

### 효모의 분류, 특성 및 산업적 이용

김진욱 · 박장서  
두산인재기술개발원

효모라는 단어는 언제나 발효를 떠올리게 한다. 프랑스에서는 효모를 *levure*라 하는데 이는 부풀린다는 뜻인 라틴어 *lev-ere*에서 유래되었으며 영어의 *yeast*는 끓는다는 뜻의 희랍어 *zestos*에서 유래되었다. 또한 독일어의 *Hefe*도 비슷한 의미를 내포하고 있다. 이들은 모두 빵, 포도주 혹은 맥주의 제조과정에서 발생하는 탄산가스의 발생을 묘사한 것이다. 인류가 효모를 이용 빵과 술을 만들기 시작한 것은 4000년전 이집트 피라미드 내부의 벽화에 이미 상당히 발달된 발효과정이 묘사된 것으로 보아 역사 기록이전 시대로 생각된다. 그러나 이러한 발효과정이 효모의 작용에 의한 것임을 알게되기 시작한 것은 불과 170여년 전이다. 그러나 최초로 효모가 관찰된 것은 이보다도 훨씬 오래전인 1680년 van Leeuwenhoek에 의해서다. 그는 직접 만든 현미경으로 여러 가지 미생물을 관찰하던 중에 맥주 속에 많은 구형 또는 oval 형의 물체를 관찰하고 그림으로 기록하였다. 이 최초의 발견은 그 중요성이 평가되지 못한채 잊혀지고 있다가 1825년 맥주, 포도주 효모를 연구하던 Cagniard de la Tour, Kützing와 Schwann에 의해 효모가 budding으로 분열 증식하는 모습이 관찰되었다. 1839년 Schwann에 의해 효모세포 안에 "endospore"가 형성되는 것이 관찰된 후에 효모의 포자에 대한 연구가 시작되었다. 1870년 Rees는 이 포자가 ascus(포자낭)에 둘러 싸였다고하여 ascospore로 명명하고, 이런 포자를 형성하고 budding으로 증식하는 효모들을 *Saccharomyces*로 명명할 것을 제안하고 Ascomycetes로 분류하였다. 그러나 보다 완성된 효모의 분류체계는 1896년 덴마크의 Emil Christian Hansen에 의해 시도되었다. 그는 Pasteur가 고안한 순수배양기술을 보다 발전시켜 30여년 간 효모의 형태적, 생리적 특징들을 관찰하여 분류체계의 기초를 닦은 업적으로 오늘날 효모 분류학의 창시자로 불리우고 있다. 이후 1931년부터 1970년까지 네덜란드의 Technical University of Delft에서 유래된 "Delft School"의 Kluyver, Stelling-Dekker, Lodder, Kreger-van Rij 그리고 미국의 Wickerham 등의 선구자적인 연구를 바탕으로 오늘날 60여 genera, 500여 species의 효모가 분리되었다.

초기의 효모 연구는 오늘날 *Saccharomyces*로 분류되는 맥주 또는 포도주 발효 효모를 중심으로 이루어진 까닭에 효모의 정의는 그 이름의 유래에서도 알 수 있듯이 발효능을 가진 단세포

포로서 budding으로 증식하고 ascospore를 형성하는 것으로 인식되어 왔다. 그러나 분리된 많은 효모들 중에는 발효능이 없는 것, budding 대신 fission 혹은 bud-fission 방법으로 증식하는 것, ascospore가 아닌 ballistospore를 형성하거나 spore 형성이 관찰되지 않은 것 등 다양한 그룹의 효모도 존재한다. 한편 효모와 구별이 쉽지않은 yeast-like fungi 또는 chlorophyll이 없는 돌연변이 unicellular algae 등이 발견되면서 아직도 정확하게 '효모란 무엇인가?'에 대한 정의를 내리기는 힘든 면이 있다. 그러나 빵효모를 중심으로 효모는 어느 미생물보다도 인류의 생활과 밀접하게 연결되어 왔고, 지난 20년간 이룩된 분자생물학, 분자유전학을 비롯한 여러 분야의 생물학 연구에 model system으로서 지대한 기여를 해왔음에는 의심의 여지가 없다. 본 review에서는 지금까지 많은 연구가 되어 이미 다양한 review article들이 발표된 *Saccharomyces cerevisiae*를 중심으로 하되 급속적 다른 종류의 효모를 포함한 효모일반에 대해 고찰하는 기회로 삼고자 한다.

#### 효모의 분리 및 분류

##### 효모의 분리방법

효모는 박테리아보다는 제한적이지만 다양한 생태계 분포를 보이고 있다. 식물의 잎, 꽃, 나무줄기의 상처부위에서 흘러 나오는 수액, 곤충, 토양, 초식동물의 배설물 그리고 바다, 강 등의 수계에서도 분리된다. 수액은 곤충의 산란장소로 많이 사용되므로 곤충의 체표면에 묻어있던 효모가 수액중에서 증식되는 것으로 추정된다. 수액에서는 통상 2-3종류의 효모가 분리되며 이중에는 수액을 주 서식처로 하는 효모와 우연히 수액에 부착하게된 효모가 함께 나타난다. 효모는 saprophyte로 필요한 유기물을 외부에서 공급 받아야 하는데 대부분이 전통적으로 사용되어 오고 있는 malt extract, yeast extract (YM)가 포함된 영양배지에서 잘 자란다. 효모는 박테리아보다 산에 강하므로 배지의 pH를 3.5-3.8 정도로 맞추면 박테리아의 오염을 어느정도 억제할 수 있다. 이때 pH 조절은 inorganic acid를 사용하는 것이 바람직한데, 이는 acetic acid 등 organic acid는 효모의 생육을 억제할 수도 있기 때문이다. 배양온도는 균종에 따라 약간의 차이는 있으나 대부분의 경우

20~25°C에서 잘 자란다. 필요에 따라 항생제를 첨가하기도 하는데 이 경우 chloramphenicol이 산과 열에 안정성이 높으므로 주로 사용되고 있으며 streptomycin이나 oxytetracyclin 등은 몇몇 효모의 성장을 억제하므로 사용을 피하는 것이 좋다. 곰팡이의 생육을 억제하기 위해서는 배지에 0.1~0.15%의 propionic acid 또는 0.003%의 rose bengal을 첨가하거나 낮은 온도에서 배양하는 것이 도움이 된다.

