

Pachysolen tannophilus 융합주와 영양요구성 변이주에 의한 xylose 이용성 및 발효성의 비교연구

안재국 · 안원근 · 이재동 · 전홍기
부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Comparative studies on xylose utilization and fermentation by *Pachysolen tannophilus* fusants and auxotrophs

Jae-Kook Ahn, Won-Gun An, Jae-Dong Lee and Hong-Ki Jun

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

ABSTRACT: Auxotrophs induced by UV irradiation were lysine, arginine, methionine, and cysteine requirement. The optimal protoplast-producing conditions of *Pachysolen tannophilus* were obtained in 1 hr incubation treated zymolyase 0.5 mg/ml at 37-42°C (pH 6.5-8.5 with 0.6 M KCl as osmotic stabilizer). Cell volume of fusants were counted in about 4 times of parents and their morphological characteristics were similar to parents which were global or egg-shaped, though in fusant, pseudohypha were observed frequently. Ethanol production of fusants were similar to parents, but arginine and methionine auxotrophs were showed increased ethanol production respectively 1.6 times and 1.25 times more than parents.

KEYWORD: *Pachysolen tannophilus*, fusants, auxotrophs, ethanol production.

미래의 식량자원 및 에너지원의 확보를 위하여 식물성 biomass를 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 과정에서 식물성 biomass의 주요 당성분중의 하나인 xylose를 이용하여 미생물 단백질이나 미래의 중요한 연료로 부각되고 있는 ethanol을 생산하려는 연구의 일환으로 1980년대에 xylose를 발효할 수 있는 몇몇 효모종이 검색되었다. 이 중에서 *Pachysolen tannophilus*는 xylose뿐만 아니라 glycerol, galactose 등도 발효할 수 있으며 (Schneider 등, 1982) 호산성 발효균(Kurtzmann 등, 1982)으로도 잇점이 있다고 보고되었다. Maleszka 등(1983)은 *P. tannophilus*의 mating에 의해서 생성된 diploid이상의 polyploid균주가 2% xylose배지에서 ethanol생성율이 약 1.2배 증가하였고 생육도도 빨라졌다고 보고하였으며, ethanol자화능이 결손된 변이주에서 발효능이 증대되었다는(Lee 등, 1986) 보고가 있다.

Mating에 의해 생성된 diploid균주 등이 *P. tannophilus*의 life cycle상에서 짧은 기간동안만 유지되다가 자낭포자를 형성하여 haploid로 되는 불안정한 특성이 있으므로, 본실험에서는 diploid균주의 안정성을 높이고 보다 높은 빈도로 이들을 채집하기 위하여 UV에 의한 영양요구성 변이주를 유도하였다. 또한 영양요구성을 marker로하여 원형질체융합을 시도한 후에 융합주를 얻었다. 아울러 UV에 의해 유도된 영양요구성 변이주의 ethanol 발효능이 증대되는 특성을 보였으므로 이들 영양요구성 변이주와 융합주간의 xylose이용능력, 생육도, 발효능 등을 비교 검토하였다.

材料 및 方法

균주 및 배지조성: 본 연구에서는 *P. tannophilus* NRRL Y2460를 공시균주로 사용하였다. 보관용 및

생장용 배지로는 1% yeast extract, 1% bacto-peptone, 2% glucose로 구성된 YEPD배지를 사용하였으며 xylose의 이용성을 검토할 경우에는 탄소원으로 glucose대신에 xylose를 사용(YEPX배지)하였다. 영양요구성 변이주를 식별하기 위한 최소배지(MM)는 0.5%(NH₄)₂SO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄ · 7 H₂O, 1% glucose(또는 1% xylose), 0.5% yeast nitrogen base without amino acid로 조성하였으며 replica method에 사용된 대조군의 배지에는 각 영양요구물질을 100µg/ml 농도로 첨가하였다. 배양을 위한 고체배지에는 2%의 한천을 첨가하였고 삼투안정화 배지에는 0.6 M의 KCl과 0.6%의 한천을 첨가하였다.

시약 및 효소 : Protoplast형성을 위한 용균효소액은 0.1% 2-mercaptoethanol을 포함하는 0.6 M KCl용액에 zymolyase(일본 생화학 주식회사, ZYMOLYASE-5000)를 1% 농도로 첨가하여 membrane filter(pore size 0.22µm)로 멸균하여 준비하였다. Polyethylene glycol(PED)용액은 PEG 40g을 Tris-HCL buffer(pH 8.5)에 녹인 후 CaCl₂를 0.1 M 농도로 첨가하고 최종요구량을 100 ml조절하여 멸균하였다.

