

고농도 Galactose로부터 에탄올을 생산하는 *Saccharomyces cerevisiae* 균주의 육성

김주혜¹ · 윤민호^{2*}

¹한국독성연구소 환경독성연구센터, ²충남대학교 농업생명과학대학 생물환경화학과

Development of Ethanol Producing *Saccharomyces cerevisiae* Strain Using High Concentration Galactose

Ju-Hye Kim¹ and Min-Ho Yoon^{2*}

¹Environmental Toxicology Research Center, Korea Institute of Toxicology, 100 Jang-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-600, Republic of Korea

²Department of Bio-Environmental Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Republic of Korea

Received August 12, 2010; Accepted February 24, 2011

A galactose-fermenting yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* No. 9, was selected by screening their abilities to produce carbon dioxide gas when grown on galactose. The selected strain, No. 9 and the reference strains NRRL Y-1528 which was exceptionally resistant to high concentration of substrate, were acclimated on sugars such as glucose, mannose, and galactose, and then their ethanol productivities were investigated during fermentation on these three carbon sources. Ethanol productivity of the strain No. 9 reached to the maximum levels after 18 h of fermentation and the ethanol yield was from 36 to 38% when presented as $[EtOH]_{max}/[Sugar]_{ini}$ (g/g), regardless of the conditions of acclimation. From the results obtained by acclimation and fermentation, it was concluded that the ethanol yields from galactose were not affected by the sugars acclimated. Improvements of the strain *S. cerevisiae* No. 9 were attempted to increase the fermentation efficiency and/or ethanol yields on high concentration of substrate by the conventional mutation methods employing methanesulfonic acid, ethyl ester (EMS). Mutants, Mut-5 (SJ1-40), -17 (LK4-25) and -24 (LK2-48) fermented galactose at the concentration of 20% in the levels of higher 39.9~51.6% than the mother strain, No. 9, however, their ethanol yields never exceeded those of the reference strain.

Key words: Ethanol production, Galactose fermentation, Mutant, *Saccharomyces cerevisiae*

서 론

에탄올은 술의 주성분으로 널리 알려져 있을 뿐만 아니라 최근에는 바이오 에너지원으로서 관심이 높아지고 있다. 역사적으로 보면 에탄올은 주로 전분질을 기질로 사용하여 *Saccharomyces*속 효모에 의한 발효과정을 통하여 생산되어 왔으며 이러한 전분질을 이용한 에탄올발효가 일반적인 생산과정으로서 정착되어 있다.

전분질 이외에 목질계 바이오매스를 기질로 사용하기 위한 연구도 꾸준히 진행하여 왔다. 그러한 노력의 결과로 최근에는

glucose 뿐만 아니라 xylose를 발효할 수 있는 *Pichia stipitis* [Kordowska-Wiater와 Targonski, 2002; Agbogbo 등, 2006], *Kluyveromyces marxianus* 등의 균주[Wei 등, 1999; Wilkins 등, 2008] 또는 *Saccharomyces cerevisiae*의 호흡결손 변이주가 개발되었으며[Farone과 Cuzens, 1997], *Zymomonas mobilis*의 pyruvate decarboxylase (PDC) 및 alcohol dehydrogenase (ADH) 유전자를 재조합시킨 *Escherichia coli*도 개발하는 실용화 연구가 진행되고 있다[Nichols, 2003]. 또한 최근에는 홍조류를 이용한 바이오 에탄올 생성에 관한 연구도 활발히 진행되고 있으나 해조류의 주성분인 galactan 즉 galactose의 폴리머를 기질로 이용하거나 또는 lactose로부터 에탄올을 발효할 수 있는 효모는 그리 흔치 않다[Lee 등, 2010]. *Saccharomyces*속 균주는 glucose, mannose, galactose의 혼합 기질에서 galactose는 생산물억제현상(catabolite repression/*GAL4* gene)으로 인하여 glucose와 mannose에 비하여 당의 이용과 에탄올 발효효율

*Corresponding author

Phone: +82-42-821-6733; Fax: +82-42-823-9241

E-mail: mhyoon@cnu.ac.kr

이 크게 낮은 것으로 알려져 있다[Schmidt 등, 2007]. *Saccharomyces*속 효모 중에서 특히 galactose 발효율이 높은 균주로서는 Keating 등[2004]에 의하여 *S. cerevisiae* NRRL Y-1528이 선발 보고된 바 있다. Galactose를 발효하는 *S. cerevisiae* 균주들은 기질의 농도가 10%, 15%, 20%로 점차 증가함에 따라 발효율 즉, 에탄올의 수율- $Y_{P/S}=[EtOH]_{max}/[Sugar]_{ini}$ -이 현저히 감소함으로써 galactose로부터 바이오알코올을 생산하는데 장애가 될 것으로 예상된다.

