

GOVP 12018481

663.5
L293 6

최 종
연구보고서

**유전자 조작에 의한 발암성 Ethyl Carbamate
무함유 전통주의 제조기술 개발**

**Development of the Korean Traditional Liquor
Containing No Ethyl Carbamate by Genetic
Engineering of Alcohol Yeast**

주 관 연 구 기 관
경 북 대 학 교

농 립 부



최 종 보 고 서

2000년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 유전자 조작에 의한 발암성 ethyl carbamate 무함유 전통주의 제조기술 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 10부
2. 최종보고서 디스켓 1매

2000. 10. 28.

주관연구기관 : 경 북 대 학 교

총괄연구책임자 : 박 회 동 (인)

주관연구기관장 :

농 립 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유전자 조작에 의한 발암성 ethyl carbamate 무합유 전통주의 제조기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 10. 28.

주관연구기관명 : 경북대학교
총괄연구책임자 : 박 회 동
세부과제책임자 : 이 인 구
연 구 원 : 하 현 팔
연 구 원 : 배 천 호
연 구 원 : 이 창 호
연 구 원 : 우 임 선
연 구 원 : 윤 언 정
연 구 원 : 김 승 환
연 구 원 : 정 운 찬
연 구 원 : 김 인 환
연 구 원 : 신 민 철
연 구 원 : 이 용 호
연 구 원 : 정 영 지
연 구 원 : 주 길 재
연 구 원 : 신 재 호
연 구 원 : 허 건 영
연 구 원 : 장 한 수
연 구 원 : 권 달 호
연 구 원 : 남 주 욱

요 약 문

I. 제 목

유전자 조작에 의한 발암성 ethyl carbamate 무함유 전통주의 제조기술 개발

II. 연구 개발의 목적 및 중요성

우리 나라의 주류시장은 대내적으로 시장 진입제도의 완화 및 자유화의 진행과 대외적으로는 시장개방이 본격화됨에 따라 새로운 국면을 맞고 있다. 영국, 프랑스, 독일, 이태리, 미국 등의 선진국에서는 나름대로의 명주를 가지고 있으며, 최근에는 일본의 청주 역시 세계시장의 진출을 강화하고 있으나, 우리 나라의 대표적인 전통주인 탁주, 약주 등은 국제 경쟁력이 매우 약한 실정이다.

현재, 우리 나라에는 탁주, 약주 등의 중소 제조업체를 포함하여 약 1,300여 개의 주류 제조업체가 영업 중에 있다고 한다. 그러나 현재 우리나라의 주류시장 대부분은 맥주나 소주가 점령하고 있으며 이들 주류와 양주시장은 점점 증가추세에 있으나, 우리 나라 전통주인 탁주 및 약주의 시장은 점차 위축되고 있는 실정이다. 최근 들어 급격하게 쏟아져 들어오는 다양한 수입주류와 국산 신제품의 공세에 밀려 탁주의 시장 점유율은 맥주, 소주, 위스키에 이어 제 4위를 기록하고 있을 뿐이다. 현재 탁주는

극히 소량이 외국으로 수출되고 있을 뿐 93년 현재 매출액 1,485억 정도의 국내 시장을 형성하고 있으며, 국내 소비자에게 점차 외면당하고 있다. 또한 대부분의 탁주 소비자는 저소득, 고연령층이 대부분으로서 고급술 선호추세에 밀려 그 위치를 점점 잃어가고 있다.

따라서, 우리 나라 전통주를 계승발전시키기 위하여는 이들에 대한 폭넓은 연구가 수행되어야 할 것이지만 이들 업체의 대부분은 그 규모가 영세하여 주질의 개선을 위한 충분한 연구를 수행하기가 곤란하다. 앞으로 외국주류의 수입이 더욱 증가될 것으로 예상되어 경쟁력이 미약한 한국 전통주의 보존 및 계승을 위하여는 주질 개선을 비롯하여 여러 분야에서 다각적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

우리 나라 전통주에 대한 연구는 대부분이 무증자 당화 탁주의 제조 기술과 살균, 저장성 증가 기술, 발효 또는 저장 중의 미생물학적 연구 및 이화학적 변화에 관한 연구가 대부분을 차지하고 있다. 최근 분자생물학과 유전공학의 발달로 유전자 조작에 의한 각종 미생물의 육종에 관한 연구가 보고되고 있으나 우리 나라 전통주 효모에 관한 연구는 극히 초기 단계에 있다. 현재까지 유전자 조작에 의한 효모 균주의 육종시 필수적으로 요구되는 단수체 효모의 분리조차 보고된 바 없는 실정이다. 알코올 효모의 유전자 조작에 관하여 최근 외국에서 활성화 된 연구는 요소 비생성 알코올 효모의 육종이다.

각종의 주류에는 ethyl carbamate가 상당량 함유되어 있는데 이것은 강력한 발암물질로 알려져 있다. 이러한 ethyl carbamate는 효모의 arginine 분해효소인 arginase에 의해 arginine으로부터 생성된 요소가 에탄올과 반응하여 생성하는 것으로 알려져 있다. 외국에서는 이미 오래 전부터 각종 주류의 ethyl carbamate에 관하여 많은 관심을 가져 왔다.

1985년 11월에는 캐나다 온타리오주의 Liquor Control Board에 의해 캐나다에 시판되고 있는 알코올 음료에 ethyl carbamate가 다량 함유되어 있음이 발표된 이후 Health Protection Branch에 의해 그해 12월 효모에 의한 발효시 요소의 사용에 대한 금지조치가 행하여졌다. 미국의 경우에는 1988년 5월 이미 수입되는 포도주와 증류주에 대하여 ethyl carbamate 기준치를 준수할 것을 미국에 주류를 수출하는 7개 국가에 이미 요청한 바 있다. 일본의 경우 청주에 있어서 ethyl carbamate의 규제농도를 100ppb 이하로 제한하고 있으며 1986년부터 이미 청주중의 ethyl carbamate를 줄일 수 있는 방법에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다. 그 결과 청주 중의 ethyl carbamate가 효모의 arginine 분해로 생성된 요소로부터 유래함을 확인한 바 있다. 또한 요소 비생산 청주효모의 육종에 관한 연구가 1990년 및 1991년에 이미 보고된 바 있으며 현재 이 균주의 산업화에 관한 연구가 진행 중에 있다.

우리 나라에 있어서는 최근 약주와 탁주에 ethyl carbamate가 함유되어 있다는 사실이 밝혀졌으나 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 함량 분석방법이 확립되지 못하여 회수율이 20% 정도밖에 되지 않는다고 알려져 있다. 또한 전통주의 ethyl carbamate 함량을 감소시키기 위한 연구로는 약주에 함유되어 있는 요소를 제거하기 위하여 내산성 urease의 이용에 관한 기초적 연구가 보고된 바 있을 뿐 거의 연구가 이루어지지 못하였다.

따라서 본 연구에서는 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 분석방법을 확립하고 그 생성 기작을 규명하고자 하였다. 또한 우리 나라 전통주 알코올 효모로부터 단수체 효모를 분리하여 최근 개발된 각종의 유전공학 기술을 이용한 균주 육종의 기초를 마련하고자 하였다. 그리고 각종의 유

전공학 기법을 사용하여 전통주의 생산에 이용되고 있는 각종 효모를 대상으로 arginase 유전자의 발현을 제어함으로써 요소 비생성 알코올 효모를 육종하는 한편 이 재조합 효모를 사용하여 발암성인 ethyl carbamate를 함유하지 않는 전통 발효주의 제조기술을 확립하고자 하였다.

Ⅲ. 연구 개발 내용 및 범위

본 연구의 개발 목표는 탁주, 약주, 동동주, 김천 과하주, 문경 호산춘 등의 전통 발효주와 안동 소주, 문배주 등 전통 증류주의 발효에 관여하는 알코올 효모를 분리, 수집하여 이들의 생리적 특성을 조사하고자 하였다.

이 들 전통주발효에 관여하는 알코올 효모를 대상으로 유전공학적인 방법에 의하여 균주를 개량하는데 있어서 필수적으로 요구되는 단수체 영양요구성 변이주를 분리하여 그 특성을 조사하는 한편 우리 나라 전통주의 제조 및 저장시 발암성 ethyl carbamate 생성기작을 규명하고자 한다.

또한 유전자 조작에 의하여 발효주에 있어서 발암성 ethyl carbamate의 전구물질로 알려져 있는 요소의 생성에 관여하는 효모의 arginase 발현을 감소하도록 균주를 개량하여 발효중 요소를 생산하지 않게 함으로써 발암성으로 알려져 있는 ethyl carbamate를 함유하지 않는 우리 나라 전통주의 제조기술 확립에 있다

본 과제는 2개의 세부과제로 나누어져 있으며 본 과제에서 수행하고자 하였던 연구 개발 범위를 각 세부과제별로 정리하면 다음과 같다.

제1세부과제: 유전자 조작에 의한 요소 비생성 전통주 효모의 육종

구 분	연구 개발목표	연구 개발 내용 및 범위
1차년도 (1997)	전통주 발효에 관여하는 알코올 효모의 분리, 수집 및 특성 조사	<ol style="list-style-type: none"> 1. 전통주 발효에 관여하는 알코올 효모 수집 및 보존 2. 각종 알코올 효모의 동정 및 특성 조사 3. Tetrad analysis에 의한 알코올 효모 단수체 분리 4. 단수체 효모의 ura3, trp1 영양요구성 변이주 분리 5. ura3 및 trp1 변이주의 확인 및 안정성 조사 6. 효모 CAR1 유전자의 분리를 위한 프로브의 제조
2차년도 (1998)	알코올 효모의 arginase (CAR1) 유전자 클로닝 및 분석	<ol style="list-style-type: none"> 1. Southern hybridization에 의한 유전자 단편 확인 2. 유전자 단편의 분리 및 유전자 은행의 제조 3. 유전자 단편함유 클론 분리 4. 분리 유전자의 서브 클로닝 5. 분리 유전자의 염기서열 결정 6. 분리 유전자의 deletion plasmid 제작 7. 효모 형질전환
3차년도 (1999)	효모 CAR1 유전자의 deletion 및 재조합 효모에 의한 전통주 제조기술의 확립	<ol style="list-style-type: none"> 1. CAR1 유전자 deletion 변이주의 분리 2. Southern hybridization에 의한 CAR1 유전자의 deletion 확인 3. 단수체 재조합 효모 융합에 의한 배수체 효모 제조 4. 배수체 재조합 효모의 특성 조사 5. 재조합 효모에 의한 주모의 제조방법 확립 6. 재조합 효모에 의한 전통주 발효특성 조사 7. 재조합 효모에 의한 전통주 제조 실험

제2세부과제: 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 생성기작 규명

구 분	연구 개발목표	연구 개발 내용 및 범위
1차년도 (1997)	각종 전통주의 요소 및 ethyl carbamate 함량조사	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ethyl carbamate 및 요소의 분석기술 확립 2. 각종 전통주의 요소함량 분석 3. 각종 전통주의 ethyl carbamate의 함량 분석 4. 전통주 제조 효모의 arginase 활성 조사 5. 배양조건에 따른 전통주 효모의 arginase 활성 및 요소 생성능 조사
2차년도 (1998)	우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 생성경로 확인	<ol style="list-style-type: none"> 1. 전통주의 발효조건에 따른 요소의 생성 조사 2. 전통주의 살균조건에 따른 ethyl carbamate의 생성 조사 3. 전통주 저장 중의 ethyl carbamate 함량 변화 4. 요소의 첨가에 따른 전통주의 ethyl carbamate의 생성 확인
3차년도 (1999)	재조합 효모로 제조한 전통주의 제조 및 저장 중 ethyl carbamate 함량 조사	<ol style="list-style-type: none"> 1. 재조합 효모의 생리적 특성 변화 및 arginase 활성 조사 2. 재조합 효모의 배양 및 전통주 제조시 요소의 생성능 조사 3. 재조합 효모에 의한 전통주의 제조조건에 따른 ethyl carbamate의 생성 조사 4. 재조합 효모에 의해 제조한 전통주의 저장시 ethyl carbamate의 함량 변화 조사 5. 재조합 효모에 의한 전통주의 주질 및 기호도 평가

IV. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

제 1 절 연구 개발 결과

발암성 ethyl carbamate를 함유하지 않는 우리 나라 전통주의 제조기술 개발을 위하여 두 개의 세부과제로 연구를 수행하였다. 제1세부과제에서는 우리 나라 전통주의 발효에 관여하는 알코올 효모를 분리하여 spore dissection 방법으로 단수체를 분리하고 이 단수체로부터 ura3 변이주를 분리하였다. 이 균주를 대상으로 유전자 조작에 의하여 arginase의 생합성을 제어함으로써 요소 비생성 효모 균주를 개량하여 배수체 재조합 효모를 만들었다. 제2세부과제에서는 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 분석 기술을 확립한 다음 우리 나라 전통주로부터 분리한 알코올 효모를 이용하여 전통주의 제조 기술을 확립하였다. 이 방법에 의하여 각종의 전통주 제조 조건에 따른 ethyl carbamate의 생성 정도를 조사하여 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 생성 기작을 규명하였다. 이상의 결과를 세부과제별로 나누어 정리하면 다음과 같다.

제1세부과제: 유전자 조작에 의한 요소 비생성 전통주 효모 육종

1. 우리 나라 전통주 효모의 분리 및 동정

- 1) 우리 나라의 대표적 전통주인 탁주와 약주의 술덧으로부터 분리한 약 250여 주의 효모 중 각각의 전통주에서 분리한 10주씩의 균주를 자동

동정시스템으로 동정한 결과 탁주와 1종의 약주에서는 10주 모두, 2종의 약주에서는 9주가 *Saccharomyces boulardii*로 동정되었으며 유사도는 64.7-98.3%이었다.

- 2) 자동동정 시스템에 의해 *S. boulardii*로 동정된 균주들 중에서 알코올 발효력이 가장 강한 한 균주 SHY111을 선별하여 Lodder, Barnet, Rij 및 Kurtzman의 분류기준에 따라 *Saccharomyces cerevisiae* 유연균으로 동정하였다.
- 3) 분리균주 SHY111의 온도에 따른 생육특성은 최적 온도는 30℃이었으며 저온과 pH 5.0~9.0 사이에서도 생육이 양호하였다.
- 4) 분리균주 *S. cerevisiae* SHY111의 알코올 발효력을 현재 산업적으로 이용되고 있는 *S. cerevisiae* 발연 1호, *S. coreanus*와 비교한 결과 분리균주가 더욱 발효력이 높았다.

2. 전통주 효모 균주와 효모 표준균주와의 특성 비교

- 1) *S. cerevisiae* SHY-111과 효모 표준균주 *S. boulardii*, *S. coreanus*, *S. cerevisiae* 288c를 사용하여 발효성과 자화성을 조사한 결과, 균주 간의 탄소원 발효성과 자화성은 몇 종류의 당에서만 차이를 나타냈다.
- 2) 분리균주 *S. cerevisiae* SHY-111의 ITS (internal transcribed spacer) 영역을 PCR로 증폭한 결과 PCR 산물의 크기가 동일하였고, 이들 단편을 pUC19 벡터 plasmid에 클로닝한 후 그 염기서열을 조사한 결과 효모 표준균주인 *S. cerevisiae* 288c, *S. coreanus* 및 *S. boulardii*의 것과 동일하여 이들 모두가 유전적으로 매우 가까운 것임을 알 수 있었다.

- 3) 분리 균주 *S. cerevisiae* SHY111과 *S. boulardii*, *S. coreanus*, *S. cerevisiae* 288c 균주의 차이를 알아보기 위하여 RNA intron splicing site의 염기서열을 토대로 합성한 4종류의 PCR primer를 이용하여 PCR을 행한 결과 EI2 primer의 경우 *S. cerevisiae* SHY-111에서만 200bp의 특이적인 band가 관찰되어 나머지 균주와 구별할 수 있었다.
- 4) 전통주 4종류로부터 분리한 균주 40주의 염색체 DNA를 주형으로 하여 primer EI2로 PCR하여 DNA patten을 비교한 결과 우리 나라 전통주에 관여하는 대부분의 효모들은 *S. cerevisiae* SHY111과 모두 유사한 균주로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

3. 단수체 *ura3* 변이주의 분리 및 특성

- 1) 우리 나라 전통주 효모 *S. cerevisiae* SHY111의 포자형성을 위해 presporulation 배지에서 유도기까지 배양한 세포로부터 형성된 포자를 micromanipulator로써 분리하여 단수체 효모를 제조하였다.
- 2) 분리된 각종의 단수체 효모를 이용하여 15% glucose를 함유하는 YPD 배지에서 알코올 발효를 행한 결과 다양한 발효 양상을 나타내어 분리 효모균주가 유전적으로 불안정함을 알 수 있었다.
- 3) 효모의 *ura3* deletion을 위하여 *ura3::NEO*를 함유하는 deletion plasmid를 제작하였다. 그러나 각종의 단수체 효모는 *ura3::NEO* 단편에 의해 homologous recombination이 불가능하였다.
- 4) 각종의 단수체 효모에 ethyl methyl sulfonate를 처리하여 *ura3* 변이주 6a-*ura*와 6c-*ura*를 분리하였으며 이들 변이주들의 생육특성을 조사한 결과 uracil을 첨가한 배지에서 친주세포와 유사한 생육특성을

나타내었다.

4. 요소 비생성 효모 균주의 육종

- 1) Arginase, (CAR1) 유전자의 deletion을 위하여 yeast gene library로부터 콜로니하이브리다이제이션에 의해 CAR1 유전자 단편을 분리하였다. 이 DNA 단편으로부터 1.2kb의 CAR1 유전자를 서브클로닝하여 car1 deletion plasmid의 제작 및 PCR에 의한 antisense CAR1 DNA의 제작에 사용하였다.
- 2) car1::NEO 단편을 함유하는 car1 deletion plasmid를 제작하여, 단수체 ura3 변이주를 형질전환시킨 결과 homologous recombination에 의한 car1 deletion 변이주가 형성되지 않았다.
- 3) Antisense CAR1 DNA를 이용한 arginase의 제어를 위하여 CAR1 유전자 염기서열로부터 start codon을 가지는 염기서열과 전사개시점을 가지는 염기서열을 기준으로 각각의 forward primer를 설계하였으며, start codon으로부터 501 bp 위치의 염기서열을 기준으로 reverse primer를 설계하여 각각 501bp와 550bp의 antisense CAR1-21과 antisense CAR1-31 DNA 단편을 대량 증폭하였다.
- 4) 500bp와 550bp의 antisense CAR1 DNA를 효모 CYC1 프로모터에 fusion한 후 YIp5 벡터 plasmid에 클로닝하여 YMCp21 및 YMCp31 재조합 plasmid를 제작하였다.
- 5) YMCp21 및 YMCp31 plasmid를 ura3 변이주와 대조구로서 TCY1 및 TCY15 균주에 형질전환하여 arginase의 합성을 제어할 수 있는 단수체 재조합 효모를 제조하였다
- 6) 제조한 단수체의 재조합 효모인 6a-ura/YMCP21 및 6c-ura/YMCP21

의 경우 arginase 활성이 대조구인 TCY1과 TCY15에 비하여 최고 95% 정도가 억제되어 그 생산량이 약 5% 정도의 수준을 나타내었다.

7) 재조합 plasmid를 함유하지 않는 전통주 효모 단수체 ura3 변이주 6a-ura, 6c-ura 역시 TCY1 및 TCY15에 비하여 약 10-15% 수준의 arginase를 생산하였다.

5. 배수체 재조합 효모의 제조 및 요소 생성능

- 1) 단수체 재조합 효모 6a-ura/YMCp21과 6c-ura/YMCp21를 mating하여 배수체 재조합 효모를 제조한 후 이를 확인하기 위하여 sporulation 액체배지에서 포자형성을 유도하여 배수체 효모임을 확인하였다.
- 2) 배수체 친주세포 및 재조합 세포의 생육을 YPD 배지와 질소원으로 arginine을 첨가한 YNB 배지에서 조사한 결과 유사한 생육도를 나타내어 antisense CAR1 DNA에 의한 생리적 변화는 거의 없는 것을 확인하였다.
- 3) 배수체 재조합 효모를 이용하여 시험적으로 약주를 제조하였으며 약주의 요소 함량을 측정하여 시판되고 있는 각종 약주의 요소 함량과 비교한 결과 재조합 효모에 의한 약주의 경우 요소의 함량이 최고 95%가 감소하여 시판 약주의 약 4-5% 수준을 나타내었다.
- 4) 배수체 재조합 효모에 의한 전통주의 발효시 발효 초기에 있어서는 발암성 ethyl carbamate의 전구물질인 요소의 함량에 있어서 대조구의 경우와 큰 차이가 없었으나 발효가 진행됨에 따라 요소의 함량이 감소함을 확인하였다.

제2세부과제: 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 생성기작 규명

1. 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 분석 방법 확립

- 1) 전통주로부터 ethyl carbamate를 분석하기 위한 추출 용매로서 사용한 여러 용매 중 클로로포름을 사용하여 30℃에서 1시간 진탕 추출한 경우 회수율이 높게 나타났으나 그 회수율은 기 발표된 내용과 같이 20% 수준 미만이었다.
- 2) 약산성인 탁주의 pH를 알칼리성으로 조절하고 NaCl 또는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 포화시켜 ethyl carbamate를 추출한 결과 회수율이 크게 증가하였으며 특히 pH 9에서 회수율이 약 85-90% 정도로 나타났다.
- 3) 전통주의 ethyl carbamate 전구체인 요소의 함량은 전통주의 종류에 따라 저장 초기에 최저 1.62에서 최고 6.84ppm이었으며, 저장 중 함량의 변화는 그리 크지 않았다.
- 4) 시판 중인 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate의 함량을 분석한 결과 대부분 36-65ppb 정도이었다.

2. *S. cerevisiae* SHY111에 의한 전통주 발효 특성

- 1) *S. cerevisiae* SHY111을 이용하여 초기 당 함량을 25, 30, 35%로 달리하여 약주를 제조한 결과 최종 알코올 함량은 당 함량 증가에 따라 약간 증가하였고, 요소의 함량은 당농도가 높을수록 낮게 나타났다.
- 2) 사입온도를 달리하여 전통주를 제조한 경우 30℃에서 알코올 함량이 가장 높았으며, 일반 성분들은 사입온도가 낮을수록 함량이 낮게 나타난 반면 요소의 함량은 온도가 낮을수록 높게 나타났다.

3. 약주의 제성 및 저장 조건에 따른 ethyl carbamate 생성

- 1) 약주의 발효 후 살균처리를 한 경우 ethyl carbamate의 생성 정도는 비처리구에 비해 ethyl carbamate의 함량이 4배 이상 증가하여 열처리에 의해 ethyl carbamate 생성이 촉진되었으나 60-80℃의 범위에서 처리온도에 의한 차이는 거의 없었다.
- 2) 제조한 전통주를 10, 20, 30℃에서 각기 보관한 결과 20℃이상에서 저장기간이 길 수록 ethyl carbamate의 함량이 증가하였다.
- 3) 전통주 요소의 함량이 많고 저장 기간이 길수록 ethyl carbamate의 함량이 증가하였다.

4. 배수체 재조합 효모의 전통주 발효 특성

- 1) 배수체 재조합 효모 6a-21/6c-21은 친주인 6a/6c에 비해 알코올 생성 속도가 다소 느렸으나 최종 알코올 생성량은 거의 비슷하였다.
- 2) 재조합 효모는 친주에 비해 발효시 산생성력이 높았으며 아미노산 생성력도 더 뛰어난 것으로 나타났다.
- 3) 전통주 발효시 효모 생균수의 변화는 재조합 균주나 친주 모두에서 유사하게 나타났다.

제 2 절 활용에 대한 건의

1. 우리 나라 전통주로부터 발효에 관여하는 알코올 효모 균주들을 분리 하였으며 이중에서 *S. cerevisiae* SHY111은 알코올 발효력이 우수하여 약주나 탁주 생산에 유용한 균주로서 사용할 수 있다.
2. RNA splicing site primer 중 EI primer를 이용하여 여러 종류의 효모 균주로부터 PCR을 수행할 경우 전통주 효모인 SHY111은 200bp의 특징적인 밴드를 확인할 수 있었다. 이는 우리 나라 전통주 효모 SHY111을 다른 효모 균주로 구별하는데 응용할 수 있을 것이다. 또한 이 200bp의 PCR 단편은 *S. cerevisiae* SHY111의 특이적 DNA 단편으로서 그 이용가치가 클 것으로 기대된다.
3. 현재까지 우리 나라 전통주 효모의 단수체 분리에 관하여 보고된 바 없으므로 본 과제에서 처음으로 분리한 전통주 효모의 단수체 균주들은 각종 유전자 조작에 의한 균주개량의 친주세포로 사용할 수 있다.
4. Ura3 영양요구성 변이주의 경우에는 생육에 uracil을 요구하기 때문에 유전자 조작 실험에 있어서 URA3 유전자를 선택 유전자로 가지는 재조합 plasmid의 형질 전환시 positive selection을 위한 수용 세포로서 활용될 수 있다.
5. 전통주에서 분리한 SHY111의 단수체 효모들 중 6a와 6c의 arginase 활성은 기존의 TCY1이나 TCY15에 비해 현저하게 낮은 것으로 밝혀져 ethyl carbamate의 함량이 적은 전통주 제조에 바로 응용할 수 있다.

을 것이다.

6. Arginase 활성에 관여하는 CAR1 유전자의 발현을 억제시킬 수 있는 antisense CAR1 유전자를 설계하여 이를 함유하고 있는 plasmid YMCp21과 YMCp31을 제작하였다. 이 plasmid로 효모에 형질전환시킨 결과 숙주 효모내의 CAR1 유전자의 발현을 억제시킴으로써 약주의 요소 함량에 있어서 다른 약주들에 비하여 최고 약 95%가 감소함을 보였다. 이러한 배수체 재조합 효모를 사용하여 전통주 제조에 응용할 경우 ethyl carbamate 함량이 낮은 전통주를 생산하는데 이용할 수 있을 것이다
7. 본 과제에서 제작한 car1 deletion plasmid pUC19-car1::NEO는 비록 전통주 효모의 homologous recombination에는 실패하였으나 다른 알코올 발효 효모에 형질 전환하여 car1 유전자의 deletion을 유도하는데 응용이 가능하다.
8. 본 연구 수행 과정 중 채택 되었던 antisense RNA 기술을 응용하여 arginase 활성 억제 뿐만 아니라, 효모 균주에 있어서 독특한 방향 물질을 분해시키는 유전자 발현을 억제시켜 향기 물질을 많이 생산하는 효모 균주 제조에도 응용할 수 있을 것이다.
9. 본 과제에서 제작한 antisense CAR1 plasmid 경우 TCY1이나 TCY15과 같은 알코올 효모에 있어서 arginase의 활성이 약 85%가 감소하였으므로 이 plasmid는 다른 알코올 발효 효모에도 응용이 가능하다.

SUMMARY

I. TITLE

Development of Ethyl Carbamate-Free Korean Traditional Liquor by Genetic Engineering of Alcohol Yeast

II. OBJECTIVE AND NECESSITY

Ethyl carbamate (ECA, also known as urethane) is a suspected carcinogen found in a variety of fermented beverages and foods. Several years ago, trace levels of ECA in some types of wine, sherry, whisky, brandy, and sake were detected in Canada. Since this problem is worldwide and involves all fermented beverages, many studies on the mechanism of ECA formation and methods for lowering the ECA content have been reported. ECA has been proposed to be formed by spontaneous chemical reaction of urea and ethanol in wine and sake.

It is well known that urea is formed by arginase in the alcohol yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, which is encoded by the CAR1 gene. Recently, there have been reported that a car1 deletion mutant of a laboratory alcohol yeast strain was constructed and the car1 mutant

produced no urea. These results suggest that there is a possibility to brew the Korean rice wines containing no urea.

Recent development of molecular biology makes possible genetic modifications of yeast strains by recombinant DNA technology. There have been several reports concerning the morphological and physiological characteristics of the Korean traditional liquor yeast. However, little is yet known about the genetic characteristics of Korean wild yeasts and their haploid strains, which have never been isolated, although they can be used more easily for the strain improvement by genetic engineering. This might be due to the fact that microbiological studies conducted on Korean traditional liquors have been largely focused on the microflora in Korean *nuruk* and main mashes. Wild type yeast strains participating in the brewing of rice wine are known to be mainly diploid cells, and they have a pair of chromosomal DNA. Although mutations of a gene occurred on one chromosomal DNA in diploid cells, they cannot be expressed in the presence of an intact form of the gene on the other chromosomal DNA.

Therefore, this study was conducted in order to isolate haploid strain of the Korean traditional rice wine yeasts and construct its arginase deficient strain for possible reduction of urea in the wines. We also have tried to elucidate the role of urea in the formation of ECA as well as the role of the CAR1 gene product, arginase, in the formation of urea in Korean traditional rice wines.

III. SCOPES OF THE STUDY

This project consists of two subjects for efficient fulfillment of the research on the development of carcinogenic ethyl carbamate-free rice wine. One is the construction of non-urea producing strain from Korean traditional liquor yeasts by genetic engineering techniques. The other is the elucidation of the mechanism for ECA formation in Korean traditional liquors. Major contents and scopes of this project can be summarized as follows:

III-1. Construction of non-urea producing strain from Korean traditional liquor yeasts by recombinant DNA technology

1. Isolation and characterization of alcohol yeasts participating in the brewing of Korean traditional liquors
 - 1) Isolation of alcohol yeasts from various Korean traditional liquors
 - 2) Identification and characterization of the yeasts using traditional methods and PCR techniques
 - 3) Differentiation of the isolated strain from yeast type strains using PCR and ITS (internal transcribed spacer) sequencing analysis
 - 4) Isolation of haploid strains from the yeasts by spore dissection using a micromanipulator
 - 5) Construction of *ura3* auxotrophic mutant from the yeast haploid strain

- 6) Characterization of the haploid *ura3* mutant

2. Cloning of yeast arginase (CAR1) gene and construction of *car1* deletion plasmid
 - 1) Construction of yeast gene library for the isolation of CAR1 gene fragment
 - 2) Isolation of yeast CAR1 DNA fragment-containing plasmid by colony hybridization
 - 3) Subcloning of yeast CAR1 DNA fragment for the use of a CAR1 template DNA
 - 4) Analysis of the CAR1 DNA sequences
 - 5) Construction of a *car1* deletion plasmid
 - 6) Yeast transformation using *car1* deletion plasmid

3. Characterization of recombinant *car1* deletion mutant
 - 1) Construction of haploid *car1* mutant
 - 2) Confirmation of the *car1* deletion mutation in mutants
 - 3) Physiological characteristics of the haploid recombinant yeast strain
 - 4) Arginase activity of the recombinant yeast
 - 5) Construction of diploid recombinant *car1* deletion mutant
 - 6) Physiological characteristics of the diploid recombinant yeast
 - 7) Urea production in the Korean traditional liquor fermented by the diploid recombinant yeast

III-2. Elucidation of a mechanism for ethyl carbamate formation in Korean traditional liquors

1. Determination of ethyl carbamate content in various Korean traditional liquors
 - 1) Development of methods for ethyl carbamate and urea content determination in Korean traditional liquors
 - 2) Determination of urea content in various Korean traditional liquors
 - 3) Determination of ethyl carbamate content in various Korean traditional liquors
 - 4) Arginase activity assay in Korean alcohol yeasts
 - 5) Urea formation by Korean alcohol yeasts

2. Elucidation of a mechanism for ethyl carbamate formation in Korean traditional liquors
 - 1) Effect of fermentation conditions on the urea formation
 - 2) Ethyl carbamate formation based on the sterilization conditions of Korean traditional liquors
 - 3) Changes of ethyl carbamate concentration in Korean traditional liquors during storage
 - 4) Effect of urea concentration on the ethyl carbamate formation

3. Fermentation characteristics of Korean traditional liquor by diploid recombinant yeast strain
 - 1) Physiological characteristics of the diploid recombinant yeast

- 2) Arginase activity of the diploid recombinant yeast
- 3) Fermentation characteristics by the diploid recombinant yeast
- 4) Urea formation by the diploid recombinant yeast

IV. RESULTS AND APPLICATION

1. Isolation and characterization of an alcohol yeast from Korean traditional liquors

- 1) Isolation of Korean takju and yakju yeasts
 - Various alcohol yeast strains participating in the brewing of Korean of takju and yakju were isolated. Among them, *S. cerevisiae* SHY111 was found to be a useful alcohol yeast strain which can be industrially applied for the production of takju and yakju.
- 2) Establishment of differentiation method for the Korean yakju yeast from other yeast type strains
 - PCR using RNA intron splicing site primer resulted in the amplification of the *S. cerevisiae* SHY111 specific 200bp DNA fragment. This can be applied for the differentiation of the strain from other yeast type strains. It would be very interesting to analyze the 200bp DNA fragment in more detail, because this fragment is the Korean yakju yeast specific.

- 3) Isolation of haploid strains of the Korean yakju yeast
 - Several haploid strains were isolated from the Korean yakju yeast by spore dissection. These strains can be applied for introduction of another selective marker for the genetic engineering of the Korean yakju yeast

- 4) Construction of haploid *ura3* auxotrophic mutant of the yakju yeast
 - Auxotrophic mutant is very important in the genetic modification of a gene, because it can be used as a recipient strain for the positive selection of the genetically engineered transformant. These strains can be applied for the strain improvement by the recombinant DNA technology.

2. Cloning of yeast *CAR1* gene and construction of *car1* deletion plasmid

- 1) Isolation and subcloning of the *CAR1* DNA fragment
 - Yeast *CAR1* DNA fragments were isolated and subcloned into a vector plasmid. This plasmid can be used as a probe for the isolation of *CAR1* gene from other microorganisms, and as a template DNA for the amplification of a specific region of the yeast *CAR1* gene.

2) Construction of a car1 deletion plasmid

-A recombinant plasmid containing car1::NEO fragment for the car1 deletion was constructed. Although resulted in a failure in the homologous recombination in the Korean yakju yeast, it is highly applicable for the deletion of CAR1 gene in other yeasts.

3) Construction of antisense CAR1 DNA plasmid

-Two plasmids containing yeast CYC1 promoter fused to antisense CAR1 DNA fragment were constructed. These recombinant plasmids can be transformed into any other yeast strain which has a ura3 marker for the repression of the arginase synthesis in yeast cells and produce a very low level of urea in alcoholic beverages and fermented foods.

3. Construction of diploid recombinant yeast strain producing a low level of urea in yakju

-This strain can be applied for the production of takju and yakju containing a low level of urea, which is a precursor of the carcinogenic ethyl carbamate. Therefore, it is possible to produce ethyl carbamate-free takju or yakju.

4. Development of a method for ethyl carbamate determination in Korean takju and yakju

-An improved method for the determination of ethyl carbamate content in Korean traditional liquors was developed. This method can be applied for the determination of carcinogenic ethyl carbamate concentration in Korean liquors.

5. Elucidation of a mechanism for ethyl carbamate formation in yakju

-The mechanism for the ethyl carbamate formation in Korean traditional liquors was found to be the chemical reaction of urea and ethanol at high temperature.

6. Development of yakju brewing method using Korean wild type yeast and recombinant strain

-A brewing method for yakju using the wild type and recombinant yakju yeast was established.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	34
1-1. Objective and scope	34
1. Objective	34
2. Scope	37
Chapter 2. Construction of non-urea producing Korean traditional liquor yeast	40
2-1. Introduction	40
2-2. Materials and methods	44
1. Strains and plasmid DNA	44
2. Media and culture conditions	44
3. Isolation of yeast	46
4. Storage of microorganism	46
5. Classification of yeasts by metabolic fingerprint	46
6. Identification	47
7. Measurement of microbial growth	47
8. Measurement of fermentation ratio	47
9. Mating and sporulation	48
10. Isolation and manipulation of plasmid DNA	48
11. Isolation of yeast chromosomal DNA	50

12. Polymerase chain reaction(PCR)	51
13. Agarose gel electrophoresis	53
14. Transformation	53
15. Yeast arginase assay	54
2-3. Characteristics of Korean traditional liquor yeast	56
1. Isolation	56
2. Identification	59
3. Physiological characteristics	63
4. Fermentation characteristics	66
5. Fermentation ratio	70
2-4. Differentiation of Korean traditional liquor yeast	
from yeast type strains	72
1. Sugar assimilation and fermentation	72
2. ITS (internal transcribed spacer) sequences	74
3. RNA intron splicing site	79
2-5. Construction and characterization haploid ura3 mutant	83
1. Constructin of haploid by spore dissection	83
2. Isolation of haploid ura3 mutant	88
3. Characteristics of haploid ura3 mutant	93
2-6. Construction of car1 deletion plasmid	95
1. Isolation of CAR1 DNA fragment	95
2. Subcloning and construction of car1 deletion plasmid	101
3. Yeast transformation	103

2-7. Antisense-mediated repression of arginase gene expression	105
1. Construction of CYC1-antisense CAR1 DNA	105
2. Construction of CYC1-antisense CAR1 expression vector	111
3. Integration of CYC1-antisense CAR1 plasmid	115
4. Arginase activity in recombinant yeast	116
2-8. Urea formation by diploid recombinant yeast	119
1. Construction of diploid recombinant yeast	119
2. Characteristics of diploid recombinant yeast	121
3. Urea formation	122
2-9. Conclusion	125

Chapter 3. Formation of ethyl carbamate in Korean

traditional liquor	131
3-1. Introduction	131
3-2. Materials and methods	133
1. Preparation of yakju	133
2. Fermentation characteristics	134
3. Ethyl carbamate content assay	134
4. Urea content assay	136
3-3. Ethyl carbamate in Korean traditional liquors	137
1. Development of ethyl carbamate assay method	137
2. Urea content in Korean traditional liquors	145
3. Ethyl carbamate content in Korean traditional liquors	149

3-4. Fermentation characteristics by <i>S. cerevisiae</i> SHY111	152
1. Yakju fermentation by <i>S. cerevisiae</i> SHY111	152
2. Effect of sugar content	154
3. Effect of fermentation temperature	158
3-5. Formation of ethyl carbamate in yakju	163
1. Effect of sterilization condition	163
2. Effect of storage condition	165
3. Effect of initial urea content	166
3-6. Fermentation characteristics of recombinant yeasts	168
3-7. Conclusion	173
Chapter 4. General conclusions	177
REFERENCES	184

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
SUMMARY	17
CONTENTS	26
목 차	30
제 1 장 서 론	34
제1절 연구 개발의 목적과 범위	34
1. 연구 개발의 목적	34
2. 연구 개발 범위	37
제 2 장 유전자조작에 의한 요소 비생성 전통주 효모의 육종	40
제1절 서 설	40
제2절 재료 및 방법	44
1. 사용 균주 및 plasmid DNA	44
2. 배지 및 균의 배양	44
3. 우리 나라 전통주 효모의 분리	46
4. 균의 보관	46
5. 미생물 자동 동정시스템을 이용한 분류	46
6. 균의 동정	47

7. 생육도 측정	47
8. 발효율 측정	47
9. 배수체 포자형성	48
10. Plasmid DNA 분리 및 조작	48
11. 효모 염색체 DNA의 분리	50
12. Polymerase chain reaction에 의한 DNA 단편의 증폭	51
13. DNA 전기영동	53
14. 형질전환	53
15. 효모 arginase 활성 조사	54
제3절 전통주 알코올 효모의 분리 및 동정	56
1. 우리 나라 전통주 효모의 분리	56
2. 전통주 알코올 효모의 동정	59
3. 전통주 알코올 효모의 생리적 특성	63
4. 전통주 효모의 발효 특성	66
5. 산업용 균주와의 알코올 발효력 비교	70
제4절 <i>S. cerevisiae</i> SHY111과 표준균주와의 특성 비교	72
1. 당 이용성 및 발효성	72
2. ITS (internal transcribed spacer) 염기서열	74
3. RNA splicing site	79
제5절 단수체 <i>ura3</i> 변이주의 분리 및 특성	83
1. Spore dissection에 의한 단수체 효모의 분리 및 특성	83
2. 단수체 효모의 <i>ura3</i> 변이주 분리	88
3. 단수체 효모 <i>ura3</i> 변이주의 특성	93

제6절 효모 CAR1 유전자의 deletion plasmid 제작	95
1. 효모 CAR1 유전자 단편의 분리	95
2. CAR1 유전자의 서브클로닝 및 deletion plasmid 제작	101
3. car1::NEO 유전자 단편의 효모 형질전환	103
제7절 Antisense CAR1에 의한 요소 비생성 효모 균주의 개량	105
1. 효모 CYC1-antisense CAR1 DNA의 제작	105
2. 효모 CYC1-antisense CAR1 DNA의 YIp 벡터에의 클로닝	111
3. 효모 형질전환 및 CYC1-antisense CAR1의 integration	115
4. 재조합 효모의 arginase 활성 조사	116
제8절 배수체 재조합 효모의 생리적 특성 및 요소 생성능	119
1. 배수체 재조합 효모의 제조	119
2. 배수체 재조합 효모의 생육도	121
3. 배수체 재조합 효모의 전통주 제조시 요소 생성능	122
제9절 결 론	125

제 3 장 우리나라 전통주 ethyl carbamate 생성기작 규명

제1절 서 설	131
제2절 재료 및 방법	133
1. 약주의 제조	133
2. 전통주의 일반적인 발효 특성 조사	134
3. Ethyl carbamate 정량	134
4. 전통주의 요소 함량 측정	136

제3절	우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 분석방법 확립	137
1.	Ethyl carbamate의 분석기술 확립	137
2.	각종 전통주의 요소함량 분석	145
3.	각종 전통주의 ethyl carbamate 함량 분석	149
제4절	<i>S. cerevisiae</i> SHY111의 전통주 발효 특성	152
1.	<i>S. cerevisiae</i> SHY111에 의한 전통주 발효의 경과	152
2.	담금 당 농도의 영향	154
3.	발효 온도의 영향	158
제5절	약주의 제성 및 저장 조건에 따른 ethyl carbamate 생성	163
1.	살균 조건의 영향	163
2.	저장 조건의 영향	165
3.	초기 요소 농도의 영향	166
제6절	배수체 재조합 효모에 의한 전통주의 발효특성	168
제7절	결 론	173
제 4 장	총 합 결 론	177
참 고 문 헌	184

제 1 장 서 론

제1절 연구 개발의 목적과 범위

1. 연구 개발의 목적

우리 나라의 주류시장은 대내적으로 시장 진입제도의 완화 및 자유화의 진행과 대외적으로는 시장개방이 본격화됨에 따라 새로운 국면을 맞고 있다. 영국, 프랑스, 독일, 이태리, 미국 등의 선진국에서는 나름대로의 명주를 가지고 있으며, 최근에는 일본의 청주 역시 세계시장의 진출을 강화하고 있으나, 우리 나라의 대표적인 전통주인 탁주, 약주 등은 국제 경쟁력이 매우 약한 실정이다.

현재, 우리 나라에는 탁주, 약주 등의 중소 제조업체를 포함하여 약 1,300여 개의 주류 제조업체가 영업 중에 있다고 한다. 그러나 현재 우리나라의 주류시장 대부분은 맥주나 소주가 점령하고 있으며 이들 주류와 양주시장은 점점 증가추세에 있으나, 우리 나라 전통주인 탁주 및 약주의 시장은 점차 위축되고 있는 실정이다. 최근 들어 급격하게 쏟아져 들어오는 다양한 수입주류와 국산 신제품의 공세에 밀려 탁주의 시장 점유율은 맥주, 소주, 위스키에 이어 제 4위를 기록하고 있을 뿐이다. 현재 탁주는 극히 소량이 외국으로 수출되고 있을 뿐 93년 현재 매출액 1,485억 정도의 국내 시장을 형성하고 있으며, 국내 소비자에게 점차 외면당하고 있다. 또한 대부분의 탁주 소비자는 저소득, 고연령층이 대부분으로서 고급술 선호추세에 밀려 그 위치를 점점 잃어가고 있다.

