

원형질 융합에 의한 전분으로부터 에탄올 발효효모균주의 개량

이혜정 · 이지나 · 천경숙 · 박소영 · 마은애 · 민경희

숙명여자대학교 이과대학 생물학과, 서울대학교 분자미생물학연구소

에탄올 내성 및 알콜 생성 균주인 *S. cerevisiae* BU-1와 glucoamylase 생성 우수 균주인 *S. diastaticus* A15를 시험 균주로 하여 genetic manipulation에 의하여 haploid인 *S. cerevisiae* BU1 α 26(*alc' thr*)와 *S. diastaticus* A15a6(*STA' hom*) 균주를 분리하였다. 이들 효모 균주의 원형질체 형성을 위하여 0.8 M sorbitol의 존재하에서 zymolyase 200 μ g/ml와 400 μ g/ml을 2시간 동안 처리시 두 균주 모두 95% 이상 원형질체를 얻었다. PEG 6000을 90분간 반응시킬 경우 융합 빈도는 3.25×10^{-3} 이었다. 원형질체 융합으로 생성된 융합주의 유전적 분석, 에탄올 내성, glucoamylase 생성을 측정한 결과, 이들 융합주의 유전자형은 *STA' alc' thr hom' / STA' alc' thr hom* 로 예상되었으며, glucoamylase 활성도는 A15a6의 경우 2.7 units이었으나, 융합주 F7, F10은 각각 4.2와 8.4 units로 나타났다. 에탄올 내성 시험을 하여 선별한 결과, 가장 우수한 균주인 융합주 7개 중 F7과 F10을 선별하였다. 5%의 녹말이 포함된 발효배양액에서 30°C 5일간 배양시 생성된 에탄올 생성은 융합주 F7과 F10은 각각 2.0%와 1.8%이었다.

KEY WORDS □ protoplast fusion, ethanol fermentation from starch, yeast strains

역사적으로 효모에 의한 당으로부터의 에탄올 생산은 발효 산업에 있어서 중요한 위치를 차지하고 있다. 각종 발효기질로부터 에탄올을 생산하여 연료로서 사용하려는 의도는 최근에 착상된 것이 아니며 이미 오래 전부터 많은 연구가 진행되어 실용단계에 까지 진보되어 있었다. 그러나, 아직까지 에탄올이 대체 액체연료로서 세계 각국에서 일반적으로 사용되지 못하는 이유는 원료인 biomass 자체의 원가가 높기 때문이다. 그러므로, 대체 에너지로서의 에탄올을 생산하기 위해서는 우수 균주의 개발, 발효조건의 최적화, 새로운 효율적인 발효 공정과 에탄올 정제 기술의 개발 그리고 더욱 값싼 발효기질의 공급 등을 통해 더욱 경제적으로 대량 생산하는 기술의 개발이 필수적이다. 발효 기질인 전분으로부터 연료용 에탄올을 생산하는 공정은 α -amylase에 의한 전분의 액화, glucoamylase에 의한 액화된 전분의 당화, 그리고 당화된 기질의 효모에 의한 에탄올 발효 생산 등의 3단계 과정을 거친다. 이같은 과정을 하나의 균주내에서 이루어질 수 있는 효모세포를 융합시키고자 시도하였다.

효모 세포의 원형질 융합은 유당을 이용하여 알콜을 발효시키고자 하는 연구가(1, 11) 보고되었으며, 고온에서의 에탄올 발효를 시도하기 위하여 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Zygosaccharomyces fermentati*를 융합시켰다(8). 섬유소의 기질로부터 에탄올 발효를 목적으로 *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces* 등을 사용하였다(5). 한편 전분으로부터 직접 발효를 할 수 있는 제조업 균주를 얻기 위하여 *S.*

cerevisiae(2, 3, 10, 12, 13), 그리고 *Schigosaccharomyces pombe*(10)와 *S. diastaticus*간의 원형질융합을 실시하였다(9).

본 연구에서는 이미 에탄올 내성 균주를 선별하였으며 glucoamylase 생성효모를 분리하였다(4). 전분으로부터 직접 에탄올로 발효할 수 있는 효모로 개발하기 위하여 이 두 가지 균주의 세포를 융합시켰으며 이들 융합주로 하여금 전분으로부터 glucoamylase에 의하여 glucose를 생성시키고 이 glucose를 효모가 에탄올로 전환시키고자 하였다.

