

반수체 *Saccharomyces diastaticus*의 에탄올내성 증진

송상호^{1,2} · 김근^{1*} · 이민웅²

¹수원대학교 유전공학연구소, ²동국대학교 농생물학과

Improvement of Ethanol-Tolerance of Haploid *Saccharomyces diastaticus*

Song, Sang-Ho^{1,2}, Keun Kim^{1*} and Min-Woong Lee²

¹Center for Genetic Engineering Research, The University of Suwon, Suwon 445-743

²Department of Agrobiolgy, Dongguk University, Seoul 100-175, Korea

Abstract — Several mutation procedures have been compared to obtain an ethanol-tolerant *Saccharomyces diastaticus* strain secreting glucoamylase. These procedures include spontaneous mutation, EMS treatment, UV irradiation, and combination of EMS treatment and UV irradiation. All these methods were followed by adaptation of the yeast cells to gradually higher ethanol concentration. Among these procedures, the combined method of EMS treatment and UV irradiation gave the promising result, i.e. the ethanol tolerance of the yeast increased from 11.5%(v/v) to 14.0%(v/v). Respiratory deficient petite mutants of industrial and ethanol-tolerant yeast strains have been isolated and hybridized with haploid *S. diastaticus* strains. The resulting hybrids showed increased ethanol tolerance and starch-fermentability.

액체연료는 바이오매스로부터 얻어질 수 있는 대체에너지중 가장 유용한 형태이다. 이 중에서 에탄올은 기능적(15)으로나, 경제적인 면(4)에서 석유를 대체하는 에너지중 수송용 에너지로는 가장 적합한 연료라 할 수 있다.

효모를 사용하여 전분으로부터 연료용 에탄올을 생산하려면 우선 전분을 발효할 수 있는 당으로 전환시켜야 하는데, 이는 효모가 전분분해효소를 갖고 있지 않기 때문이다.

그러나, 여기에서 사용되는 전분 분해에 필요한 amylase의 효소비용은 전체 에탄올 생산비용의 상당 부분을 차지하고 있다. 이를 절감하기 위해 전분을 분해하고 동화할 수 있는 *Saccharomyces*와 다른 속의 효모들이 탐색·분리되었고, 이들이 amylase를 분비하는 것이 확인되었다(19). 이들 amylase를 분비하는 효모를 이용하여 직접 전분을 발효시키는 방법이 시도되었으나(1, 8), 이 amylolytic 효모들은 에탄올 내성이 약하고 당의 발효력이 약하여 부분적으로만 발효가 되기 때문에 에탄올 생산에는 적합하지 않다고 보고되었다(8). 그러나, *S. diastaticus*는 amylolytic

효모중에서 에탄올 내성이 좋고 발효속도가 빠르다고 보고되었으며(8, 16, 17), *S. diastaticus*의 균주가 4일 동안의 발효에서 12%(v/v) 에탄올을 생산하였다고 한다(16). Russell 등(24)은 *S. diastaticus*를 사용하여 cassava 전분을 발효하는데 드는 glucoamylase 효소의 사용량을 50% 이상 줄일 수 있었으며, 이는 공업적인 규모에서는 효소비용을 크게 절감할 수 있는 것이라 하였다.

공업적 에탄올 발효공정에서 요구되는 특성은 발효에 사용되는 균주에 의존성이 높다. 발효 균주는 사용된 단위 기질당 에탄올 수율이 높아야 하고, 발효속도가 빨라야 하며, 에탄올 내성이 커야 하고, 고온과 높은 당 농도에서 생육상태를 유지할 수 있는 능력이 있어야 하고 발효조건에서 안정하여야 한다(13). 특히 효모는 자신이 만든 에탄올에 생육, 발효에 있어서 다시 저해를 받고 있어 발효속도를 느리게 하며, 발효액내의 에탄올 농도를 높이는데 한계가 있게 된다(13).

효모의 발효특성을 증진시키는 데는 여러가지 유전적 방법이 유용하게 사용된다. 돌연변이(mutation), 원형질체 융합(protoplast or spheroplast fusion), hybridization, 형질전환(transformation), DNA 재조합, 그리고 연속배양 선별(continuous culture selection)

Key words: Starch-fermenting yeast, ethanol tolerance, mutation, rare-mating

*Corresponding author

등과 같은 유전적 방법들이 에탄올 내성 균주를 얻기 위해 이용되고 있다(7).

Hybridization 방법중 rare-mating은 정상적인 hybridization 방법이 효과가 없을 경우와 포자를 형성할 수 있는 능력을 잃어버린 산업균주 또는 동일한 mating type 균주들의 hybrid를 얻으려고 할 때 이용하는 방법이다(23). 이 rare-mating 방법은 배수체(polyploid) 균체에서 아주 낮은 확률로 mating-type switch가 일어나 반수체 균주와 mating 할 수 있는 균주가 생겨나는 데에 근거하고 있다. 이들 여러 방법들을 사용한 효모균주 개발에 있어 반수체(haploid) 효모가 배수체 효모보다 이와같은 여러 유전적 방법을 사용하기가 용이하기 때문에 균주개발에 큰 이점을 가지고 있다(12).

이상과 같은 배경에서 본 연구에서는 본 실험실에 보유하고 있는 glucoamylase를 분비하여 전분발효력이 있는 반수체 *S. diastaticus*의 에탄올 내성등 발효 특성을 조사하고, 이들의 에탄올 내성을 돌연변이와 교배등의 방법으로 증진시킬 수 있는 가능성을 검토하였다.

