

Killer 효모와 알콜 발효효모간의 원형질체 융합주의 특성

정기택 · 방광웅 · 김재근¹ · 송형익² · 정용진

경북대학교 농과대학 식품공학과

¹계명전문대학 식품영양과

²대구공업전문대학 식품공업과

Characterization of Protoplast Fusant between Killer Yeast and Alcohol-Fermenting Yeast

Chung, Ki Taek, Kwang Woong Bang, Jae Kuen Kim¹,

Hyung Ik Song² and Yong Jin Jung

Department of Food Engineering, College of Agriculture, Kyungpook

National University, Taegu 702-701, Korea

¹ Department of Food and Nutrition, Keimyung Junior College

² Department of Food Technology, Taegu Technical Junior College, Taegu, Korea

ABSTRACT: Cell volume and DNA contents of the fusants were similar to those of parents. Genetic stability of the fusants was increased when they were cultured on minimal medium (MM) rather than on complete medium (CM), and the fusants were stabilized by subculturing 7 generations each 7 day on MM agar. The finally selected fusants after being cultured for 6 months on CM were stable without segregation. The fusants could also form nuclein and ascospores, and show red and pink colors by the test of TTC colorization. Assimilability and fermentability of carbon sources of the fusants were similar to those of parents. The tolerance of KCl, NaCl, sodium propionate and cycloheximide showed the traits of one strain of parents. When the fusants were cultured for 72 hr and 60 hr in the medium containing 20% glucose and sucrose, respectively, the yield of ethanol for FWKS 260 was reached to 9.6 v/v% and 9.8 v/v%, respectively. The sensitive strain Kyokai 7 was found to be killed entirely after cultivation of 48 hr by the killer toxin from the fusants. The recipient S 29 and Kyokai 7 were found to have neither L nor M dsRNA plasmid. However, K 52 and fusants had both L and M dsRNA plasmid of 4.7 kb and 2.5 kb, respectively. The curants treated by heat and cycloheximide did not contain M dsRNA plasmid, but had large amounts of L dsRNA plasmid of those of killer yeasts.

KEY WORDS □ Killer yeast fusant, L dsRNA plasmid, M dsRNA plasmid, Curing.

Killer 효모에 관한 연구는 최근들어 상당히 주목받고 있는데, 즉 killer toxin을 분비하는 효모는 세포 외 단백질과 glycoprotein의 분비기작을 연구하기 위한 model로서 이용될 수 있으며, killer plasmid는 선형 dsRNA이고, 분비되는 toxin이 세포외 단백질이므로 새로운 vector system 개발의 가능성도 제시해주고 있다. 또한 killer 효모는 엄격한 미생물 조작을 필요로 하는 발효공정에도 사용될 수 있는데, 이와 같이 최근 주정공업에서는 오염균주(killer 효모 또는 감수성 효모)에 의한 나쁜 영향을 제거하기 위해 transformation 및 세포융합에 의한 cytoduction

등에 의해 killer 형질을 산업적으로 이용되는 효모균주에 도입하려는 연구가 진행되고 있다(Hastie 등, 1978; Bortol 등, 1986; Spencer와 Spencer, 1983). 그러나 양조용 효모는 mating hybridization에 적합하지 않는 diploid 또는 polyploid이고, nuclear hybridization은 양조용 효모의 중요 특성을 유지하는데 결함이 있으므로 야생 효모에 있는 killer plasmid를 양조용 효모에 도입시키는 방법으로는 세포융합에 의한 cytoduction이 가장 좋은 것으로 생각된다.

한편, killer system을 이용한 원형질체 융합에 관

한 연구로 Ouchi 등 (1979)은 일본 청주제조공정에서 야생의 killer 효모의 오염을 제거하기 위하여 핵융합 결손변이주 (*kar 1-1*)를 이용하여 새로운 균주를 육성하였고, Gunge 와 Sakaguchi (1981)는 이속간의 원형질체 융합을 통해 감수성 효모를 killer 효모화 하였으며, Ouchi 등 (1983)은 핵의 유전형질을 변화시키지 않고 새로운 균주를 육성하는 방법을 고안하여 청주제조에 이용하였다. Yamamoto 등 (1984)은 세포 융합으로 K_2 killer plasmid를 ethanol 생산효모에 도입시켜 새로운 tetraploid 균주를 육성하여 연속배양을 통한 ethanol 발효를 성공적으로 수행하였고, Shimoda 등 (1984)도 원형질체 융합으로 야생의 오염 killer 효모에 저항성을 가지는 새로운 killer 중성 효모를 육성하였다. 또한 Bortol 등 (1986)은 식초로부터 야생의 killer 효모를 분리하여 호흡결손 변이주를 얻고 이를 원형질체 융합으로 빵효모에 도입시켜 새로운 빵효모를 육성하였고, 백포도주 (Hara 등, 1981) 및 맥주 (Spencer 와 Spencer, 1983) 등에도 원형질체 융합으로 새로운 killer 융합주를 개발하여 좋은 성과를 거두고 있다. 본 실험에서는 전보 (Chung 등, 1989a, b)에 이어서 융합주의 일반적인 특성을 규명하고, 감수성 균주와의 혼합배양 및 dsRNA를 추출하여 전기영동에 의해 확인하므로서 융합주가 killer 효모임을 확인하였고, 이 융합주를 curing시킨 결과 M dsRNA가 제거되어 killer toxin 생성 및 저항성은 M dsRNA의 지배를 받고

있는 것으로 확인할 수 있었고, 최종 선별된 융합주는 친주보다 다소 높은 ethanol 생성력을 보여 ethanol 생성 효모의 특성을 그대로 유지하면서, 야생 효모의 오염을 방지할 수 있는 새로운 killer 효모균주를 육성하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* B15-1, *S. cerevisiae* Kyokai 7, *S. cerevisiae* No.105와 이들로부터 얻은 영양요구성 돌연변이주, 호흡결손 변이주 및 원형질체 융합 결과 얻어진 상보성 융합체를 사용하였는데, 그 특성 및 종류는 Table 1과 같다 (Bang 등, 1987; Chung 등, 1989a, b). 배지는 Chung 등 (1989a, b)이 기술한 바와 동일한 조성으로 제조하여 사용하였다.

