

Hansenula anomala var. *anomala*와 *Saccharomyces cerevisiae*의 原形質體 再生에 관한 研究

具英祖 · 朴完洙 · 申東禾 · 劉太鍾*

農漁村開發公社 綜合食品研究院

*高麗大學校 食品工學科

(1985년 6월 7일 수리)

Regeneration of Yeast Protoplast in *Hansenula anomala* var. *anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*

Young Jo Koo, Wan Soo Park, Dong Hwa Shin and *Tae Jong Yu

Food Research Institute/AFDC, Hwasung-Kun, Kyunggi-Do, 170-31

*Dept. of Food Technology, Korea University, Seoul, 132

(Received June 7, 1985)

Studies were conducted on the conditions for yeast protoplast regeneration in *Hansenula anomala* var. *anomala* FRI YO-32 and *Saccharomyces cerevisiae*. Protoplasts lysed when suspended in hypotonic solutions of KCl, and the least degree of osmolysis was shown in the hypertonic solution containing 1.4M KCl for the strain FRI YO-32 or 0.8M KCl for *S. cerevisiae*. It was considered that the concentration of agar and KCl, and protoplast plating method were the main factors influencing regeneration of yeast protoplasts. Yeast protoplasts were regenerated very favorably when embedded in the complete protoplast regeneration media containing 3% agar as well as 0.4M KCl for the strain FRI YO-32 or 1.0M KCl for *S. cerevisiae*. It was shown from the relationship between protoplast formation and regeneration that the higher extent of protoplast formation, the lower extent of protoplast regeneration.

효모원형질체의 재생에 관한 연구는 세포벽의 합성 및 대사물질의 전달과 세포융합 또는 형질전환 등의 유전적 조작에 관한 연구와 더불어 수행되어 왔다. 이러한 원형질체 재생현상은 일반적으로 생명체의 기본 특성중의 하나로서, 손상된 구조와 기능의 정상회복능력이다.

Necas⁽¹⁾는 "protoplast regeneration"의 개념을 단순한 "cell wall regeneration"이나 "protoplast reversion"과 같은 개념으로 생각하지 않고, 첫단계: cell wall regeneration, 둘째단계: reversion 세째단계: growth phase의 3사건들로 이루어져 있다고 보고하였다.

많은 연구자들의 보고에 의하면 효모원형질체 재

생을 위한 중요한 인자로서 물리적 배양조건을 강조하였다. 즉 원형질체 재생시 사용되는 agar나 gelatin에 의한 gel strength, 삼투압안정제 및 배양 온도등을 고려하였으며, 배양온도는 균주의 최적 성장온도가 좋다고 보고하였다.⁽²⁾

본 연구에서는 전보^(3,4)에서 보고한 전분 이용성 효모 *Hansenula anomala* var. *anomala*와 *Saccharomyces cerevisiae*의 원형질체를 제조하여, 이들 효모원형질체의 재생을 위한 최적조건 설정실험을 수행하였던 바, 그 기초자료를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

사용균주와 기본배지 및 배양조건

저자등⁽³⁾이 순수분리한 *Hansenula anomala* var. *anomala* FRI YO-32와 *Saccharomyces cerevisiae* KFCC 32356 (IFO 0849)를 사용하였다.

균주보관 및 균주계대는 저자등⁽³⁾이 보고한 방법에 준하였으며, 본 실험에서 사용한 YPD배지등은 F. Sherman등⁽⁴⁾이 제시한 상법에 따라서 사용하였다.

배양온도는 모든 실험에서 30°C로 하였으며, 기타 배양조건은 저자등⁽³⁾이 사용한 방법에 준하였다.

원형질체 형성 및 재생실험

공시균주의 원형질체 형성을 위한 기본처리방법은 J. J. Wilson등⁽⁵⁾의 방법에 준하여 저자등⁽⁴⁾이 보고한 방법에 따라 수행하였다.

원형질체 재생을 위한 최적조건 구명실험을 수행하기 위하여, 여러가지 농도의 agar와 KCl을 함유한 YPD배지(원형질체 재생배지)속에, 준비된 원형질체 현탁액을 원형질체 완충용액으로 적당히 희석하여 일정량씩 혼합한 뒤 30°C에서 7일간 배양하면서 완전세포로 재생 복귀되는 현상을 관찰하였다.

