

## 유당 자화 효모간의 원형질체 융합

최원기·전순배\*·이용규\*\*·배 석\*·이진종\*·이 향\*

전남대학교 화학과, \*생물학과, \*\*낙농학과

## Protoplast Fusion of Lactose Assimilating Yeasts

Choi, Won-Ki, Soon-Bai Chun\*, Yong-Kyu Lee\*\*, Suk Bai\*, Jin-Jong Lee\* and Hyang Lee\*

Dept. of Chemistry, \*Biology, \*\*Dairy Science, Chonnam National University, Kwang-ju, Korea

**ABSTRACT:** Intergeneric or intraspecific protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A, *Candida pseudotropicalis* ATCC 8619 and CBS 607 was attempted to produce ethanol from lactose containing materials. The intergeneric fusion frequency between *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A (*ade rho*) and *Candida pseudotropicalis* CBS 607 (*his met*) was  $1.0 \times 10^{-5}$ . These values exhibited approximately 2-3.5 fold increase when compared with fusion frequency obtained without the treatment of bovine serum albumin, myoinositol and ergosterol, suggesting that these compounds may improve intergeneric or intraspecific protoplast fusion. Nuclear fusion appears to occur in fusants between intergenera (*S. cerevisiae* + *C. pseudotropicalis*) and intraspecies (*C. pseudotropicalis* strains) as strongly suggested by DNA content, nuclear staining, comparison of survival rate to UV light and isolation of recombinants after mitotic segregation. It was also found that alcohol production from intraspecific hybrids was somewhat increased when compared with that from their parents.

**KEY WORDS** □ *Saccharomyces cerevisiae*, lactose assimilation, protoplast fusion, alcohol production

치즈 생산시에 부산물로 나오는 유청(Whey)은 환경오염원이 될 수 있는 산업폐기물로서 그 속에 상당량 함유되어 있는 유당을 이용하여, 알코올,  $\beta$ -D-galactosidase 그리고 단세포성 단백질을 얻을 수 있다. 유당 발효능이 있는 *Kluyveromyces fragilis*나 *Candida pseudotropicalis*와 같은 효모를 이용하여 저유당 유제품제조시 필요로 하는  $\beta$ -D-galactosidase나 사료용 단세포성 단백질 생산에 관한 연구 보문은 많으나(Castillo와 Moreno 1983; Castillo와 de Sanchez, 1978; Gilland와 Stewart, 1980; Mahoney 등, 1977; O'Leary 등, 1977; Sonia 등, 1979; Wendorff와 Amundson, 1971) 알코올 생산에 관한 연구사례는 많지 않다(Izaguirre와 Castillo, 1982). 이는 이들 균종의 알코올 생산능이나 내성이 *Saccharomyces*

*cerevisiae*에 미치지 못하기 때문이다.

본 연구에서는 농축유청에 대한 알코올 발효능이 좋은 *Candida pseudotropicalis* ATCC 8619 strains과 세포용적이 비교적 큰 CBS 607 strains 그리고 알코올 발효능이나 내성이 있는 *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A strains을 이용하여 몇가지 돌연변이원으로 제조한 돌연변이 균주들중 생장율이 양호하고 역돌연변이율이 원형질체 융합에 적합한 균주를 선택하여 이들로부터 원형질체 형성 및 재생물에 대한 bovine serum albumin, myoinositol 그리고 ergosterol의 증진 효과를 검토하였으며 *C. pseudotropicalis* ATCC 8619와 CBS 607 strains간의 종내 융합과 *S. cerevisiae* 간의 속간 원형질체 융합으로 얻어진 융합체들에 대한 특성을 조사하였다.

\*본 연구는 문교부 학술연구 조성비(1986)의 지원에 의한 것임.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 보관

사용균주는 *Candida pseudotropicalis* ATCC 8619, CBS 607 그리고 *Saccharomyces cerevisiae* ×2180-1A를 YM(0.3% yeast extract, Difco; 0.3% malt extract, Difco; 0.5% Bacto peptone, Difco; 1% Glucose; 2% Bacto agar, Difco) 평판배지에서 colony가 형성될 때까지 30°C에서 3~4일간 배양한 후 YM 한천 사면배지에 옮겨 3~4일간 배양하여 4°C에 유지, 보관하고 4주마다 계대배양 하였다.

### 영양요구성 돌연변이 균주의 제조

Poulter 등(1981)과 Fink(1970)의 방법에 따라 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG, Sigma)와 ethylmethane sulfonic acid(EMS, Sigma)를 이용하여 영양요구성 돌연변이 균주를 제조하고 *rho* 돌연변이 균주의 제조는 Coruzzi 등(1979)과 Ogur 등(1957)의 방법에 의하여 분리, 확인하였다.

