

α -Amylase와 Glucoamylase를 동시에 분비하는 배수체 재조합효모에 의한 전분기질로 부터의 에탄올 생산

박선영 · 김민수 · 김 근*
수원대학교 유전공학연구소

Direct Ethanol Production from Starch Substrate by Polyploid Recombinant Yeast Secreting both α -Amylase and Glucoamylase. Sun-Young Park, Min-Soo Kim and Keun Kim. Center for Genetic Engineering Research, The University of Suwon, Suwon 445-743, Korea – To improve the fermentation characteristics of the haploid starch-fermenting recombinant yeast strain K114/YIpMS Δ R(LEU2/URA3) secreting both α -amylase and glucoamylase was rare-mated with polyploid industrial yeast *Saccharomyces* sp. K35. The K35 strain had good fermentation-characteristics such as ethanol-tolerance, high temperature and sugar-tolerance, and high fermentation rate. Among the resulting 66 hybrids, the best strain RH51 was selected. The RH51 exhibited amylolytic activity of K114/YIpMS Δ R(LEU2/URA3) as well as ethanol and sugar tolerance of K35. The optimum temperature of hybrid RH51 for starch fermentation was 34°C which was same as that of K35 but different from that (30°C) of K114/YIpMS Δ R(LEU2/URA3). The optimum pH was 5.0. The optimum size of inoculum was 2% as the pellet (w/v) of yeast cells. The hybrid strain RH51 produced 7.0% ethanol (w/v) from 20% (w/v) soluble starch while K35 formed almost no ethanol, 0.3% (w/v). RH51 strain produced 7.5% (w/v) ethanol after 8 days in a 2.5 l fermenter containing 800 ml of 20% (w/v) soluble starch. The residual starch content in the fermentation medium was 1.68% (w/v), and therefore almost all the starch was fermented completely.

대체에너지의 개발은 1970년대 1, 2차 석유과동 이후 석유에너지의 유한성과, 공급불안정에 대한 대체방안으로 세계적으로 관심이 고조되어 연구개발이 급진전되었고, 우리나라에서도 1987년 대체에너지 개발촉진법의 개정을 시점으로 하여 대체에너지 개발에 적극 참여하여 왔다. 또한 공해배출이 적어 대기오염 감소를 위한 청정에너지로서 환경보호측면에서 에탄올을 사용하는 것이 선진국을 중심으로 적극 검토되고 있다.

우리나라와 같은 온대지방에서 가장 많이 쓰이는 발효기질인 전분으로부터 연료용 에탄올을 생산하는 공정은 α -amylase에 의한 전분의 용액화, glucoamylase에 의한 용액화된 전분의 당화, 그리고 당화된 기질의 효모에 의한 에탄올 발효, 생산등의 3단계 과정을 거친다. 이는 전통적으로 에탄올 발효에 사용되는 효모균주가 전분 분해력이 결여되어 있기 때문인데, 전분 분해에 필요한 α -amylase와 glucoamylase 등의 효소 비용과 에너지, 시간, 시설, 노동 등의 전처리 공정비는 전체 에탄올 생산비의 상당 부분을 차지하고 있다.

따라서 본 연구에서는 최근 급격히 발달하는 유전자 재조합법에 의하여, α -amylase와 glucoamylase를 동시에 분비하여 전분으로부터 1단계로 직접 알코올을 생산하는 효모균주를 개발하고자 하여, glucoamylase의 분비 능력이 있는 효모균주 *Saccharomyces diastolicus*에

위의 α -amylase 유전자의 cDNA를 가진 integrating vector를 제작하고 도입시켜 안정하게 α -amylase와 glucoamylase를 동시에 분비하는 단수체 효모균주를 제작한 바가 있다(1). 한편 이렇게 제작된 효모균주는 전분 분해력에 있어서 안정성과 효율면에 있어서는 우수하나 아직 공업적 에탄올 생산에 사용하기 위해서는 좀 더 개선해야 할 점들이 있다. 즉 공업적 에탄올 발효균주는 기질당 에탄올 생산 효율이 높아야 하고, 발효 속도가 빨라야 하며, 에탄올 내성이 높아야 하고 고온과 고농도의 당에서 생육상태를 유지할 수 있는 능력이 있어야 하며, 발효조건에서 안정하여야 한다(2, 3). 특히 산업적으로 쓰이는 에탄올 생산 효모균주들은 한 쌍 이상의 게놈(genome)을 지닌 다배체(polyploid)로서 반수체 실험실적 효모균주들에 비해 돌연변이 유발률이 낮아 오랜동안 발효의 안정성을 유지하고 있다.

반수체 효모균주의 발효특성을 증진시키는 유전적 방법에는 반수체 효모 a와 α 로 표시되는 두 mating type의 효모간의 교배(hybridization)방법이 유용하다(4). 교배방법중 rare-mating은 정상적인 교배방법이 효과가 없을 경우와 포자를 형성할 수 있는 능력을 잃어버린 산업균주 또는 동일한 mating type 균주들의 hybrid를 얻으려고 할 때 이용되는 방법이다(5). 이 rare-mating방법은 배수체(polyploid)균체에서 아주 낮은 확률로 mating-type switch가 일어나 반수체 균주와 mating할 수 있는 균주가 생겨나는 데 근거하고 있다(6).

이와같은 배경에서 본 연구에서는 rare-mating에 의

*Corresponding author.

Key words: Ethanol, starch, alpha-and glucoamylase, polyploid yeast, rare-mating, optimization

하여 단수체 전분 발효균주의 에탄올 내성, 당과 고온 내성, 발효효율, 발효속도 등의 다른 여러 발효적 특성도 우수하도록 개량을 하고 이 개량된 균주의 최적 발효 조건을 규명함으로써, 전분으로부터 에탄올을 생산하는 효율을 증진시키는데에 목적을 두었다.

재료 및 방법

효모 균주

Alpha-amylase와 glucoamylase를 동시에 분비하여 전분분해능이 우수한 haploid 형질전환체 K114/YIpM- Δ R(*LEU2/URA3*)(1)와 에탄올내성·당내성·고온내성·에탄올생성능등이 상대적으로 우수한 polyploid 산업균주인 효모 *Saccharomyces* sp. K35를 사용하였다(Table 1).

배지와 배양

효모의 성장 배지는 1%(w/v) yeast extract(Y), 2%(w/v) peptone(P), 그리고 적당한 탄소원으로 구성되었다. YPD1S3 배지는 1%(w/v) dextrose(D)와 3%(w/v) Lintner soluble potato starch(Sigma Chemical Co.)(S)를 각각 포함하고 있으며 발효배지 YPS4는 4%(w/v) Lintner potato starch를 함유한다. 발효조를 사용한 전분의 직접 발효시에 사용한 발효배지 YPS20은 20%(w/v) Difco soluble starch(No. 0178-17-7)을 포함한다. 최소배지 SD는 0.6%(w/v) Difco yeast nitrogen base (without amino acids), 2%(w/v) dextrose와 영양요구균의 성장에 필요한 leucine, uracil, tryptophan등을 포함한다 (16). SG는 0.67%(w/v) Difco yeast nitrogen base(without amino acid)와 3%(v/v) glycerol로 되어 있다. 모든 고체배지(agar medium)은 2%(w/v)의 agar를 포함한다.

균주의 배양은 30°C에서 행하여졌으며 산소 존재하에서 배양할 때는 rotary shaking incubator에서 250 rpm의 속도로 배양하였다.

Amylase의 활성 측정

효소활성의 정성분석은 각 균주를 YPD1S3에 접종하여 3~7일간 배양한 후 2일간 4°C에 냉장시킨 뒤 냉장으로 인한 전분의 침전으로 생긴 우유빛의 혼탁한 배경에 분비된 amylase에 의한 전분분해로 생긴 투명한 환(halo)의 생성여부로 측정하였다(7).

에탄올 및 당내성 측정

에탄올 및 당내성측정은 Song등(8)의 방법에 의하였다.

발효력 측정

당을 기질로 한 발효력 측정은 Song등(8)의 방법에 의하였다. 전분을 기질로 한 발효력 측정을 위해서는 SD agar plate에서 2일간 활성화시킨 균주 1/2 loop를 YPS4 배지 10 ml가 들어있는 cap tube에 Durharm's fermentation tube를 넣고 3일간 발효시킨 후, Durharm's tube에 모아진 CO₂ 양을 육안으로 비교하여 발효속도를 추정하거나, 그 에탄올 생산량을 정량 분석하였다.

