

Amylase분비효모와 alcohol발효효모의 세포융합에 의한 균주의 개발

제 2 보. *S. cerevisiae*와 *S. diastaticus* 간의 융합체의
glucoamylase생성 및 alcohol발효

서정훈 · 김영호 · 전도연 · 이창후

경북대학교 자연과학대학 미생물학과
(1986년 7월 19일 수리)

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

II. Alcohol and glucoamylase productivities of fusant between
S. cerevisiae and *S. diastaticus*

Jung Hwn Seu, Young Ho Kim, Do Youn Jun and Chang Hoo Yi

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

Glucoamylase and ethanol productivities of HSDD-170 and HSDM-119 formed by *S. cerevisiae* and *S. diastaticus* protoplast fusion were investigated. For the production of the glucoamylase, soluble starch as carbon source, yeast extract and C.S.L as nitrogen source added into the basal medium were favorable. The production of the enzyme reached at maximum after cultivation of the fusant for 4 days at 30°C, aerobically. The properties of glucoamylase produced by fusants were very similar to those produced by *S. diastaticus* as based on optimum temperature, pH, and pH stability. In alcohol fermentation from starch, strain HSDD-170 fermented starch faster than either of its parental strains. The maximum of alcohol yield in 15% of liquefied potato starch was 7.5% (v/v).

*S. cerevisiae*와 *diastaticus* 간의 fusants 중 전분 발효성 효모의 개발을 목적으로 하여 유전 안정성과 glucoamylase 생산성이 강한 균주를 선별하여 이들 균주의 기본적인 성질에 대하여서는 제 1 보에서 보고한 바 있다. 본 연구에서는 선별된 fusant 가 분비하는 glucoamylase의 성질과 전분을 기질로 하였을 때의 alcohol 발효능에 대해서 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시 균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 Table 1과 같으며 제 1 보에서 얻은 4주의 fusant 중 최종적으로 2주의 fusant를 분리 선별하였다. 사용한 배지는 1 보에 준하였으며, starch로부터의 alcohol 발효 test 시에

Table 1. List of strains used.

Strain	Genotype	Flocculation	Origin
<i>S. diastaticus</i> IFO 1046	wild	-	
<i>S. diastaticus</i> A 4	thr	-	
<i>S. cerevisiae</i> D13-1 A	his 3, trp 1, gal 2	-	
<i>S. cerevisiae</i> MC 16	leu 2, his 4, ade 2, lys 2		
HSDD-170	wild	+++	fusant from <i>S. cerevisiae</i> D 13-1A × <i>S. diastaticus</i> A 4
HSDM-119	wild	-	fusant from <i>S. cerevisiae</i>

는 starch (soluble starch or liquefied potato starch) 15%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, yeast extract 0.2% (pH 5.3) 조성의 배지를 사용하였다. 이때 fusant 중 HSDD-170 균주는 심한 flocculation 성질을 보였다.

Glucoamylase 효소활성 측정

제 1 보와 동일하게 Somogyi-Nelson 방법⁽²⁾ 으로 enzyme activity를 측정하였다.

Glucoamylase의 polyacrylamide gel에 의한 분석

Fusant가 생성하는 glucoamylase을 polyacrylamide gel electrophoresis 방법으로 분석해 보았다. 균주를 YPS 배지상에서 배양한 후 원심분리하여 상등액을 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 염석하고, 1mM phosphate buffer (pH 6.0) 상에서 하룻밤 투석하여 전기영동함과 동시에 집균된 cell을 saline으로 2회 세척한 후 동일량의 0.1M acetate buffer (pH 5.0)에 현탁한 후 sonication (20Kwz, 60sec × 3) 하여 intracellular type으로 하여 전기 영동하였다. polyacrylamide gel 전기영동은 B. J. Davis⁽³⁾의 high pH discontinuous system으로 하였으며 전계조건은 1 lane당 2 mA으로 하였다.

Alcohol 발효력 조사

① Glucose로 부터의 alcohol 발효력

Parent와 fusant를 glucose가 15% 첨가된 발효 배지에 접종하여 alcohol 발효능을 조사하였다. 250 ml 삼각플라스크에 발효 배양 배지 200ml를 가한 후 alcohol 발효관을 연결하여 균을 1% (v/v) 접종한 다음 30°C에서 12일간 정치배양하였다. 이때 균 생육과 발효가 진행됨에 따라 생성되는 CO_2 의 증량 감소로써 발효율을 산측하고 생성된 ethanol 함량은 증류하여 알코올 비중계로 측정하였다.

