

## *Saccharomyces cerevisiae*와 *Candida cariosilignicola* 사이의 세포융합에 관한 연구

이재동·임하선

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

### Protoplast Fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida cariosilignicola*

Lee, Jae Dong and Ha Sun Lim

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,  
Pusan National University, Pusan 607, Korea

**ABSTRACT:** This research was focused on investigation of the condition for protoplast formation and regeneration of protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* which has fermentation ability and *Candida cariosilignicola* which can grow at high temperature and utilize methanol.

The results obtained were as follows;

The highest production was collected in exponential growth phase. Ninety-nine% protoplast formation of *C. cariosilignicola* was obtained in glycin-NaOH buffer (pH10.0) containing Zymolyase 0.5mg/ml at 35°C for 1hr incubation.

The highest regeneration was produced when protoplast suspension containing 0.5% soft agar in buffered 50mM CaCl<sub>2</sub> was poured as a soft overlay onto 2% agar plates. Equal amount of protoplast suspension of two strains was mixed and centrifuged. The subsequent pellet was added to 2ml of 35% polyethylene glycol (MW 4,000) containing 50mM CaCl<sub>2</sub>, and incubated at 30°C for 10min. Then 0.1ml of the suspension of aggregated protoplast was immediately covered with minimal medium and incubated at 40°C for 5-7 days. As results, SC<sub>1</sub>, SC<sub>2</sub>, and SC<sub>3</sub> fusants were obtained. The physiological characteristics of fusants produced by protoplast fusion were; SC<sub>1</sub>, and SC<sub>2</sub> utilized maltose, galactose, methanol, potassium nitrate. SC<sub>3</sub> utilized all the above materials except galactose.

**KEY WORDS** □ *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida cariosilignicola*, protoplast fusion.

알콜발효에 이용되는 *Saccharomyces cerevisiae*는 40°C 이상에서 생육할 수 없으므로 일반적인 알콜발효과정에서 발효조 내부의 온도를 낮추기 위하여 냉각수를 사용하여 온도조절을 한다. 그러므로 발효와 당화과정을 간소화하기 위하여 가능하면 높은 온도에서 생육이 가능한 균주의 개발이 요구된다.

1983년 Lee and komagata는 methanol 자화성 효모로서 *Pichia cellobiosa*, *Candida cariosilignicola*, *Candida succiphila*를 분리, 보고하

였는데 그 중에서 *C. cariosilignicola*는 43°C에서 생육이 가능한 것으로 보고되었다(1980). 따라서 이와같은 고온성인 *C. cariosilignicola*와 중온성인 *S. cerevisiae*의 세포를 융합시켜서 고온 생육이 가능한 융합주로 만들어 발효공업에 이용하면, 발효 공정상 발효조의 내부에 생긴 발열로 인한 피해도 줄이고, 발효공정을 간소화시킬 수 있을 것이며, 두 균주 사이의 생리적 특성을 동시에 보유함으로써 균체단백생산(single cell protein)의 효과도 증가시킬 수 있을 것으로 생각된다. 뿐만 아니라 자

낭포자를 형성하는 *S. cerevisiae*와 무포자균인 *C. cariosilignicola*의 이속간 세포융합의 가능성을 실험함으로써 세포융합에 의한 융합주의 실험빈도를 고려한 유전학적 유연관계의 규명이 가능할 것이므로 분류학적인 측면에서도 중요한 기초자료를 제공할 것이다 (Matyasspiczki, 1982).

이와같은 목적을 가지고 본 실험에서는 먼저 *C. cariosilignicola*의 protoplast 형성과 재생조건을 검토한 후에 이미 연구되어진 *S. cerevisiae*와 *C. cariosilignicola* 사이의 세포융합에 관한 실험을 하였으므로 그 결과를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 실험균주

본 실험에 사용된 균주는 methanol 자화성 효모인 *Candida cariosilignicola* IAM 12484와 *Saccharomyces cerevisiae* IAM 4512이며 이들의 생리적 성질은 Table 1에 제시된 바와 같다.

