

Saccharomyces cerevisiae D-71과 *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S의 원형질체 형성과 융합

이종수·김찬조*

충남대학교 식품가공학과

Protoplast Formation and Fusion between *Saccharomyces cerevisiae* D-71 and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S

Lee, Jong-Soo and Chan-Jo Kim*

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University,
Daejeon 302-764, Korea

This experiment was carried out to obtain a hybrid with potent ethanol fermenting ability, by means of protoplast fusion between a thermophilic strain (D-71) of *Saccharomyces cerevisiae* and an osmotolerant strain (SR-S) of *Zygosaccharomyces rouxii*. The conditions for formation of protoplasts from both strains and for their fusion and regeneration were studied. Favorable conditions for formation of protoplasts from *Saccharomyces cerevisiae* D-71 were: treatment of the cells at late-exponential phase with 2-mercaptoethanol (1% v/v) for 10 minutes in the presence of 0.5M sorbitol, then incubation for 60 minutes in the set medium containing Zymolyase-20T (4mg/ml); and from *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S were: treatment of the cells at mid-exponential phase with 2-mercaptoethanol (1% v/v) for 10 minutes in the presence of 0.5M or 1M mannitol, then incubation for 120 minutes in the set medium containing Zymolyase-20T (4mg/ml). The protoplasts of parental cells were fused in the presence of 20mM CaCl₂, 0.5M sorbitol and 40% of polyethyleneglycol (M.W 4000), then fusants obtained were selected as regenerated colonies which embedded and grown in the minimal medium containing 3% of agar. The frequencies of fusant formation were 1.2×10^{-6} to 9.1×10^{-6} for the regenerated protoplast.

고온성 효모를 에탄올 발효에 이용하면 발효중의 잡균오염을 방지할 수 있고 발효시 술덧의 냉각에 소요되는 노력과 경비를 절감할 수 있으며 (1~3) 내삼투압성 효모는 고농도 기질에 대한 내성이 크므로 세포융합에 의한 고온에서 고농도 기질을 발효할 수 있는 효모의 육성은 매우 중요한 문제라고 생각한다. 이에 관련된 연구는 Hayashida 등(4)이 *Sacch. cerevisiae*와 고온성 효모인 *Hansenula polymorpha*의 세포융합실험에서 이들을 Zymolyase로 처리하여 원형질체를 만들고 PEG용액에서 융합 및 재생시킨 후 얻은 융합주의 각종 특성을 보고 하였고 Arnold 등(5)이 내삼투압성 효모인 *Zygosacch. rouxii*를 YPG 배지에 3일간 배양하여 얻은 세포를 dithioth-

reitolo 전처리한 후 달팽이소화액의 세포벽분해효소를 처리하여 약 86% 이상으로 형성된 원형질체를 분리하여 각종 안정성과 β -fructofuranosidase 활성 등을 측정된 결과를 볼 수 있을 뿐 이 분야의 연구는 아직 미흡한 실정이다. 따라서 고온에서 고농도 기질을 발효할 수 있는 효모를 세포융합으로 육성하고자 고온발효성 효모인 *Sacch. cerevisiae* D-71과 내삼투압성 효모인 *Zygosacch. rouxii* SR-S의 생리적 특성을 조사하여 표지유전인자를 정한 후 각 효모의 원형질체 형성조건과 두 효모 원형질체의 융합 및 재생조건 등을 검토하여 결과를 얻었으므로 보고하는 바이다.

Key words: Protoplast formation & fusion, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*

* Corresponding author

재료 및 실험방법

균주 및 배지

고온발효성 효모는 고량주 술덧에서 분리하여 동정한 *Sacch. cerevisiae* D-71(3), 내삼투압성 효모는 종균협회와 장유공장에서 분양받은 *Zygosacch. rouxii* 중 내삼투압성이 가장 큰 *Zygosacch. rouxii* SR-S를 사용하였다. 고온발효성 효모에는 YEPG 배지, 내삼투압성 효모는 YEPG 배지중의 KH_2PO_4 와 MgSO_4 을 0.3% malt extract와 2.0% NaCl로 대체하여 사용하였다. 또한 YEPG 배지에 0.3% malt extract를 가한 것을 완전배지, glucose 2.0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, NaCl 10.0% 조성의 배지를 최소배지로 하였다.

효소 및 시약

Zymolyase-20T는 Kirin 맥주사(日本) 제품을, Meicelase와 Driselease는 日本 生化学工業(株) 제품을, Sulfatase는 Sigma사(USA) 제품을, 2-mercaptoethanol, dithiothreitol, sodium thioglycollate와 기타 아미노산 및 비타민은 日本 和光化学(株) 제품을, triphenyl tetrazolium chloride는 BDH 화학사(U, K) 제품을 사용하였다.