영양요구성 변이주의 분리 : *P. tannophilus*를 대수증식기 후기(18시간)까지 진탕배양하여 모은 균체를 0.5 mM sodium citrate buffer(pH 6.0)로 2회 세척한 후 균현탁액을 만들어 세포수를 5.0×10⁷/ml로 조정하였다. 암실에서 stirrer로 교반하면서 UV를 조사하여 얻은 균체를 YEPD 배지에 5.0×10⁶/ml의 농도로 접종하여 30°C, 24시간 진탕배양한 후, 변이주 농축을 위해 변이주의 농축을 위하여 여기에 nystatin을 20µg/ml되게 첨가하여 2시간 배양한 다음에 집균, 세척하였다(Farahnak 등, 1986). 상기의 균체를 적당히 희석하여 YEPD 배지에 도말하고 30°C(주 등, 1985), 2일간 배양한 후 나타난 colony를 replica method로 MM에 이식하여 영양요구주를 분리하였다.

융합대상 영양요구주의 선별 : Xylose를 탄소원으로 하는 MM에 상기의 방법에 의해 분리된 각 영양요구주를 1×10⁸개 접종하여 3일간 배양한 배지 상에 나타난 colony를 revertant로 간주하였다. 생육도는 YEPX 액체배지에서 2일간 전배양한 균체를 본 배지에 620 nm에서 O.D 0.14~0.20의 농도로

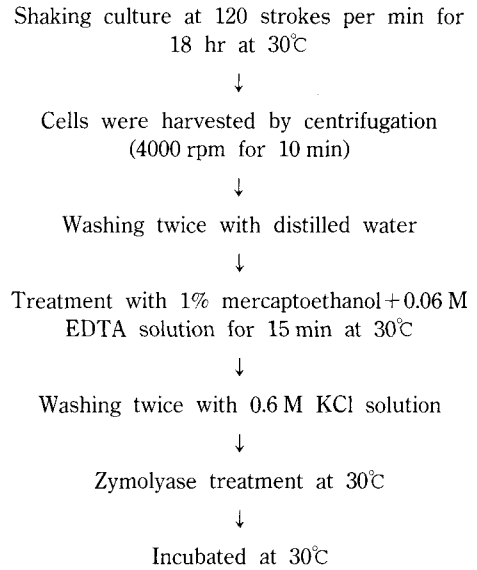


Fig. 1. Procedure of yeast protoplast formation.

접종한 후 진탕배양하면서 6시간 간격으로 흡광도로 측정하였다. Xylose발효능의 검토는 YEPX배지에서 24시간 진탕배양된 세포를 집균하여 5일간 정지배양하여 생성된 gas의 양으로 측정하였다.

Protoplast의 생성 : Protoplast의 생성과정은 Fig. 1에서 나타낸 바와 같다. Protoplast의 생성율은 protoplast용액 0.2 ml를 10 ml의 증류수에 희석하여 protoplast의 lysis를 유도한 후에 620 nm에서 흡광도를 측정하여 생성율을 검토하였다.

Protoplast의 재생 : Protoplast를 0.6 M KCl용액으로 1×10⁴/ml의 농도로 희석하여 희석액 0.1 ml를 재생배지에 도말하였다. 그 위에 43~44°C의 재생용 액화한천(0.06 M KCl+0.6% 한천)을 얇게 층층하여 protoplast의 재생을 유도하였으며, 재생 빈도는 백분율(%)로 나타내었다.

세포융합 : 세포융합은 xylose를 탄소원으로 한 배지에서 생육도가 양호하고 xylose발효능이 보전된 두 개의 영양요구성 변이주간에 이루어졌다. 융합 방법(Peberdy, 1979)은 Fig. 2에 나타내었으며, 세포융합의 빈도는 백분율(%)로 표시하였다.