에탄올 발효와 관련하여 효모의 변이주는 몇 가지 방향으로 진행되어 왔다. 에탄올의 발효율을 향상시키기 위하여 알코올에 내성을 가지거나(ethanol-tolerant mutant) [Ogawa 등, 2000], glycerol의 생성을 감소시킨(glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutant, *gpd2Δ* mutant) *Saccharomyces* 변이주[Valadi 등, 1998], 목질계에서 유래하는 xylose를 발효시키기 위하여 *P. stipitis*의 생성물억제 변이주(restricted glucose catabolite repressed mutant) [Grabek-Lejko 등, 2006]와 *S. cerevisiae*의 호흡 결손 변이주(respiratory deficient mutant) [Kordowska-Wiater와 Targonski, 2002] 등이다. 그러나 galactose 기질에 대하여는 galactose를 이용하기 위한 Gal4-Gal80 복합체의 조절 기능이 밝혀져 있을 뿐이며 그 에탄올 발효에 관련된 연구결과는 보고된 바 없다.

본 연구에서는 galactose를 효율적으로 발효할 수 있는 효모 균주를 선발하여 각종 탄소원에서 순치배양하고, 이어서 이들 탄소원을 기질로 사용하여 발효 효율을 평가하였으며, 또한 전통적인 방법에 의하여 선발된 우량효모 *S. cerevisiae* No. 9 균주의 돌연변이주를 유발시키고 이로부터 고농도 기질에 적응하는 변이주를 선발하고자 실험하였다.

재료 및 방법

효모균주. 토양과 각종 유기물 등에서 분리한 84종의 야생균주와 국내의 미생물 보존기관 (NRRL, Northern Region Research Laboratory; ATCC, American Type Culture Collections; IFO, Institute for Fermentation, Osaka; KCTC, Korean Collection for Type Cultures; KACC, Korean Agricultural Culture Collection; KCCM, Korean Culture Center of Microorganisms)에서 분양받은 31주의 효모를 실험에 사용하였으며, 비교용 균주로서는 *S. cerevisiae* NRRL Y-1528를 NRRL로부터 분양받아 사용하였다.

배지. 효모의 배양 및 에탄올 발효를 위하여 몇 가지 배지를 사용하였다. Galactose 발효 효모의 배양에는 potato dextrose (PD) agar (PD broth 24 g, agar 16 g, chloramphenicol 25 mg/L, pH 5.6) 배지를 사용하였고, 탄소원으로서 glucose, mannose 및 galactose를 이용한 환원당에서의 순치배양 및 에탄올 발효시험은 Keating 등[2004]이 기술한 방법에 의거하였다. 순치배양을 위해서는 YP-sugar broth I (yeast extract 10 g, peptone 20 g, glucose 20 g/L, pH 5.0)을 사용하였고, 에탄올 발효에는 여기에 dibasic ammonium phosphate 1.65 g/L을 추가하고 당류는 여과살균(Advantec MFS-25 membrane, 0.45 μ m)하여 3%가 되도록 첨가한 pH 5.0의 YP-sugar broth

II 배지를 사용하였다.

배양방법. 순치배양을 위해서는 15 mL 플라스틱시험관에 YP-sugar broth I 8 mL를 넣고 여기에 순수분리 한 효모를 접종하여 30°C에서 24시간 동안 진탕배양(Jeio-Tech SK-760A rotary shaker, 120 rpm)한 다음, 원심분리(Bench-top centrifuge, 10 min, 3000 rpm)하여 균체침전물을 회수하였다. 이렇게 얻은 균체 전량을 같은 방법으로 새로운 배지 8 mL에 접종하고 동일한 조건으로 다시 24시간 마다 순차적으로 새로운 배지에 이식하면서 3일 동안 진탕배양하였다. 에탄올 발효는 당 성분을 제외한 YP-sugar broth II 배지 36 mL를 125 mL 삼각플라스크에 넣고, 여기에 여과살균한 30% galactose, mannose, 또는 glucose를 4 mL 추가하고, 미리 순치배양한 효모현탁액 0.4 mL를 접종하여 30°C에서 48시간 동안 진탕배양 하였다. 접종량 0.4 mL는 배지량의 1%에 상당하는 양으로써, 순치배양 후 접종액은 탁도로 (A_{610}) 0.8~0.9, 건물 중량으로 4 g/L이었다.