### 효모의 분류

순수 분리된 효모는 일반적으로 형태적, 생리적, 유전학적 그리고 생화학적 특성에 따라 분류되어 왔다. 분류의 주요 기준은 크게 영양생식(vegetative reproduction) 양상, 유성생식(sexual reproduction)양상 그리고 생리적, 생화학적 특성으로 나누어진다. 영양생식의 양상에는 budding, fission, 혹은 bud fission 방법으로 증식을 하는지, 또는 pseudomycelium을 형성하는지, 그리고 bud 출현 위치에 따라 구분한다. 여기에 전자현미경적 미세구조의 차이점, 예를들면 세포벽의 미세구조 특성은 보다 확실한 분류의 기준이 되고 있다. 유성생식의 양상에는 ascus의 형태, 형성방법, 포자의 형성유무와 형태적 특징 그리고 homothallism인가 heterothallism인가 등이 포함된다. 다양한 탄소원에 대한 발효능 또는 자화능, 질소원 자화성 및 비타민 요구성 등은 주요한 생리적, 생화학적 분류기준으로 사용된다. 좀더 자세한 분류를 위해서는 cycloheximide resistance, G+C content 그리고 coenzyme Q의 종류 등의 분석이 자주 사용되고 있다.

지금까지 분리된 효모로는 약 60여 genera에 500 여종의 species가 있다. 이들은 크게 Ascosporogenous yeasts(Class Ascomycetes), Basidiosporogenous yeasts(Class Basidiomycetes) 그리고 Imperfect yeasts(Fungi Imperfecti) 등 3개의 그룹으로 분류가 된다. 이들은 각기 ascus spore formation, ballistospore formation(sterigma의 끝 부분에서 포자를 밀어내듯이 방출) 또는 spore의 형성이 관찰되지 않은 점에 의해 분류되었다(Table 1). Basidiosporogenous yeasts는 대부분의 생활사를 heterothallic haploid로 존재하는 특징이 있으며 G+C content가 높고, carotenoid pigment를 생성하고 cell wall 구성성분이  $\alpha$ -glucan인 특징을 가지고 있다. Imperfect yeast는 ascospore나 basidiospore를 형성하지 않는 효모로서 예를들면 *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Candida* 등이 있다. 그러나 이들이 Imperfect yeast로 분류된 것은 적절한 포자형성조건이 아직 발견되지 않았거나, heterothallic haploid로서 짝이 되는 opposite mating type이 아직 발견되지 않았을 가능성도 있다. 분류 단계별 사용되는 분류기준을 살펴보면 다음과 같다. 우선 Family 또는 그 이상의 단계에서는 포자의 형성유무, 형성 방법 그리고 형태 등에 의해 결정된다. Genus 단계에서 사용되는 주요 분류기준은 bud 형성방법, ascospore의 방출방법, ascospore의 형태와 구조, true mycelium의 형성유무, hyphal septa의 구조, Coenzyme Q 체계 그리고 nitrate 혹은 inositol 자화성 등이다. Species 단계에서는 각종 당의 자화성 및 발효여부, 세포의 형태적 특징, 질소원 자화성, life-cycle의 특징, pseudomycelium 또는 pellicle formation, G+C content를 비롯한 DNA homology data 등이다.

**Table 1.** Outline of yeast classification

Generic example
Fungi (Kingdom)
Eumycota (division)
Ascomycotina (subdivision)
Hemiascomycetes (class)
Endomycetales (order)
Spermophthoraceae (family)
<i>Metschnikowia</i>
Saccharomycetaceae (family)
Schizosaccharomycetoideae (sub-family)
<i>Schizosaccharomyces</i>
Nadsonioideae (sub-family)
<i>Hanseniaspora</i>
Lipomycetoideae (sub-family)
<i>Lipomyces</i>
Saccharomycetoideae (sub-family)
<i>Saccharomyces</i>
Basidiomycotina (subdivision)
Ustilaginales (order)
Filobasidiaceae (family)
<i>Filobasidiella</i>
Tremellales (order)
Tremellaceae (family)
<i>Tremella</i>
Teliospore-forming yeasts
<i>Rhodosporeidium</i>
Unclassified
<i>Sterigmatosporidium</i>
Deuteromycotina (subdivision)
Blastomycetes (class)
Cryptococcaceae (family)
<i>Candida</i>
Sporobolomycetaceae (family)
<i>Sporobolomyces</i>

최근에는 분자생물학적인 분류법이 도입되어 DNA sequence homology에 따른 분류방법이 보편화되고 있으며, 결과적으로 몇몇 효모들은 genera가 변경되기도 했다. 근래에 들어 전통적으로 사용되던 분류기준, 특히 효모의 species를 분별하는 분류기준이 되는 특성들이 단지 한 두가지의 유전형질에 의해서 결정된다는 것이 밝혀지면서 이러한 특성을 분류의 기준으로 하는 것이 큰 의미가 없다고 생각하게 되었다. 예를 들면 melibiose 분해효소인 melibiase, 전분분해효소인 glucoamylase 등이 그것이다. 마찬가지로 nitrate, nitrite 자화성에 관련된 유전자도 제한적인 것으로 알려졌다. 예로서 nitrate 자

화성 여부가 Genus *Hansenula*(nitrate positive)와 *Pichia*(nitrate-negative)를 가르는 주요 기준으로 지난 50년간 사용되어 왔으나 DNA 유사성은 75%나 되는 것으로 판명되면서 이들이 같은 Genus에 속하는 것으로 믿어진다.

