

주박으로부터 효모포자의 생산

임용성 · 배상면¹ · 김 근*
수원대학교 생명공학과, ¹(주)국순당

Producton of Yeast Spores from Rice Wine Cake. Lim, Young Sung, Sang Myun Bae¹, and Keun Kim*.
Department of Bioscience and Biotechnology, The University of Suwon, Kyounggi-Do, 445-743, Korea, ¹KookSoonDang Co. Ltd., KookSoonDang Bldg 110-3, Samsung-Dong, Gangnam-Gu, Seoul 135-090, Korea – Rice wine cake (RWC) is the solid waste obtained after rice wine fermentation. For the mass production of the spores of yeast *Saccharomyces* from RWC, the optimum pretreatment condition of RWC, the optimum composition of culture medium, and the optimum culture condition were examined. For sporulation, yeast cells were grown in the presporulation medium (PSM), transferred into sporulation medium (SM) containing 1% potassium acetate, and incubated in a rotary shaking incubator at 25°C for 4 days. The supernatant of the mixture of RWC and water was used as the presporulation medium (PSM). The optimum temperature and time for the pre-incubation of the mixture of RWC and water (1:2) to obtain maximum sporulation yield were 51°C and 24 hr, respectively, and optimum culture time in PSM was 48 hr. Using these optimum conditions, the asci number obtained was 0.72×10^8 /ml. The addition of wheat coat koji into SM increased the final number of asci to be 1.06×10^8 /ml. Spores were formed in the SM with the initial pH of 7-11, but no spores were formed in the SM with the initial pH of 5. To save the time and effort to pretreat the RWC, 2% and 0.5% RWC without any pretreatment were directly added into PSM containing 1% brown sugar and SM, respectively, and the maximum asci number of 1.27×10^8 /ml was obtained.

Key words: Yeast spores, rice wine cake, *Saccharomyces*, presporulation medium, sporulation medium

효모는 수분을 제거하는 건조공정을 거쳐서 활성 건조효모(active dry yeast)를 생산하게 되는데 건조과정에는 급격한 수분의 증발로 온도가 -10°C 로까지 급격히 내려가고 대부분의 세포가 사멸하게 되며[10], 건조 후에도 장시간 실온에서 저장하게 되면 보통 세포는 완전히 사멸된다[9]. 건조공정시 그리고 건조 상태와 고온 및 저온에서의 장기간 보관 같은 불리한 환경에서 생존하려면 세포보다도 외부적인 stress에 강한 포자[11, 15]가 훨씬 유리하다. 또한 생체촉매로써의 효모의 이용 면에서도 효모포자가 더 유용하여 고정화를 통한 방법으로 생체반응기 내에서의 촉매의 역할을 수행하는 방법도 고안되었다[12].

일반적으로 효모 포자를 형성시키는 방법을 살펴보면 전포자형성배지(presporulation media, PSM)라고 불리는 1차성장배지에서 세포가 대수기에 도달했을 때 포자형성배지(sporulation media, SM)로 옮겨 배양하면서 포자를 형성시킨다[5]. 영양세포를 증식시키는 PSM에서는 포도당의 농도에 의하여 세포의 성장이 조절되고[8], 당과 함께 질소원이 균형 있게 요구되는 반면 SM으로의 전이 시에는 제한된 범

위의 영양상태가 요구된다. 효모의 종류와 배양조건에 따라서 성장과 포자화의 진행과정이 각기 다르고 포자 형성율도 다르지만, 영양분의 고갈로 인해 포자는 형성된다는 사실은 일치하며[11], 배지에서 탄소원과 질소원과 인산의 고갈 시에 포자형성이 시작된다[7].

효모 1차성장배지로는 yeast extract, peptone, dextrose를 첨가한 YPD 배지가 널리 쓰이고 있으나 배지로 쓰이는 이들 시약의 비용이 효모를 산업적으로 대량 생산할 시에는 높은 단가를 차지하고 있으므로 새로운 산업용 대체배지의 사용은 효모 발효로 생산되는 모든 제품의 가격을 낮출 수 있는 중요한 요인이 된다. 특히 양조 후 발생하는 발효찌꺼기인 주박과 같은 폐기물을 재활용하여 효모성장 배지로 사용하면 산업폐기물의 재활용과 산업폐기물의 처리비용 절감의 일석이조의 효과를 볼 수 있다.