효모의 생육도 측정. 효모의 생육도는 배양액의 탁도(A_{610nm})를 측정하여 비교하였다. 한편 배양 균체의 건물 중량으로도 생육도를 나타내었으며, 건물 중량의 측정에는 배양액을 원심분리하여 균체를 회수하고, 이를 멸균 증류수로 3회 세척한 다음 동결건조(SFDSF 12, Samwon, Pusan, Korea)하여 무게를 측정하였다.

환원당 정량. 환원당의 함량은 Miller[1959]의 방법에 따라 dinitrosalicylic acid 시약을 사용하여 비색 정량하였다. 시험관에 시료용액 1 mL를 넣고 dinitrosalicylic acid 시약 3 mL를 첨가한 다음 잘 교반하여, 100°C에서 5분간 반응시킨 다음 냉각하여 550 nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선으로부터 환원당 함량을 계산하였다. 이때 표준곡선은 glucose용액을 사용하여 작성하였다.

돌연변이주 선발. 돌연변이를 유도하기 위해서 galactose 환경에서 자란 *S. cerevisiae* No. 9 균주를 0.85% 생리식염수로 세척하고 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) 완충액을 사용하여 현탁시킨 다음, 0.25 M의 농도가 되도록 EMS (Methanesulfonic acid, ethyl ester)를 첨가하고 30°C에서 3시간 동안 약하게 반응시켰다. 원심분리하여 균체를 회수한 후 생리식염수로 세 번 세척하고, 6% $Na_2S_2O_5$ 로 처리하여 EMS를 제거하였다[Lawrence, 2002]. YP-gal broth에 30°C에서 하룻밤 배양시킨 다음 YP-gal agar plate에 펼치고, 자라나는 콜로니를 tooth-pick 방법으로 새로운 plate에 옮겨 배양하였다. 변이처리 후 골라낸 Petite-type 콜로니를 1 mL의 PD broth (pH 5.5)에 넣고 vortex mixer로 현탁시켜 접종액으로 사용하였다. 시험관(18×150 mm, Pyrex)에 YP-gal broth II (3%) 8 mL와 Durham관을 넣고 현탁액 0.1 mL를 접종하여 30°C에서 48시간 정치배양하면서 Durham관에 기포의 생성 속도가 빠른 변이주를 1차 선발하였다. 1차 선발된 변이주를 다시 같은 방법으로 YP-gal broth II (20%)에 접종한 다음 정치배양하면서 Durham관에 기포의 생성 속도가 빠른 변이주를 2차 선발 하였다. 2차 선발된 변이주들의 에탄올 발효능력을 비교하기 위하여 125 mL Erlenmeyer flask에 YP-gal broth II (10, 15, 20%) 60 mL를 넣고 살균한 다음 순치배양한 균체현탁액을 30 μ L 접종하였고 여기에 고무마개로 숨을 넣은 유리관을 연결하였으며, 정치 배양하면서 7일 동안 그

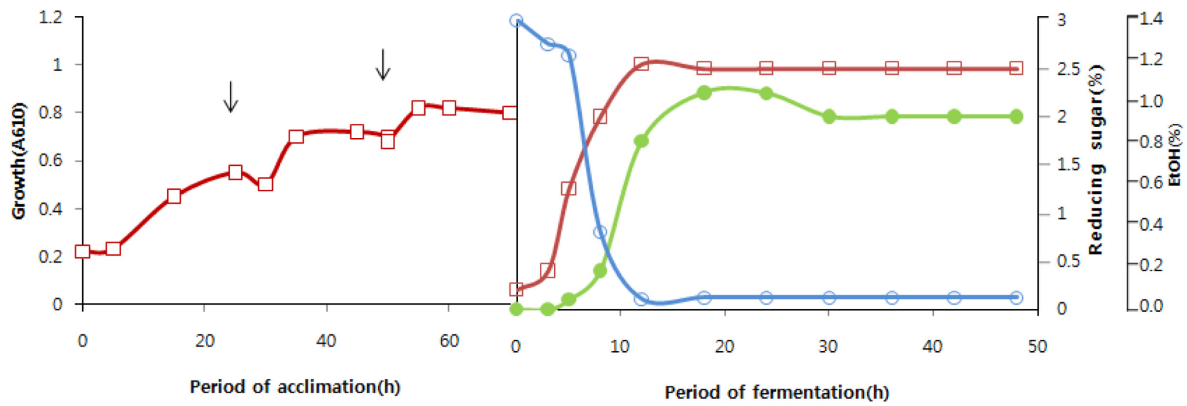


Fig. 1. Ethanol production on galactose (3%) by *S. cerevisiae* No. 9 after acclimation on galactose. □, Cell growth (A_{610}); ●, Ethanol; ○, Reducing sugar. The arrows indicate the time to inoculate the cells into fresh media for acclimation.