### 배 지

Yeast 완전배지로는 1/2YM (Yeast extract 0.15%, Polypeptone 0.25%, Glucose 0.5%, Malt extract 0.5%)를 사용하였으며 융합주의 선별을 위해서는 최소배지로 Galactose 0.5%, Yeast nitrogen base 0.67% 조성의 배지를 사용하였다. 이때 필요에 따라 한천을 2% 첨가하였다. Protoplast 재생배지로는 완전배지와 최소배지에 0.6 M KCl을 첨가하여 사용하였다.

### Protoplast형성과 세포벽재생

Protoplast형성은 kaneko(1979)의 방법에 준하

여 실시하였다. 즉 대수증식기의 세포를 회수하여 멸균수로 2회 세척한 후에 0.2% 2-mercaptoethanol과 0.06 M EDTA 용액으로 전처리하여 원심분리하고 0.6 M KCl과 0.2% 2-mercaptoethanol이 들어있는 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.5)에 Zymolyase를 0.5 mg/ml 첨가하여 30°C에서 반응시켰다.

일정시간 반응시킨 균체를 삼투압조절제로 사용된 0.6 M KCl로 2회 세척한 후 Tris-HCl buffer에 재현탁하여 protoplast의 형성을 관찰하였다.

Protoplast 형성률은 Thoma haemocytometer를 사용하여 측정하였다. 또 protoplast화된 세포는 저장용액 중에서 곧 lysis를 일으키며, 이 성질을 이용하여 쉽게 protoplast 형성률을 알 수 있었다.

세포벽형성을 위해서는 우선 생성된 protoplast를 0.6 M KCl 용액에  $1 \times 10^6$ 배 희석하였다. 상기의 희석액 0.1 ml를 재생배지상에 균일하게 도말하고 그 위에 동일조성의 배지 10 ml를 중층하여 5~7일간 30°C에서 배양하여 재생된 colony 수를 원래의 protoplast 수에 대한 비율로 산출하였다.

### Protoplast fusion

각각의 parental protoplast를 1:1비로 혼합해서 저속원심분리하여 다시 회수한 후에 35% PEG가 들어있는 50 mM CaCl<sub>2</sub> 용액 (pH 8.5) 5 ml에 30°C 10분간 반응하였다. PEG 처리후 0.6 M KCl로 2배 희석하여 원심분리하고 다시 같은 용액으로 1회 세척하였다. PEG가 완전히 제거된 균체를 0.6 M KCl 1 ml에 현탁하여 각각 hypertonic 완전배지와 최소배지에 중층 도말하여 40°C에서 5~7일간 배양하였다.

융합빈도는 최소배지에서 형성된 colony 수를 재생배지에서 형성된 colony 수에 대한 비율로 산출하였다.

### 융합세포의 성질조사

선택배지상에서 생육하는 융합균주에 대하여 그 친주들의 유전형질이 도입되었는가를 알아볼 목적으로 융합주의 형태적인 성질, 생리적인 성질을 검토하였다.

탄소원의 자화능에 대한 실험은 Klug, Markovet의 방법에 준하였다 (1963). 즉 융합주를 1/2YM slant에 24시간 배양시킨 후 멸균수 5 ml에

Table 1. Physiology characteristics of *S. cerevisiae* and *C. cariosilignicola*.

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. cariosilignicola</i>
Abrabinose	-	+
Galactose	+	-
Maltose	+	-
Methanol	-	+
Glucose	+	+
Potassium nitrate	-	+
Growth at 42 C	-	+

+; Growth -; No growth

**Table 2. Medium composition for protoplast fusion and fusant analysis.**

Medium A	Galactose 0.5%	
	Yeast nitrogen base 0.67%	
Medium B	Maltose 0.5%	
	Yeast nitrogen base 0.67%	
Medium C	Methanol 0.5%	
	Yeast nitrogen base 0.67%	
Medium D	Glucose 1.0%	NaCl 0.01%
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.1%	KNO <sub>3</sub> 0.078%
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.05%	Biotin 2.0 ug
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0.01%	

1백금이 접종하여 현탁하였다. 현탁액 0.1 ml을 Table 2의 배지 A, B, C, D가 10 ml씩 들어있는 시험관에 접종하여 30°C에서 10일간 배양하면서 생육상태를 육안으로 관찰하였다.

