

양조용 효모의 육종



방 원 기

(고려대학교 자연자원대,
농화학과 교수, 이학박사)

■ 目 次 ■

1. 머 리 말
2. 술 제조에 사용되는 여러가지 육종효모
 - 가. 생전분의 당화능을 지닌 효모의 육종
 - 나. 전분 당화능을 지닌 효모의 육종
 - 다. 고발효능 효모의 육종
 - 라. 고발효성 효모 육종
 - 마. 고에탄올 내성 효모 육종
 - 바. 유당발효 효모의 육종
3. 맺 는 말

1. 머리말

에탄올 발효기술은 여러가지 술의 제조기술로서 꾸준히 발전되어 왔다. 그러나 1973년과 1979년의 2차에 걸친 원유파동은 원유가격의 인상을 불가피하게 하였으며, 석유를 대체 할 수 있는 액체 연료로서 에탄올이 중요시 되었다. 따라서 경제적으로 시급히 에탄올을 생산하기 위한 연구가 시대적으로 요구되었으며, 급속히 발달한 새로운 생물공학적인 기법, 즉, 유전자의 조작 혹은 재조합 DNA기법에 힘입어 세계 각국의 다수의 연구자에 의해 에탄올 생산에 대한 연구가 활발히 진행되었다. 그 결과, 발효공정의 분야에서는 기존의 발효공정의 개선 및 새로운 발효공정의 개발이 검토 및 연구되어 회분식 발효법, 반회분식 발효법, 연속 발효법 및 다단식 연속 발효법 등이 확립되었다. 한편 에탄올 발효에 사용되는 미생물의 탐색과 지금까지 사용되어온 기존의 효모의 육종도 활발히 이루어져왔다. 우선 미생물의 탐색에 있어서는 효모이외에도 세균인 *Zymomonas mobilis*를 사용하여 에탄올을 생산하는 것이 생물학적 연료로서 에탄올을 생산하는 목적에 대단히 효과적인 것으로 알려졌다. 또한, 각종 술 제조시에 사용되는 효모의 육종에 대한 연구에 있어서도 상당한 진전이 이루어져 좋은 결과가 많이 발표되었다. 에탄올 발효 효모의 육종에 있어서 매우 흥미있는 연구분야는 다음과 같이 나누어 생각할 수 있다. 순수 배양을 하기 위한 킬라 인자의 효모 내로의 도입, 거품을 생성하지 않는 효모육종, 응집성 효모육종, 고온 발효성 효모육종, 내에탄올성 효모육종, 내당성 효모육종, 당화능을 지닌 효모육종, 발효율이 높은 효모육종, 술 제조시의 여러가지 색소의 방지 및 제조에 관한 효모의 육종, 그리고 술의 맛 성분에 대한 효모의 육종 등이다. 물론 이와같이 다양한 효모의 육종에는 재래식 육종기법인 자연선별, 돌연

변이 유발된 처리후 선별 및 교잡법이 사용되며, 새로운 유전공학적 기법으로는 세포질 인자도입법, 원형질 융합법, 형질전환법과 킬라인자의 도입 등이 사용된다.

본고에서는 각종 술의 제조에 사용되는 효모의 육종, 특히 생전분과 전분 발효능을 지닌 효모, 고 발효능을 지닌 효모, 고온 발효성효모, 에탄올 내성효모와 유당 발효효모에 대하여 기술하려 하며, 생물학적 연료로서 에탄올을 생산할 시에 매우 효과적인 것으로 알려져 있는 에탄올 생산 세균의 육종에 대해서는 사정이 허락하는 대로 다음 기회에 기술하려고 한다.

2. 술 제조에 사용되는 여러가지 육종효모

1) 생 전분의 당화능을 지닌 효모의 육종

술 제조시에 당밀을 원료 물질로 사용할 때에는 당밀을 3 내지 4배 희석하여 열처리 과정이 없이 그대로 술 발효에 사용할 수 있으나, 전분을 원료로 사용할 때에는 전분의 당화 및 발효에 앞서 전분을 고온으로 열처리하는 것이 필수적이다. 예를 들면 옥수수 전분을 사용하는 경우에 140~180℃로 열처리를 하여야한다. 이와같이 고온으로 열처리 함에 따라 전분의 액화 및 당화율의 상승, 유해 미생물의 살균효과와 발효율의 상승을 얻을 수 있기 때문이다. 그러나 이와같이 열 처리를 하는 것은 사용한 전분의 종류에 따라 다르긴 하지만 술 제조에 사용되는 총 에너지의 20~30%를 차지하는 것으로 알려져 있다. 최근의 에너지 가격의 상승은 술 제조시에도 에너지 절약형 제조공정을 요구하게 되었다. 열 처리 공정을 거치지 않고 바로 전분을 술 제조에 사용하게 되면, 에너지의 절약뿐만 아니라 열 처리시 발생하는 전분의 호화에 따른 점도의 상승을 피할 수 있으며, 다량의 전분을 동시에 사용할 수 있기 때문에 고농도의 에탄올을

생산하는 것이 가능하여 생산성을 크게 증가시키는 잇점이 있다. 그러므로 생전분을 그대로 당화하여 술 발효를 하기 위해서는 전분을 강력히 당화하는 효소를 지닌 효모를 육종하는 것이 필수적이다.