## 효모의 생리적, 생화학적 특성

### Nutrition and growth

일반적으로 효모는 다른 미생물과 같이 성장에 있어서 탄소원과 에너지원, 무기 및 유기 질소원, 각종 미네랄 및 비타민을 필요로 한다. 효모를 배양하기 위해 사용되는 배지로는 malt extract와 beer wort가 가장 오래전부터 사용되어 왔는데 이는 diastatic malt를 효소적으로 분해하여 starch와 단백질을 발효성 당 및 펩타이드, 아미노산으로 분해한 것이다. Wickerham은 malt extract에 yeast extract를 첨가하여 효모의 저장 및 유지에 사용하였으며(YM배지), 발효성 당을 제외한 거의 모든 영양소를 함유하고 있는 yeast autolyzate도 효모배양에 많이 사용되고 있다.

또한 상기와 같은 complex media외에 많은 효모 배양실험에 사용되는 synthetic media가 있다. 효모배양에 사용되는 대표적인 synthetic media로는 yeast nitrogen base(YNB)와 yeast carbon base(YCB)가 있다. YNB는 탄소원을 함유하지 않으며, 포함된 trace elements, 9종류의 vitamin, amino acids, mineral, ammonium sulfate의 함량이 알려져 있고, YCB는 YNB의 ammonium sulfate 대신에 glucose가 1% 첨가되어 있다. 효모배양의 최적온도는 균종에 따라 조금씩 차이가 있으나 대부분의 경우에 있어서 20~25°C에서 배양할 때 좋은 결과를 얻을 수 있다. 그러나 warm blooded animal과 관련된 효모균종과(24~30°C) antarctic region에서 분리한 효모(12~15°C)는 보통의 효모와는 다른 최적온도 범위를 갖고 있다. 그러나 효모가 성장할 수 있는 온도 상한선은 이 온도 이상에서 합성이 되지 않는 성장요소를 배지에 직접 첨가해 줌으로써 어느 정도는 극복이 가능하다. 일례로 *Saccharomyces cerevisiae*는 40°C 이상에서 사멸이 일어나지만 배지에 oleic acid와 ergosterol을 첨가해 줌으로써 이를 방지할 수 있다.

일반적으로 효모는 trisaccharide까지는 쉽게 발효할 수 있으나 inulin, starch와 같은 polysaccharide는 쉽게 발효하지 못하며 혐기적 상태나 fermentative pathway를 이용하는 경우에는 pentose sugar를 이용하지 못한다. 효모가 발효시 쉽게 이용하는 탄소원으로는 glucose, galactose, maltose, sucrose, lactose, trehalose, melibiose, raffinose가 있다. Respiratory pathway는 fermentative pathway보다 다양한 carbon source를 이용할 수 있다. 보통의 효모는 pentose나 methyl pentose를 발효시키지 못하나 pentose kinase를 가지고 있는 종류는 respiration pathway에 의해서 이들 탄소원을 이용할 수 있다. *Cryptococcus*나

*Rhodotorula*는 glucose보다 L-arabinose, D-xylose, L-rhamnose를 탄소원으로 사용 할 때 성장이 빠르게 나타난다. Respiration에 의해서만 이용이 가능한 탄소원으로는 sugar alcohol (glycerol, glucitol), organic acid(lactic, succinic, citric acid), aliphatic alcohols(methanol and ethanol), hydrocarbons, aromatic compounds(phenol, cresols, catechol, benzoic acid) 등이 있다.

효모가 이용하는 nitrogen으로는 다양한 종류가 알려졌는데 보통 urea, ammonium ion, amino acid는 효모에 의해 쉽게 이용되는 질소원으로 알려져 있다. *Hansenula*와 *Citeromyces*는 nitrate와 nitrite를 질소원으로 사용할 수 있다. 효모를 urea 이용 방식에 따라 urease-positive yeast (*Rhodospiridium* & *Cryptococcus*)와 urease-negative yeast(ascmycetous yeasts)로도 분류하기도 하는데 전자의 경우는 urease가 urea를 분해하여 2분자의 ammonia와 1분자의 CO<sub>2</sub>로 전화시키므로 성장도중 다량의 ammonia를 발생하게 된다.

효모가 필요로 하는 비타민중 meso-inositol을 제외한 모든 비타민은 coenzyme의 일부로서 catalytic function을 수행한다. 가장 일반적으로 요구되는 Biotin은 urea assimilation 및 pyruvate가 oxaloacetate를 거쳐 phosphoenolpyruvate로 전환되는 과정에서 carboxylation 반응에 관여한다. Niacin과 riboflavin은 NAD와 FAD의 oxidation-reduction반응의 coenzyme component로 사용되며, Pantothenic acid은 acetylation reaction에 관여하는 coenzyme A의 component로 이용된다. 또한 Thiamin은 pyruvate의 decarboxylation과 pentose cycle에, pyridoxin은 transamination reaction에, Folic acid는 one carbon fragment의 대사에 각각 중요한 역할을 수행한다. 이외에 p-aminobenzoate는 folic acid의 구성물이며 meso-inositol은 phospholipid의 구조물로서 structural function을 수행한다. 일반적으로 Vit B<sub>12</sub>를 요구하는 효모는 없는 것으로 알려져 있으며 이를 합성하는 효모도 없다. 대부분의 효모는 1종류 이상의 비타민을 배지에 공급해 주어야만 하며 비타민을 요구하지 않는 종류도 있는 것으로 알려져 있다. *Hansenula anomala*의 경우는 성장에 필요한 모든 비타민을 스스로 합성하는 균주로 알려져 있다. 이와같은 비타민 외에 특이한 영양요구성을 갖는 효모도 있다. *Pichia amethinina*는 sulfur-containing amino acid의 합성능력이 결핍되어 있어 10 mg/l의 methionin과 cystein을 배지에 첨가해 주어야 한다. *Pityrosporum ovale*은 성장에 unsaturated fatty acid(특히 oleic acid)를 요구하며 *Brettanomyces* & *Dekkera*속 균주는 고농도의 thiamin(10 mg/l)을 요구하며, 배양도중 발생하는 acetic acid에 의해 균이 사멸되는 것을 방지하기 위해 calcium carbonate를 배지에 첨가해 주어야만 한다. *Cyniclomyces glutulatus*는 agar plate에서 배양시 10~15%의 CO<sub>2</sub>를 필요로 하며 *Torulopsis bovina*와 *T. pintolesii*는 warm-blooded animal의 장에 기생하는 효모로서 성장에 1 mg/l의 cholin, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>를 요구한다. 이

