

## *Saccharomycopsis lipolytica*의 온도감수성 변이균주의 분리 및 특성

조 석 금

안양공업전문대학 식품영양학과

### Isolation and characterization of temperature-sensitive mutant of *Saccharomycopsis lipolytica*

Cho Seok Gum

Department of Food and Nutrition, An Yang Technical  
College, An Yang, Kyeng Ki 171, Korea

Temperature-sensitive revertant could grow on acetic acid at 23°C but not at 33°C, MX9-11RX8, isolated from mutant deficient in the activity of isocitrate lyase and its properties were investigated. The activity of isocitrate lyase and specific rate of isocitrate lyase synthesis decreased according to increase culture temperature from 23 to 33°C in acetic acid as carbon source. A rapid cessation of increase enzyme activity observed when the temperature was shift up from 23 to 33°C but cell growth was continued. On the other hand, the revertant also exhibited temperature-sensitive in *n*-hexadecane medium as carbon source, and the amount of isocitric acid was nearly equal produced to that at 23°C when the temperature shift up from 23 to 33°C.

*Saccharomycopsis lipolytica*는 절대호기성 출아효모로서 당질 뿐만 아니라 유지류의 자화성이 우수하다. 특히 *n*-alkane의 자화성은 이 효모의 특징이고 지방산과 초산을 유일한 탄소원으로 하여 잘 생육하며(1, 2, 3), citric acid와 isocitric acid를 배지 중에 축적한다고 알려져(4) 공업적으로도 이용되어 왔다.

이 효모의 대사경로에 관한 연구에서 田淵(5)는 탄소원으로서 glucose를 사용하였을 때에는 pyruvic acid에서의 CO<sub>2</sub>고정 반응과 *n*-alkane을 사용하였을 때에는 glyoxylic acid 회로가 필요하다고 보고하였고, 또한 기수쇄 *n*-alkane의 대사에 필요한 methyl citric acid 회로도 발견되었다(6). 한편 Kornberg(7, 8)는 대장균의 isocitrate lyase 결손변이체의 연구에서 isocitrate lyase는 anaplerotic 반응에 반드시 필요하다고 보고한 바 있다.

온도감수성이라는 조건부 돌연변이는 유전자의 동정에 극히 유익하며(9, 10) 특히 실험자가 표현형을 제어할 수 있다는 관점에서 공학적으로 응용가치가 높다(11). 그러나 isocitrate lyase에 관한 온도감수

성 변이는 곰팡이에서 이 효소의 결손 변이체로부터 복귀 변이균주가 분리되고 있을 뿐이다(12, 13).

본 연구에서는 *Saccharomycopsis lipolytica*의 isocitrate lyase에 대한 온도감수성 변이의 특성과 이 효소의 생화학적 성질을 조사하기 위하여 본 효모 isocitrate lyase의 결손 변이균주로부터 온도감수성 복귀 변이균주를 분리하여 몇가지 기초 자료를 얻었기에 그 결과를 보고하는 바이다.

#### 재료 및 방법

##### 사용균주 및 기본배지

본 연구에서 사용된 균주는 야생형 균주로서 *Saccharomycopsis lipolytica* ATCC 44601과 이 야생형 균주의 isocitrate lyase 결손(Icl<sup>-</sup>) 및 초산 비자화성(acetate non-utilization, Acu<sup>-1</sup>)인 MX9-11(Icl<sup>-</sup>) 변이균주(14)를 사용하였다.

완전배지와 최소배지는 Fink(15)의 합성배지를 사용하였다. 최소배지는 탄소원으로서 glucose를 20g/

**Key words:** Temperature sensitive mutant, *Saccharomycopsis lipolytica*

l 사용한 경우는 MM-glucose 배지, 탄소원을 0.1 M potassium acetate로 대체한 경우는 MM-acetate 배지로 표시하였다(14). 모든 배지는 121°C에서 15분간 살균하였다. 일반적인 배양조건은 저자 등(16, 17)이 사용한 방법에 준하였다.

#### Isocitrate lyase 유도균체의 조제

30°C의 MM-glucose 배지에서 생육시킨 균체를 MM-acetate 배지에 옮겨서 30°C에서 Flavell과 Fincham(18)의 방법에 따라서 isocitrate lyase를 유도한 균체를 조제하였다.