실험재료 및 방법

효모균주

Brewing, wine, distillery yeast 등의 산업균주 20주와 반수체 *S. diastaticus* 균주 15주(14)를 사용하였다. 이들 중 돌연변이와 rare-mating에 사용한 균주들의 특성과 source는 Table 1에 나타내었다.

배지

YPD 배지는 1% yeast extract(Y), 2% peptone(P) 그리고, 2% dextrose(D)로 구성하였고 고체 배지에는 2% agar를 더 첨가하였다. YPDIS3 배지는 1% dextrose, 3% Lintner potato starch(Sigma chemical co.)를 포함한다. 최소배지(synthetic dextrose, SD)는 0.6% Difco yeast nitrogen base without amino acid,

2% dextrose로 구성되었으며 필요에 따라 특정 영양물질을 첨가하였다. SG는 dextrose 대신에 3%(v/v) glycerol를 포함한다.

에탄올 내성 측정

YPD 고체 배지에 접종하여 30°C 에서 2일간 활성화시킨 균주를 여러 농도(5~11%, v/v)의 에탄올이 첨가된 YPD 고체배지에 replica plating 한 후 30°C 와 37°C 에서 각각 2일 배양하여 그 성장여부를 관찰, 비교하였다.

당 내성 측정

30°C 에서 활성화시킨 균주를 여러 농도(40~50%, w/v)의 dextrose가 함유된 YPD 고체배지에 replica plating 한 후 30°C 와 37°C 에서 각각 2일 배양하여 그 성장여부를 관찰, 비교하였다.

발효와 에탄올 농도측정

30°C 에서 활성화시킨 균주를 YPD 액체 배지에 접종하여 30°C 로 온도가 조절된 rotary shaking incubator에서 200 rpm으로 2일간 배양하였다. 이 배양액중 1 ml를 취하여 dextrose 함량이 22.2%(w/v)인 YPD 액체배지 9 ml이 들어있는 멸균된 cap tube에 접종한 후 30°C 에서 5일간 발효시켰다. 발효액의 에탄올은 Bernet와 Gutmann(3)의 방법을 변형하여 효소적으로 정량하였다. 반응혼합물(5 ml)은 75 mM sodium pyrophosphate, 21 mM glycine, 75 mM semicarbazide-HCl, 1.35 mM β -NAD, 0.013 내지 0.076% (v/v) 에탄올 그리고, 0.12 mg의 lyophilized alcohol dehydrogenase(Sigma, NO. A7011)로 구성되었다. 이들 시약들은 모두 Sigma Chemical Co.에서 구입하였으며, 반응혼합물의 pH는 8.7이고 반응온도는 37°C 이었다.

반응시간 20분 후 생성된 NADH는 spectrophotometer(Hitachi, U-1100)로 340 nm에서 흡광도를 측정하여 ethanol standard solution(Sigma, No. 330-20)

Table 1. Yeast strains used

Yeast strain	Characteristics	Source
K35	Brewing yeast (Vierka dark)	Friedrich Sauer Ostfildern, Germany
K41	Brewing yeast (Superbrau)	Specialty Products International, N.C, USA
K43	Brewing yeast (Old danish)	Wines Inc, OH, USA
K95	α <i>leu2 trp1 ura3</i> Δ STA ^a	Laboratory collection
K114	α <i>ade6 his2 trp1 ura3</i> Δ STA	Laboratory collection
1177	α STA	J. Mattoon, USA

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

으로 작성한 standard curve와 비교하여 에탄올을 정량하였다.

자연돌연변이 유발

30°C에서 활성화시킨 균주를 0~15%(v/v) 에탄올 농도를 나타내는 YPD 에탄올 gradient 고체배지에 접종하여 30°C, 37°C에서 각각 2일 배양하였고, 자연 돌연변이율이 매우 낮으므로 지속적인 계대배양을 하였다.

UV 조사에 의한 돌연변이 유발

UV box를 제작하였는데, Miller(21)의 방법에 따라 UV lamp(파장, 254 nm)와 빛을 받는 petri dish의 거리를 24 inch로 하였고 배지상의 효모세포들에 UV가 골고루 조사되게 하기 위해 petri dish를 올려 놓는 판이 적당한 속도로 회전하게끔 전기모터를 부착하였다. UV에 의한 생존곡선을 작성하기 위하여 YPD 고체배지에 접종하여 30°C에서 2일간 활성화시킨 균주를 loop로 하나 가득(약 10^8 cells) 취하여 10^{-6} 배수로 희석하였고, 희석액의 0.1 ml 씩을 YPD 고체 배지에 삼각유리봉으로 도말한 후 시간 간격을 두고 광활성화를 방지하기 위해 암실에서 UV를 조사하였다. UV 조사 후 30°C로 2일 배양하여 나타난 colony 수를 세어 각 UV 조사시간당 생존율을 구하였다. 이미 작성된 생존곡선에 근거하여 95%가 사멸되는 시간으로 UV를 조사한 후 30°C에서 1일 정도 배양하였고 colony가 나타나면 loop로 모아 15%(v/v) 에탄올이 첨가된 YPD 에탄올 gradient 배지에 접종하여 30°C, 37°C에서 각각 2일 배양하였다. 이 에탄올 gradient 배지에서 에탄올 내성이 제일 좋은 colony를 다시 에탄올 gradient 배지에 접종하는 계대배양을 지속적으로 하였다.

