

효모세포의 전기융합 및 융합세포의 RAPD-PCR을 이용한 유전적 분석

김 승¹ · 김재성¹ · Kumar Sapkota¹ · 박인성² · 조문구³ · 박 열¹ · 전홍성¹ · 최봉석¹ · 박세은¹ · 최한석⁵ · 김명곤⁴ · 김성준^{1,*}

조선대학교 유전자과학과¹, 루크제약(주)², 우석대학교 식품생명공학과³,
익산대학 특용작물가공과⁴, 전북대학교 식품공학과⁵

Electrofusion of Yeast Cells and Their Genetic Analysis Using RAPD-PCR

Seung Kim¹, Jae-Sung Kim¹, Kumar Sapkota¹, In-Sung Park², Moon-Gu Cho³,
Yeal Park¹, Hong Sung Chun¹, Bong-Suk Choi¹, Se-Eun Park¹,
Han-Suk Choi⁴, Myung-Kon Kim⁵ and Sung-Jun Kim^{1,*}

¹Department of Genetic Engineering, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Gwangju 501-759, Korea

²LUKE Pharmaceutical Co., 368-1 Neungpyung-Li Opo-Eup, Gwangju-Si, 464-892, Korea

³Department of Food Biotechnology, Woosuk University, Chonbuk, 565-701, Korea

⁴Department of Biotechnology, Iksan National College, 194-5 Ma-Dong, Iksan 570-752, Korea

⁵Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

Received May 29, 2006; Accepted July 18, 2006

In the present study, an attempt has been made to produce hybrid yeast strains of different useful and dominant characteristics. The hybrid yeast strains were produced by electrofusion and their genetic analysis were performed by RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction). The protoplast of *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7904 and *Zygosaccharomyces rouxii* KCTC 7966 were obtained above 92% when treated with lyticase at 30°C for 60~90 min after the pretreatment of 1~2% 2-mercaptoethanol at 30°C for 15~20 min. The fusant was produced from paired protoplast stage under the electric pulse at high frequency conditions (1.5 MHz/50 pV, 615 V/256 μsec) within glass-platinum made electrofusion chamber. Changes in RAPD patterns in mother cells and hybrid cells proved that the fusant contains two types of yeast gene originated from its parent. Furthermore, fermentation characters exhibits by the fusant cell confirmed its genetic changes. These results suggest that genetically stable hybrid yeast strains of economic importance can be produced by electrofusion technique and these electrofused yeast cells have an enormous impact in biotechnology and biomedicine.

Key words: Yeast, Protoplast, Electrofusion, Fusant, Random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction

서 론

효모는 식품 미생물학 상 매우 중요한 미생물로서 알코올 발효력이 강한 종이 많아 오래전부터 주류의 양조와 알코올제조는 물론 제빵용으로 이용되어 왔다. 특히 효모의 균체성분과 대사과정이 밝혀지면서 인류의 생활에 대한 효모의 유용성은 더욱 증가되고 있다. 효모균체는 고등동물에 우수한 영양원으로 이용되는 동시에 중요한 생화학물질의 보고이며, 또한 효모의

대사작용을 이용하여 여러 종류의 유용물질생성 등 앞으로 주류와 빵의 발효 같은 전통적인 분야 외에 효모관련 산업은 더욱 발전될 것으로 예상하고 있다^{1,2}. 종래 발효공업에서는 유용균주를 자연계에서 분리·선별하거나 변이주를 육성하여 사용하여 왔으나, 최근에는 유전자 조작 기술이나 세포융합법을 응용하여 과거 이용하지 못하였던 자원을 이용할 수 있는 상태로 변환시키거나 목적산물을 더욱 효율적으로 생산하는 연구가 활발히 진행되고 있다^{3,4}. 균주개량은 우량균주 선발, 돌연변이, 세포융합, 유전자 도입의 4가지로 나누어진다. 세포융합법은 과정이 비교적 간단하고 형성된 원형질체는 정상세포로 재생될 수 있어 경제적이며, 생활사가 불분명한 종의 유전학적 분석이 가능할 뿐 만 아니라 융합대상 세포의 DNA를 손상시키지 않고

