

원형질체 융합 방법을 이용한 전분 발효성 효모의 개발

전순배 · 배 석 · 이기영* · 김수현** · 이진종** · 김상문**

전남대학교 미생물학과, *공업화학과, **생물학과

Construction of Starch-Fermenting Yeast Using Protoplast Fusion Technique

Chun, Soon-Bai, Suk Bai, Kee-Young Lee*, Soo-Hyun Kim**, Jin-Jong Lee** and Sang-Moon Kim**

Department of Microbiology, *Chemical Technology and

**Biology, Chonnam National University, Kwang-Ju, Korea

ABSTRACT: Intraspecific fusion frequency between *Filobasidium capsuligenum* CBS 6122-2 *ade* and *met trp* or *met* strains was 2.9×10^{-3} and 8.5×10^{-3} , respectively. And intergeneric fusion frequency between *Filobasidium capsuligenum* CBS 4381 (*cys his*) and *Saccharomyces cerevisiae* 262-12-1 (*hom3 thr1*) or X2180-1A (*ade thr*) was 8.8×10^{-6} and 9.5×10^{-4} , respectively. Nuclear fusion appears to occur in fusants between intraspecies and intergenera as strongly suggested by DNA content, nuclear staining, comparison of survival rate to UV light and mitotic segregation analysis. It was also found that α -amylase and glucoamylase activity from intraspecific hybrids was 1.6-2.1 fold increased when compared with that from their parents.

KEY WORDS □ *Filobasidium capsuligenum*, *Saccharomyces cerevisiae*, protoplast fusion

현재 전분을 이용한 알코올 발효에는 α -amylase 에 의한 액화, glucoamylase에 의한 당화, 그리고 효모에 의한 발효과정 등으로 다원화 되어 있다. 이를 일원화하기 위해서는 전분 당화에 필요한 α -amylase 와 debranching 활성을 가진 glucoamylase 생성능, 그리고 알코올 발효능을 겸비한 새로운 균주의 개발이 필요하다.

Filobasidium capsuligenum 은 1972년 Rodrigues de Miranda에 의해 처음으로 기술된 담자균성 효모로 전분을 가수분해할 수 있는 amyolytic enzyme system을 가지고 있으나, 포도당 발효능이나 알코올 내성이 낮은 것으로 알려져 있다(De Mot 등, 1985).

전분 분해능을 알코올 발효성 균주에 도입시키는 개발 방안으로 유전자 재조합이나 원형질체 융합 방법이 많이 이용되고 있으나(De Figueroa 등, 1985; Farahnak 등, 1986; Pina 등, 1986; Saracheck 등, 1984; Svoboda, 1980; Wilson 등, 1982) 전자의 경우, cloning vector에 실을 수 있는 gene dosage의 한계,

숙주 세포내에서의 안정성 및 발현성에 있어서 문제점을 안고 있다. 이같은 문제점을 보완할 수 있는 한 방안이 원형질체 융합방법일 것이다. 원형질체 융합 방법에도 융합체의 안정성, 생장속도가 문제되기는 하나, 최근 *Saccharomyces diastaticus*의 dextrin 발효능을 *S. cerevisiae*에서 발현시켜 안정된 융합체를 얻은 바 있으며(De Figueroa 등, 1985), 유연관계가 먼 속간 원형질체 융합에 관한 연구 사례도 많아지고 있다(Farahnak 등, 1986; Kim 등, 1985; Pina 등, 1986; Wilson 등, 1982).

본 연구에서는 세포벽 제거 효소인 Novozym 234 (Novo industries, Denmark)와 Zymolase (Seikagaku Kogyo Co., Japan)를 사용하여 *F. capsuligenum*으로부터 제조한 영양 요구성 변이주에 대한 원형질체 형성 및 재생 조건을 검토하고, *F. capsuligenum*의 종내 및 *S. cerevisiae* 간의 속간 융합을 시도하여 약간의 결과를 얻었기에 이에 보고한다.

재료 및 방법

사용균주 및 보관

Filobasidium capsuligenum CBS 4381 (a mating type), CBS 6122-2 (a mating type)과 *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A (a mating type), 262-12-1 (a mating type, *hom3 thr1*) 등을 YM (0.3% Yeast extract, Difco ; 0.3% Malt extract, Difco ; 0.5% Bacto-peptone, Difco ; 1% Glucose ; 2% Bacto-agar, Difco) 평판배지에서 균체가 형성될 때까지 30°C에서 3-4일간 배양한 후, 4°C에서 보관하면서 4주마다 계대 배양하였고, 장기간 보존은 50% glycerol로 -20°C에서 보관하였다.