에탄올 정량

발효액의 에탄올은 Bernet and Gutmann(9)의 방법을 변형하여 효소적으로 정량하였다(10).

탄수화물의 정량

환원당은 3,5-dinitrosalicylic acid를 사용한 Bernfeld (11)의 방법을 이용하여 glucose 표준곡선에 의하여 측정하였다. 발효액내의 잔여 전분량의 측정은 Kim and Hamdy(12) 방법에 의하였다.

호흡결여 돌연변이주의 분리

호흡결여 돌연변이주(respiratory deficient mutant) (13-15)는 Sherman 등(13)의 방법에 의하여 획득하였다. 이 돌연변이주가 revertant로 변하지 않았음을 확실하게 하기 위해 4회 반복적으로 SG 배지에서 자라지 않았음을 확인하였다.

Table 1. The list of the yeast strains

Strain	Relevant properties	Source
K114/YIpMS Δ R (<i>LEU2/URA3</i>)	α ade ⁺ , his2, trp1, STA ^a <i>Saccharomyces diastaticus</i> K114 clone 1 harbouring integrated YIpMS Δ R(<i>LEU2/URA3</i>) ^b	Laboratory collection (Kim and Kim, 1996)
K35	Polyploid brewing yeast (Vierka dark) belonging to genus <i>Saccharomyces</i>	Friedrich Sauer Ostfildern, Germany
RH51	Hybrid between K114/YIpMS Δ R(<i>LEU2/URA3</i>) and K35	This work

^aSTA, gene coding for glucoamylase.

^bThe integrating vector YIpMS Δ R(*LEU2/URA3*) was constructed (Kim and Kim, 1996) from pMS12 (Thomsen, 1987) harbouring mouse salivary α -amylase cDNA, ADC1 promoter of alcohol dehydrogenase I gene, 2 μ ori of yeast, etc.

Rare-mating

K35 호흡결여 돌연변이주와 K114/YIpMS Δ R(*LEU2/URA3*)를 30°C에서 2일간 각각 활성화 시킨 다음 두 균주를 loop로 YPD agar plate 상에 서로 혼합하여 30°C에서 배양한 다음, 나타난 균체들을 다시 비발효성기질인 glycerol을 함유한 최소배지인 SG agar plate에 접종하여 자라는 colony를 hybrid로 간주 하였다. 즉 K35호흡결여 돌연변이주는 glycerol을 이용하여 자랄 수 없고, K114/YIpMS Δ R(*LEU2/URA3*)는 최소배지에서 자랄 수 없으나 hybrid는 SG배지에서 자랄 수 있기 때문이다(13).

전분 발효조건의 최적화

온도의 영향 온도가 hybrid 효모 RH51의 전분으로부터 에탄올 생성능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 30°C에서 활성화된 균주를 YPS4 액체배지가 10 ml 포함된 15 ml 용량의 cap tube에 3 loop를 접종하여 24~40°C에서 4일동안 발효하는 과정에서 생성된 에탄올의 농도를 측정하고 비교하였다.

pH의 영향 기질이 soluble starch인 경우 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 측정하고 비교하였다. 기질이 tapioca인 경우는 tapioca 분말 31%(w/v, 전분함량 67%)를 증류수 또는 0.1 M succinate buffer 100 ml에 현탁하여 최종 전분농도가 20%(w/v)가 되도록 하고 여기에 Novo사의 α -amylase(상표명 Termamyl 120L)를 총 전분량에 대해 0.08%(v/w)의 농도로 가하여 90°C에서 20분간 부분적으로 액화 시켰다. 액화가 끝난 tapioca 용액은 다시 100°C에서 5분간 열처리 한 후 냉각하고 2%(w/v) KI에 0.4%(w/v) iodine이 포함된 용액으로 액화정도를 확인 하였다. 여기에 1%(w/v) yeast extract, 2%(w/v) peptone이 되게 조절한 다음 멸균하여 발효배지로 사용하였다. 이때 배지는 증류수 또는 succinate buffer(0.1 M, pH 5)를 사용하여 조제하였다. 멸균된 배지에 hybrid RH51균주를 30°C에서 2일 동안 활성화시켜, 이의 0.5%(v/v)를 접종액으로 사용하였다.

Inoculum type의 영향 Amylase가 함유된 효모배양액과 효모를 전분배지에 접종한 때와 배양액을 제거한 효모 pellet만을 전분배지에서 접종할 때의 에탄올 생산치를 비교하였다. YPS4 배지에서 2일동안 활성화된 효모 배양액 5 ml를 그대로 혹은 6000×g에서 원심분리하여 pellet의 형태로 만든 다음 deionized water에 현탁시킨 5 ml를 250 ml 용량의 삼각 플라스크에 들어 있는 95 ml의 buffer(succinate buffer 0.1 M, pH 5)를 함유한 YPS20(최종농도 20%(w/v) Difco soluble sta-

rch) 배지에 접종하여 34°C에서 발효하여 생성된 에탄올양을 측정하여 접종시에 효모 배양액의 첨가의 영향을 조사하였다.

접종량의 영향 YPS4 배지에서 2일 동안 활성화된 효모 배양액 5, 50, 100 ml를 원심 분리하여 얻어진 pellet 0.2, 2, 4 g을 buffer(succinate buffer 0.1 M pH 5)를 함유한 100 ml YPS20배지에 접종하여 34°C에서 발효하였다.

Dextrozyme 첨가량의 영향 RH51 hybrid 균주를 30°C에서 2일간 활성화시킨 후 5 loopful의 균체를 200 ml YPS2 배지에 접종하여 rotary shaking incubator에서 30°C, 2일간 배양한 후 전체 200 ml의 배양액을 2.5 liter 용량의 교반식 발효조(한국발효기 model SY-250)에 들어있는 YPS2 1.8 liter에 접종하여 0.5 vvm, 30°C, 100 rpm의 조건으로, 2일간 배양하여 균체를 증식한 후 원심분리하여 얻어진 pellet 2%(w/v)를 500 ml 용량의 삼각플라스크에 들어있는 0.1 M succinate buffer로 pH를 5로 조절한 YPS20(Difco) 배지 100 ml에 접종 하였다.

이때 여과에 의해 멸균된 dextrozyme을 균접종시 동시에 첨가하였다. 이를 다시 34°C에서 발효시켜 그 에탄올 생성량을 측정하였다.

발효조를 사용한 전분 직접 발효

발효조는 한국발효기(주)의 제품으로 2.5 liter Jar-Fermentor SY-250을 사용하였다. RH51 hybrid 균주를 30°C에서 2일간 활성화시킨 후 5 loopful의 균체를 200 ml YPS2 배지에 접종하여 rotary shaking incubator에서 30°C, 2일간 배양한 후 전체 200 ml의 배양액을 발효조내의 YPS2 배지(1.8 liter)에 접종하여 0.5 vvm, 30°C, 100 rpm의 조건으로, 2일간 배양하여 균체를 증식하였다. 이를 다시 원심분리하여 얻어진 pellet 20 g을 YPS20 배지 800 ml에 접종한 후 34°C에서 pH 5의 조건으로 발효하였다.

결과 및 고찰

사용균주의 발효적 특성

Rare-mating에 의한 발효특성 증진을 위하여 대상 모균주들의 여러 발효특성을 조사하였고 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 실험결과에서 반수체 재조합균주 K114/YIpMS Δ R(*LEU2/URA3*)는 α -amylase와 glucoamylase를 분비하기 때문에 전분 함유배지에서 뚜렷한 amyolytic activity를 보였으나, 여러가지 발효특성 즉 30°C와 37°C에서의 에탄올내성과 당내성, 그리고 에탄올 생성능에 있어서 모두 산업균주인 배수체 K35보다 압도적으로 열세하였다. 이에 비하여 K35는 amyolytic activity가 전혀 없었는데 반하여 열내성과 병행하여 에탄올 내성과 당내성, 그리고 에탄올 생성능에 있어

Table 2. Characteristics of parental yeast strains

Strain	Growth ^a at 30°C				Growth ^a at 37°C				Ethanol production (% w/v) ^b	Amylolytic activity
	Ethanol (% v/v)		Glucose (% w/v)		Ethanol (% v/v)		Glucose (% w/v)			
	12.5	14.0	45	50	7.5	9.0	45	50		
K114/YIpMSΔR (LEU2/URA3)	- ^c	-	±	-	-	-	-	-	6.75	+++ ^d
K35	++	±	+++	+++	±	-	+++	+++	7.45	-

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

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

^c+++ represents excellent growth, ++ good, + fair, ± slight, - no growth.

