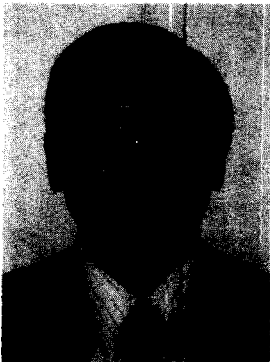


Rare-mating과 감마광선-돌연변이에 의한 에탄올 생성 우수 효모 균주의 개발



김 근

<수원대학교 유전공학과 교수>

I. 서 론

에탄올이 수송연료용 대체에너지로서 가솔린과 가격면에서 경쟁력을 갖추려면, 여러가지 신기술 개발로 그 생산비를 대폭 낮추어야 한다. 발효능이 우수한 균주를 개발하는 것은 기질의 가수분해, 발효공정, 에탄올의 분리 및 농축등의 엔지니어링 기술에 비하여 적은 투자로 크게 에탄올 생산비를 줄이는 효과를 가져다 준다.

본 연구에서는 수송연료용 에탄올의 생산을 위해 고생산성 저에너지형 효모 균주의 개발을 목표로 하고 있는데, 이는 짧은 시간에 잔당이 적고 고농도의 에탄올을 생산하는 균주를 뜻한다. 또한 균체를 여러번 재순환 하여 사용할 수 있도록 고 생존능 (high-viability)의 효모균주도 개발하고자 한다. 구체적으로는 33℃에서 4-5일간의 회분식 발효동안 전분 기질로부터 수율의 감소없이 에탄올 13%(v/v) 이상을 생산할 수 있는 균주를 개발하고자 하는데, 이러한 균주의 개발은 발효조의 용량을 줄이고 에탄올의 분리정제의 효율을 높이고 증류에너지의 사용을 절약할 수 있는 효과를 가져다 준다. 또한 발효시간의 단축으로 에탄올 생산에 필요한 에너지를 줄일 수 있고, 에탄올 생산성을 높여준다.

효모균주의 발효적 특성을 개량하기 위해서는 여러가지 유전적 방법이 사용되는데, 이에선 선택(selection), 돌연변이(mutation), 적응(adaptation), 잡종형성(hybridization), rare-mating, 원형질체 융합(protoplast fusion), 형질전환(transformation)등의 방법들이 있다.

효모세포의 생식은 보통 세포표면에 출아(bud)를 형성함으로 진행되는 무성생식이나 특별한 조건하에서 유성생식을 할 수 있다. 유성생식에서 정상적인 이배체(diploid)세포는 4개의 단수체 세포인 ascospore를 포함한 asci를 형성한다. Ascospore는 a와 α type의 mating-type을 갖는데 각각의 mating-type은 단수체 세포로 출아하여 생식할

目 次

I. 서 론

II. 실험재료 및 방법

III. 결과 및 고찰

IV. 결 론

수 있다.

Hybridization은 반수체 효모 a와 α 로 표시되는 두 mating-type 중 한 mating-type의 효모를 다른 mating-type의 효모와 혼합하면 두 세포가 결합하여 정상적인 a/ α type의 이배체(diploid) zygote가 형성된다. 이리하여 형성된 zygote는 원래 두 단수체 효모의 우수한 각각의 특성을 동시에 나타낼 가능성이 있게된다. 많은 수의 zygote중에서 다시 전분 발효력과 에탄올 내성등 발효 특성이 좋은 균주를 다시 선택한다(Russell and Stewart, 1985).

Rare-mating은 정상적인 hybridization 방법이 효과가 없을 경우와 포자를 형성할 수 있는 능력을 잃어버린 균주 또는 동일한 mating type 균주들의 hybrid(잡종)을 얻으려고 할 때 이용하는 방법이다(Spencer and Spencer, 1977; Russell and Stewart, 1985). 이 방법은 diploid나 polyploid에서 rare mating-type switching의 결과로 mating할 수 있는 strain이 자연적으로 드물게 생성되는 원리에 근거하고 있다(Gunge and Nakatomi, 1972).

Non-mating 균주를 높은 세포밀도로 혼합하였을 때 핵이 융합된 진정한 hybrid는 아주 낮은 비율로 생기며 진정한 hybrid들을 쉽게 선택적으로 분리할 수 없는 어려움이 있다. 그러므로, hybridization과 rare-mating 이후 hybrid의 분리를 위해서 영양요구성 돌연변이주와 petite 돌연변이주 등 selection marker를 지닌 균주의 사용은 필수적이라 할 수 있다. 즉 서로 다른 selection marker를 가진 두 균주를 혼합하여 최소고체배지에 접종하면 핵이 융합된 진정한 hybrid들만 성장하고 융합이 안된 모균주들은 성장을 하지 못하는 원리로서 진정한 hybrid만 분리해 낼 수가 있다.

영양요구성 균주는 DNA의 염기서열 또는 표현형이 변화됨을 의미하며, 대사경로에서 단백질 생합성 등에 관여하는 효소의 결합으로 야생형(wild

type)의 생육에 필요한 최소영양이 포함된 배지에 vitamins, 아미노산, 그리고 핵산관여물질들과 같은 특정한 대사물을 첨가하여야만 정상적인 생육을 하게된다. 효모의 경우 특히 산업적으로 쓰이는 에탄올발효 균주들은 두쌍 이상의 게놈(genome)을 지니고 있어 반수체인 실험실적 효모 균주들에 비해 돌연변이 유발율은 낮은 것으로 알려져 있다.