본 연구에서는 장기간 유통과 보관이 가능한 활성 효모 포자를 대량생산하기 위하여 세포의 성장수를 높이면서 포자형성을 증진시킬 수 있는 주박을 이용한 대체배지와 배양 방법들을 개발하고자 하였다.

*Corresponding author

Tel: 82-31-220-2344, Fax: 82-31-220-2344

E-mail: kkim@suwon.ac.kr

재료 및 방법

균주

본 실험실에서 소장하고 있던 *Saccharomyces* 속에 속하는 효모균주 FR을 실험에 사용하였다.

종균배양 배지 및 배양

효모의 종균배양은 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 1.5-2.0% agar로 구성된 YPD agar배지를 사용하여 30°C에서 2일간 실시하였다.

전포자형성 배지(Presporulation medium, PSM) 및 배양

(주)국순당에서 쌀을 재료로 하여 술 발효를 한 후 그 발효액을 여과시키고 남은 부산물인 주박(rice wine cake, RWC)을 물로 추출한 후 원심 분리한 다음 얻어진 상등액을 효모의 전포자형성배지(PSM)로 사용하였다. 주박에는 수분 56.78%, 탄수화물 34.03%, 조단백 5.84%, 조지방 0.62%, 조섬유 2.38%, 조회분 0.35%, vitamin B1 2.08 ppm, vitamin B2 1.39 ppm, vitamin C 407.45 ppm(이상 한국과학기술분석센터의 분석 결과) 및 발효 후 잔존하는 효모(total cell 3×10^9 /g, viable cell 4.1×10^3 cfu/g)가 함유되어 있다. 주박과 증류수의 비율을 1 : 2로 하여 믹서로 분쇄 및 혼합하여 걸죽한 상태의 혼합물을 제조하였다. 이 혼합물을 5 N NaOH로 pH 6으로 보정하고 500 ml 삼각 플라스크에 150 ml씩 넣어 rotary shaking water bath에 넣고, 85 rpm의 회전 속도로 진탕하여 주박내의 여러 영양물들을 추출함과 동시에 주박내의 효모를 어느 정도 자가분해(autolysis)시키는 과정을 진행시켰다. 이 과정 후 배지내 당 농도를 측정하였고 3000 rpm 이상에서 원심분리한 후 그 상등액을 멸균하여 PSM으로 사용하였다. 필요시에는 PSM에 전처리하지 않은 주박과 시중에서 구입한 갈색설탕을 첨가하였다. 배양조건은 제조된 PSM에 효모를 접종(1~2 백금이/100 ml)하고

30°C에서 200 rpm의 속도로 rotary shaking incubator에서 배양하였다.

포자형성배지(Sporulation medium, SM) 및 배양

포자형성배지(SM)는 1% potassium acetate[11]로 구성되었다. 필요시 1% potassium acetate인 SM에 peptone, corn steep liquor, 밀기울 국(koji) [(주)국순당], 그리고 주박 등을 첨가하였다. 포자 형성을 위하여서는 500 ml flask에 SM 배지 100 ml를 넣고 PSM에서 배양한 효모 배양액 10 ml를 접종하여 25°C에서 200 rpm의 속도로 rotary shaking incubator에서 3~4일간 배양하였다.

당농도 분석

배지내 잔당(residual sugar)의 정량은 3, 5-dinitrosalicylic acid를 이용한 환원당 정량법[1]을 사용하였다.

