

## Rare Mating에 의한 양조효모에서의 glucoamylase 발현 균주 HCS 선별 및 특성

최병주\* · 장금일<sup>1</sup> · 김광엽<sup>1</sup>

하이트맥주(주)연구소, <sup>1</sup>충북대학교 농과대학 식품공학과

**Characterization of Brewing Yeast Expressing Glucoamylase Selected by Rare Mating. Choi, Byoung-Ju\*, Keum-Il Jang<sup>1</sup>, and Kwang-Yup Kim<sup>1</sup>.** HITE BREWERY CO., LTD. R & D Center, 740, Hawhakyeh-ri, Buk-bang-myun, Hongchong-gun, Kangwon-do 250-885, Korea, <sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea – Rare mating was used to select a respiratory deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* HBC52 strain. Glucoamylase gene of *S. diastaticus* K114 was developed into the RD mutant, which could uptake maximum amount of non-fermentable sugars through the expression of glucoamylase gene, and the fermentation characteristics of the developed strain, HCS were investigated. The size of HCS yeast and HBC52 yeast strain were 13  $\mu$ m and 10  $\mu$ m, respectively. HCS strain which can uptake maximum amount of non-fermentable sugar through the expression of glucoamylase gene was developed. By karyotype analysis, HCS strain but not RD mutant HBC52 showed a band of 1150 kb chromosome DNA. This band should include glucoamylase gene from *Saccharomyces diastaticus* K114. This strain has glucoamylase, which can degrade starch. By transduction and continuance of glucoamylase gene, HCS strain degraded starch and formed halo. Also, HCS strain maintained the character after 50 generations. Glucoamylase activities of *Saccharomyces diastaticus* K114 and HCS yeast strains are 9.5 and 2.7~3.4 (unit/ml). HCS and HBC52 strain showed similar sugar fermentation patterns and low flocculation. In spore and film forming test, HCS and HBC52 strain formed neither spores nor films. In the limit fermentation test, HBC52 strain showed fermentation level of 68% and HCS strain showed 76~78%. As the limit attenuation of HBC52 and HCS were 2.00 ( $^{\circ}$ P) and 0.7~0.93 ( $^{\circ}$ P). This study demonstrates that HCS strain may be used for low carbohydrate beer fermentation.

**Key words:** Rare mating, glucoamylase, karyotype, respiratory deficient mutant, flocculation

일반적으로 산업용 효모는 haploid(n)는 거의 없고, 유전적으로 안정한 diploid(2n) 이상이다[15]. 그러나 양조효모는 triploid(3n) 또는 aneuploid(2n+1 혹은 3n+1)을 주로 사용한다. 포자형성이 잘되면 균주가 돌연변이가 일어난 확률이 높기 때문에 triploid 또는 aneuploid일 경우 실질적으로 감수분열이 일어날 수 없다. 맥주양조에 이용하기 위한 효모균주 개발방법에는 selection, adaptation, mutation, cell fusion, mating/rare mating, transformation 등의 기술이 있다[24,25,29,34,42]. 이들 방법 중 rare mating의 기술을 이용하여 정상적으로 발효를 수행하는 *Saccharomyces cerevisiae* HBC52 균주 가운데에서 호흡결손 효모인 RD mutant 균주에 *S. diastaticus* K114가 지닌 glucoamylase 형질을 도입하여 HCS 균주들을 개발하여 그 특성을 살펴 보았다.

### 재료 및 방법

#### 균주

본 실험에 사용된 효모균주는 하이트맥주(주) 연구소에 보관 중인 *S. cerevisiae* HBC52 와 *S. diastaticus* K114 를 사용하였으며, 위 두 균주를 rare mating하여 *Saccharomyces* sp. HCS균주를 얻었다.

#### 실험균주의 선별 및 mating

Respiratory deficient(이하 RD) mutant 균주를 선별하기 위하여 정상적으로 발효를 수행 중인 발효탱크에서 *S. cerevisiae* HBC52를 무균조건에서 채취하여 멸균수로 희석하고 200  $\mu$ L를 YPDG(yeast extract 1 %, peptone 2%, dextrose 0.1%, glycerol 3%, agar 2%) 배지에서 4일간 25 $^{\circ}$ C에서 배양 후 TTC overlay agar (tripenyl tetrazolium chloride 0.5%, dextrose 0.5%, agar 1.5%) 배지를 10 mL 첨가하여 2~3시간 반응시켰다. 이때 *S. cerevisiae* HBC52 균주는 백색에서 붉은 색으로 RD mutant 균주는 백색에서 색깔이 변하지 않는 특성을 사용하여 원하는 균주를 선별

\*Corresponding author  
Tel. 033-430-8383, Fax. 033-430-8389  
E-mail: cbju@netian.com

하였다. 색이 변하지 않은 colony는 YPDG 배지에 계대하여 24°C에서 7일간 배양하여 최종적으로 RD mutant 균주를 선별하였다[12,38]. 균주의 rare mating은 RD mutant 균주를 YPD(yeast extract 1%, peptone 2%, dextrose 2%, agar 2%) 배지에 도말하여 25°C에서 1일 배양하고, 그 위에 *S. diastaticus* K114를 cross streaking하여 25°C에서 4일간 배양하였다. 배양된 균주에 증류수를 첨가하고 균체를 harvest 하여 효모수가 약  $1 \times 10^8$  cells/ml가 되도록 희석하여 200  $\mu$ L씩 SG(yeast nitrogen base without amino acid 0.67%, glycerol 3%, bacto-agar 2%) 배지에 도말 후, 25 °C에서 7일 배양하여 SG배지에서 성장한 colony를 wort agar에 옮겨 25°C에서 3일 배양하여 여기서 성장된 각각의 colony를 SD(yeast extract 1%, dextrose 0.5%, bactoagar 2%), SG, SYPD(yeast extract 1%, peptone 2%, dextrose 1%, starch 3%, agar 2%) 배지에 picking하여 25°C에서 3일간 배양하였다. SD, SG, SYPD 배지에서 모두 성장하면서 전분을 분해하여 halo를 형성한 colony를 선별하였다. 이때 halo를 형성한 균주는 rare mating에 의해 *S. diastaticus* K114에 있는 glucoamylase가 RD mutant 균주로 도입되어 새로운 HCS 균주로 개발되었다.