EMS 처리에 의한 돌연변이 유발

EMS를 이용한 돌연변이 유발 실험은 Lindegren 등(18)의 방법을 기초로 하였다. 생존곡선을 작성하기 위하여 30°C에서 활성화시킨 균주를 loop로 하나 가득 취해 적당한 배수(10^{-3} ~ 10^{-4})로 희석한 후 원심 분리한 균체를 EMS 0.3 ml(3%, v/v), 0.2 ml potassium phosphate buffer(pH 8.0) 9.2 ml, 40% dextrose 용액 0.5 ml이 들어 있는 100 ml 삼각 flask에 접종하여 30°C로 조절된 rotary shaking incubator(200 rpm)에서 배양하였다.

적당한 시간 간격으로 세포 현탁액 0.2 ml을 취하여 6% sodium thiosulfate 용액 9.8 ml이 들어있는 cap

tube에 넣어 10분 정도 반응시킴으로서 EMS를 불활성화시켜 돌연변이 반응을 중단하였다. 다시 이 효모 현탁액에서 0.1 ml 씩을 취하여 YPD 고체배지에 삼각 유리봉으로 도말하였고, 30°C에서 2일 배양 후 나타난 colony를 세어 각 EMS 처리시간당 생존율을 구하였다. 작성된 생존곡선에 근거하여 95%가 사멸되는 반응시간으로 EMS를 처리한 효모 현탁액 0.1 ml을 YPD 고체배지에 도말하여 30°C에서 1일 배양 후 나타난 colony를 loop로 모아, 0~15%(v/v) 에탄올 농도의 YPD 에탄올 gradient 배지에 접종하여 30°C, 37°C에서 각각 2일간 배양하였다. 배양 후 제일 좋은 에탄올 내성을 나타내는 colony들을 loop로 모아 다시 YPD 에탄올 gradient 배지에 접종하여 적응시키는 과정을 지속적으로 하였다.

EMS 처리와 UV 조사 병행에 의한 돌연변이 유발과 적응

작성된 생존곡선에 근거하여 50%가 사멸되는 시간(25분)으로 EMS를 처리한 효모균주를 YPD 고체배지에 삼각 유리봉으로 도말한 후 총사멸율이 99%가 되도록 30초 동안 UV를 조사하였다. 30°C에서 1일 정도 배양 후 나타난 colony들을 loop로 모아 0~15%(v/v) 에탄올 농도의 YPD 에탄올 gradient 배지에 접종하였고, 30°C, 37°C에 각각 배양하여 적응시키는 과정을 지속적으로 6회 반복하였다.

돌연변이주 분리

영양요구성 돌연변이주는 UV와 EMS를 사용하고, 호흡결여 돌연변이주는 acriflavine을 사용하여 각각 분리하였다(25). Auxotrophic marker 분석도 Sherman의 방법(25)을 따랐다.

Rare-mating에 의한 hybrid 형성

이배체 petite 돌연변이주와 반수체 영양요구성 돌연변이주를 YPD 배지에 접종하여 30°C로 2일 배양한 후 두 균주를 높은 세포밀도로 YPD 액체배지 내에서 혼합시켰다. 그런 다음 5~6일 동안 정지(1) 배양하거나 혼합 후 2~3시간 동안(2) 원심분리하여 원심분리 tube 내에서 두 균주가 접촉되게 한 다음 3일간 정지배양하였다. 배양액을 증류수로 여러 차례 세척하였고 포자형성을 방지하기 위해 3%(v/v) 에탄올이 첨가된 SG 배지에 도말하였다. 충분한 시간 동안 30°C로 배양한 후 나타난 colony들을 hybrid로 간주하였고, 에탄올 내성과 glucoamylase 분비력을 측정하였다.

Table 2. Comparative effects of different temperatures and ethanol concentrations on the growth of industrial yeast strains^a

Yeast Strain	30°C		37°C	
	Ethanol Conc. (%, v/v)		Ethanol Conc. (%, v/v)	
	12.5	14.0	7.5	9.0
K35	++ ^b	±	±	-
K37	++	±	-	-
K38	±	-	-	-
K39	-	-	-	-
K41	++	-	+	-
K42	++	-	±	-
K43	±	-	±	-
K44	++	-	±	-
K45	++	±	±	-
K46	++	±	-	-
K47	±	-	-	-
K61	-	-	-	-
K126	±	-	-	-
K133	+	±	-	-
S2	++	++	-	-
S3	-	-	-	-
S5	+	±	-	-
S6	+	±	-	-
S7	++	++	-	-
S8	++	++	-	-

^aThe rate of growth was evaluated after 2 days with each culture grown on YPD containing various concentrations of ethanol at 30°C or 37°C.

^b ++: represents good growth, +: slight, ±: poor, -: no growth

결과 및 고찰

에탄올내성과 에탄올 생성능 비교

열 내성과 병행하여 에탄올 내성이 우수한 균주는 K35, K41, K42, K43, K45와 같은 산업균주들이었고 (Table 2), glucoamylase를 분비하는 *S. diastolicus* 반수체 균주들은 모두 에탄올 내성이 열등하였다 (Table 3).

이들 우수한 산업균주들은 30°C에서 최고 14.0% (v/v) 에탄올의 존재하에서도 성장을 하였으나, 반수체 균주들은 12.5% (v/v) 에탄올이 함유된 배지에서도 거의 자라지 못했다.