**결과 및 고찰**

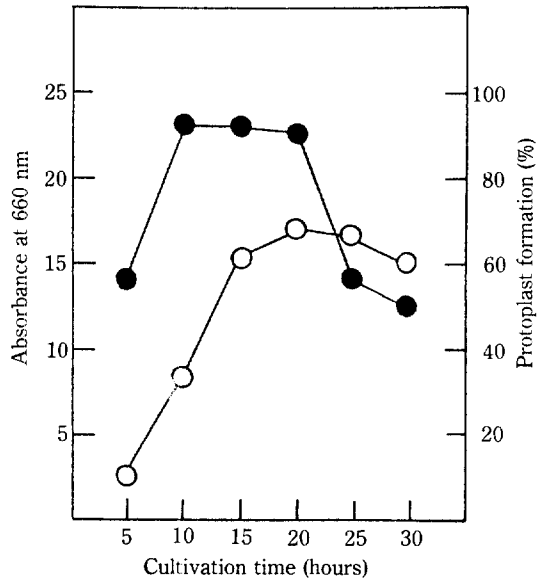
**Protoplast 생성과 세포벽재생**

**Growth phase에 따른 protoplast 형성률 :** 효모 세포의 세포벽 구성성분은 growth phase마다 다르므로 (O. NEČAS, 1971) lytic enzyme이 작용하기에 적당한 시기를 설정하기 위하여 growth phase에 따른 protoplast 형성률을 검토하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 protoplast 형성은 대수기에서 가장 양호하였다.

**각종 buffer와 pH변화에 따른 protoplast의 형성률 :** Zymolyase 활성에 가장 적합한 buffer 및 pH의 효과를 조사하기 위하여 세포수를 동일하게 조정 한 후 Zymolyase 0.5 mg/ml를 가해서 30°C에서 1시간 반응시킨 결과 *C. cariosilignicola* 경우 pH 10.0 glycine-NaOH buffer가 protoplast 형성에 가장 효과적이었다 (Fig. 2).

이 결과는 *S. cerevisiae* 경우는 pH 7.0 phosphate buffer에서 protoplast 형성률이 가장 높았다는 보고와는 차이가 많았으며 *C. cariosilignicola* 경우에는 알카리측으로 갈수록 protoplast 형성률이 높아짐을 알 수 있었다.

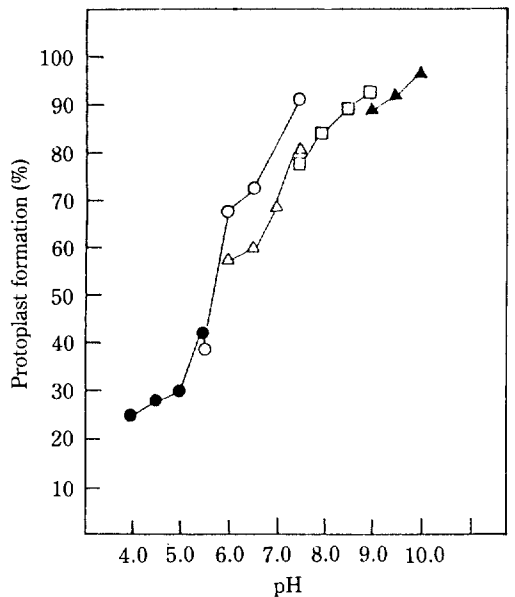
**Zymolyase의 영향 :** *C. cariosilignicola*의 일정량 (1×10<sup>7</sup>)을 0.6 M KCl 과 0.2% 2-mercaptoethanol을 함유한 Tris-HCl buffer (pH 8.5)