형질전환에 의해 생 전분 당화능을 지닌 효모를 육종하기 위해서 우선 생 전분을 당화하는 효소원을 검토하였다. 검토 결과 *Rhizopus sp.*의 글루코아밀라아제(*glucoamylase*)가 가장 효과적인 것으로 판명되었다. *Rhizopus sp.*의 글루코아밀라아제는 25개의 아미노산 잔기로 이루어진 시그널 펩티드(*signal peptide*)를 가지며, 604개의 아미노산으로 이루어진 분자량 65,000인 단백질이다. 글루코아밀라아제를 효모에서 다량 발현시키기 위해 효모 해당체의 효소인 글리셀 알데히드 3인산 탈수소효소(*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, GDP)의 프로모터(*promotor*)와 터미네이터(*terminator*)를 이용하는 방법을 검토하였으며, GDP 유전자(*gap*)를 클로닝(*cloning*)하여 이를 글루코아밀라아제의 벡터(*vector*)로 사용하였다[그림 1].

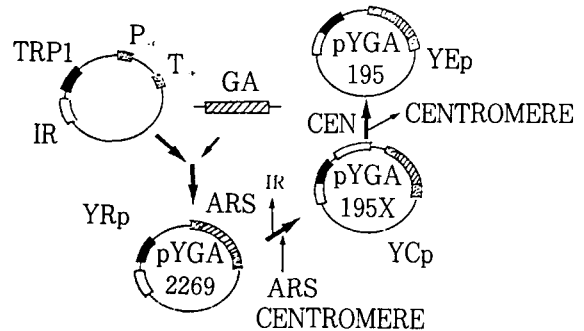


Fig. 1. The Construction of a Shuttle Vector Containing the Glucoamylase Gene

이렇게하여 얻은 플라스미드 pYGA 2269을 사용하여 에탄올 생산능이 좋은 *Saccharomyces cerevisiae* XS-30-2B에 형질전환을 한 경우 0.5U/ml의 글루코아밀라아제를 분비하였다. 다시 동원체(*centromere*)를 지닌 YCp형 플라스미드 pYGA 195를 사용하여 상기의 효모를 형질전환하면 1.0U

/ml의 글루코 아밀라아제를 생산하였다. 이와같이 글루코 아밀라아제 유전자를 지닌 플라스미드를 효모에 도입하여 형질전환체를 만들어 개량함에 의해 13U/ml의 글루코 아밀라아제를 생산하는 형질 전환체 효모를 얻는 것도 가능하였다. [그림 2]는 여

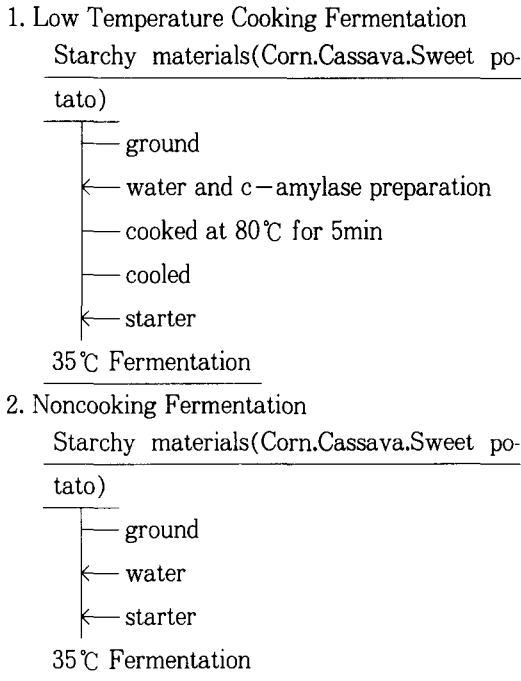


Fig. 2. Flow Sheet of Alcoholic Fermentation

러가지 전분원료를 사용하여 열 처리하는 경우와 열 처리하지 않은 경우의 에탄올 생산과정을 나타낸 것이며, 열 처리하지 않은 전분에 표준효모를 사용하여 에탄올을 생산할 경우에는 1.5%의 에탄올이 생산되었으나, 형질 전환된 효모를 사용하여 에탄올을 생산할 경우, 플라스미드의 카피(copy) 수가 1개인 pYGA 195로 형질전환된 효모는 12.8%의 에탄올을 생산하였으나, 다카피(multi copy)인 pYGA 2269에 의한 형질전환 효모는 3.8%의 에탄올을 생산하였다. 이와같이 에탄올의 생산능과 글루코 아밀라아제의 생산능이 서로 상관관계가 없는 것은 글루코 아밀라아제의 과잉생산이

세포의 증식에 나쁜 영향을 미쳐 에탄올 생산능을 저하시키는 것으로 생각하였다.

