

## 핵전이를 이용한 *Saccharomycopsis* 속과 *Saccharomyces* 속간의 잡종형성

양영기\* · 임채영 · 강희경 · 문명님 · 이영하<sup>1</sup>

조선대학교 자연과학대학 생물과학부, 충남대학교 자연과학대학 미생물학과

### Intergeneric Hybrid Constructed by Nuclear Transfer of *Saccharomycopsis* into *Saccharomyces*

Young-Ki Yang\*, Chae-Young Lim, Hee-Kyoung Kang,  
Myeng-Nim Moon and Young-Ha Rhee<sup>1</sup>

Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences,  
Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

<sup>1</sup>Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Chungnam  
National University, Daejeon 302-764, Korea

**ABSTRACT:** Intergeneric hybrids between *Saccharomycopsis fiburigera* KCTC 7393 and *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7049 (*tyr*-, *ura*-) were obtained by nuclear transfer technique. Nuclei isolated from the wild type *S. fiburigera* strain were transferred into auxotrophic *S. cerevisiae* mutants and new strains showing an increased starch degrading capability were selected. Maximum production of protoplasts was obtained from the treatment with 0.1% Novozym 234 at 30°C for 90 min, and most effective osmotic stabilizer for the isolation of protoplasts was 0.6 M KCl at pH 5.8. The frequency of protoplast regeneration was 14.64% under the conditions. Genetic stability, conidial size, DNA content, and nuclear stain suggested that the fusants were aneuploidy. The specific activity of  $\alpha$ -amylase was observed to increase about 1.2~1.9 folds.

**KEYWORDS:** *Saccharomycopsis fiburigera*, *Sacchromyces cerevisiae*, Nuclear transfer,  $\alpha$ -amylase

Amylase는 전분질의 고분자 탄수화물을 분해하는데 관여하는 효소를 총칭하며 가수분해 기작이나 반응산물에 따라  $\alpha$ -amylase(EC 3.2.1.1)  $\beta$ -amylase(EC 3.2.1.2), glucoamylase(EC 3.2.1.3)  $\alpha$ -glucosidase(EC 3.2.1.20), pullulanase(EC 3.2.1.41), isoamylase(EC 3.2.1.68) 등으로 명명되고(1986; Schomburg and Salzmann, 1991) 기능적 측면에서 당화형 효소와 액화형 효소로 나누어 지기도 한다(Yammamoto, 1988). 특히,  $\alpha$ -amylase는 전분이나 글리코겐의 주성분인 amylose와 amylopectin의  $\alpha$ -1,4 glycoside 결합을 무작위적으로 분해하는 endo형의 가수분해 효소로서 여러 가지 형태의 소당류로 분해하는 전분액화효소이며 maltose 생성율은 50% 정도이다(1986). 이러한  $\alpha$ -amylase는 열안정성에 따라 액화형 thermostable  $\alpha$ -amylase와 당화형 thermostable  $\alpha$ -amylase로 구분할 수 있다. 대규모로 사용된 최초의 액화형  $\alpha$ -amylase는 *Bacillus amyloliquefaciens*에서 생산된 것이었으며 더욱 열 안정성이 높은 *B. licheniformis*가 산업적으로 도입되었다(Hernandez and Pilt, 1975). 당화형  $\alpha$ -amylase의 특징은 액화과정에 사용될 수 있을 만큼 열에 강하지 못한 반면에 thermostable  $\alpha$ -amylase에서 얻을 수 없는 저분자량의 최종산물을 생산할 수 있으므로 주로 고농도

의 maltose 시럽 제조분야에서 이용된다(Barfoed, 1976). 한편, 미생물의 우수균주 개발 방법은 종래에는 돌연변이 유발이나 교잡을 통하여 이루어져 왔으나 상대적으로 효율이 낮고 특정 산물의 생산증대에 한계가 있음이 인식되어 보다 분자적인 차원에서의 접근 방법이 필요하게 됨에 따라 원형질체 융합과 핵전이 및 유전자 재조합 기술이 이용되고 있다. 원형질체 융합 기술은 polyethylen glycol(PEG) 사용에 의하여 식물이 원형질체 융합이 높은 빈도로 이루어짐을 보고된 후, 몇몇 사상균류들의 종내, 종간의 원형질체 융합이 이루어 졌다(Lee et al., 1989). 이를 통하여 원형질체 융합기술이 유전물질 전달을 위한 유용한 방법임이 밝혀졌고, 또한 균류에 있어서 생활사가 밝혀지지 않은 종의 유전학적 분석이 가능하고 산업적으로 유용한 우수균주의 육종법으로 이용될 수 있음이 인정되었다(Ferencyz, 1983). 그럼에도 불구하고 원형질체 융합기술은 잡종선발에 있어 융합에 사용된 모균주가 서로 상이한 유전자 marker를 가진 변이주를 이용해야 하는데 야생형 균주는 특정유전자 표지를 갖고 있지않아 융합에 이용하는 방법이 없고 이종간에는 융합이 어렵거나 설사 융합이 이뤄졌다 할지라도 생육기간이 지극히 한정되는 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 이용되고 있는 핵전이는 Ferencyz와 Pesti(1982)에 의하여 최초로 시도되었는데, 이 방법은 핵공여체