융합주의 분리 및 분석 : MM에서 colony의 발육이 왕성한 16군주를 분리하여 YEPX배지에서의 예비발효능을 검토하였다. 그 결과 융합주의 발효능이

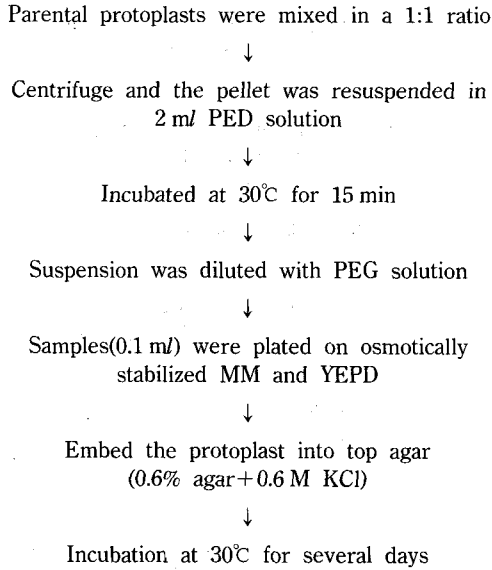


Fig. 2. Procedure of yeast protoplast fusion.

비교적 높고 발효효율이 양호한 3균주를 검토대상으로 하였다.

세포크기 측정: 세포를 YEPD배지에서 48시간 진탕배양하고 원심분리하여 멸균수를 2회 세척하였다. 이들을 현미경하에서 세포의 길이와 폭을 측정하였으며, 세포의 체적은 일반적인 방법에 의해 계산하였다.

DNA함량 측정: DNA는 Schneider의 방법(Schneider, 1945)으로 추출하고 정량은 Burton의 diphenylamine법(Burton, 1955)으로 하였으며 DNA standard로는 Calf thymus DNA(Sigma)를 사용하였다.

Ethanol의 정량: Ethanol의 정량은 Gas chromatography(HP 5890A model, USA)를 이용하였다. Column은 2 mm×6 ft의 glass column, 충전제는 Carbowax, injector온도 165°C, detector온도 135°C, detector는 FID이며 n-propanol을 internal standard로 하였다. 이 때 온도 program은 70°C~110°C였다. Sample injection량은 1 μ l이었으며, sample의 준비는 Lyons와 Bard의 방법(Gudzinowicz 등, 1977)으로 하였다.

Xylose의 정량: 배양액 0.1 ml에 증류수 0.9 ml을 넣고 3,5-dinitro salicylic acid 시약 3 ml을 첨가하여 끓는 수조에서 5분간 반응시킨 후 냉각수로 식히고

Table I. Reversion rate of isolated mutants

Mutant No.	Auxotrophic marks	Reversion rate
M1	L-lysine	3.5×10^{-7}
M2	L-lysine	$< 10^{-8}$
M3	L-methionine	1.4×10^{-7}
M4	L-cysteine	5.0×10^{-8}
M5	L-arginine	2.0×10^{-8}
M6	L-methionine	$< 10^{-8}$
M7	L-methionine	$< 10^{-8}$

다시 증류수를 20 ml 넣어 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

융합주의 안정성 검토: 세포융합에 의하여 생성된 융합주를 MM에 이식하여 4°C에서 10주간 보존한 다음 YEPD배지에 이식하여 30°C에서 48시간 배양하였다. 이들 균체를 적당히 희석하여 MM 및 YEPD배지에 도달한 후에 나타난 colony수를 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

結果 및 考察

영양요구주의 분리: UV는 생존율이 0.1~1%가 되는 시간에 해당하는 50초간 조사하였다. Nystatin농축법(주현규 등, 1985)에 의하여 약 10배정도의 변이주 농축효과가 있었으며, 분리된 영양요구주의 reversion test를 행한 결과는 Table I에 나타내었다. 또한 이들의 xylose산화능은 친주와 비슷하였으나 발효력이 증가된 양상을 보였다. 이 중에서 발효력이 우수하고 reversion율이 낮은 M5와 M6를 융합대상 균주로 선정하였다.