무게의 변화를 측정하였다. Galactose는 발효과정 중에 에탄올 0.51과 CO_2 분자 0.49의 비율로 전환되므로, CO_2 의 방출에 따른 중량 감소로부터 에탄올 생성량을 계산하였다. 또한 다음 방법에 따라 GC로 에탄올을 정량하여 재확인하였다.

에탄올 정량. 에탄올 농도는 기체크로마토그래피의 방법으로 분석하였다. 10 mL 유리 바이알에 포화식염수 0.2 mL, 내부표준물질로서 0.05% *tert*-butanol (Junsei, Tokyo, Japan) 0.1 mL, 그리고 시료 0.2 mL를 정확하게 첨가한 후, 고무마개로 완전하게 밀봉하여 headspace autosampler (Combi PAL, CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland)가 장착된 GC (Varian CP-3800, Foster City, CA)를 사용하여 분석하였다. 에탄올 표준용액 (AccuStandard Inc., New Haven, CT)은 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 및 0.4% 농도의 것을 사용하여 표준곡선을 작성하였으며, 상관계수(r)는 0.999 이상의 수준이었다. 컬럼은 CP-wax capillary column (15 m×0.25 mm×0.5 μ m), 검출기는 FI detector를 사용하였다. 운용조건은 inject port 210°C, detector 50°C, oven 250°C, flow rate 1.3 mL/min이었다.

결과 및 고찰

Galactose 발효성 효모의 선발. 미생물 보존기관으로부터 galactose 발효력이 있을 것으로 예상되는 효모 균주를 분양받고, 또한 자연계에서 분리한 야생효모 균주를 대상으로 하여 YP sugar (galactose 또는 glucose) broth II에서 48시간 배양하고 CO_2 가스의 발생여부를 관찰하여 분양균주 중에서 14균주, 야생균주 중에서 7균주를 galactose 발효 가능균주로 1차 선발하였다. 이들 21균주를 Keating 등[2004]의 방법(재료 및 방법 2항)에 따라 YP galactose broth I에서 3일간 순치배양한 다음 YP sugar (galactose 또는 glucose) broth II에서 발효시험을 수행하여 이들 중에서 비교적 galactose와 glucose의 발효력이 높은 야생균주 *S. cerevisiae* No. 9를 최종 선발하여 변이주 개발을 위한 모균주로 사용하였다. 한편 Keating 등[2004]이 연구한 바 있는 galactose 발효능이 우수한 *S. cerevisiae* NRRL Y-1528 균주를 비교용으로 사용하였다.

순치배양. 야생효모 No. 9와 비교용 균주 NRRL Y-1528을

Table 1. Ethanol yields and biomass accumulation during single sugar fermentation by the yeast strains

Strains	Sugar, acclimated	Fermentation substrate	EtOH Y_{PS} (g/g)	[Dry cell] $_{max}$ (g/L)
<i>Saccharomyces</i> sp. No. 9	Gal	Gal	0.38	4.180
		Man	0.37	4.151
		Glu	0.37	4.134
	Man	Gal	0.37	4.168
		Man	0.35	4.151
		Glu	0.36	4.155
<i>S. cerevisiae</i> NRRL Y-1528	Gal	Gal	0.36	4.180
		Man	0.37	4.280
		Glu	0.37	4.172
	Man	Gal	0.38	4.197
		Man	0.36	4.176
		Glu	0.39	4.147
Glu	Gal	0.36	4.193	
	Man	0.36	4.272	
	Glu	0.36	4.176	
	Glu	Gal	0.36	4.205
		Man	0.36	4.172
		Glu	0.41	4.176

Ethanol yields were presented as the amount of product per unit substrate, $Y_{PS} = [EtOH]_{max}/[Sugar]_{ini}$ (g/g).

YP sugar broth II에 접종하여 순치배양방법에 따라 72시간 동안 30°C에서 진탕배양하면서 일정 시간 간격으로 균체의 생육도 및 사용한 탄소원이 에탄올 발효에 미치는 영향을 평가하였다. 선발균주 No. 9는 galactose 순치배양에서 사용한 3% galactose 탄소원에서 균주의 생육은 접종 후 12시간 까지 증가하다 그 이후에는 큰 변화가 없었다. 즉 최초 12시간 동안은 대수생장기, 그 이후에는 정지기의 양상을 나타내었다. 발효기간 중 환원당의 함량은 초기에 급격히 저하되어 즉 6시간 후 최초 3% (2.85%)로부터 0.7~1.5% 수준으로 감소하였으며 12시간 후에는 거의 소모되어 잔유량은 0.05% 이하이었으며(Fig. 1), NRRL Y-1528 균주도 이와 유사한 결과를 보였다.