\*Corresponding author <E-mail: ygyang@mail.chosun.ac.kr>

균주에 영양요구성 돌연변이와 같은 유전자 표지를 도입하는 번거로움과 유용한 형질이 돌연변이에 의해 저해되는 위험성을 극복할수 있는 기술이다. 따라서, 본 연구에서는 핵전이를 이용하여  $\alpha$ -amylase 생산균인 *Saccharomycopsis* 속과 영양요구성 변이주인 *Sccharomyces* 속의 잡종을 유도한 후, 원형질체 형성과 재생조건 및 재생양상을 관찰하고, 잡종의 분석과  $\alpha$ -amylase 활성을 측정하여  $\alpha$ -amylase의 생산균주 선발을 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 시약

본실험에 사용된 균주인 *S. fiburigera*, *S. cerevisiae*(*tyr-, ura-*)는 YM(Difco) 사면 배지에 각각 접종하여 30°C에서 4일간 계대배양한 후 4°C에 보관하면서 사용하였다. 완전배지로는 YM배지를 사용하였으며, colony 크기를 제한하기 위하여 0.2%의 oxgall을 첨가하였다.

최소배지로는 dextrose 10 g, minimal salt stock solution 20 ml/l, 균주에 따른 영양 요구물, 그리고 colony의 크기를 제한하기 위하여 sodium desoxycholate(SDC) 0.08%를 혼합하여 제조하였다.

### 원형질체의 형성 및 재생

완전 액체 배지에  $5 \times 10^5$  cells/ml 되도록 균을 접종하여 30°C에서 18시간 배양하여 집균한 다음 1% Novozym 234로 처리하여 30°C에서 2시간 반응시키면서 hemocytometer로 원형질체 생성량을 산정하였다. 원형질체의 재생을 위해서 30%(w/v) sucrose 용액을 매체로 원심분리(400 × g, 30 min)하여 상층액을 모은 뒤 농축시키고 세척하였다. 이 순수분리한 원형질체를 삼투안정제로 적절히 희석하여 원형질체 재생용 배지에 도말하고 배양한 다음 Lee 등의 방법(Lee et al., 1989)에 따라 재생을 산출하였다.

### 핵의 순수분리 및 핵전이에 의한 형질전환

야생형 균주로부터 핵을 추출하기 위한 방법으로서 Ferenczy와 Pesti(1982)의 방법을 사용하였다. 즉 원형질체를 형성시킨 후, 2 ml의 SMC I(0.3M sucrose, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>)를 첨가하여 homogenizer로 원형질체를 깨뜨리고, 이 파쇄액을 원심분리 하였다. 분리된 pellet에 0.6 M sucrose가 첨가된 SMC II(0.6 M sucrose, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>) 2 ml를 가하여 재현탁시킨 후 sucrose discontinuous gradient에 시료 0.36 ml를 가하고 초원심 분리(Beckman, 9,000 × g, 60 min)하였다. 이렇게 하여 얻은 nuclear pellet을 1 ml의 0.6 M KCl 용액에 재현탁시켜 4°C에 보관하고 이를 순수 분리된 핵으로 사용하였다. 형질전환 시키고자하는 야생형인 *S. fibuligera*의 핵과 영양요구성 변이주인 *S. cerevisiae*의 원형질체를 각각 1 ml씩 혼합하여 원심분리하였다. 이와 같은 방법으로 얻어진 pellet에 30% PEG 용액(MW 6,000, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 M

glycine, pH 5.8) 1 ml를 조심스럽게 혼합한 다음 30°C에서 10분간 반응시킨 후 0.06 M KCl로 세척하여 환원용 완전배지와 환원용 최소배지 및 완전, 최소배지에 각각 도말하여 30°C에서 5~10일간 배양하였다.

### 유전적 안전성

환원용 최소배지에서 얻어진 이형 접합체의 균체를 완전배지에 접종하여 30°C에서 48시간 배양한 후 saline 용액에 현탁( $5 \times 10^7$  cells/ml) 희석하여 80~100 colonies/petri dish 정도 되게 완전배지에 도말하여 배양하였다. 완전배지상에 나타난 colony를 다시 완전배지와 최소배지에 replica하여 완전배지상의 colony에 대한 최소배지에 나타난 colony비로써 이들의 유전 안정성을 검토하였다.

### 세포 체적 측정, 핵염색 및 DNA 함량의 측정

Micrometer를 사용하여 *S. fiburigera*의 야생형 균주와 선발된 영양 요구성 변이주 및 형질전환체의 세포 체적을 측정하였으며, 모균주와 형질전환체의 핵을 염색하여 관찰하였다. 또한 형질전환체의 순수분리한 후 Giles와 Myers의 diphenylamine test 법(Giles and Myers, 1965)에 따라 DNA의 함량을 측정하였다. 표준 DNA 시료로는 salmon testis에 추출한 Na-DNA type III(Sigma)를 5 mM NaOH에 순차적으로 용해한 후 10% perchloric acid로 추출하여 사용하였다.

