

전기융합법을 이용한 phytase 생성 내염성 효모 균주의 개발

오철환 · 인만진¹ · 오남순*

공주대학교 식품공학과, ¹청운대학교 식품영양학과

Strain Development by Electrofusion between Phytase-producing Yeast and Salt-tolerant Yeast

Chul-Hwan Oh, Man-Jin In¹ and Nam-Soon Oh*

Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 340-802, Korea

¹Department of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, Hongseong 350-701, Korea

Received January 18, 2007; Accepted March 6, 2007

서 론

Phytate는 주로 곡류와 두류에서 총인 함량의 60~90%를 차지하는 인의 주요한 저장 화합물로 inositol에 6개의 인산기가 결합된 inositol ester 구조로 되어 있다.¹⁾ 주요 곡류와 두류 중 phytate 함량은 옥수수 0.8%, 현미 0.89%, 대두 1.4%, 연질밀 1.13%, 탈지 참깨박 5.18% 등으로 보고되어 있다.²⁾ 또한 곡류와 두류를 주재료로 사용하는 발효식품인 장류의 경우 원재료와 제조방법에 따라 차이는 있으나 phytate가 0.16~1.2%까지 함유³⁾되어 있는 것으로 알려져 있다.

Phytate는 킬레이트 활성에 의하여 중금속 제거, 항암작용 등과 같은 긍정적인 효과도 보고⁴⁾되어 있으나, 호소에서 부영양화를 유발하여 환경오염을 일으키는 원인물질이며 생체 내에서 Mg, Ca, Fe 등의 무기질이나 영양성분의 체내 흡수를 저해하는 항영양인자(antinutrient)로도 작용한다.^{5,6)} 그러므로 단위동물용 사료뿐만 아니라 식품 중의 phytate의 분해 및 제거는 영양학적으로 매우 중요하며, 최근에는 주로 생물체 기원의 phytase를 사용하여 사료와 식품 중의 phytate를 제거하거나 함유량을 감소시키는 방법이 산업적으로 실용화되어 있다.^{7,8)} 특히 식품에서는 곡류에 존재하는 phytase를 이용⁹⁾하거나 phytase를 생산하는 효모와 유산균을 첨가하여 phytate를 분해하는 연구가 보고되어 있으나 대부분 빵과 같이 소금함량이 높지 않은 식품에 한정되어 있는 실정이다.^{10,11)} 이는 내염성 phytase 또는 phytase를 생산하는 내염성 효모나 유산균과 같은 유용 식품 미생물에 대한 기술개발의 부진에서 그 원인을 찾아볼 수 있다.

본 연구는 장류 식품과 같은 염장 식품 중에서 phytase를 생성하는 내염성 효모 균주를 개발하고자 수행되었다. 여러 가지 균주 개량법이 있으나 본 연구에 사용된 세포 융합법은 과정이

비교적 간단하고, 균주 개량의 확률이 높으며, 안전하고 간편하게 이용된다는 장점이 있다. 특히 전기융합법(electrofusion)은 세포가 전기장내에 있을 때 인접한 세포막 사이에 전자기적 에너지에 의하여 일시적인 간극이 생겨 세포막 병합과 세포융합 과정을 촉진시키는 원리를 이용하는 원형질체의 융합기술이다.¹²⁾ 따라서 본 연구는 전기 융합법을 이용하여 phytase를 생성하는 내염성 효모 균주를 개발하고자 내염성 효모인 *Zygosaccharomyces rouxii*와 phytase를 분비하는 비내염성 *Saccharomyces cerevisiae* 사이에 전기융합을 실시하였으며, 융합된 세포가 높은 염농도에서 생육하면서 phytase를 생성함을 확인하였다.

재료 및 방법

미생물 및 재료. 본 실험에 사용된 미생물은 공주대학교 식품공학과에 보관 중인 효모로서 민속주에서 분리한 phytase를 분비하는 *Saccharomyces cerevisiae* CY 균주¹³⁾와 고추장에서 분리한 내염성의 *Zygosaccharomyces rouxii* Y-80 균주¹⁴⁾를 사용하였다. 효모의 세포벽 분해효소는 Tunicase FN(Daiwa Kasei K. K., Tokyo, Japan)를 사용하였으며, 전기적 세포융합은 Electro Cell Manipulator ECM2001(Harvard Apparatus, Holliston, MA)을 이용하였다.