### 원형질체 형성 및 재생

원형질체 형성 및 재생은 Chun과 Bai(1984)의 방법을 약간 수정하여 실시하였는데 세포벽 제거 효소인 Novozym 234(Novo Industrias, Denmark)의 농도는 *S. cerevisiae* ×2180-1A의 경우 3mg/ml, 그리고 *C. pseudotropicalis* ATCC 8619의 경우 1mg/ml를 사용하였다. 원형질체 형성 및 재생증진 효과를 알아보기 위하여 myoinositol은 *S. cerevisiae*의 경우 0.1mg/ml, *C. pseudotropicalis* ATCC 8619의 경우 0.5mg/ml를 전배양시 첨가하였으며, ergosterol은 *S. cerevisiae* ×2180-1A의 경우 0.04mg/ml를, *C. pseudotropicalis* ATCC 8619의 경우에는 0.06mg/ml를 첨가하였다. 한편, 원형질체 형성 완충용액에 양쪽 모두 4mg/ml의 bovine serum albumin(BSA, Sigma)를 첨가하였다.

### 원형질체 융합

원형질체 융합은 Chun 등(1986)의 방법에 따라 35% polyethylene glycol(PEG, M. W. 4,000, Sigma)과 10-100mM CaCl<sub>2</sub>가 들어있는 완충용액(pH 6.0)에서 30분간(30°C) 유지시켜 융합을 유도하였다.

### 융합체의 특성

융합체의 특성은 DNA 정량(Stewart, 1975), 핵 염색(Fournier, 1977), UV 조사에 따른 생존력 비교(Olaiya와 Sogin, 1979), 세포체적 측정과 형질분리분석(Wilson 등, 1982)으로 확인하였고, 융합체로부터 생성된 알코올은 Gas chromatography(Shimadzu Co.)에서 Chromosorb Column을 이용, methanol을 internal standard로 하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 돌연변이 균주의 제조 및 역돌연변이율

몇가지 돌연변이원을 이용하여 *Saccharomyces cerevisiae* ×2180-1A(a mating' type)로부터 6균주, *Candida pseudotropicalis* ATCC 8619로부터 7균주의 영양요구성 돌연변이 균주를 각각 분리하였다. 그중 *S. cerevisiae*의 경우 adenine threonine(*ade thr*) 요구성 균주와 *ade rho* 균주가, *C. pseudotropicalis*에서는 valine(*val*), tryptophan(*trp*) 그리고 methionine valine(*met val*) 요구성 균주가 비교적 생장율도 양호하고 원형질체 형성을 및 재생율도 높았으며, 이들의 역돌연변이율은  $1.8 \times 10^{-9} \sim 1.6 \times 10^{-7}$ 으로 원형질체 융합과 유전적 연구분석에 적합하였다(Table 1).

### 원형질체 형성 및 재생

예비실험 결과, 효모세포벽 제거효소로 널리 사용되고 있는 Zymolase(60,000U. Kirin brewing Co. Japan)보다는 *C. pseudotropicalis* ATCC 8619와 CBS 607 간의 종내 융합이나 *S. cerevisiae* ×2180-1A간의 속간 융합에는 Novozym 234가 효과적임을 알게 되었다. 융합율을 보다 증진하기 위하여 Bai(1987)의 방법에 따라 *C. pseudotropicalis* ATCC 8619와 *S. cerevisiae*의 원형질체 형성 및 재생에 미치는 BSA, myoinositol 그리고 ergosterol의 증진효과를 조사하였던 바 Table 2에서 보여준 것과 같이 원형질체 형성율은 91.2-98.8%로 첨가되지 않은 대조구(73.9-97.5%)에 비해 향상되었으며 재생율의 경우에서도 1.4-3.0배의 증진효과가 있었다.

이와 같은 결과는 *C. pseudotropicalis* CBS

**Table 1.** Spontaneous reversion frequency of auxotrophic mutants.

Yeast Species and auxotrophic strains	Mutagen	Reversion frequency
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> X2180-1A		
<i>ade thr</i>	EMS-UV	$3.5 \times 10^{-9}$
<i>ade rho</i>	EMS-MnCl <sub>2</sub>	$1.8 \times 10^{-9}$
<i>Candida pseudotropicalis</i> ATCC 8619		
<i>val</i>	NTG	$1.2 \times 10^{-8}$
<i>trp</i>	NTG	$1.6 \times 10^{-7}$
<i>met val</i>	NTG	$4.8 \times 10^{-8}$
<i>Candida pseudotropicalis</i> CBS 607 <sup>a</sup>		
<i>his met</i>	NTG	$1.1 \times 10^{-9}$
<i>his asn</i>	NTG	$2.5 \times 10^{-9}$

<sup>a</sup> Data from Bai, 1987

Values are the average of three experiments.

**Table 2.** Protoplast formation and regeneration frequency of auxotrophic mutants.

Yeast species and auxotrophs	Protoplast	
	formation (%)	Regeneration (%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> X2180-1A		
<i>ade thr</i>	98.1 (74.0) <sup>a</sup>	24.3 (6.4)
<i>ade rho</i>	97.8 (79.7)	28.2 (20.9)
<i>Candida pseudotropicalis</i> ATCC 8619		
<i>trp</i>	91.2 (74.0)	45.6 (15.0)
<i>val</i>	94.3 (83.3)	4.5 (1.1)
<i>met val</i>	95.6 (75.2)	28.4 (14.3)
<i>Candida pseudotropicalis</i> CBS 607 <sup>b</sup>		
<i>his met</i>	98.8 (97.5)	42.0 (19.1)
<i>his asn</i>	97.5 (94.0)	37.3 (15.6)

<sup>a</sup> Indicates the frequency of protoplast formation and regeneration from cells not treated with BSA, myoinositol and ergosterol.<sup>b</sup> Data from Bai, 1987.