### 세포의 조효소 용액의 제조 및 활성도의 측정

모균주와 형질전환체의 세포를  $1.0 \times 10^7$  cells/ml이 되도록 완전 액체배지에 접종하여 대수기 말까지 성장시킨후 균체를 원심분리로 수회하여 2% 가용성 전분과 영양 요구물이 첨가된 최소배지에 접종하여 30°C에서 48시간 배양하고 원심분리(5,000 × g, 15 min)하여 얻은 상층액을 세포외 조효소 용액으로 사용하였다.  $\alpha$ -amylase의 효소 활성도를 측정하기위한 기질로는 1% 가용성 전분을 사용하여 amylase helix에 영향을 주는 iodine을 사용하는 방법(Hernandez and Pilt, 1975)을 이용하였다.

즉, 기질인 1% 가용성 전분 1 ml와 0.5 M citric acid buffer(pH 5.0) 1 ml를 혼합한 후 40°C에서 10분간 방치한 다음 효소용액 1 ml를 반응시험관에 첨가하여 30분간 반응시키고 나서 1 N HCl 1 ml를 넣어 반응을 정지시켰다. 반응액 0.1 ml를 0.2% iodine-0.4% KI 혼합액 1 ml와 증류수 2 ml를 넣어 잘 혼합한 후 실온에서 15분간 방치하였다. 그 용액을 spectrophotometer(Kontron Co.)를 사용하여 파장 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit는 최적조건에서 1분 동안 가용성 전분으로부터 glucose 1.0 mg을 생산하는 효소의 양으로 결정하였으며 단백질 정량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준 시료로 사용하여 Lowry 방법(Lowry et al., 1951)으로 측정하였다.

### 세포의 수용성 단백질의 양상분석

모균주와 형질전환체의 세포의 수용성 단백질의 양상을

알아보기 위해 Laemmli 방법(Laemmli, 1970)에 의하여 SDS-PAGE를 시행하였다. 즉, 전기영동 gel로는 10% polyacrylamide gel을 사용하였고, stacking gel에서 100 V, seperating gel 150 V로 전개하고 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한후 탈색시켜 band를 관찰하였다. 분자량 측정을 위한 molecular weight size marker로는 phosphorylase B(MW 97,400), BSA(MW 66,000), glutamate dehydrogenase(MW 55,000), ovalbumin(MW 43,000), aldolase (MW 40,000), carbonic anhydrase(MW 31,000), soybean trypsin inhibitor(MW 21,500), lysozyme(MW 14,300) (Promega)을 사용하였다.

**전분 분해능 검정**

각각의 균주를 2% 전분이 함유된 최소배지에 옮겨 30°C에 24시간 방치하였을 때 투명한 층이 형성되는가를 확인하여 분해능을 검정하였다(Yammamoto, 1988).

**결과 및 고찰**

**원형질체 형성**

배양시간에 따른 원형질체의 형성율을 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과 배양시간이 10시간째에 가장 높은 원형질체 수득율을 나타내었으며, 그때의 연령은 대수기 중간에 해당되었다. 또한, 원형질체 형성에 영향을 미치는 삼투안정제의 종류별(KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sorbitol, mannitol), 농도별(0.4 M, 0.6 M) 효과를 조사하여 Fig. 2에 나타내었다. 본 실험에서는 1% Novozym 234를 처리하여 2시간 동안 반응시켰을 때 *S. fiburigera*의 경우 0.6 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 93.6%, 0.6 M KCl에서 91.5% 순으로 높게 나타났으며, 0.4 M mannitol에서 가장 낮은 효율을 나타내었다. *S. cerevisiae*의 경우 0.6 M KCl에서 96.7%로 가장 높게 나타났는데 속간 잡종을 유도하기 위해서는 두 균주에 모두 적절한 삼투안정제에서 원형질체 형성율이 무난할것으로 판단되는 0.6 M KCl을 사용하였다.

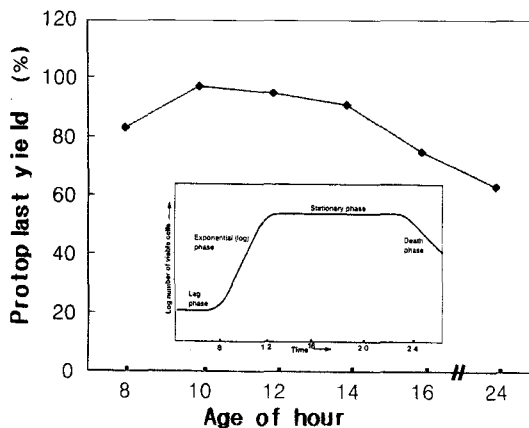


Fig. 1. Effect of age of *Sacchromycopsis fiburigera* and *Saccharomyces cerevisiae* on protoplast yield.

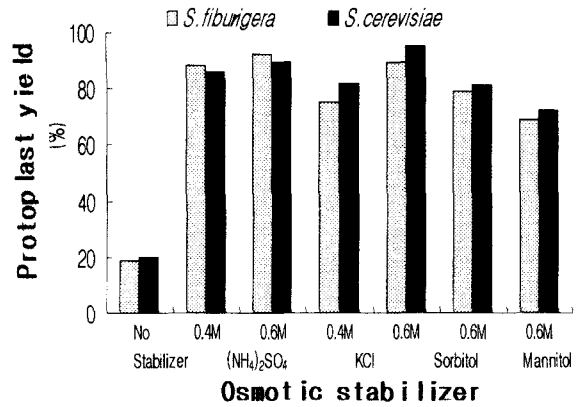


Fig. 2. Effect of osmotic stabilizers on protoplast yield of *S. fiburigera* and *S. cerevisiae*.