배지 및 배양. *S. cerevisiae* CY 균주와 *Z. rouxii* Y-80 균주는 YM broth(Difco, Detroit, MI) 배지에서 배양하였다. 배양은 30°C의 인큐베이터에서 150 rpm으로 진탕하면서 CY 균주는 24시간, Y-80 균주는 36시간 동안 배양하였다. Phytase를 생성하는 내염성 융합균주를 위한 선별배지는 Lambrechts 등의 방법¹⁵⁾을 변형한 PSM(phytase screening medium) 배지¹³⁾에 NaCl을 10% 첨가하여 사용하였다.

원형질체의 제조. YM broth에서 24-36시간 동안 배양한 각 균주의 배양액을 4°C에서 6,000×g로 5분간 원심분리한 후 균체를 회수하고 멸균된 생리식염수와 증류수로 3회 세척한 다음

*Corresponding author

Phone: +82-41-330-1485; Fax: +82-41-333-9610

E-mail: nsoh@kongju.ac.kr

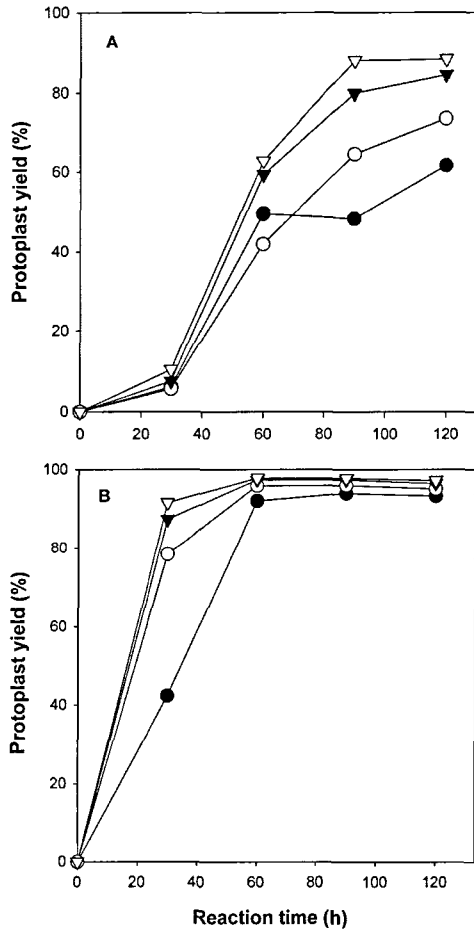


Fig. 1. Effects of concentration of Tunicase and reaction time on the protoplast formation in *S. cerevisiae* CY (panel A) and *Z. rouxii* Y-80 (panel B). Symbols: ●, 3 U/ml; ○, 6 U/ml; ▼, 12 U/ml; ▽, 24 U/ml.

균수를 1×10^8 cells/ml 농도로 조절하였다. 여기에 2-mercaptoethanol을 1.0%로 첨가하여 30°C에서 10분간 전처리한 후 Tunicase 효소 용액(24 U/ml)을 첨가하여 37°C에서 60-90분간 반응시켜 원형질체를 제조하였다. 원형질체 형성수율은 다음과 같이 삼투압 저항성 균수를 측정하여 계산하였다.¹⁶⁾ 효소 처리 후 원심분리로 균체를 회수한 후 증류수에 현탁시켜 생성된 원형질체를 용균시킨 다음 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이를 효소처리 전 효모 현탁액의 흡광도와 비교하여 원형질체 형성수율을 계산하였다.

전기적 세포융합 및 융합균주의 선별. 형성된 원형질체를 electrofusion 완충용액(1.2 M sorbitol, 0.1 mM Ca-acetate, pH 6.0)으로 2회 세척하고 각각의 원형질체를 1:1의 비율로 혼합한 혼합용액 80 μ l를 electrofusion chamber에 넣은 다음 AC 13 V로 pearl chain을 형성시킨 후 고전압 펄스(DC 200-500 V, pulse length 10-15 μ sec)를 2회 가하여 세포융합을 실시하였다. 융합 반응액을 10% NaCl을 함유한 PSM배지에 도말하고, 30°C에서 배양하여 투명환을 생성하는 융합균주를 선별하였다. 선별된 융합균주는 10% NaCl을 함유한 PSM사면배지에 옮겨 4°C에서 보관하였다.