Petite 돌연변이주는 호흡계가 결여된 균주로 cytochrome계 중 cytochrome C만 정상적이거나 거의 정상인 양을 가지고 있고 나머지는 결여되어 있으며 이는 mitochondrial DNA가 없거나 변화된 mitochondrial DNA를 지니고 있기 때문에 밝혀졌고 그 marker가 안정된 상태를 유지할 수 있는 장점이 있다(Spencer et al., 1985; Spencer et al., 1988). Petite 돌연변이주는 자연적으로도 높은 율(0.5%)로 생기지만 그 비율을 증가시키기 위해 여러 시약을 사용하는데, acriflavine과 ethidium bromide가 효과적인 것으로 알려져 있으며 성장을 위한 탄소원으로 glycerol을 이용할 수 없기에 선택배지 상에서 쉽게 분리할 수 있다(Seki et al., 1985).

돌연변이는 유전자의 변화가 일어나는 것으로, 가장 많이 쓰이는 돌연변이 유발원에는 자외선(UV), EMS(ethylmethane sulfonate)등이다. 감마광선(γ -ray)에 의한 돌연변이는 잘 사용되지 않는 방법이지만 돌연변이율이 높고 빠르게 유전자의 변화가 일어난다는 점에서 장점이 있다(Hannan et al., 1976). 이 방법들은 염색체 유전자좌(locus)의 많은 부분을 손상시켜 효소활성을 상실시키므로 표현형이 쉽게 노출되어 돌연변이율이 높기 때문이다.

본 연구에서는 스크리닝(screening)을 통해 확보하여 놓은 에탄올 생성능 및 생존능 우수균주들로부터 교배(rare-mating)와 감마광선에 의한 돌연변이등의 유전적 방법을 통해 현재 국내 주정공장의 현장에서 사용되는 발효 균주들보다 고농도

의 기질에서도 수율의 저하없이 에탄올 생성능 및 생존능이 더 우수한 균주를 개발해 내는 것이다.

II. 실험재료 및 방법

1. Rare-mating에 의한 균주개발

1.1 Rare-mating

에탄올 생성능과 생존능이 좋은 균주를 얻기 위하여 rare-mating기술을 이용하였다. Mating된 hybrid의 확인과 분리를 위하여 auxotrophic mutant(Sherman et al., 1986)와 petite mutant(Tatsujii et al., 1983)를 사용하였다.

가. 균주

Mating에 사용된 균주는 균주의 선별과정중 에탄올 생산능이 높은 배수체균주인 *Saccharomyces cerevisiae* 11-1과 단수체균주 *Saccharomyces sp.* 1185가 사용되었고 2주일에 한 번씩 계대배양 한 후 4°C에서 보관하며 사용하였다. 11-1균주는 국내토양으로부터 탐색과정을 거쳐 분리하였으며, 1185균주는 a, *Can'*, *STA*, *his⁻*의 특징을 가지며 에탄올 생성능이 비교적 높은 단수체 균주이다.

나. 배지 및 배양

효모균주의 성장배지로는 YPD를 사용하였는데 1%(w/v) yeast extract, 2%(w/v) peptone, 2%(w/v) dextrose로 구성하였다. SG배지는 0.67(w/v) Difco yeast nitrogen base(without amino acid)와 3%(v/v) glycerol로 구성되었다. 발효용 배지인 YPD25는 YPD에서 dextrose가 25%(w/v)가 되게 조정하였다. 모든 실험의 배양온도는 33°C를 사용하였고, 세포의 성장등을 위한 액체배지의 경우 진탕배양이 필요할 때는 rotary shaking incubator에서 200 rpm의 속도로 배양하였다. 또한 성장배지에서는 48시간 배양하였다.

다. Selection marker의 도입

본 실험에서는 acriflavine을 사용하여 respiratory deficient mutant를 얻었다(Tatsujii et al., 1983; Sherman et al., 1986; Spencer et al., 1988). 사용된 균주는 *S. cerevisiae* 11-1로 30°C에서 활성화시킨 균주를 YPD broth가 5 ml 들어 있는 cap test tube에 1loop를 접종하고 acriflavine수용액(14.4 µg/ml) 300 µl를 첨가하여 암실에서 30°C로 2일간 정치배양 하였다. 배양액을 10⁻²~10⁻³으로 희석한 후 0.1 ml을 취하여 YPDG 고체배지에 도말한 다음 30°C에서 2일간 배양하였다. Colony가 나타나면 그 위에 TTC agar medium[0.05%(w/v) triphenyl tetrazolium chloride, 0.05%(w/v) dextrose, 2%(w/v) agar]을 멸균처리 후 식힌다음 colony들이 있는 agar plate위에 얇게 도말하여 3시간 배양하면 흰색과 붉은 색을 나타내는데, 이때 흰색 colony를 YPD와 SG 고체배지에 동시에 접종하여 30°C에서 2일간 배양한 후 YPD에서는 자라지만 SG에서는 자라지 못하는 colony를 respiratory deficient mutant(petite mutant)로 간주하였다(Bacila et al., 1978). 이 respiratory deficient mutant가 revertant로 변하지 않았음을 확실하게 하기 위해 YPD와 SG배지에서 최고 10회 계대배양하여 안정성을 확인하였다.

