

전분분해활성과 알코올 발효능을 보유한 효모의 육종

주민노 · 홍성욱 · 김관태¹ · 염성관¹ · 김계원¹ · 정건섭*

연세대학교 생명과학기술학부, ¹(주)국순당

Breeding of Yeast Strain with Starch Utilizing and Alcohol Fermenting Ability by Protoplast Fusion. Ju, Min No, Sung Wook Hong, Kwan Tae Kim¹, Sung Kwan Yum¹, Gye Won Kim¹, and Kun Sub Chung*.
Division of Biological Science & Technology, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea, ¹Kooksoondang Brewery Co. Ltd., Heongsung 225-831, Korea – The fusants which contain starch utilizing ability and alcohol fermenting ability were developed by protoplast fusion of *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1 and *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804. *Saccharomyces cerevisiae* KH-12 was obtained by haploid induction from *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1. The auxotrophic mutants of yeast were obtained by using an ethylmethane sulfonate (EMS). The frequency of protoplast formation in *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1 (Met⁻) and *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804 (Trp⁻) were 90.5% and 97.7%, respectively. The frequency of fusant formation was 1.79×10^{-4} for the regenerated protoplast and the 1,000 fusants were obtained. Fusant FA 776 was selected as a potential yeast which contain an alcohol fermenting ability in the starch medium. The genetic stability was 4.64% for 10 passages of generation. Fusant FA 776 produced 13 mg/ml of alcohol in 24% starch medium and showed 1.86-fold higher alcohol fermenting ability than *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804.

Key words: Starch utilizing, alcohol fermenting, protoplast fusion

서 론

Saccharomyces 속에 속하는 효모들은 매우 유용한 알코올 발효균주로 이용되어 왔으며, 단백질과 비타민을 풍부하게 함유하고 있기 때문에 약용, 식용 및 사료용으로 널리 사용되고 있다[1]. 효모는 세포막을 투과하여 세포 안으로 흡수된 영양성분을 이용하는 단세포생물로서 효모의 세포막은 전분이나 단백질과 같은 고분자물질은 투과시키지 못하기 때문에 포도당과 같은 단당류나 아미노산, 암모니아와 같은 저분자 물질로의 전환을 필요로 한다.

전분질인 곡류를 기질로 이용하는 전통주 발효공정에서는 누룩을 첨가하는 당화공정이 반드시 필요하다. 그러나 누룩의 생산 설비와 비용문제, 그리고 누룩취로 인하여 제품의 기호성이 낮아지는 단점이 있다.

원형질체 융합방법은 산업적으로 유용한 실용균주의 육종이 가능하고 생물학 및 분자생물학 분야에 중요한 연구방법으로 유전자 재조합 방법보다 훨씬 빠르고 많은 유전자를 도입할 수 있기 때문에, 알코올 발효와 같이 많은 유전자가 관여하는 대사계의 개량에 유리한 방법이다. 또한 원형질체 융합으로 육종한 균주는 genetically modified organism

(GMO)의 법적규제를 받지 않고 사용이 가능하므로 실용효모의 육종에 적합하다고 보고된 바 있다[12].

지금까지 전통발효주에 관한 연구로는 미생물[9, 11] 및 효소[15, 16], 성분변화[10], 약재를 첨가한 발효주의 품질평가[6], 누룩에 의한 전통주의 품질과 성분변화[13, 14], 전통주의 기능성[5, 7] 등이 보고되었고 이는 전통 발효주의 과학화에 기여해 왔다. 그러나, 현재까지 전통주 발효에 원형질체 융합방법을 이용하여 전분분해활성과 알코올 발효능을 동시에 보유하는 효모융합체를 개발하고 이를 응용한 산업화는 아직 되어있지 않다. 따라서, 본 연구에서는 알코올 발효능이 우수한 효모와 전분분해능이 우수한 효모를 원형질체 융합방법을 이용하여 새로운 효모 융합체를 개발하고 그 중에서 두 가지 특성이 모두 우수한 융합체를 선발하여 관능적인 특성 변화 및 누룩대체 효과 가능성 등을 검토하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용된 전분분해능이 우수한 *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804 균주는 한국유전자은행에서 분양받았고, 알코올 발효능이 우수한 *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1 균주는 (주)국순당에서 분양받아 사용하였다.

*Corresponding author

Tel: 82-33-760-2252, Fax: 82-33-760-2186

E-mail: kschung@yonsei.ac.kr

사용배지 및 균주배양

효모의 성장배지로 사용한 YPD 배지는 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) dextrose로 제조하였다. 전분분해능 측정을 위한 YPS 배지는 YPD 배지에서 dextrose를 제거하고 2% (w/v) soluble starch를 첨가하여 제조하였다. 알코올 발효능 측정을 위한 YPD24 배지는 dextrose 함량을 24% (w/v)로 제조하였다.