세포 성장 및 포자형성을 측정

세포 혹은 포자 배양액을 일정비율(1/10, 1/100)로 희석한 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 성장을 알아내었고, 또한 haemocytometer를 사용하여 현미경으로 세포수 및 자낭의 수를 세어 그 비율을 포자 형성율로 나타내었다. 포자 형성율은 1개의 자낭(ascus)안에 4개의 자낭포자(tetrad)가 뚜렷이 생성된 경우에만 1개의 자낭으로 간주하여 다음과 같이 측정하였다.

$$\text{즉, 포자 형성율 (\%)} = \frac{\text{자낭 수}}{\text{세포 및 자낭 전체수}} \times 100$$

결과 및 고찰

주박액의 전처리(pre-incubation)

주박을 PSM으로 사용하기 전에 물과 혼합한 후 여러 시간 동안 pre-incubation하여 주박내의 여러 혼합물들을 추출

Table 1. Effect of pre-incubation time of the rice wine cake on the cell growth and sporulation rate in sporulation medium.^a

Preincubation time (hr)	Cell growth in PSM ^b (A ₅₇₀ I/100)	SM ^c			
		Cell No. ($\times 10^8$ /ml)	Residual sugar (%)	Spo-rated ^d (%)	Ascus No. ($\times 10^8$ /ml)
0	0.284	0.13	0.01	4.3	0.01
12	0.441	0.78	0.02	28.0	0.22
24	0.426	1.00	0.04	27.8	0.28
42	0.272	1.00	0.05	24.5	0.25
68	0.263	0.85	0.04	22.6	0.20

^a Rice wine cake was mixed with water at a mixing ratio of 1 : 2, the pH of the mixture was adjusted to 6 and incubated at 50°C in a rotary shaking water bath at 85 rpm.

^b The supernatant of the preincubated mixture of rice wine cake and water was used as PSM, inoculated with one loopful of FR strain, and incubated at 30°C for 2 days in a rotaty shaking incubator.

^c The 10 ml cell culture broth of PSM was inoculated into 100 ml SM and incubated in a rotary shaking incubator for 4 days for sporulation.

^d Sporulation-rate.

시키는 과정을 실행하였는데, Table 1은 여러 pre-incubation 시간이 PSM에서와 SM에서의 세포성장과 포자 형성에 끼치는 영향에 대한 실험결과를 나타낸 것이다. 우선 PSM에서의 세포 성장률을 보면 12시간과 24시간 후에서 높은 세포 성장률을 보였다. 또한 SM배지에서는 24, 42시간 후에 높은 세포 성장을 보였다. SM에서의 포자 형성율은 12시간과 24시간의 경우가 제일 많았는데 SM에서의 세포수가 24시간의 경우가 12시간의 경우보다 많았기 때문에, 결과적으로 24시간 동안 pre-incubation한 경우에 0.28×10^8 /ml로서 가장 높은 자낭 수를 나타내었다. 한편 pre-incubation하지 않은 0시간의 경우 PSM에서의 낮은 성장을 나타내었고, SM에서도 낮은 포자 형성율을 보였는데, 이는 주박내의 영양분이 잘 추출되지 않았기 때문으로 사료된다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 본 연구결과는, 우선적으로 PSM에서의 효모 성장 시 좋은 영양상태에서 잘 자란 효모를 SM에 접종하였을 시에 영양부족상태에서 자란 효모에 비해 포자형성이 좋아진 다[11]는 사실을 뒷받침한다고 여겨진다.

여러 다른 온도에서 주박과 물의 혼합액을 24시간 동안 pre-incubation하였고, 원심분리한 후에 그 상등액을 PSM으로 하여 세포배양을 하고 그 세포 배양액을 SM에 접종하여 3일, 4일 후에 각각 세포 수와 포자 형성율을 측정하였다 (Table 2). Pre-incubation동안 초기 주박액의 0.5%의 잔당 (data not shown)이 여러 온도에서 24시간 후에는 3.4~6.9%의 당으로 증가한 것으로 보아 주박과 물의 혼합물의 pre-incubation동안 주박 내의 전분이 역시 주박 내에 잔존하는 누룩의 glucoamylase에 의해 분해가 이루어진 것으로 사료된다. 이러한 당 함량은 효모를 배양 할 수 있는 충분한 당의 양으로 여겨진다. 여기에서 보면 주박의 전 처리 온도가 48°C와 51°C의 경우가 PSM에서 비교적 많은 세포성장수를

나타내었고, SM에서는 51°C와 54°C에서 4일 배양 후 가장 많은 세포 성장수를 나타내었는데, 결국 51°C에서 가장 높은 38.3%의 포자 형성율로서 0.49×10^8 /ml의 최대자낭수를 생산하였다.