외에도 40% 이상의 당을 요구하는 osmophilic yeast와 3~4% 이상의 NaCl을 요구하는 sea water 분리주는 고유의 서식처에 적합한 환경적 요구를 가지고 있다.

효모를 포함한 fungi의 성장을 억제하는 물질로서 특이적으로 작용하는 항생물질이 있다. Cycloheximide(Actidione)은 *Streptomyces griseus*가 생산하는 항생물질로서 polyribosomal level에서 cytoplasmic protein 합성을 저해하며 Chloramphenicol은 mitochondrial protein의 합성을 저해한다. Lomofungin은 RNA의 합성을 방해하나  $Cu^{2+}$ 와  $Zn^{2+}$ 의 농도에 의해 불활성화 된다. Tunicamycin은 mannan-protein의 합성 및 분비를 억제하여 mannan-containing enzyme을 억제한다. 이외에 Nystatin, candicidin, amphotericin A, B, pimaricin, filipin 등은 plasmalemma와 강하게 결합하여 membrane permeability에 변화를 야기함으로써 성장을 억제한다.

### Carbohydrate metabolism

*Saccharomyces*속 균종은 aerobic 조건하에서와 같이 fermentation에 의해서도 잘 성장한다. glucose를 이용할 때 가장 빠르게 성장하지만 효율은 낮아서 13%만이 cell material로 전환되며 나머지는 fermentation product로 전환된다. galactose를 이용하여 호기적 조건으로 배양한 경우는 glucose에 비해 성장은 늦으나 26%가 cell material로 전환되며 55%가 fermentation product로 전환된다. 반면 알콜을 이용한 경우는 성장은 늦지만 39%가 cell material로 전환된다. 이와같은 현상은 catabolite repression에 의해 발생하는데, glucose-limited chemostat에서는 호기적 조건에서 55%의 동화작용을 보이며, 혐기적 조건에서 단지 9%의 동화작용을 보이고 나머지는 모두 알콜로 전환된다. 이러한 현상을 에너지적인 측면에서 보면, 알콜을 이용한 호기적 성장에서 거의 모든 ATP는 mitochondrial oxidative phosphorylation에 의해서 얻어지며 이는 호기적 glucose-limited chemostat에서도 동일하다. 반대로 혐기적 성장에서는 ATP는 glycolysis에서 substrate level phosphorylation에 의해서 얻어진다. Glycolysis에 관여하는 효소는 효모의 총 soluble protein의 30~65%를 차지한다고 보고되어 있는데 이는 fermentation pathway의 중요성을 정량적으로 보여주는 증거라 할 수 있다. 대부분의 glycolytic enzyme의 유전자 발현은 glucose에 의해 그 발현이 10~50배 증가된다. Phosphofruktokinase(PFK)와 pyruvate kinase(PYK)는 glycolysis의 cooperative kinetics와 allosteric control을 보여주는 중요한 효소이다. 효모는 배양 후기에 세포내에 storage carbohydrate로서 glycogen과 trehalose를 축적하게 된다.

일반적으로 효모를 fermentative organism으로 생각하는 경향이 많으나 성장조건에 따라서 glucose 및 다른 non-fermentable carbon source를 호기적으로 이용하는 능력도 갖추고 있다. 효모는 이러한 두가지의 pathway에 의해서 성장에 필요

한 energy를 얻는데 fermentative pathway의 경우는 respiration의 기질로 사용되는 alcohol을 많이 축적하기 때문에 oxidative pathway의 경우보다 1/10 정도의 적은 energy를 얻게 된다. Pasteur는 효모가 낮은 농도의 glucose(<0.1%)를 이용하는 경우, 공기의 존재하에서 fermentative activity가 감소하며 (Pasteur effect) glucose가  $CO_2$ 와 물로 전환됨을 관찰하였다. 이러한 현상은 제빵효모의 생산에 응용되어 알콜생성을 최소화하여 많은 효모균체를 얻는데 직접 응용되고 있다. 이와는 달리 효모가 높은 glucose농도에서는 산소를 공급하여 주어도 respiratory activity가 증가하지 않고 aerobic fermentation이 일어나는 현상이 있다(Crabtree or glucose effect). 이러한 현상은 glucose의 농도가 높으면 호흡에 관여하는 효소의 생성이 저해되어(catabolite repression) 발생하는 현상으로 glucose의 농도가 낮을수록 호흡에 의해 이용되는 glucose의 비율이 높아짐을 알 수가 있다. 그러나 이러한 현상은 효모의 종류에 따라서 약간씩의 차이가 있다.

