

T0001030

GOVP120050682

최 종
연구보고서

고 수준 Thr, Trp함유 효모 사료첨가제 개발

Development of yeast feed additive containing high
contents of Threonine and Tryptophan

충 남 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “고 수준 Thr, Trp 함유 효모 사료첨가제 개발에 관한 연구” 과제 (제 1세부과제 “사료용단백질 Yeast의 효능검증”, 제 2세부과제 ”아미노산 애널로그를 이용한 대량생산 균주 육종“, 제 3세부과제 ”효모 transformation 및 발효생산 연구“에 관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 9 월 14 일

주관연구기관명 : 충남대학교

총괄연구책임자 : 이 봉 덕

세부연구책임자 : 이 봉 덕

“ : 송 경 빈

“ : 안 길 환

연 구 원 : 장 애 무

“ : 김 양 일

“ : 이 동 규

“ : 선 남 규

“ : 염 형 준

“ : 이 명 숙

“ : 이 찬 용

“ : 송 재 연

“ : 서 석 인

“ : 곽 응 권

“ : 박 훈 우

“ : 이 윤 희

“ : 박 미 선

요 약 문

I. 제 목

고 수준 Thr, Trp 함유 효모 사료첨가제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 Threonine, 및 Tryptophan을 대량 함유하는 효모 사료첨가제를 개발 생산, 사료원가 절감으로 축산농가 수익증대 및 사료수입 절감 통한 외화 유출을 억제하기 위한 목적으로 이루어지며, 기술적으로 yeast를 유전적으로 조작하여 threonine, 또는 tryptophan 등의 함량을 높여 사료의 아미노산 조성을 좀 더 이상적으로 만들어 별도의 비용을 수반하지 않고도 사료의 품질을 향상시킬 것으로 사료되고, 경제·산업적 측면에서 아미노산의 저가 공급으로 축산농가의 수익증대와 수입원료사료의 감축을 위하여 필수적이라 하겠다. 또한 사회·문화적 측면에서 사료원가의 부담을 줄여 축산농가의 소득증대와 사료원료의 수입을 줄여 한국의 경제에 이바지 할 뿐만 아니라 사회적인 안정도 꾀하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 특정 아미노산을 대량생산하는 균주 *Yeast Saccharomyces cerevisiae*, 또는 *Candida*의 특정 아미노산 analogue 저항성균주 개발, *Yeast Saccharomyces cerevisiae*의 특정 아미노산 반복 염기서열을 갖는 유전자 vector 개발하였다. 또한 개발 사료의 동물 성장에 대한 효과를 검증하기 위해 동물사료에 첨가제의 첨가형태, 배합비율 및 유통방법에 대해 연구하고 개발된 아미노산함유 사료첨가제의 효과를 검증하였다. 그리고 이들의 시제품 제조 및 상품화를 위해 5 리터 규모의 벤치스케일 발효시험을 하고 2 톤 규모의 시제품 생산하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구 결과 목표한 Threonine 및 Tryptophan을 대량 함유하는 *Saccharomyces* 및 *Candida* 효모 균주를 개발 하였다. 이들을 배양하는 기술을 개발하고 시제품을 생산하여 닭을 이용한 실증 실험을 하였다. 시제품을 닭에게 영양 조건을 같이 하여 적용하였을 때, 닭의 체중 변화 등에 대조구와 차이가 없고 독성 등의 영향이 없어 차후 산업화가 가능하리라 예상된다. 따라서 참여 기업에 균주 및 배양 기술 이전할 예정이다. 다만 발효기의 선투자 조건이 필요할 것으로 예상된다.

SUMMARY

I. Title

Development of yeast feed additive containing high contents of threonine and tryptophan.

II. Purpose

This study is pursued to develop yeast feed additive containing high contents of threonine and tryptophan. The developed feed additive could decrease feed price, increase farmer income, and reduce import of feed additive. Genetically controlled yeast can produce increased contents of threonine and tryptophan and the yeast can be used for a feed additive to improve feed quality. In economical aspects, by providing cheap amino acids, increases in farmer income and decreases in feed import could be obtained. In social aspects, by supporting farmers, social balances can be improved.

III. Range of study

In this study, resistant mutants against certain amino acid analogue in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida rugosa* were developed. Also, a vector system containing repeated sequences of threonine and tryptophan but it was toxic to microorganisms. To measure the effect of the developed feed additive, the yeasts were applied to feed for animal feed practice. The method of additive, ratio of additive and transportation type were studied and optimized. A 5-liter-scale fermentation was performed to study cultural characterization of the developed yeast strains. A 2-ton-scale fermentation was applied for test feed additive products.

IV. Results and application of the study

In this study, *Saccharomyces* and *Candida* containing increased threonine and tryptophan were successfully developed. Cultivating technology of the yeasts were developed. The test product was used to measure the effect on chicken. When the nutritional conditions were the same in chicken experiments, the weight gain of yeast feeding group was not different from the control. Also there was no toxic effect and thus industrial application would be possible. The results and technologies will be transferred to the accompanied company. However, the company should invest fermenters to produce the developed yeasts.

CONTENTS

Chapter 1. Outline	8
Section 1. Purpose.....	8
Section 2. Importance.....	8
1. Importance.....	9
2. Range.....	11
3. Goal and content.....	12
Chapter 2. Current state of technology	15
Chapter 3. Results	16
Section 1. Effect of developed microbial strains by feeding.....	16
1. Material and method.....	16
2. Results.....	22
Section 2. Development of strains producing high contents of amino acid.....	26
1. Development of resistant strains of amino acid analogue in <i>S. cerevisiae</i>	26
2. Development of resistant strains of amino acid analogue in <i>Candida</i>	40
3. Development of amino acid overproducing transformants.....	49
Section 3. Cultivation of developed strain yeast.....	56
1. Cultivation of strains, TC5-1 and TC6-1, obtained by resistant to threonine and tryptophan analogue in <i>S.cerevisiae</i>	59
2. Cultivation of <i>S. cerevisiae</i> transformants.....	61
Section 4. Single cell, protein production of the yeast for feed additive.....	78
1. Introduction.....	78
2. Materials and method.....	79
3. Results and discussion.....	81
4. Conclusion.....	87
Section 5. Cultivation research of <i>C. rugosa</i>	88
1. Optimal condition for growth of <i>C. rugosa</i>	88
2. Standard curve of <i>C. rugosa</i>	91
Section 6. Experimental scale producing.....	94

Chapter 4. Degree of performance.....	97
Chapter 5. Plan for use of the results.....	99
Section 1. Results of research.....	99
Section 2. Plan of application.....	101
Chapter 6. Foreign scientific information during study.....	102
Chapter 7. References.....	103
< Appendix >.....	107

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....	8
1절. 연구개발의 목적.....	8
2절. 연구개발의 필요성.....	8
1. 연구 개발의 필요성.....	9
2. 연구 범위.....	11
3. 연차별 연구개발 목표와 내용.....	12
제 2 장 국내·외 기술개발 현황.....	15
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	16
1절. 개발된 효모 균주의 동물에 미치는 영향.....	16
1. 재료 및 방법.....	16
2. 결 과.....	22
2절. 고 아미노산 생산 균주 개발.....	26
1. 효모 <i>Saccharomyces</i> 의 amino acid analogue 저항성 강화 균주 개발.....	26
2. <i>Candida</i> 석유효모에 대한 analogue 저항성 균주개발.....	40
3. Plasmid를 이용한 고 아미노산 균주 확보.....	49
3절. 생산된 고 아미노산 생산 균주의 배양연구.....	56
1. <i>S. cerevisiae</i> 의 threonine과 typtophan analogue 저항성 균주, TC5-1과 TC6-1의 생육특성 연구.....	59
2. <i>S. cerevisiae</i> 의 plasmid를 이용한 transformants의 배양연구.....	61
4절. 사료첨가제를 위한 효모 단세포 단백질의 생산.....	78
1. 서론.....	78
2. 실험 재료 및 방법.....	79
3. 결과 및 고찰.....	81
4. 결론.....	87
5절. <i>C. rugosa</i> 의 배양 연구.....	88
1. <i>C. rugosa</i> 의 최적 성장 조건.....	88
2. <i>Candida rugosa</i> 의 standard curve.....	91
6절. 시제품 생산 연구.....	94

제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	97
제 5 장	연구개발결과의 활용계획.....	99
	1절. 연구성과.....	99
	2절. 활용계획.....	101
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	102
제 7 장	참고문헌.....	103
< 부록 >	107

제 1 장 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발의 목적

Threonine, 및 Tryptophan을 대량 함유하는 효모 사료첨가제를 개발 생산, 사료원가 절감으로 축산농가 수익증대 및 사료수입 절감 통한 외화 유출 억제

2절. 연구개발의 필요성

우리나라의 사료산업은 총 매출액 4조원을 넘는 거대한 시장규모이다. 그러나 최근 축산물 소비증가율은 둔화되었고, 사료산업을 둘러싼 국내·외 환경이 점차로 어려워지고 있다. 우리나라 사료산업의 특징으로는 단기간에 고속 성장한 신생산업이라는 점과, 대부분 원료 사료의 높은 해외의존도를 들 수 있다. 최근의 통계를 보면, 우리나라는 사료용 원료의 95% 이상을 해외에 의존하고 있는 실정이다. 더욱이 최근의 광우병 파동으로 인한 대두박 가격의 급등 가능성은 그 누구도 부인할 수 없는 실정이어서 우리나라의 사료산업, 더 나아가서 축산업의 미래를 어둡게 하고 있다. 배합사료 제조에 어분과 대두박 등의 고단백질 사료원료들이 필수아미노산 급여원 으로서 막대한 양이 외국에서 수입되어 사용되어 왔다. 또한 lysine과 methionine 같은 제한 아미노산들은 발효 공업적으로 대량 생산된 제품이 비싸게 거래되고 있는 실정이다.

본 연구계획서는 기존의 국내 부존 사료자원의 개발이라는 차원을 넘어서, 새로운 사료자원의 창출이라는 개념을 갖고 작성되었다. 즉 효모의 유전자를 변이유도 혹은 유전자조작 기법을 통하여 변형시켜서 우리가 원하는 필수아미노산을 많이 함유 또는 생산하게 한 후, 이들 아미노산을 추출하지 않고 그대로 건조·가공하여 상대적으로 저렴한 고단백질 원료사료를 국내 사료업계에 공급하고, 또한 해외시장에도 수출한다는 취지이다. 본 연구진의 예비 실험 결과에 의하면 tryptophan 및 threonine의 애널로그에 저항성을 갖는 균주를 분리해본 결과 이들이 더욱 많은 이들 아미노산을 함유하고 있음을 알 수 있었다. 이와 같이 생산된 제품의 필수아미노산 조성을 우리가 원하는 패턴대로 유도할 수 있는 단계로 본연구진의 기술수준으로 원만한 연구결과를 기대할 수 있어 본 과제를 신청하는 바이다.

1. 연구 개발의 필요성

가. 기술적 측면

일반적으로 곡류의 필수아미노산 조성은 동물성장에 필요한 아미노산들인 lysine, methionine, threonine이 부족하다고 알려져 있다. 이에 비하여 동물 및 어류의 아미노산 조성은 곡물에 비하여 영양가치가 높게 나타나 있다. 배합사료의 제조에는 부족한 아미노산을 공급하기 위하여 사료첨가제를 사용한다.

본 과제에서는 효모를 변이유도 방법 혹은 유전공학적 기법을 이용하여 균체 아미노산 조성을 바꿔 고단백질 사료첨가제로 이용하려 한다. Yeast의 유전공학적 연구는 오랜 기간 동안 연구되어 왔고, 빵효모나 맥주효모로써 현재로도 사용되고 있다. 본 연구과제의 기본적인 개념은 yeast를 유전적으로 조작하여 threonine, 또는 tryptophan 등의 함량을 높여 사료의 아미노산 조성을 좀 더 이상적으로 만든다는 것이다. yeast의 사용에는 또 다른 장점이 있는데 yeast는 기존에도 때때로 사료의 품질을 향상시키기 위하여 사료에 첨가하는데 이의 아미노산 조성을 바꾼다면 별도의 비용을 수반하지 않고도 사료의 품질을 향상시켜 축산농가의 소득에 이바지 할 수 있을 것으로 사료된다.

나. 경제·산업적 측면

threonine 과 tryptophan은 비싸기 때문에 사용을 꺼릴 뿐만 아니라 다른 아미노산 고함유 원료사료 (예: 어분 등)를 사용함으로써 사용량을 줄이고 있다. 만약 이들의 가격이 줄어들게 되면 threonine과 tryptophan의 사용량은 3-10배 까지 증가 될 것으로 전망된다.

효모의 생산은 국내생산과 해외에서 생산하는 방식이 있는데 국내는 빵효모, 국외는 석유효모를 생산하는 것이다.

따라서 이들 아미노산의 저가 공급은 축산농가의 수익증대와 수입 원료사료의 감축을 위하여 필수적이라 하겠다. 본 연구에서는 이러한 한국 축산농가의 어려운 점을 감안하여 이들 아미노산제품의 저가공급의 길을 열어 농가의 소득증대와 수입 감소에 일조하려 한다.

Table 1. 연구 개발된 효모의 생산 및 판매형태

연구개발효모	현재가격 (원/kg)	예상판매가격
빵효모 (국내생산)	4,000	4,000-8,000원
석유효모 (수입)	500	1,500-4,000원

다. 사회·문화적 측면

현재 한국의 축산은 초유의 어려운 상황에 놓여 있다. 이러한 때에 대상그룹이 lysine생산 및 판매권을 독일의 기업에게 팔아넘김으로서 한국의 사료첨가제로서 필수적인 lysine의 가격조절 능력은 상실되어 버렸다. 안팎으로 어려운 이때에 본 연구과제는 사료원가의 부담을 줄여 축산농가의 소득증대와 사료원료의 수입을 줄여 한국의 경제에 이바지 할 뿐만 아니라 사회적인 안정도 꾀하고자 한다.

2. 연구 범위

가. 미생물로부터 특정 아미노산 대량생산 균주개발

- Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, 또는 *Candida*의 특정 아미노산 analogue 저항성 균주 개발
- Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, 또는 *Candida*의 특정 아미노산 반복 염기서열을 갖는 유전자 vector 개발

나. 개발 사료의 동물성장에 대한 효과 검증

- 동물사료에 첨가제의 첨가형태, 배합비율 및 유통방법
- 개발된 아미노산함유 사료첨가제의 효과 검증

다. 시제품 제조 및 상품화

- 5 리터 규모의 벤치스케일 발효시험
- 2 톤 규모의 시제품 생산

3. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2001): 효모 <i>Saccharomyces</i> 를 사용 고아미 노산 첨가물 로 개발	○ 사료용단백질 Yeast의 효능검증 (제1세부): 효모의 사료첨가물로의 공급형태 결정 (가공형태)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 원료구입 (효모) <ul style="list-style-type: none"> - 참여기업에서 공급 (현물) - 원료가공 (효모 엑기스 준비 형태 및 생효모) ○ 닭에서의 효과 측정 <ul style="list-style-type: none"> - 육계사양시험 - 산란계 시험 - 효모소화율 측정 ○ 과제관리 <ul style="list-style-type: none"> - 보고서 작성 - 과제총괄 협의 및 관리
	○ 아미노산 애널로그를 이용한 대량생산 균주 육종 (제2세부): 효모 <i>Saccharomyces</i> 아미노산 Tryptophan 및 Threonine analogue 저항성 강화 균주 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 효모 <i>Saccharomyces</i> 아미노산 Tryptophan analogue 저항성 강화 균주 개발 <ul style="list-style-type: none"> - Tryptophan analogue 선발 - 저항성 균주 개량 (nitrosoguanidine) ○ 아미노산 Threonine analogue 저항성 균주 개발 <ul style="list-style-type: none"> - Threonine analogue 선발 - 저항성 균주 개량 (nitrosoguanidine) ○ 과제관리 <ul style="list-style-type: none"> - 보고서 작성 - 차기년도 준비
	○ 효모 transformation 및 발효생산 연구 (제3세부): 효모 <i>Saccharomyces</i> 를 poly Thr, poly Trp, poly Thr-Trp sequence 함유 plasmid로 transformation	<ul style="list-style-type: none"> ○ 실험준비 <ul style="list-style-type: none"> - 각종시약 구매 - repeated 아미노산 sequence DNA 구매 ○ 효모 transformation <ul style="list-style-type: none"> - poly 아미노산 plasmid로 transformation - Recombinant 의 아미노산 축적능 검사 ○ 과제관리 <ul style="list-style-type: none"> - 보고서 작성 - 차기년도 준비 ○ 효모 생산 및 가공 <ul style="list-style-type: none"> - 빵 효모 <i>Saccharomyces</i> 생산 (약 100 kg) - 효모 엑기스 형태 와 생효모 건조 형태 - 제 1 세부에 공급

<p>2차년도 (2002): 개발된 효모의 실증 및 석유효 모의 고 아미노 산첨가 물로 개발</p>	<p>○ 사료용단백질 Yeast의 효능검증 (제1세부): 1차년도 개발된 균주이용 실증연구 (동물성장 효과측정)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 원료구입 (효모) <ul style="list-style-type: none"> - 참여기업에서 공급 (현물) ○ 닭에서의 효과 측정 <ul style="list-style-type: none"> - 육계사양시험 - 산란계 시험 - 동물성장을 측정 ○ 과제관리 <ul style="list-style-type: none"> - 보고서 작성 - 과제총괄 협의 및 관리
	<p>○ 아미노산 애널로그를 이용한 대량생산 균주 육종 (제2세부): 1차년도 개발 효모를 이용 복합 저항성 균주개발 (예, threonine과 tryptophan)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 효모 <i>Saccharomyces</i> 아미노산 Threonine과 Tryptophan analogue 저항성 강화 균주 개발 ○ 효모 <i>Saccharomyces</i> 아미노산 Threonine과 Tryptophan analogue 복합 저항성 균주 개발 ○ 과제관리 <ul style="list-style-type: none"> - 보고서 작성 - 차기년도 준비
	<p>○ 효모 transformation 및 발효생산 연구 (제3세부): 개발 <i>Saccharomyces</i> 효모의 발효연구 (대량생산 시스템 개발)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개발효모를 이용한 Thr 및 Trp의 생산증대 <ul style="list-style-type: none"> - Thr 키 효소 함유 plasmid로 transformation - Trp 키 효소 함유 plasmid로 transformation - Recombinant 효모의 성장특성 검사 ○ 실험준비 (진바이오텍 참여) <ul style="list-style-type: none"> - 발효기 준비 (1톤-10톤 규모) - 발효조건 설정 ○ 효모 생산 및 가공 (진바이오텍 참여) <ul style="list-style-type: none"> - 빵 효모 <i>Saccharomyces</i> 생산 (약 100 kg) - 제 1 세부에 공급 ○ 1, 2 차년도 개발 효모 생산 조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 발효기 (5-100 L)를 이용한 생산 - 참여기업에 기술이전 ○ 과제관리 <ul style="list-style-type: none"> - 보고서 작성 - 차기년도 준비

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
3차년도 (2003): 개발효모의 실증 및 산업화 실생산	○ 사료용단백질 Yeast의 효능검증 (제1세부): 2차년도 개발된 균주이용 실증연구 (동물성장 효과측정)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 원료구입 (효모) <ul style="list-style-type: none"> - 참여기업에서 공급 (현물) ○ 동물사육에서의 효과 측정 <ul style="list-style-type: none"> - 육계사양시험 - 산란계 시험 - 돼지사양 시험 ○ 과제관리 <ul style="list-style-type: none"> - 보고서 작성 - 과제총괄 협의 및 관리
	○ 아미노산 애널로그를 이용한 대량생산 균주 육종 (제2세부)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 효모 <i>Torula</i> 또는 <i>Candida</i> 석유효모를 이용한 애널로그 저항성 균주개발 ○ 효모 <i>Torula</i> 또는 <i>Candida</i> 석유효모를 이용한 복합된 애널로그 저항성 균주개발 ○ 과제관리 <ul style="list-style-type: none"> - 최종 보고서 작성
	○ 효모 transformation 및 발효생산 연구 (제3세부)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 2 차년도 까지 개발된 각종 효모의 발효 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 돌연변이 효모와 recombinant 효모의 성장특성 검사 - 대량 생산을 위한 대형 발효기 이용 연구 - 시제품 성분검사 ○ 효모 <i>Torula</i> 또는 <i>Candida</i>를 이용 유전자 조작 <ul style="list-style-type: none"> - poly 아미노산 plasmid로 transformation - Recombinant 의 아미노산 축적능 검사 - Thr 및 Trp 키 효소 함유 plasmid로 transformation ○ 실험준비 (진바이오텍 참여) <ul style="list-style-type: none"> - 발효기 준비 (1톤-10톤 규모) - 발효조건 설정 ○ 효모 생산 및 가공 (진바이오텍 참여) <ul style="list-style-type: none"> - 효모 <i>Saccharomyces</i> 또는 <i>Candida</i> 또는 <i>Torula</i> 생산 (약 100 kg) - 제 1 세부에 공급 ○ 과제관리 <ul style="list-style-type: none"> - 보고서 작성

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

현재 국내·외 타 연구기관에서 본 과제와 관련한 연구를 진행한 적이 없다. 외국의 경우 원료사료가 풍부하여 사료의 가격에 대해서 한국에 비하여는 덜 민감한 편이다. 따라서 외국에서도 이러한 연구가 진행된 적이 없고 국내에서도 본 연구가 최초로 기안된다.

현 기술상태의 취약부분은 본 과제에 있어서 별로 존재하고 있지 않다. DNA의 합성이나, plasmid의 제조 등은 효모의 경우 이미 일반적인 기술로 난해한 부분은 존재하고 있지 않다. 다만 효모의 대량생산을 위해서는 산업적 규모의 (5 - 50 ton) 생산이 필요한데, 본 과제 참여기업과 관련기업이 이러한 시설을 갖추고 있어 대량생산할 예정이다.

그리고 농축수산물의 수입개방화 추세에 따라 저가의 외국의 농축수산물이 범람하고 있으나 이에 대한 대책은 별로 없는 실정이다. 앞으로 이런 개방화가 가속화되면 국내 농축수산업은 고사될 가능성도 없지 않다. 이러한 상황에서 사료가격을 저하시킨다면 축산농가의 어려움을 한결 덜 수 있다고 사료된다.

또한 현재 국제 곡물 값은 안정되어 있으나 엘리뇨나 다른 기상이변에 의하여 곡물의 수급이 불안정하면, 그해의 곡물 작황에 따라서 국제 곡물가격이 결정될 때 가격의 변동폭이 상당히 커지게 된다. 이러한 상황이 닥치면 사료의 주 곡물을 바꾸어야 하는데 이때의 영양적인 밸런스의 유지는 비용을 수반하게 된다. 그러한 때에 본 연구의 결과가 있게 되면 발효에 의한 생산은 시기나 장소 또는 기후에 변함없이 생산이 가능하기 때문에 사료의 가격을 안정시키는데 일조하게 된다.

더욱이 최근 유럽의 광우병 파동으로 인한 동물성 단백질 사료의 사용금지 조치는 국제적인 식물성 단백질 사료의 가격인상을 초래하였다. 따라서 대부분의 사료를 수입에 의존하고 있는 국내 실정에 비추어 볼 때, 본 과제를 성공적으로 완수할 경우 그 파급 효과는 실로 크다고 하겠다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절. 개발된 효모 균주의 동물에 미치는 영향

1. 재료 및 방법

가. 공시 효모

본 과제에서는 다음의 5가지 시제품 균주를 사용하였으며, 이들의 조단백질 및 Thr, Trp 함량은 Table 2에 수록된 바와 같다.

Table 2. 공시 균주 개요

처리	효모명	조단백질(%)	건물중		조단백질중	
			Thr(%)	Trp(%)	Thr(%)	Trp(%)
A	<i>Candida rugosa</i> 대조균주(CR)	25.97	1.31 (100)	0.21	5.04 (100)	0.81
B	<i>Candida rugosa</i> 변이주(MCR)	32.15	2.76 (211)	0.29	8.95 (178)	0.94
C	<i>S. cerevisiae</i> 변이주(MSC)	32.90	2.36 (155)	0.52 (193)	7.39 (147)	1.63 (183)
D	<i>S. cerevisiae</i> transformant (TSC)	32.03	3.20 (211)	0.33	10.54 (210)	1.09
E	<i>S. cerevisiae</i> 대조균주(SC)	30.29	1.52 (100)	0.27 (100)	5.02 (100)	0.89 (100)

A: *Candida rugosa* 대조균주 (CR)

B: *Candida rugosa* 변이주 (MCR)

C: *Saccharomyces cerevisiae* 변이주 (MSC)

D: *Saccharomyces cerevisiae* transformant (TSC)

E: *Saccharomyces cerevisiae* 대조균주 (SC)

※괄호안은 각각의 대조균주를 100으로 하였을 때의 지수임.

나. 육계 사양실험

1일령 된 육계 수컷 병아리 (Ross) 200수를 시중에서 구입하여 충남대학교 실험동물사육사에서 사육하였다. 본 실험은 5처리로 처리당 4반복을 두었으며 반복당 10수를 1단 철제 케이지에 수용하였다. 점등은 종야점등으로 하였으며, 계사내 온도는 1일령에 34℃로 고정된 후 3주령에 24℃ 까지 점차적으로 하강한 다음 시험 종료시 즉 5주령까지 유지하였다.

시험사료는 옥수수 및 대두박 위주 기본사료를 대조구사료로 하였고, 이 대조구사료에 각각의 공시 효모를 3% 수준으로 대두박을 동량 대체하였다 1-3 주령 동안에는 육계전기사료를, 4-5주령에는 육계후기사료를 급여하였다 (Table 3).

Table 3. 전기 및 후기 육계 기본 사료의 배합례 및 영양소 함량¹

Ingredients	Starter (1-3 wk)	Finisher (4-5 wk)
Yellow corn (%)	59.742	64.252
Soybean meal (%)	28.26	27.833
Corn gluten meal (%)	6.261	3.00
Soybean oil (%)	2.00	1.828
Dicalcium phosphate (%)	1.762	1.218
Limestone (%)	0.936	1.126
Salt (%)	0.40	0.40
DL-methionine (50 %) (%)	0.359	0.139
L-lysine (98%) (%)	0.08	0.004
Vitamin premix ² (%)	0.10	0.10
Mineral premix ³ (%)	0.10	0.10
Total (%)	100.00	100.00
Calculated Composition		
ME (kcal/kg)	3,100	3,100
CP (%)	21.00	19.00
Ca (%)	1.00	0.90
Total P (%)	0.719	0.619
Available P (%)	0.45	0.35
Methionine (%)	0.50	0.38
Lysine (%)	1.10	1.00

1 The experimental diets were formulated by adding 3.0% yeast (A, B, C, D, E) to the control diet at the expense of soybean meal.

A: *Candida rugosa* 대조균주 (CR)

B: *Candida rugosa* 변이주 (MCR)

C: *Saccharomyces cerevisiae* 변이주 (MSC)

D: *Saccharomyces cerevisiae* transformant (TSC)

E: *Saccharomyces cerevisiae* 대조균주 (SC)

2 Provided followings per kilogram of diet: vitamin A, 5,500 IU; vitamin D3, 1,100 IU; vitamin E, 11 IU; vitamin B12, 0.0066mg; riboflavin, 4.4mg; pantothenic acid, 11mg (Ca-pantothenate: 11.96mg); choline, 190.96mg (choline chloride 220mg); menadione, 1.1mg (menadione sodium bisulfite complex 3.33mg); folic acid, 0.55mg; pyridoxine, 2.2mg (pyridoxine hydrochloride, 2.67mg); biotin, 0.11mg; thiamin, 2.2mg (thiamin mononitrate 2.40mg); ethoxyquin, 125mg.

3 Provided following milligram per kilogram of diet: Mn, 120; Zn, 100; Fe, 60; Cu, 10; I, 0.46 and Ca, min: 150, max: 180

체중은 반복별로 1일령, 3주령 및 5주령에 측정하였고, 사료섭취량은 3주령 및 5주령에 반복별 총 급여량으로부터 잔량을 감하여 구하였다. 사료효율(feed/gain)은 반복별 총 사료섭취량을 증체량으로 나누어서 구하였다. 사료와 물은 무제한 급여를 원칙을 하였다.

육계 실험에서 얻어진 성적은 분산분석을 실시하였고, Duncan의 신 다중 검정법을 사용하여 5% 수준에서 처리 평균간 유의성을 검정하였다.

다. 산란계 실험

37주령된 산란계 (Lohmann Brown)를 5처리 3반복, 반복 당 12수씩 총 180수를 공시하여 8주간의 사양실험을 수행하였다.

실험사료 5가지는 옥수수-대두박 기본 산란계 사료의 대두박 3%을 효모 (A, B, C, D, 및 E)로 동량 대체하여 배합하였다 (Table 4).

Table 4. 산란계 기본사료 배합례 및 영양소 함량

Ingredients	Basal layer diet ¹
Yellow corn	68.32
Soybean meal (CP 44%)	17.83
Corn gluten meal (CP 60%)	3.60
Limestone	8.40
Tricalcium phosphate	0.93
DL-methionine	0.09
L-lysine	0.08
Salt	0.25
Vitamin premix ²	0.25
Mineral premix ³	0.25
Total	100
Chemical composition	
ME (kcal/kg)	2,800
CP (%)	16.00
Ca (%)	3.40
Available P(%)	0.28

¹ The experimental diets were formulated by adding 3.0% yeast (A, B, C, D, E) to the control diet at the expense of soybean meal.

A: *Candida rugosa* 대조균주 (CR)

B: *Candida rugosa* 변이주 (MCR)

C: *Saccharomyces cerevisiae* 변이주 (MSC)

D: *Saccharomyces cerevisiae* transformant (TSC)

E: *Sacchromyces cerevisiae* 대조균주 (SC)

² Provided per kg of diet: Vit A, 5,500 IU; Vit D3, 1,100 ICU; Vit E, 11 IU; Vit B12, 0.0066mg; riboflavin, 4.4mg; pantothenic acid, 11mg; choline, 190.96mg; menadione, 1.1mg; folic acid, 0.55mg; pyridoxine, 2.2mg; biotin, 0.11mg; thiamin, 2.2mg; ethoxyquin, 125mg.

³ Provided me per kg of diet: Mn, 120; Zn, 100; Fe, 60; Cu, 60, I, 0.46.

점등시간은 하루 16시간으로 하였으며, 물과 사료는 무제한 급여하였다.

계란은 매일 수거하여 주별 평균 산란율을 계산하였고, 사료 섭취량은 주 1회 조사하였다. 계란 품질은 산란시점 시작 후 4주, 6주 및 8주령에 각각 하루를 택하여, 산란한 달걀 중 연과란을 제외한 모든 계란에 대하여 분석을 실시하였다. 난각 강도는 계란 껍질 강도 측정기 (Egg shell force gauge Model II, Robotmation Co. Ltd., Chuo-ku, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 난각두께는 FHK (Fujihara Co. Ltd., Saitama, Japan)로 측정하였다. 계란의 난각색, Haugh Unit, 난황색은 QCM+ System (Technical Services and Supplies, York, England)을 이용하여 측정하였다.

산란계 실험에서 얻어진 성적은 분산분석을 실시하였고, Duncan의 신 다중검정법을 사용하여 5% 수준에서 처리 평균간 유의성을 검정하였다.

라. 수탉 대사실험

63주령된 Single Comb White Leghorn 수탉 18수를 6처리 3반복, 반복 당 1수씩을 대사케이지에 수용하였다. 6처리는 아래와 같이 설계되었다.

- A: (옥수수 90% + 대두박 10%) x 0.85 + A 효모 15% = 100%
- B: (옥수수 90% + 대두박 10%) x 0.85 + B 효모 15% = 100%
- C: (옥수수 90% + 대두박 10%) x 0.85 + C 효모 15% = 100%
- D: (옥수수 90% + 대두박 10%) x 0.85 + D 효모 15% = 100%
- E: (옥수수 90% + 대두박 10%) x 0.85 + E 효모 15% = 100%
- F: (옥수수 90% + 대두박 10%) = 100%

본 수탉 대사실험은 전분 채취법으로 실시하였다. 실험사료에 대한 적응기간은 5일이었고, 분 채취기간은 3일간이었다. 매일 아침 수당 90 g씩의 실험사료를 급여하였고, 익일 아침에 잔량을 측정하였다. 매일 아침 채취된 분은 65℃ 통풍건조기에서 건조시킨 후, 3일간의 배설량을 합하였다. 영양소 이용률 계산은 Sibbald 등(1960) 방법에 준하였다.

산란계 실험에서 얻어진 성적은 분산분석을 실시하였고, Duncan의 신 다중검정법을 사용하여 5% 수준에서 처리 평균간 유의성을 검정하였다.

2. 결 과

가. 육계 실험

A, B, C, D, E 5종류의 효모를 육계 옥수수-대두박 위주사료에 3% 수준으로 첨가·급여시 육계의 성장에 미치는 효과는 Table 5에 요약하였다.

Table 5에서 보는 바와 같이 1-3주령에 효모 종류에 따른 유의한 차이는 증체량, 사료섭취량 및 사료효율(feed/gain) 어디에도 검출되지 않았다. 이러한 현상은 4-5주령 및 1-5주령에 있어서도 동일하게 관찰되었다.

Table 5. 육계 효모 사양시험 결과

항목	처 리 ¹					SEM	Significance (P≤0.05)
	A	B	C	D	E		
1-3 주							
증체량, g/bird	677 ²	659	679	647	697	18.0	NS
사료섭취량, g/bird	986	934	982	932	959	20.8	NS
Feed/gain	1.46	1.42	1.45	1.44	1.38	.003	NS
4-5 주							
증체량, g/bird	772	654	699	694	712	57.6	NS
사료섭취량, g/bird	1566	1495	1526	1556	1622	59.5	NS
Feed/gain	2.03	2.35	2.24	2.27	2.33	.164	NS
1-5 주							
증체량, g/bird	1449	1313	1378	1341	1409	65.2	NS
사료섭취량, g/bird	2552	2429	2508	2488	2580	70.2	NS
Feed/gain	1.76	1.86	1.83	1.87	1.84	.070	NS

¹ A: *Candida rugosa* 대조균주 (CR)

B: *Candida rugosa* 변이주 (MCR)

C: *Saccharomyces cerevisiae* 변이주 (MSC)

D: *Saccharomyces cerevisiae* transformant (TSC)

E: *Sacchromyces cerevisiae* 대조균주 (SC)

² Results are expressed as means (±SD) of four replicates per dietary group.

나. 산란계 실험

옥수수-대두박 위주의 기본사료 중 대두박 3%를 A, B, C, D, E 5가지 효모로 동량 대체하여 37주령 산란계에 급여 시 산란율과 사료섭취량 그리고 계란품질에 미치는 효과는 Table 6에 요약하였다.

대두박 3%를 효모로 동량 대체하여 급여하여도, 산란율, 난중 및 난 생산사료 효율과 같은 산란생산성에는 유의한 영향을 끼치지 않았다. 난질검사 결과, H.U.와 난각 과각강도에 있어서 유의성이 검출되었고 ($P \leq 0.05$), 난각두께, 난각색 및 난황색에 있어서는 효모 종류에 따른 차이가 검출되지 않았다.

Table 6. 효모 산란계 사양실험 및 난질 검사 결과

항목	처 리 ¹					SEM	Signifi- cance (P≤0.05)
	A	B	C	D	E		
산란율, %	88.33 ⁵	85.33	78.00	88.33	81.67	5.816	N.S.
난중, g/egg	60.35	59.09	62.35	62.23	61.98	1.244	N.S.
난생산사료효율 ²	2.53	2.64	2.72	2.38	2.58	0.188	N.S.
Haugh Unit ³	81.10 ^a	84.43 ^a	82.97 ^a	83.73 ^a	72.70 ^b	2.475	P≤0.05
난황색	8.27	9.30	9.73	9.36	9.00	0.367	N.S.
난각색 ⁴	46.20	46.77	45.30	43.57	43.03	1.078	N.S.
난각파각강도, kg/cm ²	4.00 ^{ab}	3.17 ^c	4.17 ^a	3.70 ^b	3.60 ^b	0.131	P≤0.05
난각두께, mm	0.36	0.35	0.36	0.36	0.35	0.006	N.S.

¹ A: *Candida rugosa* 대조균주 (CR)
 B: *Candida rugosa* 변이주 (MCR)
 C: *Saccharomyces cerevisiae* 변이주 (MSC)
 D: *Saccharomyces cerevisiae* transformant (TSC)
 E: *Sacchromyces cerevisiae* 대조균주 (SC)

² 총사료섭취량/총난중

³ HU formula (Eisen 등, 1962)에 의하여 구함.

⁴ 수치는 반사율이며, 흰색 100%, 검정색 0%의 반사율로 표시.

⁵ Means of three replicates per dietary group.

다. 수탉 대사시험

5가지 효모들 (A, B, C, D, E)의 고형물 (DM) 대사율과 Thr 및 Trp 이용율을 수탉대사 시험을 통하여 구하였던 바, 그 결과는 Table 7에 나타난 바와 같다. 3가지 영양소 이용율에 있어서 효모 처리간 유의성이 검출되지 않았다.

Table 7. 효모의 영양소 이용율 (수탉대사시험)

항 목	효 모 ¹					SEM	Signifi- cance (P≤0.05)
	A	B	C	D	E		
고형물 대사율, %	71.92 ²	75.94	69.38	72.87	72.13	2.536	N.S.
Thr 이용율, %	77.63	75.65	74.28	71.63	81.21	3.442	N.S.
Trp 이용율	82.50	79.69	78.20	75.88	76.74	3.751	N.S.

¹ A: *Candida rugosa* 대조균주 (CR)
 B: *Candida rugosa* 변이주 (MCR)
 C: *Saccharomyces cerevisiae* 변이주 (MSC)
 D: *Saccharomyces cerevisiae* transformant (TSC)
 E: *Sacchromyces cerevisiae* 대조균주 (SC)

²Means of three replicates per yeast group.

2절. 고아미노산 생산 균주 개발

1. 효모 *Saccharomyces*의 amino acid analogue 저항성 강화 균주 개발

가. 균주 및 amino acid analogue의 선정

특정 아미노산을 overproduction하는 미생물의 개발을 위하여 이미 안전성이 확보된 대표적인 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하였으며, 특히 본 연구방법으로 이용되는 아미노산 analogue에 저항성을 갖지 않는 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* X2180 mating type(♂)를 선정했다.

본 실험에 사용할 analogue를 선정하기 위해 tryptophan analogue로 알려진 indole, indoleacrylic acid, fluorotryptophan과 threonine analogue로 알려진 serine, β-hydroxynorvaline에 대한 균주의 저항성을 측정하였다. 측정 결과, tryptophan analogue에서는 fluorotryptophan이 균주의 성장을 저해하는 것으로 나타났으며, threonine analogue에서는 β-hydroxynorvaline에서 성장 저해가 나타났으므로 본 실험에 이 두 analogue를 이용하기로 선정하였다.

나. 선정된 균주에 대한 amino acid analogue의 minimum inhibitory concentration 측정 및 저항성 균주 screening method

아미노산에 대한 균주의 sensitivity를 측정하기 위해 disk diffusion test를 이용하였다. *S. cerevisiae* 균주를 1% 접종한 top agar(0.75%) plate에 paper disk를 overlaid한 후, 각기 다른 농도의 analogue를 30μl씩 loading하여 30℃에서 배양한 후 생육 저지대를 관찰하였다.

Tryptophan analogue에 대한 *S. cerevisiae*의 sensitivity 측정 결과, 0.1mM fluorotryptophan의 농도에서부터 생육 저지대가 관찰되었다(Fig. 1). 동일한 방법으로 threonine analogue에 대한 실험 결과 2.5mM β-hydroxynorvaline의 농도에서 생육 저지대가 관찰되었다. (Fig. 2)

한편, 본 실험에서 analogue 저항성 균주의 screening은 wild type의 MIC 농도보다 높은 농도인 2mM fluorotryptophan과 10mM β-hydroxynorvaline을 이용하였으며 이 농도에서 wild type은 뚜렷한 생육저지대가 나타났다.(Fig 3, 4)

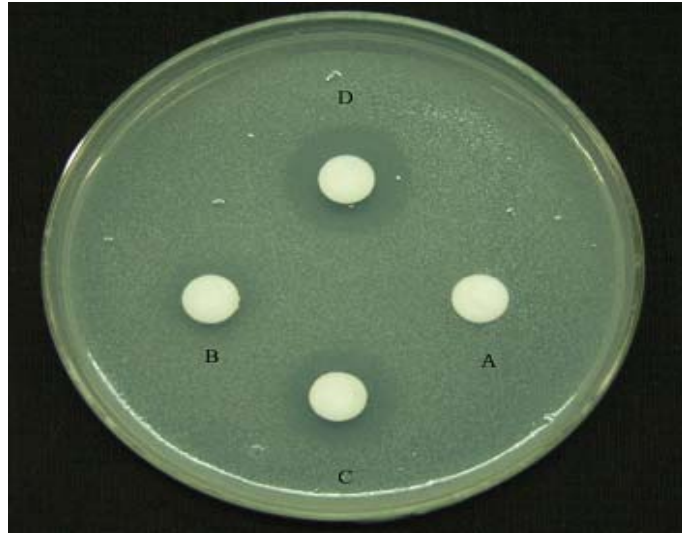


Fig. 1. Minimum inhibitory concentration of fluorotryptophan against *S. cerevisiae* : A ; control, B ; 0.1mM, C ; 0.25mM, D ; 0.5mM

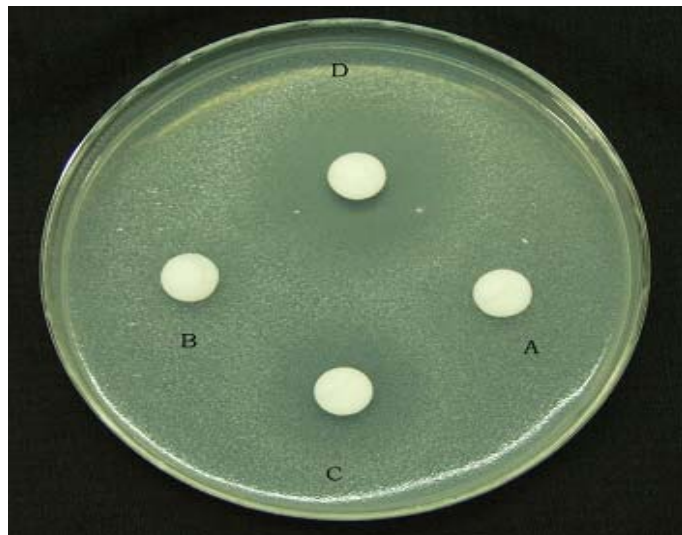


Fig 2. Minimum inhibitory concentration of β -hydroxynorvaline against *S. cerevisiae* : A ; control, B ; 0.1mM, C ; 0.25mM, D ; 0.5mM

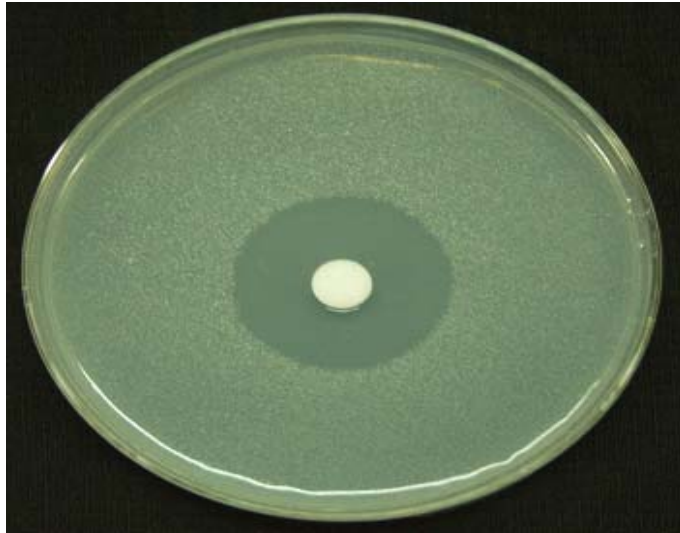


Fig. 3. Effect of 2mM fluorotryptophan for *S. cerevisiae*

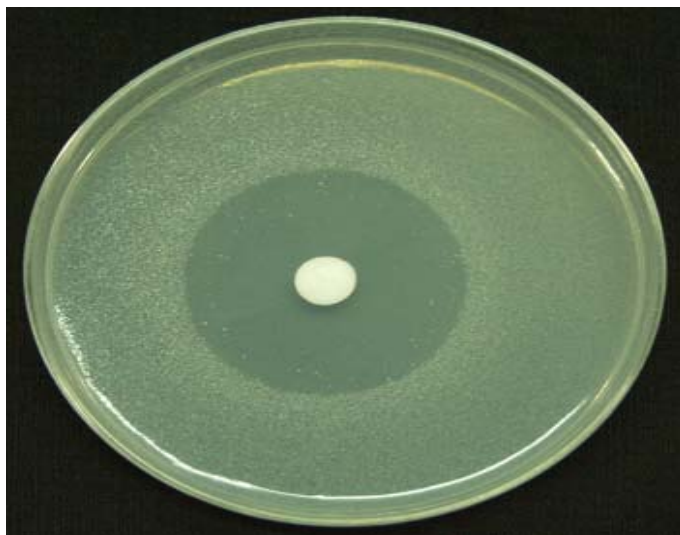


Fig. 4. Effect of 10mM β -hydroxynor valine for *S. cerevisiae*

다. *S. cerevisiae*에 대한 UV mutagenesis analogue 저항성 균주 screening

아미노산 analogue에 저항성을 갖는 효모 균주의 생성을 위해 본 실험에서는 UV 조사를 이용한 mutation method를 이용하였다. *S. cerevisiae* 균주를 1×10^7 cell/ml의 농도 (O.D=0.5)가 되도록 배양한 후 254nm의 UV 파장에서 200, 500J/m²으로 조사하였다. UV 조사된 효모 균주는 2mM fluorotryptophan이 포함된 배지에 spreading 하여 생존 균주를 선별하였으며 위의 실험의 control로써 UV가 조사되지 않은 wild type의 효모 균주를 비교 실험하였다.