*Corresponding author

Phone: +82-62-230-6664; Fax: +82-62-230-6664

E-mail: sjbkim@chosun.ac.kr

전환시키는 장점이 있어 현재 동종간⁵⁾, 이종간 또는 이속간⁶⁾도 많이 실시되고 있다. 즉, 세포융합법은 돌연변이법에 비해 균주 개량의 확률이 높고, 안전하며, 유전자 도입방법에 비해 적은 비용과 간편한 분석방법을 이용할 수 있고, 미생물 고유의 특성에 구애받지 않고, 새로운 종류의 미생물을 얻을 수 있다는 장점을 가지고 있다. 미생물의 세포융합방법은 크게 물리적, 화학적 방법으로 나누어진다. 화학적 방법은 융합과정을 직접 확인할 수 없을 뿐만 아니라 융합과정에 소요되는 시간이 연장되기도 하며, 또한 세포내 물질의 소실로 인하여 융합체의 생존능력이 감소되면서 비교적 낮은 융합율을 나타내는 단점이 있다⁷⁾. 이와 같은 화학적 방법의 여러 단점을 보완하기 위해 물리적 방법의 일종인 전기융합기술^{3,8)}이 도입되었다. 전기융합 방법은 융합비율이 높고, 세포의 융합과정을 현미경 관찰 하에서 진행하므로 융합의 모든 과정을 관찰할 수 있는 장점이 있다^{4,8-9)}. 뿐만 아니라, 식물세포와 동물세포를 비롯하여 효모와 균류 등 고등균주의 육종 분야에서도 사용이 가능하다¹⁰⁾. 배양 공정에서 고농도의 기질에 대한 내성효모나 내삼투압성 효모를 사용하면 발효생산을 효과적으로 진행시킬 수 있는 장점이 있으나, 효모가 고농도의 기질을 발효할 때 발효시간이 연장되는 단점¹¹⁾이 알려져 있다. 즉, 효모의 빠른 성장속도는 그대로 유지하면서 고농도의 초기 기질에서 빠른 성장특성을 나타내는 효모를 육성하기 위해 많은 연구를 하고 있다¹²⁾. 한편, 세포융합기술에서 문제로 지적되고 있는 것은 융합세포의 확인과 분리방법이다. 발효특성과 같은 일반적인 내용으로는 융합이 되었다는 것의 직접적인 증명이라 할 수 없기 때문이다.

따라서 본 연구에서는 식품 및 제약분야에서 많이 사용하고 있는 건조효모의 생산수율과, 고농도기질을 발효할 수 있는 효모를 전기융합 방법으로 육성하고자 발효효모인 *Saccharomyces cerevisiae*(*S. cerevisiae*)와 내삼투압성 효모인 *Zygosaccharomyces rouxii*(*Z. rouxii*)의 전기융합을 실시하였고, 융합된 세포의 일반적인 형태, 배양특성을 관찰하였으며, 또한 융합체를 확인하기 위한 유전적 분석실험으로 RAPD-PCR 방법¹³⁻¹⁹⁾에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

원형질체 형성 및 세포융합. 12~36시간 동안 배양한 각각의 균체를 멸균증류수로 2회 세척 후 1.5% 2-mercaptoethanol solution에 현탁하여 30°C에서 10~20분간 전처리 후, enzyme solution(lyticase 200 U/ml, 0.2% 2-mercaptoethanol 2.0 ml, KCl 59.64 g/l, KH₂PO₄ 9.53 g/l)을 첨가하여 1 × 10⁷ cells/ml 농도로 재현탁시킨 다음 30°C에서 60~90분간 처리하여 원형질체를 형성시킨다. 원형질체는 1.0~1.2 M sorbitol 용액으로 삼투압을 조절한 뒤 각각의 원형질체를 1:1의 비율로 혼합한 혼합용액을 electrofusion chamber에 넣고 고주파를 발생시켜 paired protoplast(Fig. 1)를 형성시킨 상태에서 고전압 펄스를 반복적으로 가하여 융합체 형성을 유도하였다.

