

Saccharomyces cerevisiae D-71과 *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S의 세포융합으로 육성한 융합주의 특성

이종수·김찬조

충남대학교 식품가공학과

Characterization of Fusant from Protoplast Fusion between *Saccharomyces cerevisiae* D-71 and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S

Lee, Jong-Soo and Chan-Jo Kim*

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University,
Daejeon 302-764, Korea

The protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* D-71, a thermophilic strain and *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S, an osmotolerant strain were fused, and a fusant (FS-RN 1) was selected, then was characterized for its genetic stability, DNA content, cell capacity, growth rate, tolerance to salts and chemicals, β -fructofuranosidase level and ethanol fermenting activity. After 6 months of preservation, 5.8% of the fusant clones were segregated to parental types. The DNA content and cell capacity of the fusant were greater than those of the parental strains. Lag period of growth for the fusant was longer than those for the parents. The fusant colonies showed pink-color reaction to triphenyltetrazolium chloride(TTC) test. The fusant appeared to have resistances to NaCl at moderate levels between both parental strains, and resistances to KCl, sodium propionate and cycloheximide similar to either one of the parents. β -Fructofuranosidase activity of the fusant was 24.2×10^{-3} IU/g(dry wt) for 3 days culture. Ethanol yields after 4 days of fermentation by the fusant at 30°C were: 6.0%(v/v) from 40% of glucose and 8.8%(v/v) from 20% of sucrose.

전보(1)에서는 *Sacch. cerevisiae* D-71과 *Zygosacch. rouxii* SR-S의 원형질체 형성과 융합조건 등을 검토, 보고하였다.

알콜발효에 이용할 목적으로 육성한 융합주의 특성에 관한 연구는 주로 전분발효성효모의 육성과 그의 생리적 특성 및 이용성 등(2~11)에 대하여 실시되었고 그밖에 응집성효모(12)와 속성알콜발효효모(13)의 육성과 특성에 관하여 연구, 검토되었다. 일반적으로 융합주는 친주에 비하여 유도기가 길고 세포체적이 크며 DNA 함량이 높은 공통된 성질(2, 4, 7, 13)이 있는 것으로 알려지고 있다.

이 연구에서는 *Sacch. cerevisiae* D-71과 *Zygosacch. rouxii* SR-S의 세포융합으로 육성한 융합주중 유전안정성이 크면서 40°C에서 발효력이 높은 FS-RN 1를 선별하여 각종 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

융합주의 선별

Sacch. cerevisiae D-71과 *Zygosacch. rouxii* SR-S의 특성이 보완되어 최소배지에서 발육한 융합주들을 7일간격으로 다시 최소배지에 계대배양하여 유전적으로 안정화시켰다(5). 안정화된 융합주들은 완전배지에 배양하여도 친주로 복귀되지 않았기 때문에 3일간 완전배지(1)에 배양한 후 다시 완전배지와 최소배지에 동일 세포수를 도말하여 양쪽 배지에서 집락의 수가 같게 나타나는 균주들을 선별하고 이들 중 최소배지에서 생육이 왕성하고 40°C에서 40%의 glucose에 대한 발효력이 높은 FS-RN 1주를 선정하였다.

Key words: Protoplast fusion, characterization, *S. cerevisiae*, *Z. rouxii*

* Corresponding author

유전안정성

FS-RN1 균주를 약 4°C의 냉장고에 6개월간 보존 후 완전배지에 접종하여 30°C에서 2일간 배양한 후 멸균생리식염수에 5.0×10^7 /ml로 현탁시킨 다음 완전배지와 최소배지에 평행배양하여 완전배지와 최소배지에서 생육된 집락수의 비율로서 유전안정성을 검토하였다(2).

DNA 함량과 세포체적

Sacch. cerevisiae D-71은 48시간, *Zygosacch. rouxii* SR-S와 FS-RN1 균주는 72시간 배양한 후 Rodphaya 등(13)의 방법에 따라 DNA를 추출한 다음 Diphenyl법(14)으로 salmon sperm DNA를 표준 DNA로 하여 정량하였다. 또한 Sipiczki 등(15)의 방법에 따라 친주와 FS-RN1의 세포체적을 측정하였다.