실험 결과 각각의 UV 조사에 의해 2mM fluorotryptophan이 포함된 배지에서 생육이 가능한 colony를 분리하였으며(Fig. 5), 이 colonies은 enriched medium인 YPD 배지와 minimal medium인 SD pro 배지에 각각 patch하여 성장속도를 비교하였다. 성장속도의 비교 결과, 두 배지에서 모두 성장속도가 빠른 균주를 선택하여 다음 실험에 이용하였다. Threonine analogue에 저항성을 갖는 효모 균주의 개발을 위해 tryptophan과 동일한 방법을 이용하였으며, 10mM β-hydroxynorvaline을 이용하여 screening했다.(Fig. 6) 실험결과 UV mutagenesis를 통해 tryptophan analogue에 저항성을 갖는 74개의 균주를 분리하였으며 threonine analogue에 저항성을 갖는 70개의 균주를 분리하였다. 또한 이들 균주의 두 배지에서의 성장속도의 비교를 통하여 64개의 tryptophan analogue 저항성 균주를 선정하였으며 31개의 threonine analogue 저항성 균주를 선정하였다.

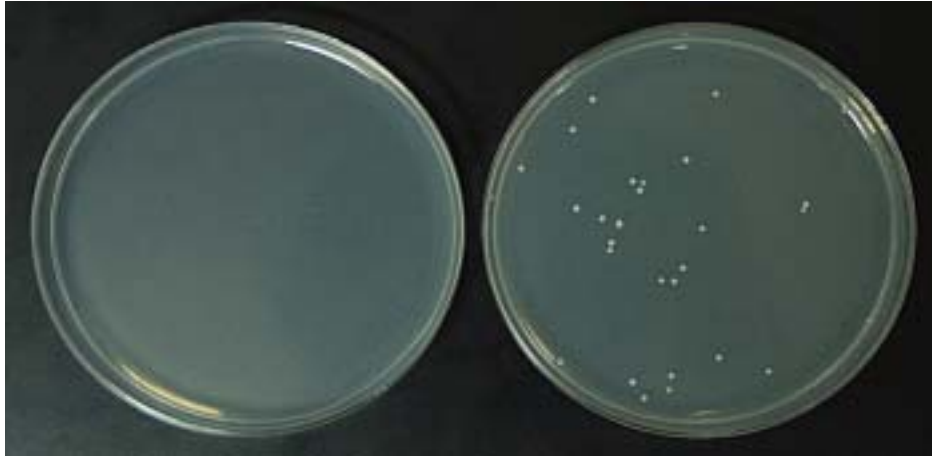


Fig 5. Tryptophan analogue resistant mutant at 2mM fluorotryptophan Left : wild type, Right : mutant

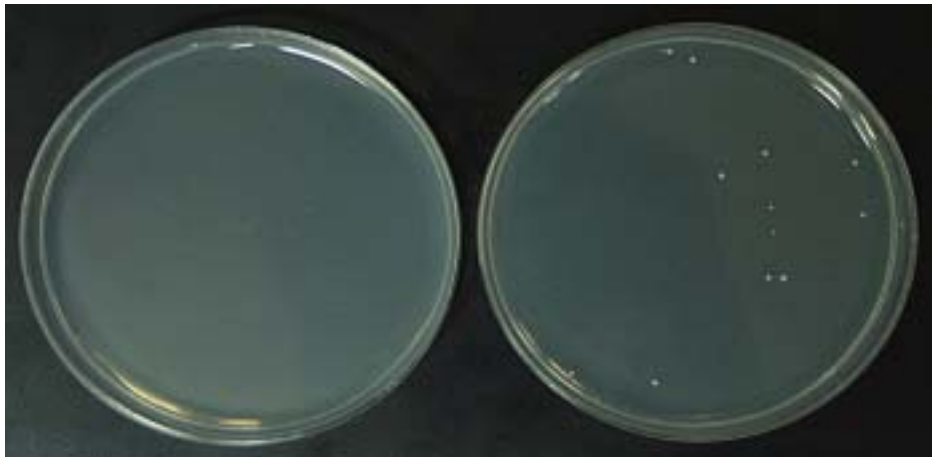


Fig. 6. Threonine analogue resistant mutant at 10mM β -hydroxynorvalin Left : wild type, Right : mutant

라. *S. cerevisiae*에 대한 amino acid analysis

분리된 균주로부터 생성되는 amino acid의 함량을 측정하기 위해 Pico-tag method를 이용하여 HPLC로 분석하였다. 균주의 전처리 과정으로 선택된 균주를 O.D가 1이 되도록 배양한 후 원심분리를 통해 pellet과 상등액을 분리하였고 상등액은 extracellular amino acid 함량을 측정하기 위해 동결건조 하였다. 분리된 pellet은 lysis buffer에 resuspend 한 후 동량의 glass bead를 넣어 강하게 vortexing하여 원심분리를 통하여 상등액을 취해 intracellular amino acid 함량을 측정하였다. 각각의 시료는 total amino acid 분석을 위해 24 시간동안 110℃, constant boiling HCl로 처리 후 분석하였으며, tryptophan의 함량을 분석하기 위한 전처리 과정으로는 methanesulfonic acid를 사용하였다.

Tryptophan analogue 저항성 균주인 W5-35와 wild type의 세포내 total amino acid 함량에 대한 tryptophan 함량을 측정해 본 결과 wild type의 0.081%에 비해 약 27%가 높은 0.103%의 함량을 나타냈으며 이 균주의 세포 배양액을 wild type과 비교한 결과 wild type의 0.43% 보다 72%가 높은 0.74%의 tryptophan 함량을 가진 것으로 나타났다. 또한 threonine analogue 저항성 균주인 TC5-1균주를 비교 실험한 결과 세포내 threonine 함량에서는 wild type에 비해 약 12.7%의 증가를 보여 차이가 크지 않았으나 세포 배양액에 있어서 wild type의 threonine 함량 6.07%보다 약 66%가 높은 10.08%의 threonine 함량을 가진 것으로 나타났다. (Table 8)

Table 8. Ration of Trp and Thr content against total amino acid contents of wild type and mutant

Strains	Intracellular		Extracellular	
	Trp (%)	Thr (%)	Trp (%)	Thr (%)
Wild type	100	100	100	100
Trp mutant(W5-35)	127	-	172	-
Thr mutant(TC5-1)	-	112	-	166

마. Tryptophan analogue에 대한 TC5-1의 MIC (minimal inhibitory concentration) test 를 통해 최적 analogue concentration 선정 및 screening

1차년도 실험결과 Trp, Thr over-production mutant로 선정된 W5-35와 TC5-1중 amino acid 함량이 높은 TC5-1을 복합 저항성 균주 개발에 이용하기로 했다.

1차년도 실험결과 wild type의 경우 fluorotryptophan은 2 mM의 농도에서 screening을 실시하였으나 2차 년도에서는 선정된 균주가 mutant인 관계로 MIC test를 다시 실시하였다. 균주의 생육 저지대를 측정하기 위해 disk diffusion test를 이용하였다. 선정 균주를 1% 접종한 top agar (0.75%) plate에 paper disk를 overlaid한 후, 각기 다른 농도의 analogue를 30 μ l씩 loading하여 32 $^{\circ}$ C에서 배양한 후 생육 저지대를 관찰하였다.

Tryptophan analogue에 대한 균주의 sensitivity 측정 결과, 0.1 mM fluorotryptophan의 농도에서부터 생육 저지대가 관찰되었다(Fig. 7). 따라서 본 실험에서 tryptophan analogue 저항성 균주의 screening은 MIC 농도보다 높은 농도인 2.5 mM fluorotryptophan을 이용하였으며 이 농도에서 선정 균주는 뚜렷한 생육저지대가 나타났다 (Fig. 8).

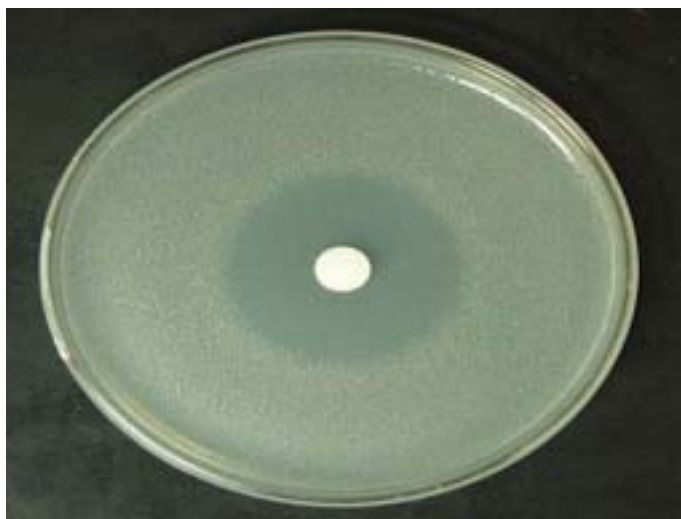


Fig 7. Effect of 2 mM fluorotryptophan on the growth of TC5-1 mutant

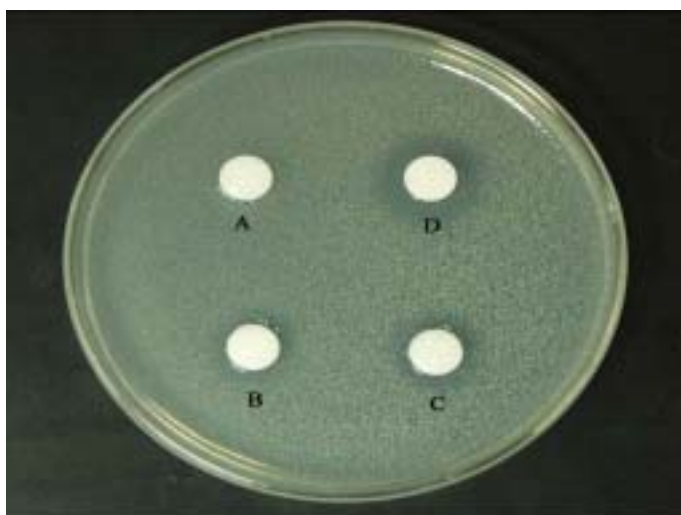


Fig. 8. Minimum inhibitory concentration of fluorotryptophan against TC5-1 (A ; control, B ; 0.1 mM, C ; 0.15 mM, D ; 0.2mM)

바. Tryptophan analogue에 대한 TC5-1의 Ethylmethane-sulfonate(EMS) mutagenesis

Mutagenesis 방법에는 ultraviolet(UV) light와 chemical(ethylmethane-sulfonate(EMS), nitrosoguanidine) mutagenesis 방법이 있다. 1차 년도에서는 UV mutagenesis 방법을 이용하여 mutant를 얻었다. UV mutagenesis 방법의 장점은 chemical mutagen보다 사용하기 간편하고 위해요소가 적다는 점이며 많은 유형의 mutation이 일어날 수 있다는 점이다. 1차년도 실험 결과 선정된 TC5-1를 가지고 UV mutagenesis 결과 mutant를 얻을 수 없었다. 그 이유는 이 방법을 사용하여 mutation 시켰을 경우 본 연구에서 원하는 mutation이외에도 다른 mutation이 일어나 analogue plate에서 colony가 생성되지 않은 것이다. 이번 2차 년도에는 chemical mutagen인 Ethylmethane-sulfonate(EMS) mutagenesis 방법을 실시하였다.

1) TC5-1의 EMS mutagenesis 및 analogue 저항성 균주 screening

TC 5-1 균주를 $OD_{600} = 0.8 \sim 1.0$ 정도 되도록 배양하고 3,000 rpm에서 15 min간 원심분리 한 후 멸균된 3차 증류수로 3번 washing하였다. 최종 washing이 끝나면 3차 증류수로 resuspending하여 EMS 5% 로 15분간 반응시키고 10% sodium thiosulfate를 넣어 반응을 정지하였다. 반응이 정지된 실험구를 원심분리하여 상등액을 버리고 3차 증류수로 2번 washing하고 생성된 mutant를 2.5 mM fluorotryptophan analogue 배지에 spreading하였다.

EMS 처리된 균주는 2.5 mM fluorotryptophan이 포함된 SD-proline 배지에 spreading하여 analogue 저항성 균주를 선별하였다. 본 실험의 control로써 EMS 처리가 되지 않은 균주를 비교 실험하였다. Analogue가 포함된 배지에서 생육이 가능한 colony를 분리하였으며(Fig. 9), 분리된 8개의 colonies은 enriched medium인 YPD 배지와 minimal medium인 SD-proline 배지에 각각 patch하여 성장속도를 비교하였다. 성장속도의 비교 결과, 두 배지에서 모두 성장속도가 빠른 균주를 선택하여 amino acid analysis를 통하여 over-producing 여부를 판정하였다.



Fig 9. Tryptophan analogue resistant mutant at 2.5 mM fluorotryptophan Left : wild type, Right : mutant

사. Tryptophan analogue에 대한 TC5-1의 EMS mutagenesis analogue 저항성 균주 screening된 mutant의 tryptophan, threonine 함량 측정

1) 선정된 균주의 amino acid analysis 정량법

선정된 8개의 복합 저항성 균주로부터 생성되는 amino acid의 함량을 Pico-tag detection method을 이용하여 HPLC로 분석하였다. 순수한 20개 아미노산을 이용하여 standard를 만들어 Thr, Trp의 retention time을 측정하였다 (Fig. 10). Analogue plate에서 1차적으로 screening 된 8개의 mutant들은 HPLC로 아미노산 분석을 통해 다시 2차적으로 screening 되었으며 Trp, Thr의 함량 분석 결과는 Table 9와 같다. 8개의 EMS mutant 중 wild type에 비해 Trp, Thr의 함량이 모두 높은 TC6-1, TC6-3, TC6-5을 3개의 최종 candidates로 선정하였고 실험의 재현성을 위해 3회 반복 실험하였다. Fig. 11은 wild type의 intracellular amino acid의 분획 결과이며 Fig. 12는 3개의 mutant 중 가장 Trp, Thr의 함량이 높은 TC6-1의 분획 결과이다.

Table 9. The amount of Trp, Thr of produced by the wild type and mutants.

(unit : $\mu\text{g}/\text{DCW}_{\text{mg}}$)

Cell	cell 10 μg 당 peak면적	
	Threonine	Tryptophan
s.7964	45672	75982
TC 6-1	188168	132968
TC 6-2	38390	29888
TC 6-3	79810	206990
TC 6-4	45936	100382
TC 6-5	125870	110194
TC 6-6	54796	176534
TC 6-7	97532	154068
TC 6-8	45340	101222

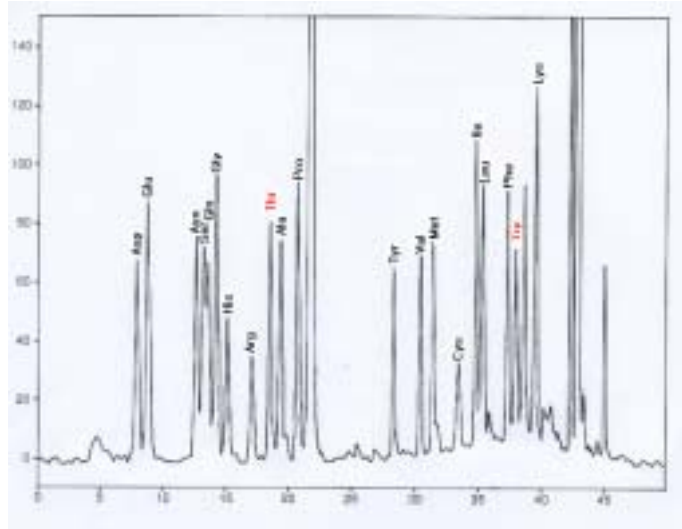


Fig 10. HPLC chromatogram of 20 amino acids using Pico-tag column

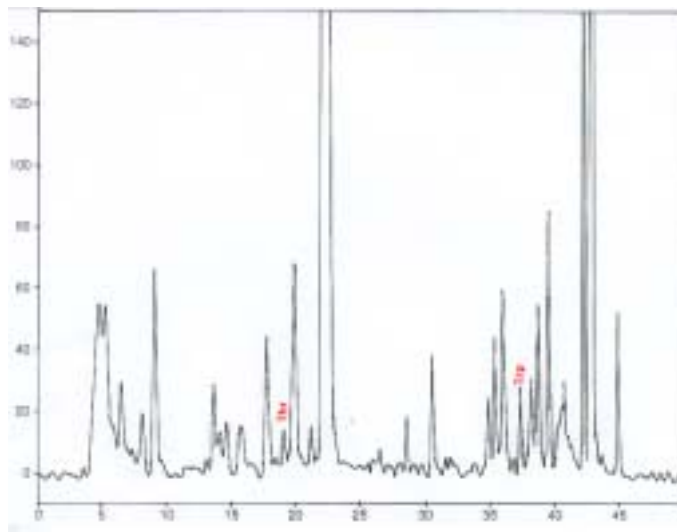


Fig 11. HPLC chromatogram of the wild type

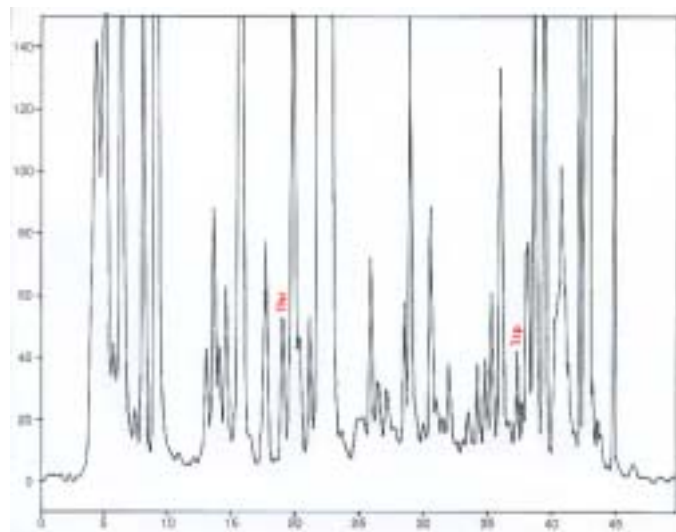


Fig 12. HPLC chromatogram of TC 6-1 selected

2) 선정된 균주의 amino acid 분석

선정된 균주는 O.D가 1이 되도록 배양한 후 원심분리를 통해 pellet과 상등액을 분리하였고 분리된 pellet은 lysis buffer에 resuspend 한 후 동량의 glass bead를 넣어 bead beater로 lysis 하여 intracellular amino acid 함량을 측정하였다. 각각의 시료는 total amino acid 분석을 위해 24시간동안 110℃에서 6N HCl로 hydrolysis 하여 분석하였으며, tryptophan의 함량을 분석하기 위한 전처리 과정으로는 methanesulfonic acid를 사용하였다. 복합 저항성 균주로서 개발된 mutant와 wild type의 intracellular 및 yeast culture total amino acid에 대한 Trp, Thr의 함량 분석 결과는 Table 10과 같다.

Mutagenesis에 의해 selected mutant cell은 intracellular accumulation이 주로 이루어졌음을 알 수 있었으며 결과적으로 Thr이 Trp보다 효과적으로 overproduce 함을 알 수 있었다. 본 연구에서는 threonine, tryptophan 등 필수 아미노산을 overproducing하는 균주를 개발하여 특정 아미노산을 많이 함유, 또는 생산하는 개발된 균주로부터 이들 아미노산을 추출하지 않고 그대로 건조·가공하여 균체 자체를 사료에 이용하고자 하는 것이다. 따라서 개발된 균주는 아미노산의 대량생산에 그치는 것이 아니고 대량생산된 아미노산이 protein 생합성에 관여하여 균체자체의 Trp, Thr의 함량이 높아져야 한다. 현재까지 복합저항성 균주는 여러 가지 어려움으로 인해 개발된 적이 없었다. 본 연구에서 처음으로 시도되어 개발된 TC6-1은 tryptophan과 threonine이 intracellular에선 4.5배 정도 대량생산되었으며 harvested cell 자체로는 threonine은 TC5-1에 비해 20% overproduction 하였고 tryptophan은 많은 차이를 보이지 않았는데 그 이유는 yeast가 bacteria가 아닌 진핵세포이기 때문인 것으로 여겨진다.

Table 10. The amount of Trp, Thr produced by the wild type and TC 6-1.

(unit : $\mu\text{g}/\text{DCWmg}$)

	Intracellular accumulation in the cell		Harvested cell	
	Tryptophan	Threonine	Tryptophan	Threonine
Wild type	0.07	0.12	2.13	13.47
TC 6-1	0.13	0.58	2.13	15.88
Ratio of Mutant/Wild	1.94	4.69	1	1.17

2. *Candida* 석유효모에 대한 analogue 저항성 균주개발

가. *C. rugosa*에 대한 amino acid analogue의 minimum inhibitory concentration 측정 및 저항성 균주 screening method

균주의 생육 저지대를 측정하기 위해 *S. cerevisiae* 생육 저지대 측정방법과 동일한 방법인 disk diffusion test를 이용하였다. 선정된 균주를 3×10^6 cell/ml 농도로 접종한 top agar(0.7%) plate에 paper disk를 overlaid한 후, 각기 다른 농도의 analogue를 30 μ l씩 loading하여 25 $^{\circ}$ C에서 배양한 후 생육 저지대를 관찰하였다.

Tryptophan analogue에 대한 균주의 sensitivity 측정 결과, 0.1 mM fluorotryptophan의 농도에서부터 생육 저지대가 관찰되었다(Fig. 13). 따라서 본 실험에서 tryptophan analogue 저항성 균주의 screening은 MIC 농도보다 높은 농도인 2mM fluorotryptophan을 이용하였다.



Fig. 13 Minimum inhibitory concentration of fluorotryptophan against *Crugosa* (A ; control, B ; 0.015mM, C ; 0.025mM, D ; 0.05mM, E ; 0.1mM F; 0.2 mM, G; 0.25mM, H; 0.5mM, I; 5mM)

나. *C. rugosa*에 대한 Ethylmethane-sulfonate(EMS) mutagenesis 및 analogue 저항성 균주 screening

아미노산 analogue에 저항성을 갖는 효모 균주의 생성을 위해 본 실험에서는 EMS mutagenesis를 이용한 mutation method를 이용하였다. *C. rugosa* 균주를 1×10^7 cell/ml의 농도($O \cdot D=0.5$)가 되도록 배양한 후 3,000rpm에서 10min간 원심분리 한 후 멸균된 3차 증류수로 washing하였다. 최종 washing이 끝나면 멸균된 3차 증류수로 resuspending하여 EMS 3, 4, 5%로 10, 20, 30, 40min동안 반응 시킨 후 10% sodium thiosulfate를 넣어 반응을 정지하였다. 반응이 정지된 실험구를 원심분리 하여 상등액을 버리고 3차 증류수로 2번 washing하고 생성된 mutant를 2 mM fluorotryptophan analogue 배지에 spreading하였다. 실험 결과 EMS 4%, 반응시간 10min으로 EMS mutagenesis 조건을 확립하였다. 이 조건에서 *C. rugosa*를 EMS 처리하여 SD-proline 배지에 spreading 하여 analogue 저항성 균주를 선별하였다. 본 실험의 control로써 EMS 처리가 되지 않은 균주를 비교 실험하였다.

SD-proline 배지에서 자란 mutants 50개의 colony를 분리하였으며, 분리된 50개의 colonies은 enriched medium인 YPD 배지와 minimal medium인 SD-proline 배지에 각각 patch하여 성장속도를 비교하였다. 성장속도의 비교 결과, 두 배지에서 모두 성장속도가 빠른 균주를 선택하여 amino acid analysis를 통하여 over-producing 여부를 판정하였다.

다. *C. rugosa*에 대한 저항성 균주 screening에서 선정된 균주 amino acid analysis

1) 선정된 균주의 amino acid analysis 정량법

선정된 50개의 복합 저항성 균주로부터 생성되는 amino acid의 함량을 Pico-tag detection method을 이용하여 HPLC로 분석하였다. 순수한 20개 아미노산을 이용하여 standard를 만들어 Thr, Trp의 retention time을 측정하였다. 아미노산 standard는 Fig 10.과 같다. Analogue plate에서 1차적으로 screening 된 50개의 mutant들은 HPLC로 아미노산 분석을 통해 다시 2차적으로 screening 되었으며 Trp, Thr의 함량 분석 결과는 Table 10와 같다. 50개의 EMS mutant 중 wild type에 비해 Trp, Thr의 함량이 모두 높은 C3, C4, C11, C12를 candidates로 선정하여 반복 실험한 결과 EMS mutant들의 Trp, Thr의 함량 분석 결과는 Table 11와 같으며 그 결과 C3은 wild type에 비해 Thr, Trp은 각각 43.42%, 80.41%로 나타났으며 C4는 11.97%, 39.17%로 나타나 C4에 비해 C3 mutant가 Threonine과 Tryptophan함량이 높게 나와 이를 최종 candidates로 선정하였다. Fig. 14은 wild type의 amino acid의 분획 결과이며 C3, C4, C11, C12의 분획결과는 각각 Fig. 15, 16, 17, 18에 나타내었다. 이 중 Fig. 15은 4개의 mutant 중 가장 Trp, Thr의 함량이 높은 C3의 분획 결과로서 각각 80.41%, 43.42%의 증가를 보였다.

Table 10. The amount of Trp, Thr of produced by the wild type and mutants.

Strains	peak면적		Strains	peak면적	
	Threonine	Tryptophan		Threonine	Tryptophan
Control	226606	512638	C26	x	x
C1	320025	418724	C27	x	33421
C2	511771	373304	C28	619450	130037
C3	3163350	1144510	C29	426525	81565
C4	4523223	1425474	C30	594674	171560
C5	490703	375968	C31	271245	47981
C6	939471	460917	C32	471964	x
C7	777297	414671	C33	x	93999
C9	815220	514335	C34	x	67818
C10	554420	437917	C35	345331	x
C11	4779328	1149805	C36	414664	x
C12	5681836	1520470	C37	535023	x
C13	x	x	C38	557141	99244
C14	109465	137956	C39	525272	109492
C15	x	x	C40	586885	x
C16	187186	x	C41	325454	x
C17	64974	x	C42	369252	74911
C18	120708	x	C43	368066	x
C19	x	x	C44	388729	81768
C20	99631	x	C45	222000	128396
C21	x	x	C46	321828	55432
C22	x	x	C47	488715	105479
C23	x	x	C48	271744	x
C24	x	x	C49	x	x
C25	x	x	C50	249608	94628

Table 11. The amount of Trp, Thr of produced by the wild type and mutants.

Strains	peak면적		Trp (%)	Thr (%)
	Threonine	Tryptophan		
Wild type	4372296	1486305	100	100
C3	7887917	2131689	180.41	143.42
C4	6085133	1753358	139.17	117.97
C11	6245034	1551442	142.83	104.38
C12	4051969	1649043	92.67	110.95

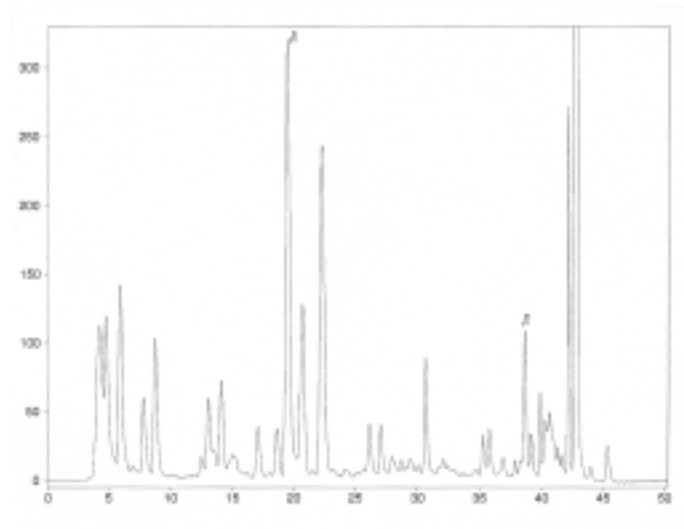


Fig 14. HPLC chromatogram of the wild type

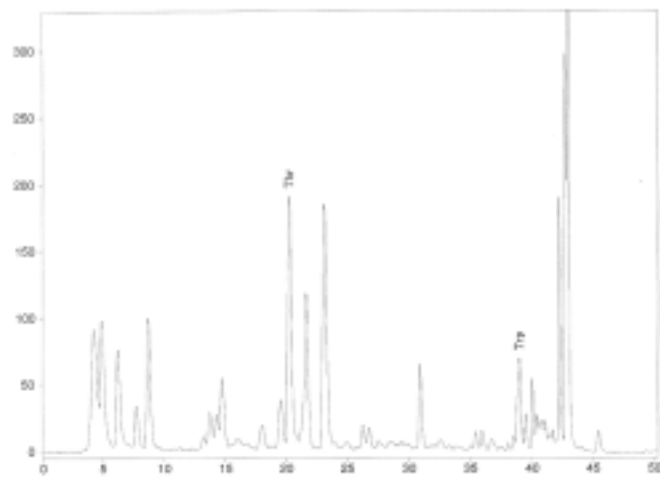


Fig 15. HPLC chromatogram of the C3

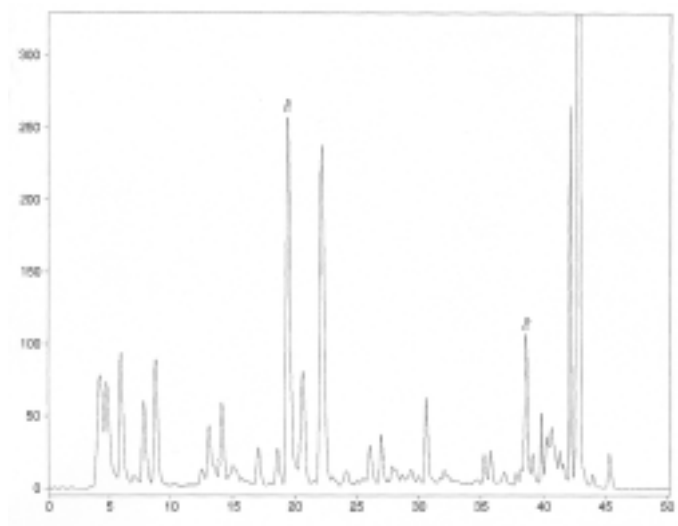


Fig 16. HPLC chromatogram of the C4

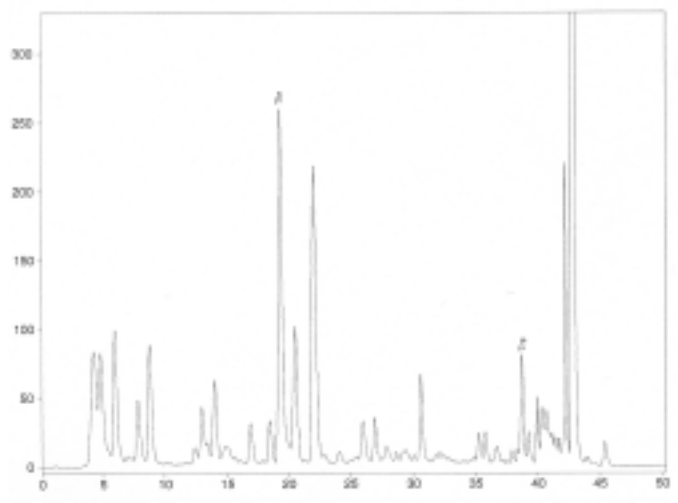


Fig 17. HPLC chromatogram of the C11

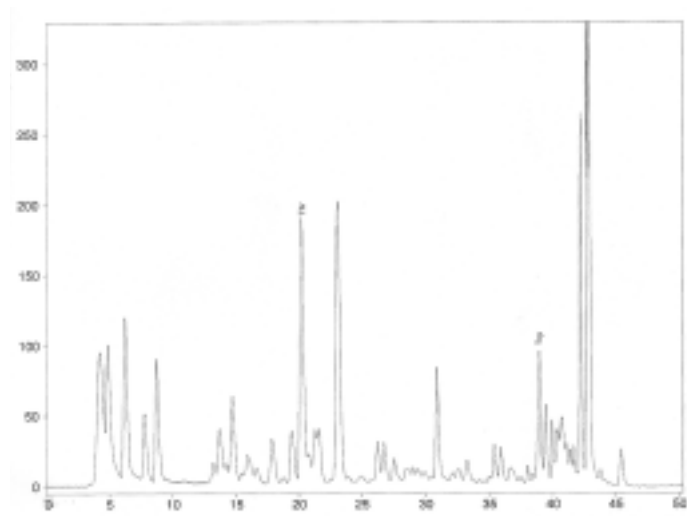


Fig 18. HPLC chromatogram of the C12

2) 선정된 균주의 amino acid 분석

선정된 균주 C3의 total amino acid 분석을 위해, 균주는 control과 함께 O.D가 1이 되도록 배양한 후 원심분리를 통해 pellet과 상등액을 분리하였고 분리된 pellet은 lysis buffer에 resuspend 한 후 동량의 glass bead를 넣어 bead beater로 lysis 하여 amino acid 함량을 측정하였다. 각각의 시료는 total amino acid 분석을 위해 24시간동안 110°C에서 6N HCl로 hydrolysis 하여 분석하였으며, tryptophan의 함량을 분석하기 위한 전처리 과정으로는 methanesulfonic acid를 사용하였다. 복합 저항성 균주로서 개발된 mutant와 wild type의 yeast culture total amino acid에 대한 Trp, Thr의 함량 분석 결과는 Table 12과 같다.

본 연구에서 개발된 C3는 intracellular에서는 Tryptophan과 Threonine이 Wild type에 비해 각각 1.4배, 2배 정도 높게 생산되었으며, harvested cell에서는 Tryptophan이 1.6배, Threonine이 2배 정도 높게 overproduction된 것으로 나타났다. 따라서 Mutagenesis에 의해 Thr이 Trp보다 효과적으로 overproduce 함을 알 수 있었다.

본 연구에서는 threonine, tryptophan 등 필수 아미노산을 overproducing하는 균주를 개발하여 특정 아미노산을 많이 함유, 또는 생산하는 개발된 균주로부터 이들 아미노산을 추출하지 않고 그대로 건조·가공하여 균체 자체를 사료에 이용하고자 하는 것이다. 따라서 개발된 균주는 아미노산의 대량생산에 그치는 것이 아니고 대량생산된 아미노산이 protein 생합성에 관여하여 균체자체의 Trp, Thr의 함량이 높아져야 한다.

Table 12. The amount of Trp, Thr produced by the wild type and C3

(unit : $\mu\text{g}/\text{cell culture ml}$)

	Intracellular accumulation in the cell		Harvested cell	
	Tryptophan	Threonine	Tryptophan	Threonine
Wild type	7.28×10^{-2}	9.45×10^{-2}	1.51×10^{-1}	2.42×10^{-1}
C3	9.9×10^{-2}	19.99×10^{-2}	2.35×10^{-1}	4.85×10^{-1}

3. Plasmid를 이용한 고 아미노산 균주 확보

가. 균주 및 Vector 의 선정

특정 아미노산을 overproduction하는 미생물로 이미 안전성이 확보된 대표적인 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하였다. 산업적 생산에 직접 적용하기 위하여 산업적으로 생산되는 조흥화학의 균주와 실험용으로 YC500균주 (*trp⁻*, *leu⁻*, *ura⁻*, *his⁻*)를 이용하였다. 유전자 조작을 위한 plasmid 생산균주로는 대장균 DH5 α 를 이용하였다.

본 연구에서는 연구에 소요되는 기간을 줄이기 위하여 직접적으로 유전자 vector를 제조하는 것보다는 기존에 개발되어 상업적으로 구매할 수 있는 것을 이용하였다. 따라서 사용된 vector는 Stratagene의 pESC vector를 이용하였다. 이 vector는 효모 *S. cerevisiae*에서 단백질 발현에 이용되는 vector라 본과제에서 이용하기 적합한 것으로 사료되어 이를 이용하였다.

나. 고아미노산 생산 plasmid의 제조

Tryptophan과 threonine의 10반복 sequence를 갖는 36-44 bp DNA를 Genotech에 합성을 의뢰하여 제조하였다. 이의 sequence는 다음과 같다.

A: GATC ATG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TAA
GGCC
B: TTA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CAT
C: GATC ATG ACT ACT ACT ACT ACT ACT ACT ACT ACT TAA
GGCC
D: TTA AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT CAT
E: GATCC ATG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TAA G
F: GATCC TTA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CAT G

합성된 DNA를 A와 B, C와 D, E와 F를 1:1로 섞어 annealing를 시도하였으나 이들을 이용한 insertion이 되지 않는 것으로 보아 annealing 이 일반적인 조건에서 이루어지지 않는 것으로 파악되었다. 따라서 대부분의 annealing을 이루는 taq polymerase buffer에서 95 $^{\circ}$ C에서 annealing을 한 결과 이들의 size가 작아서 다시 회수하기가 곤란하였다. 따라서 최종적인 annealing 조건은 TE buffer에서 95 $^{\circ}$ C에서 행하였다.

아래에 나타낸 그림처럼 anealing 된 insert sequence를 BamHI과 ApaI enzymes를 이용하여 ligation 시켰다.

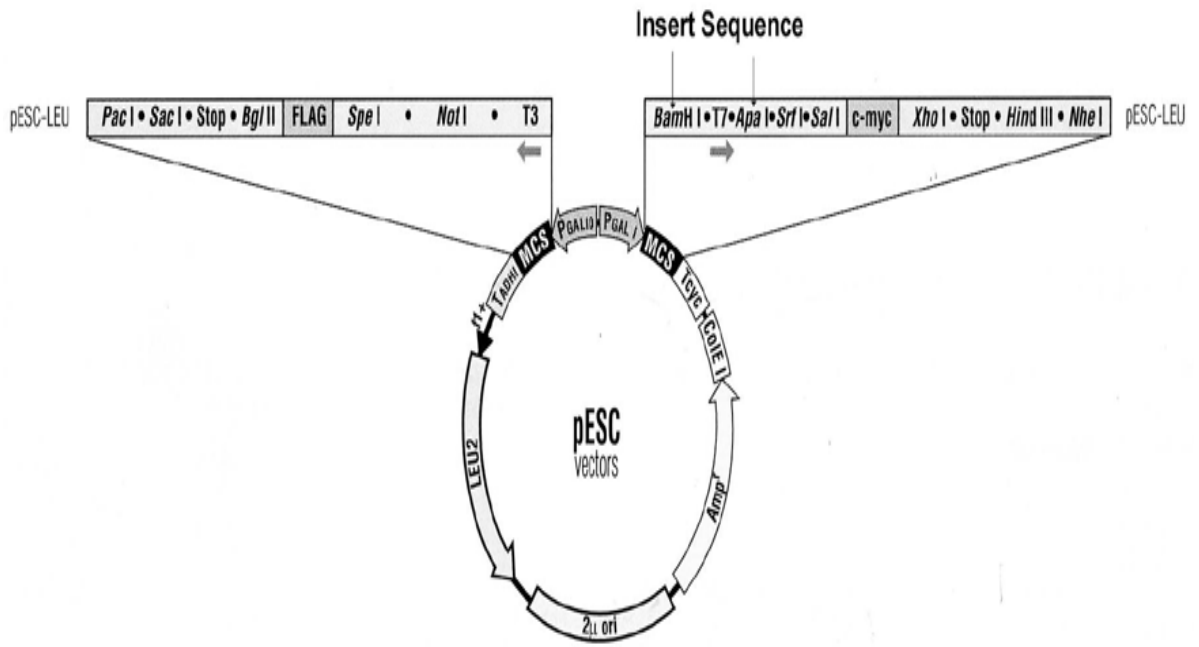


Fig 19. BamHI과 ApaI enzymes를 이용한 insert sequence의 ligation

다. 발현 peptide의 측정

발현 peptide는 Tricine gel을 이용하여 측정하였다. Tryptophan과 Threonine의 10반복 sequence를 갖는 36-44 bp의 합성 DNA를 Vector pESC-LEU에 insertion시킨 plasmid를 *S. cerevisiae*에 transformation시킨 후 cell을 배양하였다. 배양된 cell은 lysis시킨 것을 1/10로 dilution시켜 Tricine gel에 loading하여 size marker를 이용 poly-tryptophan MW (2111)와 poly-threonine MW (1160)에서 band들의 존재를 확인하였다. 각각의 marker size와 band들은 다음의 그림에 나타내었다.

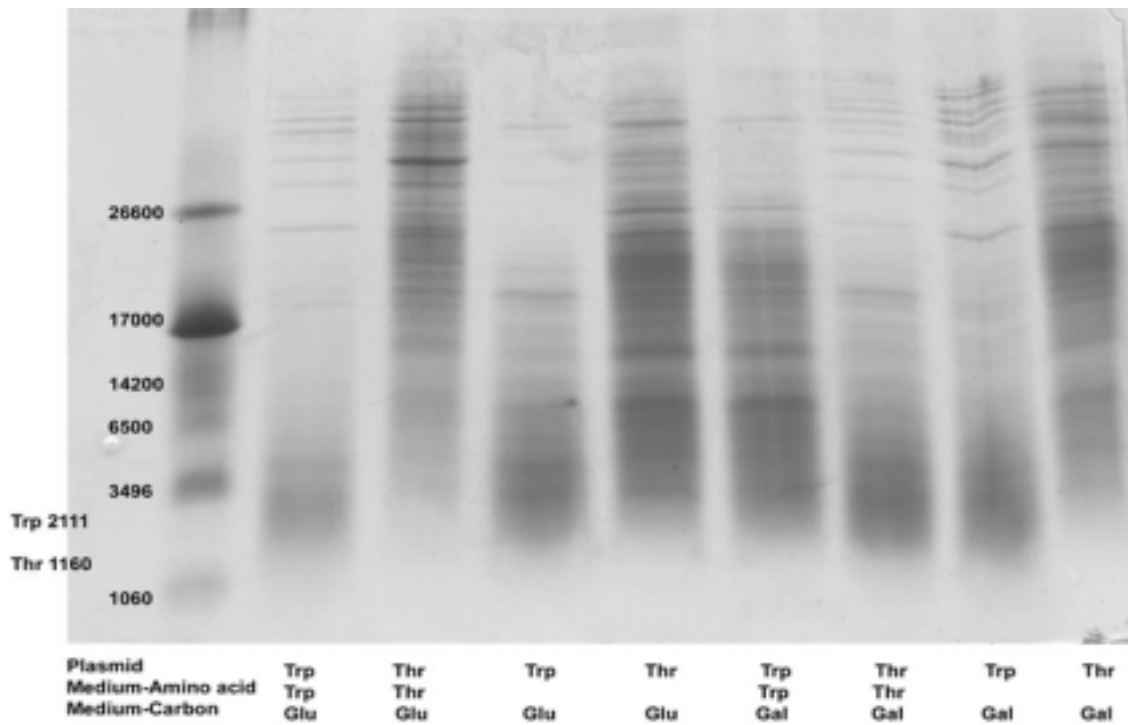


Fig 20. poly-tryptophan MW (2111)와 poly-threonine MW (1160)에서 각각의 marker size와 band

라. Peptide 발현 시 생성되는 Amino acid의 분석

발현된 peptide에 의하여 증대된 Tryptophan, Threonine 함량을 분석하기 위하여 세포내 총 아미노산의 성분을 분석하였다. 시료 20 μ l를 취하여 PICO-tag 방법을 이용하여 hydrolysis 및 PITC labeling을 실시하여 PITC labeling 된 시료 400 μ l 중에서 10 μ l를 취하여 HPLC에 loading 하여 chromatogram을 얻었다. Chromatogram 상에서 나타난 peak의 함은 original sample의 0.5 μ l에 해당하였다.

사용된 HPLC system은 Waters 510 model을 이용하였고 detection system은 Waters 996 photodiode array detector를 이용 254nm에서 측정하였다. 사용된 column은 Waters Pico-tag column (3.9 \times 300mm, 4 μ m)을 이었다. HPLC gradient 조건은 다음의 표와 같다.

Table 13. HPLC gradient 조건

Time	Flow	%A	%B
Initial	1.0	100	0
9.0	1.0	86	14
9.2	1.0	80	20
17.5	1.0	54	46
17.7	1.0	0	100
18.2	1.0	0	100
20.0	1.0	0	100
20.7	1.0	0	100
21.0	1.0	100	0
24.0	1.0	100	0
25.0	1.0	100	0

* %A: 140 mM sodium acetate (6% acetonitrile)

%B: 60% acetonitrile

시료의 전처리를 위하여 Tryptophan은 hydrolysis법을 이용하였고, Threonine은 general amino acid analysis법을 이용하여 분석하였다. 아래의 표에 나타낸 바와 같이 Threonine의 경우 Carbon source가 glucose일 때 (promotor의 activation 없음) Threonine의 생성량이 yeast 균체에 비하여 2.7% 이었으나 galactose를 첨가하여 promotor를 activation 시켰을 때는 Threonine의 생성량이 4.6%를 기록하여 대략 70%의 증가량을 보였으나, Tryptophan의 경우 Carbon source의 차이에 따른 생성량 증가를 보이지 않았다. 이는 Tryptophan의 경우 사용된 균주가 tryptophan auxotroph이기 때문으로 사료된다.

Table 14. Carbon source에 따른 Yeast의 Amino acid의 함량(%)

Insert in Plasmid	Trp	Thr	Trp	Thr
Medium에 첨가된 Amino acid	Trp	Thr	Trp	Thr
Medium에 첨가된 carbon	Glucose	Glucose	Galactose	Galactose
	% Amino Acid/Yeast			
Cys	0.2	0.2	0.2	0.2
Asp	2.8	2.7	3.5	3.5
Glu	5.2	5.8	7.0	6.7
Ser	1.3	1.1	1.6	1.5
Gly	1.5	1.4	1.9	1.9
His	0.8	0.7	1.1	1.0
Arg	2.6	2.8	2.3	2.2
Thr	2.9	2.7	3.7	4.6
Ala	2.4	1.9	2.7	2.3
Pro	2.2	1.9	2.6	2.3
Tyr	0.8	0.6	0.9	0.8
Val	1.7	1.4	2.0	1.8
Met	0.6	0.6	0.7	0.6
Cys2	0.0	0.0	0.0	0.0
Ile	1.4	1.1	1.8	1.5
Leu	1.8	1.4	2.2	1.9
Phe	1.2	0.8	1.3	1.1
Trp	0.1	0.0	0.1	0.0
Lys	1.4	1.0	1.6	1.5
합계	30.9	28.1	37.4	35.3

마. copy number 와 insert의 size에 따른 Amino acid 의 생산

Insert concatamer를 제작하기 위하여 다음의 DNA를 합성하였다.