호흡결손 변이주의 분리

Killer 효모의 호흡결손 변이주 (ρ^-)는 methionine $30 \mu\text{g/ml}$, ethidium bromide $20 \mu\text{g/ml}$ 를 함유하는 SD 배지에서 30°C 로 24 시간 진탕배양한 뒤 원심집균하고, 멸균 saline으로 2회 세척한 후, 같은 용액에 적당히 현탁하여 YPDG 평판배지 (yeast extract 1%, peptone 2%, dextrose 0.1%, glycerol 3%, agar 2%)에 도말하고 30°C 에서 3일간 배양하였다. YPDG 평판상에 생성된 petite 집락을 methio-

Table 1. The strains of *Saccharomyces cerevisiae* used

Strain	Killer phenotype ^{a)}	Phenotype ^{b)}	Remark
B 15-1	$K^+ R^+$	wild type, [KIL-k]	Isolated killer yeast
K 52	$K^+ R^+$	Met^- , [KIL-k]	NTG mutant of B 15-1
K 52-76	$K^+ R^+$	Met^- , ρ^- , [KIL-k]	EtBr mutant of K 52
Kyokai 7	$K^- R^-$	wild type, [KIL-o]	Sensitive (Shimoda <i>et al.</i> , 1984)
No. 105 ^{d)}	$K^- R^-$	wild type, [KIL-o]	Recipient
S 29	$K^- R^-$	Lys^- , [KIL-o]	NTG mutant of No. 105
FWKS 105	$K^+ R^+$	wild type, [KIL-k]	$K 52 \times S 29$
FWKS 260	$K^+ R^+$	wild type, [KIL-k]	$K 52 \times S 29$
K 52-C 4	$K^- R^-$	wild type, [KIL-o]	Cycloheximide curant of B 15-1
K 52-T 6	$K^- R^-$	wild type, [KIL-o]	Temperature curant of B 15-1
FC-105	$K^- R^-$	wild type, [KIL-o]	Cycloheximide curant of FWKS 105
FC-260	$K^- R^-$	wild type, [KIL-o]	Cycloheximide curant of FWKS 260

a) K^+ or K^- means ability or inability to secrete the active killer toxin. R^+ or R^- refers to resistance or sensitivity to the killer toxin.

b) Killer plasmids are denoted [KIL-k]. [KIL-o] is the wild type sensitive carrying no plasmids.

c) ρ^- means respiratory deficient mutant with ethidium bromide.

d) *Saccharomyces cerevisiae* Technical Research Institute of National Tax Administration No. 105. (Chung *et al.*, 1985).

nine 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 함유하는 SDG 평판배지 (yeast nitrogen base w/o amino acids 0.67%, dextrose 0.1%, glycerol 3%, agar 2%)에 이식하고 30°C에서 2일간 배양한 다음, TTC 상층배지를 45°C로 냉각시켜 SDG 평판에 중층시키고 30°C에서 3시간 보존한 후 백색을 나타내는 집락을 호흡결손 변이주로 최종 선별하였다 (Sherman 등, 1982).

원형질체 융합 및 융합주의 선별

원형질체의 제조, 분리 및 융합은 Chung 등 (1989b)의 방법에 의거하였으며, 융합주의 선별은 먼저 양친주의 영양요구성이 상호보완 되어 최소배지 (MM)에서 재생된 융합주를 7일 간격으로 새로운 MM에 7회 계대배양하여 유전적으로 안정화시켰다. 안정화된 융합주는 완전배지 (CM)에 배양하여도 친주로 복귀되지 않았기 때문에 3일간 CM에 배양한 후 다시 CM과 MM에 동일 세포수를 도말하여 양쪽에서 집락의 수가 같게 나타나는 균주 중 MM에서 생육이 왕성하고, killer 활성이 뛰어나며, ethanol 발효력이 우수한 FWKS105 및 FWKS260을 융합주로 최종 선별하였으며, 이들 융합주의 성질이 다소 상이하였으므로 각각의 특성을 비교하여 검토하였다.

Killer 활성 측정

Killer 활성은 Chung 등 (1989a, b)의 방법에 따라 well test 및 혼합배양으로 측정하였다.

유전 안정성

최종 선별한 융합주의 유전 안정성을 MM과 YPD-MB lawn 상에서 subculture 하므로써 조사하였다. 일정기간 동안 보존한 균주와 계속 계대배양한 균주를 CM에 접종하여 30°C에서 2일간 배양한 후 멸균 saline에 10^7 cells/ml로 현탁한 다음 CM과 MM에 평판배양하여 CM과 MM에서 생육된 집락수의 비율로서 유전 안정성을 검토하였다 (Seu 등, 1986).

DNA 함량과 세포체적

친주 및 융합주의 DNA 함량은 Rodphaya 등 (1983)의 방법에 준하여 DNA를 추출한 다음 diphenylamine법 (Gerhardt 등, 1981)으로 hering testes DNA를 표준 DNA로 하여 정량하였다. 또한 Sipiczki와 Ferenczy (1977)의 방법에 따라 친주와 융합주의 세포체적을 측정하였다.

핵 및 포자염색

핵은 각각의 균주를 YPD 배지에서 30°C로 3일간 배양한 후 aldehyde-mordanted basic fuchsin법 (飯塚 등, 1980)으로 염색하였다. 또 포자형성을 조사하기 위하여 각 균주를 presporulating 배지 (Sherman 등, 1982)에 희석하여 30°C에서 3일간 배양한 후 다시 균체를 sporulating 배지 (Sherman 등, 1982)에 이식하여 30°C에서 5일간 배양하여 Möller법 (飯塚 등, 1980)에 따라 basic carbolic

fuchsin으로 염색하고 methylene blue로 대비 염색하였다.

Triphenyltetrazolium chloride (TTC) 정색시험

飯塚 등 (1980)의 방법에 따라 친주와 융합주의 TTC 정색시험을 실시하였다.

Ethanol 발효력

친주 및 융합주의 ethanol 발효력은 yeast extract 0.5%, peptone 0.5%가 함유된 배지에 glucose와 sucrose를 각각 20, 30 및 40%씩 첨가한 후 48시간 전배양한 배양액을 3% 되게 접종하여 30°C에서 4일간 발효시켜 생성된 ethanol을 증류하여 그 함량을 측정하였다. 또한 20%의 기질을 함유한 배지에서 정시적으로 ethanol을 측정하므로써 시간에 따른 ethanol 생성력도 함께 조사하였다. 한편 잔당은 DNS법 (Summers와 Somers, 1949)으로 측정하였다.