Values are the average of three experiments.

607 strains의 결과(Bai, 1987)와 일치하였다. 그러나 *C. pseudotropicalis* ATCC 8619의 valine 요구성 균주의 경우 원형질체 재생율이 1.1%였고 세가지 첨가물을 처리했을 때에도 4.5%로 증진되

기는 하였으나 다른 돌연변이 균주에 비해 재생율의 수준이 매우 낮은 것은 Ghosh 등(1960)이 보고한 바와 같이 돌연변이 후에 비정상적 세포벽 합성이 하나의 원인이 될 수 있다.

#### 원형질체 융합

*S. cerevisiae* ×2180-1A, *C. pseudotropicalis* ATCC 8619 그리고 CBS 607로부터 상보적 영양 요구성 균주들의 속간 및 종내 융합율을 조사하였다. 35% PEG, 10-100 mM CaCl<sub>2</sub>가 첨가된 citrate phosphate 완충용액(pH 6.0)에서 30분동안 원형질체 융합을 유도한 결과, Table 3에서 보여준 바와 같이 BSA, myoinositol 그리고 ergosterol을 첨가한 처리구가 비처리구에 비해 종내는 물론 속간에서도 융합율의 향상이 있었다.

속간 융합의 경우 *Zygosaccharomyces fermentati*와 *S. cerevisiae* 사이의 융합율이  $2.1 \times 10^{-7}$ - $6.7 \times 10^{-5}$ (Pina 등, 1986) 그리고 *S. cerevisiae*와 *C. tropicalis*에서는  $9.6 \times 10^{-6}$ - $1.8 \times 10^{-4}$ (Kim과 Seu, 1985)으로 본 실험의 *S. cerevisiae*와 *C. pseudotropicalis*의 융합율  $1.0 \times 10^{-5}$ 과 유사하였다. 한편, strains이 다른 *C. pseudotropicalis*의 종내 융합(ATCC 8619+CBS 607)에서 융합율은  $3.9 \times 10^{-6}$ - $1.0 \times 10^{-4}$ 으로 *Schwanniomyces alluvius*의  $1.5 \times 10^{-6}$ (Wilson 등, 1977)과는 유사했으나 *C. albicans*의  $1.3 \times 10^{-4}$ - $9.1 \times 10^{-4}$ (Pesti와 Ferenczy, 1982), *Schizosaccharomyces pombe*의  $1.7 \times 10^{-3}$ (Sipiczki와 Ferenczy, 1977b), *Saccharomycopsis lipolytica*의  $5.0 \times 10^{-4}$ - $1.5 \times 10^{-3}$ (Stahl, 1978) 그리고 *C. pseudotropicalis* CBS 607의 같은 strains내의 융합율인  $7.0 \times 10^{-4}$ - $1.5 \times 10^{-3}$ (Bai,

**Table 3.** Fusion frequency between complementary auxotrophs.

Phenotype	Fusion frequency
<i>his met</i> + <i>val</i>	$1.0 \times 10^{-4}$ ( $8.8 \times 10^{-5}$ ) <sup>a</sup>
<i>his met</i> + <i>trp</i>	$3.9 \times 10^{-6}$ ( $1.1 \times 10^{-6}$ )
<i>his asn</i> + <i>met val</i>	$1.3 \times 10^{-5}$ ( $4.5 \times 10^{-6}$ )
<i>his met</i> + <i>ade rho</i> <sup>b</sup>	$1.0 \times 10^{-5}$ ( $3.6 \times 10^{-6}$ )

<sup>a</sup> Indicates the fusion frequency of protoplasts formed from cells treated with BSA, myoinositol and ergosterol. Values are the average of three experiments.<sup>b</sup> Intergeneric fusants between *S. cerevisiae* and *C. pseudotropicalis* CBS 607.

1987)에 비하여 낮은 경향을 나타내어 같은 종일 지라도 strains이 다른 균주끼리의 원형질체 융합 일 경우에는 융합율이 떨어지는 것으로 사료되었다.

#### 융합체의 특성

*C. pseudotropicalis*의 strains ATCC 8619 (*val*, *trp* 그리고 *met val*)와 strains CBS 607 (*his met*와 *his asn*) 사이에서 얻은 종내 융합균 주종 F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> 그리고 F<sub>5</sub>에 대한 세포당 체적 및 DNA 함량을 측정하여 본 결과 Table 4에서 보여준 바와 같이 체적과 DNA 양이 2배나 그 이상으로 증가되었다.

F<sub>1</sub>의 경우 세포당 DNA 양이 양친인 CBS 607 (*his met*, 22.9±0.6 fg/cell)과 ATCC 8619 (*trp*, 32.7±1.2 fg/cell)의 DNA 양을 합한 55.6±0.9 fg/cell에 근사치인 59.6±1.2 fg/cell 이었고 체적은 약 2.8배 이었다.

