

Hybridization에 의한 반수체 재조합 효모균주의 전분 발효능 증진

박선영·김 근*·이창후¹

수원대학교 유전공학연구소, ¹에너지자원기술개발지원센터

Improvement of Starch-fermentability of Recombinant Haploid Yeast Strain by Hybridization. Sun-Young Park, Keun Kim*, and Chang-Hoo Lee¹. Center for Genetic Engineering Research. The University of Suwon. Suwon 445-743, ¹R & D Management Center for Energy and Resources, Seoul 137-060, Korea - To improve the fermentation characteristics (such as starch-degradability, ethanol tolerance, sugar and high-temperature tolerance) of recombinant haploid yeast *Saccharomyces diastaticus* K114, hybridization technique was used. The hybridization partner was *S. diastaticus* 1177 which had good glucoamylase activity and fermentability. The best hybrid HH64 showed improved ethanol tolerance, sugar and high-temperature tolerance. Especially, the starch-fermentability was significantly improved, since the hybrid produced 1.60% (w/v) ethanol from 4% (w/v) starch, while the recombinant haploid K114 produced 1.30% (w/v) ethanol. The optimum temperature and pH for the starch-fermentation by the hybrid HH64 was 30°C and 5, respectively. The hybrid yeast HH64 produced 7.5% (w/v) ethanol directly from 20% (w/v) starch.

에탄올(에틸알콜)은 기능적인 면에서나 경제적인 면으로나 타 에너지로 대체하기 곤란한 수송용 액체에너지로서 석유를 대신할 수 있는 에너지 중 가장 적합한 연료라 할 수 있다(5,11). 또한 공해 배출이 적어 청정 에너지로서 환경보호 측면에서 에탄올을 사용하는 것이 선진국을 중심으로 적극 검토되고 있다.

우리나라와 같은 온대지방에서 가장 많이 쓰이는 발효기질인 전분질로부터 연료용 에탄올을 생산하는 공정은; α -amylase에 의한 전분의 용액화, glucoamylase에 의해 용액화된 전분의 당화, 그리고 당화된 기질의 효모에 의한 에탄올 발효와 생산 등의 3단계 과정을 거친다. 이는 전통적으로 에탄올 발효에 사용되는 *Saccharomyces cerevisiae*와 *S. carlsbergensis* 같은 효모균주가 전분 분해력이 결여되어 있기 때문인데, 전분분해에 필요한 α -amylase와 glucoamylase 등의 효소비용과 그 공정비는 전체 에탄올 생산비의 상당부분을 차지하고 있다. 현재까지 전분으로부터 에탄올을 생산할 수 있는 균주는 glucoamylase를 분비하는 효모인 *Saccharomyces diastaticus*가 가장 적합한 균주로 알려져있는데 이 균주를 사용하면 필요한 glucoamylase량의 50%만 첨가해주어도 동일한 효과를 얻을 수 있었는데(17), 이는 공업적인 규모에서는 효소비용을 크게 절감할 수 있는 것이라 하겠다. 따라서 α -amylase와 glucoamylase를 동시에 분비하고 발효력이 우수한 균주를 개발한다면, 전분을 발효함에 있어 전통적인 3단계 발효공법을 거치지 않고, 1단계로 에탄올을 생산할 수 있어 대체 에너지로서의 에탄올을 경제적으로

로 대량 생산하는 데에 기여하게 된다. 이리하여 본 실험실에서는 쥐의 침샘유래의 α -amylase의 cDNA 유전자를 *S. diastaticus* 세포의 염색체에 삽입시켜 안정하게 α -amylase를 분비케하여, α -amylase와 glucoamylase를 동시에 분비하는 단수체 효모균주를 제작한 바 있다(15). 최근에 세균인 *Bacillus* 유래의 α -amylase 유전자와 *S. diastaticus* 유래의 glucoamylase gene을 동시에 갖는 재조합 균주들이 제작되었고 이 균주에 의한 전분분해력의 증진에 대한 보고가 있었다(1,8).

그러나 이들 재조합 균주들이 산업적인 에탄올 생산 균주로 쓰이려면 에탄올 생산 수율이 높아야 하고, 발효속도가 빨라야 하며, 에탄올 내성이 높아야 하고, 고온과 고농도의 당에서 생육상태를 유지할 수 있는 능력이 있어야 하며, 발효조건에서 안정하여야 한다(2,10). 특히 산업적으로 쓰이는 에탄올발효 효모균주들은 두쌍 이상의 게놈(genome)을 지닌 이배체 이상의 다배체(polyploid)로서 반수체 실험실적 효모 균주들에 비해 돌연변이 유발률은 낮아 오랜 세월동안 발효의 안정성을 유지하고 있다.

효모균주개발이라는 관점에서 hybridization은 반수체 효모 a와 α 로 표시되는 두 mating-type 중 한 mating-type의 효모를 다른 mating-type의 효모와 혼합하면 두 세포가 결합하여 a/ α type 이배체(diploid) zygote가 형성된다(17). 이리하여 형성된 zygote는 원래 두 단수체 효모의 특성을 동시에 나타내거나 gene dosage의 증가로 증진된 특성을 나타낼 수 있다. 실제로 hybridization에 의한 전분발효능의 증진(16)과 에탄올 내성의 증진(9)의 결과가 보고된 바가 있다.

이상과 같은 배경으로 본 연구에서는 hybridization 방법을 통하여 α -amylase와 glucoamylase를 동시에 분비하는 단수체 재조합 균주의 전분분해력과 여러 에

*Corresponding author.

Key words: Ethanol production from starch, alpha-and gluco-amylases, fermentation characteristics, hybridization.

탄을 발효특성들, 그리고 이배체 형성에 의한 유전적 안정성을 높이고자 하였다.

실험재료 및 방법

효모균주

Alpha-amylase와 glucoamylase를 동시에 분비하여 전분분해능이 우수한 형질전환체 K114/YIpMSΔR (LEU2/URA3)clone 1(15)와 glucoamylase를 분비하고 에탄올발효능이 우수한 *Saccharomyces diastaticus* 1177을 교배에 사용하였는데 이들 균주들의 특성들과 그 외 실험에 사용한 균주들의 특성들을 Table 1에 나타내었다.