Ethanol 생성. 순치배양에 사용하는 탄소원의 종류 및 기질

Table 2. Ethanol yields and biomass accumulation during single sugar fermentation by the selected mutant strains

Strains	Sugar, acclimated	Fermentation substrate	EtOH ^b Y _{PS} (g/g)	[Dry cell] _{max} (g/L)
<i>Saccharomyces</i> sp. No. 9 ^a	Gal	Gal	0.38	4.180
		Man	0.37	4.151
		Glu	0.37	4.134
Mut-5	Gal	Gal	0.38	4.185
		Man	0.36	4.159
		Glu	0.37	4.167
Mut-17	Gal	Gal	0.39	4.193
		Man	0.36	4.160
		Glu	0.38	4.175
Mut-24	Gal	Gal	0.38	4.177
		Man	0.37	4.155
		Glu	0.38	4.168

^aThe mutant-5, -17 and -24 were selected because they showed increased ethanol productivities compared to the mother strain No. 9.

^bEthanol productivity on 3% galactose by *S. cerevisiae* No. 9 and its mutants after acclimation on galactose.

로 사용한 3% glucose, mannose, galactose 등의 탄소원이 에탄올 발효에 미치는 영향을 규명하고자 48시간 배양 하였으며, 여기에서 얻은 에탄올 발효결과를 Table 1에 요약하여 나타내었다. Galactose를 기질로 사용하였을 경우 에탄올 생산은 초기 12시간에는 천천히 상승하다가 18시간 후에 가장 높은 수준에 도달하였고 그 수율은 [EtOH]_{max}/[Sugar]_{ini}(g/g)을 퍼센트로 환산하여 나타내면 35.7~37.6%로써, glucose 순치시험구 35.7%, mannose 순치시험구 37%, galactose 순치시험구 37.6%이었다. Mannose를 기질로 사용하였을 경우 에탄올의 최고 수율은 glucose 순치시험구에서 37%, mannose 순치시험구 35.4%, galactose 순치시험구 37.7%로써 오히려 mannose 순치조건에서 2% 정도 낮은 결과를 나타내었다. Glucose를 기질로 사용하였을 경우에는 glucose 순치시험구에서 37%, mannose 순치시험구에서 35.9%, galactose 순치시험구에서 36.6%로써 거의 비슷하였다. Mannose 순치시험구에서 다소 낮았으며, 순치배양을 통한 발효기간 중 환원당의 감소율 및 에탄올의 수율은 No. 9 및 NRRL Y-1528 균주 모두에서 유사한 변화 경향을 보였으며 대체적으로 에탄올 수율은 37% 내외였다.

변이주의 ethanol 생성능. 고농도의 galactose를 발효하는 효모 균주를 개발하기 위하여 모균주인 *S. cerevisiae* No. 9를 EMS 처리하여 얻은 clone을 YP-gal broth II에서 시험하여 단계적으로 변이주를 선발하였으며, 마지막 단계에서는 5개 변이주에 대하여 10, 15, 20%의 galactose에서의 발효율을 비교하였다. 이들 중 galactose 발효능이 우수한 Mut-5 (SJ1-40), 17 (LK4-25), 24 (LK2-48)의 3개 변이주를 최종 선발하여 galactose 순치배양 조건에서 3% glucose, mannose, galactose 기질에서 48시간 배양 한 후 단당류의 종류별 에탄올 생성능을 모균주와 비교하였다. 모균주와 변이주간에 3% 기질에서의 에탄올 생산량은 차이가 크지 않았으나, 변이주의 당 이용성은 galactose, glucose, mannose 순으로 높았다(Table 2). 이들 변이주의 고농도 galactose 농도에 따른 에탄올 생성량을 비교한 실험에서

Table 3. Ethanol yields on 10, 15, and 20% substrates by the selected mutant strains

Substrate concentration	Yeast strains	Period of fermentation EtOH Y _{PS} (g/g)		
		48 h	96 h	144 h
10% galactose	No. 9*	0.12	0.35	0.42
	Mut-5	0.11	0.36	0.43
	Mut-17	0.13	0.36	0.43
	Mut-24	0.11	0.42	0.47
	NRRL-1528	0.26	0.44	0.48
15% galactose	No. 9*	0.03	0.16	0.26
	Mut-5	0.05	0.19	0.29
	Mut-17	0.04	0.21	0.33
	Mut-24	0.04	0.20	0.32
	NRRL-1528	0.12	0.32	0.40
20% galactose	No. 9*	0.02	0.09	0.15
	Mut-5	0.04	0.14	0.21
	Mut-17	0.03	0.13	0.19
	Mut-24	0.03	0.17	0.24
	NRRL-1528	0.12	0.29	0.35

*The mother strain of the mutant-5, mutant-17 and mutant-24.