**Fig. 1. The formation of protoplast by different growth phases of *C. cariosilignicola*.**

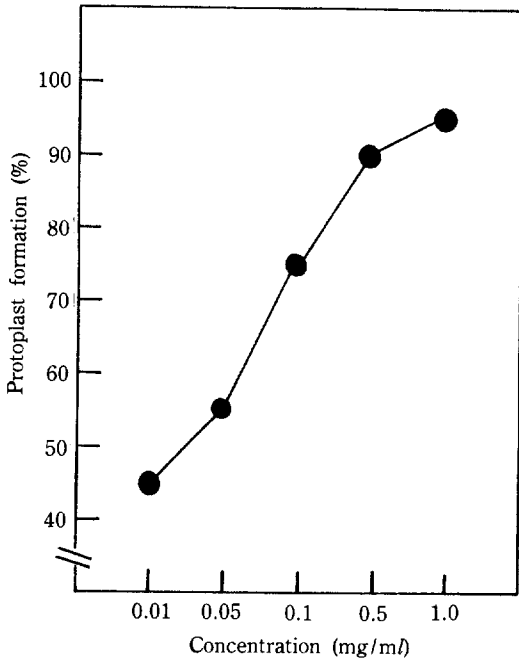
The cultivation was carried out in a test tube (22 x 200mm) with 10ml of 1/2 YM medium at 30°C Growth was measured at 660 nm after cells were sampled at 5hrs intervals.

○—○ ; growth ●—● ; protoplast formation



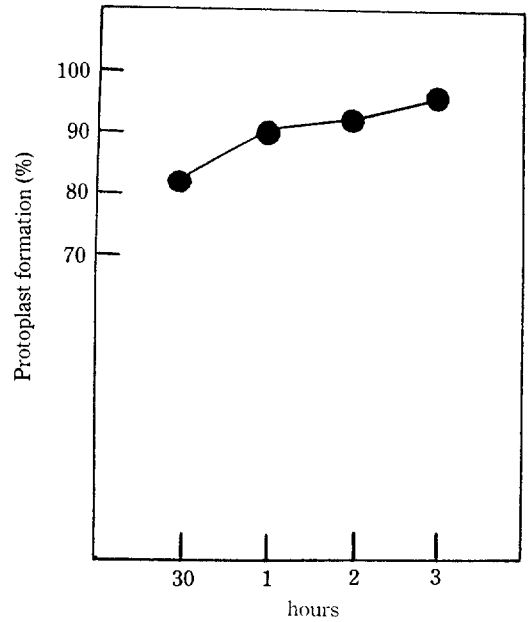
**Fig. 2. Effect of pH and buffer on protoplast formation of *C. cariosilignicola*.**

Buffer used; 0.05 M Sodium acetate buffer (●—●), 0.05 M Sodium phosphate buffer (○—○), 0.05 M Potassium phosphate buffer (△—△), 0.05 M Tris-HCl buffer (□—□), and 0.05 M Glycine-NaOH buffer (▲—▲).



**Fig. 3.** Effect of zymolyase concentration on protoplast formation of *C. cariosilignicola*.

Protoplast formation was carried out in various zymolyase concentration at 30°C for 1 hr.



**Fig. 4.** Determination of optimal enzyme reaction time for protoplast formation of *C. cariosilignicola*.

Protoplast formation was carried out in 0.5 mg/ml zymolyase for various times at 30°C.

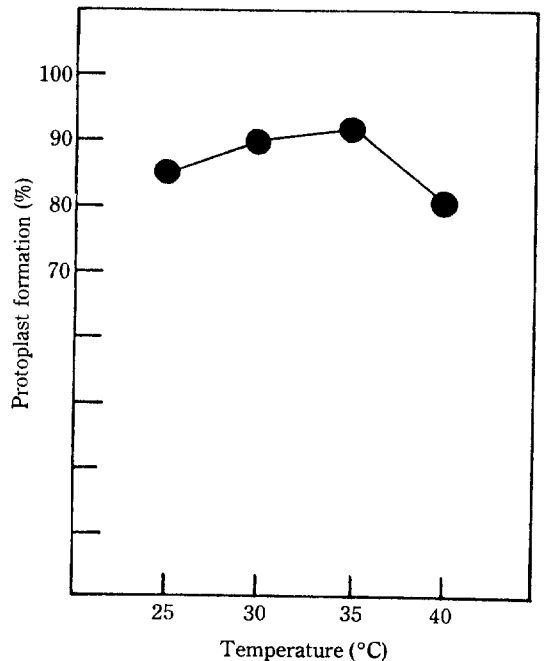
로 현탁시킨 후 Zymolyase를 농도별로 첨가하여 protoplast 형성률을 측정하면 효소농도가 0.5 mg/ml일 때 protoplast 형성률이 90% 이상에 달했다(Fig. 3).