② Starch로부터의 alcohol 발효력

정치 발효와 Jar fermenter (Model No. M-100, Tokyo RIKAKUKU KK)의 2 가지 방법으로 측정하였다. Starch로써는 soluble starch와 potato starch를 각각 건조 중량으로 15%씩 사용하였다. 정

치 발효시에는 30°C에서 12일간 배양하였고 Jar fermenter에서는 30°C에서 4일간 배양하였다. Jar fermenter 발효 조건은 증균을 1% (v/v) 접종한 후 0.5v/v · min으로 6시간 aeration한 후 배양 12시간 후부터 1N NaOH로 pH를 4.2로 조절하였으며, 생성 alcohol은 증류하여 알코올 비중계로 측정하였다. 발효율은 투입한 총 당에 대한 alcohol 생성량과 소비된 당에 대한 알코올 생성량으로써 표시하였다.

③ Potato starch의 액화 방법

15%의 potato starch를 기질로 사용할 때는 potato starch (수분 함량 15.8%) 260.5g을 증류수 1,000ml에 현탁하고 여기에 Novo사의 α -amylase (상표명 Termamyl)을 총 starch에 대해 0.8% 농

Table 2. Effect of carbon sources on growth and glucoamylase production.

Carbon source Strain	Glucose	Maltose	Dextrin	Soluble starch
<i>S. diastaticus</i> IFO 1046 (wild)	11.5* (4.95)**	3.5 (5.61)	144.4 (2.91)	420.9 (4.72)
<i>S. diastaticus</i> A 4	6.8 (3.28)	1.0 (3.72)	82.0 (1.37)	280.5 (1.14)
<i>S. cerevisiae</i> D 13-1 A	-*** (4.95)	- (3.19)	- (0.43)	- (0.26)
HSDD-170	6.2 (6.99)	- (4.32)	360.2 (2.90)	432.0 (5.69)
HSDM-119	- (5.94)	8.93 (5.02)	268.2 (2.64)	412.3 (5.53)

Cells were cultured in the minimal medium (N source: C. S. L. 0.2%) containing various carbon sources for 4 days. Glucoamylase activity was measured 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.

**Cell growth O. D. at 620nm.

***Less than lunit.

Table 3. Effect of nitrogen sources on growth and glucoamylase production.

Nitrogen sources Strain	(NH ₄) ₂ SO ₄	NH ₄ Cl	Peptone	Bacto-tryptone	Yeast extract	C. S. L.
<i>S. diastaticus</i> IFO 1046 (wild)	82.5* (0.17)**	95.0 (0.47)	206.3 (3.47)	249.0 (4.53)	450.0 (3.87)	325.5 (4.09)
<i>S. diastaticus</i> A 4 (thr)	0.7 (0.08)	5.8 (0.11)	156.3 (2.17)	199.4 (2.82)	300.0 (2.99)	175.5 (3.01)
<i>S. cerevisiae</i> D 13-1A	-*** (0.08)	- (0.23)	- (0.39)	- (0.40)	- (1.14)	- (4.09)
HSDD-170	40.0 (0.27)	26.4 (0.31)	174.9 (5.53)	114.9 (3.21)	444.0 (5.76)	452.0 (6.99)
HSDM-119	12.0 (0.17)	85.2 (0.48)	212.5 (3.23)	181.5 (3.77)	424.5 (4.01)	396.4 (5.99)

Cells were cultured in starch minimal medium containing various nitrogen sources for 4 days. Glucoamylase activity was measured at 50°C for 1 hour in the 0.1 M 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.

**Cell growth O. D. at 620 nm.

***Less than 1 unit.

도로 가하여 90°C에서 20분간 액화하였다. 액화가 끝난 starch 용액은 다시 100°C에서 5분간 열처리 한 후 냉각하고 여과하여 최종 volume이 1,500ml 되게 make up 하여 발효에 사용하였다.