- ① Thr : 5'-Phosphate-ACT ACC ACA ACG-3'
- ② Thr anticodon : 5'-Phosphate-GGT AGT CGT TGT-3'
- ③ cStart codon : 5'-Phosphate-GGT AGT CAT GGA TCC-3'
- ④ cStop codon : 5'-GTC GAC TTA CGT TGT-3'
- ⑤ BamH I sequence : 5'-GGA TCC-3'

이 중 1과 2를 이용 ligation하여 보다 큰 size를 제작하였다. 이를 PCR로 증폭시켜 실험에 이용한 결과 이들 plasmid로부터 합성되는 peptide 가 E. coli 및 S. cerevisiae에서 독성을 보이는 것으로 사료된다. 이들을 이용한 E. coli 및 S. cerevisiae transformant를 구할 수 없을 뿐 아니라 앞에서 제작한 plasmid를 가진 transformant의 성장이 매우 느려졌기 때문이다. 현재의 가정은 이들 peptide가 미생물에 독성을 갖거나 또는 threonine 또는 tryptophan의 사용이 크기 때문에 세포내 이들 아미노산의 pool 이 작아져 성장이 늦어지거나 아예 자라지 못하는 것으로 사료된다.

따라서 본 과제에서는 plasmid를 이용한 고아미노산 생산균주에 대한 실험은 기존에 위에서 제작된 transformant를 이용하여 실험하였다.

3절. 생산된 고 아미노산 생산 균주의 배양연구

효모는 곰팡이나 버섯 무리이지만 균사가 없고, 광합성능이나 운동성도 가지지 않는 단세포 생물을 말하며, 대부분 토양 속에 살지 않으며 꽃의 꿀샘이나 과실의 표면과 같은 당농도가 높은 곳에 많이 생육하고 있다. 이러한 효모는 산업적으로 가장 널리 이용되고 있는 균주 중의 하나이다.

효모의 세포벽은 주로 glucan과 mannan으로 그 밖의 지질 단백질과 소량의 키틴질을 함유한다. 세포 내에는 핵, 미토콘드리아, 액포, 글리코겐 과립을 가지며, 발효뿐 아니라 호흡능도 좋으며 다량의 RNA를 함유하며 1967년 전까지 전 구조가 결정된 5종의 tRNA는 모두 효모에서 유래한 것이어서 분자유전학의 진전에 큰 기여를 하고 있다.

성의 구별이 없는 이들은 주로 budding(출아법)으로 번식하는데, 분리된 많은 효모들 중에는 발효능이 없는 것, budding 대신 fission(분열) 혹은 bud-fission 방법으로 증식하는 것, ascospore(자낭포자)가 아닌 ballistospore를 형성하거나 spore(포자)형성이 관찰되지 않는 것 등 다양한 그룹의 효모도 존재한다

효모는 응용미생물학상 극히 중요한 미생물군으로서 당을 발효시켜 에탄올(C_2H_5OH)과 이산화탄소(CO_2)를 생산하는 능력을 가진 것이 많으며 이것은 맥주의 제조나 빵의 발효에 이용된다. 이밖에 효모를 이용하는 기술로는 식품음료 및 값싼 지방·단백질 원료 사료에 사용될 뿐만 아니라 효모 세포 자체를 보강하거나 변형시켜 추출물을 얻어내는 등 다양하게 응용되었다. 효모로부터 얻을 수 있는 산물로는 영양보강제, 풍미성분, 효소, 핵산, 단백질, 탄수화물(다당류) 등을 들 수 있다 (太田 靜行.1992, 杉本 洋.1994). 또한 당질원료 및 탄화수소를 탄소원으로 하여 잘 생육할 수 있는 효모도 있어서 주목을 받고 있다. 그러나 한편으로는 양조식품 등에 유해한 효모와 병원성을 갖는 효모도 알려지고 있다. 자연계에서 우수한 성질을 갖는 효모를 분리한 후, 목적에 맞게 순수분리하여 계대배양 한 것을 배양효모(culture yeasts)라 하며 맥주효모, 청주효모, 빵효모 등이 이에 속한다.

효모는 호기성 및 통성혐기성균으로 혐기·호기적인 양 조건하에서 생육할 수 있다. 혐기적인 조건하에서는 알코올 발효를 하게 되며 호기적인 조건하에서는 당류를 완전히 산화분해하기 때문에 혐기적 발효보다 10배 이상의 자유에너지를 획득 할 수 있다.

분류학자에 의해 보고된 바 있는 349종의 효모 (Lodder, J. 1970) 중에서 경제적인 중요성을 갖는 균주는 극히 제한되어 있는데, 그 중 흔히 사용되고 있는 균주와 이용공정 및 해당산물을 Table 15에 요약하였다.

효모 중에서도 *Saccharomyces cerevisiae*의 다양한 균주가 주로 사용되는데, 그 이유는 평균보다 높은 수준에서 GRAS(Generally Recognized As Safe)를 받았기 때문이다. 그러나 wild type 효모의 경우 생산량이 적기 때문에 대부분 돌연변이주를 사용한다 (Maria-jose Fafan. 1999).

*Saccharomyces cerevisiae*의 균주는 식품 발효나 음료 생산에 널리 이용되고 있으며,

Saccharomyces uvarum 혹은 *Saccharomyces carlsbergensis*의 균주가 맥주 발효에 사용되며, 단백질 생합성에는 탄화수소 배지에서 생육하는 *Candida utilis*가 보다 많이 이용되는 경향이 있다.

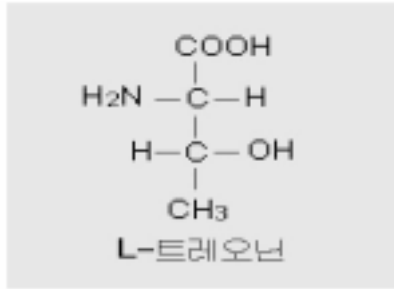
효모가 생산하는 산물 중에서 아미노산은 단백질의 구성성분을 이루고 있는 필수 영양소이며 맛, 생리학적 활성 그리고 화학적인 특성 등의 영양학적 가치가 높아 산업적으로 널리 이용되고 주로 의약품, 식품 및 사료첨가제로서 사용되고 있다. 아미노산의 산업적 가치는 식품의 측면에서 40%, 영양 공급적 측면에서 50%, 의약품·화장품, 화학 산업적 측면이 10%에 이른다.

아미노산 중에서도 threonine (Fig. 10-a)은 발육, 성장, 체중유지, 체지방유지, 혈구성분 조성, 유즙분비 등에 중요한 역할을 하는 필수아미노산의 하나로서, 주사제, 동물의 사료첨가제, 항생제(예, Azthreonam)의 원료로 이용되고 있으나 공급이 수요에 못 미치고 있는 실정이다. 이에 threonine의 생산효율을 높이기 위한 여러 가지 방법에 관한 연구가 진행되고 있다 (김경자. 1993, Kim, Cheon-Gyu. 1994, Lubert stryer. 1999). 또한 tryptophan (Fig. 10-b)은 무취이며, 약간의 쓴맛을 갖는 황백색의 물질로서 필수아미노산 중의 하나이며 threonine과 마찬가지로 의약품 및 사료첨가제로 용도가 매우 넓은데 반하여 고가이기 때문에 경제적인 트립토판 생산공정이 요구되고 있다 (Chung, Nam-Hynn. 1986, Lee, In-Young. 1992).

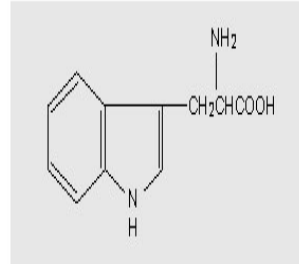
본 연구는 가축의 사료첨가제로 사용되는 단세포 아미노산들 중에서 중요한 성분인 threonine과 tryptophan 함유량을 증가시킨 효모를 개발하여 단세포 단백질로서의 양질의 사료원료를 개발하기 위함이며, 단세포 단백질원으로서의 효모 균주 중에서 *Saccharomyces cerevisiae* YPH500, Trp, Thr 세 균주를 이용하여 생육환경의 최적화를 통해 일정 발효기간 내에 최대의 균체 생산량을 얻도록 발효조건을 결정하고 최종적으로 생산된 효모균주의 아미노산 함량을 분석 비교한다.

Table 15. Major industrial yeasts and their usage

Yeast Species	Products / Applications
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bread-type products, beer brewing, wine making, distilled beverages, ethanol, cider, food yeast, feed yeast, yeast-derived products (autolysates, hydrolysates, protein, biochemicals), invertase
<i>Saccharomyces uvarum</i> (syn. <i>S. carlsbergensis</i>)	Beer brewing
<i>Saccharomyces sake</i>	Sake brewing
<i>Saccharomyces bayanus</i>	Sparkling wines
<i>Saccharomyces lactis</i>	Lactase
<i>Kluyveromyces fragilis</i> (syn. <i>S. fragilis</i>)	Food yeast, feed yeast, ethanol
<i>Candida utilis</i>	Food yeast, nucleic acids, feed yeast
<i>Candida tropicalis</i>	Food yeast, feed yeast
<i>Candida pseudotropicalis</i>	Food yeast, feed yeast
<i>Candida lipolytica</i>	Feed yeast



(a)



(b)

Fig. 21. Threonine (a) and Tryptophan structure (b)

1. *S. cerevisiae*의 threonine과 tryptophan analogue 저항성 균주, TC5-1과 TC6-1의 생육 특성 연구

새로운 배지 위에 미생물이 접종되어지면 미생물의 성장형태는 일반적으로 유도기 (Lag phase), 대수기 (Exponential phase), 정상기 (Stationary phase), 사멸기 (Death phase)의 4 단계로 나뉘어진다. 성장의 첫 단계인 지체기(lag phase)는 세포가 새로운 환경에 적응하는 기간이다. 보통 지체기의 세포는 크기가 매우 작고 분열은 아직 시작하지 않고 있다. 대수기 (exponential phase)는 대부분의 세포가 성숙한 크기에 이르고 분열을 개시하게 될 시점으로 부터 시작된다. 이즈음에서 개체군의 폭발적인 증식이 시작되어지며 이 단계에서 1차 대사 산물인 Thr, Trp이 생성되는 것으로 생각된다. Fig. 13.에서 볼 수 있듯이 wild type인 S7964는 36 hr, mutant TC 5-1은 42 hr, 복합 저항성 균주인 TC6-1은 54hr 만에 정지기에 도달했다. UV와 EMS에 의해 cell이 mutation되면서 점차 대수기가 길어졌는데 이로 인해서 cell의 내부에 Thr, Trp을 accumulation할 수 있는 기간이 더 길어졌기 때문인 것으로 사료되며 wild type에 비해 TC 6-1은 4.5배 높은 intracellular accumulation이 이루어졌음을 알 수 있었다.

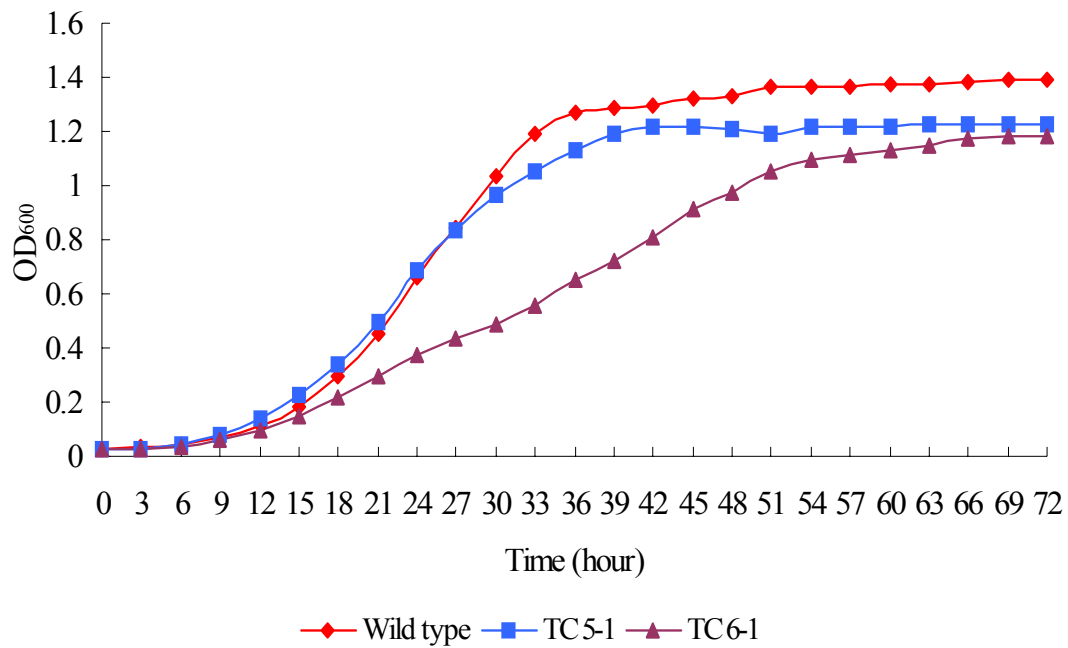


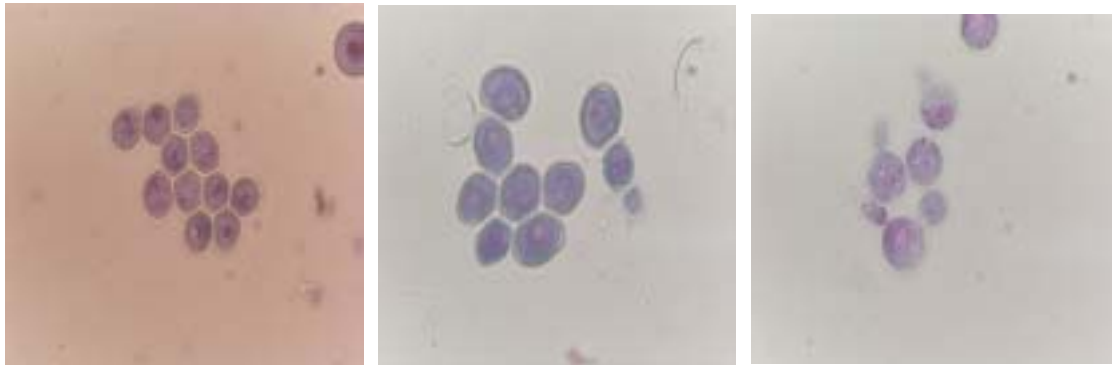
Fig. 22. Growth curve of the wild type strain and the mutants

2. *S. cerevisiae* 의 plasmid를 이용한 transformants의 배양연구

가. *S. cerevisiae* 세 균주의 형태적 특성

효모의 형태는 종류에 따라 다르고 같은 효모일지라도 배양조건이나 시기, 세포의 나이, 세포의 영양상태 등에 따라 다르게 나타난다.

S. cerevisiae 세 균주의 경우에는 일반 세균에 비하여 크기가 훨씬 큰 것을 알 수가 있다(Fig. 11). 그리고 위 그림에도 나와 있듯이 세 균주 모두 약간 계란형임을 알 수 있다. 이로 보아서 이 세 균주는 모두 맥주효모와 빵효모, 청주효모 등과 유사한 모양을 갖고 있다. 그리고 Fig. 11 에서도 볼 수 있듯이 특이한 것은 YPH500, Thr 균주와 Trp의 차이점은 콜로니 색이다. Trp은 나머지 두 균주와는 다르게 붉은 색의 콜로니를 띄고 있다. 또한 이들은 성장동안 성숙된 세포의 표면에 작은 돌기가 생기고, 이것이 점차 커짐과 동시에 핵이 둘로 나뉘어 독립된 세포로 되는 출아법을 통해 번식을 하였다. 이 결과로 보아 위 세 균주는 *S. cerevisiae* 속한다.



(a) YPH500

(b) Trp

(c) Thr

Fig. 23. Simple staining of *S. cerevisiae* YC500, Trp (typtophan plasmid 함유 transformant) , Thr (threonine plasmid 함유 transformant)

나. 최적배지의 선택

최적의 배양조건을 규명하기 이전에 yeast 배양에 적합한 최적배지를 선택하기 위하여 각기 조성이 약간씩 다른 배지들을 가지고 균주를 배양하였으며 그 결과는 Table 4에 보여주고 있다. Table 16 에서도 볼 수 있듯이 성장순서는 YPD, YPG, YP 등의 순이며 YPD와 YPG의 차이는 거의 미약하였으나 전반적으로 YPD broth에서 생장이 좋은 것을 볼 수 있다. 이는 아마도 서론에서 언급한 배지의 조성을 토대로 했을 때 YPD나 YPG의 조성에는 생장에 필수적인 major element, minor element이 포함되어 있기 때문일 것이다. 이로 보아 알 수 있는 것은 약간의 조성에 차이만이 있어도 그리고 그 양에 차이가 있어도 균주의 생장이 달라질 수 있다는 것이다. 또한 각각의 배지에서 Thr 균주의 생장이 다른 두 균주에 비해 월등하게 좋은 것으로 나타났다. 이후의 실험은 최적배지로 선택된 YPD 배지로 실행하였다.

Table 16. Yeast growth according to medium kinds

Medium	cell growth *		
	YPH500	Trp	Thr
YSMM	1.5569	1.5614	1.7510
YPG	3.1177	3.1941	3.2735
YM	2.3907	2.4137	2.7446
YP	2.7558	2.7268	3.0125
YPD	3.2265	3.1941	3.3120

*: OD at 600nm of cultured broth
Culture condition: 48h, 30°C, 200rpm

다. 최적발효조건의 규명

1) 시간에 따른 각 균주의 성장정도

YPD를 최적배지로 선택한 후 각 균주의 시간에 따른 성장정도를 알아보기 위하여 200rpm, 30℃에서 12시간 별로 48시간 동안 배양을 하였으며 그 결과를 Fig. 24 에 나타냈다. shaking incubator 내의 배양은 48시간 이상이 되면 균주의 성장정도가 거의 없거나 일정해졌기 때문에 48시간 이상의 실험을 하지는 않았다.

배양시간이 길수록 점점 생장이 좋아지는 것을 보였고 특히 배양 후 12시간에는 급격하게 생장이 증가하였다. 그 후 24시간까지 양호한 성장을 보이다가 24시간 이후부터는 생장이 둔해지는 것을 볼 수가 있으나 48시간까지는 조금이나마 꾸준한 증가를 보였다. 위 실험의 결과에서도 나왔듯이 여기에서도 Thr 균주가 다른 두 균주 보다 생장이 높은 것을 볼 수 있었다.

2) 시간에 따른 건조 균체량

시간에 따른 성장과 동시에 건조 균체량을 측정하기 위해서 배양 12시간마다 각각 20ml 씩 배양액을 취하여 건조 균체량을 측정해보았다(Fig. 25).

각 균주의 성장정도를 알아봤을 때 Thr 균주가 가장 높게 나왔었던 것처럼 이번 결과에서도 동일하게 나왔다. 하지만 성장정도에서는 작게만 볼 수 있었던 차이가 건조 균체량 측정에서는 확연하게 나타남을 볼 수가 있다.

우선 24시간까지는 서서히 균체량이 증가하다가 24~36시간까지 빠르게 양이 증가한다는 것을 알 수가 있다. 그리고 위의 실험과 마찬가지로 36시간 이후는 그 정도가 둔화되고 있는 것으로 나타났다.

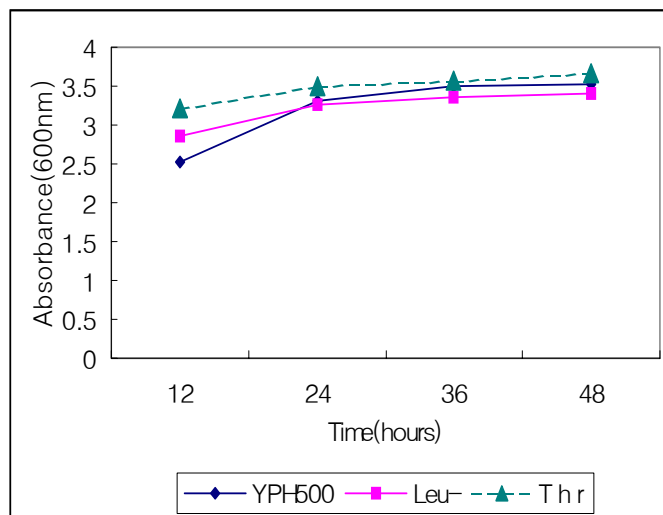


Fig. 24 Time course of cell growth of three yeast strains Culture condition: 48h, 30°C, 200rpm, pH 6.0 (Leu-: Trp)

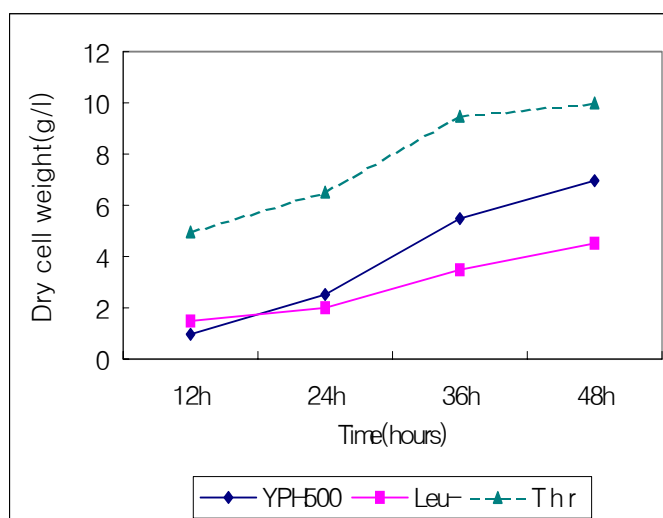


Fig. 25. Time course of dery cell weight of three yeast strains Culture condition: 48h, 30°C, 200rpm, pH 6.0 (Leu-: Trp)

3) 최적 온도와 pH의 조건

YPD 배지를 사용하여 세 균주를 shaking incubator 내의 플라스크에서 배양하면서 증식 환경에 큰 영향을 주는 온도 및 pH의 영향을 조사한 결과가 Fig. 26와 27에 나와있다.

Fig. 26에서 YPH500과 Trp은 비슷한 양상으로 성장을 나타냈다. 30°C에서 가장 높은 성장률을 보인 것으로 보아 이들 균주는 일반적인 yeast의 성장온도인 30°C에서 가장 좋은 성장을 나타냈고 중온성 미생물임을 알 수 있다. 반면에 20, 40°C에서는 비슷한 성장정도를 보였으며 20°C에서는 YPH500이 더 좋은 성장을 보였으나 최적온도인 30°C를 기준으로 그 차이가 점차 줄어들었다. 하지만 40°C 이상에서는 0.1 이하로 거의 생장이 없는 것으로 보아 높은 온도로 인해 대사조절이 파괴되었거나 세포가 사멸되었기 때문에 생장이 급격하게 감소했을 것으로 생각되었다.

Fig. 27에서는 다양한 pH의 영향을 나타내고 있는데 pH 3.0에서 모두 가장 낮은 성장을 보였으며 세 균주 모두 약간의 차이는 있지만 pH 6.0에서 가장 좋은 성장을 보였다. 최적 pH인 6.0에서는 이전의 실험결과와 마찬가지로 Thr 균주가 다른 두 균주 보다 생장이 좋은 것을 볼 수가 있었다. 이 결과로 보아 yeast 균주의 적당한 성장 pH는 6.0~7.0임을 알 수 있고 약산성과 중성사이에서 최적의 성장을 보임을 알 수 있다. 즉 세 균주를 30°C 이상과 pH 6.0 이상의 조건으로 배양을 하게 되면 균체의 성장이 느려지게 됨을 알 수가 있다.

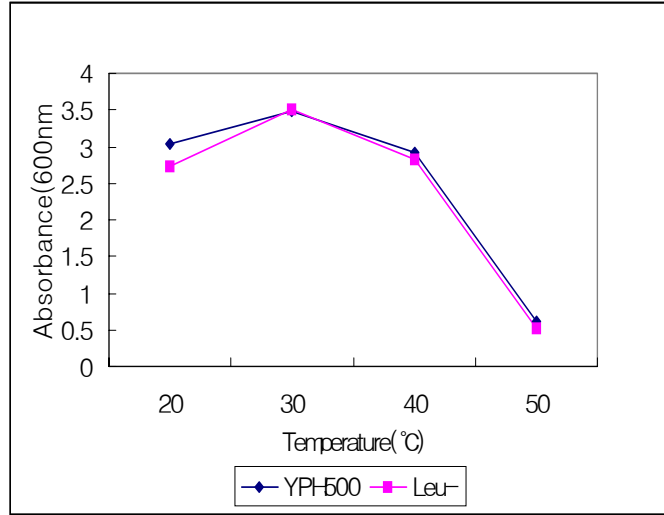


Fig. 26. Effect of temperature on yeast strains Culture condition: 48h, 200rpm, pH 6.0 (Leu-: Trp)

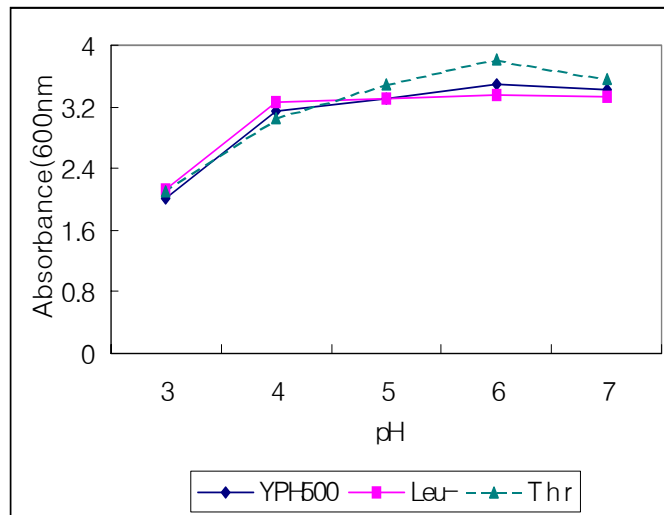


Fig. 27. Effect of various pH on yeast strains Culture condition: 48h, 30°C, 200rpm (Leu-: Trp)

4) 최적 산소공급 정도

고등식물의 호흡에는 산소가 절대 필요하나 미생물 중에는 산소가 없어도 살아나는 것과 산소가 있으면 도리어 유해하여 사멸하는 것도 있다. 여기서는 Yeast 균주들의 생장에 있어서 산소가 있을 때 더욱 잘 자랄 것으로 생각이 되어 배지 내 산소공급 정도에 따른 실험을 하였다. Fig. 28 은 그 결과를 보여주고 있는데 배지 내 volume이 전반적으로 배지 내 볼륨이 50ml 일 때 가장 높은 생장을 보였으며 150ml에서 가장 낮은 생장을 보였으며 Thr 균주가 다른 두 균주 보다 생장이 좋은 모습을 보이고 있다. Thr 균주가 50ml 일 때 가장 생장이 좋았는데 이때 Thr을 기준으로 각 균주를 비교해보면 YPH500이 95%, Trp이 93% 정도의 생장을 보였다. 그리고 볼륨이 많아질수록 Thr, YPH500, Trp^p 균주는 각각 96%, 83%, 88%까지 낮아짐을 알 수가 있었다. 즉 산소공급의 정도가 어느 정도 이상을 넘어서게 되면 균주의 생장이 오히려 감소될 수 있음을 보여주고 있다.

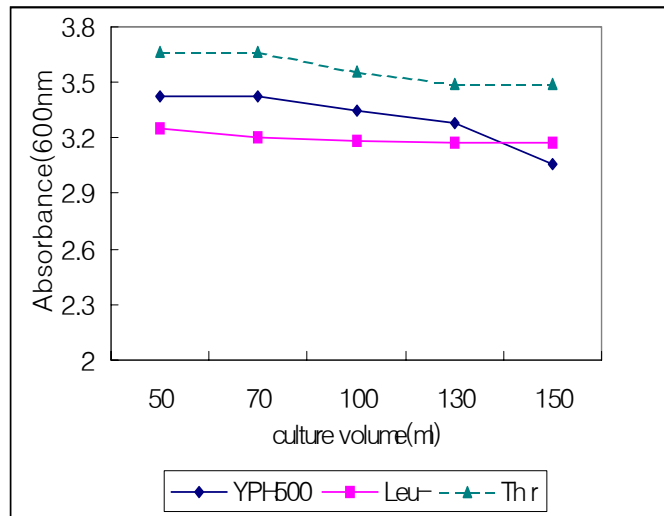


Fig. 28. Effect of various aeration on three yeast strains Culture condition: 48h, 30°C, 200rpm, pH 6.0 (Leu-: Trp)

5) 탄소원 분석

배양배지 제조 시 탄소원으로 glucose를 넣어줬는데 이들 균주들이 자라면서 이 glucose를 먹고 자라기 때문에 배지 내에 남은 탄소원의 정도를 TLC (Thin layer chromatography)를 통해 이미지로 알아본 것이 Fig. 29에 나와있다.

전 실험을 통해서 이미 배양 12시간 이후에서는 거의 밴드의 정도가 비슷했기 때문에 초기 접종 후와 배양 12시간째를 찍어보았다. 초기 밴드는 세 균주 모두 진하게 나온 것을 볼 수가 있고 배양 12시간 후 그 밴드의 정도에 차이가 처음 것과는 뚜렷하게 나는 것을 볼 수 있었다. 이는 이들 균주들이 모두 배양을 하면서 12시간까지 거의 첨가해준 탄소원을 밴드의 진한 정도는 Trp, YPH500, Thr 순으로 나왔다. 다른 말로 하면 Thr, YPH500, Trp 순으로 첨가해준 탄소원을 빨리 이용하여 소모한다는 것을 의미한다. 이전의 실험들에서 Thr 균주가 생장이 좋게 나왔었는데 이유는 탄소원을 빨리 이용하여 더 잘 성장하기 때문이라고도 볼 수 있다.

각 균주의 당에 대한 환원력을 알아보기 위하여 48시간 동안 배양한 배양액의 흡광도를 표준곡선과 비교하여 환원당의 양을 계산하였다. 그리고 당의 환원력은 당에 따라서 다르기 때문에 오차를 최소화하기 위해 표준 곡선 작성에는 분석하려는 glucose와 동일하게 사용하였다(Fig. 30, Table 17).

Fig. 30은 표준용액으로 사용했던 glucose 농도에 따른 흡광도를 나타내었다. 그리고 이것을 이용해서 standard curve를 작성한 후 표준곡선을 이용해서 역으로 그 값을 추적하여 Table 17에 보여지는 환원당의 수치를 계산할 수 있었다. 그 결과 Thr에서는 glucose 0.039%에 해당하는 환원당이 포함되어 있었고 Trp에는 0.083%, 그리고 YPH500에는 0.034%에 해당하는 환원당이 포함되어 있음을 알 수가 있고 glucose에 대한 환원력은 Trp, YPH500, Thr 순으로 좋게 나타났다. 그러나 환원당이 많고 환원력이 좋다고 해서 이것이 균주의 성장과 연관되는 것은 아니다. 환원당은 단지 첨가했던 당을 분해시켜 미지의 다른 당으로 만드는 것이기 때문이다.

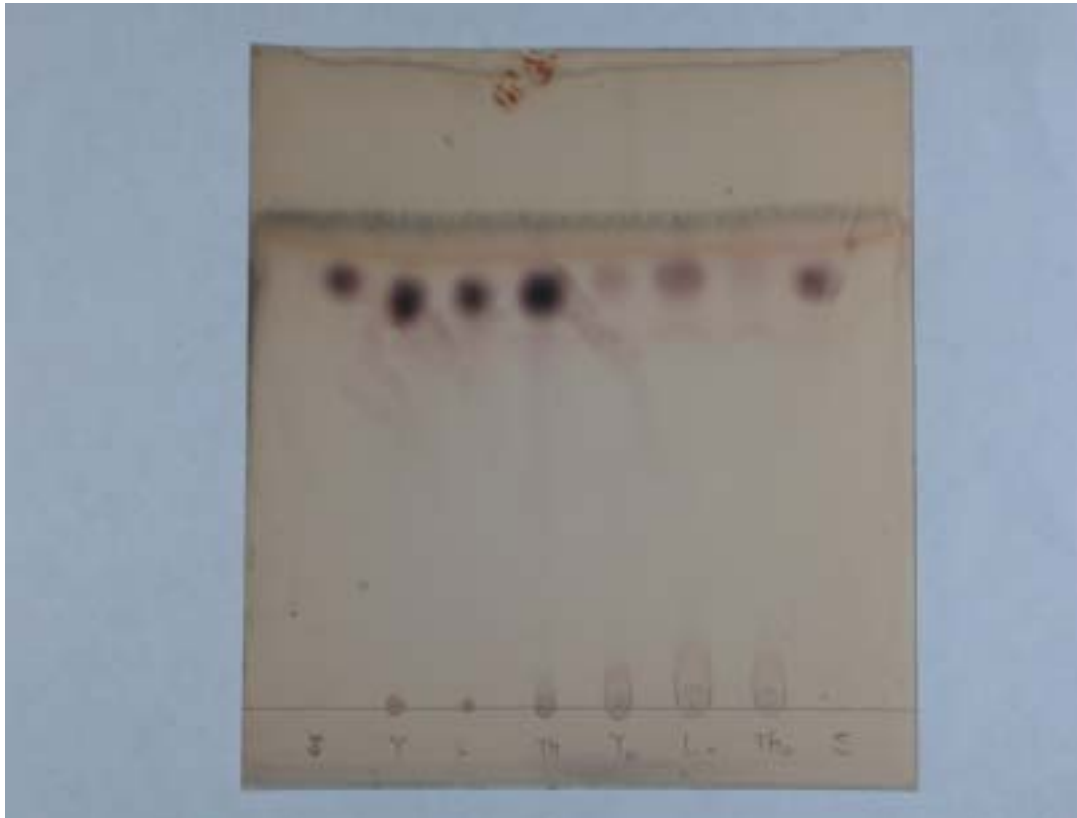


Fig. 29. Carbon source assay using TLC for three yeast strains S: standard, initial(Y: YPH500, L: Trp, Th: Thr), 12h(Y2, L2, Th2), S: standard

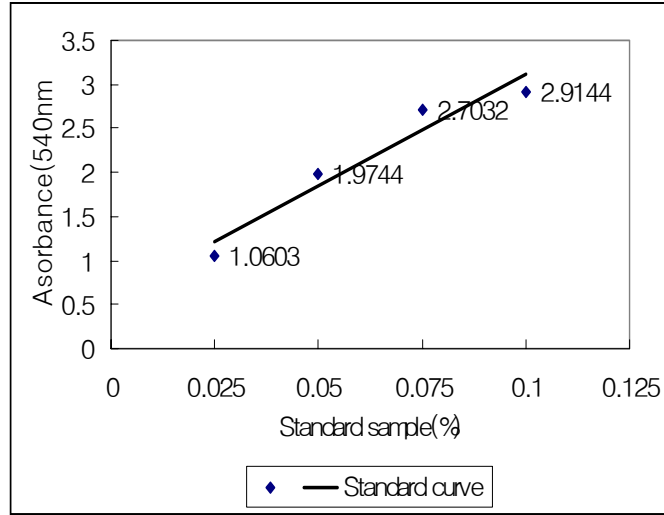


Fig. 30. Standard curve of glucose sample for DNS

Table 17. DNS value according to culture time of three yeast strains

Yeast stains	Absorbance(600nm)	환원당 수치(%)
Thr	1.5626	0.039
Trp	2.6683	0.083
YPH500	1.4575	0.034

6) 최적 탄소원과 질소원 조건

위의 실험들에서 세 균주 중 가장 좋은 성장을 보였던 Thr 균주를 가지고 이후 실험들을 실행하였다. 본 실험에서는 균주배양에 필요한 최적 탄소원과 질소원을 최적화하고자 일반적으로 미생물 배양에 자주 사용되는 탄소원과 질소원의 비를 달리하여 shaking incubator에서 균주를 배양하였다.

Table 18, 19에서 보는 바와 같이 Thr 균주는 glucose 이외의 여러 탄소원을 이용하여 성장할 수 있었다. 그 중에서도 대체적으로 좋은 성장을 보이는 탄소원을 선택하여 농도를 다르게 하여 실험을 반복하였다.

탄소원에 따른 Thr 균주의 성장을 조사한 결과 단당류인 glucose와 fructose, 그리고 이당류인 sucrose에서 생장이 가장 좋았고 그외 탄소원들에서는 거의 비슷한 성장을 보이지만 대체적으로 다당류에서는 별다른 영향이 없는 듯 하다. 이들은 모두 탄소원을 첨가하지 않은 control에서 보다는 좋은 성장율을 보였다. 그리고 생장이 좋았던 glucose와 fructose, 그리고 sucrose의 농도가 높을수록 더 좋은 성장을 보였으며 대체적으로 7%에서 생장이 가장 좋음을 알 수 있었다.

Table 18. Effect of carbon sources on the growth of *S. cerevisiae* Thr

Carbon sources	Cell growth *
Glucose	3.2613
Fructose	3.2988
Sucrose	3.3120
Maltose	2.6160
Mannitol	2.6079
Starch(potato)	2.6807
Starch(soluble)	2.6502
Dextrin	2.6473
control	2.5946

*: OD at 600nm of cultured broth
 Carbon compounds: 1% concentration
 Culture condition: 48h, 30°C, 200rpm, pH 6.0

Table 19. Effect of concentration of carbon sources on the growth of *S. cerevisiae* Thr

Carbon sources	Cell growth according to carbon concentration *		
	3%	5%	7%
Glucose	3.4021	3.4367	3.4216
Fructose	3.4952	3.4370	3.4952
Sucrose	3.5624	3.5166	3.5612

* OD at 600nm of cultured broth

Culture condition: 48h, 30°C, 200rpm, pH 6.0

질소원에 따른 생장은 Table 20와 21에서 보여주고 있는데 무기질소원과 유기질소원을 사용하여 실험을 하였다.

무기질소원에서는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 와 NH_4Cl 그리고 유기질소원에서는 yeast extract에서 생장이 좋았고 NaNO_3 , Urea에서는 control 보다 낮은 생장을 보였으며 그외 질소원에서는 별다른 차이는 보이지 않았다. Table 20에서 생장이 좋은 3가지 질소원을 가지고 농도별로 다시 실험을 하였다. 그 결과 탄소원에서와 마찬가지로 농도가 높을수록 그 생장이 좋아지는 것을 볼 수가 있었다. Table 21 에서도 볼 수 있듯이 특히 yeast extract에서 눈에 띄게 좋은 생장을 보였는데 이는 yeast extract에는 amino acids, peptides, 수용성 vitamins, carbohydrates, minerals의 함량이 높기 때문인 것으로 보여진다.

7) *S. cerevisiae* Thr의 vitamin과 금속염의 요구성

여기에서는 탄소원과 질소원 외에도 Thr 균주의 생장에 영향을 주는 비타민과 금속염의 요구성을 알아보기 위하여 앞에서도 나와있듯이 Table 3과 같이 여러 가지 배지를 제조하였고 비타민의 농도를 결정하고 배지에 첨가한 후 48시간 배양하였다. 이 때 사용했던 비타민들은 모두 수용성이며 이들은 일반적으로 미생물과 동물조직 세포의 배양 시 요구되는 증식인자이다. 이렇게 control을 포함한 6개의 배지조성에 대한 Thr 균주의 생장에 미치는 영향을 조사한 결과 Table 22 에서 나타난 바와 같이 Ca · Pantothenate, Pyridoxine · HCl, Biotin의 첨가에서는 생장에 크게 도움을 주지는 못한 것을 관찰할 수가 있었으며 반면에 inositol을 첨가한 배지에서 control과의 DCW(Dry cell weight)가 1.3~1.5(g/l)의 차이가 나는 것을 볼 수가 있고 특히 4가지 비타민을 모두 혼합하여 첨가한 배지에서는 눈에 띄게 균체량이 증가한 것을 볼 수가 있다. 이와같이 비타민은 증식인자로서 요구가 되지만 각각 균주의 비타민 요구성은 다르기 때문에 한가지 이상의 비타민을 혼합하여 배양할 때 생장이 더 좋다는 것을 추측할 수 있다.

Table 20. Effect of nitrogen sources on the growth of *S. cerevisiae* Thr

Nitrogen sources	Cell growth *
KNO ₃	1.9632
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.2058
NH ₄ H ₂ PO ₄	2.1489
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2.0378
NH ₄ NO ₃	2.0393
NaNO ₃	2.0335
NaNO ₂	1.0286
NH ₄ Cl	2.1517
Urea	1.7299
Peptone	2.0194
Yeast extract	2.9913
control	2.0458

* : OD at 600nm of cultured broth
 Nitrogen compounds: 0.2% concentration
 Culture condition: 48h, 30°C, 200rpm, pH 6.0

Table 21. Effect of concentration of Nitrogen sources on the *S. cerevisiae* Thr

Nitrogen sources	Cell growth according to nitrogen concentration *		
	0.4%	0.6%	0.8%
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.2385	2.3620	2.4577
NH ₄ Cl	2.1709	2.3136	2.4037
Yeast extract	3.3120	3.3542	3.4188

* : OD at 600nm of cultured broth

Culture condition: 48h, 30°C, 200rpm

Table 22. Effect of salts and vitamins on the growth of Thr

Culture condition ^①	Dry cell weight (g/L) ^②		
	YPH500	Tr ^p	Thr
(1) + (2)	2.005	1.91	2.105
(1) + (2) + Inositol	3.340	3.005	3.640
(1) + (2) + Ca · Pantothenate	2.265	1.575	2.860
(1) + (2) + Pyridoxine · HCl	1.585	1.030	2.116
(1) + (2) + Biotin	1.555	1.485	2.090
(1) + (2) + Vitamin complex ^③	5.700	5.065	6.350

① Composition (1) and (2) are the same as in Table 3.

② Culture hours: for 48 hours

③ Vitamin complex: Inositol + Ca · Pantothenate + Pyridoxine · HCl + Biotin

8) Fermentor를 이용한 *S. cerevisiae* Thr의 회분식 배양

1차 세계대전 당시 독일에서 처음으로 식량원이나 동물의 사료용으로 사용하기 위해 효모 균체를 대량으로 얻기 위한 시도가 이루어졌었고, 그 후 단백질 보조제로서 효모를 배양한 사례가 있었으며, 다양한 탄소원을 이용한 배양에 관한 연구가 많이 실행되어 왔다. 이 탄소원을 이용하여 높은 건조중량을 갖는 효모를 획득하고자 하였으며, 최근에는 세포 고정화 방법, 침전식 공정, 원심 분리 공정 등을 이용하여 세포를 재순환하여 효모를 고농도로 배양하는 방법이 개발되었으며 이런 연속 배양 방법을 통하여 효모를 210g/l까지 배양할 수 있게 되었다. 하지만 실제 효모를 생산하는 방법은 fed-batch 배양을 통해 호기적으로 실시되고 있어 이번 실험에서도 5L fermentor를 이용하여 회분식 배양을 하였다(Fig. 31, Table 23).

균주를 접종하자마자 1차 sampling을 하여 건조중량을 측정한 결과 1.0(g/l) 이하로 거의 생장이 없는 것으로 보였고 logarithmic phase에 접어들어 배양 16시간까지 균주는 빠르게 생장을 하였으며 16~48시간까지는 탄소원이나 질소원 등의 영양소 고갈과 배지 pH의 변화 등의 원인으로 거의 미세한 차이만을 보일 뿐 stationary phase 단계에 들어선 것을 볼 수 있다. 그리고 세포수가 감소하는 48시간 이후부터는 균체량이 급격하게 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이것은 Table 23에 나와있는 탄소소모량과도 관련이 되어 있다. Table 23에서 보면 탄소소모량은 1차 sampling에서 가장 많은 소모가 일어났으며 시간이 지나면서 그 소모정도가 줄어드는 것을 알 수가 있으며 1차~6차 sampling까지는 점차적으로 줄어드는 추세를 보였지만 7차(48시간)에서는 거의 반절이 줄어든 급격한 감소를 보였다. 이것으로 보아 배양액 내의 효모 세포들이 포화상태에 이르러 성장정도가 주춤해졌다는 것을 추측할 수 있다.

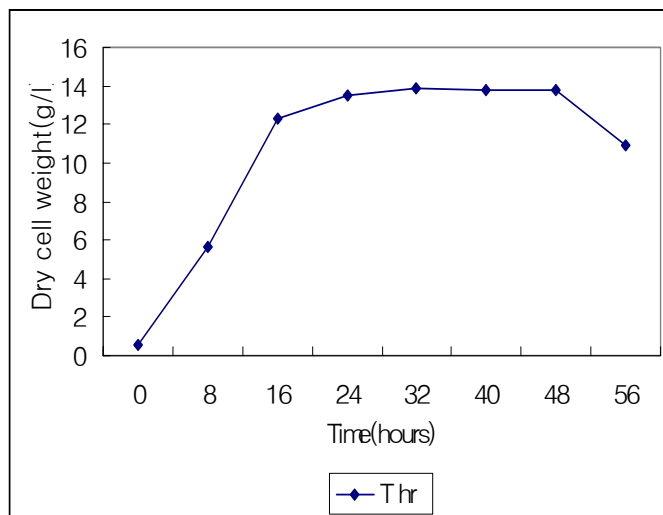


Fig. 31. Dry cell weight during fed-batch culture using a fermentor Fermentation condition: 56h, 30°C, 300rpm, pH 5.5~6.0

Table 23. Total sugar-phenol sulfuric acid method of Thr

Sample No.	Absorbance(OD ₆₀₀)	탄소 소모량($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	0.8198	42
2	0.6685	34
3	0.4858	25
4	0.4544	23
5	0.4165	22
6	0.4094	21
7	0.2060	11
8	0.1767	9

라. 결론

본 연구는 사료첨가제로 사용되는 단세포 아미노산들 중에서 중요한 성분인 threonine과 tryptophan 함유량을 증가시킨 효모를 개발하여 단세포 단백질로서의 양질의 사료원료를 개발하기 위함이며, 단세포 단백질원으로서 효모 균주 중에서 *S. cerevisiae* YPH500, Tr^p, Thr 세 균주를 이용하여 생육환경의 최적화를 통해 최대의 균체 생산량을 얻도록 하고 최종적으로 생산된 효모 균주의 아미노산 함량을 분석하여, 이를 산업적으로 적용하고자 하였다.