^d+++ represents excellent halo formation on YPD1S3 agar medium, - no halo formation.

Table 3. Comparative effects of different temperatures and sucrose concentrations on the growth of respiratory deficient mutant (RD) strains of yeast K35^a

Yeast strain	Growth at 30°C		Growth at 37°C	
	40%		50%	
	40%	50%	40%	50%
K35(wild)	+++	+++ ^b	+++	+++
RD 1	++	+	++	++
RD 2	++	+	++	++
RD 3	++	+	++	++
RD 4	++	+	++	+
RD 5	++	+	++	+
RD 6	++	++	++	++
RD 7	++	+	++	++
RD 8	++	+	++	+
RD 9	++	++	++	++
RD 10	++	+	++	++
RD 11	++	++	++	++

^aThe rate of growth was evaluated after 3 days with each culture grown on 40 or 50%, (w/v) sucrose agar plate containing 1% yeast extract and 2% peptone at 30°C or 37°C.

^b+++ represents very good growth, ++ good, + slight.

반수체 재조합균주보다 훨씬 우수하였다. 특히 이 K35주는 30°C와 37°C 모두에서 50%(w/v)의 당농도에서도 매우 높은 성장율을 보인 것이 특이하게 관찰되었다.

호흡결여 돌연변이주 획득

Rare-mating후 hybrid의 선택적 분리를 위해 polyploid 산업균주 K35에 genetic selection marker를 도입하기 위해 acriflavine으로 처리하여 176주의 1차 선발주에서 호흡결여 돌연변이주가 확실한 11주를 분리해 내었다. 이들 변이주들의 성장에 대한 온도, 당농도의 영향(Table 3) 그리고 에탄올 농도의 영향(Table 4)을 조사하여 우수 변이주를 선발하고자 하였다. 온도와 당농도의 영향에 있어서는 변이주 clone들은 야생형 친

Table 4. The effects of ethanol concentrations on the growth of respiratory deficient mutant (RD) strains of yeast K35^a.

Yeast strain	Ethanol conc. (% w/v)			
	8	9	10	11
K35(wild)	+++ ^b	+++	+++	+++
RD 1	++	+	-	-
RD 2	+	+	-	-
RD 3	+	-	-	-
RD 4	+	+	-	-
RD 5	+	+	-	-
RD 6	++	++	+	-
RD 7	+	-	-	-
RD 8	+	-	-	-
RD 9	++	+	+	+
RD 10	+	-	-	-
RD 11	+++	++	++	++

^aThe rate of growth was evaluated after 3 days with each culture grown at 30°C on YPD agar plate containing various concentrations of ethanol.

^b+++ represents very good growth, ++ good, + slight, - no growth.

주보다 50% sucrose에서 성장이 약화되는 경향을 보였다. 에탄올 농도의 영향에 있어서는 변이주들 간에 뚜렷한 차이를 보였는데 일반적으로는 야생형 친주보다 변이주들이 에탄올 내성이 역시 약화되었음을 나타내었다(Table 4). 이상의 결과에 근거하여 온도, 당 내성, 에탄올 내성이 우수한 호흡결여변이주 RD11을 선정하여 rare-mating에 사용하고자 하였다.

Rare-mating에 의한 우수 hybrid 균주의 선발

Alpha-amylase와 glucoamylase의 동시 분비 균주인 haploid K114/YIpMSΔR(LEU2/URA3)와 여러가지 발효적 특성이 우수한 polyploid 균주 K35의 호흡결여 돌연변이주와의 mating 결과 총 66주의 hybrid clone을

얻었다. 이들 중에서 전분발효에 필요한 우수형질을 가진 균주를 선발하기 위하여 이들의 전분발효에 관련된 여러 특성을 조사 하였다. 먼저 각 hybrid 66주들 간의 온도 내성, 당 내성은 상호 차이를 보이지 않았는데 30°C와 37°C에서 그리고 각 45%와 50% sucrose 함유 YPD agar plate에서 3일 배양 후 모든 clone들이 똑같은 성장율을 보였다. 한편 에탄올 내성에서는 hybrid clone들 간에 차이를 보여 30°C에서 12%(v/v) 에탄올에서 성장을 보인 clone들은 32주의 hybrid들이었다. 전분분해력을 나타내는 halo 크기도 상대적으로 크기에 있어 차이를 보였다. 또한 fermentation rate에서는 12 clone이 다른 clone들에 비해 상대적으로 높은 rate를 나타내었다. 이들 66주의 hybrid clone들 중에서 RH51주가 여러 특성들에서 상대적으로 가장 우수하게 나타나 가장 우수한 hybrid주로 선정하였다.

Hybrid RH51의 특성

우수 hybrid RH51의 여러 특성들을 모균주인 K114/YIpMSΔR(LEU2/URA3)와 K35과 비교하여 Table 5에 나타내었다. Hybrid RH51은 α-amylase와 glucoamylase의 분비능은 K114/YIpMSΔR(LEU2/URA3)로부터 획득하였고, 배수성(ploidy), 에탄올내성, 당내성은 K35로부터 획득하였다. 이리하여 RH51은 전분으로부터 에탄올 생성능이 증진되었음을 보여주었다.

RH51에 의한 전분발효 조건의 최적화

온도의 영향 Hybrid 균주 RH51 균주의 전분발효에 있어서 온도의 영향을 조사 하였고 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 온도가 전분 발효에 미치는 영향에서 발효 초기에는 에탄올 생성농도의 폭이 컸으며 발효 후기로 갈수록 그 폭이 작아진 경향을 보였으나 발효기

간이 변하여도 그 최적 온도는 변함이 없었다. RH51 경우 34°C가 최적 발효 온도로 나타났다. 최적 발효 온도를 결정하는 과정에는 α-amylase와 glucoamylase에 의한 당화 과정과 당으로부터 발효하는 과정을 들 수가 있는데 α-amylase와 glucoamylase의 최적 반응 온도는 각각 45°C 그리고 55°C(7)이고, 보통 효모의 최적온도는 28~35°C인(16) 것으로 비추어 보아 여기에 나타난 최적 전분 발효 온도 34°C는 주로 발효하는 과정의 영향으로 사료된다. 또한 hybrid RH51의 최적 온도 34°C는 이 hybrid의 양친 중 K35에서 기인함을 알 수 있었다(Table 6). 즉 이 hybrid의 양친중 하나인 K114/YIpMSΔR(LEU2/URA3) 균주의 최적 온도는 30°C이고 K35의 최적 온도는 34°C이였기 때문이다.

pH의 영향 Hybrid yeast RH51에 의한 전분으로부터 에탄올 생산에 대한 pH의 영향을 조사하였고, 그 결과를 Fig. 2에 각각 나타내었다. 최적 발효 pH는 5이었고 succinate buffer가 citrate-phosphate buffer보다 월등히 좋은 발효력을 나타내었다.