실험 균주의 특성

균주의 크기는 stage micrometer로 측정하였으며[7], 형태는 현미경(Olympus BX50, Japan)으로 관찰하였다. Karyotype 분석은 pulse field electrophoresis(Pharmacia LKB · EPS 500/400, sweden)로 수행하였으며[30], LMP agarose (100 mM EDTA, 1% low melting point agarose)를 42 °C water bath에 넣어 온도를 맞추고, 각각의 효모 균주를 20 mL의 YPD(yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 4%) 배지로 27°C에서 24시간 배양하여 균주를 잘 현탁시킨다. 현탁용액 200  $\mu$ L에 증류수 180  $\mu$ L를 혼합하여 1/20로 희석한 후, 시료를 spectrophotometer로 600 nm에서 O.D. 를 측정하여 total O.D. 를 계산한다. 계산은 예를 들어 O.D. 가 0.4, YPD solution 20 mL, 희석비율 1/20일 경우 total O.D.는  $0.4 \times 20 \times 20 = 160$ 이 된다. 한 plug당 O.D. 2를 맞추기 때문에 80 plug가 된다. 즉 plug당 0.1 mL이므로 총 8 mL가 사용된다. YPD broth를 3,000 rpm으로, 15 분간 원심분리하여 cell을 가라앉힌 후 상등액을 버린다. Pellet에 LMP agarose를 넣어 total volume을 맞추고, 이때 실험은 42°C에서 수행한다. 각각의 시료를 Mould에 부운 후, 약 5분간 -20°C에서 굳힌다. 다음에 plug를 취하여 동량의 SEC solution [1M sorbitol, 10 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM Na-citrate (pH 5.8)]을 넣은 후, cellulase (zymolyase 100T, 1 mg/ml)을 넣어 37°C에서 1시간 처리하고 난 후, 증류수로 20분 간격으로 4°C에서 3회 세척한다. 다시 ES solution (0.45 M EDTA, 1% laurysarcosine)

으로 20분 간격으로 4°C에서 3회 세척한다. Plug의 동량의 ES solution을 넣고 proteinase K (1 mg/ml)를 50°C에서 overnight 반응시킨 시료를 다시 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5)로 20분 간격으로 3회 세척한 다음 TBE buffer (Tris base, boric acid, 0.5M EDTA)를 running buffer로 사용하여 전기영동을 전압 200 V에서 1 phase는 70초로 15시간 그리고 2 phase는 95초, 6시간동안 3 phase는 120초로 6시간 수행하여 총 27시간 실시하였다[27, 28,33].

실험 균주의 전분 분해능 측정방법

Rare mating 된 균주의 mating 여부를 확인하기 위하여 전분이 3%함유된 SYPD배지에 효모균주 각각의 colony를 replica plating 하고[22,25], 25°C에서 3일간 배양한 후, halo형성 유무를 확인하였다[26]. 그리고 mating 된 균주의 glucoamylase 유지의 유무를 확인하기 위해 배양된 균주의 배양액 0.1 mL( $10^5$  cells/mL)를 100 mL 맥즙에서 세포분열이 10세대 만큼 증식시켜,  $2^{10}$  또는 1024배의 cell( $10^8$  cells/mL)이 되었을 때 다시 0.1 mL를 맥즙에 재 접종하였다. 이 과정을 50세대 동안의 세포분열까지 반복 후, SYPD agar에 접종하여 전분 분해능의 유무를 확인하였다[10].

실험 균주의 glucoamylase 활성측정

실험에 사용된 균주들의 glucoamylase 활성 측정[21,35]은 YPD broth에 균주를 접종하여 25°C에서 3일간 배양을 한 후, 세포배양액을 원심분리 하였다. 원심분리된 상등액을 취하여 효모균주가 세포외로 분비한 glucoamylase 활성을 측정하였으며, 반응시료는 0.1 mL의 배양된 상등액, 0.4 mL의 증류수와 0.5 mL의 1% 호화된 수용성 전분 용액으로 하였다. 시료는 50°C에서 30분 동안 반응시키고 1 mL의 3,5-dinitrosalicylic acid를 넣어 이 혼합액을 첨가한 시험관을 끓는 물속에서 5분간 처리하여 발색시킨 후, 10 mL의 증류수를 첨가하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 반응시간 동안 전분에서 유리된 환원당량을 측정하였다. 환원당 측정의 blank는 반응시료를 50°C에서 30분간 반응시키지 않은 것을 사용하였으며, glucoamylase 활성 1 unit는 1 mL의 효모 균주 배양액내에서 1분간 1  $\mu$ mole의 환원당을 전분으로부터 방출시키는 효소의 양으로 하였다.

당발효 실험 및 응집성 실험

균주의 당 발효실험은 *S. cerevisiae* 원균주(HBC52)와 mating된 균주(HCS), *S. diastaticus* (K114)균주의 여러 종류의 당 이용 유무를 확인하기 위해 수행되었으며, 이 실험은 durahm 발효관에 yeast extract 0.45 %, peptone 0.75%를 함유한 배양액 4 mL를 분주하여 살균 후, 16%의 당액을 각각 1 mL씩 첨가한다. 여기에 효모균주를 살균수에 현탁하여 0.1 mL를 접종한 후 3~5일간 25°C에서 배양하면서

gas축적 유무를 관찰하였다. 또한 균주의 응집성 실험은 helm's method[13]에 의해 수행되었으며, HBC52와 HCS균주의 flocculation 정도를 측정하였다. 효모균주 5~6 g을 30 mL calcium sulfate(0.51 g CaSO<sub>4</sub>/1 L 증류수)액에 현탁하여 원심분리 후 효모를 회수한다. 효모균주 1 g을 15 mL 원심분리관에 넣고 10 mL buffered calcium sulfate (0.51 g calcium sulfate, 6.8 g sodium acetate, 4.05 g acetic acid/1 L 증류수, pH 4.5)용액을 첨가하여 현탁시켜 20°C의 water bath에서 20분간 정치하고, 재현탁하여 10분 간격으로 60분까지 침전된 균체의 부피를 측정하였다.