재료 및 방법

균주

알콜 내성 및 고알콜 생성균주인 *Saccharomyces cerevisiae* BU-1와 glucoamylase 고생산 균주인 *S. diastaticus* A15를 세포융합을 위하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 균주는 Table 1과 같다.

Genetic marker의 도입

S. cerevisiae BU-1을 YPD broth 5 ml에 하루 preculture한 다음 sporulation broth medium 50 ml에 접종하여 3일간 30°C에 진탕 배양하였으며, 포자 형성은 현미경($\times 400$) 상에서 관찰하였다. 90% 정도 포자를 형성시킨 자낭세포를 얻어, 멸균수로 3회 세척하였다. 이를 10 mM 2-mercaptoethanol이 포함된 zymolyase-60,000(Kirin, 2 mg/ml) 용액에 현탁시킨 후, 실온에서 20분간 반응시켰다. 세포벽을 제거한 후 YPD 배지상에서 micromanipulator로

Table 1. Yeast strains used for this experiment

Strain	Genotypes	Sources
<i>Saccharomyces</i>		
<i>cerevisiae</i> BU-1	<i>STA⁻ alc^e(2n)</i>	This experiment
BU1 α 26	<i>STA⁻ alc^e thr (n)</i>	"
262a	<i>STA⁻ alc^e thr hom (n)</i>	Jeonbook Univ.
262 α	<i>STA⁻ thr hom (n)</i>	"
<i>Saccharomyces</i>		
<i>diastaticus</i> A15	<i>STA⁺ alc^e(2n)</i>	This experiment
A15a6	<i>STA⁺ alc^e hom (n)</i>	"

포자를 dissection시킨 후, test strain인 *S. cerevisiae* 262a(*alc^e thr hom*)와 262 α (*STA⁻ thr hom*)를 mating시켰다. 이것을 30°C 배양기에서 배양한 후 다시 포자형성 배지에 계대 배양하여 현미경으로 포자형성 유무를 관찰하였다. 이때 BU1 α 26(n)와 A15a6(n)을 분리하였다. 포자형성이 일어난 세포를 다시 harvest하여 멸균수로 3회 세척하고 이를 10 mM 2-mercaptoethanol이 포함된 zymolyase-60,000 용액에 현탁시킨 후, 실온에서 20분간 반응시켰다. 세포벽이 제거된 후 YPD 배지상에서 포자를 dissection시킨 후 30°C에서 배양하였다. 이것을 최소배지(SD medium : 0.67% YNB without amino acid, 2% glucose, 2% Bacto-agar)를 이용하여 marker를 확인하였으며, marker를 가진 BU1 α 26(n)을 marker를 가진 알콜 내성 균주로 선별하였다. 우수 glucoamylase 생성균주인 *Saccharomyces diastaticus* A15를 사용하여 genetic marker를 도입하는 방법도 위의 방법과 동일하게 수행하였으며, 회합하는 recombinant type의 glucoamylase의 활성 측정과 유전적 표지 확인을 통하여 genetic marker를 도입하였다.

원형질체 형성

세포 융합을 위한 우수한 알콜 내성균주인 *S. cerevisiae* BU1 α 26(n)와 glucoamylase 생성 우수균주인 *S. diastaticus* A15a6 균주를 250 ml의 삼각플라스크에서 50 ml씩 진탕 배양하였다. 배양조건 및 세포의 원형질체 형성은 Taya(11) 방법에 의하여 실시하였다.

원형질체의 융합과 재생

Polylethylenglycol(PEG)에 의한 원형질체 융합 실험은 Taya(11)와 Gunge & Tamaru(3)의 방법에 의하여 수행하였다.

Glucoamylase 효소 활성 측정

수용성 전분을 기질로 하여 0.1 M sodium acetate buffer(pH 6.0)에 조효소액을 가하여 총 반응액을 0.5 ml로 하였다. 50°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 100°C에서 30분간 boiling하여 반응을 정지시킨 다음 이 반응액을 Somogyi-Nelson method로 reducing sugar량을 결정하였다(7). Specific activity의 1 unit은 1 hour에 1 ml의 반응액당 1 μ g glucose를 생성하는 양으로 결정하였다.

에탄올 내성 실험

삼각 플라스크(250 ml)에 44 ml의 YPD medium(1% Yeast extract, 2%의 Bacto-peptone, 2% glucose)을 만든 후 12%의 에탄올을 포함한 알코올함유-YPD를 만들었다. 그런다음 이 액체배지에 균주를 접종하여 내성 정도를 관찰하였다.

