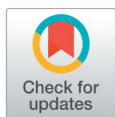
ABSTRACT

We aimed to produce a potent β -glucuronidase inhibitor from wild yeast that could inactivate toxic substances in the colon. Culture supernatants and cell-free extracts of non-pathogenic wild yeasts were prepared and their β -glucuronidase inhibitory activities were measured. Cell-free extract from *Candida oleophila* WP5-19-1 showed the highest β -glucuronidase inhibitory activity (49.0%). The β -glucuronidase inhibitor was maximally produced (IC_{50} value; 8.4 mg) when *C. oleophila* WP5-19-1 was cultured in potato dextrose medium containing 5% dextrose (initial pH; 6.0) at 30°C for 24 hours. β -glucuronidase inhibitor of *C. oleophila* WP5-19-1 was partially purified by trypsin hydrolysis, ultrafiltration (3 kDa), and Sephadex G-50 filtration. The partially purified β -glucuronidase inhibitor was stable from 30°C to 60°C and at pH 6.0 9.0, and showed residual inhibitory activity of about 80%.

Keywords: β -glucuronidase inhibitor, *Candida oleophila* WP5-19-1, Non-pathogenic wild yeast, Partial purification, Probiotics

서론

최근, 국민들의 건강에 대한 관심이 크게 증가하고 특히 장내 유익균만의 대량 분포를 위해 프로바이오틱스를 복용하거나, 장 건강을 증진시키는 새로운 생리기능성 물질의 개발 등의 다양한 연구가 진행되고 있다[1-3]. 대체로 장내 유해세균들은 β -glucosidase, β -glucuronidase, tryptophanase, azoreductase, nitroreductase 등의 활성이 높아지면 아민류, 독성물질, 변이원 등을 생성하고, 이들이 장점막에 손상을 주어 대장암을 일으키거나, 장관내로 흡수된 유독 물질들이 체내를 순환하면서



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2022 March, 50(1): 31-40
<https://doi.org/10.4489/KJM.20220002>

Received: January 27, 2022

Revised: February 21, 2022

Accepted: January 22, 2022

© 2022 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.

암 유발, 면역기능 저하 등의 다양한 질병의 원인이 된다[4].

β -Glucuronidase (EC 3.2.1.31)는 glucuronic acid의 β -1탄소에 비당체가 결합한 glucuronide unit를 가수분해하는 효소로 다양한 미생물[5]에서 생성되고 동물에서는 주로 간장과 신장에 분포하고 있다. 이 효소는 간에서 benzopyrene 등의 발암물질이 glucuronic acid conjugate로 무독화 되어 장으로 보내졌을 때 이 결합을 끊어 발암성을 나타내게 한다[6]. N-Hydroxy-N-2-fluorenylacetylacetamide와 diethylstilbesterol을 포함한 많은 발암 물질은 장에 결합된 glucuronide의 가수 분해에 의해 활성화된다. Xenobiotics는 살아있는 생명체에 이질적인 분자로 해독 과정에서 간에서 UDP-D-glucuronic acid와 결합되며 다시 β -D-glucuronide는 소장과 신장을 통해 배설된다. 그러나 소장의 β -glucuronidase는 이들 접합체를 가수 분해하고 탈리된 xenobiotics는 소장 벽을 통해 흡수되어 간으로 되돌아간다. β -glucuronidase는 최종 대사 산물로 소변과 대변을 통해 배설되기 때문에 xenobiotics의 배설에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 장내 세균에 의해 생성된 β -glucuronidase는 glucuronide를 가수 분해하여 장내 독성을 띠며 재 흡수를 통해 xenobiotics의 배설을 감소시킨다[7].

따라서 대장암 발병을 억제하기 위한 방법의 일환으로 대장에서의 발암원을 생성하는 β -glucuronidase에 대한 저해물질의 개발과 β -glucuronidase가 장내의 높은 pH에 의해 유도되므로 장내 pH를 낮추어 이 효소 활성을 저하시키는 방법 등이 알려져 있다.

그러나, 지금까지 β -glucuronidase 저해물질 생산연구는 한방식품[4], 버섯[8], 뽕나무 등의 flavonoid류[9,10]와 해조류[7] 등에서 β -glucuronidase 저해활성이 보고되어 있을 뿐 이들 저해물질의 대량생산을 위한 체계적인 생산조건의 최적화 연구 등은 실시되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 대부분이 비병원성이면서 배양이 용이하고 각종 유용 대사산물을 많이 생산하는 것으로 알려진 효모로부터[11-21] 대장암 발병 억제를 위한 β -glucuronidase 저해물질을 생산하여 이를 의약이나 건강소재산업에 응용하고자 실시되었다. 먼저 대전광역시 월평공원 주변의 토양 등으로부터 분리된 야생 효모들 중 비병원성 효모들을 선별하여 이들의 β -glucuronidase 저해 활성을 측정하여 우수 야생 효모를 선발하였다. 또한 이들의 β -glucuronidase 저해물질의 생산 조건을 검토하였고 한외여과와 Sephadex G-50 여과 등으로 β -glucuronidase저해물질을 부분 정제하여 몇 가지 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