ATCC 8619 strains이 CBS 607에 비해 세포당 DNA 함량이 약 1.5배나 많아 이의 ploidy 상태를 알아보기 위해 Olaiya와 Sogin(1979)의 *Candida*

*albicans*, Chang 등(1984)의 *Candida maltosa*, 그리고 Bai(1987)의 *Candida pseudotropicalis* CBS 607 등에서와 같이 UV조사에 대한 균의 생존력으로 ploidy 상태를 예측할 수 있음을 시사한 바 있기에 융합체들과 이의 양친에 대한 UV조사 후 생존력을 비교하였다. Fig. 1에 표시된 A에서 보여준 바와 같이 strains ATCC 8619(*trp*)와 CBS 607(*his met*)은 UV에 대한 감수성과 세포 불활성(기울기)의 양상이 거의 비슷하였고, 이들의 융합체인 F<sub>1</sub>은 Fig. 1의 D에서 보여준 CBS 607(*his met*)과 *S. cerevisiae* × 2180-1A(*ade rho*)의 속간 융합균주들(F<sub>6</sub>, F<sub>7</sub>, F<sub>8</sub> 그리고 F<sub>9</sub>)과도 비슷한 양상을 보였다.

이같은 결과는 ATCC 8619의 ploidy가 haploid 상태임을 암시하고 있다. 그런데 핵 염색의 결과 F<sub>1</sub>세포들의 핵이 하나이고, 양친의 그것에 비해 크며(Plate 1) 세포의 크기, 군체의 형태 등에서도 균일할 뿐 아니라 형질분리를 유도하였으나 전혀 분리형을 찾아볼 수 없었다.

또 Fig. 2에서 보여준 바와 같이 고농도의 유당

Table 4. Cell size, volume and DNA content of parental strains and intraspecific fusion hybrids.

strain	mean length ( $\mu$ m)	mean width ( $\mu$ m)	mean volume ( $\mu$ m <sup>3</sup> )	DNA / cell (fg/cell)	ploidy (n) <sup>a</sup>
<i>C. pseudotropicalis</i> ATCC 8619					
<i>val</i>	6.2 ± 1.0	4.3 ± 0.6	59.0 ± 15.8	34.8 ± 0.3	1
<i>trp</i>	5.7 ± 0.8	4.6 ± 0.5	63.8 ± 20.3	32.7 ± 1.2	1
<i>met val</i>	5.7 ± 0.6	4.5 ± 0.5	60.5 ± 17.3	36.0 ± 3.2	1
<i>C. pseudotropicalis</i> CBS 607 <sup>b</sup>					
<i>his met</i>	7.5 ± 0.9	4.0 ± 0.5	65.7 ± 23.4	22.9 ± 0.6	1
<i>his asn</i>	5.6 ± 0.5	5.1 ± 0.4	77.8 ± 18.8	22.6 ± 0.5	1
Fusants:					
<i>his met</i> + <i>trp</i>					
F1	10.0 ± 1.8	5.9 ± 0.9	181.1 ± 47.4	59.6 ± 1.2	2.1
<i>his met</i> + <i>val</i>					
F2	8.8 ± 0.9	5.9 ± 0.8	164.4 ± 49.6	73.8 ± 0.1	2.6
F3	9.8 ± 0.7	5.9 ± 0.7	177.7 ± 36.5	73.2 ± 4.6	2.5
<i>his asn</i> + <i>met val</i>					
F4	8.2 ± 1.1	6.4 ± 0.6	175.0 ± 44.0	71.2 ± 0.3	2.4
F5	8.7 ± 1.0	6.4 ± 0.8	183.8 ± 36.8	68.0 ± 2.9	2.3

<sup>a</sup> For F1, haploid(n) value based on average of parents *his met* + *trp* (27.8 0.9 fg/cell)

For F2 and F3, haploid(n) value based on average of parents *his met* + *val* (28.9 0.5 fg/cell)

For F4 and F5, haploid(n) value based on average of parents *his asn* + *met val* (29.3 1.9 fg/cell)

<sup>b</sup> Data from Bai, 1987.