따라서, 우리 나라 전통주를 계승발전시키기 위하여는 이들에 대한 폭

넓은 연구가 수행되어야 할 것이지만 이들 업체의 대부분은 그 규모가 영세하여 주질의 개선을 위한 충분한 연구를 수행하기가 곤란하다. 앞으로 외국주류의 수입이 더욱 증가될 것으로 예상되어 경쟁력이 미약한 한국 전통주의 보존 및 계승을 위하여는 주질 개선을 비롯하여 여러 분야에서 다각적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

우리 나라 전통주에 대한 연구는 대부분이 무증자 당화 탁주의 제조 기술과 살균, 저장성 증가 기술, 발효 또는 저장 중의 미생물학적 연구 및 이화학적 변화에 관한 연구가 대부분을 차지하고 있다. 최근 분자생물학과 유전공학의 발달로 유전자 조작에 의한 각종 미생물의 육종에 관한 연구가 보고되고 있으나 우리 나라 전통주 효모에 관한 연구는 극히 초기 단계에 있다. 현재까지 유전자 조작에 의한 효모 균주의 육종시 필수적으로 요구되는 단수체 효모의 분리조차 보고된 바 없는 실정이다. 알코올 효모의 유전자 조작에 관하여 최근 외국에서 활성화 된 연구는 요소 비생성 알코올 효모의 육종이다.

각종의 주류에는 ethyl carbamate가 상당량 함유되어 있는데 이것은 강력한 발암물질로 알려져 있다. 이러한 ethyl carbamate는 효모의 arginine 분해효소인 arginase에 의해 arginine으로부터 생성된 요소가 에탄올과 반응하여 생성하는 것으로 알려져 있다. 외국에서는 이미 오래 전부터 각종 주류의 ethyl carbamate에 관하여 많은 관심을 가져 왔다.

1985년 11월에는 캐나다 온타리오주의 Liquor Control Board에 의해 캐나다에 시판되고 있는 알코올 음료에 ethyl carbamate가 다량 함유되어 있음이 발표된 이후 Health Protection Branch에 의해 그해 12월 효모에 의한 발효시 요소의 사용에 대한 금지조치가 행하여졌다. 미국의 경우에는 1988년 5월 이미 수입되는 포도주와 증류주에 대하여 ethyl carbamate

기준치를 준수할 것을 미국에 주류를 수출하는 7개 국가에 이미 요청한 바 있다. 일본의 경우 청주에 있어서 ethyl carbamate의 규제농도를 100ppb 이하로 제한하고 있으며 1986년부터 이미 청주중의 ethyl carbamate를 줄일 수 있는 방법에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다. 그 결과 청주 중의 ethyl carbamate가 효모의 arginine 분해로 생성된 요소로부터 유래함을 확인한 바 있다. 또한 요소 비생산 청주효모의 육종에 관한 연구가 1990년 및 1991년에 이미 보고된 바 있으며 현재 이 균주의 산업화에 관한 연구가 진행 중에 있다.

우리 나라에 있어서는 최근 약주와 탁주에 ethyl carbamate가 함유되어 있다는 사실이 밝혀졌으나 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 함량 분석방법이 확립되지 못하여 회수율이 20% 정도밖에 되지 않는다고 알려져 있다. 또한 전통주의 ethyl carbamate 함량을 감소시키기 위한 연구로는 약주에 함유되어 있는 요소를 제거하기 위하여 내산성 urease의 이용에 관한 기초적 연구가 보고된 바 있을 뿐 거의 연구가 이루어지지 못하였다.

따라서 본 연구에서는 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 분석방법을 확립하고 그 생성 기작을 규명하고자 하였다. 또한 우리 나라 전통주 알코올 효모로부터 단수체 효모를 분리하여 최근 개발된 각종의 유전공학 기술을 이용한 균주 육종의 기초를 마련하고자 하였다. 그리고 각종의 유전공학 기법을 사용하여 전통주의 생산에 이용되고 있는 각종 효모를 대상으로 arginase 유전자의 발현을 제어함으로써 요소 비생성 알코올 효모를 육종하는 한편 이 재조합 효모를 사용하여 발암성인 ethyl carbamate를 함유하지 않는 전통 발효주의 제조기술을 확립하고자 하였다.

2. 연구 개발 내용 및 범위

본 연구의 개발 목표는 탁주, 약주, 동동주, 김천 과하주, 문경 호산춘 등의 전통 발효주와 안동 소주, 문배주 등 전통 증류주의 발효에 관여하는 알코올 효모를 분리, 수집하여 이들의 생리적 특성을 조사하고자 하였다.

이들 전통주의 발효에 관여하는 효모를 대상으로 유전공학적인 방법에 의하여 균주를 개량하는데 있어서 필수적으로 요구되는 단수체 영양요구성 변이주를 분리하여 그 특성을 조사하는 한편 우리 나라 전통주의 제조 및 저장시 발암성 ethyl carbamate 생성기작을 규명하고자 한다.

또한 유전자 조작에 의하여 발효주에 있어서 발암성 ethyl carbamate의 전구물질로 알려져 있는 요소의 생성에 관여하는 효모의 arginase 발현을 감소하도록 균주를 개량하여 발효중 요소를 생산하지 않게 함으로써 발암성으로 알려져 있는 ethyl carbamate를 함유하지 않는 우리 나라 전통주의 제조기술 확립에 있다.

본 과제는 2개의 세부과제로 나누어져 있으며 본 과제에서 수행하고자 하였던 연구 개발 범위를 각 세부과제별로 정리하면 다음과 같다.

제1세부과제: 유전자 조작에 의한 요소 비생성 전통주 효모의 육종

구 분	연구 개발목표	연구 개발 내용 및 범위
1차년도 (1997)	전통주 발효에 관여하는 알코올 효모의 분리, 수집 및 특성 조사	<ol style="list-style-type: none"> 1. 전통주 발효에 관여하는 알코올 효모 수집 및 보존 2. 각종 알코올 효모의 동정 및 특성 조사 3. Tetrad analysis에 의한 알코올 효모 단수체 분리 4. 단수체 효모의 ura3, trp1 영양요구성 변이주 분리 5. ura3 및 trp1 변이주의 확인 및 안정성 조사 6. 효모 CARI 유전자의 분리를 위한 프로브의 제조
2차년도 (1998)	알코올 효모의 arginase (CARI) 유전자 클로닝 및 분석	<ol style="list-style-type: none"> 1. Southern hybridization에 의한 유전자 단편 확인 2. 유전자 단편의 분리 및 유전자 은행의 제조 3. 유전자 단편함유 클론 분리 4. 분리 유전자의 서브 클로닝 5. 분리 유전자의 염기서열 결정 6. 분리 유전자의 deletion plasmid 제작 7. 효모 형질전환
3차년도 (1999)	효모 CARI 유전자의 deletion 및 재조합 효모에 의한 전통주 제조기술의 확립	<ol style="list-style-type: none"> 1. CARI 유전자 deletion 변이주의 분리 2. Southern hybridization에 의한 CARI 유전자의 deletion 확인 3. 단수체 재조합 효모 융합에 의한 배수체 효모 제조 4. 배수체 재조합 효모의 특성 조사 5. 재조합 효모에 의한 주모의 제조방법 확립 6. 재조합 효모에 의한 전통주 발효특성 조사 7. 재조합 효모에 의한 전통주 제조 실험

제2세부과제: 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 생성기작 규명

구 분	연구 개발목표	연구 개발 내용 및 범위
1차년도 (1997)	각종 전통주의 요소 및 ethyl carbamate 함량조사	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ethyl carbamate 및 요소의 분석기술 확립 2. 각종 전통주의 요소함량 분석 3. 각종 전통주의 ethyl carbamate의 함량 분석 4. 전통주 제조 효모의 arginase 활성 조사 5. 배양조건에 따른 전통주 효모의 arginase 활성 및 요소 생성능 조사
2차년도 (1998)	우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 생성경로 확인	<ol style="list-style-type: none"> 1. 전통주의 발효조건에 따른 요소의 생성 조사 2. 전통주의 살균조건에 따른 ethyl carbamate의 생성 조사 3. 전통주 저장 중의 ethyl carbamate 함량 변화 4. 요소의 첨가에 따른 전통주의 ethyl carbamate의 생성 확인
3차년도 (1999)	재조합 효모로 제조한 전통주의 제조 및 저장 중 ethyl carbamate 함량 조사	<ol style="list-style-type: none"> 1. 재조합 효모의 생리적 특성 변화 및 arginase 활성 조사 2. 재조합 효모의 배양 및 전통주 제조시 요소의 생성능 조사 3. 재조합 효모에 의한 전통주의 제조조건에 따른 ethyl carbamate의 생성 조사 4. 재조합 효모에 의해 제조한 전통주의 저장시 ethyl carbamate의 함량 변화 조사 5. 재조합 효모에 의한 전통주의 주질 및 기호도 평가

제 2 장 유전자조작에 의한 요소 비생성 전통주 효모의 육종

제1절 서 설

우리 나라의 국민 1인당 술 소비량은 100% 알코올로 환산할 경우 93년 현재 약 6.6 L로서 세계 23-24위 수준이며, 주류산업은 세계 제 22위 맥주 생산국이라는 것을 제외하고는 국제적으로 필적할 만한 제품과 전략을 갖지 못하고 있다. 우리 나라의 전통주인 탁·약주는 주류 시장이 제도적으로 보장되어 온 내수를 중심으로 수십 년을 지내온 결과로서 국제 경쟁력이 극히 취약한 상태에 있다. 또한 최근 들어 급격하게 쏟아져 들어오는 다양한 수입주류와 국산 신제품의 공세에 밀려 탁주의 시장 점유율은 맥주, 소주, 위스키에 이어 제 4위를 기록하고 있다. 탁주는 극히 소량이 외국으로 수출되고 있을 뿐 93년 현재 매출액 1,485억의 국내 시장을 형성하고 있으며, 국내 소비자에게 점차 외면 당하고 있는 실정이다. 현재 대부분의 탁주 소비자는 저소득, 고 연령층이 대부분으로서 고급술 선호추세에 밀려 그 위치를 점점 잃어가고 있다. 이는 최근 과학의 발달로 인하여 세계적으로 식품의 경향이 품질의 고급화 및 위생적인 측면에 대한 관심이 날로 증가하기 때문으로 추정된다.

현재까지 우리 나라 전통주에 대한 연구는 대부분이 무증자 당화 탁주의 제조 기술과 살균, 저장성 증가 기술, 발효 또는 저장 중의 미생물학적 연구 및 이화학적 변화에 관한 연구가 대부분을 차지하고 있다. 우리 나라 전통주 알코올 효모로는 한 종의 *Saccharomyces coreanus*와 두

종의 *Saccharomyces cerevisiae*의 분리 및 특성에 관한 연구보고가 있을 뿐 이 균주의 단수체 효모조차도 현재까지 분리된 바 없는 실정이다.

알코올 발효음료에는 발암성으로 알려져 있는 ethyl carbamate가 상당량 함유되어 있는데 이것은 효모의 arginine 분해효소인 arginase에 의해 arginine으로부터 생성된 요소가 에탄올과 반응하여 생성하는 것으로 알려져 있다. 외국에서는 이미 오래 전부터 각종 주류의 ethyl carbamate에 관하여 많은 관심을 가져 왔다. 1985년 11월에는 캐나다 온타리오주의 Liquor Control Board에 의해 캐나다에 시판되고 있는 알코올 음료에 ethyl carbamate가 다량 함유되어 있음이 발표된 이후 Health Protection Branch에 의해 그해 12월 효모에 의한 발효시 요소의 사용에 대한 금지 조치가 행하여졌다. 일본의 경우 청주에 있어서 ethyl carbamate의 규제 농도를 100ppb 이하로 제한하고 있으며 미국의 경우에는 1988년 5월 이미 수입되는 포도주와 증류주에 대하여 ethyl carbamate 기준치를 준수할 것을 미국에 주류를 수출하는 7개 국가에 이미 요청한 바 있다. 일본의 경우 1986년부터 이미 청주중의 ethyl carbamate를 줄일 수 있는 방법에 관한 많은 연구가 진행되어 청주 중의 ethyl carbamate가 효모의 arginine 분해로 생성된 요소로부터 유래함을 확인하였으며 요소 비생산 청주효모의 육종에 관한 연구가 1990년 및 1991년에 이미 보고된 바 있다.

효모에서 arginine은 CAR1 유전자의 산물인 arginase에 의해 ornithine과 요소로 분해된 후 ornithine은 다시 CAR2 유전자가 코딩하는 ornithine 아미노기 전달효소 (ornithine transaminase, EC 2,6,1,13)에 의해 아미노기가 α -keto glutaric acid에 전이되어

glutamate를 생성함과 동시에 γ -glutamyl semialdehyde로 전환된다. 생성된 γ -glutamyl semialdehyde는 PRO 또는 PUT 유전자 산물들에 의해 glutamate 또는 proline의 생합성에 이용되게 된다. 한편 arginase에 의해 생성된 요소는 효모에 의해 서서히 분해되기 때문에 그 일부가 술 속에 남아 후에 발암성의 ethyl carbamate로 전환되게 된다.

최근 분자생물학의 발달로 인하여 효모 CAR1 유전자의 발현 조절 현상에 관하여는 많은 연구보고가 있다. CAR1 유전자의 분자생물학적 연구로는 1984년 Sumrada와 Cooper에 의해 유전자가 처음으로 클로닝되고 그 염기서열이 밝혀진 이후 발현의 조절에 관여하는 cis-acting element와 여기에 결합하는 DNA 결합 단백질들에 관하여 많은 연구가 진행되었다. CAR1 유전자의 발현은 배지내에 arginine이 존재할때 고도로 유도되며 proline이나 glutamate 배지에서는 발현이 억제된다. 이러한 현상은 Northern 하이브리다이제이션과 arginase 활성 및 CAR1 프로모터-lacZ fusion plasmid를 이용한 β -galactosidase 활성등의 측정으로 밝혀졌다. 그후 1990년 Kovari 등에 의해 CAR1 유전자의 프로모터 분석에 의해 cis-acting element들에 관한 세부적인 연구가 이루어져 CAR1 프로모터 영역이 발현을 activation시키는데 관여하는 UAS_{C1}과 UAS_{C2} (constitutive upstream activation sequence 1 & 2), arginine에 의한 유도에 관여하는 UAS_I(inducible upstream activation sequence) 및 억제에 관여하는 URS1(upstream repression sequence 1)으로 구성되어 있음이 밝혀졌다. arginine에 의한 CAR1 유전자의 발현 유도에 관여하는 UAS_I에는 ARG80, ARG81, MCM1 및 현재까지 알려지지 않은 적어도 1개 이상의 또 다른 단백질이 작용하는 것

으로 알려져 있다. Glutamate 또는 proline에 의한 CAR1 유전자의 발현 억제 현상에 관여하는 URS1은 내부에 AGCCGCCCA 염기서열을 가지고 있다.

이와 같이 실험실에서 연구에 사용되는 효모의 CAR1 유전자 발현 조절에 관하여는 많은 연구보고가 있다. 또한, 실제 주류산업에 사용되고 있는 알코올 효모에 있어서는 일본에서 청주효모를 대상으로 CAR1 유전자 결실에 의한 요소 비생성 균주의 개량에 관한 연구가 보고가 있으며 현재 이 균주의 산업화를 위한 연구가 수행중에 있다.

그러나, 우리 나라에 있어서는 전통주에 ethyl carbamate가 함유되어 있다는 사실이 최근 밝혀진 것과, 약주에 함유되어 있는 요소를 제거하기 위하여 내산성 urease의 이용에 관한 기초적 연구가 보고된 바 있을 뿐 전통주의 ethyl carbamate에 관하여 거의 연구가 이루어지지 못하였다.

본 연구에서는 우리 나라 전통주의 발효에 관여하는 전통주 효모를 분리하고 tetrad dissection에 의한 단수체 효모를 분리하여 유전공학적 방법에 의한 효모균주의 육종을 위한 기초를 마련하였다. 이 효모의 arginase 합성을 제어함으로써 알코올 발효 중 요소의 생산을 억제할 수가 있으며, 전통주의 ethyl carbamate 생성을 방지할 수가 있을 것이다. 따라서, 최근 균주 개량에 널리 이용되고 있는 유전공학 기법을 사용하여 CAR1 유전자의 발현을 제어함으로써 요소 비생성 알코올 효모를 육종하는 한편 이 재조합 효모를 사용하여 발암성인 ethyl carbamate를 함유하지 않는 전통 발효주의 생산기술을 확립하고자 하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 사용 균주 및 plasmid DNA

본 실험에 사용된 균주 및 plasmid DNA는 Table 2-2-1과 같다. 전통주 효모 균주로 *Saccharomyces cerevisiae* SHY111, 알코올 효모 표준균주로는 *S. cerevisiae* S288c, KCCM11215, TCY1 및 TCY15와 *Saccharomyces boulardii*를 사용하였다. Plasmid pMC21과 pMC31의 제작을 위한 벡터 plasmid로는 pUC19를 사용하였으며, plasmid YMCp21과 YMCp31의 제작을 위하여는 YIp5를 사용하였다. 각종 유전자 단편의 분리를 위하여는 CYC1 프로모터를 함유하고 있는 pLG669Z, NEO 유전자를 함유하고 있는 pGTy-917 π N, CAR1 유전자를 함유하고 있는 pUC19-CAR1을 사용하였다. Plasmid DNA의 증폭 및 보존을 위하여는 *Escherichia coli* HB101을 사용하였다.

2. 배지 및 균의 배양

E. coli HB101의 배양을 위해서 Luria-Bertani(LB) 액체배지를 사용하였으며, 대장균의 형질전환용 선택배지는 selective marker인 sodium ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가한 LB 평판배지를 사용하였다. 효모의 배양을 위해서 YPD 액체배지를 사용하였으며, 최소배지로 YNB 배지를 사용하였다. 효모의 형질전환용 선택배지는 YNB 배지에, L-lysine(25 mg/l)을 첨가한 평판배지를 사용하였으며, arginase 효소의 활성을 측정하기 위하여는 YNB 배지에 유도물질 및 질소원으로 0.1% arginine을 첨가한 배지를 사용하였다(Table 2-2-2).

Table 2-2-1. Strains and plasmids used.

Strain and plasmid	Relevant genotype
Strain	
<i>S. cerevisiae</i> SHY111	Wild-type Korean traditional yeast
<i>S. cerevisiae</i> 6a	Haploid of strain SHY111
<i>S. cerevisiae</i> 6c	Haploid of strain SHY111
<i>S. cerevisiae</i> KCCM11215	Wild type alcohol yeast(formerly <i>S. coreanus</i>)
<i>S. cerevisiae</i> TCY1	MAT α , lys2, ura3
<i>S. cerevisiae</i> TCY15	MAT α , lys5, ura3
<i>S. boulardii</i>	Wild type
<i>E. coli</i> HB101	hsdS20(r ⁻ ,m ⁻), recA13, supE44, proA2, rpsL20(Sm ^r)
Plasmid DNA	
pUC19	Ap ^r , lacI', lacZ
YIp5	Ap ^r , Tc ^r , URA3
pGTY-917 π N	Ap ^r , URA3, NEO, 2 μ
pUC19-ura::NEO	Ap ^r , lacI', lacZ, ura3::NEO
pUC19-car1::NEO	Ap ^r , lacI', lacZ, car1::NEO
pHPCAR1-37	Ap ^r , CAR1
pUC19-CAR1	Ap ^r , CAR1
pLG669Z	Ap ^r , Tc ^r , URA3, P _{CYC1} - lacZ, 2 μ
pMC21	Ap ^r , lacZ, P _{CYC1} -antisense CAR1-21
pMC31	Ap ^r , lacZ, P _{CYC1} -antisense CAR1-31
YMCp21	Ap ^r , Tc ^r , URA3, P _{CYC1} -antisense CAR1-21
YMCp31	Ap ^r , Tc ^r , URA3, P _{CYC1} -antisense CAR1-31

Table 2-2-2. The composition of media.

Media	Ingredient	Concentration(% w/v)
LB medium	Yeast extract	0.5
	Tryptone	1.0
	NaCl	1.0
YPD medium	Yeast extract	1.0
	Bacto peptone	2.0
	Glucose	2.0
YNB medium	Yeast nitrogen base(w/o AA & AS)	0.17
	Glucose	2.0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
Fermentation medium	Yeast extract	1.0
	Bacto peptone	2.0
	Glucose	15.0

3. 우리 나라 전통주 효모의 분리

본 실험에서 우리 나라 전통주 알코올 효모의 분리를 위한 균원 시료로는 대구 경북 일원에서 생산하고 있는 3종의 약주와 1종의 탁주 제조를 위한 술덧을 채취하여 사용하였다. 효모의 분리는 술덧 시료를 0.9% NaCl 용액으로 단계희석 방법에 의해 희석한 후 YPD 고체배지에 도말배양하여 각 시료에 대하여 최소 50여 개의 콜로니를 분리한 다음 시료 당 10 주의 균주를 대상으로 실험에 사용하였다.

4. 균의 보관

술덧으로부터 순수 분리한 균주를 YPD 한천 배지에 균주를 1백금이 접종하여 30℃에서 24시간 배양하여 균의 증식 정도를 확인한 후 4℃에 보관하면서 계대배양하며 실험에 사용하였다. 또한 균주의 변이를 방지하기 위하여 분리 균주의 배양액을 30% glycerol 용액에 1:1로 혼합한 후 현탁하여 -70℃에 냉동 보관하였다.

5. 미생물 자동 동정시스템을 이용한 분류

전통주 술덧으로부터 시료당 10 주씩 균주를 분리하여 Automated bacteria, Yeast & Fungi Identification System(Biolog Co. USA)을 이용하여 균주를 분류하였다.

6. 균의 동정

술덧에서 분리한 균주는 효모의 분류 동정법에 따라 형태학적 특성, 배양학적 특성 및 생리적 특성을 조사한 후 Lodder의 The Yeast 및 Kurtzman의 The Yeasts, a taxonomic study에 따라 분류 동정하였다.

7. 생육도 측정

균주의 생육도는 UV spectrophotometer(Hitachi Co., U2000. Japan)로 660nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었다.

8. 발효율 측정

발효율 측정은 CO₂ 감량법과 증류법을 병행하여 행하였다. CO₂ 감량법에 의한 발효율의 측정을 위하여는 500 ml 플라스크에 200 ml 배지를 넣은 후 CO₂ 발효관을 끼워 살균한 다음 따로 살균한 당을 첨가하고 균을 접종하여 회전식 플라스크 배양기(Vision scientific Co. Korea)에서 배양하였다. 발효과정 중 CO₂ 이외의 수분의 증발을 막기 위하여 CO₂ 발효관 내에 진한황산을 채워 배양을 행하였다. 이때 발효율은 CO₂ 생성에 따른 중량감소를 계산하여 알코올 발효율로 환산하였다.⁵⁾

$$\text{Fermentation ratio(\%)} = \frac{\text{CO}_2\text{생성에 따른 감소 무게(g)}}{\text{당이 CO}_2\text{로 전환되는 전체 무게(g)}} \times 100$$

증류법에 의한 발효율의 측정을 위하여는 발효액 100 ml를 증류하여 80 ml의 증류액을 받고 여기에 물을 가하여 100 ml가 되게 한 다음 주정계를 사용하여 알코올 도수를 읽은 후 온도보정 환산표에 의하여 알코올 함량으로 환산하였다. 발효율은 당이 알코올로 전환되는 전체 부피에 대한 실제 알코올의 생성량 100분율로 나타내었다.

9. 배수체 포자형성

YPD 액체 배지에서 하룻밤 배양한 각각의 단수체 효모들을 YPD 고체 배지상에서 서로 교차하여 획선 도말한 후 30℃에서 하룻밤 배양하였다. 이 후 교차되어 도말되어진 부분에서 형성된 균체를 획선도말 배양하여 생성된 콜로니들의 포자 형성 유무를 확인하여 배수체 형성 유무를 확인하였다. 포자의 형성은 YPD 배지에서 배양한 종배양액을 presporulation 액체 배지(yeast extract 0.8%, peptone 0.3%, potassium acetate 5%)에 5%가 되도록 접종하여 22℃에서 진탕배양한 후 균체를 분리하여 멸균수로 2회 세척하고 동일 부피의 sporulation 액체 배지(yeast extract 0.1%, glucose 0.05%, potassium acetate 1%)에 재현탁한 후 30℃에서 7일간 진탕배양하면서 포자 형성 유무를 관찰하였다.

10. Plasmid DNA 분리 및 조작

가. Plasmid DNA 추출

Plasmid DNA의 추출은 Birnboim 등의 방법을 변형하여 다음과 같이

행하였다. Selective marker인 ampicillin을 함유한 LB 액체배지에 plasmid DNA를 지닌 *E. coli* HB101을 하룻밤 동안 배양한 후, 집균하여 생리식염수로 세척하였다. 세척한 균체를 1M Tris·HCl-0.5M EDTA buffer에 현탁시키고 1% SDS-0.2 N NaOH 용액을 첨가하여 용균시킨 후, 5M potassium acetate 용액을 가하고 원심분리하여 상정액을 분리하였으며, 분리된 상정액에 PCI(phenol : chloroform : iso-amylalcohol = 25 : 24 : 1)를 처리한 후 원심분리하여 상정액을 회수하였다. 여기에 무수 에탄올을 가하여 plasmid DNA를 하룻밤 동안 침전시킨 후 70% 에탄올로 세척하고 DNA를 건조시켰다. 건조된 plasmid DNA를 50 μ l의 TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)에 현탁하여 사용하였다.

나. 제한효소 처리

DNA 조작을 위한 제한효소의 처리는 각 제한효소의 생산회사가 제시하는 방법으로 행하였다. 제한효소처리 후 효소를 실험시키기 위해 60°C에서 10분 동안 가열처리를 하였다.

다. Electroelution에 의한 plasmid DNA 단편의 분리

제한효소로 절단한 plasmid DNA를 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide를 첨가한 agarose gel 상에서 전기영동하여 목적으로 하는 plasmid DNA 단편을 확인한 후 원하는 밴드 윗부분에 DEAE-cellulose paper를 넣고, 전류를 반대방향으로 해서 목적으로 하는 단편을 paper로 모두 옮겼다. Paper를 회수하여 washing buffer(10mM Tris, 1mM EDTA, 0.1M NaCl,

pH 8.0)로 세척하고 elution buffer(10mM Tris, 1mM EDTA, 1M NaCl, pH 8.0) 600 μ l를 첨가하여 68°C에서 1시간 동안 처리하였다. 여기에 PCI를 처리하고 무수 에탄올을 첨가하여 -20°C에서 하룻밤 동안 침전시켰다. 이 침전물을 70% 에탄올로 세척하고 건조시킨 후 TE buffer에 현탁하여 사용하였다.

라. DNA ligation

이미 농도를 알고있는 marker DNA, vector DNA와 insert DNA를 각 1 μ l씩 취해서 agarose gel 상에서 전기영동하여 각 DNA의 몰농도를 marker DNA로부터 계산하였다. Vector DNA와 insert DNA의 몰농도 비가 1 : 3이 되도록 하여 T4 DNA ligase 처리 후, 12°C에서 8시간 이상 반응시켰다.

11. 효모 염색체 DNA 분리

균주의 chromosomal DNA의 분리는 Sherman등의 방법에 따라 분리하였다. YPD 배지 5ml에 균주를 접종하고 24시간 배양한 다음 원심분리하여 균체를 회수하였다. 여기에 0.5ml의 0.9M sorbitol-0.1M EDTA(pH 7.5) 용액을 첨가하여 현탁한 후, 50 μ l의 zymolase(2.5 mg/ml)와 50 μ l의 0.28M β -mercaptoethanol을 첨가하여 37°C에서 1시간 방치하였다. 그리고 5,000rpm으로 5분간 원심분리하여 균체를 회수한 후, 0.4ml의 50mM Tris-20 mM EDTA 완충액(pH 7.4)에 현탁한 다음 40 μ l의 10% SDS를 첨가하여 65°C에서 20분간 방치한 후 160 μ l의 5M potassium acetate를

첨가하고 30분 동안 0°C에 방치한 후, 10,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 원심분리 후 얻은 상등액에 2배량의 무수 ethanol을 첨가하여 chromosomal DNA를 침전시킨 후, 원심분리하여 ethanol을 완전히 제거하였다. 이것을 다시 10mM Tris-1mM EDTA 완충액(pH 7.4)에 용해시킨 후 50 μ l의 RNase(1mg/ml)를 첨가하고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 여기에 0.5ml의 isopropanol을 첨가하여 chromosomal DNA를 침전시킨 후 원심분리하여 isopropanol을 완전히 제거한 다음, 10mM TE 완충액(pH 7.4) 녹여서 4°C에 보관하면서 사용하였다.

12. Polymerase chain reaction(PCR)에 의한 DNA 단편의 증폭

가. PCR

DNA의 증폭을 위한 PCR 반응은 반응액의 조성을 변형하여 10 μ l Ex Taq buffer, 10 μ l dNTP Mixture(2.5 mM each), 10 μ l template DNA(<1 μ g), 2 μ l primer(100pmol)를 각각 첨가한 후 0.5 μ l Taq polymerase를 첨가한 다음 멸균 3차 증류수로 총 반응량이 100 μ l되게 하였다 (Table 2-2-3). 반응은 1 cycle은 1회, 2 cycle은 31회, 3 cycle 1회로 모두 33 cycles로 하였다. 반응조건은 Table 2-2-4와 같이 94°C에서 1분간 denaturation하고 45°C에서 2분간 annealing한 후 extension은 74°C에서 1.5분간하였다. 초기 denaturation은 94°C에서 3분간하고 최종 extension 74°C 10분간 처리하였다. Bio-RAD사의 GENE cycleTM을 사용하여 PCR 하였다.

Table 2-2-3. Composition of PCR mixture.

Composition	Amount
<i>Taq</i> polymerase(5 U/ μ l)	0.5 μ l
10 \times <i>Taq</i> polymerase buffer(Mg ²⁺ Free)	10 μ l
25mM MgCl ₂	10 μ l
2.5mM each dNTP mixture	8 μ l
Template DNA	0.2 μ g
Forward primer	20pmol
Reverse primer	20pmol
Total Volume	100 μ l

Table 2-2-4. Polymerase chain reaction for the amplification of DNA.

Cycle	Denaturation	Annealing	Extension	Frequency
1	95 $^{\circ}$ C/2min	55 $^{\circ}$ C/1min	72 $^{\circ}$ C/1.5min	1
2	95 $^{\circ}$ C/1min	55 $^{\circ}$ C/1min	72 $^{\circ}$ C/1.5min	30
3	95 $^{\circ}$ C/1min	55 $^{\circ}$ C/1min	72 $^{\circ}$ C/10min	1

나. Spin-column에 의한 PCR 산물의 정제

Sambrook의 방법¹⁾에 기초하여 다음과 같이 PCR 산물의 정제를 행하였

다. Dispenser용 1ml tip에 멸균한 glass wool을 채우고, Sephadex G-25로 현탁된 TE buffer를 가한 후, tip을 1.5ml Ependorf tube에 끼워서 원심튜브에 넣는다. 수평원심분리기로 3000rpm에서 2분간 원심분리하여 buffer 제거 후, PCR 산물 100 μ l를 가하고 3000rpm에서 3분간 원심분리하여 정제하였다.

13. DNA 전기영동

전기영동은 증폭된 DNA를 loading 완충액(0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol)을 trace로 4% polyacrylamide gel에서 0.1M TBE (1M Tris-0.83M Borate-10mM EDTA, pH8.0) 전기영동액을 사용하여 전기영동 하였다. 전기영동 후 gel은 1 μ g/ml EtBr (ethidium bromide) 용액에서 30분간 염색한 후 UV transilluminator로 관찰하였다. Gel 사진은 UV 및 적색필터를 부착한 사진기에 polaroid 흑백 필름을 사용하여 촬영하였다.

14. 형질전환

가. 대장균의 형질전환

대장균의 형질전환은 CaCl₂법에 기초하여 다음과 같이 행하였다. LB 액체배지에 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 배양한 배양액 0.7ml를 60ml의 LB 액체배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 진탕배양하였다. 660nm에서 흡광도가 0.55~0.65에 도달한 배양액을 집균하여 50mM CaCl₂로 처리하고 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 방치한 후, 균체 현탁액 200 μ l에 DNA 10 μ l를 넣고 0 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응

시킨 다음, 42°C에서 2분간 heat shock을 가하였다. 여기에 LB 액체배지 2.5ml를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 진탕배양 후, ampicillin을 함유한 LB 평판배지에 도말하여 37°C에서 배양한 다음 콜로니를 선별하였다.

나. 효모의 형질전환

효모의 형질전환은 Hill등의 방법에 준하여 다음과 같이 행하였다. YPD 액체배지에 균을 접종한 다음 30°C에서 하룻밤 동안 배양하여 얻은 배양액 10 μ l를 100ml의 YPD 액체배지에 접종하여 30°C에서 진탕배양하였다. 660nm에서 흡광도가 1.0~1.5에 도달한 배양액을 집균하여 lithium 용액(0.1M LiAc, 10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0)으로 세척하고, 동일 용액 1ml에 현탁하였다. 이 현탁액 100 μ l에 plasmid DNA 10 μ l를 넣고 실온에서 5분간 반응시킨 후, 40% PEG (polyethylene glycol) 4000 용액 350 μ l를 첨가하고 30°C에서 45분간 반응시킨 다음 DMSO (dimethyl sulfoxide) 50 μ l를 가하여 42°C에서 5분간 heat shock을 가하였다. 이것을 멸균증류수로 세척하여 원심분리한 후 70 μ l의 멸균 증류수에 재현탁하여 YNB 평판배지에 도말한 후 30°C에서 배양한 다음 콜로니를 형질전환체로 선별하였다.

15. 효모 arginase 활성 조사

가. 효소액의 조제

YNB 배지에서 하룻밤 동안 배양한 배양액 50 μ l를 질소원으로 0.1% arginine만을 가한 YNB 배지 50ml에 접종하여 30°C에서 진탕배양하였다.

660nm에서 흡광도가 0.7~1.0인 배양액 20ml에 1% cycloheximide 200 μ l를 가하여 모든 배양액이 일정한 흡광도를 가질 때까지 빙냉수에 보관하였다. 배양액을 집균한 후, 0.85% NaCl로 다시 세척하였다. 균체를 arginase buffer (50mM Tris, 1mM MnCl₂, 1mM DTT, pH9.5) 0.9ml에 현탁시키고, chloroform 50 μ l, 0.1% SDS 50 μ l를 가하여 최고속도로 20초간 일정하게 vortexing한 후, 빙냉수에 보관하고 효소액으로 사용하였다.

나. Arginase 활성 측정

Archibald의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 효소액 180 μ l에 0.8M L-arginine 20 μ l를 가하여 45 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시킨 후, 35% perchloric acid 150 μ l를 가하여 반응을 중지시켰다. 효소반응액을 원심분리하여 침전된 단백질을 제거하고, 상정액 일정량을 취하여 반응액으로부터 생성된 요소를 정량하였다. 요소의 정량을 위한 발색시약으로 phenyl-propanedione reagent를 사용하였으며, 이는 A 액(1-phenyl-1,2-propanedione 3g/100ml in ethanol)과 B 액(H₂SO₄ 90ml and H₃PO₄ 270ml in 1 l water)을 1:29(V/V)가 되게 조제하였다. 효소반응 상등액 300 μ l에 phenyl-propanedione 시약 3ml를 가하여 100 $^{\circ}$ C에서 30분간 가열한 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 요소의 단위는 상기조건에서 A₆₀₀=1인 세포현탁액 1ml가 생성하는 요소의 양(μ g)을 요소의 단위로 사용하였다.

제3절 전통주 알코올 효모의 분리 및 동정

1. 우리 나라 전통주 효모의 분리

우리 나라의 발효에 관여하는 알코올 효모를 분리하기 위하여 발효가 왕성하게 진행중인 탁주(김천시 소재), 선산약주(일명 송로주, 구미시 소재), 김천 과하주(김천시 소재), 경주 황금주(경주시 소재)의 술덧을 채취하여 효모균주 250여주를 분리하였다. 전통주의 발효에 관여하는 효모의 균일성을 조사하는 한편 각각의 전통주 발효에 관여하는 대표적인 효모균주를 분리하기 위하여 각각의 주류에서 분리된 효모균주 중 각각 10 주씩을 무작위로 선발하였다. 이것을 미국 Biolog사의 동정 system을 이용하여 metabolic finger print에 의한 개략적인 효모의 동정 및 grouping을 행하였다 (Table 2-3-1, 2-3-2).

1종의 탁주 및 3종의 약주로부터 각각 무작위로 10 주씩 취한 40 주의 균주 중 38 주가 *S. boulardii*로 밝혀졌으며 1 주가 *Candida multisgummis*, 나머지 1 주가 *Zygosaccharomyces cidri*로 동정되었으며 이 때의 유사도는 64.7%-98.3%이었다. 따라서 발효 중의 우리 나라 전통주에는 균일한 효모균주가 분포함을 알 수 있었다. 또한 분리 균주 중 대부분을 차지하고 있는 *S. boulardii*로 동정된 이 균주가 전통주의 발효에 주로 관여하고 있으며 전통주의 종류에 따른 알코올 효모의 차이는 거의 없음을 알 수 있었다.

Table 2-3-1. Grouping of alcohol yeast strains isolated from main mashes of various Korean traditional liquors by Automated Identification System based on metabolic fingerprint.

Sample	Identification	No. of strains	Similarity(%)
Takju	<i>Saccharomyces boulardii</i>	10	89.4 - 98.3
Yakju 1	<i>Saccharomyces boulardii</i>	9	83.5 - 89.9
	<i>Candida multigummis</i>	1	77.2
Yakju 2	<i>Saccharomyces boulardii</i>	9	64.7 - 97.8
	<i>Zygosaccharomyces cidri</i>	1	93.0
Yakju 3	<i>Saccharomyces boulardii</i>	10	74.1 - 90.8

Ten yeast strains each randomly isolated from main mashes of various Korean traditional liquors were identified by the identification system of Biolog Co. Ltd. USA.

Table 2-3-2. Similarity of alcohol yeast strain SHY 111 isolated from Yakju main mash by Automated Identification System based on metabolic fingerprint.

Closest species	SIM ¹⁾	DIST ²⁾	AVG ³⁾	MAX ³⁾
<i>Saccharomyces boulardii</i>	0.890	1.241	0.063	0.119
<i>Geotrichum terrestre</i>	0.015	2.584	1.250	7.338
<i>Kluyveromyces lactis</i>	0.003	3.091	0.375	1.337

¹⁾Similarity = P(in) × P(db)

P(in)= probability of the identification being correct, given the entered data that belongs to a species in the data base.

P(db)= probability that entered data belongs to a species in the data base.

²⁾Distance(DIST): between the entered data and each searched record in the data base is calculated.

³⁾Average(AVG) and maximum(MAX) distance values that are obtained when all of the strains Biolog has run for that species are compared against the data record for the species.

우리 나라 전통주의 발효술덧에 있어서 대부분을 차지하고 있는 *S. boulardii*로 동정된 균주들의 알코올 발효력을 알아보기 위하여 10주의 효모균주를 선발한 후 15%의 포도당을 함유하는 YPD 배지를 사용하여 30°C에서 3일간 알코올 발효시험을 행하였다(Table 2-3-3).

알코올의 함량 측정은 H₂SO₄를 사용한 CO₂ 감량법과 증류법에 의하여 행하였다. 사용한 10주의 알코올 발효력은 커다란 차이를 보이지 않았으나 균주 SHY111의 알코올 발효력이 다른 것에 비하여 다소 우수하였으며 SHY113은 발효력이 다소 약하였다. 특히 증류법에 의한 알코올 발효율은 SHY111의 경우에는 84.14%, SHY113은 81.02%를 나타냈다.

Table 2-3-3. Alcohol fermentation ratio by the isolated yeast strains in YPD medium supplemented with 15% glucose.

Strains	Fermentation ratio(%)	
	CO ₂ -H ₂ SO ₄ method	Distillation method
SHY111	89.59	84.14
SHY112	84.81	83.10
SHY113	83.80	81.02
SHY114	88.30	83.10
SHY115	86.69	79.98
SHY116	87.03	81.02
SHY117	89.74	81.02
SHY118	88.39	81.08
SHY119	88.55	83.10
SHY120	89.84	81.02

2. 전통주 알코올 효모의 동정

우리 나라 전통주의 대표적인 효모로 생각되는 분리균주 SHY111의 세포와 자낭포자의 현미경사진은 Fig. 2-3-1과 같다. 본 균의 세포형은 대부분이 계란형이고 일부가 구형 또는 타원형으로서 전형적인 효모의 형태를 가지고 있었다(Fig. 2-3-1, A).

본 균을 질소원이 결핍되고 유일한 탄소원으로서 초산칼륨을 함유하는 포자형성 배지에서 6일간 배양하여 methylene blue 용액으로 염색하여 포자를 현미경으로 조사하였다. 본 균은 대부분이 2개 또는 3개, 일부가 4개의 자낭포자를 형성함을 알 수 있었다(Fig. 2-3-1, B).

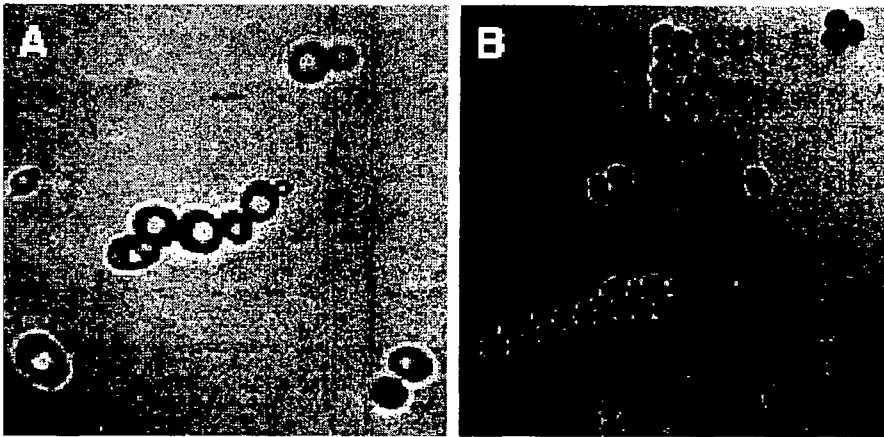


Fig. 2-3-1. Microphotographs($\times 400$) of the strain SHY111(A) isolated from main mashes of Korean traditional liquor and its ascospores(B)

Biológ 사의 동정 system은 미생물의 당대사능을 조사하여 개략적인 동정 및 각종의 균주들을 grouping하는 데는 간편하고 유리한 방법이나 정확한 동정은 어려운 것으로 알려져 있다. 따라서 분리된 균주 SHY111을 Rodder, Barnet, Rij 및 Kurtzman의 동정서에 따라 효모 균주를 조직적이고 체계적인 방법으로 동정하기 위하여 각종의 형태학적, 배양적 및 생리학적 성질을 조사한 결과는 Table 2-3-4와 같다.

분리 균주는 무성적으로 출아에 의해 증식하고 가균사나 진균사는 형성하지 않았으며 YM 배지상에서 전형적인 효모의 형태로 증식하였으며 25°C에서 35°C까지 생육이 인정되었다. 또한 젤라틴 액화력, 세포외 다당류의 생산, 산 생성능, 요소의 분해능, glucoside의 분해력 및 cycloheximide에 대한 저항성 등은 음성으로 나타났다.

본 균은 glucose, galactose, sucrose, maltose, raffinose 등을 잘 발효하였으나 lactose, inulin은 발효하지 못하였다. 또한 자화성을 조사한 결과 glucose, galactose, maltose, sucrose, trehalose, raffinose, glycerol 등은 자화하였으나 질산염은 자화하지 못하였다(Table 2-3-5).

이상의 결과는 Rodder, Barnet, Rij 및 Kurtzman에 의한 분류에서의 *S. cerevisiae*와는 inulin과 ribose의 자화능에서 상이한 결과를 나타내었을 뿐 각종의 형태학적 및 생리학적 성질이 *S. cerevisiae*와 동일하여 Kurtzman의 효모 분류방법에 따라 *S. cerevisiae* 유연군으로 동정하였다. 최근의 보고에 따르면 *S. boulardii* 균주는 *S. cerevisiae*의 무포자성 균주 (asporogenous strain)로 제안된 바 있으며, 효모의 동정서를 가장 최근에 다시 정리한 Kurtzman에 의하면 *S. boulardii* 역시 *S. cerevisiae*의 한 균주로서 분류하고 있다. 따라서 본 과제에서 분리된 균주 SHY111 역시 자낭포자의 형성조건이 다소 까다롭긴 하나 자낭포자를 형성하는 것으로 미루어 보아 *S. cerevisiae*에 가까운 것으로 추정된다.