이는 *Aspergillus* 속, *Penicillium* 속, *Geotrichum* 속 그리고 *Saccharomyces* 속 등에서 0.6~0.8 M KCl이 가장 좋은 효율을 보였다는 보고와 유사하였다(Lim, 1996; Yang *et al.*, 1989). 또한, 세포벽 분해효소로는 최근 균류의 원형질체 형성에 있어 가장 많이 이용되고 있는 Novozym 234 (Novo.Co.)를 0.2~2.0%로 제조하여 실험한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 0.6 M KCl을 삼투안정제로 사용하여 2시간 동안 30°C에서 반응한 결과 1%의 Novozym 234 용액에서  $8.3 \times 10^7$  pts/ml로 가장 높았으며 그후 효소농도가 높아짐에도 불구하고 원형질체 수는 큰 변화가 없었다. 세포벽 분해효소에 의한 원형질체 형성율을 살펴보면 *A. nidulans*에서는 Oerskovia 분해효소를 처리하였을 때  $82.5 \times 10^7$  pts/ml (Van den Borek *et al.*, 1979)의 형성은 본 실험에 비하여 높은 형성율을 나타내었으나, Novozym 234를 *P. chrysogenum*에 처리 하였을 경우  $3.79 \times 10^7$  pts/ml, *A. niger*에서는  $1.6 \times 10^7$  pts/ml(Kirimura *et al.*, 1986), chitinase와 hemicellulase나 Novozm 234를 혼합 사용하였을 경우 *A. niger*에서  $1.8 \times 10^6$  pts/ml(Kirimura *et al.*, 1986)를 얻었다는 보고에 비하면 Novozym 234만을 사용하였음에도 형성율이 높게

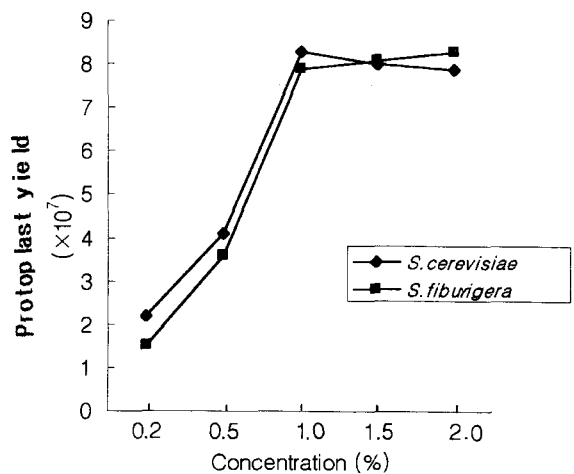


Fig. 3. Effect of enzyme (Novozym 234) concentration on protoplast yield of *S. fiburigera* and *S. cerevisiae*.

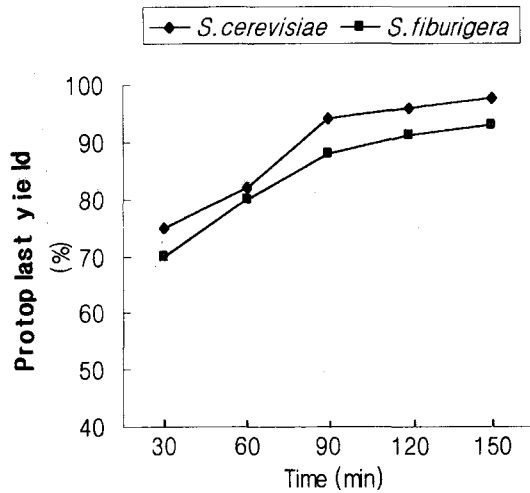


Fig. 4. Effect of digestion time on protoplast yield of *S. fiburigera* and *S. cerevisiae*.

나타났다. 효소의 처리시간에 따른 원형질체 생성율의 변화를 조사한 결과는 Fig. 4에 나타낸 바와 같다. 삼투안정제 0.6 M KCl에 1% Novozym 234를 녹여 각 균체에 처리한 후 반응시간을 30분 간격으로 120분까지 원형질체 형성율을 본 결과 120분에서 최대 양상을 보였으나 90분간 반응시킨 결과와 큰 차이가 없었고, *P. verruculosum*에서 세포벽 분해효소 처리시간을 오래하면 원형질체 재생률이 낮아진다는 보고(Kim, 1988)와 본 실험결과를 고려하여 효소처리 시간을 90분으로 하였다. 앞서 Stephen과 Nasim(1981)의 *S. alluvius*와 *Sch. pombe*에서 반응시간 30분에 90% 이상의 형성율을 보였다는 결과보다는 처리시간이 길었지만, *Aspergillus* 속과, *Penicillium* 속(Rho, 1991)의 보고에 따른 2시간 보다는 처리시간이 짧았다. 삼투안정제의 종류 및 농도와 함께 원형질체 형성에 중요한 요인으로 알려진 pH의 영향의 대한 결과를 Fig. 4에 나타내었는데 pH 5.5-6.0 사이의 범위에서 원형질체 형성이 좋은 것으로 나타났으며 그 중에서 pH 5.8이 최적인 것으로 나타났다. *Trichoderma* 속(Hong et al., 1984) *Penicillium* 속(Kim, 1988)에서 각각 pH 5.5-5.9에서 원형질체 형성율이 최대였다는 보고와 *Aspergillus* 속에서 둘다 최적 pH가 5.8이었다는 보고(Lim, 1996; Rho, 1991)와 거의 일치하였다. 이러한 결과는 세포벽 분해에 관여하고 효소성분의 최적반응이 pH와 함께 원형질체 내부의 본래 pH와 비슷함으로써 원형질체의 형성 및 안정성 유지가 가능한 것으로 추정된다.