Yeast 세 균주는 전배양을 통해 활성을 높였고 균주 성장에 가장 적합한 배지조성을 찾기 위한 실험을 YPD 배지를 선택하였으며 시간에 따른 각 균주의 성장도와 균체량에서 최적배양시간이 48시간임을 확인하였으며 세 균주 중 Thr이 가장 좋은 성장력을 갖고 있었다. 특히 Thr은 다른 두 균주 보다 월등하게 많은 균체생산량을 갖고 있었으며 이는 fermentor를 사용하여 배양했을 때 더 많이 획득할 수 있었다.

배양조건에서 물리적 요인인 온도, pH이 최적조건은 세 균주 모두 차이는 있었지만 각각 30°C, pH 6.0에서 최적의 성장을 보였으며 화학적 요인인 산소공급의 영향에서는 모두 50ml에서 90% 이상의 성장을 보였으며 호기성 균주임을 알 수 있었다.

탄소원 분석을 하기 위하여 TLC를 사용하였는데 접종한 후 초기 밴드는 진하고 두꺼운 것으로 보아 탄소원이 많이 남아있고 배양 12시간 후 밴드는 거의 두께가 약하고 색이 연한 것으로 보아 탄소원이 거의 소모된 것을 보았다.

위의 실험들에서 생장이 가장 좋았던 균주 Thr을 선택해서 탄소원과 질소원, 그리고 그의 영양요구성에 대한 실험을 시행하였다.

우선 탄소원으로는 glucose, fructose와 같은 단당류의 이용이 가장 좋았으며 그 농도가 7%일 때 최적생장을 나타냈고 질소원에서는 유기질소원인 yeast extract에서 최적생장을 나타내는 것으로 확인되었다. 그리고 vitamin과 금속염의 영양요구성은 Inositol, Ca·Pantothenate, Pyridoxine·HCl, Biotin을 단독으로 첨가했을 때는 성장에 큰 도움을 주지는 못하고 네가지 vitamin을 모두 혼합하여 첨가했을 때 control에 비해 균체량이 눈에 띄게 증가하는 것을 확인하였다.

생장이 좋은 *S. cerevisiae* Thr을 5L fermentor를 이용하여 배양한 결과 shakin incubator 내에서 보다 많은 균체량을 얻을 수가 있었으며 그에 따라 소모되는 탄소정도도 많아짐을 알 수 있었다.

본 과제에서 사용한 YC500균주 (trp⁻, leu⁻, ura⁻, his⁻)와 비교하였을 때 2세부과제에서 개발한 TC5-1의 생장이 더 좋았으므로 (미 발표 자료) 이 균주를 이용하여 3차년도에 배양연구를 수행하였다.

4절. 사료첨가제를 위한 효모 단세포 단백질의 생산

1. 서론

효모는 산업적으로 많이 이용되고 있는 미생물 균주 중에 하나이다. 분류학상으로는 곰팡이나 버섯 무리이지만 균사가 없고, 광합성능이나 운동성도 가지지 않는 단세포 미생물의 총칭이다. 대부분 토양 속에 살지 않으며 꽃의 꿀샘이나 과실의 표면과 같은 당 농도가 높은 곳에 많이 생육하고 있다. 이러한 효모는 당을 발효시켜 에탄올과 이산화탄소를 생산하는 능력을 가진 것이 많으며 이것은 맥주의 제조나 빵의 발효에 이용된다.

효모 자체는 값싼 지방·단백질 원으로 사료에 사용된다. 비타민 B 또는 D를 함유하며 의약품 공업에도 사용되어진다. 효모의 세포벽은 주로 glucan 과 mannan으로 그 밖의 지질 단백질과 소량의 키틴질을 함유한다. 세포 내에는 핵, 미토콘드리아, 액포, 글리코겐 과립을 가지며, 발효뿐 아니라 호흡능도 좋다. 또한 다량의 RNA를 함유하며 1967년 전까지 전 구조가 결정된 5종의 tRNA는 모두 효모에서 유래한 것이어서 분자유전학의 진전에 큰 기여를 하고 있다. 효모의 생활사는 1935년 처음으로 세대교번이 밝혀졌고, 1960년에는 염색체지도가 완성되어 유전학의 좋은 재료가 되고 있다.

효모 중에서도 *Saccharomyces cerevisiae*를 주로 사용하는데, 그 이유는 평균보다 높은 수준에서 GRAS(generally recognized as safe)를 받았기 때문이다. 그러나 wild type yeast의 경우 아미노산 생산량의 그리 좋지 않기 때문에 대부분 돌연변이주 (영양요구성 또는 조절변이주)를 사용한다. *S. cerevisiae*의 균주는 식품발효나 음료 생산에 널리 이용되고 있으며, *S. uvarum* 혹은 *S. carlsbergensis*의 균주가 맥주 발효에 사용된다.

효모가 생산하는 대사산물 중에서 아미노산은 체내에서 중요 구성물질인 단백질의 구성 단위이다. 아미노산은 현재 식품, 사료, 의약, 동물의약품, 화장품, 농약등 여러 분야에서 다양하게 이용되고 있는 실정이다. 이렇듯 아미노산은 맛, 생리학적 활성 그리고 화학적인 특성 등의 영양학적 가치가 높아 산업적으로 널리 이용되고 그에 따른 연구도 많이 진행되고 있다.

그 예로 아미노산 중에서 threonine은 히드록시- α -아미노산의 하나이고, lysine과 마찬가지로 사료에 부족하기 쉬운 필수 아미노산으로서 수십 년 동안 사료에 첨가되어 왔다. 트레오닌은 돼지나 닭의 사료에 사료효율개선, 증체율 향상, 육질 개선, 면역력 향상, 생산성 향상 효과를 나타내며, 저단백 사료의 제조에 도움을 줌으로서 환경 친화적인 사료를 만들 수 있다는 데에 장점을 보인다. 이외에도 주사제, 항생제등의 원료로 사용되며 인간의 식료품으로도 제한적으로 사용되고 있다. 그러나 threonine 공급량이 수요에 못 미치고 있으며, 전 세계적으로 일 년에 약 10000톤 정도가 더 필요한 실정이다. 이에 L-threonine의 생산효율을 높이기 위한 여러 가지 연구가 이루어지고 있다.

본 실험은 사료첨가제로 사용하기 위한 단세포 단백질원으로서의 효모 균주 중에서 아미

노산의 양이 증가되도록 유도된 *S. cerevisiae* DJ-7을 이용하여 pH, 온도, 산소공급 등의 생육환경의 최적화를 통해 가장 생장률이 좋은 상태로 만드는 것이다.

2. 실험 재료 및 방법

가. 균주

일반적으로 단백질 생산에 응용되고 있는 *Saccharomyces cerevisiae* 중 아미노산의 생산성이 증가 되도록 개발되어진 조절 변이주 균주인 DJ-7을 glycerol stock으로 냉동보관 하면서 사용하였다.

나. Growth condition

선별된 균주의 배양조건은 실험하고자 하는 목적 즉 온도, pH등으로 배양함에 따라 달라질 수 있다. 또한 yeast가 자라는데 있어 액체배지의 경우에는 shaking incubator에서 200rpm을 사용하였다.

1) 최적배지의 선별

증류수 1L당 배지 조성은 Yeast배양에 주로 쓰이는 YPD (Glucose 40g, Yeast extract 10.0g, peptone 10.0g, KH₂PO₄ 10.0g), YM(yeast extract 4.0g, Malt extract 10.0g, glucose 10g), YPG (Glucose 20.0g, NaCl 20.0g, peptone 10.0g Yeast extract 10.0g)의 배지 조성을 사용하였으며 250ml의 baffled 삼각 플라스크에 각각 50ml 배지에 균주를 접종한 후 shaking incubator (30℃, 200rpm)에서 48시간 배양하여 성장속도를 비교 관찰하였다.

2) 온도

보통 yeast의 경우 30℃에서 배양을 하지만 실험결과를 내기 위한 조건에 '온도에 따른 성장률의 변화'를 관찰해야 하므로 온도에 따른 실험을 할 때에만 20℃, 30℃, 40℃로 맞추어 배양을 하였다. 이 때의 배양조건은 shaking incubator에서, 200rpm으로 48시간 배양 후 absorbance(600nm)로 생육정도를 측정하였다.

3) pH

보통 yeast는 약산성인 pH 5 ~6정도에 최적생장을 보이지만 사용 균주는 변형된 균주이므로 wild type의 조건과 다르게 pH 4, 5, 6 으로 변화를 주어 보았다. 이 때의 배양조건은 shaking incubator에서 30℃, 200rpm으로 48시간 배양 후 absorbance로 생육정도를 비교하였다.

4) 최적 탄소원(carbon source)

탄소원을 첨가하지 않은 control과 9가지 탄소원을 바꾸어 주면서 실험을 하여 성장정도를 측정하였다. 이때 배지를 제조할 때 질소원은 yeast extract를 사용 하였고 배양 조건은 이전 실험과 동일하였다.

5) 산소공급

산소공급에 따른 성장률을 알아보기 위해서 250ml baffled 삼각플라스크 내에 배지 부피 (ml)을 달리하여 shaking incubator (30℃, 200 rpm)으로 48시간동안 배양하여 성장정도를 absorbance를 측정하였다.

다. 아미노산 분석

만들어진 mutant의 amino acid 함량은 아미노산에 PITC를 labeling하여 HPLC로 분석하였다. 선정된 균주는 8가지이며 순수한 20개 아미노산을 이용하여 standard를 만들어 mutant와 비교 분석에 이용하였다.

선정된 균주는 OD₆₀₀ ≍ 1 이 되도록 배양한 후 centrifuge를 이용하여 배지와 균주를 분리 하였고 분리된 균주는 lysis buffer에 넣고 bead beater를 이용하여 세포내(intracellular) amino acid을 추출하여 함량을 측정하였다. Cell lysis에는 glass bead를 사용하였다.

Cell (harvested cell)의 아미노산 조정을 분석하기 위하여 산가수분해법을 사용하여 cell 을 아미노산단위로 lysis하였다. Cell은 N₂ gas로 충전된 glass vial에 6N HCl과 함께 넣고 24시간동안 110℃에서 가열하여 분해 하였으며 tryptophan의 함량을 분석하기 위하여 전처리 과정으로 methanesulfonic acid처리 단계를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. Screening된 mutant의 tryptophan, threonine 함량 측정

순수한 20개 아미노산을 이용하여 standard를 만들어 mutant와 비교 분석에 이용하였다. Analogue plate를 이용하여 1차 screening 된 mutant는 intracellular 아미노산 분석을 통해 2차 screening 하였으며 (Table 24) wild type에 비해 Trp, Thr의 함량이 모두 높은 DU 3-2, DU 4-3, DU 5-3을 최종 candidates로 선정하였다.

최종 균주로 선정된 DU 5-3을 OD₆₀₀ ≍ 1 이 되도록 배양한 후 centrifuge를 이용하여 배지와 균주를 분리 하였고 분리된 균주는 lysis buffer에 넣고 bead beater를 이용하여 세포내(intracellular) amino acid을 추출하여 함량을 측정하였다. Cell lysis에는 glass bead를 사용하였다. Cell (harvested cell)의 아미노산 조정을 분석하기 위하여 산가수분해법을 사용하여 cell을 아미노산 단위로 lysis하였다. Cell은 N₂ gas로 충전된 glass vial에 6N HCl과 함께 넣고 24시간동안 110℃에서 가열하여 분해 하였으며 tryptophan의 함량을 분석하기 위하여 전처리 과정으로 methanesulfonic acid처리 단계를 사용하였다.

개발된 mutant DU 5-3과 wild type의 intracellular 및 harvested cell의 Trp, Thr의 함량 분석 결과는 Table 25 와 같다.

Table 24. The amount of Trp, Thr of produced by the wild type and mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.

(unit : $\mu\text{g}/\text{DCW}_{\text{mg}}$)

Strains	cell 10 μg 당 peak면적	
	Threonine	Tryptophan
wild	45672	75982
DU 1	38390	29888
DU 2	45340	101222
DU 2-1	45936	100382
DU 3	54796	176534
DU 3-2	125870	110194
DU 4	97532	154068
DU 4-3	79810	206990
DU 5-3	188168	132968

Table 25. The amount of Trp, Thr produced by the wild type and DU 5-3.

(unit : $\mu\text{g}/\text{DCW}_{\text{mg}}$)

	Intracellular accumulation in the cell		Harvested cell	
	Tryptophan	Threonine	Tryptophan	Threonine
Wild type	0.07	0.12	2.13	13.47
DU 5-3	0.13	0.58	2.13	15.88
Ratio of Mutant/Wild	1.94	4.69	1	1.17

본 연구에서 사용된 mutagenesis에 의해 만들어진 mutant는 Thr, Trp의 overproducing 이 cell의 구성 protein보다 intracellular accumulation이 주로 이루어졌음을 관찰할 수 있었다. 두 아미노산 중에서는 threonine이 tryptophan보다 좀더 높은 비율로 overproduce 되었다.

본 연구에서 개발된 DU 5-3은 tryptophan과 threonine이 intracellular에선 1.9배, 4.7배 정도 overproducing 되었으며 cell 자체로는 threonine은 wild type에 비해 17% overproduction 하였고 tryptophan은 차이를 보이지 않았다.

나. Fast growing mutant의 선택

선정된 DU 5-3를 비롯한 세 균주 모두가 아미노산 함량은 늘었으나 균주의 변이중에 균체성장속도가 느려져 이 균주로부터 다시 single colony selection 에 의하여 가장 잘 자라는 colony를 선발하는 방식으로 이를 반복하여 최종적으로 한 균주를 선발하고 *Saccharomyces cerevisiae* DJ-7으로 명명하였다. 그리고 YPD 와 YPG, 그리고 YM 배지에서 서의 growth를 비교하여 Table 26에 나타내었다.

Table 26. The growth of the selected yeast strains in the various media.

medium	cell growth*			
	DJ 3-2	DU 4-3	DU 5-3	DJ-7
YPD	3.22	3.20	3.31	3.92
YPG	3.12	3.20	3.28	3.70
YM	2.40	2.41	2.75	2.83

*OD at 600nm of cultured broth/culture condition : 36hr, 30°C, 200rpm

세 가지 broth를 비교하여 보면 전반적으로 YPD broth에서 더 생장이 좋은 것을 볼 수 있으며 그 중에서도 DJ-7 균주가 가장 좋은 생장을 보였다. 그러므로 이후의 실험은 Table 26의 결과를 토대로 하여 균주는 DJ-7, 그리고 배지는 YPD broth로 실행하였다.

다. 온도에 따른 생장

Saccharomyces cerevisiae DJ-7은 일반적인 yeast의 생장온도인 30°C에서 가장 좋은 생장을 나타내는 것으로 보였고 40°C 이상에서는 생장을 저해 받는 것으로 보인다. 이때 Absorbance 3.4 에서의 건조균체량(DCW)은 12g/l 이었다.

Table 27. Effect of temperature on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* DJ-7

Temp.	cell growth*
	YPD
20°C	3.00
30°C	3.42
40°C	3.04

*OD at 600nm of cultured broth/culture condition : 48hr, 200rpm

라. pH에 따른 성장결과

Saccharomyces cerevisiae DJ-7의 최적 성장 pH는 Table 28의 결과에서 알 수 있듯이 pH7로 나타났다. 이는 대개의 효모들이 중성 pH에서 최적의 성장을 보이는 것과 같았다.

Table 28. Effect of various pH on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* DJ-7

pH	cell growth*
	YPD
pH 5	3.11
pH 6	3.26
pH 7	3.58
pH 8	3.25

*OD at 600nm of cultured broth/culture condition : 48hr, 30℃, 200rpm

마. carbon source첨가에 따른 실험 결과

미생물의 대사에 가장 커다랗게 영향을 보이는 탄소원을 정하기 위하여 8 가지의 탄소원(carbon source)을 첨가하여 배양하여 성장을 비교한 결과를 Table 29 에 나타내었다. 8가지의 탄소원 중에서는 Glucose, Fructose, sucrose 세 가지가 가장 좋은 성장을 보였으며 sucrose는 다른 두 탄소원 Glucose와 fructose에 비하여 조금 낮았으며 나머지 탄소원 들에서는 거의 비슷한 성장을 보였다.

Table 29. Effect of carbon sources on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* DJ-7

Carbon sources	Cell growth *
Glucose	3.50
Fructose	3.50
Sucrose	3.35
Maltose	2.04
Mannitol	1.83
Starch(potato)	1.68
Starch(soluble)	1.78
Dextrin	2.16
control	1.78

* : OD at 600nm of cultured broth/Culture condition: 48hr, 30°C, 200rpm

바. 통기(aeration)량에 의한 효과

같은 부피(250ml)의 삼가플라스크내의 배지량을 달리하면 배지량이 적을수록 산소 전달(aeration)이 커지게 된다. 산소 전달량을 정량적으로는 측정할 수 없지만 대체적인 산소에 대한 영향을 측정하기 위한 방법으로 실험한 결과 Table 30의 결과를 얻었다. 이미 예상한 바와 같이 효모 또한 호기적인 조건에서 산소 전달량이 커질수록 생육이 증가하는 전형적인 호기성을 보였다.

Table 30. Effect of aeration on *Saccharomyces cerevisiae* DJ-7

vol.	50ml	70ml	100ml	130ml	150ml
cell growth*	3.57	3.47	3.37	3.27	3.12

*: OD at 600nm of cultured broth/Culture condition: 48hr, 30°C, 200rpm

4. 결론

서론에서도 언급하였던 것과 마찬가지로 아미노산은 산업적으로 가치가 높으며 그 중에서도 본 실험의 목적 아미노산인 threonine은 사료첨가제로 예전부터 계속해서 사용했던 재료이다. 이것은 인간에게서도 일반적인 쌀에서는 섭취할 수 없는 필수아미노산으로써 사용되면 동물사료에 첨가하면 증체율의 향상뿐 아니라 육질도 좋아지고 면역력이 강화되는 등의 효과가 뛰어나 좋은 연구 재료이고 그 연구가 성공적일 경우 축산농가뿐 아니라 우리 인간에게도 상당한 이득이 주어질 수 있어 앞으로도 꾸준한 연구가 필요하다.

본 실험에서는 2차년도에 보고서에 언급한 바와 같이 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* wild 균주로부터 ethylmethane sulfonate (EMS), 자외선 조사 등으로 처리하여 돌연변이를 유도하고 아미노산 생성량을 높이기 위한 영양요구성 변이주와 조절변이주를 구하여 아미노산 조성 분석을 하여 Threonine 과 tryptophan 함량이 높은 변이주를 선별하여 각각 *Saccharomyces cerevisiae* DU 3-2, DU 4-3, DU 5-3이라고 명명하였다. 일르의 아미노산 조성을 분석한 결과 DU 5-3은 tryptophan과 threonine이 intracellular에선 4.5 배 정도 증가되었으며 harvested cell 자체로는 threonine은 wild 균주에 비해 17% overproduction 하였고 tryptophan은 차이를 보이지 않았다. 이들은 돌연변이 중에 일어난 변화로 인하여 성장속도가 느려지는 것을 발견하고, 이를 극복하기 위하여 가장 아미노산 조성이 높은 DU 5-3균주로부터 single colony isolation 법에 의하여 생장이 가장 빠른 균주를 택하여 *Saccharomyces cerevisiae* DJ-7이라 명명하고 생육온도, pH, 탄소원, 산소공급량 등 생육 환경의 최적화를 통해 최대의 균체 생산량(13.8g/l)을 얻었다.

5절. *C. rugosa*의 배양 연구

1. *C. rugosa*의 최적 성장 조건

가. Urea변화에 따른 *Candida rugosa*의 성장속도 차이

배지의 urea를 변화시켜 키웠을 때 *Candida rugosa*의 성장정도를 측정하였다.

배지 조성은 g/50ml기준으로 Hydrol 3%(1.5ml), Urea, KH_2PO_4 0.4g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, NaCl 0.05g, $\text{CaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, Trace(100×) 0.11g, Yeast extract 0.05g으로 조성되었고 배지에서 Hydrol이 당성분이기 때문에 따로 glucose를 첨가하지 않아도 되었다. Urea 조성 변화는 0g, 0.05g, 0.15g, 0.25g, 0.5g로 하였다.(배지 제조시 유의사항은 CaCl, Urea 와 나머지 배지조성물로 3구분하여 따로 autoclave후 섞는다. 모두 섞어서 autoclave할 경우 Urea 0.5g/50ml 경우 pH9.15로 당과 반응, CaCl은 배지에 다량의 염 성분을 가라앉히게 됨. 9.15이하의 pH에서도 소량은 염 성분이 발생하여 O.D.값 측정에 오차를 발생 시킬 수 있다.)

buffer solution 은 0.2M potassium hydrogen phthalate (4.084g/100ml) → 0.2M NaOH (0.8g/100ml)를 이용하여 pH6으로 맞춘다.(buffer solution : D.W. = 1 : 3 (120ml : 360ml)으로 하여 0.05M 만든다.)

*Candida rugosa*는 YM plate에서 키운 후 colony를 따서 flask에 각각 접종하고, 접종된 *Candida rugosa*를 24시간동안 배양 후 1ml씩 실험용 배지에 접종한 후 shaking incubator에서 키우고. (24°C, 150rpm) cell mass를 측정한다.



Fig 32. YM plate에서 배양된 *C. rugosa*

Table 31. O.D값 측정 결과

urea 측정시	Urea 0		Urea 0.05		Urea 0.15		Urea 0.25		Urea 0.5		회석 배수
	600nm	650nm	600nm	650nm	600nm	650nm	600nm	650nm	600nm	650nm	
12 hr.	0.447	0.428	0.614	0.585	0.683	0.653	0.696	0.668	0.700	0.672	×4
24 hr.	0.248	0.240	0.492	0.476	0.771	0.749	0.740	0.719	0.618	0.601	×16
26 hr.	0.247	0.239	0.521	0.504	0.782	0.761	0.769	0.747	0.727	0.709	×16
36 hr.	0.270	0.264	0.441	0.426	0.785	0.761	0.825	0.802	0.705	0.686	×24 (Urea0 : ×16)
48 hr.	0.564	0.584	0.273	0.264	0.491	0.473	0.533	0.515	0.447	0.432	×36 (Urea0 : ×16)
60 hr.	0.433	0.421	0.319	0.308	0.531	0.514	0.539	0.517	0.441	0.429	×36 (Urea0 : ×12)

측정결과 urea 0.15와 0.25에서 좀더 나은 성장을 보였고, urea 0.25가 최적 조건으로 판명되었다.

나.. pH변화에 따른 *Candida rugosa*의 성장속도 차이

*Candida rugosa*의 성장의 최적 pH를 구하기 위해 pH 4, 5, 6 ⇨ 0.05M potassium phthalate buffer와 pH 7, 8 ⇨ 0.05M potassium phosphate buffer를 사용하여 pH를 측정하였다.

Table 32. Potassium phthalate buffer와 Potassium phosphate buffer의 pH

Photassium phthalate buffer	Photassium phosphate buffer
0.2M potassium hydrogen phthalate (4.084g/100ml) pH=4.04 + 0.2M potassium hydroxide (1.1222g/100ml) pH=13.12	0.2M K ₂ HPO ₄ (3.484g/100ml) pH=9.17 + 0.2M KH ₂ PO ₄ (2.723g/100ml) pH=4.67
potassium hydrogen phthalate 과 potassium hydroxide의 비율은 대략적으로 아래와 같다. * pH=4 ⇨ 1:0 *pH=5 ⇨ 11:5 *pH=6 ⇨ 1:1	K ₂ HPO ₄ 과 KH ₂ PO ₄ 의 비율은 대략적으로 아래와 같다. * pH=7 ⇨ 5:6 *pH=8 ⇨ 8:3

buffer solution 45ml + glucose 0.5ml 하여 autoclave (300ml baffled flask사용) (※ glucose를 첨가하여 autoclave할 경우 pH가 올라 갈수록 갈변현상을 나타내었다. 갈변 현상은 pH meter기의 standard solution pH4, 7, 10과 섞어서 autoclave하였을 경우에도 pH7, 10에서 발생하였으므로 glucose는 알칼리 용액과 혼합하여 autoclave하였을 경우 갈변현상을 나타낸다고 할 수 있다. autoclave하지 않았을 경우에는 혼합하여도 갈변현상이 발생하지 않으므로 glucose와 buffer를 따로 autoclave 한 후 섞는 것이 갈변으로 인한 오차를 없앨 수 있다.), Clean bench안에서 autoclave한 buffer용액에 YN 5ml를 첨가한다. (YN : buffer = 1 : 9) ※*C. rugosa*는 urea 실험 때와 동일하게 배양하였다.

Table 33. pH 변화에 따른 O.D값 측정 결과

측정시 \ pH	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
1day후	0.003	0.279	0.014	0.393	1.1
3day후	0.563	2.034	2.125	2.155	1.955
4day후	1.068	1.919	2.147	2.126	1.944
5day후	1.810	1.929	2.134	2.099	1.965

O.D.값 측정 결과 pH4는 초기에 자라는 속도가 느림, 전체적으로 배양 결과는 큰 차이가 없지만 pH6, pH7에서 조금 더 좋은 결과를 나타냄. pH6에서 최적성장을 나타냄

2. *Candida rugosa*의 standard curve

YM배지 50ml에 *C. rugosa* colony 접종, 48 hr. incubation 후 500ml flask 10개에 (각각 YM 100ml) 배양된 *C. rugosa*를 1ml씩 접종, 다시 48 hr. incubation 꺼내어서 500ml bottle 2개에 같은 양을 나누어 넣는다. 2800rpm에서 5min분간 centrifuge, 상등액 제거 후 bottle두개중 한 개의 침전물을 D.W.로 씻어서(물의 양은 되도록 40ml를 넘지 많지 한다.) 나머지 bottle에 합친다.

50ml conical tube에 모두 옮기고 centrifuge (2800rpm, 5min.)한다. 상등액 제거 후 D.W.로 25ml까지 맞춘다. vortexing으로 resuspention한 후 10ml, 10ml, 5ml 3종류로 구분하여 10ml 두개는 각각 건조(90℃), 5ml는 Abs값을 측정하였다.

Table 34. 균체 건조 중량 환산

균체 건조중량(g/100ml)	0.1251
균체 건조중량(g/ml)	0.001251
균체 건조중량($\mu\text{g}/\text{ml}$)	1.251

Table 35. 희석배수에 따른 600nm와 660nm 각각의 파장에서 측정된 abs값에 따른 cell mass

<i>C. rugosa</i> standard curve			
	cell mass($\mu\text{g}/\text{ml}$)	660nm	600nm
	1.251		
x 400	0.003	0.189	0.181
x 300	0.004	0.260	0.248
x 200	0.006	0.371	0.353
x 100	0.013	0.539	0.516
x 70	0.018	0.838	0.806

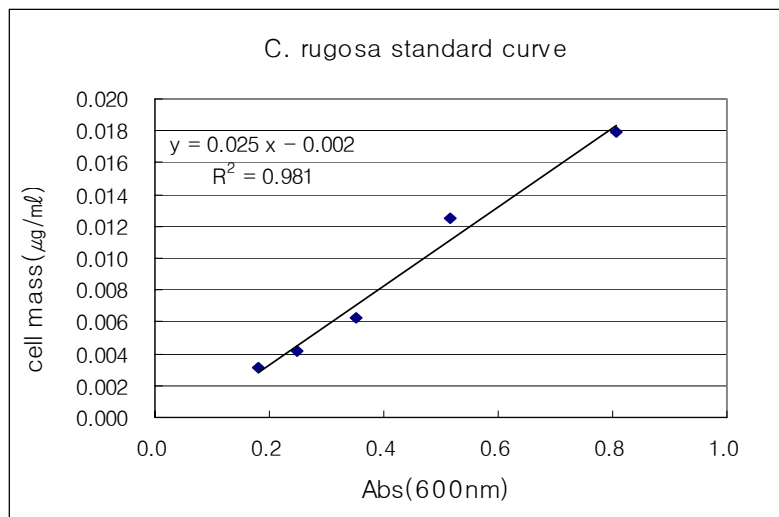


Fig 33. 600nm에서의 *C. rugosa* standard curve

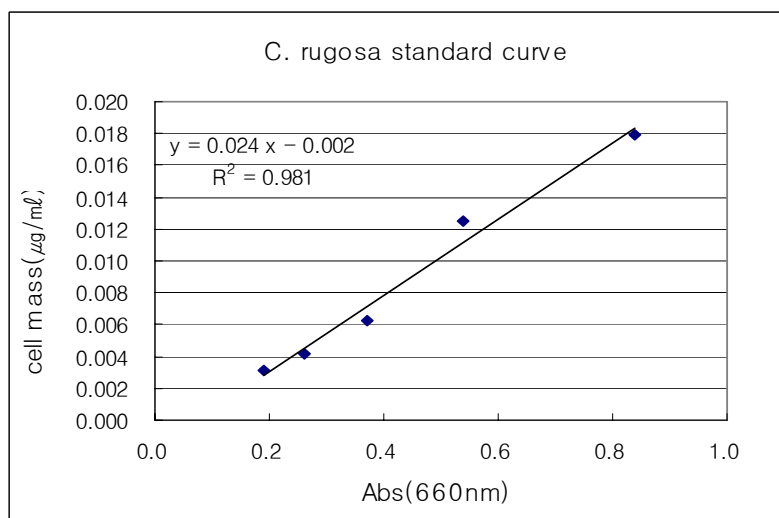


Fig 34. 660nm에서의 *C. rugosa* standard curve

6절. 시제품 생산 연구



30L 발효기에서 최초 seed 배양을 실시한다.
발효조건은,
pH 6, 온도 30℃, 80~100rpm의 조건으로 배양하여 최종 3KL 발효기로 scale up한다.



30L → 200L → 500L → 3KL 발효기로 scale up한다.
균주는 각 발효기에 연결된 관을 통해서 이동한다.



샘플링하기전 증기살균하는 과정



약 4~5시간 마다 샘플링 후 cell mass를 측정한다.
cell mass는 UV-Spectrophotometer를 이용해 600nm에서 측정한다.
성장곡선을 이용하여 대수기 정점에서 scale up을 실시한다.



배양된 균주는 배양배지와 분리 위해 원심분리를 실시한다.
15,000rpm의 속도로 30분간 원심분리 후 배양액을 수세하는 과정을 반복 실시한다.



원심분리기를 통해 얻은 균주를 동결건조기를 이용하여 동결건조시켜 제품화 한다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

Yeast로부터 특정아미노산을 과잉생산하기 위한 가장 빠르고 쉬운 방법은 yeast를 threonine, tryptophan의 analogue들에 대하여 저항성을 갖도록 하는 것이다.

1차 년도에서는 저항성을 갖는 균주를 선정하기 위해 yeast 중 아미노산 analogue에 저항성을 갖지 않는 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* X2180 mating type(α)를 선정하였으며, 본 실험에 사용할 analogue를 선정하기 위해 tryptophan analogue로 알려진 indole, indoleacrylic acid, fluorotryptophan과 threonine analogue로 알려진 serine, β-hydroxynorvaline에 대한 균주의 저항성을 측정하였다. 측정 결과, tryptophan analogue에서는 fluorotryptophan가 균주의 성장을 저해하는 것으로 나타났으며, threonine analogue에서는 β-hydroxynorvaline에서 성장 저해가 나타났으므로 본 실험에 이 두 analogue를 이용하기로 선정하였다. 아미노산에 대한 균주의 sensitivity를 측정하기 위해 MIC test 결과 0.1mM fluorotryptophan의 농도에서부터 생육 저지대가 관찰되었다. 동일한 방법으로 threonine analogue에 대한 실험 결과 2.5mM β-hydroxynorvaline의 농도에서 생육 저지대가 관찰되었다. 한편, 본 실험에서 analogue 저항성 균주의 screening은 wild type의 MIC 농도보다 높은 농도인 2mM fluorotryptophan과 10mM β-hydroxynorvaline으로 결정하였다. Analogue 농도 결정 후 *S. cerevisiae*를 가지고 UV mutagenesis 하여 64개의 tryptophan analogue 저항성 균주를 선정하였으며 31개의 threonine analogue 저항성 균주를 선정하였다. 선정된 균주를 가지고 amino acid의 함량을 측정하기 위해 Pico-tag method를 이용해 HPLC로 분석하였다. 그 결과 Tryptophan analogue 저항성 균주인 W5-35와 wild type의 세포내 total amino acid 함량에 대한 tryptophan 함량을 측정해 본 결과 wild type의 0.081%에 비해 약 27%가 높은 0.103%의 함량을 나타냈으며 이 균주의 세포 배양액을 wild type과 비교한 결과 wild type의 0.43% 보다 72%가 높은 0.74%의 tryptophan 함량을 가진 것으로 나타났다. 또한 threonine analogue 저항성 균주인 T5-1균주를 비교 실험한 결과 세포내 threonine 함량에서는 wild type에 비해 약 12.7%의 증가를 보여 차이가 크지 않았으나 세포 배양액에 있어서 wild type의 threonine 함량 6.07%보다 약 66%가 높은 10.08%의 threonine 함량을 가진 것으로 나타났다.

2차년도에서는 1차년도 실험결과 Trp, Thr over-production mutant로 선정된 W5-35와 TC5-1중 amino acid 함량이 높은 TC5-1을 가지고 복합 저항성 균주 개발에 이용하기로 했다. TC5-1의 MIC test 결과 0.1 mM fluorotryptophan의 농도에서부터 생육 저지대가 관찰되었으며 본 실험에서 tryptophan analogue 저항성 균주의 screening은 MIC 농도보다 높은 농도인 2.5 mM fluorotryptophan으로 결정하여 다음 실험에 이용하였다. 선정된 TC5-1을 가지고 EMS mutagenesis하여 8개의 colonies(TC6 mutants)를 분리하였다. 분리된 8개의 mutant를 가지고 amino acid 분석 결과 TC6-1은 tryptophan과 threonine이 intracellular에선 4.5배 정도 대량생산되었으며 harvested cell 자체로는 threonine은 TC5-1에 비해 20%

overproduction 하였고 tryptophan은 많은 차이를 보이지 않았다.

3차년도에서는 *candida* 석유효모를 가지고 amino acid 저항성 강화 균주를 개발하였다. 3차년도에는 1, 2차년도에서 확립된 실험방법을 토대로 실험에 임하였다. 먼저 *candida* 균주들 중 *candida rugosa*를 선정하여 각각의 analogue에 대해 MIC test한 결과 0.1 mM fluorotryptophan의 농도에서부터 생육 저지대가 관찰되었으며 본 실험에서 analogue 저항성 균주의 screening은 MIC 농도보다 높은 농도인 2mM fluorotryptophan으로 결정하였다. analogue 농도 결정 후 *C. rugosa*를 가지고 EMS mutagenesis 하여 결정된 analogue plate에 spreading하여 50개의 mutant를 얻었다. 선정된 50개의 mutant를 amino acid 분석 결과 amino acid함량이 가장 높은 C3의 경우 wild type에 비해 tryptophan 함량은 1.6배, threonine 함량은 2배 정도 높게 overproduction한 것으로 나타나 *candida*의 경우에도 3차년도 연구 목표인 analogue 강화 균주 개발 목표를 달성하였다.

본 연구과제는 threonine과 tryptophan을 함유하는 효모를 생산하여 연간 30억원 정도의 아미노산의 원가를 절감하고 60억원 정도의 수입대체효과를 기대할 수 있으리라 생각되며 기업체에서 실용화연구를 수행할 수 있을 것이다. 연구가 완료되면 곧 실용화하여 산업적으로 활용할 수 있으며, 산업화를 위하여서는 시제품을 산업규모로 생산하여 가공하여 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

추가적으로 연구 및 조사한 석유효모가 현재의 효모의 가격 중 가장 저렴하여 이들 공급업체들과 연계하여 매우 저렴한 가격으로 공급하는 기반을 마련할 것이다. 참여기업은 이들 외국회사와 기술적으로 연계하고, 수입을 하여 고부가가치화 하여 비싼 아미노산의 수입을 줄일 것으로 생각된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1절. 연구성과

1. 논문: 4건

- 1) Kim, S.H , Y.M Ha, H.J Youm, G.H An, B.D Lee, M.S Won, K.B Song. 2004. Isolation of tryptophan overproducing strain by EMS mutagenesis of *Candida rugosa*. J. Food Sci. Nutr. 9: 187-189.
- 2) 염형준, 이승현, 김선혜, 전남규, 안길환, 이봉덕, 원미선, 송경빈. 2004. Trp, Thr analogue 복합 저항성 *Saccharomyces cerevisiae* 균주 개발. 한국 식품 영양과학회지. 33(6): 1017~1021
- 3) 이봉덕, 장애무, 오홍록, 이수기, 안길환. 2004. Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance and meat quality in broilers. 한국가금학회지. 31(1): 1-7
- 4) An, G.H , A.J. Sinskey. 2003. Effect of catabolic threonine dehydratase expression on isoleucine production in the threonine producing recombinant of *Corynebacterium lactofermentum ATCC 21799*. Food Science and Biotechnology. 12: 137-141.

2. 학술회의 논문 발표 : 5건

- 1) Kim, S.H , H.J Youm, G.H An, B.D Lee, M.S Won, K.B Song .2001. Improved production of amino acids from a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. . 한국식품과학회발표(제주대)
- 2) Kim, S.H , H.J Youm, G.H An, B.D Lee, M.S Won, K.B Song .2002. Improved production of threonine and tryptophan from a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*.. 한국식품영양과학회발표(경상대)
- 3) Yeom, H.J, S.H Lee, S.H Kim, N.K Sun, G.H An, B.D Lee, K.B Song. 2004. Isolation of Trp, Thr overproducing strain of *Saccharomyces cerevisiae*. 한국식품과학회 발표(용평)
- 4) Yeom, H.J, S.H Kim, Y.M Ha, G.H An, B.D Lee, K.B Song. 2004. Isolation of tryptophan overproducing strain by EMS mutagenesis of *Candida rugosa*. 2004. 6 한국식품과학회 발표(용평)
- 5) Zhang, A.W, B.D Lee, D.J Yu, K.W Lee, G.H An. 2004. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on growth performance and meat quality of broiler chickens. XXII World's Poultry Congress Book of Abstracts. 세계가금학회(터어키)

3. 논문제출: 2건

- 1) Zhang, A.W , B.D. Lee, K.W. Lee, K.B. Song, G.H. Ahn, C.H. Lee, Effects of graded levels of dietary *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance and meat quality in broiler chickens. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*
- 2) Zhang, A.W., B.D. Lee, K.W. Lee, K.B. Song, G.H. An, C. H. Lee. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. *Poultry Science*

2절. 활용계획

1. Threonine과 Tryptophan을 함유하는 효모를 생산하여 기업체에서 실용화연구를 수행한다. 이를 위해 경제성 분석 등 실무 차원에서 검토한다.
2. 산업화를 위하여 개발된 균주를 산업규모로 생산하여 (5-50톤) 가공하여 사용한다.
3. 추가적인 연구 및 조사로는 러시아 등의 석유효모가 현재의 효모의 가격중 가장 싼데 이들 공급업체들과 연계하여 매우 싼가격으로 (kg당 1000원 이내) 공급하는 기반을 마련한다. 참여기업은 이들 외국회사와 기술적으로 연계하고, 수입을 하여 고 부가가치화 하여 비싼 아미노산의 수입을 줄인다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

균주 개발과 관련해서 아미노산을 직접 생산하기 위한 연구는 아미노산 다 생산국가(미국, 일본, 한국)의 연구는 매우 많으나, 이들 균주를 직접 이용(중소기업에 타당하다 사료됨)하는 연구는 아직까지 없었다.

연구과정에서 부차적으로 효모를 닭에게 공급하였을 때 육즙이나 육질이 좋아진다는 결과가 나왔다. 그러나 외국에서의 이러한 연구는 전무한 편이다.

제 7 장 참고문헌

1. Allen, R. M. D. 1991. Ingredient analysis table: 1991 edition. *Feedstuffs* 63(29):29.
Crumplen R, D'Amore T, Panchal CJ, Russell I, and Stewart GG, 1989. Industrial uses of yeast: Present and future yeast. *Yeast (Special issue)* 5:3.
2. Edmonds, M. S., C. M. Parsons, and D. H. Baker. 1985. Limiting amino acids in low-protein corn-soybean meal diets fed to growing chicks. *Poultry Sci.* 64:1519-1526.
3. Eisen, E. J., B. B. Bohren, and H. E. McKean. 1962. The Haugh unit as a measure of egg albumin quality. *Poultry Sci.* 41:1461-1468.
4. Engster, H. M., N. A. Cave, H. Likuski, J. M. McNab, C. M. Parsons, and F. E. Pfaff. *Poultry Sci.* 64:487-498.
5. Fernandez, S. R., Y. Zhang, and C. M. Parsons. 1995. Dietary formulation with cottonseed meal on a total amino acid versus a digestible amino acid basis. *Poultry Sci.* 74:1168-1179.
6. Krause OG, Richarson CR Castleberry RE and Cobb CW 1989. Biological response of chicks fed sorghum grain based diets with added grain specific enzymes mixture and yeast. *Texas Tech of Agriculture Science, Lubbock.* T5.263:7.
7. Krueger WF, Kassongue A, Ganguy RC 1990. Effect of yeast added to the diet of broiler on performance to 28to 49 days of age. *Poultry Sci.* 69:75 (Abstr).
8. Newman, K. 1994. Mannan-oligosaccharides: Natural polymers with significant impact on the gastrointestinal microflora and the immune system. pp. 167-174 *in: Biotechnology in the Feed Industry. Proc. Alltech's 10th Annual Symp.* T. P. Lyons and K. A. Jacques Ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
9. Phillips WA, and Von Tungeln KL 1984. Effect of adding yeast culture to the receiving ration of stressed stocker calves. Page 117 *in: Anim. Sci. Rep. MP 116.* Oklahoma State Univ., Agric. Exp. Station, Stilwater, OK.

10. Sibbald, I. R., J. D. Summers, and S. J. Slinger. 1960. Factors affecting the metabolizable energy content of poultry feeds. *Poultry Sci.* 39:544-556.
11. Sibbald, I. R. 1976. A bioassay for true metabolizable energy in feedingstuffs. *Poultry Sci.* 55:303-308.
12. Yoshida M 1975. Yeast grown on n-paraffin as future poultry feed. *World's Poultry Sci.* 31:221.
13. Martin-Rendon, E., Farfán, M.J., Ramos, C., and Calderon, I.L. (1993) Isolation of a mutant allele that deregulates the threonine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 24, 465-471
14. Farfán, M.J., Calderon, I.L. (2000) Enrichment of threonine content in *Saccharomyces cerevisiae* by pathway engineering. *Enzyme and Microbial Technol.*, 26, 763-770
15. Delgado, M.A, Guerrero, J, and Conde, J. (1982) Genetic and biochemical study of threonine-overproducing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell. Biol.* 2, 731-736
16. Martínez-Force, E., and Benítez, T. (1992) Selection of amino-acid overproducer yeast mutants. *Curr. Genet.*, 21, 191-196
17. Riccardi, G., Sora, S., and Ciferri, O. (1981) Production of amino acids by analog-resistant mutants of the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J. Bacteriol.*, 147, 1002-1007
18. Ramos, C., and Calderon, I.L. (1992) Overproduction of threonine by *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to hydroxynorvaline. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1677-1682
19. Ramos, C., Delgado, M.A., and Calderon, I.L. (1991) Inhibition by different amino acids of the aspartate kinase and the homoserine kinase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS.*, 278, 123-126
20. Grenson, M., Hou, C., and Crabeel, M. (1970) Multiplicity of the amino acid permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 103, 770-777
21. Moyed, H.S. (1960) False feedback inhibition : Inhibition of tryptophan biosynthesis by

5-methyltryptophan. 235, 1098-1102

22. Guan-Chiun LEE, Li-Chiun LEE, Vasyi SAVA and Jei-Fu SHAW (2002) Multiple mutageneses of non-universal serine codons of the *Candida rugosa* LIP2 gene and biochemical characterization of purified recombinant LIP2 lipase overexpressed in *Pichia pastoris*. Biochem. J., 366, 603-611
23. Goran kronvall and inga karlsson, (2001) Fluconazole and voriconazole multidisk testing of *candida* species for disk test calibration and MIC estimation. Journal of clinical microbiology, 39, 1422-1428
24. 김경자. 1993. Production of Threonine Using Methanol Dehydrogenase and Serine Hydroxymethyltransferase in a New Methylophilic Bacterium KJ29. Kor. J. Microbiol. Biotechnol . 577-581
25. Coln, G. E., M. S. M. Jetten, T. T. Nguyen, M. E. Gubler, M. T. Follettie, A. J. Sinskey, and G. Stephanopoulos. 1995. Effect of inducible *thrB* expression on amino acid production in *Corynebacterium lactofermentum* ATCC 21799. Appl. Environ. Microbiol. 61:74-78.
26. Crumplen R, D'Amore T, Panchal CJ, Russell I, and Stewart GG, 1989. Industrial uses of yeast: Present and future yeast. Yeast (Special issue) 5:3.
27. Delgado, M,A, Guerrero, J, and Conde, J. (1982) Genetic and biochemical study of threonine-overproducing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol.Cell. Biol. 2, 731-736
28. Farfán, M.J., Calderon, I.L. (2000) Enrichment of threonine content in *Saccharomyces cerevisiae* by pathway engineering. Enzyme and Microbial Technol., 26, 763-770
29. Maria-jose Fafan , Isabel L.calderon. 1999 . Enrichment of threonine content in *Saccharomyces cerevisiae* by pathway engineering. Enzyme and Technology 26 (2000) 763-770
30. Martínez-Force, E., and Benítez, T. (1992) Selection of amino-acid overproducer yeast mutants. Curr. Genet., 21, 191-196.