야생 효모와 배지 및 시약

실험에 사용한 야생 효모들은 필자 등이 대전광역시 월평공원에서 분리, 동정하여 보관중인 133균주들 중 전보[22]와 같이 비병원성 효모들만 선별하여 사용하였다. 배지로는 Becton and Dickinson 사(BD Difco, Sparks, MD, USA) 제품의 yeast extract-peptone-dextrose (YPD), yeast extract-malt extract (YM), potato dextrose (PD) 등을 사용하였다. β -glucuronidase 저해활성 측정에는 Sigma 사(St. Louis, Mo, USA)제품의 β -glucuronidase (대장균 생산)와 p -nitrophenyl-D-glucuronide를 사용하였다. 기타, 완충용액 제조 등에는 분석용 특급 시약들을 사용하였다.

배양 상등액과 무세포 추출물들의 β -glucuronidase 저해활성 측정

비병원성 야생 효모들을 YPD 배지에 접종하여 30°C에서 48시간 배양한 후 8,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 배양 상등액과 균체물들을 얻었다. 균체물들을 다시 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 8.3)에 현탁 시킨 후 초음파 균체파쇄기(Vibra Cell; Sonics & Materials, Newtown, CT, USA)로 파쇄하고 12,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 무세포 추출물을 제조하였고 아래와 같이 이들 배양 상등액과 무세포 추출물들의 β -glucuronidase 저해활성을 측정하였다[4,7].

β -Glucuronidase 저해활성은 위와 같이 제조한 야생효모 무세포 추출물과 세포배양 상등액 [16] 시료 각각 100 μ L에 0.1M 인산완충용액 (pH 7.0) 280 μ L와 10 mM p-nitrophenyl-D-glucuronide 20 μ L, β -glucuronidase (0.4 unit/mL) 100 μ L를 혼합 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 여기에 0.25N NaOH 500 μ L를 가하여 반응을 정지시킨 후 원심분리(2,000 rpm, 10 min)하여 얻은 상등액의 흡광도를 405 nm에서 측정하여 다음과 같이 저해활성을 계산하였다[4].

$$\beta\text{-Glucuronidase 저해활성 (\%)} = \frac{C - (T - B)}{C} \times 100$$

(C, 대조구의 흡광도; T, 시료구의 흡광도; B, 시료구의 blank의 흡광도)

β -Glucuronidase 저해물질의 부분정제 및 특성

β -Glucuronidase 저해물질의 산업적 응용성을 검토하기 위하여 아래와 같이 부분 정제하여 작용온도와 pH 및 이들의 안정성 등을 조사하였다. 먼저 선별된 효모의 무세포추출물에 각각 1% (w/v) protease E (55°C), pepsin (37°C), trypsin (25°C), α -amylase, β -amylase (37°C)를 첨가하여 각각 반응시킨 후[23] β -glucuronidase 저해활성을 측정하였다. 효소 처리 후 얻은 활성 가수분해물을 3 kDa부터 30 kDa 이하까지 한외여과(Amicon Ultra, Millipore, Carrigtwohill Co., Cork, Ireland)를 실시한 후 각 분획별로 β -glucuronidase 저해활성을 측정하였다. 한외여과액 중 β -glucuronidase 저해활성이 우수한 분획물을 모아 Sephadex G-50 컬럼에서 0.5 mL/min의 유속으로 2 mL씩 분취한 후 각각에 대하여 280 nm와 β -glucuronidase 저해활성을 측정하여 얻은 활성 분획들을 최종 부분 정제물로 하였다.

위와 같이 얻은 부분정제물의 저해 작용 최적 온도와 pH를 조사하기 위하여 부분정제물을 20-70°C에서 작용 최적 온도를 조사하였고 부분정제물질들을 pH 4.0-pH 9.0까지 각각의 pH의 완충용액에 녹인 다음 이들의 최적 작용 pH를 조사하였다. 또한 이들 온도와 pH에서 30분씩 각각 처리한 후 잔존 저해활성을 측정하여 열과 pH 안정성을 조사하였다. 또한 Mg^{2+} 등의 각종 중금속이온들과 포도당 등 당류들에 저해활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 이들을 농도별로 처리하여 위와 같이 잔존 β -glucuronidase 저해활성을 측정하였다.