Table. 2-3-4. Morphological and physiological characteristics of the isolated strain SHY111.

Classification	SHY 111	<i>S. cerevisiae</i>
Cell shape	oval and round	
Cell size	2.5-5×6.5-7.5 μ m	
Vegetative reproduction	budding	budding
Ascospore	present(1-4)	present(1-4)
Pseudomycelium	absent	absent
True mycelium	absent	absent
Culture in YM media		
Pellicle	absent	absent
Ring	absent	absent
Growth in YM agar		
Edge	entire	entire
Elevation	convex	convex, raised
Surface	smooth	smooth
Color	white creamy	white creamy
Growth at 25℃	+	+
at 30℃	+	+
at 35℃	+	+
Gelatin liquefaction	-	-
Extracellular starch-like compounds production	-	-
Acid production	-	-
Urea hydrolysis	-	-
Ester production	+	+
Splitting of glucoside	-	-
Cycloheximide resistance		
100 ppm	-	-
1000 ppm	-	-

+ : positive, - : negative

Table. 2-3-5. Fermentation and assimilation of carbon and nitrogen compounds by the isolated strain SHY111

Source	SHY 111	<i>S. cerevisiae</i>
Carbon		
Fermentation		
Glucose	+	+
Galactose	+	+
Sucrose	+	+
Maltose	+	+
Raffinose	+	+
Lactose	-	-
Celliobiose	-	-
Trehalose	-	-
Starch	-	-
Inulin	-	-
Assimilation		
Glucose		
Galactose	+	+
Sucrose	+	+
Lactose	+	+
Maltose	-	-
Celliobiose	+	+
Trehalose	-	-
Raffinose	+	+
Starch	-	-
Inulin	+	-
Sorbose	-	-
Xylose	-	-
Arabinose	-	-
Rhamnose	-	-
Citrate	-	-
Ribose	w	-
Arbutin	-	-
Inositol	+	+
Glycerol	-	-
Mannitol	-	-
Salicin	-	-
Xylitol	+	+
Ethanol	-	-
Methanol		
Nitrogen		
NH ₄	+	+
NH ₃	-	-
NH ₂	-	-
Ethylamine HCl	-	-
Cadaverin HCl	-	-
L-lysine	-	-

+: fermentation/assimilation, w: weak, -: not fermentation/assimilation

3. 전통주 알코올 효모의 생리적 특성

가. 생육에 미치는 온도의 영향

분리된 전통주 효모 *S. cerevisiae* SHY111의 생육에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 15%의 포도당을 함유하는 YPD 배지를 사용하여 15℃에서 40℃까지 5℃의 간격으로 균을 배양하면서 경시적으로 생육도를 조사한 결과는 Fig. 2-3-2와 같다.

30℃의 온도에서 균의 초기생육 및 최대 생육도가 가장 좋았으며 배양 16시간에 최대의 생육도를 나타내었다. 25℃의 경우에는 균의 초기생육은 30℃에 비하여 다소 낮았으나 배양 20시간 후에는 30℃의 경우와 거의 유사한 생육도를 나타냈다. 35℃의 경우에는 균의 초기생육은 30℃의 경우와 거의 유사하게 빠르게 진행되었으나 최대 생육도는 30℃의 약 60%에 머물렀으며, 40℃의 경우에는 균의 초기 생육도 및 최대생육도 모두가 매우 낮았다.

그러나 30℃ 이하의 온도에서는 온도가 낮아짐에 따라 균의 초기생육은 낮았으나 최대생육도는 30℃와 비교하여 20℃에서는 약 80%, 15℃에서는 약 70%의 수준을 나타내어 본 균은 저온에서도 생육이 상당히 양호한 결과를 나타냈다. 이는 일반적으로 우리 나라 전통주의 발효시 겨울철에도 따로 가온을 충분히 하지 않고 자연상태하에서 발효를 진행하지 않기 때문에 전통주 효모가 낮은 온도의 발효실과 발효조에 적응하여 왔기 때문으로 추정된다. 이러한 특성으로 인하여 본 균은 현재 고농도의 알코올을 함유하는 술을 만들기 위하여 일반적으로 사용하고 있는 저온발효에도 이용 가능성이 높음을 알 수 있었다.

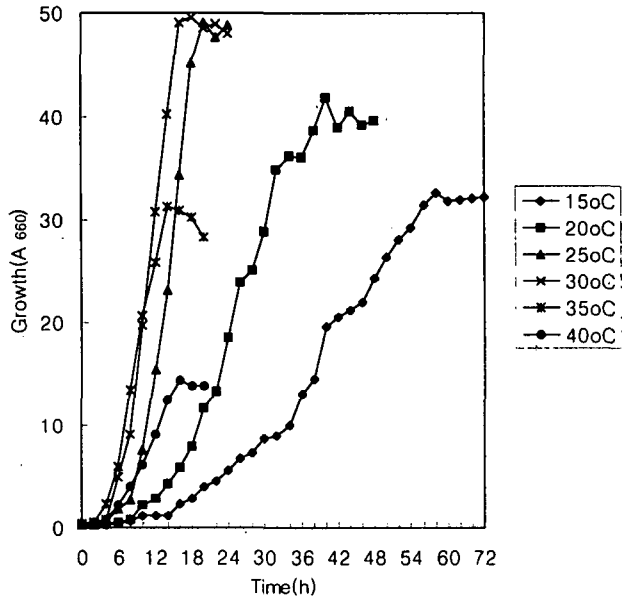


Fig. 2-3-2. Effect of temperature on the growth of *S. cerevisiae* SHY111 in YPD medium.

나. 생육에 미치는 pH의 영향

본 균의 생육에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위하여 pH를 3에서 10까지 조절한 YPD 배지에서 균의 생육도를 경시적으로 조사한 결과는 Fig. 2-3-3과 같다. 본균은 pH 3에서는 균의 초기생육 및 최대생육도가 매우 낮았으며 pH가 6 또는 7인 조건에서 균의 생육이 가장 양호하였다. 또한 pH 5와 9에서도 거의 유사한 생육도를 나타내어 본 균은 매우 넓은 pH 범위에서 생육이 양호함을 알 수 있었다. 특이한 사실은 pH 4와 10의

경우에 있어서 pH 10에서는 유도기가 pH 4보다 길었을 뿐 균의 생육속도 및 최대생육도가 거의 유사한 수준을 나타냈다. 대부분 효모의 생육최적 pH는 약산성으로 알려져 있으나 분리균주 *S. cerevisiae* SHY111은 중성부근과 다양한 범위의 pH에서 생육이 양호한 특이한 결과를 나타냈다.

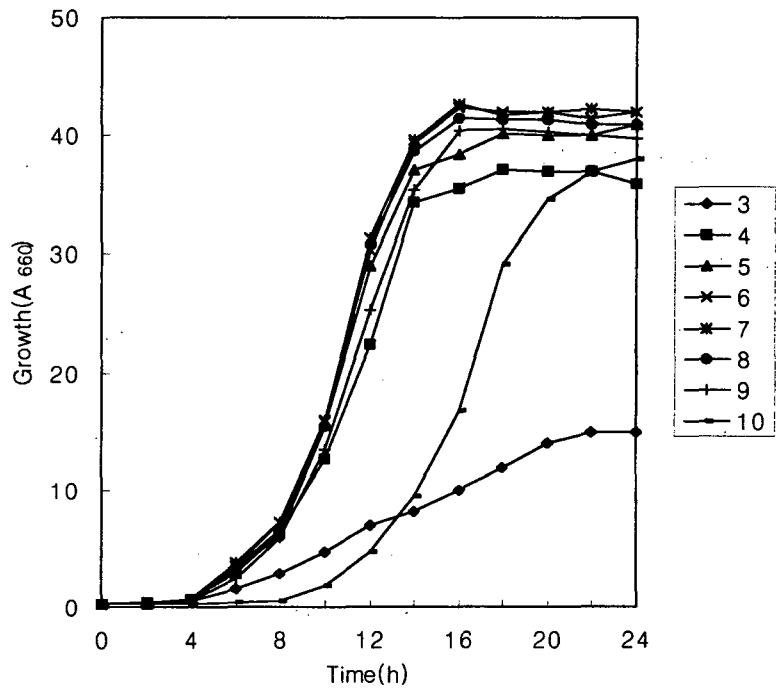


Fig. 2-3-3. Effect of pH on the growth of *S. cerevisiae* SHY111 in YPD medium.

4. 전통주 효모의 발효 특성

분리균주의 발효특성을 조사하기 위해 YPD 기본배지로 하여 CO₂-H₂SO₄ 증량감소법으로 CO₂ 생성에 따른 증량 감소로써 알코올 발효율로 환산하여 균주의 발효 특성을 조사하였다.

가. 발효온도의 영향

S. cerevisiae SHY111의 온도에 따른 발효율을 조사하기 위해 15% glucose을 함유한 YPD배지를 초기 pH 6.0, 진탕속도 120rpm으로 하고 배양온도를 15℃에서 40℃까지 5℃간으로 조정하여 배양하면서 발효율을 조사한 결과는 Fig. 2-3-4와 같다. 분리 균주는 25, 30, 35, 40℃온도에서 85%이상 높은 발효율을 나타내었으며 40℃에서도 높은 발효율을 나타내는 것은 본 균주가 고온성 효모 특성을 가지고 있기 때문으로 생각되었다. 25℃에서는 초기 발효율이 낮았지만 배양시간이 지남에 따라 발효율이 급속히 증가됨을 알 수 있었다. 이것은 온도에 따른 균체 생육도와 알코올 발효율을 비교했을 때 Fig. 2-3-2와 같이 균주의 생육과 알코올 발효율과 비례하지는 않았다.

나. 초기 pH의 영향

분리균주의 초기 pH에 따른 발효율을 조사하기 위해 15% glucose을 함유한 YPD배지를 배양온도 30℃, 진탕속도 120rpm으로 하고 초기 pH를 3.0에서 10.0까지 1.0간격으로 조정하여 배양하면서 발효율을 조사하였다 (Fig 2-3-5). pH에 따른 발효율은 초기 pH 3.0과 10.0은 발효 초기에 효

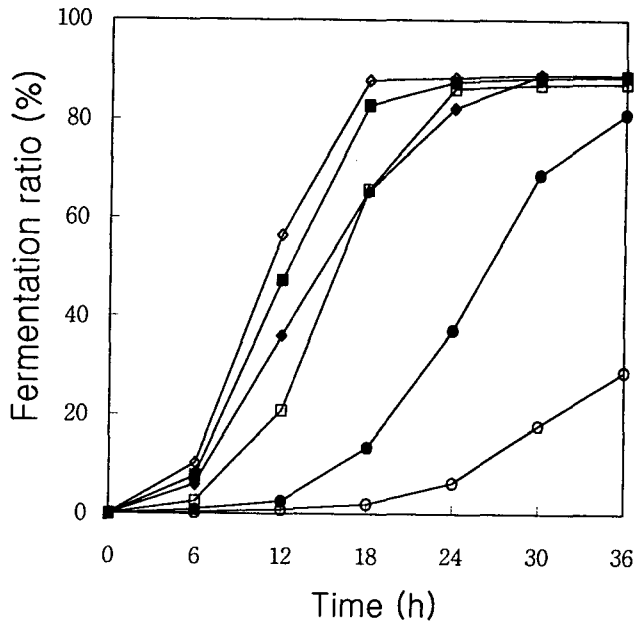


Fig 2-3-4. Effect of temperature on the fermentation ratio of *S. cerevisiae* SHY-111 in YPD medium supplemented with 15% glucose.

○-○: 15°C, ●-●: 20°C, □-□: 25°C, ■-■: 30°C, ◇-◇: 35°C, ◆-◆: 40°C.

모에 영향을 주어 발효 속도가 느리지만 발효시간이 30시간을 경과하면서 발효율은 다른 조건에서와 유사하게 나타났다. 그러므로 초기 pH는 발효 초기에 영향을 주지만 최종 발효율에는 큰 영향을 미치지 못한 것으로 보아 분리균주는 초기 pH에 큰 영향을 받지 않고 넓은 pH 범위에서 안정된 활성을 나타내는 것으로 추정되었다.

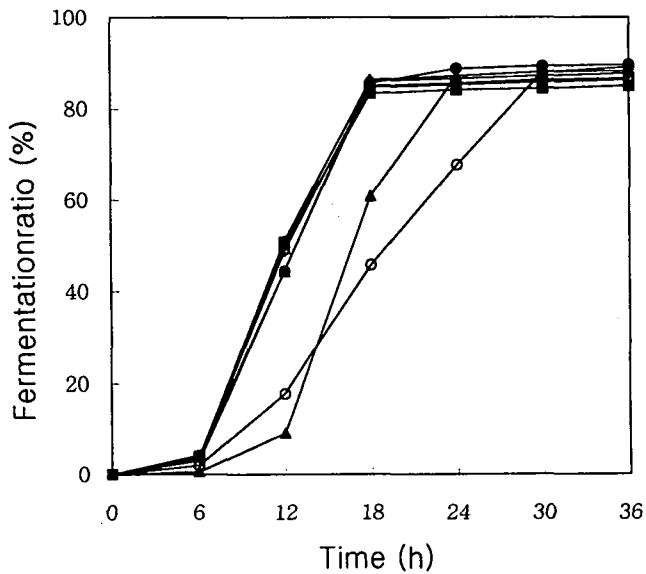


Fig. 2-3-5. Effect of initial pH on the fermentation ratio of *S. cerevisiae* SHY-111 at 30°C in YPD medium supplemented with 15% glucose.

○-○: pH 3.0, ●-●: pH 4.0, □-□: pH 5.0, ■-■: pH 6.0, ◇-◇: pH 7.0, ◆-◆: pH 8.0, △-△: pH 9.0, ▲-▲: pH 10.0.

다. 당 농도의 영향

S. cerevisiae SHY111의 당 농도에 따른 발효율은 고농도의 기질을 이용하면 생성된 알코올의 저해작용의 상승효과로 나타나 균의 생육에도 영향을 주기 때문에 초기 당 농도를 5%에서 30%까지 5%간격으로 조정 한 YPD배지를 배양온도 30°C, 진탕속도 120rpm으로 배양하면서 발효율을 조사하였다(Fig. 2-3-6). 초기 당 농도의 영향은 당 농도가 10%까지는 영향을 거의 받지 않지만 glucose의 농도가 증가할수록 삼투압의 영향을

받아 초기 발효율은 낮고 당을 점차 소비하면서 5, 10, 15, 20%에서 최종 발효율은 80%이상으로 나타났다.

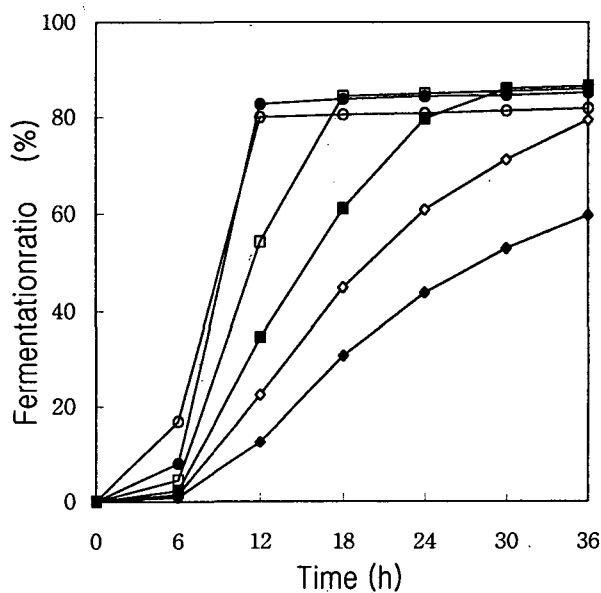


Fig. 2-3-6. Effect of initial concentration of glucose on fermentation ratio of *S. cerevisiae* SHY-111 at 30°C in YPD medium supplemented with 15% glucose.

○-○: 5%, ●-●: 10%, □-□: 15%, ■-■: 20%, ◇-◇: 25%, ◆-◆: 30%.

라. 진탕 효과

분리균주의 진탕 효과에 따른 발효율을 조사하기 위해 15% glucose을 함유한 YPD배지를 온도 30°C, 진탕속도를 변화시켜 배양하면서 발효율

을 조사하였다(Fig 2-3-7). 정치 배양시에는 진탕 배양시 보다 발효율은 낮았고 진탕속도가 60, 120, 180rpm으로 높을수록 발효 속도는 높았다.

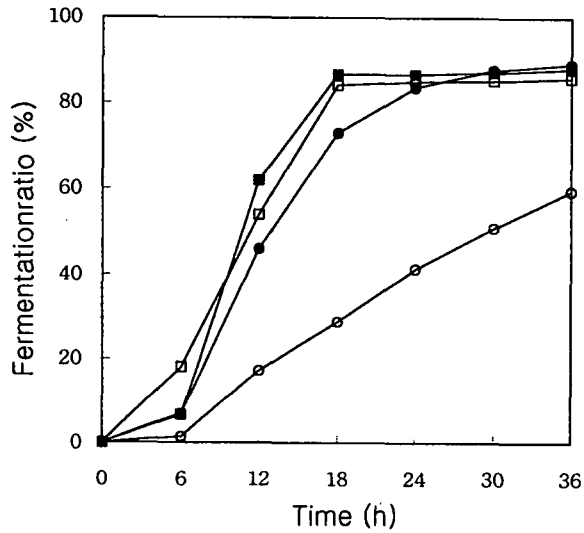


Fig. 2-3-7. Effect of shaking speed on the fermentation ratio of *S. cerevisiae* SHY-111 at 30°C in YPD medium supplemented with 15% glucose.

○-○: 0rpm, ●-●: 60rpm, □-□: 120rpm, ■-■: 180rpm.

5. 산업용 균주와의 알코올 발효력 비교

알코올 발효력이 가장 우수한 분리균주 *S. cerevisiae* SHY111과 현재 주정공업에서 산업적으로 이용하고 있는 *S. cerevisiae* 발연 1호와 대구 탁주공장에서 탁주발효에 사용하고 있는 *S. coreanus*의 알코올 발효력을 CO₂ 감량법에 의하여 경시적으로 비교한 결과는 Fig. 2-3-8과 같다.

3개의 균주 모두 발효 24시간 후에 거의 모든 당을 소비하여 알코올 발효력이 거의 최대에 도달하였다. 분리균주인 SHY111은 현재 산업적으로 이용되고 있는 두 균주보다도 발효 초기에 알코올 발효가 더욱 왕성하게 시작되었으며 최종 알코올 발효력 역시 두 균주에 비하여 다소 높았다. 증류법에 의하여 최종 알코올 발효율을 조사한 결과 균주 SHY111은 85.2%, 발원 1호와 *S. coreanus*는 83.1%이었다. 따라서 본 연구에서 분리한 균주 SHY111은 향후 전통주의 제조에는 물론 알코올 발효에도 직접 이용할 수 있는 우수한 균주로 생각된다.

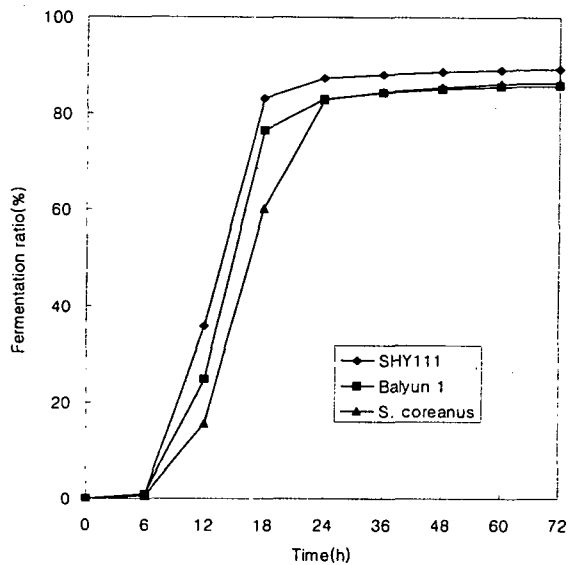


Fig. 2-3-8. Comparison of alcohol fermentation ratio of the isolated strain *S. cerevisiae* SHY111 to those of industrial strains *S. cerevisiae* Balyun 1 and *S. coreanus*. Alcohol fermentation was carried out by 3 strains at 30°C for 72 hours in the YPD medium containing 15% glucose, and alcohol contents were assayed by the CO₂-H₂SO₄ method every 6 hours.

제4절 *S. cerevisiae* SHY111과 표준균주와의 특성 비교

1. 당 이용성 및 발효성

전통주의 대표적인 효모로 생각되는 분리균주 SHY111를 현재 효모 실험에 사용되는 표준 균주인 *S. cerevisiae* S288c, 현재까지 우리 나라 전통주 발효에 관여한다고 알려진 *S. coreanus* 및 미국 Biolog사의 동정 system을 이용하여 동정된 *S. boulardii* 균주를 이용하여 Rodder, Barnet 및 Rij의 효모 분류방법에 따라 각종 탄소원의 이용성 및 발효성을 비교하였다. 탄소원 이용성은 SHY111, *S. boulardii*, *S. coreanus*, *S. cerevisiae* S288c 균주가 glucose, galactose, maltose, sucrose, raffinose, trehalose를 공통적으로 이용하였으며 lactose, cellibiose는 공통적으로 이용하지 못하였다(Table 2-4-1).

S. cerevisiae SHY111과 *S. boulardii* 균주는 inulin과 ribose의 이용성 까지 같아 탄소원의 이용성이 동일하였고, *S. coreanus*와 *S. cerevisiae* S288c는 inulin과 ribose의 이용성에 있어서 나머지 균주와 달리 SHY111과 *S. boulardii* 균주가 탄소원 이용성으로 보아 가장 유사하였다.

탄소원 발효성 조사에는 glucose, galactose, maltose, sucrose, lactose, raffinose 및 trehalose 7종류의 당을 사용하였다. 탄소원 발효성 조사결과 Table 2-4-2와 같이 *S. cerevisiae* SHY-111, *S. boulardii*, *S. coreanus*, *S. cerevisiae* S288c 균주 모두 glucose, galactose, sucrose 및 raffinose를 발효하였으며 maltose, lactose 및 trehalose는 발효하지 못하였다. *S. cerevisiae* SHY-111, *S. boulardii* 균주는 maltose를 모두 발효하였고, trehalose는 SHY-111만 발효하였다. lactose는 실험에 사용한 균주 모두 발효하지 못하였다.

Table 2-4-1. Comparison in the carbon assimilation among the various yeast strains.

Sugar	<i>S. cerevisiae</i>	SHY111	<i>S. boulardii</i>	<i>S. coreanus</i>	<i>S. cerevisiae</i> S288c
Glucose	+	+	+	+	+
Galactose	+, -	+	+	+	+
Maltose	+, -	+	+	+	+
Sucrose	+, -	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-
Raffinose	+, -	+	+	+	+
Trehalose	+, -	+	+	+	+
Cellibiose	-	-	-	-	-
Inulin	-	+	+	w	-
Ribose	-	w	w	w	-

+: assimilation, w: weak, -: not assimilation

Table 2-4-2. Comparison of fermentation among strains in carbon sources.

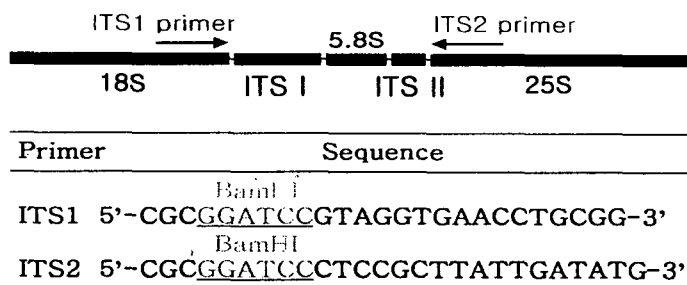
	<i>S. cerevisiae</i> SHY-111	<i>S. boulardii</i>	<i>S. coreanus</i>	<i>S. cerevisiae</i> S288c
Glucose	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+
Maltose	+	+	-	-
Sucrose	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-
Raffinose	+	+	+	+
Trehalose	+	-	-	-

+ and - represent fermentation and not fermentation, respectively.

2. ITS (internal transcribed spacer) 염기서열

최근 Kurtzman의 효모 동정서에 의하면 *S. boulardii* 균주 역시 *S. cerevisiae*의 한 균주로서 분류하고 있다. 그러나 현재까지 *S. boulardii* 균주는 *S. cerevisiae*의 asporogenous의 한 균주라는 사실이 제안되었음에도 불구하고 많은 과학자들에 의해 *S. boulardii*로 불리우고 있다. 본 연구에서 분리한 효모 균주 SHY111이 Biolog 사의 자동동정 시스템에 의한 분석 결과 *S. boulardii*로 동정되었으며 Kurtzman의 동정방법에 따라 *S. cerevisiae*로 동정됨에 따라 이 균주를 표준균주와 비교하였다.

우리 나라 전통주로부터 분리한 알코올 효모와 1996년 4월 종료된 효모 genome project에서 사용된 효모 균주와의 유전적 차이를 알아보기 위하여 유전적 변화를 가장 쉽게 받는 것으로 알려져 있는 효모 rDNA의 ITS (internal transcribed spacer) 부위를 PCR (polymerase chain reaction) 기법을 이용하여 조사하였다. 당초의 계획은 Southern hybridization을 행하려고 하였으나 간단하고 손쉽게 DNA를 증폭시킬 수 있는 PCR 기법을 이용하여 전통주 효모와 일반적으로 사용하고 있는 야생 효모 균주와의 차이를 확인하고자 하였다. PCR primer는 효모 5S rDNA, ITS I 및 ITS II 부위를 모두 증폭할 수 있도록 다음과 같이 고안하였다.



Primer ITS1과 primer ITS2를 사용하고 우리나라 전통주로부터 분리한 알코올 효모, 현재 세계적으로 야생주 효모로서 가장 널리 사용되고 있는 *S. cerevisiae* S288c와, 우리나라 약·탁주 효모로서 알려져 있는 KCCM11215, 전통주 효모가 Biologic 사의 microstation 법에 의해 동정된 결과와 동일한 균주인 *S. boulardii* 표준균주로부터 분리한 염색체 DNA를 주형으로 하여 PCR을 행하였다. 그 결과 사용한 모든 균주로부터 약 0.8Kb의 동일한 PCR 단편을 얻어 이들이 모두 유전학적으로 유사한 균주일 것으로 추정되었다(Fig. 2-4-1, A). 그러나 이 결과로는 이들 효모 균주가 서로 동일한 종인지를 정확하게 판단할 수가 없기 때문에 ITS I과 ITS II 부위의 염기서열을 서로 비교하고자 PCR DNA 단편의 클로닝을 시도하였다. 먼저 PCR에 의해 얻어진 DNA 단편을 전기영동법으로 분리하고 BamHI으로 절단 후 벡터 plasmid pUC19를 Bam HI으로 절단한 것과 ligation을 행하였다. Ligation을 행한 DNA를 대장균에 형질 전환시킨 후 형질전환체로부터 plasmid DNA를 추출하여 BamHI으로 절단하고 전기영동으로 PCR DNA 단편을 확인한 결과는 Fig. 2-4-1, B와 같다. *S. cerevisiae* SHY111, S288c, KCCM11275, *S. boulardii* 모두 0.8Kb의 DNA 단편을 함유하고 있음을 확인하였다. 사용한 4개의 효모 균주들이 유전학적으로 동일한 지 아닌 지를 확인하기 위하여 분리한 재조합 DNA의 insert 단편의 염기서열을 결정하였다. Automatic sequencer에서 출력한 여러개의 결과 중 *S. cerevisiae* SHY111의 염기서열 출력 결과는 Fig. 2-4-2와 같다. 4개의 효모 균주 DNA로부터 증폭된 ITS I 및 ITS II 부위의 염기서열을 확인한 결과는 Fig. 2-4-3과 같다. 전통주 효모 SHY111은 효모 genome project에서 결정한 염기서열과 동일한 염기서열을 가지고 있는 것으로 나타나 균주 *S. cerevisiae* SHY111은 *S. cerevisiae* AB972, *S. cerevisiae* KCCM11275 및 *S. boulardii*와 유전학적으로 아주 유사함을 확인할 수 있었다.

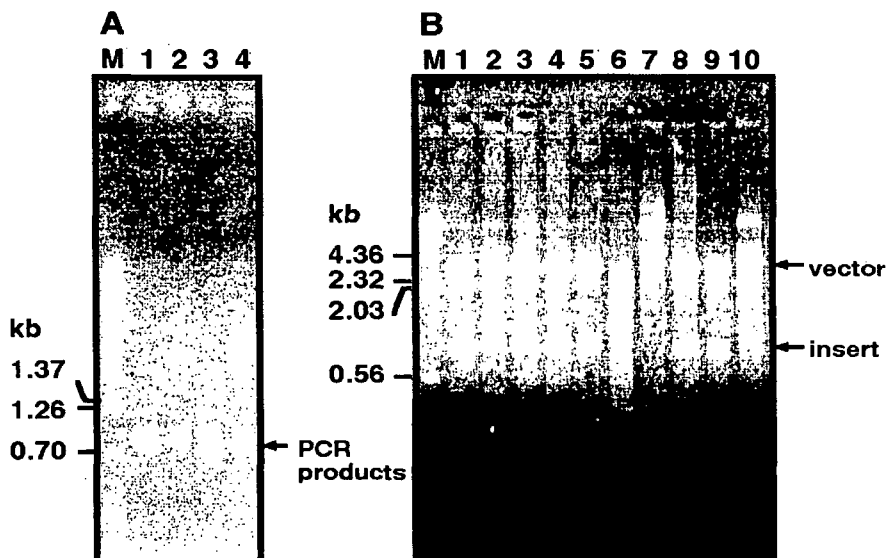


Fig. 2-4-1. Analysis and cloning of PCR products containing yeast internal transcribed spacer (ITS) I and II regions amplified from yeast chromosomal DNA. A: Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from the chromosomal DNA of the strain SHY 111 (lane 1), *S. boulardii* (lane 2), *S. cerevisiae* AB 972 (lane 3), and *S. cerevisiae* KCCM 11215 (lane 4). B: BamHI analysis of recombinant plasmids to confirm the PCR fragments derived from the strain SHY 111 (lanes 1 to 3), *S. cerevisiae* KCCM 11215 (lanes 4 to 6), and *S. boulardii* (lanes 7 to 10).

PCR was carried out using synthetic oligonucleotides as primers which derived from the sequences of yeast 18S and 25S rDNA and were designed to produce BamHI restriction sites in both ends of PCR products. The PCR products were cloned into the BamH I site of vector plasmid pUC119. Recombinant plasmids were analyzed on a 0.8% agarose gel after digested with BamHI to confirm the 800 bp insert. Mark Ms indicate DNA size markers, λ DNA digested with BstEII in Fig. A and HindIII in Fig. B.

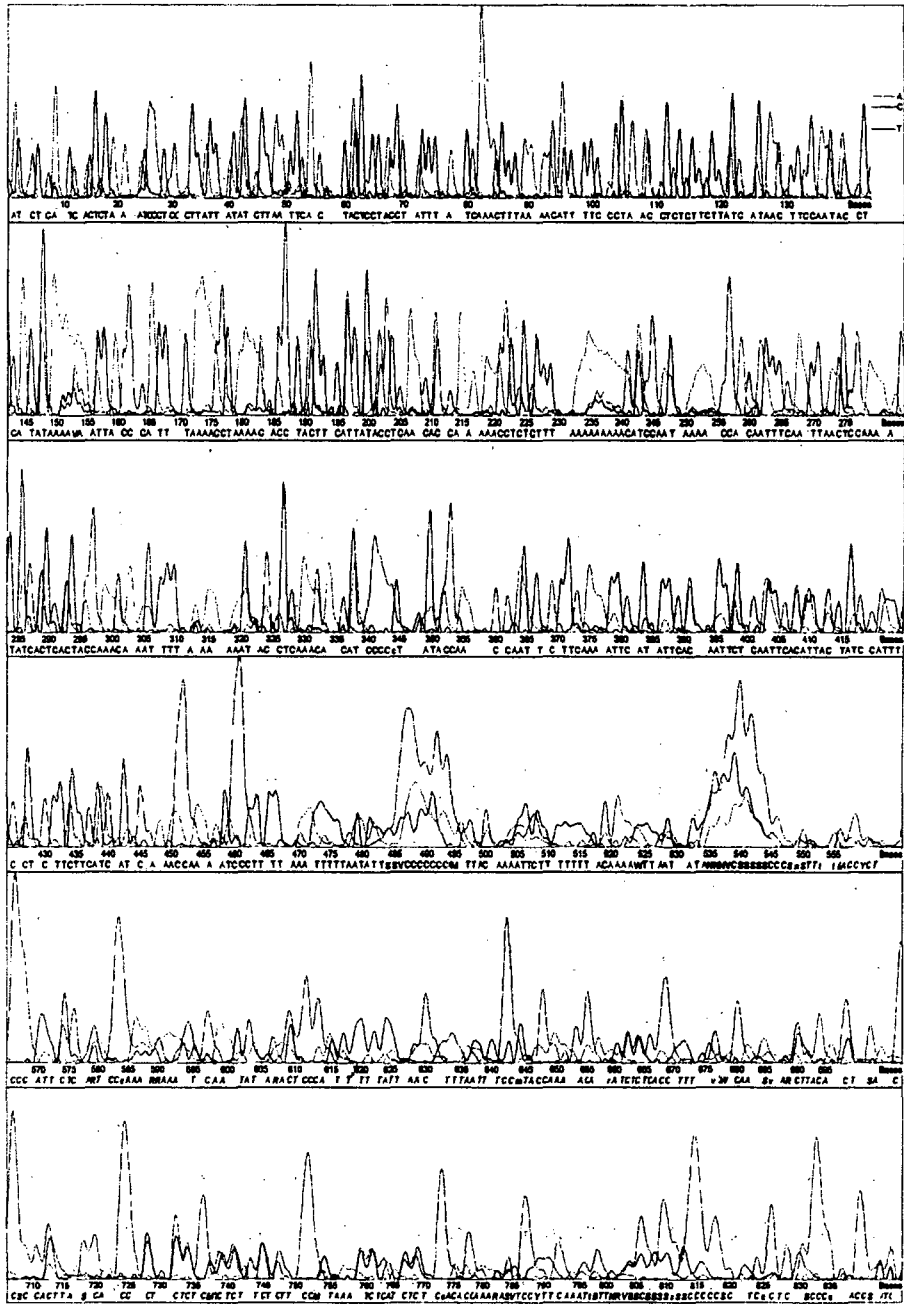


Fig. 2-4-2. Sequencing results of *S. cerevisiae* SHY111 ITS (internal transcribed spacer) region.

ITS I

SHY111 <i>S.boulardii</i> KCCM11215 Genome	AAAGAAATTT AATAATTTTG AAAATGGATT TTTTGTGTTT GGCAAGAGCA 50 AAAGAAATTT AATAATTTTG AAAATGGATT TTTTGTGTTT GGCAAGAGCA AAAGAAATTT AATAATTTTG AAAATGGATT TTTTGTGTTT GGCAAGAGCA
SHY111 <i>S.boulardii</i> KCCM11215 Genome	TGAGAGCTTT TACTGGGCAA GAAGACAAGA GATGGAGAGT CCAGCCGGGC 100 TGAGAGCTTT TACTGGGCAA GAAGACAAGA GATGGAGAGT CCAGCCGGGC TGAGAGCTTT TACTGGGCAA GAAGACAAGA GATGGAGAGT CCAGCCGGGC
SHY111 <i>S.boulardii</i> KCCM11215 Genome	CTGCGCTTAA GTGCGCGGTC TACTGGGCAA GAAGACAAGA GATGGAGAGT 150 CTGCGCTTAA GTGCGCGGTC TACTGGGCAA GAAGACAAGA GATGGAGAGT CTGCGCTTAA GTGCGCGGTC TACTGGGCAA GAAGACAAGA GATGGAGAGT
SHY111 <i>S.boulardii</i> KCCM11215 Genome	CCAGCCGGGC CTGCGCTTAA GTGCGCGGTC TACTGGGCAA GAAGACAAGA 200 CCAGCCGGGC CTGCGCTTAA GTGCGCGGTC TACTGGGCAA GAAGACAAGA CCAGCCGGGC CTGCGCTTAA GTGCGCGGTC TACTGGGCAA GAAGACAAGA
SHY111 <i>S.boulardii</i> KCCM11215 Genome	GATGGAGAGT CCAGCCGGGC CTGCGCTTAA GTGCGCGGTC ACTTTTTCTT 250 GATGGAGAGT CCAGCCGGGC CTGCGCTTAA GTGCGCGGTC ACTTTTTCTT GATGGAGAGT CCAGCCGGGC CTGCGCTTAA GTGCGCGGTC ACTTTTTCTT
SHY111 <i>S.boulardii</i> KCCM11215 Genome	TGGGCATTTC AGCAATCGGG GCCCAGAGGT AACAAACACA AACAATTTTA 300 TGGGCATTTC AGCAATCGGG GCCCAGAGGT AACAAACACA AACAATTTTA TGGGCATTTC AGCAATCGGG GCCCAGAGGT AACAAACACA AACAATTTTA
SHY111 <i>S.boulardii</i> KCCM11215 Genome	TCTATTTCATT AAATTTTTGT CAAAAACAAG AATTTTCGTA ACTGGAAATTT 350 TCTATTTCATT AAATTTTTGT CAAAAACAAG AATTTTCGTA ACTGGAAATTT TCTATTTCATT AAATTTTTGT CAAAAACAAG AATTTTCGTA ACTGGAAATTT
SHY111 <i>S.boulardii</i> KCCM11215 Genome	TTAAATATT AA 362 TTAAATATT AA TTAAATATT AA

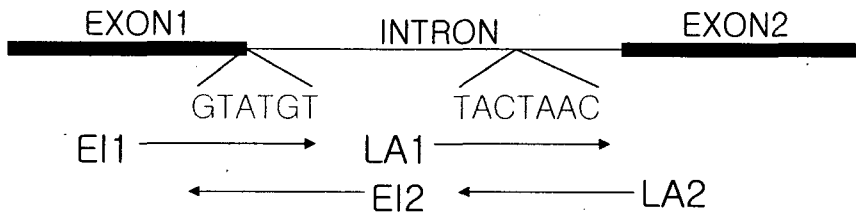
ITS II

SHY111 <i>S.boulardii</i> KCCM11215 Genome	CCTTCTCAAA CATTCTGTTT GGTAGTGAGT GATACTCTTT GGAGTTAACT 50 CCTTCTCAAA CATTCTGTTT GGTAGTGAGT GATACTCTTT GGAGTTAACT CCTTCTCAAA CATTCTGTTT GGTAGTGAGT GATACTCTTT GGAGTTAACT
SHY111 <i>S.boulardii</i> KCCM11215 Genome	TGAAATTGCT GGCCTTTTCA TTGGATGTTT TTTTCCAAA GAGAGGTTTC 100 TGAAATTGCT GGCCTTTTCA TTGGATGTTT TTTTCCAAA GAGAGGTTTC TGAAATTGCT GGCCTTTTCA TTGGATGTTT TTTTCCAAA GAGAGGTTTC
SHY111 <i>S.boulardii</i> KCCM11215 Genome	TCTGCGTGCT TGAGGTATAA TGCAAGTACG GTCGTTTTAG GTTTTACCAA 150 TCTGCGTGCT TGAGGTATAA TGCAAGTACG GTCGTTTTAG GTTTTACCAA TCTGCGTGCT TGAGGTATAA TGCAAGTACG GTCGTTTTAG GTTTTACCAA
SHY111 <i>S.boulardii</i> KCCM11215 Genome	CTGCGGCTAA TCTTTTTTTA TACTGAGCGT ATTGGAACGT TATCGATAAG 200 CTGCGGCTAA TCTTTTTTTA TACTGAGCGT ATTGGAACGT TATCGATAAG CTGCGGCTAA TCTTTTTTTA TACTGAGCGT ATTGGAACGT TATCGATAAG
SHY111 <i>S.boulardii</i> KCCM11215 Genome	AAGAGAGCGT CTAGGCGAAC AATGTTCTTA AA 232 AAGAGAGCGT CTAGGCGAAC AATGTTCTTA AA AAGAGAGCGT CTAGGCGAAC AATGTTCTTA AA

Fig. 2-4-3. Comparison in the sequences of ITS I and II regions derived from strains *S. cerevisiae* SHY 111, *S. boulardii*, and *S. cerevisiae* KCCM 11215 with the sequences acquired from the results of the Yeast Genome Project, which has used *S. cerevisiae* AB 972 as a type strain. The upper and lower boxes indicate yeast ITS I and ITS II regions, respectively.

3. RNA splicing site

*S. cerevisiae*의 intron splicing site를 primer로 사용하여 효모의 염색체 DNA를 증폭할 경우 염색체의 다양한 부위를 목표로 하기 때문에 다양한 형태의 polymorphism을 형성한다. 그리고 intron splicing site sequence는 모든 균류에 내재되어 있기 때문에, 모든 효모의 primer로 사용할 수 있다. *S. cerevisiae* SHY111, *S. boulardii*, *S. coreanus*, *S. cerevisiae* S288c사이의 차이점을 찾기 위해 primer 4종을 각각 한 종류씩 또는 2종류를 함께 사용하여 PCR product를 우선 2% agarose gel상에서 관찰한 결과 균주들간 EI2, LA1, EI2와 LA1, EI2와 LA2 primer에서 차이점이 발견되지 않았으며 2%의 agarose 상에서는 1.5kb이상의 크기의 band들의 재현성이 좋지 않았다. 재현성을 확인하기 위해 각 균주로부터 염색체 DNA를 여러 번 추출하여 PCR을 행한 product를 4% polyacrylamide gel상에서 다시 전기영동하여 관찰한 결과 LA1, EI2와 LA1, EI2와 LA2 primer 사용시 각각 *S. cerevisiae* SHY111과 *S. cerevisiae* S288c, *S. boulardii*와 *S. coreanus*가 서로 유사함을 보여 균



Primer	Sequence
EI1	5'-CTGGCTTGGTGTATGT-3'
EI2	5'-CTGGCTTGCTACATAC-3'
LA1	5'-GCGACGGTGTACTAAC-3'
LA2	5'-CGTGCAGGTGTTAGTA-3'

주간 구별을 할 수 없었다. 그러나 EI2에서는 주 band가 1.5kb, 900bp, 640bp, 470bp에서 나타났으며 200bp에서는 SHY111 에서만 특이적인 band가 관찰되어 나머지 균주와 구별을 할 수 있었다(Fig. 2-4-4).

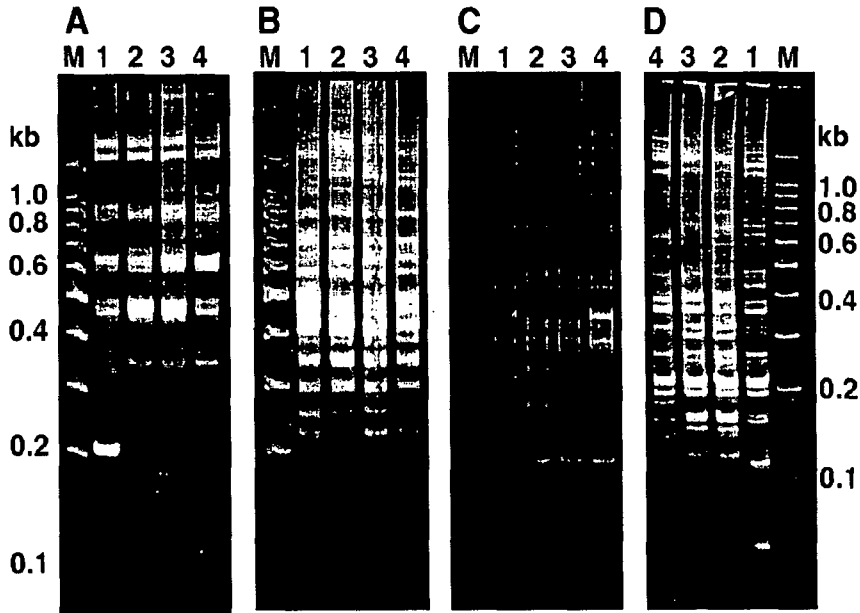


Fig. 2-4-4. PCR differentiation of the strain *S. cerevisiae* SHY 111, isolated from Yakju, from other yeast strains using synthetic oligonucleotide primers derived from the yeast intron splice site. PCR primers EI2, LA1 shown in the previous page were used alone (EI2 in Fig. 2-4-4 A, LA2 in Fig. 2-4-4 B) or in combination (EI2 + LA1 in Fig. 2-4-4 C, EI2 + LA2 in Fig. 2-4-4 D). Chromosomal DNA used for a PCR template was isolated from strain *S. cerevisiae* SHY 111 (lane 1), *S. boulardii* (lane 2), *S. cerevisiae* KCCM 11215 (lane 3) or *S. cerevisiae* AB 972 (lane 4). Mark M represents 100 bp DNA ladder as a DNA size marker.