31. Miyajima, R., and I. Shii. 1972. Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. Effects of isoleucine and valine on threonine dehydratase activity and its formation. J. Biochem. 71:951-960.
32. Moyed, H.S. (1960) False feedback inhibition : Inhibition of tryptophan biosynthesis by 5-methyltryptophan. 235, 1098-1102
33. Ramos, C., and Calderon, I.L. (1992) Overproduction of threonine by *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to hydroxynorvaline. Appl. Environ. Microbiol., 58, 1677-1682
34. Ramos, C., Delgado, M.A., and Calderon, I.L. (1991) Inhibition by different amino acids of the aspartate kinase and the homoserine kinase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS., 278, 123-126
35. Riccardi, G., Sora, S., and Ciferri, O. (1981) Production of amino acids by analog-resistant mutants of the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. J. Bacteriol., 147, 1002-1007

- 부록 1- <Asian-Aust. J. Anim. Sci. 에 투고중인 논문입니다 >

Effects of Graded Levels of Dietary *Saccharomyces cerevisiae* on Growth Performance and Meat Quality in Broiler Chickens ¹

A. W. Zhang^{*2}, B. D. Lee^{*3}, K. W. Lee^{*4}, K. B. Song[†], G. H. An[†] and C. H. Lee[†]

**Department of Animal Science and Department of Food Science and Technology,*

Chungnam National University, Daejeon, South Korea 305-764

Genebiotech Ltd., Gyungchun-li, Geryong-myun, Gongju-si, Chungnam, Korea 314-831

(Running title: *S. Cerevisiae* and Meat Quality in Broiler Chickens)

Corresponding Author: B. D. Lee

Tel: +82-42-821-5778, Fax: +82-42-825-9754, E-mail: leebd@cnu.ac.kr

1. This work was supported by ARPC under the Ministry of Agriculture and Forestry.
2. Present address: ChineseMedicine Materials College, Jilin Agricultural College, Changchun City, China
3. To whom correspondence should be addressed: leebd@cnu.ac.kr
4. Present address: Pathology Division, National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang, Korea 430-824

ABSTRACT: An experiment was conducted to investigate the effects of various levels of dietary *Saccharomyces cerevisiae* (SC) on the growth performance and meat quality (i.e., tenderness and oxidative stability) of broiler chickens. Day-old 240 broiler chicks were fed one of the four experimental diets with graded levels of SC at 0.0, 0.3, 1.0, and 3.0%. Each treatment consisted of six cages with 10 chicks per cage. Feed and water were provided *ad libitum* throughout the experiment that lasted 5 wk. Birds were switched from starter to finisher diets at 3 wk of age. The average BW gains of broiler chickens increased (linear $p < 0.05$) during either 0–3 or 0–5 wk of age as SC levels in diets increased. A linear effect ($p < 0.05$) of SC on feed intake during either 4–5 wk or 0–5 wk of ages was also monitored. The addition of SC to the control diet significantly lowered shear forces in raw breast, raw thigh and cooked drumstick meats (linear $p < 0.05$). Upon incubation, 2-thio-barbituric acid-reactive substances (TBARS) values increased gradually in breast and thigh meats while more dramatic increase was noted in skin samples. The TBARS values of either breast or thigh meats was not significantly affected ($p > 0.05$) by dietary treatments up to 10 d of incubation. At 15 d of incubation, TBARS values of breast and thigh meats from all SC-treated groups were significantly lower ($p < 0.05$) than that of the control. It appears that dietary SC could enhance growth performance of broiler chickens, and improve tenderness and oxidative stability of broiler meats.

(KEY WORDS: *S. Cerevisiae*, Growth Performance, Meat qualities, Broiler Chickens)

INTRODUCTION

Various strains of *Saccharomyces cerevisiae* (SC) have long been fed to animals as a source of unknown growth factor. It was reported that feeding SC to chickens improved weight gain and feed/gain ratio (Onifade et al., 1999 and 2000). On the other hand, Madriqal et al. (1993) failed to observe the positive effect of feeding SC on body weight in broiler chickens. In addition to growth performance, there are literature data (Akiba et al., 2001; Lee et al., 2002) showing that enrichment of diets with yeast could favorably improve broiler meat quality. Specifically, edible meats sampled from broiler chickens fed a diet containing SC exhibited increased tenderness (Bonomi et al., 1999), and increased water-holding capacity (Lee et al., 2002). However, the effect of SC supplementation on oxidative stability of chicken meat was not extensively studied albeit there are indicatives (Meyer et al., 1994; Ampel et al., 2000) that SC may possess antioxidant property. Thus, the present study was conducted to evaluate the effects of graded levels of dietary SC on growth performance and meat quality of broiler chickens. Meat qualities were monitored by observing shear force and oxidative stability as measured by 2-thio-barbituric acid-reactive substances (TBARS) values in this study.

MATERIALS AND METHODS

Animals, Diets and Experimental Design

Day-old 240 male broilers (Ross) chicks were randomly allotted to 24 wire-floored, suspended cages in a temperature-controlled room. Continuous lighting was provided throughout the 5-wk experimental period. The room temperature was gradually decreased from 32C on Day 0 to 25C on Day 21 and was kept constant thereafter. There were four dietary treatments, each consisting of six replicates. A replicate was identical to a cage with 10 birds so that each treatment had 60 chicks. Broiler starter and finisher diets were formulated (Table 1) and used as a control diet (SC 0%). Three levels of SC (Choheung Chemical Industrial Co. Ltd., Ansan, Kyunggi-do, Korea) were added to the control diet to give 0.3, 1.0, or 3.0% SC in diets, respectively, at the expense of soybean meal. Feed and water were provided *ad libitum* throughout the experiment that lasted 35 d.

Body Weight and Feed Intake Measurements

Body weight (BW) was measured by cage at 1, 21 and 35 d of ages. Feed intake was monitored by cage at 21 and 35 d of ages. Feed intake per cage and weight gain per cage were used to calculate feed/gain ratios.

Collection of Meat and Skin Samples

On the last day of 5-wk feeding trial, one bird from each cage (replicate) close to mean BW was slaughtered by bleeding the carotid artery. Immediately after the slaughter, chickens were de-feathered, and trimmed to obtain breast, thigh and drumstick meats with skins on them. Then, one half of breast and thigh meats, and whole skins sampled were stored at -20C until required for the lipid oxidation assay. The rest of breast and thigh meats, and whole drumstick meats were stored at 4C prior to the measurement of shear force.

Measurement of Shear Force

Prior to the measurement of shear force, drumstick was cooked at 75 C whereas fresh breast and thigh meats were used for the assay. They were cut into square shape (35 x 25 x 6 mm), and then subjected to the measurement of shear force. An application of cutting force to the meat samples was performed using a TA-XT2 Texture Analyzer equipped with a TA-7 Warner-Bratzler Blade (Stable Micro Systems Ltd. Surrey, England, UK). Maximum shear force (kg) was applied threetimes ($n=3$) per sample. Shear force is defined as hardness of meat.

Measurement of TBARS Values

When required for analysis, breast and thigh meat samples that had been stored at -20C were thawed at 4C, deskinning and homogenized. Six sub-samples weighing approximately 2.5 g each from breast and thigh samples were weighed into 50-mL screw-capped centrifuge tubes and subsequently incubated at 30C for 0, 1, 3, 6, 10, and 15 d. Following incubation, each sub-sample was immediately subjected to malondialdehyde acid (MDA) assay for measuring the extent of lipid oxidation. MDA, a secondary oxidation product, was determined by the method of Sushil and Meliss (1997) with minor modifications. The amounts of TBARS were expressed as mg MDA per kg of sample. The oxidative stability in skin samples was also measured as outlined for breast and thigh samples except for the homogenization step. Intact skin samples were incubated from 0 to 15 d. Immediately after incubation, samples were homogenized (Polytron PT-MR 2100, Switzerland by Kinemacia AG.) with 6 mL of 20% trichloroacetic acid and further processed as described above in order to measure the TBARS values.

Statistical Analysis

All data were evaluated by one-way ANOVA using the GLM procedure (SAS, 2000). Polynomial contrasts (linear, quadratic and cubic) were used to test the effects of graded levels of SC on BW gain, feed intake, feed/gain ratio, and shear force. In addition, significant differences of mean TBARS values between dietary treatments were analyzed by repeated measures and Tukey test in the GLM procedure (SAS, 2000). The level of statistical significance was pre-set at $p<0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Growth Performance

In Table 2 were shown the growth performance of broiler chickens fed graded levels of *SC*. At 3 wk of age, the BW gains were linearly ($p < 0.05$) increased by on average 4.2, 7.8, and 13.2% in birds fed on 0.3, 1.0 and 3.0% *SC*, respectively, as compared to those fed the control diet. Growth-promoting effect of *SC* that observed at 3 wk of age was also observed at 5 wk of age being the significant increase (linear $p < 0.05$) in group-mean BW by 6.4, 7.6, and 10.2%, respectively, for birds fed on *SC* added at 0.3, 1.0 and 3.0%, respectively, when compared to the control group. Group-mean feed intake at 3 wk of age was not affected ($p > 0.05$) by dietary treatments. However, feed intake increased as the *SC* levels in the diets increased (linear $p < 0.05$) during either 4-5 wk of age or 0-5 wk of age. The feed/gain ratios tended to be lower in all *SC*-fed groups, however, no significant difference was detected between the control and *SC* treatments ($p > 0.05$).

The present study indicates that diets enriched with *SC* could improve BW gains and feed/gain ratios of broiler chickens. In this regard, our study corroborates well with earlier studies showing the positive effect of feeding yeast on growth performance in chickens (Valdivie, 1975; Onifade et al., 1999). On the contrary to our study, Madriqal et al. (1993) reported that dietary *SC* failed to improve the BW gain of chickens.

It has been shown that the addition of yeast into broilers' diet could prevent the colonization of *Salmonella* whether or not the chickens inoculated were subsequently challenged either with (Line et al., 1997) or without (Line et al., 1998) transport stress. Feeding *SC var. boulardii* to poults increased BW gain that could be associated with a decrease in either goblet cells per millimeter of villus height or crypt depth in the ileum (Bradley et al., 1994). Similarly, cell-wall component of *SC* added at the level of 0.2% in broilers' diet significantly increased BW gains with a reduction in crypt depth and an increase in villus height when compared to the no-added groups (Santin et al., 2001). Thus, it is likely that *SC* could either improve the efficacy of immune response or stabilize intestinal microflora, or both, thus leading to better growth performance of broiler chickens as shown in this study.

Shear Force of Meat

The addition of *SC* to a corn-soybean meal base control diet significantly lowered the shear force in raw breast, raw thigh and cooked drumstick meats (linear $p < 0.05$; Table 3). The shear force values of raw breast and thigh meats tended to be higher than that from cooked drumstick. Our study suggests that the dietary supplementation of *SC* could improve meat tenderness of broilers in a dose-dependent manner.

The amount of collagen in muscle has been used as a measure of muscle desirability or tenderness. The result (Table 3) suggests that the dietary supplementation of *SC* increases meat tenderness of broilers, though the reason is not clear. The probable reason is that *SC* prevents glycogen loss in drumstick muscle and so improves meat texture. There are some other factors which affect the meat tenderness. According to Silva et al. (1999), cooking loss and juiciness were significantly ($p < 0.001$) correlated with tenderness. Bouton et al. (1973) speculated that increased water holding capacity of meat of high pH contributes to their increased tenderness. The ultimate pH values also contribute to tenderness (Bouton et al., 1971, 1973; Purchas, 1990; Jeremiah et al., 1991; Purchas and Aungsupakorn, 1993; Guignot et al., 1994; Dransfield, 1996). The result (Table 3) suggests that the dietary supplementation of *SC* increases meat tenderness of broilers, though the reason is not clear.

TBARS Values of Meat and Skin

The effects of dietary *SC* on TBARS values of breast and thigh meat samples, and skin samples were shown in Figures 1, 2, and 3, respectively. Initial TBARS values were comparable among breast and thigh meats, and skin samples, ranging from 0.18 to 0.36 mg MDA per kg of samples at the beginning of incubation. Upon incubation, TBARS values increased gradually in breast and thigh meats (Figures 1 and 2) while more dramatic increase in skin samples (Figure 3). The slopes of the increase in TBARS values against incubation time were relatively slack in breast and thigh meats as compared with those in skin samples. The TBARS values of either breast or thigh meat was not significantly affected ($p > 0.05$) by dietary treatments up

to 10 d of incubation. At 15 d of incubation, the TBARS values of both breast and thigh meat samples from broiler chickens fed diets enriched with SC was significantly lower ($p < 0.05$) than those of control chickens. The TBARS values measured at 15 d of incubation were ranged from 1.54 to 1.82 mg MDA per kg of thigh meat and from 2.28 to 3.57 mg MDA per kg of breast meat. The TBARS values of skin samples measured at 15 d of incubation was apparently higher than those of thigh meat being ranged from 3.54 to 4.20 mg per kg of skin samples and those of breast samples being intermediate.

The results (Figures 1, 2, and 3) provide the evidence that supplementation of SC into a corn-soybean meal base control diet could increase the oxidative stability of broiler meat in dose-dependant manner. It may indicate that there are some antioxidant factors in SC or SC may make the meat containing less oxidative fat (or fatty acids). Many workers (Meyer et al., 1994; Ampel et al., 2000) indicated that some antioxidant factors are present in SC. However, as shown in Figures 1, 2, and 3, the speeds of oxidation were the same in both treatments at the early stage of incubation. If an antioxidant(s) from SC contributed to the lowered oxidation, the graphs should show different pattern at the early stages of incubation. Alternatively, our study may indicate that meats from the chickens fed SC contain less oxidative fat (or fatty acids). Although fatty acid compositions of meats were not measured in this study, it has been reported that lipid deposition was significantly lowered by feeding yeast to broiler chickens (Akiba et al., 1982; Bolden et al., 1984; Mendonca et al., 1984; Takahashi and Jensen, 1984) and to laying hens (Akiba et al., 1983; Bolden and Jensen, 1985; Brenes et al., 1985; Takahashi and Jensen, 1985).

It can be concluded from this study that feeding of SC to broiler chickens could improve growth performance in a dose-dependent manner. Dietary SC can also improve meat tenderness and the oxidative stability of broiler meats.

ACKNOWLEDGMENT

This research was funded by the Ministry of Agriculture and Forestry of Korea.

REFERENCES

- Akiba, Y., L. S. Jensen and M. S. Lilburn. 1982. Effect of estrogen implants on hepatic lipid deposition in chicks fed different isonitrogenous and isocaloric diets. *J. Nutr.* 112: 189-196.
- Akiba, Y., L. S. Jensen and C. X. Mendonca. 1983. Laboratory model with chicks for assay of nutritional factors affecting hepatic lipid accumulation in laying hens. *Poult. Sci.* 62: 143-151.
- Akiba, Y., K. Sato and K. Takahashi. 2001. Meat color modification in broiler chickens by feeding yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentrations of astaxanthin. *J. Appl. Poult. Res.* 10: 154-161.
- Ampel, M., N. Mirsky and S. Yannai. 2000. Prevention of lipid oxidation by glucose tolerance factor. *Czech J. Food Sci.* 18: 142-143.
- Bolden, S. L., L. S. Jensen, and K. Takahashi. 1984. Responses in calcium and phosphorus metabolism and hepatic lipid deposition among estrogenized chicks fed various dietary ingredient. *J. Nutr.* 114: 591-597.
- Bolden, S. L. and L. S. Jensen. 1985. The effect of marginal levels of calcium, fish meal, torula yeast and alfalfa meal on feed intake, hepatic lipid accumulation, plasma estradiol, and egg shell quality among laying hens. *Poult. Sci.* 64: 937-946.
- Bonomi, A., B. M. Bonomi, A. Quarantelli and A. Orlandi. 1999. Organic chromium in the feeding of broiler chickens. *Riv. Sci. Aliment.* 28: 385-397.
- Bouton, P. E., P. V. Harris and W. R. Shorthose. 1971. Effect of ultimate pH upon the water-holding capacity and tenderness of mutton. *J. Food Sci.* 36: 435-439.
- Bouton, P. E., F. D. Carroll, P. V. Harris, and W. R. Shorthose, 1973. Influence of pH and fibre contraction state upon factors affecting the tenderness of bovine muscle. *J. Food Sci.* 38: 404-407.
- Bradley, G. L. and T. F. Savage. 1994. Dietary interaction between turkey breeder hen genotype and the feeding of a yeast culture (YC) on hatchability of fertile eggs stored 0-4, 5-9 and 10-14 days prior to incubation. *Poult. Sci.* 73:

124 (Abstr.).

- Brenes, A., L. S. Jensen, K. Takahashi and S. L. Bolden., 1985. Dietary effects on content of hepatic lipid, plasma minerals, and tissue ascorbic acid in hens and estrogenized chicks. *Poult. Sci.* 64: 947-954.
- Dransfield, E., 1996. The texture of meat: conditioning and ageing. In *Meat quality and meat packaging*. S. A. Taylor, A. R. Raimundo, M. Severini, and F. J. M. Smulders. (Eds). ECCEAMST, Utrecht, The Netherlands, pp. 6587.
- Guignot, F., C. Touraille, A. Ouali and M. Rennerre. 1994. Relationships between post-mortem pH changes and some traits of sensory quality in veal. *Meat Sci.* 37: 315325.
- Jeremiah, L. E., A. K. W. Tong and L.L. Gibson.1991. The usefulness of muscle color and pH for segregating beef carcasses into tenderness groups. *Meat Sci.* 30: 97114.
- Lee, J.-I., Y.-D. Kim, D.-Y. Kim, Y.-I. Choi, J.-N. Ahn, H.-S. Chae and J.-H. Choi. 2002. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance and meat quality of broiler chickens. *Proceedings of Journal of Animal Science and Technology*, p34.
- Line, J. E., J. S. Bailey, N. A. Cox and N. J. Stern. 1997. Yeast treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* populations associated with broiler chickens subjected to transport stress. *Poult.Sci.*, 76: 1227-1231.
- Line, J. E., J. S. Bailey, N. A. Cox, N. J. Stern and T. Tompkins.1998. Effect of yeast-supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broiler. *Poult. Sci.* 77:405-410.
- Madriqal, S. A., S. E. Watkins, M. H. Adams, A. L. Waldroup and P. W. Waldroup. 1993. Effect of an active yeast culture on performance of broilers. *Poult. Sci.* 72: 87 (Abstr.).
- Mendonca, C. X. Jr, K. Takahashi and L. S. Jensen. 1984. Effect of fractions of fish meal and hepatic lipid deposition in estrogenized chicks. *Poult. Sci.* 63: 1020-1026.
- Meyer, A. S., R. Karen and A. N. Jens.1994. Critical assessment of the applicability of superoxide dismutase as an antioxidant in lipid foods. *Food Chem.* 51: 171-175.
- Onifade, A. A., A. A. Odunsi, G. M. Babatunde, B. R. Olorede and E. Muma.

1999. Comparison of the supplemental effects of *Saccharomyces cerevisiae* and antibiotics in low-protein and high-fiber diets fed to broiler chicken. *Arch. Anim. Nutr.* 52: 29-39.
- Onifade, A. A., A. A. Odunsi, Q. A. Adebisi, A. Abubakar, A. E. Enowebot, E. Muma and O. A. Akinsoyinu. 2000. Comparison of the performance of starting pullets fed supplemental baker's or feed-grade yeast in diets containing high levels of palm kernel meal. *Arch. Geflugel.* 64: 264-268.
- Purchas, R.W. 1990. An assessment of the role of pH differences in determining the relative tenderness of meat from bulls and steers. *Meat Sci.* 27: 129-140.
- Purchas, R.W. and R. Aungsupakorn. 1993. Further investigations into the relationship between ultimate pH and tenderness for beef samples from bulls and steers. *Meat Sci.* 34: 163-178.
- Santin, E., A. Maiorka and M. Macar. 2001. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Appl. Poult. Res.* 10: 236-244.
- SAS. 2000. SAS/STAT User's Guide: Version 6. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.
- Silva, J. A., L. Patarata and C. Martins. 1999. Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during ageing. *Meat Sci.* 52: 453-459.
- Sushil, K. J. and P. Meliss. 1997. The effect of oxygen radicals metabolites and Vitamin E on glycosylation of proteins. *Free Rad. Biol. Med.* 22: 593-596.
- Takahashi, K. and L. S. Jensen. 1984. Effect of dietary composition and estradiol implants on hepatic microsomal mixed function oxidase and lipid deposition in growing chicks. *Poult. Sci.* 63: 2217-2224.
- Takahashi, K. and L. S. Jensen. 1985. Liver response to diet and estrogen in white leghorn and Rhode Island Red chickens. *Poult. Sci.* 64: 955-962.
- Valdivie, M. 1975. *Saccharomyces* yeast as a by-product from alcohol production on final molasses in diets for broilers. *Cuban J. Agric. Sci.* 9: 327-331.

Table 1. Composition of the control diet¹

Ingredients	Starter (0–3 wk)	Finisher (4–5 wk)
Corn (%)	59.26	64.63
Soybean meal (44%) (%)	20.52	18.92
Corn gluten meal (%)	9.43	7.17
Rapeseed meal (%)	5.00	3.00
Soybean oil (%)	2.00	3.00
Tricalcium phosphate (%)	1.78	1.27
Limestone (%)	0.88	1.08
Salt (%)	0.40	0.40
DL-methionine (50 %) (%)	0.34	0.16
L-lysine HCl (%)	0.19	0.17
Vitamin premix ² (%)	0.10	0.10
Mineral premix ³ (%)	0.10	0.10
Total (%)	100.00	100.00
Calculated Composition		
ME (kcal/kg)	3,100	3,100
CP (%)	21.50	19.00
Ca (%)	1.00	0.90
Available P (%)	0.45	0.35
Methionine (%)	0.50	0.38
Lysine (%)	1.10	1.00

¹ The four experimental diets were formulated by replacing soybean meal with yeast (*S. cerevisiae*) at 0 (control), 0.3, 1.0, and 3.0%, respectively.

² Provided followings per kilogram of diet: vitamin A, 5,500 IU; vitamin D₃, 1,100 IU; vitamin E, 11 IU; vitamin B₁₂, 0.0066mg; riboflavin, 4.4mg; pantothenic acid, 11mg (Ca-pantothenate: 11.96mg); choline, 190.96mg (choline chloride 220mg); menadione, 1.1mg (menadione sodium bisulfite complex 3.33mg); folic acid, 0.55mg; pyridoxine, 2.2mg (pyridoxine hydrochloride, 2.67mg); biotin, 0.11mg; thiamin, 2.2mg (thiamin mononitrate 2.40mg); ethoxyquin, 125mg.

³ Provided followings per kilogram of diet: Mn, 120 mg Zn, 100 mg Fe, 60 mg Cu, 10 mg I, 0.46 mg; and Ca, min: 150 mg, max: 180 mg

Table 2. Effect of graded levels of *S. cerevisiae* (SC) supplementation on growth performance of broiler chickens

Growth performance /bird	SC, %				Pooled SEM**	Polynomial contrasts		
	0.0	0.3	1.0	3.0		linear	quadratic	cubic
0-3 wk								
BW gain, g	604*	631	654	689	17.1	p<0.05	NS***	NS
Feed intake, g	1073	1081	1085	1120	30.1	NS	NS	NS
Feed/gain	1.78	1.72	1.67	1.64	0.065	NS	NS	NS
4-5 wk								
BW gain, g	801	866	860	863	19.9	NS	NS	NS
Feed intake, g	1482	1511	1561	1560	22.3	p<0.05	NS	NS
Feed/gain	1.86	1.75	1.82	1.82	0.029	NS	NS	NS
0-5 wk								
BW gain, g	1405	1498	1515	1553	28.2	p<0.05	NS	NS
Feed intake, g	2556	2594	2644	2685	41.6	p<0.05	NS	NS
Feed/gain	1.82	1.73	1.75	1.73	0.034	NS	NS	NS

*Values are expressed as the means with six replicates per treatment.

** SEM: standard error of mean.

*** NS: not significant.

Table 3. Effect of graded levels of *S. cerevisiae* (SC) supplementation on shear force in broiler meats

Shear force, kg	SC, %				Pooled SEM**	Polynomial contrasts		
	0.0	0.3	1.0	3.0		linear	quadratic	cubic
Raw breast	6.74*	6.29	6.02	5.80	0.109	p<.05	NS***	NS
Raw thigh	6.14	5.89	5.58	5.40	0.162	p<.05	NS	NS
Cooked drumstick	5.13	4.82	5.02	4.40	0.166	p<.05	NS	NS

*Values are expressed as the means with six replicates per treatment.

**S.E.M.: standard error of mean.

*** NS: not significant.

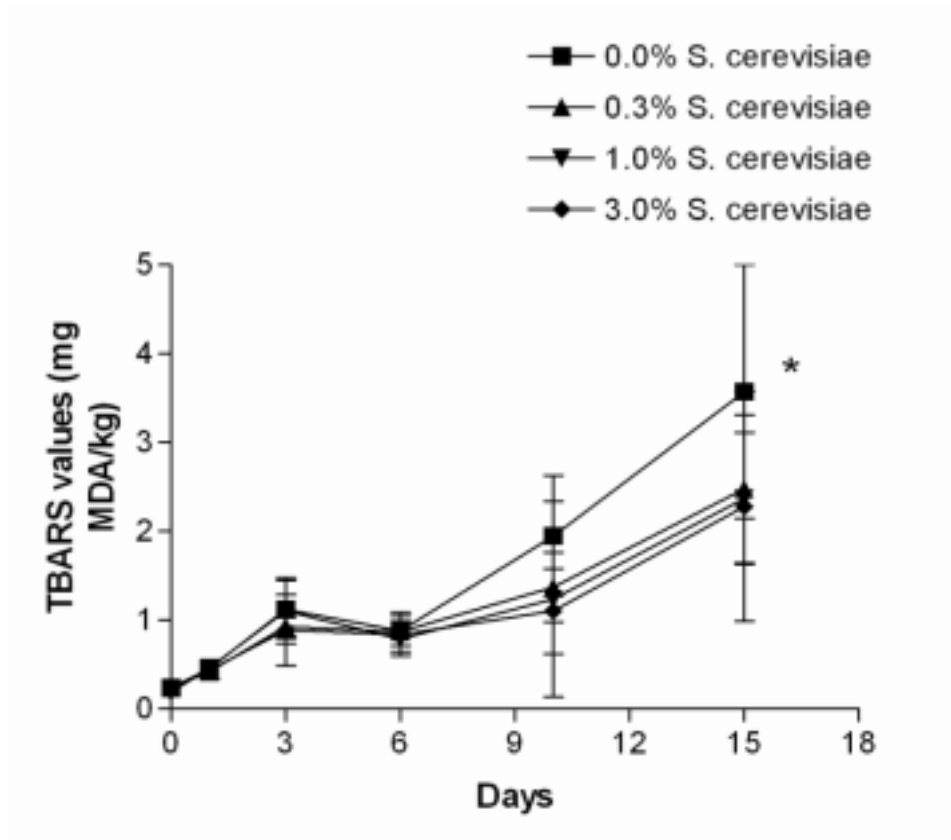


Figure 1. Effect of graded levels of *S. cerevisiae* supplementation on 2-thio-barbituric acid-reactive substances (TBARS) values of breast meat. All data points are mean TBARS values from 6 replicates standard deviation. Asterisk(*) indicates that TBARS values of the control group versus the groups fed diet containing 0.3, 1.0, and 3.0% *S. cerevisiae* were statistically different ($p < 0.05$).

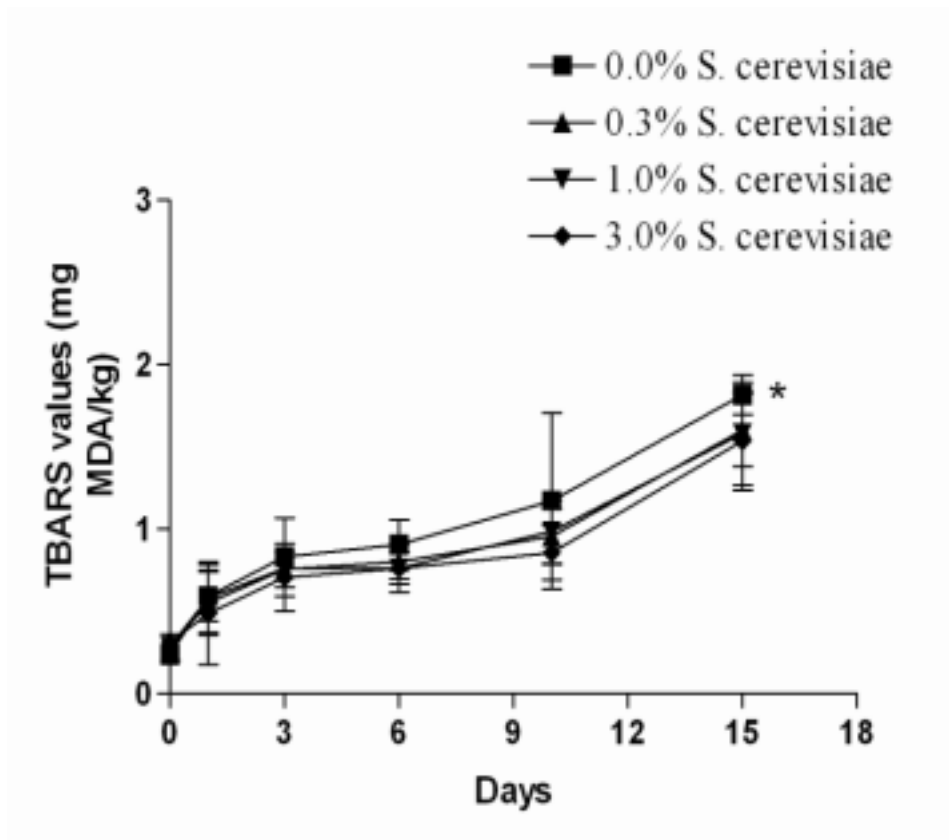


Figure 2. Effect of graded levels of *S. cerevisiae* supplementation on 2-thio-barbituric acid-reactive substances (TBARS) values of thigh meat. All data points are mean TBARS values from 6 replicates standard deviation. Asterisk (*) indicates that TBARS values of the control group versus the groups fed diet containing 0.3, 1.0, and 3.0% *S. cerevisiae* were statistically different ($p < 0.05$).

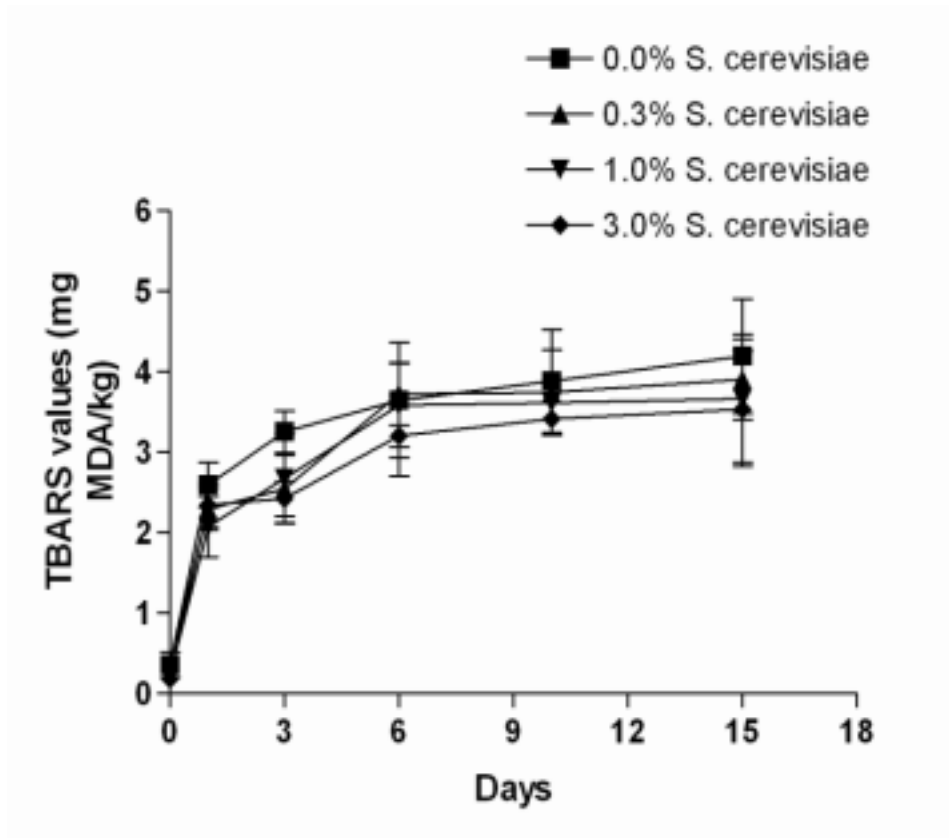


Figure 3. Effect of graded levels of *S. cerevisiae* supplementation on 2-thio-barbituric acid-reactive substances (TBARS) values of skin. All data points are mean TBARS values from 6 replicates standard deviation.

- 부록 2 - <Poultry Science에 제출중인 논문입니다>

Effects of Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Cell Components on Growth Performance, Meat Quality, and Ileal Mucosa Development of Broiler Chicks

A. W. Zhang^{*1}, B. D. Lee^{*2}, K. W. Lee^{*3}, K. B. Song[†], G. H. An[†] and C. H. Lee[†]

**Department of Animal Science and Department of Food Science and Technology,*

Chungnam National University, Daejeon, South Korea 305-764

Genebiotech Ltd., Gyungchun-li, Geryong-myun, Gongju-si, Chungnam, Korea 314-831

1. Present address: Chinese Medicine Materials College, Jilin Agricultural College, Changchun City, China
2. To whom correspondence should be addressed: leebd@cnu.ac.kr
3. Present address: Pathology Division, National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang, Korea
430-824

ABSTRACT An experiment was conducted with d-old 240 male broilers to investigate the effects of *Saccharomyces cerevisiae* (SC) cell components on the growth performance, meat quality, and ileal mucosa development. There were four dietary treatments, each consisting of six replicates. Whole yeast (WY), SC extract (YE), and SCcell wall (CW) were added at the levels 0.5, 0.3, and 0.3%, respectively, to the control starter and finisher diets. During 0-3 wk of age, a lower feed/gain ratio (P=0.05) was observed in CW, while the WY-fed birds in 4-5 wk of age showed a low feed/gain ratio compared to the control. During 0-5 wk of age, WY and CW showed higher BW gain than did the control. The shear force of raw drumstick decreased in WY compared to the control, and YE and CW fell in between. The shear forces in both cooked breast and drumstick in WY and YE decreased when compared to the control. The amounts of 2-thio-barbituric acid-reactive substances (TBARS) of breast in WY, YE, and CW were lower than the control at 10 d of incubation. In drumstick, TBARS values were lower in WY and YE than that in control at 6 and 10 d of incubation. At 10 d of incubation, skins from YE and CW showed lower TBARS values than did the control. Villus height was longer in WY and CW compared to those in control and YE. No differences were found in crypt depth among four treatments. The villus height/crypt depth ratios in WY and CW were larger than those of the control and YE. It can be concluded that dietary yeast components, like whole yeast or yeast cell wall supplementation could improve growth performance. Meat tenderness could be improved by the whole yeast or yeast extract. Both yeast extract and yeast cell wall have oxidation-reducing effect. Yeast cell wall can improve ileal villus development.

(Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, broilers, yeast cell component, growth performance, meat tenderness, oxidative stability)

INTRODUCTION

Saccharomyces cerevisiae (SC), one of the most widely commercialized yeast, has long been fed to animals. Results of earlier chicken studies with yeast, however, were not consistent. It was reported that feeding yeast to chicks improved BW gain and feed/gain ratio (Bonomi and Vassia, 1978; Ignacio, 1995; Onifade et al., 1998). On the other hand, Madriqal et al. (1993) failed to observe the positive effect of feeding yeast on BW in broiler chicks. Kanat and Calialar (1996) reported that active dry yeast effectively increased BW gains without affecting feed/gain ratio in broiler chicks. In contrast, supplementation of yeast to broiler diets improved feed/gain ratio, but not growth rates (Valdivie, 1975; Onifade et al., 1999). Very recently, it was reported that yeast could be an alternative to antibiotic-based drugs in feed in broiler chicks on new litter (Hooge et al., 2003), or on recycled litter (Stanley et al., 2004).

In addition to growth performance, there are literatures showing that enrichment of diets with yeast could favorably improve broiler meat quality. For example, edible meats from broiler chicks fed a diet containing Cr-enriched SC exhibited increased tenderness (Bonomi et al., 1999), and increased water-holding capacity (Lee et al., 2002). Moreover, the effect of SC supplementation on oxidative stability of chicken meat was not extensively studied albeit there are indicators (Meyer et al., 1994; Ampel et al., 2000) that it may possess antioxidant property.

Thus, the present study was conducted to evaluate the effects of whole cell, cell wall and cell content of SC on growth performance, various meat qualities, and ileal mucosa development of broiler chicks.

MATERIALS AND METHODS

Animals, Diets and Experimental Design

Day-old 240 male broilers (Ross strain) were randomly housed in wire-floored, suspended cages in a temperature-controlled room. All procedures were approved by the Animal Care and Welfare Committee of our Institute. Continuous lighting was provided throughout the experimental period. Room temperature was gradually decreased from 32 C on Day 0 to 25 C on Day 21 and was kept constant thereafter. There were four dietary treatments, each consisting of six replicates. A replicate was identical to a cage with 10 birds so that each treatment had 60 chicks. Broiler starter and finisher diets were formulated (Table 1) and used as a control diet (SC 0%). Whole yeast (WY, SC), SC extract (YE) and SCcell wall (CW) were added to the control diet to reach 0.5, 0.3, and 0.3% in diets, at the expense of soybean meal, soybean meal, and corn, respectively. WY, YE, and CW were provided by a commercial company⁵. Choheung Chemical Industrial Co. Ltd., Ansan, Kyunggi-do, Korea. The colony forming units of WY was counted to be 1.3×10^{10} /g. Feed and water were provided *ad libitum* throughout the experiment that lasted 35 d.

5. Choheung Chemical Industrial Co. Ltd., Ansan, Kyunggi-do, Korea

BW and Feed Intake Measurements

Birds were group weighed by cage at 1, 21 and 35 d of age. Feed intake was monitored by cage at 21 and 35 d of age. Feed intake per cage and BW gain per cage were used to calculate feed/gain ratios.

Collection of Meat and Skin Samples

On the last day of a 35-d feeding trial, one bird from each cage was selected and euthanized by cervical dislocation. Immediately after slaughter, left and right breast and drumstick meats with skins on them were sampled. One half of the breast and drumstick meats sampled were stored at 4 C prior to the measurement of shear force. The rest of the samples, *i.e.*, breast and drumstick meat, and skin samples were stored at 20 C for the lipid oxidation assay.

Measurement of Shear Force

To measure the firmness of raw and cooked breast and drumsticks, meat samples were cut into square shape (35 x 25 x 6 mm), and then subjected to the measurement of shear force. An application of cutting force to the meat samples was performed using a TA-XT2 Texture Analyzer equipped with a TA-7 Warner-Bratzler Blade66 Stable Micro Systems Ltd. Surrey, UK (Yoon, 2002). Maximum shear force (kg) was applied three times ($n=3$) per sample.

Measurement of TBARS Values

When required for analysis, breast and drumstick meat samples that had been stored at 20 C were thawed at 4 C, and homogenized. Six sub-samples weighing approximately 2.5 g each from breast and drumstick samples were weighed into 50-mL screw-capped centrifuge tubes and subsequently incubated at 30 C for 0, 3, 6 and 10d. Following incubation, each sub-sample was immediately subjected to malondialdehyde acid (MDA) assay for measuring the extent of lipid oxidation. MDA, a secondary oxidation product, was determined (Sushil and Meliss, 1997). The amounts of 2-thio-barbituric acid-reactive substances (TBARS) were expressed as mg MDA per kg of sample. measurement of oxidative stability in skin samples was

the same as outlined for breast and drumstick samples except for the homogenization step. Intact skin samples were incubated from 0 to 10 d. Immediately after incubation, skin samples were homogenized⁷ Polytron PT-MR 2100, Switzerland by Kinemacia AG. with 6 mL of 20% trichloroacetic acid and further processed as described above in order to measure the TBARS value.

6 Stable Micro Systems Ltd. Surrey, UK

7 Polytron PT-MR 2100, Switzerland by Kinemacia AG

Measurement of Ileal Mucosa

At 21 d of the feeding trial, one bird from each cage was euthanized by cervical dislocation to sample 5 cm of the middle ileal segment. They were fixed immediately in formalin for the measurement of villus height and crypt depth, which was also used to calculate villus height/crypt depth ratio (VCR). Samples that fixed in formalin were dehydrated with an alcohol-xylene sequence, and embedded in paraffin. Five-micrometer slices were prepared and stained with hematoxylin-eosin. Villus height (m) and crypt depth (m) from each slice were measured in approximately 59 microscopic fields by using an image analysis system.

Statistical Analysis

All data were evaluated by one-way ANOVA using the GLM procedure (SAS, 2000). Significant differences of mean TBARS values among dietary treatments were analyzed by repeated measures and Tukey test in the GLM procedure. The level of statistical significance was pre-set at $P \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Growth Performance

The results of feeding WY, YE and CW on the growth performance of broiler chicks are shown in Table 2. During 0-3 wk of age, a significantly lower feed/gain ratio ($P=0.05$) was observed in CW-fed birds compared to the control, while WY- and YE-fed birds showed intermediate values. BW gain was not significantly different among all treatments. During 4-5 wk of age, the BW gains in WY- and CW-fed birds were higher ($P=0.05$) than those of the control birds, and BW gain in YE-fed birds was intermediate. The birds fed CW in 0-3 wk of age and WY in 4-5 wk of age showed significantly improved feed/gain ratio compared to the control, and this difference disappeared during 0-5 wk of age.

In agreement with our study, Onifade et al. (1999) reported that SC improved feed/gain ratio, and BW gain. Valdivie (1975) reported that feed/gain ratio at 0-9 wk of age was improved significantly as the SC level in the diets increased in broiler chicks. SC also decreased the colonization of *E. coli* and increased *Lactobacillus* in the chicken gut (Sun and Li, 2001). SC reduced the frequency of *Salmonella* colonization in broiler chickens with or without transport stress (Line, et al., 1997, 1998). SC cell wall and SC *var boulardii* decreased goblet cells per millimeter of villus height, crypt depth and increased villus height (Bradley et al., 1994; Santin et al., 2001). Several workers (Valdivie, 1975; Oyofe et al., 1989; Newman, 1994; Spring et al., 2000) reported that SC improved the efficacy of the immune system, improved intestinal lumen health and increased digestion and absorption of nutrients which resulted in better performance.

Shear Force Meat

The effects of yeast (SC) components on shear force in both raw and cooked breast and drumstick meats were shown in Table 3. There was no significant difference in shear force in raw breast meats among all treatments; however, in raw

drumstick meats, it decreased significantly ($P=0.05$) in WY compared to control, and YE and CW were intermediate. For cooked meat, the shear force in both breast and drumstick meats in WY and YEfed birds decreased significantly ($P=0.05$) when compared to the control.

Tenderness is the sum of the mechanical strength of skeletal muscle tissue after rigor mortis, and the weakening of the structure during the post-mortem storage (Takahashi, 1996). It is the most important textural characteristic of meat and has the greatest influence on consumer preference. The meat tenderness can be estimated by measuring the shear force, the lower the tenderer. Our study suggests that the dietary supplementation of SC could improve meat tenderness of broilers, although the underlying mechanism(s) is not readily understood.

TBARS Values of Meat and Skin

In breast meats, up to 6 d of incubation, there were no significant differences in TBARS values ($P>0.05$) among four treatments (Figure 1). At 10 d of incubation, however, values of WY, YE, and CW were significantly lower ($P=0.05$) than those of the control. During 10 d of incubation, TBARS values were not significantly different among WY, YE, and CW ($P>0.05$).

Up to 3 d of incubation, no significant difference was found in TBARS values of drumstick meats among four treatments (Figure 2). At 6 and 10 d of incubation, TBARS values were significantly lower ($P=0.05$) in WY and YE than those in the control, but were not different from CW.

There were no significant differences in skin TBARS values before 6 d of incubation among four treatments (Figure 3). At 6 d of incubation, TBARS values were significantly lower ($P=0.05$) only in YE than that in the control. At 10 d of incubation, TBARS values were significantly lower ($P=0.05$) in YE and CW than that in the control.

The results (Figures 1, 2, and 3) provide the evidence that supplementation of SC to a corn-soybean meal base control diet could improve oxidative stability of broiler meat. It may indicate that there are some antioxidant factors in SC, or SC may make the meat contain less oxidative fat (or fatty acids). Several researchers have reported that there are some antioxidant factors in SC, such as glucose tolerance

factor fractions (acts as an antioxidant Ampel et al., 2000), and copper-zinc superoxide dismutase (acts as oxidation-retarding factor Meyer et al., 1994). The SC cell wall, which contains β -glucan, carboxymethylglucan, mannans, and some proteinous substances, was reported to display relatively good antioxidative properties (Ferenayk, et al., 1986 Patchen et al., 1987; Real, et al., 1992; Hofer, 1995; Liu et al., 1997; Babincov, et al., 1999; Tsiapali et al., 2001), the water-soluble derivatives of β -glucan (glucan sulphate and glucan phosphate) were the most effective free radical scavengers (Krikov et al., 2001)

Figures 1, 2 and 3 show that the rate of oxidation was the same in all treatments at the early stage of incubation. However, the oxidation rates were reduced in WY, YE and CW compared to the control at the later stage of incubation, indicating that meats from chicks fed SC contain less oxidative fat (or fatty acids). If an antioxidant from SC could retard the oxidation rate, the graphs should show different patterns at the early stages of incubation. At present, a clear explanation for an antioxidant effect of SC is not available, but it may well be that the oxidative fat or fatty acids content is different between SC-fed and control birds. Some investigators reported that lipid deposition in broiler chicks (Akiba et al., 1982; Bolden et al., 1984; Mendonca et al., 1984; Takahashi and Jensen, 1984) or in laying hens (Akiba et al., 1983; Bolden and Jensen, 1985; Brenes et al., 1985; Takahashi and Jensen, 1985) fed yeast diets was significantly less than that in chicks fed a corn-soybean meal diet.

