

Hansenula sp. MS-364의 생육과 Formate Dehydrogenase의 활성

유병욱 · 권태종*

건국대학교 공과대학 미생물공학과

Growth of *Hansenula* sp. MS-364 and Formate Dehydrogenase Activity. Byoung-Yook Ryu and Tae-Jong Kwon*. Department of Microbiological Engineering, College of Engineering Kon-Kuk University, Seoul 143-701, Korea - Medium components for maximum activity of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase (EC 1.2.1.2; FDH) were optimized with a methanol-assimilating yeast *Hansenula* sp. MS-364, preserved by our laboratory. The maximum activity of the enzyme was obtained when the strain was cultivated at 30°C for 24 hours in a medium containing methanol 3%(v/v), yeast extract 0.8%(w/v), K₂HPO₄ 0.1%(w/v), KH₂PO₄ 0.1%(w/v), MgSO₄·7H₂O 0.05%(w/v), and the pH of the culture broth was adjusted at 5.0.

Methylotrophs란 탄소와 탄소간에 결합이 없는 환원된 C₁ 화합물을 유일한 에너지원 및 탄소원으로 이용하여 성장할 수 있는 미생물을 말한다(1). 1892년 Loew에 의해 methanol에서 생육하는 *Bacillus methylicus*가 최초로 발견된 이후 methylotrophs에 대한 많은 연구가 진행되어왔다(2). 한편, 1969년 Ogata 등(3)이 *Kloeckera* sp. 균주의 특성을 연구한 것이 메탄올 자화효모에 대한 연구의 시초로서 그후 여러 연구자들에 의해 메탄올 자화효모가 분리, 연구되었으나 메탄올 자화세균에 대한 여러 연구결과에 비해 상대적으로 효모에 대한 연구결과는 미흡하다. 현재까지 알려진 바에 의하면 자연계에서 분리된 메탄올 자화성 효모는 세균과는 달리 몇 종류로 제한되어 있어 단 4가지 속의 균주만이 메탄올을 자화할 수 있다(4).

Formate: NAD⁺ oxidoreductase(NAD⁺-dependent formate dehydrogenase; FDH, EC 1.2.1.2)는 식물과 동물, 미생물에서 발견되는 효소로서 보조효소인 NAD⁺와 기질 formate에 작용하여 CO₂와 NADH를 방출한다. 메탄올 자화효모에서는 이화작용 경로의 마지막에 작용하여 formate를 최종적으로 CO₂로 산화시킨다. 이때 환원된 NADH는 호흡 과정을 통해 ATP를 생산한다(5, 6).

FDH는 NADH 생산에 이용되며 NADH는 아미노산의 효소적 합성이나 효소분석 등에 폭넓게 사용되고 있는데 비해 NAD⁺ 형태보다 2배이상 가격이 비싸다. 따라서 FDH나 세포 자체를 적당한 담체에 고정화하여 NAD⁺로부터 NADH를 생산하거나, 메탄올 자화성 균의 세포 파쇄액으로부터 NADH를 생산하는 연구가 진행되고 있

다(7, 8). 또한 FDH는 젖산이나 아미노산 등의 유기합성에서 co-immobilization 등을 통한 NAD(H)의 재생 system에 사용되기도 한다(9-11). 즉, FDH의 산물인 CO₂는 gas 형태로 system 외로 방출되기 때문에 최종산물에 의한 저해현상이 없고 또한 CO₂에서 formate로의 효소 역반응은 일어나지 않으며, 값싼 원료(formate)를 사용한다는 장점이 있기 때문에 재생 system에서는 alcohol dehydrogenase 등의 다른 dehydrogenase에 비해 월등히 유리하다. 한편으로, FDH는 혈액 내의 formate나 oxalate 등의 의학적 정량에도 사용될 수 있으며 이러한 효소적 방법은 단시간에 정확한 정량이 가능하므로 FDH의 고정화를 통해 sensor로의 이용도 고려되고 있다(12, 13).

국내에서는 메탄올 자화성 미생물의 산업적 응용이나 메탄올 자화효모에 관련된 여러 가지 효소의 성질에 관한 기초연구가 미비한 실정이다. 따라서 본 연구는 본 실험실에서 분리한 메탄올 자화성이 우수한 균주 *Hansenula* sp. MS-364로부터 FDH의 생산조건을 검토하였기에 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험실에서 분리, 보관하고 있는 균주 가운데 메탄올 자화성이 우수한 *Hansenula* sp. MS-364(14)를 사용하였다.

균의 배양

본 실험에 사용한 기본배지의 조성은 다음과 같다. Methanol 3%(v/v), yeast extract 0.8%(w/v), K₂HPO₄ 0.1%(w/v), KH₂PO₄ 0.1%(w/v), MgSO₄·7H₂O 0.05%

*Corresponding author

Tel. 82-2-450-3519, Fax. 82-2-455-0158

E-mail: 203-252.136.106

Key words: *Hansenula* sp., Formate dehydrogenase, Methylotrophs

(w/v), 초기 pH는 5.5였다. 100 ml 삼각 flask에 기본배지를 20 ml씩 분주하여 살균한 후 전 배양한 배양액 0.1 ml을 접종하여 30°C에서 48시간 동안 진탕배양(160 rpm)하였다.

균체량 측정

배양액을 증류수로 희석하고 spectrophotometer (Hitachi model 200-20)를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도에 해당하는 건조균체량(Dry Cell Weight: D.C.W.)은 배양액을 원심분리하여 얻은 균체를 105°C에서 건조한 후 중량을 측정하였다.