당 내성에 있어서도 에탄올의 경우와 같은 경향을 보여, 산업균주들이 우수하였으며 (Table 4), 반수체 균주들은 열등하였다 (Table 5). 특히, K35 산업균주는

Table 3. Comparative effects of different temperatures and ethanol concentrations on the growth of glucoamylase-producing laboratory haploid yeast strains^a

Yeast Strain	30°C		37°C	
	Ethanol Conc. (%, v/v)		Ethanol Conc. (%, v/v)	
	11.5	12.5	6.5	7.5
K82	- ^b	-	±	-
K83	+	±	-	-
K84	-	-	±	-
K92	-	-	±	-
K94	-	-	-	-
K95	-	-	-	-
K97	-	-	±	-
K98	-	-	±	-
K99	++	-	-	-
K100	+	-	±	-
K102	++	-	-	-
K109	++	-	-	-
K114	-	-	-	-
1177	±	-	-	-
1185	+	-	-	-

^aThe rate of growth was evaluated after 2 days with each culture grown on YPD containing various concentrations of ethanol at 30°C or 37°C.

^b ++: represents good growth, +: slight, ±: poor, -: no growth

다른 산업균주들과는 달리 50% (v/v)의 glucose 존재 하에서도 그 성장률이 현저하게 빠름을 보여주었다. 이는 15% (v/v) 에탄올 농도와 50% (w/v) sucrose 농도에서 균주의 성장을 관찰하였다고 보고한 Benitez 등(2)의 결과와 비슷하였다. 그리고, 에탄올 내성, 당 내성 우수 산업균주들과 glucoamylase의 활성이 매우 우수한 반수체 1177 균주의 에탄올 생성능을 조사한 결과는 Table 6에 나타내었는데, K35, K41, K42, K88, 그리고 1177 균주들이 10% (v/v)에 가까운 에탄올 생성능을 보여 조사한 균주들 중에서 우수한 균주로 분류되었다. 특히, 반수체 1177 균주는 에탄올 내성과 당내성이 상대적으로 열세함에도 불구하고 높은 에탄올 생성능을 나타내었는데, 이는 에탄올 생성능과 에탄올 존재하의 성장능은 서로 관련이 없다고 보고한 Benitez 등(2)의 결과와도 일치하며, 특히 D'amore와 Stewart(7)는 에탄올 내성과 에탄올 생성능의 두 표현형은 유전적으로 독립된 현상이라는 가설을 발표하였다.

에탄올의 저해효과는 세포막에서 가장 강하게 관찰되었다는 보고가 있고, 그 주된 독성효과는 막의

Table 4. Comparative effects of different temperatures and glucose concentrations on the growth of industrial yeast strains^a

Yeast Strain	30°C		37°C	
	Glucose Conc. (%, v/v)		Glucose Conc. (%, v/v)	
	45	50	40	45
K35	+++ ^b	+++	+++	+++
K37	++	++	++	+
K38	++	++	-	-
K39	++	++	+	+
K41	+++	+++	+++	+++
K42	+++	+++	+++	+++
K43	+++	+++	+++	+++
K44	+++	+++	+++	+++
K45	+++	+++	+++	+++
K46	++	++	-	-
K47	++	++	++	++
K61	-	-	-	-
K126	++	++	+	-
K133	+++	++	+++	++
S2	+++	+++	+++	++
S3	-	-	-	-
S5	+++	++	+++	++
S6	++	++	+++	+++
S7	+++	+++	+++	+++
S8	++	++	+++	+++

^aThe rate of growth was evaluated after 2 days with each culture grown on YPD containing various concentrations of glucose at 30°C or 37°C.

^b+++ : represents excellent growth, ++ : good, + : slight, ± : poor, - : no growth

손상 혹은 막지질의 지방산 조성을 변화시켜 결국 막의 유동성을 변화시키는 것으로 보인다(7, 11). 이 저해효과는 또한 다른 환경요인과의 관련이 있는데, 고온과 고농도 당의 존재하에서 효과가 더욱 두드러진다(13).

돌연변이와 적응을 통한 에탄올 내성 증가

돌연변이 유발원의 처리와 높은 농도의 에탄올에 대한 적응으로 에탄올내성 증가를 꾀하였고, 실험결과는 Table 7에 나타내었다. 여기에서 보듯이 돌연변이원을 사용하거나 사용하지 않거나 관계없이 11.5% (v/v)에서 12.5%(v/v)로 에탄올 내성이 증가하였다. 특히 돌연변이원을 단독으로 처리한 경우보다 EMS와 UV를 병행하여 처리한 방법에서 뚜렷한 에탄올 내성의 증가를 관찰하였다. 이 결과는 높은 농도의 에탄올이 첨가된 배지에 여러 차례 적응시키는 방법만

Table 5. Comparative effects of different temperatures and glucose concentrations on the growth of glucoamylase-producing laboratory haploid yeast strains^a

Yeast Strain	30°C		37°C	
	Glucose Conc. (%, v/v)		Glucose Conc. (%, v/v)	
	45	50	40	45
K82	+ ^b	+	+	±
K83	+	+	+	+
K84	-	-	-	-
K92	+	+	+	±
K94	-	-	-	-
K95	+	+	-	-
K97	-	-	-	-
K98	-	-	-	-
K99	+	+	++	+
K100	±	±	±	±
K102	+	+	-	-
K109	+	+	±	±
K114	±	±	+	±
1177	+	±	+	±
1185	±	±	+	±

^aThe rate of growth was evaluated after 2 days with each culture grown on YPD containing various concentrations of glucose at 30°C or 37°C.