라. Rare-mating

30°C에서 활성화시킨 영양요구주 *Saccharomyces sp.* 1185와 respiratory deficient mutant인 *S. cerevisiae* 11-1을 loop으로 YPD agar plate상에서 서로 혼합하여 30°C에서 2일 배양한 후 SG agar plate로 옮겨 성장시킨 다음 colony들이 나타나면 이 colony들은 다시 SG plate에 접종하여 자라는 colony를 hybrid균주로 간주하였다(Miklos et al., 1991; Seki et al., 1983; Legmann et al., 1986).

1.2 우수 hybrid균주의 선별

Hybrid의 선별을 위해 mating 결과 얻어진 150주의 hybrid균주들을 아래에 적힌 conventional selection method와 continuous culture selection method의 두 방법을 사용하였다.

가. Conventional selection method

백오십주의 hybrid균주들을 에탄올이 각 13, 15, 17% (v/v) 들어있는 YPD고체배지에 Pepper-multiple inoculator로 접종한 후 colony를 선별적으로 분리하였다. 이때 고체배지는 parafilm으로 sealing을 하여 에탄올의 증발을 막았고 30°C에서 3일간 성장시켰다.

나. 연속배양 선별방법

백오십주의 hybrid주들을 pH로 조절되는 continuous culture reactor에 동시에 접종하였다. 성장하는 cell이 생성하는 organic acid에 의해 pH가 낮아지고 에탄올이 포함된 배지가 들어가는 형태를 취하게 된다(Jimenez and Benitez, 1988).

다. 우수균주의 선별

여러 효모균주의 에탄올 발효능을 알아보기 위하여 여러방법으로 시험하였다. 15 ml cap test tube에 Durham fermentation tube를 포함하여 YPD25 10ml을 넣고 33°C에서 수시로 Durham fermentation tube의 CO₂ gas집적과 3일 후 에탄올 생성량, 잔당, viability등을 측정하였다.

라. 초기발효속도 측정

균주의 발효 속도를 비교하기 위하여 10 ml의 YPD배지를 채운 15 ml cap tube에 Durham fermentation tube(내부부피, 0.932ml)를 넣고 접종하여 30°C에서 정치배양 시키면서 발효중에 발생하는 CO₂ 가스가 Durham fermentation tube를 가득 채우는 시간(hr for filling)을 측정하였다. 초기발효속도(ml/hr)는 $[0.932 \div (\text{hr for filling})]$ 로 계산하여 나타내었다.

마. 에탄올 정량

Bernet and Gutman(1974) 방법에 의하여 alcohol dehydrogenase 효소를 이용한 에탄올 정량을 하였다.

발효효율(efficiency) 계산은 다음식에 의하여다.

Efficiency(%) =

$$\frac{\text{Ethanol content equivalent(g)}}{\text{Sugar utilized(g)}} \times 100$$

여기서 ethanol content equivalent는 ethanol (g) ÷ 0.511이다(1g의 glucose에서 이론치로 0.511 g의 ethanol이 생성되기 때문).

바. 잔당 정량

잔당(residual glucose)는 DNS시약(3,5-dinitrosalicylic acid 10 mg/ml, 2 N NaOH 0.2 ml/ml, sodium potassium tartarate·4H₂O 3g/ml)를 이용한 환원당정량법(Bernfeld, 1955)에 의하여다.

사. 생존능 측정

생존능은 methylene blue 염색법을 이용 haemocytometer로 측정하였다(Lee et al., 1981).

2. γ -irradiation에 의한 균주개발

1.1. 균주

Flask scale에서 선별된 우수균주중 conventional method의 hybrid clone 14(V14)와 continuous culture selection method의 clone 2(T2)를 사용하였다.

1.2. 돌연변이

균주의 활성화를 위하여 YPD plate에 2회 계대 배양한 후 YPD 액체배지에 1 loop접종하여 30°C에서 균주가 1.5×10^8 cell/ml이 될 때까지 배양하였다. 이 배양된 균주 1.5 ml를 2 ml용량의 멸균된 plastic vial에 넣고 [⁶⁰Co]를 γ -ray source로 사

용하여 여러 irradiation dose(0.7–8.8K Gy)별로 조사하였다. γ -Ray조사후 sample은 4°C로 유지시켜 가급적 빨리 YPD agar plate에 도말하여 2일동안 30°C에서 배양한 후 나타난 생존수를 계산하여 생존곡선을 작성하였다.

1.3 균주 선별

가. 1차 선별

Plate상에 도말하여 2일 후 형성된 colony들을 YPD25 액체배지 10 ml가 들어있는 15 ml cap test tube에 각각 접종하였다. 예비실험 결과에서 에탄올 생성량이 많은 균주일수록 잔당이 적은 것으로 대체적으로 나타났기 때문에 이들 중에서 모 균주보다 적은 잔당량을 보인 균주를 우수한 균주로 간주하고 선별하였다.