2) 전분 당화능을 지닌 효모의 육종

발효전에 전분을 열처리 하는 것과 마찬가지로 전분의 당화에 사용되는 에너지도 에탄올 생산시에 사용되는 총 에너지의 가격을 상승시키는 요인이다. *Saccharomyces diastaticus*의 전분 발효능의 개량을 위하여 서로 다른 유전자를 지닌 효모의 세포 융합을 시도하였다. 효모의 세포융합에는, 가) 정상 세포로부터 세포질의 제조, 나) 세포질의 융합, 다) 융합세포질의 정상세포로의 재생이라는 과정을 밟아 이루어진다. *S. diastaticus*에는 아밀라아제의 생산을 지배하는 STA1, STA2 및 STA3와 같은 3종의 유전자가 있으며, 각각 서로다른 염색체 상에 배치되어 있는 것으로 알려져 있다. 또한 그들의 구조와 조절기구조도 명확히 밝혀져있다. 세포 융합에 사용한 *S. diastaticus*의 1배체 세포의 성질은 <표 1>에 나타낸 바와 같다. 이때 서로다른 STA유전자를 지닌 1배체 세포의 융합을 통하여 <표 2>에 나타낸 바와같은 결과를 얻었다. <표 2>에서 볼 수 있는 바와 같이 융합주 세포의 아밀라아제 생산능은 그의 DNA함량에 거의 비례하는 것으로 나타났으며, 세포융합의 결과 STA유전자의 증폭(gene dosage 효과)가 발생한 것이 확실시

Table 1. The Characteristics of Haploid *Saccharomyces diastaticus*

Strains	Genotype
708-7B	<i>α</i> , arg4, STA1
5206-4C	<i>α</i> , arg4, STA2
5206-4CRD	<i>α</i> , arg4, his2, chy ⁺ , ρ ⁻ , STA2
5206-7D	<i>α</i> , adel, met14, STA2
5301-17B	<i>α</i> , lys7, sTA3
C1372-5C	<i>α</i> , met3, STA3
CB-3RD ^{a)}	<i>α</i> , arg4, chr ⁺ , ρ ⁻ , STA1, STA2

Table 2. Productivities of Amylase and Ethanol of *Saccharomyces diastaticus* Fusants

Fusant	Parental strains		Expected STA genotype	Ploidy ^{a)}	Productivity		Amylase productivity/ploidy (10^{-3} units/cell/hr)
	A	B			Amylase (10^{-3} units/cell/hr)	Ethanol (10^{-10} μ g/cell/hr)	
	708-7B		STA1	1	6.50	1.70	6.5
	5206-4C		STA2	1	5.83	1.79	5.8
	5206-4CRD		STA2	1	8.43	3.17	8.4
	5301-17B		STA3	1	6.56	2.44	6.6
	5206-7D		STA2	1	5.46	1.81	5.5
	C 1372-5C		STA3	1	6.21	2.13	6.2
BC-3	5206-4C	5301-17B	STA2, 3	1.8	8.61	3.00	4.8
BC-5	5206-4C	5301-17B	STA2, 3	1.9	7.65	2.82	4.0
BB-3	708-7B	5301-17B	STA1, 3	2.6	10.31	6.43	4.0
BB-25	708-7B	5301-17B	STA1, 3	1.6	11.80	2.58	7.4
BCRD-3	5206-4CRD	708-7B	STA1, 2	1.5	8.45	3.03	5.6
BCRD-7	5206-4CRD	708-7B	STA1, 2	1.7	8.71	2.68	5.1
TS-2	5301-17B	CB-3RD	STA1, 2, 3	2.0	9.82	2.53	4.9
TS-3	5301-17B	CB-3RD	STA1, 2, 3	2.4	10.01	3.10	4.2
DC-5	5206-7D	C 1372-5C	STA2, 3	1.8	8.50	2.82	4.7
DC-8	5206-7D	C 1372-5C	STA2, 3	1.4	8.30	2.60	5.9

Table 3. The Characteristics of *Saccharomyces diastaticus* Fusants

Characteristic	Parent strains		Fusant			
	IFO1046	RD22-10	F-1	F-2	F-3	F-4
Cycloheximide resistance(μ g/ml)	<1.0	100<	100<	100<	100<	100<
Respiratory ability	+	-	+	+	+	+
DNA contents(mg/cells)	3.8	3.7	5.8	6.7	7.0	5.3
Cell volume(μ m ³)	70~80	70~80	190~200	160~170	150~160	150~160

되었다. 계속하여 2배체 세포의 융합에 의해 4배체 세포를 만들어 융합주의 성질을 조사하였다. <표 3>에서 볼 수 있는 바와같이 융합주는 양친주의 성질을 상호보완하고 있으며, 융합주의 DNA 함량은 양친주의 1.4~1.9배, 세포의 체적은 1.9~2.6배로 나타났다. 이와같은 수치로 보아 새로이 생성된 융합주는 4배체로 생각되었다. 또한 융합주

세포의 아밀라아제 생산능은 양친주의 약 2배였으며, 전분을 탄소원으로 사용할 경우 세대시간이 양친주의 약 0.7배로, 생육속도가 빨랐다. *S. diastaticus*의 전분 발효능을 증가시키기 위해서는 아밀라아제의 생산능을 높여주면 좋다는 것이 명확히 되었기 때문에 아밀라아제를 생산하는 서로 속(genus)이 다른 효모(미생물)과 세포융합을 수행

Table 4. The Characteristics of *Saccharomyces diastaticus* IFO 1046, Strain 220 and Strain 251