원형질체형성수율(protoplast yield) 및 재생효율(regeneration efficiency)의 측정

원형질체형성수율은 생균수변화에 의하여 다음과 같이 측정하였다. 형성된 원형질체를 증류수로 osmotic lysis시킨후 YPD배지에 배양하였을 경우 나타나는 colony 수를 원형질체가 되지 않은 세포수로 하여 효소처리전의 초기세포수에 대한 비율로 아래와 같이 계산하였다.

$$PY (\%) = \frac{X_o - X_{np}}{X_o} \times 100$$

X_o : 효소처리전의 생균수

X_{np} : 효소처리후 osmotic lysis시킨후의 생균수

원형질체 재생효율은 각 처리구의 재생용 배지에 원형질체 현탁액을 적당히 희석시킨 액을 집중하여 완전세포로 재생한 colony 수를 형성된 원형질체 수에 대한 비율로 다음과 같이 계산하였다.

$$R. E. (\%) = \frac{X_r - X_{np}}{X_o - X_{np}} \times 100$$

X_r : 재생용배지에서 계수된 총재생 세포수

삼투압분해율(Degree of Osmolysis)의 측정

여러가지 농도의 KCl을 함유한 0.05M Tris-HCl

완충용액(pH 7.5)에서 원형질체의 삼투압 안정성 측정시에, 각 처리구의 원형질체 현탁액을 일정한 기간동안 실온에서 방치한 후, 0.8M KCl을 함유한 Tris 완충용액으로 세척하여 spectrophotometer (B&L spectronic 21)을 사용하여 525nm에서 흡광도를 측정하여 초기 원형질체 현탁액의 흡광도에 대한 비율로 아래와 같이 측정하였다.

$$D. O. (\%) = \frac{A_o - A_t}{A_o} \times 100$$

A_o : 초기 원형질체현탁액의 흡광도

A_t : 일정한 기간 방치한 후 원형질체현탁액의 흡광도

결과 및 고찰

효모원형질체의 삼투압안정성

효모원형질체의 재생에 관한 실험에 앞서, 원형질체용 완충용액에서의 삼투압 안정성을 검토하기 위하여 여러가지 농도의 KCl을 함유한 원형질체용 완충용액에 효모원형질체를 현탁시켜 실온에서 하루를 방치한 다음, osmotic lysis의 정도를 비교 검토한 결과는 Fig. 1과 같다.

Fig. 1에서 보는 바와같이 0.6M KCl 이하의 농도에서는 FRI YO-32 균주와 *S. cerevisiae*는 거의 같은 정도의 심한 osmotic lysis를 보여주나 1.0 M KCl 이상에서는 FRI YO-32 균주가 *S. cerevisiae* 보다 내삼투압성을 보여 주었다. 이때 원형질체용

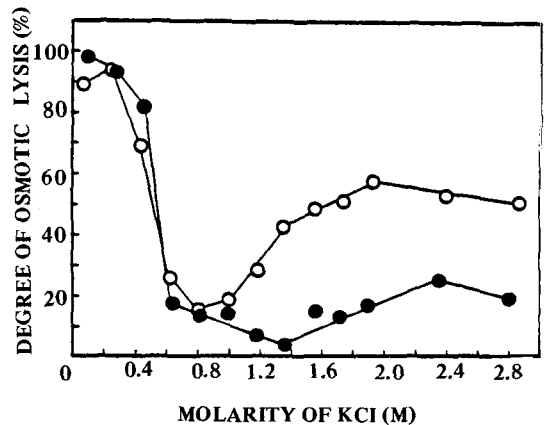


Fig. 1 Effect of molarity of osmotic stabilizer (KCl) on the stability of yeast protoplasts in the strain FRI YO-32 (● - ●) and *S. cerevisiae* (○ - ○)

완충용액의 최적 KCl 농도는 FRI YO-32 균주인 경우 1.4M *S. cerevisiae*는 0.8M로 사료되었으며, 이러한 각 원형질체용 완충용액을 사용할 경우 각 효모원형질체의 안정성이 최대로 유지될 수 있다고 판단되었다.

Svihla 등⁽⁶⁾의 보고에 의하면 *Candida utilis*의 원형질체는 0.6M KCl 용액속에서 4℃로 보관하였을 경우 2 개월 이상 osmolysis가 일어나지 않았으며, 25℃인 경우에도 1 주일 이상을 견딜 수 있었다. 또한 원형질체의 삼투압내성에 대한 배양온도와 금속이온의 효과를 보고한 Diamond 등⁽⁷⁾의 보고에 의하면 배양온도가 30℃ 이하로 낮을 수록 삼투압내성이 증가하고 금속이온, 특히 Ca⁺⁺은 효모원형질체의 삼투압내성을 증가시켰다.