통계분석

모든 시료의 분석은 3번 반복 수행되었다. Microsoft Office Excel 2007 program (Microsoft, Seattle, WA, USA)을 사용하여 Mean $\pm$ SD 값으로 표시하였고, 각 그룹 간의 유의성을 검증하기 위하여 one-way ANOVA 분석으로 $p < 0.02$ 수준에서 유의성을 검증하였다[24,25].

결과 및 고찰

β-Glucuronidase 저해활성 우수 균주의 선발

대전광역시 월평공원 내원사와 연자산, 갑천 누리길 등으로부터 분리한 야생효모 133균주들 중 선별된 비병원성 야생효모 125균주들의 배양 상등액과 이들의 무세포 추출물들에 대하여 β-glucuronidase 저해활성을 측정한 결과 59균주들이 저해활성을 보였다(Table 1).

Table 1. β-Glucuronidase inhibitory activities of non-pathogenic wild yeasts from in Wolpyeong park in Daejeon city, Korea.

No.	Putative species	Isolated No.	β-Glucuronidase inhibitory activity (%)		Remarks ^a
			Intracellular	Extracellular	
1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	HP-29-1	10.8±1.5 ^b	n.d ^c	General yeasts
2	<i>Candida bracarensis</i>	WP35-1	5.6±0.3	n.d	General yeasts
3	<i>Candida humilis</i>	WP4-70-1	7.6±0.1	5.8±0.2	General yeasts
4	<i>Candida oleophila</i>	WP5-19-1	49.0±1.3	n.d	General yeasts
5	<i>Candida sake</i>	HP-13-2	10.0±0.8	n.d	General yeasts
6	<i>Cryptococcus taibaiensis</i>	HP-9-3	16.4±1.5	n.d	General yeasts
7	<i>Hannaella oryzae</i>	HP-15-3	15.7±1.5	n.d	General yeasts
8	<i>Holtermanniella takashimae</i>	HP-25-1	13.9±2.3	n.d	General yeasts
9	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	WP14-7	35.4±0.2	n.d	General yeasts
10	<i>Kazachstania gamospora</i>	WP9-1	27.7±0.7	n.d	General yeasts
11	<i>Metschnikowia koreensis</i>	WP5-37-2	11.8±1.7	1.0±0.2	General yeasts
12	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	H-30-3	10.8±0.7	n.d	General yeasts
13	<i>Microbotryozyma collariae</i>	WP5-21-3	13.4±1.7	n.d	General yeasts
14	<i>Rhodospiridium fluviale</i>	WP4-59-1	5.3±0.1	9.1±0.5	General yeasts
15	<i>Rhodotorula glutinis</i>	HP-17-5	6.4±0.9	n.d	General yeasts
16	<i>Rhodotorula nothofagi</i>	WP5-19-3	2.9±1.0	11.4±0.8	General yeasts
17	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	WP5-3	n.d	5.8±0.2	General yeasts
18	<i>Saturnispora diversa</i>	WP4-66-1	5.3±0.6	n.d	General yeasts
19	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	WP4-54-1	23.6±1.9	n.d	General yeasts
20	<i>Sporobolomyces phaffii</i>	WP33-5	1.0±0.1	n.d	General yeasts
21	<i>Tetrapisispora iriomotensis</i>	WP5-14-1	20.0±2.0	n.d	General yeasts
22	<i>Tetrapisispora namnaensis</i>	WP5-6-1	17.1±1.5	n.d	General yeasts
23	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	WP48-2	9.0±0.1	n.d	General yeasts
24	<i>Tricholoma matsutake</i>	H-30-1	6.2±0.1	n.d	General yeasts
25	<i>Candida metapsilosis</i>	HO9-1	6.8±0.7	n.d	Thermo-tolerant yeasts
26	<i>Candida pseudolambica</i>	HWP33-1	n.d	9.5±0.8	Thermo-tolerant yeasts
27	<i>Cutaneotrichosporon mucoides</i>	HDM13-1	n.d	9.3±0.5	Thermo-tolerant yeasts
28	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	HG11-1	10.0±0.2	n.d	Thermo-tolerant yeasts
29	<i>Issatchenkia terricola</i>	HWP5-36-3	9.6±1.0	n.d	Thermo-tolerant yeasts
30	<i>Kazachstania unispora</i>	HMH13-1	2.4±0.5	n.d	Thermo-tolerant yeasts
31	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	HH7-1	11.4±1.5	n.d	Thermo-tolerant yeasts
32	<i>Pichia guilliermondii</i>	HWP5-19-1	16.2±0.5	1.8±0.2	Thermo-tolerant yeasts
33	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HY1-1	n.d	5.8±0.1	Thermo-tolerant yeasts
34	<i>Schwanniomyces vanrijiae</i>	HHP8-1	10.8±0.5	n.d	Thermo-tolerant yeasts
35	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	HO9-3	6.5±0.5	n.d	Thermo-tolerant yeasts
36	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	HWP5-3	2.1±0.6	n.d	Thermo-tolerant yeasts
37	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	HO5-1	6.5±0.5	8.3±0.7	Thermo-tolerant yeasts