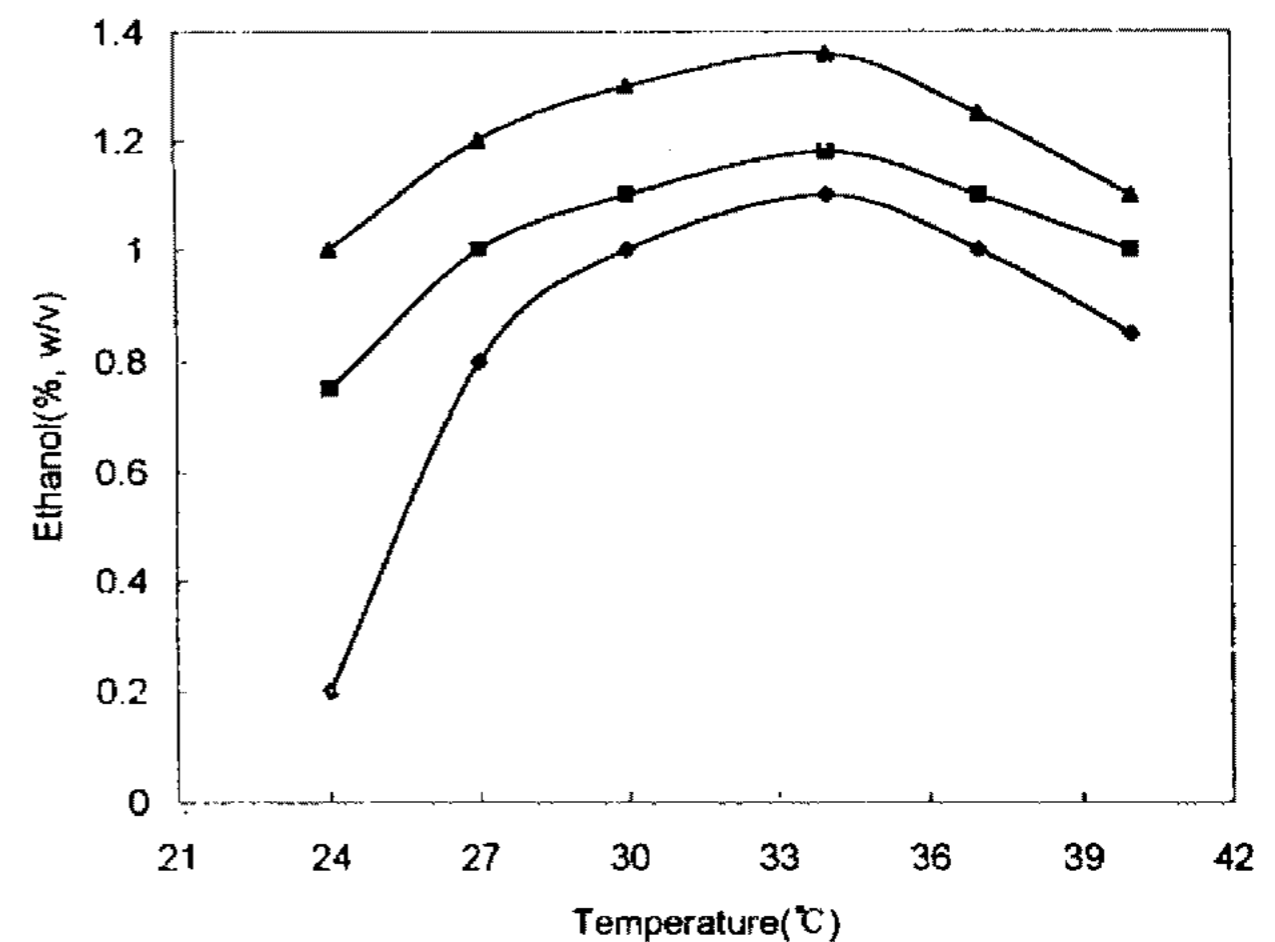


Fig. 1. Effect of temperature on the starch-fermentation by hybrid yeast RH51. The fermentation was conducted for 2~4 days in YPS4 broth.

—♦— 2 days —■— 3 days —▲— 4 days

Table 5. Characteristics of K114/YIpMSΔR(LEU2/URA3) and K35 and their hybrid RH51

	K114/YIpMSΔR (LEU2/URA3)	K35	Hybrid RH51
α-Amylase	+	-	+
Glucoamylase	+	-	+
Ploidy	Haploid	Polyploid ^a	Polyploid ^b
Ethanol-tolerance ^c	-	+	+
Sugar-tolerance ^d	-	+	+
Ethanol (% w/v) from starch ^e	1.3	0.0	1.5

^aK35 formed spores.

^bRH51 formed spores.

^cGrowth at 30°C in the presence of 12% (v/v) ethanol.

^dGrowth at 37°C in 50% (w/v) sucrose.

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

Table 6. Optimal temperatures for starch-fermentation by different yeast strains and their hybrids^a.

Yeast strain	Optimal temperature (°C)
K35 wild type	34
K35 petite mutant	30
K114	30
K114/YIpMSΔR(LEU2/URA3)	30
Hybrid RH51	34

^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 the starch-fermentation.

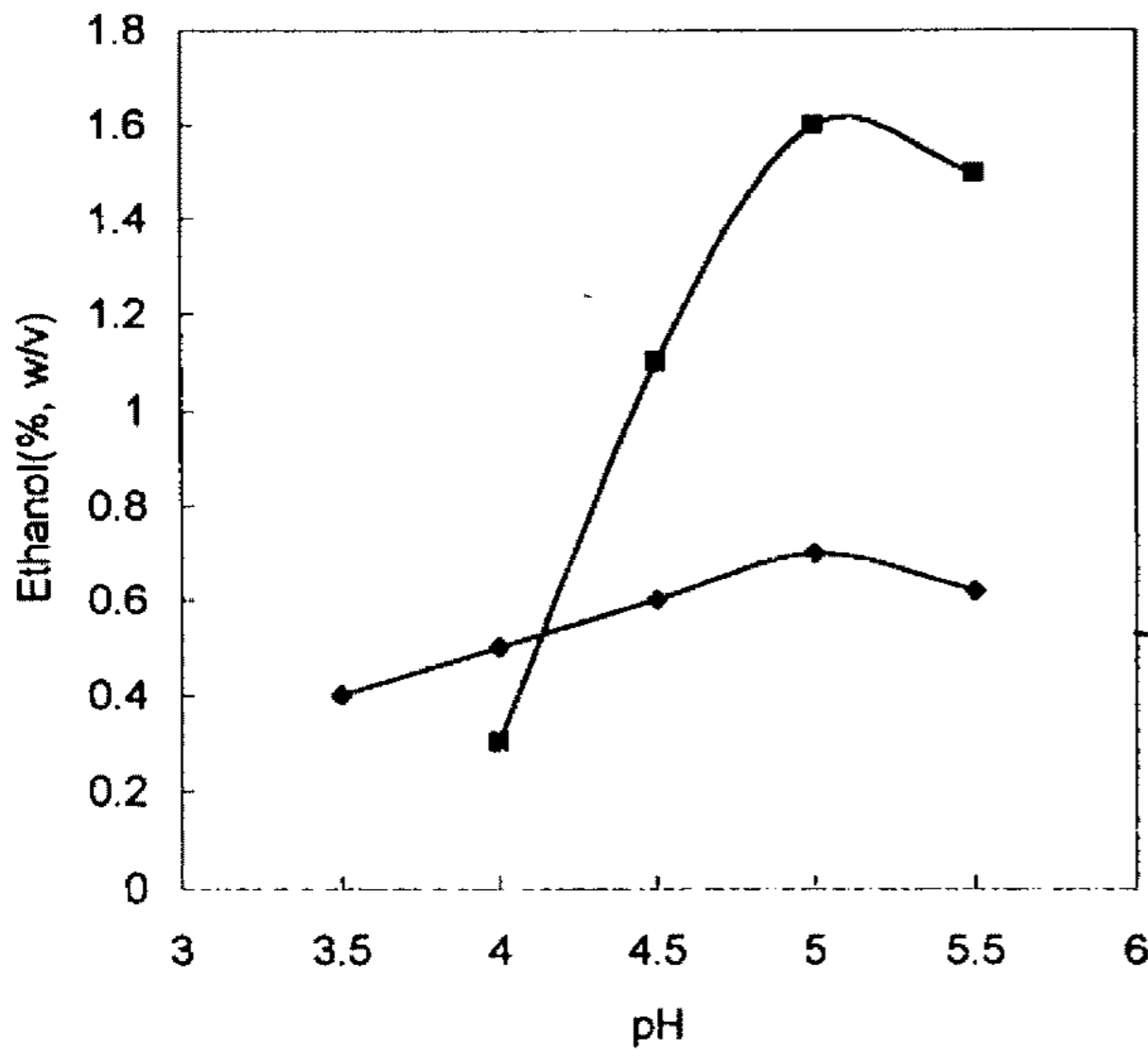


Fig. 2. Effect of pH on the ethanol fermentation of starch by hybrid yeast RH51. The fermentation was conducted for 2 days with buffered YPS4 broth at 30°C. —◆— 0.1 M citrate-phosphate buffered —■— 0.1 M succinate buffered

