

Xylanase 분비효모와 Xylose 발효효모의 Protoplast Fusion

김남순·배명애·서정훈*

경북대학교 자연과학대학 미생물학과

Cell Fusion Between Xylose Fermenting Yeast and Xylanase Secreting Yeast

Kim, Nam-Soon, Myung-Ae Bae and Jung-Hwn Seu*

Department of Microbiology, College of Natural Science, Kyungpook National University,
Taegu 702-701, Korea

To improve a new yeast strain capable of converting xylan to ethanol directly, we tried protoplast fusion between xylose fermenting yeast (*Candida* sp. X-6-41) and xylan assimilating yeast (*Cryptococcus* sp. XB-33), finally selected the most promising two fusants (XFU-1 and XFU-2). As the optimum conditions for protoplast formation, the yeast cells were cultured to exponential phase in YPD and YPX containing 0.6M KCl, respectively, and then treated with zymolyase (0.25mg/ml), cellulase(4mg/ml) and 100mM 2-mercaptoethanol at pH 8 and 30°C. The protoplasts of parental auxotrophs were fused in the presence of 20mM CaCl₂ and 40% polyethylene glycol(M.W. 4000). The physiological and morphological characteristics of the fusants, such as assimilation of carbon sources, cell size, growth rate, xylanase activity and xylan fermentation ability were investigated. Xylanase activity of fusants that cultured in chemically minimal medium was higher than that of fusants that cultured in completed medium, because xylanase producing activity of xylose fermenting yeast(X-6-41) was inhibited by isoleucine.

목재, 농산물폐기물에 상당량 존재하는 hemicellulose의 주된 성분은 xylan이며, arabinose가 side chain에 결합된 것이 가장 일반적인 형태이다. Xylan을 분해하는 enzyme에 대해서는 세균, 효모, 곰팡이 등(1-3)에서 보고되어 있으나 xylan을 기질로 하여 ethanol을 직접 생성하는 효모에 대해서는 보고된 바가 없다. 다만 ruminal xylan-fermenting bacteria에 의해 xylan이 발효된다는 보고(4-6)가 있으나 그의 발효산물의 성질조차도 밝혀지지 않았으며 ethanol 생성은 거의 보고되어 있지 않는 실정이다.

그래서 본 연구에서는 xylan으로부터 당화조작을 거치지 않고 직접 ethanol을 생성하는 효모균주를 개발하기 위하여 전보에서 분리, 선정된 xylanase 분비효모 *Cryptococcus* sp.인 XB-33 균주(7)와

xylose 발효효모 *Candida* sp.인 X-6-41 균주(8)를 NTG 처리하여 얻은 영양요구주를 protoplast fusion시켰으며 이때 얻어진 fusant의 xylan을 기질로 했을 때의 ethanol 발효력과 성질들을 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 실험에 사용한 균주는 xylose 발효효모 *Candida* sp.인 X-6-41(8)과 xylanase 분비효모 *Cryptococcus* sp.인 XB-33(7)의 야생주이며, 이들 균주를 N-methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine(NTG)으로 처리하여 분리한 영양요구 변이주와 이들 균주의 원형 질체를 융합하여 얻은 융합체로서 그 내용은 Table 1과 같다.

Table 1. List of used strains.

Strain	Phenotype	Remark
X-6-41*	Wild type	Isolated from soil
XB-33**	Wild type	Isolated from soil
X-6-41-1	His ⁻	NTG mutant of X-6-41
XB-33-37	Arg ⁻	NTG mutant of XB-33
XFU-1	Wild type	Fusant between X-6-41 and XB-33
XFU-2	Wild type	Fusant between X-6-41 and XB-33

*; Xylose fermenting strain

**; Xylanase secreting strain

배지 및 배양

영양요구 변이주 분리를 위해서는 YPX 배지, 원형질체 생성을 위해서는 각각 0.6 M KCl을 첨가한 YPD, YPX 배지에서 대수증식기 말기(X-6-41 : 17 hr, XB-33 : 36 hr)까지 증식한 균체를 사용하였고, 원형질체의 재생을 위해서는 완전배지와 최소배지에 0.6 M KCl을 첨가한 hypertonic 고체배지에서 5~7 일간 배양하였고, xylanase 생성과 alcohol 발효를 위해서는 chemically defined medium(CDM), XSD, XPM 배지를 사용하였으며 이들의 조성은 Table 2와 같다.

영양요구 변이주의 분리

영양요구성 변이는 Alderberg(9), Lederberg(10), Holliday(11) 등의 방법에 준하여 분리하였다.