Characteristic	Strain		
	IFO 1046	Strain 220	Strain 251
Meletitose assimilation	Yes	No	No
Amylase isozyme	Amylase 1, 2(STA1, 2)	Amylase 2(STA2)	Amylase 2(STA2)
Spore formation	Yes	No	No
Cluster formation	No	Yes	Yes
Amylase productivity	Low	High	High
Mating type	<i>a/a</i>	<i>a/a</i>	<i>a/a</i>
Ploidy	Diploid	Diploid	Diploid

하여, 새로운 융합주를 만들었다. 이때 사용한 양친주는 *S. diastaticus* IFO 1046과 *Aur eobasidium pullulans*이었다. 세포융합에 의해 만들어진 220주와 251주는 양친주인 *S. diastaticus* IFO 1046보다 전분 발효능이 우수하였다<표 4>. 220주와 251주는 *S. diastaticus* IFO 1046보다 10배 이상의 속도로 아밀라아제를 생산하였으며, 10배 이상의 속도로 발효를 수행하였다. 또한, 251주를 사용하여 전분으로부터 에탄올을 생산하는 경우 고농도의 균체(10^7 cell/ml 정도)를 접종하면, 포도당을 사용하여 에탄올을 생산할 때와 같은 속도로 에탄올을 생산하였다.

3) 고발효능 효모의 육종

(1) 형질전환

맥주제조에 있어서 발효가 끝났음에도 불구하고 이용되지 않은 탄수화물, 즉 덱스트린(dextrin)이 남게 된다. 이와같은 탄수화물의 잔재는 맥주의 맛에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 덱스트린이 제거된 맥주가 마실 때 경쾌한 맛을 주는 라이트 맥주(light beer)인 것이다. 따라서 유전자 재조합의 기법을 사용하여 맥주에 잔존하는 덱스트린을 분해하기 위해 아밀라아제 생산능을 지닌 효모를 육종하였다. 이때 사용한 글루코 아밀라아제 생산

유전자는 *S. diastaticus*가 지닌 3개의 유전자, STA1, STA2 및 STA3중 가장 활성이 강한 글루코 아밀라아제를 생산하는 STA1을 사용하였다. 벡터로는 항생제의 일종인 G418에 내성이며 동시에 가나마이신에 내성인 플라스미드 YCpG 11에 STA1유전자를 재조합하여 플라스미드 YCpG 11 STA1을 만들어 사용하였다[그림 3]. 형질 전환에

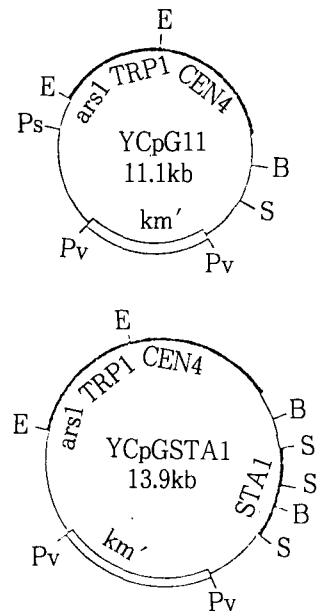


Fig. 3. The Structures of Plasmid YCpG11 and Plasmid YCpGSTA1

Table 5. Glucoamylase Activity in the Culture Supernatants

Host	Plasmid	With (+) or without (-) G418 in YPS medium	Glucoamylase activity*
YNN 27	YCpG11	-	0
	YCpG11	+	0
	YCpGSTA1	-	0
	YCpGSTA1	+	0
IFO 0565	YCpG11	-	0.2
	YCpG11	+	0
	YCpGSTA1	-	7.9
	YCpGSTA1	+	12.2
S 341	None	-	0
	YCpGSTA1	-	2.9
	YCpGSTA1	+	3.5
B 109	None	-	0.1
	YCpGSTA1	-	1.4
	YCpGSTA1	+	3.1

* Activity is expressed as 0.01 μ M of reducing sugar formed per mg protein per min. reaction time at 50 $^{\circ}$ C.

사용한 균주는 *S. cerevisiae* YNN 27, *S. carlsbergensis* IFO 0565, 맥주효모 S 341과 B 109였다. 이들 효모를 모두 플라스미드 YCpG 11 STA1을 사용하여 형질전환하여 실험을 수행하였다. <표 5>에서 볼 수 있는 바와같이 *S. carlsbergensis* IFO 0565, S341과 B109주의 각각의 형질전환체에서 배지상에 글루코 아밀라아제의 활성이 검출되었다. 플라스미드의 안정화를 위해 G418을 첨가하여 배양하였을 경우 대체적으로 강한 활성을 나타내었으나 G418의 존재가 유전자의 발현에 필수적인 것은 아니었다. STA1유전자를 지닌 맥주효모 S341과 B109를 사용하여 맥주발효를 수행해 본 결과를 <표 6>에 나타내었다. <표 6>에서 볼 수 있는 바와같이 형질전환체에 의해 발효된 맥주에는 숙주보다 추출물이 적었으며, 발효중에 효모에 의해 이용된 추출물의 비(발효도)는 70%가 넘는 고발효능을 나타내었다. 또한, 발효액중의 텍스트린을 정량한 경우, 텍스트린의 양은 숙주에 비해 형질전환체에서는 70%나 적은 값을 나타내었다. 이와같은 실험결과는 DNA재조합 기법을 사용함으로써 보다 고발효능을 지닌 맥주효모의 육종이

