

Candida sp. KM-09와 *Saccharomyces cerevisiae*의 이속간의 원형질체 융합

문종상 · 고태룡 · 심기환 · 성낙계*
경상대학교 식품공학과

Intergeneric Protoplast Fusion between *Candida* sp. KM-09 and *Saccharomyces cerevisiae*

Mun, Jong-Sang, Hack-Ryong-Ko, Ki-Hwan Shim
and Nack-Kie Sung*

Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

Abstract — In order to develop yeast strains which can effectively produce ethanol from cellulosic hydrolyzates, protoplast fusion between *Candida* sp. KM-09-135 and *Saccharomyces cerevisiae* SM-07 was carried out and obtained the excellent fusant KMS-23. Fusant KMS-23 showed the optimal growth temperature and ethanol productivity at 37°C, and assimilated xylose, cellobiose, maltose and raffinose as fermentative sugars. Cell size of the fusant was about 1.2 times greater than that of KM-09-135 and 1.5 times SM-07. DNA content of fusant was 1.3 times higher than that of SM-07 and similar with KM-09-135. Fusant KMS-23 produced 2.57% (v/v) ethanol from saccharified wheat bran containing 6.44% (w/v) of reducing sugar, which was 1.3 times higher than parent strains under the same conditions.

섬유성 biomass를 ethanol로 전환할 때 당화공정이 선행되어야 하는데 그 구조의 견고성으로 인하여 산·알칼리의 전처리가 요구되며, 이때 formic acid, furfural 등의 이차산물이 생성되어(1, 2) 기존의 발효균인 *Saccharomyces*속과 *Zymomonas*속 등은 섬유성 당화액에서 배양시 강한 생육저해현상을 나타낼 뿐만 아니라 glucose 발효력은 뛰어나나 섬유성 당화액의 상당량을 차지하는 hemicellulose의 분해당인 오탄당을 전혀 이용하지 못하는 단점이 있다(3, 4). 따라서, biomass로부터 경제성 있는 ethanol 생산을 위해서는 glucose 뿐만 아니라 hemicellulose의 주 구성성분인 xylose 및 arabinose를 잘 발효하는 균주를 개발할 필요성이 있다. 한편, 원형질체를 이용한 세포융합은 원형질체에서 정상세포로 재생 가능한 균주에서는 모두 유력한 육종수단이 될 수 있는데(5-7) 효모균

주의 육종에는 *Saccharomyces*속내의 융합(8, 9)과 *Saccharomyces*속과 *Candida*속과의 이속간(5, 6, 10)에서 대부분 행하여지고 있다.

따라서, 본 실험에서는 섬유성 가수분해물에서 생육 및 ethanol 생성능이 우수하고 오탄당인 xylose와 이당류인 cellobiose 발효능을 지닌 분리균 *Candida* sp. KM-09와 glucose를 고수율의 ethanol로 전환시키며 효모로서 비교적 높은 온도인 37°C의 생육적온을 가진 *Saccharomyces cerevisiae*의 원형질체 융합을 행하여 섬유성 biomass로부터 ethanol 생성능이 향상된 융합주를 얻었기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

천연 섬유성 기질의 당화효소를 생산하는 균주로서는 *Pseudomonas* sp. LBC-505를 사용하였으며, 원형질체 융합 대상균주로서는 분리균 *Candida* sp.

Key words: Cellulosic hydrolyzates, protoplast fusion, ethanol production

*Corresponding author

KM-09(haploid)와 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1216(haploid)을 사용하였다.

배지 및 배양

본 실험에 사용된 배지는 Table 1과 같다. *Pseudomonas* sp. LBC-505는 PY-CMC 배지에서, 37°C, 48 시간 진탕배양하였으며, 원형질체 융합, 영양요구성 변이주의 분리 및 재생시는 각각 YPD, MM 및 RMM 배지를 사용하였고, ethanol 생산을 위해서는 FM 배지에서 7일간 진탕배양하였다.

