

## 화학적 처리방법에 의한 효모의 세포벽 제거

문정혜 · 김중균†

부경대학교 생물공학과

## The Disruption of Yeast Cell Wall by Chemical Treatment

Jung-Hye Moon and Joong-Kyun Kim†

Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

### Abstract

The cell wall of *Kluyveromyces fragilis* yeast, which is worthy of an algal substitute, was disrupted by a chemical treatment to increase the digestion of filter-feeders that yeasts are fed to. The optimum conditions of the chemical treatment were obtained by incubating yeasts at 30°C for one hour after treated by 1 M of Na<sub>2</sub>-EDTA that was dissolved in 0.2 M of Tris-buffer and by 0.3 M of 2-mercaptoethanol. The percentage of protoplast production was about 30%. The percentage could be doubled by the pretreatment of three times of 30 seconds sonication.

*Key words* : chemical treatment, *Kluyveromyces fragilis*, disruption, cell wall, protoplasted yeast

### 서 론

양식산업에 있어 유용 양식어종을 대량 종묘 생산할 때 초기먹이생물이 차지하는 비중은 너무나도 중요하다. 지금까지 동물성플랑크톤의 초기먹이생물로서는 단세포 algae를 주로 사용하여 왔으나<sup>1)</sup>, 계속적으로 대량 배양하여야 하고 이에 따른 노동력이 많이 드는 단점을 가지고 있다. 이에 비해 효모는 크기가 작고 풍부한 단백질 및 비타민을 가지고 있으며, 상대적으로 대량생산하기가 용이하여 좋은 algae의 대용물로 생각되어진다. 그러나, 효모는 mannoprotein으로 이루어진 바깥층과 glucan이 이루는 안쪽층의 이중의 세포벽을 형성하기 때문에<sup>1)</sup>, 이 효모를 먹이로 하는 동물성플랑크톤이나 치어·패류가 소화하기 어려운 단점을

가지고 있다. 기존의 초기먹이생물로는 *Saccharomyces cerevisiae*가 사용되어지고 있으나, 최근에는 *S. cerevisiae*보다 성장속도가 훨씬 빠르며 식품첨가물의 하나로 지정되어 single cell protein으로 이용되고 있는 *Kluyveromyces fragilis*에 대한 초기먹이생물로의 개발 가능성이 보고되고 있다<sup>2-3)</sup>.

두꺼운 세포벽을 부수는 방법에는 기계적 처리법, 효소학적 처리법 그리고 화학적 처리법이 있다. 기계적 처리법으로는 high-pressure homogenization 방법이 가장 일반적으로 사용되어지고 있으나, 세포의 종류에 따라 압력세기를 결정해야하는 어려움이 있다<sup>4)</sup>. 효소학적 처리법<sup>5-9)</sup>에는 다양한 enzyme이 사용되어지는데 특히, protease와 glucanase가 가장 일반적으로 사용되어지고 있다. Protease는 세포외벽인 mannoprotein 층을 파괴하여 glucanase가 glu-

† Corresponding author

can층에 효과적으로 작용할 수 있게 해 준다. 이런 효소학적 처리는 처리비용면에 있어 제한적 요소를 가지고 있다. 이에 반하여, 화학적 처리방법에는 세포벽의 두께에 따라 항생제를 사용하는법<sup>3,10)</sup> 또는 킬레이트 화합물인 EDTA 사용하는법<sup>11-17)</sup>, 그리고 세포막의 단백질에 영향을 주는 화학제인 chaotropic agents<sup>18)</sup>, guanidine-HCl<sup>19)</sup>, Triton X-114<sup>20)</sup>, toluene<sup>15,21)</sup> 및 박테리아에 일반적으로 사용되는 hydroxybutyrate<sup>22-23)</sup> 등이 있으며, 기계적 처리법이나 효소학적 처리방법에 비해 비용면에서 장점을 가진다.