#### 온도감수성 변이균주의 분리

변이유발 실험은 Fink(15)의 방법에 따라서 30°C에서 수행하였다. 즉 완전배지에서 1일간 배양한 MX9-11 (Icl<sup>-</sup>) 변이균주를 원심분리(4,000×g, 5분)하여 모으고 무균수로서 2회 원심분리하여 세척한 균체를 0.1 M Tris-malic acid 완충액(pH 7.0)에 현탁하고 변이유기제로서 *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine(MNNG)를 최종농도 400 mg/ml 되도록 가하여 40분간 처리로서 변이유발시킨 후 다시 무균수로서 2회 세척하고 나서 무균수에 적당히 현탁하였다. 이 현탁액을 바로 MM-acetate 평판배지에 도말하고 23°C에서 4~7일간 배양하면서 생육한 colony를 분리하였다. 분리한 균주중 MM-acetate 평판배지상에서 23°C에서는 생육할 수 있지만 33°C에서는 생육할 수 없고, 23°C와 33°C의 MM-glucose 평판배지상에서 야생균주와 같이 생육할 수 있는 변이균주를 온도감수성을 나타내는 초산자화성 변이균주로서 분리하였다.

#### 온도 shift up 효과의 측정

탄소원으로 초산을 사용하였을 때의 온도 shift up 효과를 조사하기 위하여 5l의 MM-acetate 배지(0.02% adekanol 함유)에 100 ml의 MM-acetate에서 생육시킨 seed culture을 접종하고 10l들이 Jar fermentor(Marubishi Laboratory Equipment Co, LTD, MD-500)를 사용하여 호기적 조건(1 vvm, 3000 rpm)하에서 배양하였다. 배양액의 온도는 배양 8시간째에 23°C에서 33°C로 올렸으며, 배양액의 pH는 5M acetic acid 용액을 첨가함으로써 6.5로 자동 조절하였다.

*n*-Hexadecane을 탄소원으로 사용하였을 때의 isocitrate lyase와 isocitric acid에 대한 온도 shift

up의 효과는 MM-glucose에서 하룻밤 배양한 seed culture을 300 ml의 산 생선용 *n*-hexadecane 배지에 0.25% 접종하고 23°C에서 진탕배양하였다. 배양 60시간째에 배양액의 절반을 다른 플라스크에 옮기고 온도를 33°C로 올려서 배양하였다.

배양액은 적당히 분취하여 원심분리하고 침전된 균체를 냉각 acetone jar(Cryo cool CC-60, NES-LAB)중에서 빨리 동결시킨 후 -20°C에서 보존하면서 다음 실험에 사용하였다.

#### 균체 농도와 isocitric acid의 측정

균체 농도는 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. Isocitric acid는 Stern(19)의 방법에 준하여 저자(17) 등이 보고한 방법에 따라 측정하였다.

#### 효소활성 측정

Isocitrate lyase(EC 4.1.3.1)의 활성은 연속적 방법(20)과 불연속적 방법(21)으로 측정하였다. 연속적 방법은 저자(17) 등이 보고한 방법에 따라서 전처리한 후 Dixon과 Kornberg(20)의 방법에 따라 행하였고, 불연속적 방법은 Serrano(22) 등의 방법에 따라 toluene으로 처리한 세포를 준비한 후 Khan(21) 등의 방법에 따라서 E<sub>520</sub>에서 비색정량하였다.

Malate synthase(EC 4.1.3.2)의 활성은 Dixon과 Kornberg(23)의 방법에 따라서 측정하였다.

각각의 효소활성 단위는 실온에서 1분간 생산물 1 mmol을 형성할 수 있는 양을 1 unit로 표시하였다. 단백질량은 Lowry(24) 등의 방법에 따라서 측정하였고 건조 균체량은 660 nm에서 흡광도를 측정한 후 건조 균체량으로 환산하였다.

## 결과 및 고찰

#### Isocitrate lyase의 유도

Isocitrate lyase의 생성상태를 조사하기 위하여 ATCC 44601 야생형 균주로서 효소를 유도한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

Glucose를 탄소원으로 사용한 배지에서 배양한 야생형 균주의 효소활성은 억제된 낮은 level로 존재하였지만 이것을 탄소원으로 초산을 함유한 배지에 옮겨 진탕배양하면 이 효소는 빠르게 생성되어 약 6시간 이후는 억제 level의 약 20배 상승하여 일정하게 되었다. 이 동안에 균체증식은 약 4시간의 lag phase를 지나 서서히 증가하기 시작하였다.