영양요구성 돌연변이 균주의 제조

Poulter 등(1981), Fink (1970) 그리고 Kakar 등(1983)의 방법에 따라 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG, Sigma), ethylmethane sulfonic acid (EMS, Sigma) 그리고 NaNO_2 와 자외선을 이용하여 영양요구성 돌연변이 균주를 제조하였다.

원형질체 형성 및 재생

원형질체 형성 및 재생은 Bai (1987)의 방법을 약간 수정하여 다음과 같이 실시하였다. Myoinositol (0.5 mg/ml)을 첨가한 50 ml YEYP (1% Yeast extract, Difco ; 2% Bacto-peptone, Difco ; 2% Glucose) 액체배지에서 균을 일정시간 진탕 배양한 후, osmotic stabilizer로 0.6 M KCl이 들어 있는 50 mM phosphate buffer (pH 7.5)에 $1.5-2 \times 10^7$ /ml로 세 포 농도를 조절하고 최종 농도를 2-mercaptoethanol은 100 mM, BSA는 4 mg/ml로 하여 30°C에서 30분간 서서히 교반 (80 strokes min.)하면서 진저리를 하였다. 진저리가 끝나면 Novozym 234 (0.1 mg/ml)와 Zymolase (0.1 mg/ml)를 혼합, 30°C에서 60분 동안 정지 반응시켜 만들어진 원형질체를 1,000×g에서 5분 동안 원심분리하여 수집하고, 이를 0.6 M KCl이 포함된 5 mM phosphate buffer로 만든 2% (v/v) Bacto-agar 매지에 $1.5-2 \times 10^7$ cells를 도말한 다음, 상기 buffer가 포함된 YEYP agar를 덧 부은 뒤, 3-4일간 균체가 형성될 때까지 배양하였다.

원형질체 융합

원형질체 융합은 Bai (1987)의 방법에 따라 영양요구성 돌연변이 균주의 원형질체를 각각 $1-2 \times 10^7$ /ml로 1:1의 상보적 조합을 만들어 35% polyethylene glycol (PEG, MW 4,000, Sigma)과 100 mM CaCl_2 가 들어 있는 5 mM phosphate buffer (pH 6.0)에서 30분간, 30°C에서 유지시켜 융합을 유도하였다.

융합체의 분석

융합체의 분석은 DNA 정량 (Stewart, 1975), 핵 염색 (Fournier 등, 1977), UV 조사에 따른 생존력 비교 (Olaiya와 Sogin, 1979), 세포 제적 측정과 형질 분리

분석 (Wilson 등, 1982)으로 확인하였다.

Amylolytic enzyme 조제 및 활성 측정

α -amylase의 활성은 전분으로부터 유리된 환원당량을 Somogyi (1952)와 Nelson (1944) 방법으로, glucoamylase 활성은 전분으로부터 유리된 포도당량을 glucose-oxidase 방법 (Sigma technical bulletin No. 510)으로 측정하였다. 이 때, 반응액은 50 mM phosphate buffer (α -amylase, pH 7.0 ; glucoamylase, pH 6.0)에 0.5% 전분을 녹인 기질 용액 5 ml와 조효소액 1 ml를 혼합하여 50°C에서 10분간 배양한 후, 10분간 끓여서 반응을 정지시켰다. α -amylase 1 unit는 1분 동안에 전분으로부터 1 μ M의 maltose를, glucoamylase 1 unit는 1 μ M의 포도당을 유리해내는 효소의 양으로 정의하였다.

결과 및 고찰

돌연변이 균주의 제조 및 역돌연변이율

융합에 필요한 상보적 영양요구성 균주를 제조하기 위해 몇 가지 돌연변이 원을 이용하여 *Filobasidium capsuligenum* CBS 4381과 CBS 6122-2로부터 돌연변이 균주를 각각 제조하였다 (Table 1). *F. capsuligenum* strains으로부터 7개의 영양요구성 돌연변이주를 얻었는데, 이들 중 CBS 4381의 cysteine histidine (*cyshis*) 요구성 변이주와 CBS 6122-2의 adenine (*ade*), methionine (*met*) 그리고 methionine tryptophan (*met trp*) 요구성 변이주들이 생장유도 양호하고, 역돌연변이율이 $1.3 \times 10^{-6} - 2.1 \times 10^{-6}$ 이어서 원형질체 융합과 유전적 연구 분석에 적합하였다.

