

## 구연산 생성 *Candida lipolytica*의 원형질체 융합

성낙계 · 심기환 · 전효곤 · 강신권 · 박석규\*

경상대학교 식품가공학과  
\*경남대학교 식품공학과  
(1985년 10월 5일 수리)

### Intraspecific Protoplast Fusion of Citric Acid Producer, *Candida lipolytica*

Nack Kie Sung, Ki Hwan Shim, Hyo Kon Chun,  
Sin Gwon Kang and Seok Kyu Park\*

Department of Food Science and Technology,  
Gyeong Sang National University, Jinju, Korea

\*Department of Food Engineering, Kyung Nam University Masan, Korea  
(Received October 5, 1985)

In order to develop a protoplast fusion system for citric acid and SCP producing *Candida lipolytica*, the optimal conditions for the formation and regeneration of protoplast were examined and the protoplast fusion was performed. At the optimal conditions of growth phase and Zymolyase treatment, frequencies of protoplast formation were 98%. Approximately 20 - 30% of protoplasts were regenerated on the regeneration minimal medium containing 3% agar and 30mM CaCl<sub>2</sub> with the overlay of the same medium. The fusion frequencies,  $4 - 5 \times 10^{-4}$ , were accomplished by the treatment of two nutritionally complementary auxotrophic protoplasts, L-14 (lys<sup>-</sup>) and T-24 (try<sup>-</sup>), with 30% PEG 6000 containing 100mM CaCl<sub>2</sub> at 30°C for 20 minutes.

산업적으로 중요한 효모의 균주개량에 protoplast 융합을 이용하고자 하는 시도는 *Saccharomyces* 속 균주에 거의 국한되어 있어 ethanol 耐性균주, 고온에서 ethanol을 생성하는 균주, 당자화 spectrum이 넓어진 균주를 육종하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다<sup>(1-6)</sup>.

SCP, 유기산 생산에 이용되고 있는 *Candida* 속의 균주개량은 *Saccharomyces* 속에 못지 않는 의의가 있을 것으로 생각되어 탄화수소나 당에서 citric acid와 副産物로 SCP를 생산할 수 있는 *Candida lipolytica* (*Saccharomycopsis lipolytica*)에 대한 균주개량을 시도하였다. *Candida lipolytica*는 glucose 이외의 당을 자화할 수 없었고<sup>(7)</sup> 또한

종래의 균주개량방법으로 사용된 돌연변이에 의해 citric acid 생성량은 증가시킬 수 있었으나 균체량이 적어지는 결점이 있었다<sup>(8)</sup>. 그러나 이런 결점은 새로운 균주개량법인 protoplast 융합에 의해 비교적 용이하게 해결될 것으로 생각된다.

본 보고에서는 *Candida lipolytica*를 이용하여 종래의 citric acid 생성효모균주보다도 citric acid 생성능과 내산성이 우수하고 균체와 구연산을 동시에 생성하는 균주를 개발하는 것을 목적으로 하여 *Candida lipolytica*의 protoplast 형성, 정상세포로의 복귀, PEG 처리에 의한 융합조건을 검토하여 기초 자료를 얻었기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 供試菌株

본 실험에 사용된 균주는 citric acid 생성효모인 *Candida lipolytica* J-24<sup>(8)</sup>와 NTG에 의해 유도된 영양요구성변이주이다.

### 培地

본 실험에 사용된 배지는 Table 1과 같으며 Protoplast의 세포벽 재생 시에는 0.5M KCl을 첨가하여 高張培地를 만들어 사용 하였다.

### 영양요구성변이주의 분리

돌연변이의 유기는 Akiyama<sup>(9)</sup> 등의 방법에 준하고 영양요구성변이주의 농축은 Matsuoka<sup>(10)</sup> 등의 방법에 준했다. 즉 *C. lipolytica* J-24를 YEPD배지에서 24시간동안 진탕배양하고 원심분리(5,000 rpm, 8 min)하여 얻어진 균체를 saline으로 3회 세척한 후 Tris-buffer (pH 7.0)로써 1ml당  $10^7 \sim 10^8$ 개의 효모를 함유하는 현탁액을 만들어 NTG를 최종농도가 0.4 mg/ml 되게 첨가하여 28°C에서 30분간 반응시킨후 saline으로 NTG를 씻어낸 다음 Tris buffer로써 현탁액을 만들었다.