효모원형질체의 재생효율의 측정과 그 영향인자 저자들은 전보⁽⁴⁾에서 효모원형질체 형성에 영향을 주는 인자들에 대하여 고찰하였으며 이때 원형질체 형성수율은 실험방법적으로 간편하고 편리한 흡광도변화에 의하여 측정하였다. 그러나 효모원형질체의 형성수율 및 재생효율은 실제적으로 효모세포나 원형질체의 viability를 고려하여 측정하는 것이 바람직하다고 사료되었다.

일반적으로 효모원형질체의 재생에 영향을 주는 인자로서 agar 나 gelatin에 의한 물리적인 gel strength, 삼투압안정제 배양온도등이 주로 고려되고 있으며 이때 효모원형질체의 재생을 위한 배양온도는 모균주의 배양최적온도로 사료되었다.⁽⁸⁾

이러한 사항들을 예비적으로 평가하기 위하여 기준균주로서 *H. anomala var. anomala* FRI YO-32 균주를 사용하여 실험한 결과는 Table 1 과 같다. Table 1에서 보는 바와같이 흡광도변화에 의한 원형질체 형성효율은 89.23%인데 반하여 생균수측정에 의한 원형질체 형성효율은 99.27%로 높게 측정되었다. 이러한 이유는 원형질체의 osmolysis 후 흡광도 측정시 세포벽산재에 의한 흡광도의 증가 경향, 또는 생균수측정시 전처리 및 효소처리에 의한 viability loss에 의하여 osmolysis 후의 원형질체가 되지 않은 생균수의 감소경향으로 사료되었다. 이와같이 제조된 원형질체의 재생효율을 측정하기 위하여 삼투압안정제의 첨가 유무에 따라서 여러가지 농도의 agar 를 포함한 YPD를 이용하여 pouring culture method에 의하여 재생효율을 측정한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

KCl을 첨가한 경우는 첨가하지 않은 경우에 비하여 훨씬 높은 재생효율을 보여 주었으며 이때 agar

Table 1. Evaluation of protoplast yield and regeneration efficiency in the strain FRI YO-32

	Conc. of cell (Ab. or cells/ml)	Protoplast yield (%)	Regeneration Efficiency (%)
Initial absorbance (at 525 nm)	0.659		
Absorbance after osmolysis	0.071	89.23	
Initial viable cell	7.25x10 ⁸		
Viable cell after osmolysis	1.85 x 10 ⁵	99.97	
Pouring culture without KCl:			
Agar, 0.5-3.0%	0.93-1.78x10 ⁵		
Pouring culture with KCl (1.4M)			
: Agar, 0.5%	0.75 x 10 ⁶		0.10
1.5%	3.37 x 10 ⁶		0.46
3.0%	4.5 x 10 ⁷		6.21

농도가 증가할수록 재생효율이 증가하는 경향을 보여 주었고, KCl을 첨가하지 않은 경우에는 agar 농도에 따라서 별차이가 없었다.

이상의 결과로 볼 때 효모의 원형질체 재생에 영향을 끼치는 인자로서 삼투압안정제와 agar 농도가 중요하다고 사료되었다.

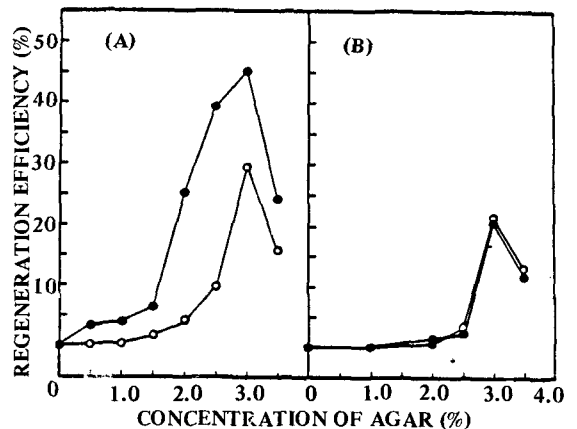


Fig. 2 Effect of agar concentration on protoplast regeneration in the strain FRI YO-32 (A) and *S. cerevisiae* (B) at various concentration of KCl (● - ●; 0.6M, ○ - ○; 1.4M)