④ 잔당 분석

발효가 끝난 배양액내의 잔당은 산 가수분해 방법으로 측정하였다. 배양액 1ml, 물 20ml의 용액에 HCl (conc. S. G=1.125)를 가하고 수조상에서 4시간 동안 산 가수분해하였다. 가수분해가 끝난 용액을 방냉한 다음 2 N NaOH로 pH를 5.5-6.5 범위로 조절한 후 물로써 최종 100ml 되게 make up 하고 이 액 0.5ml를 취해 Somogyi-Nelson 방법⁽²⁾으로 환원당을 측정하였다.

⑤ Alcohol 측정

생성된 alcohol은 배양액 250ml를 취해 200ml까지 증류한 다음 증류수로써 최종 부피가 250ml 되게 make up한 후 alcohol hydrometer로 측정하였다.

결 과

Fusant가 분비하는 glucoamylase의 제 성질

① Enzyme생성에 대한 탄소원의 영향

최소 배지상에 glucose대신 여러가지 탄소원을 2%가하여 30°C에서 4일간 진탕배양한 후 glucoamylase생성능을 조사한 결과 Table 2와 같다. *S. diastaticus* A4의 경우 야생주에 비해 전반적으로 효소생성이 떨어졌고, *S. cerevisiae*는 효소생성은 전혀 일어나지 않았으나 glucose와 maltose에서 미비하나마 생육을 보였다. Fusant의 경우 효소생성

능이 soluble starch를 C원으로 했을때 *S. diastaticus*야생주 수준으로 분비하였고 dextrin첨가시에도 효소생성이 되었다. 이의 결과로 보아 *S. diastati-*

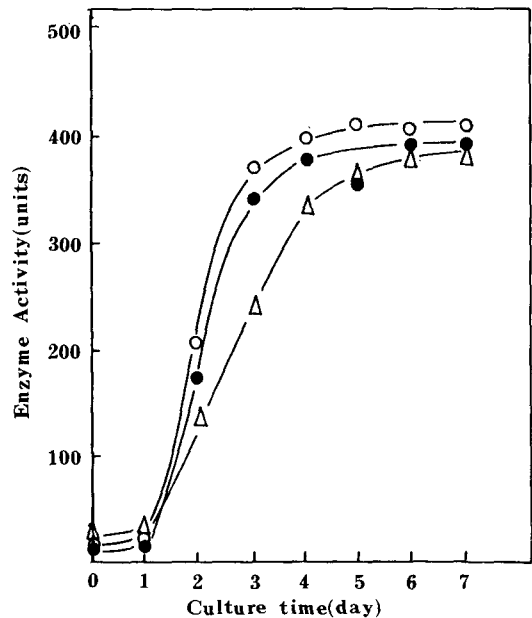


Fig. 1. Time courses of glucoamylase production.

Time courses of glucoamylase production by strains *S. diastaticus* IFO 1046 (●-●), HSDD-170 (○-○), and HSDM-119 (△-△). Cells were grown at 30°C for various intervals. Glucoamylase activity was measured at 50°C for 1 hour in the acetate buffer (pH 5.0).

cus와 fusant에 있어서의 glucoamylase는 기질에 의해 유도되는 유도 enzyme임을 알았다.

② Enzyme생성에 대한 질소원의 영향

탄소원으로 soluble starch를 2% 첨가한 최소 배지에 여러가지 질소원을 0.2% 첨가하여 30°C에서 4일간 진탕배양하여 효소생성능을 비교한 결과는 Table 3과 같다. *S. cerevisiae*의 경우 yeast extract 첨가시 소량의 growth을 보였을 뿐이며, *S. diastaticus*는 N원으로 yeast extract 첨가시 효소생성도 최대로 될 뿐 아니라 cell growth도 가장 좋았다. Fusant는 HSDD-170이 C. S. L.에서 좋은 결과를 보였고, HSDM-119는 yeast extract첨가구에서 효소생성이 가장 높았으며 C. S. L.첨가시 효소생성은 떨어지나 cell growth는 yeast extract첨가구 보다 더 나았다. 결과는 나빠졌으나 yeast extract와 C. S. L.를 첨가하여 알코올 발효력을 조사해본 바 발효력이 C. S. L.가 훨씬 떨어짐으로 각 발효 실험시에는 yeast extract를 첨가하였다. Parent 공히 무기 N원 첨가시 cell growth 및 효소생성이 급격히 떨어짐을 알았다.