Protoplast의 생성 및 재생: *P. tannophilus*의 protoplast생성을 위한 제반조건들을 검토한 결과 반응시간을 1시간 기준으로 하였을 때 zymolyase는 0.5 mg/ml가 protoplast생성의 최적농도로 나타났다. 삼투안정제로는 MgSO₄, KCl, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄를 대상으로 검토한 결과 KCl이 가장 효과적인 것으로 판명되었다. 또 최적 pH와 온도범위는 각각 5.0-10.0, 37-42°C로 상당히 안정한 분포를 나타내었는데, 이것은 zymolase의 활성범위인 pH 5.0-10.0, 35-45°C와 거의 일치하는 결과로 세포벽의 안정성보다 효소의 안정성이 protoplast생성에 훨씬 큰 요인임을 보이는

Table II. Alcohol production of fusants for selection

Fusant No.	Alcohol production(W/V)	Xylose consumption(%)	F. E.(%)*
F1	0.090	0.362	48.7
F2	0.061	0.413	29.0
F3	0.066	0.250	51.8
F4	0.056	0.207	53.0
F5	0.062	0.348	35.0
F6	0.035	0.236	29.1
F7	0.089	0.501	34.8
F8	0.084	0.464	35.4
F9	0.081	0.503	31.5
F10	0.081	0.397	40.3
F11	0.071	0.425	32.7
F12	0.089	0.353	49.8
F13	0.093	0.472	38.6
F14	0.100	0.480	40.8
F15	0.090	0.514	34.4
F16	0.087	0.359	47.5

Fermentation efficiencies

Table III. Cell sizes and DNA contents of fusion partners and products

Strain	Length (μm)	Width (μm)	Volumn (μm ³)	DNA content (pg DNA/cell)
Parent	3.61	3.02	17.23	13.13
M5	3.63	2.67	13.54	12.57
M6	3.75	2.49	12.17	12.83
F1	5.27	5.04	70.06	24.41
F12	5.40	4.83	65.93	24.01
F12	5.26	4.88	65.55	25.61

것으로 간주된다.

Protoplast의 재생은 중층법을 이용한 결과 재생율이 2.38~3.50%의 재생율을 보였다.

융합주의 선정 및 분석: 세포융합 후 도달하여 MM에 나타난 colony중에서 생육이 왕성한 16종의 융합주를 분리한 후 발효능을 시험하여 ethanol생성능이 비교적 높고 발효효율이 양호한 융합주 3 균주(F1, F12, F16)를 검토대상으로 선정하였다(Table II).

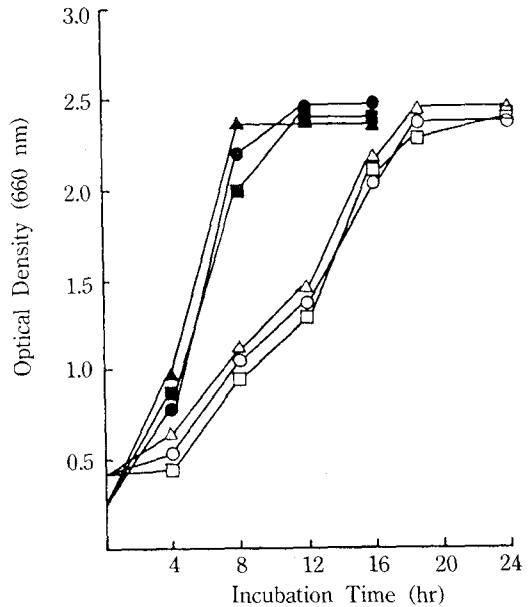


Fig. 3. Growth curves of individual strain.

○-○: F1, ▲-▲: F12, ■-■: F14, ○-○: Prototroph, △-△: M5, □-□: M6

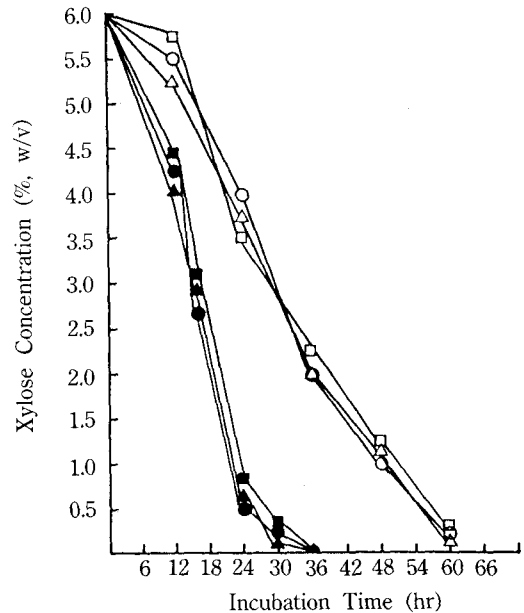


Fig. 4. Xylose consumption of individual strain.