Xylose 발효효모 X-6-41 과 xylanase 분비효모 XB-33 을 YPX 배지상에서 배양하여 이 균체를 식염수로 세척한 후 0.5 mg/ml 의 NTG 가 들어있는 식염수에 현탁하여 30°C에서 30 분간 처리하였다. NTG 처리된 균체를 식염수로 2 번 세척, 원심분리하여 완전배지에 도말한 후 완전배지에서 생육된 colony 를 다시 완전배지와 최소배지에 이식하여 최소배지에서 자라지 않은 colony 를 amino acid pool 을 이용하여 그 영양요구성을 확인하였다.

원형질체의 생성

원형질체의 생성은 Fournier 등(12)의 방법을 변형하여 사용하였다.

각각 0.6 M KCl을 첨가한 YPD, YPX 배지상에서 대수증식기 말기까지 배양한 균체를 회수하여 살균된 식염수로 2 번 세척한 후 zymolyase 5,000

Table 2. Composition of media.

Ingredient (%)						
	CM	MM	YPX	CDM	XSD	XPM
Xylose	2	2	1	—	—	—
Xylan	—	—	—	1	1	1
Yeast extract	0.2	—	0.5	—	—	0.1
Polypeptone	0.1	—	0.5	—	—	0.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2	0.2	—	0.3	0.2	0.1
NBWA*	—	—	—	—	0.2	—
NaH ₂ PO ₄	0.1	0.1	—	0.1	0.05	0.1
CaCl ₂	—	—	—	0.1	—	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	0.05	—	0.1	0.05	0.01
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001	0.001	—	—	—	—
KCl	0.05	0.05	—	—	—	—

*; Yeast nitrogen base without amino acid

**; Hypertonic medium = complete or minimal med. + KCl to 0.6M

(0.25 mg/ml), cellulase (4 mg/ml), 100 mM 2-mercaptoethanol 을 함유한 0.6 M KCl Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 현탁하여 30°C에서 일정간격 시간 동안 반응시켜 protoplast 화 시켰다. 원형질체 생성 정도는 Yamamura 등(13)의 방법에 따라 용균율 (Lysis ratio)로 나타내었다.

원형질체 융합과 선별

원형질체 융합은 Fournier 등(12)의 방법을 사용하였다.

친주의 원형질체를 1 : 1로 섞은 후 원심분리하여 회수한 균체를 40% (w/v) PEG 4000 와 20 mM CaCl₂ 가 든 0.6 M KCl Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 현탁하여 30°C에서 10 분간 반응시켰다. 이 용액을 20 mM CaCl₂ 가 든 0.6 M KCl Tris-HCl buffer 로 희석, 세척한 후 0.6 M KCl 과 2% agar 를 함유한 CM 과 MM 에 중층 도말하였다. 영양요구성이 상호 보완되어 자란 융합체를 7 일 간격으로 최소배지에 계대배양하면서 유전적으로 안정화시킨 후(12) 생육이 비교적 왕성한 균주를 1 차 선별하여 xylose fermentation, xylanase activity, xylan fermentation 능력이 높은 균주를 최종적으로 선별하였다.

세포크기의 측정

융합세포와 친주의 세포크기 측정은 Sipiczki 등(14)의 방법을 사용하였다.

YPX 환천사면배지에 보존된 각각의 균주를 액체

YPX 에 옮겨 30°C에서 24 시간 배양한 후 다시 새로운 YPX 액체배지상에 접종하여 30°C에서 18 시간 배양하고 cell volume 을 측정하였다.

Alcohol 정량

발효액을 일정량 채취하고 약 90% volume 까지 증류한 후 증류수로 원래의 volume 으로 make up 시킨 후 gas chromatography 로 측정하였다.

Xylanase activity 측정

효소액 0.1 ml 와 0.5 ml 의 1% xylan 현탁액(0.5N NaOH에 녹인 후 0.5N HCl로 중화) 및 0.5 ml 의 50mM phosphate buffer(pH5.0)를 잘 혼합하여 50°C에서 60분간 반응시킨 후 이의 원심상등액 1ml 에 DNS(Dinitrosalicylic acid) (15) 용액 1ml 를 가하여 15분간 boiling water bath 에서 처리한 후 546 nm 에서 O. D. 를 측정하였다.