전통주로 부터 분리한 균주들의 grouping에 PCR 기법을 이용할 수 있는가를 조사하기 위해 200bp band가 특이적으로 나타난 EI2 primer를 이용하였다. 전통주에서 분리하여 Biolog사의 자동 동정 system으로 동정한 균주들의 chromosomal DNA을 각각 분리하여 PCR의 template DNA로 사용하여 PCR을 행한 결과는 Fig. 2-4-5와 같다.

선산약주(yakju 1)에서 분리한 효모 10종은 PCR 결과 모두 같은 종류의 균주임이 확인 되었고 200bp의 특이적인 band는 모든 균주에서 나타났으며 2종의 균주에서 1.4kb에서 나머지 균주와 다른 band가 확인되었다. 이는 미국 Biolog사의 동정 system을 이용한 균주들의 grouping시 1종이 *Candida multisgummis*로 나타난 결과와는 상이하였다.

김천 과하주(yakju 2)에서 분리한 효모 10 주의 PCR 결과는 8 주가 같은 결과를 나타내었고 나머지 2 주는 200bp에서 특이적인 band가 나타난 것 외에는 모두 같았다. 그 결과 Biolog사의 동정 system으로 동정한 결과는 9 주가 모두 *S. boulardii*였고 1 주가 *Zygosaccharomyce cidri*인 것과는 다소 상이한 결과를 나타내었다.

탁주(takju), 경주 황금주(yakju 3)에서 분리한 효모 10주의 PCR 결과는 모두 같은 종으로 나타났는데 이것은 미국 Biolog사의 동정 system에 이용한 결과와 같았다. 하지만, 선산약주, 김천 과하주, 탁주, 경주 황금주의 대부분 주종을 이루는 것은 *S. boulardii*지만 1.4kb에서 차이점을 찾을 수 있으며 선산약주와 탁주 그리고 김천 과하주, 경주 황금주는 서로 동일한 결과를 나타내었다.

그러므로 PCR을 통한 grouping에서도 동정 system을 이용할 때 처럼 우리 나라 전통주에 관여하는 대부분의 효모들은 모두 약간의 차이만 있을 뿐 한 가지 균주로 구성되어 있다는 것을 알 수 있었다. PCR은 균주 간 미세한 차이까지도 찾아 낼 수 있어 같은 균주 간에도 차이점을 확인

할 수 있었으며 미지의 시료로부터 효모를 분리하여 grouping하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

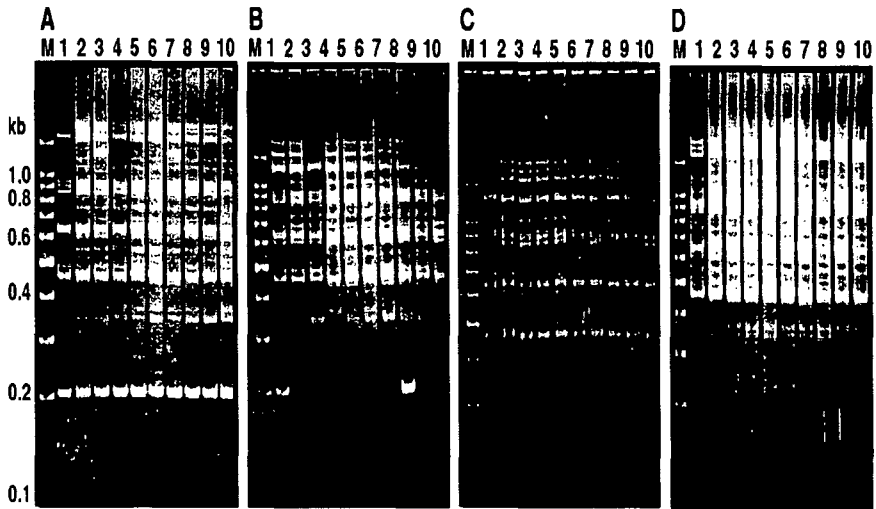


Fig. 2-4-5. Differentiation of the isolated yeasts using PCR with RNA splicing primer EI2. Chromosomal DNAs isolated from the ten strains each derived from the main mashes for 3 different kinds of yakju and 1 takju were used as the template DNA.

A: Yakju 1, B: Yakju 2, C: Takju, D: Yakju 3.

제5절 단수체 *ura3* 변이주의 분리 및 특성

1. Spore dissection에 의한 단수체 효모의 분리 및 특성

현재까지 우리 나라의 전통주 발효에 관여하는 알코올 효모는 1906년에 일본의 Saito가 누룩으로부터 분리하여 동정한 *S. coreanus*로 알려져 있을 뿐 이 균의 특성에 관한 연구는 현재까지 보고된 바 없는 실정이다. 배수체의 효모는 비록 하나의 유전자를 결실시킨다 하더라도 상동염색체에 의하여 그 변이가 발현되지 않기 때문에 유전자 조작에 의한 균주의 육종이 불가능하다. 또한 배수체의 두 유전자를 동시에 결실시키는 것은 거의 불가능한 것으로 알려져 있기 때문에 유전자 조작을 위하여는 단수체의 분리가 필수적이거나 현재까지 우리 나라 전통주 효모에서 단수체의 분리는 이루어진 바가 없다.

S. cerevisiae SHY111 역시 자연계에서 분리된 야생형의 효모로서 자낭포자를 형성하는 것으로 보아 배수체의 효모임을 알 수 있다. 이 균주의 포자를 효율적으로 형성하기 위하여 최적조건을 조사한 결과는 Table 2-5-1과 같다. 현재까지 각종의 효모에 있어서 효율적으로 포자를 형성하는 것으로 알려져 있는 pre-sporulation 배지의 조성을 이용하여 유도기 및 정지기까지 세포를 배양한 후 sporulation 배지로 옮겨 포자 형성을 유도한 후 포자형성 빈도를 조사하였다. 그 결과 정지기의 세포를 이용한 경우 전반적으로 포자를 형성하였으나 그 빈도는 높지 못하였다. 반면에 유도기의 세포를 이용한 경우에는 6종의 pre-sporulation 배지 중 3종의 배지를 사용한 경우에만 포자를 형성하여 포자형성을 효율적으로 못함을 알 수 있었다. 그러나 최대 포자형성 빈도는 0.8% yeast extract, 0.3% Bacto-peptone, 5% potassium acetate의 pre-sporulation 배지에서 유도기까지 배양한 세포가 가장 높았다.

Table 2. Sporulation frequency of *S. cerevisiae* SHY111 on liquid sporulation medium based on the composition of pre-sporulation media and the growth phase of the cells.

Pre-sporulation medium type*	Sporulation frequency (%)	
	Log phase cells	Stationary phase cells
A	0	0
B	5.6	5.3
C	0	6.5
D	18.9	13.5
E	0	2.9
F	18.5	5.8

*Pre-sporulation media type A and B composed of 1% yeast extract, 1% Bacto-peptone, and 1% glucose (A) or 1% potassium acetate (B). Type C and D media composed of 0.8% yeast extract, 0.3% Bacto-peptone, and 10% glucose (C) or 5% potassium acetate (D). Type E and F media contained 0.3% yeast extract, 0.35% Bacto-peptone, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% $(NH_4)_2SO_4$, 0.2% KH_2PO_4 , and 1% glucose (E) or 1% potassium acetate (F). Yeast cells grown in the YPD medium were inoculated into various pre-sporulation liquid media and incubated at 22°C with shaking (120 rpm). Cells were harvested at log phase or stationary phase by centrifugation, and resuspended in an equal volume of sporulation medium after washing twice with 0.9% sterile NaCl. The cell suspension was then incubated at 30°C for 7 days, and numbers of asci were directly counted on a microscope. Sporulation frequency was expressed as the percentage of the number of asci per total counts.

이 균주들로부터 반수체 효모를 얻기 위하여 포자형성 배지에서 7일간 자낭포자를 형성시킨 후 현미경하에서 현미해부기를 사용하여 각각의 단포자 분리를 행한 결과는 Fig. 2-5-1과 같다. 20개의 자낭으로부터 유래한 각각 4개의 자낭포자를 YPD 한천배지에서 6일간 배양한 결과 tetrad 간에 생육이 크게 상이한 결과를 나타냈다. 4b, 6a, 13d 등과 같이 생육이 아주 양호한 것과 생육이 중간정도인 것들 및 생육이 아주 미약한 것 등 다양한 경향을 보였다. 특히 어떤 포자들은 콜로니를 형성하지 않았는데 이들을 현미경상에서 관찰한 결과 겨우 1회 내지 2회의 분열을 행한 것을 알 수 있었다.

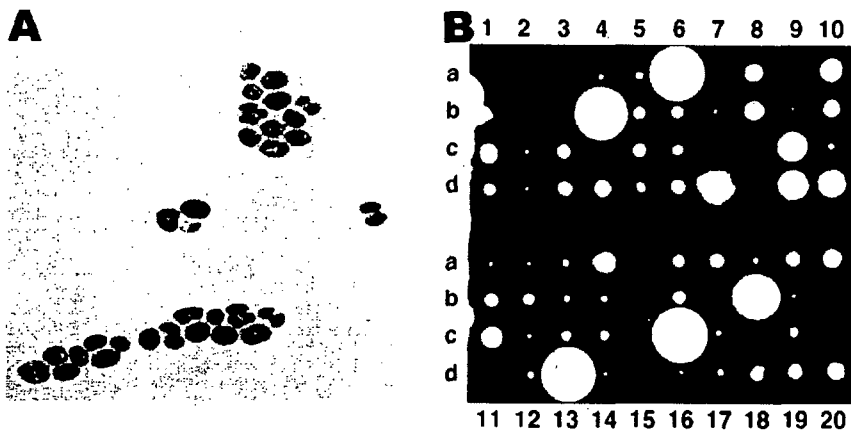


Fig. 2-5-1. Microphotograph of ascospores ($\times 400$) (A) and dissected tetrads (B) of *S. cerevisiae* SHY111. Sporulation was induced at 30°C for 7 days in a liquid sporulation medium using log phase cells grown in the pre-sporulation medium. After the tetrad dissection, the spores were germinated and grown at 26°C for 5 days on a YPD plate. Each ascus was designated with a number, and each 4 colonies derived from the same ascus was designated with alphabet a to d.

이러한 포자들은 발아가 끝난 상태에서도 출아속도가 매우 낮아서 일

이러한 포자들은 발아가 끝난 상태에서도 출아속도가 매우 낮아서 일어나는 현상으로 추정되나 이는 좀더 연구해야 할 문제이다. Tetrad들간에 YPD 배지상에서 콜로니를 형성하였으나 생육정도에 있어서 매우 상이한 결과를 보이는 현상을 재확인하기 위하여 분리한 여러개의 tetrad 중에서 비교적 생육이 양호한 세 종의 tetrad를 YPD와 YNB 배지에서 24시간 동안 경시적으로 균의 생육도를 조사한 결과는 Fig. 2-5-2와 같다.

모든 tetrad들이 YPD나 YNB 배지에서의 생육이 배수체인 야생효모보다 매우 낮은 생육도를 나타냈다. Tetrad 5는 YPD 배지에서 배양한 경우와 tetrad 6은 YPD 및 YNB 배지 모두에서 균의 생육정도가 양호한 것과 양호하지 못한 것들이 마치 2:2로 분리되는 것 같은 현상을 보였다. 이는 모든 단수체 효모들이 YPD 및 YNB 액체배지에서 한 개의 자낭에서 분리된 4개의 자낭포자간에 생육에 있어서 큰 차이를 나타냈다.

또한 이들 단수체 효모들을 15%의 포도당을 함유하는 YPD 배지에서 CO₂ 감량법으로 알코올 발효력을 조사한 결과 알코올 생산속도, 알코올 발효율 및 발효시간 모두에 있어서 단수체 효모들간에 커다란 차이를 나타내었다(Fig. 2-5-3).

이와 같이 분리한 포자들이 서로 생육정도나 알코올 발효율에 있어서 상이한 결과를 나타내는 것은 균주 *S. cerevisiae* SHY111이 감수분열을 통하여 포자를 형성할 때 불완전한 포자를 형성하여 이 포자들이 유전적으로 매우 불안정하여 나타난 결과인 것으로 추정된다.

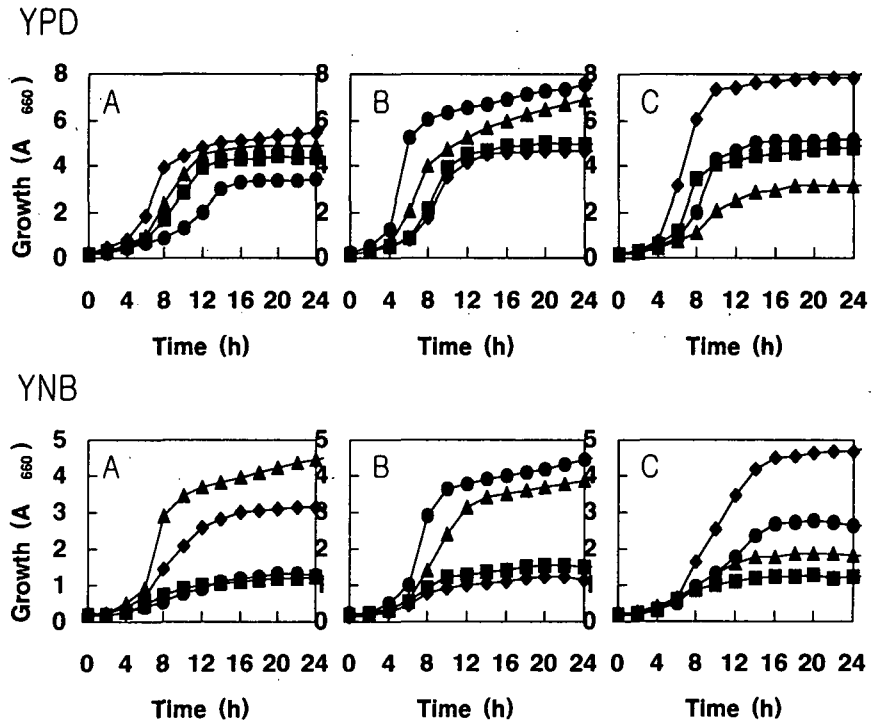


Fig. 2-5-2. Comparison of the growth patterns for several haploid strains derived from *S. cerevisiae* SHY111. Three sets of the haploid cells derived from the *S. cerevisiae* SHY111 spores were grown at 30°C in both YPD (upper panel) and YNB media (lower panel), and their cell growth was monitored every 2 h at 660 nm. All the haploid cells were designated as a (●—●), b (■—■), c (▲—▲), and d (◆—◆) derived from tetrad sets 5 (A), 6 (B), and 10 (C) as shown in Fig. 2-5-1.

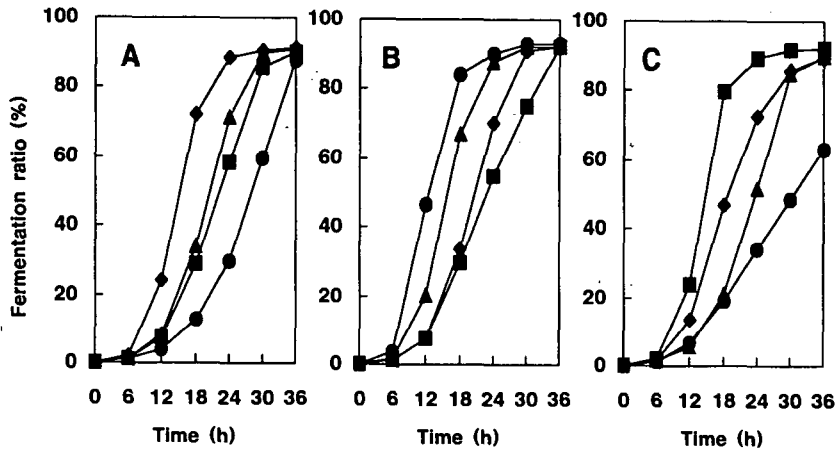


Fig. 2-5-3. Comparison of the alcohol fermentation patterns of some haploid strains derived from *S. cerevisiae* SHY111. Three sets of the haploid cells derived from the *S. cerevisiae* SHY111 spores were used for the alcohol fermentation at 30°C in YPD supplemented with 15% glucose, and their fermentation ratios were monitored every 6 h. All the haploid cells were designated as a (●—●), b (■—■), c (▲—▲), and d (◆—◆) derived from tetrad sets 5 (A), 6 (B), and 10 (C)

2. 단수체 효모의 *ura3* 변이주 분리

가. *URA3* 유전자의 *disruption plasmid* 제작

유전자 조작에 의한 균주의 개량시에는 주로 plasmid 벡터를 사용하여 유전자 조작을 행한 후 plasmid에 의해 형질전환시키는 방법을 주로 이용

하게 된다. 이 경우에 있어서 형질전환에 사용한 수용세포와 형질전환체를 구별할 수 있는 marker가 필수적으로 요구된다. 현재 효모에서 형질전환 marker로 가장 많이 사용되는 것은 uracil의 합성에 관여하는 유전자인 URA3 유전자이다. 본 연구에서 분리한 단수체 전통주 효모의 ura3 영양요구성 변이주를 분리하기 위하여 homologous recombination에 의한 URA3 유전자의 disruption 변이를 유도하였다.

이에 사용될 URA3 유전자의 disruption plasmid의 제작은 Fig. 2-5-4와 같이 행하였다. 먼저 YIp5 plasmid의 StuI 절단부위를 절단하여 여기에 12 mer의 BamHI 링커를 연결하여 plasmid YIBp3를 만들었다. 이 plasmid를 SmaI, PstI으로 절단하여 BamHI 링커를 함유하는 URA3 유전자 단편을 분리한 후 이 것을 pUC19 plasmid의 SmaI, PstI 절단부위에 클로닝하여 URA3 유전자를 가지고 있는 pUC19 plasmid pUC19-URA3를 제조하였다. 영양요구성 marker가 전혀 없는 효모에서 대표적인 positive marker로 사용할 수 있는 것들 중에는 항생제 geneticin에 대한 저항성을 코드하는 NEO 유전자를 들 수가 있다. 이 NEO 유전자를 함유하는 단편을 분리하기 위하여 pGTy2-917 π N plasmid를 BamHI으로 절단하여 956bp의 DNA 단편을 분리하였다. 이 단편을 BamHI으로 절단한 pUC19-URA3 plasmid에 ligation하여 URA3의 결실변이에 사용할 수 있는 DNA 단편 ura3::NEO를 함유하는 pUC19-ura3::NEO plasmid를 제작하였다. 이 plasmid를 HindIII, EcoRI으로 절단하여 효모에 형질전환하여 homologous recombination에 의하여 효모 염색체내의 URA3 유전자를 ura3::NEO로 전환시킬 수가 있다.

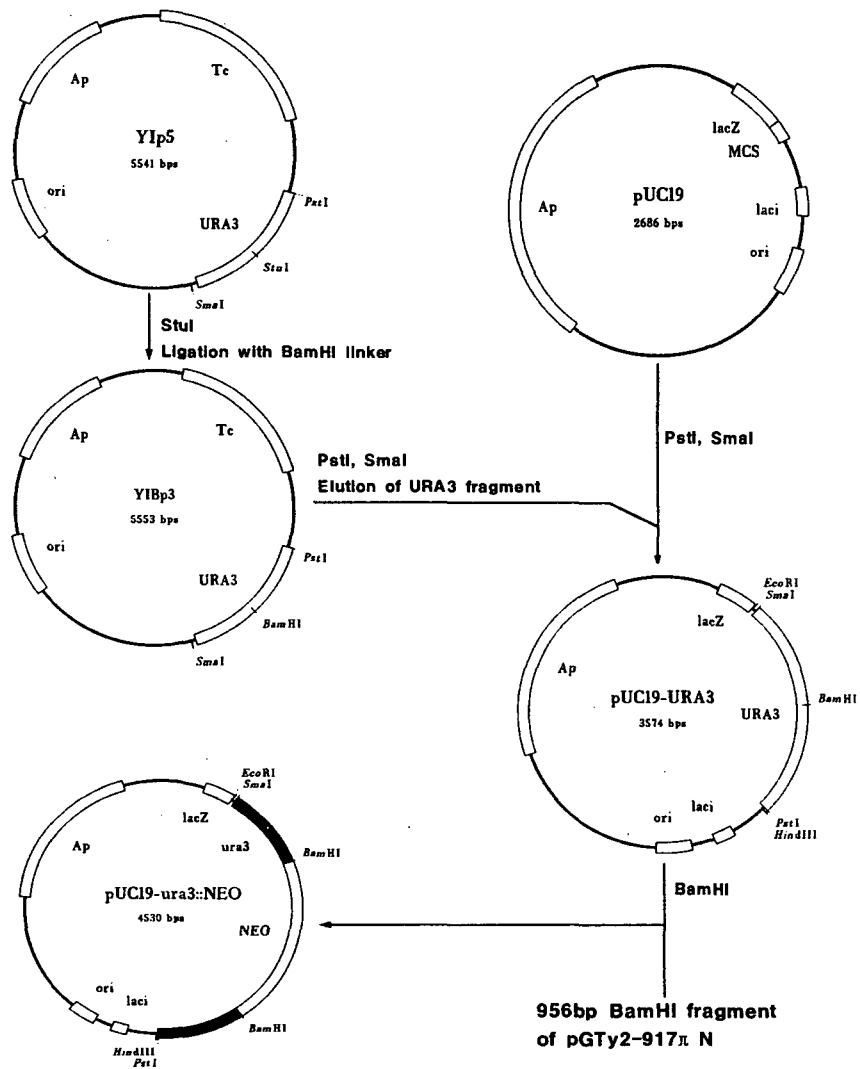


Fig. 2-5-4. Strategy for the construction of *ura3* disruption plasmid in yeast. Plasmid pUC19-ura3::NEO digested with EcoRI and HindIII can be used for the transformation of haploid yeast cells to disrupt the URA3 gene.

나. 효모 형질전환 및 *ura3* 변이주의 선별

우리 나라 전통주로부터 분리한 효모균주에 관하여는 현재까지 단수체 분리 및 형질전환 등의 연구가 거의 이루어진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 이들의 형질전환을 통하여 geneticin 내성 및 *ura3* 영양요구성 변이를 유도하여야 하기 때문에 각 균주들의 geneticin에 대한 내성을 먼저 조사하였다.

야생의 배수체 효모균주 SHY111은 geneticin 50 μ g/ml의 농도에서는 생육 가능하였으나, geneticin 80 μ g/ml의 농도에서는 생육이 불가하였다. 대조구로 사용한 균주 288c, KCCM 11215도 같은 결과를 나타내었으나, *S. boulardii*의 경우에는 30 μ g/ml에서도 생육하지 않아 다른 3종의 균주와는 차이를 나타내었다. *S. cerevisiae* SHY111을 spore dissection하여 분리한 단수체 효모의 경우 5c는 30 μ g/ml에서 생육하지 않았으며, 균주 6a, 6c와 10a는 80 μ g/ml, 균주 5d와 10d는 100 μ g/ml농도에서 생육하지 않았다. 이러한 결과는 각각의 단수체 효모 사이에 geneticin 농도에 따른 생육의 차이가 상당히 있을 것으로 보인다. 이를 바탕으로 하여 *ura3::NEO* 유전자 단편에 의한 각각의 단수체 효모의 형질전환을 행한 후 geneticin에 대한 저항성으로 형질전환체를 선별하였다. 일반적으로 형질전환체의 빈도가 매우 낮았으나 현재 geneticin에 대한 저항성을 나타내는 형질전환체가 몇 개의 단수체 효모에서 수십 개가 분리되었다. 이들 효모 균주를 대상으로 uracil 영양요구성을 조사한 결과 분리된 모든 형질전환체가 uracil을 생육에 요구하지 않았다. 이 실험은 여러번 반복하여 행하였으나 homologous recombination에 의한 *ura3* 영양요구성 변이주를 분리할 수가 없었다. 이러한 현상은 야생주 효모로부터 유래한 단수체 균주의 경우 이미 알려진 바 있으나 그 원인은 현재까지 규명되지 못하고 있는 실정이다.

다. 따라서 *ura3* 영양요구성 변이주의 분리를 위하여 분리한 단수체 효모를 대상으로 화학적 변이제 처리에 의한 변이주의 분리를 시도하였다.

다. Ethyl methyl sulfonate 처리에 의한 *ura3* 변이주의 분리

EMS (ethyl methyl sulfonate) 처리에 의한 단수체 효모 *ura3* 영양요구성 변이주를 얻기 위하여 *S. cerevisiae* SHY111의 단수체 균주들 중 생육이 비교적 우수한 균주 6a, 6c, 10d를 각각 5ml의 YPD 액체 배지에 접종하여 30°C에서 하룻밤 배양하였다. 배양액으로부터 분리한 균체들을 멸균수로 세척한 후 sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 현탁하였으며, 현탁액 1ml씩을 microtube로 옮긴 다음 각각 10, 30, 50, 70 μ l의 EMS를 첨가하고 혼합한 후 30°C에서 반응시켰다. 반응시킨 균체 현탁액을 원심분리하여 균을 집균한 후 멸균수로 세척하고 새 microtube로 옮긴 후 5% sodium thiosulfate 용액으로 세척한 다음 재현탁하였다. Uracil 요구성 효모에 대한 선택배지인 5-FOA 고체 배지와 YPD 액체 배지에 균체 현탁액 각각 0.1ml를 접종하여 30°C에서 하룻밤 배양하였으며 5-FOA 고체배지에 도말한 경우에는 배양 24시간 후 콜로니의 생성 유무를 확인하였다. YPD 배지에 배양한 경우는 배양액 0.1ml를 5-FOA 고체 배지 상에 도말하여 30°C에서 배양시켜 콜로니 생성을 확인하였다. EMS 처리후 바로 5-FOA 고체 배지로 도말한 경우에는 EMS 처리 농도에 상관없이 콜로니가 전혀 생성되지 않았으며, YPD 액체 배지에서 먼저 배양한 후 5-FOA 고체 배지에서 도말 배양한 경우에는 30, 50 μ l의 EMS를 처리한 경우에서 콜로니가 생성되었다. 따라서 5-FOA 고체 배지에서 생성된 콜로니들을 *ura3* 변이주로서 선별하였다.

3. 단수체 효모 *ura3* 변이주의 특성

단수체 효모로부터 분리한 *ura3* 변이주들의 uracil 요구성을 확인하기 위해 분리 균주들을 각각 YPD에서 배양한 후 YNB 및 YNB-uracil(YNB + uracil 20mg/l) 고체배지 및 액체배지에 각각 접종하여 30°C에서 배양하여 생육 유무를 확인하였다(Fig. 2-5-5, 2-5-6). 각 균주들로부터 *ura3* 변이주로 추정되는 분리 균주들 중 각각 5종의 균주들이 uracil을 첨가하지 않은 YNB 배지에서는 생육이 불가능하였으며 오직 uracil을 첨가한 YNB 배지에서만 생육하는 것을 확인하였다(Fig. 2-5-5).

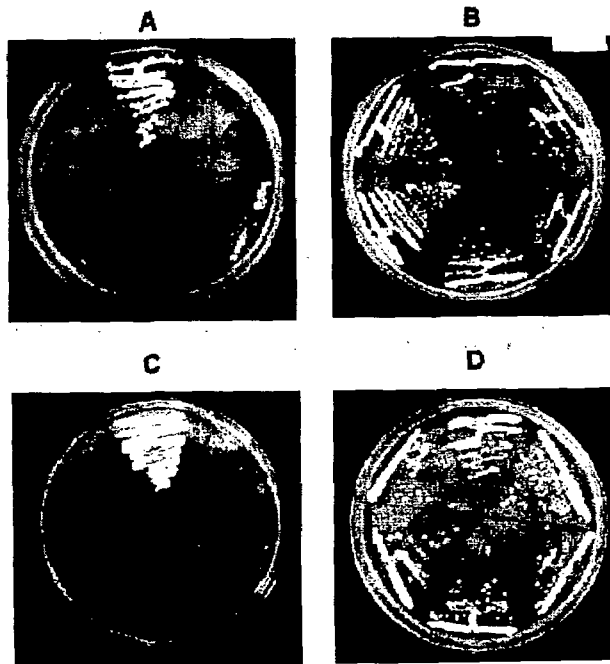


Fig. 2-5-5. Photograph of *ura3* mutants on YNB and YNB-uracil plate.
A : 6a-*ura* on YNB plate, B : 6a-*ura* on YNB-uracil plate, C : 6c-*ura* on YNB plate, D : 6c-*ura* on YNB-uracil plate.

또한 이 균주들을 uracil을 함유하는 YNB 액체배지에서 배양한 결과 균의 생육도가 친주와 유사하였다(Fig. 2-5-6). 따라서 6a와 6c에 대한 이들 균주들을 *ura3* 변이주로서 최종 선별하였으며 각각 6a-*ura* 및 6c-*ura*로 명명하여 이후 실험에 사용하였다.

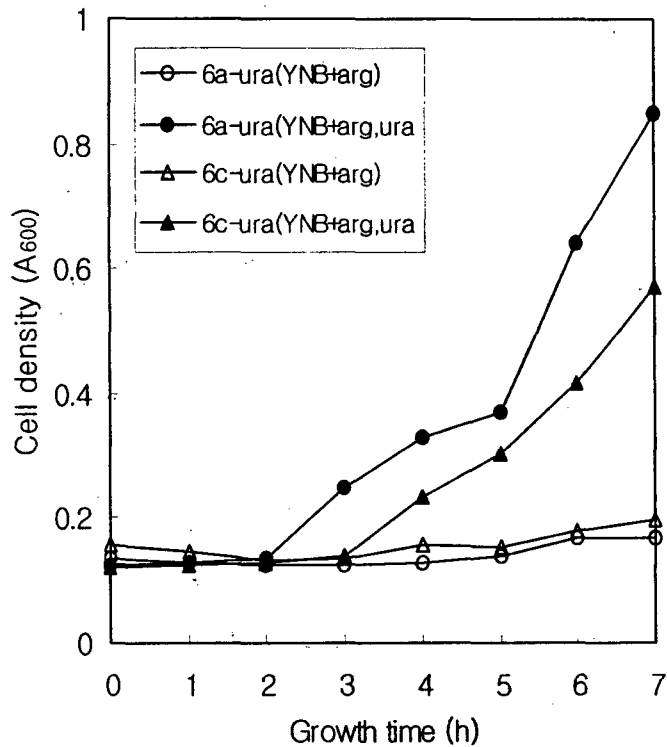


Fig. 2-5-6. Growth phenotype of *ura3* mutants derived from haploid strain 6a and 6c in YNB media containing 0.1% arginine as a nitrogen source. The *ura3* mutants derived from strain 6a and 6c were designated as 6a-*ura* and 6c-*ura*, respectively.

제6절 효모 CAR1 유전자의 deletion plasmid 제작

1. 효모 CAR1 유전자 단편의 분리

전통주 효모 *S. cerevisiae* SHY111이 유전학적으로 *S. cerevisiae* S288c와 동일하기 때문에 *S. cerevisiae* SHY111의 CAR1 유전자 역시 *S. cerevisiae* S288c의 것과 동일할 것으로 판단되었다. 따라서 전통주 효모 CAR1 유전자의 deletion을 위하여 유전정보가 잘 알려져 있는 *S. cerevisiae* S288c의 CAR1 유전자를 사용할 수가 있을 것이다. 현재 *S. cerevisiae* S288c의 gene library는 손쉽게 구할 수 있다. 따라서 효모 genomic DNA를 Sau3AI으로 부분절단하여 pBR322 벡터 plasmid의 BamHI 제한효소 절단부위에 ligation하여 제작한 gene library를 입수하였다. pBR322-yeast genomic DNA library를 대장균에 형질전환시킨 후 CAR1 유전자의 단편을 함유하고 있는 클론을 분리하기 위하여 합성한 CAR1 유전자의 일부 30-mer의 올리고뉴클레오티드를 프로브로 하여 콜로니 하이브리디제이션을 행한 결과는 Fig. 2-6-1과 같다. 그 결과 한 개의 plate당 수 개의 positive 클론을 찾을 수가 있었다.

이렇게 1차 콜로니 하이브리디제이션의 결과에서 얻은 positive 클론을 희석배양으로 순수분리하여 각각의 콜로니들을 다시 2차 콜로니 하이브리디제이션을 행한 결과는 Fig. 2-6-2와 같다. 1차 콜로니 하이브리디제이션 결과를 토대로 동일한 부위의 콜로니들 9개로부터 순수분리한 많은 콜로니들이 positive 클론으로 나타났다. 이렇게 하여 순수분리된 최종 CAR1 유전자를 함유하는 plasmid를 지닌 형질전환체의 positive 클론을 얻었다.



Fig. 2-6-1. Colony hybridization for the detection of transformants harboring yeast CAR1-containing plasmid. A ^{32}P -labelled synthesized 30-mer oligonucleotide derived from yeast CAR1 sequence was used as a probe.



Fig. 2-6-2. Second colony hybridization for the detection of transformants harboring yeast CAR1-containing plasmid. A ^{32}P -labelled synthesized 30-mer oligonucleotide derived from yeast CAR1 sequence was used as a probe.

이 positive 클론으로부터 추출한 재조합 plasmid를 pHPCAR1-37로 명명하였으며 CAR1 유전자의 급원으로 사용하였다. 이 plasmid를 추출한 후 제한효소로 절단하여 확인한 결과는 Fig. 2-6-2와 같다. 이 클론은 4.3kb의 pBR322외에도 약 4.5kb의 insert를 가지고 있음을 확인하였다. 또한 CAR1 유전자 내부에는 1.2kb의 Hind III, Dra I 절단부위를 가지고 있음이 이미 알려져 있으므로 이 plasmid를 Hind III와 Dra I으로 절단하여 전기영동한 결과 1.2kb의 단편을 가지고 있음을 확인하였다. 따라서 이 1.2kb의 CAR1 유전자 단편의 클로닝을 행한 후 염기서열의 분석을 행한 결과는 Fig. 2-6-3과 같다.

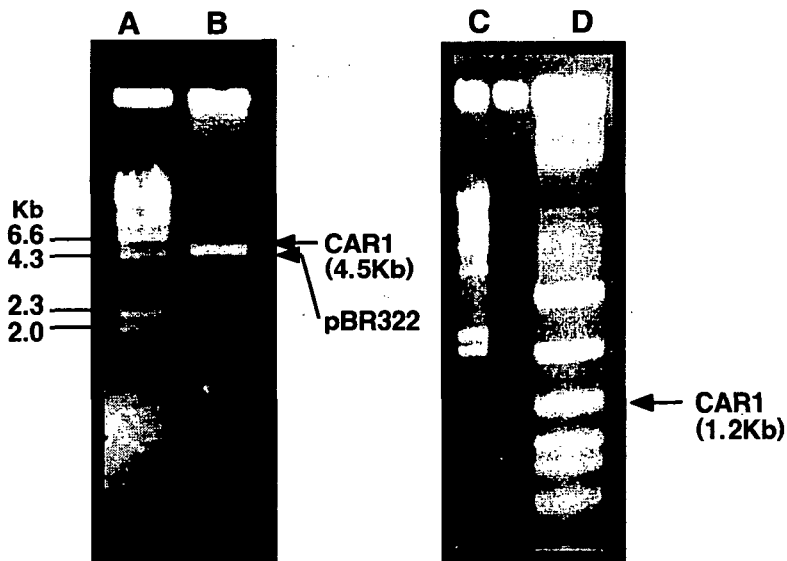


Fig. 2-6-2. Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid pHPCAR1-37 containing 4.5Kb CAR1 DNA fragment.

A and C : MW marker(λ /HindIII), B : pHPCAR1-37/BamHI, D : pHPCAR1-37/HindIII, DraI

Eco0109IEco241 Vha464I Af111
Psp0MI Fri0IApaINspI BfrI
SduI BanIIBspTI
aagcttGGTGTGCGAGAAGGGCCCTAAATACATGCTTAAGCATGGTCTGCAAACAAGCATAGAGGATTTGG Base pairs
ttcgaaCCACAGCTCTTCCCGGGATTTATGTACGAATTCGTACCAGACGTTTGTTCGFATCTCCTAAACC 1 to 70
HindIII BspI20IBmyI Bst98I
DrallBspI286IMspCI

BspI286I PflMI
Eco24I Van91I
Fri0I
GCTGGTCTACGGAATTAGAGCCCTCAATGGACGAGGCCCAATTTGTGGAAAAGTTGAAAATGGAGAAGGA Base pairs
CGACCAGATGCCTTAATCTCGGGAGTTACCTGCTCCGGGTTAAACACCCTTTCAACTTTTACCTCTTCCT 71 to 140
AccI BmyI EspI396I
SduI BanII AccB7I

Tth111I
CTCCACAAC TGGGGTTCTCTGTATGATAGACGGTGTCAAGGCTAAAAGAGCAGATTTGGTTGGTGAA Base pairs
GAGGTGTTGACCCCAAGGAGACAATACTATCTGCCACAGTTCGGATTTTCTCGTCTAAACCAACCCTT 141 to 210
AspI
AtsI

BsrGI Asp700I EcoI30I
BstXI SspBI XmnI EcoT14I
ErhI
GCCACCAAGTTGGTGTACAAC TCCGTGCGAAAGTGGTCCAGGCGAACAGATTCCTTGACCTTGGGTG Base pairs
CGGTGGTTC AACCCATGTTGAGGCACAGCTTTCACAGGTCGCTGTCTAAGGGGAACTGGAAACCCAC 211 to 280
StyI
BspI407I BssT1I

SstII
BclI MspA11Cfr42I
FbaI NspBII KspI
GtgateATTCAATAGCCATTGGTACTGTATCCGCGTTTTGGACAAATACCCCGATGCTGGTCTTTTATG Base pairs
CactagtAAGTTATCGGTAACCATGACATAGGCGCCAAAACCTGTTTATGGGGCTACGACCAGAAAATAC 281 to 350
Ksp22I BstDSISacII
DsaI Sfr303I

BbiI
BsaHI
HinII
GATAGACGCCACGCTGATATAAACACCATAGAAAGCACCCCTCTGGAAACTTGACCGGCTGTCCCGTG Base pairs

CTATCTGCGGGTGGCACTATATTTGTGGTATCTTTCTGTTGGGGAGACCTTTGAACGTGCCGACAGGGCAC 351 to 420

Hsp92I

Msp17I AcyI

Eco88I

Ama87I

AvaI

TCATTCTAATGGGTTTGAACAAGGATGCCACATTTGCCGAGTCGCTCAAATGGGTTCCAGGCAACT Base pairs
AGTAAGGATTACCCAAACTTGTCTACAGGGTGAACAGGGCTCAGCGAGTTTACCCAAGGTCGGTTGA 421 to 490

BcoI

BsoBI

BmyI

BglII

BspI286I

MflI

Eco24I

XhoII

TGAGCCCAAAAAAGATCGCGTATATTTGGGTTGAGAGATGTTGATGCCGAGAAAAGAAAATCTTGAAaga Base pairs
ACTCGGGTTTTTCTAGCGCATATAACCCAACCTCTCTACAACACTACGGCCTCTTTTCTTTTAGAACTTct 491 to 560

FriOI

SduI BanII

HincII

HindII

tctGGGTATCGCCGCCTTTTCCATGTACCACGTTGACAAATACGGCATCAACGCTGTCATTGAAATGGCA Base pairs
agaCCCATAGCGCGGAAAAGGTACATGGTGCAACTGTTTATGCCGTAGTTGCGACAGTAACTTTACCGT 561 to 630

MslI

VneI BspI286IAIw21I

PpuMI

BspI286IAIw21IBbiII

SduI AspHI

Psp5II

SduI AspHIBsaHI

BsrDI

Bbv12I

Bbv12IHinII

AccI

ATGAAAGCCGTGCACCCAGAAAACAAACGGTGAAGGTCCCATTATGTGCTCCTATGACGTCGATGGTGTAG Base pairs
TACTTTTCGGCACGTGGGTCTTTGTTTGCCTTCCAGGGTAATACACGAGGATACTGCAGTACCACATC 631 to 700

Alw44IBmyI

DraII

BmyIHsp92IAatII

ApaLIBsiHKAI

EcoO109I

BsiHKAIMsp17I

AcyI

SfcI

BpmI

EcoNI

GsuI

ACCCATTATACATTCTGCTACAGGTACTCCAGTGAGAGGTGGGTTGACCTTGAGAGAAGGTCTTTTCTT Base pairs
TGGGTAATATGTAAGGACGATGTCATGAGGTCCTCCACCCAACCTGGAACCTCTTCCAGAAAAGAA 701 to 770

HincII

BstSFI

HindII

CfrI BsaWI

GGTGAAAAGATTGGCCGAATCCGGTAATTTAATTGCCCTAGACGTTGTTGAATGTAACCCTGATCTGGCT Base pairs
CCACCTTCTAACC GGCTTAGGCCATTAATTAACGCGATCTGCAACAACCTTACATTGGGACTAGACCGA 771 to 840

2. CAR1 유전자의 서브클로닝 및 deletion plasmid 제작

분리된 CAR1 유전자를 사용하여 CAR1 유전자의 deletion plasmid를 제작하기 위하여 1.2 kb의 HindIII, DraI CAR1 유전자 단편을 pUC19의 HindIII, SmaI에 서브 클로닝을 시도하였다 (Fig. 2-6-4). SmaI과 DraI이 연결될 경우 이 부위를 절단할 수 없으므로 이 부위 바로 upstream 부위에 존재하는 pUC19 polylink 유래의 EcoRI 절단부위를 사용하여 단편을 절단할 수 있다. 따라서 재조합 plasmid를 HindIII과 EcoRI으로 절단할 경우 1.2 kb의 CAR1 유전자 단편을 확인할 수가 있다. 형질전환체로부터 얻은 plasmid DNA를 HindIII와 EcoRI으로 절단하여 전기영동한 결과는 Fig. 2-6-5, A와 같다. 6개의 형질전환체 중에서 3개의 클론이 1.2 kb의 HindIII, EcoRI 단편을 함유하고 있음을 알 수 있었으며 그 중 하나를 골라 pUC19-CAR1으로 명명하였다 (Fig. 2-6-5, lane A, C, D).

전통주 효모에서 CAR1 유전자가 deletion되었음을 확인할 수 있는 선택 marker로서는 본 연구실에 보유하고 있는 NEO 유전자(G418 항생제 내성)를 선택하였다. 이 유전자를 함유하고 있는 pUC19-ura3::NEO plasmid를 BamHI으로 절단하여 1.0 kb의 DNA 단편을 분리함으로써 NEO 유전자를 얻을 수 있는데 이 plasmid를 BamHI으로 절단한 후 전기영동하여 1.0 kb의 DNA 단편을 확인한 결과는 Fig. 2-6-5, B와 같다. 1.2 kb의 CAR1 유전자 내부에는 BamHI DNA 단편과 서로 연결될 수 있는 BglIII와 BclII 절단부위가 각각 1개씩 존재한다. 따라서 3.9 kb의 pUC19-CAR1 재조합 plasmid를 BglIII와 BclII으로 절단하여 300 bp의 단편을 제거하고 3.6 kb의 pUC19-CAR1 plasmid의 BglIII, BclII 단편을 분리하였다. 이 단편과 BamHI으로 절단한 pUC19-ura3::NEO plasmid로부터 분리한 1.0 kb의 NEO 유전자를 연결하여 CAR1 유전자 내부의 300 bp 단

편이 제거되고 이 부위에 1.0 kb의 NEO 유전자가 삽입된 CAR1 유전자의 deletion plasmid를 제작하였다 (Fig. 2-6-4).