NTG 처리한 세포현탁액 0.5ml를 5ml의 YEPD 배지에 접종, 30°C에서 12시간 배양하여 집균 세척한 후 5ml의 무질소최소배지에 현탁시켜 12시간 배양한 다음 집균하여 4.5ml의 최소배지에서 6시간 배양후 살균한 HCl로 pH를 4.0~4.2로 조절한 다음 10mg/ml 되게 Nystatin<sup>(11)</sup>을 2시간동안 30°C에서 처리한 후 Nystatin을 멸균수로 씻어낸 다음 회석하여 YEPD 고체배지에 평판하여 배양한 다음 최소배지에 replica시켜 최소배지에 생육하지 않는 colony를 완전배지에서 선별하였다.

### Protoplast의 조제

*C. lipolytica*의 세포벽을 제거하기 위한 효소는

Table 1. Chemical composition of media.

Ingredients	(%)	
	YEPD	M 3
Glucose	5	10
Peptone	0.5	
Yeast extract	0.2	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1	0.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05	0.05
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.06	0.06
Thiamine·HCl		0.004

Table 2. Back mutation rate of auxotrophic marker of isolated auxotroph

Strain	Genotype	Back mutation rate*
L-14	lys <sup>-</sup>	less than 10 <sup>-10</sup>
T-24	trp <sup>-</sup>	less than 10 <sup>-6</sup>

\*:  $\frac{\text{colony number on minimal medium}}{\text{colony number on complete medium}}$

Zymolyase 5000을 사용하였고<sup>(12)</sup> 균을 YEPD 배지에서 진탕배양하여 균체를 원심분리하여 집균한 다음 삼투압을 조정된 0.05M phosphate buffer 로서  $10^7$  cells/ml 되게 현탁액을 만들어 Zymolyase 5000을 처리하여 protoplast가 전체 세포수의 98% 이상될때까지 효소반응조건을 검토하였다.

### 정상세포로의 환원

*C. lipolytica*를 98%이상 protoplast화한 다음 osmotic stabilizer를 첨가한 buffer로써 씻어준 다음 osmotic stabilizer를 첨가한 M 3 한천배지에 매물시켰다. 이때 재생율은 효소반응시키지 않은 현탁액을 평판시켜 형성된 colony 수에 대한 protoplast용액을 osmotic stabilizer를 첨가한 배지에 평판시 형성된 colony 수에 osmotic stabilizer를 첨가하지 않은 배지에 평판시 형성된 colony 수를 뺀 colony 수의 비율(%)로 표시하였다.

### 융합

영양요구성이 다른 두균을 각각 protoplast화 최적조건에서 protoplast화시킨후 각각 0.5ml ( $5 \times 10^6$  cell/ml)씩 원심분리관에 넣은 다음 원심분리하여 얻은 pellet 위에 CaCl<sub>2</sub>를 함유한 PEG 용액 2ml를 첨가한 후 즉시 혼합하여 소정온도에서 일정시간 반응시켜 원심분리하여 PEG를 씻어낸 다음 회석하여 평판하였다. 융합율은 PEG 처리후 재생용 완전배지에 형성되는 colony 수에 대한 재생용 최소배지에 형성되는 colony 수의 비로써 표시하였다.

## 결과 및 고찰

### 영양요구성변이주의 분리

*C. lipolytica* J-24를 NTG 처리 및 Nystatin 농축에 의해 marker의 안정성이 인정되는 2개의 균을 선별하였다. 분리한 두 영양요구성변이주의 영양요구성 marker의 복귀변이율을 Table 2에 표시하였다.

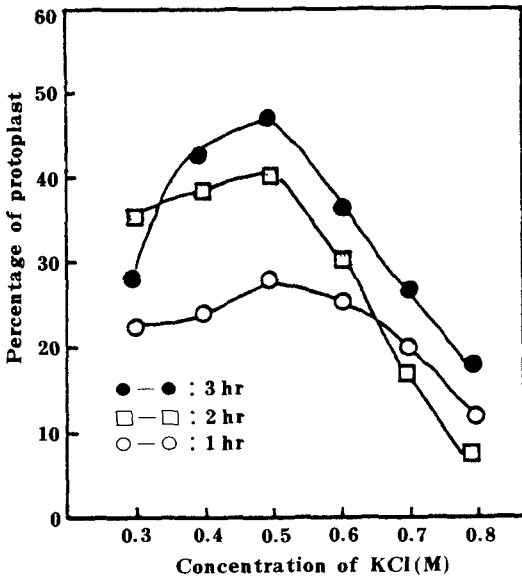


Fig. 1. Effect of KCl concentration on protoplast formation.

일반적으로 융합실험에는 다중돌연변이주를 많이 이용하고 있으나 분리된 영양요구성변이주의 back mutation rate가  $10^{-8}$  보다 낮고 효모의 융합빈도가  $10^{-3} \sim 10^{-6}$  정도<sup>(12)</sup> 이므로 다중영양요구성변이를 시킬 필요가 없다고 생각되어 균주 L-14와 T-24를 융합실험에 사용하였다.