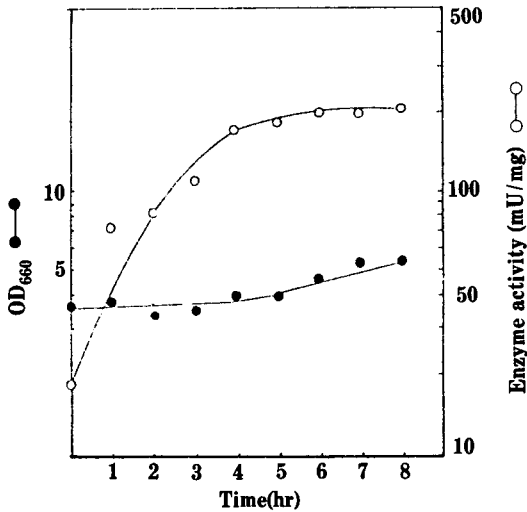


Fig. 1. The induction of isocitrate lyase activity in acetate minimal medium after ATCC 44601 cells was grown in glucose minimal medium.

Crude enzyme was obtained by a French press at about 500 kg/cm<sup>2</sup>, and that was assayed by continuous method. Symbols; -○-: enzyme activity, -●-: OD<sub>660</sub>

이러한 결과는 미생물이 초산과 같은 C<sub>2</sub> 화합물 또는 궁극적으로 C<sub>2</sub> 화합물로 전환되는 기질을 탄소원으로 하여 생육할 때에는 TCA 회로의 중간체를 보충하기 위하여 이 효소가 유도된다는 보고(7, 25)와 일치하였다.

#### 온도감수성 변이균주의 분리 및 특성

온도감수성 변이균주를 분리하기 위하여 MX9-11 (Icl<sup>-</sup>) 변이균주(14)를 변이유기체로서 MNNG를 사용하여 상법(15)에 따라 변이유발 실험을 하였다. 10% 이하의 생존률을 보여주는 처리조건하에서 변이유발하여 23°C의 MM-acetate 평판배지상에서 Icl<sup>+</sup> 복귀 변이균주를 12균주 분리하고, 그 중에서 33°C의 MM-acetate 평판배지상에서 생육할 수 없는 것을 온도감수성 변이균주로서 3균주 분리하였다. 이중 23°C의 MM-acetate 배지에서 isocitrate lyase를 유도하였을 때 활성의 회복이 가장 높은 MX9-11RX8 변이균주를 온도감수성 복귀 변이균주로 하여 본 실험에 사용하였다.

야생형 균주와 그 변이균주들을 MM-glucose 배지에서 생육시킨 후 MM-acetate 배지에서 배양한 세포의 isocitrate lyase와 malate synthase의 활성과 MM-acetate 평판배지상에서의 생육 상태를 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Properties of Icl mutant and Acu<sup>ts</sup> revertant.

Strain (phenotype)	Specific activity <sup>(a)</sup>		Grown <sup>(b)</sup> on acetate at		
	Isocitrate lyase	Malate synthase	23°C	28°C	33°C
ATCC 44601 (wild type)	192	221	+	+	+
MX9-11(Icl)	1.2	346	-	-	-
MX9-11RX8 (Acu <sup>ts</sup> )	163	242	+	+/-	-

(a) After growing cell in glucose minimal medium at 30°C, ATCC 44601 and MX9-11 were induced at 30°C but MX9-11RX8 was induced at 23°C for 6 hr in acetate minimal medium. Crude enzyme was obtained by a French press at about 500 kg/cm<sup>2</sup>.

(b) The growth test was done on acetate minimal medium plates by spotting a washed cell suspension grown in complete medium.