^b+++ : represents good growth, + : slight, ± : poor, - : no growth

Table 6. Ethanol production by various strains of yeast^a

Yeast strains	Ethanol (%, v/v) produced
K35	9.57
K38	6.59
K41	9.95
K42	9.63
K43	8.11
K44	8.30
K45	9.25
K46	9.19
K47	8.99
K68	7.92
K88	10.11
K92	7.67
K125	7.22
1177	10.18

^aThe initial glucose concentration in the fermentation broth was 20% (w/v) and the fermentation was carried for 5 days at 30°C.

으로는 에탄올 내성을 증가시킬 수 없었다는 Ismail과 Ali(9, 10)의 결과와는 달리 본래의 내성 11.5%(v/v)

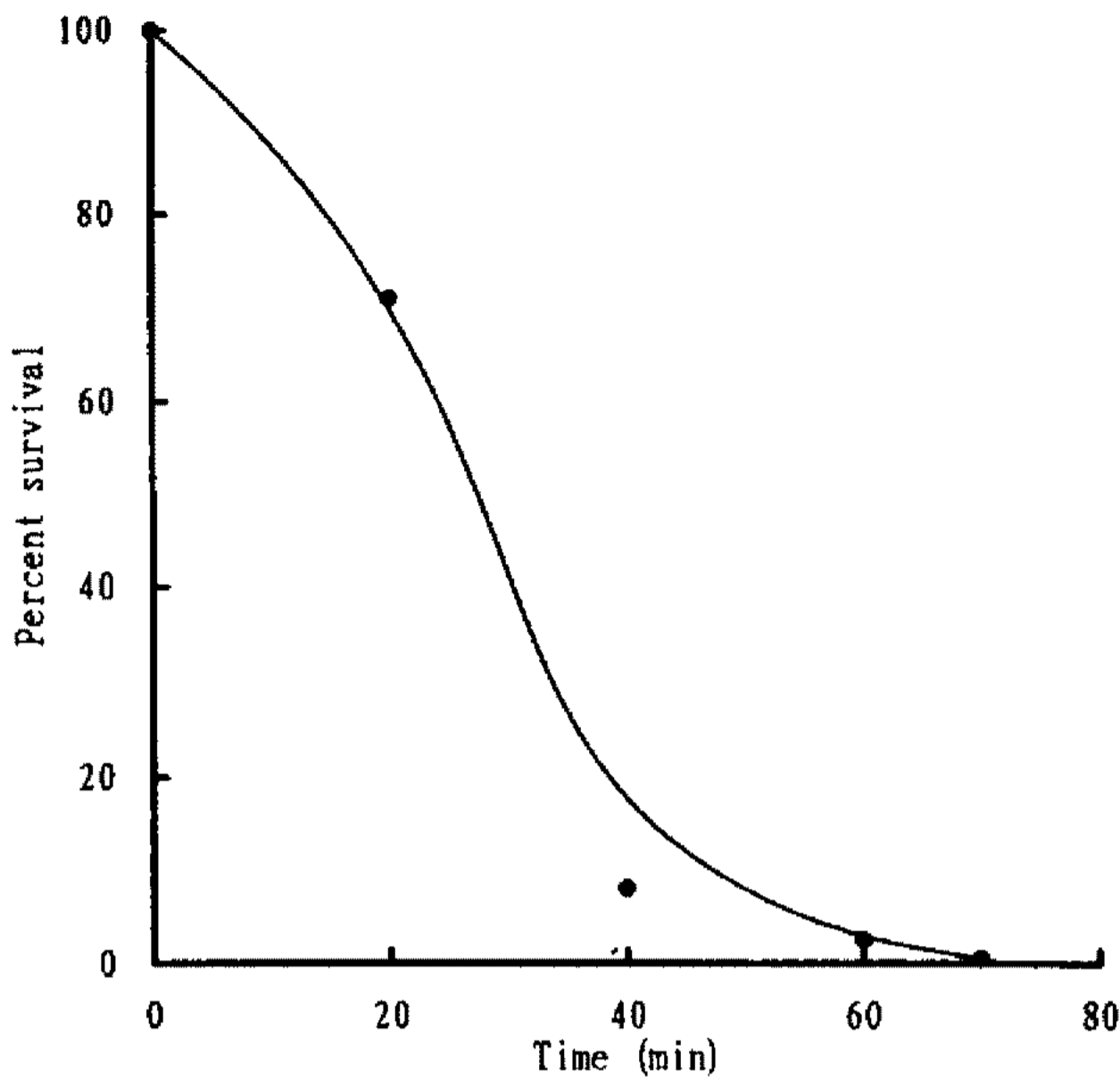


Fig. 1. Survival curve with EMS treatments.