효모의 단수체 유도에 사용한 presporulation 배지는 10% (w/v) dextrose, 0.3% (w/v) peptone, 0.8% (w/v) yeast extract로 제조하였고, sporulation 배지는 1% (w/v) potassium acetate, 0.5% (w/v) dextrose, 0.1% (w/v) yeast extract로 제조하였다[3].

영양요구성 변이주 형성 확인을 위해 사용한 SD 배지는 0.67% (w/v) yeast nitrogen base w/o amino acid, 2% (w/v) dextrose로 이루어진 최소배지에 20종의 amino acid를 각각 첨가하여 제조하였다.

원형질체 재생 배지는 YPD 배지에 삼투안정제로 1.2 M sorbitol, 3% (w/v) agar를 첨가하여 사용하였다. 균주배양은 30°C incubator(Vision scientific co. Ltd., Korea)에서 48시간동안 배양한 후, 실험에 사용하였다.

전분분해능 측정

전분분해능 측정을 위한 반응 혼합물은 0.05 M acetate buffer(pH 5.0) 50 mL에 150 mL의 0.5% (w/v) soluble starch, 배양상등액 50 mL를 조효소액으로 사용하였다. 이 혼합액을 30°C에서 30분간 반응시킨 후 Somogyi and Nelson 방법[17]을 통해 환원당을 측정하였다.

알코올 발효능 측정

알코올 발효능 측정은 YPD24 배지에서 2일간 배양한 배양상등액 100 mL를 이용하여 ethanol kit (Roche, German)를 이용하여 측정하였다.

효모의 단수체 유도

효모의 단수체 유도는 presporulation 배지에서 30°C, 1일간 배양한 후, sporulation 배지에서 30°C, 5일간 배양하였다. 형성된 포자는 원심분리하여 균체를 회수한 뒤, 6.7 mM Tris-HCl buffer(pH 7.8) 3 mL에 현탁한 뒤, 200 U/mL lyticase(L-4025, Sigma, USA)를 처리하여 1일간 방치하였다. 초음파 세포 파쇄기(Sonosmasher, Ulso Hitech Co., Korea)를 이용하여 포자를 분리하고 8 mg/mL streptomycin (S-9137, Sigma, USA)을 0.5 mL 첨가하여 1시간동안 방치하였다. 상등액을 취해 YPD plate에 도달한 후 sporulation 배지에 배양하여 포자 형성유무를 확인하였다.

영양요구성 변이주 제조

영양요구성 변이주 제조에 사용된 mutagenesis solution은

9.7 M ethylmethane sulfonate(220507, Sigma, USA) 0.3 mL 0.2 M phosphate buffer(pH 8.0) 9.2 mL 그리고 40% (w/v) glucose solution 0.5 mL로 제조하여 사용하였고, mutagenesis solution 0.2 mL에 6% (w/v) sodium thio-sulfate solution 9.8 mL을 첨가하여 반응을 중지하였다. 형성된 변이주의 영양요구성 marker 탐색은 amino acid pool을 이용하여 수행하였다[2].

원형질체 형성

효모를 0.05 M Tris-HCl(pH 7.5)로 세척한 다음, 0.05 M Tris-HCl buffer(pH 7.5)와 1.2 M sorbitol(T-1378, Sigma, USA)로 구성된 protoplast buffer에 현탁하였다. 1M 2-mercaptoethanol(M-3148, Sigma, USA) 0.2 mL을 첨가하여 30°C에서 15분동안 처리한 후 200 U/mL lyticase를 첨가하여 30°C에서 1시간동안 처리하였다. 원형질체 형성율은 Yamamura의 방법[19]을 사용하여 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{원형질체 형성율(\%)} = \frac{A(t_0) - A(t)}{A(t_0)}$$

A(t₀) : 초기 세포현탁액 흡광도 (A₅₇₀)

A(t) : 원형질체 형성후 흡광도 (A₅₇₀)