Table 1. Continued

No.	Putative species	Isolated No.	β -Glucuronidase inhibitory activity (%)		Remarks ^a
			Intracellular	Extracellular	
38	<i>Aureobasidium pullulans</i>	NHP11-1	8.1 $\pm$ 0.1	n.d	Halo-tolerant yeasts
39	<i>Candida apicola</i>	Y-1-1	10.1 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.3	Halo-tolerant yeasts
40	<i>Candida sake</i>	NWP5-1	10.8 $\pm$ 0.7	n.d	Halo-tolerant yeasts
41	<i>Citeromyces matritensis</i>	O-9-1	19.4 $\pm$ 1.5	n.d	Halo-tolerant yeasts
42	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NHP28-1	8.8 $\pm$ 0.5	n.d	Halo-tolerant yeasts
43	<i>Sterigmatomyces halophilus</i>	GJ-9-2	10.1 $\pm$ 1.6	n.d	Halo-tolerant yeasts
44	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	O-9-4	9.3 $\pm$ 0.5	n.d	Halo-tolerant yeasts
45	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	O-5-7	5.4 $\pm$ 0.8	8.3 $\pm$ 0.6	Halo-tolerant yeasts
46	<i>Bulleromyces albus</i>	AWP2-3	n.d	6.1 $\pm$ 0.5	Alkalo-tolerant yeasts
47	<i>Candida humilis</i>	AWP49-1	n.d	4.2 $\pm$ 0.7	Alkalo-tolerant yeasts
48	<i>Candida sake</i>	AHP17-2	15.1 $\pm$ 1.3	n.d	Alkalo-tolerant yeasts
49	<i>Hannaella oryzae</i>	AHP27-2	11.0 $\pm$ 1.5	n.d	Alkalo-tolerant yeasts
50	<i>Lachancea thermotolerans</i>	AWP4-55-1	6.9 $\pm$ 0.4	n.d	Alkalo-tolerant yeasts
51	<i>Oenothera odorata</i>	AWP3-1	5.4 $\pm$ 1.0	n.d	Alkalo-tolerant yeasts
52	<i>Pichia guilliermondii</i>	AWP5-14-1	8.1 $\pm$ 0.9	1.8 $\pm$ 0.2	Alkalo-tolerant yeasts
53	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	AWP5-9-3	15.0 $\pm$ 0.4	n.d	Alkalo-tolerant yeasts
54	<i>Rhodospiridiobolus azoricus</i>	AWP30-1	6.8 $\pm$ 0.3	n.d	Alkalo-tolerant yeasts
55	<i>Rhodospiridiobolus fluvialis</i>	AWP4-59-3	10.0 $\pm$ 0.6	n.d	Alkalo-tolerant yeasts
56	<i>Rhodotorula paludigena</i>	AWP4-52-2	2.6 $\pm$ 0.2	n.d	Alkalo-tolerant yeasts
57	<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	AWP3-4	12.2 $\pm$ 1.9	n.d	Alkalo-tolerant yeasts
58	<i>Sporidiobolus paraseus</i>	AHP11-2	1.0 $\pm$ 0.4	n.d	Alkalo-tolerant yeasts
59	<i>Vishniacozyma peneaus</i>	AWP13-2	6.6 $\pm$ 0.1	n.d	Alkalo-tolerant yeasts

^a General yeasts: grown at 30°C in yeast extract-peptone-dextrose (YPD) medium; Thermo-tolerant yeasts: grown at 35°C in YPD medium; Halo-tolerant yeasts and alkalo-tolerant yeasts: grown in YPD medium (3% NaCl, pH 9.0) at 30°C, ^b Values are mean $\pm$ SD (n=3), ^c not detected.

이들 중 *Candida oleophila* WP5-19-1 균주의 무세포 추출물의 β -glucuronidase 저해활성이 49.0%로 가장 높았고, *Issatchenkia occidentalis* WP14-7 균주의 β -glucuronidase 저해활성도 35.4%를 보였다. 또한, *Kazachstania gamospora* WP9-1 균주의 무세포 추출물이 27.7%, *Scheffersomyces stipites* WP4-54-1 균주가 23.6%를 보였으나 나머지 균주들을 대부분 15% 미만이었다. 따라서 β -glucuronidase 저해활성이 가장 높았던 *C. oleophila* WP5-19-1을 우수 균주로 최종 선발하였다.