Killer plasmid의 제거 (curing)

YPD 액체배지에서 배양한 중 배양액을 멸균 saline에 적당히 희석하여 0.1-0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 cycloheximide를 함유한 YPD 평판배지에 도말하여 30°C에서 집락이 생성될 때까지 배양하고, 또 균체를 도말한 YPD 평판을 30-42°C에서 집락이 생성될 때까지 배양한 후 YPD-MB lawn 상에 replica 하여 25°C에서 2일간 배양하여 killer 세포와 cured 세포를 산정하여 %로 나타내었다.

Double-stranded RNA plasmid의 추출

Double-stranded RNA (dsRNA) plasmid의 추출은 Fried와 Fink의 방법 (1978)을 약간 변형시켜 다음과 같이 행하였다. YPD 배지에서 대수 증식기 말기까지 배양한 균체를 원심집균하고 50mM Na₂EDTA (pH 7.0) 용액으로 세척한 다음 2.5% 2-mercaptoethanol을 함유한 50mM Tris-H₂SO₄ 완충액 (pH 9.3)에 현탁시켜 25°C에서 15분간 진탕하였다. 이 균체 현탁액을 원심집균하고 0.1% SDS를 함유하는 STE 완충액 (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM Na₂EDTA)에 재현탁하여 25°C에서 20분간 진탕시킨 후 동량의 phenol로 핵산을 추출하고, phenol-chloroform (1:1), chloroform-isoamylalcohol (24:1)로 단백질을 제거한 후 원심 분리한 상등액에 -20°C의 99% ethanol을 2배량 가하여 RNA를 침전시켰다. 이 RNA를 원심회수하고 70% ethanol로 2회 세척한 후 건조시켜 TE 완충액 (10mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM Na₂EDTA)에 용해하고 DNase II (Sigma)를 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 되게 처리하고 ethanol로 침전시킨 후 소량의 TE 완충액에 용해하여 dsRNA로 사용하였다.

Agarose gel 전기영동

dsRNA의 전기영동은 1.0% agarose gel과 TBE 완충액 (89mM Tris-borate, 89mM boric

Table 2. Genetic stability of the finally selected fusants.
2-1. After 1 month cultivation on CM and MM

Strain	Percentage of auxotrophs	
	on CM	on MM
FWKS 105	16.21	2.63
FWKS 260	1.38	0.53

Percentage of auxotrophic cells from fusion product between K 52 and S 29 after cultivation for 1 month on CM and MM.

2-2. Effect of 7 successive subculture on genetic stability of the fusants

Strain	Colonies on		% of auxotrophs
	CM	MM	
FWKS 105	3.64×10^7	3.61×10^7	0.82
FWKS 260	7.43×10^7	7.42×10^7	0.13

Interval between subculture was 7 days on MM.

2-3. Genetic stability of the fusants

Strain	Colonies on		% of auxotrophs
	CM	MM	
FWKS 105	1.62×10^7	1.62×10^7	0
FWKS 260	2.13×10^7	2.13×10^7	0

The genetic stability of the finally selected fusants was determined after 6 months cultivation on CM.

acid, 2mM Na₂EDTA (pH 8.0)) 및 tracking dye로서 0.25% bromophenol blue-40% sucrose 용액을 사용하여 30mA에서 행하였으며, dsRNA 염색에는 0.5 µg/ml의 ethidium bromide 용액을 사용하였다.

결과 및 고찰

유전 안정성

융합주를 CM과 MM에서 각각 1개월간 보존한 후 이들의 유전 안정성을 조사한 결과, Table 2-1에서와 같이 CM보다는 MM에서 보존하는 것이 보다 더 유전적인 안정을 기할 수 있었음을 알았다. 또한 MM에서 안정화된 융합주를 7일 간격으로 7회 계대배양한 결과, FWKS 260의 경우에는 0.13%의 복귀율을 나타내어 비교적 안정화된 융합주임을 알 수 있었다 (Table 2-2). 한편 Table 2-3은 6개월간 계속 사용한 융합주의 유전 안정성을 조사한 것으로 segregant가 전혀 나타나지 않았으므로 매우 안정화된 융합주임을 알 수 있었다.

Table 3. DNA contents in the cells of parents and fusants

Strain	Content of DNA (fg/cell)
S 29	61.0
K 52	64.3
FWKS 105	69.9
FWKS 260	81.2

The parental auxotrophs and fusants were cultured to stationary phase in YPD medium at 30°C with shaking, and the DNA contents were expressed as fg/cell.

Table 4. Cell size and capacity of the parents and fusants

Strain	Cell length (µm)	Cell width (µm)	Cell volume* (µm ³)
S 29	6.03	5.58	98.31
K 52	6.58	5.23	94.24
FWKS 105	7.48	5.98	140.06
FWKS 260	7.76	6.42	167.47

*Cell volume was calculated with the equation $V = \frac{4}{3} \pi \cdot \frac{a}{2} \cdot (\frac{b}{2})^2$. Where, V is cell volume, a is length of cells and b is width of cells. The parental auxotrophs and fusants were cultured to stationary phase in YPD medium at 30°C with shaking. The cell size was measured with micrometer.

DNA 함량과 세포체적

융합주의 heterokaryon 성질을 조사하기 위하여 DNA 함량을 측정된 결과, Table 3에서와 같이 양친주에 비하여 DNA 함량이 더 높은 것으로 나타났으며, 세포체적도 융합주 FWKS 260의 경우 167.47 µm³으로 친주보다 더 컸는데 (Table 4), 이는 융합주의 세포체적이 양친주보다 비교적 큰 것으로 미루어 융합시 양친주의 세포질 DNA가 융합주에 더 많이 함유된 결과라 사료된다.

증식도

융합주의 증식도는 Fig. 1과 같이 각각 친주와 유사한 경향을 보였는데, FWKS 260은 killer 효모인 K 52와, FWKS 105는 수용주인 S 29와 비슷하였다. 일반적으로 융합주는 친주보다 유도기가 더 긴 것으로 알려져 있는데 (Kue와 Yamamoto, 1979), FWKS 105는 유도기가 17시간으로 친주보다 다소 길었으나 FWKS 260은 친주와 유사하였으며, 증식속도는 오히려 친주보다 다소 높은 편이었다.