융합세포 재생 및 선별. 융합반응액을 chamber에서 조심스럽게 취해 첫 번째 재생배지(yeast extract 4.0 g/l, peptone 5.0 g/l, dextrose 50 g/l, noble agar 20 g/l)에 도달하고 도달되어진 배

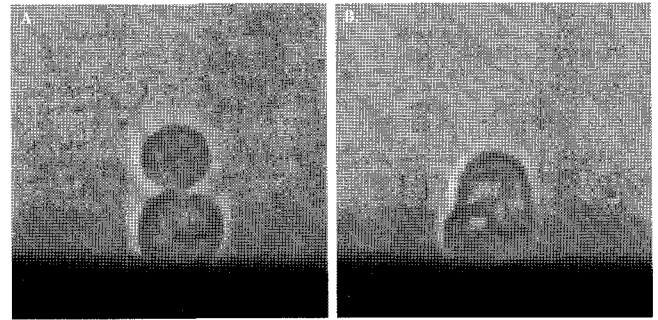


Fig. 1. A photograph of paired protoplast state (A), and fused cell (B). Photograph was taken by CCD system.

지위에 다시 재생배지(yeast extract 4.0 g/l, peptone 5.0 g/l, dextrose 50 g/l, noble agar 8.0 g/l)를 도달한 후, 30°C에서 7일간 배양하여 재생시킨다. 성장한 균체를 다시 dextrose 200 g/l을 함유한 고체배지에 계대하여 성장이 빠른 균체를 선별하여 융합주를 선별하였다. 선별된 융합주를 4°C에서 5개월간 보관시킨 다음, 무작위적으로 single colony를 선택하여 250 ml flask에 50 ml의 YMG20(yeast extract 3.0 g/l, malt extract 3.0 g/l, peptone 5.0 g/l, dextrose 200 g/l) 배지를 넣고, 배양하여 빠른 성장속도(15시간)를 기준으로 성장된 flask와 성장이 되지 않은 flask를 백분율(%)로 계산하여 융합주의 안정성을 확인하였다¹²⁾.

모균주 및 융합주 발효특성. 모균주와 융합주의 탄소원 자화성을 확인하기 위해 glucose, fructose, galactose, maltose, sucrose, lactose, soluble starch, raffinose, dextrin, mannitol를 각각 2%씩 유일한 탄소원으로 함유한 YPD(yeast extract 10 g/l, peptone 20 g/l, dextrose 20 g/l: KCTC 7904), YM-DS(yeast extract 3.0 g/l, malt extract 3.0 g/l, peptone 5.0 g/l, dextrose 50 g/l, sodium chloride 1.0 g/l: KCTC 7966), YM(yeast extract 3.0 g/l, malt extract 3.0 g/l, peptone 5.0 g/l, dextrose 10 g/l: Fusant)배지에 접종하여 48시간 동안 30°C에서 진탕배양 한 다음 탄소원 발효 유무를 세포성장으로 조사하였다.

모균주 및 융합주 내성분석. 모균주와 융합주의 당내성(0~50%)과 염내성(0~18%)을 확인하기 위해 각각의 균주를 glucose와 NaCl이 함유된 YPD, YM-DS, YM 배지에서 12~36시간 배양한 후, 균체의 성장 여부를 660 nm에서 흡광도를 측정하여 O.D. 값으로 비교 분석하였다.

융합주 RAPD-PCR 분석. 융합주의 유전자 분석은 RAPD-PCR 방법을 사용하여 각각의 모균주에서 확인되는 RAPD pattern이 융합체에서도 확인되는지를 조사하였다(Table 1).

융합주 배양. 융합세포의 배양은 seed culture와 main culture로 나누어 실시하였다. Seed culture는 먼저 분리한 융합체를 백금으로 취하여 12~20시간 동안 30°C에서 실시하였다. Main culture는 seed culture 한 배양액 2%(v/v)를 YMG20 배지(yeast extract 3.0 g/l, malt extract 3.0 g/l, peptone 5.0 g/l, glucose 200 g/l)에 접종하여 실시하였다. 또한 실험 비교균주로써 *S. cerevisiae* KCTC 7904, 1202, 1205, 1215의 4가지 균주를 사용하여, 5.0 l 발효조 배양에서 비증식속도(specific growth rate: μ)를 계산하였다.

Table 1. List of random primers used for RAPD-PCR

Primer	Primer sequence
Primer # 515	GGG GGC CTC A
Primer # 516	AGC GCC GAC G
Primer # 517	GGT CGC AGC T

Table 2. Effect of time and concentration of 2-mercaptoethanol on protoplast formation in *S. cerevisiae* and *Z. rouxii*

	Reaction time (min)	2-mercaptoethanol concentration (%)		
		1	1.2	1.5
<i>S. cerevisiae</i>	10	73	79	85
	15	80	83	89
	20	84	88	91
<i>Z. rouxii</i>	10	72	76	80
	15	75	79	83
	20	78	84	89

The values are given in percentage. Data represents the mean of five observations.