현재 β -glucuronidase 저해물질 연구로서 Weng [9]등은 scutellarein, luteolin, baicalein, quercetin을 포함한 일부 flavonoid가 IC₅₀ 5.76 μ M에서 IC₅₀ 29.64 μ M의 강한 억제효과를 나타냄을 보고하였고 Bai [10] 등은 뽕나무 껍질에서 분리된 플라보노이드에서 IC₅₀이 1.12 μ M에서 10.63 μ M 범위의 저해활성으로 β -glucuronidase를 저해하였음을 보고하였으며 Kim 등[7]은 *Grateloupia elliptica*에서 β -glucuronidase를 IC₅₀ 5.4 mg/mL와 8.5 mg/mL로 저해하는 두 가지 bromophenol을 보고하였다.

Candida oleophila WP5-19-1의 β -glucuronidase 저해물질 생산

배지와 dextrose의 영향: β -Glucuronidase 저해물질 생산 우수 균주로 최종 선발한 *C. oleophila* WP5-19-1을 각종 미생물 배지에 접종한 후 30°C에서 48시간 배양한 후 균 생육과 β -glucuronidase 저해활성을 측정하였다(Table 2). 균 생육은 starch peptone 배지 외에 대부분의 배지에서 양호하였으나 β -glucuronidase 저해활성은 PD 배지에서 배양하여 얻은 무세포 추출물이 IC₅₀값 10.2 mg으로 가장 높은 저해활성을 보였다.

β -Glucuronidase 저해활성이 우수하였던 PD배지에서의 dextrose와 yeast extract의 영향을 조사하

Table 2. Effect of media on the production of β -glucuronidase inhibitor from *Candida oleophila* WP5-19-1.

Media	Growth (A_{660})	β -Glucuronidase inhibitory activity
		IC ₅₀ (mg of cell-free extracts)
Yeast ext.-peptone-dextrose (YPD)	1.36	19.0 $\pm$ 0.5c
Yeast ext. -malt ext. (YM)	1.18	12.5 $\pm$ 0.2
Potato dextrose (PD)	1.51	10.2 $\pm$ 0.2
General fungi medium ^a	1.53	14.8 $\pm$ 0.3
Malt extract	1.14	11.3 $\pm$ 0.4
Starch-peptone	0.44	20.8 $\pm$ 0.5
Czapex-dox	0.83	10.7 $\pm$ 0.1
GYP ^b	1.34	45.4 $\pm$ 0.1
Nutrient broth	0.88	11.1 $\pm$ 0.2

^a General fungi medium: glucose 1%, peptone 0.5%, yeast extract 0.3%, malt extract 0.5%, ^b GYP medium; glucose 1%, yeast extract 0.5%, peptone 0.5%, sodium acetate 0.2%, Tween 80 0.5 mL, inorganic salt solution 0.5 mL (v/v), CaCO₃ 1%, ^c Values are mean $\pm$ SD (n=3), Significantly different at $p < 0.02$.

기위해 1% yeast extract를 첨가한 PD배지와 첨가하지 않은 PD배지에 dextrose를 PD배지 총 함량으로 1-10%까지 일정 농도로 첨가하여 각각 배양 후 생육도와 β -glucuronidase 저해활성을 측정하였다. 균 생육은 dextrose 1-10% 농도 간에 큰 차이 없이 A_{660} 1.1-1.5를 보였으나 β -glucuronidase 저해활성은 dextrose 5% 첨가한 PD배지에서 배양하였을 때 IC₅₀값 8.9 mg으로 가장 높은 저해활성을 보였고 2%를 첨가하였을 때 IC₅₀ 9.4 mg의 저해활성을 보여 dextrose 5% 첨가가 β -glucuronidase 저해물질 생산이 가장 좋은 농도였다(data not shown). 또한 5% dextrose를 함유한 PD배지에 yeast extract 1% 첨가하여 배양하였을 때 β -glucuronidase 저해활성은 IC₅₀값 13.1 mg로 오히려 낮아졌다.

배양 시간의 영향: *C. oleophila* WP5-19-1를 PD 배지에 접종하여 30°C에서 72시간까지 배양하면서 이들의 균 생육과 β -glucuronidase 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 균 생육은 12시간에 대수기 중기를 거쳐 24시간에 정지기에 도달하였고 β -glucuronidase 저해활성은 대수기 말기와 정지기인 24시간과 48시간 배양해서 얻은 무세포 추출물에서 각각 IC₅₀ 8.4 mg, IC₅₀ 8.5 mg으로 가장 높았다. 또한 배양 24시간 마다 두 번 dextrose를 초기 농도로 공급하여 72시간까지 유가식으로 배양하였을 때 β -glucuronidase 저해활성은 24시간 회분식 배양에서의 저해활성 IC₅₀ 8.4 mg과 비슷하게 유지되었다(data not shown). 따라서, 배양 48시간 이후 저해활성이 급격히 감소된 회분식 배양보다는 저해물질 생산이 72시간까지 지속되는 유가식 배양이 대량생산에 유리할 것으로 사료된다.