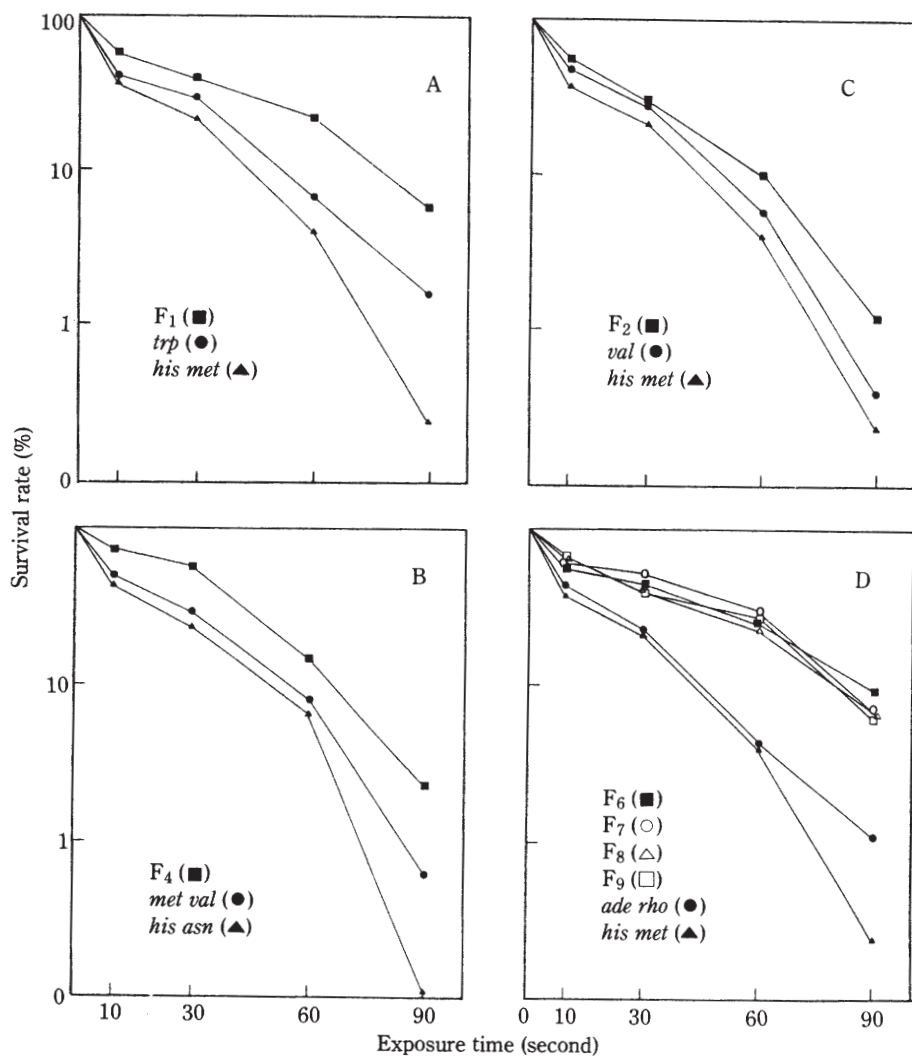


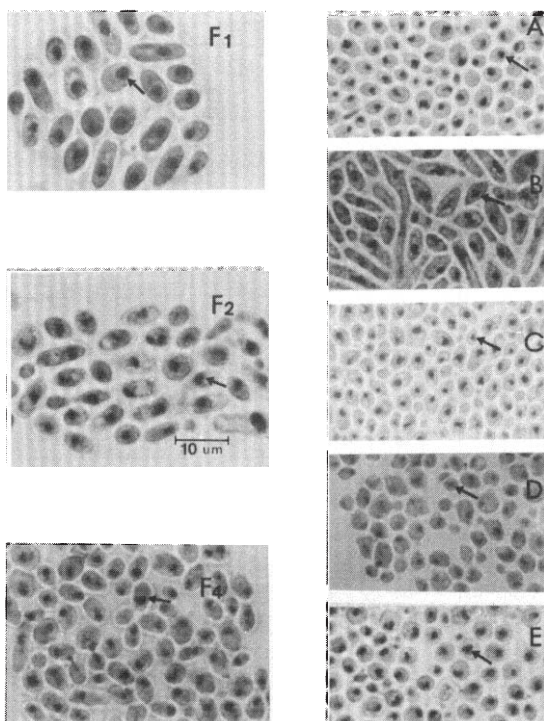
Fig. 1. Survival rate of fusion hybrids as compared with parental strains after exposure to UV light.

(20%)에서 최대 생장율과 저항성이 양친인 ATCC 8619와 유사하였고, 전 농도에 걸쳐서 알코올 생성능이 양친에 비해 향상된 것 등으로 미루어 양친의 생리적 특성이 발현되고 있었음을 알 수 있었다.

이같은 결과들은 핵량이 상이한 두 양친의 haploid genome이 하나의 핵내에 존재하면서 유전적 균형을 이루고 있음을 강력히 시사하고 있다. 한편, CBS 607의 *his met*와 ATCC 8619의 *val*간의 융합균주(*F<sub>2</sub>*와 *F<sub>3</sub>*) 그리고 CBS 607의 *his asn*과 ATCC 8619의 *met val* 사이의 융합균주(*F<sub>4</sub>*와 *F<sub>5</sub>*)에서의 세포당 DNA 함량이  $68.0 \pm$

$2.9-73.8 \pm 0.13$  fg/cell로 외견상 CBS 607 strains의 2개 세포와 ATCC 8619의 1개 세포가 융합한 후 heterocaryon 상태를 거쳐 핵융합이 되는 과정에서 염색체 상실에 의한 핵량의 감소로 genome의 불균형상태를 유지한 것으로 보고 *F<sub>2</sub>*와 *F<sub>4</sub>*를 선택하여 UV 조사에 대한 생존력 (Fig.1)과 형질분리분석 (Table 5)을 실시하였다.