원형질체 융합 및 total DNA 함량측정

효모융합은 Wilson 등의 방법[18]을 기초로 하였다. 효모융합에 사용한 polyethylene glycol solution(PEG)은 polyethylene glycol 4,000(Yakuri, Japan)을 0.01 M CaCl₂와 1.2 M sorbitol이 함유되어 있는 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 용해시켜 40% (w/v) PEG solution으로 제조하여 사용하였다. 각 효모의 원형질체를 원심분리(1,000 × g, 3 min)하여 획득한 원형질체를 protoplast buffer에 3 × 10⁸ cell/mL 되도록 현탁하였다. 세포 현탁액을 1:1로 혼합한 후 원심분리(1,000 × g, 3 min)하여 상등액을 제거한 뒤, 침전물에 PEG solution을 1.5 mL 첨가하여 30°C, 30분간 방치하였다. 처리된 현탁액을 원심분리(1,000 × g, 3 min)하여 상등액을 제거하고 protoplast buffer로 세척한 후 희석하여 원형질체 재생배지에 도달한 뒤 colony 형성 유무를 확인하였고 융합 유무는 효모중의 total DNA 함량측정 비교를 통해 확인하였다. 융합체를 YPD 배지에서 배양한 후 0.5 N perchloric acid(244252, Sigma, USA) 10 mL에 현탁한 후 70°C, 20분간 2회 처리하여 DNA를 추출한 뒤 1% (w/v) diphenylamine (33149, Sigma, USA)과 2.75% (v/v) sulfuric acid가 함유되어 있는 diphenylamine solution에 의한 흡광도 값을 이용하여 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{DNA content (fg/cell)} = \frac{A_{600}}{S} \times D \times \frac{10^9}{\text{Cell No.}}$$

S: slope of standard curve

D: dilution rate

융합주의 유전적 안정성

융합주의 유전적 안정성을 조사하기 위해 YPD 액체배지에 접종하여 30°C, shaking incubator에서 150 rpm으로 진탕 배양하였다. 2일동안 배양한 것을 1세대로 하여 이 과정을 10세대 동안 반복하였다. 10세대의 배양액을 채취하여 적당한 배율로 희석한 후, YPD 고체배지와 SD 고체배지에 도말한 뒤, 각각의 고체배지에 나타난 colony수의 비율로 융합주의 유전적 안정성을 조사하였다.

$$\text{유전적 안정성(\%)} = \frac{\text{SD 고체배지에 나타난 colony 수}}{\text{YPD 고체배지에 나타난 colony 수}} \times 100$$

결과 및 고찰

단수체 분리

Sporulation 배지에서 배양한 후 단수체를 유도한 결과, malachite green으로 염색하였을 때, 포자는 대조염색과 비교하여 녹색으로 관찰되었다(Fig. 1). 알코올 발효능이 우수한 *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1의 경우, 이배체 상태로 관찰되었고 전분 분해능이 우수한 *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804의 경우, 단수체 상태인 것으로 관찰되었다. 따라서 효모의 단수체 유도는 *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1에서만 실시하였다. 단수체 유도 후, 총 13개의 colony를 선발하여 효모의 total DNA 함량을 비교한 결과는 Table 1에 나타난 것처럼 모균주인 *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1과 비교하였을 때 KH-12의 DNA 함량이 모균주의 절반 정도임을 확인할 수 있었다. 따라서 marker로 사용하기 위한 영양요구성 변이주 제조에는 분리된 단수체 KH-12를 사용하였다.

Genetic marker의 도입

원형질체 융합에 의해 생성된 융합체의 선별을 위해서는

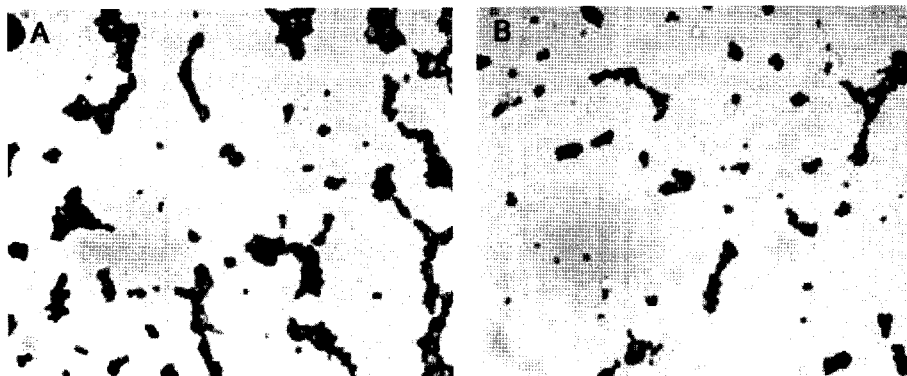


Fig. 1. Malachite green staining of selected yeasts on microscopy ($\times 1,000$). A. *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1, B. *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804.