원형질체 형성 및 재생

*F. capsuligenum*은 *Schizosaccharomyces pombe* (Dickinson 등, 1982)나 *Cryptococcus neoformans* (Rhodes 등, 1985) 등과 같이 세포벽 구성성분에 β -1,3-glucan 이외에 상당당의 α -1,3-glucan을 가지고 있어 (Bastide 등, 1979), β -1,3-glucanase 활성만을 가진 glusulase나 Zymolase 보다는 α -1,3-glucanase 활성도 있는 Novozym 234가 *F. capsuligenum*의 세포벽 제거에 보다 효과가 있을 것으로 생각되어 Novozym 234 (0.2 mg/ml)를 사용하여 *F. capsuligenum*의 영양요구성 변이주들로부터 원형질체 형성을 유도하였다. 그 결과, 원형질체 형성율 59.4-78%이었고, 재생율은 0.2-1.4%로 낮았으나 Novozym 234 (0.2 mg/ml)와 Zymolase 20T (0.1 mg/ml)를 혼합하였을 때 원형질체 형성율은 차이가 없었지만 재생율은 1.1-3.9%로 2.8-5.5배의 증진을 보여주었다 (Table 2). 그리고 BSA와 myoinositol을 처리했을 때는 7.2-13.7%로 3.1-6.5배의 증가가 있었다. 이와 비슷한 결과를 Bai (1987)는 *C. pseudotropicalis*의 원형질체 형성 및 재생에서 얻은 바 있다.

원형질체 융합

Table 1. Spontaneous reversion frequency of auxotrophic mutants from *F. capsuligenum* and *S. cerevisiae*

Species/strains	Mutagen	Reversion frequency	Source or Reference
<i>F. capsuligenum</i>			
CBS 4381			
<i>cys his STA</i> ⁻	NaNO ₂ , UV	2.1 × 10 ⁻⁹	This work
<i>met his STA</i> ⁻	NaNO ₂ , UV	2.6 × 10 ⁻⁹	This work
<i>val his STA</i> ⁻	NaNO ₂ , UV	1.7 × 10 ⁻⁹	This work
<i>ade his</i>	EMS	5.3 × 10 ⁻⁹	This work
CBS 6122-2			
<i>ade</i>	NTG	1.3 × 10 ⁻⁸	This work
<i>met</i>	NTG	3.2 × 10 ⁻⁸	This work
<i>met trp</i>	NTG	1.1 × 10 ⁻⁹	This work
<i>S. cerevisiae</i>			
X2180-1A			
<i>ade thr</i>	EMS, UV	3.5 × 10 ⁻⁹	W.K. Choi (1988)
262-12-1			
<i>hom3 thr1</i>	—	1.5 × 10 ⁻⁹	Yeast genetic stock, California Univ., USA

Table 2. The comparison of Novozym 234 with Novozym 234 + Zymolase on the protoplast formation and regeneration from *F. capsuligenum* auxotrophs

Strains and the mutants	Novozym 234		Novozym 234 + Zymolase	
	formation(%)	regeneration(%)	formation	regeneration
CBS 4381				
<i>cys his</i>	95.8(71.2) ^a	0.7(0.2)	91.3(65.9)	7.2(1.1)
CBS 6122-2				
<i>ade</i>	76.2(59.4)	3.8(1.1)	74.2(64.3)	13.7(3.3)
<i>met</i>	91.8(78.0)	4.1(1.4)	84.2(71.8)	12.2(3.9)
<i>met trp</i>	80.3(69.1)	3.8(1.2)	73.5(67.1)	11.2(3.7)

^aIndicates the frequency of protoplast formation and regeneration from cells not treated with BSA (4 mg/ml) and myoinositol (0.5 mg/ml).

The concentration of Novozym 234 and Zymolase, and the other procedures were described in the text.

Values are the average of three experiments.

F. capsuligenum 균주들간의 종내 및 *S. cerevisiae* X2180-1A나 262-12-1와의 속간 융합율을 조사한 결과, Table 3에서 보여준 바와 같이 종내 융합율은 2.9×10^{-3} (*ade + met trp*)과 8.5×10^{-3} (*ade + met*)이었고, 속간 융합율은 8.8×10^{-6} (*cys his + hom3 thr1*)와 9.5×10^{-4} (*cys his + ade thr*)으로 BSA와 myoinositol을 처리하지 않은 대조구에 비해 각각 종내에서는 1.9-3.6배, 속간에서는 1.4-1.8배의 증진을 보여주었다.