나. 2차 선별

일차 선별에서 선별된 16주의 돌연변이 효모균주를 YPD25에 1 loop씩 접종하여 33°C에서 3일 동안 정치배양을 발효시켰다. 3일 후 에탄올 생성과 잔당, 발효효율등을 비교하였다.

다. 타피오카 발효

평저 flask에 타피오카 분말과 타피오카분말의 0.1%(v/w) 이상의 공업용 α -amylase(Termamy 120 L, Novo Co.) 그리고 증류수 혹은 수도물을 넣어 혼합하였다. 이때 혼합비율은 inoculum(주모) 배양시에는 원료 : 물의 비율이 1 : 4.5이었고, 발효액 조제시에는 1 : 4이었다. 혼합된 원료를 무압증자로(105°C)에서 5~10분 마다 진탕하며 2시간 동안 증가시켰다.

2일간 YPD agar plate에서 활성화시킨 균주를 10 ml 배양액당 1 loop씩 접종하여 30°C에서 150 rpm으로 약 1일 배양하여 $1-2 \times 10^8$ cells/ml가 되도록 하였다. 증자와 당화가 끝난 타피오카 배지에 10%(v/v)의 inoculum($1-2 \times 10^8$ cells/ml)을 접종하여 발효시켰다. 발효 온도는 35°C였으며

1일 1회씩 흔들어 주며 4–5일간 발효하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Rare-mating에 의한 균주개발

효모균주의 hybridization은 서로 다른 mating type을 가지는 a와 α haploid균주 사이에서 자연적으로 일어나는 현상이다. 그러나 같은 mating type을 가졌을 때의 잡종형성이나 haploid와 polyploid사이의 접종형성은 쉽게 이루어 지지 않는다. 이런경우 non-mating type 두 종의 균주를 높은 농도의 세포수로 혼합하면 아주 드물게 잡종균주가 자연적으로 발생하게 된다. 이 방법을 이용하여 에탄올 생성능이 높은 non-mating type의 두 균주를 이용하여 더욱 우수한 에탄올 생성능을 가지는 잡종균주를 얻을 수 있다.

에탄올 내성을 갖는 효모균주들을 유전적으로 분석한 결과 에탄올 존재하에서 많은 유전자들이 세포성장을 저해하고 있음이 알려졌다(Jimenez and Benitez, 1987). 이 유전자들은 nonisogenic strain들에서 서로 다르기 때문에 nonisogenic hybridization 혹은 mating(genetic complementation)에 의해 모균주보다 에탄올 내성이 더 높은 hybrid들이 생길 수가 있다. 실제로 에탄올 내성이 증진된 hybrid들이 발견되었고(Jimenez and Benitez, 1987), 교배방법이 에탄올 내성이 높은 균주를 얻는 통상적인 방법으로 되어왔다(Ismail and Ali, 1971; Jimenez and Benitez, 1987; Seki et al., 1983).

본 연구에서는 haploid 1185균주와 industrial polyploid 11-1균주의 rare-mating을 실시하였고, rare-mating으로 얻어진 hybrid 150주를 두 가지 다른 selection방법을 사용하여 에탄올 생성능 우수균주의 선별을 수행하였다. 수많은 hybrid들 중에서 우수균주를 선별하는 일은 많은 작업이

필요하기 때문에 우수균주를 효과적으로 간단히 선별하는 방법의 확립이 먼저 선행되어야 할 필요가 있다.

에탄올 내성은 많은 유전자들에 의해서 유전적으로 조절된다고 알려져 있다(Aguilera and Benitez, 1986). 따라서 에탄올 내성이 높은 효모들연변이주들을 얻기가 매우 어렵고, 내성이 높다고 하여 꼭 높은 농도의 에탄올을 생성한다고 볼 수는 없으나(Del Castillo Agudo, 1985), 에탄올 내성을 가지고 있고 높은 에탄올 생성을 보이는 균주를 얻기 위하여 보편적인 방법으로 사용되는 에탄올 함유배지에서의 선별방법과 연속배양에서의 장기간에 걸친 선별방법을 이용하였다(Brown and Oliver, 1982).

여기서 사용된 방법중 conventional selection

method는 YPDE[ethanol 11, 13, 15%(v/v)] agar plate에 150여주의 효모균주를 각각 접종한 후 13%의 고정된 에탄올 농도에서 생존하는 균주를 선별하였고 다른 선별방법인 연속배양에 의한 에탄올 내성균주선별은 효모가 생산하는 유기산에 의해 산성화되는 배양액에 점점 높은 농도의 에탄올을 첨가배지가 들어가 넓은 범위의 에탄올 농도에서 우점종으로 살아남는 효모균주를 내성이 높은 균주로 간주하여(Jimenez and Benitez, 1988) 각각 무작위적으로 17균주씩을 선별하였다. 이 균주들 중 conventional selection method는 V로, pH-regulated continuous culture selection method는 T로 나타내었다.