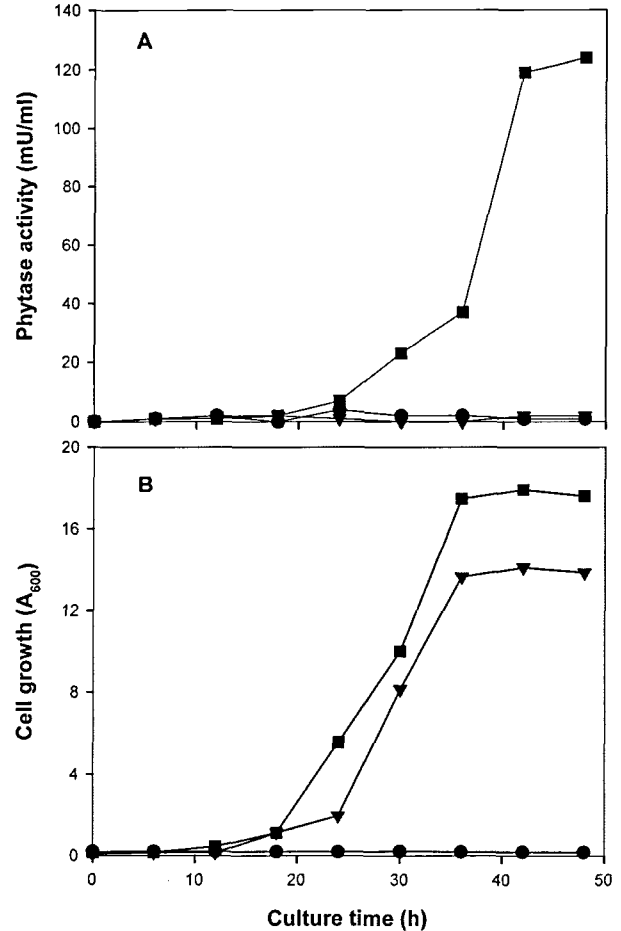


Fig. 2. Phytase production (panel A) and cell growth (panel B) profile of fusant, *S. cerevisiae* CY and *Z. rouxii* Y-80. Yeast strains were cultured in YM broth containing 10% NaCl at 30°C. Symbols: ●, *S. cerevisiae* CY; ▼, *Z. rouxii* Y-80; ■, fusant.

융합균주 배양 및 phytase 활성 측정. 융합균주를 10% NaCl을 함유한 YM broth에 접종하고 30°C에서 배양하면서 균주의 생육과 phytase 활성을 측정하여 친주인 Y-80 균주 및 CY 균주와 비교하였다. 균주의 생육은 600 nm에서의 흡광도로 나타내었으며, phytase 활성은 Quan 등의 방법¹⁷⁾을 변형하여 다음과 같이 세포외로 분비된 phytase의 활성을 측정하였다.¹⁸⁾ 배양액을 4°C에서 15분간 원심분리(10,000 \times g)하여 얻은 상등액 0.1 ml를 2 mM sodium phytate 용액(pH 3.60) 0.9 ml와 혼합하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 10% TCA용액 1 ml를 가하여 효소반응을 정지시키고 발색시약(5.5% 황산에 용해한 1.5% ammonium molybdate용액과 증류수에 용해한 2.7% ferrous sulfate용액을 4:1로 혼합하여 제조한 용액) 1.5 ml를 첨가하여 10분간 발색시킨 다음 700 nm에서 흡광도를 측정하여 유리된 인산의 양을 계산하였다. 효소활성 1 unit는 1분 동안 1 μ mol의 phosphate를 유리시키는 효소량으로 정의하였다.

결과 및 고찰

원형질체 형성에 영향을 주는 요인. 균주의 융합을 위하여 효

소(Tunicase)로 효모의 cell wall을 제거하고 *S. cerevisiae* CY 균주와 *Z. rouxii* Y-80 균주의 원형질체를 제조하였다. 균체에 2-mercaptoethanol을 처리하고 원형질체를 제조한 결과 원형질체의 형성수율이 크게 증가하였다. CY 균주에서 Tunicase 효소를 24 U/ml의 농도로 하여 원형질체를 제조할 때 2-mercaptoethanol로 세포를 전처리하는 경우 형성수율이 48%에서 90%로 약 2배 가량 증가하였다. 그러나 Y-80 균주에서는 동일 효소 반응 조건에서 2-mercaptoethanol의 처리와 무관하게 형성수율이 95% 수준으로 측정되었다. 즉, CY 균주의 원형질체 형성수율을 높이기 위하여 2-mercaptoethanol의 처리가 필수적이었으며, 원형질체의 형성수율은 Tunicase의 사용량에 비례하여 증가하는 경향을 보였다. Y-80 균주의 원형질체 형성수율은 Tunicase를 3 U/ml 농도로 60분간 반응시킬 때 90% 이상을 나타냈으나, CY 균주의 원형질체 형성수율은 24 U/ml의 농도에서 90분간 처리할 때 약 90%의 수율을 보여(Fig. 1) Y-80 균주가 CY 균주보다 Tunicase 효소의 농도에 더 민감하게 반응하는 것으로 판단되었다. 원형질체 형성을 위한 효과적인 Tunicase 효소의 반응시간은 60-90분으로 기존의 결과¹⁹⁾와 유사하였다.