③ 효소생성에 대한 배양일수의 영향

이상의 결과로 탄소원으로 soluble starch 2%, 질

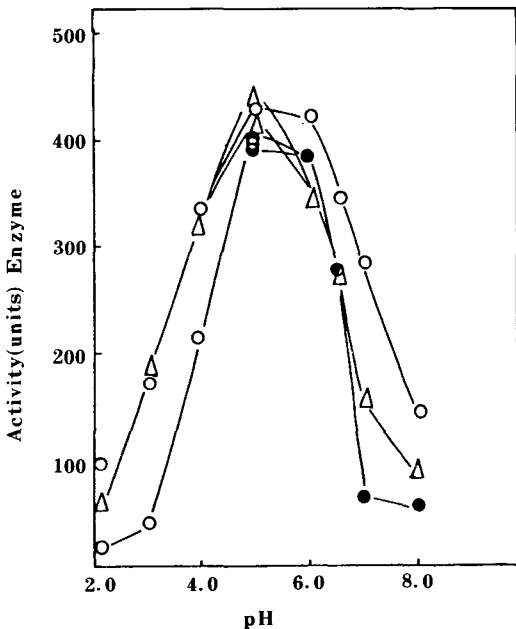


Fig. 2. Effect of pH on the activity of glucoamylase.

pH dependencies of glucoamylase secreted from strains of *S. diastaticus* IFO 1046 (●-●), HSDD-170 (○-○), and HSDM-119 (△-△) were examined in the various pH (2.0 to 8.0) at 50°C for 1 hour.

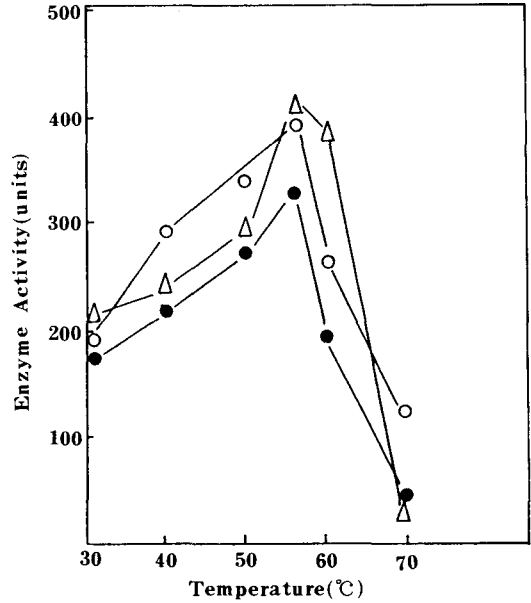


Fig. 3. Effect of temperature on the activity of glucoamylase.

The glucoamylase activity of *S. diastaticus* IFO 1046 (●-●), HSDD-170 (○-○), and HSDM-119 (△-△) was measured at each temperature for 1 hour in the 0.1M acetate buffer (pH 5.0).

소원으로 yeast extract 0.2% 첨가한 최소 배지상에서 효소 생성일수를 30°C에서 진탕 배양하면서 조사하였다. Fig. 1에서와 같이 친주 및 융합체 공히 이 조건하에서는 적어도 48시간 이상의 배양으로 효소 생성이 최대에 도달함을 알았다.

④ 효소반응에 대한 pH의 영향

SMM배지상에서 30°C에서 4일간 배양하여 얻은 glucoamylase의 반응 최적 pH를 알아보기 위해 pH 2.0-pH 5.0은 0.1M acetate buffer를, pH 5.0-pH 8.0은 0.1M phosphate buffer를 사용하여 조사하였다. Fig. 2의 결과 *S. diastaticus* 유래의 glucoamylase의 최적 반응 pH는 약산성으로 pH 5.0-pH 5.5에서 최대 활성을 나타내었으며, pH 4.0이하나 pH 7.0 이상에서는 급격히 효소활성이 떨어짐을 알 수 있었다. 이때 반응조건은 50°C에서 1시간 반응하였다.

효소반응에 대한 온도의 영향

Glucoamylase의 반응 최적온도를 조사한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 55°C에서 최대활성을 보였다. 일반적으로 30~50°C 반응 온도에서 완전한 효소활성을 보인데 반해 60°C 이상의 온도에서는 급격히 활성이 실패되었다.