한편 여러 hybrid들의 발효시험을 하였고 이들

[Table 1] The ethanol fermentation by various hybrid clones selected by conventional method^a

Parental strain	Hybrid clone No.	Ethanol production (% , w/v)	Residual glucose (% , w/v)	Viability(%)
1185 11-1		7.38	7.07	57.1
		7.55	6.68	62.7
	V1	7.63	6.64.	45.8
	V2	7.04	7.20	44.7
	V3	7.85	5.39	52.0
	V4	7.28	6.77	61.9
	V5	7.02	7.84	77.4
	V6	8.21	5.52	58.8
	V7	6.20	8.28	58.1
	V8	6.96	7.20	54.8
	V9	N.D. ^b	4.27	74.2
	V10	6.83	8.02	60.5
	V11	7.24	5.86	60.0
	V12	5.57	9.56	69.0
	V13	5.84	9.96	83.3
	V14	8.22	4.96	65.9
	V15	6.40	8.97	58.7
V16	7.29	7.41	61.5	
V17	7.36	6.72	52.9	

^a One loopful of each activated cells was inoculated into a 15 ml-cap tube containing 10 ml YPD-25 and the fermentation was conducted at 33°C for 3 days.

^b N.D., not determined

[Table 2] The ethanol fermentation by various hybrid clones selected by continuous culture method^a

Parental strain	Hybrid clone No.	Ethanol production (% w/v)	Residual glucose (% w/v)	Viability(%)
1185 11-1		7.38	7.07	57.1
		7.55	6.68	62.7
	T1	6.23	8.71	52.8
	T2	9.65	1.77	55.6
	T3	6.81	7.67	73.5
	T4	8.36	5.22	64.3
	T5	9.49	2.89	65.6
	T6	7.22	7.03	58.3
	T7	8.20	6.16	65.2
	T8	9.38	2.50	65.4
	T9	7.45	9.69	62.2
	T10	8.52	4.14	70.9
	T11	7.70	7.97	69.7
	T12	8.02	5.99	65.8
	T13	6.64	6.90	56.7
	T14	6.68	4.14	63.3
	T15	9.05	5.52	66.0
T16	8.81	2.84	68.8	
T17	7.58		66.7	

^a One loopful of each activated cells was inoculated into 15 ml cap tube containing 10 ml YPD-25 and the fermentation carried out at 33°C for 3 days.

의 에탄올 생성량, 잔당, 생존율을 측정하여 그 결과를 Table 1과 2에 나타내었다. Conventional한 방법에서 선별된 균주들 중 모균주들 보다 높은 에탄올 생성율을 보인 hybrid clone은 5주였으며 V14가 8.22%(w/v)로 제일 많은 에탄올을 생산하였고 동시에 잔당도 낮았다. 생존능도 모균주들보다 더 높아 65.9로 나타났다. Continuous culture방법에 의해 선별된 균주들 중 모균주들보다

높은 에탄올생성량을 보인 hybrid clone은 11주였으며 특히 T2와 T8 clone들이 각각 9.65, 9.38%(w/v)에 에탄올생성량을 보여 모균주보다 월등히 많은 에탄올생성량을 보였으며 이들 두 균주는 잔당도 모균주보다 적게 나타났으며 T8경우는 생존율도 우수하게 나타났다. 이들 결과들에서 볼 수 있듯이 일반적으로 잔당이 적을수록 높은 에탄올 생성능을 보여 주고 있다.

[Table 3] The initial fermentation rates of various yeast hybrids and their parents^a

Conventional selection method			Continuous culture selection method		
Parental strain	Hybrid clone No.	Initial fermentation rate(ml/hr) ^b	Parental strain	Hybrid clone No.	Initial fermentation rate(ml/hr)
1185		0.233	1185		0.233
11-1		0.186	11-1		0.186
	V1	0.133		T1	0.233
	V2	0.155		T2	0.311
	V3	0.155		T3	0.155
	V4	0.133		T4	0.186
	V5	0.117		T5	0.233
	V6	0.133		T6	0.233
	V7	0.155		T7	0.233
	V8	0.133		T8	0.311
	V9	0.133		T9	0.233
	V10	0.117		T10	0.233
	V11	0.155		T11	0.186
	V12	0.133		T12	0.233
	V13	0.155		T13	0.186
	V14	0.233		T14	0.186
	V15	0.133		T15	0.311
	V16	0.117		T16	0.186
	V17	0.133		T17	0.186

^a One loopful of each activated yeast culture was inoculated into 15 ml cap tube containing 10 ml YPD20 broth and Durham fermentation tube.

^b Initial fermentation rate is equal to the volume(0.932ml) of the Durham fermentation tube divided by the time(hr) required for filling up the Durham fermentation tube by CO₂ gas formed during fermentation.

여러 hybrid들의 초기발효속도를 측정한 결과를 Table 3에 나타내었는데 여기에서도 모균주보다 우수한 hybrid균주가 continuous culture 방법의 경우 T2, T8, T15의 3 clone이 나왔다.

본 실험에서는 V14, T2의 2 clone들을 우수균주로 선정하여 계속 실험하였다.

이들의 에탄올 생성능을 모균주 1185와 11-1과 flask scale로 다시 비교 실험하였는데(Table 4) 에탄올은 T2가 3일 발효후 V14에 비하여 1.5

%(w/v) 더 높은 11.36%(w/v)의 에탄올을 생산하였고 5일째는 9.88과 10.54%(w/v)로 비슷하였다. 여기서 T2 경우 에탄올량이 5일째에 감소하였는데 그 이유는 에탄올이 증발하였거나 세포의 대사작용에 재사용되었음으로 추측된다. 또한 잔당과 효율역시 T2가 3일, 5일에 0.64와 0.04%(w/v), 91.2와 82.6%(w/v)를 보여 에탄올 고 생산성균이 주로 다시 확인되었다.