23°C부터 33°C 온도범위의 MM-acetate 평판배지 상에서 생육할 수 없는 MX9-11(Icl<sup>-</sup>) 변이균주(14)의 isocitrate lyase 비활성 1.2 mU/mg protein은 야생형 균주의 0.6% 정도로서 활성이 거의 없었다. 한편 MX9-11RX8 복귀 변이균주는 23°C의 MM-acetate 평판배지상에서 생육할 수 있지만 33°C에서는 명확하게 생육이 인정되지 않았으며, 23°C에서 효소를 유도하였을 때 isocitrate lyase의 활성을 85°C까지 회복하는 온도감수성을 나타내었다. 그러나 malate synthase의 활성은 야생형 균주와 같이 거의 변화가 없었다. 이 사실은 만약 isocitrate lyase 합성이 glyoxylate cycle의 다른 효소인 malate synthase와 배위적(配位的)으로 결합되어 있다면 두 효소의 형성에 영향을 미친다(26)고 생각되지만 효소의 변화는 isocitrate lyase에만 특이적이었던 Kornberg(27)의 보고와 일치하였다.

#### 배양온도에 따른 isocitrate lyase의 생성과 비생성 속도

야생형 균주와 MX9-11RX8 복귀 변이균주를 여러 가지 온도의 MM-acetate 배지에서 유도한 세포의 isocitrate lyase 생성량과 비생성 속도를 비교 조사한 결과를 Fig.2와 Tabel 2에 각각 나타내었다.

야생형 균주는 온도가 높아짐에 따라서 효소의 생성량과 비생성 속도는 증가하여 31°C에서 최대치를 나타내고 그후는 감소하였다. 반면에 MX9-11RX8 복귀 변이균주는 온도의 증가에 따라서 둘다 감소하

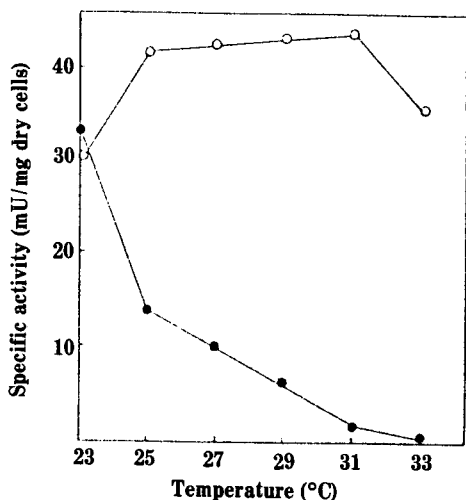


Fig. 2. Isocitrate lyase synthesis of acetate-induced cell for 6 hr at various temperature in ATCC 44601 (○-) and MX9-11RX8 (●-) strains. ICL activity was assayed by discontinuous method with toluene-treated cells.

Table 2. Specific rate of isocitrate lyase synthesis at various temperature in MX9-11RX8 strain.

Induction temp. <sup>(a)</sup> (°C)	Specific rate <sup>(b)</sup> of ICL synthesis (mU/mg/hr)	
	ATCC 44601	MX9-11RX8
23	5.26	8.20
25	6.20	2.75
27	7.12	0.95
29	7.26	0.50
31	8.57	0.31
33	7.30	0.18

(a) Cells were grown in glucose minimal medium at 30°C, then ATCC 44601 and MX9-11RX8 induced in acetate minimal medium at 30°C and 23°C, respectively.

(b) Specific rate of isocitrate lyase synthesis was calculated using acetate induction cells from 0 time to 4 hr, ICL activity was assayed by discontinuous method with toluene-treated cells.

여 33°C에서는 효소를 거의 생성하지 않았다. 이 결과는 야생형 균주의 isocitrate lyase 합성 최적온도는 약 31°C이고, MX9-11RX8 복귀 변이균주는 탄소원으로 초산을 사용한 배지에서는 온도감수성이며 온도에 따라서 효소의 합성이 다르다는 것을 알 수 있었다.