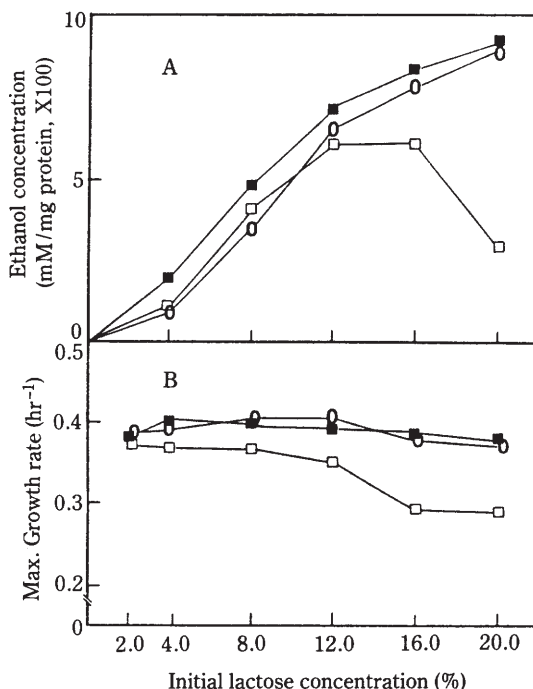
Fig. 1의 B에서 보여준 바와 같이 *F<sub>4</sub>*의 UV에 의한 세포의 불활성도를 양친의 그것과 비교해볼 때 거의 차이가 없음을 볼 수 있었다. 또, Table 5에서 보여준 바와 같이 *his asn*과 *met val* 사이의 융합체로부터 *his met* 분리형이 높은 비율(7.



**Plate 1.** Photomicroscopy of nuclei of intraspecific fusion hybrids and their parents.

Arrows indicate nucleus. F<sub>1</sub>: A(*trp*) + B(*his met*); F<sub>2</sub>: B + C(*val*); F<sub>4</sub>: D(*his asn*) + E(*met val*).

$0 \times 10^{-3}$ )로 나타난 반면에 *val*이나 *asn* 분리형이 전혀 출현하지 않았고, 이들 *his met* 분리형에 대한 세포당 DNA 양도 57.76 fg/cell로 F<sub>4</sub>에 비해 줄어든 것으로 보아 염색체 상실이 일어났음을 엿



**Fig. 2.** Effect of lactose concentration on the ethanol production (A) and growth (B) of F<sub>1</sub> and its parents. Yeast strains were grown in YEP containing lactose as carbon source of 38hr at 30°C on shaker (120 strokes/min). The measurement of ethanol is described in the text.

Symbols: *C. pseudotropicalis* CBS 607 (*his met*) (□); *C. pseudotropicalis* ATCC 8619 (*trp*) (○); Fusion hybrid, F<sub>1</sub> (■). Values are the average of three experiments.

**Table 5.** Mitotic segregation analysis of two fusion hybrids.

	Fusion hybrids			
	F <sub>2</sub> ( <i>his met</i> + <i>val</i> )		F <sub>2</sub> ( <i>his asn</i> + <i>met val</i> )	
	SMS <sup>a</sup>	IMS <sup>b</sup>	SMS	IMS
Total colony screened	2332	2476	1756	1728
Total auxotrophic segregants	0	1	7	12
Frequency of segregation	$> 4.3 \times 10^{-4}$	$4.0 \times 10^{-4}$	$4.0 \times 10^{-3}$	$7.0 \times 10^{-3}$
Parental: <i>his met</i>	0	0	0	0
<i>his asn</i>	0	0	0	0
<i>val</i>	0	0	0	0
<i>met val</i>	0	0	0	0
Recombinant: <i>his met</i>	0	0	7	12
<i>met</i>	0	1	0	0

<sup>a</sup> Spontaneous mitotic segregation

<sup>b</sup> Induced mitotic segregation

**Table 6.** Cell size, volume and DNA content of parental strains and intergeneric fusion hybrids.

strain	mean length ( $\mu\text{m}$ )	mean width ( $\mu\text{m}$ )	mean volume ( $\mu\text{m}^3$ )	DNA / cell (fg/cell)	ploidy (n) <sup>a</sup>
<i>S. cerevisiae</i> x2180-1A <i>ade rho</i>	4.7 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.2	44.4 $\pm$ 6.4	21.8 $\pm$ 0.4	1
<i>C. pseudotropicalis</i> CBS 607 <sup>b</sup> <i>his met</i>	7.5 $\pm$ 0.9	4.0 $\pm$ 0.5	65.7 $\pm$ 23.4	22.9 $\pm$ 0.6	1
Fusants:					
<i>his met</i> + <i>ade rho</i>					
F6	12.0 $\pm$ 1.6	5.1 $\pm$ 1.1	170.8 $\pm$ 53.6	42.2 $\pm$ 0.3	1.9
F7	10.8 $\pm$ 1.9	5.6 $\pm$ 0.8	174.4 $\pm$ 34.6	43.5 $\pm$ 1.7	1.9
F8	9.2 $\pm$ 0.8	6.3 $\pm$ 1.1	191.1 $\pm$ 56.8	48.0 $\pm$ 4.5	2.2
F9	8.5 $\pm$ 0.9	6.2 $\pm$ 0.7	175.1 $\pm$ 46.5	47.3 $\pm$ 4.6	2.1