#### 포자형성 및 피막형성 실험

이 실험은 AJL method[14]에 따라 실시되었으며, 양조 효모와 야생효모를 구분하는 포자의 형성 유무를 관찰하였다. Sodium acetate solution에서 25°C, 48시간이상 배양 후 현미경(Olympus BX50, Japan) 1000×의 배율로 실험하였다. 효모균주를 YPD broth(yeast extract 1%, peptone 2%, dextrose 2%) 10 mL에 1 백금이를 접종하여 25°C에서 20일간 배양한 후, 피막형성 유무와 침전된 효모의 양을 관찰하였다.

#### 실험 균주의 최종 당도 측정

실험 균주의 최종당도 측정은 Technical Manual의 carlsberg 실험법[40]으로 실시하였으며, 맥주 250 mL에 효모균주 32 g을 각각 넣어 25°C에서 16시간 교반 발효시켜 여과한 액의 당도를 Density Meter(Paar Beer Analyser SP-1, Austria)로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

#### 균주의 특성

실험에 이용된 효모균주의 크기는 *S. diastaticus*인 K114는 약 5 μm였고, 원 양조효모균주인 *S. cerevisiae* HBC52는 약 10 μm를 나타냈으며 mating된 균주 HCS들은 크기가 약 13 μm로 측정되었다. Clerck[16]과 Kunze[43]의 양조효모의 크기가 약 5~10 μm라는 보고보다 본 실험에서 mating되어 얻어진 실험균주들의 크기가 크게 나타났으나, Reed 등[23]이 보고한 측정 결과 3.5~13 μm 외는 유사한 결과를 보였다. 실험효모 균주들 중 mating된 균주는 일반적인 양조효모들이 약 5~9 μm의 크기에 비해 약간 큰 크기를 가지는 것으로 실험 결과 나타났다. 효모 균주들의 slant culture에서 번식의 상태 즉, colony의 상태는 모든 균주들이 filiform형태를 나타내는 결과를 얻었다. 또한 형태는 실험효모 균주가 모두 둥글고 타원형이었으며, 이들 세포모양이 Fig. 1에 나타나 있다.

Karyotype 분석을 위해 2 O.D.로 맞춘 시료들을 가지고 phase를 조절하여 핵형분석을 실시하였다. Marker 효모균주

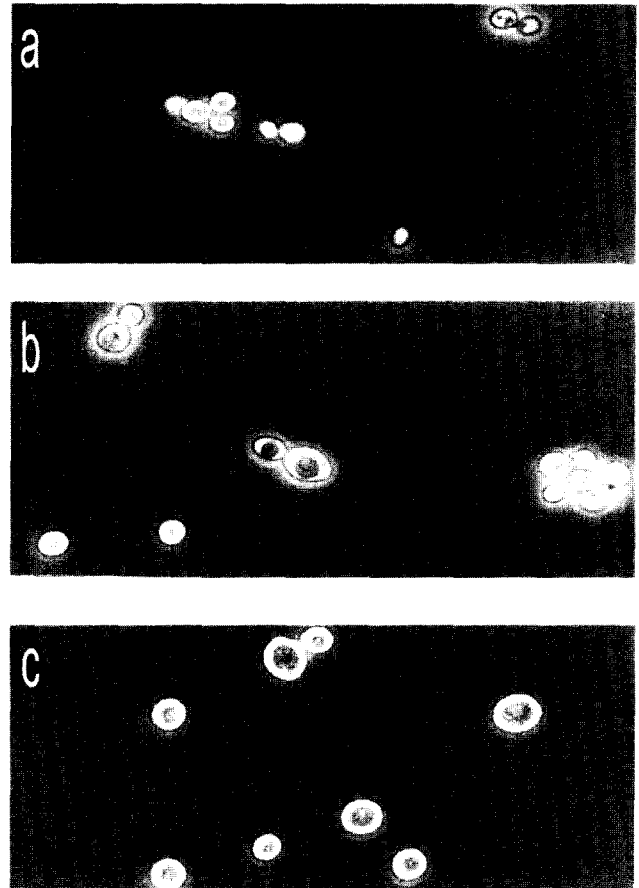


Fig. 1. Shape of yeast strains used in this study (×1,000). a, *S. diastaticus* K114 strain; b, *S. cerevisiae* HBC52 strain; c, Rare mating yeast HCS1 strain (×1,000)

로는 *S. cerevisiae* YNN295를 구입하여 실험을 수행하였으며, marker균주의 chromosome의 크기는 Table 1에 나타내었다.

*S. cerevisiae* HBC52로 발효 중인 발효탱크에서 RD mutant 약 1,000개의 single colony를 분리하여 *S. diastaticus* (K114)와 rare mating을 수행하여 그 가운데에서 약 140 균주를 얻어 marker 균주와 원 균주인 *S. cerevisiae* HBC52와 같이 HCS 균주들을 핵형분석하여 HBC52와 chromosome band가 가장 비슷한 HCS1과 HCS2, HCS3 균주를 선발하여 분석한 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

각각 효모균주의 chromosome 분자량은 image analyser를 이용하여 분석한 결과, *S. cerevisiae* HBC52와 RD mutant 효모균주는 약 217~1900 kb의 분자량을 가지며, rare mating된 균주들은 약 225~2006 kb의 분자량을 나타내었다. 그리고 Table 2에서 보듯이 K114 균주는 218~1788 kb의 분자량을 가지는 결과를 보여주고 있다. 특히 RD mutant 균주에는 나타나지 않는 약 1160 kb의 염색체가 HCS1과 HCS2, HCS3 균주에는 비슷한 분자량으로 나타났

**Table 1. Sizes of marker yeast chromosome**

Yeast chromosome	Size (kb)
XII	1900
IV	1640
VII*	1120
XV*	1100
XVI	945
XIII	915
II	815
XIV	785
X	745
XI	680
V	610
VIII	555
IX	450
III	375
VI	295
I	225

\*Chromosome VIII and XV are formed as one band.