핵 및 포자염색

핵은 친주와 FS-RN1을 30°C에서 3일간 배양한 후 Aldehyde-Mordanted Basic Fuchsin법(16)으로 염색하였다. 또한 포자는 *Sacch. cerevisiae* D-71를 yeast ext. 0.8%, peptone 0.3%, dextrose 10.0% 함유한 전포자형성배지에 접종하여 30°C에서 3일간 배양한 후 다시 potassium acetate 1.0%, yeast ext. 0.1%, dextrose 0.05%의 포자형성배지(3)에 접종하여 5일간 배양한 다음 Moller법(16)으로 염색하였다. *Zygosacch. rouxii* SR-S와 FS-RN1은 이들을 간장국가수분해액(21)에 5% NaCl과 2%의 한천을 가하여 만든 배지에 접종하여 25°C에서 5일간 배양한 후 *Sacch. cerevisiae* D-71과 같이 염색하였다.

Triphenyltetrazolium chloride(TTC) 정색시험

김(17)과 飯塚(16) 등의 방법에 따라 친주와 FS-RN1의 TTC 정색시험을 실시하였다.

β -Fructofuranosidase 활성측정

친주와 FS-RN1을 일정시간 간격으로 배양한 후 원심분리하여 균체를 얻은 다음 0.25 M 초산완충액(pH 7.0)을 가하여 균체를 희석하고 이에 10% ethyl acetate를 가하여 30°C에서 15분간 처리하여 효소를 추출하였다(18). 이 효소액 1 ml와 sucrose 200 mM을 함유한 0.25 M 초산완충액(pH 7.0) 1 ml를 혼합하여 30°C에서 1시간 반응시킨 후 DNS 시약 2 ml를 가하여 반응을 중지시킨 다음 DNS법(19)으로 생성된 환원당을 정량하였다. 효수단위는 30°C에서 분당 200 mM의 sucrose에서 100 mM의 환원당이

생성되는데 요하는 효소의 양을 1 IU로 표시하였다(18).

에탄올 발효력

250 ml 삼각플라스크에 yeast ext. 0.4%, peptone 0.5%를 함유한 배지 100 ml를 가하고 glucose와 sucrose를 각각 20, 30 및 40%씩 첨가한 후 48시간 전배양한 효모액을 접종한 다음 30°C와 40°C에서 4일간 발효시켜 생성된 에탄올을 측정하였다.

결과 및 고찰

유전안정성

FS-RN1의 유전안정성은 Table 1과 같이 저온에서 6개월 보관했을 때 약 5.8%가 친주로 복귀되었다. 유전안정성은 보관조건 등에 따라 변동하므로 이 결과를 다른 보고(2, 10)와 직접 비교하기가 어려우나 FS-RN1은 비교적 안정하다고 생각된다.

DNA 함량과 세포체적

Table 2에서와 같이 친주보다 FS-RN1의 DNA 함량이 높았다. 이는 친주보다 융합주의 DNA 함량이 높았다는 기 발표결과(2, 3, 7, 10)와 같았다.

또한 FS-RN1의 세포체적은 162.54 nm^3 으로 친주보다 컸다(Table 3).

증식도

FS-RN1의 증식도는 Fig. 1과 같이 유도기가 18시간으로 *Sacch. cerevisiae* D-71의 12시간보다 길었고 증식정도도 낮은 편이었으나 *Zygosacch. rouxii*

Table 1. Genetic stability of the fusant, FS-RN 1.

Strain	Colonies on		% of Auxotroph
	CM	MM	
FS-RN 1	1.55×10^7	1.46×10^7	5.80

CM; Complete medium, MM; Minimal medium

Table 2. DNA contents in cells of the parents and the fusant, FS-RN 1.

Strains	Content of DNA (fg/cell)
<i>Sacch. cerevisiae</i> D-71	63.70
<i>Zygosacch. rouxii</i> SR-S	34.20
FS-RN 1	84.50

Table 3. Cell size and capacity of the parents and the fusant, FS-RN 1.