핵 및 포자

친주와 융합주의 핵을 염색하여 검정한 결과, Fig. 2와 같이 모두 적자색으로 염색된 1개의 핵을 관찰할 수 있었다. 또한 Fig. 3과 같이 친주인 S 29는 2-3, K 52는 3-4개의 자낭포자를 형성하였는데, 융합주는 모두 3-4개의 자낭포자를 형성하였지만 친주의 호흡결

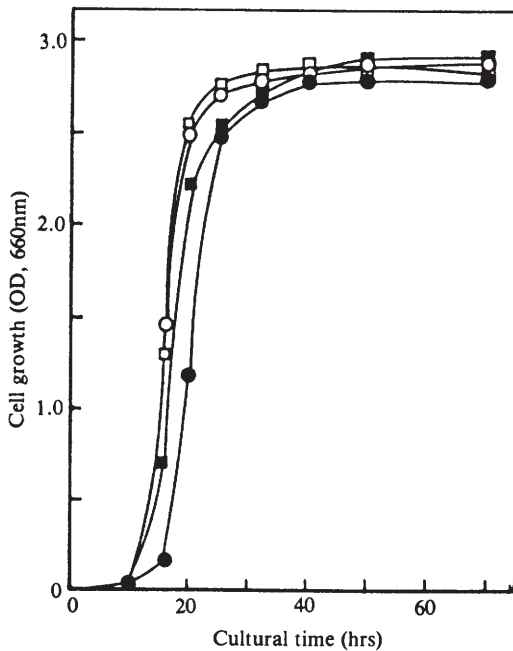


Fig. 1. Growth curves of the parents and fusants. The strain S 29 (●-●), K 52 (○-○), FWKS 105 (■-■), and FWKS 260 (□-□) were cultured in YPD medium at 30°C for the indicated times with shaking. The cell growth was expressed as OD at 660 nm.

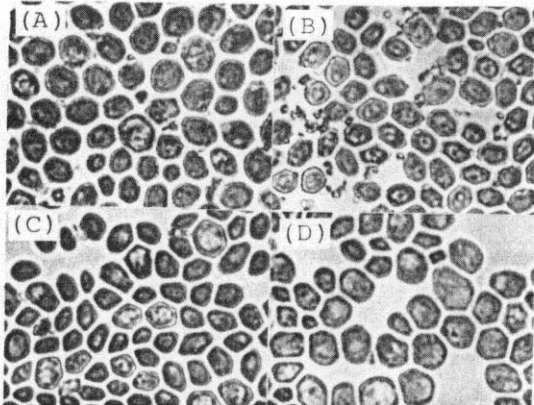


Fig. 2. Microscopic photographs of the nuclei of parents and fusants stained by the aldehyde-mordanted basic fuchsin method. (A); S 29 (B); K 52 (C); FWKS 105 (D); FWKS 260

손 변이주인 K 52-76은 포자를 전혀 형성하지 않고 영양세포인 채로 남아있었다.

Triphenyltetrazolium chloride 정색시험

TTC가 dehydrogenase의 작용으로 생성된 수소

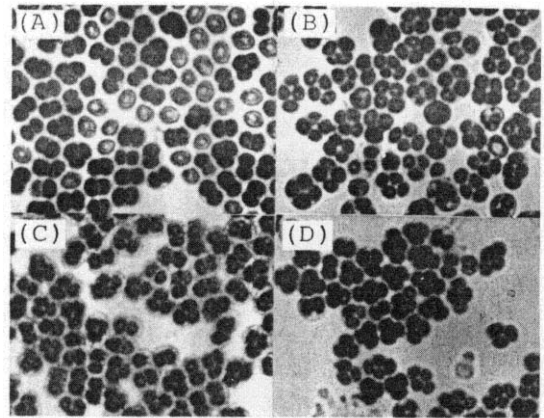


Fig. 3. Microscopic photographs of the spores of parents and fusants stained by the Möller's method.

(A); S 29 (B); K 52
(C); FWKS 105 (D); FWKS 260

Table 5. TTC colorization-test for the parents and fusants

Strain	Color
S 29	reddish pink
K 52	pink-white
FWKS 105	reddish pink
FWKS 260	red
Kyokai 7	reddish pink
K 52-C 4	pink-white
K 52-76	white

The strains cultured on the TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) lower agar medium (1% glucose, 0.2% peptone, 0.15% yeast extract, 0.1% KH_2PO_4 , 0.04% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 2% agar) for 2 days at 30°C were incubated for 3 hours at 30°C after pouring the TTC upper agar medium (0.5% glucose, 0.05% TTC, and 1.3% agar).

에 의하여 환원됨으로서 집락의 색을 변화시키는 TTC 정색시험 결과 Table 5와 같이 S 29는 reddish pink, K 52는 pink 색을 나타내었으며, 융합주인 FWKS 105는 reddish pink, FWKS 260은 적색을 나타내었으며, 친주보다 융합주가, 특히 FWKS 260이 훨씬 빠르게 정색반응을 나타내어 dehydrogenase 활성이 친주보다 강한 것으로 나타났으며 이로 미루어 ethanol 발효력도 다소 높을 것으로 사료된다. 한편 K 52-76은 집락의 색이 아무런 변화가 없이 백색인 채로 남아있었다.

탄소원의 자화능 및 발효특성

융합주의 탄소원에 대한 자화능은 친주와 유사하였으나, K 52가 maltose를 미약하게 자화하는 반면 융합주 중 FWKS 260은 maltose 자화능이 훨씬 높았

다(Table 6). 한편, 각종 기질을 2% 함유한 배지에 Durham 관을 넣고 24시간 배양한 후 생성된 CO₂량으로 발효능을 조사한 결과, Table 7과 같이 FWKS 260이 sucrose, maltose, raffinose 등에서 우수한 발효력을 나타내었다.

내염성 및 약재내성

Table 6. Assimilability of carbon sources by the parents and fusants

Strain	Glucose	Maltose	Melezitose	Xylose	Raffinose
S 29	+	+	+	-	+
K 52	+	d	+	-	+
FWKS 105	+	+	+	-	+
FWKS 260	+	++	+	-	+

The strains were cultured on the minimal medium (0.2% (NH₄)₂SO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.05% KCl, and 2% agar) containing 2% carbon sources such as glucose, maltose, melezitose, raffinose, and xylose by streaking for 4 days at 30°C.

++; well growth, +; growth, d; poor growth, -; no growth.