으며 이를 K114 효모균주에 있는 염색체(약 1153 kb)가 rare mating 시 RD mutant 효모균주로 도입이되어 형질로 유지된 것으로 추측된다. Casey[11]는 *S. cerevisiae* 균주들이 핵형분석한 결과 약 150~2200 kb의 분자량을 가지는 결과를 얻었으며, Aigle 등[1]은 *S. uvarum* 균주의 핵형을 분석하여 분자구조를 연구하였다. Rare mating에 의해 얻어진 HCS 효모균주들의 염색체 분자량 및 band 수에서도 차이가 있음을 보여주고 있으며, 즉 분자량이 큰 band에서는 서로 유사한 결과를 보였으나 분자량이 작은 염색체 VIII에서 17개의 분자량에서는 HCS1 균주만이 HBC52 효모균주와 비슷한 형태를 지니고 있었으며[44], HCS2 균주는

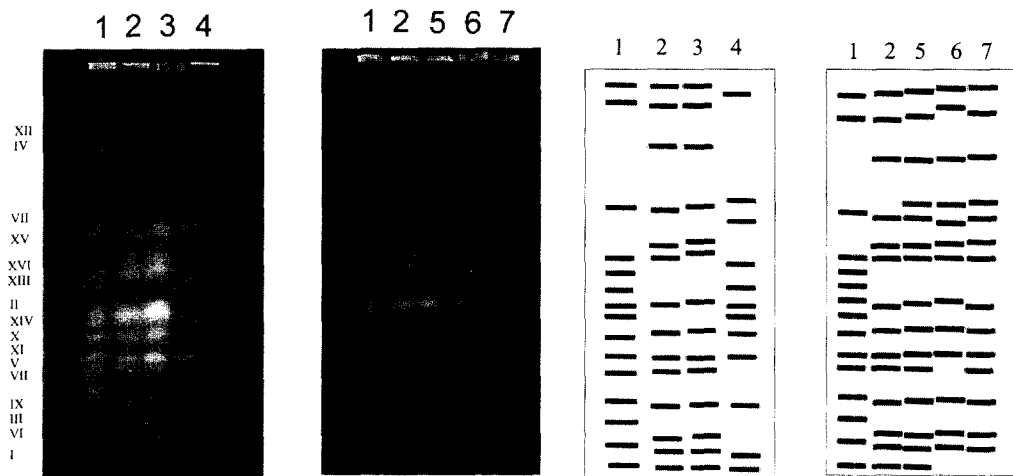
**Table 2. Molecular weights of yeast chromosome**

Yeast chromosome	Size (kb)					
	HBC52	RD mutant	K114	HCS1	HCS2	HCS3
Band 1	1900	1888		1942	1966	2006
2	1628	1632	1788	1661	1751	1714
3	1425	1425		1410	1415	1420
4			1153	1153	1158	1166
5	1105	1122	1063	1093	1074	1086
6	988	1001	934	989	993	993
7	948	968	872	947	945	945
8	821	829	815	800	811	785
9	694	707	758	694	694	693
10	606	611	690	614	616	617
11	560	568	617	553		545
12	434	438	438	440	446	437
13	317	323		314	323	312
14	273	278	261	273	275	269
15	217	217	218	225		

VIII와 I이 분석결과 나타나지 않았으며 HCS3균주는 I의 band가 나타나지 않았다.

실험 균주의 전분분해

호흡결손 돌연변이(RD mutant) 균주는 glucose를 이용할 수 있으나, glycerol을 이용하지 못하기 때문에 glycerol만 들어간 SG배지에서는 성장하지 못한다. Adenine, histidine, tryptophane, uraci 등 4개의 아미노산 영양요구성 marker를 가지는 *S. diastaticus*(K114)균주는 아미노산 영양요구성이기 때문에 아미노산이 없는 배지 즉, SG, SD배지에서 성장하지 않는다. 그러나 이 균주는 glucoamylase를 분비하는



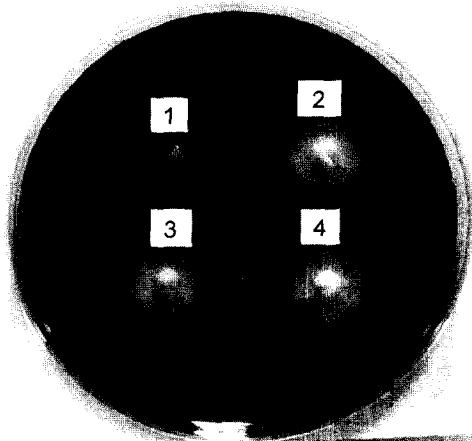
**Fig. 2. Pulse field gel electrophoresis of yeast chromosomes from yeast strains. Yeast chromosome was resolved on LMP agarose gel for 27 hours at 200V in TEB buffer.**

1, Marker yeast (*S. cerevisiae* YNN295); 2, HBC52 (*S. cerevisiae*); 3, RD mutant strain of HBC52; 4, *S. diastaticus* (K114); 5, HCS1 (Rare mating strain); 6, HCS2 (Rare mating strain); 7, HCS3 (Rare mating strain).

STA gene을 가지고 있어 starch를 함유하고 있는 SYPD배지에서는 성장 가능하다[39]. 물론 정상적인 양조효모는 SG나 SD배지에서도 성장이 가능하다. 그리고, SYPD배지에서는 성장이 가능하지만 starch를 함유하고 있어 glucoamylase를 가지고 있지 않기 때문에 전분을 분해하지 못하여 halo를 형성하지 않는다[19,20]. RD mutant균주와 *S. diastaticus*(K114)균주와의 rare mating에 의해서 만들어진 HCS균주들은 mitochondria가 정상적으로 작용하지 못하는 RD mutant 균주에 *S. diastaticus*로부터 정상적인 mitochondria와 glucoamylase를 분비하는 STA gene을 받아들여 정상적인 균주로 된다[9]. 따라서 Fig. 3에서 보듯이 SYPD 배지에서 일반 양조효모 균주인 HBC52와 RD mutant 균주는 전분을 분해하지 못하기 때문에 halo를 형성하지 않았으며, glucoamylase를 함유하고 있는 균주 즉, *S. diastaticus* (K114)와 rare mating 균주인 HCS들은 배지에 포함되어 있는 starch를 분해하여 halo를 형성하였다. 이때 halo 형성 유무를 확인하기 위해 SYPD 배지표면을 iodine으로 염색하였다.