PSM에서의 배양시간의 포자형성에 대한 영향

주박을 51°C에서 24시간 전 처리한 후 그 원심 분리 상등액을 PSM으로 사용하고, 이 PSM에서의 배양시간에 따른 SM에서의 포자 형성율 및 자낭 형성율을 조사한 결과를 Table 3에 나타내었다. PSM에서의 배양된 세포 수는 배양 시간이 경과함에 따라 점점 증가하였고 60시간 후 84시간에 이르는 배양시간에서는 완만한 세포 성장률의 증가를 보였다.

SM 배지에서는 36시간동안 PSM에서 배양 후 SM에 접종한 경우에서 가장 높은 포자형성율을 보였으나, 48시간 후에 세포성장수가 36시간보다 더 많아 48시간 후에 0.72×10^8 /ml의 최대 자낭형성수를 나타내었다. 특히 36시간 배양시간에서 포자형성이 가장 높았던 사실은 PSM에서 early-stationary phase의 culture를 SM에 옮겼을 때 가장 포자형성을 잘 하였다는 보고[2, 14]와 근접하는 것으로 여겨진다.

Table 1, 2, 3의 결과는 주박과 물의 혼합물의 원심 분리 상등액을 PSM으로 사용하기 위한 예비실험이 되었고, 51°C 그리고 24시간의 pre-incubation 온도와 전 처리 과정을 거친 주박액을 PSM으로 하여 48시간 동안 효모를 배양하는 것이 SM에서 가장 많은 수의 자낭을 형성함을 알았다.

영양원을 첨가한 SM배지에서의 포자생산

Table 4는 주박 PSM배지에서 자란 세포를 여러 다른 영양원이 포함된 SM에 접종하여 포자를 형성시킨 결과를 나타낸 것이다. 4일간 배양 후의 형성된 세포 수 및 자낭 수

Table 2. Effect of pre-incubation temperature of rice wine cake on the sporulation.

Pre-incubation Temperature (°C)	After preincubation ^a		PSM ^b			SM ^c								
						3 days			4 days					
	Sugar content ^d (%)	pH	Cell No. ($\times 10^8$ /ml)	Residual sugar (%)	pH	Cell No. ($\times 10^8$ /ml)	Residual sugar (%)	pH	Spo-rate (%)	Ascus No. ($\times 10^8$ /ml)	Cell No. ($\times 10^8$ /ml)	pH	Spo-rate (%)	Ascus No. ($\times 10^8$ /ml)
42	6.9	3.95	1.83	0.50	3.6	0.23	0.05	6.0	0.0	0.00	0.82	7.5	0.0	0.00
45	ND ^e	4.51	1.85	0.62	4.2	0.21	0.05	6.0	0.0	0.00	0.10	8.8	0.0	0.00
48	5.8	4.50	2.45	0.58	4.3	0.73	0.06	6.7	0.0	0.00	1.04	8.6	0.0	0.00
51	4.7	4.60	2.31	0.43	4.5	1.12	0.05	8.9	20.5	0.23	1.27	9.3	38.3	0.49
54	6.8	4.83	1.86	0.51	4.3	1.23	0.06	9.1	26.0	0.32	1.29	9.4	33.0	0.43
55	3.6	5.26	1.10	0.38	4.9	0.35	0.04	8.4	0.0	0.00	0.29	8.8	18.2	0.05
65	3.4	5.27	1.30	0.28	4.6	0.68	0.03	8.2	0.0	0.00	0.62	8.7	17.3	0.11

^a Rice wine cake was mixed with water and the mixture was incubated at various temperature for 24 hr in a rotary shaking waterbath
^b The PSM was the supernatant after the centrifugation of the pre-incubation. One loopful of yeast FR was inoculated into 100 ml of PSM and incubated at 30°C for 2 days in a rotary shaking incubator.
^c The SM was inoculated with 10% PSM culture and incubated at 25°C for 3 and 4 days in a rotary shaking incubator.
^d The initial sugar content in the mixture of RWC and water was 0.5%.
^e ND, not determined.