**Protoplast의 형성조건**

Protoplast 형성에 영향을 미치는 osmotic stabilizer의 종류 및 농도, 배양시간, Zymolyase 처리조건을 조사해 보았다.

Osmotic stabilizer로 사용되고 있는 KCl, sorbitol, MgSO<sub>4</sub> 중에서 KCl이 protoplast 형성에 적합한 osmotic stabilizer였으며 그 최적농도는 Fig. 1에서 나타낸 바와 같이 0.5M 이었다.

*C. lipolytica*의 배양기간이 protoplast 화에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 2와 같으며 균의 대수증식후기인 20~25시간 배양한 균체가 protoplast 화에 가장 적합한 것으로 나타났다. 다른 효모의 경우 14~17시간 생육시킨 균체가 많이 이용되는데<sup>(13)</sup>, 이것은 세포벽의 조성이 균주의 차이나 생육 조건에 따라 달라질 수 있기 때문에 본 실험과는 차이가 나는 것으로 사료된다.

Zymolyase 처리시 pH의 영향을 인산 buffer를 사용하여 조사해본 결과 pH 7.0이 가장 좋았다 (Fig. 3). Zymolyase 처리시 온도는 27°C에서 최대

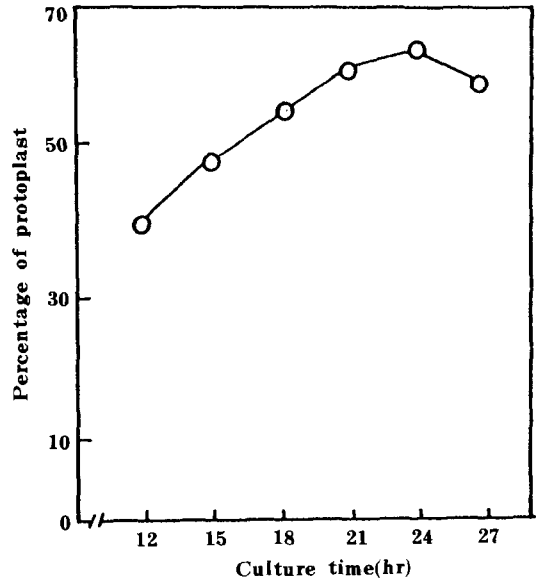


Fig. 2. Effect of culture time on protoplast formation.

의 protoplast 형성을 보였으며 Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 그 이상의 온도에서는 반응시간이 경과함에 따라 protoplast는 오히려 파괴되는 것으로 나타났다. 이것은 Zymolyase 5000이 *Arthrobacter luteus* 배양액을 유산염석하여 냉동건조시킨 것으로 여러가지 효소의 복합효소이므로<sup>(12)</sup> 온도가 높아

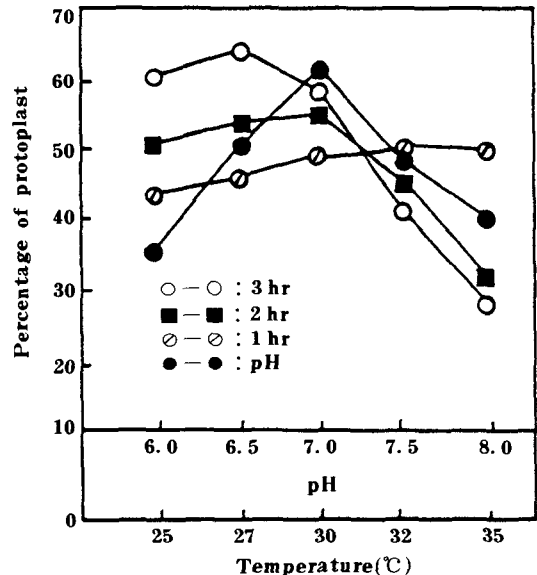


Fig. 3. Effect of the temperature and pH of Zymolyase treatment on protoplast formation.

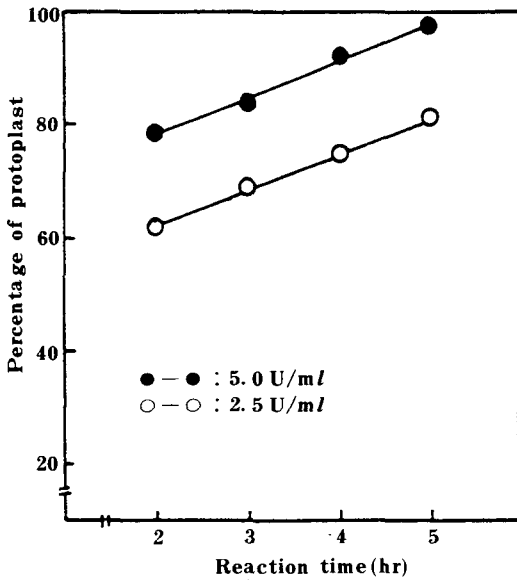


Fig. 4. Effect of concentration and treatment time of Zymolyase on protoplast formation.