조효소액의 조제

배양액을 냉장원심분리(5,000×g, 10분)하여 균체를 회수하고, 회수된 균체를 생리식염수로 2회 세척한 후 10 mM phosphate buffer(pH 7.5)에 현탁하여 초음파 분쇄기(Cole-Parmer Instrument Co. model 4710)로 200 watt, 50 Hz에서 15분간 2회 파쇄한 후 냉장원심분리(15,000×g, 20분)하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

효소의 활성측정

FDH의 활성도는 Allais 등(15)의 방법에서 buffer의 농도를 변형하여 측정하였다. 즉, 0.6 mM NAD⁺ 2 ml, 0.9 M sodium formate 0.1 ml, 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 0.8 ml을 35°C에서 10분간 예열한 다음 조효소액 0.1 ml을 첨가하여 효소반응시켰다. 효소반응의 결과로 환원된 NADH 양을 340 nm에서 흡광도를 측정하여 효소의 활성으로 환산하였다. 상기의 조건에서 1 분당 1 mole의 NADH를 생성하는 효소량을 1 unit로 정의하였다.

결과 및 고찰

탄소원의 영향

메탄올을 제외한 기본배지에 각종 alcohol을 최종농도가 1%(v/v) 되도록 각각 첨가하여 배양한 후 균체증식과 효소활성을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 균체증식은 glycerol, ethanol, methanol 순으로 우수하였으나 효소활성은 메탄올에서 가장 높았다. 이러한 결과는 Avilova 등(16)의 *Candida methylca*가 ethanol이나 glucose 등의 다른 탄소원에 비해 메탄올에서 FDH의 활성이 좋았다는 보고와 유사하다. 또한 Fujii 등(17)의 *Candida* sp., Izumi 등(18)의 *Candida methanolica*, Kato 등(19)의 *Kloeckera* sp. No. 2201에서도 메탄올에서 생육할 때 더 높은 FDH 활성을 나타내었다. 이와 같은 결과로 보아 FDH는 유도기질에 의해 생산되는 유도효소라

Table 1. Effects of carbon sources on FDH activity

Carbon source (1%, v/v)	Cell growth (D.C.W., g/l)	Relative activity (%)
None	0.48	14
Methanol	4.14	100
Ethanol	5.52	42
n-Butanol	0.12	6
n-Propanol	0.16	12
Isobutyl alcohol	0.13	8
Glycerol	8.88	60

The activity was expressed as the relative value as to that of methanol.

고 사료된다.

메탄올 농도의 영향

메탄올 첨가농도에 따른 균체증식과 효소활성은 Fig. 1과 같다. 효소의 활성은 4%(v/v), 56시간에서 가장 높았으나 3%(v/v), 48시간과 거의 비슷하였다. 메탄올의 첨가농도가 낮을수록 균은 더빨리 정상기에 도달하였고 농도가 증가할수록 초기 생육저해로 인해 유도기가 길어짐을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 Avilova 등(16)에 의한 *C. methylca*에서의 0.5%(v/v) 메탄올 첨가시 FDH 활성이 가장 우수하였다는 보고에 비해 상대적으로 높은 농도였다. 본 실험에서는 최적의 효소생산을 위해 상대적으로 배양시간이 짧은 3%(v/v) 농도에서 48시간 배양