Table 3. Effect of time and concentration of lyticase on protoplast formation in *S. cerevisiae* and *Z. rouxii*

	Reaction time (min)	Lyticase concentration (U/ml)		
		100	150	200
<i>S. cerevisiae</i>	30	67	72	87
	40	69	75	89
	50	70	80	90
	60	70.5	84	92
<i>Z. rouxii</i>	60	60	67	81
	70	62	70	85
	80	64	72	87
	90	67	77	90

The values are given in percentage. Data represents the mean of five observations.

결과 및 고찰

원형질체 형성 수율. 융합에 사용된 *S. cerevisiae*는 약 12~16 시간 배양한 세포에서 원형질체 형성비율(91%)이 가장 높았고, *Z. rouxii*는 26~30시간 배양한 세포에서 원형질체 형성비율(90% 이상)이 가장 좋았다. 2-mercaptoethanol이 원형질체 형성에 미치는 효과(Table 2)는 1.5%에서 20분간 처리하는 것이 가장 좋은 결과를 나타내었다. 실험에 사용한 lyticase의 적정농도는 lyticase 200 U/ml이었고, 반응 시간은 Park²⁰⁾의 실험을 토대로 각각 60~90분 동안 처리했을 때가 형성수율(Table 3)이 가장 높음을 확인할 수 있었다.

융합비율 및 재생. 1.5 MHz/50 pV의 고주파를 혼합 반응액에 가하였을 때 paired protoplast가 가장 많이 형성되었으며, 이 상태에서 615 V/256 μ sec의 고전압을 가한 결과 약 25%의 융합체를 얻을 수 있었다. 위의 조건보다 전압이 낮은 경우 융합이 거의 일어나지 않았고, 높은 경우는 protoplast가 융합 중에 터져버리는 경우가 발생하였다. 지금까지 전기융합에서는 pearl chain을 만든 다음 융합을 시킨다고 Urano 등⁹⁾과 Zimmermann^{21,22)}이

Table 4. Assimilation of various carbon sources by the parents and the fusant

Carbon sources	<i>S. cerevisiae</i> KCTC 7904	<i>Z. rouxii</i> KCTC 7966	Fusant
Glucose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Galactose	+	-	+
Maltose	-	+	-
Saccharose	+	-	+
Lactose	-	-	-
Solublestarch	-	-	-
Raffinose	+	-	+
Dextrin	-	+	+
Mannitol	-	-	-

Growth of each yeast strain was measured using spectrophotometer at 660 nm. +: Growth, -: No growth; Each experiment was repeated 5 times.

보고하였으나, 본 연구에서 실험한 결과 pearl chain 상태에서는 융합이 전혀 이루어지지 않았고, 여러 개의 원형질체가 이루어진 pearl chain 보다는 두 개씩 연결된 paired protoplast 상태가 융합률이 훨씬 좋았음을 확인할 수 있었다. 융합 반응액을 electrofusion chamber로부터 세포에 손상이 가지 않게 micropipette으로 조심스럽게 회수하여, 이것을 미리 만들어 놓은 굳기 직전의 2% noble agar가 함유된 재생배지(10 ml)에 0.1 ml을 1차 혼합하고 바로 0.8% noble agar가 함유된 동일한 배지(10 ml)를 융합체 위에 분주하면서 원형질체가 고루 퍼지도록 조심스럽게 혼합하고 배지를 응고시킨다. 이것을 30°C에서 7일간 배양하여 colony를 형성시켜 융합체를 재생시켰다. 이 과정에서 세포벽이 재생되지 않은 융합체는 성장이 불가능하므로 colony를 형성하지 못해 그대로 사멸되는 것을 확인할 수 있었다.

탄소원 발효능력. 친주와 융합주의 탄소원에 대한 발효능력은 Table 4와 같이 실험에 사용한 거의 모든 탄소원에서 *S. cerevisiae*의 성질을 갖는 발효특성을 나타내었다.