영양요구성 변이주의 분리

Alderberg(11), Liderberg(12) 및 Holliday(13) 등의 방법을 조합, 변형하여 실험을 행하였다. 대수 증식기 중기까지 배양한 균체를 NTG(1 mg/ml) 처리한 후 YPD 배지에 도말, 배양하여 자란 colony를 YPD 및 MM 배지에 각각 tooth picking하여 YPD 배지에서는 자라나 MM 배지에서는 자라지 못하는 균주를 변이주로 선별하고 amino acid pool을 이용, 영양요구성 물질을 확인하였다.

원형질체 형성, 융합 및 재생

효모의 원형질체 형성은 Wilson(14)의 방법에 따라 행하였다. 형성된 원형질체는 Fournier(7)와 Celso(6) 등의 방법을 조합, 변형하여 융합 및 재생실험을 행하였다. 즉, 원형질화된 두 균주를 10⁷/ml 되게 1:1 비율로 혼합한 다음 35% PEG 4000, 50 mM CaCl₂ 및 15%(v/v) dimethyl sulfoxide를 함유한 용액에 현탁하고 30°C, 20분간 진탕배양하였다. 이 배양액을 다시 0.8 M KCl과 50 mM CaCl₂가 포함된 Tris-HCl (pH 7.5) 용액으로 2회 세척한 다음 0.1 ml을 42°C의 3% agar를 포함하는 동일용액에 혼합하고 0.8 M KCl을 함유한 MM 배지에 증충한 후, 37°C, 5~7일간 배양하여 영양요구성이 상호보완되어 나타난 colony를 융합체로 선별하였다. 융합빈도는 RMM 배지에서의 colony수, 재생율(%)은 RCM 배지에서의 colony수를 각각 총 원형질체수로 나눈 값으로 하였다.

DNA 함량 및 핵염색

DNA 함량은 Wilson(14)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 회수된 세포를 0.1 N perchloric acid에 현탁시켜 70°C에서 20분간 2회 처리한 상징액 3 ml에 6 ml

Table 1. The composition of media used in this work (g/l)

Component	PY-CMC	YPD	MM	RMM	FM ^a
Glucose		30	20	20	
CMC	10				
Yeast extract	5	5			1
Polypeptone	5	5			2
NaCl					3
K ₂ HPO ₄	1				
KH ₂ PO ₄					1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2				1
KCl				0.8 M	
Yeast nitrogen base			6.7	6.7	
pH	6.8	5.6	5.6	5.6	5.6

^a Saccharified wheat bran containing 6.44% (w/v) of reducing sugar was added to the medium instead of carbon source.

diphenylalanine 용액(diphenylalanine 5g에 진한 H₂SO₄ 13.75 ml를 넣고 glacial acetic acid로 500 ml 되게 조정)을 첨가하여 끓는 물에 10분간 방치한 후 냉각시켜 흡광도를 측정하여 다음 식으로 계산하였다.

DNA 함량(mg/10¹⁰ cells)

$$= \frac{\text{흡광도}(600 \text{ nm})}{A} \times B \times \frac{10^{10}}{\text{Cell No.}}$$

A : 표준곡선의 기울기

B : 회석율

이때, 표준검량곡선은 calf thymus DNA를 이용하여 작성하였으며, 핵 염색은 Fournier(7) 등의 방법에 따라 행하였다.

Ethanol 분석

Ethanol은 gas chromatography로 분석하였으며, GC기종은 HEWLETT-PACKARD 5890, column은 HP-FFAP capillary(50 m×0.2 mm×0.33 μm)을 사용하였고 carrier gas는 helium, oven temperature는 200°C, 주입량은 2 μl(split = 100 : 1)였으며, detector는 FID를 사용하였다.

