

Amylase 분비 효모와 alcohol 발효 효모의 세포 융합에 의한 균주의 개발

제 3 보. *S. diastaticus*와 *C. tropicalis* 간의 세포 융합 및 융합체의 성질

서정훈 · 권택규 · 홍순덕

경북대학교 자연과학대학 미생물학과
(1986년 7월 19일 수리)

A study on strain improvement by protoplast fusion between amylase secreting yeast and alcohol fermenting yeast

III. Isolation and characterization of fusant between *S. diastaticus* and *C. tropicalis*

Jung Hwn Seu, Taeg Koo Kwon and Soon Duck Hong

Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu, Korea

(Received July 19, 1986)

S. diastaticus hydrolysed α -1.4 linkage of the starch and was known fermenting yeast strain, but poorly hydrolyzed α -1.6 linkage of the starch. To improve the starch fermentation ability of yeast, we tried that protoplast fusion between *S. diastaticus* and *C. tropicalis* and finally two strains of fusants (FPDC42, FPDC43) were obtained. *C. tropicalis* well hydrolysis both α -1.4 and α -1.6 linkages in the starch. The protoplast of parental auxotrophic cells were fused in the presence of 10mM CaCl_2 and 35% of polyethylene glycol (M. W. 4,000). The fusion frequency was 10^{-5} to 10^{-6} . Properties of the fusants (genetic stability, assimilation of carbon sources, random spore formation, copper resistance, NaCl tolerance, DNA content, cell size and growth rate) were investigated.

전분을 기질로 한 alcohol 발효성 효모의 개발^(1,2)을 위하여 본 연구의 1 보⁽⁸⁾ 및 2 보⁽⁹⁾에서는 발효성 효모인 *S. cerevisiae*와 glucoamylase의 생성효모인 *S. diastaticus*를 융합하여 얻은 균주에 대한 성질, glucoamylase의 성질, 및 fusants의 유전 안정성 그리고 직접 전분을 기질로 했을 때의 alcohol 생성능에 대해서 보고한 바 있다.

*S. diastaticus*가 생성하는 glucoamylase는 전분에 대한 α -1,4-glucoside 분해 활성이 비교적 강하

나 α -1,6-glucoside 분해 활성이 아주 약하다. 실제로 전분을 분해하는 데는 α -1,6-glucoside linkage 분해력이 강할수록 유리하므로 본 연구에서는 glu-coamylase를 분비하며 동시에 alcohol 발효를 할 수 있는 *S. diastaticus*와 α -1,6-glucoside 결합을 분해하는 amylase를 생성하는 *C. tropicalis*를 protoplast fusion하여 얻은 균주 중 유전 안정성을 위시하여 이들 균주의 기본적인 성질을 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 실험에 사용한 균주는 *Saccharomyces diastaticus* IFO 1046과 *Candida tropicalis* IFO 0589의 야생주이며, 이들 균주를 N-methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (NTG)으로 처리하여 분리한 영양 요구 변이주와 이들 균주의 protoplast를 융합하여 얻은 융합체로서 Table 1과 같다.

시약 및 효소

본 실험에 사용한 효모의 세포벽 분해효소는 Seikagaku Kogyo사의 Zymolyase 20,000이었으며, polyethylene glycol과 각종 아미노산은 Rikagaku사의 것을, 전분 액화를 위해 사용한 α -amylase (*Bacillus licheniformis*)는 Novo사의 것을, 기타배지는 Difco사의 제품을 사용하였다.

배지

Yeast완전 배지는 (YPD) yeast extract 0.5%, polypeptone 0.5%, dextrose 2%를 사용하였으며 최소배지(MM)는 glucose 2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5%, KCl 0.5%, yeast nitrogen base w/o a. a. 0.2% 조성의 배지를 사용하였다. 이때 필요에 따라 한천을 1.8%로 첨가하였다.

Protoplast 생성용 배지는^(5,6) (PM) glucose 4%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5%, KCl 0.5%, yeast extract 0.2%를 사용하였으며, protoplast 재생 배지로는 완전 배지와 최소 배지에 KCl을 0.6M 되게 첨가하여 사용하였다.

Starch발효능 조사는 yeast extract 1%, polypeptone 1%, soluble starch 2%인 YPS를 사용하였다.