전기적 세포융합. 제조된 원형질체간의 전기적 세포융합을 위하여 기존의 방법^{19,20)}과는 다소 상이하게 electrofusion 완충용액(1.2 M sorbitol, 0.1 mM Ca-acetate, pH 6.0)을 이용하였다. 완충용액 중의 삼투압 안정제로 1.2 M의 sorbitol을 사용하였으며, 첨가된 Ca^{2+} 이온은 세포간 응집을 방해하는 원형질체 표면의 음전하를 제거하여 융합을 촉진시키는 것으로 알려져 있다.²¹⁾ Electrofusion chamber에 AC 13 V의 전류를 30초간 흘려주어 원형질체를 일직선으로 배열시킨 후 DC 200 V(pulse length 15 μ sec) 혹은 DC 500 V(pulse length 10 μ sec)를 2회 가하여 세포융합을 실시하였다. 융합 반응액을 10% NaCl을 함유한 PSM사면배지에 도말하여 7-10일간 배양한 결과 200 V의 전압에서 생성된 융합균주는 680 cells/ml이었으며, 500 V의 경우는 60 cells/ml의 융합균주가 생성되었다. 이들 융합균주들 중 PSM 평판배지(NaCl 10% 함유)중에서 투명환의 크기가 가장 큰 융합균주를 최종적으로 선별하였다.

융합균주의 phytase 생산 특성. 최종적으로 선별된 융합균주는 10% NaCl이 첨가된 YM 액체배지 접종하고 30°C에서 진탕 배양한 후 phytase를 생성하는 내염성 균주 여부를 확인하였다. 비교 실험균주로 친주인 *S. cerevisiae* CY 균주와 *Z. rouxii* Y-80 균주를 동일한 조건으로 배양하여 생육도와 phytase 효소활성도를 비교하였다. 그 결과(Fig. 2) 융합균주의 생육은 *Z. rouxii* Y-80 균주보다 우수하였으며 stationary phase에서 25% 이상 생육이 증가하였다. 반면에 *S. cerevisiae* CY 균주는 NaCl 7% 이상의 농도에서는 생육이 불가능하므로¹⁸⁾ 본 실험에서도 생육과 phytase 활성은 관찰되지 않았다. 그러나 융합균주의 phytase 활성은 48시간 배양 후 124 mU/ml까지 증가하였다. *S. cerevisiae* CY 균주를 무염의 YM 액체배지에서 배양한 경우 세포외로 분비된 phytase 활성이 236 mU/ml까지 생산된다는 본 연구진의 이전 보고¹³⁾와 비교하면 phytase 활성은 친주와 비교할 때 약 53% 수준이었으며, NaCl 농도가 10%라는 배지환경을 고려하면 비교적 우수한 활성을 보이는 것으로 판단

된다. 따라서 선별된 융합균주는 NaCl이 10% 첨가된 배지 조건에서 생육이 우수하며, 이와 동시에 phytase 활성도가 친주 대비 약 50% 이상 생성됨을 확인하였다. 향후 융합균주의 안정성을 확인함과 더불어 장류 제조에 융합균주를 이용함으로써 발효과정에서 장류의 숙성과 항영양자인 phytate의 변화를 추적하는 연구를 수행하고자 한다.

초 록

내염성 조건에서 phytase를 생성하는 효모 균주를 개발하기 위하여 phytase를 생산하는 효모인 *S. cerevisiae* CY 균주와 내염성 효모인 *Z. rouxii* Y-80 균주 사이의 전기적 세포융합을 실시하였다. *S. cerevisiae* CY 균주와 *Z. rouxii* Y-80 균주의 배양된 세포를 1.0%의 β -mercaptoethanol로 전처리하고 Tunicase로 세포벽을 분해시킨 후 원형질체를 얻었다. 각 균주의 원형질체는 electrofusion 완충액에 1:1의 비율로 현탁한 후 AC 13 V에서 30초간 처리하고 고전압(DC 500 V/10 μ sec)을 가하여 전기적 세포융합을 실시하였다. 선별된 융합균주는 NaCl이 10% 첨가된 배지에서 친주들과 비교한 결과 *Z. rouxii* Y-80 균주보다는 생육면에서 25% 이상 증가하였으며, phytase 활성도는 친주인 *S. cerevisiae* CY 균주 대비 53%의 생성도를 확인하였다.