이같은 종내 융합율은 *S. lipolytica*의 5.0×10^{-4} - 1.5×10^{-3} (Stahl, 1978), *C. pseudotropicalis*의 7.0×10^{-4} -

1.5×10^{-3} (Bai, 1987)과는 비슷한 결과를 보였고 *Schw. alluvius*의 1.5×10^{-6} (Wilson 등, 1982), *C. tropicalis*의 3.5×10^{-5} (Fournier 등, 1977) 보다는 높은 경향을 나타냈다. 속간 융합율은 *Zygosaccharomyces fermentati*와 *S. cerevisiae*에서의 융합율 9.6×10^{-6} - 1.8×10^{-4} (Pina 등, 1986), *S. cerevisiae*와 *C. pseudotropicalis*에서의 1.0×10^{-5} (Choi 등, 1988)과 유사한 결과를 나타냈고 *Kluyveromyces fragilis*와 *S. cerevisiae*에서의 융합율 7.0×10^{-3} (Parahnak 등, 1986)에 비해서는 낮았다. 그리고 속간 융합에서 흔히 나타나는 abortive co-

Table 3. Fusion frequency between complementary auxotrophs

Phenotype	Fusion frequency
Intraspecific fusion	
<i>ade + met</i>	8.5×10^{-3} (4.5×10^{-3}) ^a
<i>ade + met trp</i>	2.9×10^{-3} (8.1×10^{-4})
Intergeneric fusion	
<i>cys his + ade thr</i>	9.5×10^{-4} (6.7×10^{-4})
<i>cys his + hom3 thr1</i>	8.8×10^{-6} (4.9×10^{-6})

^aIndicates the fusion frequency of protoplast formed from cells not treated with BSA and myoinositol.

Values are the average of three experiments.

lony들이 많이 나타나 Pina 등 (1986)이 보고한 바와 같이 세포질 융합이 일어났더라도 핵 융합이 일어나지 않았거나, 핵 융합이 일어났어도 2-3세대 후 바로 형질 분리됨으로서 최소 배지에서 생장이 정지된 것 같다.

융합체의 특성

*F. capsuligenum*의 영양요구성 돌연변이 균주 중, 성장율과 원형질체 재생율이 좋은 *ade*와 *met* 그리고 *met trp* 요구성 균주를 가지고 종내융합을 실시하여 선택된 총 317개 융합체들 중 최대 성장율이 양친의 그것들 (0.38-0.51 hr)과 유사한 융합체 F25와 F35 (0.40-0.49 hr)의 교잡성에 관하여 조사하였다.

Table 4에서 보여준 바와 같이 세포당 DNA 양 (fg/cell)을 측정해 본 결과, F25와 F35의 경우, 각각 71.0과 72.0 fg/cell로 양친형의 35.3-36.0 fg/cell에 건

주어 보았을 때 약 2배 증가되었고, 체적도 2배 이상으로 증가되었다. 자외선 조사에 대한 융합체의 생존력이 양친형의 그것에 비해 높은 경향을 보여주었는데 (Fig.1의 A), 이는 Olayia와 Sogin (1979)이 지적한 바와 같이 융합체들이 diploid임을 암시해 주고 있다. 이와 유사한 결과를 Bai (1987)는 *C. pseudotropicalis*에서 보고한 바 있다. 또한 핵 염색 결과, 융합체의 핵이 양친의 그것에 비하여 더 크고 한 개의 핵임을 알 수 있었다 (Plate 1). 이들 융합체들에 대한 보다 확실한 융합 상태를 검토하기 위하여 형질 분리분석을 실시하였던 바 (Table 5), F25에 대한 자연 형질분리 분석으로 3,711 군체에 대한 분리 빈도가 2.7×10^{-4} 이었고, p-fluorophenylalanine (100 μ g/ml)을 처리한 유도 형질 분리 분석의 경우 총 2,954 군체에 대한 분리 빈도는 6.8×10^{-4} 이었다. 이 때, 군체의 크기는 균일하였고, sector 형성도 거의 없었으며, 양친형은 물론 교잡형인 *ade trp* 요구성 분리형이 분리되어 이들의 DNA 양을 정량해 본 결과, 70.5-72.0 fg/cell로 diploid type임을 알 수 있었는데, 이는 핵 융합 후 상동 염색체간의 교차나 염색체의 재분배에 기인된 것 같다.

다음으로 F25, F35와 이의 양친형에 대한 α -amylase와 glucoamylase 활성을 비교하였다 (Table 6). α -amylase는 양친형에서 7.7-8.5 nU/cell 이었고, F25와 F35에서는 각각 16.2 nU/cell, 14.8 nU/cell로 1.7-2.1배, glucoamylase는 양친형에서 3.1-3.3 nU/cell, 융합체에서 5.3-6.1 nU/cell로 1.6-2.0배의 증가를 보여줌으로서 gene dosage 증가에 의한 균종 개발에 원형질체 융합 방법이 활용될 수 있을 것으로 보여진다.