따라서, 본 논문에서는 초기먹이생물을 먹이로 하는 동물성플랑크톤 및 치어·패류의 소화력을 높이고자 *Kluyveromyces fragilis* 효모의 세포벽을 화학적 처리방법으로 부수어 protoplast 상태의 효모를 만들고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 사용균주 및 배양

이 실험에 사용되어진 효모균은 *Kluyveromyces fragilis* (ATCC 36534)이며, YEPD agar slant에 보관·유지하였다. 이 agar 배지의 조성은 2% dextrose, 0.5% yeast extract, 2% peptone 및 2% agar 이었다. 화학적 처리 실험에 사용할 효모균은 먼저 10 ml 시험관에서 37°C, 180 rpm 과 호기적조건으로 late-log phase까지 배양한 뒤 5%의 접종양으로 플라스크에 접종시켰다. 플라스크 배양은 500 ml 플라스크에서 37°C, 180 rpm의 조건에서 late-log phase까지 배양하여 최대 세포수를 얻은 후 원심냉동분리기로 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 효모균만을 수거한 후 화학적 처리 실험에 사용하였다.

### 2. 화학처리제

실험에 사용되어진 화학처리제로는 효모균주의 세포벽 제거에 효과적인 것으로 보고되어진<sup>12-17)</sup> 시그마제품의 ethylenediaminetetraacetic acid 와 2-mercaptoethanol을 사용하였다.

### 3. 화학적 처리실험

먼저 플라스크배양 후 원심분리하여 얻어진 젖은 상태의 효모균의 무게를 재어둔다. 0.2M의 Tris-buffer (pH8)에 Na<sub>2</sub>-EDTA를 완전히 녹여 용액을 만든 후 미리 무게를 재

어둔 효모균에 처리하되, 전체 용액중 젖은 상태의 효모균의 무게가 200 g wet yeasts/ml이 되도록 처리한다. Vortex를 통하여 화학처리제와 묻쳐서 있는 효모가 잘 섞이도록 하고 난 후 바로 2-mercaptoethanol을 섞고 다시 vortex한다. 이렇게 화학제로 처리된 효모는 30°C 배양기에 넣어 배양한 후 5,000 rpm에서 5분간만 원심분리하여 형성된 protoplasted yeast가 터지지 않도록 한다. 상층액을 버리고 protoplasted yeast만을 수거하여 그 세포수를 측정한다. 이때 Na<sub>2</sub>-EDTA와 2-mercaptoethanol의 농도와 화학제 처리 후의 배양시간이 protoplasted yeast 생성에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위하여 Na<sub>2</sub>-EDTA는 0.02, 0.07, 0.1, 0.5, 1, 2, 및 3 M에서, 2-mercaptoethanol은 0.05, 0.3, 0.5, 0.8, 1, 1.5 및 3 M의 여러 농도에서 실험을 행하였고, 화학제 처리후의 배양시간은 0.5, 1, 3, 5, 및 10 시간에 걸쳐 실험을 하였다. 화학적 처리실험을 통한 protoplasted yeast로의 전환률을 높이기 위한 전처리 방법인 sonication은 Kinematica(스웨덴) 제품의 Polytron PT 10-35 homogenizer를 사용하여 행하였고, protoplasted yeast의 세포수를 측정하기 위해 methylene blue를 화학제로 처리된 효모에 염색한 후 광학현미경을 이용하여 1,000 배의 배율에서 protoplasted yeast수를 측정하였다. 모든 실험은 3번의 반복실험을 통하여, 그 평균값을 취하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Na<sub>2</sub>-EDTA 농도의 영향 따른 protoplasted yeast 생성

Fig. 1는 Na<sub>2</sub>-EDTA를 0.2 M의 Tris-buffer(pH8)에 여러 농도로 녹인 후 효모균에 처리할 때, 효모균과 (Na<sub>2</sub>-EDTA+Tris-buffer)용액의 농도가 200g wet yeasts/ml이 되도록 먼저 처리하고 vortex한 후 0.3 M의 2-mercaptoethanol을 첨가하여 잘 섞은 후 1시간동안 30°C에서 배양한 결과에 따른 protoplast 생성정도를 나타낸 것이다. 이때, protoplasted yeasts는 Fig. 2에서 보이는 것과 같이 세포막이 제거되므로써 거의 둥근 형태를 지니며, 또한 methylene blue로 파랗게 염색됨을 알 수 있었다. 이에 비하여, intact cell은 methylene blue에 염색도 되지 않을 뿐더러 모양도 *K. fragilis* 효모 본래의 계란 모양 또는 pseudomycellium을 형성하는 것을 볼 수 있다. 최대의 protoplasted yeast는 1 M의 Na<sub>2</sub>-EDTA농도로 처리될 때 얻어지며, 이때의 protoplast 생성률은 약 30%였다.