생리적 특성

Lodder(6)와 飯塚(7)의 방법에 따라 조사하였다.

원형질체 형성

有馬 등(8)과 구(9)의 방법에 따라 시험효모를 30°C에서 12~48시간 배양한 후 6000×g로 5분간 원심분리하여 균체를 회수하고 삼투압 안정제와 0.1 mM의 EDTA가 함유되어 있는 일정량의 완충용액(이하 set medium이라 함)에 570 nm에서의 흡광도가 1.5되게 현탁시킨 후 1.0%의 thiol 화합물을 가하여 30°C에서 15분간 전처리한 다음 Zymolyase-20T와 Driselease 및 Meicelase는 1 mg/ml, Sulfatase는 5 U/ml(1U: 37°C, pH 5.0에서 시간당 1 μmol의 *p*-nitrocatechol sulfate을 가수분해시키는 활성) 등을 각각 첨가한 후 90분간 반응시켜 원형질체를 형성시켰다.

원형질체의 융합

형성한 *Sacch. cerevisiae* D-71과 *Zygosacch. rouxii*

SR-S의 원형질체를 각각 1.5×10^7 /ml가 되게하여 1:1로 혼합한 후 set medium으로 2회 세척한 다음 PEG와 20 mM CaCl_2 및 0.5 M sorbitol을 함유한 완충용액(이하 융합배지라 함)에 현탁시켜 30°C에서 60분간 두어 융합시켰다. 융합세포를 PEG를 뺀 융합배지로 2회 세척한 다음 최소배지에 도말하고 증정한 후 30°C에서 5일간 배양하여 재생시켰다.

원형질체 형성수율 및 융합 빈도수 측정

원형질체 형성수율은 Yamamura 등(10)의 방법에 따라 형성된 원형질체와 이를 증류수로 일정시간 osmolysis시킨 후의 흡광도를 570 nm에서 측정하여 계산하였다. 또한 융합 빈도수는 최소배지에서 재생된 융합주의 집락수와 완전배지에서 재생된 융합주의 집락수와와의 비율(11)로 측정하였다.

SEM에 의한 형태관찰

천주와 이들의 원형질체를 2.5%의 glutaraldehyde로 90분간 고정시킨 후 증류수로 세척한 다음 다시 2.0% osmic acid로 90분간 고정하고 증류수로 세척하였다. 이것을 75%, 90%, 95% 및 100% ethyl alcohol로 60분간씩 순차적으로 처리하고 다시 amyl acetate로 60분간씩 2회 처리한 다음 critical point dryer(Hitachi H 109-2)로 건조시킨 후 Ion Coater(EIKO IB-3)로 2분간 금을 피복하여 주사현형자현미경(Hitachi S-570)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

시험효모의 특성

생리적 특성: *Sacch. cerevisiae* D-71은 KNO_3 를 자화하지 못하였고 아미노산 및 비타민 요구성이 없었으며 50% glucose-yeast extract 배지에서 생육하지 못하였다. 또한 NaCl에 대한 내성은 9.0%이었고 생육최고온도는 43°C로 일반효모에 비하여 높았으며 triphenyl tetrazolium chloride 정색시험에서는 적홍색이었다.

Zygosacch. rouxii SR-S는 KNO_3 를 자화하지 못하였고 calcium pantothenate를 반드시 요구하였으며 50% glucose-yeast extract 배지에서 생육하였다. 또한 NaCl에 대한 내성은 22%이었고 triphenyl tetrazolium chloride 정색시험에서 홍색이었으며 galactose와 raffinose 및 inulin을 발효하지 못하였다.

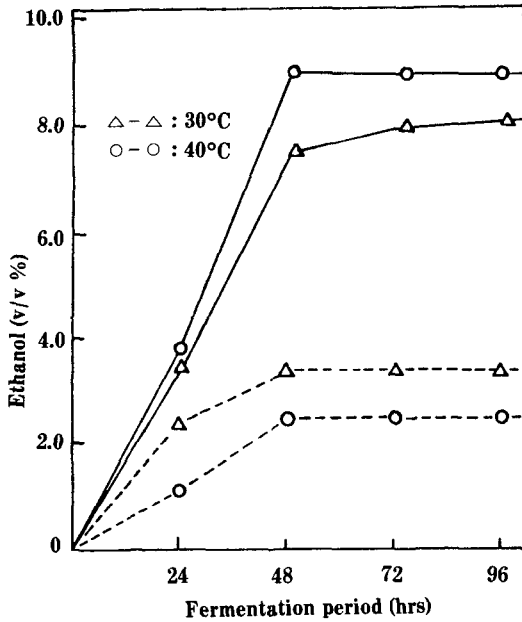


Fig. 1. Ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* D-71(—) and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S(---). Fermentation was performed at 30°C and 40°C in E medium (0.4% yeast ext. 0.7% peptone) containing 20% glucose without shaking.