Table 6. Comparison of Extracts in Beer Fermented by Brewing Yeasts and Their Transformants

Strain	Plasmid	Original extract, %	Extract in beer, %	Fermentation rate, %
		(A)	(B)	(A - B)
After fermentation at 12 $^{\circ}$ C				
S341	None	12.46	3.64	70.8
S341	YCpGSTA1	12.38	3.42	72.4
B109	None	11.91	5.08	57.3
B109	YCpGSTA1	12.17	3.42	71.9
After fermentation at 12 $^{\circ}$ C and 25 $^{\circ}$ C*				
S341	None	12.46	3.69	70.4
S341	YCpGSTA1	12.38	3.22	74.0
B109	None	11.91	5.18	56.5
B109	YCpGSTA1	12.17	3.01	75.3

* Fermentation was carried out at 25 $^{\circ}$ C for 6 days after fermentation at 12 $^{\circ}$ C in order to exhaust the fermentable sugars.

가능하다는 것을 나타낸 것이었다.

(2) 세포융합

고발효능 에탄올 생성효모를 얻기위하여 <표 7>에 있는 바와같이 여러가지 특성을 지닌 *S. cerevisiae*를 사용하여 세포융합을 수행하였다. 여기서 N 1주와 아르기닌(arginine) 영양요구성 변이주인 TJ1-A3의 융합에 의해 융합주 AM 12를 얻었다. 양친주인 N 1주와 TJ1주가 40℃에서 각각 9.6% 및 7.0%의 에탄올밖에 생산 못하는 것에 비해 AM 12주는 12.4%의 에탄올을 생산하였다. 또한, AM 12주는 매우 응집성이 좋아 발효시에 침전이 잘되기 때문에 세포를 재사용하여 에탄올을 생산하는 반복 회분식 공정이 가능하며, 37℃에서 에탄올의 평균 생산성은 13 g/1.h인 것으로 나타났다.

4) 고온발효성 효모육종

증류주를 제조할 때에 발효시에 발생하는 발효열의 냉각, 증류시의 가열등에 많은 에너지가 필요하기 때문에 이와같은 에너지를 절감하는 방법의 하나로 고온발효성 효모를 사용하는 것이 좋은 것으로 생각된다. 고온발효성 효모를 육종하기 위해 사용한 친주의 성질들을 <표 8>에 나타내었는데, 고온발효성 효모인 *S. cerevisiae* 1031R-2는 40℃에서도 잘자라며, 에탄올 발효능이 있어 현재 일본의 청주제조에 널리 사용되고 있으나, 신념새와 같은 이취를 생성하는 것이 이 효모의 결점이다. 또한 *S. cerevisiae* Kyokai No.7은 역시 일본청주 제조효모로 비교적 고온성이며 향기 생성능이 좋다. 에탄올 생성이 고온에서도 잘되고 비교적 이취가 낮게 생성되는 균주를 얻기 위하여 상기의 양균주를 사용하여 세포융합을 수행하였다. <표 9>

Table 7. Strains of *Saccharomyces cerevisie*

Strain	Remarks
TJ1	Flocculent yeast isolated in Thailand. Homothallic diploid.
K7-64C	Derivative of strain Kyokai-No. 7 stocked in National Research Institute of Brewing, Japan. Used in Sake brewing. Non Mater. No spore formation.
K11	Strain Kyokai-No. 11 stocked in National Research Institute of Brewing, Japan. Used in Sake brewing. Slight formation of spores.
N1	Isolated form mash of Awamori(Okinawa split) brewing.

Table 8. Characteristics of Parental Strains

Strains	Ploidy	Formation of ascospore	Genotype	at 40℃		Production of off-flavor
				Growth	Fermentation	
Kyokai no.7 (<i>S. cerevisiae</i> ; sake yeast)	2	-	β al/ β al*	+	+	-
1031R-2 (<i>S. cerevisiae</i> ; wild yeast)	2	+	ade/ade	++	+++	+

* required Ca-pantothenate at 35℃ in β -alanine medium

에 나타난 바와같이 양균주의 세포융합에 의해 AM1서부터 AM5의 융합주 5개를 얻었다. 이들 세포의 크기와 체적, 세포 1개당의 DNA함량으로부터 AM2와 AM4는 양친주가 1:1로 융합된 4배체로 추정되었다. 또한, <표 9>에서 볼 수 있는 바와같이 5개의 융합주를 YM배지 및 옥수수 생전분배지에 사용하여 40℃에서 발효실험을 수행해본 결과, 5개의 융합주중 AM2 균주의 에탄올 생산능은 양친주에 비하여 약 절반이나, 이취의 강

Table 9. Ethanol Production of Fusants and Sensory Evaluation of Off-flavor of their Fermented Mashs

Strains	Ethanol concn. (%)*		Intensity of off-flavor**
	YM medium	Corn grits	
(Parents)			
Kyokai no.7	3.9	3.3	1.0
1031R-2	6.1	6.5	3.0
(Fusants)			
AM1	5.1	6.8	3.0
AM2	3.5	3.9	2.0
AM3	2.8	4.6	3.0
AM4	4.1	4.9	3.0
AM5	3.7	6.7	3.0

* 10^9 cells were incubated in 100ml of YM medium(yeast extract 0.3g, Polypepton 0.5g, malt extract 0.3g, glucose 10g, 7.5% lactic acid 0.7ml, distilled water 100ml, pH 4.5) or corn grits suspension(corn grits 20g, commercial amylase preparation 0.04g, 7.5% lactic acid 0.46ml, distilled water 100ml, pH 4.5), and fermented for 4days at 40℃. Corn grits were not cooked.