배지와 배양

효모의 성장 배지는 1%(w/v) yeast extract(Y), 2%(w/v) peptone(P), 그리고 적당한 탄소원으로 구성되었다. YPD배지는 2%(w/v) dextrose(D)를 함유하고, YPD 1S3 배지는 1%(w/v) dextrose와 3%(w/v) Lintner soluble potato starch(Sigma Chemical Co.) (S)를 각각 포함한다. 발효배지 YPS4는 4%(w/v) Lintner potato starch를 함유한다. 최소배지 SD는 0.6%(w/v) Difco yeast nitrogen base(without amino acids), 2%(w/v) dextrose와 각 영양요구주의 성장에 필요한 영양소를 포함한다(18). Sporulation 배지는 1.0%(w/v) potassium acetate, 0.1%(w/v) yeast extract 그리고 0.5%(w/v) dextrose로 구성되어있다. Presporulation 배지는 0.8%(w/v) yeast extract, 0.3%(w/v) peptone, 10% dextrose (w/v), 2%(w/v) agar로 되어있다.

모든 균주의 배양은 30°C에서 행하여졌다. 2 circle plasmid를 갖는 형질전환체는 plasmid를 세포내에 유지시키기 위하여 최소배지에서 배양하였다. 산소존재 하에서 균주를 배양할 때는 rotary shaking incubator에서 250 rpm의 속도로 배양하였다.

Amylase의 활성 측정

효소 활성의 정량적 측정을 위한 반응 혼합물은 0.1 ml sodium phosphate buffer(1 M, pH 7.5)에 0.2 ml의 1.6%(w/v) 포화된 Lintner potato starch, 그리고 6000 ×g에서 원심분리한 배양액의 상등액 0.7 ml을 조효소 용액으로 하여 구성하였다. 이 혼합 반응물을 45°C에서 30분동안 반응시킨 후, 1 ml의 3,5-dinitrosalicylic acid 시약을 넣어 반응을 중지시킨 후 바로 생성된 환원당을 측정하였다(4). 여기서 사용된 반응조건인 pH 7.5, 45°C는 pMS12 형질전환체로부터 분비된 α-amylase 조효소의 최적 pH, 최적온도를 본 실험실에서 조사한 실험결과 얻어진 것이다. 효소 1 unit는 1 ml의 조효소 용액당 1분간 1 mole의 환원당을 방출하는 효소의 양이라고 정의하였다.

효소활성의 정성분석은 각 균주를 YPD1S3 agar plate에 접종하여 3~7일간 배양한 후 2일간 4°C에 냉장시켰다. Amylase활성을 가진 균주는 냉장으로 인한 전분의 침전으로 생긴 우유빛의 혼탁한 배경에 전분분해로 생긴 투명한 환(halo)를 나타낸다(14).

에탄올 내성 측정

YPD agar 배지에 접종하여 30°C에서 2일간 활성화시킨 균주를 여러 농도(11.5~14.0%, v/v)의 에탄올이 첨가된 YPD agar plate에 각각 replica plating한 후 30°C에서 각각 2일간 배양하여 그 성장 여부를 기록하였다.

당 내성 측정

당 내성의 측정은 30°C에서 활성화시킨 균주를 45%와 50%(w/v)의 glucose 혹은 sucrose가 포함된 YP agar plate에 replica plating한 후 30°C와 37°C에서 각각 2일간 배양하여 그 성장 여부를 기록하였다.

발효력 측정

당을 기질로한 발효력 측정을 위해서는 균주를 YPD

Table 1. The list of the yeast strains.

Strain	Relevant properties	Source
K114/pMS12ΔR(LEU2)	<i>S. diastaticus</i> K114 (10,16) containing pMS12ΔR(LEU2) ^a	Laboratory collection (9)
K114/YIpMSΔR-(LEU2/URA3)clone 1	a <i>ade6</i> , <i>his2</i> , <i>trp1</i> <i>S. diastaticus</i> K114 harbouring integrated YIpMSΔR(LEU2/URA3)	Laboratory collection (12)
HH64	Hybrid of K114/YIpMSΔR(LEU2/URA3) clone 1 and <i>S. diastaticus</i> 1177(<i>lys</i> ⁻)	This work
<i>S. diastaticus</i> 1177	α STA ^c	Laboratory collection (16)
<i>S. diastaticus</i> 1177(<i>lys</i>)	Lysine auxotroph of <i>S. diastaticus</i> 1177	This work

^aThe episomal plasmid pMS12ΔR(LEU2) was constructed (9) from pMS12 (17) harbouring mouse salivary α-amylase cDNA, ADC1 promoter of alcohol dehydrogenase I gene, 2 μ ori of yeast, etc.

^bThe integrating vector YIpMSΔR(LEU2/URA3) was constructed (12) from pMS12ΔR(LEU2) and contains yeast LEU2 gene and yeast URA3 gene.

^cContains one or more STA genes responsible for glucoamylase production of undefined genetic locus.

배지에 접종하여 rotary shaking incubator에서 2일동안 배양하였다. 이 배양액중 1 ml을 취하여 glucose 함량이 22.2%(w/v)인 YPD 배지 9 ml가 들어 있는 멸균된 cap tube에 접종시킨 후, 30°C에서 5일간 발효시켰다. 전분을 기질로한 발효력 측정을 위해서는 SD agar plate에서 2일간 활성화시킨 균주 3 loop를 YPS4 배지 10 ml가 들어있는 cap tube에 Durharm fermentation tube를 넣고 3일간 발효시킨 후, Durharm fermentation tube내부에 모아진 CO₂ 양을 육안으로 비교하여 발효력을 추정하거나, 그 에탄올 생산량을 정량 분석하였다.

에탄올 정량

발효액의 에탄올은 Bernet and Gutmann(3)의 방법을 변형하여 효소적으로 정량하였다(13).

형질전환체의 안정도 측정

형질전환체의 α -amylase 유전자 보유율은 발표된 방법(12)에 의하여 측정하였다.

UV조사에 의한 돌연변이 유발

활성화시킨 균주 1 loop를 취하여 10⁻⁶배로 희석하였고 희석액의 0.1 ml씩을 YPD agar plate에 삼각 유리봉으로 도말한 후 시간 간격을 두고 암실에서 UV (파장, 245 nm)를 조사하였다. UV조사 후 광활성화를 방지하기 위하여 알루미늄박으로 petri dish를 싸서 빛을 차단시키고 30°C에서 2일간 배양하여 나타난 colony수를 세어 각 UV조사시간 당 생존율을 구하였다.