Table 1. Contents of total DNA from inducing haploid yeasts.

| Strains | Optical density (600nm) | Viable cell (CFU/ml) | Content of DNA (fg/cell) |
|--------------------|-------------------------|----------------------|--------------------------|
| ^a KOY-1 | 0.031 | 3.19×10^8 | 48.59 |
| ^b KH-1 | 0.021 | 4.75×10^8 | 22.11 |
| ^b KH-2 | 0.021 | 4.20×10^8 | 25.24 |
| ^b KH-3 | 0.014 | 2.30×10^8 | 31.09 |
| ^b KH-4 | 0.021 | 2.70×10^8 | 37.96 |
| ^b KH-5 | 0.021 | 2.90×10^8 | 35.86 |
| ^b KH-6 | 0.019 | 2.40×10^8 | 39.58 |
| ^b KH-7 | 0.020 | 2.65×10^8 | 36.79 |
| ^b KH-8 | 0.026 | 3.35×10^8 | 38.51 |
| ^b KH-9 | 0.024 | 3.30×10^8 | 36.21 |
| ^b KH-10 | 0.024 | 3.75×10^8 | 32.53 |
| ^b KH-11 | 0.021 | 5.00×10^8 | 21.3 |
| ^b KH-12 | 0.019 | 4.70×10^8 | 19.68 |
| ^b KH-13 | 0.013 | 2.65×10^8 | 24.15 |

^a *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1 was obtained from Kooksoondang Brewery Co.

^b Haploid yeasts were induced from *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1 strain.

parental strain에 genetic marker의 도입이 선행되어야 한다. 전분분해능이 우수한 *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804 균주는 Trp의 영양요구성 marker가 있음을 확인하였고 알코올 발효능이 우수한 *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1 균주에서 단수체로 분리된 KH-12 균주는 영양요구성 marker를 보유하지 않아 KH-12 균주에 ethylemethane sulfonate (EMS)를 사용하여 genetic marker를 보유한 영양요구성 변이주를 제조하였다. EMS 처리는 90% 이상의 사멸율을 나타내는 구간인 120분간 처리하였다. 그 결과 7주의 영양요구성 변이주를 획득하였고, 이들은 Trp와 Met⁻로 확인되었다. *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804 균주는 Trp 영양요구성 marker가 있기 때문에 *Saccharomyces cerevisiae* KH-12 균주는 Met 영양요구성 marker가 있는 변이주를 사용하였다.

Table 2. Ratio of protoplast formation of selected yeasts.

| Strains | Before lyticase treatment (A ₅₇₀) | After lyticase treatment (A ₅₇₀) | Ratio of protoplast (%) |
|---|--|---|----------------------------|
| ^a <i>Saccharomyces diastaticus</i> KCTC 1804 | 0.136 | 0.003 | 97.7 |
| ^b <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KH-12 | 0.200 | 0.019 | 90.5 |

^a Obtained from Korean collection for type culture

^b Protoplast from *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1 strain

Yeasts were suspended in a protoplast buffer. 1M 2-mercaptoethanol was added, followed by incubation 30°C for 15 min. Then, 200 U/mL lyticase was added and incubated 30°C for 1h. Protoplasts were determined by UV spectrophotometer (A₅₇₀).

원형질체 형성

영양요구성 marker를 보유한 선발균주의 원형질체 형성율은 증류수 같은 삼투압이 매우 낮은 용액내에서는 원형질체가 용균된다는 사실에 근거한 Yamamura의 방법[19]을 사용하여 계산하였다. Kim[8]은 *Saccharomyces cerevisiae* 균주의 원형질체 형성율을 95%로 보고하였는데 본 실험에서는 *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804 균주의 원형질체 형성율은 97.7%로 원형질체 형성율이 높았고 *Saccharomyces cerevisiae* KH-12 균주의 원형질체 형성율은 90.5%로 확인되었다(Table 2). Calleja[4]는 효모마다 원형질체 형성율이 다른 이유를 일반적으로 양조 효모의 세포는 glucan 40%, mannan 40%, protein 12%, lipid 6% 그리고 chitin과 phosphate로 구성되어 있는데 효모마다 세포벽의 구성성분이 약간씩 달라지기 때문이라고 보고하였다.

원형질체 융합

원형질체 융합율은 삼투안정제가 포함된 SD배지에서 생성된 colony 수를 삼투안정제가 포함된 YPD 배지에서 생성된 colony 수와의 비율로 계산하였고, 그 결과 원형질체 융합율은 1.79×10^{-4} 로 관찰되었다(Table 3). 이 결과는 Kim[18]이 보고한 6×10^{-6} 보다 더 높은 원형질체 융합율을 나타내었다.