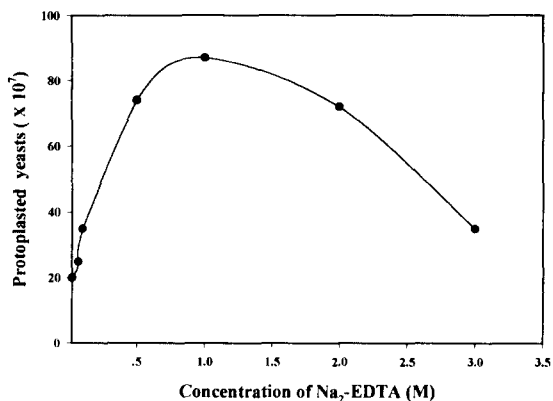


Fig. 1. The effect of the Na<sub>2</sub>-EDTA concentration on protoplast production.

EDTA는 세포벽 구조의 형성에 중요한 역할을 하는 기능성 2가 양이온을 추출할 수 있는 능력이 있다고 알려지고<sup>23-24)</sup>, cytoplasmic membrane에는 큰 영향을 미치지 않는다고 한다<sup>4)</sup>. 또한, EDAT에 Tris-buffer가 첨가되면 세포벽 구조에 필수적인 1가 유기 아민을 비롯한 2가 양이온의 추출이 더 용이하다고 보고되고 있다<sup>12-13)</sup>. 이상의 사실에서 추론할 수 있는 것은 EDTA는 chelating 역할 뿐만 아니라 lipopolysaccharide를 세포벽으로부터 유리시키는 데 관여하는 것으로 보인다. 따라서, 화학적 처리방법에 의한

protoplast 상태의 yeast를 만들기 위한 화학적 처리제로서는 알맞은 농도의 EDTA가 필수적이라 하겠다.

## 2. 2-mercaptoethanol의 농도의 영향에 따른 protoplasted yeast 생성

Fig. 3은 Fig. 1에서 결정된 Tris-buffer에 녹여 만든 1 M의 Na<sub>2</sub>-EDTA의 농도에 여러 농도의 2-mercaptoethanol을 처리하여 1시간동안 배양한 결과에 따른 protoplast 형성정도를 나타낸 것으로, 0.3 M 농도로부터 1.0 M의

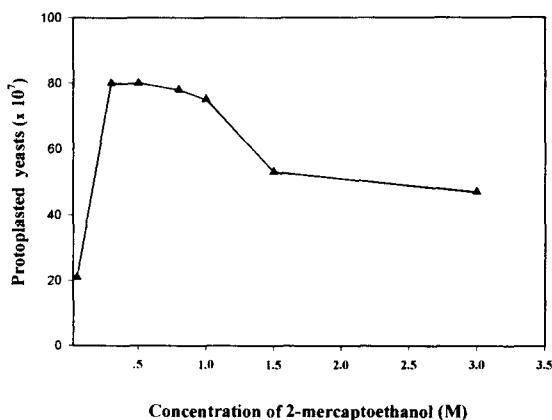
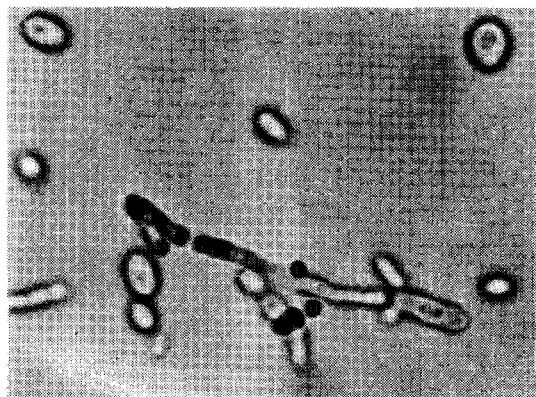
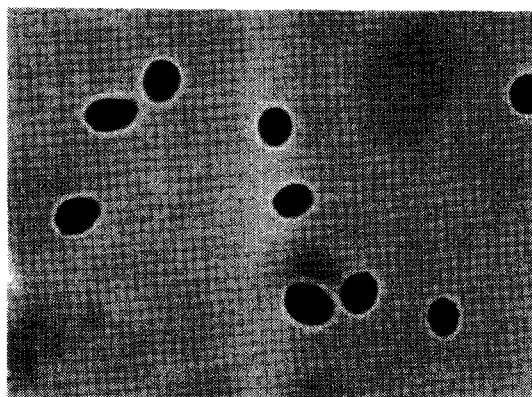


Fig. 3. The effect of the 2-mercaptoethanol concentration on protoplast production.