*Rhodotorula*와 *Cryptococcus* 속의 모든 효모와 *Candida*와 *Torulopsis*의 몇몇 종은 fermentative activity가 결여되어 있으며 *Debaryomyces*와 *Pichia*는 respiratory activity가 fermentative activity보다 훨씬 강한 것으로 알려져 있으며, 반대로 *Torulopsis pontolopesii*는 respiratory activity가 결핍되어 있으며 *Saccharomyces carlsbergensis*는 respiratory activity보다 fermentative activity가 훨씬 강한 것으로 알려져 있다.

Glucose 등 sugar는 facilitated diffusion에 의해서 효모균체 내로 uptake된 후 EM pathway를 통과하면서 2분자의 pyruvate와 4분자의 ATP로 전환된 후, 생성된 2분자의 pyruvate는 2분자의  $CO_2$ 와 2분자의 acetaldehyde로 전환된다. 이 2분자의 acetaldehyde는 alcohol dehydrogenase의 작용에 의해 2분자의 alcohol로 전환된다. 효모는 질소원이 없는 상황에서도 70%의 glucose를 alcohol로 전환할 수 있다. Kluver는 이러한 발효 과정에 3가지의 기본원칙을 설정하였다.

첫째, 효모가 D-glucose를 발효하지 못하면 다른 sugar도 발효시키지 못한다.

둘째, 효모가 D-glucose를 발효시킬 수 있으면 D-fructose와 D-mannose를 발효시킬 수 있으며 종류에 따라서는 D-galactose도 발효시킬 수 있다.

셋째, maltose를 발효시키는 효모는 lactose를 발효시키지 못하며, 반대의 경우도 성립된다.

이러한 법칙에 대한 근거는 첫째 di-, tri-, polysaccharide는 cell surface에 존재하는 효소에 의해서 hexose로 전환되어야 효모에 의해 사용될 수 있는데 효모가 hexose sugar를 이용하지 못하면 di-, tri-, polysaccharide도 이용할 수가 없다. 둘째, glucose, fructose, mannose는 동일한 transport system을 통해 흡수되며 동일한 효소에 의해서 인산화 되므로 이들 sugar에 대한 이용능력은 공통으로 보유하게 되지만 galactose는 다른

system을 사용하게 되므로 galactose를 이용하기 위해서는 galactokinase gene을 가지고 있어야만 한다. 또한 maltose는 maltose permease에 의해 cell로 흡수된후 maltase의 합성을 induction하여 glucose로 분해된다. 이때 발생하는 glucose는 maltose permease의 발현을 저해하고 이어서 maltase의 발현도 저해된다. Raffinose는 invertase와 melibiase가 존재하는 경우에 100% 이용될수도 있다. 효모중에는 이들 두 효소를 모두 가지고 있는 효모도 수종 존재하지만 이들 효모는 galactose를 이용하지 못하는 종류이므로 raffinose를 100% 사용하지는 못한다. 예를들어 빵효모 생산에 사용되는 당밀에는 약 1~1.5%가 raffinose인데 빵효모인 *S. cerevisiae*는 melibiase를 만들지 못해 3 탄당인 raffinose의 2/3는 이용을 못한다. *Sporobolomyces singularis*는 lactose를 이용할수 있으나 이중 galactose 부분은 이용하지 못해, cell내에 2~3개씩 galactose가 연결된 형태로 남게 된다. 효모에 의해서 생성되는 alcohol의 농도는 균종과 영양분에 따라 차이가 있으나 3.4~18%정도 alcohol을 얻을 수 있다.

Fermentation condition하에서는 glucose의 95%가 ethanol(48.4%)과 CO<sub>2</sub>(46.6%)로 전환되며 *S. cerevisiae*에서는 미량의 glycerol, succinic acid, higher alcohol, 2,3-butaediol, acetaldehyde, acetic acid, lactic acid가 부산물로 생성된다. Aerobic condition 하에서는 alcohol형성 대신에 상당량의 acetic acid (*Brettanomyces*, *Dekkera*), ethyl acetate (*Hansenula*), 여러종류의 ester, succinic acid, zymonic acid, polyhydric alcohol (glycerol, erythritol, arabitol, mannitol), lipid and glycolipid (polyol fatty acid ester, hydroxy fatty acid, sphingolipid, erythro-8,9,13-triacetoxycosanoic acid) 등이 생성된다. 효모에 의해서 생성, 축적되는 색소로 대표적인 것으로는 황색 혹은 적색의 carotenoid가 있는데 이는 *Sporobolomyces*, *Sporidiobolus*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Phaffia*, *Cryptococcus*속의 효모가 생산하며 이외 *Candida pulcherrima*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Pichia* 효모가 iron containing media에서 성장하면서 생산하는 Pulcherrimin, *S. cerevisiae*와 *Schizosaccharomyces pombe*가 생산하는 Polyribosylaminoimidazole과 black yeast가 생산하는 dark pigment가 있다.

## Genetics and molecular biology of yeasts

가장 하등한 진핵세포 가운데 하나인 빵효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 아마도 오늘날가장 발달된 모델시스템 중 하나로서 생물학에서 제기되는 대부분의 문제점들에 대한 해답을 내포하고 있다. 불과 20여년 전까지만 해도 빵효모 또는 알콜발효 효모에 지나지 않던 *Saccharomyces cerevisiae*가 genetics, biochemistry, cell biology 그리고 molecular biology 등 생물학 각 분야에서 모델시스템으로 이용되고 있는 이유는