에탄올 발효 실험

에탄올 생성을 위한 fermentation broth medium은 1% yeast extract, 0.5% peptone, 0.35% KH₂PO₄, 0.3%(NH₄)₂SO₄, 0.0025% MgSO₄·7H₂O, 32%의 glucose를 사용하였다. 호기성 발효 실험에서는 250 ml의 삼각 플라스크에 100 ml의 발효 배양액을 제조하여 30°C의 shaking incubator(180 rpm)에서 발효시켰다. 혐기성 발효 실험에서는 동일한 방법으로 배양하되 멸균된 liquid paraffin을 두께가 1 cm 되도록 배양액에 넣어 공기를 차단시키면서 30°C에서 정지 배양하였다. 이 경우는 완전한 anaerobic condition은 아니며, 그 이유는 어느 정도의 O₂ 공급이 있어야 unsaturated fatty acid가 생성되기 때문이다.

Gas-chromatography에 의한 에탄올 정량

Gas chromatography의 방법에 의하여 정확한 에탄올 정량을 실시하였다(4).

단백질 정량

단백질정량은 Lowry method(6)의 방법에 의하여 측정하였다.

세포의 형태적인 분석

Cell size의 측정은 micrometer eyepiece를 가진 광학현미경을 가지고 실시하였으며, 이때 cell size는 무작위적으로 선택한 100 cells의 평균값으로 결정하였다. Cell volumes(V)은 $V=4/3\pi(a/2)^2 \times b/2$ 의 방정식을 가진 정타원형일 것이라는 가정아래서 계산하였다. 이때 a와 b은 짧은축과 긴축의 길이를 의미한다.

결과 및 고찰

에탄올 내성균주 및 glucoamylase 생성균주의 genetic marker 도입

에탄올 내성 효모이며 고에탄올을 생성 효모인 *S. cerevisiae* BU-1과 glucoamylase 생성 효모인 *S. diastaticus* A15를 융합시키기 위하여 이들 각 균주에 genetic marker를 도입하여야 한다.

본 실험에서는 세포에 손상을 입히지 않고 genetic marker를 도입하는 방법을 시도하였다. 재료 및 방법에서 설명한 바와 같이, *S. cerevisiae* BU-1 strain 으로부터 sporulation하여 α type인 *S. cerevisiae* BU1 α 26(*alc^e thr⁺ hom⁺*)을 얻었다. 이 균주와 haploid인 *S. cerevisiae* 262a(*alc^e thr hom⁻*)을 mating시켜서 Fig. 1과 같이 2n의 효모 세포를 얻었다. 이것을 다시 sporulation plate 상에서 포자 형성을 시켜서 다른 여러가지의 haploid인 *alc^e thr⁻*, *alc^e thr⁺*, *alc^e thr⁻ hom⁺*, *alc^e thr⁺ hom⁺*, *alc^e thr⁻ hom⁻*, *alc^e thr⁺ hom⁻*, *alc^e thr⁻ hom⁻* 등의 progeny들을 얻을 수 있었다. 그 중에서도 우리가 원하는 strain은 *alc^e thr⁺*의 genetic marker를

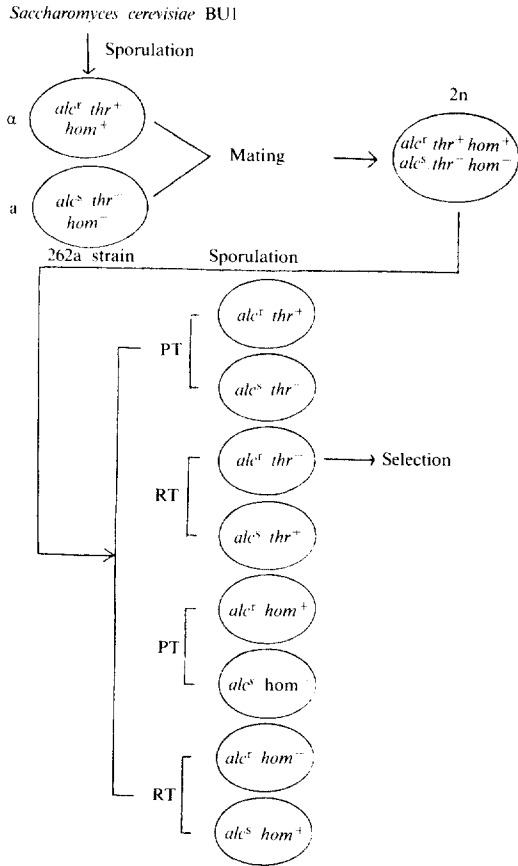


Fig. 1. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* BU1 α 26 ($alc^+ thr^-$) by the genetic mating experiment.