결과 및 고찰

영양요구성 변이주의 분리

원형질체 융합을 위한 특정인자를 얻기 위하여 먼저

Table 2. Phenotypic characteristics of auxotrophic mutants

Strain	Phenotype	Ethanol (% v/v)		*Reversion frequency
		Glucose (10%)	Saccharified wheat bran	
<i>Candida</i> sp.				
KM-09-	Wild type	4.25	2.20	
01	Ura ⁻	4.17	1.26	1.1×10 ⁻⁵
06	Phe ⁻ , Lys ⁻	2.85	1.21	3.4×10 ⁻⁵
07	Phe ⁻	3.50	1.58	1.5×10 ⁻⁶
09	Met ⁻	3.43	1.70	2.5×10 ⁻⁷
12	His ⁻	3.63	1.53	1.7×10 ⁻⁶
24	Leu ⁻	4.32	1.84	1.3×10 ⁻⁶
79	Met ⁻ , Ura ⁻	2.24	1.35	3.2×10 ⁻⁵
135	Leu ⁻	4.11	2.06	1.4×10 ⁻⁶
227	His ⁻	3.51	1.79	2.3×10 ⁻⁷
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
1216	Wild type	4.87	0.64	
01	Met ⁻	4.12	0.48	1.6×10 ⁻⁵
07	Trp ⁻	4.92	0.70	2.1×10 ⁻⁷
11	Leu ⁻ , His ⁻	3.32	0.26	1.8×10 ⁻⁷
13	Ura ⁻	5.07	0.81	2.1×10 ⁻⁶
26	His ⁻	3.70	0.39	1.6×10 ⁻⁶
130	Met ⁻	4.50	0.66	1.8×10 ⁻⁶

$$\text{*Reversion frequency} = \frac{\text{No. colonies on MM}}{\text{No. colonies on YPD}}$$

Candida sp. KM-09와 *S. cerevisiae* KCTC 1216의 영양요구성 변이주 분리실험을 행하였다.

NTG 처리에 의해 얻어진 영양요구성 변이주의 유전적 안정성 및 ethanol 생성능을 친주와 비교하여 최종 선발하였다(Table 2). 선발된 변이주들의 prototroph로의 전환빈도는 $1.1 \times 10^{-6} \sim 2.2 \times 10^{-5}$ 정도로 낮았으며, 유전적 안정성이 비교적 높았다. 한편, *S. cerevisiae* SM-13과 같은 단일 아미노산 요구주의 경우 친주에 비하여 ethanol 생산능이 약간 증가하였으나 두개의 아미노산을 요구하는 변이주들은 대부분이 친주에 비해 ethanol 생산능이 감소하였는데, 이는 심한 변이에 의해 탄소 및 ethanol 생성대사 등에 관여하는 효소생성능의 저하에 기인하는 것으로 생각된다. 따라서, 유전적 안정성, ethanol 생성능이 비교적 친주와 비슷한 KM-09-135와 *S. cerevisiae* SM-07을 원형질체 융합 대상균주로 최종 선발하여 다음 실험을 행하였다.

융합주의 선발

PEG 존재하에서 융합을 행하여 RMM 배지에서 영양요구성이 상호보완되어 자란 colony를 융합체로 최종 선발하였다. 일단 융합된 균주는 유전적으로 불안정하며 특히, 이속간의 융합체는 배양 중 다시 친주로 분리되기 쉽기 때문에 MM 배지에 반복 계대배양하여 유전적 안정성을 부여할 필요가 있다(7). 따라서, 융합주로 선발된 균주 중 유전적 안정성, 생육도 및 탄소원 이용성 뿐만 아니라, 밀기울 당화액으로부터 ethanol 생성능이 우수한 다섯가지 융합주를 최종 선발하였다(Table 3). 이때 KM-09-135와 SM-09 두 친주의 원형질체 재생율은 38%였으며 융합빈도는 5.2×10^{-4} 으로 서 등(9)과 Takaaki 등(18)의 보고와 비슷한 것으로 비교적 높은 수준이었고 두 친주의 back mutation 빈도보다 높게 나타났다. 융합주 중 KMS-23이 가장 우수한 것으로 나타났으며, 10%(w/v) glucose를 기질로 한 배지에서 5.13%(v/v)의 ethanol을 생산하여 친주인 KM-09-135보다 약 1.3배 증가한 반면, xylose 발효능은 약간 감소하였으며 cellobiose는 친주와 거의 비슷한 수준이었다. 밀기울