다음과 같다. 우선 일찍이 확립된 classical genetics에 molecular biology technique이 접목되어 "powerful molecular genetic system"이 구축된 점이다. 이는 1975년 효모의 형질전환 방법이 최초로 Hinnen 등에 의해 개발되므로서 시작되었다. 여기에 사람 세포를 포함한 모든 진핵세포의 기본적인 세포구조 및 기능이 유사하고 때로는 상보성이 있는 것으로 밝혀지면서 다루기 쉬운 효모를 연구하기 시작했다. 예를 들면 cytoskeletal organization, subcellular organelles, secretion systems, receptor and second messenger arrangement, metabolic arrangement 그리고 chromosome mechanics 등이다. 특히 gene structure와 그 산물인 단백질의 기능과의 관계를 *in vitro*, *in vivo*에서 동시에 확립할 수 있어 생명현상의 근본적인 규명에 획기적인 발전을 가져다 주었다. 다시 말하면 소위 reverse genetics 그리고 reverse biochemistry를 상대적으로 손쉽게 수행할 수 있다. 한편 haploid와 diploid 상태를 자유롭게 전환시킬 수 있으므로 목표하는 유전자의 기능이 필수적인지 아닌지를 null mutation을 유발시켜 쉽게 점검할 수 있을 뿐 아니라 유관한 다른 유전자와의 genetic relationship, 예를들면 epistasis를 확립할 수 있다. 또한 효모는 비병원성이며 배양속도가 빠른 잇점이 있다(doubling time이 1.5~2시간).

*Schizosaccharomyces pombe*는 *Saccharomyces cerevisiae*에 뒤이어 새롭게 등장한 모델시스템으로 특히 cell cycle 연구에서 많은 업적을 기록하고 있으며 chromosome mechanics 분야의 연구도 활발하게 진행되고 있다. 이는 *Schizosaccharomyces pombe*가 *Saccharomyces cerevisiae* 보다 고등생물에 더 가깝고 전체 genom size는 14000 kb 정도로 비슷하나 chromosome 수가 3개 뿐으로 16개의 *S. cerevisiae*에 비해 단순하기 때문일 것이다. 일례로서 *Sch. pombe cdc2* mutant를 complementation 시키는 방법으로 사람의 유전자가 직접 분리되었다. 한편 *S. cerevisiae*에서 확립된 molecular biology techniques 적용될 수 있다는 점에서 *Sch. pombe*를 새로운 모델시스템으로 사용하는데 유리한 점이다.

*S. cerevisiae*의 plasmid vector system은 2 μm DNA의 replication origin을 이용한 multiple copy plasmid, CEN based low copy(1~2 copies) plasmid 그리고 integrative plasmid들을 기본구성으로 하고 다양한 promoter(regulated or high expression)와 secretion signal 등이 조합된 plasmid들이 개발되어 있다. 고농도 배양이 용이하고 빠른 배양속도와 안전성 그리고 high expression system 때문에 지금까지 많은 heterologous protein의 효모에서 발현시켜 생산한 결과가 보고되고 있다 (Table 2)(6).

그러나 고등세포, 특히 사람세포와는 다른 glycosylation 양상이 문제점으로 나타나고 있다. 근래에는 새로운 *Pichia*, *Hansenula*, *Yarrowia lipolytica*를 비롯 *Sch. pombe*를 heterologous gene expression system으로 개발하여 사용하기 시

**Table 2.** Some heterologous compounds secreted by *Saccharomyces cerevisiae*.

Compound	Glycosylated	Approx. M	Location		
			i	w	m
Viral haemagglutinin	+	>250,000			+
Fungal cellobiohydrolase I	+	200,000	-	20	80
Aspergillus glucoamylase	+	100,000			90
Mouse IG heavy chain	+	70,000			15
Mouse IG light chain	-	28,000			40
Human serum albumin	-	67,000			+
Calf prochymosin	+	60,000	90	-	10
<i>Bacillus</i> $\alpha$ -amylase	+	60,000	25	-	75
Human $\alpha$ -amylase		55,000	30	25	45
Mouse $\alpha$ -amylase		55,000			70
Wheat $\alpha$ -amylase		42,000		-	+
Human interleukin 1 $\beta$	-	22,000	-	-	+
Interferon-Con 1	+	20,000	5	90	5
Human interferon	+	20,000	60	20	20
Human lysozyme		14,700			67
Human ANP		7,400			+
Epidermal growth factor		5,500	5	-	90
Human calcitonin		3,500	-	-	95
Human $\beta$ -endorphin		3,000	-	-	95

\*i: intracellular, w: in the cell wall, m: in the suspending medium. - : not present, +: present but not quantified.

**Table 3.** Production of foreign proteins in non-Saccharomyces yeasts.

Yeast	Protein <sup>a</sup>	Location <sup>b</sup>	Pormoter <sup>c</sup>
<i>Pichia pastoris</i>	$\beta$ -galactosidase	I	AOX1, DHAS
	HBsAg	I	AOX1
	Tetanus toxin fragment C	I	AOX1
	Pertactin	I	AOX1
	TNF	I	AOX1
	Streptokinase	I	AOX1
	SOD	I	AOX1
	HIVgp120	I,S	AOX1
	<i>S.c.</i> invertase	S	AOX1
	Bovine lysozyme	S	AOX1
	Human EGF	S	AOX1
	Aprotinin	S	AOX1
	HAS	S	AOX1
<i>Hansenula polymorpha</i>	$\beta$ -lactamase	I,S	MOX, DAS, FMD
	HBsAg	PERI	MOX, FMD
	PreS1-S2-HBsAg	PERI	MOX
	$\alpha$ -galactosidase	S	MOX
	Glucoamylase	S	FMD
	HSA	S	MOX
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Prochymosin	S	LAC4
	IL-1 $\beta$	S	<i>S.c.</i> PHO5, <i>S.c.</i> PGK
	HSA	S	LAC4, <i>S.c.</i> PHO5, <i>S.c.</i> PGK
	HSA-CD4	S	<i>S.c.</i> PGK