가진 BU1 α 26를 얻을 수 있었다(Fig.1 참조). Glucoamylase 생성 우수 효모인 *S. diastaticus* A15를 sporulation시켜서 위와 같은 방법으로 $STA^+ thr^+ hom^+$ 인 haploid a type을 얻을 수 있었다. 이것을 *S. cerevisiae* 262 α ($STA^- thr^- hom^-$)와 mating시켜서 diploid(2n)을 만들었으며, 이것으로부터 다시 sporulation을 시켜서 여러가지 haploid type 인 $STA^+ thr^+$, $STA^- thr^-$, $STA^+ thr^-$, $STA^- thr^+$, $STA^+ hom^+$, $STA^- hom^-$, $STA^+ hom^-$, $STA^- hom^+$ 를 얻을 수 있었다. 이들 중에서 본 실험에 필요로 하는 *S. diastaticus* A15a6($STA^+ hom^-$)을 얻을 수 있었다. 원형질체 형성

원형질체 형성은 isotonic solution 속에서만 가능하므로 sorbitol의 농도에 대하여 원형질체 형성을 조사하여 융합의 기본 조건을 규명하고자 하였다. *S. cerevisiae* BU1 α 26, *S. diastaticus* A15a6의 균주를 sorbitol의 농도에 따라서 원형질체 형성률을 haemocytometer를 사용하여 조사하였다. *S. cerevisiae* BU1 α 26의 경우 0.8 M의 용액속에 200 μ g/ml의 zymolyase를 3시간 처리하였을 경우 70%의 원형질체를 형

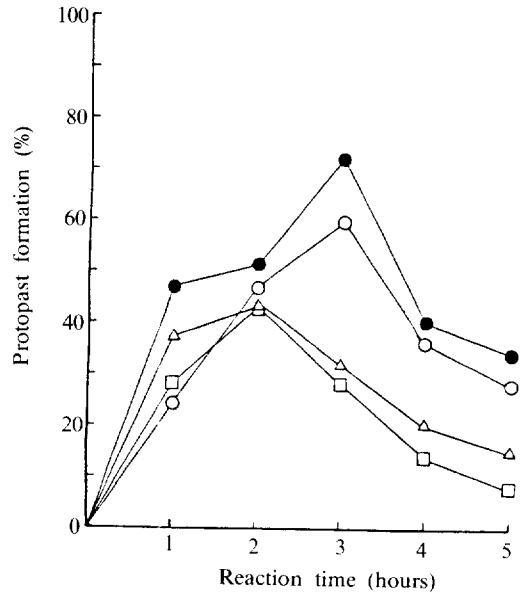


Fig. 2. Sorbitol effect on protoplast formation of *S. cerevisiae* BU1 α 26. 0.6 M (○), 0.8 M (●), 1.0 M (△), 1.2 M (□)

성함을 알 수 있었다(Fig.2 참조). 한편 위와 동일한 조건 하에서 *S. diastaticus* A15a6도 2시간 반응 후에는 약 95%의 원형질체가 형성되었다(Fig.3 참조). 이 결과에 따르면 *S. cerevisiae* BU1 α 26, *S. diastaticus* A15a6 모두가 0.8 M sorbitol에서 가장 최적의 원형질체 형성률을 보임을 알 수가 있었다.

Gunge와 Tamaru(3)은 *S. cerevisiae*의 원형질 융합 실험에서 sorbitol 농도를 0.8 M에서 최적의 조건으로 보고하였으며, Taya 등(11)은 *S. cerevisiae*와 *Kluyveromyces lactis*의 원형질을 융합시키기 위해서도 0.8 M sorbitol을 사용하였다. 본 실험에서도 sorbitol 최적농도가 0.8 M 이었으므로 등장액으로써 0.8 M sorbitol이 원형질체 형성에서 이상적인 결과로 사료 된다.