원형질체 융합과정을 통해 총 1,000주의 융합체를 획득하였고, 획득한 융합체의 전분 분해능을 모균주인 *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804 균주와 비교하여 전분분해능이 모균주와 비슷하거나 혹은 높아진 효모 10주를 1차 선발하였다(data not shown). 1차 선발된 융합체 10주의 알코올 발효능을 각각의 모균주인 *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804 균주, *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1 균주와 비교하여 최종적으로 전분배지에서의 알코올 생성능이 가장 우

Table 3. Fusion frequency.

| | |
|--|--------------------------|
| Number of colony on ^a SD plate | 1.4×10^1 CFU/ml |
| Number of colony on ^b YPD plate | 7.8×10^4 CFU/ml |
| Fusion frequency | 1.79×10^{-4} |

^a SD: yeast nitrogen base w/o amino acid-dextrose-20 amino acid medium

^b YPD: yeast extract-peptone-dextrose medium.

수한 융합체인 FA 776을 선발하였다(Fig. 2).

효모융합체의 유전적 안정성 및 특성

효모 융합체를 YPD 배지에서 2일간 배양한 것을 1세대로 하여 10세대 동안 반복한 뒤, YPD 고체배지와 SD 고체배지에 각각 도말하여 나타난 colony 수의 비율로써 융합체의 유전적 안정성을 조사한 결과, 선발된 융합체 FA 776은 10세대 계대 배양시 4.64%의 비율로 revertant로 복귀하여 비교적 유전적 안정성이 유지되는 것으로 사료되었다(Table 4).

효모의 total DNA 함량의 비교를 통해 두 효모간 융합 유무를 관찰하였다. 선발융합체의 colony를 취하여 total DNA 함량을 비교한 결과, *Saccharomyces cerevisiae* 균주로부터 분리된 단수체 효모 KH-12는 26.56 fg/cell, *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804 균주는 25.40 fg/cell의 DNA 함량을 나타내었다. 이들을 사용해서 얻어진 융합체인 FA 776의 DNA 함량은 42.67 fg/cell로 나타났으며 이를 통하여 세포 융합의 유무를 관찰하였다(Table 5).

융합체의 발효실험

선발융합체의 알코올 발효능은 dextrose 기질로 제조한 YPD24 배지(Fig. 3), soluble starch 기질로 제조한 YPS24 배지(Fig. 4)에서 각각 조사하였다. 알코올 발효능이 우수한 모균주인 *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1 균주는 YPD24 배지에서 60시간 발효시 알코올 생성량은 17 mg/mL이었지만, YPS24 배지에서는 알코올 생성이 거의 일어나지 않았다. 따라서, 전분을 기질로 사용한 배지 내에서 *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1 균주를 이용한 알코올 발효는 불가능하다는 사실을 확인하였다. 전분분해능이 우수한 모균주인 *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804 균주는 YPD24 배지에서 60시간 발효시 알코올 생성량은 11 mg/mL이었고, YPS24 배지에서의 알코올 생성량은 7 mg/mL이었다. 이 결과는 *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804 균주가 dextrose를 기질로 사용한 배지에서의 알코올 생성량은 *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1 균주에 비해 떨어지지만, 전분을 기질로 사용한 배지에서는 *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1 균주와는 반대로 알코올 발효가 가능하다는 사실을