짐에 따라 세포막 구성성분을 파괴하는 효소의 활성이 높아져 일어나는 현상으로 생각된다.

효소농도와 반응시간이 protoplast 화에 미치는 영향을 조사한 결과를 Fig. 4에 표시하였다. 5units/ml의 효소농도로서 5시간의 반응에 의해 98%이상이 protoplast화 되었다.

**Protoplast의 재생조건**

재생용배지에 첨가되는 agar 농도와 CaCl<sub>2</sub> 농도의 영향을 조사해 보았다. 1~3.5% 범위에서 agar 농도는 재생에 별로 큰 영향을 미치지 않았으며 중층에 의해 약간 증가하였고 50 mM의 CaCl<sub>2</sub> 첨가시의 재생율은 약 30%로 첨가하지 않았을때의 20%보다 증가하였다.

**Protoplast의 융합조건**

L-14와 T-24의 protoplast 융합시 PEG 종류 및 농도, CaCl<sub>2</sub> 농도, PEG 처리시간, PEG 처리온도가 융합빈도에 미치는 영향을 조사하여 보았다. PEG에는 분자량이 다른 몇 종류의 것이 있으나 효모에는 주로 PEG 6000과 4000이 많이 이용되므로<sup>(13)</sup> PEG 4000과 6000의 농도가 L-14와 T-24의 융합빈도에 미치는 영향을 조사해 본 결과를 Fig. 5에 표시하였다.

Soligen<sup>(14)</sup> 등은 *S. cerevisiae* sphaeroplast 융합에서 PEG 6000이 4000보다 낮은 것으로 보고 하였으나 본 실험에서는 6000이 좋은 것으로 나타났다.

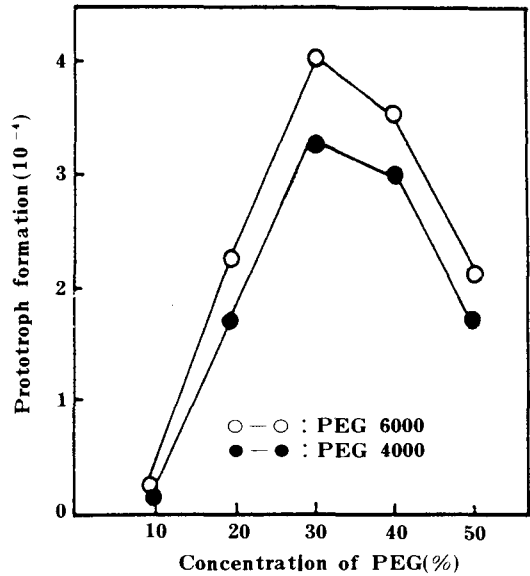


Fig. 5. Dependence of prototroph formation from L-14(lys<sup>-</sup>) and T-24(trp<sup>-</sup>) on the concentration of PEG 6000 and PEG 4000 in the fusion mixture.

융합율에 좋은 영향을 미치는 농도는 30~40%이었다. PEG를 처리하여 재생용 완전배지와 재생용최소배지에 평판시의 colony 수와 PEG 처리하지 않고 재생용 완전배지와 최소배지에 평판하였을때의 colony 수를 Table 3에 표시하였다. PEG를 사용하지 않았을 때의 RCM의 colony 수는 332개인데 비해 PEG를 사용했을 때의 RCM의 colony 수가 77개인 것은 PEG 처리시 응집과가 형성되는 것이 원인인 것 같다.