한편 이 농도에서 처리온도, 처리시간에 따른 protoplast 형성률을 측정한 결과 35°C에서 1시간 반응시키는 것이 가장 효과적임을 알 수 있었다(Fig. 4, 5).

**세포벽 재생**

**PEG 처리시간에 따른 영향:** 세포벽의 재합성을 촉진하는 중요한 인자로서 1981년 Svoboda는 PEG가 protoplast 융합 뿐만 아니라 세포벽 재생에도 효과가 있다고 보고한 바가 있다(1981). 그러나 본 실험에서는 protoplast 현탁액을 원심분리한 후 35% PEG에 처리하여 반응시간에 따른 재생률을 측정해 본 결과 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Table 3).

특히 2시간 이상 처리하면 재생율이 아주 낮아짐을 알 수 있었으므로 35% PEG 용액에 처리하는 과정을 거치지 않고 바로 재생과정을 시행하였다.



**Fig. 5.** Effect of incubation temperature on protoplast formation of *C. cariosilignicola*.

Protoplast formation was carried out in 0.5 mg/ml zymolyase at various incubation temperature.

**Table 3.** Effect of treatment time of 35% PEG on regeneration of *C. cariosilignicola*.

Treatment time	Regeneration
0	$9.8 \times 10^7$
10 min.	$1.43 \times 10^7$
30 min.	$2.66 \times 10^6$
60 min.	$2.0 \times 10^6$
120 min.	$3.0 \times 10^5$

Protoplast regeneration was carried out for 7 days at 30°C Regeneration frequency; Number of colonies/ $3 \times 10^9$  protoplast.

**배양법의 영향 :** 단층평판법, 중층법 및 Russell pouter 법을 사용하였다 (Russell, 1982). 본 실험의 결과는 Table 4와 같다. Russell pouter 법은 일반적인 중층법과는 달리 현탁액을 50mM CaCl<sub>2</sub>가 들어있는 0.5% 한천배지에 직접 혼합하여 2% 재생한천배지에 중층시킨다. 또 35% PEG가 들어있는 액체배지를 재생배지로 이용하는 방법 등이 있는데 (A, SVOBODA, 1983) 본 실험에서는 Russell pouter 법과 중층법이 효과적이었다.

**융합주의 선별 :**

일반적으로 효모세포를 protoplast 융합시킬 때 는 융합주의 선별을 용이하게 하기 위하여 영양요 구주나 호흡결손주 등을 사용한다. 본 실험에서는 균주의 유전적특성을 그대로 보유하기 위하여 돌 연변이를 유발시키지 않고 원래의 균주를 protoplast화 시켜서 융합하였다. 그러므로 융합주를 선별하기 위한 marker로써 원균주의 생리적 성질을 이용하였다.

**Table 4.** Effect of plating methods on regeneration of *C. cariosilignicola*.

Plating methods	Number of colonies
Monolayer method	$0.6 \times 10^7$
Overlayer method	$1.1 \times 10^8$
Liquid medium containing 35% PEG	$7.0 \times 10^7$
Medium containing 50 mM CaCl <sub>2</sub> and 0.5% agar	$1.2 \times 10^8$