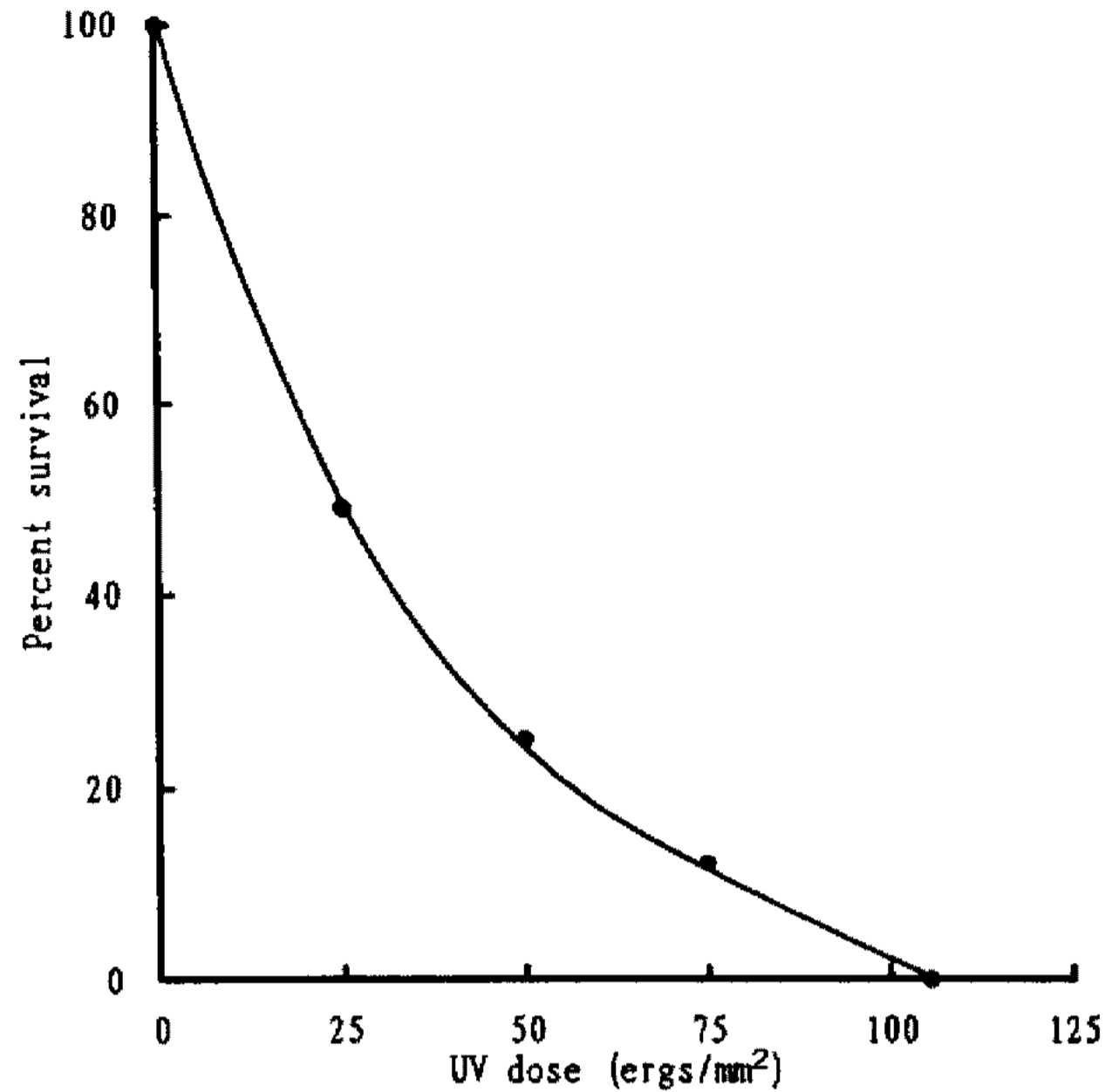


Fig. 2. Survival curve with UV irradiation.

에서 14.0%(v/v)로 에탄올 내성을 증가시킬 수 있었다.

D'amore와 Stewart(7)는 에탄올 내성에 여러 유전자들이 관여한다고 하였고, Brown과 Oliver(5, 6)는 에탄올 내성 증가에 여러 돌연변이가 필요할 것이라고 한 사실에 비추어, 본 연구결과에 나타내었듯이 EMS나 UV의 단독 처리 때보다도 두 돌연변이 유발원을 병행하여 처리함이 에탄올 내성 증가에 필요한 여러 돌연변이를 일으키는데 효과가 있을 것으로 사료된다.

영양요구성 돌연변이주 획득

에탄올 내성이 낮은 glucoamylase 분비균주 1177의 돌연변이와 적응을 통한 에탄올 내성의 향상과 rare-mating을 위한 genetic marker의 도입 등을 목적으로 EMS와 UV에 의한 1177 균주의 생존곡선(survival curve)을 조사하였고, 그 결과를 Fig. 1과 Fig. 2에 각각 나타내었다. 생존곡선에 근거하여 95%의 사멸율을 나타내는 각 돌연변이 유발원의 처리조건은 EMS(3%, v/v)의 경우 35분이었고, UV의 경우는 4.4 uW/mm²로 4분 조사한 양 즉 105.5 erg/mm²이었으며, EMS와 UV를 병행한 경우는 각각 25분과 30초이었다. 이와같은 95% 사멸율을 나타내는 EMS와 UV의 강도에서 생존한 총 5472 colonies 중에서 단일 marker를 가진 32주의 영양요구성 변이주를 확인하였는데, 이들은 Lys⁻, Arg⁻, Met⁻, His⁻이었으며, 특히 Lys⁻ mutant가 많은 수를 차지하였다.

또한 영양요구성 변이주 30주의 glucoamylase 활성을 측정하였는데, 모두 YPD1S3 배지 상에서 halo를

Table 7. The growth of haploid *S. diastaticus* 1177 treated with different mutagenic agents on YPD medium containing various concentrations of ethanol^a

Mutagenic agent	Yeast strain	Ethanol concentration (% v/v)			
		10.0	11.5	12.5	14.0
None	unadapted control	+	±	-	-
None	adapted	++	+	+	-
UV	"	++	++	+	-
EMS	"	++	+	+	-
EMS+UV	"	++	+	+	+

^aAfter each mutagenic treatment, the cells were streaked onto the ethanol gradient (0 to 15%, v/v) plates with six times of repeated transfer (adaptation process). The resulting cells were tested for the growth on YPD agar plates containing various concentrations of ethanol.