Strains	Cell length (μm)	Cell width (μm)	Cell volume* (μm ³)
<i>Sacch. cerevisiae</i> D-71	6.81	5.74	112.14
<i>Zygosacch. rouxii</i> SR-S	5.50	5.25	79.8
FS-RN 1	8.50	6.00	162.54

$$* V = \frac{4}{3} \pi \cdot \frac{a}{2} \cdot \left(\frac{b}{2}\right)^2$$

: where a, length of cells; b, width of cells

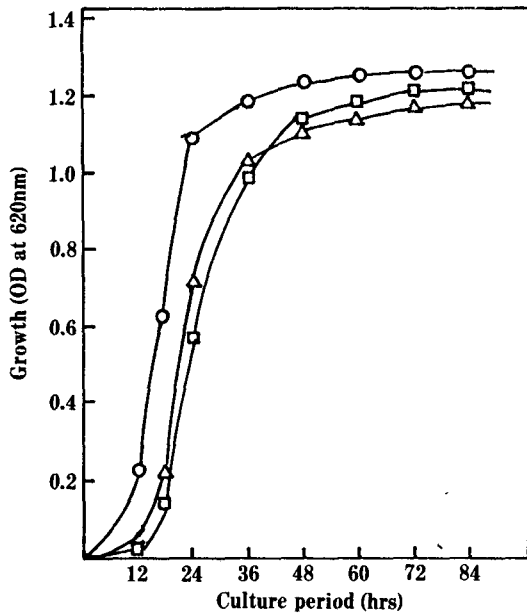


Fig. 1. Growth of the parents and the fusant, FS-RN 1 on YPDM medium.

○—○: *Saccharomyces cerevisiae* D-71
 △—△: *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S
 □—□: Fusant, FS-RN 1

SR-S와는 유사한 증식도를 나타내었다. 이와같이 융합주의 유도기가 긴 것은 기 발표결과(2, 3, 7, 20)와 같은 것으로 이는 융합주의 일반적인 성질인 것으로 생각된다.

핵 및 포자

친주와 FS-RN 1의 핵을 염색하여 검경한 결과 모두 적자색을 띤 1개의 핵을 관찰할 수 있었다(Plate 1). 또한 포자는 Plate 2와 같이 *Sacch. cerevisiae* D-71는 일반효모의 포자형성배지에서 포자를 잘 형성하였으나 *Zygosacch. rouxii* SR-S와 FS-RN 1은 형성하지 않았고 5%의 NaCl이 함유되어 있는 간장

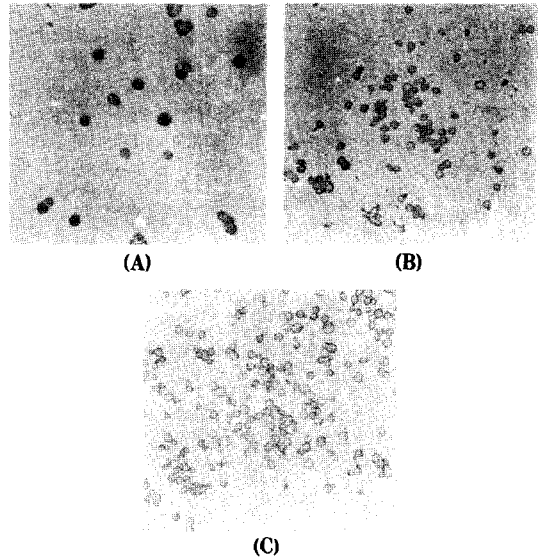


Plate 1. Nuclei of the parents and the fusant, FS-RN 1, stained by the Aldehyde-mordanted basic fuchsin method.

(A) *Saccharomyces cerevisiae* D-71
 (B) *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S
 (C) Fusant, FS-RN 1

국즙한천배지(21)에서 잘 형성하였으며 이는 Mori(21)의 보고와 같은 것이었다.

Triphenyltetrazolium chloride 정색시험

TTC 정색시험을 실시한 결과 Table 4와 같이 *Sacch. cerevisiae* D-71는 적홍색, *Zygosacch. rouxii* SR-S는 홍색을 나타내었으며 FS-RN 1은 친주보다 다소 더디게 홍색을 나타내었다.

탄소원의 자화성 및 내염성

Table 5에서와 같이 FS-RN 1의 탄소원의 자화성은 *Sacch. cerevisiae* D-71과 같았다. 또한 NaCl과 KCl에 대한 내성은 Table 6과 같이 *Zygosacch. rouxii* SR-S>FS-RN 1>*Sacch. cerevisiae* D-71의 순이었다. 이러한 FS-RN 1의 NaCl에 대한 내성은 *Sacch. diastaticus*와 *Candida tropicalis*의 융합주가 8%의 내성을 보였다는 서 등(3)의 보고보다 높은 값이었다.

약제내성

Table 7과 같이 FS-RN 1은 sodium propionate 1.0%, cycloheximide 8μg/ml에서 생육하여 친주의 하나인 *Zygosacch. rouxii* SR-S와 같은 내성을 보였다.

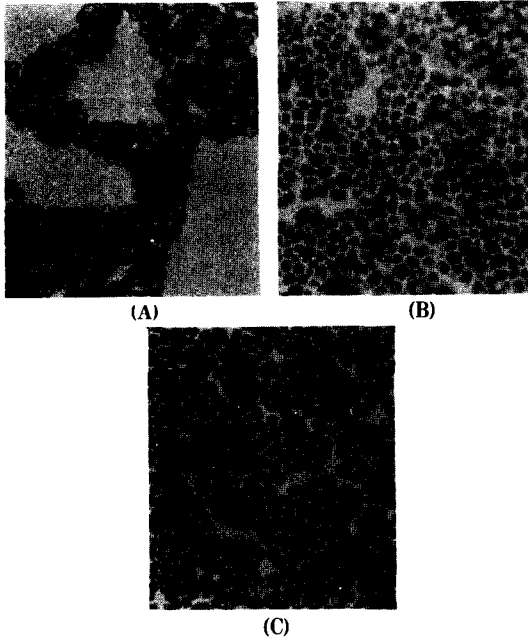


Plate 2. Spores of the parents and the fusant, FS-RN 1, stained by the Moller's method.

- (A) *Saccharomyces cerevisiae* D-71 in Spore formation medium.⁽³⁾
- (B) *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S in Soysouce koji hydrolysates medium⁽²¹⁾
- (C) Fusant, FS-RN 1 in Soysouce koji hydrolysates medium⁽²¹⁾

Copper 이온의 내성

Table 8 과 같이 *Sacch. cerevisiae* D-71은 600 $\mu\text{g/ml}$ 의 copper 이온농도에서 생육하지 못하였으나 *Zygosacch. rouxii* SR-S와 FS-RN 1은 800 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 생육하였다. 이러한 융합주의 copper 이온에 대한 내성은 서 등(3)의 *Sacch. diastaticus*와 *Candida tropicalis*의 융합주의 내성보다 강하였다.

β -Fructofuranosidase 활성

β -Fructofuranosidase 활성은 Fig.2와 같이 전 배양기간 동안 ethyl acetate를 처리하지 않은 세포현

Table 4. TTC(Triphenyl-tetrazolium chloride) test for the parents and the fusant, FS-RN 1.

Strains	Color
<i>Sacch. cerevisiae</i> D-71	reddish pink
<i>Zygosacch. rouxii</i> SR-S	pink
FS-RN 1	pink

Table 5. Assimilation of carbon source by the parents and the fusant, FS-RN 1.

Strains	Glu- cose	Lac- tose	Raffi- nose	Inulin	D-Xylose	Treha- lose
<i>Sacch. cerevisiae</i> D-71	+	-	+	+	-	+
<i>Zygosacch. rouxii</i> SR-S	+	-	-	-	-	-
FS-RN 1	+	-	+	+	-	+

탁액보다 ethyl acetate를 처리한 세포현탁액이 훨씬 높았다. 또한 *Sacch. cerevisiae* D-71은 배양 24시간, *Zygosacch. rouxii* SR-S와 FS-RN 1은 배양 72시간에 최고의 활성을 보였다. 이는 Arnold 등(18)이 *Sacch. rouxii*의 β -fructofuranosidase 활성이 배양 72시간에 가장 높았고 ethyl acetate로 처리한 세포현탁액이 무처리 현탁액보다 월등히 높았다는 보고와 같은 결과이었다.

Glucose와 sucrose에 대한 발효력

Table 9와 같이 glucose 20%와 30% 함유배지에서 FS-RN 1은 *Sacch. cerevisiae* D-71의 에탄올 발효력보다는 약하였으나 *Zygosacch. rouxii* SR-S보다는 높았고 특히 40%의 glucose를 30°C에서 4일간 발효시켰을 때 6.0%(v/v)의 에탄올을 생성하여 친주보다 높은 발효력을 보였다. 또한 FS-RN 1을 20%의 sucrose 함유배지에서 30°C와 40°C로 4일간 발효시켰을 때 각각 8.8%(v/v)와 3.0%(v/v)의 에탄올을 생성하여 친주보다 높은 발효력을 보였다.

Table 6. Sodium chloride and potassium chloride tolerance of the parents and the fusant, FS-RN 1.

Strains	Concentration of NaCl(%)							Concentration of KCl(%)				
	2	5	8	12	16	20	22	2	8	16	20	22
<i>Sacch. cerevisiae</i> D-71	++	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Zygosacch. rouxii</i> SR-S	++	++	++	++	+	+	-	+	+	+	+	-
FS-RN 1	++	++	++	+	+	-	-	+	+	+	-	-

Table 7. Sodium propionate and cycloheximide tolerance of the parents and the fusant, FS-RN 1.

Strains	Sodium propionate concentration (%)				Cycloheximide concentration ($\mu\text{g/ml}$)			
	0.5	1.0	1.5	2.0	1	5	8	10
	<i>Sacch. cerevisiae</i> D-71	+	+	+	-	+	-	-
<i>Zygosacch. rouxii</i> SR-S	+	+	-	-	+	+	+	-
FS-RN 1	+	+	-	-	+	+	+	-

Table 8. Copper resistance of the parents and the fusant, FS-RN 1.

Strains	Concentration of Cu^{2+} ($\mu\text{g/ml}$)					
	0	400	600	800	1000	1500
<i>Sacch. cerevisiae</i> D-71	++	+	-	-	-	-
<i>Zygosacch. rouxii</i> SR-S	++	++	++	+	±	-
FS-RN 1	++	++	++	+	±	-

전반적으로 FS-RN 1은 glucose보다 sucrose에 대한 발효력이 높았는데 이는 Fig. 2에서와 같이 sucrose의 가수분해효소인 β -fructofuranosidase 활성이 높아 생성되는 당 함량이 많기 때문인 것으로도 생각되고 당밀을 원료로 하는 에탄올공업의 이용면에 대한 검토가 기대된다.

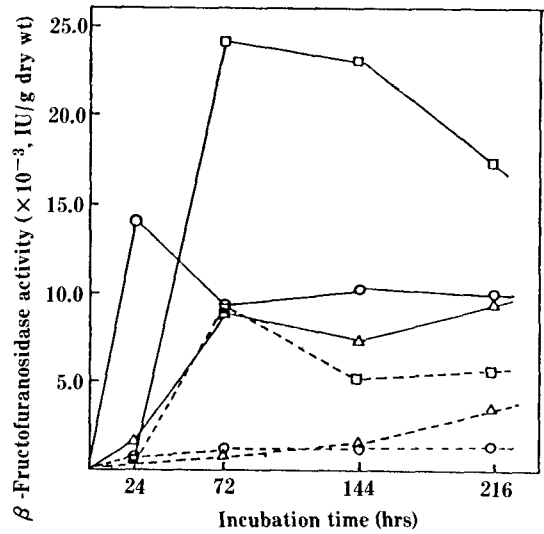


Fig. 2. β -Fructofuranosidase formation by the parents (*Saccharomyces cerevisiae*, ○---○; *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S, △---△) and the fusant, FS-RN 1(□---□) during stationary cultivation on YPDM medium.

The β -fructofuranosidase activity was assayed for intact cells and for ethyl acetate extracts, respectively.
 --- : Intact cell
 — : Ethyl acetate extracts

요 약

고온발효성인 *Sacch. cerevisiae* D-71과 내삼투압성인 *Zygosacch. rouxii* SR-S를 세포융합시킨 후 유

Table 9. Ethanol formation by the parents and the fusant, FS-RN 1.

Substrate	Concentration (%)	Temperature (°C)	Ethanol (v/v %)		
			<i>Sacch. cerevisiae</i> D-71	<i>Zygosacch. rouxii</i> SR-S	FS-RN 1
Glucose	20	30	7.6	3.4	4.0
		40	9.2	2.5	3.1
	30	30	10.0	3.2	4.3
		40	7.7	2.0	3.0
	40	30	5.4	3.0	6.0
		40	5.2	0.8	3.6
Sucrose	20	30	8.0	6.2	8.8
		40	4.0	2.8	3.0
	30	30	11.2	7.2	9.0
		40	10.0	3.8	4.1
	40	30	10.8	5.5	7.6
		40	9.5	2.1	3.4

전적으로 안정한 융합주 FS-RN1를 선별하여 각종 특성을 조사하였다.

FS-RN-1은 이를 4°C에서 6개월 보관했을 때 5.8%의 친주복귀율을 보여 유전적으로 안정하였고 친주에 비하여 세포체적이 컸고 DNA 함량이 많았으며 유도기가 다소 길었다. 또한 FS-RN1은 TTC 정색 시험에서 홍색을 띠었고 5% NaCl이 함유되어 있는 간장국가수분해액의 한천배지에서 포자를 형성하였다. FS-RN1의 NaCl에 대한 내성은 친주의 중간이었으나 탄소원 자화성, KCl과 sodium propionate 및 cycloheximide 내성은 친주중 어느 한쪽의 성질을 띠었다. FS-RN1를 72시간 배양한 후 회수한 세포를 ethyl acetate로 처리한 세포현탁액의 β -fructofuranosidase 활성은 건물 g당 24.2×10^{-3} IU로 친주보다 훨씬 높았다. 또한 FS-RN1의 발효력은 40% glucose와 20% sucrose를 30°C에서 4일간 발효시켰을 때 각각 6.0%(v/v)와 8.8%(v/v)의 에탄올을 생성하여 친주보다 높았다.

참고문헌

- 이중수, 김찬조 : 한국산업미생물학회지, **16**, (2), 142(1988).
- 서정훈, 김영호, 전도연, 이창우 : 한국산업미생물학회지, **14**(4), 311(1986).
- 서정훈, 권택규, 홍순덕 : 한국산업미생물학회지, **14**(5), 359, 365(1986).
- 배영석, 서정훈 : 한국산업미생물학회지, **14**(1), 23(1986).
- 정호권, 서원택, 구교임 : *HG. J. Gen. Eng.*, **1**, 37(1984).
- 정건섭, 구영조 : 식품연구사업보고(농산물 유통공사), **13**, 92(1986).
- Sakai, T., Kyo-Im Koo, Saitoh, K. and T. Katsuragi : *Agric. Biol. Chem.* **50**(2), 297 (1986).
- Yamashita, I. and S. Fukui : *Agric. Biol. Chem.* **47**(11), 2689 (1983).
- Barney, M.C., Jansen, G.P. and J.R. Helbert. : *J. Amer. Soc. of Brewing Chemists.* **38**, 1 (1980).
- Broock, M.R., Sierra, M. and L. de Figuerva : *Adv. in Biotech.*, **171** (1980).
- Russell, I. and G.G. Stewart : *J. Inst. Brew.* **85**, 95 (1979).
- Sangkaha, K., Myoga, S., Uedono, S., Seki, T. and H. Taguchi : *Ann. Rep. of ICME*, **4**, 415 (1981).
- Rodphaya, D., Kakizono, T., Seki, T., Kincshita, S. and H. Taguchi : *Ann. Rep. of ICME*, **6**, 221 (1983).
- Aigle, M., Erbs, D. and M. Moll. : *J. Inst. Brew.* **89**, 72 (1983).
- Sipiczki, M. and L. Ferenczy : *Molec. Gen. Genet.* **157**, 77 (1977).
- 飯塚 廣, 後藤 昭仁 : 酵母の分類と同定法. 東京大學出版會, 東京(1973).
- 김찬조 : 한국미생물학회지, **8**(2), 69(1970).
- Arnold, W.N. : *J. of Bacteriol.*, **120**(2), 886 (1974).
- Pesez, M. and J. Bartos : *Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Organic Compound and Drugs.* Marcel Dekker. N.Y. 407 (1974).
- 김영호, 서정훈 : 한국산업미생물학회지, **13**, (4), 383(1985).
- 秋山裕一 : 酵母の利用と開發. 學會出版センタ, 東京, 149(1978).

(Received June 17, 1988)