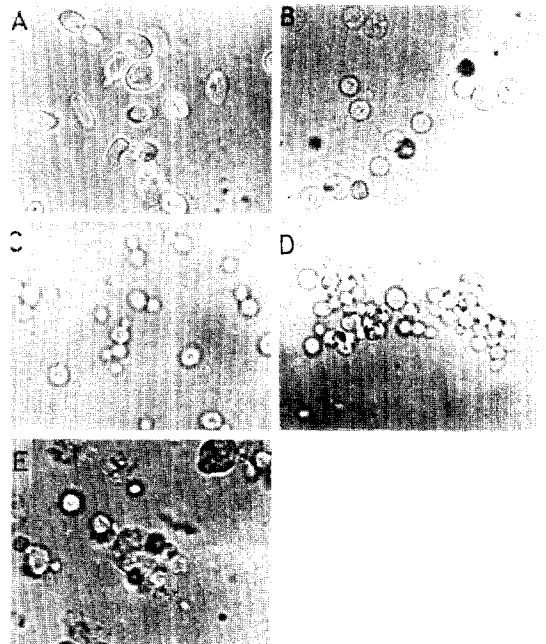
Protoplast regeneration was carried out for 7 days at 30°C Regeneration frequency; Number of colonies/ $9 \times 10^8$  protoplast.

Protoplast 혼합액을 최소배지에 중층시켰을 때 융합주로 간주될 수 있는 colony가 0.01% 빈도로 형성되었다( $1 \times 10^8$ ). 형성된 융합주의 안정성을 각각 조사하기 위하여 모든 colony를 H. Miller (1977)의 replica plating 방법에 준하여 최소배지 (Galactose 0.5%, Yeast nitrogen base 0.67%)에 2회 연속 배양하였다. 그 중에서도 생육이 비교적 왕성한 균주를 최종적으로 선별하여 생육도와 탄소원의 차화능의 차이에 의하여 SC<sub>1</sub>, SC<sub>2</sub>, SC<sub>3</sub>로 명명하였다.

**융합세포의 성질**

**형태적인 성질 :** 각 protoplast를 1:1로 섞은 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 PEG 용액 2 ml을 가하여 30°C에서 10분간 처리한 결과 Fig. 6과 같은 형태가 나타났었다.

세포의 크기에 있어서는 일반적으로 친주보다는 융합주가 크다고 보고된 바 있다 (Jung Hwn Seu, 1986).



**Fig. 6.** Microscopic photographs of (A) *S. cerevisiae* IAM 4512, (B) protoplast formation of *S. cerevisiae* IMA 4512, (C) *C. cariosilignicola* IAM 12484 and (D) protoplast formation of *C. cariosilignicola* IAM 12484. Protoplasts was suspended in the 0.6M Kcl. (E) 35% PEG-treated mixture of *S. cerevisiae* protoplasts and *C. cariosilignicola* protoplasts for 10min.

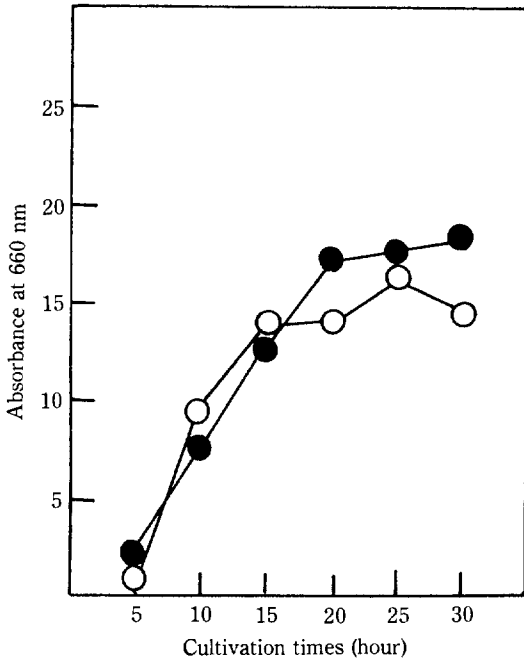


Fig. 7. Growth of SC<sub>1</sub> and SC<sub>2</sub>.

The cultivation was carried out in a test tube (22 x 200mm) with 10 ml of 1/2 YM medium at 30°C. Growth was measured at 660 nm after cells were sampled at 5 hrs, intervals.