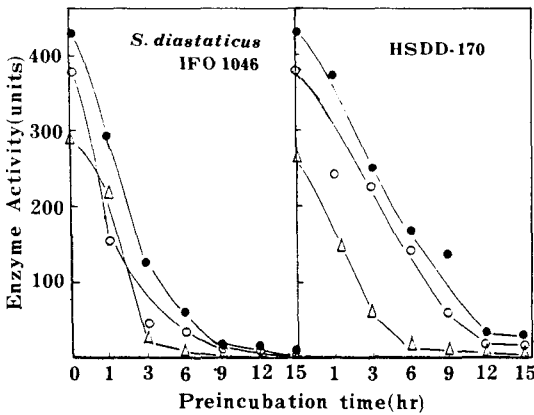


Fig. 4. pH stability of the glucoamylase.

The enzyme solutions adjusted to pH 2.0 (Δ - Δ), 5.0 (\circ - \circ) and culture broth (pH 5.8, \bullet - \bullet) were preincubated at 30°C for various intervals. The remaining activity of glucoamylase was measured at 50°C for 1 hour in the 0.1 M acetate buffer (pH 5.0).

Glucoamylase의 pH 안정성

S. diastaticus 및 fusant의 발효상의 특징으로 발효 초기에 배양액 내의 pH가 급격히 떨어짐을 알았다. 따라서 이들이 분비하는 amylase의 pH 안정성을 조사하였는데 먼저 SMM배지상에서 4일간 배양한 효소액을 0.1N HCl로 각각 pH 2.0과 pH 5.0으로 맞추고 배양원액과 동시에 30°C에서 각 시간별로 전처리한 후 glucoamylase 효소활성을 측정해 보았다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 HSDD-170은 *S. diastaticus* 보다는 pH에 대한 안정성이 높았으나, 배양원액 자체도 전처리 시간이 6시간 이상에서는 효소활성의 약 50%가 실패됨을 알았으며, pH 2.0의 경우 전처리 1시간으로 약 50% 이상이 실패되는 것으로 보아 이들이 분비하는 glucoamylase의 pH 안정성은 매우 낮음을 알았다. 따라서 발효시 pH adjust가 매우 중요한 조건이 됨을 알 수 있었다.

Polyacrylamide gel에 의한 glucoamylase의 분석

High pH discontinuous system으로 전기영동해 본 바 Fig. 5에서 보는 바와 같이 배양액에서는 *S. cerevisiae*은 전혀 band를 확인할 수 없는 반면, *S. diastaticus*와 HSDD-170은 미약하나마 3개의 band를 확인할 수 있었다. 염색의 결과도 같은 pattern이었는데 intracellular type에 있어서는 parent와 fusant간에 다소의 차이를 알 수 있었다. I. Yamashita 등의 보고^(4,5)에 따르면 *S. diastaticus*는 *S. cerevisiae*와 동일한 유전적 성질을 가지면서 다만 glucoamylase producing ability를 가지는 균으로 보

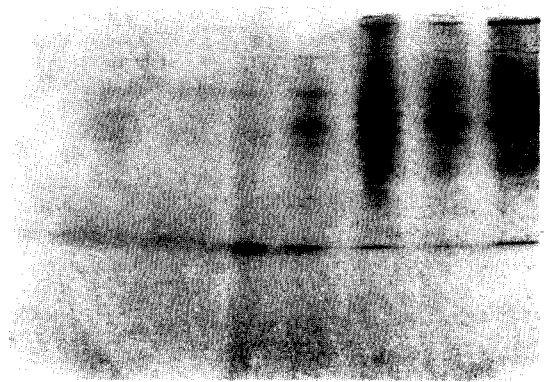


Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoresis pattern of proteins isolated from yeast.

An aliquot of each sample was analysed by 0.7% polyacrylamide gel electrophoresis (2 mA/lane).

고하였다. 이때 \rightarrow 표의 band는 *S. cerevisiae*에서 전혀 확인되지 않으면서 fusant HSDD-170 염색에서 보일 뿐 아니라 intracellular에서도 *S. diastaticus*와 일치하는 band이므로 아마 glucoamylase band가 아닌가 추측된다.