#### 원형질체 재생

형성시킨 원형질체를 순수분리하여 삼투안정제로 세척한 후 재현탁시켜 배지에 접종하면 원형질체가 다시 원래의 균체로 재생되어야만 하는데 원형질체가 재생되는데 중요한 요인 중의 하나는 원형질체가 안정하게 존재하면서 세포벽 합성에 좋은조건을 만들어 줄 수 있는 삼투안정제의 선택이라 할 수있다. 따라서 본 실험에서는 *S. fiburigera*의

Table 1. Effect of osmotic stabilizers on protoplast regeneration of *S. fiburigera* and *S. cerevisiae*

Osmotic stabilizer	Regeneration frequency (%)*	
	<i>S. fiburigera</i>	<i>S. cerevisiae</i>
0.4 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.17	1.87
0.6 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9.08	9.68
0.4 M KCl	2.52	2.82
0.6 M KCl	14.13	14.64
0.4 M Mannitol	0.91	1.34
0.6 M Mannitol	7.83	7.03
0.4 M Sorbitol	1.41	3.60
0.6 M Sorbitol	6.80	7.10

경우 원형질체 형성에 적합했던 0.6 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 보다 0.6 M KCl에서 더 높은 재생율을 보였다. 이와 반대로 0.4 M 농도의 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCl, mannitol, sorbitol 등은 재생율이 상당히 낮게 나타났다. 원형질체 재생율은 Table 1에 나타내었는데 0.6 M KCl에서 *S. fiburigera*가 14.1%, *S. cerevisiae*가 14.6%로 가장 높게 나타났다. 삼투안정제에 의한 재생율은 *T. harzianum* 원형질체를 0.6 M sorbitol로 처리하였을 때 0.68%(Sivan et al., 1990) *A. oryzae*에서 0.6 M KCl의 경우 1.46~13%, *S. cerevisiae*에서는 0.6 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 재생율이 21%임이 보고되었다(Lee, 1989). Rho (1991)는 *A. oryzae*에서 0.6 M KCl를 사용하였을 경우 15~25%의 재생율을 보고하였다. 이러한 결과는 균주에 따른 재생율이 삼투안정제의 종류에 따라 각기 다름을 알수 있었다.

#### 핵전이에 의한 잡종의 형성

핵전이에 의한 형질전환은 Sandwich method로 변형시킨 방법으로 *Saccharomyces* 속과 *Trichoderma* 속 및 *Aspergillus* 속에서 사용한 방법(Yang et al., 1989)을 적용하여 *S. fiburigera* 야생형 균주로부터 형질전환을 위한 핵을 순수분리하고, 형질전환 시키고자하는 *S. cerevisiae*의 원형질체를 형성시킨후 핵의 형질전환을 행하고, 다음식에 의하여 형질전환율을 산출하였다.

형질전환율 =

$$\frac{\text{재생용 완전배지상의 균체수} - \text{완전배지상의 균체수}}{\text{재생용 최소배지상의 균체수} - \text{최소배지상의 균체수}} \times 100$$

*S. fiburigera* 야생균주와 *S. cerevisiae* 영양요구성 변이주간의 형질전환 실험을 실시한 결과 약 0.25% 정도의 형질전환율을 나타내었다. 이러한 결과는 *A. nidulans* 514와 야생형 균주간의 형질전환 시켰을 때 형질전환율이 4.8%(Yang et al., 1989), *T. koningii* 야생균주와 변이주 CUT 121 사이에서 31%(Sivan et al., 1990) 보다 낮았으나 *A. usami* CM 311과 *A. oryzae* 611 사이에서의 형질전환율이 0.17%(Rho, 1991)이었다는 보고와 비슷하였다. 이와같이 낮은 형질전환율은 순간 형질전환으로 인한 불안정성과 사용된 실험방법상의 차이에 기인한 것으로 사료된다.