Table 3. Effect of culture time in presporulation medium on the sporulation.

PSM ^a				SM ^b							
Culture time (hr)	Cell No. ($\times 10^8$ /ml)	Residual sugar (%)	pH	3 days				4 days			
				Cell No. ($\times 10^8$ /ml)	pH	Spo-rate (%)	Ascus No. ($\times 10^8$ /ml)	Cell No. ($\times 10^8$ /ml)	pH	Spo-rate (%)	Ascus No. ($\times 10^8$ /ml)
12	2.9	0.24	4.20	1.40	8.94	30	0.55	1.23	9.22	34	0.42
24	3.4	0.24	4.34	1.14	8.99	25	0.29	1.05	9.28	44	0.46
36	4.6	0.24	4.22	1.46	9.01	21	0.31	1.22	9.24	56	0.68
48	5.1	0.23	4.13	1.49	9.08	20	0.30	1.45	9.39	50	0.72
60	6.1	0.25	4.05	1.90	9.11	30	0.57	1.41	9.31	50	0.71
72	6.5	0.24	4.00	1.32	9.18	34	0.45	1.17	9.24	48	0.56
84	6.7	0.25	4.00	0.91	9.00	37	0.34	0.89	9.25	46	0.41

^a Rice wine cake was mixed with water and the mixture was incubated at 51°C for 24 hr and the supernatant obtained after the centrifugation of the mixture was used as PSM.

^b The SM was inoculated with 10% PSM culture and incubated at 25°C for 3 and 4 days in a rotary shaking incubator.

Table 4. Effect of various nutrients added into sporulation medium on the sporulation.^{a, b}

Nutrient added (%)	3 days				4 days			
	Cell No. ($\times 10^8$ /ml)	pH	Sporate (%)	Ascus No. ($\times 10^8$ /ml)	Cell No. ($\times 10^8$ /ml)	pH	Sporate (%)	Ascus No. ($\times 10^8$ /ml)
None	1.42	9.17	30	0.43	1.37	9.35	56	0.77
Peptone (0.25)	1.63	9.34	47	0.77	1.58	9.50	57	0.90
Corn steep liguor (0.25)	1.92	9.42	46	0.88	1.75	9.59	60	1.05
Koji ^c (1.40)	1.59	9.32	58	0.92	1.51	9.44	70	1.06
Koji (4.20)	2.29	8.75	2	0.07	2.89	8.85	10	0.29

^a Rice wine cake was mixed with water and the mixture was incubated at 51°C for 24 hr and the supernatant obtained after the centrifugation of the mixture was used as PSM. One loopful of yeast FR inoculated into 100 ml of PSM and incubated at 30°C for 2 days in a rotary shaking incubator

^b The SM was added with various nitrogen sources, inoculated with 10% PSM culture and incubated at 25°C for 3 and 4 days in a rotary shaking incubator.

^c The koji is the wheat-coat powder fermented by *Aspergillus shirousami* secreting glucoamylase and proteinase.