Table 7. Fermentability of carbon sources by the parents and fusants

Strain	Glucose	Sucrose	Maltose	Galactose	Raffinose	Melibiose
S 29	++	+	++	+	+	-
K 52	++	+	+	++	+	-
FWKS 105	++	++	+	++	+	-
FWKS 260	++	++	++	++	++	-

The strains were cultured in test tubes containing the medium (0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 2% carbon sources such as glucose, maltose, sucrose, galactose, raffinose, and melibiose) and Durham tubes for 24 hours at 30°C. The fermentability was expressed as the amounts of CO₂ (++; large, +; small, and -; not) formed in Durham tubes.

Table 8. NaCl and KCl tolerance of the parents and fusants

Strain	NaCl(%)						KCl(%)			
	2	5	8	10	12	14	5	10	15	20
S 29	++	++	+	+	d	-	++	++	+	d
K 52	++	+	d	-	-	-	++	+	d	-
FWKS 105	++	++	+	d	d	-	++	++	+	d
FWKS 260	++	+	d	-	-	-	++	+	d	-
K 52-76	+	-	-	-	-	-	+	d	-	-

The strains were cultured on YPD agar plate containing NaCl (2 ~ 14%) and KCl (5 ~ 20%) by streaking for 4 days at 30°C. ++; well growth, +; growth, d; poor growth, -; no growth.

Table 8에서와 같이 NaCl에서는 S 29 및 FWKS 105가 12% 이하에서, K 52 및 FWKS 260은 8% 이하에서 생육이 가능하였으며, KCl에서는 이보다 높아 S 29 및 FWKS 105가 20%, K 52 및 FWKS 260이 15% 이하에서만 생육이 가능하였다. 또한 sodium propionate에서는 S 29 및 FWKS 105가 4%, K 52 및 FWKS 260이 2% 이하에서, cycloheximide에서는 S 29 및 FWKS 105가 1 µg/ml, K 52 및 FWKS 260이 0.8 µg/ml 이하에서만 생육이 가능하여 내염성과 유사한 경향을 나타내었다 (Table 9).

Glucose와 sucrose에 대한 발효력

융합주의 ethanol 발효력은 Table 10에서와 같이 glucose 및 sucrose 모두 20% 첨가시 가장 우수하였고, 고농도의 기질에서는 다소 둔화되었으며, 일반적으로 융합주가 친주보다 더 높은 ethanol을 생성하는 경향이었는데, FWKS 260의 경우 20% glucose에서 9.6v/v%, 20% sucrose에서는 9.8v/v%의 ethanol을 생성하였으며, glucose보다 sucrose에서 더 높은 ethanol 수율을 보여 sucrose 가수분해 효소인 β-fructofuranosidase의 활성이 높아 생성되는 당함량이 높기 때문인 것으로도 생각되며 (Arnold, 1974), 당밀을 원료로 하는 ethanol 발효 공업의 이용면에 대한 검토가 기대된다.

또한, 20%의 기질을 함유한 배지에서 발효시키면 서 경시적으로 ethanol 생성력을 측정한 결과, glucose를 기질로 사용한 경우 FWKS 260은 72시간 배양으로 ethanol 생성이 최대에 달했으며 (Fig. 4), sucrose의 경우 60시간 배양으로 9.3v/v%의 ethanol을 생성하였는데 (Fig. 5), 전반적으로 glucose보다 sucrose를 기질로 사용하였을 때 발효시간이 단축되는 경향이었다.

Killer toxin 생성능

융합주의 killer 형질보유 여부 및 융합주가 분비하는 killer toxin의 감수성 효모에 대한 생육 억제력을 검토하기 위하여 융합주와 감수성 효모인 Kyokai 7을 YPD 배지에 각각 동량 (1×10⁶ cells/ml) 또는

Table 9. Sodium propionate and cycloheximide tolerance of the parents and fusants

Strain	Sodium propionate(%)				Cycloheximide(μ g/ml)			
	1.0	2.0	3.0	4.0	0.5	0.8	1.0	1.2
S 29	+	+	d	d	+	+	d	-
K 52	+	d	-	-	+	d	-	-
FWKS 105	+	+	d	d	+	+	d	-
FWKS 260	+	d	-	-	+	d	-	-
K 52-76	+	-	-	-	-	-	-	-

The strains were cultured on YPD agar plate containing sodium propionate (1–4%) and cycloheximide (0.5–1.2 μ g/ml) by streaking for 5 days at 30°C.

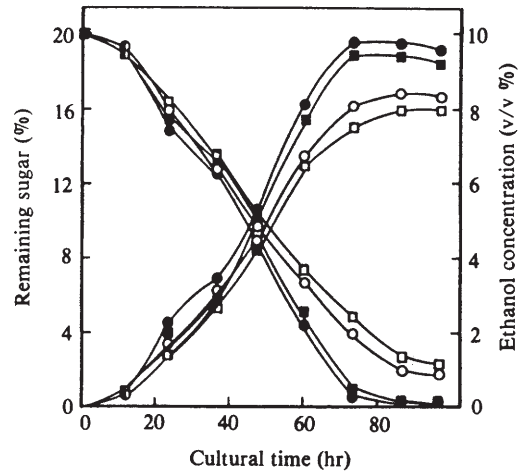
++; well growth, +; growth, d; poor growth, -; no growth.

Table 10. Ethanol fermentation on glucose and sucrose by the parents and fusants

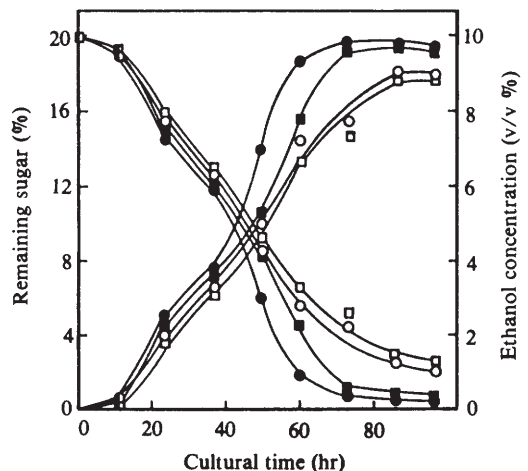
Substrate	Concentration (%)	Ethanol (v/v %)			
		S 29	K 52	FWKS 105	FWKS 260
Glucose	20	8.3	7.9	9.3	9.6
	30	6.8	5.9	6.5	7.6
	40	4.2	5.4	4.8	5.7
Sucrose	20	9.0	8.8	9.7	9.8
	30	7.7	5.3	5.7	7.1
	40	6.9	4.3	4.8	6.8

Fermentation was performed by standing culture in a medium containing 20%, 30% and 40% glucose or sucrose, 0.5% yeast extract and 0.5% peptone. Each strain seed cultured in the same medium for 48 hrs at 30°C was inoculated to 3v/v %. Ethanol produced was measured after fermentation for 91 hrs at 30°C.

