

Article

포도 과피에서 분리한 효모 *Pichia manshurica*와 *Pichia terricola*의 생리활성 증진효과

박상국¹ · 김동민² · 오계현^{1*}

¹순천향대학교 자연과학대학 생명시스템학과, ²도쿄대학교 생명공학과

Enhanced physiological activities of wine yeasts *Pichia manshurica* and *Pichia terricola* isolated from grapes pericarp

Sang-Kook Park¹, Dong-Min Kim², and Kye-Heon Oh^{1*}

¹Department of Life Science and Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 31538, Republic of Korea

²Department of Biotechnology, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan

(Received August 16, 2017; Revised September 14, 2017; Accepted September 22, 2017)

The purpose of this study was to investigate the enhanced physiological activities of two *Pichia* strains, yeasts isolated from grapes pericarp. Based on phylogenetic analysis using 18S rRNA sequencing, two isolates were identified as *Pichia manshurica* GU-3 and *Pichia terricola* GU-4, respectively. The scanning electron microscopic analysis showed that the two isolates grown on YPD medium were of typical elliptical shape with buds and bud scars on cell surface. Physiological activities of the single and mixed *Pichia* cultures were monitored and compared. In mixed cultures after 72 h of incubation, the maximum activities of tyrosinase inhibition, ACE inhibition, and antioxidant were 81.7%, 45.9%, and 42.7%, respectively. Superoxide dismutase-like activity was approximately 30% in the mixed cultures. These studies demonstrate that *Pichia* species cultured in the form of mixture can enhance the physiological activities and has potential for the development of new bioactive products.

Keywords: *Pichia*, grape pericarp, physiological activity, yeast

포도주는 전세계 과일주 시장의 주종을 차지하고 있으며, 건강에 좋은 알코올성 음료로 알려지면서 포도주를 찾는 소비자

는 지속적으로 증가하고 있다. 프랑스와 그리스인들이 섭취하는 고지방 음식에 비해 낮은 심장 질환을 겪는 French paradox 현상을 적포도주의 적당한 섭취로 설명하는 연구들이 보고되면서 포도주는 건강기능성을 가진 식품으로 알려지게 되었다 (Frankel *et al.*, 1994; Goldberg *et al.*, 1995). 과피와 씨를 포함한 포도에는 페놀화합물인 resveratrol, quercetin, catechin, epicatechin 등의 다양한 생리활성물질이 존재하며, 생체 내에서 항산화, 심장병예방, 항암, 혈압강하, 동맥경화 및 노화 예방 등의 효능이 있는 것으로 보고되었다(Koh, 1999; Kim, 2009).

한편 양조 산업에서 포도를 포도주로 전환시키기 위해서는 효모나 세균과 같은 고도로 특화된 미생물들에 의한 발효과정이 필요하며, *Saccharomyces cerevisiae*가 가장 잘 알려져 있다 (Fleet, 1999; Mortimer and Polsinelli, 1999). 양조산업에서 이용되는 효모균주는 *Saccharomyces* 종과 비(非)*Saccharomyces* 종으로 나누어지며, 최근 비*Saccharomyces* 종에 대한 관심이 높아지고 있다. 비*Saccharomyces* 종은 포도밭에서 기인한 야생효모이며, 다양한 효소를 세포 밖으로 분비함으로써 와인의 향기성분 증가에 중요한 영향을 미친다는 연구가 발표되었다 (Charoenchai *et al.*, 1997). Bauer와 Pretorius (2000)의 연구에 따르면 포도주 발효공정에서 발견되는 *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia* 등의 비*Saccharomyces* 종들은 *S.*

*For correspondence. E-mail: kyeheon@sch.ac.kr;
Tel.: +82-41-530-1353; Fax: +82-41-530-1493

*cerevisiae*보다 낮은 발효활성을 가지나, 초기 발효과정을 수행하는 주요 균주로 보고되었다. 특히 *Pichia* 종은 맥주나 포도주 발효공정에서 유해균주로 알려져 있으나, *Pichia* 종과 일반 맥주효모, 그리고 호프를 함께 혼합할 경우에 시너지 효과가 발생하여 발효산물의 증가로 인해 맥주의 풍미와 맛을 증가시킨다는 연구가 보고된 바 있다(Sarens and Swiegers, 2012). Mo와 Chang (2007)은 분리한 *Pichia anomala* 균주가 음식과 음료의 품질을 향상시킬 뿐만 아니라, 장미향을 내는 phenylethyl alcohol을 생산하는 것으로 보고하였으며, Kim 등(2012)은 누룩에서 분리한 *Pichia* 균주를 이용하여 막걸리의 품질향상을 위한 연구를 수행하였다. 또한 *Pichia guilliermondii*가 *Rhizopus nigricans*에 의한 토마토의 무름병(*Rhizopus rot*)의 발병률을 감소시키는 효과가 있다는 연구가 보고된 바 있다(Zhao et al., 2008).