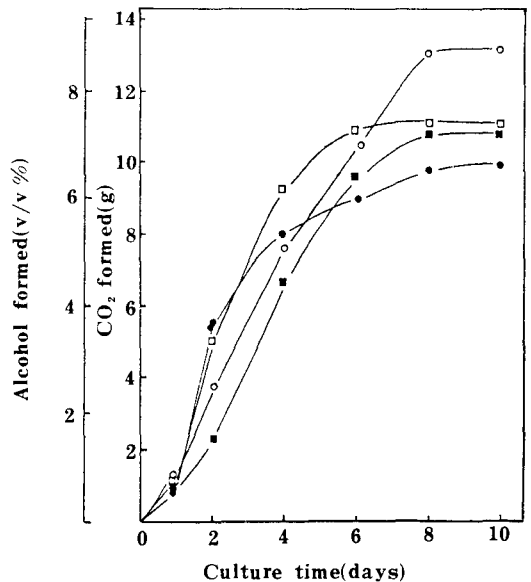


Fig. 6. Alcohol fermentation in glucose medium.

The fermentation was preformed by standing culture in a medium containing 15% glucose, 0.3% $(NH_4)_2SO_4$, 0.2% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% KH_2PO_4 and 0.2% yeast extract (pH 5.0) and yeast seed was inoculated to 1% (v/v). The ethanol produced was measured after 12 days at 30°C. The symbols: \circ - \circ ; *S. cerevisiae*, \bullet - \bullet ; *S. diastaticus*, \square - \square ; HSDD-170, \blacksquare - \blacksquare ; HSDD-119

Table 4. Alcohol productivity of fusants in starch media.

Starch (15%)	Strain	Alcohol (v/v%)	Fermentation ratio (%)
Soluble starch	<i>S. diastaticus</i> IFO1046	3.1	29.2
	<i>S. cerevisiae</i> D13-1 A	0	0
	HSDD-170	5.9	55.1
	HSDM-119	5.1	47.7
Liquefied potato starch	<i>S. diastaticus</i> IFO1046	6.2	57.9
	<i>S. cerevisiae</i> D13-1 A	0.5	4.5
	HSDD-170	6.7	62.6
	HSDM-119	6.6	61.7

The ethanol produced was measured after 12 days fermentation at 30°C without any shaking.

Alcohol 발효력 조사

① **Glucose에 대한 발효력**

Glucose 15%에 대한 각 균주의 알코올 발효능을 CO₂ 발생량으로 측정하였다. Fig. 6의 결과 *S. cerevisiae*가 최대 8.7%의 알코올 생성을 보인데 반해 *S. diastaticus*는 6.6%, HSDD는 7.3%, 그리고 HSDM 119는 7.1%의 알코올 생성을 나타내었다. Fusant의 glucose에서의 alcohol 생성능은 *S. cerevisiae*에는 못미치나 *S. diastaticus*보다는 성적이 우수함을 알았다.

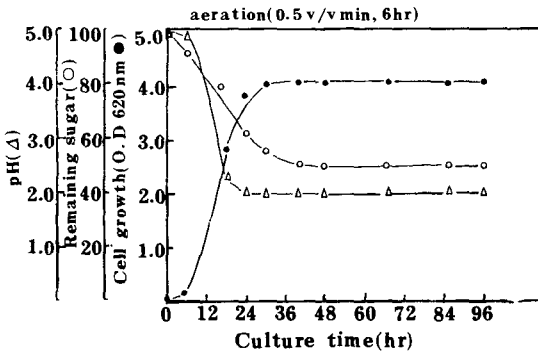


Fig. 7. Alcohol fermentation in liquefied potato starch.

The fermentation was performed by mini jar fermenter (Model No. M-100, TOKYO RIKAKAKU KK) in a medium containing 15% of potato starch, liquefied with α-amylase, 0.3% (NH₄)₂SO₄, 0.2% MgSO₄·7H₂O, 0.1% KH₂PO₄ and 0.2% yeast extract (pH 5.0) and yeast seed was inoculated to 1% (v/v). pH was not controlled during the fermentation and the ethanol produced was measured after 4 days at 30°C.

Alcohol production=3.6%
 Fermentation yield (yield/total sugar)=33.6%
 Fermentation ratio (yield/consumed sugar)=73.0%

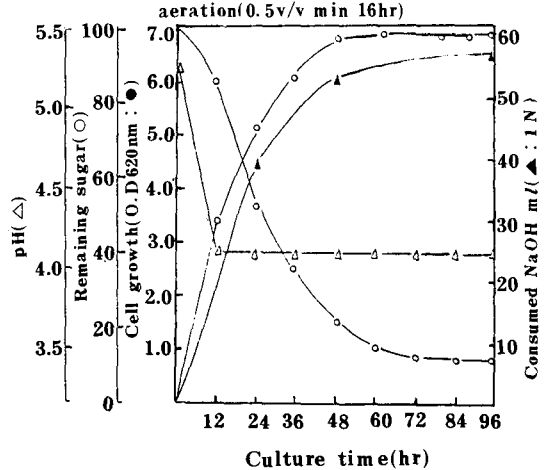


Fig. 8. Alcohol fermentation in liquefied potato starch.