나타내어 돌연변이에 의해 그 활성을 잃지 않았음을 알 수 있었다.

Lindegren 등(18)은 3%(v/v) EMS를 사용하여 90%가 사멸되는 70분 처리조건에서 돌연변이율이 가장 높았다고 하였으며, 돌연변이주의 영양 요구성도 adenine과 methionine이 대부분이었다고 보고하였다. 또한 특정 영양물질을 요구하는 돌연변이주가 많이 생기는 것은 염색체 재배열에 의한 position effect 때문이라 하였다. Miller(21)는 UV에 의한 돌연변이주를 유발할 때 99~99.9%가 사멸되는 조건으로 빛을 조사하여야 돌연변이율이 높다고 하였으며, Resnick

Table 8. The number of hybrid obtained after rare-mating of industrial yeast with *S. diastaticus* haploid yeasts

Mating Pair	No. of hybrid on SG medium	
	Mating procedure I ^a	II ^b
K35×K95	17	18
K41×K95	5	117
K43×K95	1	1
K35×K114	0	0
K41×K114	240	202
K43×K114	0	0

^aThe cells of each strain of the mating pair were mixed in fresh YPD broth and incubated in still culture for 5~6 days.

^bThe cells of each strain of the each mating pair were mixed in fresh YPD broth and centrifuged, so that the cells are held in close contact for up to 2~3 hours and incubated for 3 days.

(22)의 data는 균주에 따라 UV에 대한 민감도가 달라 조사조건은 150~1,500 ergs/mm²으로 다양함을 보여주었다.

Petite 돌연변이주 획득

에탄올 내성이 우수한 산업균주 K35, K41, K43에 genetic marker를 도입하기 위해 ethidium bromide 로 처리한 후 각각 40주의 시험 colony 중에서 K35의 경우 5주, K41의 2주, K43의 경우 4주의 petite 돌연변이주를 분리하였다.

Rare-mating에 의한 에탄올 내성 증가

Glucoamylase 분비 균주(K95, K114)와 에탄올 내성 우수균주들(K35, K41, K43)의 petite 돌연변이주와의 mating 결과를 Table 8과 Table 9에 나타내었다. K95 균주는 K35, K41 균주의 petite 돌연변이주와의 교배에서 많은 hybrid가 생겼으며, K114 균주는 K41 균주의 petite 돌연변이주와의 교배에서만 많은 hybrid를 얻었다. K35, K41, K43은 Table 9에서 나타난 바와 같이 SG에서 전혀 자라지 않았으므로 야생형으로 복귀되지 않았음을 알 수 있었다. 이들 rare-mating 결과 생성된 hybrid들은 산업균주와 같은 에탄올 내성과 *S. diastaticus*와 같은 glucoamylase 활성이 있음을 나타내었는데(Table 9), 결론적으로 rare-mating에 의한 교배의 방법으로 *S. diastaticus*의 에탄올 내성을 증진시킬 수 있음을 보여주고 있다.

전분 직접 발효

Table 9. The characteristics of petite industrial yeast, glucoamylase-producing haploid yeast, and their hybrids^a

Yeast strain	Growth on SG	Growth on YPD+11% (v/v) ethanol	Glucoamylase activity
K95, K114	-	-	+
K35, K41, K43 (petite)	-	+	-
Hybrids	+	+	+

^aThe growth temperature was 30°C.

Table 10. Ethanol fermentation from starch by different yeast strains and their hybrids^a

Yeast strain	Clone number	Ethanol Conc. (% w/v) ^b
1177		1.11
K35		0.04
Hybrid	1	1.42
	8	1.32
	9	1.39

^aHaploid 1177 strain was rare-mated with diploid K35 petite mutant strain.

^bThree loopfuls of active cells of each yeast strain were inoculated into 10 ml of YPS4 broth and fermented at 30°C for 3 days.

1177 lys⁻ 균주와 K35 petite 돌연변이주와의 rare-mating 결과 얻어진 hybrid 들의 전분으로부터 에탄올 생성능을 조사하였고 그 결과를 Table 10에 나타내었다. 여기에서 보면 1177 균주는 glucoamylase 분비능이 있어 4%(w/v)의 전분으로부터 1.11%(w/v)의 에탄올을 생산하였으나 K35는 전분분해능이 없어 에탄올을 거의 생산치 못하였다. 그러나 이들 두 균주들의 hybrid 들은 전분으로부터 에탄올을 1177 균주의 경우보다 많은 1.32~1.42%(w/v)를 생산하였다. 이 hybrid 들은 1177 균주의 glucoamylase 생성능 뿐 아니라 K35 균주의 에탄올내성 등 우수발효능을 겸비한 것으로 보인다. 발효능이 낮은 두 haploid 균주를 교배시킴으로서 발효능이 증진된 균주도 획득할 수 있었다는 보고(20)에 비하여, haploid 균주와 산업균주와의 rare-mating의 결과로 에탄올내성 및 전분으로부터 에탄올 생성능이 증진되었음을 보여준 것은 본 연구의 좋은 성과라고 할 수 있다.