(A)



(B)

Fig. 2. The intact and the protoplasted *K. fragilis* yeasts. Magnification :  $\times 1,000$ . (a) Intact yeasts and (b) Protoplasted yeasts.

농도범위까지 protoplasted yeast가 가장 많이 형성되어졌다. 경제적인 측면을 고려하여 0.3 M의 2-mercaptoethanol농도를 최적조건으로 정하여 이후의 실험에 적용하였다.

효모의 바깥층은 mannoprotein으로 이루어져 있는데, 이 층의 각 분자들이 단백질 부분사이에서 disulfide bond를 통해 단단히 결합되어 있어 효모의 바깥층에서 안쪽의 glucan층으로의 물질침투를 막고있다<sup>25)</sup>. Thiol 화합물은 이러한 disulfide bond를 끊어주어 바깥쪽 세포벽을 통하여 화학처리제가 잘 스며들 수 있도록 하는 것으로 추정된다<sup>26)</sup>. 따라서, 이러한 thiol화합물의 하나인 2-mercaptoethanol은 효모 바깥층을 부수는 데 필수적인 화학제라고 사료된다.

### 3. 화학제 처리후의 배양시간의 영향에 따른 protoplasted yeast 생성

Fig. 4.는 앞 실험에서 구한 최적조건인 Tris-buffer에 용해된 1 M의 Na<sub>2</sub>-EDTA와 0.3 M의 2-mercaptoethanol로 처리한 후 30°C의 여러 배양시간에 따른 효모의 protoplast 형성정도를 나타낸 것으로 1시간 배양했을 때 가장 좋은 결과를 보였다. 배양시간이 길어질 수록 protoplasted yeast의 개수는 현저하게 감소함을 보였다.

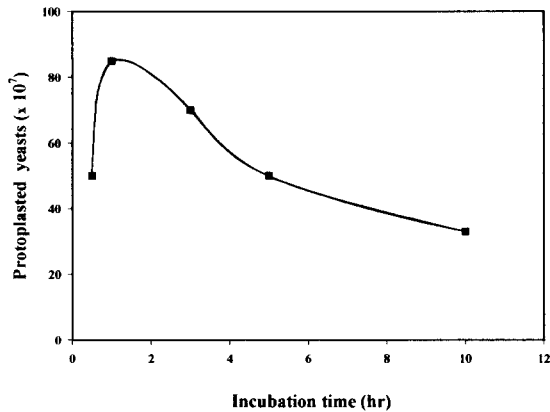


Fig. 4. The effect of the incubation time on protoplast production.

이상의 결과로부터 화학적 처리방법에 의한 *K. fragilis* 효모의 세포벽 제거는, Tris-buffer에 녹인 1 M의 Na<sub>2</sub>-EDTA와 0.3 M의 2-mercaptoethanol 처리 후 30°C에서 1시간 배양하는 것이 가장 좋음을 알 수 있었다. 이때, 효

모의 protoplast 형성률은 약 30%로 그다지 높지 않았다. 따라서, *E. coli*의 세포벽에 가장 효과적인 결과를 나타낸다고 보고된<sup>3,10)</sup> antibiotics의 사용을 생각해 볼 수 있으나, 가격과 화학물질의 본성의 독성효과로 인해 그 사용이 제한되고 있어, 비용이 적게드는 물리적인 방법을 화학적처리 방법에 결합시켜 보는 것도 좋을 것으로 보인다.