다음으로 *F. capsuligenum* (*cys his*)과 *S. cerevisiae* (*ade thr* 혹은 *hom3 thr1*) 사이에서 얻은 4개의 융합

Table 4. Cell size, volume and DNA contents of *F. capsuligenum* parental strains and intraspecific fusion hybrids

Strains	Mean length (μ m)	Mean width (μ m)	Mean volume (μ m ³)	DNA / cell (fg)	Ploidy (n) ^a
<i>F. capsuligenum</i>					
CBS 6122-2					
wild type	7.0 \pm 0.4	4.5 \pm 0.2	74.2 \pm 9.8	35.3 \pm 1.2	1.0
<i>ade</i>	6.9 \pm 0.5	4.7 \pm 0.5	75.3 \pm 6.1	35.5 \pm 0.9	1.0
<i>met</i>	7.5 \pm 0.7	6.3 \pm 0.4	152.9 \pm 12.8	36.0 \pm 0.6	1.0
<i>met trp</i>	7.7 \pm 0.6	6.2 \pm 0.4	155.0 \pm 10.1	35.8 \pm 0.8	1.0
Fusion hybrids;					
<i>ade + met trp</i>					
F25	10.8 \pm 0.5	8.3 \pm 0.6	380.0 \pm 37.1	71.0 \pm 0.7	2.0
<i>ade + met</i>					
F35	10.5 \pm 0.3	8.3 \pm 0.2	373.0 \pm 28.7	72.0 \pm 0.8	2.0

^aFor F25, haploid(n) value based on average of parents *ade + met trp* (35.7 \pm 0.9 fg/cell).

For F35, haploid(n) value based on average of parents *ade + met* (35.8 \pm 0.8 fg/cell).

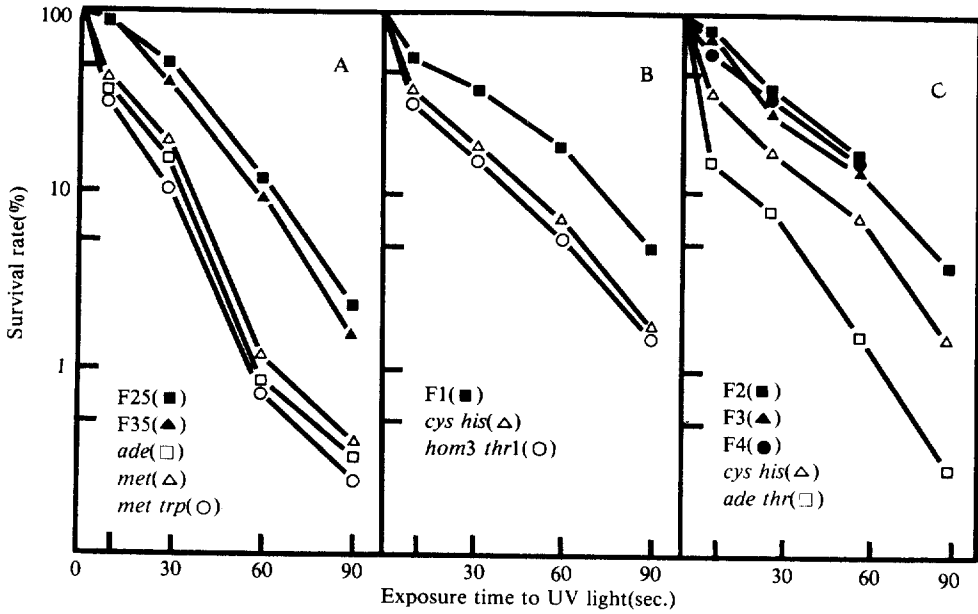


Fig. 1. Survival rate of intraspecific(A) and intergeneric (B and C) fusion hybrids as compared with parental strains after exposure to UV light.

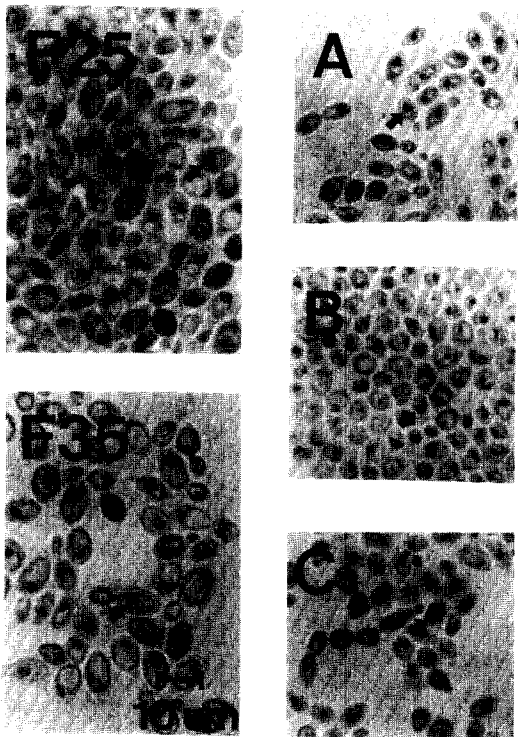


Plate 1. Photomicroscopy of nuclei of intraspecific fusion hybrids and their parents. Arrows indicate nucleus. F25: A(*met trp*) + B(*ade*). F35: A + C(*met*).