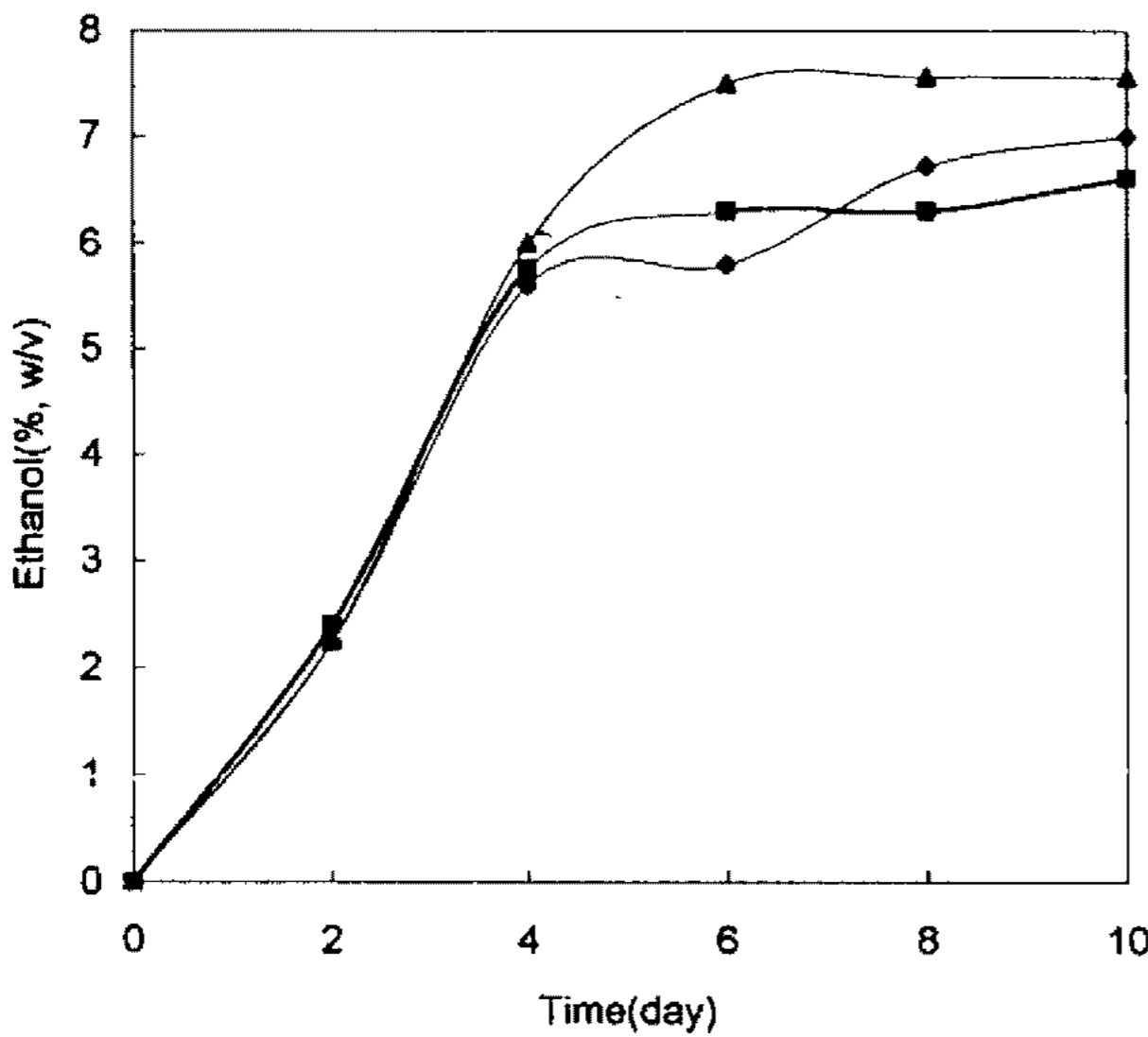


Fig. 3. Effect of pH condition of the fermentation medium on the ethanol production from starch by hybrid yeast RH 51. The medium composed of 20% (w/v) soluble starch (Difco), 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone. —◆— Control (pH not adjusted) —■— Initial pH 5 —▲— Buffered pH 5 (0.1 M succinate)

또한 발효 배지 YPS20내의 pH 조건의 영향, 즉 control(pH not adjusted), 초기 pH 5.0와 buffered pH 5인 배지에서의 전분 발효를 조사하였고 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 4일 동안의 발효에서 에탄올 생산량에 큰 차이가 없었으나 그 이후에서는 buffer(pH 5)가 처리된 경우가 가장 좋은 에탄올 생산량을 나타내었다. 이상의 결과로서 soluble starch를 사용한 발효 배지의 최적 pH는 5인 것으로 사료된다. 한편 mouse α -amylase

Table 7. Effect of inoculum type on the starch-fermentation* by hybrid yeast RH51.

Inoculum type	Ethanol conc. (% w/v)				
	2 days	4	6	8	10
Yeast culture broth ^b	2.25	5.75	6.5	7.00	7.00
Pellet ^c	2.25	5.75	6.75	7.00	7.00

*The fermentation broth was composed of 20% (w/v) Difco soluble starch, 1% yeast extract, 2% peptone, and fermented at 34°C.

^bYeast cells were activated on YPD1S3 agar plate at 34°C for 2 days, and 3 loopful cells were transferred into 5 ml YPS2 broth and incubated for 2 days at 34°C. And the 5 ml YPS2 yeast culture broth was inoculated into 95 ml broth composed of 20 g Difco soluble starch, 1 g yeast extract, 2 g peptone.

^cThe 5 ml YPS2 yeast culture broth was centrifuged and suspended in distilled water (final volume, 5 ml), and used as an inoculum.

활성에 있어 최적 pH는 7.5(data not shown)이었고, *S. diastaticus*의 glucoamylase의 최적 pH는 5.4이었다는 사실(17)과 효모의 최적 pH가 4~5인 사실(18)에 비추어 볼 때, 본 실험 결과에서 나타난 hybrid RH51의 최적 전분발효 pH인 pH 5는 최적 온도의 경우와 마찬가지로 전분분해의 최적 pH이라기보다는 분해당을 에탄올로 전환하는 발효과정의 최적 pH인 것으로 보인다. Lauce and Mattoon(17)은 *S. diastaticus*의 에탄올 발효에 있어서 전분이나 dextrin의 성분이나 발효 배지의 pH가 에탄올 생산성에 중요한 영향을 미친다고 보고하였으며 0.1 M succinate buffer가 첨가된 YPS를 발효배지로 사용하였을 때 buffer가 없는 YPS 배지보다 효모의 성장과 발효에 있어 향상을 가져왔다고 하였다.

Inoculum type의 영향 Inoculum type의 전분발효에 대한 영향을 조사하였고, 그 결과를 Table 7에 나타내었다. 여기에서 알 수 있듯이 yeast culture broth로 접종한 발효배지나 pellet의 형태로 접종한 발효배지에서의 에탄올 생산량은 완전 동일 하였다. 이 결과는 접종에 사용한 yeast broth는 전분배지 YPS2에서 배양시에 배지로 분리된 α -amylase와 glucoamylase를 포함하고 있어, pellet의 경우 보다 높은 에탄올 생산 속도를 보이리라고 기대한 것과는 다른 결과이다.

접종량의 영향 접종량(inoculum size)의 전분 발효력에 대한 영향을 조사하였고 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 최적 접종량은 2%(w/v; 효모세포의 wet weight에 근거함) pellet이었고, 발효 6일째에 최고 에탄올 생산량 7.25%(w/v)에 달하였다. 한편 10일 후의 발효에서 잔여 전분이 3.4%(w/v) 정도 남았음이 관찰

되었다.