감수성 주를 9×10^7 cells/ml 되게 더 많이 접종하여 25°C에서 72시간 동안 혼합배양하면서 각 균의 생균수 변화를 경시적으로 조사한 결과는 Fig. 6과 같다. 접종 후 12시간까지는 모두 비슷하게 증식하다가 24시간 이후부터는 감수성 균주가 점차 사멸하기 시작하였는데, FWKS 105 보다는 FWKS 260이 killer toxin 생성에 대한 유도기가 더 짧았으며, 감수성주를 다량 접종한 구에 있어서도 배양 48시간 이후부터는 감수성주를 거의 발견할 수가 없어 융합주는 정상적으로 killer 형질을 보유하여 killer toxin을 생성함을 알 수 있었다. 일반적으로 killer 효모가 분비하는 killer toxin은 균체가 증식하기 시작하는 대수가 초기에 합성되기 시작하여 대수가 후기에 최대가 된다고 하였는데 (Bruenn, 1981; Palfree와 Bussey, 1979; Wickner, 1976, 1979), 융합주의 경우에도 전형적인 killer 효모의 killer toxin 분비형태와 유사하였다.

**Fig. 4.** Ethanol fermentation from glucose as a substrate.

The fermentation conditions for ethanol production of S 29 (○-○), K 52 (□-□), FWKS 105 (■-■), and FWKS 260 (●-●) were the same as those described in the Table 10.

**Fig. 5.** Ethanol fermentation from sucrose as a substrate.

The fermentation conditions for ethanol production of S 29 (○-○), K 52 (□-□), FWKS 105 (■-■), and FWKS 260 (●-●) were the same as those described in the Table 10.

dsRNA plasmid의 검색

친주 및 융합주의 killer plasmid를 추출하여 전기영동한 결과, Fig. 7과 같이 감수성 균주인 Kyokai 7(lane B) 및 수용주인 S 29(lane C)는 dsRNA plasmid가 전혀 나타나지 않은 반면, killer 효모인 K 52(lane D)는 각각 4.7kb 및 2.5kb인 L dsRNA 및 M dsRNA plasmid band를 확인할 수 있었고, 융합주인 FWKS 105(lane E) 및 FWKS 260(lane

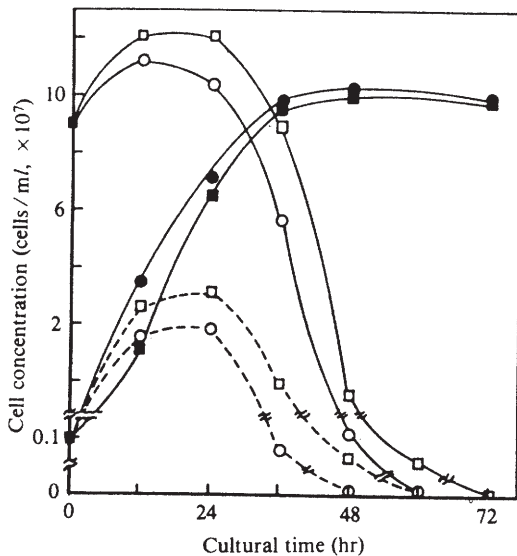


Fig. 6. Effect of killer toxin from fusants on the sensitive strain Kyokai 7.

The fusant FWKS 105 (■-■) and FWKS 260 (●-●) were cocultured with the sensitive strain Kyokai 7 (□-□; cocultured with FWKS 105, ○-○; cocultured with FWKS 260) in YPD medium (pH 4.7) by standing-culture for the indicated times at 25°C. The fusants and Kyokai 7 were cocultured with the same concentration (10^6 cells/ml, ...) and different concentration (fusants: 10^6 cells/ml, and Kyokai 7: 9×10^7 cells/ml (—)).

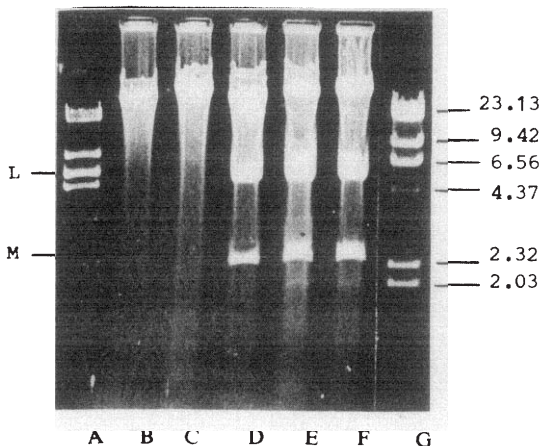


Fig. 7. Agarose gel electrophoresis of dsRNA from yeast strains.

A; Lambda DNA (EcoRI), B; Kyokai 7, C; S 29, D; K 52, E; FWKS 105, F; FWKS 260, G; Lambda DNA (Hind III), Number; DNA length (kb), L; High molecular weight species, M; Low molecular weight species.

Table 11. Curing of the wild killer strain and fusants

Strain	Methods of curing			
	Cycloheximide		Elevated temperature	
	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Curing (%)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Curing (%)
B 15-1	0.5	96.2	40	0
			42	8.5
FWKS 105	0.3	98.1	38	35.2
			40	92.3
FWKS 260	0.4	95.7	38	28.0
			40	90.4

The curing of killer dsRNA plasmids was conducted by cultivation the wild killer yeast B 15-1 and fusants on YPD medium containing cycloheximide (0.1–0.5 $\mu\text{g/ml}$) at 30°C for a week, and on YPD medium at 30°C to 42°C for a week.