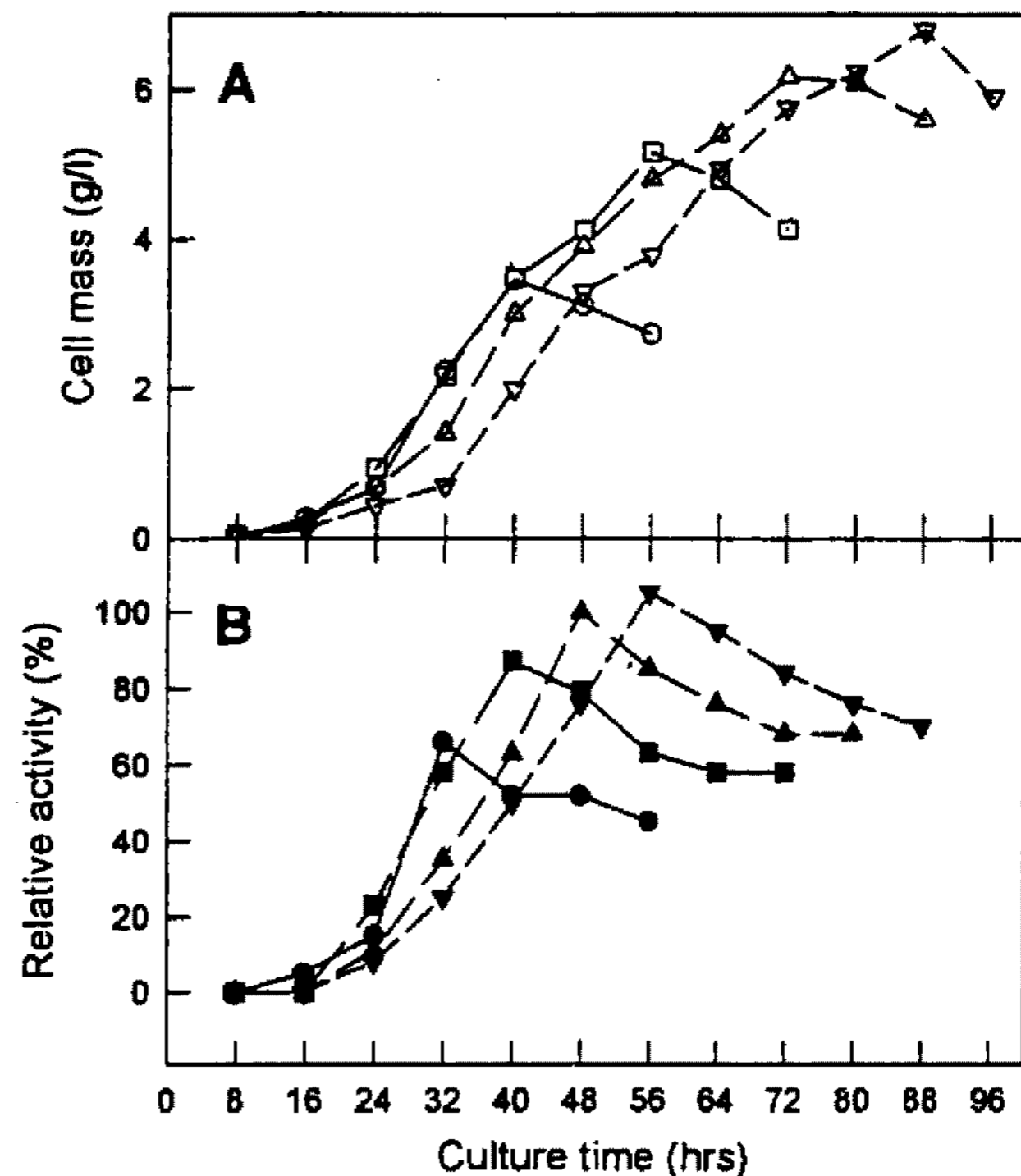


Fig. 1. Effect of various concentrations of methanol in culture medium on FDH activity.

A: cell growth B: enzyme activity.
●—●, 1%; ■—■, 2%; ▲—▲, 3%; ▼—▼, 4%.

Table 2. Effects of nitrogen sources on FDH activity

Nitrogen source (0.5%, w/v)	Cell growth (D.C.W., g/l)	Relative activity (%)
None	0.15	3
Beef extract	3.15	56
Yeast extract	5.34	100
Peptone G	3.15	47
Tryptone	5.16	85
Soybean meal	0.85	8
Casamino acids	3.90	79
Urea	0.45	12
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.70	72
NH ₄ Cl	2.49	46
NH ₄ NO ₃	2.16	55
KNO ₃	1.24	31
NaNO ₃	1.43	47

The activity was expressed as the relative value as to that of yeast extract.

Table 3. Effects of metal ions on FDH activity

Metal ion (1 mM)	Cell growth (D.C.W., g/l)	Relative activity (%)
None	6.01	100
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.11	106
FeSO ₄ ·7H ₂ O	3.42	76
ZnSO ₄	5.43	58
CuSO ₄ ·5H ₂ O	5.42	58
MnSO ₄ ·4-6H ₂ O	3.41	17
HgCl ₂	0.00	0
Cd(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.05	0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.01	0
AgNO ₃	2.69	61
Pb(NO ₃) ₂	3.21	40

The activity was expressed as the relative value as to that of no addition.

하였다.

질소원의 영향

Yeast extract를 제외한 기본배지에 각종 질소원을 0.5%(w/v)되게 첨가하여 배양한 결과는 Table 2와 같다. 효소활성과 균체증식이 가장 우수한 질소원은 yeast extract 였으며 tryptone, casamino acids 등의 유기질소원을 무기질소원보다 더욱 잘 이용하였다. 무기질소원중에서는 (NH₄)₂SO₄를 가장 잘 이용하였고, NO₃⁻ 보다 NH₄⁺ 형태의 질소원을 더 잘 이용하였다.

균체증식과 효소활성이 가장 좋았던 질소원인 yeast extract의 농도에 따른 영향을 조사한 결과는 Fig. 2에서 처럼 0.8%(w/v) 이상 첨가시 효소활성이 거의 일정함을 보였다.

금속염의 영향

MgSO₄를 제외한 기본배지에 각종 금속염을 1 mM 농도가 되게 첨가하여 배양한 결과는 Table 3과 같다. MgSO₄ 첨가시 효소활성이 가장 높았으며 그외의 금속염은 오히려 효소활성을 저해하였다. 특히 Hg²⁺, Cd²⁺, Co²⁺ 등의 중금속은 균의 생육을 완전히 저해하였다.

효소활성이 가장 높은 MgSO₄의 첨가농도에 따른 균체증식과 효소활성은 Fig. 3과 같이 0.05% (w/v)에서 가장 우수하였다.

비타민의 영향

기본배지에 각종 비타민을 최종농도 0.01%(w/v)로 각각 첨가하여 접종한 후 배양한 결과는 Table 4와 같다. 대부분의 비타민이 균체증식을 다소 증가시켰으나 효소활성에는 별다른 영향을 미치지 않았다. 이는 유기질소원인 yeast extract로부터 얻는 비타민 만으로 균체생육