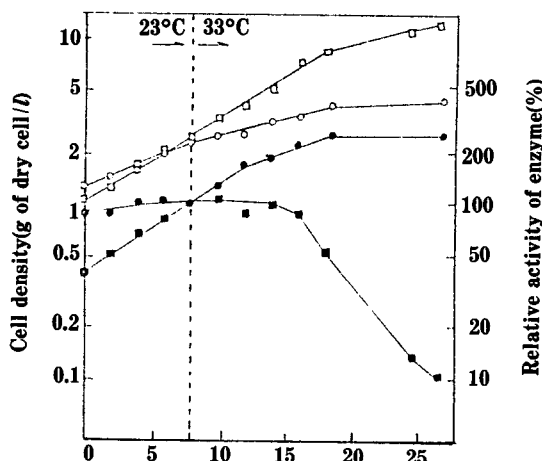


Fig. 3. Effect of temperature shift up on the isocitrate lyase activity in acetate minimal medium grown cells. Cell density (open symbol) was obtained by OD<sub>660</sub>. ICL activity (closed symbol) was assayed at 23°C with toluene-treated cells, and are shown relative activities as 100 when temperature were shift up at 8 hr. Activities of ATCC 44601 (○-, ●-) and MX9-11RX8 (□-, ■-) at the time were 132.7 mU/ml and 150 mU/ml, respectively.

온도 shift up의 효과

배양온도의 shift up에 따르는 효과를 조사하기 위하여 탄소원으로 초산을 사용하여 Fig. 3과 같이 대수증식기의 배양온도를 23°C에서 33°C로 상승시켰을 때의 균체증식과 isocitrate lyase 활성의 경시변화로 나타낸 결과 야생형 균주는 온도 shift up 후에도 효소의 합성을 계속하였지만 MX9-11RX8 복귀 변이균주는 온도 shift up 직후에 효소의 합성을 정지하고 약 1세대 기간은 그대로 일정 level로 유지한 후 감소를 나타내었으며 균체증식은 야생형 균주와 비슷한 증식을 나타내었다. 이 사실은 대장균의 isocitrate lyase 온도감수성 변이균주를 생육온도에서 제한온도로 옮겼을 때 isocitrate lyase의 합성은 바로 정지하고 6시간 지나서 균체농도의 증가와 아울러 isocitrate lyase의 비활성은 지수적으로 떨어졌다는 Kornberg (27)의 보고와 일치하였다.

그러므로 MX9-11RX8 복귀 변이균주는 초산을 탄소원으로 사용하였을 때 23°C의 생육세포 중에서는 균체증식에 대하여 isocitrate lyase는 과잉으로 합성되지만 33°C에서는 합성되지 않는 온도감수성 복귀 돌연변이균주 (temperature-sensitive acetate-utilizing; Acu<sup>ts</sup>)로 사료된다.

n-Hexadecane 배지에서 온도 shift up에 따르는

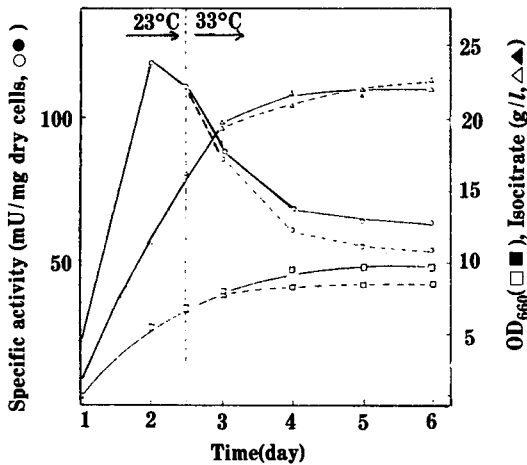


Fig. 4. Effect of temperature shift up on the acid production and isocitrate lyase synthesis of MX9-11RX8 strain in *n*-hexadecane medium.

Half of a culture at 23°C (open symbol) shift up to 33°C (closed symbol) at 60 hr, ICL activity was assayed by discontinuous method with toluene-treated cells.

MX9-11RX8 복귀 변이균주의 isocitrate lyase 합성과 isocitric acid 생산과의 관계는 Fig. 4에서와 같이 23°C에서 효소의 활성은 배양 2일까지 거의 직선적으로 증가하여 최고치에 도달하였고 그 후 활성이 빠르게 감소한 후 4일부터 완만한 감소를 나타내었다. 따라서 이 효소가 *n*-hexadecane을 탄소원으로 이용할 때에는 glyoxylic acid 회로로 유도성인 것을 알 수 있다(14, 16). 한편 배양 60시간째에 온도를 33°C로 올렸을 때 isocitrate lyase의 활성은 23°C보다 감소하였지만 isocitric acid 생산량은 거의 변화가 없었다.