Table 3. Characteristics of *Candida* sp. KM-09-135, *S. cerevisiae* SM-07 and fusants on the ethanol fermentation

Strain	Ethanol (% v/v)			
	Glucose (10%)	Xylose (4%)	Cellobiose (2%)	*Saccharified wheat bran
<i>Candida</i> sp.				
KM-09-135	4.20	1.23	0.08	2.03
<i>S. cerevisiae</i>				
SM-07	4.87	—	—	0.64
Fusants				
KMS-05	4.30	0.85	—	1.37
KMS-11	4.23	0.44	0.10	1.65
KMS-12	4.56	0.31	—	1.82
KMS-23	5.13	1.12	0.12	2.57
KMS-29	4.46	0.24	0.04	1.98

*Total sugars (as the reducing sugar) of the saccharified wheat bran was 6.44% (w/v).

*Cells were cultivated at 32°C (KM09-135) and 37°C (fusants) for 7 days with shaking in FM medium containing carbon source.

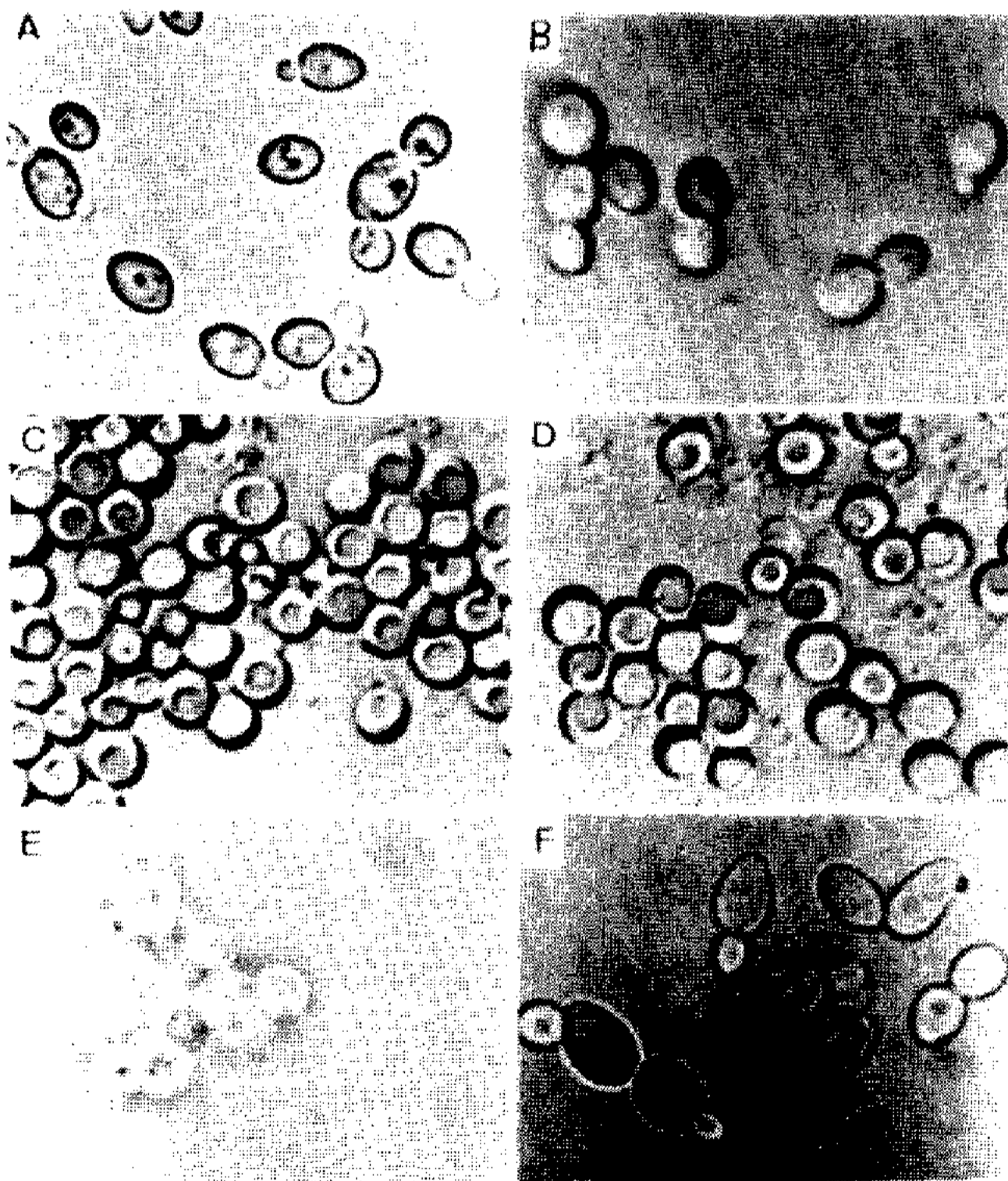


Fig. 1. Micrographs of *Candida* sp. KM-09-135 (A), *S. cerevisiae* SM-07 (B), protoplasmic KM-09-135 (C) and SM-07 (D), PEG-treated mixture of KM-09-135 and SM-07 protoplasts (E), and fusant KMS-23 (F).

당화액에서는 KM-09-135에 비해 약 1.3배 증가하였는데 이는 *S. cerevisiae*의 형질에 의한 glucose 발효능의 향상이 주요인인 것으로 사료된다. *Candida* sp.