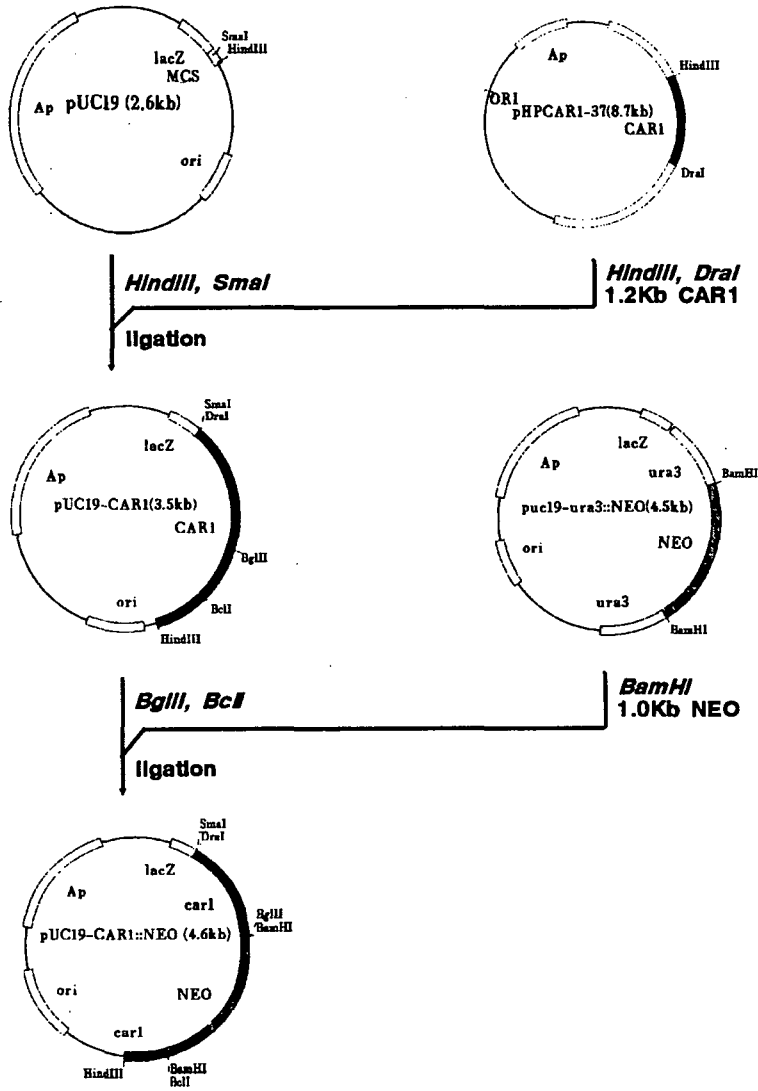


Fig. 2-6-4. Subcloning of 1.2Kb CAR1 fragment into the pUC19 vector plasmid and construction of CAR1 deletion plasmid.

3.6 kb의 pUC19-CAR1 plasmid 단편과 1.0 kb의 NEO 유전자를 ligation하여 대장균에 형질전환시킨 후 형질전환체로부터 얻은 plasmid를 BglII으로 절단하여 전기영동한 결과는 Fig. 2-6-5 C와 같다. 이들 단편이 정상적으로 ligation이 될 경우에 재조합 plasmid의 크기는 4.6 kb(pUC19-CAR1 3.6 kb + NEO 1.0 kb)로서 이 plasmid를 BglII으로 절단할 경우 1.1 kb 단편(plasmid pUC19 유래)과 3.6 kb 단편(pUC19 1.6 kb + CAR1 유전자 1.0 kb + NEO 유전자 1.0 kb)을 확인할 수 있다. 9개의 형질전환체 중에서 4개의 클론이 1.1 kb의 단편외에 3.6 kb의 단편을 함유하고 있음을 확인하였다(Fig. 2-6-5, lane A, C, E, I). Lane B, F, G, H는 pUC19-CAR1 유래의 3.6 kb DNA 단편이 self-ligation된 plasmid로 추정되며 lane D는 비정상적인 ligation에 의해 생성된 것으로 추정된다.

3. car1::NEO 유전자 단편의 효모 형질전환

벡터 plasmid pUC19에는 두 개의 PvuII 제한효소 절단부위를 가지고 있다. pUC19의 polylinker 사이에 car1::NEO 유전자를 함유하고 있는 재조합 plasmid pUC19-car1::NEO를 PvuII로 절단하면 2.36kb와 2.40kb의 두 개의 단편을 얻을 수 있다. 이중 2.4kb의 단편내에 car1::NEO 유전자가 함유되어 있기 때문에 효모에 형질전환시킬 경우 homologous recombination에 의해 염색체 DNA의 CAR1 유전자 사이에 NEO 유전자를 삽입시킴으로써 car1 유전자의 deletion 변이주를 만들 수 있다.

따라서 재조합 plasmid pUC19-car1::NEO로부터 linear 형의 car1::NEO DNA 단편을 얻기 위하여 제한 효소 PvuII 로 처리한 다음 단수체 ura3 변이주인 6a-ura와 6c-ura에 형질전환시켜 CAR1 유전자의 deletion을 시도하였다. 이때 selective marker로서는 NEO 유전자의

geneticin 저항성을 이용하였다. 이렇게 하여 수 십개의 geneticin 저항성을 나타내는 형질전환체를 분리하였으나 이들 모두는 arginine을 유일한 질소원으로 첨가한 YNB 배지에서 모두 생육이 가능하였다. CAR1 유전자가 deletion되었을 경우 형질전환체는 질소원으로서 arginine을 이용하지 못한다. 이 실험은 수십 회 반복하였음에도 불구하고 car1 deletion 변이주를 분리할 수가 없었다. 이러한 현상은 1년차 연구에서 ura3 deletion 변이주의 분리를 시도하였을 때도 동일한 현상을 나타낸 바 있다. 현재까지 그 이유는 알 수 없으나 6a와 6c와 같은 단수체 전통주 효모의 경우 NEO 유전자를 selective marker로 사용할 수가 없는 것으로 생각되었다. 따라서 제7절의 방법으로 antisense CAR1 DNA에 의한 CAR1 유전자의 발현 제어를 시도하였다.

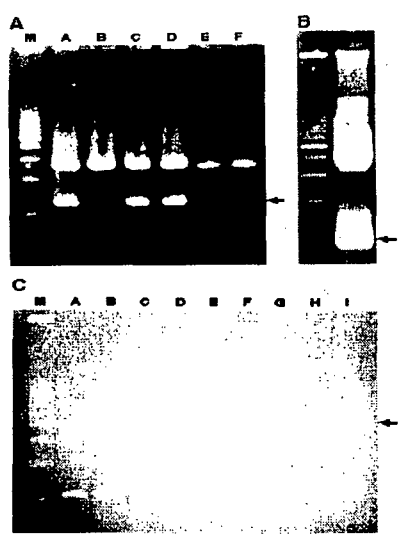


Fig. 2-6-5. Restriction enzyme analyses of recombinant plasmids
M represent 1 kb ladder DNA as a size marker. A: pUC19-CAR1/Hind III+Eco RI, B: pUC19-ura3::NEO/Bam HI, C: pUC19-car1::NEO/BglII

제7절 Antisense CAR1에 의한 요소 비생성 효모 균 주의 개량

1. 효모 CYC1 promoter-antisense CAR1 DNA의 제작

Antisense CAR1 DNA를 사용하여 CAR1 유전자의 발현을 억제하기 위하여 PCR에 의하여 antisense CAR1 DNA를 증폭시킨 후 이 증폭된 PCR 산물의 단편과 효모 CYC1 promoter와의 fusion을 행하였다.

PCR primer의 설계는 *S. cerevisiae* CAR1 유전자 염기서열로부터 start codon을 가지는 염기서열(CAR1-2)과 전사개시점을 가지는 염기서열(CAR1-3)을 기준으로 각각 27-mer의 forward primer를 설계하였으며, start codon으로부터 501 bp 위치의 염기서열을 기준으로 27-mer의 reverse primer(CAR1-1)를 설계하였다.

PCR 산물의 클로닝을 용이하게 하기 위하여 CAR1-1에는 BamHI, CAR1-2와 CAR1-3에는 KpnI 제한효소 부위를 가지도록 primer를 설계하였다. 이 primer들을 사용하여 증폭된 antisense CAR1 DNA는 제한효소 BamHI과 KpnI으로 절단하여 벡터 plasmid에 클로닝이 가능하다. 이렇게 설계된 primer는 (주)바이오니아에서 합성하여 urea-polyacrylamide gel을 사용하여 정제한 후 실험에 사용하였으며, 합성된 primer의 종류와 염기서열은 Fig. 2-7-1과 같다.

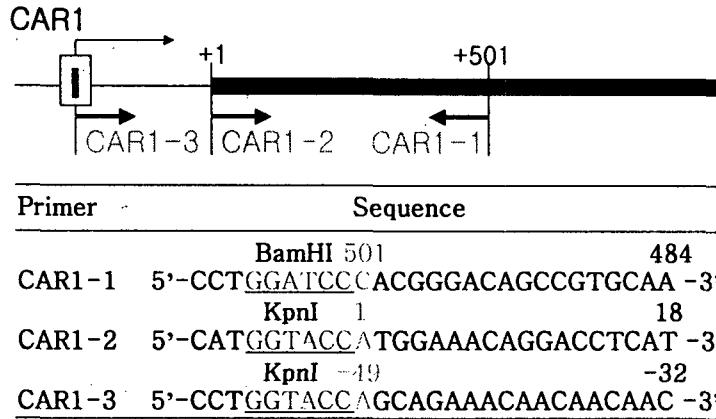


Fig. 2-7-1. Primers for the amplification of antisense CAR1 DNA used in the PCR. The exact position and sequences of the primers were shown in the table. Restriction enzyme sites for the cloning of PCR products were underlined. The number shown above each sequence indicates the position from the start codon of yeast CAR1 gene.

*S. cerevisiae*의 antisense CAR1 DNA 제작을 위한 template DNA로 CAR1 유전자를 함유하고 있는 pUC19-CAR1 plasmid DNA를 사용하였으며, pUC19-CAR1에 제한효소 BamHI을 처리하여 template DNA인 CAR1 유전자를 획득하였다. *S. cerevisiae*의 CAR1 유전자에 대한 antisense CAR1 DNA를 증폭시키기 위하여 CAR1-2, CAR1-3을 forward primer로 CAR1-1을 reverse primer로 사용하였으며, pUC19-CAR1로부터 얻은 CAR1 유전자를 template DNA로 사용하여 PCR을 행하였다. 이 때 template DNA의 양을 결정하기 위하여 원액 및 10배 희석액을 template DNA로 사용하여 PCR을 행하였으며, 적절한 희

석배수를 정하기 위하여 전기영동을 행하였다. 그 결과, 가장 적절한 template DNA의 희석배수로 10배로 결정하였다. 이상에서 정한 조건으로 PCR을 행하여 antisense CAR1 DNA를 대량 획득하였으며, 전기영동 결과, CAR1-1과 CAR1-2를 primer로 사용하여 얻은 antisense CAR1-21 DNA는 약 501 bp, CAR1-1과 CAR1-3을 primer로 사용하여 얻은 antisense CAR1-31 DNA는 약 550 bp를 나타내는 것이 확인되었다(Fig. 2-7-4, left panel).

Primer CAR1-2와 CAR1-1으로부터 증폭된 PCR 산물을 antisense CAR1-21, primer CAR1-3과 CAR1-1으로부터 증폭된 PCR 산물은 antisense CAR1-31이라 명명하였다. Vector DNA로 ampicillin 저항성 유전자를 지니고 있는 pUC19를 사용하였으며, 이를 SalI과 BamHI으로 절단(2.67 kb와 12 bp)하여 2.67 kb의 단편을 분리하였다. Antisense CAR1 DNA의 발현을 위한 CYC1 promoter를 얻기 위하여 plasmid pLG669Z를 SalI과 BamHI으로 절단(10.9 kb와 1.08 kb)하였으며, 1.08 kb의 CYC1 promoter를 분리하였다. pUC19 vector DNA와 CYC1 promoter의 몰농도 비가 1 : 3이 되도록 하여 ligation 시켰으며, 이를 pUC19-P_{CYC1}이라 명명하였다. 다음 단계로 pUC19-P_{CYC1} plasmid DNA 내의 CYC1 promoter에 antisense CAR1 DNA를 ligation 시키기 위하여 pUC19-P_{CYC1}을 KpnI과 BamHI으로 절단(3.74 kb와 9 bp)하였으며, 3.74 kb의 단편을 분리하였다. 여기에 spun-column chromatography로 정제한 antisense CAR1-21과 CAR1-31 DNA를 제한효소 KpnI과 BamHI으로 절단(501 bp와 550 bp)하여 ligation시켰으며, pUC19 vector DNA에 CYC1 promoter와 antisense CAR1-21을 ligation시킨 재조합 plasmid DNA를 pMC21(Fig. 2-7-2), antisense CAR1-31을 ligation시킨 재조합 plasmid DNA를 pMC31이라고 명명하였다(Fig. 2-7-3).

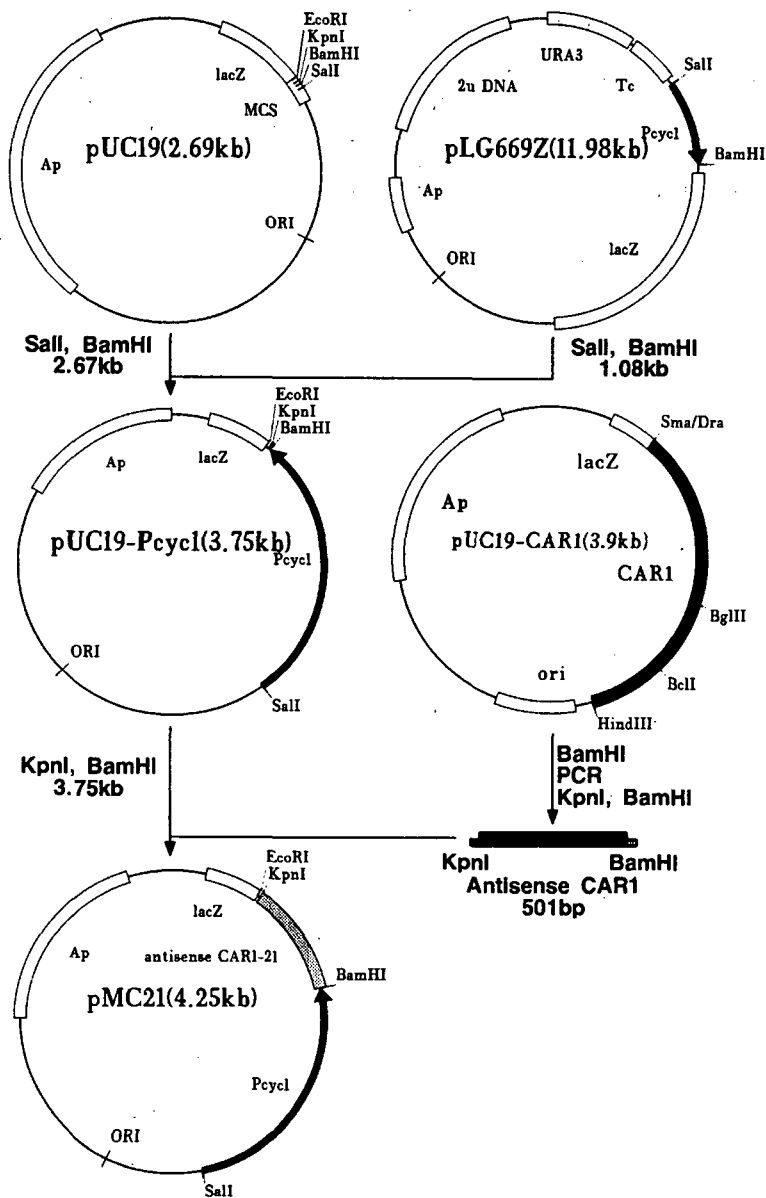


Fig. 2-7-2. Strategy for the construction of recombinant plasmid pMC21 containing yeast *CYC1* promoter-antisense *CAR1* DNA. Plasmid pMC21 carries 501 bp (from ATG start codon) antisense *CAR1* DNA fragments fused to 1.08 kb DNA fragment containing yeast *CYC1* promoter.

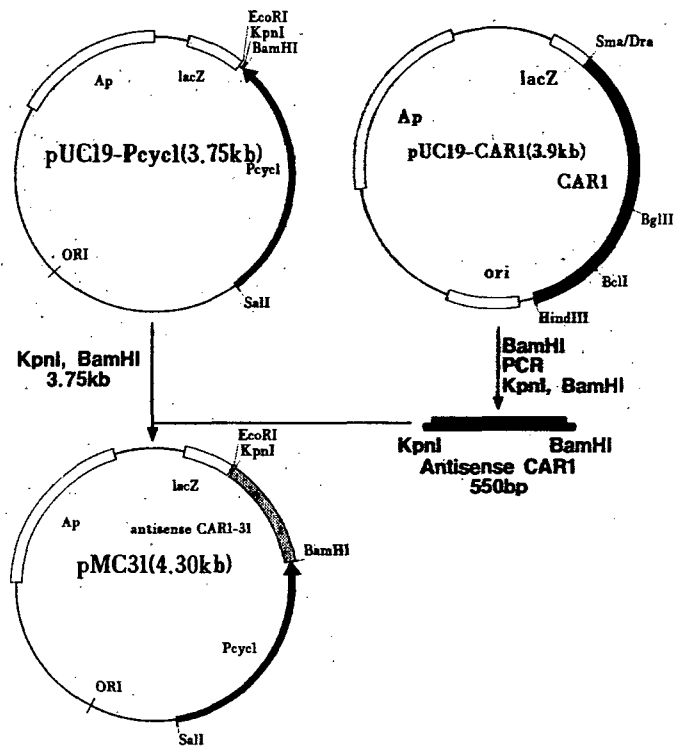


Fig. 2-7-3. Strategy for the construction of recombinant plasmid pMC31 containing yeast CYC1 promoter-antisense CAR1 DNA. Plasmid pMC31 carries 550 bp (from transcription initiation site) antisense CAR1 DNA fragments fused to 1.08 kb DNA fragment containing yeast CYC1 promoter.

E. coli HB101 형질전환체로부터 얻은 pMC21과 pMC31을 정제하여 제한효소 KpnI과 SalI을 처리하였으며, 재조합 plasmid DNA의 size를 전기영동으로 확인하였다. Agarose gel에서 전기영동한 결과 pMC21은 2.7, 1.0, 0.5 kb, pMC31은 2.7, 1.0, 0.6 kb의 밴드패턴을 나타냄을 확인하였으며, 두 plasmid의 insert 크기를 비교하였다(Fig. 2-7-4, right panel).

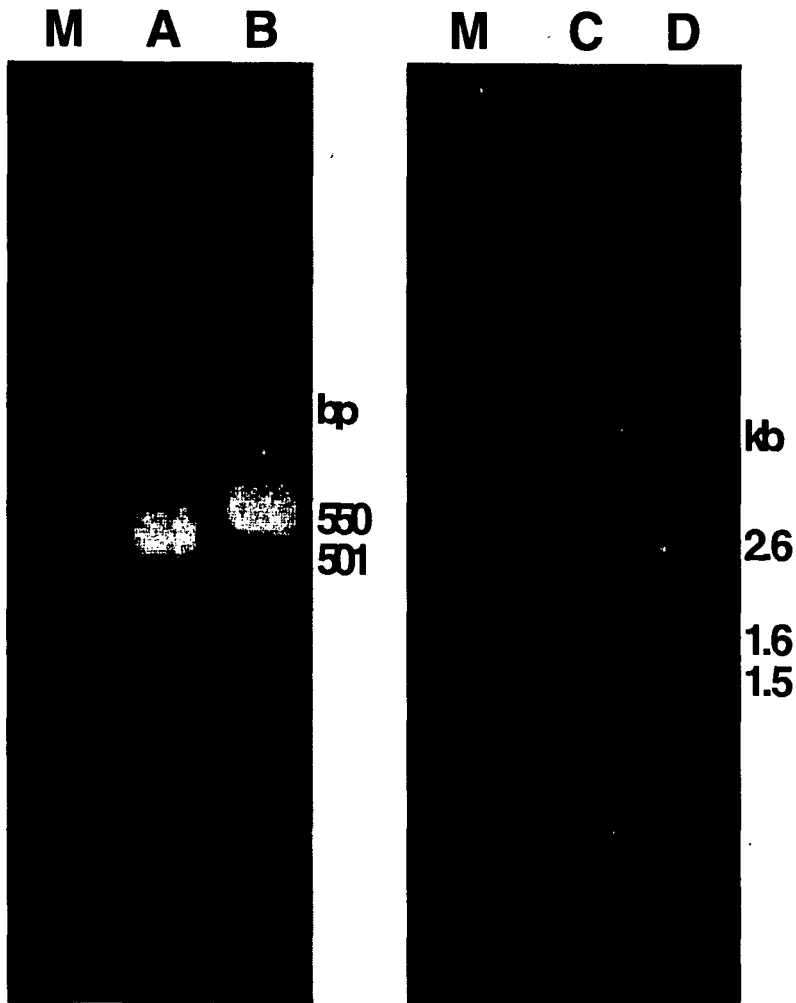


Fig. 2-7-4. Agarose gel electrophoretic patterns of antisense CAR1 DNA fragments synthesized by PCR (left panel), and recombinant plasmid pMC21 and pMC31 (right panel). The plasmids pMC21 and pMC31 were verified to contain 1.58 kb (1.08 kb CYC1 promoter + 0.50 kb antisense CAR1) and 1.63 kb (1.08 kb CYC1 promoter + 0.55 kb antisense CAR1) inserts, respectively.

2. 효모 CYC1 promoter-antisense CAR1 DNA의 YIp 벡터에의 클로닝

Antisense CAR1 DNA와 그의 발현을 위한 CYC1 promoter를 효모에 형질전환시키기 위해 효모의 selective marker로서 URA3 유전자와 대장균의 ampicillin 저항성 유전자를 가지고 있는 YIp5를 vector DNA에의 클로닝을 시도하였다. 대장균에서는 Ap^r 유전자를 효모에서는 URA3를 selective marker로 이용하였다.

Vector DNA인 YIp5를 SalI과 EcoRI으로 절단(4.89 kb와 654 bp)하여 Ap^r과 URA3 marker를 지닌 4.89 kb의 단편을 분리하였으며, pMC21과 pMC31을 SalI과 EcoRI으로 절단(2.65 kb와 1.59 kb ; 2.65 kb와 1.64 kb)하여 CYC1 promoter와 antisense CAR1 DNA를 지니고 있는 pMC21의 1.60 kb와 pMC31의 1.65 kb 단편 각각을 분리하였다.

YIp5 vector DNA와 insert DNA의 몰농도가 1 : 3이 되도록 하여 ligation 시켰으며, YIp5 vector DNA에 CYC1 promoter와 antisense CAR1-21을 ligation시킨 재조합 plasmid DNA를 YMCp21(Fig. 2-7-5)라 명명하였으며, antisense CAR1-31을 ligation시킨 재조합 plasmid DNA를 YMCp31이라 명명하였다(Fig. 2-7-6).

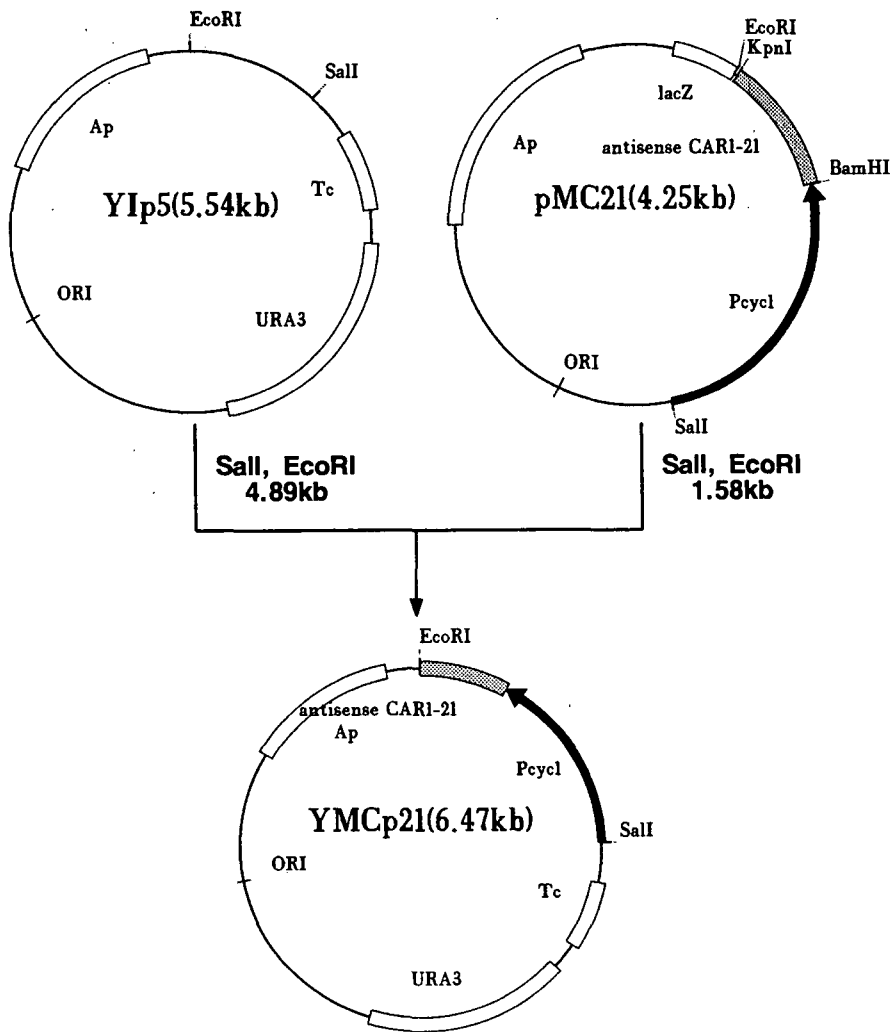


Fig. 2-7-5. Cloning of the *CYC1* promoter-antisense *CAR1* DNA of plasmid pMC21 into the yeast integration vector plasmid YIp5 for transformation into yeast *ura3* mutant.

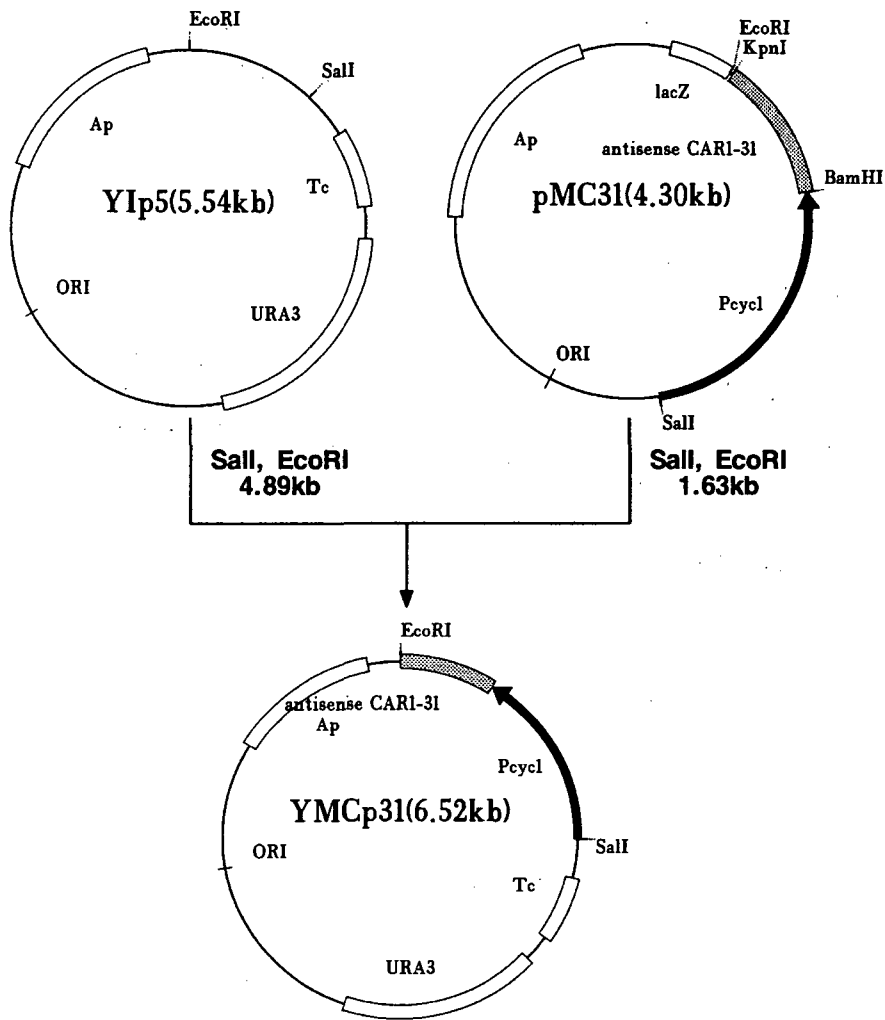


Fig. 2-7-5. Cloning of the *CYC1* promoter-antisense *CAR1* DNA of plasmid pMC31 into the yeast integration vector plasmid YIp5 for transformation into yeast *ura3* mutant.

E. coli HB101 형질전환체로부터 얻은 YMCp21 과 YMCp31을 정제하여 제한효소 SalI과 EcoRI을 처리하였으며, 재조합 plasmid DNA의 size를 전기영동으로 확인하였다. 전기영동 결과 YMCp21은 4.89 kb와 1.60 kb, YMCp31은 4.89 kb와 1.65 kb를 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 2-7-7).

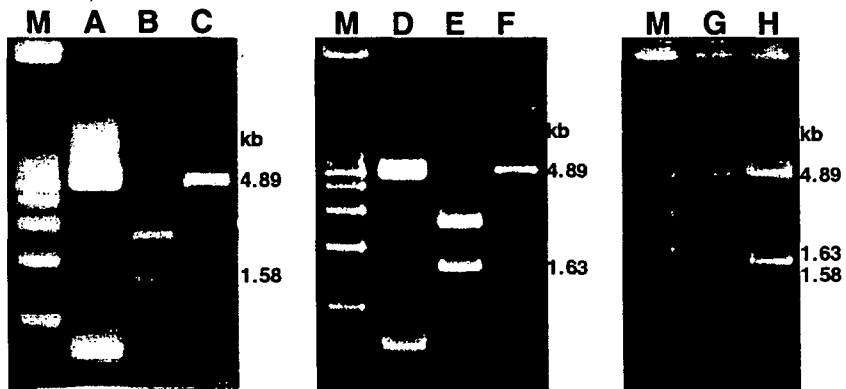


Fig. 2-7-7. Restriction enzyme analysis of the recombinant plasmids YMCp21 and YMCp31 containing the CYC1 promoter-antisense CAR1 DNA cloned in YIp5 vector plasmid.

M, 1 kb ladder as a DNA size marker; A and D, YIp5 digested with SalI and EcoRI; B, YMCp21 digested with SalI and EcoRI; C and G, YMCp21 digested with SalI and EcoRI; E, YMCp31 digested with SalI and EcoRI; F and H, YMCp31 digested with SalI and EcoRI

3. 효모 형질전환 및 CYC1-antisense CAR1의 효모내 integration

Antisense CAR1 DNA 단편을 함유하고 있는 재조합 plasmid에 의한 효모 arginase의 발현 억제 정도를 조사하기 위하여 재조합 plasmid YMCp21과 YMCp31을 사용하여 효모 형질전환을 실시하였다. 이때 사용된 효모 균주는 *S. cerevisiae* TCY1, TCY15, 6a-ura 및 6c-ura를 사용하였으며, 각 type의 효모균주에 YMCp21과 YMCp31을 각각 형질전환시켰다. 일반적으로 antisense RNA를 이용한 유전자 조작시 문제가 되는 재조합 plasmid DNA의 불안정성이라는 단점을 개선하기 위하여 yeast integration plasmid인 YIp5를 vector DNA로 사용하여 안정성을 높이고자 하였으며, 이때 YMCp21과 YMCp31은 효모의 염색체 DNA에 무작위로 integration이 되어 형질전환된다. YMCp21 혹은 YMCp31이 형질전환된 효모균주는 URA3를 selective marker로 YNB 배지를 사용하여 선별하였다. 균주 6a-ura와 6c-ura의 형질전환체의 선별을 위하여는 YNB 고체배지를, 균주 TCY1과 TCY15 형질전환체의 선별을 위하여는 YNB 고체배지에 lysine을 첨가하여 사용하였다.

또한 선별된 형질 전환체들의 형질전환을 확인하기 위해 최소배지인 YNB 액체배지에 각각 20 mg/l의 lysine을 첨가한 것(TCY1과 TCY15의 형질전환체 경우)과 첨가하지 않은 배지(6a-ura와 6c-ura의 경우)를 사용하여 형질전환체들의 생육정도를 확인한 결과, 친주의 경우 uracil을 첨가한 배지에서만 생육이 가능하였으나 형질전환체의 경우에는 uracil을 첨가하지 않은 배지에서도 생육이 가능하였다. 이 결과들로 미루어 보아 이들 균주들이 형질전환되었음을 확인할 수 있었다. (Table 2-7-1).

Table 2-7-1. Growth comparison of recipient and transformant cells.

Yeast strain	YNB	YNB + Uracil
Parent	—	+
Transformant	+	+

* For the growth of TCY1 and TCY15 transformants, 20 mg/l lysine was also added to the medium.

4. 재조합 효모의 arginase 활성 조사

Antisense RNA 기법을 이용하여 재조합한 효모에서 CAR1 유전자의 발현이 억제된 것을 확인하기 위하여 arginase 활성을 측정하였다. Arginase의 활성 측정은 기질인 arginine 일정량을 첨가한 후 arginase에 의해 분해된 요소를 정량하여 알 수 있다. 재조합 효모에서의 arginase 발현억제를 확인하기 위하여 수용세포와 형질전환체 효모의 arginase 활성을 측정하였으며, 재조합 효모의 mating type 및 antisense RNA 구조에 따른 arginase 활성을 비교하였다.

Arginine을 포함하는 YNB 배지에서 본배양을 하였으며, *S. cerevisiae* TCY1과 TCY15는 uracil과 lysine을 첨가한 배지에서 그리고 재조합 효모균주는 lysine만을 첨가한 배지에서 배양하였다. 배양액으로부터 회수한 효소액에 0.8M arginine을 가하여 일정시간 동안 반응을 시킨 후, arginase에 의해 생성된 요소의 양을 정량하였으며, 기질인 arginine을 첨

가하지 않은 반응액과 효소액을 첨가하지 않은 반응액 각각을 대조구로 사용하였다. 이때 사용된 효소의 unit는 $A_{600}=1$ 인 균체현탁액 1ml를 반응 조건에서 반응시켜 생성된 요소의 양을 말하며 unit/cell density로 나타내었다.

Plasmid YMCp21과 YMCp31로 각각 형질전환된 6a-ura, 6c-ura의 형질 전환체들의 CAR1 유전자의 발현 억제 정도를 확인하기 위하여 arginase의 활성을 조사하였다. 이와 함께 유전자형이 ura3인 *S. cerevisiae* TCY1, TCY15을 두 plasmid로 형질전환시킨 재조합 효모의 arginase 활성도 함께 비교하였다. 각 균주들을 YPD 액체 배지에서 종배양한 후 균주 6a-ura와 6c-ura는 uracil과 arginine을 첨가한 YNB 액체 배지에, 형질 전환체는 arginine만 첨가된 YNB 액체 배지에서 배양한 후 arginase의 활성을 측정하였다. 각 형질 전환체와 대조구인 수용 균주들의 arginase 활성을 조사한 결과, 6a-ura 와 6c-ura의 경우 arginase의 활성이 모두 20 단위 이상으로 나타난 것에 비해 형질 전환체들은 20 단위 이하의 활성을 나타내었다. Plasmid YMCp21로 형질 전환된 균주가 YMCp31에 비해 arginase 활성 억제효과가 더 높은 것으로 나타났으며 6a-ura 균주를 plasmid YMCp21로 형질전환한 경우 arginase 활성이 약 57%정도 억제되어 억제 효과가 가장 높은 것으로 나타났다.

TCY1과 TCY15의 경우는 arginase의 활성이 높은 것으로 나타났으며 형질 전환체의 경우 arginase의 활성이 현저히 줄어든 것을 알 수 있으나 형질 전환체의 경우도 전통주에서 분리한 야생 효모의 arginase의 활성과 비교할 때 거의 비슷한 것으로 나타나 전통주에서 분리한 효모의 arginase활성이 약한 것으로 보여진다(Fig. 2-7-8).

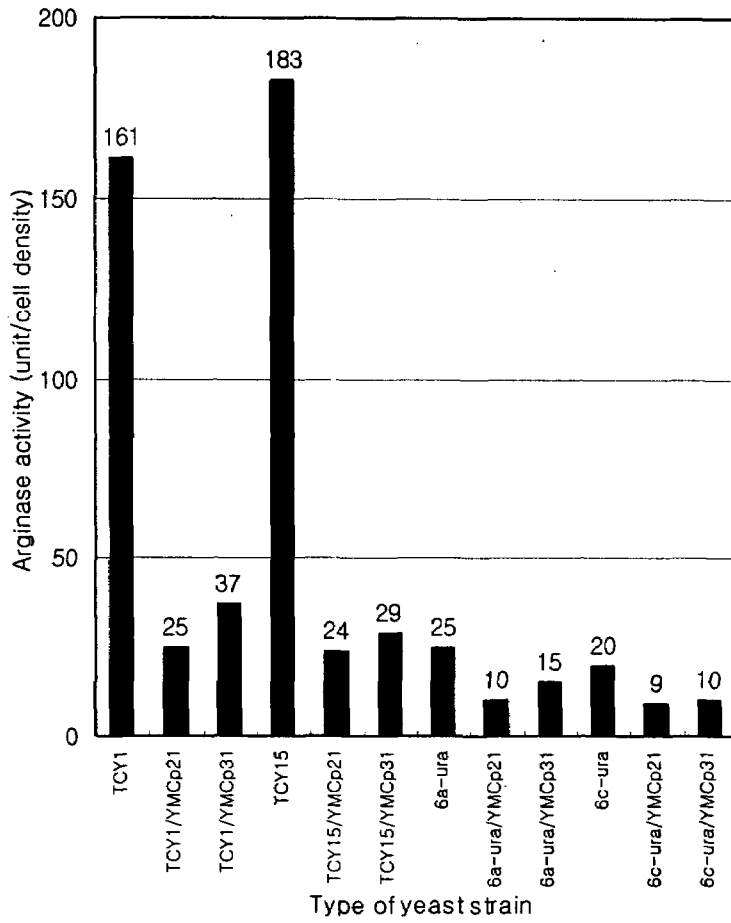


Fig. 2-7-8. Comparison in the arginase activities of parent type and recombinant yeast strains.

제8절 배수체 재조합 효모의 생리적 특성 및 요소 생성능

1. 배수체 재조합 효모의 제조

본 실험에서 사용 중인 *S. cerevisiae*는 배수체 세포 상태로 존재할 때 안정하며 증식력도 우수하다고 보고되어 있다. 따라서 본 실험에서 개량한 단수체 재조합 효모를 배수체화 시킴으로써 약주 제조에 사용시 안정된 상태를 유지할 수 있다.

따라서 여러 균주들을 서로 교배하여 배수체 효모를 제조하고자 하였다. arginase 억제 효과가 우수한 YMCp21로 형질전환된 6a-ura/YMCp21와 6c-ura/YMCp21, 그 외 분리하여 보관 중인 생육이 우수한 균주 2종을 선택하여 교배하였다. YPD 액체 배지에서 하룻밤 배양한 각각의 단수체 효모들을 YPD 고체 배지상에서 서로 교차하여 획선 도말한 후 30℃에서 하룻밤 배양하였다. 이 후 교차되어 도말되어진 부분에서 형성된 균체에서 1백금이 취하여 새로운 YPD 고체 배지로 옮겨서 획선 도말하여 배양한 후 생성된 콜로니들을 분리하였다. 분리된 콜로니들의 포자 형성 유무를 확인하므로써 배수체 형성 유무를 알 수 있다.

콜로니들의 YPD 종배양액을 presporulation 액체 배지(yeast extract 0.8%, peptone 0.3%, potassium acetate 5%)에 5%가 되도록 접종하여 22℃에서 진탕배양한 후 정지기의 배양액으로부터 균체를 분리하여 멸균수로 2회 세척하고 1V의 sporulation 액체 배지(yeast extract 0.1%, glucose 0.05%, potassium acetate 1%)에 재현탁한 후 30℃에서 4일이상 진탕배양하면서 포자 형성 유무를 관찰하였다. 그 결과, 여러 종류의 단수

체들과 교차 도말하여 획득한 콜로니들 중에서 6a-ura/YMCp21 과 6c-ura/YMCp21을 교차 도말한 경우와 대조구로서 6a와 6c를 교차 도말한 경우에서 포자가 형성됨을 확인할 수 있었다. 따라서 이 콜로니를 배수체 재조합 효모로서 선별할 수 있었다. 포자 형성된 결과는 Fig. 2-8-1에서 볼 수 있다.

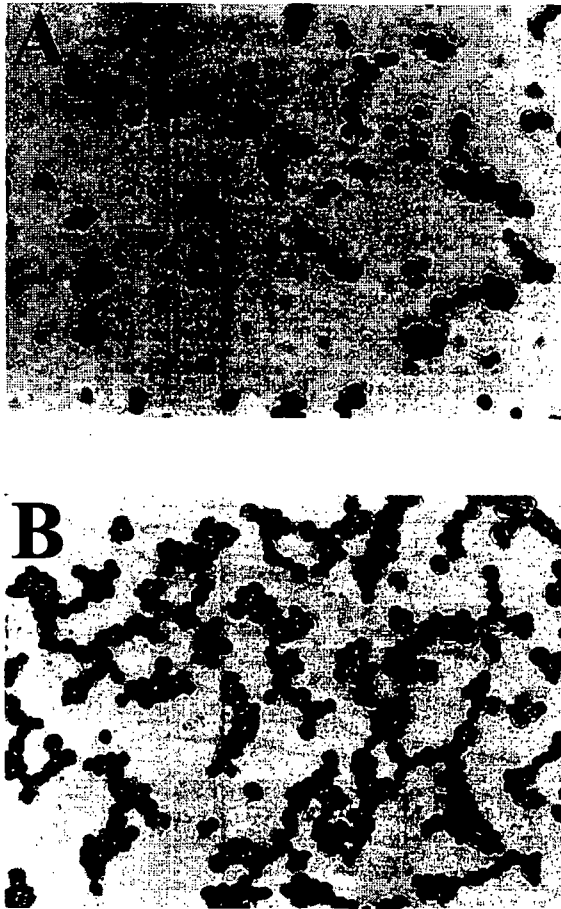


Fig. 2-8-1. Microphotograph of asci of parent and recombinant yeast strains.

A: 6a/6c B : 6a-21/6c-21

2. 배수체 재조합 효모의 생육도

재조합된 배수체 효모의 생육도를 조사하기 위해 6a-ura-21/6c-ura-21로 교배된 배수체 효모를 각각 YPD 액체 배지와 arginine을 첨가한 YNB 액체 배지에 접종하여 30°C에서 진탕배양하면서 2시간 마다 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 대조구로서는 6a-ura와 6c-ura 균주를 교배하여 제조한 배수체를 각각 YPD 배지와 uracil이 첨가된 YNB 배지에 접종하여 생육 정도를 비교하였다 (Fig. 2-8-2).

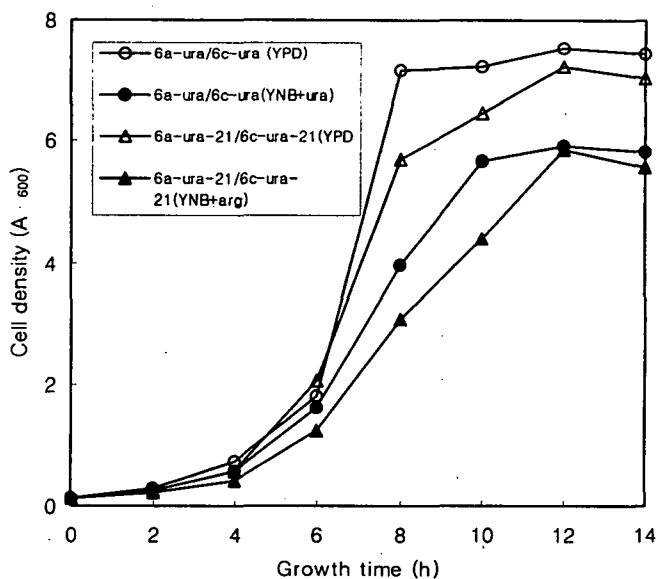


Fig. 2-8-2. Growth of parent and recombinant diploid yeast strains in YPD and YNB media.