**잡종의 분리 및 분석**

핵전이에 의하여 얻어진 잡종의 유전성 안정성을 검토한 결과를 Table 2에 나타내었는데 Table 2A에 보는 바와 같이 최소배지상에 보존하는 것이 유전적인 안정성을 기할 수 있음을 알았다. 또한 최소 배지상에서 안전 융합체를 10일 간격으로 최소배지상에 4회 이상 subculture한 결과 (Table 2B) 자연 형질분리가 일어나는율이 1% 이내로 매우 안정성이 있는 우수 균주 MN-7, MN-8, MN-16, MN-25, MN-29 등의 5균주를 최종 선발하였다. 또한 모균주와 형질 전환체의 DNA 함량과 세포크기 체적을 비교하여 Table 3에 나타내었는데 haploid인 *S. cerevisiae*와 *S. fiburigera* 보다 형질전환체에 있어서 DNA 함량이 많았으며 MN-16, MN-19 경우는 모균주 DNA양이 각각 31.4와 23.5 fg/cell에 비해 107.4 fg/cell로 약 1.5배 증가한 것으로 보아 aneuploid임을 알수 있었다. 핵염색을 하여 비교하여 본 결과를 Fig. 5에 나타내었는데 형질전환체의 핵이 모균주에 비하여 유사하거나 약간 큰 경향을 보였다. 이는 Bai(1987)의

*Candida* 중간 원형질체 융합, Yang 등(1989)의 *Aspergillus* 속과 *Penicillium* 속간 핵전이의 결과와도 유사하였다. 또한 모균주와 형질전환체 사이의 세포의 수용성 단백질의 SDS-PAGE를 행한 결과를 Fig. 6에 나타내었는데, 모균주와 형질전환체 사이의 세포의 수용성 단백질의 양상은 다르게 나타났다. 일반적으로 형질전환체는 모균주보다 다양한

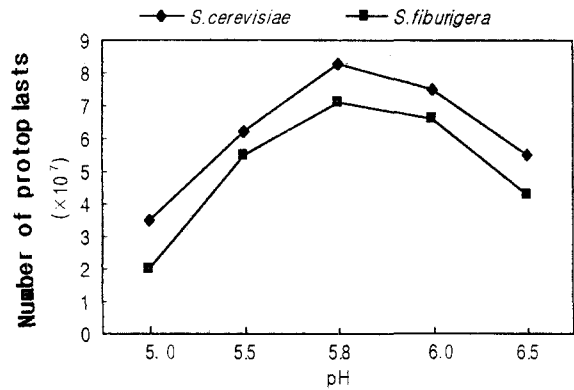


Fig. 5. Effect of pH on protoplast yield of *S. fiburigera* and *S. cerevisiae*.

**Table 2.** Genetic stability of selected intergeneric hybrids of *S. fiburigera* and *S. cerevisiae*

Strain	Colony number (x 10 <sup>6</sup> ) on		Percent auxotroph
	CM	MM	
MN-7	2.55	2.56	0.4
MN-8	2.88	2.88	0
MN-16	6.12	6.12	0
MN-19	8.02	7.90	1.5
MN-25	2.91	2.91	0
MN-29	3.80	3.80	0

(B) Genetic stability

Strain	Percent auxotroph	
	on CM	on MM
MN-7	1.0	0
MN-8	23.0	12.0
MN-16	11.7	2.1
MN-19	8.8	3.4
MN-25	7.5	2.2
MN-29	8.3	3.4

**Table 3.** Size, volume and DNA content of *S. fiburigera* and *S. cerevisiae* and their intergeneric hybrids

Strain	Diameter (μm)	Volume (μm <sup>3</sup> )	DNA content (fg/cell)
<i>S. fiburigera</i>	5.32 x 6.88	75.89	31.4
<i>S. cerevisiae</i>	4.65 x 3.88	36.63	23.5
MN-7	6.37 x 7.84	169.30	98.4
MN-8	6.62 x 7.20	164.90	99.2
MN-16	6.37 x 8.09	171.87	107.4
MN-19	6.38 x 8.17	169.80	105.2
MN-25	5.37 x 6.66	100.50	75.7
MN-29	6.38 x 7.74	168.30	102.8

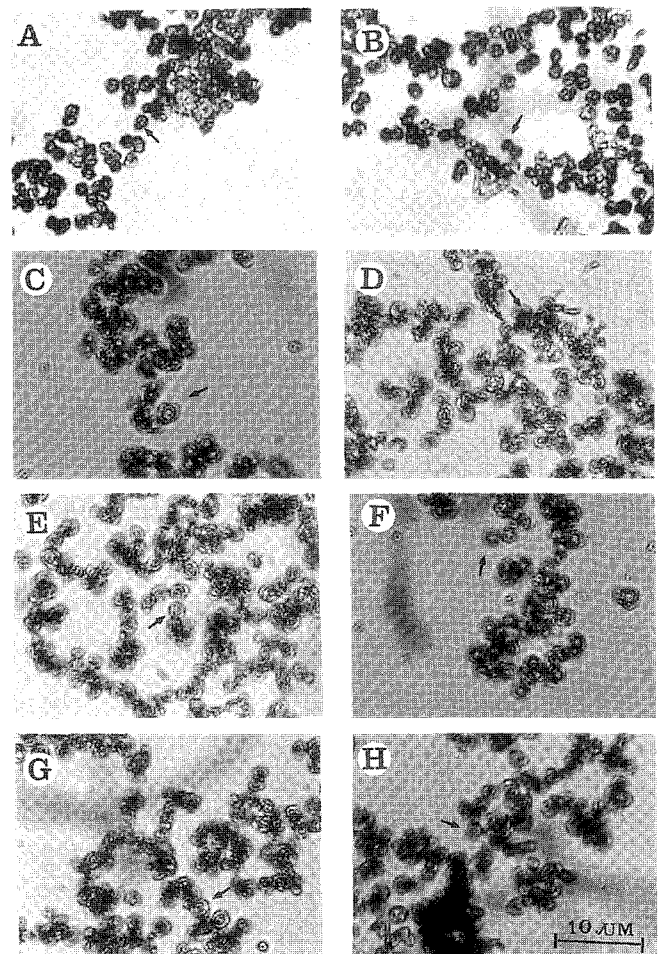
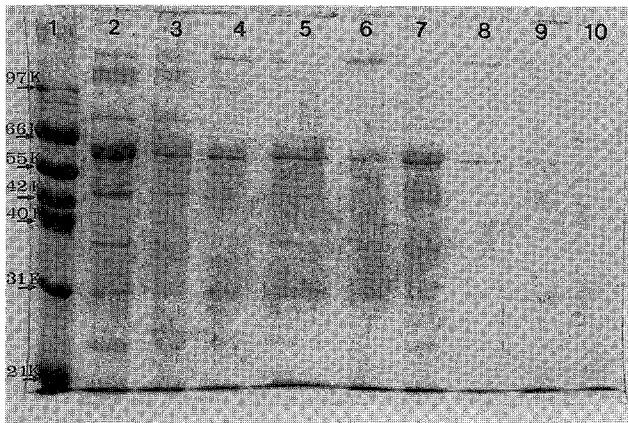