Selection marker의 도입

융합세포의 확인과 검출을 위하여 UV를 사용하여 돌연변이를 일으켜 selection marker를 가진 영양요구성 돌연변이주를 분리하였고 또한 포자의 분리도 이루어졌는데 이들의 분리와 auxotrophic marker의 분석은 Sherman 등(18)의 방법에 근거하였다.

Hybridization

Glucoamylase 활성이 있고 auxotrophic marker를 가진 1177 *lys*(mating type, α) 균주와 K114/YIpMS Δ R (*LEU2/URA3*) (mating type, α) 균주를 YPD plate상에서 loop로 서로 혼합하여 성장한 균주를 다시 SD 배지에 접종하여 자란 colony를 hybrid로 간주 하였다. Hybrid의 diploid성을 확인하기 위해서는 presporulation 배지, sporulation 배지에서 배양한 후 광학 현미경으로 포자 형성능을 관찰하였다. 다시 이 hybrid 균주들의 에탄올내성, 당내성, 에탄올의 생산능을 조사하였다.

전분발효에 대한 온도와 pH의 영향

온도와 에탄올 생성량과의 관계를 조사하기 위하여

활성화된 균주를 YPS4 액체배지가 10 ml 포함된 15 ml 용량의 cap tube에 3 loop를 접종하여 24°C~40°C에서 4일동안 발효하는 과정에서 생성된 에탄올의 농도를 측정하여 비교하였다. 에탄올 생성에 있어서 pH의 영향을 조사하기 위하여 30°C에서 활성화된 균주를 0.1 M succinate buffer(pH 4~5.5)로 처리된 YPS4 배지와 0.1 M citrate-phosphate buffer로 처리된 YPS4 배지에 각각 접종하여 30°C와 34°C에서 배양한 후 생성된 에탄올의 농도를 측정하여 비교하였다.

결과 및 고찰

사용균주의 발효적 특성

Hybridization에 의한 발효특성증진을 위하여 교배를 위한 모균주들의 발효특성을 조사하였고 그 결과를 Table 2에 나타내었다.

여기에서 보면 형질전환체 K114/YIpMS Δ R(*LEU2/URA3*)보다 1177주가 30°C에서 에탄올 내성 및 당내성에서 더 우수하였고 37°C에서도 당내성에 있어 더 우수하였다. Glucose로부터의 에탄올 생성능에 있어서도 1177주가 8.06%(w/v)로서 K114/YIP의 6.75%(w/v)보다 훨씬 더 많은 에탄올을 생성하였다. 한편 1177주 경우 30°C에서 12.5%(v/v)의 에탄올에서 성장을 보였으나 37°C에서는 7.5%(v/v)의 에탄올 존재하에서도 성장하지 않았다. 이는 일반적인 현상으로서 효모성장은 온도가 올라감에 따라 에탄올에 저해를 더 받으므로(5) 에탄올 내성은 온도와 연결해서 생각해야한다(21).

Selection marker의 도입

Hybridization에 의해 생성되는 hybrid의 선별을 위해서 parental strain에 유전적 표시인 selection marker의 도입이 선행되어야 한다. 전분발효능이 우수하면서 glucoamylase를 분비하는 1177 효모 단수체 균주에 영양요구성 selection marker를 도입하기 위하

Table 2. Characteristics of parental yeast strains.

Strain	Growth ^a at 30°C		Growth ^a at 37°C		Ethanol production		
	Ethanol (%)	Glucose (v/v)	Ethanol (%)	Glucose (v/v)	(% w/v) ^b		
	12.5	14.0	45	50	7.5	9.0	
K114/YIp ^c	- ^d	-	±	-	-	-	6.75
1177	±	-	+	±	-	+	8.06

^aThe rate of growth was evaluated after 2 days with each culture grown on YPD containing various concentration of ethanol or YP containing different contents of glucose.

^bThe initial glucose content in the fermentation medium was 20%(w/v) and the fermentation was carried out at 30°C for 5 days.

^cK114/YIp=K114/YIpMS Δ R(*LEU2/URA3*)

^d+ represents good growth, ± slight, - no growth.