○-○: F1, ▲-▲: F12, ■-■: F14, ○-○: Prototroph, △-△: M5, □-□: M6

세포크기 및 형태적특징 검토: 융합주의 크기는 친주의 3.80-4.17배에 해당하며, *Saccharomyces cere-*

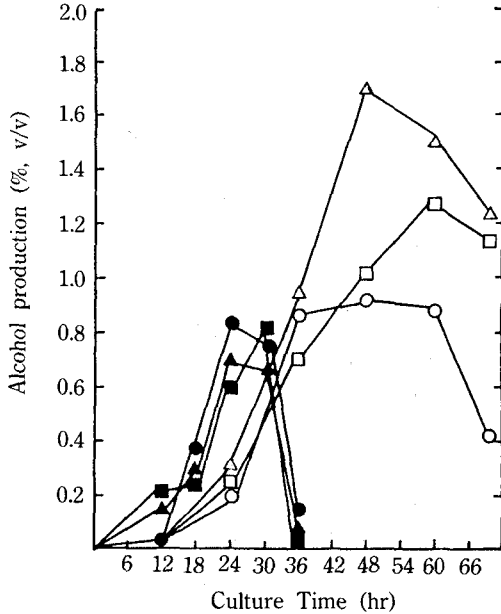


Fig. 5. Alcohol production of individual strains. ○-○: F1, ▲-▲: F12, ■-■: F14, ○-○: Prototroph, △-△: M5, □-□: M6

*visiae*의 경우에 동종융합주의 2-3배(Maraz 등, 1977), *Torulaspora delbrueckii*의 경우에는 융합주의 2.8-3.8배(Ohshima 등, 1987)보다는 다소 큰 경향을 나타내었다. 형태적으로는 구형 내지는 난형으로 친주와 유사했으나 위균사형태로 인접하는 출아세포를 다수 형성하였는데, 이것은 융합주의 왕성한 생육속도에 기인하는 것으로 생각된다.

DNA함량 : Table III에서 보는 바와 같이 F1, F12, F14 등의 융합주는 DNA함량이 거의 2배에 달하였으며, 이것은 융합에 의해 배수체를 형성한 것으로 생각된다. 이와같은 결과는 *P. tannophilus* 균주가 life cycle상에서 mating에 의한 배수체를 형성한다고 하는 Maleszka(1982)의 결과 등을 참고해 볼 때 배수체로 사료되나 그 규명을 위해서는 보다 깊은 유전학적인 검토가 있어야 하겠다.

융합주의 안정성 검토 : 융합주를 10주간 보존한 후에 MM과 YEPD배지에 각각 도말한 결과 prototroph의 생육비율이 98.7% 이상으로 비교적 높은 안정성을 나타내었다.

융합주와 변이주의 xylose이용성 비교 : 융합주의 생육속도는 친주보다 약 2배의 빠른 생육도를 보였으며(Fig. 3) xylose이용율도 이에 비례하였으나

Table IV. Stability of fusants

Strain No.	No. of Colony on MM	No. of Colony on YEPD	P. R.(%)*
F1	482	486	99.1
F12	551	549	100.3
F14	471	477	98.7

*: Prototrophs ratio, %

변이주의 경우 생육도의 증대는 볼 수 없었다. 특히 이러한 융합주의 왕성한 생육속도는 아황산 펄프액중에 함유된 xylose를 이용한 미생물단백질의 생산 등에 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 아울러 galactose, glycerol 등의 이용성을 높이는 방향으로 연구가 이루어진다면 이 분야에서도 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 생육도와는 반대로 융합주는 친주와 비슷한 발효능을 보였으며 오히려 변이주가 훨씬 높은 ethanol 발효능을 나타내었다. 특히 변이주 M5의 경우에는 친주의 1.6배에 달하는 발효능력의 증대를 보였다. 최근에 Lee(1986) 등의 보고에 의하면 *P. tannophilus*의 ethanol자화능이 결손된 변이주에서 ethanol의 생성율이 증가했다고 하였으며, 본 실험에 이용된 변이주 M5와 M6도 역시 친주보다 약한 ethanol자화능을 보였으므로 다른 연구자의 보고와 관련되는 결과를 나타내었다(Table IV).