** Intensity of off-flavor was assessed on a three point scale from 1(weak) to 3 (strong).

도가 떨어진 것을 나타내었다. 따라서 에탄올 생성 능이 더욱 더 좋고 이취의 강도도 낮은 균주를 얻기 위하여 융합주 AM2를 이용하여 4분자 분석을 수행하였다. 양친주가 1:1로 융합된 것으로 생각되는 AM2로부터 현미경을 사용하여 포자를 분리하여, 이들중에 목적으로하는 균주가 존재하는가를 검토하였다. 24개의 포자형성 세포로부터 96개의 포자를 분리하여 배지에 식균하였을 때에 55주가 생육하였다(출아율 57.3%). 이와같이하여 AM2로부터 얻어진 55개의 포자분리주에 대해 발효실험을 수행하였으며, 5% 이상의 에탄올을 생성하는 20주에 대하여 발효실험과 이취의 강도 실험을 수행하였다. <표 10>에 나타난 바와 같이 고온에서 양친주와 거의 같은량인 6% 이상의 에탄올을 생성하는 융합주가 6개나 되었으며, 융합주 AM2-17B와 AM2-18C에서는 이취의 강도가 2이하이었다. 앞으로도 AM2-17B와 AM2-18C주의 개량에 의해 고온에서 발효능의 향상은 물론 이취가 제거된 균주가 얻어질 것으로 기대된다.

5) 고에탄올 내성 효모육종

청주의 제조시 발효 말기에 효모가 사멸한다. 효모의 사멸 속도는 환경 조건, 특히 자기가 생성한 에탄올에 의해 큰 영향을 받는다. 이와 같이 발효 말기에 효모가 사멸함에 따라 여러가지 변화가 발효액 내부에 일어나게 된다. 즉 발효액 내부에서 다음과 같은 변화가 일어난다.

가) 에탄올의 생성이 완만히 진행되다가 결국 정지한다.

나) 효모가 사멸하게 되면, 계속해서 효모의 자기 소화가 일어나기 때문에, 효모의 내용물이 발효액으로 용출된다.

다) 발효액 또는 제조된 술의 아미노산도가 급격히 증가해 색을 띄게되며, 품질이 나빠진다.

라) 제성주에 백색 침전이 발생하기 쉽다.

청주 제조시에 이와 같은 문제점을 해결하기 위

Table 10. Ethanol Production of Segregants from AM2 and Sensory Evaluation of Off-flavor of their Fermented mashes

Strains	Ethanol (%)	Intensity of off-flavor	Strains	Ethanol (%)	Intensity of off-flavor
Kyokai no.7	3.3	1	AM2-16C	3.1	1.7
1031R-2	6.5	2.6	AM2-17B	6.0	1.8
AM2-3B	6.3	2.0	AM2-18C	6.0	1.7
AM2-4B	5.8	2.0	AM2-19C	3.9	1.9
AM2-4D	5.6	2.0	AM2-19D	6.1	2.4
AM2-5B	5.1	1.7	AM2-20C	3.4	2.3
AM2-5D	4.8	1.9	AM2-20D	3.2	2.1
AM2-11D	6.0	2.2	AM2-22B	2.9	1.6
AM2-12D	2.6	1.6	AM2-22C	6.4	2.2
AM2-13B	4.5	2.2	AM2-23A	4.4	2.1
AM2-15C	5.5	1.8	AM2-24D	4.4	1.7

Medium, Uncooked corn grits 20g, saccharifying enzyme 0.04g, and lactic acid 0.05ml in 100ml distilled water

하여 청주 제조의 발효 말기와 비슷한 환경에서도 잘 사멸하지 않는 효모의 육종이 필요하다. 이와 같은 효모의 육종에는 선별법이 이용되는데 청주 제조의 발효 말기와 같은 환경으로서 에탄올 20%, 포도당 1%를 지닌 pH 4.3, 0.1M 초산 완충액을 만들어, 이곳에 미리 20℃에서 5일간 정치 배양한 *S. cerevisiae* Kyokai No.7을 세척하여 현탁시킨다. 그 후 15℃에서 7-10일간 방치한다. 그 다음 상기의 에탄올 용액 중에서 생존한 효모를 평판 배양하여 균주를 선별한다. 이와같은 공정을 여러번 반복하면 에탄올 내성 효모가 농축되므로 이것을 순수 배양한다. 또는 에탄올 내성 효모의 대수 증식기의 세포가 효모 생균 용해 요소에 의해 용해되기 어려운 성질을 이용해서 내성 효모를 농축해 가는 방법을 사용하여 *S. cerevisiae* Kyokai No.7로부터 10여개의 에탄올 내성 효모를 선별하였다. 이와 같이 선별한 균체는 술의 질을 나쁘게 하지 않고 오래 동안 발효하는 것이 가능하여 사용한 백미

당 에탄올의 생산을 높이는 것이 가능하다((357.2 kg/ton). 그 외에도 효모가 사멸되지 않기 때문에, 발효액의 아미산도가 낮아져 색이 옅으며, 저장 착색도 적다. 또한, *Lactobacillus heterohiochii*와 같은 세균에 의한 백탁현상도 발생하지 않는다.