Halo를 형성한 결과는 Thomsen[17]이 *S. cerevisiae*인 DBY746과 M 55균주에  $\alpha$ -amylase를 도입시켜 실험한 전분 1%를 함유한 배지에서 halo를 형성한 결과와 효소는 다르지만 유사하게 나타났다. *S. diastaticus*에서 유래된 glucoamylase는 amylopectin의  $\alpha$ -1,6결합을 분해할 수 없어 starch를 완전히 분해시키지 못한다는 Spencer 등[36, 37]과 Erratt 등[5,6]의 보고도 있다.

Rare mating 된 균주인 HCS들이 *S. diastaticus* (K114) 균주에서 도입된 glucoamylase 형질을 계속적으로 유지하여 전분 분해능을 지니고 있는지를 확인하기 위하여 다음의 실험을 수행하였다. 즉, HCS 균주들을 10 mL 맥즙에 1 백



**Fig. 3. Degradation of yeast strains.**  
1, *Saccharomyces cerevisiae* HBC52 strain; 2, Rare mating yeast HCS1 strain; 3, Rare mating yeast HCS2 strain; 4, Rare mating yeast HCS3 strain

금이 접종하고 25°C에서 3 일간 배양하여 세포수가 10<sup>5</sup> cells/mL이 되도록 한 후, 이 배양액의 약 0.1 mL를 100 mL 맥즙에 첨가한 뒤, 약 10세대 (2<sup>10</sup>) 만큼 배양하여 세포수를 10<sup>8</sup> cells/mL로 증균시켰다. 이 배양액을 다시 10<sup>5</sup> cells/mL가 되도록 희석한 후 희석액 0.1 mL를 100 mL 맥즙에 접종하여 배양하였다. 이것을 5회 반복하여 50세대 동안까지 배양한 균주를 SYPD 배지에 접종하여 25°C incubator에서 4~5일간 배양한 후, HCS 균주들이 지속적인 glucoamylase 형질에 의한 전분 분해능의 유무를 확인하기 위해 배지에 iodine으로 염색한 결과, halo를 형성하는 실험 결과를 얻었다. 이와 같은 결과로 보아 RD mutant 균주와 *S. diastaticus*(K114)와의 rare mating된 균주인 HCS들은 50 세대까지도 지속적으로 균주내에 glucoamylase 형질을 유지하는 것으로 나타났다.

**실험균주의 glucoamylase 활성**

실험균주들의 glucoamylase 활성은 양조효모 균주인 HBC52와 *S. diastaticus* K114, 그리고 HBC52의 호흡결손 균주와 rare mating에 의해 형질이 전환된 HCS균주들의 전분 분해력을 측정하였다. 균주들의 glucoamylase 활성 측정 결과[21,35]를 Table 3에 나타냈다. 실험 결과 *S. diastaticus* K114는 9.5 unit를 보였으며, 양조효모 HBC52는 glucoamylase 형질을 지니고 있지 않기 때문에 활성이 없었다. Rare mating된 균주인 HCS균주들은 HCS1, HCS2와 HCS3가 각각 3.4, 2.7과 3.2 unit를 나타내어 차이를 보였으며, *S. diastaticus* K114의 9.5 unit보다는 매우 낮은 결과를 얻었다. 이는 glucoamylase의 형질이 호흡결손 효모균주로 도입되어 mating된 균주가 받아들인 형질에 대해 자신의 것으로 완전히 인식을 하지 않은 결과로 활성이 낮아진 것으로 판단된다. Sakai 등[32]은 *S. cerevisiae* YNN27과 *S. carlsbergensis* IFO 0565를 *S. diastaticus* 7-19과 DNA 재조합한 결과 각각 양조효모균주인 S341과 B109를 얻었다. 그리고 이들의 glucoamylase 활성을 50°C에서 30분간 측정한 결과에서 *S. cerevisiae* YNN27과 *S. diastaticus* 7-19의 재조합에서 이용된 *S. diastaticus* 7-19에서의 glucoamylase 활성은 3.2 unit였고, 재조합된 S341에서의 활성은 1.6 unit를 나타내었으며,

**Table 3. Glucoamylase activity of culture supernatants**

Strain	Glucoamylase Activity <sup>a</sup> (units/mL)
<i>Saccharomyces diastaticus</i> K114	9.5
HBC52	0.0
HCS1	3.4
HCS2	2.7
HCS3	3.2

a: Activity is expressed as millimole of reducing sugar formed per minute per milliliter of culture supernatant.

*S. carlsbergensis* IFO 056와 *S. diastaticus* 7-19의 재조합에서 이용된 *S. diastaticus* 7-19에서의 glucoamylase 활성은 4.6 unit였고, 재조합된 B109에서는 4.0 unit를 나타내었다고 보고하였는데 이는 rare mating에 얻어진 glucoamylase 형질발현이 DNA 재조합 기술에 의한 glucoamylase 형질발현보다 낮은 결과를 나타냄을 알 수 있었다. 또한 Kim 등[18]은 *S. cerevisiae* k81과 *S. diastaticus* K94, K95와 plasmid pMS12로 재조합의 기술로 실험을 하여 얻어진 amylolytic 활성은 K94균주의 colony 3, 194, 264에서 각각 0.140, 0.085, 0.143 unit (mole/mL/min)을 나타내어 본실험에 사용된 HCS 균주들 보다는 큰 활성을 가지는 균주였으며, 이는 실험에 이용된 K94 균주가 이미 gluco-amylase를 가진 상태에서 외부에서 다른  $\alpha$ -amylase를 도입하여 실험을 수행했기 때문에  $\alpha$ -amylase와 glucoamylase의 공동작용에 의해 효소의 활성이 훨씬 높게 나타난 것으로 판단된다. 따라서 다른 효모에 있는 glucoamylase 형질을 양조효모 균주에 도입하여 glucoamylase형질을 발현시키는 것에는 효소활성 측정 결과 문제점이 없는 것으로 나타났다.