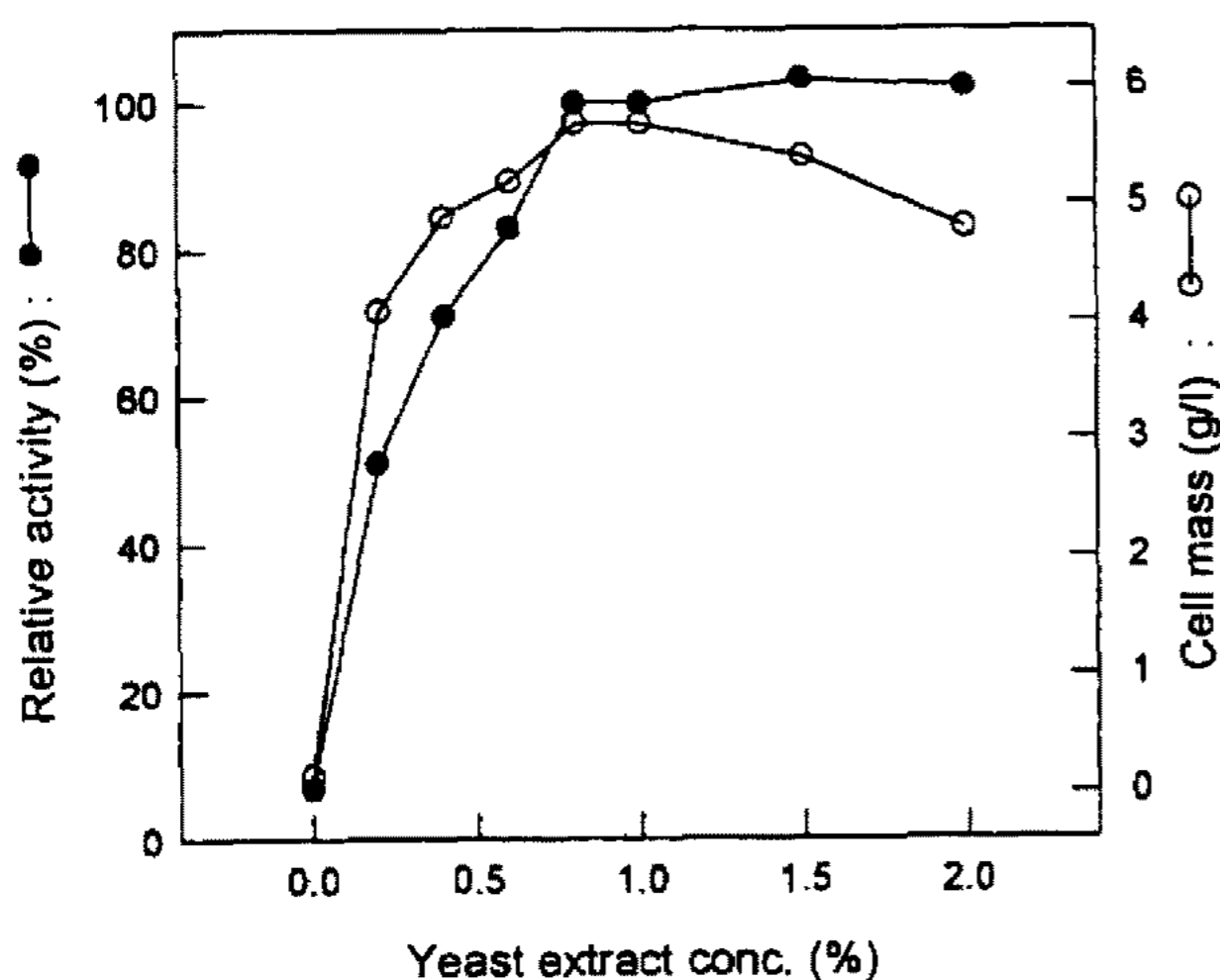


Fig. 2. Effect of various concentrations of yeast extract in culture medium on FDH activity.