Fusogenic solution

분자량 4,000의 polyethylene glycol을 35%의 농도로, 20mM의 CaCl_2 를 함유한 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 녹인 후 이를 autoclave하여 pro-

toplast 융합에 사용하였다.

Protoplast의 형성과 융합

먼저 영양 요구주를 PM 배지에 접종하고 30°C에서 18시간 진탕배양하여 얻은 대수 증식기의 균체를 5 ml 취하여 집균하고 1.2M KCl (pH 8.0) solution으로 3회 세척한 후 1.2M KCl (pH 8.0) 2 ml, 20mM β -mercaptoethanol 1 ml 및 세포벽 용해 효소액 (zymolyase 10 units/ml) 1 ml를 가하여 현탁한 후 30°C에 90분간 반응하였다.

형성된 protoplast는 1.2M KCl 용액으로 2회 세척한 후 세포 융합에 사용하였으며 protoplast 융합 방법은 제 1보⁽⁸⁾와 같다.

융합 세포의 성질

영양 요구성이 상호 보완되어 자란 융합 세포를 7일 간격으로 최소 배지와 완전 배지에 동시에 이식하여 배양하면서 최소 배지와 완전 배지에 나타나는 colony 수가 같을 때 까지 배양한 후 그 중에서 생육이 비교적 왕성한 균주를 선별하였다.

융합체의 생리적 및 형태적 특성 조사

① 유전 안정성

최소 배지상에 나타난 융합체의 유전 안정성을 최소 배지와 YPS 배지상에서 subculture 함으로써 조사하였다. 일정 기간 동안 보존된 균주와 계속 계대 배양한 균주를 새로운 완전 배지에 접종하여 30°C에서 2일간 배양한 후 살균된 saline 용액에 현탁하고 (5×10^7 cells/ml) 일정 비율로 희석하여 완전 배지에 도말 배양하였다 (80-100 colonies/petri dish).

완전 배지상에 나타난 colony를 다시 완전 배지와 최소 배지에 replica하여 완전 배지상의 colony에 대한 최소 배지에 나타난 colony비로써 이들의 유전 안정성을 검토하였다. 이때 auxotrophs의 비를 제 1보⁽⁸⁾의 식에 의해서 구하였다.

② DNA 함량 측정

YPD 배지상에서 키운 대수 증식기의 cell을 원심 집균하여 DNA 추출에 사용하였으며 추출 및 함량의 측정 방법은 제 1보⁽⁸⁾와 같다.

③ 형태적 특성 및 세포 체적 측정

YPD 한천 사면 배지에 보존된 각각의 균주를 액체 YPD에 옮겨 30°C에서 24시간 배양한 뒤 다시 새로운 YPD 배지상에 접종하여 30°C에서 18시간 배양하여 이들의 cell size를 micrometer로 측정하였다.

④ Spore staining

YPD 한천 사면 배지상의 균주를 yeast extract 0.8%, bacto peptone 0.3%, dextrose 10.0%, agar 2.0%의 presporulating medium에 희석하여 30°C에서 3일간 배양한 후 다시 균체를 sporulating medi-

Table 1. List of strains used

Strains	Pheno type	Remark
<i>S. diastaticus</i> IFO1046	Wild type	
<i>S. diastaticus</i> A4	thr ⁻	NTG mutant of <i>S. diastaticus</i>
<i>C. tropicalis</i> IFO0589	Wild type	
<i>C. tropicalis</i> RCT-40	lys ⁻	NTG mutant of <i>C. tropicalis</i>
Fusant		
FPDC-42	Wild type	A4 × RCT-40
FPDC-43	Wild type	A4 × RCT-40

um (potassium acetate 1%, yeast extract 0.1%, dextrose 0.05%) 에 이식하여 30°C에서 5일간 배양한 후 상법에 따라 염색하였다. 이때 대비염색으로는 methylene blue를 사용하였다.

⑤ 탄소원 자화능 조사

탄소원 자화능을 조사하기 위하여 parents와 fusants를 살균된 saline용액에 현탁하여 탄소원으로 각각 glucose, xylose, raffinose, succinate, pullulan 2%를 (NH₄)₂SO₄ 0.2%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, KCl 0.05% 함유한 최소 배지에 희석하여 30°C에서 4일간 배양하여 조사하였다.