원형질체 형성을 위한 zymolyase의 영향을 조사한 결과는 800 μ g/ml의 zymolyase를 한 시간 반응시켰을 때 원형질 형성이 높게 나타났으며 zymolyase 600 μ g/ml과 400 μ g/ml의 농도에서 2시간 반응시켰을 때에도 역시 90% 이상의 원형질체 형성을 보여주었다. 그러나, 원형질체 형성을 위하여는 *S. cerevisiae* BU1 α 26 균주를 zymolyase 400 μ g/ml로 2시간 처리한 것을 선택하여 실험하였다(Fig.4 참조). 한편 Fig.3과 Fig.4에서 볼 수 있는 바와 같이 *S. diastaticus* A15a6는 200 μ g/ml의 zymolyase 반응 2시간 처리시 95% 이상의 원형질체를 형성하였음을 알 수 있었다.

위와 같은 결과를 통해 반응시간이 짧으면, 원형질체가 높은 비율로 형성되지 않으며, 반응시간이 지나치게 길면, 원형질체가 파괴되거나, 멍치는 결과를 가져오므로 최적의 반응시간을 유지시켜야 함을

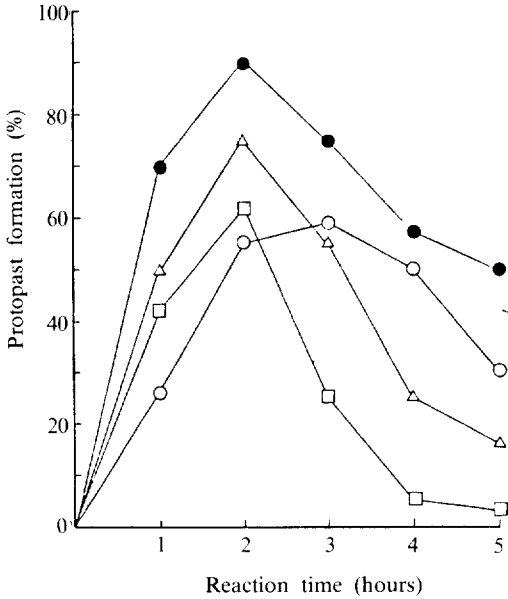


Fig. 3. Sorbitol effect on protoplast formation of *S. diastaticus* A15a6. 0.6 M (○), 0.8 M (●), 1.0 M (△), 1.2 M (▲)

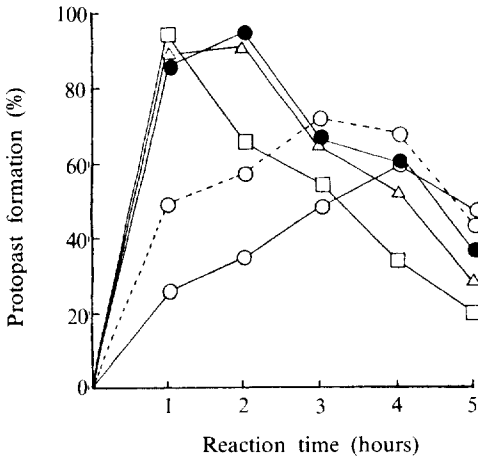


Fig. 4. Zymolyase effect on protoplast formation of *S. cerevisiae* BU1a26. 100 µg/ml (○-○) 200 µg/ml (—○—) 400 µg/ml (—●—) 600 µg/ml (—△—) 800 µg/ml (—□—)

알 수 있었다(Fig. 4).

원형질체 재생

Table 2에서 보여주는 바와 같이 *S. cerevisiae* BU1a26와 *S. diastaticus* A15a6는 zymolyase 처리시간이 길수록 재생빈도가 현저히 감소하였음을 알 수 있었다. 그러므로 본 실험의 결과로부터 두 균주 모두의 경우, zymolyase 처리시간이 120~180분에서 원형질체의 증가현상을 보여주었으나 원형질체의 재생빈도

Table 2. Regeneration frequency of parental strains.

Reaction time(min)	Strain <i>S. diastaticus</i> A15a6 (%)	<i>S. cerevisiae</i> BU1a26 (%)
30	58(42.0)*	62.5(43.0)
60	35(88.0)	40.0(86.0)
90	22(91.5)	24.0(90.0)
120	13(94.0)	14.0(94.0)
150	9(95.5)	11.0(80.0)
180	8(96.0)	10.0(66.5)

*괄호안은 원형질체 형성률(%)을 표시한 것이며, 이때 zymolyase 처리농도는 *S. diastaticus* A15a6가 200 µg/ml 그리고 *S. cerevisiae* BU1a26는 400 µg/ml를 처리하였음.