F)도 L 및 M dsRNA plasmid band를 보여 이들 융합주가 killer 효모임을 확인하였다. 또한 killer toxin의 분비를 지배하는 것으로 알려진 M dsRNA plasmid band가 친주보다 융합주의 경우 더 진한 것으로 미루어 killer 활성이 친주보다 더 강한 것으로 사료된다. L dsRNA plasmid는 크기가 4.7kb로 4.5–4.7kb($2.5\text{--}3.4 \times 10^6$ dalton)인 것(Bevan 등, 1973; Sweeney 등, 1976; Wickner와 Leibowitz, 1976; Herring과 Bevan, 1977; Bruenn과 Kane, 1978; Holm 등, 1978)과 유사하였으나, M dsRNA plasmid의 경우 보통 1.8–1.9kb($1.1\text{--}1.7 \times 10^6$ dalton)인 K_1 killer, 1.7kb(1.0×10^6 dalton)인 K_2 killer 및 1.5kb(0.87×10^6 dalton)인 K_3 killer로 구분하였는데(Nesterova 등, 1976; Bevan 등, 1973; Sweeney 등, 1976; Wickner와 Leibowitz, 1976; Adler 등, 1976; Fried와 Fink, 1979), 본 실험에서는 2.5kb로 이들과는 다소의 차이를 보였는데 이는 균주 및 균 분리원의 차이 때문으로 사료된다.

Killer plasmid의 제거

Killer 형질은 dsRNA plasmid에 의해 지배되는 것으로 알려져 있는데, 이 dsRNA plasmid는 열처리(Wickner, 1974), cycloheximide(Fink와 Style, 1972; Sweeney 등, 1976) 및 5-fluorouracil(Mitchell 등, 1976)등에 의하여 제거되어 감수성 형질을 나타낸다. 이에 B 15-1 및 융합주를 cycloheximide 및 열처리하여 curing시킨 결과 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 cycloheximide 처리로 B 15-1은 96%가 curing되었는 반면에 융합주는 이보다 저농도에서 쉽게 dsRNA plasmid가 제거되었고, 40°C에서 배양

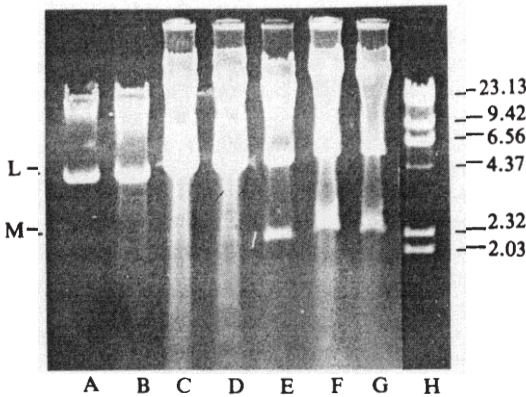


Fig. 8. Agarose gel electrophoresis of dsRNA from yeast strains.

A; K 52-T 6, B; K 52-C 4, C; FC-105, D; FC-260, E; K 52, F; FWKS 105, G; FWKS 260, H; Lambda DNA (Hind III), Number; DNA length (kb), L; High molecular weight species, M; Low molecular weight species.

적 요

원형질체 융합을 통하여 killer 효모의 유전형질을 기존의 ethanol 발효효모에 도입함으로써 야생의 killer 효모에 저항성을 가지고, 오염효모를 치사시킬 수 있으며, ethanol 발효능도 유지하는 새로운 효모균주를 개발하였다. 먼저 융합주의 생리적인 특성을 검토한 바, 융합주는 양친주에 비하여 세포체적이 크고, DNA 함량이 높았으며, 증식도는 친주와 유사한 경향이였다. 또 융합주를 최소배지에서 보존하는 것이 안정성을 높이는 방법이었으며, 7일 간격으로 7회 계대배양함으로써 유전적으로 안정화시킨 융합주를 6개월 간 계속 사용한 결과 segregant 가 전혀 나타나지 않았으므로 매우 안정하였다. 또한 융합주는 핵 및 포자를 형성함을 관찰할 수 있었으며, TTC 정색반응에서 적색 및 pink 색을 띄었으며, 탄소원의 자화성 및 발효능은 친주와 유사하였는데, KCl, NaCl, sodium propionate 및 cycloheximide 등에 대한 내성도 양친주의 한쪽을 따랐다. 그리고, 융합주를 20% glucose와 sucrose에서 72시간 및 60시간 배양했을 때, FWKS 260의 경우 각각 9.6v/v% 및 9.8v/v%의 ethanol을 생성하였고, 감수성주와 혼합배양한 결과 FWKS260의 경우 48시간 이후에는 감수성주를 거의 발견할 수 없었으며, 친주 및 융합주의 dsRNA plasmid를 추출하여 전기영동한 결과, 수용주인 S29 및 감수성주인 Kyokai 7에서는 dsRNA를 전혀 볼 수 없었는 반면, K52 및 융합주는 각각 4.7kb 및 2.5kb의 L 및 M dsRNA plasmid를 확인할 수 있어 융합주가 killer 효모임을 확인할 수 있었으며, 열처리 및 cycloheximide 처리로 curing된 curant는 M dsRNA plasmid band를 볼 수가 없었고, L dsRNA plasmid band는 오히려 더 진하게 나타났는데, 이로 미루어 L과 M dsRNA plasmid는 서로 연관성이 있으며, killer toxin 분비 및 저항성을 나타내는 유전인자를 지배하는 것은 M dsRNA plasmid임을 확인할 수 있었다.

사 사

본 논문의 일부는 문교부 자유과제 학술연구조성비 (1988/1989)에 의하여 수행되었음.

참고문헌

1. Adler, J., H.A. Wood and R.F. Bozarth, 1976. Virus-like particles from killer, neutral, and sensitive strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol.*, **17**, 472-476.
2. Arnold, W.N., 1974. Expression of cryptic β -fructofuranosidase in *S. rouxii*. *J. Bacteriol.*, **120**, 886-891.
3. Bang, K.W., S.G. Chung and K.T. Chung, 1987. Isolation of the killer yeasts and its characteristics. *The*

Biological Science Association of Korea, Symposium Abstract, p.90.

4. Bevan, E.A., A.J. Herring and D.J. Mitchell, 1973. Preliminary characterization of two species of dsRNA in yeast and their relationship to the killer character. *Nature*, **245**, 81-86.
5. Bortol, A., C. Nudel, E. Fraile, R. Torres, A. Giulietti, J.F.T. Spencer and D. Spencer, 1986. Isolation of yeast with killer activity and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion. *Appl. Microbiol. Biotech.*, **24**, 414-416.
6. Bruenn, J.A., 1981. Virus-like particles of yeast. *Ann. Rev. Microbiol.*, **34**, 49-68.
7. Bruenn, J. and W. Kane, 1978. Relatedness of the double-stranded RNAs present in yeast virus-like particles. *J. Virol.*, **26**, 762-772.