Ileal Mucosa Development

The effects of WY, YE and CW on the ileal mucosa development in 21 d-old male broiler chickens are shown in Table 4. Villus height was significantly longer in WY- and CW-fed birds ($P=0.05$) compared to those in control and YE-fed birds. No significant differences were found in crypt depth among four treatments. The VCR in WY- and CW-fed birds were significantly larger than that of the control and YE-fed birds ($P=0.05$).

Changes in intestinal morphology such as shorter villi and deeper crypts have been associated with the presence of toxins (Yason et al., 1987). A shortening of the villi decreases the surface area for nutrient absorption. The crypt can be regarded as the villus factory, and a large crypt indicates fast tissue turnover and a high demand for

new tissue (Yason, et al., 1987). Histological examination reveals the crypts to be the place of epithelial regeneration (Paulus et al., 1992). Additionally, several workers found a close correlation between the depth of the crypt and the proliferation rate of epithelial cells (Hampson, 1986; Jin, et al., 1994; Brunsgaard, 1998; Yasar and Forbes, 1999). The number of proliferations and the epithelial cell turnover have great impact on the protein and energy requirement of the small intestinal mucosa (Simon, 1989).

In the present study, the longer villus and larger VCR were observed in CW- and WY-fed birds as compared with the control and YE-fed birds. This observation may partly explain the growth promoting effect of yeast cell wall. Santin et al. (2001) reported very similar results in that cell-wall component of SC added at the level of 0.2% in broiler diet significantly increased BW gains with a reduction in crypt depth and an increase in villus height.

Yeast cell wall is composed predominantly of complex polymers of β -glucans, β -mannans, mannoproteins and a minor component of chitin. The mannans and mannoproteins represent 30-40% of the cell wall and determine the cell surface properties (Smits et al., 1999). Pathogens with the mannose-specific Type-1 fimbriae, such as *E. coli* and *Salmonella*, are attracted to the mannans and readily bind with the carbohydrate instead of attaching to intestinal epithelial cells and, when pathogenic bacteria bind to mannans, they cannot colonize the intestine and instead are moved through the intestine (Spring et al., 2000).

This experiment appears to provide the evidence that feeding of SC cell components to broiler chicks could improve growth performance, meat tenderness and the oxidative stability of meat. It is yeast cell wall, not yeast extract, that could improve ileal mucosa development of broiler chick.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by ARPC under the Korean Ministry of Agriculture and Forestry. The authors thank to S. W. Cho in Pathology Division, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, for his guidance in gut tissue preparation and reading. The professional comments from W. Guenter of the Department of Animal Science, University of Manitoba, are greatly appreciated.

REFERENCES

- Akiba, Y., L. S. Jensen, and M. S. Lilburn. 1982. Effect of estrogen implants on hepatic lipid deposition in chicks fed different isonitrogenous and isocaloric diets. *J. Nutr.* 112:189-196.
- Akiba, Y., L. S. Jensen, and C. X. Mendonca. 1983. Laboratory model with chicks for assay of nutritional factors affecting hepatic lipid accumulation in laying hens. *Poult. Sci.* 62:143-151.
- Ampel, M., N. Mirsky, and S. Yannai. 2000. Prevention of lipid oxidation by glucose tolerance factor. *Czech J. Food Sci.* 18 (Spec. Issue):142-143.
- Babincov, M., E. Machov, and G. Kogan. 1999. Carboxymethylated glucan inhibits lipid peroxidation in liposomes. *Z. Naturforsch.* 54c:1084-1088.
- Bolden, S. L., and L. S. Jensen. 1985. The effect of marginal levels of calcium, fish meal, torula yeast and alfalfa meal on feed intake, hepatic lipid accumulation, plasma estradiol, and egg shell quality among laying hens. *Poult. Sci.* 64: 937-946.
- Bolden, S. L., L. S. Jensen, and K. Takahashi. 1984. Responses in calcium and phosphorus metabolism and hepatic lipid deposition among estrogenized chicks fed various dietary ingredient. *J. Nutr.* 114:591-597.
- Bonomi, A., and G. Vassia. 1978. Observations and remarks on the use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*, in the form of living yeast, on the production and quanti-qualitative characteristics of broilers. *Arch. Vet. Ital.* (Suppl.):3-15.
- Bonomi, A., B. M. Bonomi, A. Quarantelli, and A. Orlandi. 1999. Organic chromium in the feeding of broiler chickens. *Rivista di Scienza dell'Alimentazione* 28: 385-397.
- Bradley, G. L., and T. F. Savage, and K. I. Timm. 1994. The effects of supplementing diets with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* on male poult performance and ileal morphology. *Poult. Sci.* 73:1766-1770.
- Brenes, A., L. S. Jensen, K. Takahashi, and S. L. Bolden. 1985. Dietary effects on content of hepatic lipid, plasma minerals, and tissue ascorbic acid in hens and estrogenized chicks. *Poult. Sci.* 64:947-954.
- Brunsgaard, G. 1998. Weaning and the weaning diet influence the villous height and

- crypt depth in the small intestine of pigs and alter the concentrations of short chain fatty acids in the large intestine and blood. *J. Nutr.* 128:947-95
- Ferenčák, M., D. Kotulov, L. Masler, L. Bergendi, J. Andula, and J. Tefanovi. 1986. Modulatory effect of glucans and biochemical activities of guinea-pig macrophages. *Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol.* 8:163-166.
- Hampson, D. J. 1986. Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Res. Vet. Sci.* 40:32-40.
- Hofer, M., M. Pospíšil, . Viklick, I. Ppalov, J. Hol, J. Netkov, and J. Andula. 1995. Effect of postirradiation carboxymethylglucan administration in mice. *Int. J. Immunopharm.* 17:167-174.
- Hooge, D. M., M. D. Sims, A. E. Sefton, A. Connolly, and P. S. Spring. 2003. Effect of dietary mannan oligosaccharide, with or without bacitracin or virginiamycin, on live performance of broiler chickens at relatively high stocking density on new litter. *J. Appl. Poult. Res.* 12:461-467.
- Ignacio, E. D. 1995. Evaluation of the effect of yeast culture on the growth performance of broiler chick. *Poult. Sci.* 74: 196. (Abstr.)
- Jin, L., L. P. Reynolds, D. A. Redmer, J. S. Caton and J. D. Crenshaw. 1994. Effects of dietary fiber on intestinal growth, cell proliferation and morphology in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 72: 2270-2278.
- Kanat, R., and S. Calialar. 1996. A research on the comparison effect on broiler chickens performance of active dried yeast and inactivated and stabilized probiotic yeast supplemented to the rations in different levels. *Poult. Sci.* 75:123. (Abstr.)
- Krikov, L., Z. urakov, J. Andula, V. Sasinkov, and J. Krajovi. 2001. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. *Mutation Res.* 497: 213-222.
- Lee, J.-I., Y.-D. Kim, D.-Y. Kim, Y.-I. Choi, J.-N. Ahn, H.-S. Chae, and J.-H. Choi. 2002. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance and meat quality of broiler chickens. *Proc. Kor. J. Anim. Sci. Tech.* Page 34.
- Line, J. E., J. S. Bailey, N. A. Cox, and N. J. Stern. 1997. Yeast treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* populations associated with broiler chickens subjected to transport stress. *Poult. Sci.*, 76:1227-1231.
- Line, J. E., J. S. Bailey, N. A. Cox, N. J. Stern, and T. Tompkins. 1998. Effect of yeast-supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broiler.

- Poult. Sci. 77:405-410.
- Liu, F., V. E. C. Ooi, and S. T. Chang. 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci.* 60: 763-771
- Madriqal, S. A., S. E. Watkins, M. H. Adams, A. L. Waldroup, and P. W. Waldroup. 1993. Effect of an active yeast culture on performance of broilers. *Poult. Sci.* 72:87. (Abstr.)
- Mendonca, C. X. Jr, K. Takahashi, and L. S. Jensen. 1984. Effect of fractions of fish meal and hepatic lipid deposition in estrogenized chicks. *Poult. Sci.* 63: 1020-1026.
- Meyer, A. S., R. Karen, and A. N. Jens. 1994. Critical assessment of the applicability of superoxide dismutase as an antioxidant in lipid foods. *Food Chem.* 51: 171-175.
- Newman, K. 1994. Mannan-oligosaccharides: Natural polymers with significant impact on the gastrointestinal microflora and the immune system. Pages 167-174 *in: Biotechnology in the Feed Industry*. T. P. Lyons and K. A. Jacques, ed. Proc. of Alletch's 10th Annual Symp. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Onifade, A. A., G. M. Babatunde, S. A. Afonja, S. G. Ademola, and E. A. Adesina. 1998. The effect of a yeast culture addition to a low-protein diet on the performance and carcass characteristics of broiler chickens. *Poult. Sci.* 77:44. (Abstr.)
- Onifade, A. A., A. A. Odunsi, G. M. Babatunde, B. R. Olorede, and E. Muma. 1999. Comparison of the supplemental effects of *Saccharomyces cerevisiae* and antibiotics in low-protein and high fiber diets fed to broiler chicken. *Arch. Anim. Nutr.* 52:29-39.
- Oyofe, B. A., J. R. DeLoach, D. E. Corrier, J. O. Norman, R. L. Ziprin, and H. H. Molenhauer. 1989. Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with D-mannose. *Poult. Sci.* 68: 1357-1360.
- Patchen, M. J., M. M. D'Alesandro, I. Brook, W. F. Blakely, and T. J. Mac Vittie. 1987. Glucan: mechanism involves in its radioprotective effect. *J. Leucocyte Biol.* 42:95-105.
- Paulus, U., C. S. Potten, and M. Loeffler. 1992. A model of the control of cellular regeneration in the intestinal crypt after perturbation based solely on local stem cell regulation. *Cell Prolif.* 25:559-578.
- Real, A., G. Genechea, J. A. Bueren, and G. Maganto. 1992. Radioprotection mediated by the haemopoietic stimulation conferred by AM5: a protein associated

- polysaccharide. *Int. J. Radiat. Biol.* 62:65–72.
- Santin, E., A. Maiorka, M. Macari, M. Grecco, J. C. Sanchez, T. M. Okada, and A. M. Myasaka . 2001. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Appl. Poult. Res.* 10:236–244
- SAS Institute Inc. 2000. SAS Online Doc. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Simon, O. 1989. Metabolism of proteins and amino acids. *in: Protein Metabolism and Farm Animals. Evaluation, Digestion, Absorption and Metabolism.* H. D. Bock, B. O. Eggum, A. G. Low, O. Simon and T. Zebrowska, ed. Berlin:Oxford University Press and VEB Dt Landwirtschaftsverlag.
- Smits, G. J., J. C. Kapteyn, H. V. D. Endo, and F. M. Klis. 1999. Cell wall dynamics in yeast. *Current Opinion in Microbiol.* 2:348–352.
- Spring, P., C. Wenk, K. A. Dawson, and K. E. Newman. 2000. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentration of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella*-challenged broiler chicks. *Poult. Sci.* 79:205–211.
- Stanley, V. G., C. Gray, M. Daley, W. F. Krueger, and A. E. Sefton. 2004. An alternative to antibiotic-based drugs in feed for enhancing performance of broilers grown on *Eimeria*-spp.-infected litter. *Poultry Sci.* 83:39–44.
- Sun, J. Y., and W. F. Li. 2001. Preparation of mannanoligosaccharide from *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on intestinal microflora in chicken. *Zhejiang Daxue Xuebao, Nongye Yu Shengming Kexueban* 27:447–450.
- Sushil, K. J., and P. Meliss. 1997. The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins. *Free Radic. Biol. and Med.* 22:593–596.
- Takahashi, K. 1996. Structural weakening of skeletal muscle tissue during post-mortem ageing of meat: the non-enzymatic mechanism of meat tenderization. *Meat Sci.* 43:567–580.
- Takahashi, K., and L. S. Jensen. 1984. Effect of dietary composition and estradiol implants on hepatic microsomal mixed function oxidase and lipid deposition in growing chicks. *Poult. Sci.* 63:2217–2224.
- Takahashi, K., and L. S. Jensen. 1985. Liver response to diet and estrogen in white leghorn and Rhode Island Red chickens. *Poult. Sci.* 64:955–962.
- Tsiapali, E., S. Whaley, J. Kalbfleisch, H. Ensley, W. Browder, and D. Williams. 2001.

Glucans and related natural polymers exhibit weak solution free radical scavenging activity, but stimulate free radical activity in a murine macrophage cell line. *Free Radic. Biol. Med.* 30:393-402.

Valdivie, M. 1975. *Saccharomyces* yeast as a by-product from alcohol production on final molasses in diets for broilers. *Cuban J. Agric. Sci.*, 9:327-331.

Yasar, S., and J. M. Forbes. 1999. Performance and gastro-intestinal response of broiler chickens fed on cereal grain-based foods soaked in water. *Brit. Poult. Sci.* 40:65-76.

Yason, C. V., B. A. Summers, and K. A. Schat. 1987. Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys: Pathology. *Am. J. Vet. Res.* 6: 927-938.

Yoon, K. S. 2002. Texture and microstructure properties of frozen chicken breasts pretreated with salt and phosphate solutions. *Poult. Sci.* 81:1910-1915.

Table 1. Composition of the basal diet¹

Ingredients	Starter (0-3wk)	Finisher (4-5wk)
Corn (%)	59.26	64.63
Soybean meal (44 %) (%)	20.52	18.92
Corn gluten meal (%)	9.43	7.17
Rapeseed meal (%)	5.00	3.00
Soybean oil (%)	2.00	3.00
Tricalcium phosphate (%)	1.78	1.27
Limestone (%)	0.88	1.08
Salt (%)	0.40	0.40
DL-methionine (50 %) (%)	0.34	0.16
L-lysine HCl (%)	0.19	0.17
Vitamin premix ² (%)	0.10	0.10
Mineral premix ³ (%)	0.10	0.10
Total (%)	100.00	100.00
Calculated Compositionx		
ME (kcal/kg)	3,100	3,200
CP (%)	21.50	19.00
Ca (%)	1.00	19.00
Available P(%)	0.45	0.35
Methionine (%)	0.50	0.38
Lysine (%)	1.10	1.00

¹ The four experimental diets were as follows.

Control diet: 0% *S. cerevisiae* WY: 0.5% whole yeast (*S. cerevisiae*) at the expense of soybean meal

YE: 0.3% yeast extract at the expense of soybean meal CW: 0.3% yeast cell wall at the expense of corn

² Supplied per kiloram of diet: vitamin A, 5,500 IU; vitamin D3, 1,100 IU; vitamin E, 11 IU; vitamin B12, 0.0066mg; riboflavin, 4.4mg; pantothenic acid, 11mg; choline chloride 220mg; menadione, 1.1mg; folic acid, 0.55mg; pyridoxine, 2.2mg; biotin, 0.11mg; thiamin, 2.2mg; ethoxyquin, 125mg.

³ Provided (mg/ kg of diet): Mn, 120; Zn, 100; Fe, 60; Cu, 10; I, 0.46 and Ca, min: 150, max: 180

Table 2. Effect of yeast (*S. cerevisiae*) components on growth performance of male broiler chicks

Item	Treatments ¹			
	Control	WY	YE	CW
0-3 wk				
BW gain, g/bird	621± 34 ²	639±30	652±30	636±14
Feed intake, g/bird	1002±49	999±59	1013±39	951±39
Feed/gain	1.62±0.08 ^a	1.56±0.08 ^{ab}	1.55±0.06 ^{ab}	1.49±0.04 ^b
4-5 wk				
BW gain, g/bird	999±42 ^b	1082±51 ^a	1034± 47 ^{ab}	1073±52 ^a
Feed intake, g/bird	1766±57	1783±64	1821±97	1819±93
Feed/gain	1.77±0.06 ^a	1.65±0.09 ^b	1.76±0.07 ^{ab}	1.70±0.07 ^{ab}
0-5 wk				
BW gain, g/bird	1550±51 ^b	1617±45 ^a	1608±19 ^{ab}	1623±25 ^a
Feed intake, g/bird	2689±95	2680±131	2755±112	2682±92
Feed/gain	1.74±0.06	1.66±0.06	1.71±0.06	1.65±0.05

a-bMeans in a row with no common superscripts differ significantly ($P \leq 0.05$).

¹Refer to Table 1.

²Values are expressed as means (SD) of six replicates per treatment.

Table 3. Effect of yeast (*S. cerevisiae*) components on shear force of male broiler meat

Meats	Treatments ¹			
	Control	WY	YE	CW
----- Shear force (kg) -----				
Raw meat				
Breast	6.18±1.23 ²	5.73±0.64	5.45±0.28	6.14±0.43
Drumstick	6.19±0.12 ^a	5.54±0.24 ^b	5.67±0.41 ^{ab}	5.83±0.30 ^{ab}
Cooked meat				
Breast	5.73±0.19 ^a	5.35±0.26 ^b	5.30±0.25 ^b	5.61±0.20 ^{ab}
Drumstick	6.09±0.27 ^a	5.43±0.28 ^b	5.66±0.27 ^b	5.82±0.14 ^{ab}

a-bMeans in a row with no common superscripts differ significantly ($P=0.05$).

1 Refer to Table 1.

2 Values are expressed as means (SD) of six replicates per dietary treatment

Table 4. Effect of dietary yeast (*S. cerevisiae*) components on ileal mucosa development in 21 d-old male broiler chicks

Treatments ¹	Villus height (μm)	Crypt depth (μm)	VCR ²
Control	396.87±30.62 ^{b,3}	44.01±5.73	9.16±1.53 ^b
WY	430.67±18.30 ^a	39.42±6.87	11.28±2.46 ^a
YE	402.14±19.66 ^b	40.79±4.08	9.90±0.63 ^b
CW	436.95±24.60 ^a	36.39±6.61	12.32±2.16 ^a

a-bMeans in a column with no common superscripts differ significantly ($P\leq 0.05$).

1 Refer to Table 1.

2 VCR: villus height/ crypt depth ratio

3 Each value is the mean SD of 59 microscopic fields per segment with 6 birds per treatment

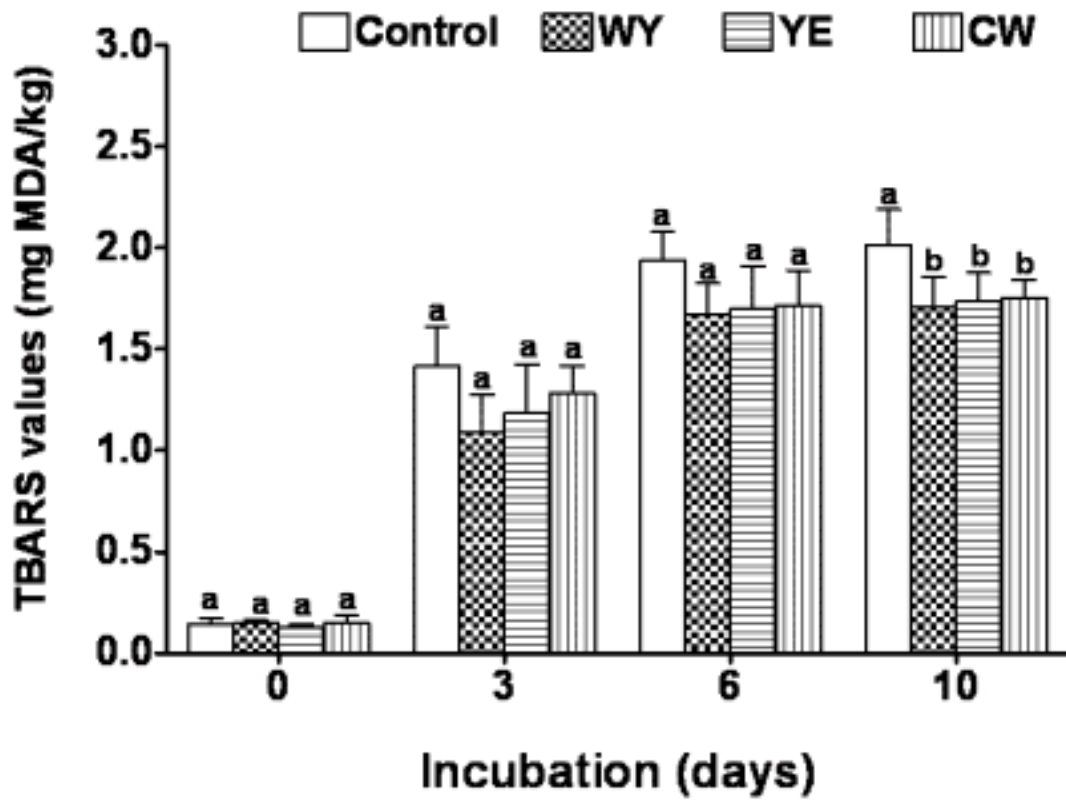


Figure 1. Effects of yeast (*S. cerevisiae*) components on TBARS values of breast. All data points are mean TBARS values from 6 replicates SD (^{a,b} $P \leq 0.05$). WY: whole yeast (0.5%); YE: yeast extract (0.3%); CW: yeast cell wall (0.3%)

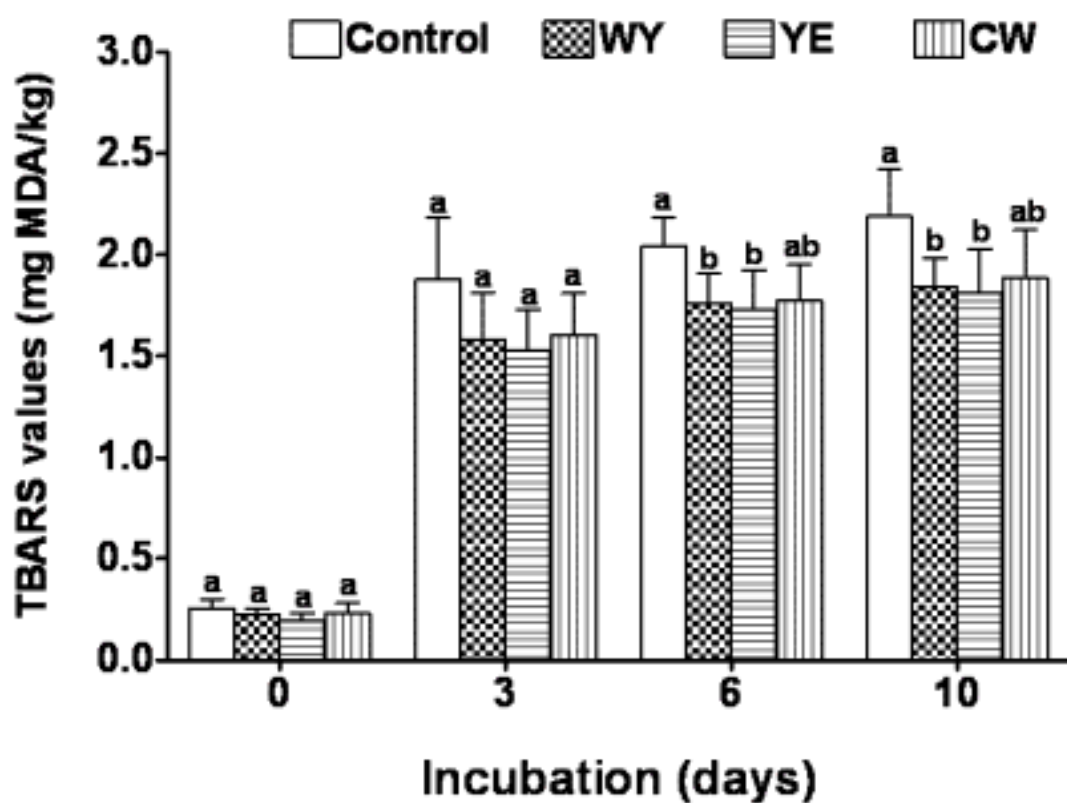


Figure 2. Dietary yeast (*S. cerevisiae*) components on TBARS values of drumstick. All data points are mean TBARS values from 6 replicates SD (^{a,b} $P \leq 0.05$). WY: whole yeast (0.5%); YE: yeast extract (0.3%); CW: yeast cell wall (0.3%)

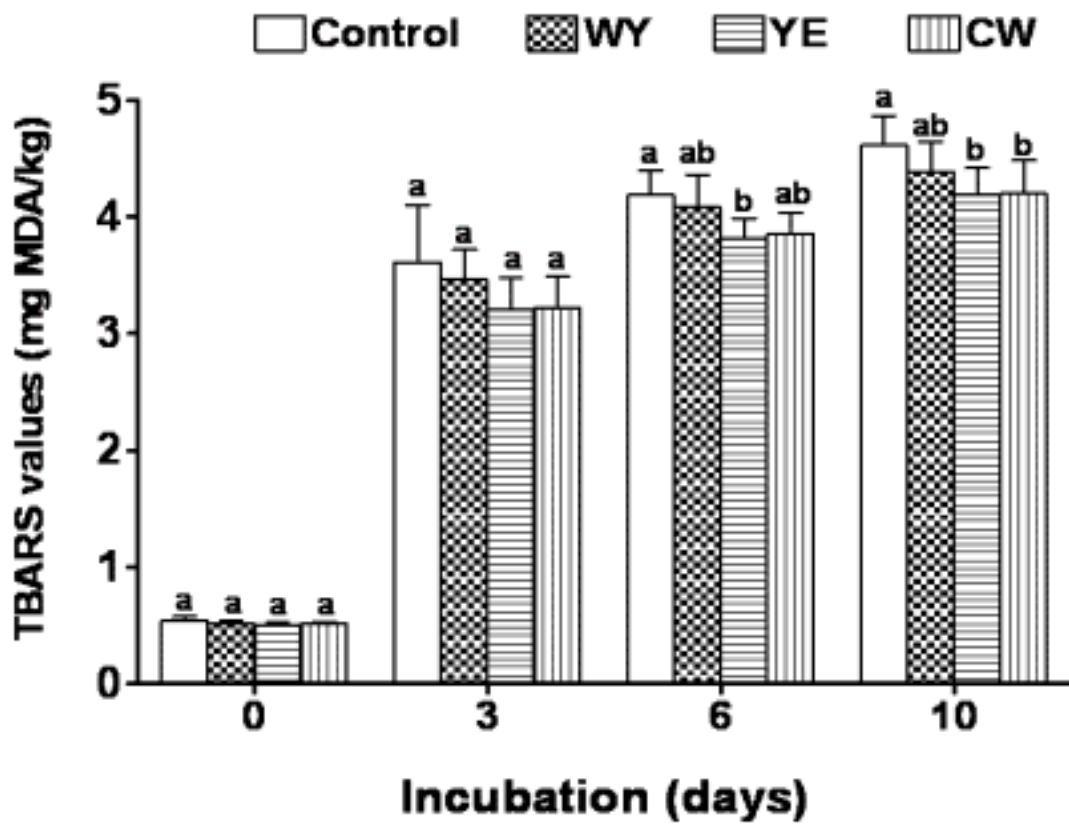


Figure 3. Dietary yeast (*S. cerevisiae*) components on TBARS of skin. All data points are mean TBARS values from 6 replicates SD ($^{a,b}P \leq 0.05$). WY: whole yeast (0.5%); YE: yeast extract (0.3%); CW: yeast cell wall (0.3%)

- 부록 3 -

**Isolation of Threonine Overproducing Strain by UV Mutagenesis of
*Saccharomyces cerevisiae***

Namkyu Sun, Jinyoung Choi, Seunghyun Lee, Sunhye Kim, Gilhwan Ahn, Bongduk Lee,
Youngsook Gil, Misun Won and Kyung Bin Song*

Department of Food Science & Technology, Department of Animal Science, College of Agricultural
and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
Genome Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon,
305-333, Korea

* Corresponding author: Kyung Bin Song

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Life Sciences,
Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea

Phone: 82-42-821-6723

Fax: 82-42-825-2664

E-mail: kbsong@cnu.ac.kr

Running title: threonine overproducing strain

Key words: *amino acid analog*, *Saccharomyces cerevisiae*, *threonine*,
UV-mutagenesis.

Abbreviations: *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Amino acids have extensive industrial applications including as nutrients and food additives in bakeries and food industries.1) Threonine is an essential but limited in animal feed and human food. To accomplish the demand for the amino-acid overproduction, isolation of *Saccharomyces cerevisiae* mutants has been studied.2) Mutants resistant to a toxic analog have the ability to regulate the synthesis of amino acids. Thus, several amino acid analogs have been used to isolate mutants overproducing specific amino acids.2-4) Hydroxynorvaline (α -amino- β -hydroxyvaleric acid) is a threonine analog known to inhibit the cell growth because its chemical structure mimics threonine and hinders the activity of the threonine feedback-inhibited enzymes in biosynthesis of the amino acid.2) Therefore, it has been widely used to isolate mutants which overproduce threonine. In hydroxynorvaline-resistant mutants, one of the threonine-sensitive enzymes has become insensitive to the feedback control by the amino acid and, as a consequence, the mutants overproduce threonine and excrete it into the medium.

The purpose of the study was to generate mutants overproducing threonine by UV mutagenesis of *S. cerevisiae*. Wild-type *S. cerevisiae* X2180 (MATa) was obtained from KCTC (Korea Collection for Type Culture, KCTC 1814, ATCC 26787). Sensitivity to hydroxynorvaline of wild-type cells and the concentration of hydroxynorvaline for the isolation of threonine-overproducing strain were examined by minimum inhibition concentration (MIC) test. *S. cerevisiae* X2180 cells grown on SD minimal medium (0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate and 2% glucose) containing 0.023% proline as a sole nitrogen source were mixed with 1% soft agar and overlaid on the SD minimal plate containing 0.023% proline. The discs containing different concentrations of hydroxynorvaline were placed on top of the agar layer containing cell culture, and growth inhibition by hydroxynorvaline indicated by halos was observed. Based on the MIC test results (Fig. 1), 10 mM of hydroxynorvaline was used as the optimal concentration for the isolation of threonine-overproducing strain.

To generate mutants overproducing threonine, UV mutagenesis (254 nm, XL-1000 UV Crosslinker, Spectronics Co., Australia) was employed due to its easy and safe procedures. The condition of UV irradiation for mutagenesis was determined by examining the survival rate of cells irradiated at different energy level (Fig. 2). *S. cerevisiae* cells in log-phase were irradiated with UV at different energy level and

plated onto YPD rich plate (1.0% yeast extract, 0.5% peptone, and 2% glucose). The colonies grown on the plate were counted to determine the survival rate. Energy of 500 Jm^{-2} was applied for UV mutagenesis because the energy required to kill 50% of cells is the best condition for UV mutagenesis.⁵⁾ To isolate threonine-overproducing strain of *S. cerevisiae* by UV mutagenesis, hydroxynorvaline-resistant mutants were screened. A total 6×10^7 yeast cells in log-phase were irradiated at 500 Jm^{-2} and plated on the SD minimal plate containing 10 mM hydroxynorvaline. Colonies (195) grown on the selection plate were streaked onto YPD and SD minimal media, among which 85 colonies growing well on both YPD and SD minimal plates containing 0.023% proline were selected. Based on TNBS assay,⁶⁾ which determines the available amino group concentration, four different colonies were chosen. To determine the content of threonine, the mutant cells were harvested, and the crude cell extracts were prepared to examine the amount of threonine in intracellular amino acid pool as follows. The cells were re-suspended in lysis buffer and vortexed using glass beads, and the cell debris was removed by centrifugation. Culture supernatant was also lyophilized to determine the amount of extracellular threonine composition. Amino acid analysis was performed by HPLC (Waters Co., Milford, MA, USA) after hydrolysis in constant boiling HCl at 110°C for 24 h, and the amount of threonine was determined using Pico-Tag detector system. The results of the amino acid analysis of the samples selected (data not shown) showed that the extracellular content of threonine in the mutant T5-1 (1.6 g/mL) increased 66% in culture supernatant, whereas the intracellular threonine pool of the mutant did not increase significantly. This indicates that the content of threonine overproduced by the mutant T5-1 was excreted into the medium. We also confirmed that the mutant T5-1 was resistant to 10 mM hydroxynorvaline (Fig. 3) and could grow in the medium containing more than 50 mM hydroxynorvaline, which indicate that feedback inhibition by threonine in cells could be hindered completely. In summary, we isolated a mutant overproducing threonine extracellularly, and results reveal that isolation of threonine-overproducing mutant by UV mutagenesis is a simple and efficient method.

Acknowledgments.

This work was supported by ARPC under the Ministry of Agricultural and Forestry.

References

1. Farfn, M. J. and Caldern, I. L. (2000) Enrichment of threonine content in *Saccharomyces cerevisiae* by pathway engineering. *Enzyme Microbial Tech.* **26**, 763-770.
2. Ramos, C. and Calderon. I. I. (1992) Overproduction of threonine by *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to hydroxynorvaline. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1667-1682.
3. Riccardi, G., Sora, S. and Ciferri, O. (1981) Production of amino acid by analog-resistant mutants of the Cyanobacterium *Spirulina platensis*, *J. Bacteriol.* **147**, 1002-1007.
4. Martnez-Force, E. and Bentez, T. (1992) Selection of amino-acid overproducer yeast mutants. *Curr. Genet.* **21**, 191-196.
5. Lawrence, C. W. (1991) Classical mutagenesis techniques. *Methods in Enzymol.* **194**, 273-281.
6. Eklund, A. (1976) On the determination of available lysine in casein and rapeseed protein concentrates using TNBS as a reagent for free epsilon amino group of lysine. *Anal. Biochem.* **70**, 434-439.

Figure Legends

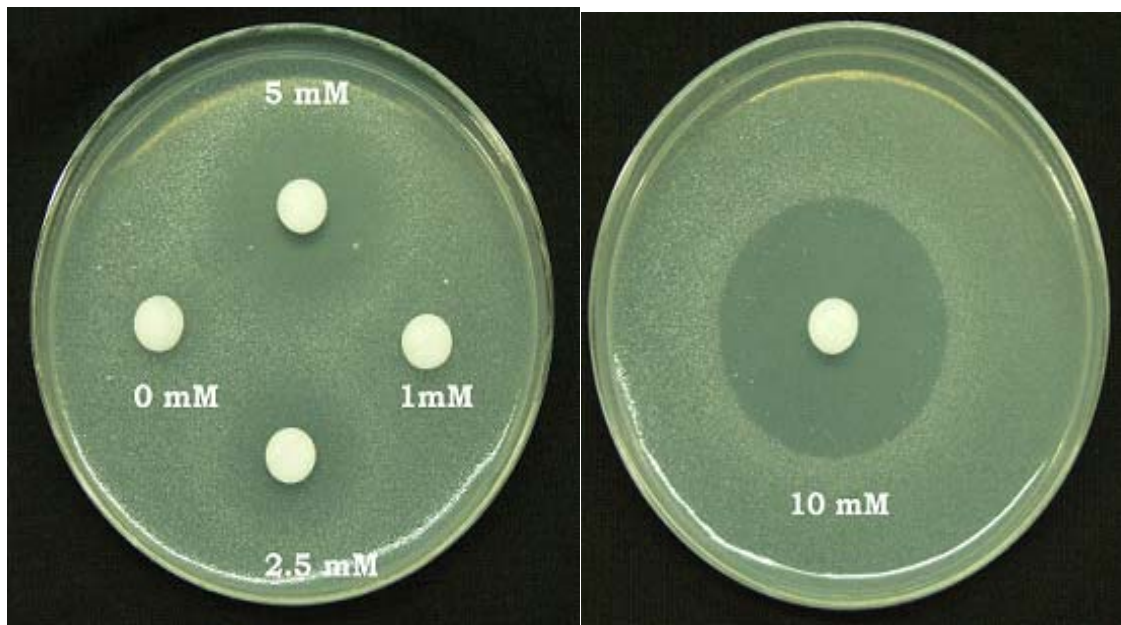


Fig. 1. Sensitivity of wild type yeast cells to hydroxynorvaline.

The wild type yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae* X2180) in log-phase were mixed with 1% agar and poured on the SD minimal plate (0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate and 2% glucose) containing 0.023% proline. The discs containing different concentrations (0, 1, 2.5, 5, 10 mM) of hydroxynorvaline were placed on the top agar layer containing yeast cells and growth inhibitions by hydroxynorvaline were examined.

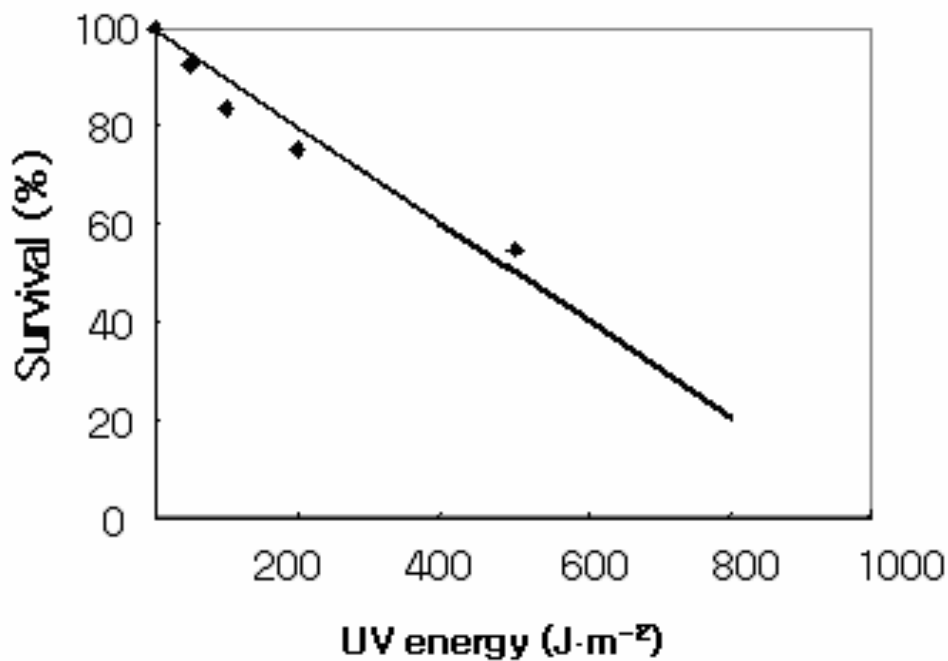


Fig. 2. Survival rate of yeast cells by UV irradiation.

The wild type yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae* X2180) in log-phase were irradiated with UV at different levels of energy (50, 100, 200, 500, 1000 Jm⁻²), and plated onto YPD rich plate (1.0% yeast extract, 0.5% peptone, and 2% glucose). The survival rate was calculated by counting the colonies on the plate.

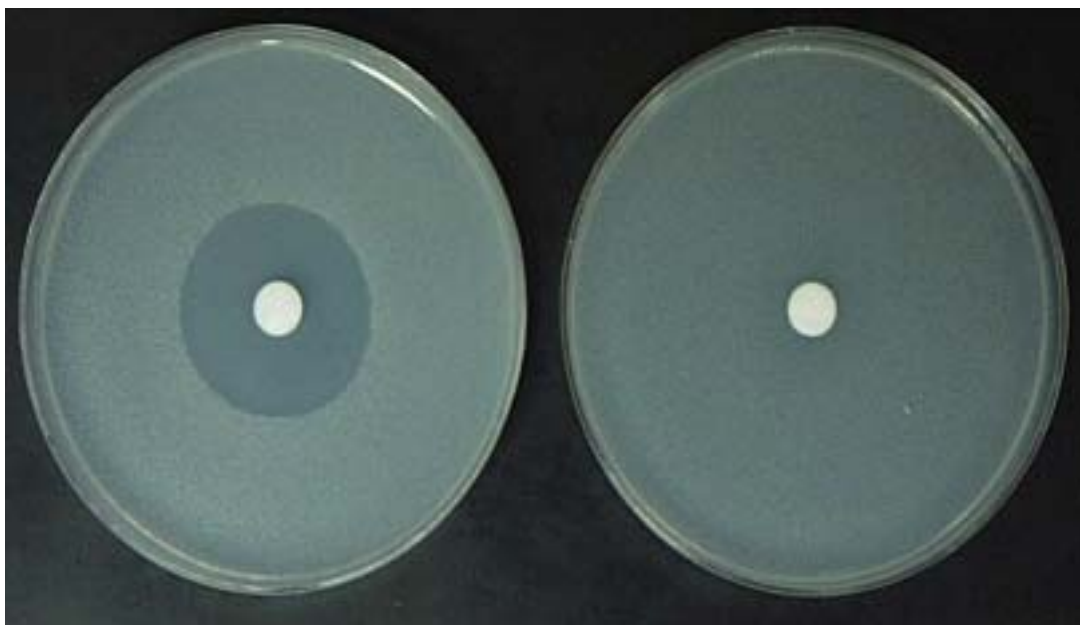


Fig. 3. Resistance of mutant T5-1 to hydroxynorvaline.

Saccharomyces cerevisiae wild type and mutant T5-1 were mixed with 1% agar and overlaid on the SD minimal plate containing 0.023% proline. The discs containing 10 mM hydroxynorvaline were placed on the top of agar layer containing yeast cells. (Left : wild type, Right : mutant)

Effects of Dietary *Saccharomyces cerevisiae* on Growth Performance and Meat Quality in Broilers

A. W. Zhang¹, B. D. Lee^{1*}, H. R. Oh¹, S. K. Lee¹, and G. H. An²

¹Department of Animal Science,

²Department of Food Technology, Chungnam National University, 220 Gung dong, Yusung gu, Daejeon 305-764, Korea

효모(*Saccharomyces cerevisiae*)의 급여가 육계의 생산성과 계육의 품질에 미치는 영향

장애무¹ · 이봉덕^{1*} · 오홍록¹ · 이수기¹ · 안길환²

¹충남대학교 축산학과, ²충남대학교 식품공학과

ABSTRACT : An experiment was conducted to investigate whether *Saccharomyces cerevisiae*(*S. cerevisiae*) could improve the growth performance and meat quality of broiler chicks. Day old 160 male broiler chicks were fed one of the two experimental diets without (0.0 %) or with *S. cerevisiae* (3.0 %) for five wks. Each treatment consisted of eight cages with 10 chicks per cage. Feed and water were provided *ad libitum*. Although not significant, BW gains of *S. cerevisiae* fed chicks tended to increase during 4~5 wk of age. The addition of *S. cerevisiae* into the control diet significantly lowered the shear force in raw drumstick meat ($P<0.05$). After 10 d of incubation, significantly lower levels of oxidation products were found ($P<0.05$) in drumstick meats and skin samples from broiler chicks fed diets enriched with *S. cerevisiae* compared to those of the control group, while in breast meats the significant difference was monitored after 6 d of incubation. It is concluded that dietary *S. cerevisiae* could improve the tenderness and oxidative stability of broiler meats.

(Key words: *S. cerevisiae*, growth performance, meat tenderness, oxidative stability, broilers)

INTRODUCTION

Yeasts are single celled, heterotrophic organisms that exist in a wide range of habitats. Yeasts in the genus *Saccharomyces* are among the most useful microorganisms. Various strains of *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) have been used in food and brewing industries. In addition, *S. cerevisiae* has long been fed to animals as a feed additive.

Recently, interest in meat quality has arisen by the need to supply the consumers with a consistent, high quality product at an affordable price. It is known that taste and sensory characteristics of meat can be influenced by diet, and a few literature data (Akiba *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002) showed that enrichment of diets with yeast could favorably improve broiler meat quality. For example, edible meats from broiler chicks fed a diet containing *S. cerevisiae* exhibited increased tenderness (Bonomi *et al.*, 1999), and increased water holding capacity (Lee *et al.*, 2002). The effect of *S. cerevisiae* supplementation on oxidative stability of chicken meat was not extensively studied albeit there are indicatives (Meyer *et al.*, 1994; Ampel *et al.*, 2000) that *S. cerevisiae* may possess antioxidant property.

During the past five decades, the growth performance of broilers has improved tremendously owing to the development of nutrition and genetics. Today, however, the broiler industry must focus more attention on public concerns such as environment and food safety. Thus, the poultry industry must develop alternatives to antibiotics growth promoters to maintain efficient poultry production and produce safe poultry products. In this regard, probiotics such as yeasts could be the most promising alternatives to antibiotics.

The present experiment was conducted to evaluate the effects of dietary *S. cerevisiae* on growth performance and meat quality traits in broiler chicks.

MATERIALS AND METHODS

1. Animals, Diets and Experimental Design

Day-old 160 male broiler chicks (Ross) purchased from a local hatchery were randomly housed in wire floored, suspended cages in a temperature controlled room. Continuous lighting was provided throughout the experimental period. Room temperature was gradually decreased from 32°C on Day 0 to 25°C on Day 21 and was kept constant thereafter. There were two dietary treatments, each consisting of 8 replicates. A replicate was identical to a cage with 10 birds so that each treatment had 80 chicks. Broiler starter and finisher diets were formulated (Table 1) to contain either 0 % or 3.0 % yeast (*S. cerevisiae*, Choheung Chemical Industrial Co. Ltd., Ansan, Kyunggi do, Korea) at the expense of soybean meal. The yeast was in a granular form that contained 45.6 % crude protein, 4.5 % crude fat, and 8.5 % crude ash, respectively, according to the manufacturer's specifications. The colony forming units of the yeast was counted to be 1.3×10^{10} /g. Feed and water were provided *ad libitum* throughout the experiment that lasted 35 d.

2. Body Weight and Feed Intake Measurements

Body weight was measured by cage at 1, 21 and 35 d of age. Feed intake was monitored by cage at 21 and 35 d of age. Feed intake per cage and weight gain per cage used to calculate feed/gain ratios.