효모들 중에는 사람의 건강에 유익한 생리활성기능을 가지는 것들이 있으며, 최근에 이들 생리활성에 대한 관심이 집중되고 있다. 대표적인 생리활성으로는 (1) 멜라닌(melanin) 합성에 관여하는 효소 중 하나인 tyrosinase 저해활성은 미백물질 선별단계에서 필수적이며, tyrosinase가 세포 내에서 활성화되어 발생하는 멜라닌 과잉생산에 의한 색소침착 및 피부노화 등의 세포손상을 방지하는 것으로 알려져 있다(Lee et al., 1999; Song et al., 2007). (2) ACE (angiotensin-converting enzyme)는 인체 내에서 혈압조절기작 중의 하나인 renin-angiotensin 계에서 혈압상승과 유지에 중요한 작용을 하는 효소로서(Soffer, 1976), ACE의 저해활성은 angiotensin II의 생성저해, aldosterone 분비감소, 혈관확장제인 bradykinin의 증가 등을 통하여 혈압을 낮추어 줄 수 있다(Oh et al., 1997). (3) SOD (superoxide dismutase) 활성은 세포 내에서 생성된 활성산소를 산소와 과산화수소로 전환시키는 생체 내의 중요한 항산화 효소 활성 중의 하나이다. SOD에 의해 생성된 과산화수소는 catalase 또는 peroxidase에 의해 물분자와 산소분자로 전환되는데, 이 SOD는 활성산소에 의한 세포손상과 각종 기능장애를 예방한다(Ha et al., 2010). 또한 (4) 항산화능은 체내에 형성된 라디칼과 활성산소를 제거하여 세포노화, 암, 심혈관계질환 등의 생체 내에서 심각한 생리적인 장애를 유발하는 요인을 제거하는 기능을 가진다(Imlay and Linn, 1988; Namiki, 1990; Gardner and Fridovich, 1991).

본 연구에서는 국내에서 생산된 여러 종류의 포도의 과피로부터 두 가지의 *Pichia* 종을 분리하여, 이들 균주가 가지는 tyrosinase 저해활성, ACE 저해활성, 항산화능, SOD-유사활성 등의 여러가지 생리활성을 조사하였다. 또한 두 균주의 혼합배양의 생리활성의 상승효과를 단일배양의 활성과 비교하였다.

재료 및 방법

균주의 확보 및 배양조건

국내에서 재배된 캠벨포도, 거봉, 머루포도를 종류별로 구입하여 과피를 분리하고, 분리된 과피를 파쇄하였다. 과피파쇄물 5 g을 100 ml 생리식염수가 담긴 플라스크에 주입한 후, 진탕배양기에서 10분간 교반시켰다. 상등액 100 μ l를 취하여 YPD (yeast extract-peptone-dextrose) (Difco Co.) 고체평판배지에 도말하고 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 순수 배양기법으로 3회 반복하여, 총 6개의 균주를 분리하였다. 이들 균주를 대상으로 분자유전학적 및 형태학적 분석을 실시하였으며, *Pichia* 종으로 동정된 2개의 균주를 선별하였다. 이들 균주를 YPD 액체배지에 각각 접종하여, 진탕배양기에서 배양을 유지하며 본 실험에 사용하였다.

18S rRNA 염기서열의 계통수 분석

분리 균주들의 계통수를 작성하기 위하여 18S rRNA PCR을 수행하였다. 이들 균주로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR을 이용한 18S rRNA 유전자 증폭에 사용하였다. 18S rRNA 유전자 증폭을 위하여 사용된 primer로는 ITS1 (5'-TCCGTAGGGACCTGCGG-3')과 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 사용하였다. PCR의 수행조건은 이전에 발표된 방법에 따라 수행하였다(Kim et al., 2012). PCR에 의해 증폭된 DNA 단편을 전기영동한 다음, agarose gel extract kit (Intron)를 이용하여 gel 상에서 회수하였으며, ABI373 Automated sequencer를 이용하여 부분적인 염기서열을 결정하였다. 얻어진 염기서열을 바탕으로 NCBI의 BLAST 프로그램을 이용하여 상동성을 비교하고 균주를 동정하였다. 계통수 작성을 위하여 MEGA6 Software (Biodesign Institute)을 사용하였으며, neighbor joining 방식의 알고리즘을 이용하여 계통수를 작성하였다.