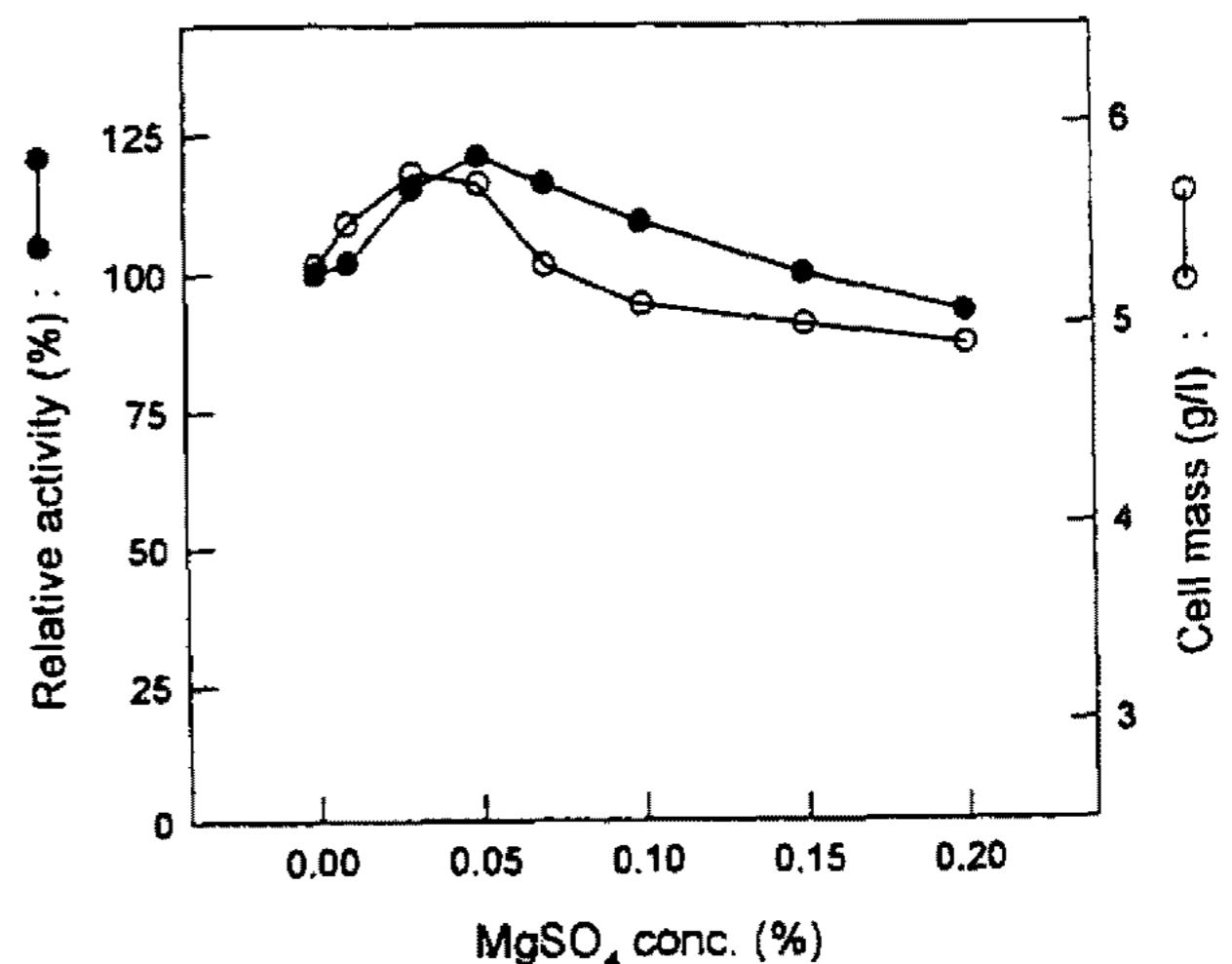


Fig. 3. Effect of various concentrations of MgSO₄ in culture medium on FDH activity.

Table 4. Effects of vitamins in culture medium on FDH activity

Vitamin (0.01%, w/v)	Cell growth (D.C.W., g/l)	Relative activity (%)
None	4.8	100
Thiamine-HCl	5.8	95
Riboflavin	5.4	94
Pyridoxine	5.5	104
Ca-pantothenate	5.4	74
Nicotinic acid	5.9	86
Folic acid	5.2	92
p-aminobenzoic acid	5.7	86
Biotin	5.4	98
Ascorbic acid	4.3	89

The activity was expressed as the relative value as to that of no addition.

이 충분한 것으로 생각된다. 이러한 결과는 Allais 등(20)의 *Hansenula polymorpha* CBM11에서 biotin과 folic acid의 첨가로 균체생육이 다소 증가하였으나 생육인자는 아니었다는 보고와 유사하다.

배양온도의 영향

배양온도의 영향을 조사하기 위하여 기본배지에 균을 접종하여 15°C에서 50°C까지 각 온도별로 배양한 결과는 Fig. 4와 같다. 효소생산의 최적온도는 30°C였고 20°C이하와 37°C이상의 온도에서는 균체증식과 효소활성이 감소되었다. 이러한 결과는 Yang 등(21)의 *Candida* 1-B와 25-A의 28°C, Yokote 등(22)의 *Torulopsis methanosorbosa* KY12001의 최적 생육온도가 30°C였다는 보고와 유사하였으며, 이들은 일반적인 효모의 최적 생육온도이다.