The fermentation was performed by mini jar fermenter (Model M-100, TOKYO RIKAKAKU KK) in a medium containing 15% potato starch, liquefied with α-amylase, 0.3% (NH₄)₂SO₄, 0.2% MgSO₄·7H₂O, 0.1% KH₂PO₄ and 0.2% yeast extract, pH 5.0 and yeast seed was inoculated to 1% (v/v). During the fermentation, pH was adjusted to 4.2 by 1 N NaOH. The ethanol produced was measured after 4 days at 30°C.

Alcohol production=7.5%
 Fermentation yield (yield/total sugar)=70.0%
 Fermentation ratio (yield/consumed sugar)=81.3%

② **Starch에 대한 발효력**

① **혐기적 발효에서의 alcohol 생성**

Table 4의 결과에서 보는 바와 같이 *S. cerevisiae*는 soluble starch와 potato starch에서 전혀 발효가 일어나지 않는데 반해 *S. diastaticus* IFO1046은 각각 3.1%와 6.2%의 알코올 생성을 보였다. 이때 fusant인 HSDD-170은 potato starch에서 최대 6.7%의 알코올 생성을 보였고 HSDD-119는 6.2%의 알코올을 생성하였다. Fusant가 parent보다 starch에서의 알코올 발효능이 이상의 결과로 더 우수함을 알 수 있었다.

② **Jar fermenter에 의한 alcohol 생성**

성적이 좋은 HSDD-170을 선별하여 mini jar fermenter로서 이 균주의 공업적 이용 가능성을 조사해 보았다. 이때 starch로서는 액화한 potato starch를 15% 사용하였으며 그의 조건은 재료 및 방법에 따랐다. HSDD-170 균주의 alcohol 발효 특징은 균생육시 산성 물질이 생겨 배양 24시간에 pH가 최저 2.0으로 떨어지므로 동시에 cell growth는 물론 당 소비 및 alcohol 발효도 정지됨을 알았다(Fig. 7). 이때 최종 당 소비는 46%였으며 생성 alcohol은 3.6%로 투입 starch에 대한 발효율은 33.6%였

다. 그러나 소비당 46%에 대한 발효율은 73.0%로 당화율은 낮으나 발효율은 높음을 알았다. 따라서 Fig. 8에서와 같이 배양 12시간부터 1N NaOH로 pH를 조절하면서 발효력을 조사해 본 바 pH 4.0이 유지될때 배양 4일로 당 소비는 86%가 되었으며 생성 alcohol은 7.5%였다. 따라서 이때 투입 starch에 대한 alcohol 전환 efficiency는 70%였으며, 소비당에 대한 것은 80.9%로 공업적 이용 가능성이 있는 것으로 판명되었다.

고 찰

Alcohol 발효 공업에 있어 당화와 발효 두 공정의 단일화를 목적으로 *S. cerevisiae*와 *S. diastaticus*의 이종간 세포 융합으로 얻은 융합체(제 1보)의 glucoamylase 생성력과 starch에서의 에타놀 생성에 대해 조사하였다.