에탄올 발효력 : *Sacch. cerevisiae* D-71로 20%의 glucose를 40°C에서 4일간 발효시켰을 때 약 9%의 에탄올을 생산하여 30°C에서 보다 높았고(Fig.1), *Zygosacch. rouxii* SR-S는 3% 미만의 에탄올을 생산하였다.

내염성 : 두 효모의 생육에 미치는 NaCl의 영향을 검토한 결과 Fig.2와 같이 *Sacch. cerevisiae* D-71은 8% 이상에서 생육하지 못하였으나 *Zygosacch. rouxii* SR-S는 20%에서도 생육하였다.

이상의 특성을 종합하여 *Sacch. cerevisiae* D-71은 NaCl 8% 이상에서 생육하지 못하는 성질을, 그리고 *Zygosacch. rouxii* SR-S는 calcium pantothenate를 절대 요구하는 성질을 유전표지인자로 하였다.

원형질체 형성조건

균의 성장시기 : 두 효모의 원형질체 형성에 미치는 성장시기의 영향을 검토한 결과 Fig.3과 같이 *Sacch. cerevisiae* D-71은 배양 12~18시간, *Zygosacch. rouxii* SR-S는 24시간의 대수기 후기에 있는 세포가 원형질체 형성율이 가장 높았고 그 후는 급격히 낮아졌다. 이는 Brown 등(12)과 구 등(13)의 보고처럼 배양시간이 경과함에 따라 배지중의 영양물

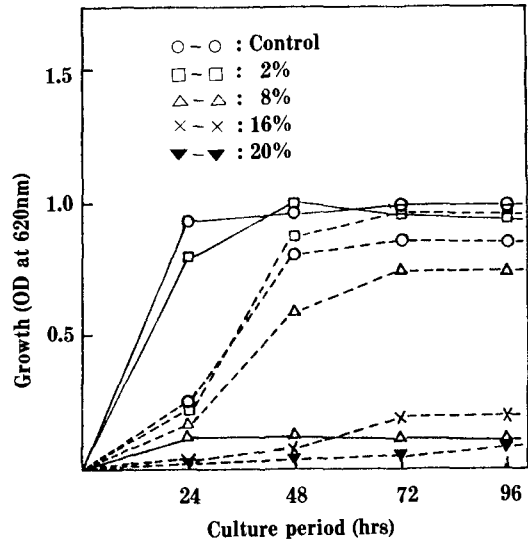


Fig. 2. Sodium chloride tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* D-71(—) and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S(---).

질의 감소 특히 glucose의 감소에 따른 glucan 합성의 저해와 mannan 합성의 촉진(14)으로 세포벽의 phosphomannan이 증가되고 기존 glucan과 mannan의 cross linkage가 증가함에 따른 것으로 생각되며 이러한 결과는 다른 효모에서의 보고(13)와 같은 경

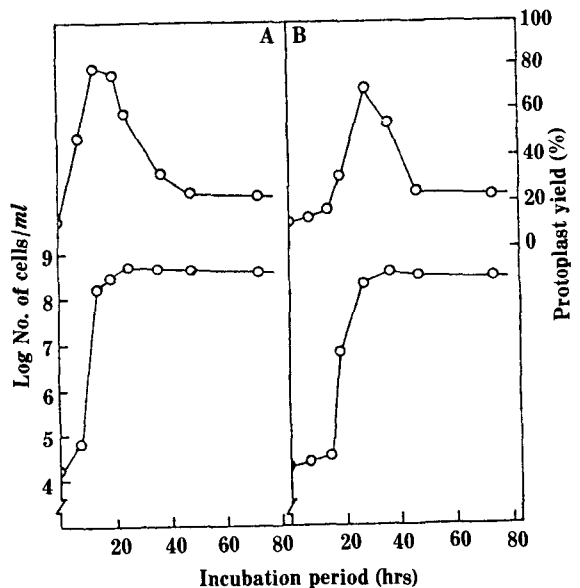


Fig. 3. Effect of growth stage of *Saccharomyces cerevisiae* D-71(A) and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S on the protoplast formation.