Dextrozyme 첨가량의 영향 전분발효후 잔여전분량을 줄이려는 목적으로 RH51에 의한 전분발효에 대한 dextrozyme의 첨가량의 영향을 조사하였고 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 여기에서 보면 dextrozyme의 첨가량이 많을수록 에탄올 생성량과 생성속도의 증가를 보였고 이는 Russell 등(19)의 결과와 일치하였다. 특히 dextrozyme을 0.16%(v/v) 첨가한 경우 최종 에탄올 생성량이 8.25%(w/v)이었고, 첨가하지 않은 대조구의 경우 7.00%(w/v)이어서 1.25%(w/v)만큼 더 많은 에탄올을 생성하였다. 또한 8일 발효 후의 잔여 전분량에 있어서도 0.16% dextrozyme를 첨가한 경우가 1.5%(w

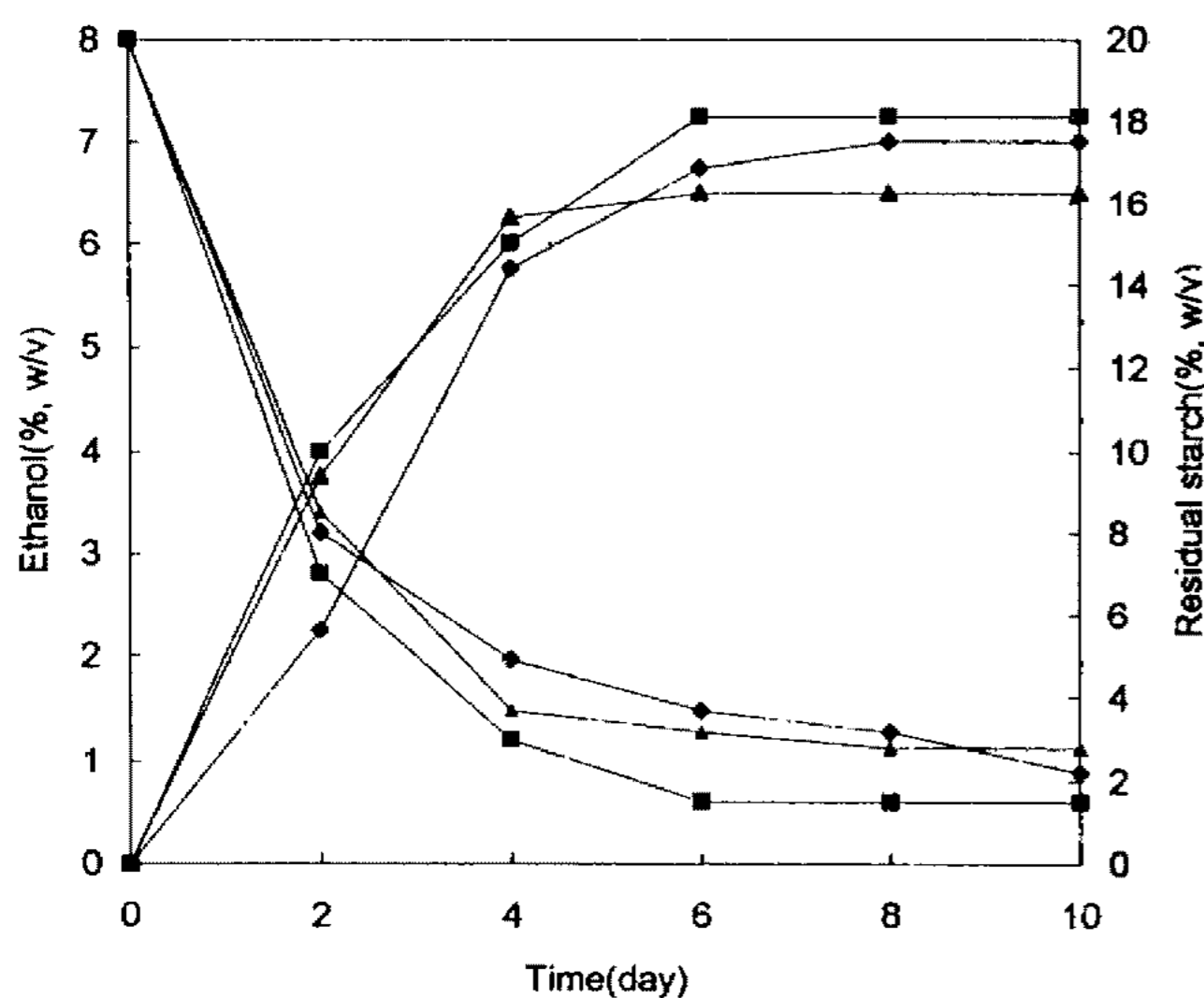


Fig. 4. Effect of the inoculum size on the ethanol fermentation of soluble starch (20%, Difco) by hybrid yeast RH51. —◆— 0.2% pellet —■— 2.0% pellet —▲— 4.0% pellet

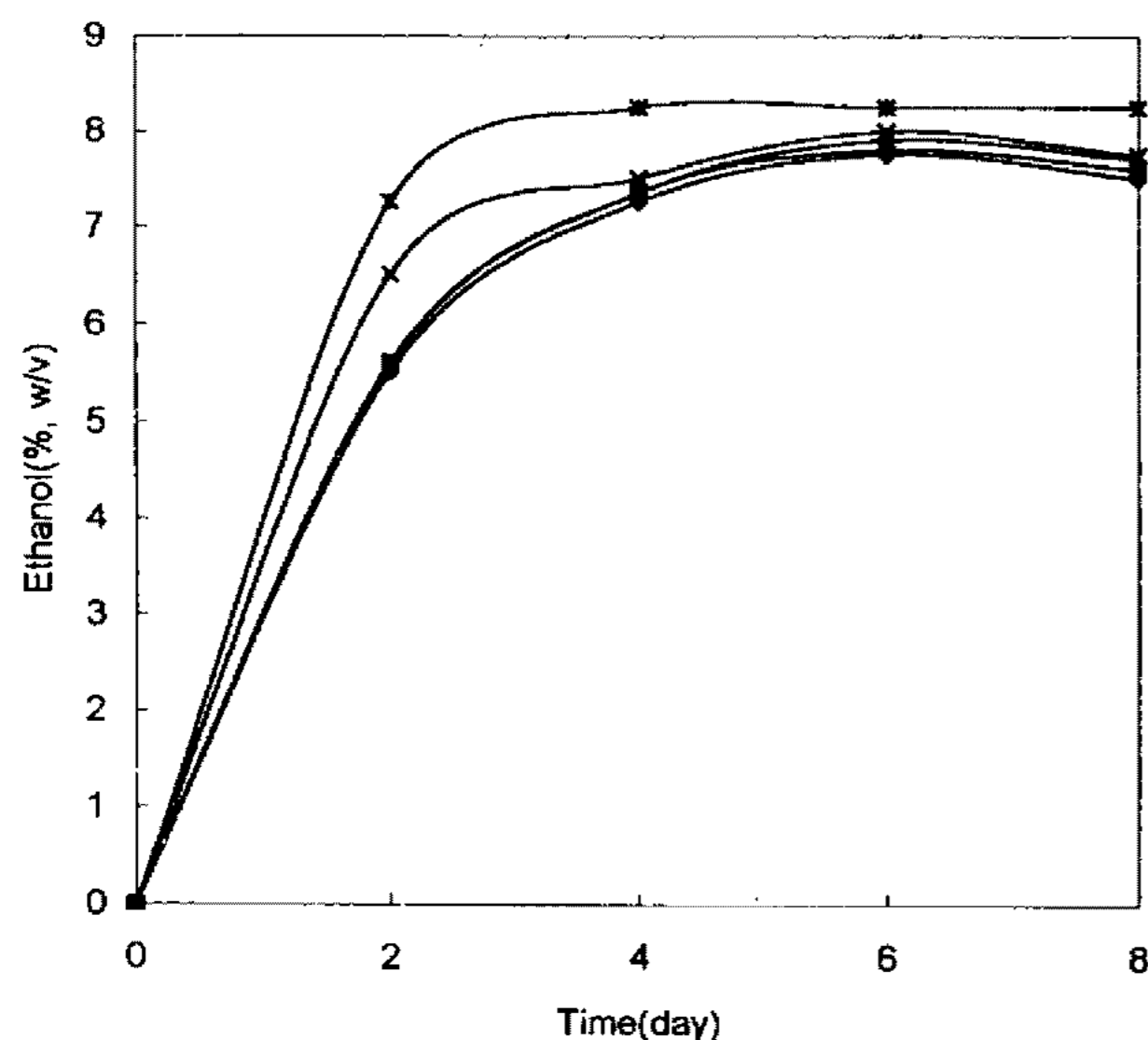


Fig. 5. Effect of dextrozyme concentration on the fermentation by hybrid RH51. —◆— 0% (v/v) —■— 0.04% (v/v) —▲— 0.08% (v/v) —×— 0.12% (v/v) —*— 0.16% (v/v)

/v), 첨가하지 않은 경우가 3.4%(w/v)으로서 dextrozyme이 잔여 전분량을 줄이고 에탄올 생성량을 높게 하였다. 이는 dextrozyme에 포함되어 있는 $\alpha(1-6)$ glycosidic linkage를 분해할 수 있는 pullulanase의 작용 때문인 것으로 풀이된다.