주사전자현미경에 의한 형태학적 관찰

분리세균의 세포외부형태를 관찰하기 위하여, 각 균주를 YPD 액체배지에 48시간 배양한 후, 원심분리(4°C, 13,000 rpm)하여 균체를 회수하고 phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 세척 후, 현탁하여 0.45 μ m membrane filter에 여과 흡착시켰다. 흡착된 균체를 2.5% glutaraldehyde와 1% OsO₄ (osmium tetroxide)로 각각 3시간 동안 고정하고, 다양한 농도의 에탄올(50%, 60%, 70%, 80%, 90%, and 95%)을 준비하여, 저농도로부터 점차 고농도로 높여가면서 각 농도별로 15분씩 연속적으로 탈수시켰다. 마지막으로 무수 에탄올에 20분간 3회 처리하여 완

전히 탈수시켰다. 탈수된 균체를 HMDS (hexamethyldisilazane) 원액으로 20분간 2회 처리하여 공기 중에서 완전히 건조시켰다. 건조된 시료는 sputter coater (IB-3, Giko Engineering Co.)를 사용하여 2 mA로 5분간 gold coating한 후, 주사전자현미경 (LEO 1455VP, ZEISS)으로 관찰하였다(Choi and Park, 1999).

분석시료의 준비

분리 및 혼합 배양 균주는 각각 YPD 액체배지에 접종하여 30°C에서 72시간 동안 배양하였으며, 8시간마다 배양액을 채취하여 분석시료를 준비하였다. 배양액은 15분동안 원심분리(4°C, 13,000 rpm)하여 균체를 회수한 후, PBS로 3회 세척하고, 초음파분쇄기로 균체를 파쇄하였으며, 30분간 다시 원심분리하여 얻은 상등액을 분석시료로 사용하였다.

Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성측정은 Yagi 등(1986)의 방법으로 측정하였으며, 기질로서는 L-tyrosine을 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 0.3 mg/ml의 농도로 완전히 녹여 사용하였다. 시료 250 µl에 L-tyrosine 용액 200 µl를 적절하게 혼합한 후, tyrosinase 50 µl를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. Buffer 500 µl를 첨가하여 총 부피를 1 ml로 맞춘 후, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 시료액 대신에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 첨가하여 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibitory activity (\%)} = [(C-T)/C] \times 100$$

C: buffer 첨가 시 475 nm에서의 흡광도

T: 시료 첨가 시의 흡광도

ACE 저해활성 측정

Cushman과 Cheung (1971)의 방법을 변형시켜 ACE 저해활성을 측정하였다. 0.3 M NaCl을 포함한 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3)에 rabbit lung acetone powder (Sigma)를 0.1 g/ml (w/v)의 농도로 4°C에서 24시간 동안 교반 추출한 후, 추출액을 40분간 원심분리(4°C, 4,000 ×g)하여 얻은 상등액을 ACE 조효소액으로 사용하였다. ACE 저해활성은 시료 50 µl에 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3) 100 µl와 ACE 조효소액 50 µl를 가하여 37°C에서 10분간 예비반응 시킨 후, 기질로서 0.3 M NaCl이 포함된 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3) 5 ml에 Hip-His-Leu (hippuryl-histidyl-leucine) 25 mg을 첨가하여 만든 기질을 50 µl를 가하여 다시 37°C에서 30분간 반응시켰다. 1 N HCl 250 µl를 가하여 반응을 정지시키고, ethyl

acetate 1 ml를 가하여 30초간 교반시킨 후, 15분동안 원심분리(4°C, 3,000 ×g)하여 상등액을 취하였다. 이 상등액을 speed vac concentrator (EYELA Co.)를 이용하여 완전히 건조시킨 후, 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3) 1 ml에 용해시켜 228 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 아래의 식을 이용하여 ACE 저해활성을 계산하였다:

$$\text{ACE inhibitory activity (\%)} = [(C-T)/C] \times 100$$

C: 시료대신 증류수 첨가 시 228 nm에서의 흡광도

T: 시료 첨가 시의 흡광도

항산화능 측정

항산화능은 Blois의 방법(1958)을 사용하여 측정하였다. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (Sigma)는 에탄올에 녹여 1 mM 농도로 제조하여, 측정 시 0.1 mM로 희석하여 사용하였다. 시료 50 µl에 DPPH 용액 1 ml와 Tris-HCl (pH 7.4) 450 µl를 잘 혼합하여 37°C에서 암실조건을 유지시킨 상태로 30분간 반응시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다:

$$\text{DPPH radical scavenging capacity (\%)} = [(C-T)/C] \times 100$$

C: DPPH 대신 80% 에탄올 첨가 시 517 nm에서의 흡광도

T: 시료첨가 시의 흡광도

SOD-유사활성 측정

SOD-유사활성은 Marklund와 Marklund의 방법(1974)으로 측정하였다. 시료 200 µl에 50 mM Tris-HCl buffer (10 mM EDTA 포함, pH 8.5) 3 ml과 7.2 mM pyrogallol 200 µl를 혼합하여 25°C, 암실조건 하에서 10분간 반응시킨 후, 1 N HCl 1 ml를 가하여 반응을 정지시켰으며, 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료액 대신에 50 mM Tris-HCl buffer (10 mM EDTA 포함, pH 8.5)를 200 µl를 첨가하여 동일조건으로 반응시킨 후, 흡광도를 측정하고 활성도를 산출하였다:

$$\text{SOD-like activity (\%)} = [(C-T)/C] \times 100$$

C: buffer 첨가 시 420 nm에서의 흡광도

T: 시료첨가 시의 흡광도

결과 및 고찰

18S rRNA 염기서열의 계통수 분석

포도과피에 서식하는 6개 효모균주를 YPD 고체배지상에

서 집락의 특성을 바탕으로 분리하였다. 분리균주의 집락 표면은 4개의 균주에서 습기에 의해 반짝였으며, 2개의 균주는 거칠어 보이는 것으로 관찰되었다. 후자에 해당하는 2개의 균주에 대하여 각각 GU-3와 GU-4로 명명하고 동정을 실시하였다. 선별된 2가지 균주에 대하여 염기서열을 부분적으로 결정하고, NCBI의 BLAST 분석프로그램을 사용하여 상동성을 서로 비교하였으며, 그 결과 분리균주는 각각 *Pichia manshurica*와 *Pichia terricola*로서, 모두 99%의 유전적 상동성을 보여주었다. 본 연구에서 이들 균주는 각각 *Pichia manshurica* GU-3와 *Pichia terricola* GU-4로 명명하였다. BLAST 분석결과를 바탕으로 분리균주와 *Pichia* 속(genus)에 속하는 다른 균주들과의 계통학적 유연관계는 Fig. 1에 나타내었다.

주사전자현미경을 통한 세포관찰

분리된 효모균주 *P. manshurica* GU-3와 *P. terricola* GU-4의

세포 외부형태는 주사전자현미경(SEM)을 이용하여 관찰하였다(Fig. 2). 그 결과 두 균주는 타원형의 효모로 관찰되었으며, 세포의 표면에서 전형적인 효모균주의 특징 중 하나인 많은 출아흔적(bud scar)과 출아(bud), 그리고 출아법(budding)을 통해 증식하는 모양도 관찰되었다(Fig. 2). *Pichia* 균주의 세포 형태는 양조 및 제빵에 널리 사용되는 *Saccharomyces cerevisiae*의 난형(*cerevisiae* form)과는 차이가 있는 것으로 확인되었다.

Tyrosinase 억제활성

P. manshurica GU-3와 *P. terricola* GU-4에 대하여 멜라닌(melanin) 합성에 관여하는 tyrosinase를 저해하는 능력을 측정하였다(Fig. 3). *P. manshurica* GU-3와 *P. terricola* GU-4 균주 모두에서 배양 24시간에서 최대활성을 나타냈으며, 각각 75.6%와 65.3%로 측정되었다. 두 균주의 혼합배양의 활성은 32시간에서 81.7%로 나타났는데, 이는 단일배양에서의

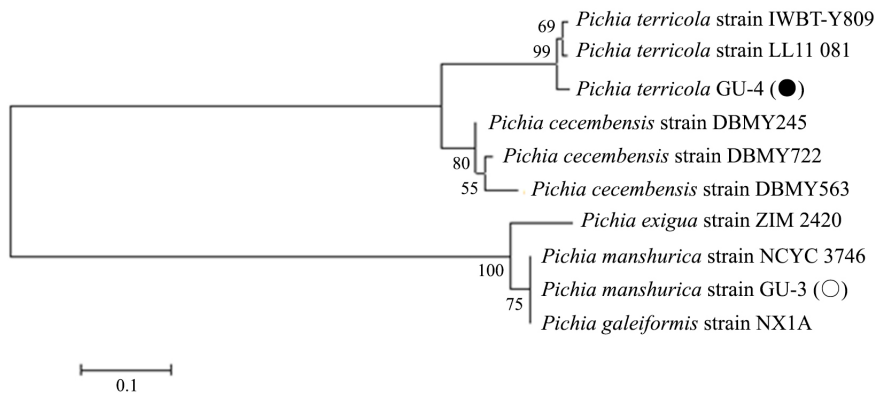


Fig. 1. Phylogenetic analysis of *P. manshurica* GU-3 (○) and *P. terricola* GU-4 (●) with the related species of the genus *Pichia* based on the 18S rRNA gene sequence comparisons. Bootstrap percentages (based on 500 replicates) > 50% are shown at branch points. Bar, 0.1 substitutions per nucleotide position.

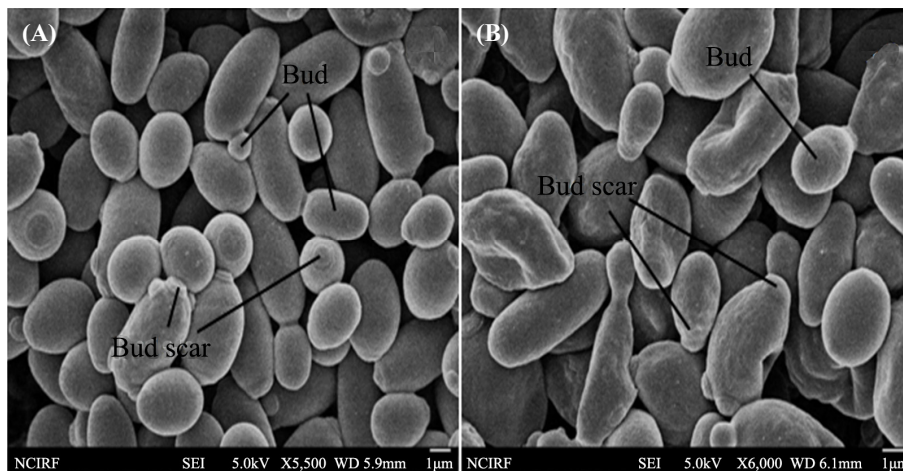


Fig. 2. Scanning electron micrographs of *P. manshurica* GU-3 (A) and *P. terricola* GU-4 (B) isolated from grapes pericarp.

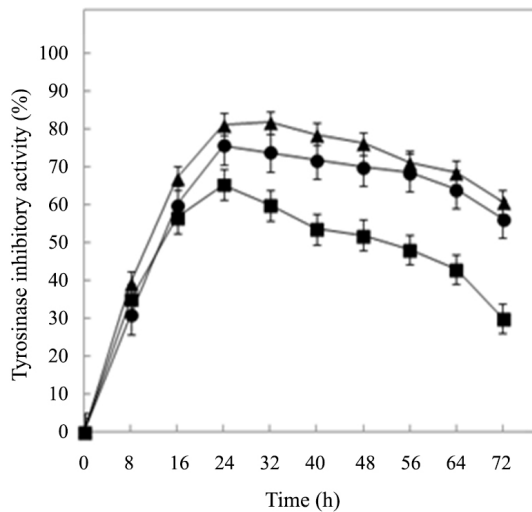


Fig. 3. Tyrosinase inhibitory activity by pure cultures, *P. manshurica* GU-3 (●) and *P. terricola* GU-4 (■), and their mixed culture (▲) during growth at 30°C. Error bars represent standard deviations based on three independent replicates.

활성과 비교하여 볼 때 상당히 높은 값이다. Jang 등(2012)은 9가지의 *Pichia* 균주를 대상으로 tyrosinase 저해활성을 측정할 결과, *Pichia burtonii* Y86-5 균주가 17.9%로 측정한 균주가운데 가장 높은 활성을 나타내었다고 보고하였다. 또한 Hyun 등(2014a)은 울릉도 야생화로부터 분리한 *Pichia silvicola*의 tyrosinase 억제활성이 약 7.4%였다고 보고하였다. 최근까지 보고된 *Pichia* 종의 tyrosinase 저해활성 연구결과들과 비교하여 볼 때, *P. manshurica* GU-3과 *P. terricola* GU-4에서 tyrosinase 억제활성은 월등히 높은 것으로 확인되었는데, 이 결과는 분리균주가 미백효과를 나타내는 멜라닌 합성저해에 더욱 효과적일 것으로 사료된다.

ACE 저해활성

P. manshurica GU-3와 *P. terricola* GU-4의 ACE 저해활성은 rabbit lung acetone powder에서 추출한 ACE 조효소액을 사용하여 측정하였다(Fig. 4). ACE 저해최대활성은 40시간 동안 배양한 *P. manshurica* GU-3와 32시간 동안 배양한 *P. terricola* GU-4에서 각각 38.8%와 35.2%로 측정되었다. 또한 두 효모의 혼합배양에서 ACE 저해활성은 40시간 동안 배양하였을 때, 45.9%로 탁월한 상승효과를 나타내었다. Kang 등(2011)은 *P. burtonii*의 배양액을 이용한 ACE 저해활성에서 29.6%의 활성이 나타나는 것으로 보고하였다. 또한 Hyun 등(2014b)은 야생화로부터 분리한 *Pichia holstii*의 배양액으로부터 약 16.9%의 ACE 저해활성을 보고하였다. 본 연구에서 사용된 GU-3와 GU-4 효모의 단일 및 혼합배양이 배양 중에