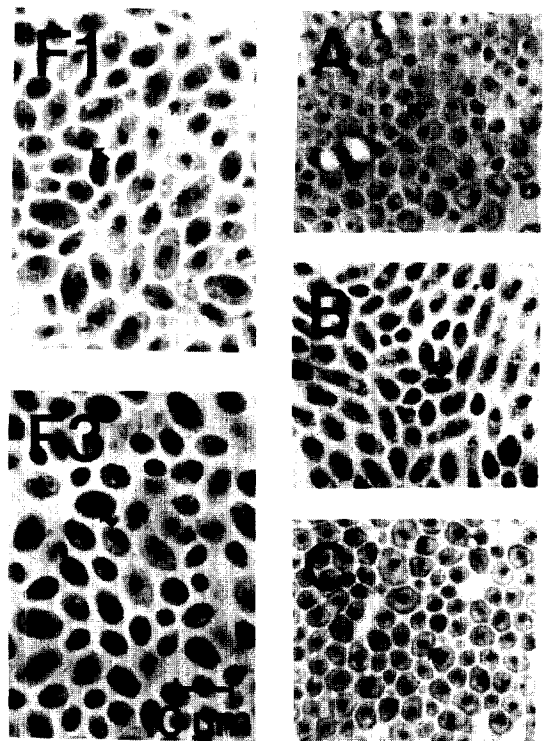


Plate 2. Photomicroscopy of nuclei of intergeneric fusion hybrids and their parents. Arrows indicate nucleus. F1: A(*S. cerevisiae, hom3 thr1*) + B(*F. capsuligenum, cys his*). F3: B + C(*S. cerevisiae, ade thr*).

Table 5. Mitotic segregation analysis of a intraspecific fusion hybrid

	F25 (<i>ade</i> + <i>met trp</i>)	
	SMS ^a	IMS ^b
Total colonies screened	3711	2954
Total auxotrophic segregants	0	2
Frequency of segregation	2.7×10^{-4}	6.8×10^{-4}
Phenotype of segregants		
Parent: <i>ade</i>	0	1
Recombinant: <i>ade trp</i>	0	1

^aSpontaneous mitotic segregation.

^bInduced mitotic segregation.

Table 6. The comparison of amylase activity of intra-specific fusion hybrids and their parents

Strains	α-amylase		Glucoamylase	
	U/ml	nU/cell	U/ml	nU/cell
<i>F. capsuligenum</i>				
CBS 6122-2;				
wild type	3.9 ± 0.4	8.2 ± 0.9	1.5 ± 0.2	3.7 ± 0.3
<i>ade</i>	3.7 ± 0.3	8.2 ± 0.5	1.4 ± 0.3	3.1 ± 0.4
<i>met</i>	0.7 ± 0.1	8.5 ± 0.5	0.3 ± 0.0	3.3 ± 0.3
<i>met trp</i>	2.5 ± 0.3	7.7 ± 0.4	1.0 ± 0.1	3.1 ± 0.1
Fusion hybrids;				
<i>ade</i> + <i>met trp</i>				
F25	2.8 ± 0.2	16.2 ± 0.8	1.1 ± 0.2	6.1 ± 0.4
<i>ade</i> + <i>met</i>				
F35	2.4 ± 0.2	14.8 ± 0.9	0.9 ± 0.9	5.3 ± 0.5

The preparation and assay of enzyme was described in the text.

세포질 융합에 뒤이어 핵 융합도 일어난 것으로 추정되었으며 (Plate 2), 자외선 조사에 의한 양친형과 융합체의 생존력은 조사하였던 바, diploid라고 추정되는

체에 대한 융합 상태를 알아보기 위하여 체적 및 DNA 함량 측정, 그리고 핵 염색 등을 실시하였다. F1의 경우, 세포당 DNA 양이 양친인 *hom3 thr1* (21.2 ± 1.1 fg/cell) 과 *cys his* (35.5 ± 1.3 fg/cell)의 DNA 양을 합한 56.7 ± 1.2 fg/cell에 근사치인 57.4 ± 1.2 fg/cell 이었고 체적도 2배 이상으로 나머지 융합체들도 유사한 경향을 보여 주었다 (Table 7). 핵 염색의 결과, 융합체 세포들의 핵이 하나이고 양친의 그것에 비해 큰 것으로 보아

Table 7. Cell size, volume and DNA contents of *F. capsuligenum*, *S. cerevisiae* parental strains and intergeneric fusion hybrids