는 영양원을 첨가하지 않았던 대조구(none)와 비교하여 볼 때 영양원을 첨가한 SM의 경우가 높게 나타났다. 특히 1.4% 국(koji) 첨가의 경우 대조구의 56%보다 70%로서 현저한 포자형성율의 증가를 보였다. 그러나 오히려 4.2%의 높은 국 첨가량은 포자낭의 형성율이 10%로서 전혀 영양원을 첨가하지 않은 대조구의 56%보다도 현저히 적은 포자 형성율을 보였다. 0.25%의 corn steep liquor와 1.4% 국 첨가 시에 포자 형성율은 60%, 70%로 차이를 보이지만 각각 1.05×10^8 /ml, 1.06×10^8 /ml의 거의 같은 자낭 수를 관찰 할 수 있었다. 한편 3일째와 4일째의 세포 수를 비교해볼 때 전반적으로 약간의 세포수가 감소되었으나, 4.2% 국 첨가의 경우는 오히려 4일 째에 세포수가 증가하였는데, 이는 SM내에서 영양소가 과다하여 세포 수는 증가하였으나, 이 세포수가 증가하는 영양소 과다의 조건에서는 포자형성은 감소되었다고 해석된다. SM에 영양원의 첨가는 포자의 생성에 영향을 끼치는 것을 실험으로 입증하였고, 적정농도의 영양원 이상의 첨가 시에는 포자형성이 영양원의 고갈을 필요로 하

기 때문에[7, 11] 오히려 포자형성에 불리하다는 것을 알 수 있었다.

SM배지의 초기 pH 변화에 따른 포자생산의 변화

주박 PSM배지에서의 2일간의 세포 배양 후에 SM배지로의 전환시에 SM의 초기 pH가 포자 형성에 미치는 영향을 조사하였고, 그 결과를 Table 5에 나타내었다.

여기에서 보면 세포성장수는 초기 pH 7일 때가 가장 많았고, 포자 형성율은 초기 pH 9일 때가 가장 높았다. 최종 형성된 자낭 수는 초기 pH 7일 때 4일 배양 후 0.44×10^8 /ml로서 가장 높은 수치를 보였다. 초기 pH가 5일 경우에는 가장 낮은 세포성장수를 보였을 뿐 아니라 포자의 형성도 전혀 이루어지지 않았다. 또 한 가지 흥미로운 사실은 초기 pH 5일 때 4일 후 SM의 최종 pH가 8.78이었으며 포자는 전혀 형성되지 않았고, 초기 pH 7, 8, 9, 11일 때 4일후 SM의 최종 pH가 초기 pH와 관계없이 모두 9.25~9.32이었고, 이 때는 모두 포자가 형성되었다는 점이다. 따라서 초기 pH는 물

Table 5. Effect of initial pH in sporulation medium on the sporulation.^a

Initial pH of SM ^b	3 days				4 days			
	Cell No. ($\times 10^8$ /ml)	pH	Spo-rate (%)	Ascus No. ($\times 10^8$ /ml)	Cell No. ($\times 10^8$ /ml)	pH	Spo-rate (%)	Ascus No. ($\times 10^8$ /ml)
5	0.88	7.03	0	0.00	0.86	8.78	0	0.00
7	1.38	8.94	20	0.28	1.26	9.25	35	0.44
8	1.24	9.04	38	0.47	1.02	9.31	40	0.41
9	1.07	9.05	38	0.41	0.70	9.32	44	0.31
11	0.91	9.08	25	0.23	0.87	9.28	32	0.28

^a One loopful of FR strain was inoculated into 100 ml of PSM and incubated at 30°C for 2 days in a rotary shaking incubator.

^b The SM adjusted to various initial pH using 1 N NaOH was inoculated with 10% PSM culture and incubated at 25°C for 3 and 4 days in a rotary shaking incubator.

Table 6. Effect of the concentration of rice wine cake in presporulation medium on the cell growth and sporulation.

PSM ^a	SM ^b								
	Concentration of RWC (%)	3 days				4 days			
Cell No. ($\times 10^8$ /ml)		Cell No. ($\times 10^8$ /ml)	pH	Spo-rate (%)	Ascus No. ($\times 10^8$ /ml)	Cell No. ($\times 10^8$ /ml)	pH	Spo-rate (%)	Ascus No. ($\times 10^8$ /ml)
0.25	1.00	0.74	9.36	27.0	0.20	0.78	9.47	48.0	0.37
0.50	1.55	0.83	9.43	43.0	0.36	0.90	9.52	67.0	0.60
1.00	2.15	1.00	9.49	51.0	0.53	1.13	9.57	72.0	0.81
2.00	5.35	2.30	9.36	38.0	0.87	2.35	9.49	54.0	1.27

^a One loopful of yeast FR was inoculated into 100 ml of PSM containing 1% brown sugar and various concentrations of rice wine cake and incubated at 30°C for 2 days in a rotary shaking incubator.