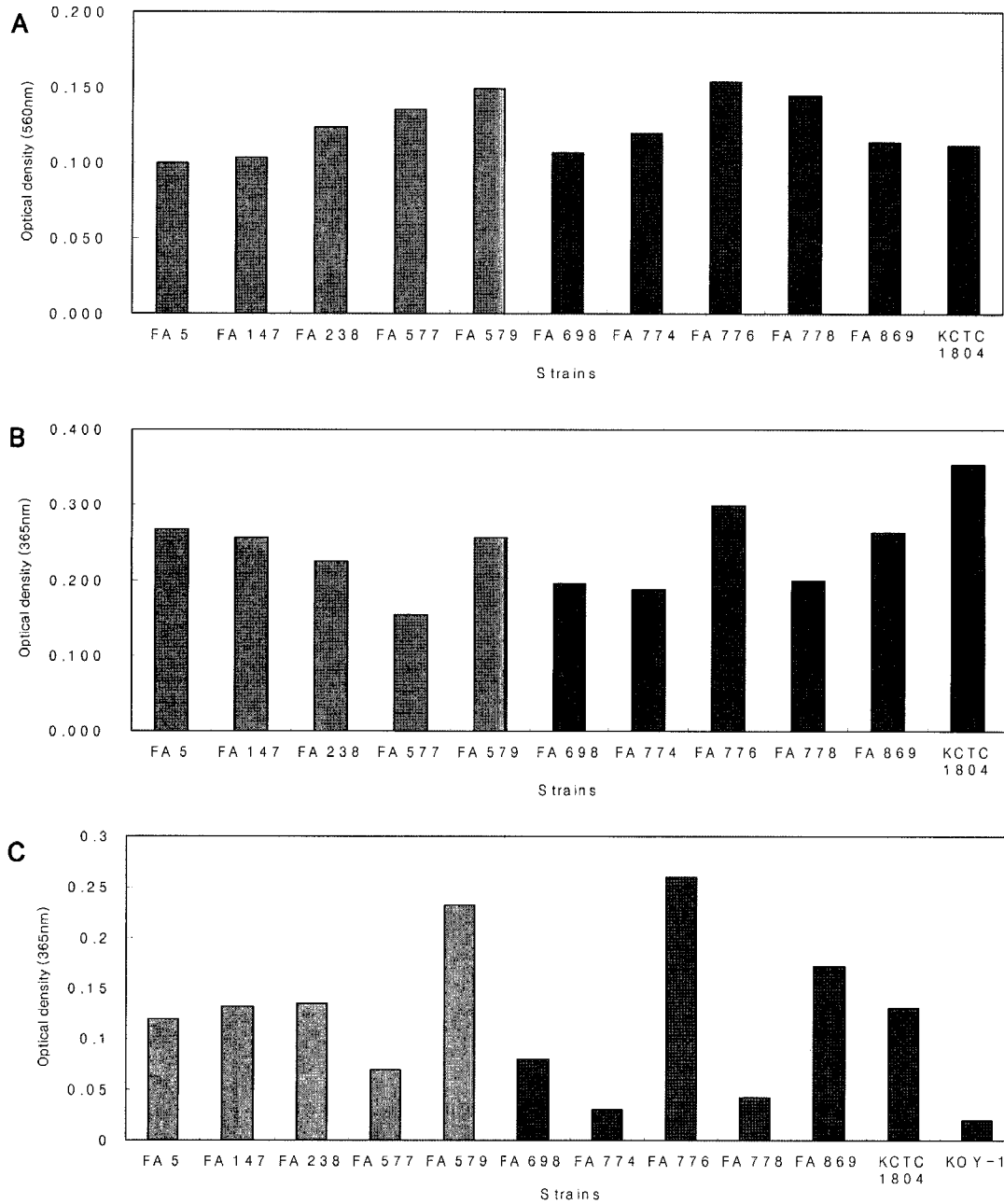


Fig. 2. Characteristics comparison of selected fusants. The supernatants of fusant cultures were used as a test solution for assay of starch utilization and alcohol content. A. Free glucose contents of selected fusants in the YPD medium, B. Alcohol contents of selected fusants in the YPD24 medium, C. Alcohol contents of selected fusants in the YPS24 medium.

Table 4. Genetic stability of fusant.

| Strain | Colony | | Revertant (%) |
|--------|-------------------------|------------------------|---------------|
| | ^a YPD medium | ^b SD medium | |
| FA 776 | 646 | 616 | 4.64 |

^a YPD: yeast extract-peptone-dextrose medium

^b SD: yeast nitrogen base w/o amino acid-dextrose-20 amino acid medium.

Table 5. Contents of total DNA from selected fusant and mother strains.

| Strains | Optical density (600 nm) | Cell/ml | Content of DNA (fg/cell) |
|-----------|--------------------------|--------------------|--------------------------|
| FA 776 | 0.032 | 3.75×10^8 | 42.67 |
| KCTC 1804 | 0.016 | 3.15×10^8 | 25.40 |
| KH-12 | 0.017 | 3.20×10^8 | 26.56 |
| KOY-1 | 0.029 | 3.01×10^8 | 48.17 |

The fusant and mother strains were cultured in the YPD medium at 30°C for 48 h. Optical density was determined by UV spectrophotometer (A_{600}).

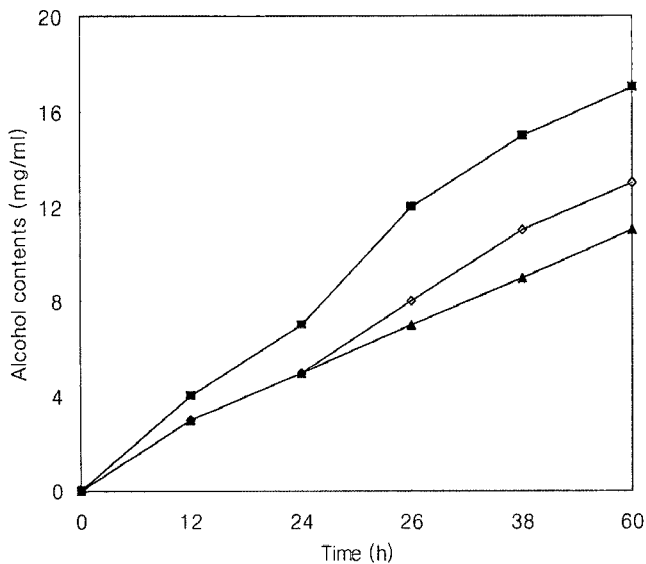


Fig. 3. Contents of alcohol of fusant and mother strains in dextrose medium. Yeasts were cultured in YPD24 medium at 30°C for 60 h. Alcohol contents were measured at 340 nm by ethanol kit. ■; *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1, ▲; *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804, ◇; Fusant FA 776.