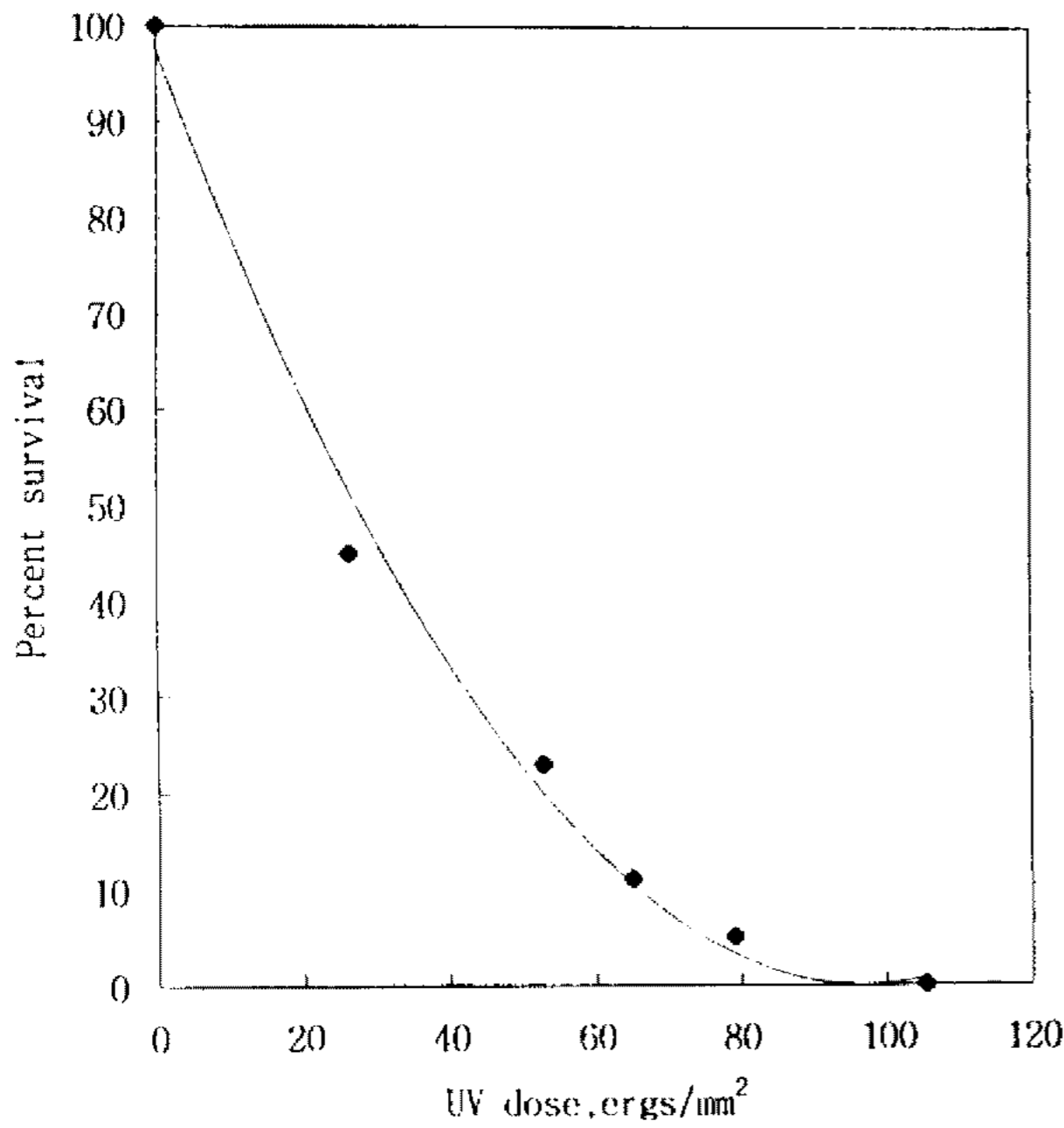


Fig. 1. Survival curve with UV irradiation.

여 기초실험에 근거한 성장곡선(Fig. 1)에 따라 95%의 사멸율을 나타내는 자외선 처리를 하였다. 여기에서 사용된 자외선의 처리시간은 4분이었고, 105.6 erg/mm²의 강도에 노출하였다.

이와같은 95% 사멸율을 나타내는 UV의 강도에서 생존한 총 723 colony로 부터 18주의 단일 marker를 가진 영양요구성 변이주를 확인하였는데 이들은 Lys⁻, Arg⁻, Met⁻, His⁻였으며, 특히 Lys mutant가 많은 수를 차지하였다(Table 3). 이들 18변이주 중에는 본 연구에서 사용한 20가지 영양소 외에 확인되지 않은 영양소의 요구성이 있는 변이주도 있을 것으로 사료된다.

또한 영양요구성 변이주 18균주의 glucoamylase 활성을 측정하였는데 모두 YPD1S3 plate상에서 halo를 나타내어 자외선 처리에 의한 돌연변이에 의해 그 활성을 잃지 않았음을 보여주었다. 이는 돌연변이원에 의해 요구하는 유전자 이외의 다른 유전자는 그 유전적성질을 잃지않고 그대로 유지하거나 더욱 증가될 수 있다는 Russell 등(17)의 결과와 일치한다. 그러나 SD plate상에 수차례 배양하였을 때 돌연변이체 m-12만이 영양요구성에 대한 revertant가 전혀 나타나지 않는 안정한 돌연변이체로 나타나 이균주를 hybridization에 사용하였다.

우수 hybrid 균주의 선발

Hybridization에서 얻어진 66주의 hybrid clone들 중에서 전분발효에 필요한 우수형질을 가진 clone를 선발하기 위하여 이들 clone들의 온도내성, 당내성, 에탄올내성, halo형성능, 발효속도, 전분발효능 등을 조사하였다. 이들 clone들은 30°C와 37°C에서 그리고 각 45%와 50% sucrose 함유 배지(YPD agar plate)에서 3일

Table 3. Characteristics of 1177 auxotrophic mutants.

Mutant strain	Amino acid requirement				Amylolytic activity	Stability of marker
	Met	Lys	Arg	His		
m- 1		+ ^a			± ^b	- ^c
m- 2	+				±	-
m- 3				+	±	-
m- 4		+			±	-
m- 5				+	±	-
m- 6		+			+	-
m- 7				+	±	±
m- 8		+			±	-
m- 9	+				±	-
m-10			+		±	-
m-11		+			++	-
m-12		+			++	+
m-13	+				±	-
m-14			+		±	-
m-15		+			±	-
m-16		+			±	-
m-17		+			±	-
m-18	+				±	-

^a + means that the amino acid is required for the growth of the mutant.

^b ++ depicts very good amylolytic activity (judged by the size of halo on YPD1S3 plate), ± poor activity.

^c The stability of marker was determined after the mutant was subcultured on YPD and SD plate for 7 times. + means that the marker is very stable, ± poorly stable, - not stable.

배양 후 모든 clone들이 똑같은 성장율을 보여 온도내성과 당내성에 있어서는 상호차이를 보이지 않았다. 한편 에탄올내성, halo형성능, 발효속도에서는 차이를 보였는데 Table 4에 나타난 HH01을 비롯한 8 clone들을 제외한 58주는 모두 12%(v/v)의 에탄올 함유배지에서 성장을 보이지 않았고, halo형성능과 발효속도가 상대적으로 열세하였다. Table 4에 나타난 바와같이 에탄올 내성, halo형성능, 발효속도가 상대적으로 우수한 8 clone들 중에서 발효속도와 전분발효능이 가장 우수한 clone은 HH64이었는데 이 clone은 YPS4배지에서 1.6%(w/v)의 에탄올을 생산하였다.

Hybrid HH64의 특성

우수 hybrid HH64의 여러 특성을 모균주인 K114/YIpMSΔR(LEU2/URA3)와 1177과 비교하여 Table 5에 나타내었다. 1177주는 α-amylase가 없었으나 HH64에는 α-amylase와 glucoamylase의 활성이 모두 있었다. 배수성(ploidy)에서는 HH64주가 이배체가 되어 단수체인 모균주들보다 유전적으로 안정하여 발효에 안정하게 쓰일 수 있다. 에탄올내성, 온도와 당내성면에서도 K114/YIpMSΔR(LEU2/URA3)에 1177주의 우수형질이 도입되어 HH64경우 에탄올 내성, 고온내성과 당내성이 증

Table 4. Various characteristics of hybrid clones of K114/YIpMSΔR(LEU2/URA3) and 1177 lys.