Table 3. Fusant frequency by PEG molecular weight and treatment time (×10⁻⁴)

반응시간 (min) PEG(MW) W	30	60	90	120
1450	—	—	—	—
3350	1.1	1.3	4.5	1.6
6000	7.4	11.7	6.5	6.1
8000	0.3	6.5	6.5	4.5

*Fusant frequency = $\frac{\text{Fusant cell number}}{\text{Total cell number}}$

는 급격히 감소함을 알 수 있었다. 이같은 결과를 토대로 하여 90분간 효소를 처리하여 2균주간의 융합을 시도하였다.

융합주 형성의 최적화

PEG 종류에 따른 융합주의 형성률을 측정하기 위하여, zymolyase에 의해서 형성된 A15a6와 BU1a26의 세포를 같은 양, 즉 1.1×10⁷ cells/0.5 ml인 1:1 혼합액을 최종농도가 35% PEG, 10 mM CaCl₂, 0.8 M sorbitol의 10 mM Tris-HCl buffer에 섞은 다음, 30°C 온도에서 반응시키면, 두 개의 다른 균주는 서로 융합되어 많은 융합주가 형성되었다(Table 3).

PEG 1450에서는 반응시간이 경과함에도 불구하고 융합주가 형성되지 않았다. PEG 3350에서는 90분간 반응시켰을 때, 4.5×10⁻⁴로 융합주의 수가 가장 많이 나타났다. 또한 PEG 6000와 PEG 8000에서는 60분간 반응시켰을 때 각각 11.7×10⁻⁴, 6.5×10⁻⁴로 가장 융합주의 형성 수가 많음을 알 수 있었다. 즉, 점성도가 약간 높은 PEG 6000와 PEG 8000에서는 60분만에 높은 융합주의 생성률을 보였다.

재생 가능한 원형질체 수에 대한 융합주 수의 비율을 Table 4에 나타내었다. 이 결과에서도 PEG 8000을 90분간 처리한 경우가 4.03×10⁻³으로 가장 높은 융합주를 생성하였으나, 점성이 대단히 높으므로 PEG 6000을 처리하여 얻은 결과인 3.25×10⁻³을 본 실험에 사용하였다.

Table 4. Fusant frequency to the regenerated protoplast number of *S. diastaticus* and *S. cerevisiae*

PEG(MW)**	Fusant number/ Regenerated protoplast number	*Fusant frequency
PEG 1450	0/3.0×10 ⁶	0
PEG 3350	9.9 × 10 ⁶ /6.9×10 ⁶	1.43×10 ⁻³
PEG 6000	1.43×10 ⁴ /4.4×10 ⁴	3.25×10 ⁻³
PEG 8000	1.45×10 ⁴ /3.6×10 ⁶	4.03×10 ⁻³

*Fusant frequency = $\frac{\text{Fusant all number}}{\text{Regenerated protoplast number}}$

Table 5. Ethanol production in fermentation medium containing 32% glucose or 5% starch

Strain	Ethanol concentration (% v/v)	
	Glucose medium	Starch medium
A15a6	2.5	0
Bu1a26	9.28	0
F 4	4.5	0.17
F 6	20.3	0.3
F 7	11.64	1.19
F 8	5.2	0.32
F 9	6.23	0.45
F 10	15.0	1.65
F 15	7.5	0.5

*Ethanol fermentation was carried out for 2 days incubation at 30 in a rotary shaker (180 rpm)