Strains	Mean length (μm)	Mean width (μm)	Mean volume (μm ³)	DNA / cell (fg)	Ploidy (n) ^a
<i>F. capsuligenum</i>					
CBS 4381					
wild type	5.9 ± 0.3	5.4 ± 0.3	89.4 ± 12.1	33.9 ± 1.1	1.0
<i>cys his</i>	7.8 ± 0.4	4.6 ± 0.2	90.0 ± 8.7	35.5 ± 1.3	1.0
X2180-1A					
wild type	5.3 ± 0.2	4.5 ± 0.2	57.9 ± 10.4	22.2 ± 0.5	1.0
<i>ade thr</i>	4.9 ± 0.1	4.0 ± 0.3	41.8 ± 6.5	21.5 ± 0.5	1.0
<i>S. cerevisiae</i>					
262-12-1					
<i>hom3 thr1</i>	4.7 ± 0.2	4.2 ± 0.2	44.4 ± 6.4	21.2 ± 1.1	1.0
Fusion hybrids;					
<i>cys his</i> + <i>hom3 thr1</i>					
F1	10.2 ± 0.4	6.9 ± 0.2	251.4 ± 16.5	57.4 ± 1.2	2.0
<i>cys his</i> + <i>ade thr</i>					
F2	10.5 ± 0.5	6.6 ± 0.3	244.3 ± 29.7	58.5 ± 0.8	2.1
F3	10.0 ± 0.1	7.4 ± 0.1	297.5 ± 24.3	56.8 ± 0.8	2.0
F4	10.9 ± 0.4	7.0 ± 0.3	274.1 ± 35.9	58.0 ± 1.8	2.0

^aFor F1, haploid(n) value based on average of parents *cys his* + *hom3 thr1* (28.4 ± 1.2 fg/cell).

For F2, 3 and 4, haploid(n) value based on average of parents *cys his* + *ade thr* (28.5 ± 0.9 fg/cell).

융합체들의 생존력이 haploid type인 양친형들 보다 높은 경향을 보여 주어 이들의 ploidy가 증가되었음을 알 수 있었다(Fig.1의 B와 C).

융합체의 생리적 특성으로 ethanol 내성을 조사한 결과, 생장배지에 ethanol 농도가 5.0% 되게 첨가하면 잔존 생장율이 *F. capsuligenum*의 경우 7.7~15.9%이고, *S. cerevisiae*의 경우에는 62.3~79.3% 이었는데 이들의 융합체인 F1-F4의 경우엔 57.3~73.9%로 양친형 중 *S. cerevisiae*와 유사한 ethanol 내성을 보여 주었다. 또한 F1은 고농도의 포도당(20%)에서도 최대 생장율 0.56 hr 로 *F. capsuligenum* (*cys his*)의 0.45 보다는 *S. cerevisiae* (*hom3 thr1*)의 0.63 hr 에 유사한 값을 보여 주었다. *F. capsuligenum*이 *S. cerevisiae*에 비해 고농도의 포도당에서 생장율이 저조한 것을 감

안할 때 F1은 *S. cerevisiae*의 특성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

이들 융합체들의 안정성을 조사하기 위하여 형질 분리 분석을 실시하였다. 약 15개월 동안 계대 배양하여 보존한 융합체를 이용하여 형질 분리 분석을 시도한 결과, 자연 형질 분리 분석으로 7,000-9,000 균체를, 유도 형질 분리 분석으로 4,000-10,000 균체를 조사하였으나 분리형을 찾아볼 수 없었다. 이는 핵량이 상이한 두 양친의 genome이 하나의 핵내에 존재하면서 비교적 안정된 핵 융합이 일어났음을 시사해 주고 있다. 현재, 전분 유전자가 손상되지 않은 영양요구성 균주와의 속간 융합체에 대한 연구는 진행중에 있으며, 본 실험에서 얻어진 전분 유전자 상실 균주는 추후 유전자 cloning에서 이용될 수 있을 것이다.

적 요

전분 분해능이 있는 담자균성 효모, *Filobasidium capsuligenum*의 종내 및 *Saccharomyces cerevisiae*와의 속간 원형질체 융합을 시도하였다.

F. capsuligenum CBS 6122-2의 종내 융합율은 각각 2.9×10^{-3} (*ade + met trp*), 8.5×10^{-3} (*ade + met*)이고, *F. capsuligenum* CBS 4381 (*cys his*)과 *S. cerevisiae* 262-12-1 (*hom3 thr1*), X2180-1A (*ade thr*)와의 속간 융합율은 각각 8.8×10^{-6} , 9.5×10^{-6} 이었다. DNA 지량, 핵 염색, 자외선 조사에 따른 생존력 비교 그리고 형질 분리 분석 결과 등을 통해 종내와 속간에서 핵 융합이 일어난 것을 알 수 있었다. 또한, 종내 융합체의 경우 세포당 α -amylase와 glucoamylase 생성능이 양친형에 비해 1.6-2.1배의 증진 효과가 있었다.