β -Glucuronidase 저해물질의 부분 정제 및 특성

부분 정제: *C. oleophila* WP5-19-1 균주가 생산하는 β -glucuronidase 저해물질을 부분 정제하기 위하여 먼저 선발 균주의 무세포 추출물에 대하여 각종 protease와 amylase를 처리한 후 얻은 가수 분해물 등의 β -glucuronidase 저해활성을 측정하였다. Trypsin 처리시 β -glucuronidase 상대 저해활성이 127.9%로 무처리 대조구(100%)에 비하여 약 27% 이상 저해활성이 높아졌다. Protease E를 처리했을 때는 106.6%로 활성에 변화가 없었고 pepsin을 처리했을 때 오히려 무처리 대조구에 비하여 약 15% 저해활성이 감소되었다. 또한, α -amylase와 β -amylase를 처리했을 때 각각 103.3, 99.1%로 저해활성에 거의 변화가 없었다.

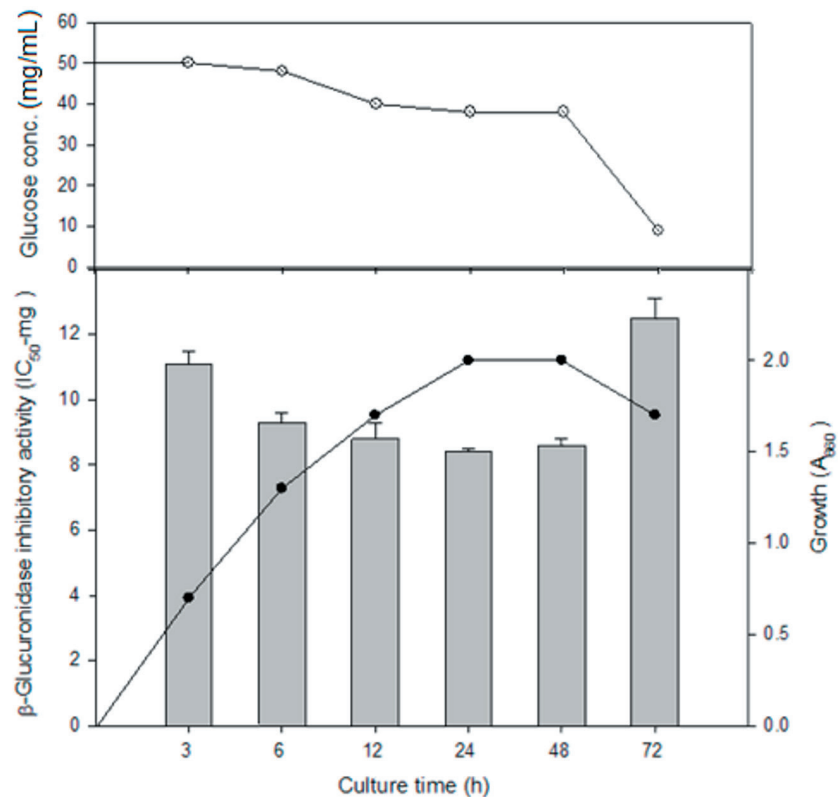


Fig. 1. Effect of culture time on the production of β -glucuronidase inhibitor from *Candida oleophila* WP5-19-1. : β -glucuronidase inhibitory activity, : growth.

C. oleophila WP5-19-1의 무세포 추출물을 trypsin으로 가수분해 시킨 다음 한외여과 장치로 3 kDa 이하, 3-30 kDa, 30 kDa 이상으로 각각 한외여과를 실시한 후 이들의 저해활성을 측정된 결과 3 kDa 이하의 여과액이 47.1%의 가장 높은 β -glucuronidase 저해활성을 보였다. 한외여과하여 얻은 분자량 3 kDa 이하의 활성 분획을 Sephadex G-50 column을 이용하여 gel 여과를 실시한 결과 43-55번 여과액이 단일 peak를 보였고 45.3%의 β -glucuronidase 저해활성을 보여 부분 정제물로 하였다.

부분 정제물질의 특성; 부분 정제된 β -glucuronidase 저해물질의 작용 최적 온도와 온도(열) 안정성을 조사한 결과 부분 정제한 β -glucuronidase 저해제는 37°C에서 가장 잘 작용하였고 30°C와 45°C에서 30분씩 처리하였을 때 90% 이상의 비교적 높은 저해활성을 보였고 30°C에서 60°C까지 안정하였다(Fig. 2). 부분 정제한 β -glucuronidase 저해물질의 작용 최적 pH는 7.0이었고 pH 6.0-9.0에서 80%이상의 잔존 저해활성을 보여 안정하였다.