융합체의 glucoamylase 생성에 대한 탄소원(Table 2)과 질소원(Table 3)의 영향을 조사한 결과 *S. diastaticus*와 융합체 공히 substrate에 의해 효소 생성이 유도되는 효소임을 알았고, 질소원으로는 무기 질소원보다는 유기 질소원인 yeast extract와 C. S. L.가 효소 생성과 균 생육에 더 좋음을 알았다. Soluble starch 2%와 yeast extract 0.2%를 첨가한 최소 배지상에서의 융합체와 *S. diastaticus*의 효소 생성 일수를 조사한 결과 균 생육이 완전히 일어난 후 효소가 생성됨을 알 수 있었으며(Fig. 1) 효소 성질에 있어 반응 최적 조건이 pH 5.0 - 5.5의 약산성 범위에서, 반응온도는 50 - 55°C에서 최대활성을 보여 Yamashita와 Fukui보고⁽⁶⁾와 일치함을 알았다(Fig. 2, 3). 그러나 pH stability에 있어서는 pH 2.0에서 전처리 1시간으로 약 50% 정도 실패되어 pH에 대한 안정성이 매우 낮았다. 따라서 발효시 pH의 조절이 매우 중요한 요건이 됨을 알았다. *S. diastaticus*의 알코올 생성능에 대해서는 이미 1983년 Fukui등⁽⁷⁾이 *S. cerevisiae*내에 *S. diastaticus*의 amylase gene을 cloning하여 YPS 배지에서 0.5% (v/v)의 알코올을 생성을 보고한 데 이어 De Mot⁽⁸⁾(1985)가 22.5%의 액화 dextrin으로부터 최대 8.6% - 9.6% (v/v)을 보고 하였으며, 최근 Sakai(1936)등⁽⁹⁾은 *S. diastaticus*의 동종간 세포 융합으로 soluble starch 10%에서 최대 2.57 (v/v)의 알코올 생성을 발표하였다.

이에 반해 본 연구로부터 분리 선별한 융합체 HSDD-170은 15%의 soluble starch에서 정치배양으로 최고 5.9% (v/v)의 알코올을 생성하였으며(Table 4) 또한 액화한 potato starch(15%)를 사용하여 mini jar로서 4일간 30°C에서 발효시킨 결과 7.5

% (v/v)의 알코올을 생성하여 총당에 대해서는 70%의 발효율을, 소비당에 대해서는 80.9%의 발효율을 보여 조건만 맞추어 준다면 공업적 이용 가능성이 있는 것으로 사료된다.

요 약

세포융합에 의한 새로운 알코올 발효 효모 개발을 목적으로, *S. cerevisiae*와 extracellular glucoamylase를 분비하는 *S. diastaticus*간의 세포융합을 통해 HSDD-170과 HSDM-119 두 균주를 선별하여 이들 융합체의 특징에 대해서는 제 1보에 발표한 바 있다.

본 보에서는 parent cell인 *S. diastaticus*와 fusant가 분비하는 amylase의 성질을 비교 조사하였으며, 전분을 이용한 알코올 발효에 있어서는 조건을 검토하였다. Amylase 생성 및 발효에 대한 탄소원으로는 dextrin과 가용성 전분에 의해 효소생성이 유도됨을 알 수 있었으며 질소원으로는 무기질소원보다 유기 질소원인 yeast extract와 C. S. L.가 좋았다. 이들 amylase의 성질은 pH 5.5, 반응온도 55°C에서 최대 활성을 보였고, pH 안정성은 낮아 pH 2.0에서 1시간 전처리로 효소활성이 거의 실패되었다. 알코올 생성능에 있어서는 액화한 potato starch 15%를 기질로 하여 조사한 바 당화율 86%에 생성된 알코올이 7.5 (v/v %)로 소비당에 대한 발효율은 80.9%였다.

사 사

본 연구는 1985년도 문교부 지원의 유전공학 연구를 위한 학술연구 조성비에 의하여 수행되었으며 관계하신 여러분께 감사사를 드립니다.

참고문헌

1. 서정훈, 김영호, 전도연, 이종태 : Amylase 분비효모와 alcohol 발효효모의 세포융합에 의한 균주의 개발 : 제 1보. *S. cerevisiae*와 *S. diastaticus* 간의 세포융합 및 융합체의 성질. 한국산업미생물학회지 투고중
2. Ando, E., H. Terayama, K. Nishizawa and T. Yamakawa: Biochemical research methods. Asakura press, Tokyo, Vol. 1, 126 (1967)
3. Davis, B.J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964).
4. Yamashita, I. and S. Fukui: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 137 (1984)
5. Yamashita, I., Y. Takano and S. Fukui: *J. of Bacteriol.*, **164**, 769 (1985)

6. Yamashita, I., T. Maemura, T. Hatano and S. Fukui: *J. of Bacteriol.*, **161**, 574 (1985)
7. Fukui, S. and I. Yamashita: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2689 (1983)
8. De Mot, R., K. van Dijak, A. Doukers and H. Verachtert: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 222 (1985)
9. Sakai, T., K.I. Koo and K. Saitoh: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 297 (1986)