사 사

본 연구는 문교부 자유공모과제 학술연구조성비(1987년도)에 의하여 이루어졌으며 이에 깊은 감사료를 표시하는 바입니다.

참고문헌

- Bai, S., 1987. Protoplast fusion in the yeast, *Candida pseudotropicalis* CBS 607. Ph.D. thesis. Chonnam National Univ., Korea.
- Bastide, S.M., E.L. Hadibi and M. Bastide, 1979. Taxonomic significance of yeast spheroplast release after enzymatic treatment of intact cells. *J. Gen. Microbiol.* **113**, 147-153.
- Choi, W.K., S.B. Chun, Y.K. Lee, S. Bai, J.J. Lee and H. Lee, 1988. Protoplast fusion of lactose assimilating yeasts. *Kor. J. Microbiol.* **26**, 188-196.
- De Figueroa, L.I., M.A. de Cabada and M.R. de Van Broock, 1985. Alcoholic fermentation of starch containing media using yeast protoplast fusion products. *Biotechno. Lett.* **7**, 837-840.
- De Mot, R., K. Van Dijck, A. Donkers and H. Verachtert, 1985. Potentialities and limitations of direct alcoholic fermentation of starch material with amyolytic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 222-226.
- Dickinson, D.P. and I. Isenberg, 1982. Preparation of spheroplast of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 651-654.
- Farahnak, F., T. Seki, D.Y. Ryu and D. Ogyrdziak, 1986. Construction of lactose-assimilating and high ethanol producing yeasts by protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 362-367.
- Fink, G.R., 1970. The biochemical genetics of yeast. In: *Methods in Enzymology*. Tabor, H. and C. W. Tabor(ed.). Academic Press, New York, USA. Vol. 17A. p.59-78.
- Fournier, P., A. Provost, C. Bourguignon and H. Helslot, 1977. Recombination after protoplast fusion in the yeast *Candida tropicalis*. *Arch. Microbiol.* **115**, 143-149.
- Kakar, S.N., R.M. Partridge and P.T. Magee, 1983. A genetic analysis of *Candida albicans*: Isolation of a wide variety of auxotrophs and demonstration of linkage and complementation. *Genetics.* **104**, 241-255.
- Kim, Y. H. and J. H. Seu, 1985. Conditions for intergeneric protoplast fusion of yeast. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**, 383-389.
- Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**, 375-380.
- Olaiya, A. F. and S. J. Sogin, 1979. Ploidy determination of *Candida albicans*. *J. bacteriol.* **140**, 1043-1049.

14. **Pina, A., I.L. Calderon and T. Benitz**, 1986. Intergeneric hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces fermentati* obtained by protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 995-1003.
15. **Poulter, R., K. Jeffery, M. J. Hubbard, M. G. Shepherd and P. A. Sullivan**, 1981. Parasexual genetic analysis of *Candida albicans* by spheroplast fusion. *J. Bacteriol.* **146**, 833-840.
16. **Rhodes, J.C. and K.J. Kwon-Chong**, 1985. Production and regeneration of protoplasts from *Cryptococcus Sabouraudia*: *J. Med. Veter. Mycol.* **23**, 77-80.
17. **Rodrigues de Miranda, L.**, 1972. *Filobasidium capsuligenum* nov. comb. Antonie van Leeuwenhoek. *J. Microbiol. Serol.* **38**, 91-99.
18. **Sarachek, A. and D.A. Weber**, 1984. Temperature-dependent internuclear transfer of genetic material in heterocaryons of *Candida albicans*. *Curr. Genet.* **8**, 181-187.
19. **Somogyi, M.**, 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23.
20. **Stahl, U.**, 1978. Zygote formation and recombination between like mating types in the yeast *Saccharomycopsis lipolytica* by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* **160**, 111-113.
21. **Stewart, P.R.**, 1975. Analytical methods for yeast. In: *Methods in cell biology*. Prescott, D.M.(ed.). Academic Press, New York, USA. Vol. 12, p. 122.
22. **Svoboda, A.**, 1980. Intergeneric fusion of yeast protoplast: *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. In: *Advances in Protoplast Research*. Farkas, G.L.(ed.). Pergamon Press, Oxford, UK. p. 119-124.
23. **Wilson, J.J., G.G. Khachatourians and W. M. Ingle-dew**, 1982. Protoplast fusion in the yeast *Schwannomyces aluvius*. *Mol. Gen. Genet.* **185**, 95-100.

(Received March 23, 1990)

(Accepted May 15, 1990)