부분 정제한 β -glucuronidase 저해물질의 중금속이온들과 당류 등에 대한 안정성을 조사한 결과 Table 3과 같이 Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} 등은 저해활성을 증가시켜 저해물질들을 활성화시켰으나 Li^{+} 과 Co^{2+} 이온 등은 저해활성을 감소시켰다. 당들은 저해물질들의 내성에 큰 영향을 주지 않았다.

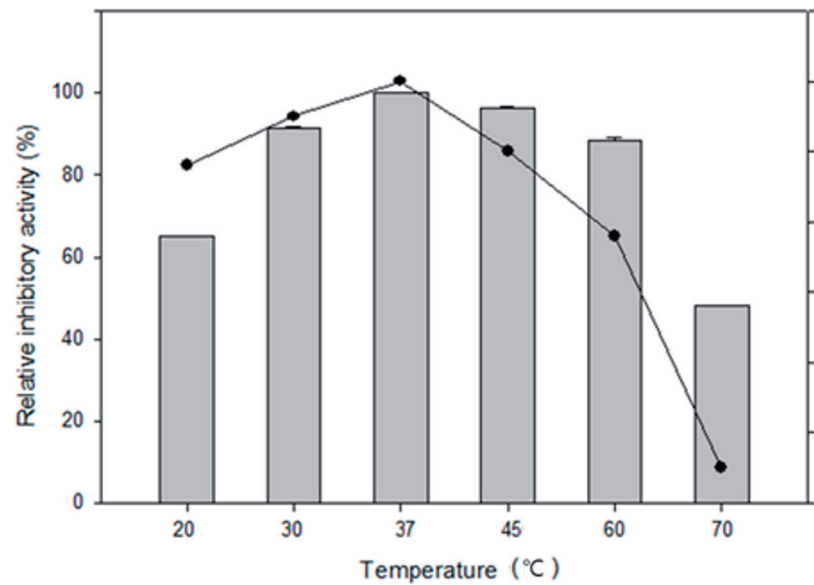


Fig. 2. Optimal inhibitory reaction temperature(—●—) and heat stability(■) of partial purified β -glucuronidase inhibitor from *Candida oleophila* WP5-19-1. Relative inhibitory activity on stability was determined after treated for 30 min at each temperature.

Table 3. Effect of heavy metals and sugars on the inhibitory activity of partially purified β -glucuronidase inhibitor from *Candida oleophila* WP5-19-1.

Heavy metal ion and sugars	Concentration (mM)	Relative inhibitory activity (%)
Control		100.0
Cu ²⁺	1	170.5
Co ²⁺	1	88.5
Li ⁺	1	81.6
Zn ²⁺	1	144.7
Fe ³⁺	1	151.6
Sodium thiosulfate	1	79.3
Glucose	30	99.6
Fructose	30	94.4
Maltose	30	94.8
Raffinose	30	100.1
Xylose	30	93.4

적요

비병원성 야생효모로부터 대장에서의 독성물질 활성화에 관여하여 대장암을 유발시키는 효소 중의 하나인 β -glucuronidase를 저해하는 물질을 생산하기 위하여 대전광역시 월평공원으로부터 분리 동정한 야생효모들 중 비병원성 야생효모들을 선별하여 배양 상등액과 무세포 추출물을 각각 제조한 후 β -glucuronidase 저해활성을 측정하였다. 133균주의 비병원성 야생효모들 중 *C. oleophila* WP5-19-1의 무세포추출물이 49.0%의 가장 높은 저해활성을 보여 우수 균주로 최종 선발하였다. β -Glucuronidase 저해물질 최적 생산 조건은 *C. oleophila* WP5-19-1를 초기 pH를 6.0으로

조정한 dextrose 5% 함유한 potato dextrose 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였을 때였고 이때 IC_{50} 값; 8.4 mg으로 가장 높은 저해활성을 보였다. *C. oleophila* WP5-19-1의 β -glucuronidase 저해물질을 한외여과와 Sephadex G-50으로 gel 여과를 실시하여 부분 정제하였고 이들은 30-60°C, pH 6.0-9.0에서 80% 이상의 잔존 저해활성을 보여 안정하였다. 또한 철, 구리, 아연과 같은 중금속 이온들은 저해활성을 활성화시켰다.