결과 및 고찰

Protoplast 형성조건

X-6-41 균주와 XB-33 균주의 protoplast 형성조건을 검토한 결과 lytic enzyme zymolyase 와 cellulase 를 각각 처리한 경우 보다 동시에 섞어 처리한 경우 시간에 따른 protoplast 율은 상당히 높아졌다(Table 3).

또한 결과에 표시하지 않았으나, 배양시간과 dithiothreitol 및 2-mercaptoethanol 농도, 처리시간에 따른 protoplast 형성은 큰 차이가 없었으며 X-6-41 의 경우 YPD 배지에 0.6M KCl 을 첨가한 고장액배지에서 대수증식기 말기까지 배양한 균체를

Table 3. Effect of enzyme on protoplast formation.

Enzyme	Strain	Protoplast ratio (%)			
		60min	90min	120min	150min
Zymolyase (0.25mg/ml)	XB-33	16.2	12.7	15.1	19.7
	X-6-41	23.0	23.0	28.3	37.1
Cellulase (4mg/ml)	XB-33	11.0	13.9	12.7	17.4
	X-6-41	31.2	41.6	42.3	43.1
Zymolyase + Cellulase	XB-33	28.2	35.3	34.2	45.2
	X-6-41	36.1	42.0	46.4	56.8

The cells which were cultured in YPX medium were incubated with different enzyme in 0.6M KCl Tris-HCl buffer containing 100mM of 2-mercaptoethanol at 30°C for various time

protoplast 시켰을 때 protoplast 율은 약 80% 까지 상승하였다(Table 4). 전반적으로 이들 두 균주의 protoplast 형성율은 비교적 낮은 편이었으며 protoplast regeneration 을 고려하여 세포융합에서는 0.6 M KCl 을 함유한 액체배지에서 각 균주를 대수증식기 말기까지 배양시킨 후 zymolyase 와 cellulase 를 각각 0.25 mg/ml, 4 mg/ml 농도로 섞어 60~90 분 처리하였다.

탄소 자화능 조사

Parent cell 인 *Cryptococcus* sp. XB-33 은 inositol 은 자화할 수 있으나 trehalose 와 arabinose 는 자화할 수 없는 반면에, *Candida* sp.인 X-6-41 은 그 반대이다. 그래서 유전적으로 안정화된 융합세포를 선별하여 탄소자화능 상호보완성을 조사하여 본 바 fusant XFU-1, XFU-2 은 XB-33-37, X-6-41-1 균

Table 4. Effect of culture medium on protoplast formation.

Medium	Strain	Protoplast ratio (%)		
		60min	90min	120min
YPD	XB-33	27.4	33.2	35.4
	X-6-41	37.0	42.3	45.2
YPX	XB-33	28.0	31.0	32.0
	X-6-41	35.4	40.1	43.0
KYPD*	XB-33	32.0	36.0	41.0
	X-6-41	79.2	80.1	80.9
KYPX**	XB-33	35.0	39.1	42.0
	X-6-41	69.2	72.1	72.0

The cells were cultured to exponential phase in different medium and then incubated in 0.6M KCl Tris-HCl buffer containing zymolyase (0.25 mg/ml), cellulase (4mg/ml) and 100mM of 2-mercaptoethanol at 30°C for various time

*: Hypertonic YPD medium containing 0.6M KCl
 **: Hypertonic YPX medium containing 0.6M KCl

Table 5. Carbon assimilation of parent & fusant

Strain	Assimilation		
	Trehalose	Inositol	Arabinose
XB-33-37	-	+	-
X-6-41-1	+	-	+
XFU-1	+	+	+
XFU-2	+	+	+