10% galactose 에서는 모균주에 비해 변이주의 에탄올 생성능이 배양 96시간 후 10% 이하의 수준으로 증가 하였으나, 15% 와 20% 에서는 변이주의 에탄올 생성능이 20~30% 높았다 (Table 3). 또한 선발 변이주를 galactose에서 순치배양한 후 배양시간별 에탄올 생성능을 비교한 결과, galactose 10%에서 발효력은 NRRL Y-1528 균주가 처음부터 높았으나 90~100 h 이후부터는 Mut-24이 비슷한 수준으로 증가하였고 144 h 이후에는 0.47Y_{PS}(g/g)로 거의 비슷한 수준을 나타내었다. Mut-5와 Mut-17은 모균주보다는 높은 발효력을 보였지만 NRRL Y-1528에 비하면 약 9% 정도 낮은 수준이었다(Fig. 2A).

Galactose 15%에서 실험한 결과 20 h까지는 모든 균주의 발효력이 비슷하였으나 그 후 NRRL Y-1528 균주가 높아지기 시작하여 144 h가 지난 후에도 가장 높았으며, 다음으로는 Mut-17, Mut-24, 그리고 Mut-5순이었다. 변이주들의 평균 에탄올 생성능은 0.31Y_{PS}(g/g)로 모두 모균주 NO. 9보다는 높은 발효력을 보였지만 NRRL Y-1528 보다는 20% 이상의 낮은 발효능을 보였다(Fig. 2B).

Galactose 20%에서 실험한 결과도 15%에서와 마찬가지로 20 h까지는 모든 균주의 발효력이 비슷하였으나 그 후 NRRL Y-1528 이 월등히 높아지기 시작하여 144 h가 지난 후에는 다른 균주들과 큰 차이를 보였다. NRRL Y-1528 다음으로는 Mut-24, Mut-5, 그리고 Mut-17 순으로 발효력이 높았다. 변이주의 발효력의 순서는 15%에서 얻은 결과와는 다소 차이가 있었고, 그리고 20%에서도 변이주들의 에탄올 생성능 0.21Y_{PS}(g/g)은 0.15Y_{PS}(g/g)의 모균주보다는 높은 발효력을 나타내었지만 NRRL Y-1528 보다는 30% 이상의 낮은 발효능을 보였다(Fig. 2C). 이상의 결과를 Table 2에 요약한 것처럼 변이주 들은 모균주 보다 galactose를 기질로 한 에탄올 발효능이 모균주 보다 39.9~51.6% 높았으나 galactose의 농도가 증가 할수록 비교균주인 NRRL Y-1528에 비해 에탄올 생산능력이 감소하는 경향을 보였다.

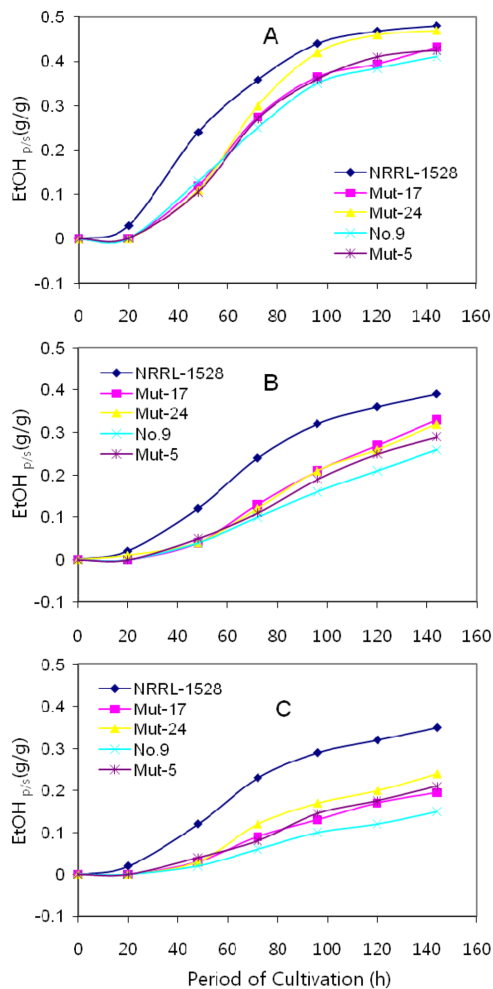


Fig. 2. Comparison of ethanol productivity on 10 (A), 15 (B), and 20% (C) galactose by *S. cerevisiae* No. 9 and its mutants after acclimation on galactose. Data are means of triplicate measurements.