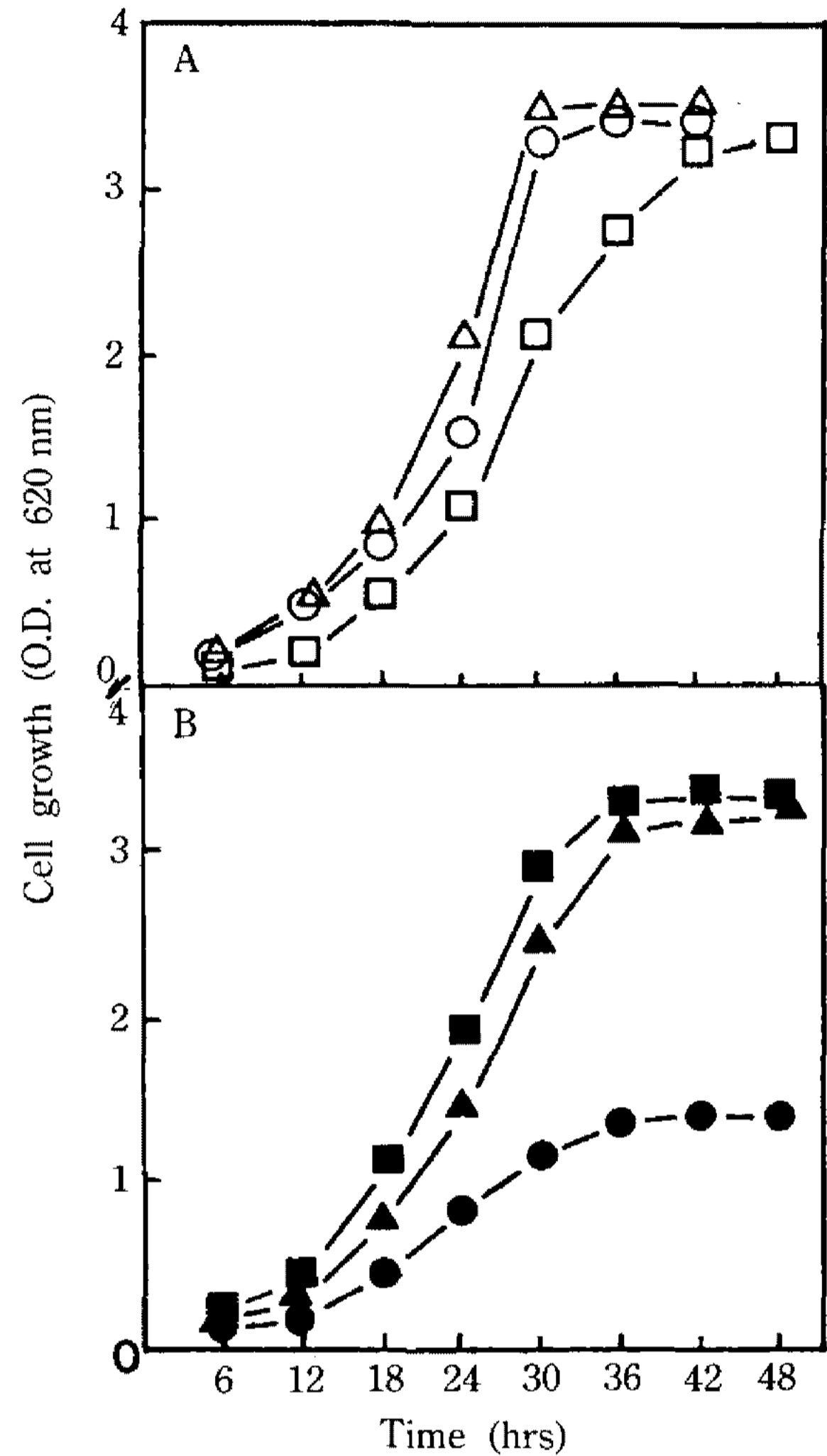


Fig. 2. A: Growth curves of KM-09-135 (○), SM-07 (△) and KMS-23 (□). Cells were cultivated at 32°C in YPD medium. B: Growth curves of KMS-23 at 32°C (▲), 37°C (■) and 40°C (●) in YPD medium, respectively.

KM-09-135(A), *S. cerevisiae* SM-07(B), 이들 두 친주의 protoplasts(C, D), PEG 처리 후(E), KMS-23(F)을 Fig.71에 나타내었다.

융합주의 특성

최적생육온도 : 친주 및 융합주의 생육곡선(Fig. 2 A)과 융합주의 최적생육온도(Fig. 2B)를 조사한 결과, KMS-23은 친주에 비해 생육속도 특히, 유도기가 다소 길게 나타났으며 두 친주의 30시간에 비해 약 40시간만에 정지기에 도달하였다(A). 이는 융합주 KMS-23이 아직 유전적으로 덜 안정하고, 세포의 크기가 증대하였기 때문인 것으로 생각된다. 그러나 유도기가 지난 12시간 이후부터는 대체로 왕성한 생육도를 나타내었다. 이러한 현상은 친주에 비해 융합주의 생

Table 4. Carbon utilization of fusant KMS-23

Characteristics	<i>Candida</i> sp. KM-09-135	<i>S. cerevisiae</i> SM-07	Fusant KMS-23
Fermentation:			