융합주의 glucose 내성 및 NaCl 내성. 융합주의 내당성을 조사한 결과 탄소원 소화능력과 달리 내삼투압성 균주인 *Z. rouxii*의 영향으로 glucose 농도로서 50%까지 생육이 가능하였다(Table 5). 이것은 융합주에 *Z. rouxii*의 유전형질이 포함되어 있다는 것을 간접적으로 증명하는 것으로 판단되었으나, 55% 이상에서는 성장이 극히 미미하거나 정지되었다. 또한 융합주의 내염성은 glucose에 대한 내성과 마찬가지로 *Z. rouxii*의 성질이 나타났으며, 배지 내 NaCl 농도를 측정된 결과 15% NaCl 농도에서도 생육이 가능한 것을 확인하였다(Table 6). 한편 융합주의 NaCl에 대한 내성은 *S. diastaticus*와 *C. tropicalis*의 융합주가 8%의 내성을 보였다는 Seo²³⁾의 결과에 비해 약 2배 정도 높은 내성으로 내삼투압성이 요구되는 분야에서 활용이 예상된다. 즉 일반적인 성장과 탄소원의 소화능력은 대표적인 효모균주인 *S. cerevisiae*의 성질을 가지면서 고농도의 당과 염에 대한 내성을 갖는 개량효모 균주를 이용하여 발효시간과 품질을 개선시킨 양조 분야의 응용가능성이 클 것으로 사료된다.

유전 안정성. 융합주는 유전적으로 매우 불안정하여 배양도

Table 5. Glucose tolerance in parents and fusant. Growth of each yeast strain was measured using spectrophotometer at 660 nm

Glucose (%)	<i>S. cerevisiae</i> KCTC 7904	<i>Z. rouxii</i> KCTC 7966	Fusant
0	+	+	+
1	+	+	+
2	+	+	+
5	+	+	+
10	+	+	+
20	+	+	+
30	+	+	+
40	-	+	+
50	-	+	+
55	-	-	-

+: Growth, -: No growth; Each experiment was repeated 5 times.

Table 6. Sodium chloride tolerance in parents and fusant

NaCl (%)	<i>S. cerevisiae</i> KCTC 7904	<i>Z. rouxii</i> KCTC 7966	Fusant
0	+	+	+
3	+	+	+
6	+	+	+
9	+	+	+
12	-	+	+
15	-	+	+
18	-	-	-

Growth of each yeast strain was measured using spectrophotometer at 660 nm. +: Growth, -: No growth; Each experiment was repeated 5 times.

중에 친주로 복귀되는 경우가 많으므로 최소배지(YM agar)에서 1차 배양한 다음 일정기간의 계대배양을 통하여 유전적으로 안정화시켜야 한다. 융합주의 유전적 안정성을 검토하기 위해 5회 계대 배양한 융합주를 저온에서 5개월간 보관한 다음 조사한 결과 고농도의 기질 발효성과 배양시간을 기준으로 비교할 때 약 28% 정도가 친주로 복귀되었다. 융합주의 유전안정성에 대하여는 보관조건 등의 차이에 따라 변동폭이 커질 수 있으나 Lee¹²⁾, Seo²³⁻²⁴⁾, Lin²⁵⁾ 등의 연구결과와 비교할 때 본 실험에서 얻은 융합주는 비교적 안정한 것으로 확인하였다.

RAPD patterns. PCR 처리로 얻은 최종반응산물을 전기영동하여 각각의 균주에서 다양한 band pattern을 얻었다. 융합주의 유전자 특성을 분석하기 위해 먼저 어떤 primer가 *S. cerevisiae*와 *Z. rouxii* 두 종류의 균주 모두에서 각각 특이적으로 반응하여 band를 형성시킬 수 있는지 확인하기 위해 대부분의 primer가 각 균주와 반응하여 발현되는 것을 확인하였다. 합성 primer가 *S. cerevisiae*와 *Z. rouxii*에서 특이하게 반응하여 band를 형성하였고, 두 균주에서 특이성을 보인 primer를 융합체에 적용하여 같은 조건에서 실험한 결과, 융합주는 모균주가 가진 band를 모두 발현함으로써 모균주의 band pattern 특성을 모두 가지고 있음을 Fig. 3과 같이 확인할 수 있었다. 그러나 각 모균주에서는 band가 형성되었지만 융합주가 각 모균주의 band를 모두 가지지 못한 경우도 발생하였는데 이것은 RAPD법에 의