*S. cerevisiae*에서의 galactose의 대사는 galactose permease (*GAL2*), galactokinase (*GAL1*), transferase (*GAL7*), epimerase (*GAL10*) 등에 의한 일련의 Lelior 경로를 거치게 되며, 여기에 관여하는 유전자들은 지속적인 galactose의 공급에 의하여 그 발현이 유도된다고 알려져 있다 [Ostergaard 등, 2001; Majumdar 등, 2004; Yan 등, 2010]. 본 연구의 에탄올 발효시험에서는 순치배양에 사용하는 탄소원에 따라서 발효 효율에 차이를 나타내어, galactose에서 순치된 효모는 발효 과정에서 다른 당에서 순치한 경우 보다 galactose의 소비가 빠르고 에탄올의 수율도 높을 것이라고 기대하였다. 그러나 예상과는 달리 선발균주 No. 9를 비롯한 비교용 균주 NRRL Y-1528의 경우 galactose 순치구가 glucose 또는 mannose 순치구에 보다 galactose 소비가 뚜렷하게 빠르지 않았다. 즉 선발균주들은 galactose 발효에 있어서 순치배양 조건이 크게 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. Keating 등 [2004]은 *S. cerevisiae* NRRL Y-1528에 의한 galactose의 발효에 이와 유사한 결과를 보고한 바 있다. 비록 선발균주 및 비교용 균주는 에탄올 발효에 있어서 순치 조건과 기질인 탄소원에 따라 큰 차이를 보이지 않았으나, 대체적으로 glucose에서 에탄올의 발효수율이 다소 높은

경향을 나타내었다. 선발균주 *S. cerevisiae* No. 9은 glucose, galactose, mannose의 3개 기질로부터 비슷한 수준으로 에탄올을 생산하였으나 mannose에서 수율이 약간 떨어졌으며, 다른 분리균주인 No. 40의 경우에는 galactose와 mannose로부터의 에탄올 생산이 비슷하였다. 비교용 균주인 NRRL Y-1528은 선발균주 No. 9에 비하여 galactose의 발효 수율이 양호하였다. 또한 EMS 처리에 의하여 모균주인 galactose 발효성 효모 *S. cerevisiae* No. 9로부터 에탄올 발효력이 향상된 변이주 Mut-5 (SJ1-40), -17 (LK4-25) 및 -24 (LK2-48)의 galactose 농도별 에탄올 발효력은 galactose 20% 농도에서 발효시험을 하였을 경우 선발된 변이주는 모균주보다 에탄올 발효율이 39.9~51.6% 높았으나, 비교용 균주 *S. cerevisiae* NRRL Y-1528의 에탄올 발효력에는 미치지 못하였다. 따라서 고농도 galactose 발효능이 우수한 새로운 변이주 개발과 순치배양 중에 galactose 발효 대사에 관여하는 UDP galactose-4-epimerase (*GAL10*) 효소의 활성은 물론, 그 유전자의 존재 및 발현 여부를 비교함으로써 균주 간 *GAL10* 유전자와 galactose 발효와의 상관관계를 확인하는 후속 연구가 요구된다.