이 효모의 특징은 *S. cerevisiae* Kyokai No.7보다 일반적으로 산이 많이 생성된다(산도로 0.2~0.4). 이와 같은 산도의 증가는 주로 피루부산(Pyruvic acid)과 말산(malic acid)에 기인한다. 단, 피루부산은 발효액을 충분히 발효시키면 감소한다. 또한 술의 향미에 나쁜 영향을 미치는 초산 함량은 *S. cerevisiae* Kyokai No.7와 같은 수준으로 매우 적다. 그 외에도 이 균주는 고농도의 에탄올에 약한 킬라 야생 효모에 의한 오염의 염려가 없는 것이 장점이다.

6) 유당 발효 효모의 육종

우유로부터 치즈를 만든 후 부산물로 생성되는

Table 11. Comparison of Physiological Characteristics of Parental Strains and the Fusant. PN13

	<i>S. cerevisiae</i> Kyokai 7	<i>K. lactis</i> T396	PN 13
Fermentation			
Glucose	+	+(week)	+
Lactose	-	+	+
Vitamin requirement			
Ca-Pantothenate	±	-	-
Nicotinic acid	-	+	-
Ethanol tolerance(10%)	Positive	Absent	Absent
Growth on high sugar concentration medium(>25%)	Fast	Slow	Fast
Cycloheximide resistance(0.1mg/ml)	Absent	Positive	Absent
Cell size	4~6 μ m	2~4 μ m	2~6 μ m

Key : +, fermented or required; ±, stimulatorily required; -, not fermented or not required.

Table 12. Comparison of Growth and Ethanol Production of Parental Strains and Various Fusants

Each strain was cultivated for 7 days without shaking in the following media; 25% lactose YEP medium for the fusants and *K. lactis* T396, and 25% glucose YEP medium for *S. cerevisiae* Kyokai 7.

Strain	Growth (g/liter)	Ethanol (g/liter)
PN13	5.8	43.4
PN17	2.7	20.3
PN41	3.1	18.0
PN45	2.6	21.2
PNA13	2.7	17.1
PNA18	2.9	22.2
PNA24	3.1	21.4
<i>K. lactis</i> T396	3.0	32.1
<i>S. cerevisiae</i> Kyokai 7	5.4	89.3

유장은 종종 폐기물로 처리되어 공업용수를 오염시키는 문제를 발생시켜왔다. 또한, 전통적으로 술 제조에 사용되는 *S. cerevisiae*는 유장이 지니고 있는 유당을 발효할 수 있는 능력이 없다. 유당을 에탄올로 효과적으로 전환시키기 위해 에탄올 생산능이 좋은 효모 *S. cerevisiae* Kyokai No.7과 유당을 잘 이용하는 효모 *Kluyveromyces lactis* T396을 세포 융합하였다. 세포융합에 의해 새로운 융합주 PN13을 얻었으며, 양친주와 융합주의 생리적 특성은 <표 11>에 나타난 바와 같다. 융합주 PN13은 유당을 발효하는 능력을 지니게 되었으나 10% 에탄올에서 내성을 갖지 못하는 것이 결점인 것으로 나타났다. 여러가지 융합주를 사용하여 25% 유당을 지닌 배지에서 에탄올을 생산해 본 결과 <표 12>, 융합주 PN13이 다른 융합주에 비해 월등히 많은 양의 에탄올을 생산하였으나 아직 양친주인 *S. cerevisiae* Kyokai No.7의 에탄올 생산능에는 미치지 못하였다. 그러나, 증식은 융합주 PN13과 *S. cerevisiae* Kyokai No.7에 있어서 같은 수준이었다. 다시 융합주 PN13, *S. cerevisiae* Kyokai No.7 그리고 *Kluyveromyces lactis* T 136을

사용하여 탄소원으로서는 포도당을 사용하였을 때와 유당을 사용하였을 때에 성장 곡선과 에탄올 생산 곡선을 조사하였다. [그림 4]에서 볼 수 있는 바와 같이 포도당을 탄소원으로 사용했을 때에는 융합주 PN13의 성장은 *S. cerevisiae* Kyokai No.7에는 미치지 못하였으나, 에탄올 생산에 있어서는 *S. cerevisiae* Kyokai No.7과 마찬가지로 5일 후에 104 g/l의 에탄올을 생산하였다. 또한, [그림 5]에서 볼 수 있는 바와 같이 유당을 탄소원으로 사용하였을 때는 성장 곡선에 있어서 융합주 PN13이 단연 우수하였으며, 에탄올 생산에 있어서도 발효 7일째에 *K. lactis* T396은 30 g/l의 에탄올을 생산하였으나 융합주 PN13은 43 g/l의 에탄올을 생산하였다.