우수 융합주의 선별

1차 선별과정은 SD 최소배지상에서 revertants를 선별하였으며, 이 때 선별된 재조합주의 유전자형은 *alc⁺ hom⁻ /alc⁻ thr⁺* (2n)으로 예상되었다. 2차 선별은 clear zone 형성균주를 선별하였다. 따라서 이들 선별된 재조합주의 유전자형은 *STA thr hom⁻ /STA⁺ thr⁺ hom⁻* 으로 측정되며, 3차 선별은 alcohol-tolerant 균주를 선별하였다. 1차, 2차 선별을 통해서 얻은 33개의 융합주의 에탄올 내성을 시험한 결과, 21균주가 선별되었다. 따라서, 융합주 F6, F7, F10, F15들의 유전자형은 *STA thr⁻ hom⁺ alc⁺ /STA⁺ thr⁺ hom⁻ alc⁻* (2n)으로 사료된다. 4차 선별과정은 glucoamylase 생성균주의 선별과정을 거쳤으며, 알콜 내성 및 고 알콜 발효능이 우수한 균주들은 융합주 F4, 6, 7, 8, 9, 10, 15번이었다(Table 5). 이 결과를 보면 32% glucose 배지에서 A15a6은 역시 낮은 에탄올 생산량을 보였고, BU1a26은 거의 10%에 가까운 에탄올 생산량을 보였다. 7개의 융합주 중 3개는 BU1a26보다도 더욱 높은 에탄올 생산량을 나타내었다. 특히 F6, F10은 거의 15%의 에탄올 생성물을 보여주었다. 5% starch배지에서는 A15a6, BU1a26은 에탄올을 생성하지 못하였고 F7, F10은 1.19%, 1.65%로

Table 6. Cell size and cell volume of parental and fusant strains

Strains	Cell size(um)	Cell volume(um ³)
A15a6	5.8×6	205.0
Bu1a26	4.7×7.1	80.6
F 7	10.5×11.7	607.9
F 10	8.1×10.9	380.6

Table 7. Temperature effect on glucoamylase production by parental or fusants on YPS medium

Strains	Temperature		
	30°C	50°C	70°C
Bu1a26	1.56	2.70	0.08
A15a6	0.44	0.31	0.16
F 7	3.68	4.20	4.02
F 10	6.14	8.47	3.34

Table 8. The time-course of ethanol fermentation by parental or fusant strains (단위: v/v, %)

Medium	Glucose medium					Starch meidium				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Culture time (day)										
Strain										
A15a6	0.1	2.5	3.5	5.3	5.9	0	0	0	0	0
Bu1a26	1.5	9.3	11.3	13.0	14.0	0	0	0	0	0
F 7	3.2	9.0	9.7	13.3	14.5	0.6	1.2	1.2	1.6	2.0
F 10	4.1	9.2	10.5	13.7	15.0	0.8	1.7	1.7	1.7	1.8

다른 융합주 보다 훨씬 높은 에탄올 생성물을 보였다. 융합주 F6은 32% glucose 배지와는 다르게 5% starch 배지에서는 낮은 에탄올 생성물을 보임으로서 F7, F10이 가장 우수한 융합주으로써 최종적으로 선별되었다.

우수 융합주의 생장특성

우수 융합주의 cell size와 cell volume을 보면, 모균주인 A15a6, BU1a26와 융합주 균주의 형태학적인 차이점을 알아보기 위해서 위의 4가지 균주를 micrometer eyepiece를 가진 광학 현미경을 가지고 cell size와 cell volume을 측정하여 본 결과 Table 6와 같다. 위의 결과를 통해서 보면, cell size와 cell volume 면에서 모균주인 A15a6, BU1a26보다 융합주 균주인 7, 10이 더 큼을 알 수 있었다. 특히 F7번은 모균주보다 크기가 거의 2배에 가까운 값을 나타내었고 부피는 거의 3배, 4배의 차이까지 보여주었다 (Table 6).

위의 4개의 균주의 glucoamylase의 활성을 측정하여 본 결과는 Table 7에서 보여주는 바와 같다. 이

결과에 따르면, 융합주인 F7이나 F10은 pH 6에서 A 15a6보다 효소활성이 높았음을 알 수 있었다. 동일 조건에서는 F7은 30°C에서 보다는 70°C에서 더욱 높은 효소 활성을 보여주었다.

에탄올 발효의 최적화

에탄올 발효에 대한 pH의 영향의 영향을 보면, 250 ml 삼각 플라스크 100 ml의 다른 pH의 발효배지<1% yeast extract, 0.5% peptone, 0.3% KH₂PO₄, 0.3% (NH₄)₂SO₄, 0.0025% MgSO₄·7H₂O, 32% glucose or 5% starch>에 2개의 모균주와 우수 융합주 2개를 접종하여 30°C shaking culture로 aeration fermentation시켜 가면서 pH 6 배지에 따른 에탄올 생산량을 비교하였다(Table 8). 이같은 방법으로 2개의 모균주와 2개의 융합주를 배양시간을 달리하며 에탄올 생성량을 비교해 보았다. 32% glucose 배지에서로부터의 에탄올 발효에서는 고알콜 생성 균주인 BU 1a26이 5일 배양 후 14.0%의 에탄올 생성량을 나타낸 것에 반해서 F7, F10은 각각 14.5%와 15.0%에 해당하는 에탄올 생성량을 보였다. 5% starch 배지에서, 2개의 모균주에서는 에탄올이 생성되지 않았으며, 융합주에서만 에탄올이 생성되었다. 배양일 5일이 되면서 부터는 F10은 1.8%, F7은 2.0%의 에탄올을 생성함을 알 수 있었다.