3. Collection of Meat and Skin Samples

On the last day of 35 d feeding trial, one bird from each cage was selected and slaughtered by cervical dislocation. Immediately after slaughter, left and right breast and drumstick meats with skins on them were sampled. One half of breast and drumstick meats sampled were stored at 4°C prior to the measurement of shear force. The rest of the samples, *i.e.*, breast and drumstick meat, and skin samples were stored at -20°C for the lipid oxidation assay.

Table 1. Composition of the control diet¹

Ingredients	Starter (1~3 wk)	Finisher (4~5 wk)
Yellow corn (%)	59.742	64.252
Soybean meal (%)	28.26	27.833
Corn gluten meal (%)	6.261	3.00
Soybean oil (%)	2.00	1.828
Dicalcium phosphate (%)	1.762	1.218
Limestone (%)	0.936	1.126
Salt (%)	0.40	0.40
DL methionine (50%) (%)	0.359	0.139
L lysine HCl (98%) (%)	0.08	0.004
Vitamin premix ² (%)	0.10	0.10
Mineral premix ³ (%)	0.10	0.10
Total (%)	100.00	100.00
Calculated composition		
ME (kcal/kg)	3,100	3,100
CP (%)	21.00	19.00
Ca (%)	1.00	0.90
Total P (%)	0.719	0.619
Available P (%)	0.45	0.35
Methionine (%)	0.50	0.38
Lysine (%)	1.10	1.00

¹ The experimental diets were formulated by adding 3.0% yeast (*S. cerevisiae*) to the control diet at the expense of soybean meal. The yeast was in a granular form which contained 45.6% CP, 4.5% crude fat, and 8.5% crude ash, and its cfu was 1.3×10^{10} /g.

² Provided followings per kilogram of diet: vitamin A, 5,500 IU; vitamin D₃, 1,100 IU; vitamin E, 11 IU; vitamin B₁₂, 0.0066mg; riboflavin, 4.4 mg; pantothenic acid, 11 mg (Ca pantothenate: 11.96 mg); choline, 190.96 mg (choline chloride 220 mg); menadione, 1.1 mg (menadione sodium bisulfite complex 3.33 mg); folic acid, 0.55 mg; pyridoxine, 2.2 mg (pyridoxine hydrochloride, 2.67 mg); biotin, 0.11 mg; thiamin, 2.2 mg (thiamin mononitrate 2.40 mg); ethoxyquin, 125 mg.

³ Provided followings mg per kilogram of diet: Mn, 120; Zn, 100; Fe, 60; Cu, 10; I, 0.46 and Ca, min: 150, max: 180.

4. Measurement of Shear Force

Intact breast and drumstick meat samples were cut into square shape (35×25×6 mm), and then subjected to the measurement of shear force. An application of cutting force to the meat samples was performed using a TA XT2 Texture Analyzer equipped with a TA 7 Warner Bratzler Blade (Stable Micro Systems Ltd. Surrey, England, UK). Maximum shear force (*g*) was applied three times (*n*=3) per sample. Shear force is expressed as hardness of meat.

5. Measurement of TBARS Values

When required for analysis, breast and drumstick meat samples that had been stored at 20°C were thawed at 4°C, and homogenized (PH91, SMT Company, Japan). Six sub samples weighing approximately 2.5 g each from breast and drumstick samples were weighed into 50 mL screw capped centrifuge tubes and subsequently incubated (Sli 600ND, Eyela, Japan) at 30°C for 0, 1, 3, 6, 10, 15 and 21 d. Following incubation, each sub sample was immediately subjected to malondialdehyde acid (MDA) assay for measuring the extent of lipid oxidation. MDA, a secondary oxidation product, was determined by the method as described earlier (Sushil and Meliss, 1997) with minor modifications. Each sample was added with 6 mL of 2 % trichloroacetic acid and concussed for 5 min. The mixture was then adjusted to become 12.5 mL with distilled water and filtered through a Whatman No. 1 filter paper. A 3 mL filtrate was added with 3 mL of 5 mM 2 thio barbituric acid (TBA) and held at room temperature in a darkroom for 15 h. The absorption rate of the mixture was then measured at 530 nm. The amounts of 2 thio barbituric acid per kg of sample. The measurement of oxidative stability in skin samples was the same as outlined for breast and drumstick samples except for the homogenization step. Intact skin samples were incubated from 0 to 21 d. Immediately after incubation, samples were homogenized (Polytron[↓] PT MR 2100, Switzerland by Kinemacia AG.) with 6 ml of 20 % trichloroacetic acid and further processed as described above in order to measure the TBARS values.

6. Statistical Analysis

All data were subjected to one way ANOVA using the GLM procedure (SAS, 2000). The level of statistical significance was pre set at $P<0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Growth Performance

Growth performance from this feeding trial was shown in Table 2. Though not statistically meaningful, the BW gain tended to improve by the supplement of *S. cerevisiae* during the whole period of feeding experiment. Feed intake throughout the experiment was not affected by dietary treatments. Although not significant, the feed/gain ratios were lower in birds fed on *S. cerevisiae* than those of the control. The feed/gain ratios were improved 2.5 % during 0~3 wk of age, 4.8 % during 4~5 wk of age, and 3.9 % during 0~5 wk of age, compared to the control.

Our study indicates that dietary *S. cerevisiae* can improve the growth performance of broiler chicks. Several workers (Valdivie, 1975; Stanley *et al.*, 1993; Onifide *et al.*, 1999) also reported that the growth rate increased when broiler chicks were fed *S. cerevisiae*.

2. Shear Force of Meat

Table 2. Effect of dietary *S. cerevisiae* on growth performance of broiler chicks

	Control	3 % <i>S. cerevisiae</i>
0~3 wk		
Body weight gain, g/bird	572.4±37.1 ¹	590.4±43.6
Feed intake, g/bird	931.0±62.5	934.4±34.3
Feed/gain	1.63±0.10	1.59±0.09
4~5 wk		
BW gain, g/bird ²	949.7±44.3 ^b	992.9±37.3 ^a
Feed intake, g/bird	1776.7±61.3	1766.1±101.6
Feed/gain	1.87±0.11	1.78±0.10
0~5 wk		
Body weight gain, g/bird	1522.1±75.1	1583.0±74.0
Feed intake, g/bird	2707.6±96.5	2700.5±115.2
Feed/gain	1.78±0.11	1.71±0.06

Mean±SD. ^{a,b} *P*<0.05.

As shown in Fig. 1, the addition of 3 % *S. cerevisiae* to a corn soybean meal control diet lowered shear force in drumstick meat ($P<0.05$); however, such difference was not detected in breast meat.

The Warner Bratzler shear force determination is a widely accepted method to determine meat tenderness (Shackelford, *et al.*, 2001). Tenderness is the sum of the mechanical strength of skeletal muscle tissue after rigor mortis, and the weakening of the structure during the post mortem storage (Takahashi, 1996). It is the most important textural characteristic of meat and has the greatest influence on consumer acceptance of meat. Post mortem aging is widely known to improve tenderness. The amount of collagen in muscle has been used as a measure of muscle desirability or tenderness. The result (Fig. 1) suggests that the dietary supplementation of *S. cerevisiae* increases meat tenderness of broilers, though the reason is not clear. The probable reason is that *S. cerevisiae* prevents glycogen loss in drumstick muscle and so improves meat texture. Likewise, Immonen *et al.* (2000) reported lower shear force values in meats of high and intermediate glycogen contents compared to meats of low glycogen content.

There are some other factors which affect the tenderness. According to Silva *et al.* (1999), cooking loss and juiciness were significantly ($P<0.001$) correlated with tenderness. Many researchers speculated that increased water holding capacity of meat of high pH contributes to their increased tenderness (Bouton *et al.*, 1971, 1973; Jeremiah *et al.*, 1991; Purchas, 1990, 1993; Guignot *et al.*, 1994; Dransfield, 1996).

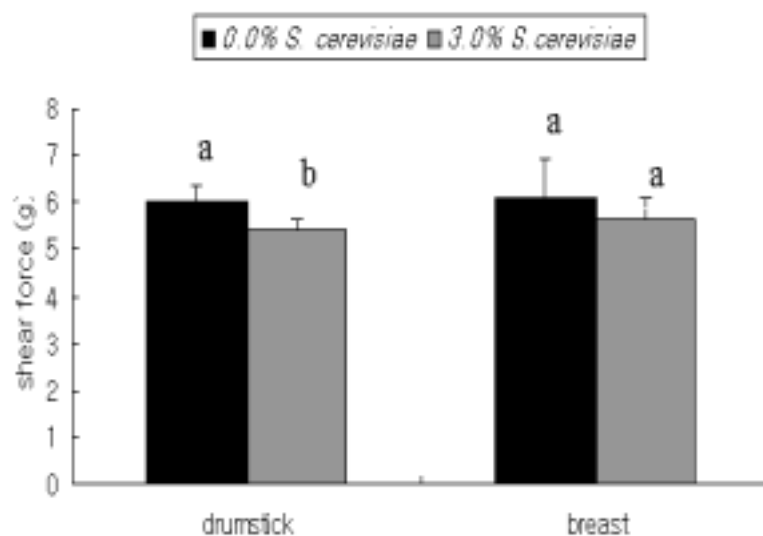


Fig. 1. Effect of dietary *S. cerevisiae* on shear force of drumstick and breast meats of broiler chicks (a,b: $P<0.05$).

3. TBARS Values of Meat and Skin

The effect of *S. cerevisiae* on oxidative stability in breast and drumstick meats, and skin samples were shown in Figs. 2, 3 and 4, respectively. Upon incubation, TBARS values increased gradually in breast and drumstick meats (Fig. 2 and 3) while more dramatic increase was evident in skin samples (Fig. 4). After 10 d of incubation, significantly lower TBARS values ($P<0.05$) of both drumstick meats and skin samples from broiler chicks fed diets enriched with *S. cerevisiae* than those from control chicks. In breast meats, this effect of lowering the TBARS values ($P<0.05$) by yeast feeding was monitored after 6 d of incubation.

The results (Fig. 2, 3, and 4) provide the evidence that supplementation of *S. cerevisiae* into a corn soybean meal base control diet could increase the oxidative stability of broiler meat and skin. It may indicate that there are some antioxidant factors in *S. cerevisiae*, or *S. cerevisiae* may make the meat and skin containing less oxidative fat (or fatty acids). Some researchers reported that there are some antioxidant factors in *S. cerevisiae*, such as thioredoxin peroxidase (acts as a peroxidase), glucose tolerance factor fractions (acts as an antioxidant), copper zinc superoxide dismutase (acts as oxidation retarding factor) (Meyer *et al.*, 1994; Ampel *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001). Many other researchers also back up such view that *S. cerevisiae* presents antioxidant properties or some oxidant defense systems (Chen *et al.*, 1998; Jamieson, 1998; Bastin *et al.*, 2002).

In contrast to the viewpoint described above, the graphs in Figs. 2, 3, and 4 show that the speeds of oxidation were the same in both treatments at the early stage of incubation, but the TBARS values in chicks fed *S. cerevisiae* did not increase further, indicating that the further oxidation was not happened. If an antioxidant(s) from *S. cerevisiae* contributes to lower the TBARS values, the graph from 3.0 % *S. cerevisiae* fed birds would show a sigmoid flexure at the early stages of incubation. At present, a clear explanation for an antioxidant effect of *S. cerevisiae* is not available, but it may well be that the oxidative fat or fatty acids content is different between *S. cerevisiae* fed chicks and control chicks. Several investigators also reported that dietary yeast significantly decreased the lipid deposition in both broiler chicks (Akiba *et al.*, 1982; Bolden *et al.*, 1984; Mendonca *et al.*, 1984; Takahashi and Jensen, 1984) and laying hens (Akiba *et al.*, 1983; Bolden and Jensen, 1985; Brenes *et al.*, 1985; Takahashi and Jensen, 1985).

It can be concluded from this experiment that dietary *S. cerevisiae* at the level of 3.0 % could stimulate growth performance, tenderize meat, and decrease the degree of oxidation in broiler meat and skin in broiler chicks.

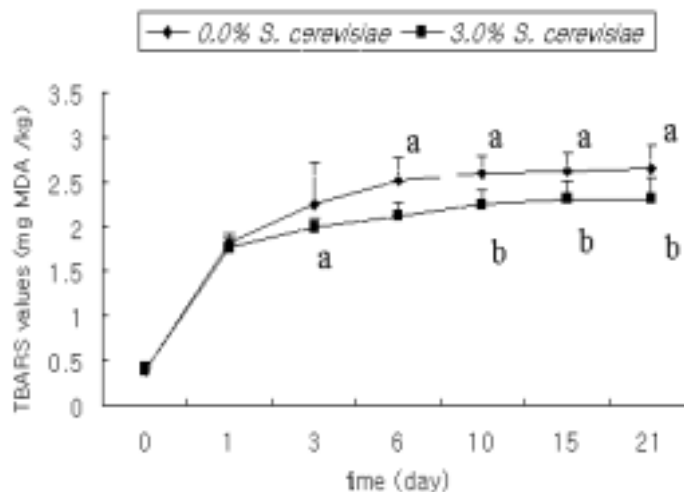


Fig. 2. Effect of dietary *S. cerevisiae* on TBARS values of breast meats. All data points are mean TBARS values from 8 replicates standard deviation (a,b: $P < 0.05$).

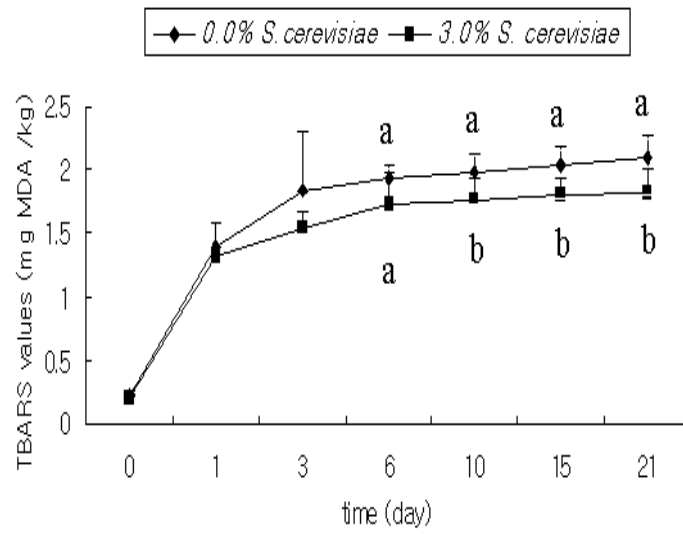


Fig. 3. Effect of dietary *S. cerevisiae* on TBARS values of drumstick meats. All data points are mean TBARS values from 8 replicates standard deviation (a,b : $P < 0.05$).

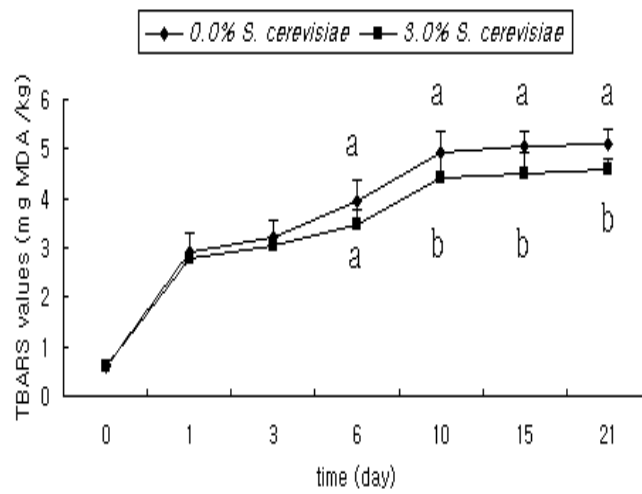


Fig. 4. Effect of dietary *S. cerevisiae* on TBARS values of skin. All data points are mean TBARS values from 6 replicates standard deviation (a,b: $P < 0.05$).

적 요

효모(*Saccharomyces cerevisiae*)의 급여가 육계의 생산성과 몇 가지 육질요인들의 개선 효과가 있는지 알기 위하여 사양실험을 실시하였다. 갓 부화한 160수의 수컷 병아리 (Ross strain)를 두 처리로 나눈 후, 각각 0%와 3.0%의 *S. cerevisiae*를 함유한 사료를 5주간 급여하였다. *S. cerevisiae* 급여구는 무급여구에 비하여 체중이 무거운 경향을 보였으나 유의성은 없었다. *S. cerevisiae* 첨가는 신선한 다리근육 (drumstick meat)의 전단력을 유의하게 감소시켰으나 ($P<0.05$), 삶은 다리근육에서는 이러한 효과가 관찰되지 않았다. 흉근과 다리근육 및 피부조직의 산화 안정성은 *S. cerevisiae* 첨가에 의하여 유의하게 개선되었다 ($P<0.05$). 결론적으로 사료에 3% 수준의 *S. cerevisiae* 첨가는 계육의 연도와 산화 안정성을 개선시키는 것으로 나타났다.

(색인 : *Saccharomyces cerevisiae*, 육계, 성장능력, 계육의 연도, 계육의 산화안정성)

REFERENCES

- Akiba Y, Sato K, Takahashi K 2001 Meat color modification in broiler chickens by feeding yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentrations of astaxanthin. J Appl Poult Res 10:154-161.
- Akiba Y, Jensen LS, Mendonca CX 1983 Laboratory model with chicks for assay of nutritional factors affecting hepatic lipid accumulation in laying hens. Poultry Sci 62(1): 143-151.
- Akiba Y, Jensen LS, Lilburn MS 1982 Effect of estrogen implants on hepatic lipid deposition in chicks fed different isonitrogenous and isocaloric diets. J Nutr 112(1): 189-196.
- Ampel M, Mirsky N, Yannai S 2000 Prevention of lipid oxidation by glucose tolerance factor. Czech J Food Sci 18(Spec. Issue): 142-143.
- Bastin P, Dillemans M, Nederveelde LV, Boivin P, Debourg A 2002 Evaluation of the potent antioxidant effect of *Saccharomyces cerevisiae* extract during beer production. Cerevisia 27:27-32.
- Bolden SL, Jensen LS 1985 The effect of marginal levels of calcium, fish meal, torula yeast and alfalfa meal on feed intake, hepatic lipid accumulation, plasma estradiol, and egg shell quality among laying hens. Poultry Sci 64(5):937-946.

- Bolden SL, Jensen LS, Takahashi K 1984 Responses in calcium and phosphorus metabolism and hepatic lipid deposition among estrogenized chicks fed various dietary ingredient. *J Nutr* 114(3):591-597.
- Bonomi A, Bonomi BM, Quarantelli A, Orlandi A 1999 Organic chromium in the feeding of broiler chickens. *Rivista di Scienza dell'Alimentazione* 28:385-397.
- Bonomi A, Vassia G, Bianchi M 1978 Observations and remarks on the use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragillis* in the form of living yeast, in the feed of turkeys for slaughter. *Arch Vet Ital* 29(1 2, Suppl.): 26-33.
- Bouton PE, Carroll FD, Harris PV, Shorthose WR 1973 Influence of pH and fibre contraction state upon factors affecting the tenderness of bovine muscle. *J Food Sci* 38: 404-407.
- Bouton PE, Harris PV, Shorthose WR 1971 Effect of ultimate pH upon the water holding capacity and tenderness of mutton. *J Food Sci* 36:435-439.
- Brenes A, Jensen LS, Takahashi K, Bolden SL 1985 Dietary effects on content of hepatic lipid, plasma minerals, and tissue ascorbic acid in hens and estrogenized chicks. *Poultry Sci* 64 (5): 947-954.
- Chen MT, Lin KB, Guo HL, Tseng YY 1998 Changes of color, pH, TBA and VBN of pork marinated in the liquid culture of *Monascus anka*, lactic acid bacteria and yeast. *Zhonghua Nongxue Huibao*, 181:68-76.
- Dransfield E 1996. The texture of meat: conditioning and aging. In: Taylor SA, Raimundo AR, Severini M, Smulders FJM 1996 Meat quality and meat packaging ECCEAMST, Utrecht, The Netherlands, pp.65-87.
- Guignot F, Touraille C, Ouali A, Renerre M 1994 Relationships between post mortem pH changes and some traits of sensory quality in veal. *Meat Sci* 37:315-325.
- Immonen K, Ruusunen M, Hissa K, Puolanne E 2000 Bovine muscle glycogen concentration in relation to finishing diet, slaughter and ultimate pH. *Meat Sci* 55, pp.25-31.
- Jamieson DJ 1998 Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 1511-1527.
- Jeremiah LE, Tong AKW, Gibson LL 1991 The usefulness of muscle color and pH for segregating beef carcasses into tenderness groups. *Meat Sci* 30: 97-114.
- Kim JH, Kim SC, Kim YM, Ha HM, Ko YD, Kim CH 2001 Effects of dietary supplementation of fermented feed (Bio a) on the performance of laying hens, fecal

- ammonia gas emission and composition of fatty acids in egg yolk. *Korean J Anim Sci Tech* 43(3):337-348.
- Lee JI, Kim YD, Kim DY, Choi YI, Ahn JN, Chae HS, Choi JH 2002 Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance and meat quality of broiler chickens. *Proc Korean J Anim Sci Tech* p 34.
- Mendonca CX, Jr, Takahashi K, Jensen LS 1984 Effect of fractions of fish meal and hepatic lipid deposition in estrogenized chicks. *Poultry Sci* 63(5):1020-1026.
- Meyer AS, Karen R, Jens AN 1994 Critical assessment of the applicability of superoxide dismutase as an antioxidant in lipid foods. *Food Chemistry* 51:171-175.
- Onifade AA, Odunsi AA, Babatunde M, Oloredo BR, Muma E 1999 Comparison of the supplemental effects of *Saccharomyces cerevisiae* and antibiotics in low protein and high fiber diets fed to broiler chicken. *Archiv Anim Nutr* 52(1):29-39.
- Onifade AA, Odunsi AA, Adebisi QA, Abubakar A, Enowebot AE, Muma E, Akinsoyinu OA 2000 Comparison of the performance of starting pullets fed supplemental baker's or feed grade yeast in diets containing high levels of palm kernel meal. *Archiv fuer Gefluegelkunde* 64(6):264-268.
- Purchas RW 1990 An assessment of the role of pH differences in determining the relative tenderness of meat from bulls and steers. *Meat Sci* 27:129-140.
- SAS Institute Inc 2000 SAS Online Doc. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Shackleford SD, Wheeler TL, Meode MK, Reagan JO, Byrnes BL, Koohmaraie M 2001 Consumer impressions of tender select beef. *J Anim Sci* 79: 2605-2614.
- Silva JA, Patarata L, Martins C 1999 Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during aging. *Meat Sci* 52: 453-459.
- Stanley VG, Ojo R, Woldesenbet S, Hutchinson DH 1993 The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poultry Sci* 72: 1867-1872.
- Sushil KJ, Meliss P 1997 The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins. *Free Radical Biology and Medicine* 22:593-596.
- Takahashi K 1996 Structural weakening of skeletal muscle tissue during post mortem ageing of meat: the non enzymatic mechanism of meat tenderization. *Meat Sci* 43: 567-580.
- Takahashi K, Jensen LS 1984 Effect of dietary composition and estradiol implants on hepatic microsomal mixed function oxidase and lipid deposition in growing chicks.

Poultry Sci 63(11):2217-2224.

Takahashi K, Jensen LS 1985 Liver response to diet and estrogen in white leghorn and Rhode Island Red chickens. Poultry Sci 64(5): 955-962.

Valdivie M 1975 *Saccharomyces* yeast as a by product from alcohol production on final molasses in diets for broilers. Cuban J Agric Sci 9:327-331.

- 부록 5- Trp, Thr analogue 복합 저항성 *Saccharomyces cerevisiae* 균주 개발. 염형준, 이승현, 김선혜, 선남규, 안길환, 이봉덕, 원미선, 송경빈. 한국 식품 영양 과학회지 2004. 7 ; 33(6), 1017~1021

Trp, Thr analogue 복합 저항성 *Saccharomyces cerevisiae* 균주 개발

염형준¹·이승현¹·김선혜¹·선남규¹·안길환¹·이봉덕²·원미선³·송경빈^{1†}

¹충남대학교 식품공학과

²충남대학교 축산학과

³한국생명공학연구원

Isolation of Trp, Thr Overproducing Strain of *Saccharomyces cerevisiae*

Hyoungjun Youm¹, Seunghyun Lee¹, Sunhye Kim¹, Namkyu Sun¹, Gihwan An¹,
Bongduk Lee², Misun Won³ and Kyung Bin Song^{1†}

¹*Department of Food Science & Technology, College of Agricultural and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea*

²*Department of Animal Science, College of Agricultural and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea*

³*Genome Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, 305-333, Korea*

†Corresponding author: Kyung Bin Song
Department of Food Science and Technology,
College of Agriculture and Life Sciences,
Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea
Phone: 82-42-821-6723
Fax: 82-42-825-2664
E-mail: kbsong@cnu.ac.kr

Runningtitle: Trp, Thr overproducing strain

Isolation of Trp, Thr Overproducing Strain of *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

To isolate a mutant which overproduces threonine and tryptophan, mutants of *Saccharomyces cerevisiae* were screened after UV and EMS mutagenesis. Hydroxynorvaline, a Thr analogue was used for selection of a Thr- overproducing mutant after UV mutagenesis. Among 31 mutants, TC 5-1 was selected as the strain candidate, based on amino acid analysis. TC 5-1 was then treated by EMS mutagenesis for Trp overproduction. Eight mutants were selected using fluorotryptophan for Thr and Trp overproducing strains. Amino acid analysis results showed that TC 6-1 was the best strain since it had the highest amount of Thr and Trp among mutants.

Key words: amino acid analogue, *Saccharomyces cerevisiae*, Threonine, Tryptophan

서 론

아미노산은 제과업계 등 식품산업에 있어 영양소뿐만 아니라 식품첨가물로 많이 사용되고 있다 (1). 최근 아미노산 음료가 국내외에서 출시되고 있으며 특히 Thr과 Trp은 필수 아미노산으로 동물 사료에 있어 부족하기 쉬운 대표적인 아미노산 중에 속한다. 특정 아미노산의 양산을 위한 *Saccharomyces cerevisiae* 등 미생물 균주 개량을 통한 연구가 많이 수행되어 왔다 (2). 효모는 단백질과 비타민의 주요 공급원인데 아미노산 강화된 효모가 영양가를 높이기 위해 시리얼 및 제과 품목 등에 첨가된다 (3). 특히 threonine과 tryptophan은 곡류의 제한 아미노산으로서 영양가치, 맛, 기능성 등의 이유로 인해 제과 분야에서 많이 사용되고 있다. 효모 중 *Saccharomyces cerevisiae*는 빵, 맥주, 포도주 산업 등에서 많이 사용되는 효모이고 제빵업계에서 새로운 효모 균주 개발 (3) 및 아미노산 analogue를 이용하거나 (4-9) 유전자재조합 기술을 통한 특정 아미노산을 대량 제조하는 효모 균주 개발에 관한 연구 (10,11)가 보고되어 왔다.

효모로부터 특정아미노산을 과잉생산하기 위한 방법으로서 효모를 특정 아미노산의 analogue들에 대하여 저항성을 갖도록 하는 방법이 있다. 이런 방법의 원리는 특정 아미노산에 대한 아미노산 analogue가 포함된 배지에서 미생물을 배양하게 되면 효모는 특정 아미노산을 대신하여 외부 analogue를 사용하여 단백질 대사 등을 수행하게 된다. 이 결과로 효모는 생합성된 효소나 단백질이 제 역할을 수행하지 못하게 되어 사멸하게 된다 (9). 따라서 효모가 특정 analogue에 대한 저항성을 갖는다는 것은 그 analogue에 대응하는 아미노산을 과잉생산 한다는 것을 의미하는 것이다.

본 연구에서는 threonine, tryptophan을 overproducing하는 *Saccharomyces cerevisia* 균주를 개발할 목적으로 threonine, tryptophan analogue에 저항성을 갖는 균주를 선별 하고자 하였다. 특히 이미 안전성이 확보된 미생물인 효모 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하였으며 mutagenesis 방법 (12)으로는 UV와 EMS를 사용하였다.

재료 및 방법

균주 및 amino acid analogue의 선정

본 연구에서 사용한 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* X2180 mating type (♂)를 사용했고 배지는 SD minimal 배지 (0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, 0.023% proline, 2% glucose)를 사용하였다. 아미노산 analogue를 선정하기 위해 tryptophan analogue로 알려진 indole, indoleacrylic acid, fluorotryptophan과 threonine analogue로 알려진 serine, hydroxynorvaline에 대한 균주의 저항성을 측정하였다. 예비 실험 결과, tryptophan analogue에서는 fluorotryptophan, threonine analogue에서는 hydroxynorvaline에서 성장 저해가 나타났으므로 본 실험에서는 이 두 analogue를 사용하였다.

Thr analogue의 minimum inhibitory concentration (MIC) 측정

아미노산 analogue에 대한 균주의 sensitivity를 측정하기 위해 disk diffusion test 이용하였다. Thr에 대한 analogue인 hydroxynorvaline의 MIC test는 *Saccharomyces cerevisiae* 균주를 1% 접종한 top agar (0.75%) plate에 paper disk를 올려놓은 후, 1 mM, 2.5 mM, 5 mM의 hydroxynorvaline 30 μ L로 paper disk를 충분히 적시고 32°C에서 배양한 후 생육 저지대를 관찰함으로써 MIC를 결정하였다.

UV mutagenesis 및 Thr analogue 저항성 균주 screening

아미노산 analogue에 저항성을 갖는 효모 균주의 생성을 위해 본 실험에서는 UV 조사를 이용한 mutation 방법을 사용하였다. UV 조사 조건을 설정하기 위한 생존율 측정을 위해 *Saccharomyces cerevisiae* 균주를 1×10^7 cell/mL의 농도 (OD=0.5)가 되도록 배양한 후 254 nm의 UV 파장에서 50, 100, 200, 500, 1000 J/m²로 조사하였다. UV 조사된 효모 균주는 10 mM hydroxynorvaline이 포함된 배지에 도말하여 생존 균주를 선별하였으며 control로써는 UV가 조사되지 않은 wild type의 효모 균주를 비교하였다. 실험 결과 생육이 가능한 colony를 분리하여 enriched medium인 YPD 배지와 minimal medium인 SD-proline 배지에 각각 patch하여 성장속도를 비교하였다. 성장속도의 비교 결과, 두 배지에서 모두 성장속도가 빠른 균주를 선택하여 다음 실험에 이용하였다.

선정된 균주의 Trp analogue에 대한 MIC 측정

균주의 생육 저지대를 측정하기 위해 disk diffusion test를 이용하였다. 선정 균주를 1% 접종한 top agar (0.75%) plate에 paper disk를 올려놓은 후, 0.1 mM, 0.15 mM, 0.2 mM 농도의 fluorotryptophan 30 μ L으로 paper disk를 충분히 적시고 32°C에서 배양한 후 생육 저지대를 관찰하여 MIC를 측정하였다.

Trp analogue에 대한 EMS mutagenesis

선정된 TC 5-1 균주를 OD₆₀₀ = 1.0 정도 되도록 배양하고 3,000 rpm에서 15 min간 원심분리 한 후 멸균된 3차 증류수로 3번 세척하였다. 최종 세척이 끝나면 3차 증류수로 다시 부유시켜 EMS 5%로 15분간 반응시키고 10% sodium thiosulfate를 넣어 반응을 정지하였다. 반응이 정지된 실험구를 원심분리하여 상등액을 버리고 3차 증류수로 2번 세척하고 생성된 mutant를 2.0 mM fluorotryptophan analogue 배지에 도말하였다. EMS 처리된 균주는 2.0 mM fluorotryptophan이 포함된 SD-proline 배지에 도말하여 analogue 저항성 균주를 선별하였다. 본 실험의 대조구로 EMS 처리가 되지 않은 균주를 비교 실험하였다. Analogue가 포함된 배지에서 생육이 가능한 colony를 분리하였으며, 분리된 8개의 colony는 enriched medium인 YPD 배지와 minimal medium인 SD-proline 배지에 각각 patch하여 성장속도를 비교하였다. 성장속도의 비교 결과, 두 배지에서 모두 성장속도가 빠른 균주를 선택하였다.

Amino acid analysis

선정된 균주로부터 생성되는 amino acid의 함량을 측정하기 위해 HPLC Pico-tag detection system을 이용하여 분석하였다. 순수한 20개의 아미노산을 이용하여 standard curve를 만들어 Thr, Trp의 retention time을 측정한 후 균주의 아미노산 분석 결과와 비교하여 분석하였다. Standard curve는 순수한 아미노산 Asp, Trp, Tyr 0.1%, 나머지 17 가지는 1% 농도를 사용하여 작성 하였다.

균주의 전처리 과정으로 선택된 균주를 OD₆₀₀가 1이 되도록 배양한 후 원심분리를 통해 pellet을 분리하였다. 분리된 pellet은 lysis buffer에 부유시킨 후 동량의 glass beads를 넣어 vortexing하고 원심분리를 통하여 상등액을 취해 intracellular amino acid 함량을 측정하였다. 각각의 시료는 total amino acid 분석을 위해 24시간동안 110°C, constant boiling HCl로 처리 후 분석하였으며, tryptophan의 함량을 분석하기 위한 전처리 과정으로는 methanesulfonic acid를 사용하였다.

HPLC의 이동상으로는 0.14 M Sodium acetate buffer(0.5 mL/L TEA, 60 mL/L Acetonitrile with titration glacial acetic acid at pH 5.9)를 사용하였으며 용매는 60% Acetonitrile를 사용 하였다. Column은 Waters Pico-Tag column으로 크기는 3.9 mm × 300 mm, 입자는 5 μm 이다. Detector는 UV-visible absorbance detector로 파장은 254 nm에서 측정 하였다.

결과 및 고찰

Thr analogue의 MIC 측정

Thr analogue에 대한 실험 결과 2.5 mM hydroxynorvaline의 농도에서 생육 저지대가 관찰되었다 (Fig. 1). 따라서, 본 연구에서는 analogue 저항성 균주의 screening은 wild type의 MIC 농도보다 높은 농도인 10 mM hydroxynorvaline을 이용하였으며 이 농도에서 wild type은 뚜렷한 생육저지대를 나타냈다.

UV mutagenesis 및 Thr analogue 저항성 균주 screening

UV 조사 생존율을 측정 결과 (Fig. 2) UV mutagenesis 조건으로 50% 균을 사멸하는 500 J/m² 로 정하였다. UV 조사에 의해 10 mM hydroxynorvaline이 포함된 배지에서 생육이 가능한 콜로니들을 분리하였고 enriched medium인 YPD 배지와 minimal medium인 SD-proline 배지에 각각 patch하여 두 배지에서 모두 성장속도가 빠른 31 균주 중 아미노산 분석 결과에 의해 최종 선정 균주로서 TC 5-1를 결정하였다.

Trp analogue에 대한 MIC 측정

Trp analogue에 대한 선정 균주 (TC5-1)의 sensitivity 측정 결과, 0.1 mM fluorotryptophan의 농도에서부터 생육 저지대가 관찰되었다 (Fig. 3). 따라서 본 실험에서 tryptophan analogue 저항성 균주의 screening은 MIC 농도 보다 높은 농도인 2.0 mM fluorotryptophan을 이용하였으며 이 농도에서 선정 균주 TC 5-1은 뚜렷한 생육 저지대가 나타났다 (Fig. 3).

EMS 처리된 Thr Mutant의 Trp analogue 저항성 균주 screening

선정된 균주 TC 5-1로부터 ethyl methane sulfonate (EMS) mutagenesis를

통해 2차 mutation을 시켜 Trp analogue에 저항성을 갖는 균주를 찾아냄으로써 Thr, Trp을 동시에 over-production하는 최종 복합성 저항 균주를 개발하고자 하였다. 효모의 일반적인 mutagen으로는 EMS, UV 조사, nitrous acid, diethyl sulfate, N-methyl-N'-nitrosoguanidine (MNNG) 등을 들 수 있다 (12). 이 중 효모 mutation에 가장 많이 사용되고 있는 EMS는 alkylating agent로 DNA 염기에 작용하여 mis-pair를 일으켜 point mutation을 일으킨다. EMS 처리를 하게 되면 keto form의 guanine이 O⁶부분에 alkylation되면서 enol form으로 구조가 변화하게 되고 DNA replication 후 cytosine대신에 thymine이 결합하게 돼 base pair가 바뀌게 된다 (Fig. 4. 참조) (12). EMS 처리한 TC 5-1 균주를 2.0 mM fluorotryptophan이 포함된 배지에 도말하여 생존 균주를 선별하였으며 EMS 처리되지 않은 parent cell인 TC 5-1을 control로써 비교 실험하였다. 실험 결과, EMS 처리에 의해 2.0 mM fluorotryptophan이 포함된 배지에서 생육이 가능한 colony들을 분리하였으며, 이들을 enriched medium인 YPD 배지와 minimal medium인 SD-proline 배지에 각각 patch하여 성장속도를 비교하였다. 성장속도의 비교 결과, 두 배지에서 모두 성장속도가 빠른 8개 균주를 선택하여 배양한 후 HPLC를 이용하여 아미노산 분석을 하였다. 본 연구에서 사용한 analogue screening method는 mutant의 특정 아미노산 over-producing 여부를 확인하기 위한 가장 빠르고 편리한 방법으로 analogue가 포함된 배지에서 cell을 키울 때 아미노산 대신 analogue가 단백질 대사에 관여하여 단백질이 제 역할을 수행하지 못하게 됨으로써 미생물이 정상적으로 생육하지 못하게 된다 (9). 따라서 analogue가 포함된 배지에서 생육하는 효모의 경우 해당 아미노산을 over-producing하게 된다.

Screening된 mutant의 Trp, Thr 함량 측정

선정된 8개의 복합 저항성 균주로부터 생성되는 아미노산의 함량을 Pico-tag detection method을 이용하여 HPLC로 분석하였다. Analogue plate에서 screening된 8개의 mutant들은 HPLC로 아미노산 분석을 통해 다시 2차적으로 screening되었으며 8개의 EMS mutant 중 wild type에 비해 Trp, Thr의 함량이 가장 높은 TC 6-1을 최종 균주로 선정하였다. 복합 저항성 균주로서 개발된 mutant와 wild type의 intracellular에 대한 Trp, Thr의 함량 분석 결과는 Table 1와 같다. Mutagenesis에 의해 선정된 효모 균주는 Thr이 Trp보다 효과적으로 overproduce 함을 알 수 있었다. 본 연구에서는 Thr, Trp 등 필수 아미노산을 overproducing하는 균주를 개발하여 특정 아미노산을 많이 생산하는 균주로부터 이들 아미노산을 추출하지 않고 그대로 건조·가공하여

균체 자체를 이용할 수 있다. 현재까지 복합 저항성 균주는 여러 가지 어려움으로 인해 개발된 적이 없었다. 본 연구에서 처음으로 시도되어 개발된 TC 6-1은 Thr과 Trp이 intracellular에서 4.83, 1.85배 각각 많이 생산되었다 (Table 1).

선정된 균주 TC 6-1의 생육특성

미생물의 성장형태는 일반적으로 유도기 (lag phase), 대수기 (exponential phase), 정상기 (stationary phase), 사멸기 (death phase)의 4단계로 나뉘어 지는데, 이 중 미생물이 폭발적으로 증식하여 개체가 빠르게 증가하는 대수기에서 1차 대사 산물인 Thr, Trp이 가장 활발히 생성되는 것으로 생각된다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이 wild type인 S7964는 36 hr, mutant TC 5-1은 42 hr, 복합 저항성 균주인 TC 6-1은 54 hr 만에 정지기에 도달했다. UV와 EMS에 의해 효모가 mutation되면서 점차 대수기가 길어졌는데 이로 인하여 cell의 내부에 Thr, Trp을 accumulation할 수 있는 기간이 더 길어졌기 때문으로 사료되며 wild type에 비해 TC 6-1은 Thr, Trp이 각각 4.83, 1.85배 높은 intracellular accumulation이 이루어졌음을 알 수 있었다.

요약

Thr, Trp을 overproduce하는 효모 균주를 분리하기 위하여 *Saccharomyces cerevisiae*를 UV와 EMS로 mutagenesis 한 후 screen하였다. Thr analogue인 hydroxynorvaline이 UV mutagenesis 후 Thr overproducing 하기 위해 사용되었다. 31 mutant 중 아미노산 분석 결과에 의해 TC 5-1이 선정되었고 다시 Trp overproducing 위해 EMS mutagenesis 하였다. 8개의 mutant가 flurotryptophan을 이용하여 Thr, Trp을 overproduce하는 mutant로 선정되었다. 아미노산결과에 의해 그 중 TC 6-1이 최종 효모 균주로 선정되었다.

감사의 글

본 연구는 농림기술관리센터의 연구비 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Farfan MJ, Calderon IL. 2000. Enrichment of threonine content in *Saccharomyces cerevisiae* by pathway engineering. *Enzyme Microbial Technol* 26: 763-770.
2. Riccardi G, Sora S, Ciferri O. 1981. Production of amino acid by analog-resistant mutants of the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J Bacteriol* 147: 1002-1007.
3. Rincon AM, Benitez T. 2001. Improved organoleptic and nutritive properties of bakery products supplemented with amino acid overproducing *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. *J Agric Food Chem* 49: 1861-1866.
4. Martinez-Force E, Benitez T. 1992. Selection of amino-acid overproducer yeast mutants. *Curr Genet* 21: 191-196.
5. Martinez-Force E, Benitez T. 1992. Changes in yeast amino acid pool with respiratory versus fermentative metabolism. *Biotech Bioeng* 40: 643-649.
6. Moller A. 1994. L-Tryptophan production from anthranilic acid by amino acid auxotrophic mutants of *Candida utilis*. *Process Biochem* 29: 521-527.
7. Suzzi G, Pomano P, Polsinelli M. 1998. Isolation and characterization of mutants resistant to amino acid analogues obtained from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *W J Microbiol Biotechnol* 14: 243-246.
8. Gasent-Ramirez JM, Benitez T. 1998. Lysine-overproducing mutants of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast isolated in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 63: 4800-4806.
9. Ramos C, Calderon IL. 1992. Overproduction of threonine by *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to hydroxynorvaline. *Appl Environ Microbiol* 58: 1677-1682.
10. Delgado MA, Guerrero JA, Conde J. 1982. Genetic and biochemical study of threonine-overproducing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 2: 731-736.

11. Farfan MJ, Aparicio L, Calderon IL. 1999. Threonine overproduction in yeast strains carrying the HOM3-R2 mutant allele under the control of different inducible promoters. *Appl Envir Microbiol* 65: 110-116.
12. Lawrence CW. 1991. Classical mutagenesis techniques. *Methods in Enzymol.* 194: 273-281.

Table 1. Amount of Thr, Trp produced by the wild type and mutants

(unit : $\mu\text{g}/\text{DCWmg}$)

Cell	Intracellular accumulation in the cell		Ratio of Mutant/Wild	
	Threonine	Tryptophan	Threonine	Tryptophan
Wild, S7964	0.12	0.07	-	-
TC 6-1	0.58	0.13	4.83	1.85
TC 6-2	0.10	0.03	0.83	0.43
TC 6-3	0.21	0.19	1.75	2.71
TC 6-4	0.12	0.09	1	1.28
TC 6-5	0.33	0.10	2.75	1.43
TC 6-6	0.14	0.16	1.16	2.28
TC 6-7	0.25	0.14	2.08	2
TC 6-8	0.12	0.09	1	1.28

Figure Legend

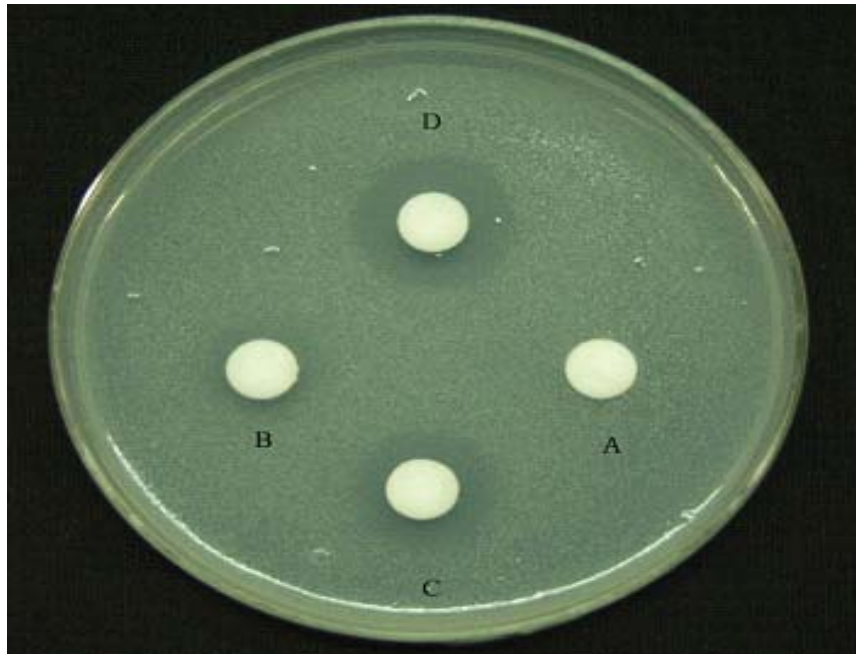


Fig. 1. Sensitivity of wild type yeast cells to hydroxynorvaline.

The wild type yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae* X2180) in log-phase were mixed with 1% agar and poured on the SD minimal plate (0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate and 2% glucose) containing 0.023% proline. The discs containing different concentrations (0, 1, 2.5, 5, 10 mM) of hydroxynorvaline were placed on the top agar layer containing yeast cells and growth inhibitions by hydroxynorvaline were examined.