PEG와 함께 융합시 필수인자인 CaCl<sub>2</sub> 농도가 융합에 미치는 영향을 조사해본 결과를 Table 4에 표시하였다. 융합에는 PEG의 ⊖ 전위와 Ca<sup>++</sup>의 ⊕

Table 3. Effect of 30% PEG 6000 treatment on the colony formation in the RCM and RMM

Strain	PEG used		PEG not used	
	RCM	RMM	RCM	RMM
L-14×T-24	77	32	332	ND
L-14×L-14	NT	ND	NT	ND
T-24×T-24	NT	ND	NT	ND

RCM, RMM: regeneration complete, minimal medium 10<sup>4</sup> fold diluted suspension was plated in RCM ND: not detected, NT: not tested

**Table 4. Dependence of prototroph formation from L-14(lys<sup>-</sup>) and T-24(trp<sup>-</sup>) on CaCl<sub>2</sub> concentration in 30% PEG 6000 and the treatment time and temperature of 30% PEG 6000 containing 50 mM CaCl<sub>2</sub>**

Scale	Prototroph formation ( $\times 10^{-4}$ )		
	CaCl <sub>2</sub> (mM)	Time (min)	Temp. (°C)
0	0.1		
10		1.5	
15		3.2	3.4
20		4.1	3.8
25	2.3	3.8	4.0
30		3.4	3.9
35		2.9	3.1
50	3.8		1.3
100	4.7		

전위에 의해 일어나는 세포막 표면의 전가분포 변화를 포함하는 구조상의 변화가 크게 영향을 미치는 것으로 고찰되고 있다<sup>(13,15)</sup>. Arima<sup>(13)</sup> 등은 *S. cerevisiae*의 경우 30% PEG 6000을 사용 했을시 50mM의 CaCl<sub>2</sub>의 농도에서 효율이 좋다고 하였고 Solingen<sup>(14)</sup> 등은 10 mM 이상의 CaCl<sub>2</sub> 농도는 sphaeroplast에 lytic 한 영향을 미친다고 하였으나 본 실험에서는 100 mM이 융합에 좋은 영향을 미쳤다.

PEG 처리시간의 연장은 CFU (colony forming units)를 형성하는 protoplast 수를 증가하는 것으로 알려져 있고<sup>(16)</sup> 본 실험에서는 20~25분 정도가 적당한 것으로 나타났다 (Table 4). Table 4에서 보는 바와 같이 30% PEG 6000을 처리할때 온도는 25~30°C 사이가 적합한 것으로 나타났다.

## 요 약

내산성이 우수하고 citric acid와 SCP를 많이 생산할 수 있는 효모균주를 육종하기 위하여 구연산 생성효모인 *Candida lipolytica*의 종내 원형질체 융합 조건을 검토하였다. 배양기간과 효소처리조건을 최적화함에 의해 98%의 protoplast가 형성되었다.

3% agar와 30 mM CaCl<sub>2</sub>를 함유한 재생용최소배지에 동일배지의 중층에 의해 약 20~30%의 protoplast가 재생되었다. 2개의 영양요구성이 상보적인 영양요구성원형질체, L-14와 T-24에 100 mM CaCl<sub>2</sub>를 함유하는 30% PEG 6000을 30°C에서 20분간 처리하여  $4 \sim 5 \times 10^{-4}$ 의 융합빈도가 얻어졌다.

## 사 사

본 연구는 1983년도 한국유전공학학술협의회 지원연구비로 수행되었으며 지원하여 주심에 심심한 사의를 드립니다.

## 참고문헌

- Panchal, G.J., A. Habison, I. Russell, G.G. Stewart: *Biotechnol. Letters*, **4**, 33 (1982)
- Russell, I., G.G. Stewart: *J. Inst. Brew.*, **85**, 35 (1979)
- Gunge, N., K. Sakaguchi: *J. Bacteriol.*, **147**, 155 (1981)
- Gunge, N., A.T. Tamaru, F. Ozawa, K. Sakaguchi: *J. Bacteriol.*, **145**, 382 (1981)
- Gunge, N., A.T. Tamaru: *Japan J. Genet.*, **53**, 41 (1978)
- Arima, K., I. Takano: *Saccharomyces Yeast Genetics*, **93**, 1 (1979)
- Lodder, J: *The Yeasts. a taxonomic study*, North Holland Publishing Co., Amsterdam, 991 (1970)
- Chun, H.K., N.K. Sung, S.K. Park: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **47**, (1985)
- Akiyama, S., T. Suzuki, Y. Sumino, Y. Nakao, H. Fukuda: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 879 (1973)
- Matsuoka, M., K. Uchida, S. Aiba: *J. Bacteriol.*, **152**, 530 (1982)
- Snow, R.: *Nature (London)*, **211**, 206 (1966)
- Kitamura, K., Y. Yamamoto: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1761 (1981)
- 有馬賢治, 高野 勇: *微生物のプロトプラスト融合*, *醸酵工学会誌*, **37**, 380 (1979)
- Solingen, P., J.B. Plaat: *J. Bacteriol.*, **130**, 946 (1977)
- Kao, K.N., M.R. Michayluk: *Planta*, **115**, 533 (1974)
- Ochi, K.: *J. Bacteriol.*, **139**, 984 (1979)