[Table 4] Flask-scale ethanol fermentation by various yeasts and hybrid clones.

Yeast strain	Ethanol (%, w/v)		Residual glucose (%, w/v)		Efficiency(%)	
	3 days	5 days	3 days	5 days	3 days	5 days
1185	6.34	8.70	8.56	3.40	75.5	78.8
11-1	9.68	10.32	3.12	0.44	86.6	82.2
Hybrid V14	8.84	9.88	4.16	1.56	83.0	82.5
Hybrid T2	11.36	10.54	0.64	0.04	91.2	82.6

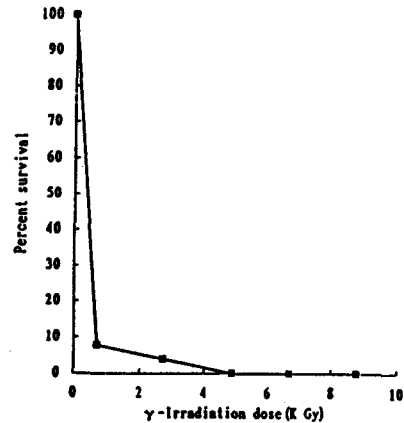
* An Erlenmeyer flask with a capacity of 250 ml containing 100 ml of YPD25 broth was inoculated with activated yeast cells to be a cell concentration of 1.5×10^8 cell/ml and was incubated anaerobically at 33°C for 3 days or 5 days.

2. γ -irradiation에 의한 균주개발

강력한 물리적 돌연변이원인 γ -ray에 의해 에탄올 생성능이 우수한 효모균주를 개발하기 위해 hybrid V14를 사용하여 돌연변이를 위한 최적 방사선량을 확립하고자 하였으며, 다시 이 최적 방사선량을 사용하여 T2균주의 에탄올 생성 우수균주를 개발하고자 하였다.

2.1 최적 방사선량의 결정

V14 hybrid균주의 γ -ray 조사에 의한 생존율을 조사하여 그 결과로부터 생존곡선을 Fig.1와 같이 작성하였다. 이들 결과에서 보면 0.7K Gy의 방사선량에서도 급격히 생존율이 감소하여 7.65%의 생존율을 나타냈으며 6.7K Gy 이상의 방사선량에서는 생존율이 0%를 나타내었다. 또한 사용한 각 선량에서의 생존균주들 중 17주-18주를 무작위적으로 선택하여 에탄올 발효시험을 하였고 우수 에탄올 생성균주를 얻기위한 1차선별을 위해 잔당을 측정하였는데(data not shown) 모균주보다 우수한 균주는 선량 0.7K Gy에서 10주, 2.7K Gy에서 2주, 4.9K Gy에서 2주, 6.7K Gy에서 2주들 모두 16주가 출현하였다. 이들 16주의 에탄올 생성능을



[Figure 1] The survival curve with γ -irradiation.

측정하여 그 결과를 Table 5에 나타내었다. 여기서 control보다 더 많은 에탄올 생성능을 보인 균주는 0.7K Gy에서 2주, 4.9K Gy에서 1주를 얻었고 그 외 선량에서는 전혀 얻지 못하였다. Table 6는 이들 실험결과들은 종합한 것인데 여기에서 보면 모균주보다 우수한 균주의 출현빈도가 0.7K Gy 경우 58.8%로 가장 높았고 선량이 많을 수록 출현 빈도가 낮아져 6.7K Gy의 경우는 5.6%를 나타내었다. 또한 가장 높은 에탄올 생성량인 9.6%(w/

v)를 보인 균주의 출현도 0.7K Gy의 방사선량에 γ -ray의 최적 방사선량은 0.7K Gy로 결정하였다. 서 획득하였으므로 결론적으로 균주개발을 위한 γ

[Table 5] The ethanol fermentation^a by various mutant strains of hybrid clone V14 obtained by γ -irradiation.

Radiation dose used(K Gy)	Strain	Ethanol Production Residual glucose		Efficiency(%)
		(%, w/v)	(%, w/v)	
0	Control	8.26	2.67	72.37
0.7	101	5.25	9.76	67.40
	103	7.10	6.55	75.30
	104	7.07	5.84	72.20
	105	8.36	2.54	72.83
	106	6.92	7.09	75.60
	107	9.60	2.23	82.49
	108	6.37	8.02	73.40
	109	7.99	4.10	74.80
	110	6.79	5.79	69.16
	116	6.59	7.75	74.75
2.7	203	6.27	8.78	75.64
	205	6.22	8.87	75.45
4.9	304	6.01	9.27	74.76
	306	9.37	2.45	81.04
6.7	403	7.21	6.42	75.93
	405	7.27	6.15	75.46

^a One loopful of each activated mutant cells was inoculated into 15 ml cap tube containing 10 ml YPD25 and fermentation was carried out and aerobically at 33°C for 3 days.

[Table 6] Frequency of obtaining strains with improved ethanol-production rate by γ -irradiation mutation.