실험 균주의 당 발효와 응집성

당 발효실험은 균주가 이용할 수 있는 기본 영양원으로 yeast extract와 peptone을 첨가하고, 각각 glucose와 maltose, sucrose, galactose, melibiose, cellobiose, lactose, trehalose, raffinose 등을 함유한 배지를 만들어 HBC52와 RD mutant

Table 4. Sugar assimilation characteristics of each strains

	HBC52	RD mutant	K114	HCS1	HCS2	HCS3
Glucose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	-	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-	-
Raffinose	+	+	+	+	+	+

+ : Product of gas, - : Non-product of gas

균주, HCS 균주 등 실험균주들이 당을 발효시키는지의 특성을 알아 보기 위해 실험을 수행하였다. Table 4에 나타난 결과와 같이 HBC52와 RD mutant 균주는 glucose와 maltose, sucrose, galactose, melibiose, raffinose 등은 발효를 하였으나, cellobiose와 lactose, trehalose는 발효하지 못하는 특성을 가졌으며, glucoamylase가 도입된 rare mating균주(HCS)들은 일반 양조효모가 가지는 특성과 같이 cellobiose와 lactose, trehalose만을 발효하지 않는 결과를 보였다. 그러나 *S. diastaticus*(K114) 균주는 cellobiose와 lactose, trehalose뿐만 아니라 galactose도 발효하지 않는 특성을 나타냈다. 이 결과로 보아 rare mating된 HCS 균주들은 양조효모균주의 특성을 가지는 균주로 밝혀졌다[8,41].

효모 균주들의 응집성 실험은 Helm's assay method[13]에 따라 수행하였다. 실험에서 10분 경과 후 효모 침전량과 buffer용액의 분리여부에 의해 분리가 잘 되면 flocculation type으로, 그리고 분리가 일어나지 않으면 non-flocculation type으로 분류하였다. 또한 시간의 경과에 따라 침전량의 증감에 의해서 시간이 경과함에 따라 침전량이 증가하면 flocculation type 효모로, 침전량이 감소되면 non-flocculation type 효모로 Helm 등[13]은 분류하였다. Burns 등[3]은 10분에서 침전량이 1 mL보다 크면 강 응집성 효모로, 침전량이 0.5 mL보다 작으면 약 응집성 효모로 분류하여 보고하기도 하였다. 본 실험 결과 10분 후의 침전량은 HBC52가 0.1 mL이고, HCS1과 HCS2, HCS3 균주는 각각 0.2 mL와 0.2 mL, 0.1 mL를 나타냈으며 Table 5와 Fig. 4에 나타난 결과처럼 실험 균주들은 약 응집성 효모이며, 시간이 경과됨에 따라 침전량이 증가되는 결과로 보아 flocculation type의 효모로 사료된다. 또한 Burns 등[3]이 보고한 약 응집성 효모인 10분에서 침전량이 1 mL보다 크게 나타나 이들의 결과와도 일치하였다. 따라서 HCS 균주들은 original 양조효모인 HBC52와 비슷한 성질을 가지는 균주임이 밝혀졌다.

실험 균주의 포자형성 및 피막형성

포자 형성 실험[31]은 Danish AJL Item No. M9-2.2 방법[14]에 의해 수행되었다. 일반적으로 포자 형성 유무 실험은 정상적인 양조효모의 시료에서 야생효모의 검출 방법으로 이용된다. Original 양조효모인 HBC52와 *Saccharomyces*

Table 5. Flocculation characteristics of yeast strains

Strain	Flocculation type*	Sedimentation volume (mL)					
		10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
HBC52	F	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.5
HCS1	F	0.1	0.2	0.4	0.5	0.6	0.6
HCS2	F	0.2	0.3	0.6	0.8	0.8	0.9
HCS3	F	0.2	0.4	0.6	0.7	0.8	0.8

\*HF : High flocculation type, F : Flocculation type, P : Powdery type

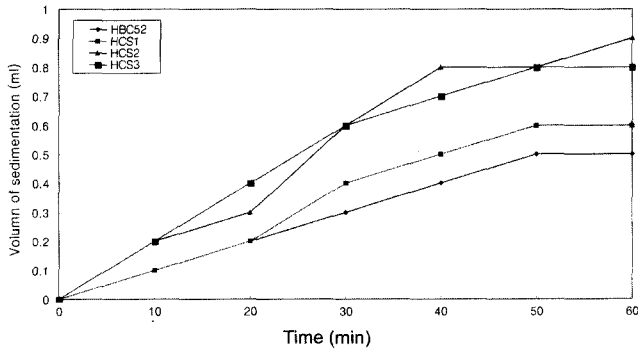


Fig. 4. Flocculation of yeast strains.

*diastaticus* (K114) 균주에 의해 rare mating 균주인 HCS 균주들이 mating시 포자 형질을 도입하였을 가능성을 검증하고, 양조효모로서의 이용 여부를 확인하기 위해 실험을 수행한 결과, HCS균주들이 포자를 형성한 세포들을 관찰할 수 없는 것으로 보아 non-spore 균주로 확인되었다. 보통 상면 발효 효모는 포자형성능이 크며, 하면 발효 효모는 포자 생성능이 적게 나타나는 것으로 알려져 있다[4]. 따라서 HBC52균주가 하면 발효 효모인 것으로 보아 rare mating 균주 즉, HCS 균주들도 하면 발효 효모라는 결과를 본 실험 결과에서 얻었다.