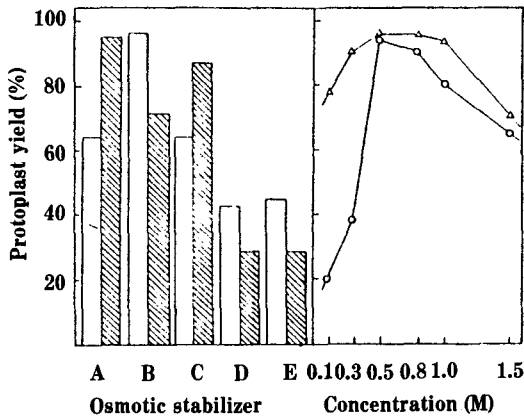


Fig. 4. Effect of osmotic stabilizer and of sorbitol (○-○) and mannitol concentration (△-△) on the protoplast formation for *Saccharomyces cerevisiae* D-71 (□) and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S(▨).

A: Mannitol (0.5M), B: Sorbitol (0.5M), C: Sucrose (0.5M), D: KCl (0.5M), E: MgSO₄ (0.5M)

향이었다.

삼투압 안정제: *Sacch. cerevisiae* D-71은 0.5M sorbitol이 원형질체 형성시 삼투압 안정제로 가장 적합하였고 *Zygosacch. rouxii* SR-S는 0.5~1.0M의

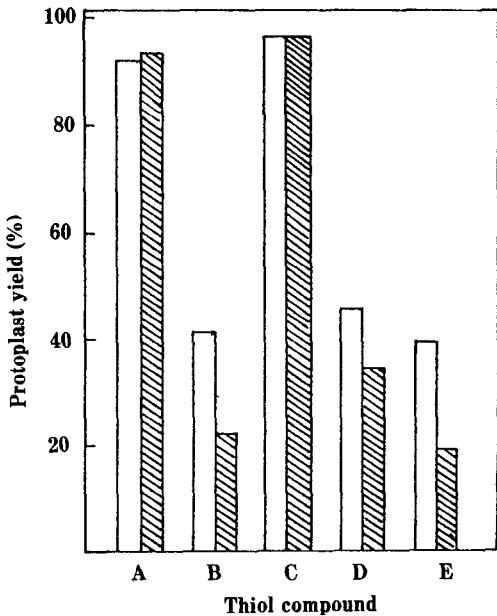


Fig. 5. Effect of thiol compounds on the protoplast formation of *Saccharomyces cerevisiae* D-71(□) and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S(▨).

A: 2-Mercaptoethanol (1%), B: Sodium thioglycollate (0.5M), C: Dithiothreitol (0.05M), D: Sodium sulfite (0.05M), E: Without treatment

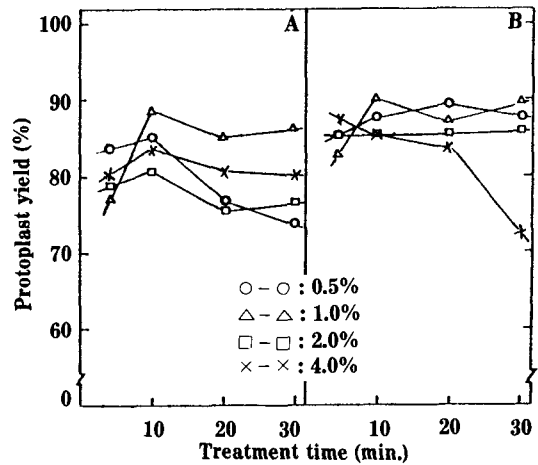


Fig. 6. Effect of 2-mercaptoethanol concentration on the protoplast formation of *Saccharomyces cerevisiae* D-71(A) and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S(B).

mannitol이 가장 양호하였다(Fig. 4). 이는 *Sacch. cerevisiae*의 원형질체 형성에는 0.6M의 sorbitol이 가장 적합하였다는 김 등(15)의 보고와 Arnold 등(5)이 *Sacch. rouxii*는 2.0M의 KCl이 가장 좋았고 1M의 mannitol도 안정효과가 컸다는 보고와 유사한 결과이었다.

전처리의 효과: 두 효모의 원형질체 형성에는 2-mercaptoethanol과 dithiothreitol의 전처리 효과가 컸고(Fig. 5), 2-mercaptoethanol은 Fig. 6과 같이 1.0%로 10분간 전처리 했을 때 제일 좋았다. 이는 구(9)가 *Sacch. cerevisiae* Hakker No 1의 원형질체 형성실험에서 1.0%의 2-mercaptoethanol로 10분간의 전처리가 제일 좋았다는 결과와 같은 것이었다.