Yeast clone	Ethanol tolerance (% v/v) ^a		Halo ^b formation	Fermentation ^c rate	Ethanol production (% w/v)
	11.5	12.0			
HH01	++	+	++	+	1.3
HH02	++	+	++	+	1.3
HH03	++	+	++	++	1.6
HH04	++	+	++	++	1.4
HH05	++	+	++	+	1.3
HH54	++	+	++	++	1.3
HH60	++	+	++	++	1.6
HH64	++	+	++	+++	1.6

^aThe ethanol tolerance was measured after 3 days with each culture grown at 30°C on YPD agar plate containing 11.5 or 12.0% (v/v) of ethanol.

^bThe halo formation was tested on YPD1S3 agar plate by incubation of the plate at 30°C for 3 days.

^cThe fermentation rate and ethanol produced were determined by using cap tubes containing Durham fermentation tube and 10 ml of YPS4. Three loopfuls of each strain were used for an inoculum and fermentation was conducted at 30°C for 3 days.

Table 5. Characteristics of K114/YIpMSΔR(LEU2/URA3) and 1177 yeast strains and their hybrid HH64.

	K114/YIpMSΔR (LEU2/URA3)	1177	Hybrid HH64
α-Amylase	+	-	+
Glucoamylase	+	+	+
Ploidy	Haploid	Haploid	Diploid
Ethanol-tolerance(% v/v) at 30°C	<10	12	12
Temperature and sugar tolerance	- ^a	+	+
Ethanol(% w/v) production from starch ^b	1.30	0.95	1.60

^aGrowth at 37°C and in 45%(w/v) sucrose.

^bThree loopfuls of each strain were inoculated into 10 ml of YPS4 and the fermentation was carried out at 30°C for 3 days.

진되었다. 특히 주목할 것은 4%의 전분으로부터 K114/YIpMSΔR(LEU2/URA3), 1177, 그리고 hybrid HH64가 각각 1.30, 0.95, 1.60%(w/v)를 생산하여 hybridization 후 전분발효능이 크게 증진되었음을 알 수 있다. 이러한 hybrid HH64주의 전분발효능의 증가는 K114/YIpMSΔR(LEU2/URA3)에 1177주의 glucoamylase 유전자가 도입되어 glucoamylase의 유전자의 gene dosage가 증가한 때문으로 해석된다(7,16).

Table 6은 여러 형질전환체의 α-amylase 유전자의 세포분열시 안정성을 나타낸 것이다. 여기에서 보면 integrated vector가 episomal vector보다 훨씬 더 안정한

Table 6. Mitotic stability^a of α-amylase gene in the cells of yeast K114 transformant and its hybrid HH64 after different numbers of cell multiplication.

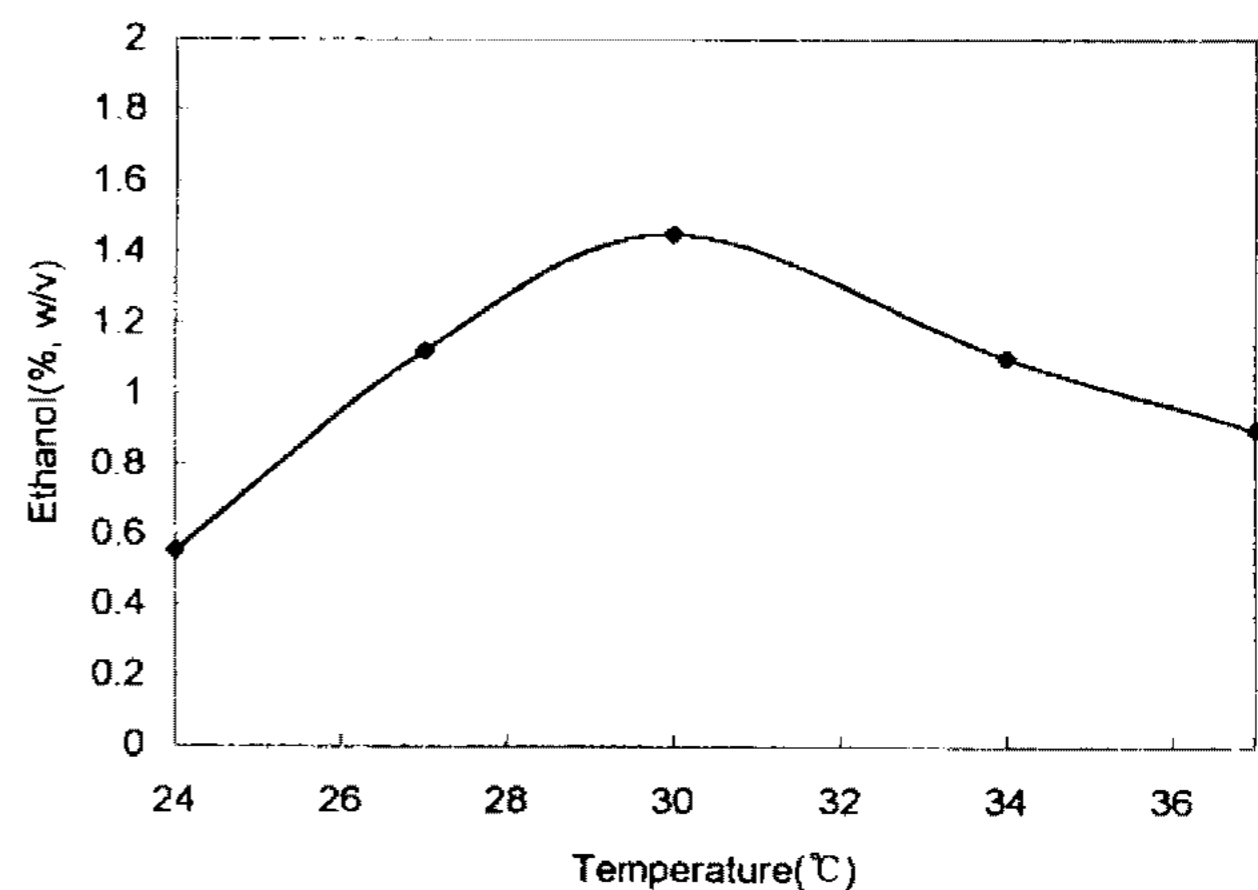
Strain	Mitotic stability (%)				
	0 G ^b	20	40	80	100
K114 with episomal vector ^c	100	92.6	59.0	17.3	0
K114 with integrated vector ^d	100	100	100	100	100
Hybrid HH64	100	100	100	100	100

^aThe halo forming ability of each transformant was expressed as the presence of the α-amylase gene in the cell of the transformant.