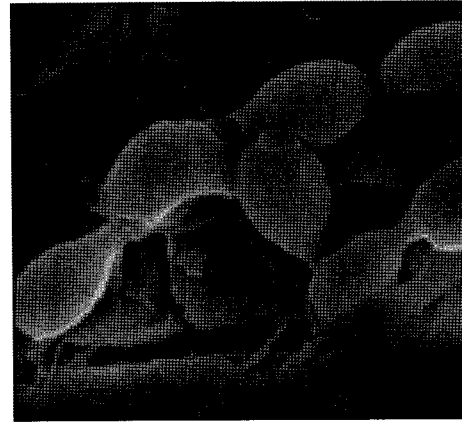


Fig. 2. A photograph of fusant yeast. Photograph was taken by SEM.

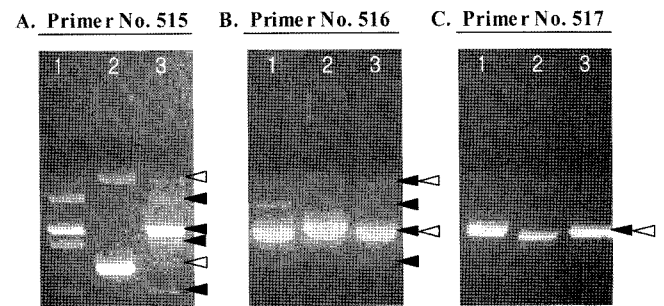


Fig. 3. RAPD pattern of parent strains and fusant. Lane 1, *S. cerevisiae*; Lane 2, *Z. rouxii*; Lane 3, Fusant. < indicates *Z. rouxii*; ◀ indicates *S. cerevisiae*.

한 polymorphism은 한 품종에서는 나타나더라도 다른 품종에서는 나타나지 않거나 동일 품종에서도 재현성의 변이가 있을 수 있기 때문이라고 추측된다.

융합주 회분배양. 융합주의 우수성을 확인하기 위해 사용된 비교 실험균주들의 회분배양에서는 5.0 l fermenter를 이용하여 배양시간에 따른 균체 농도의 변화를 건조 균체량으로 확인하였다. Seed culture는 YMG10 배지(yeast extract 3.0 g/l, malt extract 3.0 g/l, peptone 5.0 g/l, glucose 100 g/l) 50 ml에 각각 균주를 한 백금이씩 접종하여 30°C, 교반속도 150 rpm, 16시간 동안 배양하였다. Main culture는 3.0 l working volume으로 YMG20 배지에서 seed culture 배양액 50 ml를 접종하여 43시간 동안 배양하였다. 그 결과, 배양을 시작한지 15시간이 지나면서 융합주가 다른 균주들에 비해 월등한 성장률을 보여주었고, 건조균체량(Fusant 11.9 g/l, KCTC7904 9.3 g/l, KCTC1202 8.3 g/l, KCTC1205 7.6 g/l, KCTC1215 7.8 g/l)도 다른 균주에 비해 최대는 약 1.5(156.5%)배 정도 향상된 수치를 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 한편, 융합주를 모균주들과 위와 같은 조건으로 회분배양을 실시한 결과, 비교실험과 마찬가지로 15시간이 지나면서 모균주들에 비해 빠른 성장속도를 나타내었고, 건조 균체량을 기준으로 평가할 때 Fusant 11.0 g/l, *S. cerevisiae* 8.0 g/l, *Z. rouxii* 6.0 g/l와 같이 평균 157.1%(최소 138.1%, 최대 176.1%)향상된 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 5).

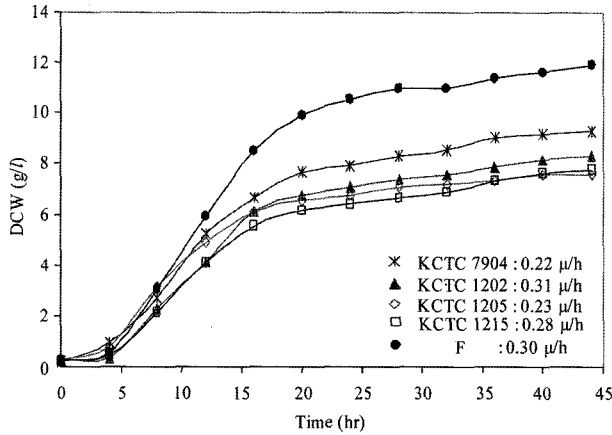


Fig. 4. Growth curve of fusant and other yeast strains. Specific growth rate was calculated using Sigma-plot software. Data represents the mean of five observations. μ , specific growth rate.