배수체 재조합 효모와 대조구의 YPD 배지 상에서의 생육도를 비교해보면 생육 초기에는 개량 배수체 효모와 대조구의 생육속도가 비슷하였으나 이후 대조구의 증식이 빠른 것으로 나타났으며 최대 생육 정도를 비교하면 대조구의 경우가 약간 높은 것으로 나타났다. 각각 uracil 이나 arginine을 첨가한 YNB 배지에서 배양한 경우에는 최대 생육도가 낮은 것을 제외하고는 생육 패턴은 YPD 배지에서와 유사하게 나타났다. 결과적으로 개량 효모의 생육 정도는 대조구와 비교해서 큰 차이를 나타내지는 않는 것으로 보여진다.

3. 배수체 재조합 효모의 전통주 제조시 요소 생성능

배수체 재조합 효모를 사용하여 제조한 약주의 요소 함량을 측정하여 현재 시판되고 있는 각종 약주의 요소 함량과 비교한 결과는 Fig. 2-8-3과 같다. 재조합 효모에 의한 약주의 요소 함량은 0.170ppm으로서 현재 시판되고 있는 다른 약주에 비하여 그 함량이 낮았다. 특히 요소의 함량이 가장 높은 것으로 나타난 약주 5의 경우에 비하여 그 함량이 2.5% 정도 밖에 되지 않았다. 그러나 친주 배수체 효모에 의한 경우의 0.299ppm에 비하여는 약 55% 수준을 나타내었다. 이로 미루어 보아 친주 배수체 효모인 6a/6c의 경우에도 다른 전통주 효모에 비하여 아주 낮은 요소 생성능을 가지고 있음을 알 수 있었다.

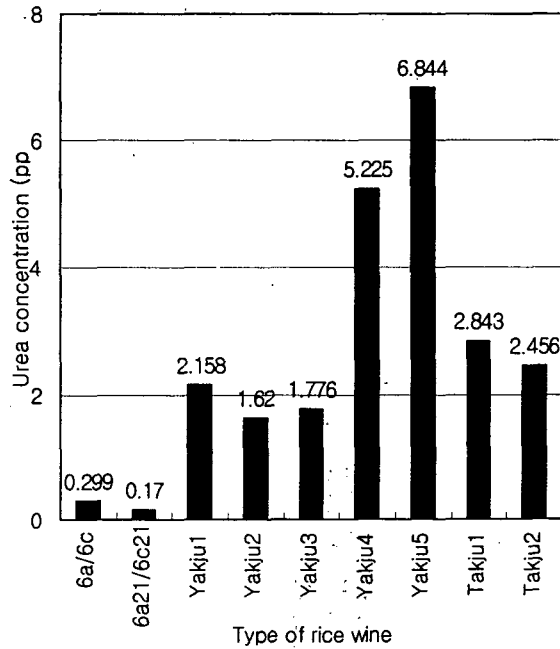


Fig. 2-8-3. Urea content in the yakju fermented by the recombinant diploid yeast strain compared with various commercial yakju.

이와 같이 재조합 효모 균주에 의한 약주 제조시 요소의 함량이 낮아지는 현상을 확인하기 위하여 재조합 효모를 사용하여 약주를 발효시키면서 발효 후 5일째와 9일째 발효 여액 중 요소의 함량을 조사한 결과는 Fig. 2-8-4와 같이 나타났다. 발효 후 5일째와 발효 종료시 최종 발효액 중에 요소의 함량의 변화에서 보여지는 것처럼 대조구의 경우 요소 함량의 변화가 거의 없는 것으로 나타나는데 비해 재조합 효모 균주의 경우에

는 발효가 경과됨에 따라 요소가 약 40%정도 감소한 것으로 나타났다. 이러한 현상은 재조합 효모에 있어서 arginase 활성이 낮기 때문에 새로운 요소의 생성은 약하나 발효액 중에 존재하는 요소가 효모에 의해 분해되기 때문인 것으로 생각된다.

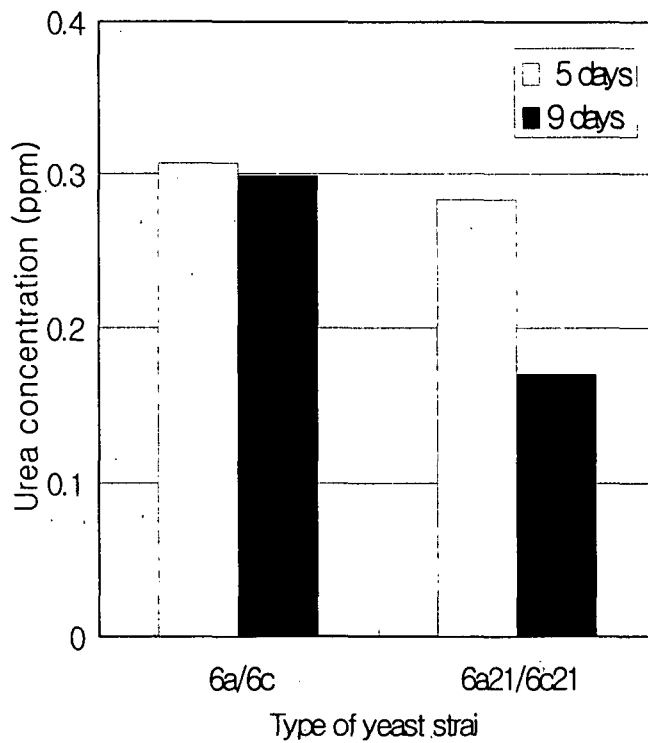


Fig. 2-8-4. Comparison of urea concentration in yakju fermented by parent and recombinant diploid yeast strains.

제9절 결 론

우리 나라 전통주에는 상당량의 발암성 ethyl carbamate를 함유하고 있는데 이 ethyl carbamate는 강력한 발암성 물질로 알려져 있다. 따라서 외국에서는 이미 주류의 ethyl carbamate 함량에 관하여 엄격한 기준을 정하여 두고 있다. 또한 ethyl carbamate의 전구물질인 요소의 비생성 균주를 개량하여 현재 산업화 연구 단계에 있기도 하다. 그러나 우리 나라의 경우 현재까지 유전공학적 방법으로 균주를 육종하기 위하여 필수적으로 필요한 단수체 효모마저 분리된 바 없는 실정이다. 본 제1세부과제에서는 우리 나라 전통주의 발효에 관여하는 알코올 효모를 분리하여 spore dissection 방법으로 단수체 ura3 영양요구성 변이주를 분리하고 이 균주를 이용하여 유전자 조작에 의한 arginase의 생합성을 제어함으로써 요소 비생성 효모 균주를 개량하였다. 그 결과를 정리하면 다음과 같다.

1. 우리 나라 전통주 효모의 분리 및 동정

- 1) 우리 나라 대표적인 전통주인 탁주와 약주의 술덧으로 부터 약 250여 주의 효모를 분리하였다. 각각의 전통주에서 분리한 10주씩의 균주를 자동동정시스템으로 동정한 결과 탁주와 1개의 약주에서는 10주 모두, 2종의 약주에서는 9주가 *S. boulardii*로 동정되었으며 유사도는 64.7-98.3%이었다.
- 2) 자동동정 시스템에 의해 *S. boulardii*로 동정된 균주들 중에서 알코올 발효력이 가장 강한 한 균주 SHY111을 선별하여 균의 형태학적 및 배양학적, 생리학적 특성을 조사한 결과를 기초로 하여 Lodder,

Barnet, Rij 및 Kurtzman의 분류기준에 따라 *S. cerevisiae* 유연군으로 동정하였다.

- 3) *S. cerevisiae* SHY111의 온도에 따른 생육특성은 30℃에서 균주 성장상태가 가장 우수하였고 15℃에서는 균주가 성장이 느렸으며 25℃에서는 초기 생육은 낮았지만 최종 생육상태는 30℃와 같아 효모의 최적 온도는 30℃임을 알 수 있었다. *S. cerevisiae* SHY111의 pH별 생육특성은 pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0에서 모두 생육이 양호하였다.
- 4) *S. cerevisiae* SHY111의 발효특성을 조사한 결과 온도에서는 15, 20℃ 같은 낮은 온도와 pH 3.0과 10.0 같은 조건에서 초기 발효율이 낮았다. 15% 이상의 고농도의 당에서도 초기 발효속도는 낮아졌고 정처 배양시는 진탕 배양시보다 초기 발효율은 낮지만 최종 발효율은 진탕 배양시와 별 차이가 없는 발효율을 나타내었다.
- 5) 분리균주 *S. cerevisiae* SHY111의 알코올 발효력을 현재 산업적으로 이용되고 있는 *S. cerevisiae* 발연 1호와 *S. coreanus*와 비교한 결과 분리균주가 더욱 발효력이 높았다.

2. 전통주 효모 균주와 표준균주와 특성 비교

- 1) *S. cerevisiae* SHY-111와 효모 표준균주 *S. boulardii*, *S. coreanus*, *S. cerevisiae* 288c를 사용하여 발효성과 자화성을 조사한 결과 *S. cerevisiae* SHY-111, *S. boulardii*, *S. coreanus*, *S. cerevisiae* S288c 균주 간의 탄소원 발효성과 자화성은 몇 종류의 당에서 만 차이를 나타냈다.
- 2) 분리균주 *S. cerevisiae* SHY-111의 ITS (internal transcribed spacer) 영역을 PCR로 증폭시켜 조사한 결과 PCR 산물의 크기가 동

- 일하였다.
- 3) 상기 2)항의 PCR 단편을 pUC19 벡터 plasmid에 클로닝한 후 그 염기서열을 조사한 결과 효모 표준균주인 *S. cerevisiae* 288c, *S. coreanus* 및 *S. boulardii*의 것과 동일하였다. 따라서 이 균주들은 모두 유전적으로 매우 가까운 것임을 알 수 있었다.
 - 4) 분리 균주 *S. cerevisiae* SHY111과 *S. boulardii*, *S. coreanus*, *S. cerevisiae* 288c 균주의 차이를 알아보기 위하여 RNA splicing site의 염기서열을 토대로 PCR primer 4종류를 제작하여 이들을 분류할 수 있는 방법을 확립하였다.
 - 5) RNA splicing site 부위의 primer 4종류 각기 또는 한 쌍을 이용하여 PCR을 행한 결과 EI2 primer의 경우 *S. cerevisiae* SHY-111에서만 200bp의 특이적인 band가 관찰되어 나머지 균주와 구별을 할 수 있었다.
 - 6) 전통주 4종류로부터 분리한 균주 40주의 염색체 DNA를 주형으로 하여 균주 *S. cerevisiae* SHY111 특이적 200bp를 증폭하는 primer EI2로 PCR하여 DNA patten을 비교한 결과 우리 나라 전통주에 관여하는 대부분의 효모들은 모두 같은 약간의 차이만 있을 뿐 유사한 균주로 구성되어 있음을 알 수 있었다.
 - 7) 4종의 전통주 효모들 중에서 한 종의 약주에서는 10주 모두, 한 종의 약주에서는 10주 중 2주만이 200bp의 특이적 band가 관찰되었다. 나머지 한종의 약주와 탁주의 효모들로부터는 전혀 200bp band가 검출되지 않았다.

3. 단수체 *ura3* 변이주의 분리 및 특성

- 1) 전통주 효모 *S. cerevisiae* SHY111의 포자형성을 위한 최적 배지의 조성은 0.8% yeast extract, 0.3% Bacto-peptone, 5% potassium acetate이었으며 이 배지에서 유도기까지 배양한 세포가 가장 높은 포자형성 빈도를 나타내었다.
- 2) 전통주 효모 *S. cerevisiae* SHY111의 포자를 micromanipulator로서 분리하여 단수체 효모를 제조하였다.
- 3) 각종의 단수체 효모는 YPD 배지와 YNB 배지에서 서로 다른 생육 양상을 보였으며 특히 그 차이는 YNB 배지에서 더욱 컸다.
- 4) 분리된 각종의 단수체 효모를 이용하여 15% glucose를 함유하는 YPD 배지에서 알코올 발효를 행한 결과 다양한 발효 양상을 나타내어 분리 효모균주가 유전적으로 불안정함을 알 수 있었다.
- 5) *ura3* deletion을 위하여 *ura3::NEO*를 함유하는 *ura3* deletion plasmid를 제작하였다. 그러나 각종의 단수체 효모는 *ura3::NEO* 단편에 의해 homologous recombination이 불가능하였다.
- 6) 각종의 단수체 효모에 ethyl methyl sulfonate를 처리하여 *ura3* 변이주를 분리하였다. 분리된 변이주는 uracil을 함유하지 않는 YNB 배지에서 생육이 불가능하였으며 uracil을 함유하는 배지에서는 생육이 양호하였다.

4. 요소 비생성 효모 균주의 육종

- 1) *CAR1* 유전자의 deletion을 위하여 yeast gene library로부터 콜로니 하이브리디제이션에 의하여 *CAR1* 유전자를 분리하였다. 1.2kb의

- CAR1 유전자를 서브클로닝하여 car1 deletion plasmid의 제작 및 antisense CAR1 DNA의 제작을 위한 주형으로 사용하였다.
- 2) car1::NEO 단편을 함유하는 car1 deletion plasmid를 제작하여 이 단편으로 단수체 ura3 변이주를 형질전환시킨 결과 homologous recombination에 의한 car1 deletion 변이주가 형성되지 않았다.
 - 3) Antisense CAR1 DNA를 이용한 arginase의 제어를 위하여 CAR1 유전자 염기서열로부터 start codon을 가지는 염기서열(CAR1-2)과 전사개시점을 가지는 염기서열(CAR1-3)을 기준으로 각각의 forward primer를 설계하였으며, start codon으로부터 501 bp 위치의 염기서열(CAR1-1)을 기준으로 reverse primer를 설계하였다.
 - 4) plasmid DNA 내의 CAR1 유전자를 template DNA로, CAR1-1과 CAR1-2를 primer로 사용하여 antisense CAR1-21(501 bp)을, CAR1-1과 CAR1-3을 primer로 사용하여 antisense CAR1-31(550 bp) DNA를 대량 증폭하였다.
 - 5) 500bp와 550bp의 antisense CAR1 DNA를 효모 CYC1 프로모터에 fusion한 후 CYC1-antisense CAR1 DNA를 YIp5 벡터 plasmid에 클로닝하여 YMCp21 및 YMCp31 재조합plasmid를 제작하였으며 제한 효소를 처리하여 각각의 단편을 확인하였다.
 - 6) Antisense CAR1 DNA를 함유하는 재조합 plasmid YMCp21과 YMCp31을 전통주 효모 단수체 ura3 변이주와 대조구로서 TCY1 및 TCY15 균주에 형질전환하여 arginase의 합성을 제어할 수 있는 단수체 재조합 효모를 제조하였다.
 - 7) 재조합 plasmid YMCp21을 함유하는 단수체 재조합 효모 6a-ura/YMCp21 및 6c-ura/YMCp21의 경우 arginase 활성이 TCY1과 TCY15에 비하여 90% 정도가 억제되었다.

- 8) 재조합 plasmid를 함유하지 않는 전통주 효모 단수체 *ura3* 변이주 6a-*ura*, 6c-*ura* 역시 TCY1 및 TCY15에 비하여 약 70-80% 수준의 *arginase*를 생산하였다.

5. 배수체 재조합 효모의 제조 및 요소 생성능

- 1) Antisense CAR1 DNA plasmid로 형질전환된 단수체 재조합 효모 6a-*ura*/YMCp21과 6c-*ura*/YMCp21를 mating하여 배수체 재조합 효모를 제조하였다.
- 2) 배수체 재조합 효모를 확인하기 위하여 sporulation 액체배지에서 포자형성을 유도한 결과 포자를 잘 형성함을 알 수 있었으며 따라서 이 균주는 배수체 효모임을 확인하였다.
- 3) 배수체 친주세포 및 재조합 세포의 생육을 YPD 배지와 질소원으로 *arginine*를 첨가한 YNB 배지에서 조사한 결과 유사한 생육도를 나타내어 antisense CAR1 DNA에 의한 생리적 변화는 거의 없는 것을 확인하였다.
- 4) 배수체 재조합 효모를 이용하여 시험적으로 약주를 제조하였으며 약주의 요소 함량을 측정하여 시판되고 있는 각종 약주의 요소 함량과 비교한 결과 재조합 효모에 의한 약주의 경우 요소의 함량이 최고 95%가 감소하였다.

제 3 장 우리 나라 전통주 ethyl carbamate 생성기작 규명

제1절 서 설

술에 포함되어 있는 상당량의 ethyl carbamate는 강력한 발암물질로서 알려져 있기 때문에 몇몇 선진국에서는 이에 대한 기준을 정해두고 그 함량을 엄격하게 관리하고 있다. 최근 술이나 발효식품에 있어서 ethyl carbamate의 농도를 최소화하고자 하는 것이 공통적인 추세라고 할 수 있을 것이다. 일본의 경우에는 오래 전에 ethyl carbamate 전구체인 요소 비생성 청주 효모를 개량하여 현재 산업화 연구를 수행하고 있을 정도로 술에 함유되어 있는 ethyl carbamate의 함량은 위생적으로 중요한 의미를 가진다. 이와 같이 술의 ethyl carbamate의 함량을 관리하기 위하여는 ethyl carbamate의 분석기술의 확립이 선행되어야 할 것이다. 현재까지 주로 연구되어 온 것은 포도주를 중심으로 ethyl carbamate 분석기술이 발달하여 왔다. 각종의 주류는 그 마다 독특한 특성을 가지고 있기 때문에 특정 주류의 ethyl carbamate의 정확한 분석을 위하여는 그 주류에 적합한 ethyl carbamate 분석방법과 조건을 확립하여야 한다.

현재까지 우리 나라 전통주를 대상으로 ethyl carbamate 분석기술의 확립에 관하여는 거의 연구가 활성화되지 못하였다. 최근 한 보고에 의하면 우리 나라 탁주와 약주의 ethyl carbamate를 용매로 추출하여 GC-MS로 분석한 결과 회수율이 약 20%밖에 되지 않는다고 하였다. 따라서 우리 나라 전통주에 적합한 ethyl carbamate의 분석기술 확립은 중

요한 의미를 가지고 있다.

또한 최근까지 보고된 바에 의하면 술에 함유되어 있는 ethyl carbamate는 핵과를 원료로 한 과실주의 경우에는 주로 원료 과실에 함유되어 있는 배당체 유래의 CN 화합물로부터 유래되는 것으로 알려져 있다. 그러나 우리 나라 전통주와 같이 곡류 전분을 원료로 할 경우에는 원료속의 단백질이 분해되어 생성된 arginine으로부터 생성 될 가능성이 크다. 이러한 현상은 쌀을 주원료로 하는 일본 청주의 경우 원료 단백질이 가수분해되어 생성된 arginine이 효모의 arginase에 의해 분해되어 요소와 ornithine으로 분해된 후 요소와 알코올이 결합하여 생성하는 것이 알려져 있기 때문이다. 특히 알코올 발효에 관여하는 효모는 요소의 분해에 주로 관여하는 urease를 가지고 있지 않으며 DUR1,2 (degradation of urea) 유전자 산물에 의해 서서히 분해되게 된다. 그러나 arginase에 의해 arginine으로부터 요소가 생성되는 속도는 아주 빠르게 진행이 됨으로써 생성된 요소가 잘 분해되지 못하고 술 속에 남아 있어 가열살균 등의 과정을 통하여 발암성 ethyl carbamate를 생성하게 된다. 이와 같이 요소가 상당량 함유된 술을 살균하여 실온에 보관할 경우 특히 ethyl carbamate로의 전환은 더욱 증가하게 된다. 그러나 ethyl carbamate의 생성과 분석 기술에 관하여는 현재에도 거의 연구가 수행되지 못하고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 우리 나라 전통주에 함유되어 있는 ethyl carbamate의 분석 기술을 확립하고 전통주의 발효조건과 제성조건 및 저장조건에 따른 ethyl carbamate의 생성정도를 조사함으로써 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate의 생성기작을 규명하고자 하였다. 또한 우리 나라 전통주로부터 순수분리된 전통주 효모와 본 연구의 제1세부과제에서 개량된 재조합 효모의 요소 생성능과 ethyl carbamate 생성능을 조사하고 이들의 관계를 규명하고자 하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 약주의 제조

전통주의 제조시 재조합 효모의 요소 생성능을 조사하기 위하여 재조합 효모를 사용하여 전통주의 제조실험을 행하였다. 전통주 제조를 위한 원료 조성은 Table 3-2-1과 같다. 세미한 쌀을 수돗물에 침지하여 약 15% 정도의 수분을 흡수시킨 후 물을 빼고 증자하였으며 증자 후 방냉하여 전통주 제조에 사용하였다. 그리고, 쌀국즙 배지에 각각 찐주와 재조합 효모의 종배양액을 접종하여 30℃에서 배양하여 주모로 사용하였다. 배양한 주모와 증자미, 곡자등을 혼합한 후 사입하여 20℃에서 알코올 발효를 행하였다.

발효가 끝난 약 5일 후 술덧을 압착하여 고형분을 제거하고 상등액만을 회수한 다음 물을 가하여 알코올 함량이 13%(v/v) 되게 조정한 후 80℃에서 15분간 열처리하여 약주를 제조하였다.

Table 3-2-1. The ingredients for the preparation of experimental yakju.

Material	Amount
Cooked rice	1 kg
Ground gokja	100 g
Seed mash	100 ml
Water	1,500 ml

2. 전통주의 일반적인 발효 특성 조사

전통주를 발효 특성을 알아보기 위해 발효 과정 중 1일을 간격으로 발효액을 취하여 알코올 함량과 효모수, pH, 산도, 아미노 산도를 분석하였다. 알코올 함량은 증류법으로 측정하였으며, 효모수 측정은 시료 1ml를 취하여 멸균수로 희석한 후 YPD고체 배지에 도말하여 30°C에서 24시간 배양한 후 콜로니를 계수하여 이를 1ml 당 균체수로 계산하였다. pH 측정은 상등액을 pH meter로 측정하였으며, 산도는 0.1N-NaOH 적정법으로 측정하였다. 아미노산도는 페놀프탈레인 용액을 수직하고 0.1N-NaOH로 중화한 후 중성 formalin용액을 첨가하여 유리된 산을 0.1N-NaOH로 재적정하여 소비 ml를 환산하여 계산하였다.

3. Ethyl carbamate 정량

Ethyl carbamate를 추출하기 위해 먼저 시료에 100b의 propyl carbamate를 내부 표준물질로 첨가한 후 시료 20ml를 취하여 0.5N NaOH를 가하여 pH를 9.0으로 조정하였다. 15g의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 첨가하고 37°C 진탕기에서 150rpm으로 30분간 진탕하였다. 그리고 50ml의 클로로포름을 가하고 다시 1시간 동안 진탕시킨 후 분액여두로 옮겨 1시간 정치하였다. 정치 후 분액여두로 chloroform 층을 분리한 후 무수 황산나트륨을 통과시켜 chloroform을 탈수시킨다. 남은 시료에 다시 50ml의 클로로포름을 가하고 1시간 동안 진탕시킨 후 전과 동일한 방법으로 클로로포름층을 분리하여 얻은 클로로포름은 감압 농축하였다. 유리칼럼(15×400mm)에 florisil을 충전시킨 후 클로로포름으로 세척한 다음 농축액을 흡착시키고 벤젠:에테르:메탄올 (108:32:1)의 혼합액 200ml로 ethyl carbamate를 용출

시킨 후 감압 농축하였다. 농축액을 다시 100 μ l까지 농축하여 GC-MS를 이용하여 정량하였다. 시료의 ethyl carbamate 정량을 위한 GC-MS 의 조건은 Table 3-2-2와 같다.

Table 3-2-2. Gas chromatography-mass spectrometric parameters for the determination of ethyl carbamate content.

Items	Operation conditions
Gas chromatography	
Instrument	Fisons GC 8000 series
Carrier gas	He, 1.5ml/min
Column	DBWax(30m \times 0.25mm) film thickness :0.25 μ m
Temperature gradient	70 $^{\circ}$ C held for 2min, 8 $^{\circ}$ C/min to 150 $^{\circ}$ C, 20 $^{\circ}$ C/min to 250 $^{\circ}$ C, 250 $^{\circ}$ C for 10min
Injector	210 $^{\circ}$ C
Detector	210 $^{\circ}$ C
Mass spectrometry	
Instrument	Micromass Quttro II
Fragmentation mode	Electron Impact at 70eV
SIM	m/z 62
Injection mode	splitless

4. 전통주의 요소 함량 측정

시료 200ml를 55℃에서 감압 농축기를 이용하여 농축한 후 농축액에 증류수를 첨가하여 10ml로 정용하였다. 이 농축 시료액 내의 암모니아를 제거하기 위하여 Dowex 50 WX8-100 양이온 교환수지를 충전한 칼럼에 주입한 후 초순수를 이용하여 용출한 액 100ml를 다시 농축하여 10ml로 정용한 후 요소함량 측정에 사용한다.

시료 농축액 0.2ml에 urease (2mg/ml) 용액을 첨가하여 혼합한 후 밀봉하고 37℃에서 15분간 반응시켰다. 여기에 5ml의 phenol 용액(0.106M phenol-0.17mM sodium nitroprusside)과 5ml의 hypochlorite 용액을 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 530nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 값으로부터 미리 요소 표준물질을 사용하여 동일한 방법으로 작성한 검량선을 이용하여 요소의 함량을 환산하였다.

제3절 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 분석방법 확립

1. Ethyl carbamate의 분석기술 확립

술에 함유되어 있는 ethyl carbamate 분석기술에 관하여는 오래 전부터 많은 연구가 이루어져 왔다. 현재까지 알려져 있는 주요 방법은 술로부터 ethyl carbamate를 유기용매로 추출한 후 이것을 농축하여 GC-MS로 분석하는 것이다. GC-MS의 조건은 Table 3-2-2과 같으며 이 조건을 기본으로 하여 ethyl carbamate의 분석기술을 확립하였다.

일반적으로 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate의 추출 수율은 20% 미만으로 매우 낮은 것으로 알려져 있다. 따라서 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate의 분석을 위하여는 원래 술에 함유되어 있지 않으나 ethyl carbamate와 유사한 특성을 가지는 물질을 일정량 첨가하여 추출을 행하는 것이 일반적인 방법으로 알려져 있다. 따라서 대조구로서 상기의 조건에서 표준물질인 ethyl carbamate와 내부의 대조구로서 사용한 propyl carbamate의 검량선을 작성하기 위하여 2.5, 5, 25, 50 및 100ppb 농도의 표준 용액을 GC-MS로 조사한 결과는 그림은 Fig. 3-3-1과 같다. 재료 및 방법에서 기술한 분석조건에서 ethyl carbamate는 retention time 약 12분경에 검출되었으며, propyl carbamate는 13.4분경에 검출됨을 알 수 있다. 검량선은 GC-MS로 그 함량을 조사할 때 매번 작성하여 사용하였다.

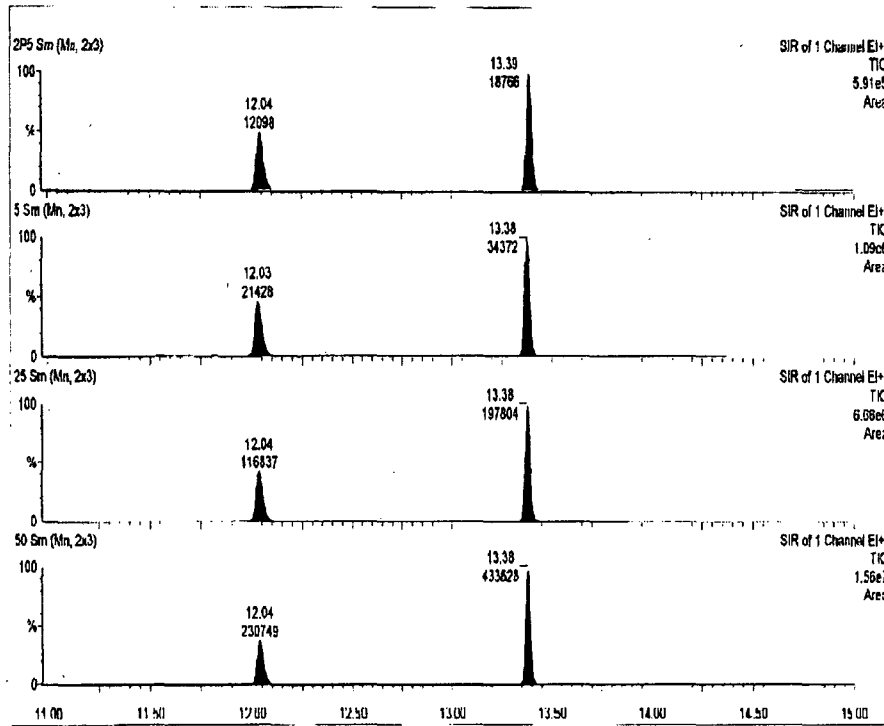


Fig. 3-3-1. GC-MS patterns of ethyl carbamate and propyl carbamate. The peaks at around 12 and 13.4 minutes represent ethyl carbamate and propyl carbamate, respectively.

이와 같이 확립된 ethyl carbamate 분석 조건으로 GC-MS를 사용하여 우리 나라 대표적 전통주류의 하나인 탁주와 약주로부터 ethyl carbamate를 추출한 후 그 함량을 조사한 결과는 Fig. 3-3-2와 같다.

술에 함유되어 있는 ethyl carbamate를 정량하는 방법에 대한 연구들은 주로 유럽의 포도주를 대상으로 이루어져 개발된 방법이다. 일반적으로 포도주에서는 ethyl carbamate의 회수율이 약 60%인 것으로 알려져

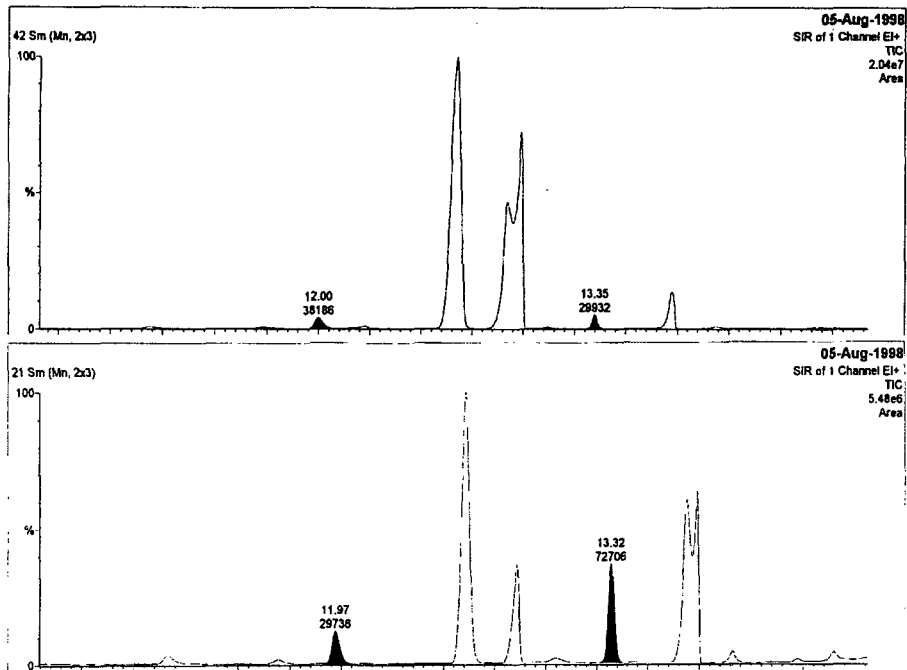


Fig. 3-3-2. Typical GC-MS chromatograms of ethyl carbamate samples extracted from takju(upper) and yakju(lower).

있으나 최근의 보고에 의하면 우리 나라의 전통주에서 ethyl carbamate의 회수율은 약 20%밖에 되지 않는다고 한다. 우리 나라 전통주의 발암성 ethyl carbamate의 생성기작을 알아보기 위하여는 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate의 분석기술이 우선적으로 확립되어야 한다. 이러한 목적으로 탁주를 대상으로 ethyl carbamate의 분석기술을 확립하기 위하여 탁주에 ethyl carbamate를 100ppb 첨가한 것과 첨가하지 않은 것을 사용하여 ethyl carbamate를 정량한 후 회수율을 조사하였다. 현재까지 주류에

서 ethyl carbamate의 추출에 가장 적합한 것으로 알려진 각종의 유기용매들로 탁주의 ethyl carbamate를 추출한 후 이것을 농축한 다음 GC-MS로 ethyl carbamate 함량을 측정하여 회수율을 조사한 결과 클로로포름이 다른 유기 용매 추출에 비해 다소 우수한 회수율을 나타냈다 (Fig. 3-3-3).

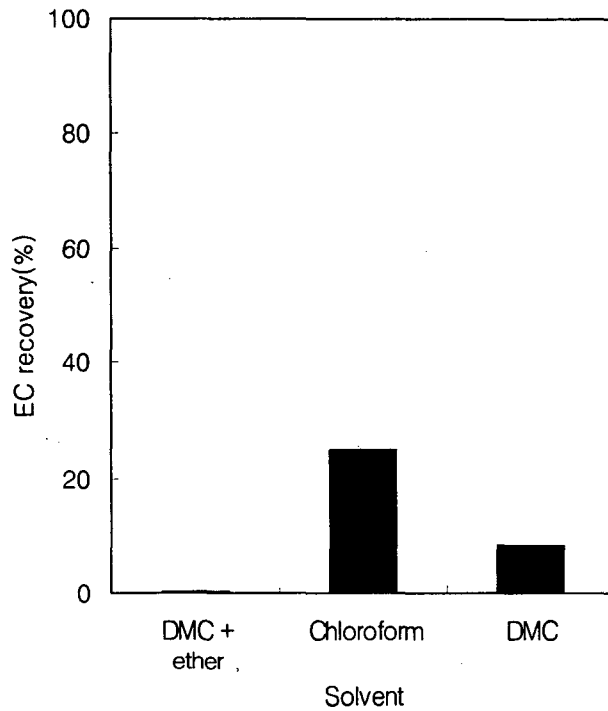


Fig 3-3-3. Effect of the kind of organic solvent on the ethyl carbamate recovery from Takju for the ethyl carbamate assay.

그러나 탁주로부터 ethyl carbamate의 회수율이 약 23%밖에 되지 않

아 회수율을 높이기 위한 일환으로 진탕시간, 온도, pH 조절 등의 추출조건을 검토하였다. 클로로포름을 탁주에 첨가하여 진탕시간을 달리한 후 ethyl carbamate의 회수율을 조사한 결과 30, 60, 120분에 있어서 큰 차이를 볼 수는 없었으나 60분 진탕한 것이 30분 또는 120분 진탕한 것보다 다소 회수율이 높았다(Fig. 3-3-4). 또한 클로로포름과 탁주를 혼합하여 진탕할 때 온도를 20, 30, 40℃로 조절하여 회수율을 조사한 결과는 30℃에서 진탕한 것이 다소 회수율이 높았다(Fig. 3-3-5).

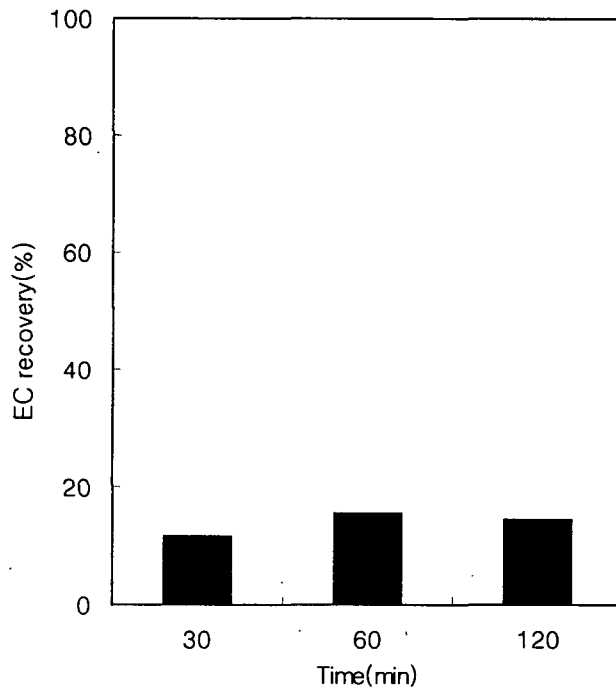


Fig. 3-3-4. Effect of shaking time of chloroform and *takju* mixture on the ethyl carbamate recovery from Takju.

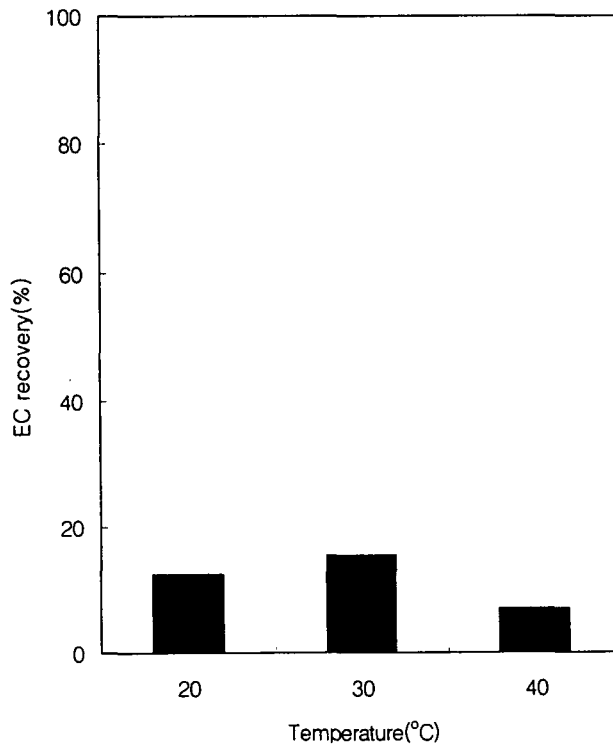


Fig. 3-3-5. Effect of incubation temperature on the ethyl carbamate recovery from *takju*.

Ethyl carbamate는 분자구조내 아미노기를 가지고 있기 때문에 pH에 따라 물이나 알코올에 대한 용해도가 달라질 것으로 추정되어 원래 약산성인 탁주의 pH를 8, 9, 10, 11로 조절한 후 클로로포름으로 추출하여 회수율을 조사한 결과 알칼리성에서 모두 회수율이 증가하였다(Fig. 3-3-6). 특히 pH 9로 조절한 경우에는 회수율이 약 60%에 달하였다. 현재까지 우리나라 전통주의 ethyl carbamate의 회수율이 약 20%인 것과 비교해보면 엄청나게 증가한 숫자이다. 현재까지 우리나라 전통주에서 pH를 조

절하여 ethyl carbamate의 회수율이 이와 같이 증가된 경우는 없으며 더욱이 포도주를 대상으로 많은 연구자에 의해 연구가 진행된 경우에도 그 회수율이 약 60%인 것을 감안한다면 이 방법은 향후 술의 ethyl carbamate 정량에 있어서 널리 적용될 수 있을 것이다.

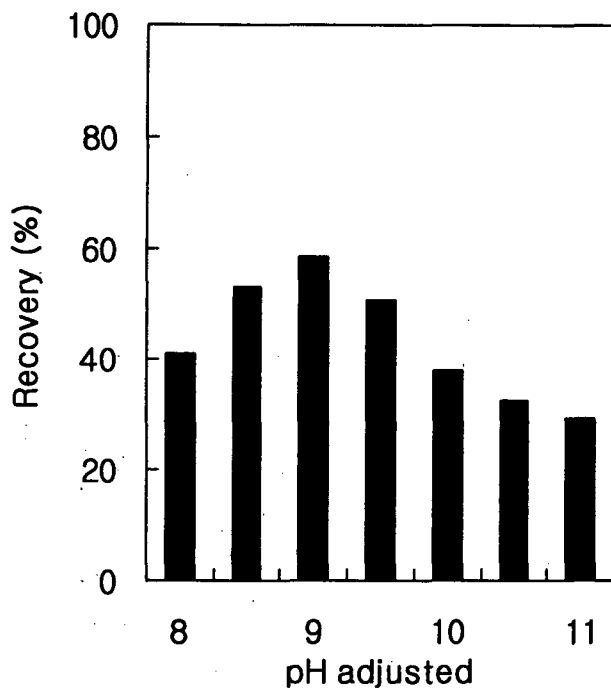


Fig. 3-3-6. Effect of pH adjustment on the ethyl carbamate recovery from takju.

본 연구에서 사용하고 있는 ethyl carbamate의 회수방법은 다른 연구자에 의해 개발된 방법에 NaCl을 포화시켜 ethyl carbamate의 용해도를 감소시키는 동시에 각종의 조건을 변화시키는 변법을 사용하였다. 따라서

pH를 9.0으로 조절하여 높은 회수율을 얻은 경우에도 NaCl을 다소 함유하고 있는 상태에서 행한 결과이기 때문에 NaCl의 포화여부가 ethyl carbamate의 회수율에 어떤 영향을 미치는지 조사하기 위하여 NaCl을 포화시킨 것과 NaCl을 첨가하지 않은 것을 pH 9.0으로 조절하여 ethyl carbamate의 회수율을 조사한 결과 NaCl로 포화시킨 경우에는 75-80%의 높은 회수율을 얻었다(Fig. 3-3-7). 또한 ammonium sulfate를 포화시켜 ethyl carbamate 회수율을 조사한 경우는 약 90% 정도로 증가함을 알 수 있었다. 따라서 탁주의 ethyl carbamate 정량을 위하여는 ammonium sulfate의 포화 및 pH를 9.0으로 조절함으로써 높은 회수율로 정량할 수 있을 것으로 추정된다.

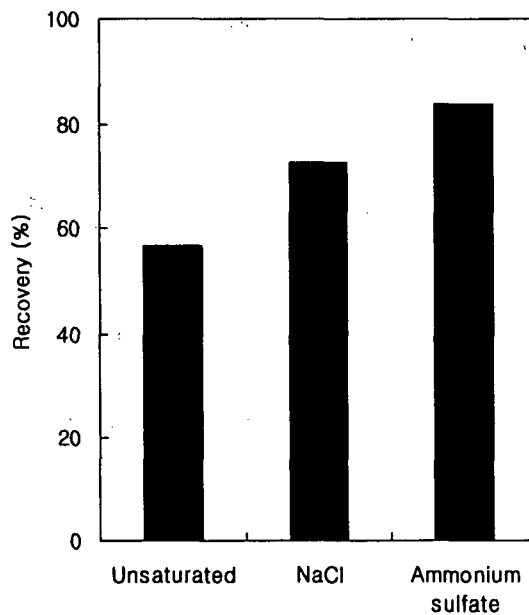


Fig. 3-3-7. Effect of NaCl saturation on the ethyl carbamate recovery from takju.

2. 각종 전통주의 요소함량 분석

가. 요소의 분석기술 확립

일반적으로 곡류를 원료로 한 복발효주에 있어서 발암성 ethyl carbamate의 생성은 요소의 함량과 관련이 깊은 것으로 알려져 있으므로 우리 나라 전통주의 요소함량과 ethyl carbamate의 함량은 깊은 상관관계가 있을 것으로 추정할 수 있다. 따라서 전통주의 요소함량 분석을 위하여 요소의 정량방법을 확립하고자 하였다. 일반적인 요소의 정량법은 urease를 사용하여 요소를 분해시킨 후 생성된 암모니아를 530nm에서 비색정량하는 것이다. 이 방법에 의하여 요소를 정량하기 위하여 요소의 농도를 달리하여 그 함량을 정량한 후 530nm에서의 흡광도와 요소의 함량을 나타낸 요소의 검량곡선을 작성한 결과는 Fig. 3-3-8과 같다. 표준물질로 첨가한 요소의 함량이 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 530nm에서의 흡광도가 직선적인 상관관계를 가지고 있어서 이 방법이 요소의 함량분석에 매우 적합한 방법으로 생각되었다.