^bG means the number of generations of cell-multiplication.

^cK114/pMS12ΔR(LEU2)

^dK114/YIpMSΔR(LEU2/URA3)

**Fig. 2. Effect of temperature on starch-fermentation by hybrid yeast HH64. The fermentation was conducted for 4 days with YPS4 broth.**

α-amylase 유전자 보유도를 나타내었다. 한편 hybrid HH64의 유전자보유 안정성이 100세대 세포분열 후 100%로 나타나 단수체인 K114/YIpMSΔR(LEU2/URA3)에서의 유전자 보유안정성이 hybridization 후에도 이배체인 HH64에서 그대로 유지되었음을 알 수 있다.

전분발효에 대한 온도의 영향

Hybrid 균주 HH64의 전분발효에 있어서 온도의 영향을 조사하였고 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 여기에서 보듯이 hybrid 효모 HH64의 경우 30°C가 최적 발효 온도로 나타났다. 최적 발효 온도를 결정하는 과정에는 α-amylase와 glucoamylase에 의한 당화과정과 당으로부터 발효하는 과정을 들 수가 있는데 α-amylase와 glucoamylase의 최적 반응 온도는 각각 45°C 그리고 55°C(14)인 것으로 비추어 보아, 여기에 나타난 최적 전분 발효 온도 30°C는 전분분해의 최적온도이기 보다는 전분으로부터 얻어진 당을 에탄올로 전환하는 발효과정의 최적온도인 것으로 사료되며, 전분분해보다도 당 발효과정이 전체 최적 전분발효 온도를

Table 7. Optimal temperatures for starch-fermentation by various yeast strains and their hybrid^a.

Yeast strain	Optimal temperature (°C)
1177 wild type	30
1177 <i>lys</i> mutant	30
K114	30
K114/YIpMSΔR(<i>LEU2/URA3</i>)	30
Hybrid HH64	30

^aEach yeast strain (3 loopful) was inoculated into 10 ml YPS4, incubated at 24~40°C for 3~4 days, and the ethanol (% w/v) produced was measured to determine the optimal temperatures for starch-fermentation.

결정하였다고 볼 수 있다.

Table 7은 모균주들과 hybrid HH64의 전분발효에 있어서 최적온도를 비교한 것으로, 모균주들도 HH64와 같이 모두 최적온도가 30°C이었다. 한편 1177주의 *lys* mutant도 1177 wild type과 같은 30°C가 전분발효 최적온도이었고, K114의 형질전환체 K114/YIpMSΔR(*LEU2/URA3*)도 K114와 같은 30°C가 전분발효 최적온도이었다.

전분발효에 대한 pH의 영향

Hybrid yeast HH64에 의한 전분으로부터 에탄올 생산에 대한 pH의 영향을 조사하였고, 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 이 hybrid 균주의 최적 전분발효 pH는 5이었는데 0.1 M succinate buffer가 0.1 M citrate-phosphate buffer 보다 월등히 좋은 발효력을 나타내었다. 한편 mouse α-amylase 활성화에 있어 최적 pH는 7.5(data not shown)이었고, *S. diastaticus*의 glucoamylase의 최적 pH는 5.4(16)이었다는 사실을 감안하면 여기에서 나타난 최적 전분발효 pH인 pH 5는 온도의 경우와 마찬가지로 전분분해의 최적 pH라기 보다는 분해된 당을 에탄올로 전환하는 발효과정의 최적 pH인 것으로 추정된다.

또한 발효 배지내의 pH상태의 영향, 즉 control(pH not-adjusted), 초기 pH 5, 그리고 buffered pH 5의 전분 발효에 대한 영향을 조사하였고 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 4일 동안의 발효에서는 에탄올 생산량에 큰 차이가 없었으나 그 이후에서는 buffer(pH 5)가 처리된 경우가 가장 좋은 에탄올 생산량을 나타내었다. 이상의 결과로서 가용성전분을 사용한 발효 배지의 최적 pH는 5인 것으로 사료된다. Laluce and Mattoon(16)은 *S. diastaticus*의 에탄올 발효에 있어서 전분이나 dextrin의 성분이나 발효배지의 pH가 에탄올 생산성에 중요한 영향을 미친다고 보고하였으며 0.1 M succinate buffer가 첨가된 YPS를 발효배지로 사용하였을 때 buffer가 없는 YPS배지경우보다 효모의 성장과 발효에 있어 향상을 가져왔다고 하였다. 한편 Fig. 4에서 주목할