γ -Radiation dose(KGy)	Frequency ^a (%)	Highest ethanol production(% w/v)
0.0	—	8.26
0.7	58.8	9.60
2.7	23.5	6.27
4.9	11.1	9.37
6.7	5.6	7.27

^a The ethanol-production rate to calculate the frequency(%) was estimated by residual glucose content in fermentation broth.

[Table 7] The ethanol fermentation^a by various mutant strains of hybrid clone T2 obtained by γ -irradiation.

Parental strain	Mutant	Ethanol Production (% w/v)	Residual glucose (% w/v)
Control		9.65	4.01
	4	7.75	3.80
	6	6.95	7.78
	7	8.82	3.66
	13	10.71	0.45
	14	9.25	2.40
	15	10.14	0.72
	20	9.04	2.71
	23	9.54	4.48
	26	10.53	0.99
	34	10.36	0.45
	35	9.74	0.76
	48	10.68	0.54
	55	10.78	0.90
	62	10.36	0.32
	64	10.71	0.27
	75	12.20	0.41
	78	10.51	0.32
	79	10.38	0.27

^a One loopful of each activated mutant cells was inoculated into 15ml cap tube containing 10 ml YPD25 and fermentation was carried out an aerobically at 33°C for 5 days.

2.2 1차 선별

γ -irradiation(0.7K Gy)후에 생존한 colony들을 모아 continuous culture selection방법을 사용하여 얻어진 균주 1000여주에서 colony의 외형이 좋고 잘자란 150주를 무작위적으로 선택하여 에탄올 발효를 하였고 잔당을 측정하여 그 발효능을 비교하였다. 여기에서 대조구보다 잔당이 적게 나타나 에탄올 생성능이 모균주 T2보다 우수하다고 사료되는 18주를 선별하였다(data not shown).

2.3 2차 선별

1차 선별에서 선별된 18주의 YPD25와 타피오카 배지에서의 에탄올 발효시험을 하였고 그 결과를 Table 7에 나타내었다. 시약합성배지 YPD25 배지 발효시험에서는 control보다 에탄올 생성능이 증진된 mutant는 12주이었고, 특히 mutant No. 75(T2-75)가 25%(w/v)의 glucose로부터 12.20%(w/v)의 에탄올, 즉 15.46%(v/v)의 에탄올을 생산하여 가장 우수한 균주로 나타났다. 또한

[Table 8] The ethanol fermentation of tapioca by industrial distillery strain KL and mutant strains of hybrid clone T2 obtained by γ -irradiation

Strain		Ethanol (%)	
Control	Mutant	w/v	v/v
KL		9.7	12.3
	T2-48	9.6	12.2
	T2-62	10.3	13.1
	T2-75	10.5	13.3

^a 20 ml(10^8 cell/ml) of each activated cells was inoculated into 500 ml Erlenmyer flask containing 200 ml tapioca slurry medium and the fermentation was carried out at 30°C for 4 days.

타피오카(17-18% 환원당, w/v) 배지에서는 T2-75를 포함한 5 돌연변이주가 control의 모균주보다 에탄올 생성능이 증진된 것으로 나타났다 (data not shown).

2.4 타피오카 발효

2차 선별에서 선별된 5균주를 다시 220ml의 타피오카 배지에서 발효시킨 결과를 Table 8에 나타내었는데 여기에서 특히 T2-62와 T2-75주는 24%(w/v)의 환원당을 가진 타피오카 발효배지로부터 각각 13.1%, 13.3%(v/v)의 에탄올을 생산하여 12.3%(v/v)를 생산한 국내주정생산 현장균주 KL보다 더 높은 에탄올 생성능을 나타내었다. 이들 개발된 균주들은 18%(w/v)의 환원당을 가진 타피오카 발효경우와 비교하여 볼 때 수율의 저하가 없었음이 관찰되었다.

IV. 결 론

1. 반수체인 *Saccharomyces sp.* 1185(his⁻)와 산업균주 *Saccharomyces cerevisiae* 11-1의 호흡결여 돌연변이주와의 rare-mating 결과 모균주들 보다 에탄올 발효능이 우수한 여러

hybrid균주들을 획득하였다.

2. Flask scale 발효시험결과 hybrid clone T2가 3일 발효후 25%(w/v) glucose로부터 11.36%(w/v)의 에탄올을 생산하여 rare-mating에 의해 얻어진 hybrid들 중에서 가장 우수한 균주로 선정되었다.
3. γ -Irradiation에 의한 에탄올 생성우수균주 개발시험에 있어 개발시험에 있어 7.6%의 효모세포 생존율을 나타내는 선량 0.7K Gy가 우수균주를 획득하는데 있어 최적의 방사선량으로 결정되었다.
4. Hybrid clone T2를 감마광선(γ -ray) 선량 0.7K Gy로 조사한 후 얻어진 돌연변이들 중에서 1, 2차 선별을 통해 5일 발효후 25%(w/v) glucose를 함유한 시약배지로부터 12.20%(w/v)의 에탄올, 즉 15.46%(v/v)의 에탄올을 생산하는 T2-75균주를 최우수균주로 최종선발하였다.
5. 산업기질인 타피오카(환원당 약 24%, w/v)를 사용한 발효시험 결과 T2-75는 수율의 저하없이 13.3%(v/v)의 에탄올을 생산하여, 12.3%(v/v)를 생산한 국내주정생산 현장균주 KL보다 더높은 에탄올생성능을 보였다.