세포벽 분해효소: *Helix pomatia*로 부터 생산된 Sulfatase와 Driselease, Meicelase P-1 및 Zymolyase-20T의 원형질체 형성에 미치는 효과는 Fig. 7과 같이 두 효모 모두 Zymolyase-20 T가 제일 좋았고 *Sacch. cerevisiae* D-71은 4.0 mg/ml로 60분간, *Zygosacch. rouxii* SR-S는 4.0 mg/ml로 120분간 처리하였을 때 원형질체 형성이 가장 잘 되었다(Fig. 8).

구(9)는 *Sacch. cerevisiae* No 1을 Zymolyase 5000 0.8 mg/ml로 60분간, 김 등(15)은 *Sacch. cerevisiae*를 Zymolyase 1.0 mg/ml로 120분간 처리하였을 때 원형질체 형성율이 가장 높았다고 보고하였다. 이들과 비교하여 볼 때 Zymolyase-20T의 농도가 다소 높고 원형질체 형성율이 2~3% 낮은 것은 정 등(16)의 보고와 같이 *Sacch. cerevisiae*

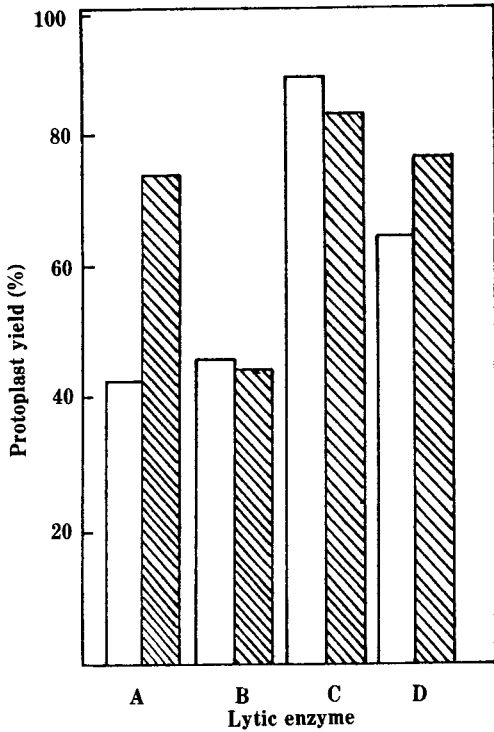


Fig. 7. Effect of various lytic enzyme on the protoplast formation of *Saccharomyces cerevisiae* D-71(□) and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S(▨).

A: Sulfatase (5U/ml), B: Meicelase (1mg/ml), C: Zymolyase-20T (1mg/ml), D: Driselase (1mg/ml)

D-71의 세포벽의 glucan과 mannan 함량이 각각 14.5%와 14.75%이었고 *Zygosacch. rouxii* SR-S는 glucan 24.0%, mannan 19.0%로서 *Sacch. cer-*

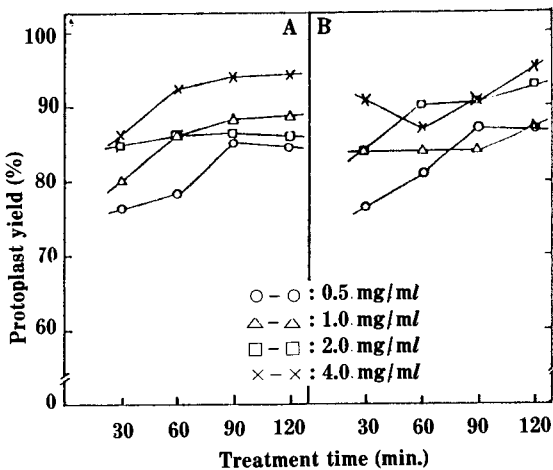


Fig. 8. Effect of concentration of Zymolyase-20T on the protoplast formation of *Saccharomyces cerevisiae* D-71 (A) and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S(B).

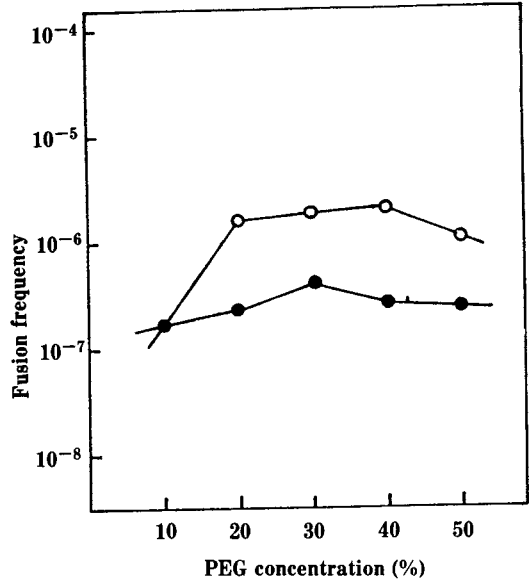


Fig. 9. Effect of concentration of PEG on the fusion between *Saccharomyces cerevisiae* D-71 and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S.