### 4. 화학적 처리법

이상의 실험결과에서 볼 때, 효모의 세포벽을 파괴하는데 필수적으로 사용되어야 할 Na<sub>2</sub>-EDTA 및 2-mercaptoethanol을 사용하여 최적조건에서 protoplasted yeast를 생성하였으나, 그 생성률이 약 30%에 지나지 않았다. 따라서, 화학적 처리방법만으로는 한계가 있는 것 같이 보인다. Fournier<sup>24)</sup>는 snail enzyme(helicase)만을 사용하여 20% 정도의 *Candida tropicalis* 효모의 protoplast 형성률을 얻었으나, mercaptoethanol을 첨가하였을 때는 그 생성률을 60%까지 올릴 수 있었으며, 약 10분간의 sonication등을 포함한 전처리를 통해 protoplast를 99%까지 얻었다고 보고하였고, Lobyeva<sup>25)</sup>는 *Helix pomatia*에서 얻은 세포벽 분해 효소와 0.01 M의 L-cysteine을 사용하여 protoplast를 형성한 *Candida utilis*를 거의 100% 얻었다고 보고하였다. 이러한 결과들을 볼 때, 효소적 처리방법과의 병행이 protoplast생성에 더욱 효과적이며, *K. fragilis*효모는 *Cadida*

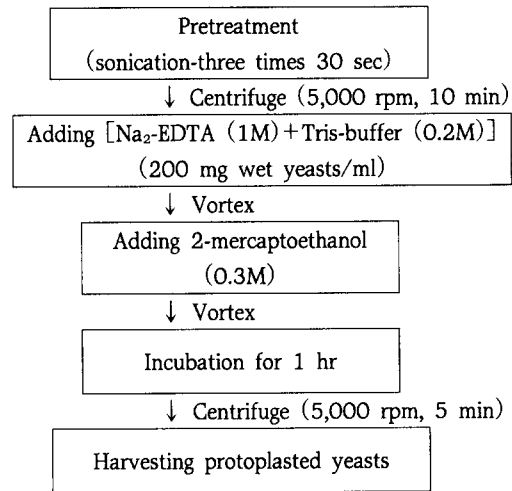


Fig. 5. A suggested procedure of the chemical treatment

효모와는 달리 세포벽 구조의 화학조성이 조금 틀리고 pseudomycellium을 형성함으로 인해 protoplast 생성률이 낮은 것으로 보인다. 또한, 효모는 flocculation을 이루므로<sup>27)</sup> 인해 처리한 화학제가 효과적으로 작용하지 못할 것으로 추정되므로, sonication 등으로 이러한 flocculation을 깨어 주는 전처리가 필요하다고 보여진다. 실제로 본 실험에서도 Polytron homogenizer를 사용하여 50%의 전력으로 0°C에서 30초간 3번의 sonication을 실시한 후 화학적 처리를 하였을 때, 약 60%의 protoplast가 형성됨을 알았다. 따라서, 가격이 비싼 효소를 사용하지 않고 경제적인 측면에서 얻을 수 있는 가장 바람직한 화학적처리방법은 Fig. 5와 같이 사료된다.

## 요 약

효모를 먹이로 하는 filter-feeder들의 소화력을 높이고자, algae의 대용물로서 가치가 있는 *Kluyveromyces fragilis* 효모를 화학적 처리방법에 의해 세포벽을 파괴시켰다. 화학적 처리방법의 최적조건은 0.2 M Tris-buffer에 용해시켜 만든 1 M의 Na<sub>2</sub>-EDTA와 0.3 M의 2-mercaptoethanol을 처리한 후 30°C 배양기에서 1시간 배양하는 조건에서 얻어졌다. 이때, 약 30%의 protoplast yeast를 얻었고, 화학제 처리전 미리 30초간 3번의 sonication을 실시함으로써, 그 생성률을 약 2배이상 올릴 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 부경대학교 해양산업개발연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터 지원금과 해양수산부의 수산특정연구 지원비의 일부에 의해 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Coutteau, P., Lavens, P., and Sorgeloos, P. : Baker's yeast as a potential substitute for live algae in aquaculture diets : *Artemia* as a case study. *J. World Aqua. Soc.*, 21(1), 1(1990).
2. Moon, J-H. and Kim, J. K. : Production of yeast diet for aquaculture in batch fermenters. *J. Korean Fish.*