Sucrose	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-
Maltose	+	-	+
Cellobiose	+	-	-
Raffinose	-	+	-
Xylose	+	-	+
Starch	-	-	-
Growth:			
Sucrose	+	+	+
Cellobiose	+	-	+
Raffinose	-	+	+
Strach	+	+	+
Erythritol	-	-	-
Xylitol	+	-	+
Citrate	+	-	+
Ethanol	+	+	+
L-Arabinose	+	-	+

Table 5. Cell size and DNA contents of the fusant

Strain	Cell size (μm)		DNA contents (mg/10 ¹⁰ cells)
	Length	Width	
<i>Candida</i> sp. KM09-135	4.3~6.0	3.0~6.3	1.88
<i>S. cerevisiae</i> SM-07	4.0~5.6	2.8~4.0	1.57
Fusant KMS-23	6.5~7.5	4.0~5.6	1.98

*Cells were cultivated at 32°C for 48 hrs in YPD.

육도가 떨어진다는 Sakaai와 Satoh(15)의 보고와는 약간 상이하였다. 한편, KMS-23은 32°C에서 보다 37°C에서 생육이 우수하였으며, 40°C 이상에서는 생육이 억제되었다(B).

당의 이용성: 융합주 KMS-23의 당 이용특성을 조사해 본 결과(Table 4), KM-09와 거의 일치하였으나 특이한 것은 raffinose의 발효 및 자화능이 인정되었다.