Key words: 내염성 효모, phytase, electrofusion

참고문헌

- Reddy, N. R., Sathe, S. F., and Salunkhe, D. K. (1982) Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.* **28**, 1-92.
- Kim, Y. H. (1996) Qualities of bread and changes in phytic acid during breadmaking with whole wheat flour. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **25**, 779-785.
- Sa, J. H., Lee, T. W., Kim, T. W., Park, K. Y., Lee, W., Shin, I. C., Jeong, K. J., Han, K. S., Shim, T. H., and Oh, H. S. (2005) Chemical characteristics and antioxidative effect of small black soybean (*Yak-Kong*). *Rep. Inst. Health & Environ.* **16**, 53-62.
- Shamsuddin, A. M. (1995) Inositol phosphates have novel anticancer function. *J. Nutr.* **125**, 725S-732S.
- Sandberg, A. S. (1994) Antinutrient effects of phytate. *Nutrition* **18**, 429-432.
- Erdman, J. W. and Ponerros-Schneier, A. (1989) Phytic acid interactions with divalent cations in foods and in the gastrointestinal track. *Adv. Exp. Med. Biol.* **249**, 161-171.
- Zyta, K. (1992) Mould phytases and their application in the food industry. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 467-472.
- Hamada, A., Yamaguchi, K., Harada, M., Horiguchi, K., Takahashi, T., and Honda, H. (2006) Recombinant, rice-produced yeast phytase shows the ability to hydrolyze phytate derived from seed-based feed, and extreme stability during ensilage treatment. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 1524-1527.
- Leenhardt, F., Levrat-Verny, M. A., Chanliaud, E., and Remesy, C. (2005) Moderate decrease of pH by sourdough fermentation

- is sufficient to reduce phytate content of whole wheat flour through endogenous phytase activity. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 98-102.
10. Reale, A., Mannina, L., Tremonte, P., Sobolev, A. P., Succi, M., Sorrentino, E., and Coppola, R. (2004) Phytate degradation by lactic acid bacteria and yeasts during the wholemeal dough fermentation: a ^{31}P NMR study. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 6300-6305.
 11. Jung, J. H., Kang, S. G., Kim, Y. S., and Chung, H. J. (1990) Degradation of phytic acid in *Chunhkookjang* fermented with phytase producing bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 423-428.
 12. Choi, S. H., Sung, C., Oh, M. J., and Kim, C. J. (1997) Intergeneric protoplast fusion in *Saccharomyces fibuligera* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* **84**, 158-161.
 13. Seo, S. -W., In, M. -J., and Oh, N. -S. (2005) Production and reaction properties of phytase by *Saccharomyces cerevisiae* CY strain. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**, 228-232.
 14. Oh, N. -S., Shin, D. -B., In, M. -J., Chang, Y. I., and Han, M. (2004) Effects of capsaicin on the growth and ethanol production of *Zygosaccharomyces rouxii* KFY80 isolated from *Gochujang* (fermented hot pepper paste). *Food Sci. Biotechnol.* **13**, 749-753.
 15. Lambrechts, C., Boze, H., Moulin, G., and Galzy, P. (1992) Utilization of phytate by some yeasts. *Biotechnol. Lett.* **14**, 61-66.
 16. Jo, Y. B., Choi, H. J., Baik, H. S., and Jun, H. K. (1997) Evaluation of optimum conditions for the electrofusion between *Lactobacillus* sp. JC-7 isolated from *Kimchi* and *Lactobacillus acidophilus* 88. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 121-128.
 17. Quan, C. S., Zhang, L. H., Wang, Y. J., and Ohta, Y. (2001) Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. *J. Biosci. Bioeng.* **94**, 419-425.
 18. Seo, S. -W. (2007) Production and characterization of phytase from *Saccharomyces cerevisiae* CY. In M. S. thesis of Kongju National University, Korea.
 19. Kim, S., Kim, J. -S., Sapkota, K., Park, I. -S., Cho, M. -G., Park, Y., Chun, H. S., Choi, B. -S., Park, S. -E., Choi, H. -S., Kim, M. -K., and Kim, S. -J. (2006) Electrofusion of yeast cells and their genetic analysis using RAPD-PCR. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**, 186-191.
 20. Oh, S. -W., Lee, S. -H., Lee, H. -J., and Han, E. -S. (2006) Studies on the electrofusion applied to the yeast to produce high quantity of organic germanium. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**, 712-716.
 21. Oh, I. S., So, S. S., and Kim, H. G. (1998) Optimum conditions of pH and Ca^{2+} concentration for electrofusion of tobacco protoplasts. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 399-403.