참고문헌

- Aguilera A. and T. Benítez, Ethanol-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol., 143 : 337-344(1986).
- Bacila, M., A. W. Xavier, and J. Horii. Induction of respiration-deficient mutants of *Saccharomyces* and evaluation of their efficiency for ethanol production, in Biochemistry and Genetics of yeasts, Bacila, M. Horecker, B. L. and Stoppani, A. O. M., Eds., Academic Press, London, 577(1978).
- Bernet, T., and I. Gutman, Ethanol determination with alcohol dehydrogenase and β -NAD. p 1499-1502 In H. U. Bergmeyer (ed.) Method of enzymatic analysis. Vol 3 Academic Press, Inc., New York(1974).
- Bernfeld, P. Amylases α and β . Methods Enzymol. 1 : 149-158(1955).
- Brown, S. W. and S. G. Oliver. The effect of temperature on the ethanol tolerant of the yeast, *Saccharomyces uvarum*. Biotechnol. Lett. 4 : 269-273(1982).
- Del Castillo Agudo, L. Genetic aspects of ethanol tolerance and production by *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Microbiol. 12 : 41-44(1985).
- Gunge, N., and Nakatomi, Y. Genetic mechanisms of rare-matings of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* heterozygous for mating type. Genetics 70 : 41-58(1972).
- Hannan M. A., Sarwar M. G., Baten A. and Choudhury A., Stepwise mutational improvement of *Aspergillus niger* for citric acid productivity in cane molasses. Folia Microbiol., 21 : 409-412(1976).
- Ismail, A. A., and Ali, A.M.M. Selection of high ethanol-yielding *Saccharomyces*. I. Ethanol tolerance and the effect of training in *Saccharomyces cerevisiae* Hansen Fol. Microbiol. 16 : 346-349(1971).
- Ismail, A.A., and Ali, A.M.M. Selection of high ethanol-yielding *Saccharomyces*. II Genetics of ethanol tolerance. Fol. Microbiol. 16 : 350-354(1971).
- Jiménez J. and T. Benítez, Genetic analysis of highly ethanol-tolerant wine yeast. Curr. Genet., 12, 421-428(1987).
- Jiménez J. and T. Benítez, Selection of ethanol-tolerant yeast hybrids in pH-regulated continuous culture. Appl. Environ. Microbiol., 54, 917-922(1988).
- Lee, S. S., F. M. Robinson, and H. Y. Wang. Rapid Determination of Yeast Viability. Biotechnol & Bioengin. Symp. 11 : 641-649(1981).
- Legmann R. and P. Margalith. Ethanol formation by hybrid yeast. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23 : 198-202(1986).
- Miklos, I. and M. Sipiczki. Breeding of a distiller's yeast by hybridization with a wine yeast. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35 : 638-642(1991).
- Russell, I. and G. G. Stewart. Valuable techniques in the genetic manipulation of industrial strains. J. Am. Soc. Brew. Chem. 43 : 84-90(1985).
- Seki, T., S. Myoga, S. Limtong, S. Uedono, J. Kumnuanta, and H. Taguchi. Genetic construction of strains for high ethanol production. Biotechnol. Lett. 5 : 351-356(1983).

- Seki, T., Choi, E.H., and Ryn, D. Construction of killer wine yeast strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 : 1211-1215(1985).
- Sherman, F., Fink, G., and Hicks, J. B. *Method in genetics : laboratory course manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York(1986).
- Spencer, J. F. T., C. Bizeau, N. Reynolds, and D. M. spencer. The use of mitochondrial mutant in hybridization of industrial yeast strains. *Curr. Genet.* 9 : 649-652(1985).
- Spencer, J. F. T., D. M. Spencer. Hybridization of non-sporulation and weakly sporulating strains of brewer's and distiller's yeasts. *J. Inst. Brew.* 83 : 287-289(1977).
- Spencer, J. F. T., D. M. Spencer, and A. R. W. Smith. Yeast genetics. p65-106. In I. Campbell and J. H. Duffus(ed.) *Yeast : A practical approach.* IRL Press(1988).
- Tatsuji, S., Myoga, S., Limtong, S., Vedono, S., Lumnuanta, J., and Tagachi, H. Genetic construction of yeast strains for high ethanol production. *Biotechnol. Lett.* 5 : 351-356(1983).

交市人, 不如友山翁. 謁朱門, 不如親白屋. 聽街談巷語, 不如聞樵歌牧詠.
談今人失德過舉, 不如述古人嘉言懿行.

시중(市中) 사람을 사귀는 산골 늙은이를 벗함만 못하고, 고위 고관(高位高官)의 집에 허리굽힘은 오막살이를 친함만 못하며, 거리에 떠도는 말을 들음은 나무꾼과 목동의 노래를 들음만 못하고, 지금 사람의 덕(德) 없음과 그릇된 행실을 말함은 옛사람의 아름다운 언행(言行)을 이야기함만 못하다

—菜根譚중에서—