●—; SC<sub>1</sub> ○—; SC<sub>2</sub>

본 실험결과 융합체를 재생시킨 후 3주간은 친주보다 큰 구형인 출아세포였으나 그 후 친주인 *C. cariosilignicola*의 크기와 비슷하게 복귀되는 현상이 나타났었다.

**생리적인 성질:** 융합체 해석에 쓰이는 균주의 생리적인 성질로서는 증식률, 탄소원의 자화능 등을 사용하였다.

증식량의 측정결과 *S. cerevisiae*는 30°C에서 높은 증식률을 보였으나 40°C에서 증식이 억제되었고 *C. cariosilignicola*는 40°C에서도 증식률이 높았다. 융합주의 경우 SC<sub>1</sub>과 SC<sub>2</sub>는 40°C에서 증식률이 높았으나 42°C에서는 저조하였다. 또 융합주 SC<sub>1</sub>, SC<sub>2</sub>에 대하여 완전배지상에서의 생육속도를 검토한 결과 융합세포의 대수증식기는 20시간째에 나타났으나 친주의 대수증식기는 10시간째에 나타났다. 즉 융합세포는 친주보다 대수증식기되는 시기가 늦은 것으로 사료된다.

생육곡선의 측정결과에 의하면 SC<sub>1</sub>는 *S. cer-*

Table 5. Physiology characteristics of SC 1 SC 2 and SC 3.

	SC 1	SC 2	SC 3
Galactose	+	+	-
Glucose	+	+	+
Maltose	W	W	W
Methanol	+	+	+
Nitrate	+	+	+
Growth at 42°C	W	W	W

+ ; Good growth W; Weak growth - ; No growth

*evisiae*와 유사하고 SC<sub>2</sub>는 *C. cariosilignicola*와 유사함을 알 수 있었다.

각 융합주의 탄소원의 자화능을 검토한 결과 양친주와 유사한 성질을 가지는 균주와 중간적인 성질을 나타내는 균주로 나뉘었다(Table 5).

즉 Table 5에서 나타난 바와 같이 SC<sub>1</sub>과 SC<sub>2</sub>는 galactose, methanol, potassium nitrate 를 모두 자화할 수 있는 것으로 보였으나 SC<sub>3</sub>는 maltose, methanol, potassium nitrate를 자화할 수 있었다. SC<sub>3</sub>를 30일 후 다시 검토한 결과 maltose의 자화능은 상실되고 methanol과 potassium nitrate만 자화할 수 있었다. 이것은 아마도 융합주가 불안정하여 life cycle을 거치는 동안 결국 친주인 *C. cariosilignicola*로 되돌아간 것으로 추측된다. 이와같은 예로는 1978년 Sipiczki가 *S. pombe*와 *Schizosaccharomyces octosporus* 사이의 세포를 융합시켰으나 융합주가 불안정하여 다시 친주인 *S. octosporus*의 성질만 가진 colony가 분리되었다고 보고하였다. 같은 해에 Provost (1978)가 *Candida tropicalis*와 *Saccharomyces fibligera* 사이의 세포융합 실험을 한 결과도 역시 융합주가 불안정하여 계대배양시 친주로 복귀되었다고 보고하였으며, 1981년 Stewart 역시 *Saccharomyces* strain과 *K. lactis* 사이의 융합주가 불안정하여 친주로 복귀되었다고 보고하였다 (1983).

이와같이 원형질체의 융합에서 얻어진 융합주는 일반적으로 불안정하여 양친의 형질로 흡수되는 결과는 본 실험상에서도 나타났었다.

## 적 요

Methanol 자화성 효모중에서 40°C 이상에서 생육할 수 있는 생리적인 특징을 가진 *Candida cariosilignicola*의 protoplast 형성과 재생조건을 먼저 검토한 후 *C. cariosilignicola*와 *S. cerevisiae* 사이의 protoplast 융합조건을 조사하였다. *C. cariosilignicola*의 원형질체 형성의 최적조건은 용균효소인 Zymolyase를 0.5mg/ml 농도로 35°C 1시간 처리하였을 때 이었고 삼투압 안정제로서는 0.6M KCl이 가장 효과적이었다.