REFERENCES

1. Kim DH, Choi HJ, Bae EA, Han MJ, Park SY. Effect of artificially cultured *Phellinus linteus* on harmful intestinal bacterial enzymes and rat intestinal α -glucosidases. J Fd Hyg Safety 1998;13:20-3.
2. Lee KA, Kim MS, Cho HB. Effect of extract of fermented dropwort on intestinal bacteria and enzymes in vitro. Kor J Microbiol 2008;44:358-61.
3. Lee HC, Andrew MJ, Low CS, Lee YK. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. Research in Microbiol 2006;157:876-84.
4. Rhee YK, Kim DH, Han MJ. Inhibitory effect of *Zizyphi fructus* on β -glucuronidase and tryptophanase of human intestinal bacteria. Kor J Food Sci Technol 1998;30:199-205.
5. Myung DS, Joo YE. Gut microbial influence and probiotics on colorectal cancer. Korean J Gastroenterol 2012;60:275-84.
6. Kim EJ, Shin IU, Kwun SY, Park EH, Yi JH, Kim MD. Exploration of β -glucuronidase activity of lactic acid bacteria isolated from Kimchi. Microbiol Biotechnol Lett 2019;47:434-40.
7. Kim KY, Choi KS, Hideyuki K, Kim SM. β -Glucuronidase inhibitory activity of bromophenols purified from *Grateloupia elliptica*. Food Sci Biotechnol 2008;17:1110-4.
8. Han MJ, Bae EA, Rhee YK, Kim DH. Effect of mushrooms on the growth of intestinal lactic acid bacteria. Korean J of Food Sci Technol 1996;28:947-52.
9. Weng ZM, Wang P, Ge GB, D ZR, Wu DC, Zou LW, Dou TY, Hou J, Zhang TY, Yang L. Structure-activity relationships of flavonoids as natural inhibitors against *E.coli* β -glucuronidase. Food Chem Toxicol 2017;109:975-83.
10. Bai Y, Chen L, Cao YF, Hou XD, Jia SN, Zhou Q, He YQ, Hou J. Beta-glucuronidase inhibition by constituents of mulberry bark. Planta Med 2021;87:631-41.
11. Kim JY, Han SM, Lee JS. Isolation and tyrosinase inhibitory activity of wild yeasts obtained from soil in the fields of medicinal plants, ginseng and Korean angelica. Kor J Mycol 2018;46:315-323.
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.
13. Lee DH, Lee DH, Lee JS. Characterization of a new antidementia β -secretase inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme Microb Technol 2007;42:83-8.
14. Lee DH, Lee JS, Yi SH, Lee JS. Production of the acetylcholinesterase inhibitor from *Yarrowia lipolytica* S-3. Mycobiol 2008;36:102-5.
15. 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.

16. Jang IT, Kim YH, Kang MG, Yi SH, Lim SI, Lee JS. Production of tyrosinase inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. Kor J Mycol 2012;40:60-4.
17. Jang IT, Kim YH, Yi SH, Lim SI, Lee JS. Screening of a new fibrinolytic substances-producing yeast. Kor J Mycol 2011;39:227-8.
18. Kim HK, Kim JY, Han SM, Kim CM, Lee JS. Microbiological characteristics and physiological functionalities of unrecorded wild yeast strains in the soils of Hajodae and Gyungpodaee beaches in Korea. Kor J Mycol 2019;47:249-58.
19. Han SM, Kim JY, Kim C, Lee JS. Characteristics of unrecorded wild yeasts obtained from soil of spices plant fields and its physiological functionality. Kor J Mycol 2019;47:75-81.
20. Lee JS, Yi SH, Kwon SJ, Ahn C, Yoo JY. Microbiological characteristics and physiological functionality of unrecorded yeasts from mountains soils in Daejeon metropolitan city and Chungcheongnam-do, Korea. Kor J Mycol 2016;44:138-44.
21. Jeong SC, Hyun KW, Kim JH, Lee JS. Isolation of a halotolerant yeast and the production of extracellular protease. Kor J Biotechnol Bioeng 2001;16:158-62.
22. Jang JE, Park SJ, Lee JS. Isolation of wild yeasts and characterization of physiological functionalities of unrecorded wild yeasts obtained from flowers and soils of the Wolpyung park, Daejeon city and Gykpo beach of Jeollabuk-do in Korea. Kor J Mycol 2021;49:87-100.
23. 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.
24. Oh EH, Park JM, Kim SH, Song IG, Han NS, Yoon HS. Biological activities of *Phellinus linteus* mycelium culture with cassia semen extract on β -glucuronidase inhibitory activity. Kor J Food & Nutr 2012;25:620-8.
25. Yoo J, Hwang JS, Goo TW, Yun EY. Comparative analysis of nutritional and harmful components in Korean and Chinese mealworms (*Tenebrio molitor*). J Kor Soc Food Sci Nutr 2013;42:249-54.