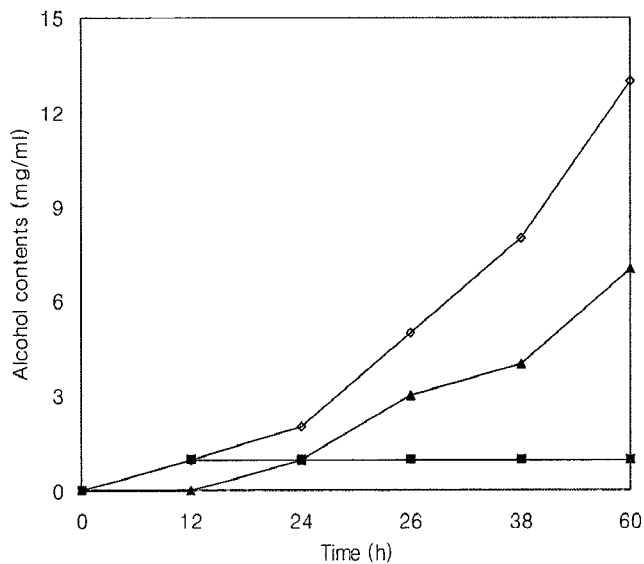


Fig. 4. Contents of alcohol of fusant and mother strains in soluble starch medium. Yeasts were cultured in YPS24 medium at 30°C for 60 h. Alcohol contents were measured at 340 nm by ethanol kit. ■; *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1, ▲; *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804, ◇; Fusant FA 776.

확인할 수 있었다.

효모융합체 FA 776의 경우 dextrose를 기질로 사용한 YPD24 배지에서 60시간 발효하였을 때의 알코올 생성량은 13 mg/mL, soluble starch를 기질로 사용한 YPS24 배지에서의 알코올 생성량은 13 mg/mL로, dextrose를 기질로 사용한 배지에서의 알코올 생성량이 *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1 균주와 유사하였고, 전분을 기질로 사용한 배지에서

Table 6. Contents of alcohol of fusant and mother strains in different medium.

| Strains | Alcohol content (mg/mL) | |
|--|---------------------------|---------------------------|
| | ^a YPD24 medium | ^b YPS24 medium |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KOY-1 | 17 | 1 |
| <i>Saccharomyces diastaticus</i> KCTC 1804 | 11 | 7 |
| Fusant FA 776 | 13 | 13 |

Yeasts were cultured in the YPD24 and YPS24 medium at 30°C for 60h, respectively. Alcohol contents were measured at 340nm by ethanol kit

^a YPD24: yeast extract-peptone-24% dextrose medium

^b YPS24: yeast extract-peptone-24% soluble starch medium.

의 알코올 생성량은 *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804 균주와 비교하였을 때 1.86배 향상된 알코올 발효능을 보유하는 것으로 확인되었다(Table 6). 따라서 전분분해 활성을 가진 알코올발효 효모인 FA 776은 향후 전통주 발효 공정에서 누룩대체 효과 및 제품의 관능적인 특성 변화에 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 보인다.

요 약

Saccharomyces diastaticus KCTC 1804 균주와 *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1 균주를 이용하여 전분분해활성과 알코올 발효능을 동시에 가지는 효모융합체를 개발하였다. *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1 균주의 단수체 유도를 통하여 *Saccharomyces cerevisiae* KH-12 균주를 획득하였다. EMS를 사용한 돌연변이 유발을 통하여 *Saccharomyces cerevisiae* KH-12 균주의 Met 영양요구성 변이주를 획득하였다. Lyticase 처리로 *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1 (Met⁻), *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804(Trp⁻) 균주의 원형질체 형성률은 각각 90.5%, 97.7%로 관찰되었다. 원형질체 융합은 polyethylene glycol 4,000을 이용하여 실시하였고, 이때 원형질체 융합율은 1.79×10^{-4} 으로 관찰되었다. 원형질체융합과정을 통해 총 1,000주의 융합체를 획득하였고, 획득한 융합체의 전분분해능과 알코올발효능을 비교하여 최종적으로 전분배지 YPS24에서 알코올생성능이 가장 우수한 효모융합체인 FA 776을 최종 선발하였다. 최종 선발된 효모융합체 FA 776은 10세대 계대배양 후의 revertent 복귀율이 4.64%로 유전적 안정성을 확인하였으며, 효모융합체의 total DNA 함량을 비교한 결과, *Saccharomyces cerevisiae* 균주로부터 분리된 단수체 효모 KH-12는 26.56 fg/cell, *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804 균주는 25.40 fg/cell이었고, 이들을 사용해서 얻어진 융합체 FA 776의 DNA 함량은 42.67 fg/cell이었다. 전분배지 YPS24 배지에서 60시간 발효하였을 때 *Saccharomyces cerevisiae* KOY-1 균주는 알코올 생성하지 못하였지만 효모융합체 FA 776