재생배지는 50mM CaCl<sub>2</sub>를 함유한 0.5% 한천배지에 protoplast 현탁액을 혼합한 다음 2%의 한천배지상에 중층시키는 Russell pouter법을 사용하였다.

두 균주의 protoplast를 동일한 양으로 혼합시킨 후 원심분리하여 균체를 모으고 35% PEG가 함유된 50mM CaCl<sub>2</sub>용액 2ml에 30°C 10분간 처리하여 0.6M KCl이 들어있는 최소배지에 중층한다. 그리하여 40°C 7일간 배양한 결과 융합주 SC<sub>1</sub>, SC<sub>2</sub>, SC<sub>3</sub>을 얻었다. 최소배지에서 생육한 융합주를 3회 같은배지에 계대배양하여 탄소원의 자화능을 검토해 본 결과 SC<sub>1</sub>과 SC<sub>2</sub>는 maltose, galactose, methanol, potassium nitrate를 자화할 수 있었으나 SC<sub>3</sub>의 경우에는 maltose, methanol, potassium nitrate는 자화할 수 있었으나 galactose의 자화능은 가지고 있지 않았다.

## 사 사

본 연구는 86년도 한국과학재단 목적기초연구비로 수행되었음.

## REFERENCES

1. Arnold, Wilfred N. and Robert G. Garrison, 1979. Isolation and Characterization of Protoplasts from *Saccharomyces roussii*. *J. of Bacteriology* **137**, 1386-1394.
2. Ferenczy, L. and Anna Maráz, 1977. Transfer of mitochondria by protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **268**, 524-545.
3. Lee, J.D. and KOMAGATA, 1980. *Pichia cellobiosa*, *Candida cariosilignicola*, and *Candida succiphila*, New Species of Medtand-As-similating Yeast. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 514.
4. Lee, K.J., 1983. Recent Developments of Biotechnology for Ethanol fermentation *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **11**, 311-316.
5. Matyasspiczki, 1982. Hybridization studies by Crossing and Protoplast Fusion within the Genus *Schizosaccharomyces* Lindner. *J. of General Microbiology* **128**, 1989-2000.
6. Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
7. O. NECAS, 1971. Cell wall synthesis in Yeast Protoplasts *Bacteriological Reviews* **35**, 149-170.
8. Potrykus, I. and C.T. Harms, Zurich, 1983. Protoplasts 1983. 160-161.
9. Poulter Russell, 1982. Recombination Analysis of Naturally Diploid *Candida albicans*. *J. of Bacteriology* **152**, 969-975.
10. Poulter, Russell and Kate Jeffery, 1981. Para-sexual Genetic Analysis of *Candida albicans* by Spheroplast Fusion. *J. of Bacteriology.* **146**, 833-840.
11. Russeli, I. and G.G. Stewart, 1979. Spheroplast fusion of brewers Yeast Strains. *J. Inst. Brew.* **74**. 95-98.
12. Seu, J.H., T.K. Kwon, 1986. Isolation and characterization of fusant between *S. diastaticus* and *C. tropicalis*. *Kor. J. Appl. Microbiol Bioeng.* **14**, 359-363.
13. Svoboda, 1981. Ferenczy L, Keveif (eds) Training course on fungal protoplast fusion and its applications, Attila zozsef University, Szeged, Hungary, 65.
14. SVOBODA, A, 1978. Anion of Yeast protoplasts Induced by Polyethylene Glycol. *J. of General Microbiology.* **109**, 165-175.
15. SVOBODA, A, and D. PIEDRA, 1983. Reversion of Yeast Protoplasts in Media Containing Polyethylene Glycol. *J. of General Microbiology* **129**, 3377-3379.
16. 有馬賢治, 高野, 1979. 微生物의 Protoplast 融合, 醱酵工學, **57**, 380~395.
17. 飯塚廣, 後藤昭二: 酵母의 分類同定法: **42**, (1963).

(Received Dec. 7, 1987)