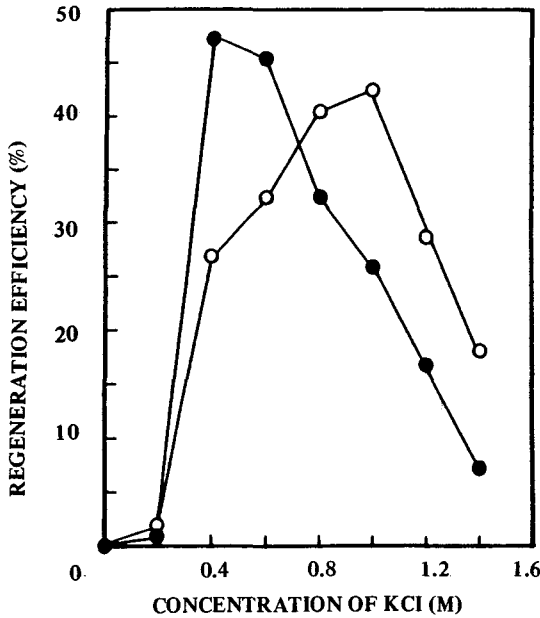


Fig. 3 Effect of concentration of osmotic stabilizer (KCl) on protoplast regeneration in *S. cerevisiae* (○-○) and the strain FRI YO-32 (●-●)

효모원형질체의 재생에 대한 agar 및 삼투압안정제 농도의 영향

앞에서 검토하였듯이 효모원형질체의 재생에 영향을 주는 중요한 인자로서 agar 농도와 삼투압안정제 KCl의 농도를 설정하였으며, 우선 일정한 KCl 농도하에서 FRI YO-32균주와 *S. cerevisiae*의 원형질체 재생에 대한 agar 농도의 영향을 검토한 결과는 Fig. 2와 같다.

두 균주의 원형질체 재생을 위한 최적 agar 농도는 모두 3%로 관찰되었으며, FRI YO-32 균주는 0.6M KCl의 경우 45.3%의 높은 재생율을 관찰할 수 있었고 *S. cerevisiae*는 약 21%의 재생율을 보여주었다.

이러한 3% agar을 함유한 원형질체 재생배지에 여러 농도의 KCl을 첨가하여 FRI YO-32균주와 *S. cerevisiae*의 원형질체 재생을 검토한 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 3에서 보는 바와같이 FRI YO-32 균주의 경우 0.4M KCl일때 재생효율이 가장 좋았고 KCl 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보여주었다. 반면에 *S. cerevisiae* 경우에는 KCl 농도가 증가할수록 재생효율이 증가하여 1.0M KCl에서 가장 좋은 재생효율을 보여주었다.

이러한 결과는 Fig. 1에서 보았듯이 각 효모원형

질체의 삼투압안정성에 대한 결과와 상반된 결과로서, FRI YO-32는 1.4M KCl에서 0.4M KCl로, *S. cerevisiae*는 0.8M KCl에서 1.0M KCl로 삼투압안정성에 대한 최적 삼투압안정제의 농도가 재생을 위한 최적 삼투압안정제의 농도로 변화되었다.

효모원형질체의 재생에 대한 재생배양 방법의 효과

효모원형질체의 재생에 영향을 끼치는 주요 인자로서 agar나 삼투압안정제의 농도외에 재생배양 방법을 고려하지 않을 수 없다.

여러 연구자들(***))에 의하여 지적되었듯이 효모원형질체가 성공적으로 재생되기 위해서는 적당한 gel strength를 갖는 물질속에 embedding되어야 한다.

H. anomala var. *anomala* FRI YO-32와 *S. cerevisiae*의 원형질체 재생에 대한 surface plate method, pour plate method 및 soft agar double layer method 등의 배양방법의 영향을 검토한 결과는 Table 2와 같다. 효모원형질체는 agar surface에서는 전혀 재생되지 않고 pour plate method나 soft agar double layer method에서와 같이 agar 속에 embedding시킴으로서 재생이 가능한 것으로 사료되었으며, 본 실험결과에서는 두 균주 모두 pour plate method에서 가장 좋은 재생효율을 보여 주었다.

효모원형질체의 재생을 위한 세포벽 분해효소의 처리시간의 영향

전보(4)에서 보고한 원형질체형성을 위한 최적조

Table 2 Comparison of culture methods on regeneration of yeast protoplasts

	<i>H. anomala</i> var. <i>anomala</i> FRI YO-32	<i>S. cerevisiae</i> KFCC 32356
Initial cell count (CFU/ml)	8.4 x 10 ⁸	2.25 x 10 ⁸
Cell count after osmolysis (CFU/ml)	7.9 x 10 ⁴ (PY=99.99%)	8.5 x 10 ⁴ (PY=99.96%)
Surface plate method (CFU/ml)	5.85 x 10 ⁴ (RE=0%)	6.76 x 10 ⁴ (RE=0%)
Pour plate method (CFU/ml)	2.06 x 10 ⁸ (RE=24.52%)	7.3 x 10 ⁷ (RE=32.44%)
Soft agar double layer method (CFU/ml)	9.6 x 10 ⁷ (RE=11.43%)	7.3 x 10 ⁶ (RE=3.24%)

* PY : protoplast yield.