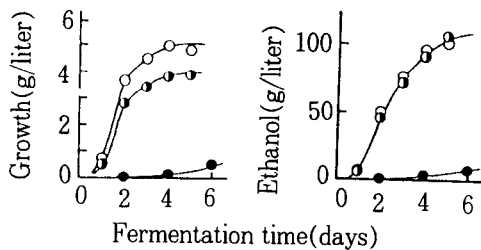


Fig. 4. Time Course of Fermentation on Glucose.

Each strain was cultivated in 25% glucose YEP medium without shaking.

○, *S. cerevisiae* Kyokai 7; ●, *K. lactis* T396; ◐, PN 13.

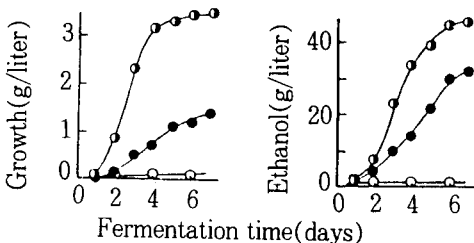


Fig 5. Time Course of Fermentation on Lactose.

Each strain was cultivated in 25% lactose YEP medium without shaking.

○, *S. cerevisiae* Kyokai 7; ●, *K. lactis* T396; ◐, PN 13.

3. 맺는말

양조용 효모의 육종에 대하여 비교적 흥미있게 생각되는 분야를 간단히 기술하여 보았다. 생물학적 연료로서의 에탄올 생산에 있어서는 값싼 발효 기질과 에탄올의 생산성이 대단히 중요한 요소이기 때문에 그에 따른 균주의 육종이 요구되나, 양조에 있어서는 양조특성에 변화를 주지않고 경제적이며, 질이 우수한 술을 양조할수 있게끔 효모를 육종하는 것이 매우 중요한 요소이다. 생전분의 당화능을 지닌 효모의 육종에 있어서나 전분당화능을 지닌 효모의 육종에 있어서는 비교적 새로운 기술인 유전자 재조합기법이 사용되고 있으나 내에탄올성 효모의 육종이나 내열성 에탄올 효모의 육종에 있어서는 아직도 재래적인 자연선택법이 주로 사용되고 있다. 이는 효모가 지닌 내에탄올성 및 내열성 기능이 유전자 수준에서 잘 해명되어 있지 않기 때문인 것으로 생각된다. 무엇보다도 앞으로의 양조효모의 육종에 있어서 중요한 것은 양조에 관하여는 효모의 양조특성을 지배하는 전유전자의 발현과 제어기구가 개개의 기능별로, 다음에 전체적으로 해명되어야 할 것으로 생각된다. 이와같은 양조효모의 유용한 기능들을 유전자 수준에서 해명함은 미래의 경제적이며, 질 좋은 술의 제조를 명확히 할 것으로 생각된다. 또한, 마지막 부분에서 기술한 유당의 에탄올로의 전환은 사람이 마시는 술의 제조보다는 공업용 에탄올 생산에 시제적인 것으로 생각된다. 그러나 세포융합에 사용한 효모가 양조용 효모이며 앞으로 우리나라에서도 낙농제품의 생산 증가로 유장이 다량 부산물로 생산될 것으로 생각되어 기술한 것이다.

참 고 문 헌

1. J. F. T. Spencer and D. M. Spencer : Ann. Rev. Microbio., 37, 121(1983)
2. T. Ashikari et al : Agric. Biol. Chem., 50, -

- 957(1986)
3. I. Yamashita and S. FuKui : Agric. Biol. Chem., 47, 2689(1983)
 4. J. H. Nunberg et al : Molec. Cell Biol., 4, 2306(1985)
 5. J. P. Holland and M. J. Holland : J. Biol. Chem., 254, 9839(1979)
 6. 多田節三 : 釀協, 84, 841(1989)
 7. 吉栖 肇 : 發酵 と 工業, 45, 579(1987)
 8. 坂井拓夫 : 發酵 と 工業, 44, 238(1986)
 9. 板井和久 : 發酵 と 工業, 45, 569(1987)
 10. T. Seki et al : Biotechnol. Lett., 5, 351 (1983)
 11. I. Russell and G. G. Stewart : J. Inst. Brew., 85, 95(1979)
 12. M. C. Barney et al : J. Am. Soc. Brew. Chem., 38, 1(1980)
 13. P. L. Skatrud et al : J. Am. Soc. Brew. Chem., 38, 49(1980)
 14. 宮崎 伸一, 北本勝ひこ, 高橋康次郎, 吉澤 淑 : 發酵工學, 65, 1(1987)
 15. 原 昌道 : 釀協, 73, 701(1978)
 16. M. Taya et al : Agric. Biol. Chem., 48, 2239 (1984)
 17. S. Hara : Bioscience and Industry, 48, 527 (1990)
 18. S. Hayashida et al : Agric. Biol. Chem., 53 923(1989)

責人者, 原無過於有過之中, 則情平.

責己者, 求有過於無過之內, 則德進.

남을 꾸짖을 때에는 허물 있는 가운데서 허물 없음을 찾아내라.

그리하면 감정이 평온하리라.

자기를 꾸짖을 때에는 허물없는 가운데서 허물 있음을 찾아내라

그리하면 덕(德)이 자라나리라.

— 채근담(菜根譚) 중에서 —