⑥ Cu에 대한 내성 조사

Fusants와 parental type의 Cu내성을 조사하기 위해 Cu⁺⁺이온을 400, 600, 800, 1,000 (μg/ml) 농도로 첨가한 YPD배지에 희석하여 30°C에서 4일간 배양하여 Cu에 대한 내성을 비교 관찰하였다.

⑦ NaCl에 대한 내염 조사

Fusants와 parents의 NaCl 내염을 조사하기 위해 NaCl염을 5, 8, 10, 12, 14% 농도로 첨가한 YPD 배지에 희석하여 30°C에서 4일간 배양하여 NaCl 내염성을 조사하였다.

⑧ Fusants와 parents의 생육도 조사

Fusant의 증식율을 조사하기 위해서 fusant와 parent의 생육도를 조사하였다. 방법은 YPD 액체 배지에 균을 일정량씩 접종한 후 30°C에서 진탕배양 (120 strokes/min) 하면서 일정시간 간격으로 균의 생육도를 620nm에서 흡광도를 측정하여 생육곡선을 나타내었다.

결 과

세포 융합의 빈도

S. diastaticus A4 (thr⁻)와 *C. tropicalis* RCT-40 (lys⁻)를 이속간 세포 융합시켰을때 최소 배지에 자란 colony 수는 250개이고 완전배지에서 자란 colony 수는 3.19×10^7 으로서 융합 빈도는 7.84×10^{-6} 이었다.

융합체의 일반적 성질 조사

① 유전 안정성

Fusant의 유전 안정성은 재료 및 방법에 따라 조

Table 2. Genetic stability of fusants

Strains	Colony		Auxotroph
	on CM*	on MM**	
FPDC-42	419	418	0.2
FPDC-43	373	372	0.3

*CM : Complete medium.

**MM : Minimum medium.

Table 3. DNA content of parents and fusants

Strains	260nm/ 280nm	Content of DNA (fg/cell)
<i>S. diastaticus</i> A4	1.84	116.7
<i>C. tropicalis</i> RCT-40	1.94	126.9
FPDC-42	2.09	145.5
FPDC-43	1.98	157.9

사한 바 400여 colony을 각각 CM과 MM에 replica한 결과 fusant의 auxotroph비율은 0.2% - 0.3%로 매우 유전적 성질이 안정한 것으로 나타났다 (Table 2).

② DNA 함량

Fusant의 heterocaryon성질을 조사하기 위하여 fusant의 DNA 함량을 조사한 결과 융합체의 DNA content는 parent인 *S. diastaticus* A4와 *C. tropicalis* RCT-40보다 함량이 많은 것으로 나타났다.

(Table 3).

③ Fusant의 형태적 특성 및 세포 체적

Fusants와 parents의 size를 광학 현미경으로 400배의 배율로 측정된 결과 fusants가 친주 세포보다 컸고 이의 측정치는 Table 4와 같다.

④ Spore 염색

*C. tropicalis*는 불완전균류로서 spore를 형성하지 못하는 반면에 *S. diastaticus*는 자낭균류로서 spore를 형성하는데 fusant의 경우 *S. diastaticus*보다는 훨씬 낮은 빈도이기는 하나 spore를 형성할 수 있었다 (Fig. 1).

⑤ 탄소원 자화능

Lodder⁽⁷⁾에 의하면 *S. diastaticus*가 raffinose를 탄소원으로 자화할 수 있으나 xylose와 succinate는 자화할 수 없는 반면에, *C. tropicalis*는 xylose와 succinate를 자화할 수 있으나 raffinose를 자화할 수 없다. 그래서 본 실험에서 얻은 융합체의 탄소원 자화능을 조사하여 본 바 융합체는 이들 탄소원 자화능의 일부가 상호 보완되어 있음을 알 수 있다. (Table 5).