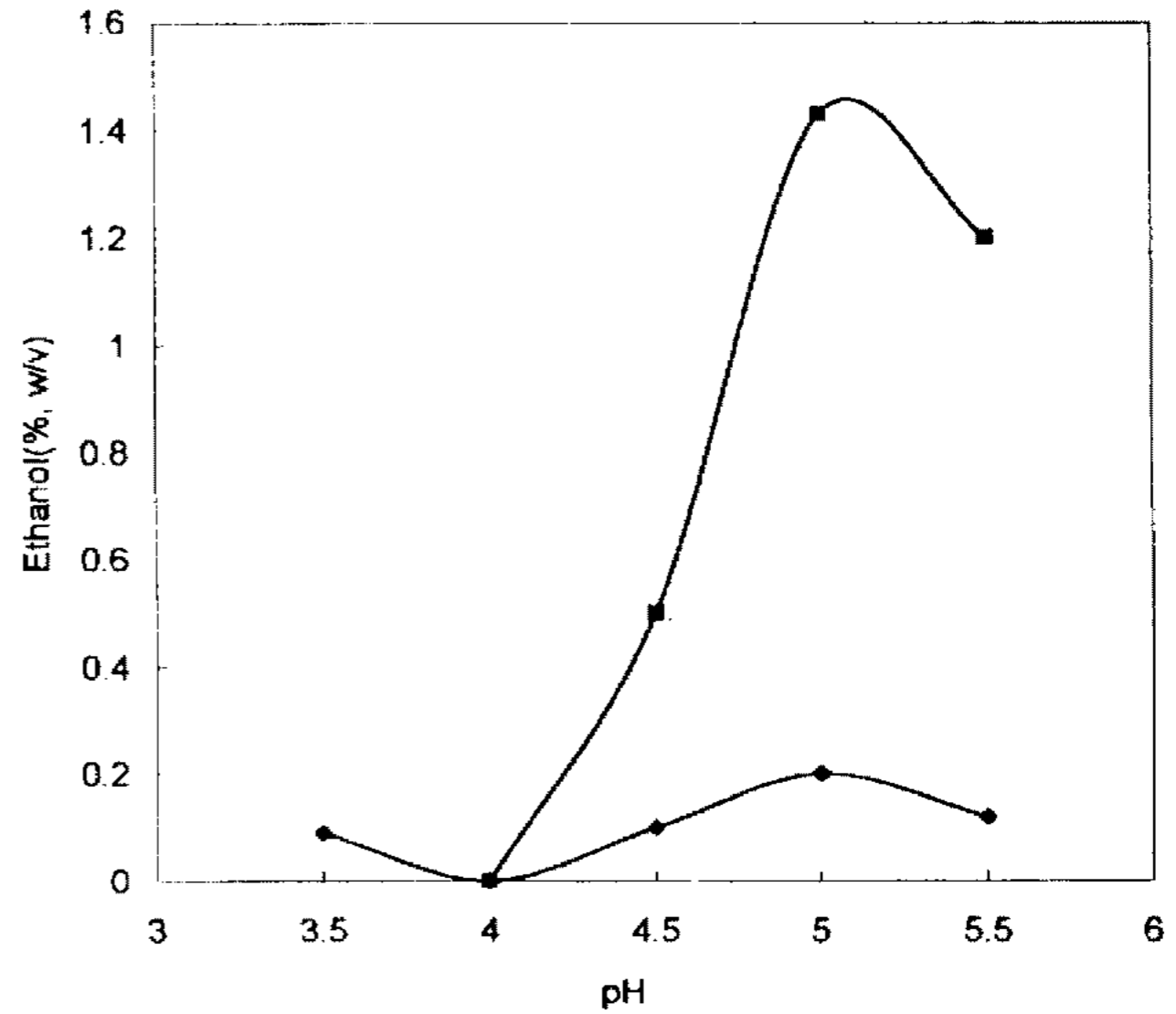


Fig. 3. Effect of pH and buffer type on the ethanol fermentation by hybrid yeast HH64. The fermentation was conducted at 30°C for 2 days with buffered YPS4 broth.

◆ 0.1 M citrate-phosphate buffer
 ■ 0.1 M succinate buffer

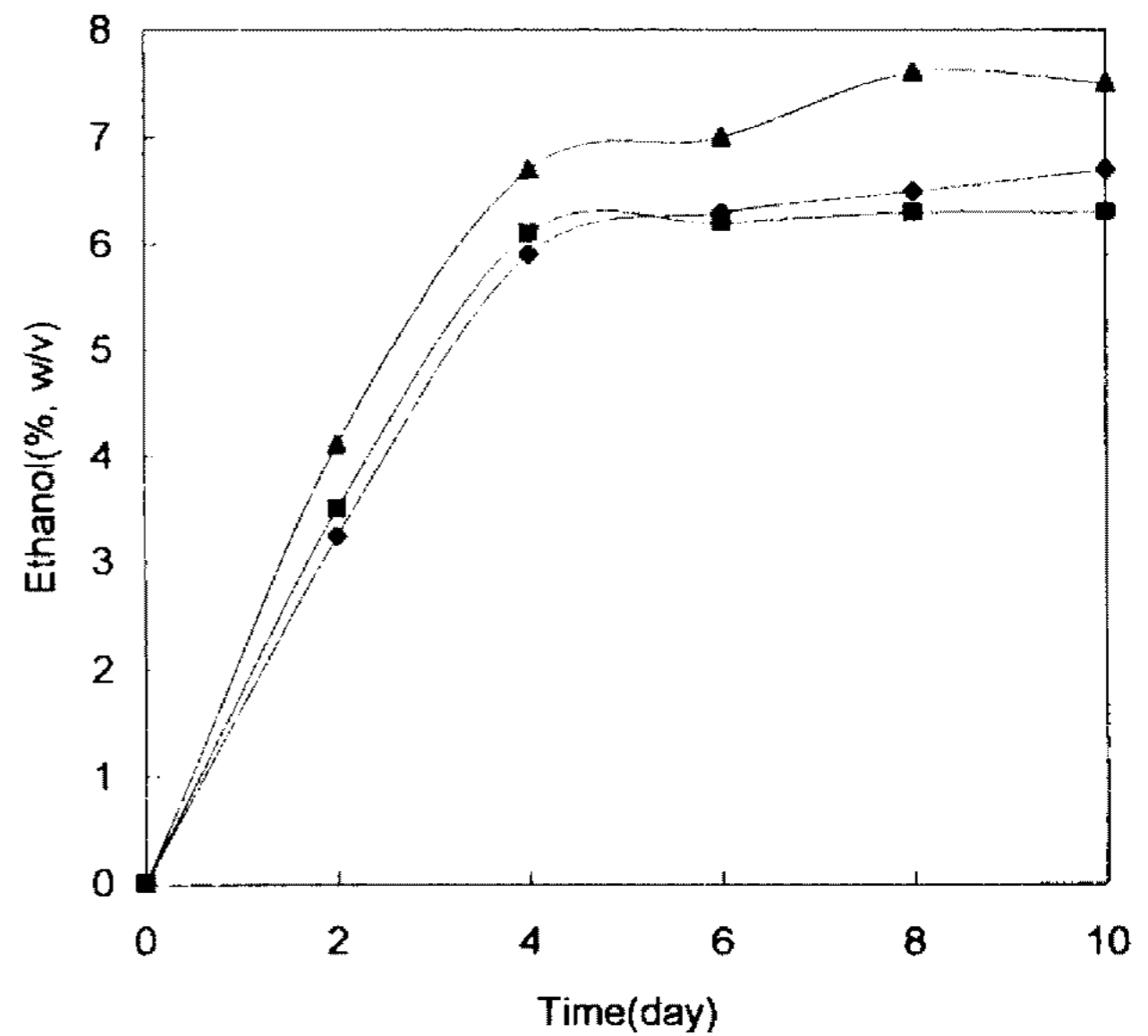


Fig. 4. The effect of pH condition of the fermentation medium on the ethanol production by hybrid yeast HH64. The medium was composed of 20% soluble starch (Difco), 1% yeast extract, 2% peptone.