이 방법은 요소를 urease에 의하여 암모니아와 이산화탄소로 분해시킨 후 암모니아를 정량하는 방법이므로 시료 속에 존재하는 암모니아에 의하여 높은 수치의 back ground를 나타내게 된다. 따라서 시료속에 존재하는 암모니아를 미리 제거해 주어야 한다. 시료속의 암모니아를 제거하기 위하여는 Dowex 50WX8-100 양이온교환수지가 주로 사용되어진다. 이 칼럼에 있어서 시료를 주입한 후 요소의 용출에 필요한 완충액의 양을 결정하기 위하여 칼럼 크로마토그래피를 행한 결과는 Fig.3-3-9와 같다. 5 ml의 용출액을 사용하여 용출할 경우 30번의 분획 정도에서 요소가 완전히 용출됨을 확인할 수가 있었다.

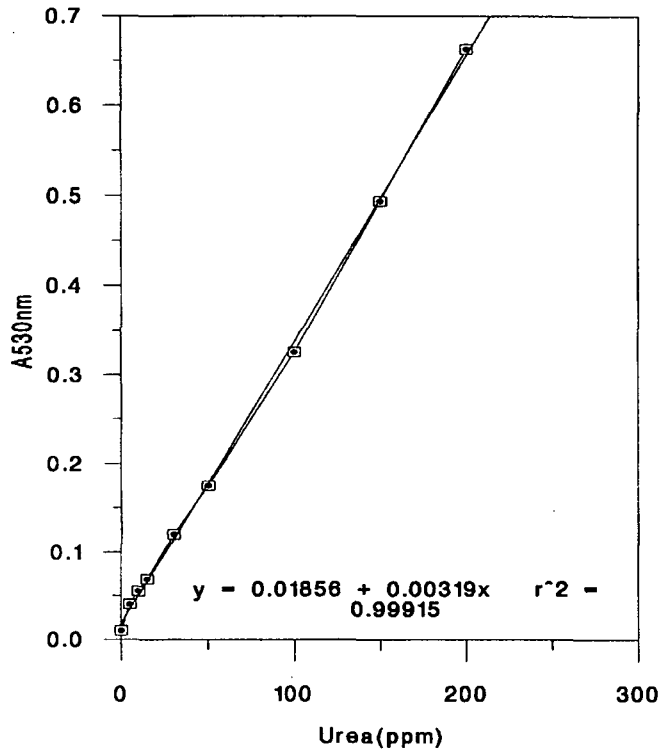


Fig. 3-3-8. Standard curve for the determination of urea concentration.

이와 같은 방법을 사용하여 시중에 유통되고 있는 우리 나라 전통주 9종을 취하여 요소의 함량을 측정 한 결과는 Table 3-3-1과 같다. 대체적으로 우리 나라 전통주에 있어서 요소의 함량은 1.620~6.844ppm으로 나타났으며 술의 종류에 따라 그 함량에 있어서 상당한 차이를 나타내었다. 그 중에서 특히 선산 약주에 있어서 요소의 함량이 6.844ppm으로 가장 높았으며 천대 홍주와 백세주에서 그 함량이 매우 낮은 결과를 나타내었다.

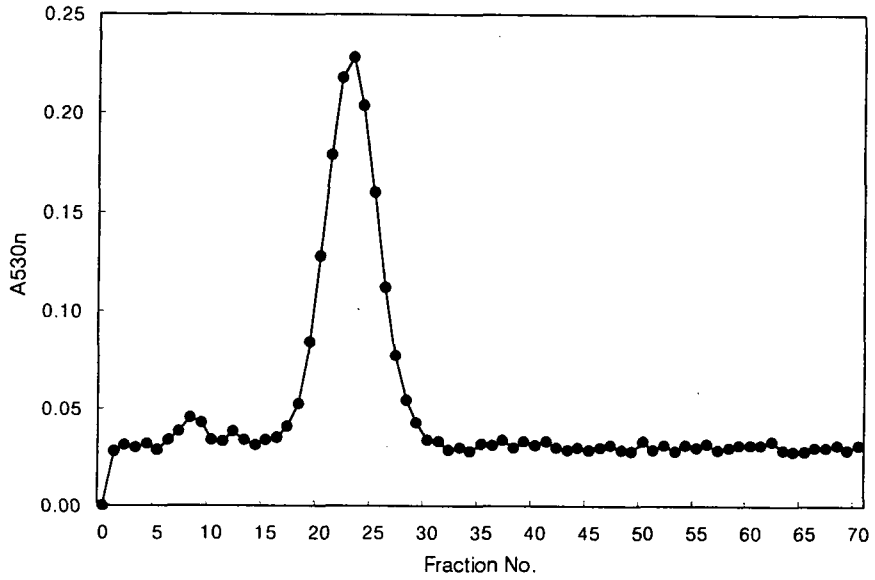


Fig. 3-3-9. Cation exchange chromatography with Dowex 50WX8-100 resin column for the determination of urea concentration.

Table 3-3-1. Determination of urea concentration in Korean traditional liquors.

Liquors	Urea (ppm)
Takju 1	2.456
Takju 2	2.843
Yakju 1	5.225
Yakju 2	2.158
Yakju 3	1.776
Yakju 4	1.620
Yakju 5	6.844
Soju 1	3.030
Soju 2	2.560

저장동안 전통주의 요소 생성량의 변화를 알아보려고 전통주 4종(약주 2종, 탁주 1종, 전통소주 2종)을 30℃에서 저장하면서 요소 함량의 변화를 경시적으로 조사한 결과는 Fig. 3-3-10과 같다. 요소의 함량은 저장초기에는 다소 감소하였는데 이는 청주의 저장 초기단계에 요소는 *S. cerevisiae*의 좋은 질소원으로 소비된다는 Katsuhiko의 보고와 일치하는 것으로 보여진다. 그 이후 다소 증가하는 경향을 나타내었으나 이미 김 등에 의해 보고된 25℃ 저장시 탁주에서의 급격한 요소 함량의 변화와는 달리 변화량이 다소 낮게 나타났다. 김 등은 저장동안 요소의 함량은 효모의 존재에 따라 가속화된다는 보고하였는데 이는 탁주보다 전통주내의 효모의 양이 낮은 것이 그 원인으로 여겨진다.

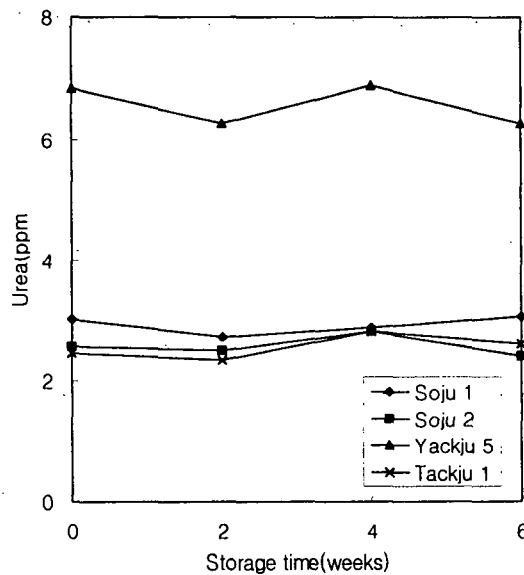


Fig. 3-3-10. Changes of urea concentration in Korean traditional liquors during the storage. urea concentration was determined every other week in Korean traditional liquors stored at 30℃.

3. 각종 전통주의 ethyl carbamate 함량 분석

가. 시판중인 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 함량 분석

우리 나라에 유통중인 8종의 전통주에 함유된 ethyl carbamate의 함량을 조사한 결과는 Table 3-3-2과 같다. 조사된 시료들에서의 ethyl carbamate 함량은 대부분 35-65ppb 정도이었다. 소주에 비해 약주 종류들에서 ethyl carbamate가 다소 적은 양이 검출되었는데, 이는 ethyl carbamate의 생성이 열처리에 의존적이므로 증류 과정 중에 ethyl carbamate가 다량 생성되었다는 결과들과 유사한 것으로 생각된다. 그리고 약주 3의 경우는 다른 약주와는 원료에서 차이가 있는데 부가된 원료들에서 ethyl carbamate 생성에 필요한 전구체가 생성된 것으로 생각되어진다.

본 연구에서 사용한 주류는 살균 후 저장기간을 거치지 않은 신선한 것을 대상으로 분석한 결과로서 일정한 저장기간을 거치게 되면 더욱 많은 ethyl carbamate가 생성될 것으로 예상된다. 따라서 하루 빨리 이러한 발암성 물질의 전구체인 요소를 생성하지 않는 효모 균주를 육종하여 우리 나라 전통주의 제조에 직접 이용함으로써 ethyl carbamate를 함유하지 않는 전통주의 개발이 시급하다 하겠다.

일본의 경우에는 쌀의 표면을 제거하여 도정율이 약 75%의 것을 사용하여 청주를 제조하나 우리 나라 전통주의 제조시에는 곡류의 표면을 제거하지 않고 그대로 양조에 사용하게 되므로 표면에 존재하는 단백질이 가수분해되어 생성된 각종의 아미노산으로부터 많은 양의 요소가 생성되어 이것이 ethyl carbamate의 전구물질로 작용할 수 있을 것으로 추정된다.

Table 3-3-2. Determination of ethyl carbamate concentration in various Korean traditional liquors

Liquor type	Ethyl carbamate (ppb)
Takju 1	53.35
Takju 2	46.13
Yakju 1	35.86
Yakju 2	42.98
Yakju 3	64.50
Yakju 4	46.94
Yakju 5	38.78
Soju 1	53.68
Soju 2	50.31

나. 저장중 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 함량 변화

일반적으로 곡류를 발효시켜 제조한 주류에서는 가열살균시 요소가 에탄올과 결합하여 ethyl carbamate가 생성되며 이러한 주류를 저장하게 되면 저장시간에 따라 ethyl carbamate가 더욱 증가하는 것으로 알려져 있다. 저장중 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 함량 변화를 알아보기 위해 30℃에서 저장하면서 그 변화를 조사한 결과는 Fig.3-3-11과 같이 나타났다. 대부분의 시료에서 저장기간이 늘어날수록 ethyl carbamate의 함량이 증가하였다. 그리고 증가율은 시료마다 차이가 있었으며 약주 5는

2주 후부터 함량이 급격히 증가하였으며 탁주 1은 저장 초기에 급격히 증가하였다가 차츰 증가율이 감소하였다. 그 외 소주 2종에서는 비슷한 증가율을 나타내었다. 이러한 결과들은 ethyl carbamate의 주요 전구체인 요소의 함량이 ppm 단위로 높기 때문에 저장 기간이 늘어날수록 ethyl carbamate의 함량이 증가할 것이며, 약주 5의 경우는 초기 전구체의 함량이 다른 전통주에 비하여 월등히 높아 저장이 지속되면서 ethyl carbamate의 함량이 다른 시료에 비해 크게 늘어날 것으로 추측된다. 이러한 결과들은 이전의 다른 연구자들에 의한 발효주의 저장 실험에서 밝혀진 결과들과 유사하였다.

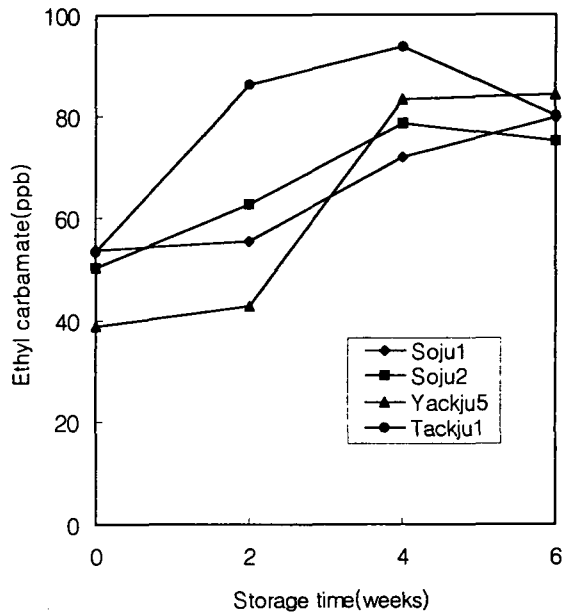


Fig. 3-3-11. Changes of ethyl carbamate concentration in Korean traditional liquors during storage. Ethyl carbamate concentration was determined every two weeks in Korean traditional liquors stored at 30°C.

제4절 *S. cerevisiae* SHY111의 전통주 발효 특성

1. *S. cerevisiae* SHY111에 의한 전통주 발효의 경과

전통주로부터 분리·동정한 효모 균주 *S. cerevisiae* SHY111을 사용하여 담금 담농도를 30%로 조정하여 20℃에서 발효를 행하면서 경시적으로 알코올 농도, 환원당 및 효모 생균수를 조사한 결과는 Fig. 3-4-1과 같다. 발효 1일 후 환원당이 급격히 증가하였으나 2일 후부터는 알코올 발효가 진행됨에 따라 감소하여 4-5일 후 거의 발효가 완료되는 것으로 나타났다. 최종 알코올 농도는 약 15% 정도이었으며 최종 환원당의 함량은 2-3mg/ml의 수준이었다.

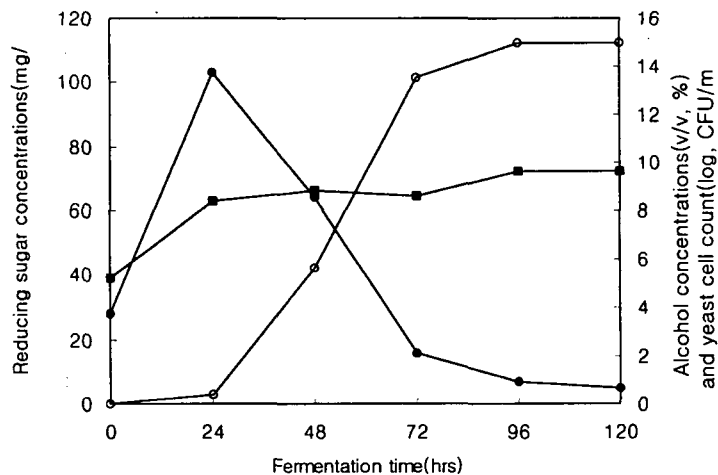


Fig. 3-4-1. Changes in the alcohol and reducing sugar contents and yeast viable cell counts of main mash during the yakju brewing by *S. cerevisiae* SHY111.

○-○ : Alcohol, ●-● : Reducing sugar, ■-■ : Yeast viable counts

전통주의 발효 과정 중 pH, 산도 및 아미노산도를 조사한 결과는 Fig. 3-4-2와 같다. 산도는 발효가 경과됨에 따라 3일 후 까지 증가하여 최고 3.2mg/ml의 수준을 나타낸 후 점차 감소하여 발효가 종료될 시점에서는 약 1.2mg/ml를 나타내었다. pH는 초기 7.0에서 발효가 경과됨에 따라 감소하는 경향을 보이다가 발효 2일 후부터 약 3.8의 일정한 수준을 유지하였다. 아미노산의 변화는 담금 직 후 다소 낮았으나 발효 과정 중 거의 일정한 값을 나타내었다.

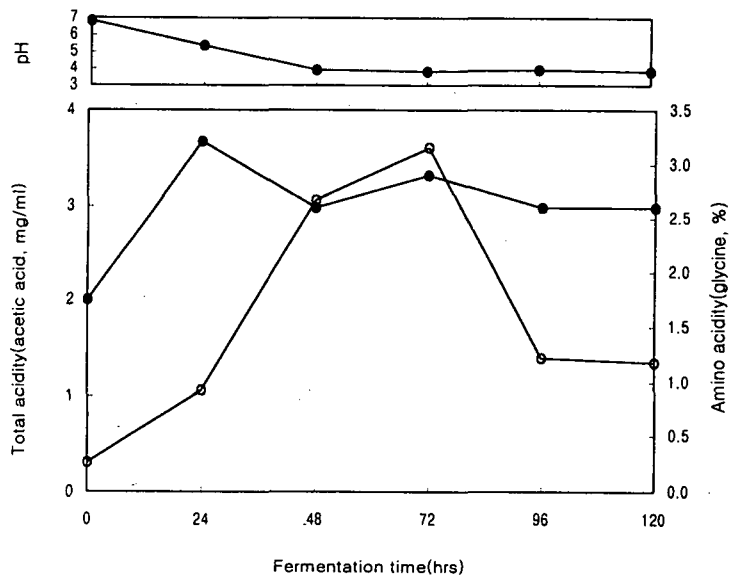


Fig. 3-4-2. Changes in the pH, total acid and amino acid contents of main mash during the yakju brewing by *S. cerevisiae* SHY111.

○-○ : Total acid, ●-● : Amino acid

2. 담금 당 농도의 영향

전통주 제조시 당함량을 조절하기 위해 급수 비율을 달리하여 당함량이 각기 25%, 30%, 35%가 되도록 하고 20℃에서 사입하여 전통주를 제조하였다. 제조된 전통주의 최종 알코올 함량은 Fig. 3-4-3과 같으며 최종 알코올 함량의 측정은 알코올 생성이 정지되는 시기에 행하였다. 최종 알코올 함량은 당 함량이 증가함에 따라 약간의 증가함을 나타내었으나 담금 당농도에 비례하여 증가하지는 않았다.

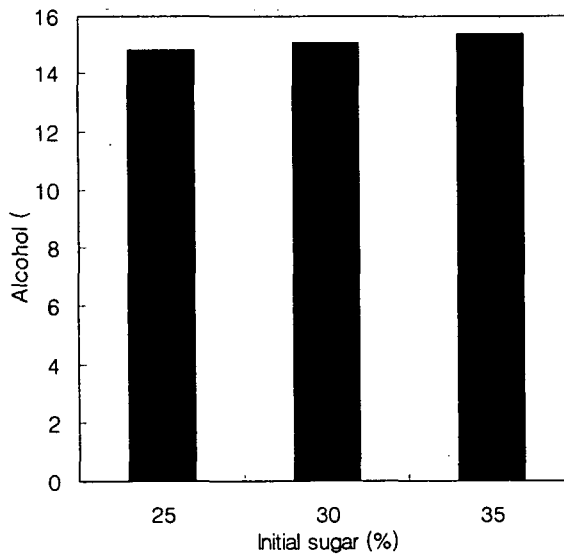


Fig. 3-4-3. Effect of initial sugar concentration on the alcohol content in yakju fermented by *S. cerevisiae* SHY111.

또한 전통주 제조 후 효모의 수를 조사한 결과 효모 수에서도 담금 당 농도에 따라 큰 차이를 나타내지 않았다. 이러한 현상은 전통주의 발효에 관여하는 효모가 생성된 알코올에 의해 활성이 감소하거나 담금시 첨가된 누룩의 함량에 의해 원료 속의 전분이 분해되는 정도가 제한을 받기 때문으로 추정된다(Fig. 3-4-4).

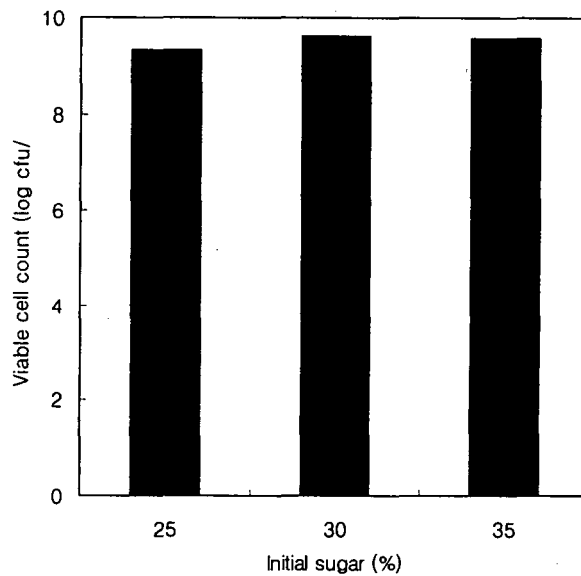


Fig. 3-4-4. Effect of initial sugar concentration on the viable yeast count in yakju fermented by *S. cerevisiae* SHY111.

본 연구에서 제조한 전통주의 pH와 산도를 측정된 결과는 pH의 경우 3구간에서 거의 비슷하였으며 산도의 경우 30%, 35%의 당함량의 전통주에서 20% 당함량의 전통주보다 약 0.2% 정도 높았다(Fig. 3-4-5). pH와 산도의 변화는 발효시 생성되는 유기산에 의한 것으로서 pH가 현저히 낮

거나, 산도가 너무 높은 경우는 산패되었을 가능성이 높다. 또한 산미가 너무 강함으로써 술의 독특한 향미를 느낄 수 없게 된다. 따라서 발효중 또는 제조가 종료된 전통주의 산도를 측정함으로써 전통주의 발효와 주질의 중요한 척도로 삼고 있다. 1차년도 실험에서 시판 약주들의 pH를 측정한 결과 평균 약 3.5mg/ml 정도로 본 실험에서 제조된 약주의 pH는 약간 높은 것으로 나타나 본 연구에서 제조한 전통주가 일반 시중의 전통주보다 pH에 있어서는 다소 우수하게 나타났다. 또한 아미노산 함량은 담금 초기 당농도가 30%인 경우에 가장 높게 나타났으며, 25%와 35%에서는 비슷한 함량을 보였다(Fig. 3-4-6).

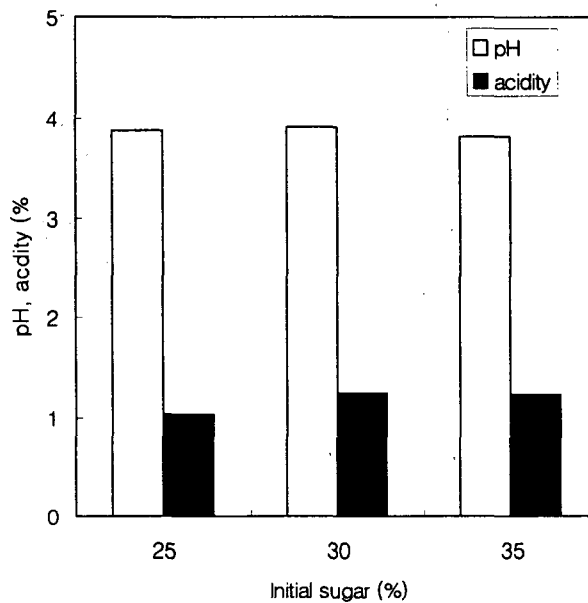


Fig. 3-4-5. Effect of initial sugar concentration on the pH and total acidity in yakju fermented by *S. cerevisiae* SHY111.

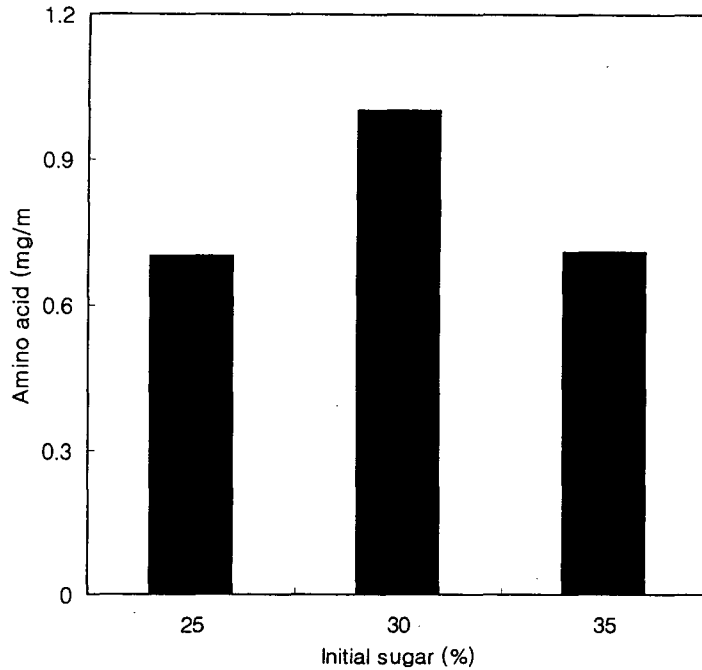


Fig. 3-4-6. Effect of initial sugar concentration on the amino acid content in yakju fermented by *S. cerevisiae* SHY111.

초기 담금 농도에 따른 약주의 요소 함량을 조사한 결과는 Fig. 3-4-7 과 같이 *S. cerevisiae* SHY111에 의해 제조한 약주의 요소 함량은 약 0.6-0.7ppm 수준을 나타내었으며 초기 담금 당농도가 높을수록 약주의 요소 함량이 감소하였다. 일반 약주의 요소 함량은 본 연구의 결과 약 1.62-6.84ppm으로 나타났다. 그러나 본 과제에서 분리한 효모 균주에 의하여 약주를 제조한 경우에는 일반 약주에 비하여 아주 낮은 농도의 요소 함량을 나타내었다.

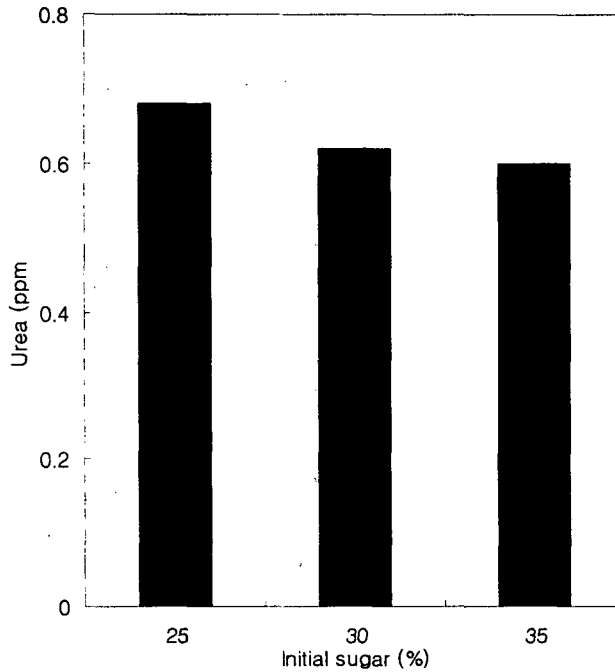


Fig. 3-4-7. Effect of initial sugar concentration on the urea content in yakju fermented by *S. cerevisiae* SHY111.

3. 발효 온도의 영향

사입 온도에 따른 전통주의 발효 특성을 알아보기 위해 당 함량을 30%로 일정하게 담금한 후 10℃, 20℃, 30℃에서 발효를 행하여 약주를 제조한 후 약주의 일반성분 및 요소 함량을 측정하였다(Fig. 3-4-6 ~ 3-4-10). 그 결과 최종 알코올 함량은 30℃로 사입을 한 경우가 가장 높은 수준을 나타내었으며 20℃에서도 유사한 값을 나타내었으나 10℃에서는 낮은 수준을 나타내었다(Fig. 3-4-6).

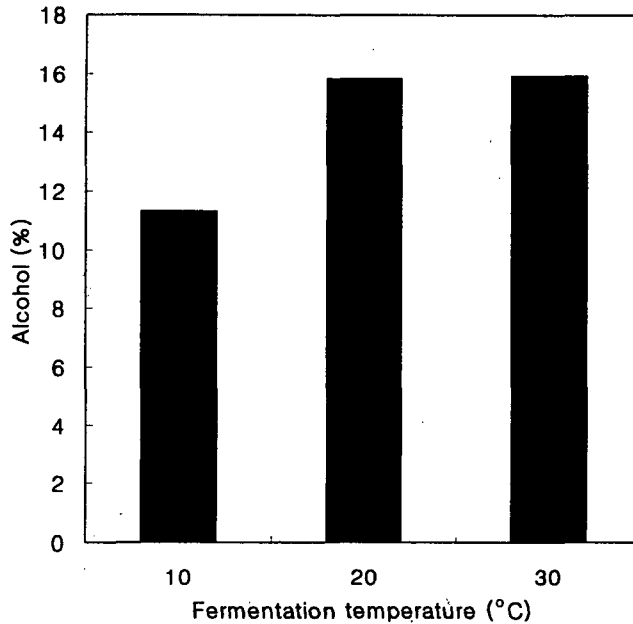


Fig. 3-4-6. Effect of fermentation temperature on the alcohol content in yakju fermented by *S. cerevisiae* SHY111.

발효 온도에 따른 효모의 생균수는 30°C에서 가장 높았으며 20°C에서는 다소 낮은 수준을 유지하였으나 10°C에서는 생균수가 더욱 감소하였다. 이 현상은 발효온도가 높을수록 알코올의 함량이 높았으나 발효온도가 낮을수록 알코올 함량이 낮은 전 실험의 결과와 잘 일치하였다. 따라서 본 효모의 경우 10°C와 같은 저온의 조건에서는 효모의 생육이 저해되어 정상적인 알코올 발효를 유도하기가 어려울 것으로 추정된다. 한편 제 1세부과제에서 생육도의 조사 결과 15%의 glucose를 함유하는 YPD 배지에서는 온도에 따라 효모의 초기 생육이 다소 지연되었으나 일정 시간이

지난 후 생육도가 유사하게 나타났다. 그러나 실제 알코올 발효의 경우에는 다소 상이한 결과를 나타내었다(Fig. 3-4-7).

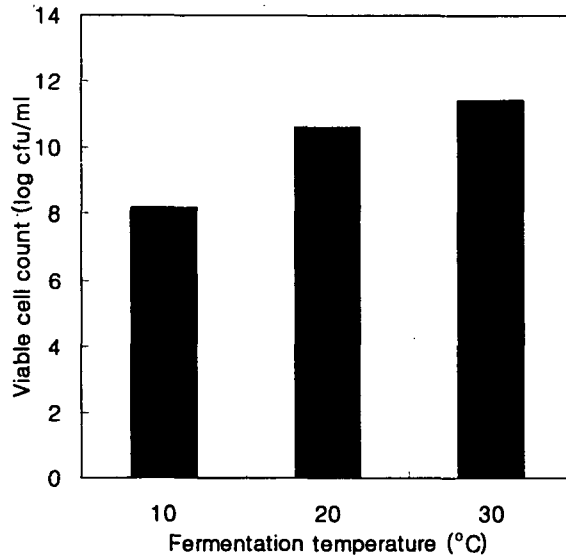


Fig. 3-4-7. Effect of fermentation temperature on the yeast viable cell count in yakju fermented by *S. cerevisiae* SHY111.

발효온도에 따른 pH 및 산도의 변화를 조사한 결과는 Fig. 3-4-8과 같다. 대체적으로 발효온도에 따른 차이는 미미하였으나 저온의 조건에서 약주의 pH가 다소 낮았으며 고온의 조건에서 산도가 다소 낮게 나타났다. 또한 발효온도별 약주의 아미노산도는 30°C와 20°C에서는 거의 유사한 수준을 나타내었으나 10°C의 경우에 있어서는 낮은 값을 나타내었다 (Fig. 3-4-9).

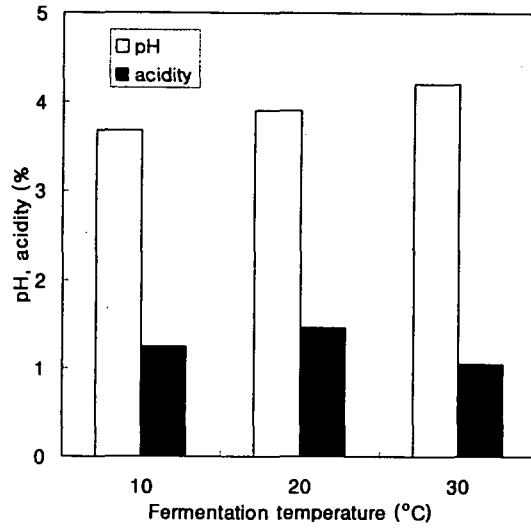


Fig. 3-4-8. Effect of fermentation temperature on the pH and acidity in yakju fermented by *S. cerevisiae* SHY111.

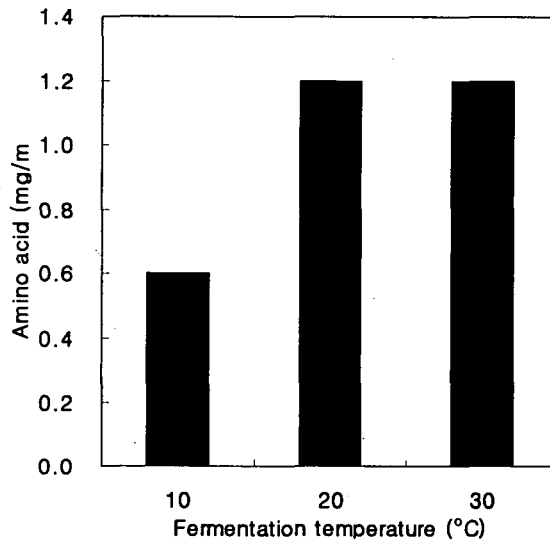


Fig. 3-4-9. Effect of fermentation temperature on the amino acid content in yakju fermented by *S. cerevisiae* SHY111.

온도별로 전통주를 발효한 후 제조한 약주의 요소 함량을 조사한 결과는 Fig. 3-4-10과 같다. 요소의 함량은 특이하게 발효온도가 낮을수록 다소 높은 경향을 나타내었다. 20℃에서 발효를 행한 경우에는 약주의 요소 함량이 약 0.6ppm 수준이었으나 10℃에서는 약 1.5ppm 수준을 나타내었다. 그러나 30℃에서 발효를 행한 경우에는 0.15ppm 정도의 아주 낮은 요소 함량을 나타내었다.

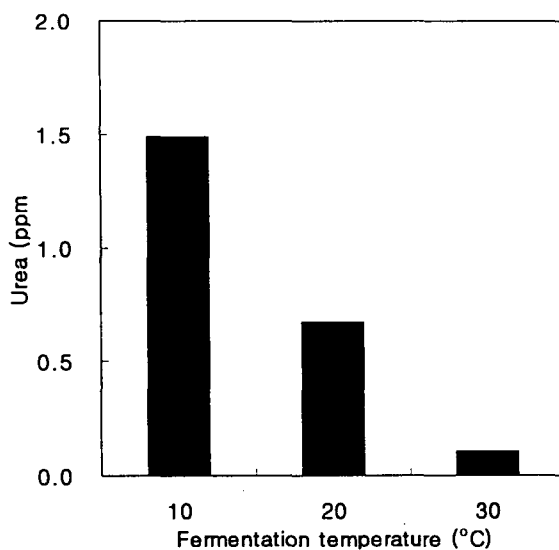


Fig. 3-4-10. Effect of fermentation temperature on the urea content in yakju fermented by *S. cerevisiae* SHY111.

제5절 약주의 제성 및 저장 조건에 따른 ethyl carbamate 생성

1. 살균 조건의 영향

술에 생성되는 ethyl carbamate는 효모에 의해 생성되는 알코올과 요소에 의해 생성되며, 이러한 생성 반응은 열에 의해 촉매된다. 따라서 발효주의 경우 살균, 효소의 파괴 및 향미의 숙성 조절을 위한 살균 공정 이후 술에 존재하는 요소와 알코올로부터 ethyl carbamate가 급격히 증가하게 된다. 따라서 ethyl carbamate의 생성 정도와 살균 온도 사이의 관계를 알아보려고 살균 온도를 달리하여 살균한 후 시료 내의 ethyl carbamate의 함량을 조사하였다.

일반적인 전통주 제조 공정에서 살균 온도는 약 50-60℃정도이므로 본 실험에서는 60℃, 70℃, 80℃를 살균 조건으로 하여 20분간 살균하였다. 살균 후 방냉한 다음, 시료내에 존재하는 ethyl carbamate의 함량을 조사한 결과는 Fig. 3-5-1과 같다. 살균하지 않은 대조구의 경우 ethyl carbamate의 함량은 1 ppb이하로 매우 미량임을 알 수 있는 반면, 살균을 한 경우에는 모두 ethyl carbamate의 4배이상 증가함을 볼 수 있었으며, 살균 온도가 낮은 60℃에서 보다 많은 ethyl carbamate의 생성 결과를 얻었다.

또한 살균 시간에 따른 변화를 알아보기 위해 70℃에서 각각 10분, 20분, 30분간 살균하여 ethyl carbamate의 생성량을 조사하였다(Fig 3-5-2). 생성된 ethyl carbamate의 생성량은 약 4-4.5 ppb정도였으며, 이는 살균 시간에 따라 약간의 차이를 보였다. 이러한 결과들을 토대로, 본 연구 수

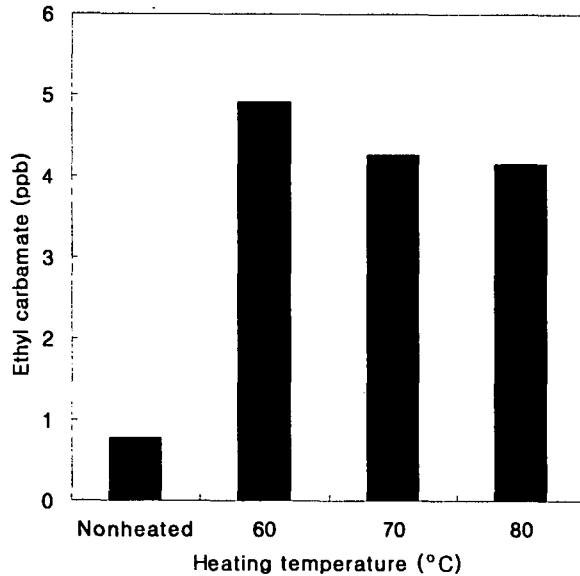


Fig. 3-5-1. Effects of heating temperature on ethyl carbamate formation in yakju.

행 중 시중에서 판매중인 약주에서 측정된 ethyl carbamate의 함량과 비교한 결과 실험실에서 제조한 전통주에 함유된 ethyl carbamate의 함량이 상대적으로 매우 적은 것으로 나타났다. 이는 ethyl carbamate의 전구체인 요소의 함량 역시 이 전의 결과에서 나타난 요소의 함량보다도 적은 것을 고려할 때, 전구체 함량이 적고, 또한 살균 직후 측정된 결과이므로 이후에 생성될 요소 함량을 고려하지 않았기 때문으로 사료되어 진다. 그리고 시중에서 판매되는 전통주의 경우 제조시 첨가하는 약재 등에 의한 요소 생성이 더 있을 것으로 추정된다.

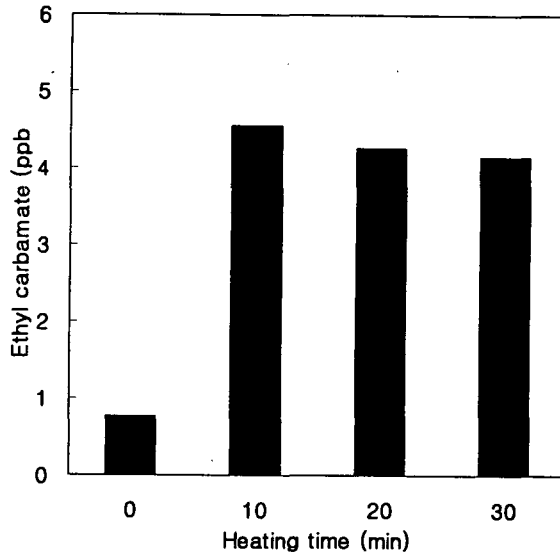


Fig. 3-5-2. Effect of heating time at 70°C on ethyl carbamate formation in yakju.

2. 저장 조건의 영향

대부분 술은 시중에 유통되는 경우 냉장보관을 하는 경우는 매우 드물며, 보관상태가 ethyl carbamate의 생성을 촉진시킬 수도 있을 것으로 생각되어 저장 조건에 따른 전통주 ethyl carbamate의 함량을 조사하였다.

이를 위해 70°C에서 20분간 살균한 전통주를 각각 4°C, 10°C, 20°C, 30°C, 40°C로 보관하면서 4주마다 ethyl carbamate의 함량을 측정하였다 (Fig. 3-5-3). 그 결과 4°C, 10°C와 같이 저온의 조건에서 저장한 경우에는 8주간의 저장기간 중 ethyl carbamate의 증가는 전혀 나타나지 않았다. 이에 반해 20°C 이상에서는 저장 기간이 길어질수록 ethyl carbamate

의 함량이 증가함을 알 수가 있었다. 따라서 전통주 내 ethyl carbamate의 생성을 억제하기 위해서는 저온하에서 저장하는 것이 유리할 것으로 생각된다.

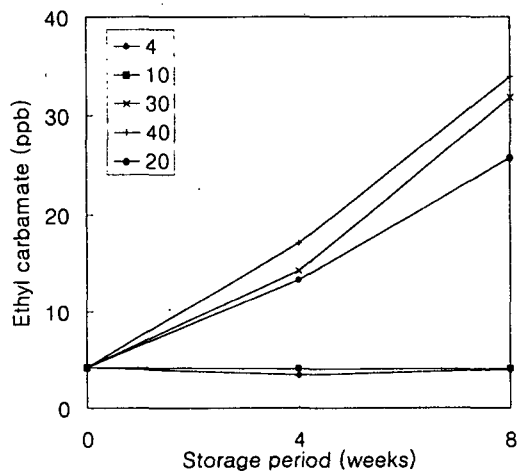


Fig. 3-5-3. Effect of storage temperature on ethyl carbamate formation in yakju. The ethyl carbamate contents in yakju were determined every 4 weeks during storage at a range of temperature shown in the figure.

3. 초기 요소 농도의 영향

Ethyl carbamate의 전구체로 알려져 있는 요소가 전통주내에 함유되어 있을 경우 저장 중 ethyl carbamate의 함량은 증가할 것으로 추정되어 실험실에서 제조된 전통주에 요소를 첨가하여 살균할 경우 증가되는 ethyl carbamate의 함량을 측정하고자 하였다. 이를 통해 술에 함유된 요

소가 ethyl carbamate의 생성량에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

제성이 끝난 전통주 시료에 각각 50ppm, 100ppm의 요소를 첨가하고 70℃에서 20분간 살균하였다. 자연 방냉 후 요소의 함량을 측정된 결과 (Fig. 3-5-4) 요소를 첨가하지 않고 동일 조건으로 살균한 대조구에 비해 ethyl carbamate의 함량이 증가한 것을 알 수 있었다. 100 ppm의 요소를 첨가한 시료의 경우 약 2배 이상의 ethyl carbamate가 생성되었다. 이 후 이들을 20℃에서 저장하면서 측정된 결과 요소 첨가구에서는 저장 시간이 길어짐에 따라 ethyl carbamate의 함량이 급격하게 증가함을 볼 수 있었다. 따라서 초기의 ethyl carbamate의 함량이 적다하더라도 요소의 함량이 높을 경우 저장 시간이 길어짐에 따라 ethyl carbamate 생성은 계속 일어날 것으로 생각된다. 따라서 우리 나라 전통주에 함유되어 있는 발암성 ethyl carbamate는 발효중 생성된 요소가 살균과정을 거친 후 비교적 고온에서 유통될 때 그 기간이 길어질수록 증가하는 것으로 추정된다.

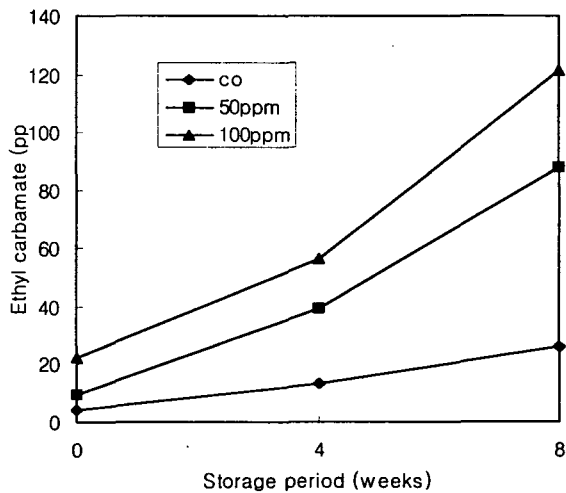


Fig. 3-5-4. Effect of initial urea concentration on the ethyl carbamate formation in yakju during storage at 20℃.

제6절 배수체 재조합 효모의 전통주 발효 특성

제1세부과제에서 제조한 배수체 재조합 효모(6a-ura-21/6c-ura-21)와 대조구로서 6a-ura/6c-ura 배수체를 이용하여 전통주의 발효 특성을 조사하였다. 전통주는 본 실험에서 정립한 방법에 의해 제조되었으며 발효 중 효모 생균수, 환원당 및 알코올의 함량, pH, 산도, 아미노산도의 변화를 1일 간격으로 측정하였다.