○ - ○ : Polyethylene glycol (M.W 4000)
● - ● : Polyethylene glycol (M.W 6000)

eviae (발효 7호)보다 높기 때문인 것으로 생각된다.

원형질체 융합 및 재생조건

PEG의 농도 : 원형질체 융합에 미치는 PEG 4000

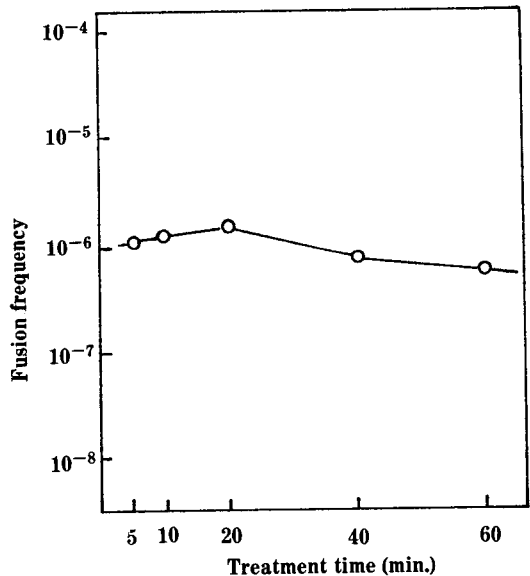


Fig. 10. Effect of treatment time of PEG (M.W 4000) on the fusion between *Saccharomyces cerevisiae* D-71 and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S.

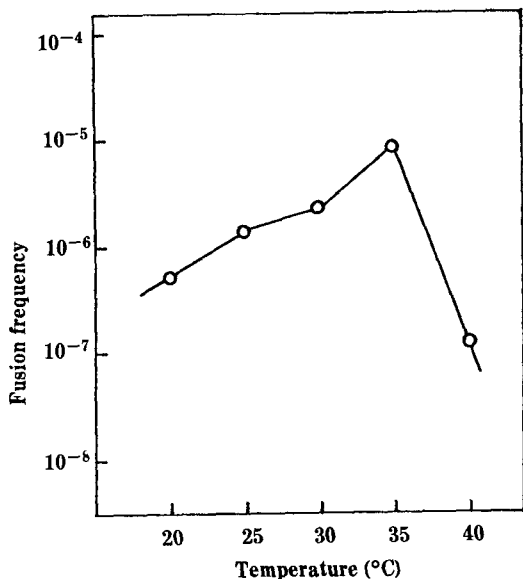
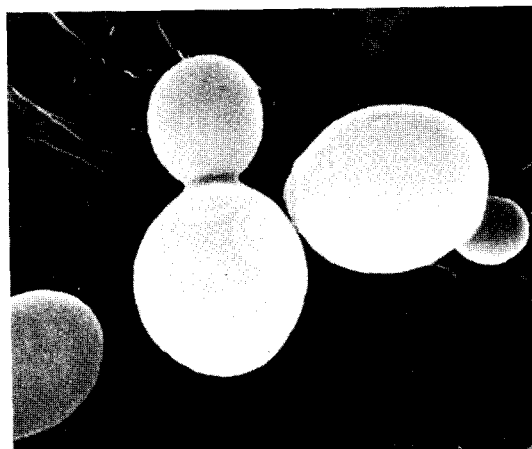


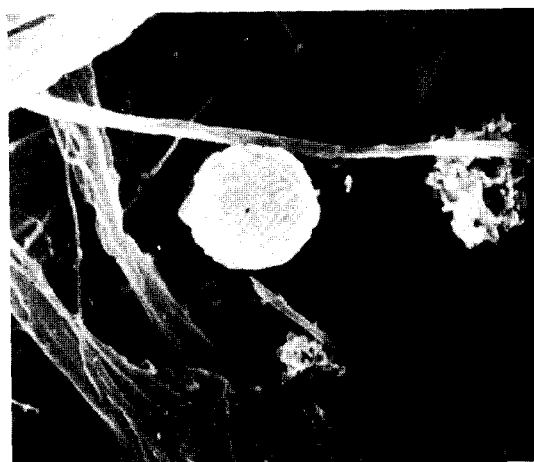
Fig. 11. Effect of temperature on the fusion between *Saccharomyces cerevisiae* D-71 and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S.