본 실험은 피막 형성 상태 즉, 건조, 습윤의 상태, 두께, 색, 광택, 덩어리의 형성 유무 등에 관하여 관찰하고, 침전 효모의 양을 측정하였다. 일반적인 *S. diastaticus* 균주는 피막 형성 및 haze를 유발하는 균주로 알려져 있으나, 실험에 사용된 *S. diastaticus* (K114)균주는 피막 형성이 관찰되지 않았으며, HBC52와 HCS균주들에서도 피막이 형성되지 않는 결과를 얻었다. 침전 효모량은 HBC52균주는 0.1 mL, *S. diastaticus* (K114) 균주는 0.1 mL를 나타냈다. 또한 rare mating 균주인 HCS1과 HCS2, HCS3는 각각 0.15 mL와 0.15 mL, 0.15 mL를 나타낸 결과가 Table 6에 보여주고 있다.

실험 균주의 최종당도

최종 당도 실험은 효모균주들의 발효력을 예측하는 실험으로 수행하였다. 최종 당도 측정은 Calsberg방법[40]에 의해 계산하였다.

$$\text{Limit fermentation (\%)} = \frac{100 \times (P - E_A)}{P \times 121} \left( \frac{1}{1 - 0.005161 \times E_A} \right)$$

P : Original gravity (°P)

E<sub>A</sub> : Apparent extract (°P)

실험 결과 HBC52보다 HCS균주들이 glucoamylase형질을 지니고 있기 때문에 맥즙의 당 성분을 더 많이 이용함에 따라 최종당도가 낮게 나타났으며, 발효의 수준은 HBC52가 68%, HCS1과 HCS2, HCS3 균주들이 78%와 76%,

Table 6. Film characteristics of yeast strains

Strains	Film	Sedimentation volume <sup>b</sup> (mL)
HBC52	-	0.1
<i>Saccharomyces diastaticus</i> (K114)	-	0.1
HCS1	-	0.15
HCS2	-	0.15
HCS3	-	0.15

+ : Products of the Film, - : Non-products of the Film.

Table 7. Limit fermentation of yeast strains

Strain	Apparent extract (°P)	L.F. (%)
HBC52	2.00	68
HCS1	0.70	78
HCS2	0.93	76
HCS3	0.85	77

Original gravity of wort: 10.99 (°P), L.F. : Limit fermentation

77%로 얻어졌다(Table 7). 이와 같은 결과는 담색 맥주에서 효모균주들이 74~82%의 최종발효도를 보인다는 橋谷[2]의 결과와 비교해 볼 때 original 양조균주인 HBC52는 다소 낮게 나타났으나, HCS균주들은 거의 비슷하거나 약간 높게 나타나는 결과를 얻었다. 본 실험에 이용된 rare mating 된 균주인 HCS균주들이 맥즙 중의 당을 이용할 수 있는 능력면에서 일반 양조효모 균주보다 높기 때문에 low carbohydrate 맥주 생산에 적합한 균주로 사용에 문제점이 없는 것으로 사료된다.

요 약

*S. cerevisiae* HBC52와 *S. diastaticus* K114 의 rare mating 에 의해 개발된 HCS 균주들은 크기가 약 13 μm, karyotype 분석결과 K114 균주에만 있는 약 1150kb 분자량을 가지는 염색체 band를 유지하였으며, 전분을 분해하여 halo를 형성하였다. Glucoamylase활성은 약 2.7~3.4 (units/mL)를 가진 균주임이 밝혀졌으며, 당 발효실험과 응집성 실험을 수행한 결과 HBC52 균주와 유사한 당 발효특성을 보이고 응집성 특성도 약응집성의 flocculation type으로 비슷하였다. 그리고 HCS균주의 포자형성과 피막형성 유무 실험에서는 양조효모인 HBC52균주와 같이 포자가 형성되지 않았으며, 피막도 형성되지 않았다. 균주들의 최종당도 실험은 HBC52균주가 약 68%의 발효수준을 나타냈고, HCS 균주들은 이 보다 높은 76~78%의 수준을 보였다. 즉, HBC52 균주가 최종당도 2.00(°P)를 보인 반면 HCS 균주들은 0.7~0.93(°P)를 보이는 결과를 나타내어 맥주양조에서 low carbohydrate beer를 생산할 수 있음이 확인되었다.