Fig. 6. Photomicrographs of nuclei of *S. fiburigera* and *S. cerevisiae* and their intergeneric hybrids. A: *S. fiburigera*, B: *S. cerevisiae*, C-G: intergeneric hybrids.

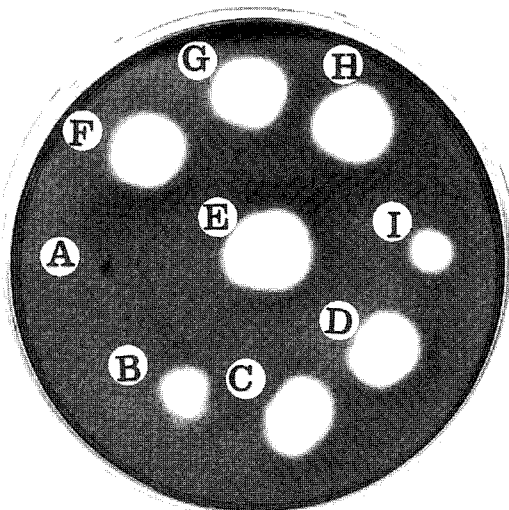
band를 형성하였으며 *S. fiburigera* 양상과 유사하였다. 이러한 결과는 모균주와 형질전환체에서 각 균주의 단백질 생성 및 분비기작이 다른것에 기인한 차이인 것으로 보인다.

**Table 4.** Extracellular  $\alpha$ -amylase activity of *S. fiburigera* and *S. cerevisiae* and their intergeneric hybrids

Strain	Enzyme activity (unit)	Protein content (mg)	Specific activity (unit/mg)
<i>S. fiburigera</i>	38.6	15.1	2.56
<i>S. cerevisiae</i>	13.2	15.7	0.84
MN-7	44.2	13.3	3.32
MN-8	54.3	14.9	3.64
MN-16	63.8	13.2	4.83
MN-19	58.3	14.1	4.13
MN-25	59.7	16.3	3.66
MN-29	62.3	15.5	4.01
MN-34	60.2	15.3	3.93



**Fig. 7.** SDS-PAGE patterns of total soluble protein of *S. fiburigera* and *S. cerevisiae* and their intergeneric hybrids. Lane, 1: Marker, 2: *S. fiburigera*, 3-9: intergeneric hybrids, 10: *S. cerevisiae*.



**Fig. 8.**  $\alpha$ -Amylase activity of *S. fiburigera* and *S. cerevisiae* and their intergeneric hybrids on iodine plate assay. A: *S. cerevisiae*, B-H: intergeneric hybrids, I: *S. fiburigera*.

**형질전환체의  $\alpha$ -amylase 활성**

모균주와 형질전환체의  $\alpha$ -amylase 활성을 측정된 결과를 Table 4에 나타내었는데 *S. fiburigera*와 *S. cerevisiae*의 핵전이에서 얻어진 형질전환체들은 고유활성도가 3.32~4.83 units/mg로 모균주의 2.56과 0.84 units/mg 보다 약 1.2~1.9배 증가된 양상을 보였다.

전분분해는 역가 검정에서 활성 측정결과를 Fig. 7에 나타내었는데 그 결과 얻어진 형질전환체의  $\alpha$ -amylase활성이 모균주에 비해서 높음을 알수 있었고 특히 MN-16과 MN-19에서 넓은 투명환을 나타내어  $\alpha$ -amylase 활성측정과 일치함을 알수 있었다.