세포크기 및 DNA 함량: 융합주의 세포크기 및 DNA 함량을 조사한 결과(Table 5), KMS-23의 세포크기는 *Candida* sp. KM-09-135와 *S. cerevisiae* SM-07에 비해 각각 약 1.3, 1.5배 증가하였으며 다른 보고자들의 경우(16-19)와 일치하였다. 한편, DNA 함량은 KM09-135, *S. cerevisiae* SM-07 및 KMS-23이

각각 1.88, 1.57 및 1.98 mg/10¹⁰ cells로서 융합주가 두 친주보다 약간 높게 나타났으며, 이는 KMS-23이 완전한 1:1 융합에 의한 새로운 2배체의 융합주가 아닌 것으로 생각되는데, 효모의 원형질체 융합에서 DNA의 함량이 2배로 증가하여 하나의 hybrid diploid nucleus 또는 binucleate heterokaryon을 형성하였다는 보고(17, 18, 20)와는 상이하였다.

요 약

섬유성 당화액에서의 ethanol 생산에 적합한 균주를 개발할 목적으로 *Candida* sp. KM-09-135와 *Saccharomyces cerevisiae* SM-07의 이속간의 원형질체 융합을 행하여 우수한 융합체로 인정된 KMS-23 균주를 얻었다. 융합주 KMS-23은 37°C에서 생육 및 ethanol 생성능이 가장 좋았고, 발효당으로 xylose, cellobiose, maltose 및 raffinose도 이용하였다. 세포의 크기는 KM-09-135 및 SM-07에 비해 각각 1.2배, 1.5배 증가하였으나 DNA 함량은 약간의 증가만 보여 완전한 2배체의 융합주가 아닌 것으로 나타났다. 환원당으로서 6.44%(w/v)의 당을 함유한 밀기울 당화액에서 융합주 KMS-23은 동일조건하에서 KM-09-135보다 약 1.3배 높은 2.57%(v/v)의 ethanol을 생산하였다.

감사의 말

본 연구를 위하여 연구비('90년도)를 지원해주신 동력자원부 에너지 관리공단에 감사드립니다.

참고문헌

1. Ghose, T.K., A. Fiechter, and N. Bakebrough: *Advances in Biochem. Engineer.*, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 5, 32 (1977)
2. Sung, N.K. and J.K. Kim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 4, 1 (1976)
3. Beck, M.J.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 17, 617 (1989)
4. Skoog, K. and B. Hahn-Hägerdal: *Enzyme Microbiol. Technol.*, 10, 66 (1988)
5. Provost, A., C. Bourguigon, P. Fournier, A.M. Ribet and H. Heslot: *FEMS Microbiol. Lett.*, 3, 309 (1979)

6. Celso, P., V. Carlos and B. Torge: *Current Genetics*, **8**, 575 (1984)
7. Fournier, P., A. Provost, C. Borguignon, H. Heslot: *Arch. Microbiol.*, **115**, 143 (1977)
8. R. Legmann and P. margalith: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 320 (19983)
9. Seu, J.H. and J.S. Bae: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 17 (1988)
10. Lee, J.S. and C.J. Kim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 142 (1988)
11. Alderberg, e.a., M. Mandel and G.C.C. Chem: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **18**, 788 (1965)
12. Lederberg, J. and E.M. Ledberg: *J. Bacteriol.*, **63**, 399 (1952)
13. Holliday, R: *Nature*, **178**, 987 (1956)
14. Wilson, J.J., G.G. Khachatourians and W.M. Ingledew: *Molec. Gen. Genet.*, **186**, 95 (1982)
15. Sakai, O.O. and K. Saitoch: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 297 (1986)
16. Mashito, T., H. Honda and T. Kobayashi: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2239 (1984)
17. Jung, G.S., Y.C. Koo and D.H. Shin: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**, 145 (1987)
18. Takaaki, F., H. Yamamoto, E. Takenaka, K. Fuginmi, A. Ando and M. Yakuki: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1661 (1988)
19. Bae, Y.S. and J.W. Sea: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 23 (1986)
20. N. Gunge and K. Sakguchi: *J. Bacteriol.*, **147**, 155 (1981)

(Received May 13, 1991)