에탄올 내성의 안정성

EMS와 UV의 병행처리로 얻어진 1177 돌연변이주와 K35×K95, K41×K95의 교배에서 얻어진 각각의 hybrid들의 에탄올 내성의 안정성을 에탄올을 포함하지 않은 YPD slant 배지에 10번 계대배양한 후 측정하였다. 1177 돌연변이주는 14%(v/v)에서 13%(v/v)로 내성이 약간 감소하였으나 rare-mating에 의한 hybrid 들은 내성이 변하지 않고 안정하였다.

요 약

Glucoamylase를 분비하여 전분 분해력이 있는 *S. diastaticus* 균주의 에탄올 내성을 증가시킬 목적으로 돌연변이와 rare-mating에 대한 연구를 수행하였다. 돌연변이 유발원은 EMS와 UV를 사용하였으며, 단독 처리보다는 병행한 결과가 더 좋아 에탄올 내성을 11.5%(v/v)에서 14.0%(v/v)로 증가시켰다. Rare-mating 방법에 의해 얻은 hybrid의 selection marker로 이용하기 위하여 *S. diastaticus* 균주의 영양요구성 돌연변이주와 *Saccharomyces*에 속하는 배수체 산업 효모균주들의 호흡결여 petite 돌연변이주를 얻었다. 이들 두 균주의 rare-mating 결과 생성된 hybrid 들은 모균주들보다 에탄올내성과 전분으로부터 에탄올생성능에서 증진되었음을 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 상공자원부의 대체에너지 기술개발사업비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Amin, G., R. De Mot, K. Van Dijck, and H. Verachtert. 1985. Direct alcoholic fermentation of starch biomass using amyolytic yeast strains in batch and immobilized cell systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 237-245.
2. Benitez, T., L. Del Castillo, A. Aguilera, J. Conde, and E. Cerdaolmedo. 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 NAD, Pp. 1499-1502. In H.U. Bergmeyer (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 3, Academic Press, Inc., New York.
4. Brandt, D. 1981. Ethanol production by fermentation. Ch. 9, Pp. 357-373. In Sofer, S.S. and O.R. Zaborsky(ed.), *Biomass Conversion Processes for Energy and Fuels*, Plenum Press, New York.
5. Brown, S.W. and S.G. Oliver. 1982. The effect of temperature on the ethanol tolerance of the yeast, *Saccharomyces uvarum*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 269-273.
6. Brown, S.W. and S.G. Oliver. 1982. Isolation of ethanol-tolerant mutants of yeast by continuous selection. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 119-122.
7. D'amore, T. and G.G. Stewart. 1987 Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 322-330.
8. Mot., R., K. Van Dijck, A. Donkers, and H. Verachtert. 1985. Potentialities and limitations of direct alcoholic fermentations of starch material with amyolytic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 222-226.
9. Ismail, A.A. and A.M.M. Ali. 1971. Selection of high ethanol-yielding *Saccharomyces*. I. Ethanol tolerance and the effect of training in *Saccharomyces cerevisiae* Hansen. *Fol. Microbiol.* **16**: 346-349.
10. Ismail, A.A. and A.M.M. Ali. 1971. Selection of high ethanol-yielding *saccharomyces*. II. Genetics of ethanol tolerance. *Fol. Microbiol.* **16**: 350-354.
11. Jimenez, J. and T. Benitez. 1987. Adaptation of yeast cell membranes to ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1196-1198.
12. Jones, R.M., I. Russell, and G.G. Stewart. 1987. Classical genetic and protoplast fusion techniques in yeast, Pp. 55-79. In Berry, D.R., I. Russell, G.G. Stewart(eds.), *Yeast Biotechnology*. Allen & Uniwinn, Boston.
13. Jones, R.P., N. Pamment, and P.F. Greenfield. 1981. Alcohol fermentation by yeasts-the effect of environmental and other variables. *Process Biochem.* **16**: 41-49.
14. 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.
15. Kosaric, N., D.C.M., Ng, and G.S. Stewart. 1980. Ethanol production by fermentation: An alternative liquid fuel. *Adv. Appl. Microbiol.* **26**: 147-227.
16. Laluce, 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. Laluce, C., M.C. Bertolini, J.R. Ernandes, A.V. Martini, and A. Martini. 1988. New amyolytic yeast strains for starch and dextrin fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2447-2451.
18. Lindergren, G., Y.L. Hwang, Y. Oshima, and C.C. Lindergren. 1965. Genetical mutants induced by ethylmethansulfonate(EMS) in *Saccharomyces*.

- Can. J. Genet. Cytol.* 7: 491-499.
19. McCann, K. and J.A. Barnett. 1986. The utilization of starch by yeasts. *Yeast* 2: 109-115.
 20. Miklos, I. and M. Sipiczki. 1991. Breeding of a distiller's yeast by hybridization with a wine yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 638-642.
 21. Miller, J.H. 1974. Ultraviolet light mutagenesis. Pp. 121-124. *In Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor, New York.
 22. Resnick, M.A. 1969. Genetic control of radiation sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 62: 519-531.
 23. Russell, I. and G.G. Stewart. 1985. Valuable techniques in the genetic manipulation of industrial yeast strains. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 43: 84-90.
 24. Russell, I., C.M. Crumplen, R.M. Jones, and G.G. Stewart. 1986. Efficiency of genetically engineered yeast in the production of ethanol from dextrinized cassava starch. *Biotechnol. Lett.* 8: 169-174.
 25. Sherman, F., G.R. Fink, and J.B. Hicks. 1986. *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor, New York.

(Received July 25, 1994)