**Table 3.** Continued

Yeast	Protein <sup>a</sup>	Location <sup>b</sup>	Pormoter <sup>c</sup>
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Schw.o.</i> $\alpha$ -amylase	S	Homologous
	tPA	S	?
<i>Yarrowia lipolytica</i>	$\beta$ -galactosidase	I	LEU2
	<i>S.c.</i> invertase	S	XPR2
	Bovine prochymosin	S	XPR2, LEU2
	porcine IFN	S	XPR2
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Polyoma middle-T Ag	I	<i>S.c.</i> PGK
	CAT	I	nmt1, HCG $\alpha$ , CMV*, SV40*, GRE
	Human epoxide hydrolase	I	adh
	Factor XIIIa	I	adh
	IBD virus VP3	I	adh, <i>S.c.</i> ADH1
	<i>E. coli</i> $\beta$ -glucuronidase	I	CaMV35S*
	Single chain Ab	I	adh
	Bacterio-opsin	PLM	adh
	STP1 glucose transporter	PLM	adh
	<i>S.dia.</i> glucoamylase	PERI?	Homologous
	<i>S.c.</i> exoglucanase	CWALL?	Homologous
	<i>S.c.</i> endochitinase	CWALL?	Homologous
	Antithrombin III	S	<i>S.c.</i> ADH1, <i>S.c.</i> CYC1
	<i>Schw.o.</i> $\alpha$ -amylase	S	Homologous

<sup>a</sup>*S.c.*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Schw.o.*, *Schwanniomyces occidentalis*; *S.dia.*, *Saccharomyces diastaticus*; <sup>b</sup>Location of expressed protein: I, intracellular; PERI, periplasmic; PLM, plasmamembrane; CWALL, cell wall; S, secreted; <sup>c</sup>Promoters given are native to the organism except: *S.c.*, *Saccharomyces cerevisiae*; \*viral; homologous, homologous to the gene expressed; GRE, glucocorticoid response elements; HCG $\alpha$ , human chorionic gonadotrophin  $\alpha$ .

작했다(Table 3)(6).

특히 *Pichia pastoris*와 *Hansenula polymorpha*는 *S. cerevisiae*보다 월등한 expression과 secretion 수준을 보여 새로운 heterologous gene expression으로 각광을 받고 있다. 그러나 아직 이 두 효모에 대한 genetics, molecular biology system이 많이 연구되지 않은 점과 특히 GRAS(generally regarded as safe)로 지정되지 않아 사용에 제한이 있다.

### 효모의 산업적 응용

매년 전 세계적으로 생산되는 효모는 어떤 미생물과도 비교될 수 없는 양인 약 200만톤으로 추산된다. 이 가운데 빵효모 또는 식용효모는 180만톤이고 나머지는 알콜발효 또는 맥주

등 알콜성 음료수를 목적으로 발효된 후의 부산물로 생산되는 양이다. 효모 *S. cerevisiae* 균체의 화학적 조성은 배양조건에 따라 변화가 있으나 일반적으로 단백질(38~60%), 핵산(7~12%), 그리고 비타민(0.05~0.15%)의 함량이 높고 지방함량이 낮아 1970년 초부터 SCP(Single cell protein)으로서 산업적 생산연구가 활발히 시작되었다. Table 4(5)에는 여러 가지 산업용 효모에서 생산되는 물질이 나열되어 있다.

여기에 새로운 효능의 발견으로 산업적으로 중요한 물질로 개발되기 시작한 것으로는 빵효모나 발효가 끝난 맥주효모의 cell wall 성분인  $\beta$ -1,3/1,6 glucan이 있다.  $\beta$ -1,3/1,6 glucan은 universal "alarm molecule" (immuno stimulant)로서 여러 동, 식물의 면역시스템을 활성화시켜주어 각종 병원성 미생물에 대한 저항성을 높여주는 기능을 하며(nonspecific disease resistance) vaccine 생성의 효율을 높이는 것으로 알려졌다. 최근에는 *S. cerevisiae*가 아닌 다른 효모로부터 생산되는 유용물질의 종류는 계속 늘어나고 있다. 예를들면 다당류인 pullulan (*Aureobasidium pullulans*), sphingolipids(*Hansenula ciferrii*), Coenzyme Q10(Basidiosporogenous or Imperfect yeasts) 등을 들 수 있다. 생태계의 효모들은 그들의 생존환경과 연관하여 여러 유기물, 혹은 난분해성물질 등에 대해 매우 강한 자화 및 분해특성을 갖는 것으로 나타났다. 이러한 효모를 이용하여 발효공업에 유용한 균을 선발해내고 양조나 식품공장의 폐액 중 유기물을 분해하는 방법이 개발되어 실용화되고 있다. 현재까지 분리된 효모종에는 protease, amylase, lipase 등을 분비하는 효모, 향기를 많이 생산하는 효모, 색소를 탈색하는 효모, 유기산을 많이 분비하는 효모등 매우 흥미로운 특성을 갖는 효모가 있었다. 예를들면 단백질을 강력히 자화하는 균주인 *Hansenula anomala*를 이용하여 가다랭이 공장의 COD 25,000 ppm 폐액을 처리한 결과 COD 1,000 ppm의 처리수를 얻은 연구보고도 있다(8). 한편 일반적으로 난분해물로 여겨지는 xylene, 글루칸, 만난, 펙틴 등을 탄소원으로서 분해 자화하는 효모가 있는 것은 주목할만 하다. *Candida pulcherrima*는 산성 protease를 분비함이 확인되었고, lipase를 분비하는 균주도 발견되었다. 이외에도 여러 식용색소로 지정된 색소를 분해하는 효모도 발견되어 효모간의 기질특이성도 인식되었다. 예를들면 *Candida japonica* AN-723는 색소 0.1%함유한 배지에서 48시간 배양에 색소를 100% 분해하는 능력을 가지고 있다. 과일향을 내는주는 *Geotrichum candidum*, 꽃향기를 내는 *Hansenula saturnus*으로 분류되었다. 항산화 물질을 분비하는 주, 악취를 분해하는 주, 알콜내성이 강한 주, 온도 내성이 강한 주, 항효모물질을 분비하는 주, 산성 및 알칼리성에서 잘 생육하는 여러 종류의 효모도 분리 동정되었다.