◆ 0.1 M control (pH not-adjusted)
 ■ initial pH 5
 ▲ 0.1 M succinate buffered pH 5

사실은 외부로부터 발효배지에 전혀 α-amylase나 glucoamylase의 첨가없이 개발된 hybrid 효모 HH64의 단독 사용만으로 20%의 전분으로부터 직접 8일동안의 발효동안에 7.5%(w/v)의 에탄올을 생산하였다는 점이다. 결국 전분으로부터 직접 에탄올을 생산할 수 있는 효모는 성공적으로 개발되었다고 할 수 있다.

요 약

Hybridization을 통하여 α -amylase와 glucoamylase를 동시에 분비하는 재조합 단수체 효모균주 *Saccharomyces diastaticus* K114의 전분분해력, 에탄올내성, 당내성, 고온내성등의 발효특성을 증진시키고자 하였다. 이 단수체 효모균주와 glucoamylase의 활성이 좋고 여러 가지 발효능이 우수한 단수체 효모균주 *S. diastaticus* 1177과의 hybridization 결과 얻어진 hybrid HH64주는 에탄올내성, 고온과 당내성이 증진되었으며, 특히 4%의 전분으로부터 1.60%(w/v)의 에탄올을 생산하여, 1.30%(w/v)의 에탄올을 생산한 재조합균주 *S. diastaticus* K114보다 전분으로부터 에탄올 생성능이 크게 증진되었다. 한편 이 HH64균주의 전분발효에 있어서의 최적 온도 및 pH는 각각 30°C와 5이었다. 개발된 hybrid 효모 HH64는 20%의 전분으로부터 7.5%(w/v)의 에탄올을 직접 생산하였다.

감사의 말씀

pMS12 plasmid를 제공해주신 Denmark의 Carlsberg Laboratory의 Karl K. Thomsen 박사와 ADHI promoter의 사용을 허락한 미국의 University of Washington의 Benjamin D. Hall 박사에게 감사드립니다. 본 연구는 대한민국 통상산업부의 대체에너지 개발사업의 연구비지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Aguanno, V.S. and I.S. Pretorius. 1994. Optimization of alpha-amylase and glucoamylase production by recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **16**: 727-732.
2. Benitez, T., L. Del Castillo, A. Aguilera, J. Conde. and E. Ceradomedo. 1983. Selection of wine yeasts for growth and fermentation in the presence of ethanol and sucrose. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1429-1436.
3. Bernet, E., and I. Gutmann. 1974. Ethanol Determination with alcohol dehydrogenase and β -NAD. p.1499-1502. In H.U. Bergmeyer (ed.), *Methods of enzymatic analysis*. Vol.3. Academic Press, Inc., New York.
4. Bernfeld, P. 1955. Amylases α and β . *Methods Enzymol.* **1**: 149-158.
5. Brandt, D. 1981. Ethanol production by fermentation. Ch.9. In "Biomass conversion process for energy and fuel". S.S. Sofer and O.R. Zaborsky (ed.), p.357-373. Plenum Press, New York.
6. Brown, S.W. and S.G. Oliver. 1982. The effect of tempera-

7. Erratt, J.A. and G.G. Stewart. 1981. Fermentation studies using *Saccharomyces diastaticus* yeast strains. *Dev. Ind. Microbiol.* **22**: 577-588.
8. Janse, B.J.H. and I.S. Pretorius. 1995. One-step enzymatic hydrolysis of starch using a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing alpha-amylase, glucoamylase, and pullulanase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 878-883.
9. Jimenez J. and T. Benitez. 1987. Genetic analysis of highly ethanol-tolerant wine yeast. *Curr. Genet.* **12**: 421-428.
10. Jones, R.P., N. Pamment, and P.F. Greenfield. 1981. Alcohol fermentation by yeast-the effect of environmental and other variables. *Process Biochem.* **16**: 41-49.
11. Kosaric, N., Ng, D.C.M., and G.S. Stewart. 1980. Ethanol production by fermentation: An alternative liquid fuel. *Adv. Appl. Microbiol.* **26**: 147-227.
12. Kim, J.H., K. Kim and Y.K. Choi, 1994. Improvement of mitotic stability of heterologous α -amylase gene in starch-fermenting yeast. *Kor. J. Microbiol.* **32**: 271-279.
13. Kim, K. and J.W. Lee. 1994. Construction of a transformed yeast strain secreting both α -amylase and glucoamylase for direct starch-fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 7-12.
14. Kim, K., C.P. Park and J.R. Mattoon. 1988. High-efficiency one-step starch utilization by transformed *Saccharomyces* cells which secrete both yeast glucoamylase and mouse α -amylase. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 966-971.
15. Kim, T.G. and K. Kim. 1996. Construction of starch-fermenting yeast using genetic engineering and rare-mating. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **59**: 39-51.
16. Lalue, C. and J.R. Mattoon. 1984. Development of rapidly fermenting strains of *Saccharomyces diastaticus* for direct conversion of starch and dextrans to ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 17-25.
17. Russell, I. and G.G. Stewart. 1985. Valuable techniques in the genetic manipulation of industrial strains. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **43**: 84-90.
18. Sherman, F., G. Fink and J.B. Hicks. 1986. *Methods in yeast genetics laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.
19. Song, S.H., K. Kim and M.W. Lee. 1994. Improvement of ethanol-tolerance of haploid *Saccharomyces diastaticus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 584-592.
20. Thomsen, K.K. 1987. Production of α -amylase by yeast. *CRC. Crit. Rev. Biotechnol.* **5**: 205-215.
21. van Uden, N. 1984. Effects of ethanol on the temperature relations of viability growth in yeast. *CRC. Crit. Rev. Biotechnol.* **1**: 263.

(Received 8 April 1996)