이상에서 본 바와 같이 xylose를 이용한 미생물단백질 생산에 *P. tannophilus*를 생산균주로 응용하려면 융합주를 대상으로 연구되는 것이 효과적일 것으로 사료된다. 또한 ethanol발효의 측면에서 연구가 진행될 경우에는 융합주보다는 U.V에 의해 유도된 변이주가 훨씬 효과적인 양상을 보였으므로 변이주에 대한 발효능의 검토가 더욱 바람직할 것으로 생각된다. 아울러 semiaerobic recycling에 대한 발효능의 증대(Schneider등, 1981)에 대해서도 보고되고 있으므로 함께 병행하여 연구가 진행된다면 보다 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

또한 xylose대사에 관여하는 효소인 xylose reductase와 xylitol dehydrogenase 등에 대한 활성연구 및 이들 효소에 대한 조절연구(Detroy 등, 1985; Lee 등, 1988)가 활발하게 진행되고 있으므로 이들 연

구도 xylose의 발효능향상에 중요한 자료가 될 것으로 생각된다.

摘 要

UV에 의해 유도된 *P. tannophilus* 영양요구주는 lysine요구성, arginine요구성, methionine요구성, cysteine요구성 등이었다. Protoplast의 생성조건은 Zymolyase농도 0.5 mg/ml, pH 6.5-8.5, 온도는 37~47°C, 삼투안정제는 KCl로 하여 1시간 배양이 최적이었다. 세포융합에 의해 생성된 융합주는 체적이 친주의 약 4배이고 형태적으로는 친주와 비슷한 구형 또는 난형이었으나 위균사의 형성이 자주 관찰되었다. 그리고 융합주는 xylose를 탄소원으로 하였을 때에는 발효능의 증대는 없었으나 생육도는 약 2배 증가한 반면에 arginine요구성 변이주인 M7은 생육도의 증가는 없었으나 1.6배의 발효능증대를 나타내었다.

參考文獻

Bicho, P. A., Runnals, P. L., Cunningham, J. D. and Lee, H. (1988): Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis* on mixed sugars. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 50-54

Bolen, P. L. and Detroy, R. W. (1985): Induction of NADPH-linked D-xylose reductase and NAD-linked xylitol dehydrogenase activity in *Pachysolen tannophilus* by D-xylose, L-arabiose, or D-galactose. *Biotechnol. Bioeng.*, **27**: 302-307

Burton, K. (1955): A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, **62**: 315-322.

Farahnak, F., Seki, T., Dewey, D., Ryu, Y. and Ogrydziak, D. (1986): Construction of lactose assimilating and high-ethanol-producing yeasts by protoplast fu-

sion. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**: 362-367

Farency, L. and Maraz, A. (1977): Transfer of mitochondria by protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.*, **268**: 524-525

Gudzinowicz, B. J. and Gudzinowicz, M. J. (1977): Analysis of drugs and metabolics, vol. 1, p. 102. New York and Basel, Merce! Dekker Inc.

Lee, H., James, A. P., Jahab, D. M., Mahmoudes, G., Maleszka, R. and Schneider, H. (1986): Mutants of *Pachysolen tannophilus* with improved production of ethanol from D-xylose. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**: 1252-1258

Maleszka, R., Valiky, I. A. and Schneider, Y. (1981): Enhanced rate of ethanol production from D-xylose using recycled or immobilize cells of *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Lett.*, **3**: 415-420

Maleszka, R., Wang, P. Y. and Schneider, H. (1982): Ethanol production from D-galactose and glycerol by *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **4**: 349-352

Maleszka, R., James, A. P. and Schneider, H. (1983): Ethanol production from various sugars by strains of *Pachysolen tannophilus* bearing different numbers of chromosome. *J. Gen. Microbiol.*, **129**: 2495-2500

Peberdy, J. F. (1979): Protoplast application in microbial genetics, University of Nottingham, England: 35-45

Sasaki, T. and Ohshima, Y. (1987): Induction and characterization of artificial diploids from haploid yeast *Torulasporea delbrueckii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 1504-1511

Schneider, W. C. (1945): Extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. *J. Biol. Chem.*, **161**: 293-331

Slininger, P. J., Bothast, R. Y., Van Guwenberge, J. F. and Kurtzmann, C. P. (1982): Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Bioeng.*, **24**: 371-384

주현규, 안병권, 이형환. (1985): 미생물유전학 실험. p. 199. 문운당, 서울.

Accepted for Publication on December 14, 1991