A ; control, B ; 1 mM, C ; 2.5 mM, D ; 5 mM

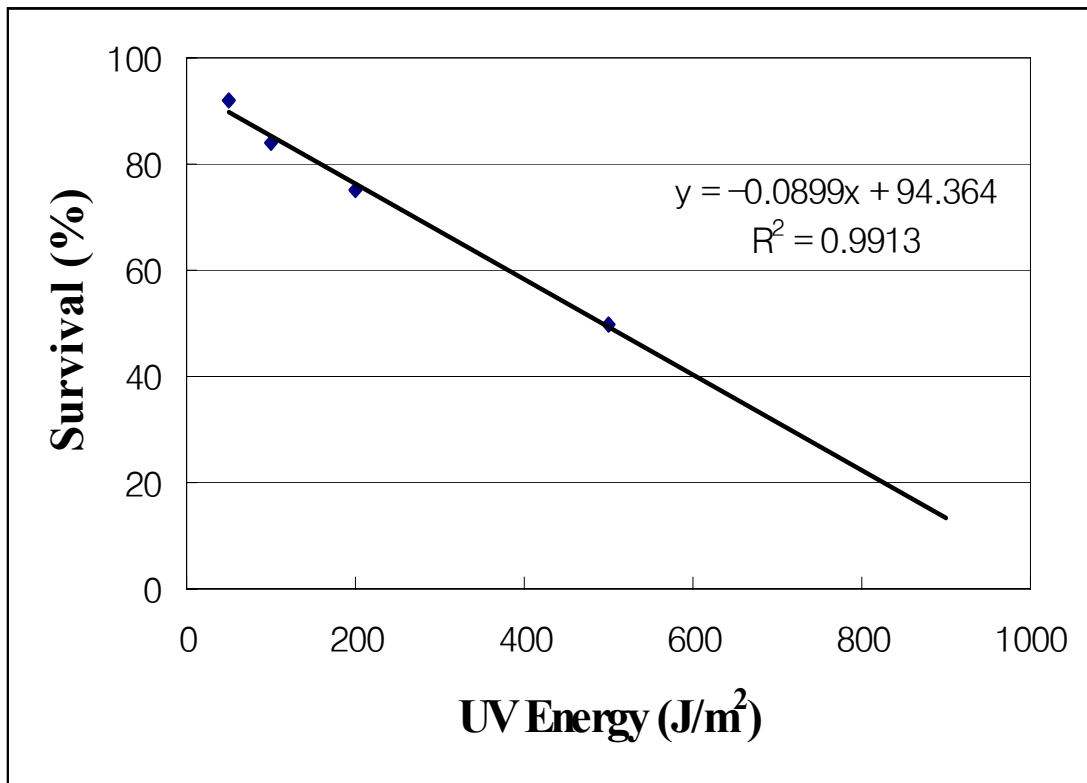


Fig. 2. Survival rate of yeast cells by UV irradiation.

The wild type yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae* X2180) in log-phase were irradiated with UV at different levels of energy (50, 100, 200, 500, 1000 J/m²), and plated onto YPD rich plate (1.0% yeast extract, 0.5% peptone, and 2% glucose). The survival rate was calculated by counting the colonies on the plate.

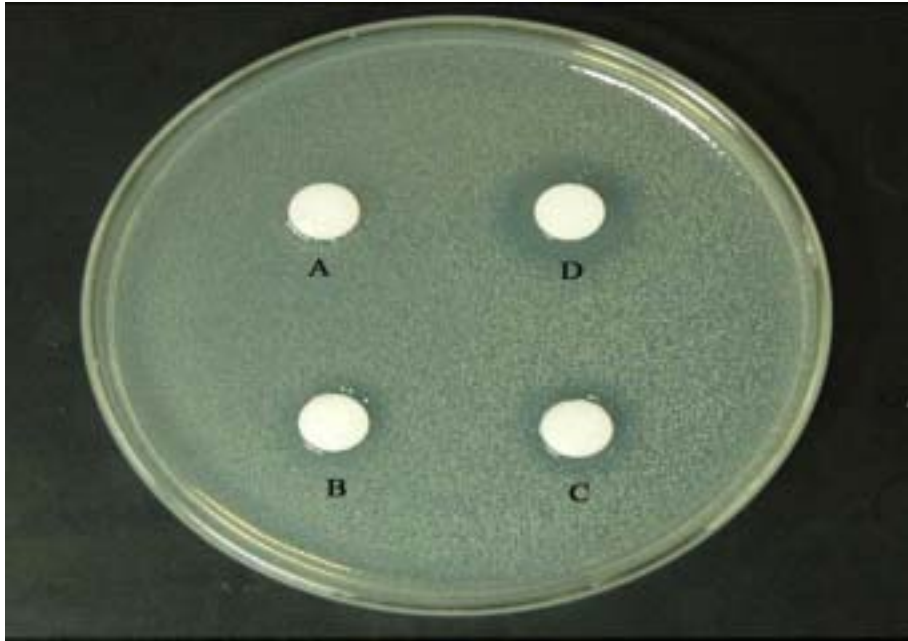


Fig. 3. Resistance of mutant TC 5-1 to fluorotryptophan.

Saccharomyces cerevisiae mutant TC 5-1 was mixed with 1% agar and overlaid on the SD minimal plate containing 0.023% proline. The discs containing fluorotryptophan were placed on the top of agar layer containing yeast cells.

A ; control, B ; 0.1 mM, C ; 0.15 mM, D ; 0.2 mM

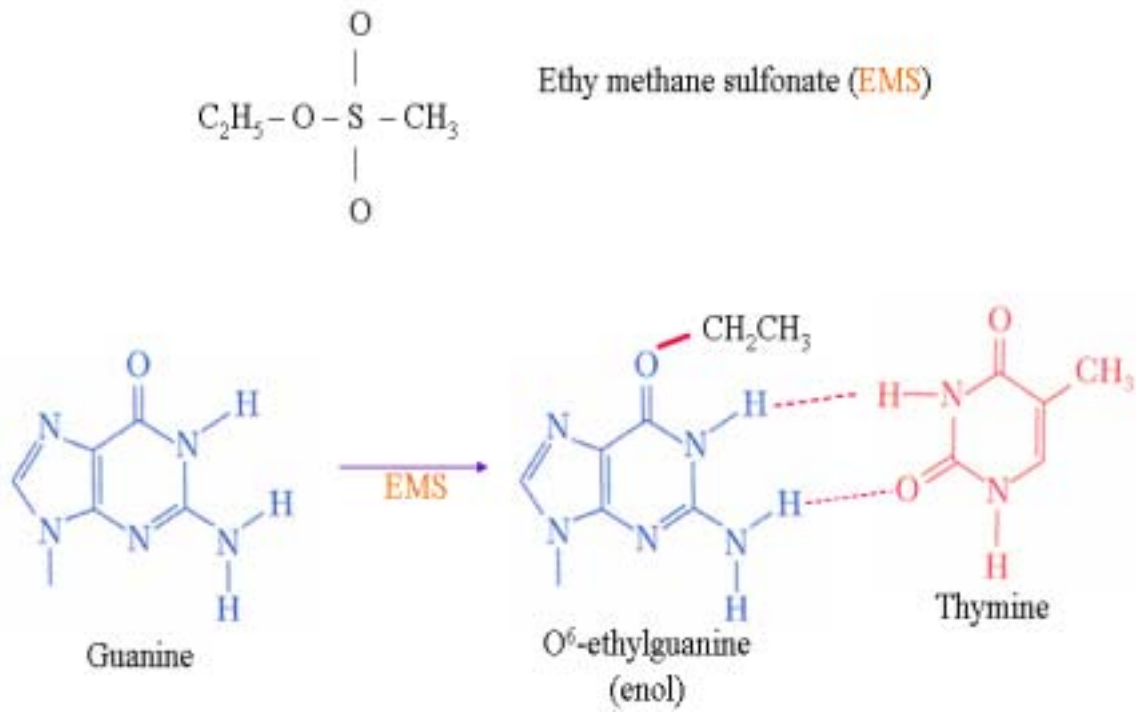


Fig. 4. EMS 처리에 의한 guanine의 구조 변화와 thymine과의 mis-pairing.

Keto form의 guanine이 O⁶부분이 EMS에 의하여 alkylation되면서 enol form으로 구조가 변화하여 thymine과 mis-pairing 하게 된다.

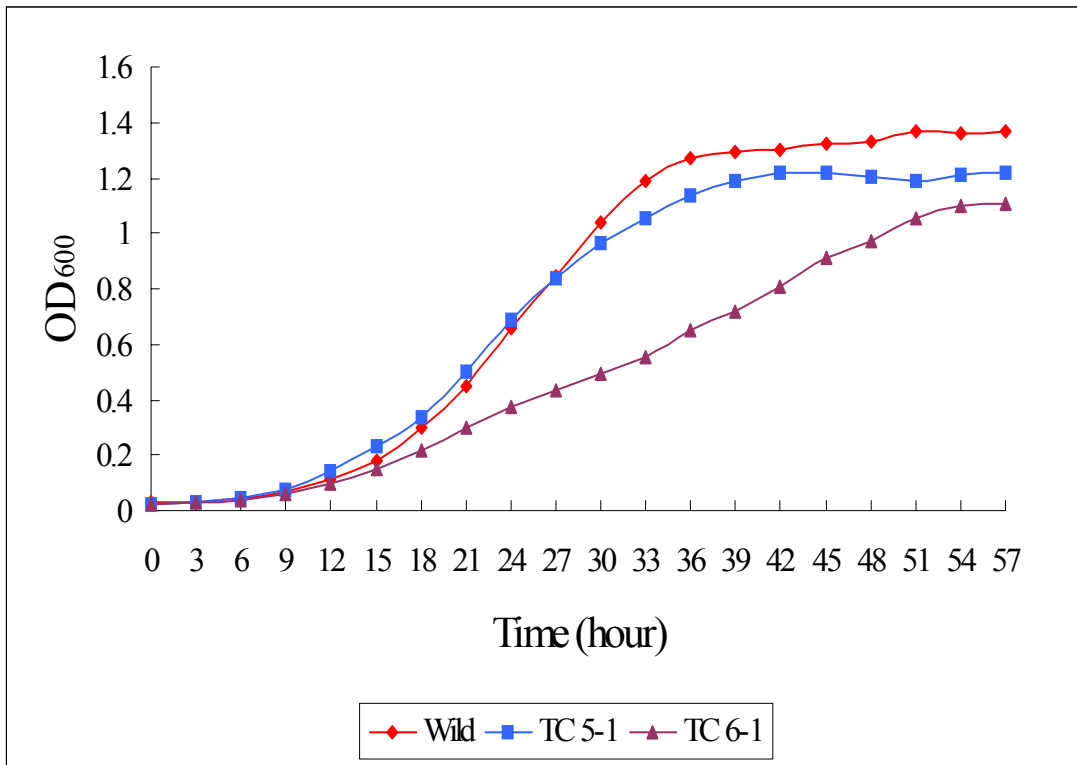


Fig. 5. Growth curve of the wild type strain and the mutants.

Saccharomyces cerevisiae wild type 및 mutants를 YPD 액체 배지에서 shaking incubation 하면서 3시간 마다 600nm에서 OD값을 측정 하였다.

- 부록 6- Sunhye Kim, Youmi Ha, Hyoungjoon Youm, Gihwan Ahn, Bongduk Lee, Misun Won and Kyung Bin Song. (2004) Isolation of Tryptophan Overproducing Strain by EMS Mutagenesis of *Candida rugosa*. J. Food Sci. Nutr. 9, 187-189.

Isolation of Tryptophan Overproducing Strain by EMS Mutagenesis of *Candida rugosa*

Sunhye Kim¹, Youmi Ha¹, Hyoungjoon Youm¹, Gihwan Ahn¹, Bongduk Lee², Misun Won³ and Kyung Bin Song^{1†}

¹*Department of Food Science & Technology, College of Agricultural and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea*

²*Department of Animal Science, College of Agricultural and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea*

³*Genome Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, 305-333, Korea*

†Corresponding author: Kyung Bin Song
Department of Food Science and Technology,
College of Agriculture and Life Sciences,
Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea
Phone: 82-42-821-6723
Fax: 82-42-825-2664
E-mail: kbsong@cnu.ac.kr

Runningtitle: Trp overproducing strain

Abstract

To isolate a mutant which overproduces tryptophan, mutants of *Candida rugosa* were screened after EMS mutagenesis. Fluorotryptophan, a Trp analogue was used for selection of a Trp-overproducing mutant after mutagenesis. Among 50 mutants, several candidates were selected based on intracellular tryptophan content. Amino acid analysis results showed that C3 was the best strain since it had the highest amount of Trp among mutants.

Key words: amino acid analog, *Candida rugosa*, tryptophan,
EMS mutagenesis

Introduction

Amino acids have extensive industrial applications including as nutrients and food additives in bakeries and food industries (Farfan and Calderon, 2000). Tryptophan is an essential but limited in animal feed and human food and it is one of the amino acids commercially produced by fermentation using genetically modified organisms. Many studies have been reported on mutants of bacteria to produce tryptophan (Karahashi et al, 87; Terasawa et al, 90; Tsunekawa et al, 92). Yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida* also have been used for the production of tryptophan (Moller 94; Xiu et al 97).

The regulation of amino acid biosynthesis can be studied by the use of amino acid analogues to select mutants which are altered in their ability to regulate the synthesis of the natural amino acid (Arfin and Gantt 83, Martinez-Force and Benitez 92). Isolation of mutants resistant to amino acid analogue is a likely source of amino acid overproducers (Alix 82). Thus, several amino acid analogs have been used to isolate mutants overproducing specific amino acids (Ramos and calderon, 92; Riccardi et al 81; Martnez-Force and Benitez 92). Fluorotryptophan is a tryptophan analog known to inhibit the cell growth because its chemical structure mimics tryptophan and hinders the activity of the tryptophan feedback-inhibited enzymes in biosynthesis of the amino acid (Ramos and calderon, 92).

Although isolation of *Saccharomyces cerevisiae* mutants have been extensively studied, there are few studies on other yeast such as *Candida rugosa*. Therefore, the purpose of the study was to generate mutants overproducing tryptophan by EMS mutagenesis of *Candida rugosa*.

Materials and Method

Strain and culture condition

Wild-type *Candida rugosa* was obtained from KCTC (Korea Collection for Type Culture, KCTC 7711, ATCC 20306). Cultivation was carried out with YM broth. YM broth contained yeast extract (3g), malt extract (3g), peptone (5g), and dextrose (10g) per liter. For solid media, 20g agar was added per liter. For screening of mutants, SD minimal medium (0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate and 2% glucose) containing 0.023% proline as a sole nitrogen source was used. Shake flask experiments were performed at 24°C and 130 rpm on a shaker.

Measurement of minimum inhibitory concentration (MIC) against Trp analogue

Sensitivity to fluorotryptophan of wild-type cells and the concentration of fluorotryptophan for the isolation of tryptophan-overproducing strain were examined by minimum inhibition concentration (MIC) test. *Candida rugosa* cells grown on with 1% soft agar and overlaid on the SD minimal plate containing 0.023% proline. The discs containing different concentrations (0.015 mM, 0.025 mM, 0.05 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.25mM, 0.5mM, 5mM) of fluorotryptophan were placed on top of the agar layer containing cell culture, and growth inhibition by fluorotryptophan indicated by halos was observed (Fig. 1).

EMS mutagenesis and screening of mutants

Candida rugosa cells grown (1×10^7 cells/ml, OD=0.5) were centrifuged at 3000 rpm for 10 min and washed with sterile distilled water. After repeated washing, cells were resuspended in the sterile distilled water and treated with 4% EMS for 10 min, which was established by preliminary experimental results (data not shown). After treatment, the reaction was stopped by the addition of 10% sodium thiosulfate, and then centrifuged at 14,240 g for 1 min. Precipitate was washed with sterile distilled water twice and cells were spread on SD-proline medium containing 2 mM

fluorotryptophan. Fifty colonies grown on the selection plate were streaked onto YM and SD-proline minimal media, and among which 4 colonies growing well on both YM and SD-proline minimal plates were selected.

Aminoacidanalysis

To determine the content of tryptophan, the mutant cells were harvested using centrifugation. To examine the amount of tryptophan in intracellular amino acid pool, the cells were re-suspended in lysis buffer and lysised using bead beater with glass beads. Amount of free tryptophan in lysis mixture was determined using HPLC (Waters Co., Milford, MA, USA) with a Pico-Tag detector system. Amino acid standard mixture was used for the quantitative analysis (Fig. 2). For total tryptophan amount of harvested cells, harvested cells were treated with 4 M methanesulfonic acid at 110°C for 24 h and its tryptophan amount was determined.

ResultsandDiscussion

Toxic amino acid analogues are known to block essential functions of amino acids in cells (Rincon and Benitez 01). Use of resistance to these analogues has led to a method to isolate mutants which overproduce the specific amino acids (Martinez-Force and Benitez 92; ramirez and benitez 98; Ramirez et al 99). Trp overproducing mutants may overcome the inhibitory effect of fluorotryptophan due to competition between Trp and the analogue for the t-RNA binding site (Moller, 94). Sensitivity to fluorotryptophan of wild-type cells was examined by minimum inhibition concentration (MIC) test. The discs containing different concentrations of 0.015 mM, 0.025 mM, 0.05 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.25mM, 0.5mM, and 5mM of fluorotryptophan were placed on top of the agar layer containing *Candida rugosa* cell culture. Growth inhibition by fluorotryptophan indicated by halos was observed (Fig. 1). Based on the MIC test results, 2 mM of fluorotryptophan was used as the optimal concentration for the isolation of tryptophan-overproducing strain.

To generate mutants overproducing Trp, EMS mutagenesis was employed. The condition of EMS mutagenesis was determined by examining the survival rate of cells treated at different EMS

concentration. EMS at 3, 4, 5% of concentration was used for 10, 20, 30, 40 min. Preliminary experiments showed that 4% and 10 min was the best mutagenesis condition (data not shown) based on the survival rate, where 40% of survival rate was observed.

After treating *Candida rugosa* cells at 4% EMS for 10 min, fluorotryptophan-resistant mutants were screened. Colonies (50) grown on the selection plate were streaked onto both YM medium and SD minimal plates containing 0.023% proline were selected. To determine the content of Trp, the mutant cells were harvested, and the crude cell extracts were prepared to examine the amount of Trp in intracellular amino acid pool. Amino acid analysis was performed by HPLC (Waters Co., Milford, MA, USA) using Pico-Tag detector system. HPLC chromatogram of 20 amino acid standards were shown Fig. 2. The results of the amino acid analysis of the samples selected showed that the intracellular content of Trp in the mutant C3, C4, C11, C12 needs further analysis (Table 1). Among the mutants, repeated experiments clearly indicated that C3 was the best candidate strain.

To determine the content of tryptophan, the mutant C3 was grown at OD=1.0 and harvested using centrifugation. To examine the amount of tryptophan in intracellular amino acid pool, the cells were lysed using a bead beater with glass beads. Amount of intracellular tryptophan increased 1.4-fold compared with the wild type (Table 2). For total tryptophan amount of harvested cells, harvested cells were treated with 4 M methanesulfonic acid at 110°C for 24 h and its tryptophan amount was determined. Results indicated that harvested cells had an increase in Trp content by 1.6-fold (Table 2). The productivity of Trp remains relatively low compared to the microbial production of other amino acid due to the complex multiple regulations in the biosynthetic pathway of Trp (Xiu et al, 97).

In summary, we isolated a Trp-overproducing mutant, C3, selected using Trp analogue by EMS mutagenesis.

Acknowledgments.

This work was supported by ARPC under the Ministry of Agricultural and Forestry

References

1. Farfan MJ, Calderon IL. 2000. Enrichment of threonine content in *Saccharomyces cerevisiae* by pathway engineering. *Enzyme Microbial Technol* 26: 763-770.
2. Riccardi G, Sora S, Ciferri O. 1981. Production of amino acid by analog-resistant mutants of the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J Bacteriol* 147: 1002-1007.
3. Rincon AM, Benitez T. 2001. Improved organoleptic and nutritive properties of bakery products supplemented with amino acid overproducing *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. *J Agric Food Chem* 49: 1861-1866.
4. Martinez-Force E, Benitez T. 1992. Selection of amino-acid overproducer yeast mutants. *Curr Genet* 21: 191-196..
5. Martinez-Force E, Benitez T. 1992. Changes in yeast amino acid pool with respiratory versus fermentative metabolism. *Biotech Bioeng* 40: 643-649.
6. Moller A. 1994. L-Tryptophan production from anthranilic acid by amino acid auxotrophic mutants of *Candida utilis*. *Process Biochem* 29: 521-527.
7. Suzzi G, Pomano P, Polsinelli M. 1998. Isolation and characterization of mutants resistant to amino acid analogues obtained from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *W J Microbiol Biotechnol* 14: 243-246.
8. Gasent-Ramirez JM, Benitez T. 1998. Lysine-overproducing mutants of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast isolated in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 63: 4800-4806.
9. Ramos C, Calderon IL. 1992. Overproduction of threonine by *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to hydroxynorvaline. *Appl*

- Environ Microbiol* 58: 1677-1682.
10. Delgado MA, Guerrero JA, Conde J. 1982. Genetic and biochemical study of threonine-overproducing mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 2: 731-736.
 11. Farfan MJ, Aparicio L, Calderon IL. 1999. Threonine overproduction in yeast strains carrying the HOM3-R2 mutant allele under the control of different inducible promoters. *Appl Envir Microbiol* 65: 110-116.
 12. Lawrence C W. 1991. Classical mutagenesis techniques. *Methods in Enzymol* 194: 273-281.

Table 1. Relative amount of intracellular Trp produced by the wild type and mutants

Strains	peakv area
	Tryptophan
Wild type	1486305
C3	2131689
C4	1753358
C11	1551442
C12	1649043

Table 2. Amount of Trp produced by the wild type and the mutant

(unit : $\mu\text{g}/\text{cell culture ml}$)

Strain	Intracellular accumulation in the cell	Harvested cell
Wild type	7.28×10^{-2}	1.51×10^{-1}
C3	9.9×10^{-2}	2.35×10^{-1}

Strain	Wild Type	C3
Intracellular accumulation in the cell	7.28×10^{-2}	9.9×10^{-2}
Harvested cell	1.51×10^{-1}	2.35×10^{-1}

Figure Legend



Fig. 1. Sensitivity of wild type yeast cells to fluorotryptophan .

A ; control, B ; 0.015 mM, C ; 0.025 mM, D ; 0.05 mM, E ; 0.1 mM,
F ; 0.2 mM, G; 0.25mM, H; 0.5mM, I; 5mM

The wild type yeast cells (*Candida rugosa*) in log-phase were mixed with 1% agar and poured on the SD minimal plate (0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate and 2% glucose) containing 0.023% proline. The discs containing different concentrations of fluorotryptophan were placed on the top agar layer containing yeast cells and growth inhibitions by fluorotryptophan were examined.

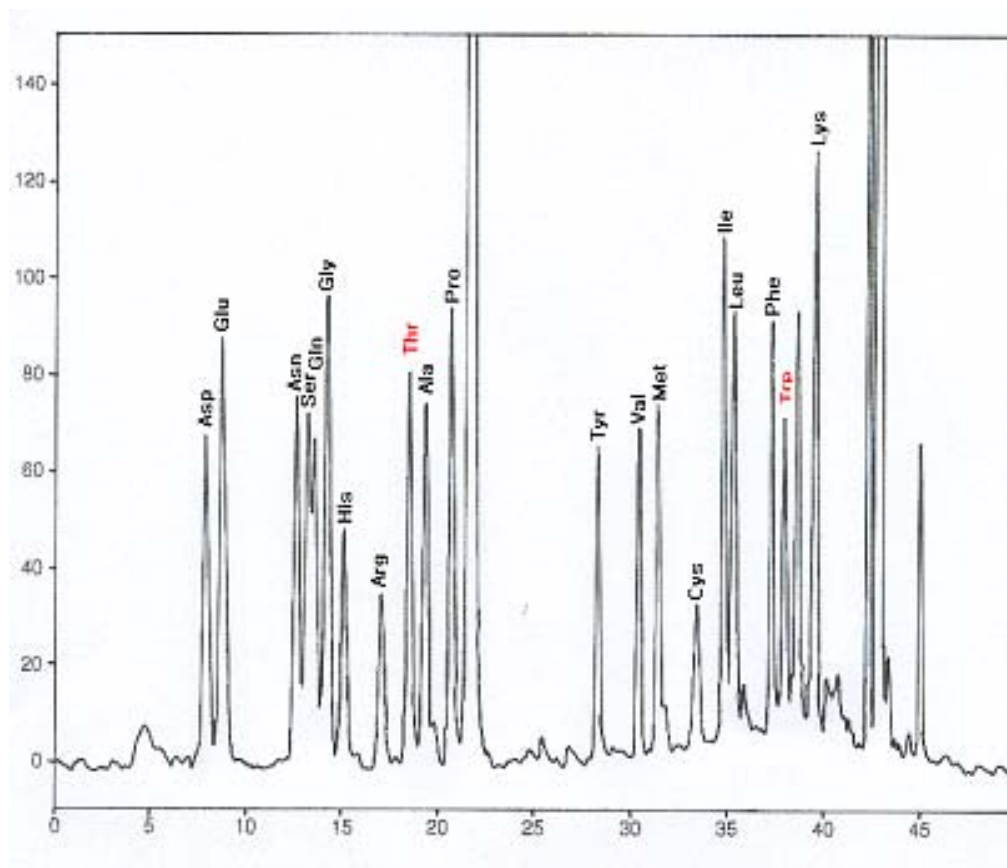


Fig. 2. HPLC chromatogram of 20 amino acids using Pico-tag column.

- 부록 7- An, Gil-Hwan and Anthony J. Sinskey. 2003. Effect of Catabolic Threonine Dehydratase Expression on Isoleucine Production in the Threonine Producing Recombinant of *Corynebacterium lactofermentum* ATCC 21799. Food Science and Biotechnology. 12: 137-141.

Accumulation of Isoleucine Intermediates in the Isoleucine Producing
Recombinant of *Corynebacterium lactofermentum* ATCC 21799

Gil-Hwan An* and Anthony J. Sinskey¹

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yusung-gu, Daejeon 305-764, South Korea

¹*Department of Biology, 68-370, Massachusetts Institute of Technology, 77 Massachusetts Ave., Cambridge, Massachusetts 02139, USA*

*Corresponding author: Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea

Tel: 82-42-821-6730

Fax: 82-42-823-4835

Email: ghahn@cnu.ac.kr

Running Title: *Isoleucine Intermediates in Corynebacterium*

Abstract Among the five consecutive enzymes in the anabolic pathway from threonine to isoleucine in *Corynebacterium* threonine dehydratase and acetohydroxy acid synthase are feedback inhibited by isoleucine. Increased activation of threonine dehydratase in *C. lactofermentum* ATCC 21799 resulted in accumulation of 2-aceto-2-hydroxybutyrate (substrate of dihydroxy acid synthase) and 2,3-dihydroxy-3-methylvalerate (substrate of dihydroxy acid dehydratase), but not α -keto-butyrate (product of threonine dehydratase and substrate of acetohydroxy acid synthase). This result suggests that dihydroxy acid synthase and dihydroxy acid dehydratase must be amplified to obtain increased isoleucine titer.

Keywords: isoleucine, dihydroxy acid synthase, dihydroxy acid dehydratase, *Corynebacterium lactofermentum*

Introduction

Amplification of a feedback-insensitive homoserine dehydrogenase (HD) gene (*hom^{dr}*) in a *Corynebacterium* lysine producer resulted in homoserine accumulation in the medium (1) (Fig. 1). Expression of *hom^{dr}* and homoserine kinase (HK) gene (*thrB*) together improved final threonine titer. Amplified expression of *ilvA* with *hom^{dr}* and *thrB* produced isoleucine from the lysine producing *C. lactofermentum* ATCC 21799 (2) (Fig. 1). Threonine dehydratase (TD; EC 4.2.1.16) catalyzes the first of five reactions leading from threonine to isoleucine, and is the only known enzyme specific for isoleucine synthesis in *Corynebacterium* (3). K_m for threonine was 21 mM, and increased or decreased to 78 or 12 mM in the presence of isoleucine or valine, respectively (4).

Catabolic threonine dehydratase (CTD; EC 4.2.1.16) of *E. coli* is produced in cells when the organism is grown anaerobically in a medium containing high concentrations of amino acids and no glucose (5). In contrast to TD encoded by *ilvA*, CTD produced by *tdcB* is insensitive to inhibition by L-isoleucine and is activated by adenosine 5'-monophosphate (AMP) (5). α -Ketobutyrate, the product of CTD, behaves as an allosteric inhibitor of the enzyme by causing dissociation of the enzyme into its subunits (6). Our group previously reported that the concentrations of isoleucine and its precursors were increased by replacing *ilvA* with *tdcB* (7).

To identify the rate-limiting enzyme involved in the biosynthesis of α -keto-butyrate into isoleucine, the accumulated intermediates of isoleucine in the recombinants of *C. lactofermentum* ATCC 21799 were detected. These results suggest that the amplification of the enzymes utilizing the detected isoleucine intermediates is required to further increase the isoleucine titers.

Materials and Methods

Strains, plasmids, and media The bacterial strains and plasmids used are listed in Table 1 (7, 8). The method of transformation is described elsewhere (7). The media used in this study were described previously (9). When appropriate, kanamycin (50 mg/L) and isopropyl--D-thiogalactopyranoside (IPTG) (50 mg/L) were used. IPTG was added at ~2 g/L of cell mass. The organisms were cultured aerobically at 30C as 400-mL cultures in 2-L Erlenmeyer flasks on a rotary shaker at 300 rpm and 1.5-L cultures in a 2-L fermentor (pH 7.0; dissolved oxygen, 30-40%) (CMF 100, Alfa-Laval/Chemap, Switzerland).

Enzyme assays. For determination of specific activities, a 50-ml sample of cells was removed from cultures. Enzyme assays were performed at room temperature with a Hewlett-Packard model 8452A diode-array spectrophotometer. Activity of each enzyme was determined by subtracting absorbance change without substrates from that with complete reaction mixture. Cell free crude extract was prepared by the following method. Cells were harvested by centrifugation for 5 min at 3000 g and washed with the enzyme assay buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 20 mM KCl, 5 mM MnSO₄, 0.1 mM EDTA, and 2 mM dithiothreitol) (10) at volume equal to that of the wet cells obtained by centrifugation for 10 min at 10,000 x g. Resuspended cells were disrupted by French pressure (French Pressure Cell Press, Sim-Aminco Spectronic Instruments, Rochester, NY) at 100 bar. The cell debris was removed by centrifugation for 20 min at 47,000 x g. The supernatant (crude extract) was used as the source of enzyme activity. Crude extract (20-50 l) was added to 1 ml of the reaction mixture. Protein concentrations were determined by the Bradford method using bovine serum albumin as a standard (11).

Activity of HK was determined in terms of the decrease in absorbance at 340 nm due to the oxidation of NADH (12,13). Composition of the assay solution of HK was 5 mM ATP, 1 mM NADH, 5 mM phospho-enol-pyruvate, 10 mM L-homoserine, 5 l of pyruvate kinase (10 units per 1-ml reaction solution; Sigma cat. # P-1506), 2 l of lactate dehydrogenase (17 units per 1-ml reaction solution; Sigma cat. # L-2500), 10 mM MgCl₂, 250 mM KCl, and 125 mM HEPES buffer (pH 7.8).

Homoserine dehydrogenase (HD) activity was determined in terms of the

decrease in absorbance at 340 nm due to the oxidation of NADPH ($\epsilon=6220$) (12, 13). The assay solution was composed of 3 mM DL-aspartate--semialdehyde (ASA), 0.4 mM NADPH, and 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0). ASA was synthesized by the method of Black & Wright (14). L-Allyglycine (2.3 g; 20 mmoles) was dissolved in 20 ml of 1 N HCl. Ozone was passed through a fritted glass plug at 0C for 100 min. ASA (6 mM) was absorbed on a column of cation exchange resin Dowex 50 (hydrogen form, 200 to 400 mesh, 2.4 x 14 cm). The column was washed with a large volume of water. ASA was eluted with 4 N HCl. 6 ml fraction per every 30 min (tubes 6 -9 contained 80%) was collected. ASA was neutralized with KHCO_3 to 10 mM just before use ($\sim 1/50$ dilution)

The activities of threonine dehydratase (TD) and catabolic threonine dehydratase (CTD) were determined in terms of increase in absorbance at 310 nm due to the formation of α -ketobutyrate. The assay solution for TD was composed of 40 mM threonine, 1 mM pyridoxal-5-phosphate, 100 mM potassium phosphate buffer (pH 8.2), and 10 mM α -ketobutyrate (to inhibit the activity of CTD) (12). The assay solution for CTD was composed of 0.4 mM AMP, 100 mM threonine, 10 mM isoleucine (to inhibit the activity of TD), and 100 mM of potassium phosphate buffer (pH 7.4) (15).

Amino Acid and Organic Acid Analyse Amino acids were analyzed as *o*-phthaldialdehyde derivatives by reversed-phase chromatography using an Amino Quant column as described previously (9).

Organic acids were analyzed using an Ion Moderated Partition Chromatography column (Aminex HPX-87H, Bio-Rad, Hercules, CA, cat.# 125-0140). The solvent for HPLC was 5 mM sulfuric acid (0.6 mL/min, isocratic). Organic acids were detected by UV (210 nm) and Reflective Index detectors. 2-Aceto-2-hydroxybutyrate (AHB) and 2,3-dihydroxy-3-methylvalerate (DHMV) were identified by measuring polarities and molecular weights. The polarities of the compounds was detected using the HPLC column, Aminex HPX-87H column. The co-cumulated compounds (e.g., isoleucine) were also used for the identification. The molecular weights were measured using a mass spectrometer (Ciphergen Biosystems, Inc., Palo Alto, CA).

Results

To measure the kinetics of isoleucine production, *C. lactofermentum* was cultivated in a 2-L fermentor. Growth and glucose consumption of the recombinant (pApe20) (Fig. 2b) were not significantly different from those of the control (Fig. 2a). The other recombinant (pApe18) (Fig. 2c) grew slowly by the addition of IPTG.

The control produced lysine (61 mM) and a small amount of isoleucine (3 mM) (Fig. 3a). The recombinant (pApe20) produced threonine (28 mM), isoleucine (8 mM), lysine (10 mM), glycine (10 mM), and homoserine 8 mM (Fig. 3b). In this study IPTG was used at 50 mg/l compared to 150 mg/l used in the previous one. The gene, *ilvA*, encoding TD was under the control of *trc* promoter that was activated by IPTG. The lowered concentration of IPTG resulted in 1/25 of the previous TD activity (Fig 4b): 1.1 vs. 28 mmole/min · mg protein (7). Therefore, the lowered expression of TD increased threonine and decreased isoleucine. The counterpart (pApe18) produced isoleucine (25 mM) and lysine (10 mM), confirming that, for the effective redirection of carbon flux into isoleucine, deregulation of TD was required (Fig. 3c). As shown in the case of TD, only 0.7 mmole/min · mg protein of CTD activity was expressed (Fig. 4c), compared to 30 mmole/min · mg protein of CTD activity of the previous research (7). However, the production of isoleucine (8 mM or 3.2 g/l) was not significantly different from the previous one (4.5 g/l) (7). This result also indicates that CTD was highly efficient compared to TD for the conversion from threonine into α -keto-butyrate.

Compared to the control, the recombinant (pApe20) produced large quantities of 2,3-dihydroxy-3-methylvalerate (DHMV), the substrate of dihydroxy acid dehydratase (Fig. 5a and 5b). The increased isoleucine production by replacement of *ilvA* with *tdcB* caused co-accumulation of 2-aceto-2-hydroxybutyrate (AHB), the substrate of dihydroxy acid synthase (Fig. 5c). This result indicates that dihydroxy acid synthase is involved in the rate-limiting step in isoleucine production in the recombinant (pApe18).

Discussion

This study focused on the carbon flux from lysine to isoleucine. The expression of homoserine dehydrogenase and homoserine kinase (Fig. 1) redirected the carbon flux from lysine to threonine (Fig. 3a and b). Deregulation of TD by expression of CTD promoted the carbon flux from threonine to isoleucine (Fig. 3b and c).

Profiles of the enzyme activities of TD and CTD were different (Fig. 4b and c). Because CTD effectively convert threonine into isoleucine, expression of CTD might cause depletion of threonine, delayed expression of enzymes, and slow growth (Fig. 2-4).

Both TD and acetohydroxy acid synthase (AHAS; EC 4.1.3.18) are feedback-inhibited by isoleucine (3) and found to be critical for controlling the carbon flow to isoleucine (16) (Fig. 1). The recombinant (pApe20) containing *ilvA* produced less isoleucine and more threonine than the counterpart (pApe18) containing *tdcB* (Fig. 3), indicating that a high titer production of isoleucine requires deregulation of TD from feedback inhibition by isoleucine. HK of *C. lactofermentum* ATCC 21799 is feedback inhibited by threonine (2) and could cause the accumulation of homoserine (Fig. 3). In addition to threonine dehydratase, there are two other routes to threonine degradation in *Corynebacterium*, both of which lead to glycine; threonine dehydrogenase (EC 1.1.1.129; *tdh*) and serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1; *glyA*) (17). Therefore, accumulation of threonine could result in the production of glycine from threonine and homoserine by feedback inhibition of HK (Fig. 3).

The second enzyme in the pathway, AHAS, is the first enzyme in a series of enzymes that catalyze parallel reactions into isoleucine and valine (18), and is unique in *Corynebacterium* (19). AHAS is also inhibited by valine and leucine, and its expression is regulated by all three branched-chain amino acids (18, 19). This enzyme has been shown to be highly inducible in the presence of its substrate, α -ketobutyrate (19). In spite of the regulatory characteristic of AHAS in *Corynebacterium*, α -ketobutyrate was not detected (Fig. 5). AHAS synthesis in *C. glutamicum* was previously shown to be subjected to multivalent repression by all three branched-chain amino acids, as indicated by the fact that individual starvation of each amino acid resulted in increased level of AHAS (19, 20). The 10-fold increase in AHAS activity observed in cultures grown with α -ketobutyrate has been attributed to the kinetic characteristics of the enzyme; a lowered K_m for α -ketobutyrate

compared to pyruvate would lead to a kinetic preferential partitioning of pyruvate to the isoleucine branch. This stripping of pyruvate precursor would cause valine and leucine deficiencies and derepress AHAS synthesis. The deficiencies of valine and leucine, in turn, cause the slow growth of the recombinant (pApe18) (Fig. 2c). This was further supported by the report, which showed that growth in medium supplemented with α -ketobutyrate leads to an increased steady-state level of the *ilvBNC* transcript (corresponding to AHAS and dihydroxy acid synthase) (21). Therefore, feedback inhibition of AHAS might be overcome through the inducible nature of this enzyme by its substrate, α -ketobutyrate.

In this study, we detected DHMV and AHB instead of α -ketobutyrate (Fig. 5). Accumulation of isoleucine by *ilvA* was coincident with that of DHMV (Fig. 5). The increased accumulation of isoleucine by *tdcB* resulted in the accumulation of AHB (Fig. 5). Isoleucine titer was significantly increased through replacement of *ilvA* with *tdcB*. However, accumulations of AHB and DHMV in cultures indicate that amplification and deregulation of genes for dihydroxy acid synthase and dihydroxy acid dehydratase are essential for the increased isoleucine titer.

Acknowledgments

This work was supported by a research project grant from the Korean Ministry of Agriculture (2001-2003).

References

1. Reinscheid, D.J., Kronemeyer, W., Eggeling, L., Eikmanns, B.J. and Sahm, H.. Stable expression of *hom-1-thrB* in *Corynebacterium glutamicum* and its effects on the carbon flux to threonine and related amino acids. Appl. Environ. Microbiol. 60: 126-132 (1994)
2. Coln, G.E., Nguyen, T.T., Jetten, M.S.M., Sinskey, A.J. and Stephanopoulos, G. Production of isoleucine by overexpression of *ilvA* in a *Corynebacterium lactofermentum* threonine producer. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 482-488 (1995)
3. Miyajima, R. and Shiiro, I. Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. I. Effects of isoleucine and valine on threonine dehydratase activity and its formation. J. Biochem. 71: 951-960 (1972).
4. Mckel, B., Eggeling, L. and Sahm, H.. Functional and structural analyses of threonine dehydratase from *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 174: 8065-8072 (1992)
5. Umbarger, H.E. and Brown, B. Threonine deamination in *Escherichia coli*. II. Evidence for the two L-threonine deaminases. J. Bacteriol. 73: 105-112 (1957)
6. Shizuta, Y., Kurosawa, A., Inoue, K., Tanabe, T. and Hayaishi, O. Regulation of biodegradative threonine deaminase: I. Allosteric inhibition of the enzyme by a reaction product and its reversal by adenosine 5'-monophosphate. J. Biol. Chem. 248: 512-520 (1973)
7. Guillouet, S., Rodal, A.A., An, G.-H., Gorret, N., Lessard, P.A. and Sinskey, A.J. Metabolic redirection of carbon flow toward isoleucine by expressing a catabolic threonine dehydratase in a threonine-overproducing *Corynebacterium glutamicum*. Appl Microbiol Biotechnol. 57: 667-673 (2001)
8. Zhang, Y., Praszker, J., Hodgson, A. and Pittard, A.J. Molecular analysis and characterization of a broad-host-range plasmid, pEP2. J. Bacteriol. 176: 5718-5728 (1994)
9. An, G.-H., Song, K.B. and Sinskey, A.J. Redirection of carbon flux to lysine in a recombinant of *Corynebacterium lactofermentum* ATCC 21799 by limited supply of pantothenate. J. Biosci. Bioeng. 88: 168-172 (1999)
10. Jetten, M.S.M., Pitoc, G.A., Follettie, M.T. and Sinskey, A.J. Regulation of phospho(enol)-pyruvate- and oxaloacetate-converting enzymes in *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41: 47-52 (1994)

11. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)
12. Coln, G.E., Jetten, M.S.M., Nguyen, T.T., Gubler, M.E., Follettie, M.T., Sinskey, A.J. and G. Stephanopoulos. Effect of inducible *thrB* expression on amino acid production in *Corynebacterium lactofermentum* ATCC 21799. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 74-78 (1995)
13. Follettie, M.T., Shin, H.K. and Sinskey, A.J. Organization and regulation of the *C. glutamicum* *hom-thrB* and *thrC* loci. *Mol. Microbiol.* 2: 53-62 (1988)
14. Black, S. and Wright, N. Aspartic α -semialdehyde dehydrogenase and aspartic β -semialdehyde. *J. Biol. Chem.* 213: 39-50 (1955)
15. Shizuta, Y., Kurosawa, A., Inoue, K., Tanabe, T. and Hayaishi, O. Regulation of biodegradative threonine deaminase: I. Allosteric inhibition of the enzyme by a reaction product and its reversal by adenosine 5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.* 248: 512-520 (1973)
16. Cordes, C., Mckel, B., Eggeling, L. and Sahm, H. Cloning, organization and functional analysis of *ilvA*, *ilvB* and *ilvC* genes from *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 112: 113-116 (1992)
17. Bell, S.C. and Turner, J.M. Bacterial catabolism of threonine. Threonine degradation initiated by L-threonine-NAD⁺ oxidoreductase. *Biochem. J.* 156: 449-458 (1976)
18. Tsuchida, T. and Momose, H.. Genetic changes of regulatory mechanisms occurred in leucine and valine producing mutants derived from *Brevibacterium lactofermentum* 2256. *Agric. Biol. Chem.* 39: 2193-2198 (1975)
19. Enggeling, I., Cordes, C., Eggeling, L. and Sahm, H. Regulation of acetohydroxy acid synthase in *Corynebacterium glutamicum* during fermentation of α -ketobutyrate to L-isooleucine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 346-351 (1987)
20. Scheer, E., Cordes, C., Eggeling, L. and Sahm, H.. Regulation of acetohydroxy acid synthase in *Corynebacterium glutamicum* during isooleucine formation from α -hydroxybutyric acid. *Arch. Microbiol.* 149: 173-174 (1987)
21. Keilhauer, C., Eggeling, L. and Sahm, H. Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* 175: 5595-5603 (1993)

Figure Legends

Fig. 1. Scheme for biosynthesis and feedback regulation of isoleucine in *C. glutamicum*. Solid arrows represent direction of preferential synthesis; dashes represent feed back inhibition. Underlines indicate enzymes.

Fig. 2. Biomass and glucose during fermentations of various *C. lactofermentum* ATCC 21799 recombinants. (a) control, (b) recombinant (pApe20), and (c) recombinant (pApe18). Symbols: (○), cell mass (g/l); and (□), glucose (g/l)

Fig. 3. Amino acids during fermentations of various ATCC 21799 recombinants. (a) control, (b) recombinant (pApe20), and (c) recombinant (pApe18). Symbols: (○), lysine; (□), threonine; (◇), isoleucine; (△), glycine; and (▽), homoserine

Fig. 4. HD, HK, TD, and CTD during fermentations of various ATCC 21799 recombinants. (a) control, (b) recombinant (pApe20), and (c) recombinant (pApe18). Symbols: (○), homoserine dehydrogenase [$\text{nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$]; (□), homoserine kinase [$\text{nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$]; (◇), threonine dehydratase [$\text{nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$]; and (△), catabolic threonine dehydratase [$\text{nmol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$]

Fig. 5. Organic acids during fermentations of various ATCC 21799 recombinants. (a) control, (b) recombinant (pApe20), and (c) recombinant (pApe18). Symbols: (○), aceto-hydroxybutyrate (area/l); and (□), dihydroxy methylvalerate (area/l)

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Genotype or description	Source or reference
<i>C. lactofermentum</i> ATCC 21799	L-Lysine producing strain, AECR	ATCC
Plasmids		
pEp2	NG2 ori, Kmr: <i>E. coli-Corynebacterium</i> shuttle vector	8
pApe18	Kmr <i>lacIq trc:tdcB</i> (catabolic threonine dehydratase, not inhibited by isoleucine under the control of <i>trc</i> promotor in pEp2) <i>homdr tac:thrB</i>	7
pApe20	Kmr <i>lacIq trc:ilvA</i> (threonine dehydratase, inhibited by isoleucine under control of <i>trc</i> promotor in pEp2) <i>homdr tac:thrB</i>	7

aKmr and Apr indicate resistance to kanamycin and ampicillin, respectively. AECR indicates resistance to *S*-2-aminoethyl-L-cysteine, a lysine analog. ATCC American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA.