

Amylase 분비효모와 alcohol 발효효모의 세포융합에 의한 균주의 개발

제 4 보. *S. diastaticus*와 *C. tropicalis* 간의 융합체의
pullulanase 생성 및 alcohol 발효

서정훈 · 김영호 · 홍순덕 · 권택규

경북대학교 자연과학대학 미생물학과
(1986년 7월 19일 수리)

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

IV. Alcohol and pullulanase productivities of fusant
between *S. diastaticus* and *C. tropicalis*

Jung Hwn Seu, Young Ho Kim, Soon Duck Hong and Taeg Koo Kwon

Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu, Korea
(Received July 19, 1986)

The activity of glucoamylase and pullulanase, properties of glucoamylase and ethanol productivities of fusants were studied. Glucoamylase and pullulanase activity of fusants were higher than parents. The optimal pH and temperature of glucoamylase of fusants were very similar to the those produced by *S. diastaticus*. In alcohol fermentation, fermenting ability and fermentation rate of fusants were higher and faster than either of its parental strain. The maximum of alcohol yield in 15% of liquefied potato starch was 7.8% (v/v).

3보⁽¹⁰⁾에서 발표한 바와 같이 *S. diastaticus*와 *C. tropicalis*의 intraspecific fusants를 얻어 특히 유전 안전성을 기준으로 하여 선별한 균주에 대해서 본 보에 있어서는 이들 균주가 생성하는 효소인 pullulanase와 glucoamylase의 활성 및 효소학적 성질을 조사하였으며 또 전분을 기질로 하였을 때의 alcohol 발효능을 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 실험에 사용한 균주는 *Saccharomyces diastaticus* IFO 1046, *Candida tropicalis* IFO 0589 영양요구 변이주 및 양 영양 요구주의 protoplast fusion으로 얻은 융합세포는 Table 1과 같다.

Table 1. List of strains used

Strains	Phenotype	Remark
<i>S. diastaticus</i> IFO 1046	Wild type	
<i>S. diastaticus</i> A4	thr ⁻	NTG mutant of <i>S. diastaticus</i>
<i>C. tropicalis</i> IFO 0589	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

배지

Amylase production을 위한 배지는 yeast extract 1%, soluble starch 2%인 YPS를 사용하였고, 삼각 flask에서 정치 방법으로 alcohol 발효를 위한 배지는 α-amylase로 액화한 potato starch 또는 soluble starch 10%, (NH₄)₂SO₄ 0.3%, MgSO₄·7H₂O 0.2%, KH₂PO₄ 0.1%, yeast extract 0.2%로 하였다.

Jar-fermenter에서의 발효배지는 liquefied potato starch 15% (NH₄)₂SO₄ 0.3%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.2%, yeast extract 0.2%로 하였다. 다른 배지는 3 보⁽¹⁰⁾와 동일하다.

Glucoamylase test와 pullulanase test

Nelson-Somogyi 방법에 의하여 측정하였으며 효소액으로는 YPS 배지상에서 4일간 진탕배양한 배양 원액을 원심분리하여 그 상등액을 사용하였으며 반응 방법은 제 1 보⁽⁹⁾와 같으며 1 unit는 본 방법에서 1 μg/ml의 glucose를 1분간에 생성하는 효소량으로 하였다. Pullulanase test는 glucoamylase test와 동일하나 기질로써 1%의 pullulan을 사용하였다.

Alcohol 정량

발효액 250ml을 취하여 상법에 따라 증류한 후 hydrometer로서 측정하였다.

잔당 분석

발효액 5ml를 취하여 원심분리한 후 그 상등액 1ml를 취하여 일정 비율로 희석하여 그 희석액중 1ml를 round flask에 넣고 c-HCl 2ml, 증류수 20ml를 첨가하여 100°C에서 4시간 산 가수분해시킨 후 2N-NaOH로서 pH 5-6으로 adjust한 후 100ml mass flask에 증류수로 fill up시켜서 이중 0.5ml를 취하여 Nelson-Somogyi 방법으로 측정하였다.

발효력 조사

① 정치법에 의한 발효력 조사

Alcohol 발효력을 조사하기 위하여 250ml 삼각 flask에 soluble starch와 liquefied potato starch 각각

Table 2. Glucoamylase and pullulanase activity of parents and fusants

Strains	Amylase (unit)	Pullulanase (unit)
<i>S. diastaticus</i> A4	228.3	24.9
<i>C. tropicalis</i> RCT-40	147.1	61.3
FPDC-42	374.4	121.2
FPDC-43	352.6	125.6

Cells were cultured in YPS medium at 30°C for 4 days. Glucoamylase and pullulanase activity were determined with Somogyi-Nelson method at 50°C for 1 hour in the 0.1M acetate buffer (pH 5.0). One unit of enzyme activity was defined as the activity forming 1 μg glucose per ml reaction mixture in a minute under standard conditions.

10%를 기질로 하여서 배양일수에 따른 CO₂ 생성량에 의한 중량 감소를 측정하고 최종적으로 alcohol을 증류하여 그 농도를 측정하였다. 필요에 따라 auxotroph strain를 사용시에는 영양 요구 물질인 threonine과 lysine를 50 μg/ml 농도로 첨가하여 발효를 하였다.

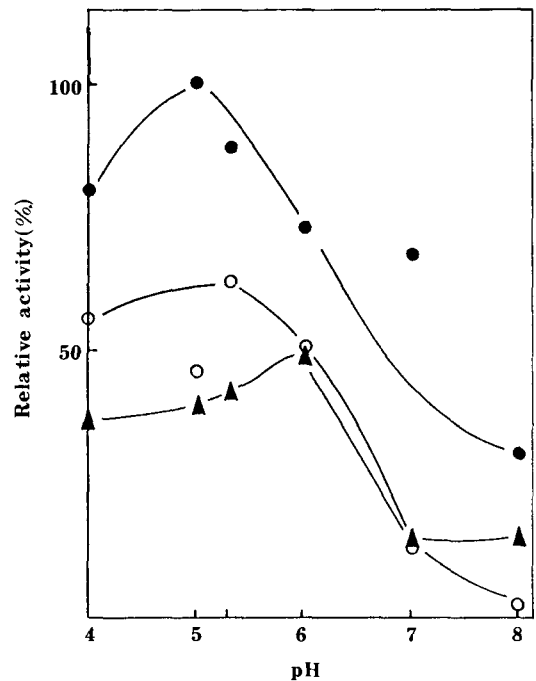


Fig. 1. Effect of pH on the activity of glucoamylase.

The glucoamylase activity of *S. diastaticus* A4 (▲-▲), FPDC-42 (●-●) and FPDC-43 (○-○) were examined in the various pH at 50°C for 1 hour.

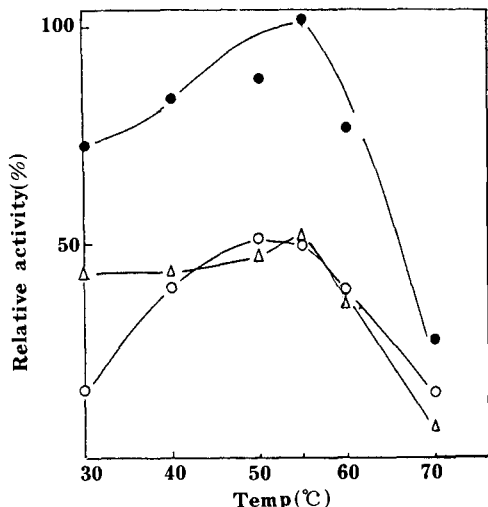


Fig. 2. Effect of temperature on the activity of glucoamylase.

The glucoamylase activity of *S. diastaticus* A 4 (▲-▲), FPDC-42 (●-●) and FPDC-43 (○-○) were measured at each temperature for 1 hour in the 0.1M acetate buffer (pH 5.3).

② Jar- fermenter에서 발효력 조사

Jar- fermenter에서는 15% potato starch를 α- amylase로 액화한 것을 기질로 하여서 균을 접종

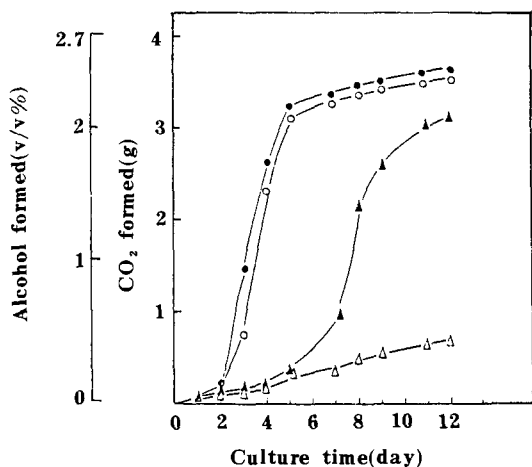


Fig. 3. Alcohol fermentation in soluble starch.

The fermentation was performed by standing culture in a medium containing 10% soluble starch, 0.3% (NH₄)₂SO₄, 0.2% MgSO₄·7H₂O, 0.1% KH₂PO₄ and 0.2% yeast extract (pH 5.3).

The yeast seed was inoculated to 1% (v/v). The ethanol produced was measured after 12 days at 30°C.

Symbols; *S. diastaticus* IFO1046 (▲-▲), *C. tropicalis* IFO0589 (△-△), FPDC-42 (●-●), FPDC-43 (○-○).

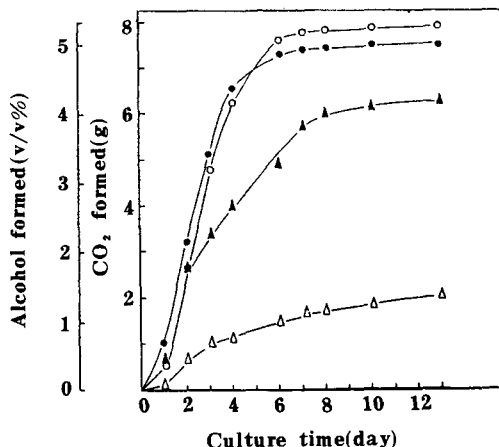


Fig. 4. Alcohol fermentation in liquefied potato starch.

The fermentation was performed by standing culture in a medium containing 10% liquefied potato starch, 0.3% (NH₄)₂SO₄, 0.2% MgSO₄·7H₂O, 0.1% KH₂PO₄ and 0.2% yeast extract (pH 5.3). The yeast seed was inoculated to 1% (v/v). The ethanol produced was measured after 12 days at 30°C.

Symbols: *S. diastaticus* IFO1046 (▲-▲), *C. tropicalis* IFO0589 (△-△), FPDC-42 (●-●), FPDC-43 (○-○).

후 6 시간 동안 aeration (0.5v/v/min.)하고 N-NaOH로 pH 4.2으로 유지시키면서 발효를 진행시켰다.

결 과

Glucoamylase와 pullulanase activity

Parent인 *S. diastaticus* A4와 *C. tropicalis* R-CT-40 및 fusant인 FPDC-42, 43의 glucoamylase와 pullulanase activity를 측정 한 결과 glucoamylase는 parent보다 fusant가 약 1.5배 정도의 높은 활성을 나타내었으며 pullulanase의 경우 역시 친주의 *C. tropicalis* RCT-40보다 약 2배 정도 높은 활성을 보였다.

Glucoamylase의 최적 pH

친주와 fusant가 생성한 glucoamylase의 성질 중 최적 pH를 조사한 결과 친주의 *S. diastaticus* A4는 pH 6에서 최대 활성을 나타내었으나 fusant인 FPDC-42는 pH 5, FPDC-43는 pH 5.3에서 최대 활성을 나타내었다.

Glucoamylase의 최적 온도

Parent와 fusants의 효소 반응 최적 온도를 조사한 결과 parent인 *S. diastaticus* A4와 fusant인 FPDC-42는 55°C에서 그리고 FPDC-43은 50°C에

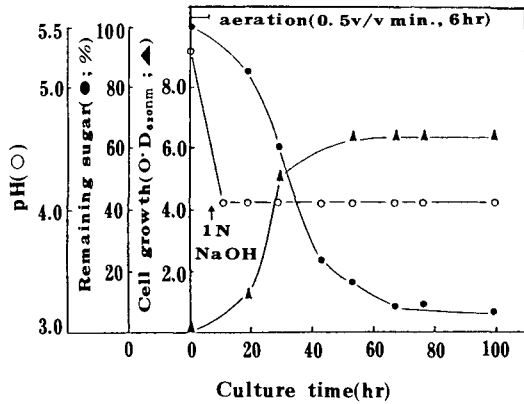


Fig. 5. Alcohol fermentation in liquefied potato starch.

The fermentation was performed by mini jar fermenter (Model No. M-100, Tokyo RIKAKAKU K.K) in the medium containing 15% of potato starch, liquefied with α -amylase, 0.3% $(NH_4)_2SO_4$, 0.2% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% KH_2PO_4 and 0.2% yeast extract (pH 5.3). Yeast seed was inoculated to 1% (v/v). During the fermentation, pH was adjusted to 4.2 by 1N NaOH. The ethanol produced was measured after 4 days at 30°C.
 Alcohol production = 7.8%
 Fermentation yield (yield/total sugar) = 73%
 Fermentation ratio (yield/consumed sugar) = 78%

서 최대 활성을 나타내었다.

Alcohol 발효

Parent strain인 wild type와 fusant인 FPDC-42, FPDC-43 균주를 사용하여 전분을 기질로 하여 alcohol 발효력을 조사하였다. 발효 방법은 정치 방법과 jar-fermenter를 사용하였으며 기질 전분으로서는 soluble starch를 사용하거나 potato starch를 α -amylase로 액화하여 사용하였다. 이때 15% potato starch를 α -amylase로서 액화시켰을때 생성한 직접 환원당은 사용한 potato starch량의 3%에 해당하였다.

고찰

새로운 alcohol 발효성 효모 균주 개발을⁽⁵⁾ 목적으로 *S. diastaticus*와 *C. tropicalis*간의 세포 융합을 하여 얻은 fusant의 glucoamylase와 pullulanase의 activity를 측정한 결과 fusant의 glucoamylase는 *S. diastaticus*보다 약 1.5배 활성이 높았다. 이것은 *S. diastaticus*의 glucoamylase에 대한 gene은 STA 1, 2, 3이 서로 unlinked되어 있고 STA 1 gene은 MAT gene에 의하여 repression되어 있다는 보고가 Yamashita와 Suzuki^(1,2,3,6)에 의하여 보고되어 있다. Fusion을 통하여 핵 융합이 일어날때 STA 1 gene에 대하여 derepression이 일어날 가능성이 있다.

Table 3. Alcohol fermentation from soluble and liquefied starch.

Fermentation method	Substrate	Substrate (%)	Temp. (°C)	Initial pH	pH control	Fermentation day	Strains	Alcohol (%)	Fermentation ratio (%)	Remaining sugar
Flaske scale (without shaking)	Soluble starch	10	30	5.3	No	12	<i>S. diastaticus</i> IFO1046	2.1	29.2	
						12	<i>C. tropicalis</i> IFO0589	0.5	7.0	
						12	FPDC-42	2.5	34.8	
						12	FPDC-43	2.4	33.4	
	Liquefied* starch	10	30	5.3	No	12	<i>S. diastaticus</i> IFO1046	4.2	58.4	
						12	<i>C. tropicalis</i> IFO0589	1.3	18.1	
						12	FPDC-42	5.0	69.6	
						12	FPDC-43	5.1	71.0	
Jar-fermenter	Liquefied* starch	15	30	5.3	Yes 4.2	4	FPDC-42	7.8	Total sugar 73% Consumed sugar 78%	0.9% (6% to total sugar)

*Potato starch was liquefied with α -amylase of *Bacillus licheniformis*.