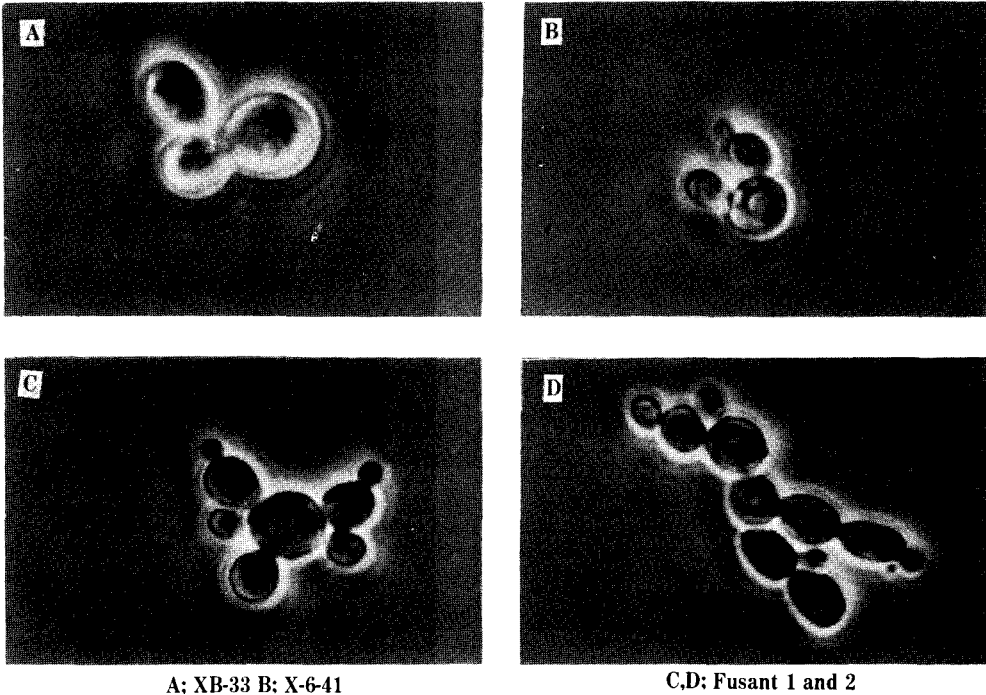


Fig. 1. Photomicrographs of parents and fusants.

Table 6. Cell size of parents and fusants.

Strain	Cell size(μm)	Cell volume(μm^3)
XB-33-37	6.7	157.4
X-6-41-1	4.8	57.9
XFU-1	5.5	87.1
XFU-2	5.3	77.9

주와 달리 trehalose, inositol, arabinose 에 대한 자화능을 가짐을 확인하였다.

세포크기 측정과 형태관찰

융합세포와 친주세포의 크기를 측정한 결과 Table 6 과 같이 fusant 인 XFU-1, XFU-2은 wild type 의 중간크기를 보였다.

그리고 세포의 형태를 관찰한 결과 Fig.1 과 같이 fusant 는 bipolar budding 을 하여 chain 과 같은 형태임을 관찰할 수 있었다.

생육도 조사

Fusant 의 생육도를 조사한 결과 X-6-41 은 유도기가 3hr, XB-33 은 9hr 이며 fusant 는 9hr 으로 나타났다. Fusant 의 growth curve pattern 은 대체

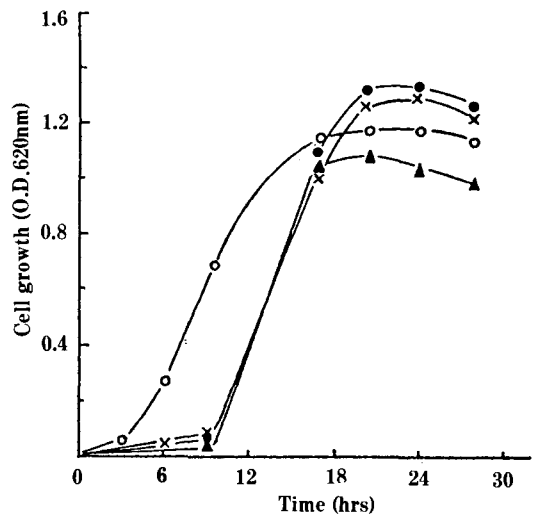


Fig. 2. Growth curve of parents and fusants. Strains were cultured in YPX medium 30°C, and the growth were measured at 620nm. O-O: X-6-41, x-x: XB-33, ●-●: XFU-1, ▲-▲: XFU-2

적으로 XB-33 과 비슷하였다(Fig.2). 이는 Sakai 와 Saitoch(16)의 보고에 따르면 parent cell 보다 fusant 의 생육이 떨어진다라는 보고와는 상이하였다.

Table 7. Alcohol anaerobic fermentation of fusants on xylan.

Strain	Alcohol concentration (%)
XB-33	0.000
X-6-41	0.008
XFU-1	0.214
XFU-2	0.280

Substrate; 2% of xylan Ferment. Temp.; 30 °C
 N-source; 0.2% of (NH₄)₂SO₄ + YNBWA 0.1%
 Shaking culture for 10days/15days (120 strokes/min)
 Alcohol was determined with GC

Table 8. Xylanase production of fusants.

Strain	Relative activity (%)		
	CDM	XSD	XPM
XB-33	6.3	8.4	100.0(1.5)*
X-6-41	65.3	63.3	3.0
XFU-1	81.0	77.3	0.6
XFU-2	100.0(0.9)*	100.0(0.7)*	0.0

Cells were grown at 30 °C for 7 days.
 Xylanase activity was measured at 50 °C for 1 hour in the 50mM phosphate buffer (pH 5.0)
 *: Relative activity: O.D. difference of C and S at 546 nm.