은 13 mg/mL의 알코올을 생성하였다. 이는 전분이용성 효모인 *Saccharomyces diastaticus* KCTC 1804 균주에 비해 1.86배나 향상된 알코올 발효능을 나타냈다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부와 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업(RIS-06P-062)의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Anna, K. K. 1990. Yeast and Yeast-like Organisms, pp. 131-205. 1st ed. VCH Press, New York, U.S.A.
2. Amberg, D. C. 2005. Methods in yeast genetics. A cold spring harbor laboratory press. pp. 11-19.
3. Amberg, D. C. 2005. Methods in yeast genetics. A cold spring harbor laboratory press. pp. 143.
4. Calleja, G B. 1987. Cell aggregation. Academic press INC., pp. 180-183.
5. Jeong, J. W. 2006. Characterization of antioxidant property of Korean alcoholic liquors. *Food Engineering Progress*. **10**: 221-225.
6. Kim, J. H., S. C. Jeong, N. M. Kim, and J. S. Lee. 2003. Effect of indian millet *Koji* and legumes on the quality and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of Korean traditional rice wine. *Korean J. Food. Sci. Technol.* **35**: 733-737.
7. Kim, J. S., S. H. Ko, W. Y. Lee, and G. W. Kim. 2004. Cytotoxic effects of Korean rice-wine on cancer cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**: 812-817.
8. Kim, K. 2001. The use of respiratory-deficient mutation and heat inactivation for the selection of yeast protoplast fusants. *J. Natural Science*. The Univ. of Suwon Univ. **4**: 103-115.
9. Kim, K. K. 2003. Rice wine making by using yeasts from Korean traditional *Nuruk*. M.S. thesis Korea Univ.
10. Kuk, S. J. 2003. Studies on the preparation of traditional ginseng wine added with different pretreated ginseng. M.S. thesis Hankyng Univ.
11. Kim, T. W. 2001. Quality assessment of traditional wine by lumitester. M.S. thesis Kyng San Univ.
12. Lee, S. M. 1992. Study of breeding yeast by cell fusion. *Anseong Agricultural Jr. college* **24**: 231-235.
13. Lee, T. S. and C. S. Park. 2002. Quality characteristics of *Takju* prepared by wheat flour *Nuruks*. *Korean J. Food. Sci. Technol.* **34**: 296-302.
14. Park, I. B., B. S. Park, and S. T. Chung. 2003. Brewing and functional characteristics of *HongkukJu* prepared with various *Hongkuks*. *Korean J. Food. Sci. Technol.* **35**: 943-950.
15. Shin, C. S., S. K. Lee, and Y. J. Park. 1996. Selection of *koji* and yeast strain for improvement of Choungju quality. *Agri. Chem. Bio.* **29**: 16-19.
16. So, M. H., Y. S. Lee, and W. S. Noh. 1999. Changes in microorganisms and main components during *Takju* brewing by a modified *Nuruk*. *Korean J. Food & Nutr.* **12**: 226-232.
17. Tsuyoshi, N., R. Fudou, S. Yamanaka, M. Kozaki, N. Tamang, S. Tapha, and J. P. Tamang. 2005. Identification of yeast strains isolated from marcha in sikkim, a microbial starter for amyolytic fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **99**: 135-146.
18. Wilson, J. J., G. G. Khachatourians, and W. M. Ingledew. 1982. Protoplast fusion in the yeast, *Schwanniomyces alluvius*. *Molec. Gen. Genet.*, **186**: 95-106.
19. Yamamura, M. 1975. Preparation of protoplasts of hydrocarbon-utilizing yeast cells and their reoperatoru activities. *Agric. Biol. Chem.* **39**: 13-20.

(Received Mar. 31, 2008/Accepted May 19, 2008)