전통주의 발효 과정 중 효모 생균수의 변화는 재조합 효모와 대조 균주에서 거의 비슷하게 나타났으며, 이는 YPD 액체배지 상에서 두 효모 균주의 생육도를 조사한 경우에서와 같이 유사한 결과를 나타내어 생육에 큰 차이가 없음을 알 수 있었다(Fig. 3-6-1).

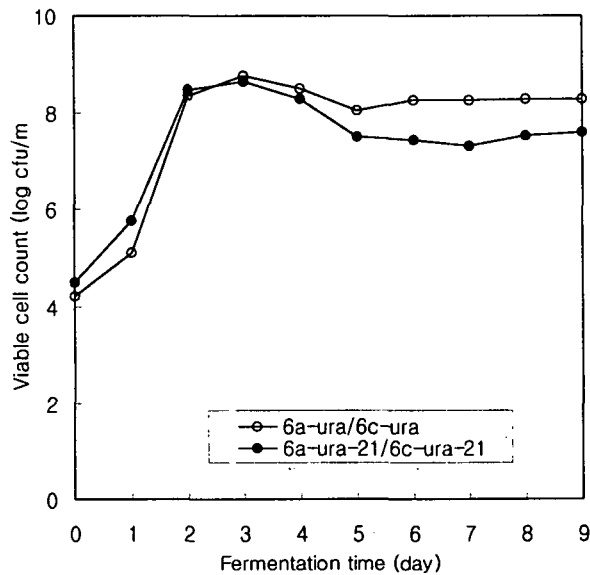


Fig. 3-6-1. Comparison in the changes of viable cell counts during yakju fermentation of recombinant and parent yeast strains.

재조합 균주와 대조 균주의 전통주 발효과정 중 술덧 환원당 함량의 변화를 조사한 결과는 Fig. 3-6-2와 같다. 재조합 균주의 경우에는 발효 2일 후부터 환원당의 감소가 진행되었으나 대조 균주의 경우에는 발효 초기에서부터 환원당이 급격히 감소하여 재조합 균주에 의한 환원당의 소비가 다소 지연되는 현상을 나타내었다. 이는 재조합 균주의 경우 대조 균주에 비하여 알코올 발효가 다소 지연되어 진행되기 때문인 것으로 추정된다. 그러나, 발효 5일 후부터는 술덧 환원당의 함량이 재조합 균주 및 대조 균주에서 거의 유사한 결과를 나타내었으며 발효 말기에는 거의 모든 당을 소비한 것으로 나타났다.

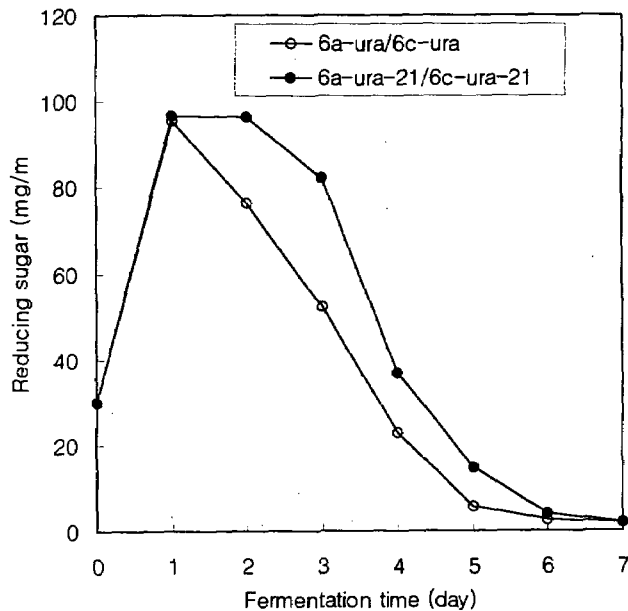


Fig. 3-6-2. Comparison in the changes of reducing sugar content during yakju fermentation by recombinant and parent yeast strains.

재조합 효모와 대조 균주에 의한 약주 발효 과정 중 알코올 함량을 조사한 결과는 Fig. 3-6-3과 같이 나타났다. 재조합 효모에 비해 대조구 효모 균주의 경우 알코올 생성 속도가 다소 빠른 것으로 나타났으며 발효 5일 후 발효가 거의 완료되는 것으로 나타났다. 이에 비해 재조합 효모의 경우에는 약 6일 후 발효가 거의 완료되었으나 발효가 완전히 끝난 후 최종 알코올 생성량은 거의 유사하게 나타났다. 이는 발효액 중의 환원당 함량의 변화 결과에서 보여지는 경향과 거의 일치하고 있음을 알 수 있었다.

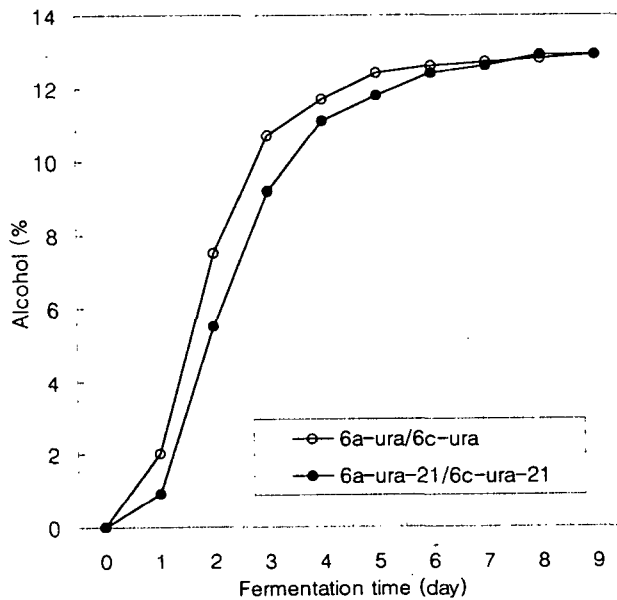


Fig. 3-6-3. Comparison in the changes of alcohol content during yakju fermentation by recombinant and parent yeast strains.

재조합 효모와 대조 균주에 의한 약주 발효 과정 중 pH와 총산 함량의 변화를 조사한 결과는 Fig. 3-6-4와 같다. 재조합 효모의 경우가 대조 균주에 비하여 pH가 낮게 나타났으며 특히 산도의 변화는 약 2배 정도 높은 것으로 나타났다. 발효 중 생균수, 환원당 및 알코올 함량의 변화는 재조합 효모 및 대조 균주에서 거의 유사한 것으로 나타났으나 산의 생성량에 있어서는 상이한 결과를 나타내었다. 이는 antisense CAR1 DNA에 의하여 atginase의 생성이 크게 감소하여 나타난 것으로 추정되나 그 기작에 관하여는 좀 더 연구해야할 문제이다.

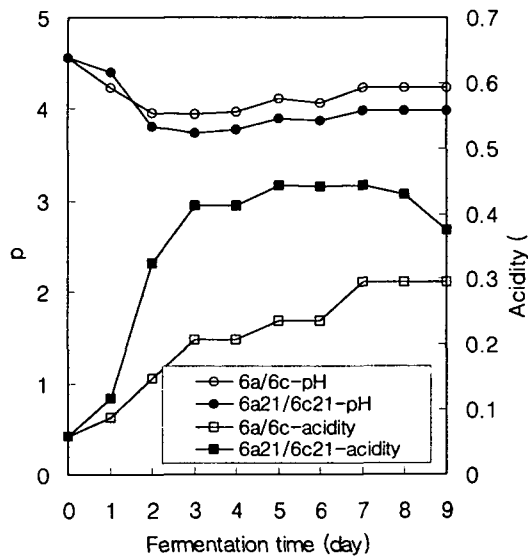


Fig. 3-6-4. Comparison in the changes of pH and acidity during yakju fermentation by recombinant and parent yeast strains.

재조합 효모 균주와 대조 균주에 의한 전통주 발효 과정 중 아미노산 함량의 변화를 조사한 결과는 Fig. 3-6-5와 같다. 전 발효 과정을 통하여 재조합 효모 균주의 경우가 아미노산의 함량이 대조 균주의 경우보다 더욱 높은 것으로 나타났다. 이는 재조합 균주의 경우 arginine의 분해에 관여하는 arginase의 합성량이 약하여 아미노산의 분해대사가 감소된 것으로 추정된다. 따라서 개량 균주를 이용하여 약주를 제조할 경우 야생 균주를 이용하여 제조한 경우와 일반적인 특성에서는 큰 차이가 없을 것으로 생각되어진다.

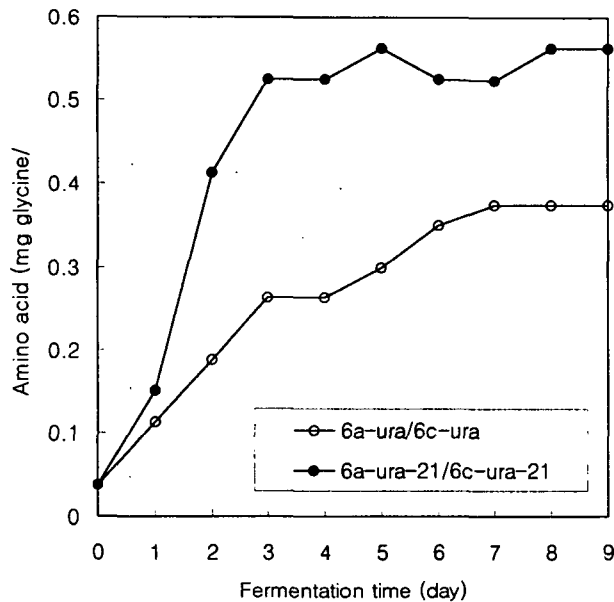


Fig. 3-6-5. Comparison in the amino acid content during yakju fermentation by recombinant and parent yeast strains

제7절 결 론

전통주에 함유되어 있는 발암성 ethyl carbamate의 생성을 억제시킬 수 있는 균주를 개량하기 위해서는 먼저 전통주 내에 있는 ethyl carbamate의 정확한 함량 분석법이 마련되어야 하며 또한 ethyl carbamate가 전통주 내에서 생성되는 조건을 파악해야 한다. 그러나 현재 우리 나라 전통주 내에 함유된 ethyl carbamate에 대한 최적 추출 조건이 마련되어 있는 않은 실정이며, 또한 전통주 제조 및 유통시 ethyl carbamate 생성에 미치는 요인들에 대한 대책들이 마련되어 있지 않은 실정이다. 이에 비해 미국의 경우는 포도주 내 ethyl carbamate의 생성 억제를 위한 행동 지침서까지 마련해 놓고 있다. 따라서 우리 나라 전통주의 제조 유통 중 여러 가지 요인에 대한 ethyl carbamate 생성에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 따라서 본 제2세부과제에서는 우리 나라 전통주에 대한 ethyl carbamate 분석법을 확립하고 전통주 제조 및 저장 과정 중에 ethyl carbamate 생성에 영향을 미치는 요인을 조사하였으며 또한 본 연구를 통해 개량된 재조합 효모 균주를 이용하여 ethyl carbamate의 함량이 낮은 전통주를 제조할 수 있었다. 그 결과들은 다음과 같다.

1. 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 분석 방법 확립

- 1) 우리 나라 전통주로부터 ethyl carbamate를 분석하기 위한 추출 용매로서 기존에 보고된 여러 용매를 사용하여 추출한 결과 클로로포름을 사용하여 추출하였을 때 가장 높은 추출 수율(약 23%)을 얻을 수 있었다.

- 2) 클로로포름을 추출 용매로 사용하여 추출 수율을 높이기 위해 추출 조건을 확립한 결과 클로로포름을 용매로 하여 30℃에서 1시간 진탕 추출한 경우 추출 수율이 높게 나타남을 알수 있었다.
- 3) 시료의 pH 조절에 의한 ethyl carbamate의 추출 수율 변화를 조사하였다. 약산성인 탁주의 pH를 알칼리성으로 조절한 결과 알칼리 범위에서 모두 회수율이 증가하였으며 특히 pH 9로 조절한 경우 회수율이 약 85-90%로 증가하였다.
- 4) 우리 나라 전통주 내의 ethyl carbamate의 전구체인 요소의 저장 중 함량 변화를 조사하였다. 전통주 종류에 따라 저장 초기의 요소의 함량은 최저 1.6에서 최고 6.84ppm이 함유되어 있는 것으로 나타났으나 저장 중 요소의 함량 변화는 그리 크지 않았다.
- 5) 시판 중인 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate의 함량을 분석한 결과 대부분 50ppb 내외 였으며 약주류의 경우 소주류에 비해 적은 양의 ethyl carbamate가 검출되어 이는 소주 제조시 증류 과정에서 열에 의해 ethyl carbamate의 생성이 촉진되어진 결과로 추정되어진다.
- 6) 약주의 종류에 따라 시료내 존재하는 ethyl carbamate의 함량의 차이는 약주 제조 원료내에서 생성되는 ethyl carbamate의 전구물질이 다르기 때문으로 생각되어진다.

2. *S.cerevisiae* SHY111에 의한 전통주 발효 특성

- 1) 분리한 *S.cerevisiae* SHY111을 이용하여 전통주를 제조하였으며 이때 담금 당 함량에 따른 전통주의 일반 성분을 비교한 결과 최종 알코올 함량은 당함량 증가에 따라 약간 증가하는 것으로 나타났으며 pH는 유사하게 나타났으며 산도의 경우 20% 당함량 전통주에서 약 0.2% 낮게 나타났다. 아미노산도는 30% 당함량 전통주에서 가장 높게 나타났으며 요소의 함량은 당농도가 높을수록 낮게 나타났다.
- 2) 사입 온도에 따른 전통주의 일반 성분 및 요소 함량 변화를 조사한 결과 30℃에서 알코올 함량이 가장 높았으며, 일반 성분들은 사입 온도가 낮을수록 함량이 낮게 나타난 반면 요소는 온도가 낮을수록 높게 나타났다.

3. 제성 및 저장 조건에 따른 ethyl carbamate 생성

- 1) 발효 후 행하는 살균 공정에서 살균 조건에 따른 ethyl carbamate의 생성 정도를 확인하였다. 살균 과정을 거친 전통주의 경우 그렇지 않은 대조구에 비해 4배이상 ethyl carbamate의 함량이 증가함을 볼 수 있었으며, 또한 70℃에서 살균 시간에 따른 생성량의 차이는 약간 있는 것으로 나타났으나 그 차이는 그리 크지 않았다.
- 2) 저장 중 전통주내 ethyl carbamate의 함량 변화를 알아보고자 제조한 전통주를 각각 여러 온도 조건에서 보관한 결과 20℃이상에서 보관한 경우 저장 기간이 길어질수록 ethyl carbamate의 함량이 증가함을 알

수 있었다.

- 3) 전통주 내 요소의 첨가량을 달리하여 ethyl carbamate의 생성을 조사한 결과 요소 첨가 후 살균한 경우 대조구에 비해 ethyl carbamate의 함량이 증가함을 알 수 있었으며 저장 중에도 저장 기간이 길어질수록 ethyl carbamate의 함량이 급격히 증가함을 나타내었다.

4. 배수체 재조합 효모의 전통주 발효 특성

- 1) 제조된 배수체 재조합 효모 6a21/6c21을 이용하여 전통주 발효 특성을 조사한 결과 대조구인 6a/6c에 비해 알코올 생성 속도가 다소 느린 것으로 나타났으며 대조구는 5일째, 재조합 효모는 6일째에 발효가 중지되었다. 그러나 최종 알코올 생성량은 거의 비슷하였다.
- 2) 재조합 효모는 대조구에 비해 발효시 산생성력이 높으며 아미노산 생성력도 더 뛰어난 것으로 나타났다. 또한 환원당의 감소는 재조합 효모의 경우 대조구에 비해 감소 정도가 낮음을 보여 주며 이는 알코올 함량 결과와 유사한 경향을 나타내는 것이다.
- 3) 전통주 발효시 효모 생균수의 변화는 재조합 균주나 대조 균주 모두에서 유사하게 나타났으며, 이는 YPD 액체 배지상에서의 결과와 일치하였다.

제 4 장 총 합 결 론

발암성 ethyl carbamate를 함유하지 않는 우리 나라 전통주의 제조기술 개발을 위하여 두 개의 세부과제로 연구를 수행하였다. 제1세부과제에서는 우리 나라 전통주의 발효에 관여하는 알코올 효모를 분리하여 spore dissection 방법으로 단수체를 분리하고 이 단수체로부터 *ura3* 변이주를 분리하였다. 이 균주를 대상으로 유전자 조작에 의하여 *arginase*의 생합성을 제어함으로써 요소 비생성 효모 균주를 개량하여 배수체 재조합 효모를 만들었다. 제2세부과제에서는 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 분석 기술을 확립한 다음 우리 나라 전통주로부터 분리한 알코올 효모를 이용하여 전통주의 제조 기술을 확립하였다. 이 방법에 의하여 각종의 전통주 제조 조건에 따른 ethyl carbamate의 생성 정도를 조사하여 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 생성 기작을 규명하였다. 이상의 결과를 세부과제별로 나누어 정리하면 다음과 같다.

제1세부과제: 유전자 조작에 의한 요소 비생성 전통주 효모 육종

1. 우리 나라 전통주 효모의 분리 및 동정

- 1) 우리 나라의 대표적 전통주인 탁주와 약주의 술덧으로부터 분리한 약 250여 주의 효모 중 각각의 전통주에서 분리한 10 주씩의 균주를 자동동정시스템으로 동정한 결과 탁주와 1종의 약주에서는 10 주 모두, 2종의 약주에서는 9 주가 *Saccharomyces boulardii*로 동정되었으며

- 유사도는 64.7-98.3%이었다.
- 2) 자동동정 시스템에 의해 *S. boulardii*로 동정된 균주들 중에서 알코올 발효력이 가장 강한 한 균주 SHY111을 선별하여 Lodder, Barnet, Rij 및 Kurtzman의 분류기준에 따라 *Saccharomyces cerevisiae* 유연균으로 동정하였다.
 - 3) *S. cerevisiae* SHY111의 온도에 따른 생육특성은 최적 온도는 30℃이었으며 저온과 pH 5.0~9.0 사이에서도 생육이 양호하였다.
 - 4) 분리균주 *S. cerevisiae* SHY111의 알코올 발효력을 현재 산업적으로 이용되고 있는 *S. cerevisiae* 발연 1호, *S. coreanus*와 비교한 결과 분리균주가 더욱 발효력이 높았다.

2. 전통주 효모 균주와 효모 표준균주와의 특성 비교

- 1) *S. cerevisiae* SHY-111과 효모 표준균주 *S. boulardii*, *S. coreanus*, *S. cerevisiae* 288c를 사용하여 발효성과 자화성을 조사한 결과, 균주간의 탄소원 발효성과 자화성은 몇 종류의 당에서만 차이를 나타냈다.
- 2) 분리균주 *S. cerevisiae* SHY-111의 ITS (internal transcribed spacer) 영역을 PCR로 증폭한 결과 PCR 산물의 크기가 동일하였고, 이들 단편을 pUC19 벡터 plasmid에 클로닝한 후 그 염기서열을 조사한 결과 효모 표준균주인 *S. cerevisiae* 288c, *S. coreanus* 및 *S. boulardii*의 것과 동일하여 이들 모두가 유전적으로 매우 가까운 것임을 알 수 있었다.
- 3) 분리 균주 *S. cerevisiae* SHY111과 *S. boulardii*, *S. coreanus*, *S. cerevisiae* 288c 균주의 차이를 알아보기 위하여 RNA intron

splicing site의 염기서열을 토대로 합성한 4종류의 PCR primer를 이용하여 PCR을 행한 결과 EI2 primer의 경우 *S. cerevisiae* SHY-111에서만 200bp의 특이적인 band가 관찰되어 나머지 균주와 구별할 수 있었다.

- 4) 전통주 4종류로부터 분리한 균주 40주의 염색체 DNA를 주형으로 하여 primer EI2로 PCR하여 DNA patten을 비교한 결과 우리 나라 전통주에 관여하는 대부분의 효모들은 *S. cerevisiae* SHY111과 모두 유사한 균주로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

3. 단수체 *ura3* 변이주의 분리 및 특성

- 1) 우리 나라 전통주 효모 *S. cerevisiae* SHY111의 포자형성을 위해 presporulation 배지에서 유도기까지 배양한 세포로부터 형성된 포자를 micromanipulator로써 분리하여 단수체 효모를 제조하였다.
- 2) 분리된 각종의 단수체 효모를 이용하여 15% glucose를 함유하는 YPD 배지에서 알코올 발효를 행한 결과 다양한 발효 양상을 나타내어 분리 효모균주가 유전적으로 불안정함을 알 수 있었다.
- 3) 효모의 *ura3* deletion을 위하여 *ura3::NEO*를 함유하는 deletion plasmid를 제작하였다. 그러나 각종의 단수체 효모는 *ura3::NEO* 단편에 의해 homologous recombination이 불가능하였다.
- 4) 각종의 단수체 효모에 ethyl methyl sulfonate를 처리하여 *ura3* 변이주 6a-*ura*와 6c-*ura*를 분리하였으며 이들 변이주들의 생육특성을 조사한 결과 uracil을 첨가한 배지에서 친주세포와 유사한 생육특성을 나타내었다.

4. 요소 비생성 효모 균주의 육종

- 1) Arginase (CAR1) 유전자의 deletion을 위하여 yeast gene library로부터 콜로니하이브리디제이션에 의해 CAR1 유전자 단편을 분리하였다. 이 DNA 단편으로부터 1.2kb의 CAR1 유전자를 서브클로닝하여 car1 deletion plasmid의 제작 및 PCR에 의한 antisense CAR1 DNA의 제작에 사용하였다.
- 2) car1::NEO 단편을 함유하는 car1 deletion plasmid를 제작하여 단수체 ura3 변이주를 형질전환시킨 결과 homologous recombination에 의한 car1 deletion 변이주가 형성되지 않았다.
- 3) Antisense CAR1 DNA를 이용한 arginase의 제어를 위하여 CAR1 유전자 염기서열로부터 start codon을 가지는 염기서열과 전사개시점을 가지는 염기서열을 기준으로 각각의 forward primer를 설계하였으며, start codon으로부터 501 bp 위치의 염기서열을 기준으로 reverse primer를 설계하여 각각 501bp와 550bp의 antisense CAR1-21과 antisense CAR1-31 DNA 단편을 대량 증폭하였다.
- 4) 500bp와 550bp의 antisense CAR1 DNA를 효모 CYC1 프로모터에 fusion한 후 YIp5 벡터 plasmid에 클로닝하여 YMCp21 및 YMCp31 재조합 plasmid를 제작하였다.
- 5) YMCp21 및 YMCp31 plasmid를 ura3 변이주와 대조구로서 TCY1 및 TCY15 균주에 형질전환하여 arginase의 합성을 제어할 수 있는 단수체 재조합 효모를 제조하였다.
- 6) 제조한 단수체의 재조합 효모인 6a-ura/YMCP21 및 6c-ura/YMCp21의 경우 arginase 활성이 대조구인 TCY1과 TCY15에 비하여 최고 95% 정도가 억제되어 그 생산량이 약 5% 정도의 수준을 나타내었

다.

- 7) 재조합 plasmid를 함유하지 않는 전통주 효모 단수체 *ura3* 변이주 6a-*ura*, 6c-*ura* 역시 TCY1 및 TCY15에 비하여 약 10-15% 수준의 *arginase*를 생산하였다.

5. 배수체 재조합 효모의 제조 및 요소 생성능

- 1) 단수체 재조합 효모 6a-*ura*/YMCp21과 6c-*ura*/YMCp21를 mating하여 배수체 재조합 효모를 제조한 후 이를 확인하기 위하여 sporulation 액체배지에서 포자형성을 유도하여 배수체 효모임을 확인하였다.
- 2) 배수체 친주세포 및 재조합 세포의 생육을 YPD 배지와 질소원으로 *arginine*를 첨가한 YNB 배지에서 조사한 결과 유사한 생육도를 나타내어 antisense *CAR1* DNA에 의한 생리적 변화는 거의 없는 것을 확인하였다.
- 3) 배수체 재조합 효모를 이용하여 시험적으로 약주를 제조하였으며 약주의 요소 함량을 측정하여 시판되고 있는 각종 약주의 요소 함량과 비교한 결과 재조합 효모에 의한 약주의 경우 요소의 함량이 최고 95%가 감소하여 시판 약주의 약 4-5% 수준을 나타내었다.
- 4) 배수체 재조합 효모에 의한 전통주의 발효시 발효 초기에 있어서는 발암성 ethyl carbamate의 전구물질인 요소의 함량에 있어서 대조구의 경우와 큰 차이가 없었으나 발효가 진행됨에 따라 요소의 함량이 감소함을 확인하였다.

제2세부과제: 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 생성기작 규명

1. 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate 분석 방법 확립

- 1) 전통주로부터 ethyl carbamate를 분석하기 위한 추출 용매로서 사용한 여러 용매 중 클로로포름을 사용하여 30℃에서 1시간 진탕 추출한 경우 회수율이 높게 나타났으나 그 회수율은 기 발표된 내용과 같이 20% 수준 미만이었다.
- 2) 약산성인 탁주의 pH를 알칼리성으로 조절하고 NaCl 또는 (NH₄)₂SO₄로 포화시켜 ethyl carbamate를 추출한 결과 회수율이 크게 증가하였으며 특히 pH를 9로 조절한 경우에 회수율이 약 85-90% 정도로 나타났다.
- 3) 전통주의 ethyl carbamate 전구체인 요소의 함량은 전통주의 종류에 따라 저장 초기에 최저 1.62에서 최고 6.84ppm이었으며, 저장 중 함량의 변화는 그리 크지 않았다.
- 4) 시판 중인 우리 나라 전통주의 ethyl carbamate의 함량을 분석한 결과 대부분 36-65ppb 정도이었다.

2. *S. cerevisiae* SHY111에 의한 전통주 발효 특성

- 1) *S. cerevisiae* SHY111을 이용하여 초기 당 함량을 25, 30, 35%로 달리하여 약주를 제조한 결과 최종 알코올 함량은 당 함량 증가에 따라 약간 증가하였고, 요소의 함량은 당농도가 높을수록 낮게 나타났다.
- 2) 사입온도를 달리하여 전통주를 제조한 경우 30℃에서 알코올 함량이 가장 높았으며, 일반 성분들은 사입온도가 낮을수록 함량이 낮게 나

타난 반면 요소의 함량은 온도가 낮을수록 높게 나타났다.

3. 약주의 제성 및 저장 조건에 따른 ethyl carbamate 생성

- 1) 약주의 발효 후 살균처리를 한 경우 ethyl carbamate의 생성 정도는 비처리구에 비해 ethyl carbamate의 함량이 4배 이상 증가하여 열처리에 의해 ethyl carbamate 생성이 촉진되었으나 60-80℃의 범위에서 처리온도에 의한 차이는 거의 없었다.
- 2) 제조한 전통주를 10, 20, 30℃에서 각기 보관한 결과 20℃이상에서 저장기간이 길 수록 ethyl carbamate의 함량이 증가하였다.
- 3) 전통주 요소의 함량이 많고 저장 기간이 길수록 ethyl carbamate의 함량이 증가하였다.

4. 배수체 재조합 효모의 전통주 발효 특성

- 1) 배수체 재조합 효모 6a-21/6c-21은 친주인 6a/6c에 비해 알코올 생성 속도가 다소 느렸으나 최종 알코올 생성량은 거의 비슷하였다.
- 2) 재조합 효모는 친주에 비해 발효시 산생성력이 높았으며 아미노산 생성력도 더 뛰어난 것으로 나타났다.
- 3) 전통주 발효시 효모 생균수의 변화는 재조합 균주나 친주 모두에서 유사하게 나타났다.

참 고 문 헌

- Allen, J. W., G. D. Stoner, M. A. Perira, L. C. Baker, Y. Sharief, G. G. Gatch, A. G. Stead, J. A. Campbell and S. Nesnow. 1986. Tumorigenesis and genotoxicity of ethyl carbamate and vinyl carbamate in rodent cells. *Cancer Res.* 46 : 4911-4915.
- Bajpai, P.K. and A. Margaritis. 1986. Effect of temperature and pH on immobilized *Zymomonas mobilis* for continuous production of ethanol.
- Barnett, J. A., R. W. Payne, and D. Yarrow. 1983. Yeast, characteristics and identification. pp. 467-469. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction on procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7(6) : 1513-1523.
- Boutard, V., R. Havouis, B. Fouqueray, C. Philippe, J. P. Moulinoux, and L. Baud. 1995. Transforming growth Factor- β stimulates arginase activity in macrophages : implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. *J. Immunol.* 155: 2077-2084.
- Caputi, Jr., A. 1995. Wines, pp. 28.1-28.16. In P. Cunniff (ed). Official methods of analysis of AOAC international. vol. 2. AOAC International, Arlington, Virginia, U.S.A.
- Castagliuolo I., M. F. Riegler, L. Valenick, J. T. LaMont, and C. Pothoulakis. 1999. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic

- mucosa. *Infect. Immun.* 67: 302-307.
- Codon, A. C., J. M. Gasent-Ramirez, and T. Benitez. 1995. Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 630-638.
- Cohen, S. N., A. C. T. Chang, and L. Hsu. 1973. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria : genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 9 : 2110-2114.
- de Miguel Barros Lopes, Alison Soden, Anna L. Martens, Paul A. Henschke, and Peter Langridge. 1998. Differentiation and species identification of yeast using PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48(1). 279-286.
- de Miguel, B. L., A. Soden, P. A. Henschke, and P. Langridge. 1996. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4514-4520.
- Elmer, G. W., L. V. McFarland, C. M. Surawicz, L. Danko, and R. N. Greenberg. 1999. Behaviour of *Saccharomyces boulardii* in recurrent *Clostridium difficile* disease patients. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 13: 1663-1668.
- Engler, M. J., and D. C. Richardson. 1982. DNA ligases. In *The Enzymes*. Academic Press, San Diego. 15B : 3-30.
- Lavallee, F., Y. Salvat, S. Lamy, D. Y. Thomas, R. Degre, L. Dulau. 1994. PCR and DNA fingerprinting used as quality control in the production of wine yeast strains. *Am. J. Enol. Vitic.*, 45(1). 86-91.

- Filho-Lima J. V., E. C. Vieira, and J. R. Nicoli. 2000. Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. typhimurium in gnotobiotic mice. *J Appl Microbiol.* 88: 365-370.
- Fink, G.R., Sherman, F., 1986. *Manual of Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Green, S. M., E. Eisenstein, P. McPhie, and P. Hensley, 1990. The purification and characterization of arginase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 265 : 1601-1607.
- Gutmann, I. and H. U. Bergmeyer. 1974. urea. *Methods Enzymatic Analysis.* 4: 1791-1801.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166 : 557-580.
- Hara, S., K. Yoshizawa and K. Nakamura. 1988. Formation of ethyl carbamate in model alcohol beverages containing urea or its related compounds. *J. Brew. Soc. Jpn.* 83: 57-63.
- Helene, C. and J. J. Toulme. 1990. Specific regulation of gene expression by antisense, sense, antigene nucleic acids. *Biochem. Biophys. Acta* 1049 : 99-125.
- Hong, Y., Y. B. Kim, S. O. Park, and E. H. Choi. 1997. Microflora and physicochemical characteristics of Nuruk and main mashes during fermentation of a traditional Andong Soju. *Foods Biotechnol.* 6: 297-303.
- Ingledeu, W. M., C. A. Magnus, J. R. Patterson. 1987. Yeast foods

- and ethyl carbamate formation in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 38 : 332-336.
- James Hill, K. A. Lan, G. Donald and David E. Griffiths. 1991. DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucl. Acids Res.* 19(20) : 5791.
- Jansen, A., S. Lewis, V. Cattell, and H. T. Cook. 1992. Arginase is a major pathway of L-arginine metabolism in nephritic glomeruli. *Kidney Int.* 42 : 1107.
- Johnson, J. R., and R. K. Mortimer. 1986. Electrophoretic karyotyping of laboratory and commercial strains of *Saccharomyces* and other yeasts. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 569-572.
- Kaiser, C., S. Michaelis, and A. Mitchell. 1994. Methods in yeast genetics, pp 137-147. 1994 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.
- Kanda, M., K. Ohgishi, T. Hanawa, and Y. Saito. 1997. Arginase of *Bacillus brevis* Nagano : purification, properties, and implication in Gramicidin S Biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 344 : 37-42.
- Kim, C. J. 1968. Microbiological and enzymological studies on Takju brewing. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* 10: 69-100.
- Kim, Young-Ho and Jung-Hwn. Seu. 1988. Culture condition for glucoamylase production and ethanol productivity of heterologous transformant of *Saccharomyces cerevisiae* gene of *Saccharomyces diastaticus*. *Kor. J. Appl. Microbiol.* 16(6) : 494-498.
- Kitamoto, K., K. Oda, K. Gomi and K. Takahashi. 1991. Genetic

- engineering of a sake yeast producing no urea by successive disruption of arginase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 301-306.
- Kurtzman, C. P., and J. W. Fell. 1998. *The yeast, a taxonomic study.* pp. 358-371. 4th ed. Elsevier Science B. V., Amsterdam, The Netherlands.
- Lavallee, F., Y. Salvas, S. Lamy, D. Y. Thomas, R. Degre, and L. Dulau. 1994. PCR and DNA fingerprinting used as quality control in the production of wine yeast strains. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 86-91.
- Lee, J. S., and T. W. Rhee. 1970. Studies on the microflora of Takju brewing. *Kor. J. Microbiol.* 8: 116-133.
- Lodder, J. 1970. *The yeast, a taxonomic study.* North-Holland Publishing Co., Amsterdam, The Netherlands.
- Loke, S. L. et al. 1989. Characterization of oligodeoxynucleotide transport into living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 3474-3478.
- Quesada, M. P., J. L. Cenis. 1995. Use of random amplified polymorphic DNA(RAPD-PCR) in the chracterization of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46(2). 204-208.
- Mandel, M., and A. Higa. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53 : 154-162.
- McCullough, M. J.; K. V. Clemons, J. H. McCusker, and D. A. Stevens. 1998. Species identification and virulence attributes of *Saccharomyces boulardii* (nom. inval.). *J. Clinic. Microbiol.* 36: 2163-2617.

- McFarland, L. V., C. M. Surawicz, R. N. Greenberg, G. W. Elmer, K. A. Moyer, S. A. Melcher, K. E. Bowen, and J. L. Cox. 1995. Prevention of β -lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am. J. Gastroenterol.* 90: 439-448.
- Middelhoven, W. J. 1964. The pathway of arginine breakdown in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Acta.* 93 : 650-652.
- Mirvish, S. S. 1968. The carcinogenic action and metabolism of urethan and N-hydroxyurethan. *Adv. Cancer Res.* 11: 1-42.
- Neeper-Bradley, T. L. and M. K. Conner. 1992. Tumor formation and sister chromatid exchange induction by ethyl carbamate : relationships among non-pregnant murine females, gravid dams, and transplacentally exposed offspring. *Teratogenesis Carcinog Mutagen.* 12: 167-177.
- Ota, K., K. Supawong, and S. Hayashida. 1982. Environmental effects on ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*. *Annual Reports ICME.* 3: 109-116.
- Ough, C. S. 1976. Ethyl carbamate in fermented beverages and foods, naturally occurring ethyl carbamate. *J. Agric. Food Chem.* 24(2) : 323-328.
- Ough, C. S., D. Stevens, T. Sendovski, Z. Huang and D. An. 1990. Factors contributing to urea formation in commercially fermented wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 68-73.
- Ough, C. S., E. A. Crowell and B. R. Gutlove. 1988. Carbamyl compound reactions with ethanol. *Am. J. Enol. Vitic.* 39: 239-249.
- Park, H. D., S. H. Kim, J. H. Shin, and I. K. Rhee. 1999. Genetic

- analysis of alcohol yeasts isolated from Korean traditional liquor by polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9: 744-750.
- Pereira, M. A., M. M. Khoury, H. P. Glauert and R. A. Davis. 1991. Screen of five alkyl carbamate for initiating and promoting activity in rat liver. *Cancer Lett.* 57: 37-44.
- Quesada, M. P., and J. L. Cenis. 1995. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterization of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 204-208.
- Riffkin, H. L., R. Wilson and S. B. Muller. 1989. Ethyl carbamate formation in the production of pot still whisky. *J. Inst. Brew.* 95: 115-119.
- Rij, K. 1984. *The Yeasts: a taxonomic study.* Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Russel, A. S., and U. T. Ruegg, 1980. Arginase production by peritoneal macrophages : a new assay. *J. Immunol. Methods.* 32 : 375.
- Saito, K. 1910. Notizen über einige Koreanische Gärungsorganismen. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk.,* 26: 369-374.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold spring Harbor, N.Y. USA.
- Selamnia. M., C. Mayeur, V. Robert, and F. Blachier. 1998. α - Difluoromethylornithine(DFMO) as a potent arginase activity inhibitor in human colon carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology.* 55: 1241-1245.

- Sherman, F. 1991. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 194: 3-21
- Southern, E. 1979. Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods Enzymol.* 68 : 152-176.
- Stein, C. A. and Y. C. Cheing. 1993. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents - is the bullet really magical?. *Science.* 261 : 1004-1012.
- Strehaiano, P., M. Mota, G. Goma. 1983. Effect of inoculum on kinetics of alcoholic fermentation. *Biotech. Letters* 5 : 135-140.
- Suizu, T., Y. Iimura, K. Gomi, K. Takahashi, S. Hara, K. Yoshizawa, and G. Tamura. 1990. Construction of urea non-producing yeast *Saccharomyces cerevisiae* by disruption of the CAR1 gene. *Agric. Biol. Chem.* 54(2) : 537-539.
- Sumrada, R. A. and T. G. Cooper. 1982. Isolation of the CAR1 gene from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of its expression. *Mol. Cell. Biol.* 2: 1514-1523.
- Sumrada, R. A., and T. G. Cooper. 1985. Target sites for positive and negative regulatory elements controlling expression of an inducible eucaryotic gene. *Sequence Specificity in Transcription and Translation.* 291-301.
- Surawicz, C. M., G. W. Elmer, P. Speelman, L. V. McFarland, J. Chinn, and G. van Belle. 1989. Prevention of antibiotic associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterol.* 96: 981-988.
- van Rij, K. 1984. The yeasts, a taxonomic study. pp. 379-395. Elsevier

- Science Publishers B. V., Amsterdam, The Netherlands.
- Whitney, P. A. and B. Magasanik. 1973. The induction of arginase in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 248 : 6197-6202.
- Yakurov, L. A. et al. 1989. Mechanism of oligodeoxynucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors?. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86 : 6454-6458.
- Yang, J. Y., and K. H. Lee. 1996. Shelf-life and microbiological study of Sansung Takju. Kor. J. Food. Sci. Technol. 28: 779-785.
- Yeun Hong, Young-Bae Kim, Sung-Oh Park and Eon-Ho Choi. 1997. Microflora and physiochemical characteristics of Nuruk and main mashes during fermentation of a traditional Andong Soju. Foods and Biotechnology, 6(4) : 297-303.
- Zamecnick, P. C. and Stephenson, M. L. 1978. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75(1) : 280-284.
- 고정삼, 양영택, 고영환, 강영주. 1993. 제주토속 좁쌀약주의 양조특성. 한국농화학회지, 36 : 277-283.
- 김은희, 1994. 인삼(*Panax Ginseng* C. C. Meyer)에서 arginase의 정제와 특성 연구. 연세대학교 석사 논문집.
- 김현수, 현지숙, 김 정, 하현팔, 유대식, 1997. 전통누룩곰팡이의 연구동향. 생물 산업, 10 : 27-32
- 민용규, 윤향식, 정현상. 1992. 백화주의 증류조작에 관한 연구. 한국농화학회지, 37 : 9-13.
- 박석규, 박필숙, 김귀영, 강우원, 이영근. 1994. 백일주 양조 중 알코올, 유리 아미노산, 비휘발성 유기산 및 지방산 조성의 변화. 동아시아 식생

- 활학회지. 4: 103-109.
- 上野金太郎, 1906. 한국곡자의 研究報告 第1回 藥學雜誌, 227 : 203-212.
- 소명환, 1993. *Aspergillus oryzae* L2에 의한 밀가루 누룩 제조시 amylase와 protease의 생산조건. 한국식품영양학회지, 18 : 506-510.
- 손순기, 노형훈, 김현진, 배상면. 1990. *Rhizopus koji*를 이용한 무증자 쌀 탁주 양조. 한국산업미생물학회지. 18: 506-510.
- 신용두, 조덕현. 1970. 탁주 발효에 있어서 발효미생물의 변동에 대하여. 한국미생물학회지, 8 : 53-64.
- 안병학, 1997. 한국 전통 민속주의 현황. 미생물과 산업. 23(2) : 31-39.
- 안병학, 박완수, 조동욱, 이효지, 1994. 전통주의 산업적 생산 기술개발에 관한 연구. 한국식품개발원 연구보고, E1283-0504.
- 안병학, 정건섭, 박완수, 이명기, 차 진등, 1995. 전통발효식품의 과학화 연구 “전통주 발효용 종균개발 연구” 과학기술처 보고서. N 1037-0625.
- 안병학. 1997. 한국 전통 민속주의 현황. 미생물과 산업. 23(2) : 31-39.
- 양지영, 이계호, 1996. 향토주인 산성막걸리의 미생물학적 고찰과 저장성에 관한 연구. Korean J. Food Sci.. Technol. 28(4) : 779-785.
- 오만진, 송보현, 민용규, 성장근, 1995. 전통발효식품의 과학화 연구 ‘전통 혼성주의 품질향상 및 산업화 기술 연구’ 과학기술처 보고서.
- 오평수, 차두중, 서항원. 1986. 쌀보리의 무증자 알코올 발효에 관한 연구. 한국산업미생물학회지. 14: 415-420.
- 이계호, 1991. 생전분 분해성 *Rhizopus* sp.에 의한 전통약주 제조 및 그 최적화 공정 기술 개발, 과학기술처 연구보고서.
- 이계호, 1993. 전분 발효성 접합 균주(*Zygomycetes*)를 활용한 쌀의 액화, 당화 최적기준 설정, 농촌진흥청 연구보고서.

- 이미경, 이성우, 윤태현. 1994. 전통누룩으로 빚은 발효주의 품질평가. 한국영양식량학회지. 23 : 78-89.
- 이배함, 정성구, 1969. 막걸리 대체원료에 따른 고성능 발효균주 개발에 관한 연구, 기술연구소보, 2 : 88-94.
- 이병노, 성창근, 오만진, 1997. 전통누룩 곰팡이의 생화학적 및 양조학적 특성. 생물산업. 10(3) : 10-16.
- 이서래, 1986. 한국의 발효식품. 한국 정신문화연구원, 한국문화총서 15. 이화여자대학교 출판부.
- 이순애, 박희동. 1995. 원료미의 분쇄정도가 무증자 당화탁주의 발효에 미치는 영향. 농산물저장유통학회지. 2: 1-8.
- 이원경, 김정립, 이명환. 1987. 국균을 달리한 탁주 양조 중 유리 아미노산 및 유기산의 소장. 한국농화학회지. 30: 323-327.
- 이주식, 이태우. 1970. 탁주의 microflora에 관한 연구. 한국미생물학회지. 8: 116-133.
- 이철호, 이현덕, 김지용, 김기명. 1986. 탁주의 관능적 품질요소와 이들의 열처리에 의한 변화. 한국식문화학회지. 4: 405-409.
- 이철호, 태원택, 김기명, 이현덕, 1991. 탁주의 저온 살균조건에 관한 연구. 한국식품과학회지. 23 : 44-51.
- 장기중, 유태종. 1981. 소국주와 시판 약주의 성분에 관한 연구. 한국식품과학회지. 13: 307-313.
- 정비석, 정순택. 1987. 전통 약주의 향기성분 비교. 한국농화학회지. 30: 264-271.
- 조정형. 1997. 다시 찾아야 할 우리의 술. 서해문집.
- 하덕모, 김동찬, 홍석민, 이철우, 1989. 누룩의 전분 자화성 효모의 동정과 그 성질. 한국농화학회지, 32 : 408-415.