** RE : regeneration efficiency.

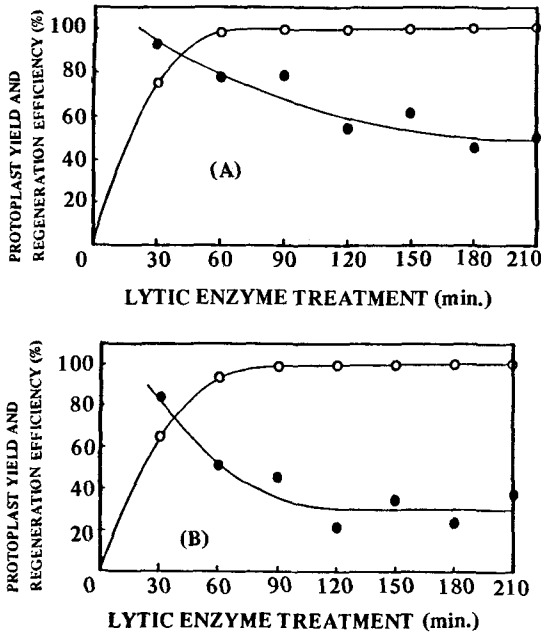


Fig. 4 Effect of lytic enzyme treatment on regeneration of protoplast in (A) *H. anomala* var. *anomala* FRI YO-32 and (B) *S. cerevisiae* KFCC 32356 (○—○ : protoplast yield, ●—● regeneration efficiency)

건과 앞에서 설정한 원형질체 재생을 위한 최적조건 하에서, *Helix pomatia*의 달팽이분해효소를 이용하여 FRI YO-32균주와 *S. cerevisiae*의 원형질체 제조시 효소처리시간이 두 균주의 원형질체 재생에 미치는 영향을 검토한 결과는 각각 Fig. 4의 (A) 및 (B)와 같다.

전체적으로 효소처리시간이 길어질수록 원형질체 형성수율은 증가하나 재생효율은 감소하는 경향을 보여 주었으며 *S. cerevisiae*보다 FRI YO-32 균주의 재생효율이 좋은 것으로 사료되었다.

이러한 실험결과는 원형질체 형성수율과 재생효율과의 관계를 보고한 Gunge 등⁽¹⁰⁾의 결과와도 일치하며, 이러한 관계로 부터 최적효소처리시간은 60분 내지 90분으로 사료되었다.

요 약

전분자원의 효율적 이용을 위한 방법의 일환으로 분리동정된 전분이용성 효모 *H. anomala* var. *anomala* FRI YO-32와 *S. cerevisiae*와의 세포융합가능성을 검토하기 위하여, 두 효모원형질체의 재생을 위한 최적조건들이 검토되었다.

*S. cerevisiae*에 비하여 FRI YO-32균주의 원형질체가 삼투압안정성이 더 좋았으며 원형질체 재생에 영향을 주는 중요한 인자로서 agar와 삼투압안정제의 농도, 원형질체 배양방법등이 검토되었다. 또한 원형질체 형성을 위한 효소처리 시간이 길어질수록 원형질체 형성수율은 증가하나 재생효율은 감소하였다.

참고문헌

1. Necas, O.: "Advances in Protoplast Research" ed. by L. Ferenczy and G.L. Farkas, Pergamon Press Ltd., Oxford, 151-161 (1980)
2. 사이언스포럼編集部: 遺傳子組換之實用化技術, 第3集, 127-175 (1982)
3. 구영조, 박완수, 신동화, 유태중: 한국산업미생물학회지, 13(2), 129-135 (1985)
4. 구영조, 박완수, 신동화, 유태중: 한국산업미생물학회지, 13(2), 137-144 (1985)
5. Sherman, F., G.R. Fink and J.B. Hicks: "Methods in Yeast Genetics, Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory (1982)
6. Svihla, G., F. Schlenk and J.L. Dainko: *J. Bacteriol.*, 82, 808 (1911)
7. Diamond, R.J. and A.H. Rose: *J. Bacteriol.*, 102, 311 (1970)
8. Necas, O.: *Nature*, 192, 580 (1961)
9. Svoboda, A.: *Experimental Cell Research*, 44, 640 (1966)
10. Gunge, N. and A. Tamaru: *Japan. J. Genet.*, 53, 5, (1978)