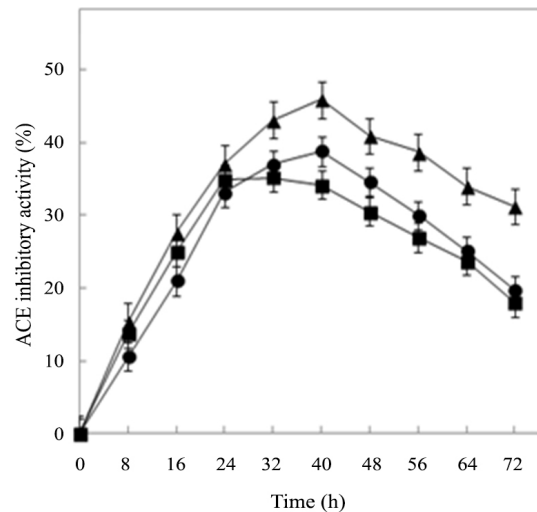


Fig. 4. ACE inhibitory activity by pure cultures, *P. manshurica* GU-3 (●) and *P. terricola* GU-4 (■), and their mixed culture (▲) during growth at 30°C. Error bars represent standard deviations based on three independent replicates.

보여준 ACE 저해활성은 탁월한 결과로서, ACE 저해활성으로 기대되는 혈관수축에 관여하는 angiotensin의 전환반응과 관련된 기능성을 크게 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

항산화능

P. manshurica GU-3와 *P. terricola* GU-4의 항산화능을 측정하기 위하여 DPPH 라디칼 소거활성을 측정하였다(Fig. 5). DPPH 라디칼 소거능은 *P. manshurica* GU-3의 경우에 배양 개

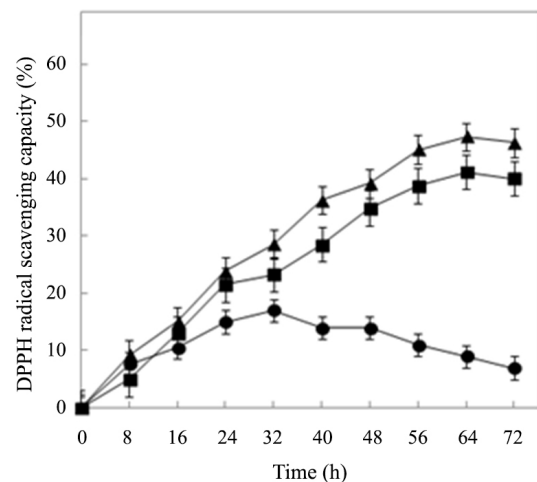


Fig. 5. Antioxidant activity by pure cultures, *P. manshurica* GU-3 (●) and *P. terricola* GU-4 (■), and their mixed culture (▲) by DPPH radical scavenging capacity during growth at 30°C. Error bars represent standard deviations based on three independent replicates.

시 후, 시간이 경과함에 따라 서서히 상승하여 32시간에 최대 17%의 활성을 보였으며, 그 후에는 감소되는 것으로 나타났다. 이에 비하여 *P. terricola* GU-4는 배양초기부터 지속적으로 상승하였으며, 배양 64시간에 최대 41%의 우수한 활성을 보여주었다. 혼합배양의 활성은 64시간에서 47.2%로 측정되었다. 유로부터 분리한 *Pichia fermentans*와 *P. guilliermondii*의 항산화능은 각각 27.4%과 13%로 보고된 바 있다(Chen et al., 2010). 이와 비교하여 볼 때, 본 연구에서 사용된 두 균주의 단일 및 혼합배양은 이전에 보고된 항산화능 측정결과와 비교하여 매우 우수한 것으로 나타났다. 또한 Jang 등(2011)이 보고한 배찌꺼기 추출물을 이용한 효모균주의 배양과 기능성을 조사한 실험에서 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7904이 보여준 항산화능은 불과 4.7% 정도였다. 일반적으로 *Saccharomyces* 종은 여러 가지 기능성 측면에서 비*Saccharomyces* 종과 비교하여 많은 연구가 진행되어왔다. 따라서 본 연구에서 얻어진 GU-3와 GU-4의 항산화능 활성 결과는 비*Saccharomyces* 종인 *Pichia* 종도 생리활성 기능이 우수하다는 것을 제시하고 있다.