8. 飯塚 廣, 後藤昭二, 1980. 酵母の分類同定法, 東京大学出版會, 東京.
9. Chung, K.T., K.W. Bang, S.G. Chung, H.I. Song and J.K. Kim, 1989a. Isolation of the killer yeasts and its characteristics. *Kor. Jour. Microbiol.*, **27**, 415-421.
10. Chung, K.T., K.W. Bang, H.I. Song, J.K. Kim and Y.J. Jung, 1989b. Conditions for protoplast formation and fusion of the killer yeast. *Kor. Jour. Microbiol.*, **27**, 422-429.
11. Chung, K.T., U.K. Kim and H.I. Song, 1985. Effects of phenolic compounds in milled barley grains on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. Jour. Microbiol.*, **24**, 168-174.
12. Fink, G.R. and C.A. Styles, 1972. Curing of killer factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2846-2849.
13. Fried, H.M. and G.R. Fink, 1978. Electron microscopic heteroduplex analysis of "killer" double-stranded RNA species from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4224-4228.
14. Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Phillips, 1981. Manual of methods for general bacteriology. *American Society for Microbiology*, Washington, pp. 456-457.
15. Gunge, N. and K. Sakaguchi, 1981. Intergeneric transfer of deoxy-ribonucleic acid killer plasmids pGKI1 and pGKI2 from *Kluyveromyces lactis* into *Saccharomyces cerevisiae* by cell fusion. *J. Bacteriol.*, **147**, 155-160.
16. Hara, S., Y. Iimura, H. Oyama, T. Kozeki and K. Kitano, 1981. The breeding of cryophilic killer wine yeasts. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1327-1334.
17. Hastie, N.D., V. Brennan and J.A. Bruenn, 1978. No homology between double-stranded RNA and nuclear DNA of yeast. *J. Virol.*, **28**, 1002-1005.
18. Herring, A.J. and E.A. Bevan, 1977. Yeast virus-like particles possess a capsid-associated single stranded RNA polymerase. *Nature*, **268**, 464-466.
19. Holm, C.A., S.G. Oliver, A.M. Newman, L.E. Holland, C.S. McLaughlin, E.K. Wagner and R.C. Wagner, 1978. The molecular weight of yeast P1 double-stranded RNA. *J. Biol. Chem.*, **253**, 8332-8336.
20. Kue, S.C. and S. Yamamoto, 1979. Preparation and growth of yeast protoplasts. *Ann. Rev. Microbiol.*, **33**, 169-181.
21. Mitchell, D.J., A.J. Herring and E.A. Bevan, 1976. The genetic control of dsRNA virus-like particles associated with *Saccharomyces cerevisiae* killer yeast. *Heredity*, **37**, 129-134.
22. Nesterova, G.F., Y.O. Soom and A.P. Perevoshikov, 1976. Double-stranded RNA of homothallic *Saccharomyces* with various cytoplasmic determinants of an antagonistic activity. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR Ser. Biol.*, **226**, 951-954.
23. Ouchi, K., T. Nishiya and H. Akiyama, 1983. UV-killed protoplast fusion as a method for breeding killer yeasts. *J. Ferment. Technol.*, **61**, 631-635.
24. Ouchi, K., R.B. Wickner, A. Toh-E and H. Akiyama, 1979. Breeding of killer yeasts for Sake brewing by cytoduction. *J. Ferment. Technol.*, **57**, 483-487.
25. Palfree, R. and H. Bussey, 1979. Yeast killer toxin; Purification and characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **93**, 437-451.
26. Rodphaya, D., T. Kakizono, T. Seki, S. Kinoshita and H. Taguchi, 1983. Physiological comparison between a fusant and its parents of *S. cerevisiae* in ethanol fermentation. *Ann. Rep. ICME*, **6**, 221-231.
27. Seu, J.H., Y.H. Kim, D.Y. Jun and J.T. Lee, 1986. A study on strain improvement by protoplast fusion between amylase secreting yeast and alcohol fermenting yeast. I. Isolation and characterization of fusant between *S. cerevisiae* and *S. diastaticus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 305-310.
28. Sherman, F., G.R. Fink and J.B. Hicks, 1982. Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor, New York, p.5, 64.
29. Shimoda, M., H. Mizoguchi and E. Fuzita, 1984. Breeding of killer-resistant sake yeasts (neutral) using the miniprotoplast fusion method. *J. Brew. Soc. Japan*, **79**, 349-354.
30. Sipiczki, M. and L. Ferenczy, 1977. Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophs mutants of identical mating type. *Mol. Gen. Genet.*, **157**, 77-83.
31. Spencer, J.F.T. and D.M. Spencer, 1983. Genetic improvement of industrial yeasts. *Ann. Rev. Microbiol.*, **37**, 121-142.
32. Summers, J.B. and G.F. Somers, 1949. Laboratory experiments in biological chemistry. Academic Press, New York, pp. 38-39.
33. Sweeney, T.K., A. Tate and G.R. Fink, 1976. A study of the transmission and structure of double-stranded RNAs associated with the killer phenomenon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **84**, 27-42.
34. Vodkin, M., F. Katterman and G.R. Fink, 1974. Yeast killer mutants with altered double-stranded ribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, **117**, 681-686.
35. Wickner, R.B., 1974. "Killer character" of *Saccharomyces cerevisiae*: Curing by growth at elevated temperature. *J. Bactriol.*, **117**, 1356-1357.
36. Wickner, R.B., 1976. Killer of *Saccharomyces cerevisiae*: a double-stranded ribonucleic acid plasmid. *Bacteriol. Rev.*, **40**, 757-773.
37. Wickner, R.B., 1979. The killer double-stranded RNA plasmids of yeast. *Plasmid*, **2**, 303-322.
38. Wickner, R.B. and M.J. Leibowitz, 1976. Chromosomal genes essential for replication of a double-stranded RNA plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*, The killer character of yeast. *J. Mol. Biol.*, **105**, 427-443.
39. Yamamoto, T., J. Yagi, K. Ohta, M. Hamano, K. Ouchi and T. Nishiya, 1984. Breeding of an alcohol yeast with K₂ type of killer plasmids and its application to continuous alcohol fermentation. *Nippon No-geikagaku Kaishi*, **58**, 559-566.

(Received February 8, 1990)

(Accepted March 2, 1990)