^b The SM (100 ml) containing 1% potassium acetate and 0.5% rice wine cake was inoculated with 10% PSM culture and incubated at 25°C for 3 and 4 days in a rotary shaking incubator.

론 최종 pH도 매우 중요한 것으로 생각할 수 있다.

포자 형성동안에는 배지의 pH가 중성에서 약 pH 9로 특징적으로 상승한다고 한다. 일반적으로 포자형성을 잘 하기 위해서는 alkaline 조건이 필요하다고 알려져 있다[6]. 포자를 형성하는 세포는 호흡에 의해 acetate를 동화하고 CO₂를 생산하며[4], 이 CO₂는 pH 7에서 9사이에서 bicarbonate ion(HCO₃⁻)으로 축적된다[6]. Ohkuni 등[13]은 세포가 acetate를 호흡하고 CO₂를 발생하며 배지를 alkali화하여 세포증식을 중단시키고 감수분열과 포자형성을 촉진시키며, 이때 0.8~1.0 mM의 bicarbonate가 signalling molecule로 작용한다고 하였다. 한편, pH 5의 상태에서는 bicarbonate가 산성화에 의해 제거되고 이러한 포자형성 촉진효과는 없어진다고 하였다[13].

전 처리하지 않은 주박 첨가의 포자형성에 대한 영향

앞에서 주박과 물의 혼합물을 pre-incubation하여 효모의 성장 배지로서 충분히 사용될 수 있음을 실험적으로 입증하였으나, 주박의 전 처리와 주박액의 원심분리 또는 여과 등에 걸리는 시간과 공정을 간소화하기 위하여 주박을 전 처리하지 않고 직접 배지에 영양원으로서 첨가하여 포자형성을 하기 위한 실험을 수행하였다. 예비실험 결과 SM에 0.25-

2.0%의 전 처리하지 않은 주박을 첨가하여 포자형성을 관찰한 결과 0.5%의 주박 첨가 시 66.7%로서 포자 형성율이 가장 좋았다(data not shown). 한편 PSM은 1% 갈색설탕을 탄소 원으로 하여 여러 농도의 주박을 첨가하였고, SM은 1% potassium acetate와 0.5%의 주박으로 제조하였는데, 이들을 사용하여 얻어진 포자형성 실험 결과를 Table 6에 나타내었다. 여기에서 배양된 세포의 수에 있어서는 2.0%의 주박을 PSM에 첨가하였을 때 가장 많은 세포수인 5.35×10^8 /ml가 측정되었다. SM 배지로의 전이 후 4일째의 포자 형성율은 1.0% 주박을 첨가한 PSM배지의 경우에서 72.0%로 가장 높게 나타났으나, PSM에 2.0%의 주박 첨가 시 4일째에 세포수가 2.35×10^8 /ml로 가장 높아져 54.0%의 낮은 포자 형성율에도 불구하고 가장 많은 세포수로 인하여 최종 포자농수는 2.0% 주박 첨가의 경우가 1.27×10^8 /ml로 가장 많은 포자를 생산하였다.

요 약

쌀 양조 후 남은 고체찌꺼기인 주박을 사용하여 *Saccharomyces* 효모 포자의 대량생산을 위하여 주박의 최적 전 처리과정, 최적 배지조성과 배양조건을 조사하였다.