SOD-유사활성

체내 활성산소를 제거하는 SOD와 유사한 활성을 나타내는 지 조사하기 위하여 두 분리효모의 SOD-유사활성을 측정하였다(Fig. 6). 분리효모를 단일배양한 경우에, *P. manshurica* GU-3와 *P. terricola* GU-4의 활성은 각각 26.5%와 24.4%로 측정되었으며, 두 효모를 혼합배양하였을 경우에 30.1%로 상

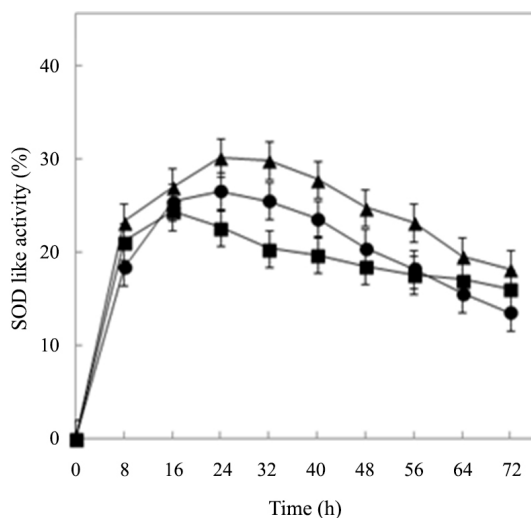


Fig. 6. SOD-like activity by pure cultures, *P. manshurica* GU-3 (●) and *P. terricola* GU-4 (■), and their mixed culture (▲) during growth at 30°C. Error bars represent standard deviations based on three independent replicates.

승된 결과를 보여주었다. Kim 등(2008)은 인삼폐액에 배양한 *Pichia anomala* KCCM 11473의 SOD-유사활성을 측정하였다. 폐액에서 배양된 경우에 SOD-유사활성이 약 13%로 나타났으나, 일반적인 효모배양에 사용되는 YPD 배지에서는 SOD-유사활성은 측정되지 않았다고 보고하였다. 본 실험에 사용된 두 분리효모의 효소활성은 단일배양과 혼합배양 모두에서 상당히 우수하게 나타났다.

본 실험에서 포도과피에서 분리된 두 가지 *Pichia* 종은 여러 가지 생리활성에서 상당히 우수한 것으로 나타났다. 또한 혼합배양으로부터 얻어진 결과가 단일배양에서의 결과보다 증진된 결과를 보여주었다. 지금까지 효모균주와 관련된 생리활성 연구는 주로 *Saccharomyces* 종에서 활발히 이루어져 온데 비하여, 비*Saccharomyces* 종에 대한 연구는 상대적으로 그 연구가 미비하였던 것이 사실이다. 향후 *Pichia* 종에 대한 보다 다양하고 향상된 생리활성 증진연구와 *Pichia* 종과 다른 효모 간의 생리활성 비교연구를 통하여, 인체에 미치는 생리활성 효과에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

적 요

본 연구는 포도의 과피에서 분리한 효모 *Pichia*의 생리활성 증진효과를 연구하기 위한 것이다. 두 균주는 18S rRNA 염기서열분석에 근거하여 *Pichia manshurica* GU-3와 *Pichia terricola* GU-4로 각각 동정되었다. 주사전자현미경 분석을 통해 YPD 배지에서 배양한 두 분리세균은 세포표면에 출아와 출아흔적을 가지고 있었으며 전형적인 타원형을 보여주었다. 단일 및 혼합 *Pichia* 배양의 생리활성을 비교 관찰한 결과, 72시간 배양한 후, 혼합배양에서 tyrosinase 억제, ACE 억제, 항산화 최대활성은 각각 81.7%, 45.9%, 42.7%로 나타났다. Superoxide dismutase-유사활성은 혼합배양에서 약 30%로 측정되었다. 이 연구를 통해서 혼합배양된 *Pichia* 종들은 생리활성을 증진시켰으며, 생리활성을 가지는 산물 개발의 가능성을 가지는 것으로 입증되었다.

감사의 말

본 연구는 순천향대학교의 학술연구지원사업의 연구비 지원 하에 수행되었습니다.