**요 약**

$\alpha$ -Amylase 생산력이 우수한 야생형인 *S. fiburigera*의 핵을 순수분리하여 영양요구성 변이주인 *S. cerevisiae*(*tyr-, ura-*)의 원형질체에 전달하는 핵전이를 이용하여 중간잡종을 형성시킨 후 이들 형질전환체로부터  $\alpha$ -amylase 고생산 균주를 획득하였다. 핵전이를 위한 원형질체 형성 및 재생 조건에서는 Novozym 234의 농도 1%, 삼투안정제는 0.6 M KCl, 효소처리 시간은 90분, 그리고 최적 pH는 5.8로 나타났다. 핵전이에 의한 형질전환율은 0.25%로 비교적 낮은 편이었으며, 유전적 안정성, 세포크기의 체적, DNA 함량의 측정 그리고 핵염색의 결과 형질전환체의 핵형은 aneuploid로 추정되었다. 형질전환체의  $\alpha$ -amylase 활성은 모균주와 비교하여 약 1.2~1.9배 증가하였다.

**감사의 글**

본 연구는 1998년도 조선대학교 학술연구비 지원으로 수행되었으며 감사드립니다.

**참고문헌**

Bai, S. 1987. Protoplast fusion in the yeast, *Candida pseudotropicalis* CBS 607. Ph.D. thesis. Chonnam National University.  
 Barfoed, H. C. 1976. Enzyme in starch processing. *General Foods World* 21: 588-604.  
 Biotechnology Dictionary Compilation Comimittee. 1986. Biotechnology Dictionary. Anastatic Printing Co. Tokyo.  
 Chung, K. C., Kawai, K., Yoshima, S. and Eguchi, Y. 1982. Production of cellulolytic enzymes by *Penicillium verrucosum*. *Hakkokogaku* 60: 355-357.  
 Ferenczy, L. and Pesti, M. 1982. Transfer of nuclei into protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Microbiol.* 7: 157-160.  
 Ferenczy, L. 1983. Current guestion of gene transfer via protoplast fusion in microorganism. 6th Intern. Protoplast Sumposium, pp. 137-142.

- Giles, K. W. and Myers, W. 1965. An improved diphenylamine method for estimation of deoxyribonucleic acid, *Nature* **206**: 93.
- Hernandez, E. and Pilt, D. J. 1975. *J. Appl. Chem. Biotech.* **25**: 297-304.
- Hong, S. W., Hah, Y. C. and Park, H. M. 1984. The conidial protoplast fusion of cellulolytic fungus. *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.* **22**: 207-213.
- Kim, J. H. 1988. The protoplast fusion from conidiospore of *Penicillium verruculosum*. M. S. Thesis, Chonnam National University.
- Kirimura, K., Yanguchi, T. and Usami, S. 1986. Interspecific protoplast fusion of citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Technol.* **64**: 473-479.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 608-685.
- Lee, J. A., Maeng, J. S., Maeng, P. J. and Rhee, Y. H. 1989. Synergistic effect of substrate on the biosynthesis of cellulase and xylanase complexes from *Aspergillus nidulans*. *Kor. J. Mycol.* **17**: 57-65.
- Lee, S. Y. 1989. Protoplast fusion *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. M. S. Thesis, Korea University.
- Lim, C. Y. 1996. Characterization of lipase producing hybrid constructed by intergeneric nuclear transfer between *Aspergillus oryzae* var. *oryzae* and *Penicillium verruculosum* F-3. Ph.D. thesis, Chosun University.
- Lowry, O. H., Rosebroung, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Morgan F. J. and Priest, F. G. 1981. Characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* NCIB 6346. *J. Appl. Bacteriol.* **50**: 107-114.
- Nasim. A. and Stephen, O. E. R. 1981. Production of protoplast in different yeast by mutanase. *Can. J. Microbiol.* **27**: 550-553.
- Nevalaninen, K. M. H. and Palva, F. T. 1978. Production of extracellular enzymes in mutants isolated from *Trichoderma viride*. *J. Biochem.* **71**: 999-1007.
- Peberdy J. F., Buckley, C. E., Daltrey, D. C. and Moore, P. M. 1976. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi *Trans. Br. Mycol. Soc.* **67**: 23-26.
- Rho, H. S. 1991. Study on interspecific hybrid formation by nuclear transfer in *Aspergillus* spp. M. S. thesis. Chungnam National University.
- Schomburg. D. and Salzmann, M. 1991. *Enzyme Handbook* Vol. 4, Springer-Verlag.
- Sivan. A., Harman, G. E. and Stasz, T. E. 1990. Transfer of isolated nuclei into protoplast of *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environm. Microbiol.* **56**: 2404-2409.
- Van den Borek, H. W., Stunninberg, J. G. and Wennekes, L. M. J. 1979. Protoplast from *Aspergillus nidulans*. *Microbios* **26**: 115-128.
- Yamashita. I. and Fukui, S. 1983. Molecular cloning of a glucoamylase proceeding gene in the yeast *Saccharomyces*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 2689-2692.
- Yammamoto, T. 1988. Handbook of amylase and related enzymes, their sources isolation methods, properties and applications. The Amylase Research Society of Japan, Osaka.
- Yang, Y. K., Park, Y., Rhee, Y. H. and Maeng, P. J. 1989. Construction of intraspecific hybrids by nuclear transfer in *A. nidulans*. *Kor. J. Mycol.* **17**: 154-160.