Table 4. Cell size and capacity of parents and fusants

Strains	Cell length (μm)	Cell width (μm)	Cell volume (μm ³)
<i>S. diastaticus</i> A4	6.99	5.42	107.52
<i>C. tropicalis</i> FPDC-42	7.27	5.39	110.59
FPDC-42	7.81	5.68	131.93
FPDC-43	7.65	5.60	125.61

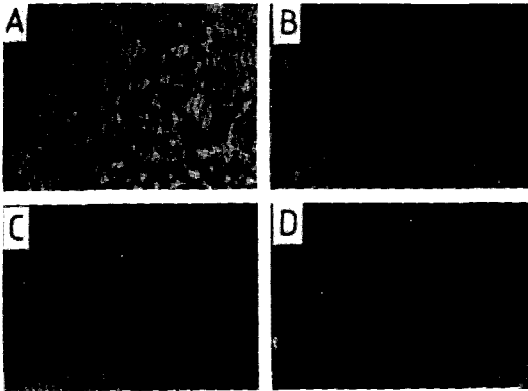


Fig. 1. Spore formation of parents and fusants
 A. *S. diastaticus* A4 B. *C. tropicalis* RCT-40
 C. FPDC-42 D. FPDC-43

⑥ Cu에 대한 내성 조사

친주와 fusant의 Cu에 대한 내성을 조사한 결과 *S. diastaticus* A4는 Cu 이온 600ppm 이상에서 생육을 할 수 없으나, *C. tropicalis* RCT-40는 1,000 ppm에서도 생육이 가능하였다. 반면에 fusant 42는 800 ppm까지, 43은 400 ppm 이하에서 생육이 가능했다(Table 6).

⑦ NaCl에 대한 내염 조사

*S. diastaticus*는 5%, *C. tropicalis*는 12% 이하에서 생육이 가능하였으나 fusant 42, 43은 8% 이하에서 생육이 가능하였다(Table 7).

⑧ Fusant와 parent의 생육도 조사

Parent인 *S. diastaticus* A4와 *C. tropicalis* RCT-40에 비해 fusant인 42, 43에서는 유도기가 더 길었다. 이와같은 현상은 세포 융합에서 얻은 융합체가 나타내는 일반적인 현상으로 보고되어 있으며, 본 실험에서 얻은 fusants도 같은 경향을 나타내고 있다(Fig. 2).

고 찰

본 실험의 목적은 starch의 alcohol 발효에 있어서

Table 5. Carbon source assimilation of parents and fusants

Strains	Glucose	Xylose	Raffinose	Pullulan	Succinate
<i>S. diastaticus</i>	+	-	+	±	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	±(-)*	+	+
FPDC-42	+	+	+	+	-
FPDC-43	+	+	+	+	-

*Lodder's publication.

Table 6. Copper resistance of parents and fusants.

Strains	Concentration of Cu (μg/ml)				
	0	400	600	800	1,000
<i>S. diastaticus</i> A4	+++	+	-	±	-
<i>C. tropicalis</i> RCT-40	+++	++	++	++	+
FPDC-42	+++	+	+	+	-
FPDC-43	+++	±	-	-	-

Table 7. NaCl tolerance of parents and fusants

Strains	Concentration of NaCl (%)				
	5	8	10	12	14
<i>S. diastaticus</i> A4	+	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i> RCT-40	+	+	+	+	-
FPDC-42	+	+	-	-	-
FPDC-43	+	+	-	-	-

전분의 α-1,4 linkage를 분해하여 alcohol 발효를 하는 *S. diastaticus*와 전분 중의 α-1,4와 α-1,6 linkage를 모두 잘 분해하는 *C. tropicalis*간의 이속간의 protoplast fusion를 시켰다. 이때 세포융합의 빈도는 동속간의 세포융합에 비하여 약간 낮은 빈도이기는 하나 10⁻⁵ - 10⁻⁶이었다. 융합체를 얻어서 CM과 MM에 각각 일정시간 간격으로 인식하여 fusant

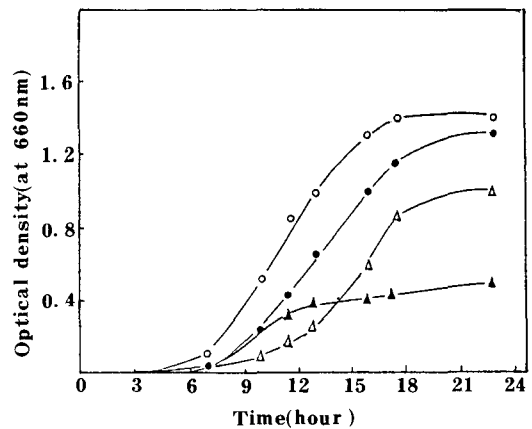


Fig. 2. Growth curves of parents and fusants.

Strains were cultured in YPD medium at 30 °C, and the growths were measured at 660nm.