일반적으로 glucoamylase는 $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-4)$, $\alpha(1-6)$ glycosidic linkage를 분해할 수 있는 효소로 이론적으로는 전분을 포도당으로 완전 분해할 수 있다. 그러나 *S. diastolicus*에서 분리된 glucoamylase의 경우는 $\alpha(1-4)$ glycosidic linkage 만을 분해할 수 있으며 $\alpha(1-6)$ glycosidic linkage의 경우는 그 활성이 거의 없어서 전분에 대한 debranching activity가 없다는 보고가 있다(20).

K35와 hybrid RH51의 전분 발효능 비교

Table 8은 pH 5에서 α -amylase와 glucoamylase를 동시에 분비하는 RH51균주와 amylase를 전혀 분비하지 않는 K35균주의 전분으로부터 에탄올 생산량을 비교한 실험의 결과이다. 여기에서 보듯이 K35균주는 거의 에탄올을 생산하지 못하는데 비하여 RH51균주는 7.0%(w/v)의 높은 에탄올 생산량을 나타내었다.

Fig. 6은 α -amylase(Termamyl 120L)에 의하여 액화된 20% 전분을 함유한 tapioca로부터의 발효력을 비교한 결과이다. 이들 균주의 최종 에탄올 생산량은 hybrid RH51의 경우가 7.3%(w/v), K35의 경우가 2.3%(w/v)이어서 α -amylase와 glucoamylase를 분비하는 hybrid RH51균주가 월등히 전분 발효력에서 우수함을 잘 나타내 주고 있다.

발효조를 사용한 전분 직접 발효

앞에서 조사한 최적 발효 조건 하에서 발효조를 사용하여 외부에서 전혀 α -amylase나 glucoamylase의 투입없이 hybrid균주 RH51만에 의한 가용성 전분(20%, w/v)의 발효 과정을 조사하였고 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 여기서 보면 대부분의 에탄올은 발효 초기인 2일 후에 생성되었고 그 후 조금씩 에탄올 생성

Table 8. The time course of ethanol production from starch by yeast RH51 and K35^a.

Yeast strain	Ethanol (% w/v) produced after				
	2 days	4	6	8	10
RH51 ^b	2.3	5.8	6.5	7.0	7.0
K35 ^c	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

^aThree loopfuls of each activated culture were transferred into 50 ml of YPS4 broth, incubated at 34°C in a rotary shaking incubator for 2 days. And the 5 ml of each culture broth was inoculated into 95 ml of buffered (succinate 0.1 M, pH 5) starch to start the fermentation at 34°C.

^bRH51 secretes both α -amylase and glucoamylase.

^cK35 does not secrete any amylase.

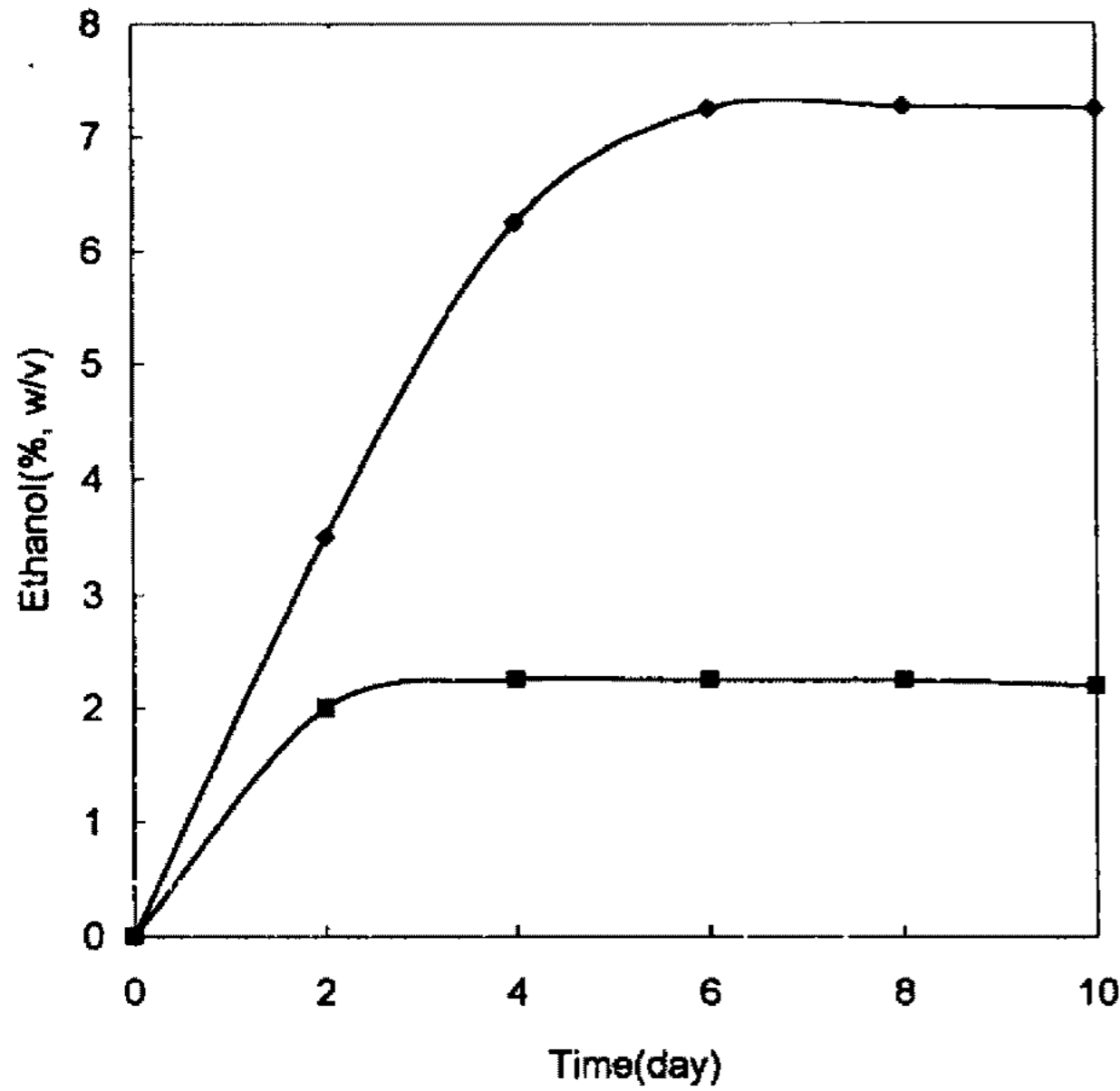


Fig. 6. Fermentation of liquefied tapioca (20%, w/v) by K35 and hybrid RH51.