과 PEG 6000의 농도의 영향을 검토한 결과 PEG 4000에서는 40%에서 3.1×10^{-6} 의 융합빈도수를 보였고 PEG 6000에서는 30%에서 4.2×10^{-7} 의 융합빈도수를 보여 PEG 4000이 효과적이었다(Fig. 9). 이는 김 등(15)이 *Sacch. cerevisiae* RSC 91과 *Candida tropicalis* RCT 104의 원형질체 융합에는 30%의 PEG 4000이 제일 좋았다는 결과와 유사하였다.

PEG 4000의 처리시간 : 융합에 미치는 PEG 처리시간의 영향은 Fig.10과 같이 40%의 PEG 4000으

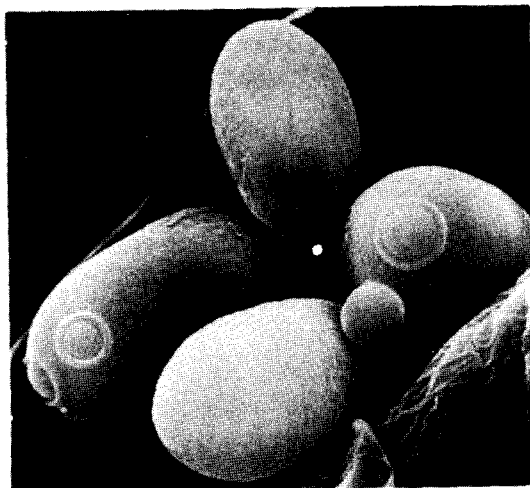


(A)

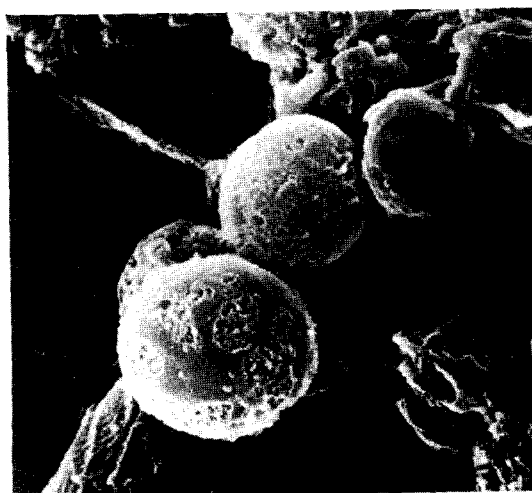


(B)

Plate 2. Scanning electron micrograph of cells (A) and protoplast (B) of *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S.

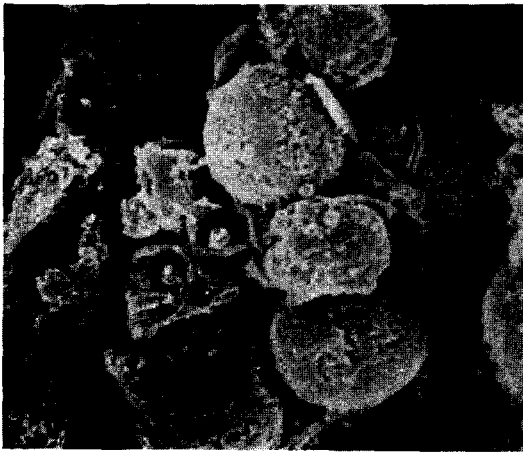


(A)



(B)

Plate 1. Scanning electron micrograph of cells (A) and protoplast (B) of *Saccharomyces cerevisiae* D-71.



(A)



(B)

Plate 3. Scanning electron micrograph of aggregates (A) and fusant (B) of the protoplasts from *Saccharomyces cerevisiae* D-71 and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S.

로 20분간 처리하였을 때 1.18×10^{-6} 의 가장 높은 융합빈도수를 보여 김 등(15)과 성 등(17)의 보고와 유사하였다.

온도, pH 및 한천의 농도: 융합에 적당한 온도는 35°C 로(Fig. 11) 생육 및 원형질체 형성 최적온도보다 다소 높았다. 또한 융합주의 재생에는 3%의 한천이 제일 좋았다. 이 결과는 *Candida lipolytica*의 동종간 세포융합실험에서 융합주의 재생에는 3%의 한천이 적합하였다는 성 등(17)의 결과와 같았다.