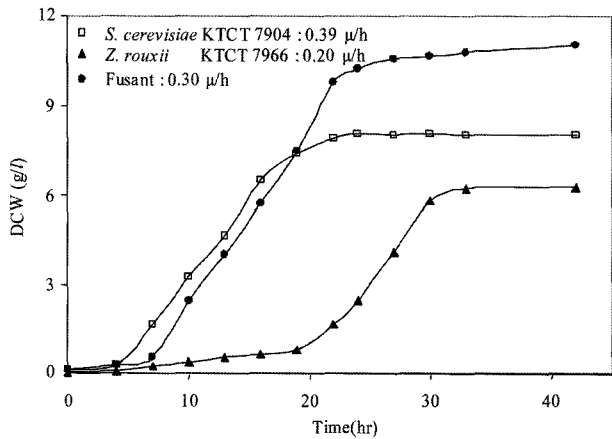


Fig. 5. Growth curve of fusant and other yeast strains. Specific growth rate was calculated using Sigma-plot software. Data represents the mean of five observations. μ , specific growth rate.

초 록

본 연구는 전기적 세포융합방법인 electrofusion을 이용하여 우량균주의 육성을 목적으로 *S. cerevisiae* KCTC7904와 *Z. rouxii* KCTC7966 간의 전기융합을 실시하였고, 융합주의 내당성과 내염성을 확인하였으며, 융합주의 선별방법을 연구하였다. 또한 융합주의 유전안정성과 RAPD-PCR 분석을 통한 융합여부의 직접적인 증거를 확인하고자 실험하였다. *S. cerevisiae* KCTC7904와 *Z. rouxii* KCTC 7966를 각각 12~36시간 배양하여 분리·세척한 다음 1.5% 2-mercaptoethanol로 20분간 전 처리하여 lyticase(200 U/ml)로 30°C에서 최종적으로 60~90분간 처리했을 때, 91% 이상의 원형질체를 얻을 수 있었다. 얻어진 원형질체를 1.0~1.2 M sorbitol 용액으로 세척 한 다음 각각 1:1의 비율로 혼합하여 1.5 MHz/50 pV의 고주파를 가하였을 때 paired protoplast가 형성되었으며, 615 V/256 μ sec의 고전압을 가한 결과 약 25% 정도의 융합체를 얻을 수 있었다. 선별된 융합주의 내당성과 내염성을 각각의 모균주와 비교하여 실험한 결과 50%의 glucose와 15%의 NaCl 을 함유한 배지에서 모두 생육이 가능하여 각각의 균주 특성을 가지고 있음을 확인

하였고, 또한 융합주를 4°C에서 5개월간 보관했을 때 약 28% 정도가 모균주로 복귀되었지만, 72%의 융합안정성을 나타내므로 비교적 안정한 상태를 확인할 수 있었다. 융합의 진위 여부를 증명하기 위해 유전적인 분석방법인 RAPD-PCR 법을 사용하여 실험한 결과 각각의 균주가 agarose gel 상에서 보인 band의 패턴이 융합주에서도 모두 보여짐을 확인하였다.

Key words: Yeast, Protoplast, Electrofusion, Fusant, Random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction

감사의 글

이 논문은 2006년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 수행되었음.