Glucoamylase에 대한 성질을 조사한 결과 *S. diastaticus*는 pH 6에서 fusant는 pH 5.0-5.5에서 최대 활성을 보였다. 온도에 대한 영향은 공히 55°C에서 최대 활성을 나타내었다.

융합체의 alcohol 발효능^(4,7,8)을 조사하였는데 정치배양으로 10% soluble starch를 사용하였을 때 *S. diastaticus*는 alcohol 2.1 (v/v%)를 생성한데 반해 fusant FPDC-42는 2.5 (v/v%)를 생성하였다. 액화한 potato-starch를 사용하였을 때는 alcohol 생성력과 발효율이 2배 정도 증가되었다.

Jar-fermenter를 사용하여 15% liquefied potato starch로 발효하였을 때 FPDC 42는 7.8 (v/v%) alcohol을 생성하였고 이때 발효력은 소비당에 대하여 7.8%로 공업적 이용 가능성이 있는 것으로 나타났다.

요 약

새로운 alcohol 발효성 효모 균주 개발을 목적으로 *S. diastaticus*와 *C. tropicalis* 간의 세포 융합을 하여 얻은 fusant의 성질에 대해서는 제 3보⁽¹⁰⁾에서 발표한 바이다.

본 보에서는 fusant의 glucoamylase와 pullulanase activity와 glucoamylase의 성질 및 발효력을 조사하였다. glucoamylase activity는 parent보다 fusant가 1.5배 높은 활성을 나타내었고 pullulanase activity 역시 두배의 높은 활성을 나타내었다.

glucoamylase의 성질을 조사한 바 온도, pH에서 비슷한 경향을 나타내었으며 발효력을 조사하기 위하여 정치법에서는 기질을 soluble starch로 한 것보다 liquefied potato starch에서 alcohol 생성력이 2배 증가되었으며 발효력 또한 더 나았다. 15% 액화한 potato starch를 기질로하여 jar-fermenter에서 발효시켰을 때 당화율 94%에서 생성된 alcohol이 7.8% (v/v)이고 소비된 당에 대한 발효율은 78

%였다.

사 사

본 연구는 1985년도 문교부 지원의 유전공학 연구를 위한 학술 연구 조성비에 의하여 수행되었으며 관계하신 여러분께 감사드립니다.

참고문헌

1. Yamashita, I., T. Maemura, T. Hatano and S. Fukui: *J. of Bacteriol.*, **161**, 574 (1985).
2. Yamashita, I., Y. Takano and S. Fukui: *J. of Bacteriol.*, **164**, 769 (1985).
3. Yamashita, I. and S. Fukui: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 137 (1984).
4. Taya, M., H. Honda and T. Kobayashi: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2239 (1984).
5. Ooshima, H., Y. Ishitani and Y. Harano: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 389 (1985).
6. Yamashita, I., T. Hatano and S. Fukui: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1161.
7. Lalue, C. and J.R. Mattoon: *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 17 (1984).
8. Sakai, T., K.I. Koo and K. Saitoh: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 297 (1986).
9. 서정훈, 김영호, 전도연, 이종태: 한국산업미생물학회지, **14**(4), 305 (1986)
10. 서정훈, 권택규, 홍순덕: Amylase 분비효모와 alcohol 발효효모의 세포융합에 의한 균주의 개발; 제 3보. *S. diastaticus*와 *C. tropicalis* 간의 세포융합 및 융합체의 성질. 한국산업미생물학회지 투고중