- Soc.*, 29(6), 882(1996).
3. Kohluausch, U. and Holtje, J. V. : Analysis of murein and murein precursors during antibiotic-induced lysis of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 173, 3425(1991).
4. Hetherington, P. J., Pandit, A. B., and Joshi, J. B. : Release of protein from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by disruption in an industrial homogeniser. *Trans. Instn. Chem. Engrs.*, 49, 142(1971).
5. Andrews, B. A. and Nagodawithana, T. W. : Yeast derived products. *Yeast technology*, 2nd ed., Van Nostrand Reinhold, New York, Chap. 8, 370(1991).
6. Asenjo, J. A. and Dunnill, P. : The isolation of lytic enzyme from *Cytophaga* and their application to the rupture of yeast cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 1045(1981).
7. Asenjo, J. A. Andrews, B. A. and Pitts, J. M. : Design of enzyme systems for selective product release from microbial cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 542, 140(1988).
8. Hunter, J. B. and Asenjo, J. A. : A structured mechanistic model of the kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 929(1988).
9. Hunter, J. B. and Asenjo, J. A. : A population balance model of enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 31(1990).
10. Spratt, B. G. : Biochemical and genetical approaches to the mechanism of action of penicillin. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 289, 273(1980).
11. Falconer, R. J., O'Neill, B. K., and Middelberg, A. P. J. : Chemical treatment of *Escherichia coli* : 1. Extraction of intracellular protein from uninduced cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 53(5), 453(1997).
12. Leive, L. : In mode and action of antibiotics on microbial walls and membranes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 235, 109(1974).
13. Nikaido, H. and Vaara, M. : Molecular basis of outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.*, 49, 1(1985).
14. Smet, M. J., Kingma, J., and Withlot, B. : The effect of toluene on the structure and permeability of the outer and cytoplasmic membranes of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 506, 64(1978).
15. Ryan, W. and Parulekar, S. J. : Recombinant protein excretion in *Escherichia coli* JM 103 [pUC8] : Effects of plasmid content, ethylenediaminetetraacetate, and Phenethyl alcohol on cell membrane permeability. *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 430(1991).

16. Ryan, W. and Parulekar, S. J. : Immobilization of *Escherichia coli* JM103[pUC8] in k-carrageenan coupled with recombinant protein release by in situ cell membrane permeabilization. *Biotechnol. Prog.*, 7, 99(1991).
17. Marvin, H. J., Beest, M. B. A., and Witholt, B. : Release of outer membrane fragments from wild-type *Escherichia coli* and from *E. coli* lipopolysaccharide mutants by EDTA and heat shock treatment. *J. Bacteriol.*, 171(10), 5262(1989).
18. Moldow, C., Robertson, J., and Rothfield, L. : Purification of bacterial membrane protein : The use of guanidium thiocyanate and urea. *J. Membrane Biol.*, 10, 137(1972).
19. Hettwer, D., and Wang, K. : Protein release from *Escherichia coli* cells permeabilization with guanidine-HCl and Triton X100. *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 886 (1989).
20. Brusca, J. S., Fletcher, G., Wulff, J. L., and Earhart, C. F. : Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *J. Bacteriol.*, 115, 717(1973).
21. Jackson, R. W., and DeMoss, J. A. : Effects of toluene on *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 90, 1420(1965).
22. Braunegg, G., Sonnleitner, B., and Lafferty, R. M. : A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 6, 29(1978).
23. Lundgren, D. G., Alper, R., Schnaitman, C. C. and Marchessault, R. H. : Characterization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate extracted from different bacteria. *J. Bacteriol.*, 89, 245(1965).
24. Fournier, P., Provost, A., Bourguignon, C., and Heslot, H. : Recombination after protoplast fusion in the yeast *Candida tropicalis*. *Arch. Microbiol.*, 115, 143(1977).
25. Lobyreva, L. B. : Preparation of *Candida utilis* protoplasts. *Inst. Microbiology, Academy of Science of the USSR*, 44(2), 289(1975).
26. Kidby, D. K., and Davies, R. : Invertase and disulfide bridges in the yeast cell wall. *J. Gen. Microbiol.*, 61, 327(1970).
27. Kida, K., Morimura, S., Kume, K., Suruga, K., and Sonoda, Y. : Repeated-batch ethanol fermentation by a flocculating yeast, *Saccharomyces cerevisiae* IR-2. *J. Ferment. Bioeng.*, 71, 340(1991).