초기 pH의 영향

동일한 기본배지의 pH를 HCl과 NaOH를 이용하여

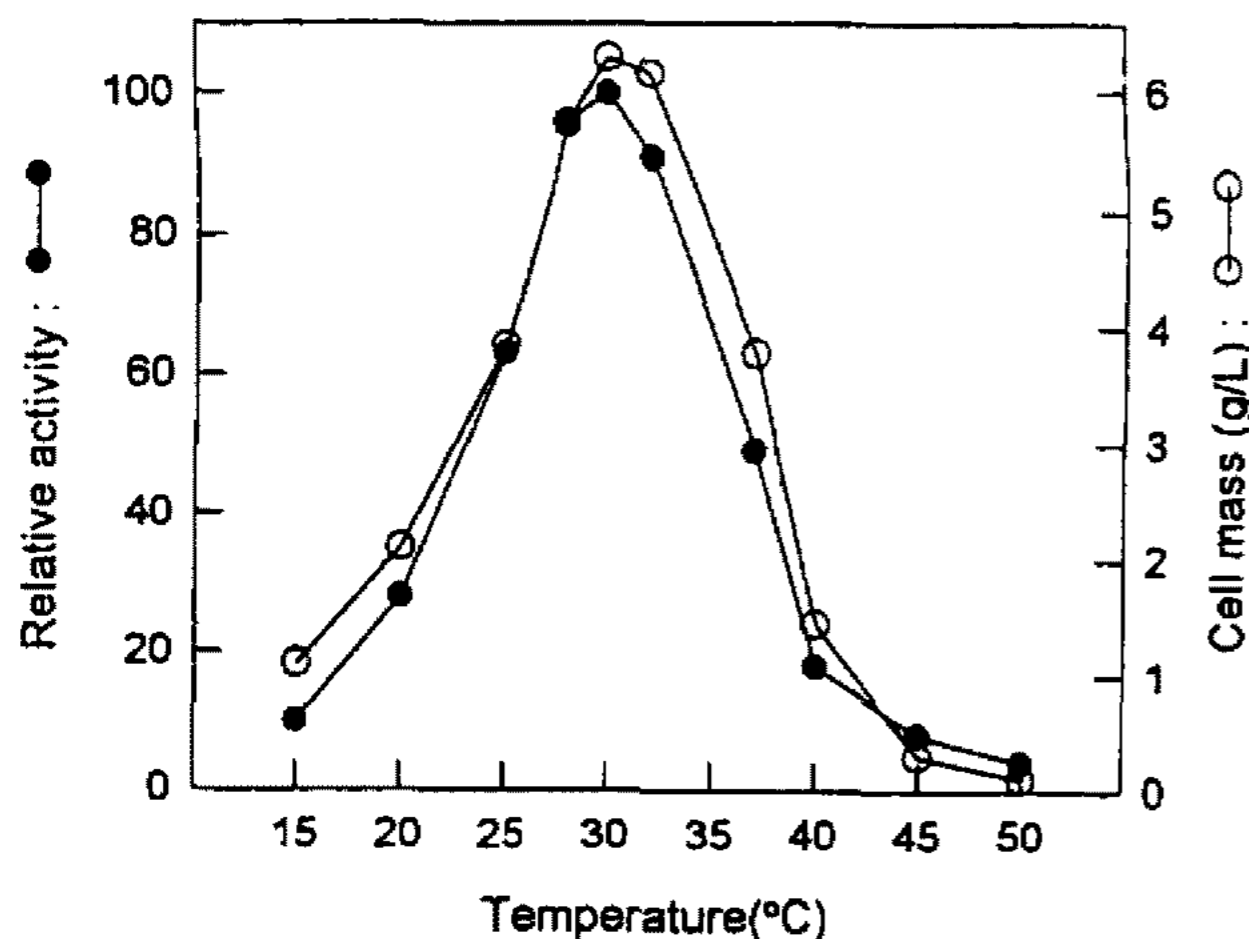


Fig. 4. Effect of temperature on FDH activity.

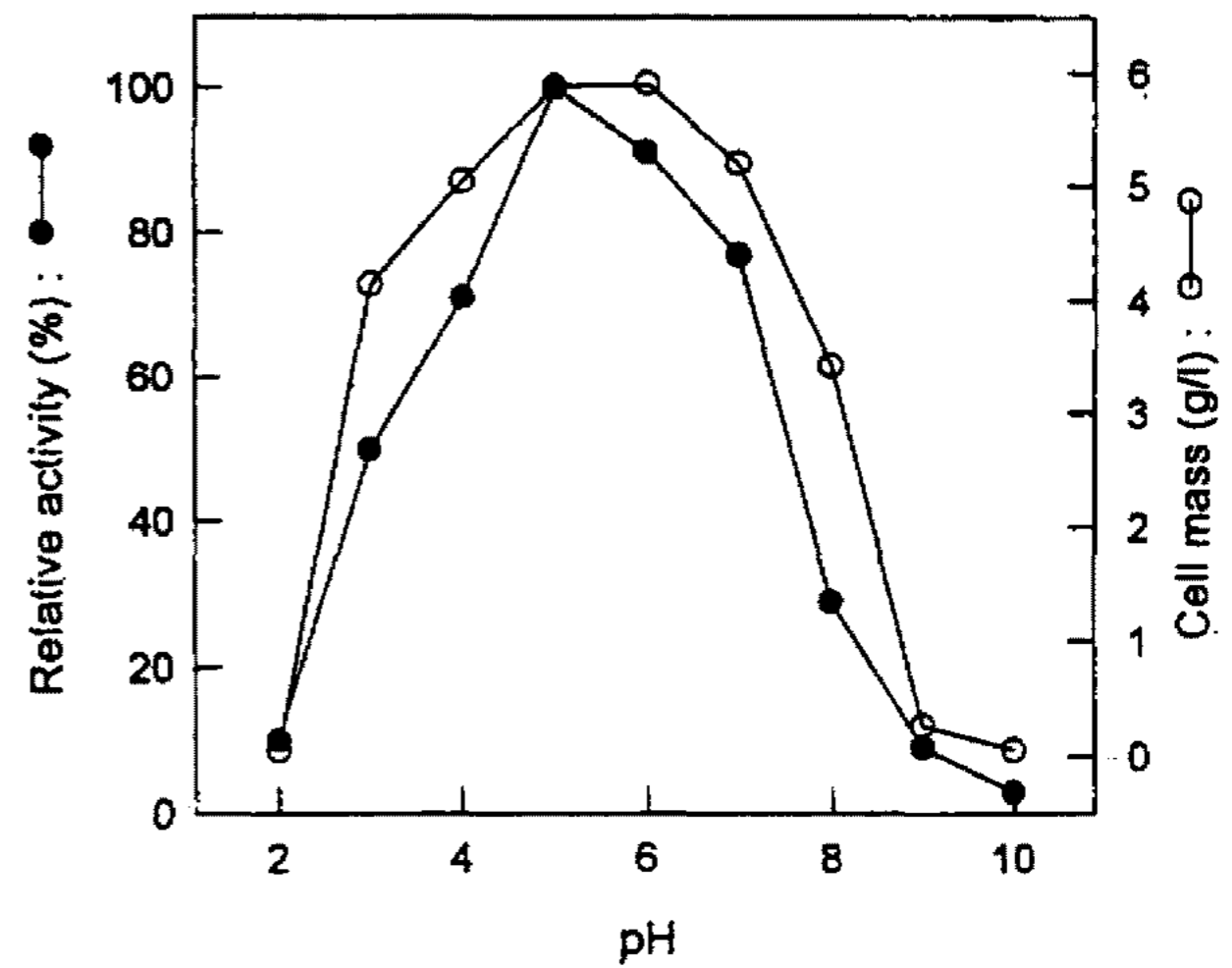


Fig. 5. Effect of initial pH of medium on FDH activity.