참고문헌

- Randez-Gil F., Sanz P. and Prieto J. A. (1999) Engineering baker's yeast: room for improvement. *Trends Biotechnol.* **17**, 237-244.
- Stanton C., Ross R. P., Fitzgerald G. F. and Sinderen D. V. (2005) Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 198-203.
- Mukai N., Nishimori C., Fujishige I. W., Mizuno A., Takahashi T. and Sato K. (2001) Beer brewing using a fusant between a sake yeast and a brewer's yeast. *J. Biosci. Bioeng.* **91**, 482-486.
- Kavanagh K. and Whittaker P. A. (1996) Application of protoplast fusion to the nonconventional yeast. *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 45-51.
- Thompson J. K., McConville K. J., Nicholson C. and Collins M. A. (2001) DNA Cloning in *Lactobacillus helveticus* by the Exconjugation of Recombinant mob-Containing Plasmid Constructs from Strains of Transformable Lactic Acid Bacteria. *Plasmid.* **46**, 188-201.
- Seo, J. H., Kim Y. H., Jun D. Y. and Lee J. T. (1986) A study on strain improvement by protoplast fusion between amylase secreting yeast and alcohol fermenting yeast (I, II). *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 305-318.
- Zachrisson, A. and Bornman C. H. (1986) Electromanipulation of plant protoplasts. *Physiol. Plant.* **67**, 507-516.
- Choi S. H., Sung C., Oh M. J. and Kim C. J. (1997) Intergeneric protoplast fusion in *Saccharomycopsis fibuligera* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* **84**, 158-161.
- Urano N., Higashikawa R. and Hirai H. (1998) Effect of mitochondria on electrofusion of yeast protoplasts. *Enzyme Microb. Technol.* **23**, 107-112.
- Finaz, C., Lefevre A. and Teissie J. (1984) Electrofusion: A new highly efficient technique for generating somatic cell hybrids. *Exp. cell Res.* **150**, 477-482.
- Lee D. W., Koh Y. S., Kim K. J., Kim B. C., Choi H. J., Kim D. S., Suhartono M. T. and Pyun Y. R. (1999) Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**, 393-400.
- Lee J. S. (1988) Strain improvement by protoplast fusion

- between thermophilic yeast and osmotolerant yeast, In Ph. D. thesis of Chungnam Univ. Republic of Korea, pp. 1-11.
13. Fadda M. E., Mossa V., Pisano M. B., Deplano M. and Cosentino S. (2004) Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **95**, 51-59.
 14. Theelen B., Silvestri M., Guého E., Belkum A. V. and Boekhout T. (2001) Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLPTm), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *FEMS Yeast Res.* **1**, 79-86.
 15. Barszczewski W. and Robak M. (2004) Differentiation of contaminating yeasts in brewery by PCR-based techniques. *Food Microbiol.* **21**, 227-231.
 16. Couto B., Vogels M. M., Hofstra J., Huis-in't-Veld H., Vossen J. and Van-der J. (1995) Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy: two identification techniques for food-borne yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* **79**, 525-535.
 17. Gomes L. H., Duarte K. M. R., Argueso J. L., Echeverrigaray S. and Tavares F. C. A. (2000) Methods for yeast characterization from industrial products. *Food Microbiol.* **17**, 217-223.
 18. Couto B., Vossen M. M., Van-der J., Hofstra J. and Huis-in't-Veld H. (1994) RAPD analysis: a rapid technique for differentiation of spoilage yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 249-260.
 19. Grando M. S., Ubeda J. and Briones A. I. (1994) RAPD analysis of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains differentiated by pulsed field gel electrophoresis. *Biotechnol. Tech.* **8**, 51-560.
 20. Park I. S. (1999) Studies on the protoplast formation and electrofusion for the improvement of yeast strains. In M.S. thesis of Woosuk Univ. Republic of Korea, pp. 18-19.
 21. Zimmermann U. and Vienken J. (1982) Electric field-induced cell-to-cell fusion. *In J. Membrane Biol.* **67**, 165-182.
 22. Zimmermann U. (1983) Electrofusion of cell: principles and industrial potent. *Trends Biotechnol.* **1**, 149-155.
 23. Seo J. H., Kim Y. H., Jun D. Y. and Lee J. T. (1986) A study on strain improvement by protoplast fusion between amylase secreting yeast and alcohol fermenting yeast (Part1) Isolation and characterization of fusant between *S. cerevisiae* and *S. diastaticus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 305.
 24. Seo J. H., Kim Y. H., Jun D. Y. and Yi C. H. (1986) A study on strain improvement by protoplast fusion between amylase secreting yeast and alcohol fermenting yeast (Part 2) alcohol and glucoamylase productivities of fusant between *S. cerevisiae* and *S. diastaticus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 311.
 25. Lin C. C., Hsieh P. C., Mau J. L. and Teng D. F. (2005) Construction of an intergeneric fusion from *Schizosaccharomyces pombe* and *Lentinula edodes* for xylan degradation and polyol production. *Enzyme Microb. Technol.* **36**, 107-117.