사 사

본 연구는 동력자원부 911C201-346FPI의 연구에 의하여 이루어졌으며, 본 실험의 genetic manipulation을 위하여 도움을 주신 전북대학교 분자생물학과 장광엽 교수에게 깊이 감사드린다.

참 고 문 헌

1. Farahnak, F., T. Seki, D.Y. Ryu, and D. Ogrzyziak, 1986. Construction of lactose-assimilating and high-ethanol-producing yeasts by protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 362-367.
2. Ferenczy, L. and A. Maraz, 1977. Transfer of mitochondria by protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.*, **268**, 524-525.
3. Gunge, N. and A. Tamaru, 1978. Genetic analysis of products of protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Japan. J. Genetics.*, **53**, 41-49.
4. Ji, K.S., S.W. Park, J.N. Lee, Y.H. Rhee, and K.H. Min, 1991. Isolation of ethanol-tolerant strains of yeast in relation to their tolerant mechanism. *Kor. Jour. Microbiol.*, **29**, 136-142.
5. Lodder, J., 1970. The yeasts. *A taxonomic study.*, 555-1083. North-Holland publishing co., Amsterdam.
6. Lowry, O.H., N.I. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
7. Nelson, H., 1944. A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**, 375-380.
8. Pina, A., I.L. Calderon, and T. Benttez, 1986. Zygogenic hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces fermentati* obtained by protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 995-1003.
9. Sakae, T., K.I. Koo, K. Saitoh, and T. Katsuragi, 1985. Use of protoplast fusion for the development of rapid starch-fermenting strains of *Saccharomyces diastaticus*. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 297-306.
10. Sipiczki, M. and L. Ferenczy, 1977. Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating-type. *Molec. Gen. Genet.*, **151**, 77-81.
11. Taya, M., H. Honda, and T. Kobayashi, 1984. Lactoseutilizing hybrid strain derived from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2239-2243.
12. Van Solingen, P. and L.B. van der Plaats, 1977. Fusion of yeast spheroplasts. *J. Bacteriol.*, **130**, 946-947.
13. Yamamoto, M. and S. Fukui, 1977. Fusion of yeast proto-plasts. *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1829-1830.

(Received November 23, 1992)

(Accepted December 18, 1992)

ABSTRACT: Construction of Starch-assimilating and Ethanol-fermenting Yeast by Protoplast Fusion

Lee, Hae-Jung, Ji-Na Lee, Kyung-Sook Chun, So-Yung Park, Eun-Ae Ma, and Kyung-Hee Min (Department of Biology, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742)

Ethanol-tolerant strain, *S. cerevisiae* BU1a26 (*alc^r thr⁻*) and glucoamylase-producing strain, *S. diastaticus* A15a6 (*STA⁺ hom⁻*) were prepared by means of genetic manipulation. Protoplast fusion was carried out to introduce *STA* gene from A15a6 strain to BU1a26 strain. Protoplast formation was shown at 0.8 M sorbitol and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zymolyase treatment for 2 hours incubation. Fusion frequency was 3.25×10^{-3} to the regenerated protoplast number using PEG 6000 for 90 min incubation. The excellent fusants with genotype of *STA⁻ alc^r thr⁻ hom⁺/STA⁺ alc^s thr⁺ hom⁻* (2n), F7 and F10, were selected by ethanol-tolerant, ethanol fermentation, and glucoamylase production tests. Glucoamylase production of A15a6 showed 2.7 units, but 4.2 or 8.4 units for F7 or F10 fusant at 50°C. Ethanol fermentation from 32% glucose by BU1a26 was 14.0%(v/v) in fermentation medium for 5 days incubation, but 14.5% or 15.0% for F7 or F10 strain, respectively. Ethanol fermentation from 5% starch was 2.0% by F7, or 1.8% by F10 strain in fermentation medium for 5 days fermentation.