## REFERENCES

1. Aigle, M., D. Erbs, and M. Moll. 1984. Some molecular structures in the genome of lager brewing yeasts. *ASBC J.* **42**: 1–7.
2. 稿谷. 1967. "ピ-ル". 酵母學. 岩波書店. 82.
3. 高木. 1981. 遺傳子操作實驗法. 講談社. 120–122.
4. Bilinski, C. A., I. Russell, and G. G. Stewart. 1986. Analysis of sporulation in brewer's yeast: induction of tetrad formation. *J. Inst. Brew.* **92**: 594–598.
5. Erin, S. C., O'conner-cox and W. M. Inledew. 1990. Effect of the timing of oxygenation on very high gravity brewing fermentation. *ASBC J.* **48**: 26–32.
6. Errat, J. A. and G. G. Stewart. 1981. Fermentation studies using *Saccharomyces diastaticus* yeast strains. *Development in Industrial Microbiology.* **22**: 577–586.
7. 微生物 Handbook 編輯委員. 1967. 微生物 Handbook. 技報堂.
8. Fernandes, S., G. Gonzalez, and A. Sierra. 1991. The acidigicitation power test and behavior of yeast in brewery fermentation. *M.B.A.A. Technical Quarterly.* **28**: 89–95.
9. Bajszar, G., J. Croonenberghs, I. L. Karnushina, S. Y. Lee, and J. R. Mattoon. 1994. Properties and engineering of a mutant STA promoter of *Saccharomyces diastaticus* *App Biochem. and Biotech.* **44**: 187–204.
10. Glennie, C.W. and A.W. Wight. 1986. Dextrins in sorghum beer. *J. Inst. Brew.* **92**: 384–386.
11. Casey, G. P. 1996. Practical applications of pulsed field electrophoresis and yeast chromosome fingerprinting in brewing QA and R&D. *MBAA TQ.* **33**: 1–10.
12. Hammond, J. R. M. and K. W. Eckersley. 1984. Fermentation properties of brewing yeast with killer character. *J. inst. Brew.* **90**: 167–177.
13. Helm, E., B. Nohr, and R.S.W. Thorne. 1953. The measurement of yeast flocculation and its significance in brewing. *Wallerstein communications.* **11**: 315.
14. Nielsen, H. 1995. With the compliment AJL quality manual. Yeast seminar. *AJL Laboratory.* M 9-2.2: 1–5.
15. 赤田倫治. 1998. 遺傳子組換え酵母の實用化. *J. Brew. Soc. Japan.* **93**: 113–119.
16. Clerck, J. D. 1958. A textbook of brewing. *Theory of fermentation.* Chapman & Hall LTD. 366–368.
17. Thomsen, K. K. 1987. Production of  $\alpha$ -amylase by yeast. *CRC Critical Reviews in Biotechnology.* **5**: 205–215.
18. Kim, J. H., K. Kim, and Y. G. Choi. 1994. Mitotic stability of heterogous  $\alpha$ -amylase gene in yeast. *Kor. J. Microbiol.* **21**: 271–279.
19. Kim, K., G. Bajszar, S. Y. Lee, K. Finn, and J. R. Mattoon. 1994. Cloning of a new allelic variant of a *Saccharomyces diastaticus* glucoamylase gene and its introduction in to industrial yeasts. *App. Biochem. Biotech.* **44**: 161–185.
20. Lalue, C. and J. R. Mattoon. 1984. Development of rapidly fermenting strains of *Saccharomyces diastaticus* for direct conversion of starch and dextrins to ethanol. *App. Environ. Microbio.* **48**: 17–19.
21. Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375–380.
22. Xie Q. and A. Jimenez. 1995. Construction of an endo-glucoamylase brewing yeast strain. *J. Inst. Brew.* **101**: 459–461.
23. Reed, G. and H. J. Pepler. 1973. Yeast technology. Biological Aspects of yeasts. AVI Publishing Co. 15–17.
24. Crumplen, R. M., T. D'Amore, I. Russell, and G. G. Stewart. 1990. The use of spheroplast fusion to improve yeast osmotolerance. *ASBC J.* **48**: 58–61.
25. Tubb, R. S. and P. L. Liljestrom. 1986. A colony-colour method which differentiates  $\alpha$ -Galactosidase-positive strains of yeast. *J. Inst. Brew.* **92**: 588–589.
26. Russell, I., C. M. Crumplen, R. M. Jones, and G. G. Stewart. 1986. Efficiency of genetically engineered yeast in the production of ethanol from dextrinized cassava starch. *Biotechnology Letters.* **8**: 169–174.
27. Russell, I. and G. G. Stewart. 1985. Valuable techniques in the genetic manipulation of industrial yeast strains. *ASBC J.* **43**: 84–90.
28. Russell, I., R. Jones, and G. G. Stewart. 1986. The influence of cytoplasmic control on the expression of nuclear genes in brewing yeast strains. *EBC Congress Yeast Genetics.* 235–242.
29. Russell, I. and G. G. Stewart. 1987. *Yeast Biotechnology.* 289–293.
30. Brook, S. and M. Fritsch. 1989. Molecular cloning a laboratory manual. Gel electrophoresis of DNA. CSH Laboratory manual press. Second edition. 6.1–6.35.
31. Sasaki, T., J. Watari, M. Kohgo, N. Nishikawa, and Y. Matsu. 1984. Breeding of a brewer's yeast possessing anticontaminant properties. *ASBC J.* **48**: 164–166.
32. Sasaki, K., S. Fukui, S. Yabuuchi, S. Aoyagi, and Y. Tsumura. 1989. Expression of the *Saccharomyces diastaticus* STA1 gene in brewing yeast. *ASBS J.* **47**: 87–90.
33. Schofield, M. A., S. M. Rowe, and J. R. Hammond. 1995. Differentiation of brewery yeast strains by DNA fingerprinting. *J. Inst. Brew.* **101**: 75–78.
34. Searle, B. A. and R. S. Tubb. 1981. Regulation of amyloglucosidase production by *Saccharomyces diastaticus*. *J. Inst. Brew.* **87**: 244–251.
35. Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**: 19–23.
36. Spencer, J. F. T. and D. M. Spencer. 1977. Hybridization of non-sporulating and weakly sporulating strains of brewer's and distiller's yeast. *J. Inst. Brew.* **83**: 287–289.
37. Spencer, J. F. T. and Dorothy M. Spencer, and A. R. W. Smith. 1983. Yeast genetics. Aspects of biochemistry and genetics of sugar and carbohydrate uptake by yeasts. Springer-Verlag. 475–484.
38. Stewart, G. G., R. Jones, and I. Russell. 1986. The use of derepressed yeast mutants in the fermentation of brewery wort. *E.B.C. Congress Yeast Genetics.* 243–247.
39. Tamaki, H. 1978. Genetics studies of ability to ferment starch in *Saccharomyces* gene polymorphism. *Molecular and general Genetics.* **164**: 205–211.



40. The Tech. Committee of ASBC. 1992. Methods of Analysis of the ASBC. 8th edition. American Society of Brewing Chemists Pilot Knob.
41. Uchida, M., K. M. O, Nakatani, and K. Nagami. 1991. Carbohydrates in brewing. I. Determination of fermentable sugars and oligosaccharides in wort and beer by partition high-performance liquid chromatography. *ASBC J.* **49**: 65–73.
42. Xiao W. and G. H. Rank. 1990. Curing industrial *Saccharomyces* yeasts of parasitic 2 mm plasmid. *ASBC J.* **48**: 107–110.
43. Kunze, V. 1996. Technology brewing and malting. *Yeast VLB.* 75–83.
44. Takata, Y., J. Watari, N. Nishikawa, and K. Kamada. 1989. Electrophoresis banding patterns of chromosomal DNA from yeast. *ASBC J.* **47**: 109–112.

**(Received Jul. 5, 2001/Accepted Sep. 29, 2001)**