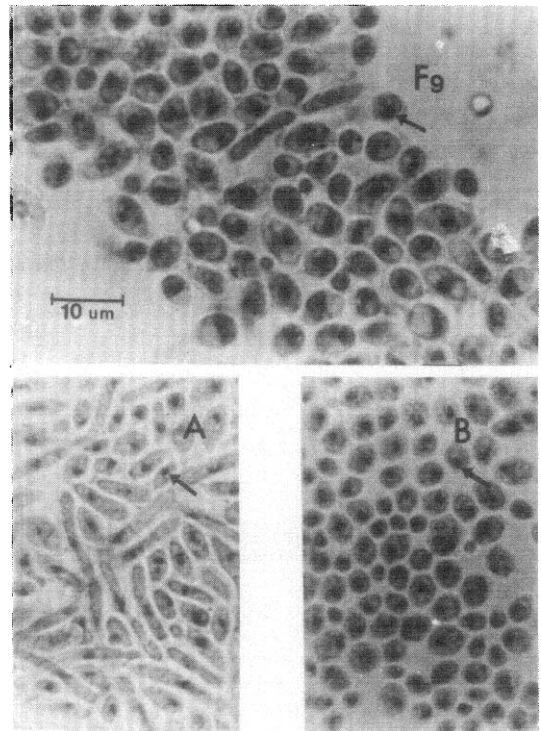
<sup>a</sup> For F6, F7, F8, and F9, haploid(n) value based on average of parents *his met* + *ade rho* (22.4 0.5fg/cell)

<sup>b</sup> Data from Bai, 1987.

볼 수 있었다. 그러나 교잡형의 출현과 핵염색의 결과(Plate 1)로서는 핵 융합이 분명히 일어났음을 알 수 있으나 각 genome간의 염색체 상실에 의한 불균형으로 F<sub>1</sub>과는 달리 UV 조사에 대한 세포의 불활성이 현저한 것으로 보았다. 한편, F<sub>2</sub>의 경우도 UV 조사에 대한 세포의 불활성(Fig. 2)이 현저한 것으로 나타났으나 융합체로부터 *met* 분리형의 비율이  $4.0 \times 10^{-4}$ 으로 F<sub>4</sub>에 비해 매우 낮았으며(Table 5), *his*나 *val* 분리형이 전혀 나타나지 않았고 *met* 분리형의 DNA 양도 73.98 fg/cell로 융합체에 비해 별 변화가 없는 것으로 보아 비교적 안정된 핵융합이 일어났음을 알 수 있었다.

*S. cerevisiae* × 2180-1A(*ade rho*)와 *C. pseudotropicalis* CBS 607(*his met*)로부터 얻은 4종류의 순간 융합체들(F<sub>6</sub>, F<sub>7</sub>, F<sub>8</sub> 그리고 F<sub>9</sub>)의 세포체적 및 DNA 함량을 양친의 그것과 비교해 보았을 때 약 2배 이었다(Table 6).

핵융합과 ploidy 상태를 알아보기 위해 핵염색과 UV 조사에 대한 생존력(Fig. 2)을 조사하였다. 이들 융합균주의 핵은 양친에 비해 크고 세포당 1개가 존재하고 있었고(Plate 2), Fig. 2의 D에서 보여준 바와 같이 UV에 대한 생존력을 양친의 그것과 비교해 볼 때 양친의 genome이 하나의 핵내에 존재하고 있음을 확인할 수 있었으나 융합체들은 매우 불안정하였다. *C. pseudotropicalis* ATCC 8619 strains에 대한 species의 특성은 밝혀져야 할 것으로 보며 이와 더불어 F<sub>1</sub> 융합체들의 유전적



**Plate. 2.** Photomicroscopy of nuclei of intergeneric fusion hybrid and its parents.

Arrows indicate nucleus. F<sub>9</sub>: A(*C. pseudotropicalis* CBS 607, *his met*) + B(*S. cerevisiae*, *ade rho*)

및 산업적 응용에 관한 연구의 필요성이 요망된다.

# 적 요

유당합유 물질로부터 알코올을 생산하기 위해 *Saccharomyces cerevisiae* ×2180-1A, *Candida pseudotropicalis* ATCC 8619와 CBS 607 사이에 속간 및 종내 원형질체 융합을 시도하였다.

*S. cerevisiae* ×2180-1A(*ade rho*)와 *C. pseudotropicalis* CBS 607(*his met*)간의 속간 융합율은  $1.0 \times 10^{-6}$ 이고 *C. pseudotropicalis* ATCC 8619와 CBS 607 사이의 종내 융합율은  $3.9 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-4}$  이었다. 이는 bovine serum albumin, myoinositol 그리고 ergosterol을 처리하지 않고 얻어진 원형질체 융합율과 비교해서 약 2-3, 5배의 증가를 보여 이들 화합물이 속간 및 종내 융합을 증진시킨 것으로 사료된다. DNA 함량, 핵염색, UV 조사에 따른 생존력 비교 그리고 형질분리 후 교잡형 출현 등을 통해서 속간(*S. cerevisiae*와 *C. pseudotropicalis*)과 종내(*C. pseudotropicalis* strains) 융합체에서 핵융합이 일어난 것을 알 수 있었다. 또한 양친형과 비교해서 알코올 생성능이 증가된 종내 융합체를 얻었다.