—◆— RH51 —■— K35

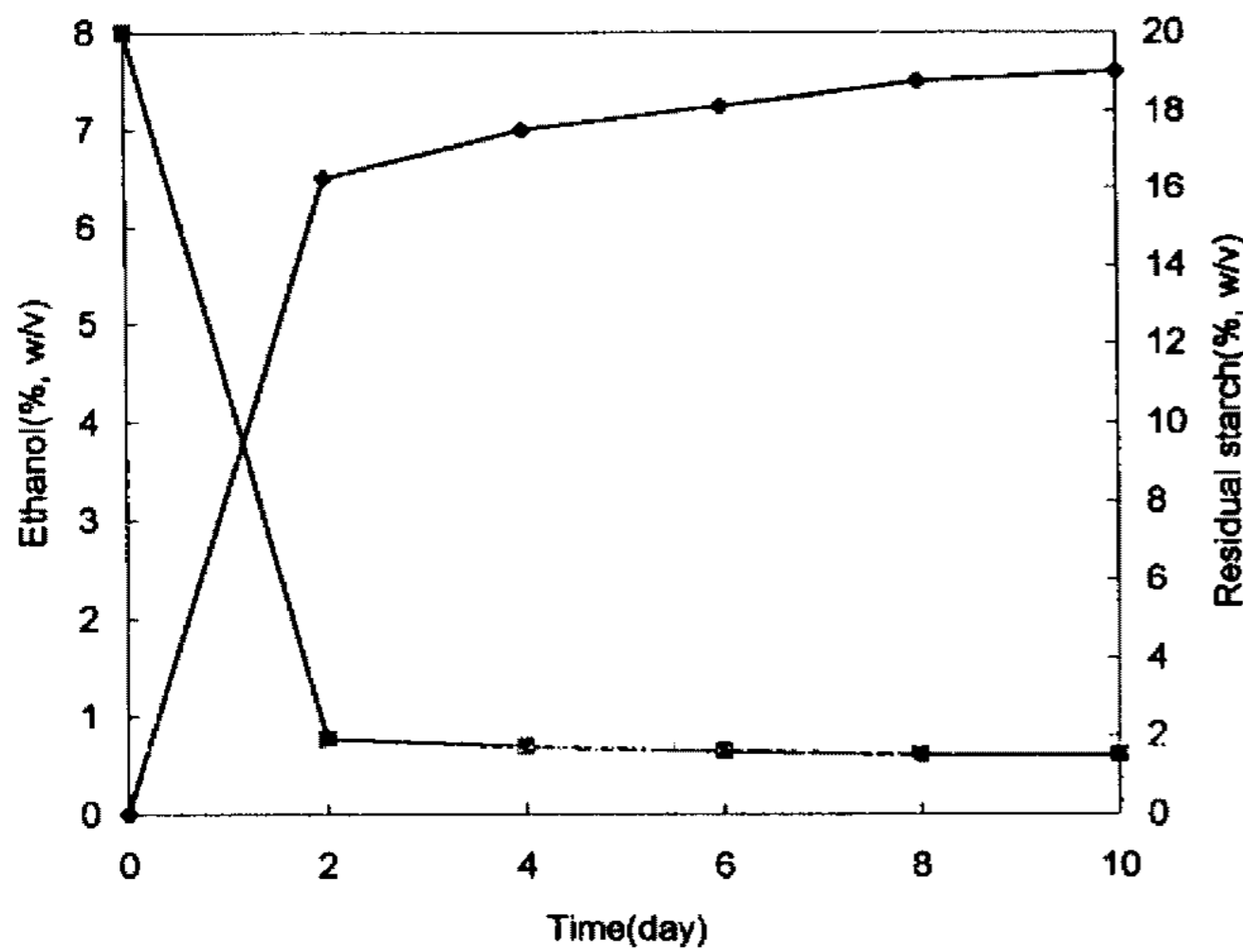


Fig. 7. The time course of ethanol production from starch by RH51 in a 2.5 l fermentor

—◆— Ethanol conc. —■— Residual starch conc.

량이 증가하여 8일째에는 최고치인 7.5%(w/v)에 도달하였다. 8일째의 발효에서 잔존 환원당은 1.28%(w/v)이었고, 잔존 전분량은 1.68%(w/v)로서 거의 모든 전분이 분해되었고, 에탄올로 전환되었음을 보여 주고 있다. 특히 발효조의 agitator를 10~20 rpm의 속도로 교반시킨 것이 전분배지와 균체와의 혼합을 증진시킴으로서 전분 분해와 에탄올 생성에 조금이라도 도움이 되었으리라고 사료된다.

요 약

α-Amylase와 glucoamylase를 동시에 분비하여 전분을 직접 발효할 수 있는 단수체 재조합 균주 *Saccharo-*

myces diastaticus K114/YIpΔR(*LEU2/URA3*)의 에탄올 발효능을 증진시키기 위하여 에탄올 내성과 당내성이 우수한 산업균주 *Saccharomyces* sp. K35주와 rare-mating을 하여 총 66주의 우수 hybrid를 얻었다. 이들 중 RH51주는 K35로부터 유래한 에탄올과 당내성을 나타냈을 뿐 아니라 K114/YIpMSΔR(*LEU2/URA3*)로부터의 amylolytic activity를 가지고 있었다. RH51의 전분 발효의 최적온도는 34°C이었는데 이는 K35와 같았고, 30°C가 최적온도인 K114/YIpMSΔR(*LEU2/URA3*)와는 달랐다. RH51의 최적 전분발효 pH는 5이었고 최적접종량도 2%의 효모세포 pellet이었다. 가용성전분 20% (w/v)로부터 전혀 amylase의 첨가없이 RH51은 7.0% ethanol을 생산하였으나 이때 모균주 K35는 거의 에탄올(0.3%, w/v) 생산을 하지 못하였다. RH51주는 20% (w/v)의 가용성 전분 함유 배지 800 ml를 갖는 2.5 l 발효조에서 전혀 외부로부터의 전분분해 효소첨가없이 8일 발효후 7.5%(w/v)의 에탄올을 생산하였는데, 이때 잔여전분량은 1.68%(w/v)로서 거의 모두 전분이 발효되었다.

감사의 말

본 연구는 대한민국 통상산업부의 대체에너지 개발 사업의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kim, T.G. and K. Kim. 1996. The construction of starch-fermenting yeast using genetic engineering and rare-mating. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **59**: 39-51.
2. Benitez, T., L. Del Castillo, A. Aguilera, J. Conde, and E. Ceradolmedo. 1983. Selection of wine yeasts for growth and fermentation in the presence of ethanol and sucrose. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1429-1436.
3. 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.
4. D'amore, T. and G.G. Stewart. 1987. Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme Microbiol. Technol.* **9**: 322-330.
5. Russell, I. and G.G. Stewart. 1985. Valuable techniques in the genetic manipulation of industrial strains. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **43**: 84-90.
6. Gunge, N., and Y. Nakatomi. 1972. Genetic mechanisms of rare-matings of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* heterozygous for mating type. *Genetics* **70**: 41-58.
7. 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.

8. 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.
9. Bernet, E. and I. Gutmann. 1974. Ethanol determination with alcohol dehydrogenase and β -NAD. Pp. 1499-1502. In H.U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 3 Academic Press, Inc., New York.
10. Kim, K. and J.-W. Lee. 1994. Construction of transformed yeast strain secreting both α -amylase and glucoamylase for direct starch-fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 7-12.
11. Bernfeld, P. 1955. Amylases α and β . *Methods Enzymol.* **1**: 149-158.
12. Kim, K., and M.K. Hamdy. 1985. Acid hydrolysis of sweet potato for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 316-320.
13. Sherman, F., G. Fink, and J.B. Hicks. 1986. *Methods in yeast genetics, laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
14. Spencer, J.F.T. and D.M. Spencer. 1988. Yeast Genetics. Pp. 65-106. In I. Campbell and J.H. Duffus (ed.), *Yeast: A practical approach*. IRL press.
15. Tatsuji, S., S. Myoga, S. Limtong, S. Vedono, J. Kumnuanta, and H. Tagachi. 1983. Genetic construction of yeast strains for high ethanol production. *Biotechnol. Lett.* **5**: 351-356.
16. Walsh, R.M. and P.A. Martin. 1977. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in a template gradient incubation. *J. Inst. Brew.* **83**: 169-172.
17. Laluce, C. and J.R. Mattoon. 1984. development of rapidly fermenting strains of *Saccharomyces diastaticus* for direct conversion of starch and dextrins to ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 17-25.
18. Reed, G. 1982. Production of fermentation alcohol as a fuel sources. Ch. 19. In "Industrial Microbiology" G. Reed (Ed.), 4th ed. Pp. 835. Avi Publishing Co., Inc. Westport, Connecticut.
19. 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.
20. Kleinman, J.M., A.E. Wilkinson, I.P. Wright, I.H. Evans, and E.A. Eevan. 1988. Purification and properties of an extracellular glucoamylase from a diastatic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **249**: 162-170.

(Received 9 August 1996)