이 사실들로부터 isocitric acid 생산에 있어서 isocitrate lyase의 활성은 23°C에서는 과잉으로 존재하고 있다고 추측되며, 이 복귀 변이균주는 *n*-hexadecane 배지에서도 온도감수성인 것으로 사료된다.

#### 요 약

*Saccharomycopsis lipolytica*의 isocitrate lyase에 대한 온도감수성 변이의 특성과 이 효소의 생화학적 성질을 조사하기 위한 기초연구로서 isocitrate lyase 결손변이 균주인 MX 9-11(Icl<sup>-</sup>)로부터 온도감수성을 나타내는 복귀 변이균주를 3균주 분리하고 그 중 활성의 회복이 가장 높은 MX9-11RX8 균주의 성질을 조사하였다.

MX9-11RX8 복귀 변이균주는 탄소원으로서 초산을 사용하였을 때 온도의 증가에 따라서 isocitrate lyase의 생성량과 비생성 속도가 감소하여 33°C에서는 거의 효소를 합성하지 않았으며, 온도를 23°C에서 33°C로 올렸을 때 효소의 합성은 바로 정지하였지만 균체증식은 계속되었다. 한편 *n*-hexadecane을 탄소원으로 사용하였을 때에도 온도감수성을 나타내었으며, 온도의 shift up 후에도 isocitric acid 생산은 거의 변화가 없었다.

#### 참고문헌

- Gaillardin, C.M., V. Charoy, H. Heslot: *Arch. Microbiol.*, **92**, 69 (1973)
- Bassel, J., J. Warbel, R. Mortimer: *J. Bacteriol.*, **108**(1), 609 (1971)
- Esser, K., U. Stahl: *Mol. Gen. Genet.*, **146**, 101 (1976)
- Abe, M., T. Tabuchi: *Agri. Biol. Chem.*, **33**, 440 (1968)
- 田淵武士: 酵母における適應と制御, 東京大學出版會, p. 191 (1977).
- Tabuchi, T., K. Igoshi: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 2381 (1978)
- Kornberg, H.L.: *Biochem. J.*, **99**, 1 (1966)
- Ashworth, J.M., H.L. Kornberg: *Biochem. Biophys. Acta.*, **89**, 383 (1963)
- Edgar, R.S., I. Lielausis: *Genetics*, **49**, 649 (1964)
- Hartwell, L.H., J. Culotti, J.R. Pringle, B.J. Reid: *Science*, **183**, 46 (1974)
- 百瀬春生: 日釀工, **56**, 592 (1978).
- King, H.B., L.A. Casselton: *Molec. Gen. Genet.*, **157**, 319 (1977)
- Leckie, B.J., F.S. Fincham: *J. Gen. Microbiol.*, **65**, 35 (1971)
- Matsuoka, M., Y. Ueda, S. Aiba: *J. Bact.*, **144**, 92 (1980)
- Fink, G.R.: *Methods Enzymol.*, **17A**, 59 (1970)
- Cho, S.G., M. Matsuoka, S. Aiba: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **13**, 179 (1985)
- 曹碩錦, 鄭東孝: 韓國農化學會誌, **25**, 331 (1986).
- Flavell, R.B., J.R.S. Fincham: *J. Bacteriol.*, **95**, 1063 (1968)
- Stern, J.R.: *Methods Enzymol.*, **3**, 425 (1957)
- Dixon, G.H., H.L. Kornberg: *Biochem. J.*, **72**, 3 (1959)

21. Khan, F.R., M. Saleemuddin, M. Siddigi, B.A. Mcfadden: *Arch. Biochem. Biophys.*, **183**, 13 (1977)
22. Serrano, R., J.H. Gancedo, C. Gancedo: *Eur. J. Biochem.*, **34**, 479 (1973)
23. Dixon, G.H., H.L. Kornberg: *Methods Enzymol.*, **5**, 633 (1962)
24. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randal: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
25. Vanderwinkel, E., M. De Vlieghere: *Eur. J. Biochem.*, **5**, 81 (1968)
26. Vanderwinkel, E., P. Liard, F. Ramos, J.M. Wiams: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12**, 157 (1963)
27. Kornberg, H.L., J. Smith: *Biochim. Biophys. Acta*, **123**, 654 (1966)