## REFERENCES

- Bai, S. 1987. Protoplast fusion in the yeast, *Candida pseudotropicalis* CBS 607 Ph. D. thesis. Chonnam National University, Korea.
- Burton, K. 1968. Determination of DNA concentration with diphenylamine. In: Methods in Enzymology. Colowick, S.P. and N.D. Kaplan(ed.), Academic Press Inc., New York, Vol. 12, p. 163-166.
- Castillo, F.J. and B. Moreno. 1983. Properties of lactose produced by *Candida pseudotropicalis*. *J. Dairy Sci.* **66**: 1616-1621.
- Castillo, F.J. and S.B. de Sanchez. 1978. Studies on the growth of *Kluyveromyces fragilis* in whey for the production of yeast protein. *Acta. Cient Venez.* **29**: 113-118.
- Chang, M.C., H.K. Jung, T. Suzuki, M. Takagi and K. Yano. 1984. Ploidy in the asporogenous yeast *Candida maltosa*, isolation of its auxotrophic mutants and their cell fusion. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **30**: 489-497.
- Chun, S.B. and S. Bai, 1984. Formation and regeneration of protoplasts by Novozym 234 from *Kluyveromyces fragilis* N100 and *Candida pseudotropicalis* CBS 607. *Korean J. Microbiol.* **22-1**: 49-56.
- Coruzzi, M., K. Trembath and A. Tzagoloff. 1979. The isolation of mitochondrial and nuclear mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with specific defects in mitochondrial function. In Methods in Enzymology, Academic Press Inc., New York, Vol. 56, p. 95-106.
- Farahnak, F., T. Seki, D.Y. Ryn and D. Ogrydziak. 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, 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.
- Ghosh, A., F. Charalampous, Y. Sison and R. Borer. 1960. Metabolic functions of myoinositol I. Cytological and chemical alterations in yeast resulting from inositol deficiency. *J. Biol. Chem.* **225**: 2522-2528.
- Gilland, S.E. and C.F. Stewart. 1980. Amount of yeast and whey protein recovered from cottage cheese whey cultured with *Kluyveromyces fragilis*. *J. Dairy Sci.* **63**: 989-990.
- Izaguirre, M.E. and F.J. Castillo. 1982. Selection of lactose-fermenting yeast for ethanol production from whey. *Biotech. Lett.* **4**: 257-262.
- Kim, Y.H. and J.H. Seu. 1985. Conditions for intergeneric protoplast fusion of yeast. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**: 383-389.
- Mahoney, R.R., T.A. Nickerson and J.R. Whitaker. 1977. Selection of strain, growth conditions and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Dairy Sci.* **58**: 1616-1621.
- Ogur, M., R.S. John and S. Nagai. 1957. Tet-



- razolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast. *Science* **18**: 928-929.
17. Olaiya, A.F. and S.J. Sogin. 1979. Ploidy determination of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **140**: 1043-1049.
  18. O'Leary, V.S., R. Green, B.C. Sullivan and V.H. Halsinger. 1977. Alcohol production by selected yeast strains in lactose hydrolysed acid whey. *Biotech. Bioeng.* **19**: 1019-1035.
  19. Pesti, M. and L. Ferenczy. 1982. Protoplast fusion hybrids of *Candida albicans* sterol mutants differing in nystatin resistance. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 123-128.
  20. Pina, A., I.L. Calderon and T. Benitez. 1986. Intergeneric hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces fermentati* obtained by protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 995-1003.
  21. Poulter, R., K. Jeffery, M.J. Hubbard, H.G. Shepherd and P.A. Sullivan. 1981. Parasexual genetic analysis of *Candida albicans* by spheroplast fusion. *J. Bacteriol.* **146**: 833-840.
  22. Provost, A., C. Bourguignon, P. Fournier, A.M. Riber and H. Helslot. 1978. Intergeneric hybridization in yeast through protoplast fusion. *FEMS Microbiol. Lett.* **3**: 309-312.
  23. Sipiczki, M. and L. Ferenczy. 1977b. Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating type. *Mol. Gen. Genet.* **151**: 77-81.
  24. Sonia, A. De Bules and F.J. Castillo. 1979. Production of lactase by *Candida pseudotropicalis* grown in whey. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 1201-1205.
  25. 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.
  26. Stewart, P.R. 1975. Analytical methods for yeast. In: *Methods in Cell Biology*. Prescott, D.M.(ed.), Academic Press, New York. Vol. 12. p. 112-133.
  27. Wendorff, W.L. and C.H. Amundson. 1971. Characterization of beta-galactosidase from *Saccharomyces fragilis*. *J. Milk Food Technol.* **34**: 300-305.
  28. Wilson, J.J., G.G. Khachatourians and W. Ingledew. 1982. Protoplast fusion in the yeast *Schwanniomyces alluvius*. *Mol. Gen. Genet.* **186**: 95-100.
- (Received May 19, 1988)