2부터 10까지 각각 조절한 후 접종하여 배양한 결과는 Fig. 5와 같다. 효소생산의 최적 pH는 5.0이었고 pH 4-7까지는 균체증식과 효소활성이 비교적 안정하였다. 이는 효모의 일반적인 생육최적 pH가 4와 6 사이라는 보고와 일치한다(20-22).

최적조건에서의 효소활성

상기 최적배지 및 배양조건으로 *Hansenula* sp. MS-364를 2.5 l jar fermentor에 working volume을 60%로 하여 교반속도 400 rpm, 통기량 0.8 vvm의 조건으로 배양시간에 따른 균체증식과 효소활성을 조사하여 Fig. 6과 같은 결과를 얻었다. 효소활성은 24시간에서 최대였으며 균체증식은 28시간에서 최대를 보였다. 이러한 결과는 flask로 배양할 때의 48시간 배양보다 상대적으로 짧은 시간에 최적의 활성을 나타내었다. 또한, 본 균주의 FDH는 유도기에서 생산되기 시작하여 대수증식기에서 최대의 활성을 보였다. 이러한 결과는 Avilova 등(16)의 *C. methylica*가 대수증식기에서 최대의 FDH 활성을 보였다는 보고와 일치하며, 또한 Kato 등(23)의 *Kloeck-*

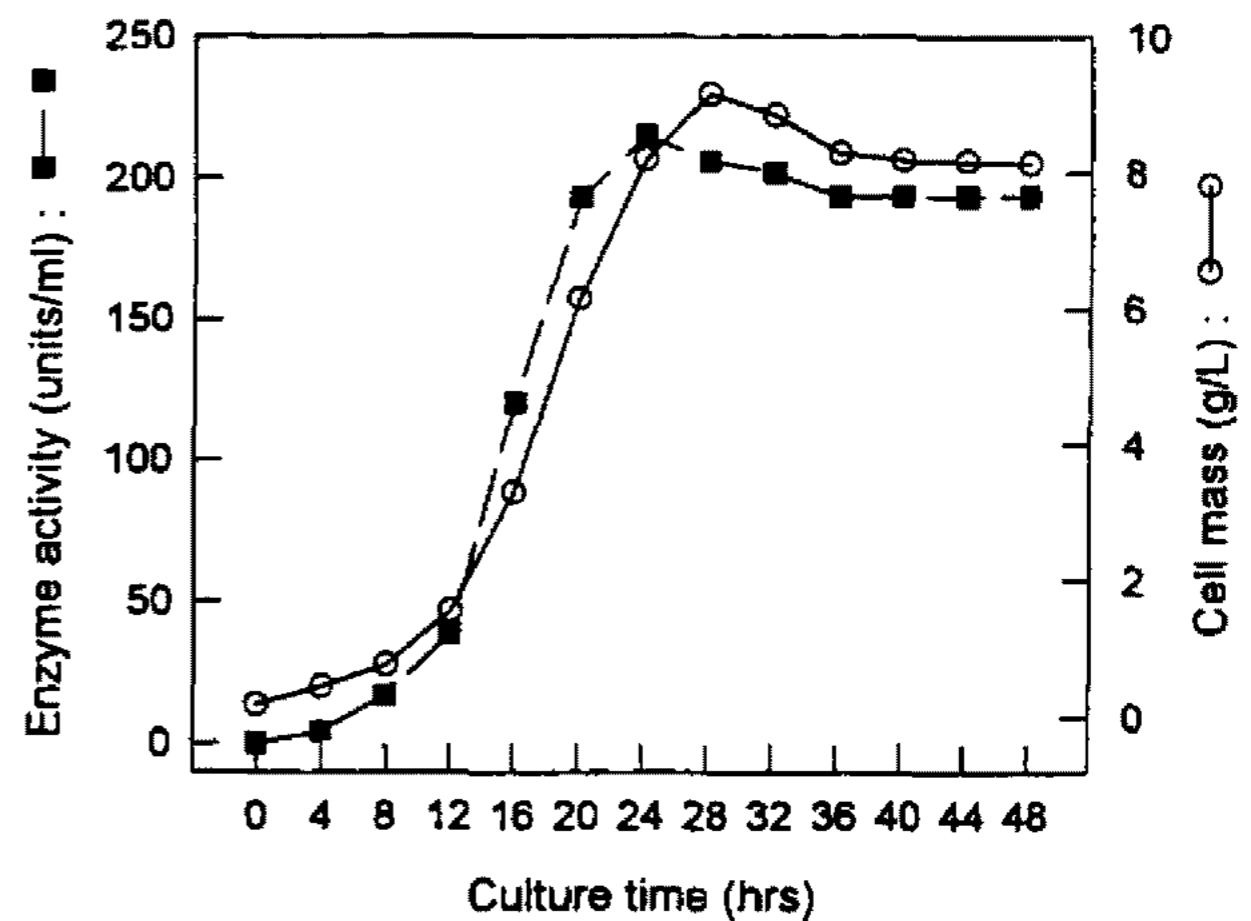


Fig. 6. Effect of culture time on FDH activity.

era sp. No. 2201의 균체증식속도와 효소활성 pattern과도 유사하였다.