○—○ : *C. tropicalis* RCT-40,
 ●—● : *S. diastaticus* A4,
 △—△; FPDC-42, ▲—▲; FPDC-43.

의 유전적 성질이 안정한 FPDC 42와 FPDC 43 두 융합체를 얻어 유전적 안정성을 조사하였다. 이때 0.2-0.3%의 segregation이 일어났던 비교적 유전적 성질이 안정한 것으로 나타났다. fusant의 DNA 함량과 cell size는 Taya와 Honda⁽³⁾의 보고에서와 같이 DNA content는 parent인 *C. tropicalis*가 126.9 (fg/cell)인데 비해 융합체인 FPDC-42, 43은 145.5, 157.9 (fg/cell)으로 DNA 함량이 증대됨을 확인할 수 있었다. cell size는 *C. tropicalis*가 110.6 (μm^3)인데 비해 FPDC42는 131.9 (μm^3)으로 증대됨을 보였다. Fusant의 Cu 내성과 NaCl 내염성을 조사한 결과 융합체는 parent의 중간 정도 성질을 나타내었고 탄소원 자화능에 대하여서는 *S. diastaticus*는 xylose와 succinate를 자화할 수 없는데 *C. tropicalis*는 모두다 자화할 수 있는데 반하여 fusant는 xylose를 자화할 수 있고 succinate를 자화할 수 없는 것으로 보아 탄소원 자화능의 일부가 상호 보완 되었음을 알 수 있었다.

Random spore 형성을 조사한 결과 *S. diastaticus*는 자낭균류로서 spore를 형성하나 *C. tropicalis*는 불완전 균류로서 spore를 형성할 수 없는 반면 fusant는 낮은 빈도이기는 하지만 spore를 형성하였다. Fusant의 생육도를 조사한 결과 Sakai와 Saitoh⁽⁴⁾의 보고와 같이 parent보다 fusant가 생육이 늦었다.

이것은 cell fusion을 시킬 경우 lag time이 길다는 것이 문제점으로 제시되고 있다.

요 약

본 실험의 목적은 starch의 alcohol 발효에 있어서 전분의 α -1.4 linkage을 분해하여 alcohol 발효를 하는 *S. diastaticus*와 전분 중의 α -1.4, α -1.6 linkage를 모두 분해할 수 있는 *C. tropicalis* 간의 이속간의 protoplast fusion을 시켰다. 이때 세포 융합의 빈도는 10^{-5} - 10^{-6} 이었으며, 이들 융합체중 amy-lase 생성능과 유전적으로 안정한 융합체를 분리하였

다. fusant의 성질을 조사하기 위하여 탄소원 자화능을 조사한바 parent와 달리 탄소원 자화능이 일부 보완됨을 보였고 또한 fusant는 원 parent보다 세포의 크기가 클 뿐만아니라, DNA 함량도 많았다. spore형성능은 *S. diastaticus* A4는 spore를 형성하나 *C. tropicalis*는 형성할 수 없는 반면에 fusant는 형성하였고, Cu^{++} 내성과 NaCl 내염성도 조사하였는데 fusant는 parent의 중간 성질을 가졌다. Fusant의 증식율을 조사하기 위하여 생육도를 조사한 결과 parent보다 유도기가 길었음을 알았다.

사 사

본 연구는 1985년도 문교부 지원의 유전공학연구를 위한 학술 연구 조성비에 의하여 수행되었으며 관계하신 여러분께 감사할 드립니다.

참고문헌

1. Laluece, C. and J.R. Matton: *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 17(1984).
2. Ogden, K. and R. S. Tubb: *Enzyme Microb. Technol.*, **7**, 220 (1985).
3. Taya, M., H. Honda and T. Kobayashi: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2239 (1984).
4. Sakai, T., K.I. Koo and K. Saitoh: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 297 (1986).
5. Seu, J. H. and Y. S. Bae: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 23 (1986).
6. Seu, J. H. and Y. H. Kim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **13**, 383 (1985).
7. Lodder, J.: *The Yeast*. North-Holland publishing Co., Netherlands, 1st ed., (1970).
8. 서정훈, 김영호, 전도연, 이종태: 한국산업미생물 학회지, **14**(4), 305 (1986)
9. 서정훈, 김영호, 전도연, 이창후: 한국산업미생물 학회지, **14**(4), 311 (1986)