새로운 효모의 스크리닝을 통해 산업적으로 유용한 물질의 탐색의 추진과 더불어 기존의 산업용 효모의 개량 노력이 이루어져 왔다. 산업적으로 효모의 배양 또는 효모의 발효기술

생물산업

Table 4. Products of Industrially Important Yeast Species.

Product	Yeast
Baker's yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Food yeast	<i>Candida utilis</i>
	<i>Candida tropicalis</i>
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
	<i>S. carlsbergensis</i>
	<i>S. cerevisiae</i>
Protein	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Torula spec.</i>
Alcoholic beverages	<i>S. cerevisiae</i>
	<i>S. bayanus</i>
	<i>S. carlsbergensis</i>
Yeast autolysates and Extracts	<i>S. cerevisiae</i>
	<i>R. rouxii</i>
	<i>Candida utilis</i>
	<i>Rhodotorula</i>
Lipid	<i>Rhodotorula glutinis</i>
	<i>Candida utilis</i>
	<i>Rhodotorula</i>
$\beta$ -carotene	<i>Candida spec.</i>
Nucleotides	<i>S. cerevisiae</i>
Mannoproteins	Brewer's yeast
Glutathione	
Enzymes	
Amylases	<i>Schwanniomyces alluvius</i>
Inulinase	<i>Candida keyfir</i>
	<i>Candida pseudotropicalis v. lactosa</i>
	<i>K. cicerisporus</i>
Lactose	<i>K. fragilis</i>
Protease	<i>Candida pseudotropicalis</i>
Pectinases	<i>S. cerevisiae, Torulopsis</i>
Glucose oxidase	Baker's yeast
Lipase	
Invertase	<i>S. cerevisiae</i>
$\alpha$ -Galactosidase	

은 오랜세월에 걸쳐 발달되어 왔으며 전통적인 공정의 효율성은 최고의 수준에 이른 것으로 생각되고 있다. 맥주효모, 포도주효모, 빵효모, 증류주 또는 연료용 효모로 대표되는 산업용 효모의 개량에 있어 재래적인 돌연변이 유발 및 선별 방법은 산업용 박테리아에서 만큼 성공적이진 못했다. 주된 이유는 산업용 효모는 대체로 polyploid(다배체)여서 돌연변이가 용이하지 않고 또한 포자형성과 타 효모와의 mating을 통한 hybrid 형성이 잘 되지 않기 때문이다. 이러한 한계를 극복할 수 있는 방법으로 원형질 융합, 유전자 재조합 기술등이 도입된 이후 지난 10여 년간 괄목할 만한 결과들이 보고 되었다. 균주 개량의 목표는 효율성, 생산성을 극대화하고 기존의 공정을 최적화하는 방향으로 진행되어왔다. 구체적인 목표들은 1) 전분, 셀룰로스, raffinose 또는  $\beta$ -glucan을 분해하는 효모, 2) 야생효모등 다른 종류의 효모 오염을 억제하는 killer factor가 도입된 효모, 3) 침강성의 조절, 4) 향성분의 개선, 5) 고온발효

효모, 6) 알콜내성 효모 그리고 7) 발효능이 향상된 효모의 개발 등을 들 수 있다(7). 최근에는 단순히 유용 유전자 또는 유전형질의 도입으로 새로운 특성을 부여하는 효모개량의 차원을 넘어 잘 밝혀진 대사경로를 억제 또는 촉진시켜 목표하는 대사산물의 생산을 향상시키는 "metabolic engineering" 기술이 응용되고 있다.

유전자 조작된 산업용 효모는 실제 사용되는가? 아직까지는 상업화된 경우는 보고된 바없다. 최근에 영국에서 전문분해 효소인 glucoamylase gene이 도입되어 맥즙내의 비발효성 당인 텍스트린의 함량을 낮추므로써 'low carbohydrate beer'를 만들 수 있는 효모가 사용허가를 받았으나 실제 소비자를 대상으로 상용화되지는 않았다. 전통적으로 보수적인 알콜발효 업계에서는 소비자 인식에 대한 우려 때문에 아직도 유전자 조작된 효모의 사용을 조심스러워하고 있으나 가까운 장래에 유전자 재조합된 효모가 상용화될 것으로 기대한다.

## 참고문헌

1. Phaff, H. J., Miller, M. W. and Mrak, E. M 1978. "The Life of Yeasts", 2nd ed. Havard University Press, Cambridge, Massachusetts.
2. Rose, A. H. and Harrison, J. S. 1987. "The Yeasts" vol. 1. Academy Press.
3. Rose, A. H. and Harrison, J. S. 1993. "The Yeasts" vol. 4. Academy Press.
4. Guthrie, C. and Fink, G. R. 1991. Guide to Yeast Genetic and Molecular Biology, Methods in Enzymology 194. Academy Press.
5. Halasz, A. and Lasztity, R. 1991. "Use of Yeast Biomass in Food Production". CRC Press.
6. Nobel, J. G. and Barnett, J. A. 1991. Yeast 7, 313-323.
7. Stewart, G. G. and Russell, I. 1993. MBAA Technical Quarterly, 30, 159-168.
8. Kakuta, T. 1989. Bio Industry, 6(2), 134-143.
9. Strathern, J. N., Jones, E. W. and Broach, J. R. 1981. "The Molecular Biology of The Yeast Saccharomyces-Metabolism and Gene Expression". Cold Spring Harbor Laboratory Press.