이상의 조건에서 시험효모의 원형질체를 융합, 재생시킨 결과 9.1×10^{-6} 의 융합빈도수를 보였고 이 융합주들은 유전표지인자가 상호 보완되었음을 영양

요구성과 NaCl 내성시험을 통하여 확인하였고 유전 안정성과 알콜 발효력을 측정하여 최종적으로 융합주 FS-RN 1를 선별하였다. 또한 이 융합빈도수는 구(9)의 융합빈도수 $10^{-3} \sim 10^{-4}$, 김 등(15)의 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ 및 성 등(17)의 $4 \sim 5 \times 10^{-4}$ 보다 낮은 결과이었다.

친주 및 원형질체의 형태

사진 1, 2 및 3은 주사형전자현미경으로 친주와 그들의 원형질체 및 융합주를 관찰한 것으로 구형의 원형질체와 융합재생된 타원형의 세포가 관찰되었고 융합중의 응집체와 일부 세포벽이 미분해된 spheroplast도 관찰되었다.

요 약

고온에서 고농도 기질을 발효할 수 있는 효모를 육성하고자 8%의 NaCl 내성을 갖은 고온발효성인 *Saccharomyces cerevisiae* D-71과 Ca-pantothenate를 절대요구하는 내삼투압성인 *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S를 친주로 하여 원형질체 형성과 융합조건을 검토하였다.

Sacch. cerevisiae D-71은 YEPG 배지에 12시간 배양한 세포를 0.1mM EDTA와 0.5M sorbitol을 함유한 인산완충액(pH 7.5)에 현탁시켜 1%의 2-mercaptoethanol로 10분간 전처리한 후 Zymolyase-20T 4.0 mg/ml를 가하여 30°C 에서 60분간 반응시켰을 때 96% 이상의 수율로 원형질체가 형성되었고 *Zygosacch. rouxii* SR-S는 YEMEPG 배지에 24시간 배양한 세포를 0.1mM EDTA와 0.5~1.0M mannitol을 함유한 인산완충액(pH 7.0)에 현탁시켜 1%의 2-mercaptoethanol로 10분간 전처리한 후 Zymolyase-20T 4.0 mg/ml를 가하여 30°C 에서 120분간 반응시켰을 때 95% 정도의 수율로 원형질체가 형성되었다.

시험효모의 원형질체를 CaCl_2 와 sorbitol 및 40%의 PEG 4000을 함유한 융합배지에 1:1로 혼합한 후 35°C 에서 20분간 처리하여 융합시킨 다음 3%의 한천을 함유한 최소배지에 중층하여 5일간 배양하였을 때 9.1×10^{-6} 의 융합빈도수를 보였다. 또한 주사형전자현미경으로 구형의 원형질체와 융합재생된 타원형의 세포를 관찰할 수 있었다.

참고문헌

1. Kummuaanta, J., B. Punpeng and K. Komagata: *Ann. Rep. of ICME* **2**, 307 (1979).
2. Fujio, Y. and P. Atthasampunna: *Ann. Rep. of ICME* **4**, 382 (1981).
3. 신철승, 박윤중: 충남대 농기연보 **11**(1), 25 (1984).
4. Hayashida, S. and S. Chavanich: *Ann. Rep. of ICME* **7**, 331 (1984).
5. Arnold, W.N. and R.G. Garrison: *J. of Bacteriol.* **137**(3), 1386 (1979).
6. Lodder, J.: *The Yeast-a Taxonomy Study*. North Halland, Amsterdam, 682 (1970).
7. 飯塚廣, 後藤昭仁: 酵母の分類と同定法. 東京大學出版會, 東京(1973).
8. 有馬賢治, 高野勇: 發酵工業, **57**, 380(1979).
9. 구교임: 大阪大學 修士學位論文(1982).
10. Yamamura, M., Y. Teranishi., A. Tanaka and S. Fukui: *Agric. Biol. Chem.* **39**(1), 13 (1975).
11. 秋山裕一: 酵母の利用と開發, 學會出版センター東京. 149(1978).
12. Brown, J.P.: *Can. J. Microbiol.* **17**, 205 (1971).
13. 구영조, 박완수, 신동화, 유태종: 한국산업미생물학회지 **13**(2), 137(1985).
14. Mcmurrough, I. and A.H. Rose: *J. of Biochem.* **105**, 189 (1967).
15. 김영호, 서정훈: 한국산업미생물학회지, **13**(4), 383(1985).
16. 정창기, 김찬조, 이종수: 한국산업미생물학회지, **16**, 136 (1988).
17. 성낙계, 심기환, 전효곤, 강신권, 박석규: 한국산업미생물학회지, **13**(4), 391(1985).

(Received March 4, 1988)