요 약

건국대학교 미생물공학과에 보관하고 있는 메탄올 자화력이 우수한 균주 *Hansenula* sp. MS-364를 이용하여 각 영양성분과 배양조건을 달리하여 FDH의 활성을 검토하였다.

최적의 효소활성을 위한 배지조성은 methanol 3.0% (v/v), yeast extract 0.8%(w/v), K₂HPO₄ 0.1%(w/v), KH₂PO₄ 0.1%(w/v), MgSO₄·7H₂O 0.05%(w/v) 이었으며 비타민의 첨가는 FDH 활성에 별다른 영향을 주지 않았다. 또한 초기 pH 5.0, 배양온도 30°C에서 배양할 때 가장 좋은 FDH활성을 나타냈다.

참고문헌

- Hanson, R. S. 1980. Ecology and diversity of methylotrophic organism, Pp 3-39. In *Advances in applied microbiology*, Vol. 26, Academic Press, San Diego.
- Quayle, J. R. 1987. An eightieth anniversary of the study of microbial C₁ metabolism, Pp 1-5. In Van Versereld, H. W., Dunine, J. A. (ed.), *Microbial growth on C₁ compounds*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- Ogata, K., H. Nishikawa and M. Ohsugi. 1969. A yeast capable of utilizing methanol. *Agric. Biol. Chem.* **33**: 1519-1520.
- Lee, J. D. and K. Komagata. 1980. Taxonomic study of methanol-assimilating yeasts. *J. Gen. Microbiol.* **26**: 133-158.
- Tani, Y., Y. Mitani and H. Yamada. 1984. ATP production by protoplasts of a methanol yeast, *Candida boidinii* No. 2201. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 431-437.
- Harder, W. and A. G. Brooke. 1990. Methylotrophic yeasts, Pp 395-428. In Verachtert, H. and R. De Mot (ed.), *Yeast: Biotechnology and Biocatalysis*, Marcel Dekker, New York.
- Izumi, Y., S. K. Mishra, B. S. Ghosh, Y. Tani and H. Yamada. 1983. NADH production from NAD⁺ using a formate dehydrogenase system with cells of a methanol-utilizing bacterium. *J. Ferment. Technol.* **61**: 135-142.
- Nath, P. K., Y. Izumi and H. Yamada. 1990. NADH production from NAD⁺ with a formate dehydrogenase system involving immobilized cells of a methylotrophic *Arthrobacter* strain. *Enz. Microb. Technol.* **12**: 28-32.
- Whitesides, G. M. 1980. Enzyme-catalyzed organic synthesis: NADH regeneration by using formate dehydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **102**: 7104-7105.
- Wichmann, R. and C. Wandrey. 1981. Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration. *Biotech. Bioeng.* **23**: 2789-2802.
- Kajiwara, S. and H. Maeda. 1987. The improvement of a droplet gel-entrapping method: The co-immobilization of leucine dehydrogenase and formate dehydrogenase. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2873-2879.
- Buttery, J. E. and B. R. Chamberlain. 1988. A simple enzymatic method for the measurement of abnormal levels of formate in plasma. *J. Anal. Toxicol.* **12**: 292-294.
- Parkinson, I. S., T. Kealey and M. F. Laker. 1985. The determination of plasma oxalate concentrations using an enzyme/bioluminescent assay. *Clin. Chim. Acta* **152**: 335-345.
- Kim, B. H., H. M. Kim and T. J. Kwon. 1995. Purification and properties of alcohol oxidase produced by *Hansenula* sp. MS-364. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**: 60-67.
- Allais, J. J., A. Louktibi and J. Baratti. 1983. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 2547-2554.
- Avilova, T. V., O. A. Egorova, L. S. Ioanesyan and A. M. Egorov. 1985. Biosynthesis, isolation and properties of NAD-dependent formate dehydrogenase from the yeast *Candida methyllica*. *Eur. J. Biochem.* **152**: 657-662.
- Fujii, T. and K. Tonomura. 1972. Oxidation of methanol, formaldehyde and formate by a *Candida* species. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 2297-2306.
- Izumi, Y., H. Kanzaki, S. Morita, H. Futazuka and H. Yamada. 1989. Characterization of crystalline formate dehydrogenase from *Candida methanolica*. *Eur. J. Biochem.* **182**: 333-341.
- Kato, N., M. Kano, Y. Tani and K. Ogata. 1974. Purification and characterization of formate dehydrogenase in a methanol-utilizing yeast, *Kloeckera* sp. No. 2201. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 111-116.
- Allais, J. J. and J. Baratti. 1983. A new methanol-assimilating thermotolerant yeast with a high cell yield. *J. Ferment. Technol.* **61**: 339-345.
- Yang, H. C. and K. C. Shin. 1977. Studies on the production of yeast: (II) Yeasts utilizing methanol as sole carbon source. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **5**: 29-35.
- Yokote, Y., M. Sugimoto and S. Abe. 1974. Yeasts utilizing methanol as a sole carbon source. *J. Ferment. Technol.* **52**: 201-209.
- Kato, N., C. Sakazawa, T. Nishizawa, Y. Tani and H. Yamada. 1980. Purification and characterization of S-formylglutathione hydrolase from a methanol-utilizing yeast, *Kloeckera* sp. No. 2201. *Biochim. Biophys. Acta* **611**: 323-332.

(Received 17 April 1997)