Xylan에서의 alcohol 발효력

Fusant의 alcohol 발효력을 조사하기 위하여 2% xylan을 기질로 한 최소배지에서 발효를 진행시킨 후 alcohol 농도를 측정된 결과 fusant인 XFU-1, XFU-2은 wild type보다 alcohol 농도가 높은 0.214%, 0.280%을 나타내었다(Table 7).

Xylanase 생성력

1% xylan을 기질로 한 액체배지에 균을 접종하여 30°C, 6일간 진탕배양한 배양상등액을 enzyme solution으로 하여 상법에 따라 xylanase 생성력을 조사하여 상대활성으로 나타낸 결과 Table 8과 같이 최소배지인 CDM, XSD에서는 선별된 fusant가 xylanase activity를 나타내었는데 반해 완전배지인 XPM에서는 xylanase 활성이 거의 없었다. 이는 fusant가 X-6-41의 성질을 많이 발현하는 것으로 추측되며 X-6-41이 완전배지에서는 xylanase 활성이 거의 없는 것은 전보(17)에서 전술한 것과 같이 xylanase 생성시 isoleucine이 xylanase 생합성을 억제하는 결과로 추측되었다.

요 약

Xylan성 biomass로부터 직접 alcohol을 얻고자 xylose 발효효모 X-6-41 균주의 NTG mutant인 X-6-41-1(his⁻) 균주와 xylanase 분비효모인 XB-33의 NTG mutant XB-33-37(Arg⁻) 균주를 세포융합시켰다. 원형질체 생성조건은 KYPX(XB-33), KYPD(X-6-41)에서 대수증식기 말기까지 증식한 세포를 집균하여 zymolyase(0.25 mg/ml), cellulase(4 mg/ml)와 100 mM 2-mercaptoethanol 처리시 protoplast 화율은 X-6-41 경우 80%, XB-33인 45%로 나타났다. 선별된 융합체의 탄소자화능은 parent의 자화능을 서로 보완하였음을 확인하였고 xylan에서의 alcohol 발효는 2% xylan에서 발효 15일만에 총당에 대해 0.28% alcohol 농도를 나타내었다. Parent와 fusant의 xylanase 활성은 완전배지보다 최소배지에서 높았는데 이것은 xylose 발효효모(X-6-41)의 경우 isoleucine에 의한 xylanase production inhibition 효과와 일치하였다.

사 사

본 연구는 1987년도 한국과학재단 목적 기초 연구비에 의해 수행되었다.

참고문헌

- Ernest, K.C. Yu, U.L. Tan Larry, K.C. Maris and J.N. Saddler: *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 19 (1987).
- Biely, P., M. Vrsahska and Z. Kratky: *Eur. J. Biochem.*, **108**, 313 (1980).
- Notario, V., T.G. Villa and J.R. Villanueva: *Can. J. Microbiol.*, **22**, 312 (1976).
- Bryant, M.P. and N. Small: *J. Bacteriol.*, **72**, 16 (1956).
- Hobson, P.N. and M.R. Purden: *J. Appl. Bacteriol.*, **24**, 188 (1961).
- Robert, B.H., R. Wolf and R.J. Bothast: *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2849 (1987).
- Bae, M.A. and J.H. Seu: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, In press.
- Kim, N.S. and J.H. Seu: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, In press.
- Alderberg, E.A., M. Mandel and G.C.C. Chen: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **18**, 788 (1965).

10. Lederberg, J. and E.M. Ledberg: *J. Bacteriol.*, **63**, 399 (1952).
11. Holliday, R.: *Nature*, **178**, 987 (1956).
12. Fournier, P., A. Provost, C. Bourquignon and H. Heslot: *Arch. Microbiol.*, **115**, 143 (1977).
13. Yamamura, M., Y. Teranishi, A. Tanaka and S. Fukui: *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 13 (1975).
14. Sipizki, M. and L. Frenczy: *FEMS Microbiology Lett.*, **2**, 203 (1977).
15. Mandels, M. and Weber: *J. Adv. Chem., Ser.*, **95**, 391 (1969).
16. Sakai, T., K.I. Koo and K. Saitoch: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 297 (1986).
17. Bae, M.A., N.S. Kim and J.H. Su: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, In press.

(Received October 13, 1988)