포자형성을 위하여서는 주박으로 제조한 전포자형성배지 (PSM)에서 효모를 배양한 후 1% potassium acetate로 구성된 포자형성배지(SM)에 10%를 재접종한 후 25°C에서 4일간 포자형성을 시켰다. 주박과 물을 1 : 2로 혼합한 후 51°C에서 24시간 preincubation한 후 그 원심분리 상등액을 PSM으로 사용하여 48시간 배양하고 이를 다시 SM에 접종하여 4일 배양하였을 때 최대 포자 자낭 수 0.72×10^8 /ml를 얻었다. SM배지에 1.4% 밀기울 국(koji)을 영양원으로 첨가하였을 때 형성된 자낭수는 1.06×10^8 /ml로 증가하였다. 초기 SM pH가 5에서는 포자가 형성되지 않았으며, pH 7~11에서 포자가 형성되었다. 한편 주박의 전 처리에 소요되는 시간과 노력을 절감하기 위하여, 전 처리 하지 않은 주박을 직접 사용하여 포자형성을 시켜보았는데, 1% 갈색설탕을 함유하는 PSM에 2% 그리고 SM에 0.5%의 전 처리 하지 않은 주박을 각각 첨가하였을 때, 최대 포자 자낭수 1.27×10^8 /ml를 얻었다.

감사의 글

본 연구는 제6차 수원대학교 산학연 공동기술개발 지역진 소사업사업의 일환으로 산업자원부, 경기도, (주)국순당의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다. 본 논문의 교정에 협조하여 주신 (주)국순당 연구소의 손순기 차장님께 감사드립니다.

REFERENCES

1. Bernfeld, P. 1955. Amylases α and β . *Methods Enzymol.* **1**: 147-158.
2. Codon, A. C., J. M. Gasint-Rairez, and T. Benitez. 1995. Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* Bakers yeast. *Appl. Environ. Micobiol.* **61**: 630-638.
3. Decaudin M, and J. L. Tholozan. 1996. A comparative study

- on the conditions of growth and sporulation of three strains of *Clostridium perfringens* type A. *Can. J. Microbiol.* **42**: 298-304.
4. Esposito, M. S., R. E. Esposito, M. Arnaud, and H. O. Halvorson. 1969. Acetate utilization and macromolecular synthesis during sporulation of yeast. *J. Bacteriol.* **100**: 180-186.
5. Fast D. 1973. Sporulation synchrony of *Sacchroyces cerevisiae* grown in various carbon sources. *J. Bacteriol.* **116**: 925-30.
6. Fowell, R. R. 1969. Sporulation and hybridization of yeasts. In A. H. Rose and J. S. Harrison(eds.), *The yeasts*, vol. **1**. pp. 303-383. Academic press, New York.
7. Freese, E. B., M. I. Chu, and E. Freese. 1982. Initiation of yeast sporulation by partial carbon, nitrogen or phosphate deprivation. *J. Bacteriol.* **149**: 840-851.
8. Gancedo, J. M. and C. Gancedo. 1986. Catabolite repression mutants of yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 179-187.
9. Herrera, T., W. H. Peterson., E. J. Cooper, and H. J. Pepler. 1956. Loss of cell constituents on reconstruction of active dry yeast. *Arch. Biochem. Biophy.* **63**: 131-143.
10. Kim, K. and J. Y. Kim. 1999. Yeast cell cultivation to produce active dry yeast with improved viability. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**: 561-565.
11. Miller, J. J. 1989. Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. p. 489-550. In A. H. Rose and J. S. Harrison(eds.), *The yeasts*, vol. **3**. Acedemic press, New York.
12. Murata, K. 1993. Use of microbial spores as a biocatalyst. *Crit. Rev. Biotechnol.* **13**: 173-193.
13. Ohkuni, K., M. Hayashi, and I. Yamashita. 1998. Bicarbonate-mediated social communication stimulates meiosis and sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 623-631.
14. Treinin, M. and G. Simchen. 1993. Mitochondrial activity is required for the expression of *IME1*, a regulator of meiosis in yeast. *Curr. Genet.* **23**: 223-227.
15. Yonemoto, Y., T. Yamashita, M. Muraji, and W. Tatebe. 1993. Resistance of yeast and bacterial spores to high voltage electric pulses. *J. Ferment. Bioeng.* **75**: 99-102.

(Received Mar. 18, 2004/Accepted June 3, 2004)