References

- Bauer, F.F. and Pretorius, I.S.** 2000. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine—a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**, 27–51.
- Blois, M.S.** 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199–1203.
- Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschke, P.A., and Todd, B.E.N.T.** 1997. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian J. Grape Wine Res.* **3**, 2–8.
- Chen, L.S., Ma, Y.I.N.G., Maubois, J.L., Chen, L.J., Liu, Q.H., and Guo, J.P.** 2010. Identification of yeasts from raw milk and selection for some specific antioxidant properties. *Int. J. Dairy Technol.* **63**, 47–54.
- Choi, M.H. and Park, Y.H.** 1999. Growth of *Pichia guilliermondii* A9, an osmotolerant yeast, in waste brine generated from kimchi production. *Bioresour. Technol.* **70**, 231–236.
- Cushman, D.W. and Cheung, H.S.** 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* **20**, 1637–1648.
- Fleet, G.H.** 1999. Microorganisms in food ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* **50**, 101–117.
- Frankel, E.N., Parks, E.J., Xu, R., Schneeman, B.O., Davis, P.A., and German, J.B.** 1994. Effect of n-3 fatty acid-rich fish oil supplementation on the oxidation of low density lipoproteins. *Lipids* **29**, 233–236.
- Gardner, P.R. and Fridovich, I.** 1991. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *J. Biol. Chem.* **266**, 1478–1483.
- Goldberg, D.M., Hahn, S.E., and Parkes, J.G.** 1995. Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clin. Chim. Acta* **237**, 155–187.
- Ha, J.H., Jeong, M.H., Seo, Y.C., Choi, W.Y., Kim, J.S., Kim, H.H., Ahn, J.H., and Lee, H.Y.** 2010. Enhancement of antioxidant activities of bark of *Berberiskoreana* Palibin by lactic acid fermentation. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **18**, 421–428.
- Hyun, S.H., Lee, H.B., and Lee, J.S.** 2014a. Characteristics of two unrecorded yeasts from wild flowers in Ulleungdo, Korea. *Mycobiology* **42**, 170–173.
- Hyun, S.H., Han, S.M., and Lee, J.S.** 2014b. Characteristics and physiological functionalities of unrecorded yeasts from wild flowers of seonyudo in Jeollabukdo, Korea. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 402–406.
- Imlay, J.A. and Linn, S.** 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**, 1302.
- Jang, I.T., Kang, M.G., Na, K.C., and Lee, J.S.** 2011. Growth characteristics and physiological functionality of yeasts in pear marc extracts. *Mycobiology* **39**, 170–173.
- Jang, I.T., Kim, Y.H., Kang, M.G., Yi, S.H., Lim, S.I., and Lee, J.S.** 2012. Production of tyrosinase inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*. *Korean J. Mycol.* **40**, 60–64.
- Kang, M.G., Kim, H.K., Yi, S.H., Lim, S.I., and Lee, J.S.** 2011. Screening new antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor-producing yeast and optimization of production condition. *Korean J. Mycol.* **39**, 194–197.
- Kim, N.M., So, S.H., Lee, S.G., Song, J.E., Seo, D.S., and Lee, J.S.** 2008. Physiological functionality and enzyme activity of biomass from *Pichia anomala* grown on ginseng-steaming effluent. *Mycobiology* **36**, 148–151.
- Kim, S.S.** 2009. Healthy characteristics of wine & French paradox. *Food Ind. Nutr.* **14**, 54–56.
- Kim, H.L., Kim, J.H., Bai, D.H., and Ahn, B.H.** 2012. Feasibility of brewing *Makgeolli* using *Pichia anomala* Y197-13, a non-*Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 1749–1757.
- Koh, K.H.** 1999. Healthy characteristics of wine. *Food Ind. Nutr.* **4**, 20–25.
- Lee, S.H., Kim, S.Y., Kim, J.J., and Jang, T.S.** 1999. The isolation of the inhibitory constituents on melanin polymer formation from the leaves of *Cercis chinensis*. *Korean J. Pharmacogn.* **30**, 397–403.
- Marklund, S. and Marklund, G.** 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469–474.
- Mo, E.K. and Chang K.S.** 2007. Isolation and identification of phenylethyl alcohol from *Pichia anomala* SKM-T. *J. Appl. Biol. Chem.* **50**, 29–31.
- Mortimer, R. and Polsinelli, M.** 1999. On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.* **150**, 199–204.
- Namiki, M.** 1990. Antioxidants/antimutagens in food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **29**, 273–300.
- Oh, S.J., Kim, S.H., Kim, S.K., Baek, Y.J., and Cho, K.H.** 1997. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the κ -casein fragments hydrolysed by chymosin, pepsin, and trypsin. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**, 1316–1318.
- Sarens, S. and Swiegers, J.H.** 2012. Enhancement of beer flavor by a combination of *Pichia* yeast and different hop varieties. U.S. patent application no. 14/241,761.
- Soffer, R.L.** 1976. Angiotensin I-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 73–94.
- Song, H.S., Moon, H.J., Park, B.E., Choi, B.S., Lee, D.J., Lee, J.Y., Kim, C.J., and Sim, S.S.** 2007. Anti-oxidant activity and whitening activity of bamboo extracts. *Yakhak Hoeji* **51**, 500–507.
- Yagi, A., Kanbara, T., and Morinobu, N.** 1986. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Med.* **3981**, 517–519.
- Zhao, Y., Tu, K., Shao, X., Jing, W., and Su, Z.** 2008. Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **49**, 113–120.