초 록

에탄올을 생성하는 고농도 galactose 발효 효모 *Saccharomyces cerevisiae* No. 9를 선발하여 비교균주인 *S. cerevisiae* NRRL Y-1528과 함께 glucose, mannose, galactose에서 순치배양하고, 이어서 이들 3개의 탄소원을 기질로 사용하여 발효 효율을 평가하였다. 모균주인 No. 9의 에탄올 생산은 초기 12시간에는 천천히 상승하다가 18시간 후에 가장 높은 수준에 도달하였으며, 그 수율은 $[\text{EtOH}]_{\text{max}}/[\text{Sugar}]_{\text{ini}}(\text{g/g})$ 을 퍼센트로 환산하였을 때 glucose, galactose, mannose의 3개 기질에서 비교용 균주 NRRL Y-1528과 비슷한 36~38%로 수준이었고 실험한 3 균주 모두 galactose 발효에 있어서 탄소원의 종류에 따라 순치배양 조건이 에탄올 수율에 영향을 미치지 않았다. 전통적인 EMS 처리에 의하여 모균주인 galactose 발효성 효모 *S. cerevisiae* No. 9로부터 에탄올 발효력이 향상된 변이주 Mut-5 (SJ1-40), -17 (LK4-25) 및 -24 (LK2-48) 3개주를 선발하였다. 기질인 10, 15, 20% galactose를 이용한 에탄올 발효능을 실험 하였을 때 모균주 No. 9 및 변이주에서도 galactose의 농도를 증가시킬수록 감소하는 경향을 나타내었다. Galactose 20% 농도에서 변이주는 모균주보다 에탄올 발효율이 39.9~51.6% 높았으나, 비교용 균주 *S. cerevisiae* NRRL Y-1528의 에탄올 발효력에는 미치지 못하였다.

Key words: 에탄올 생성, Galactose 발효, 변이주 육성, *Saccharomyces cerevisiae*

참고문헌

Agbogbo FK, Coward-Kelly G, Torry-Smith M, and Wengera KS (2006) Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. *Process Biochem* **41**, 2333-2336.

- Farone WA and Cuzens JE (1997) Method of producing sugars using strong acid hydrolysis of cellulosic and hemicellulosic materials. *Biotechnol Adv* **15**, 548-549.
- Grabek-Lejko D, Ryabova OB, Oklejewicz B, Voronovsky ATY, and Sibirny AA (2006) Plate ethanol-screening assay for selection of the *Pichia stipitis* and *Hansenula polymorpha* yeast mutants with altered capability for xylose alcoholic fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol* **33**, 934-940.
- Keating JD, Robinson J, Bothast RJ, Saddler JN, and Mansfield SD (2004) Characterization of a unique ethanologenic yeast capable of fermenting galactose. *Enzyme Technol* **35**, 242-253.
- Kordowska-Wiater M and Targonski Z (2002) Ethanol fermentation on glucose/xylose mixture by co-cultivation of restricted glucose catabolite repressed mutants of *Pichia stipitis* with respiratory deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Microbiol Pilinica* **51**, 345-352.
- Lawrence CW (2002) Classical mutagenesis techniques. *Method Enzymol* **350**, 189-199.
- Lee KS, Kweon DH, and Jin YS. (2010) Improved galactose fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* through inverse metabolic engineering. *Biotechnol Bioeng* **108**(3), DOI 10.1002/bit.22988.
- Majumdar S, Ghatak J, Mukherji S, Bhattacharjee H, and Bhaduri A (2004) UDP galactose-4-epimerase. *Eur J Biochem* **271**, 753-759.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* **31**, 426-428.
- Nichols NN, Dien BS, and Bothast RJ (2003) Engineering lactic acid bacteria with pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase genes for ethanol production from *Zymomonas mobilis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **30**, 315-321.
- Ogawa Y, Nitta A, Uchiyama H, Imamura T, Shimoi H, and Ito K (2000) Tolerance mechanism of the ethanol-tolerant mutant of sake yeast. *J Biosci Bioeng* **90**, 313-320.
- Ostergaard S, Olsson L, and Nielsen J (2001) In vivo dynamics of galactose metabolism in *Saccharomyces*: metabolic flux and metabolite levels. *Biotechnol Bioeng* **73**, 412-425.
- Schmidt D, Anders A, Klose C, Lilie H, Stubbs MT, Golbik R, and Breunig KD (2007) An unconventional Rossmann-fold in the Gal4 regulator Gal80 binds NAD(P) and is involved in Gal4-Gal80 interaction. *Yeast* **24**(S1), S77: 08-1.
- Valadi H, Larsson C, and Gustafsson L (1998) Improved ethanol production by glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**, 434-439.
- Wei W, Wang S, Zhu X, and Wan W (1999) Isolation of a mutant of *Kluyveromyces* sp. Y-85 resistant to catabolite repression. *J Biosci Bioeng* **87**, 816-818.
- Wilkins MR, Mueller M, Eichling S, and Banat IM (2008) Fermentation of xylose by the thermotolerant yeast strains *Kluyveromyces marxianus* IMB2, IMB4, and IMB5 under anaerobic conditions. *Process Biochem* **43**, 346-350.
- Yan L, Chen G, and Liu W (2010) Alterations in the interaction between GAL4 and GAL80 effect regulation of the yeast GAL Regulon mediated by the F box protein Dsg1. *Curr Microbiol* **61**, 210-216.