

사과酒 産膜酵母 *Hansenula beijerinckii* FY-5의 疎水性과 産膜性과의 關聯性

宋享翼·鄭基澤

慶北大學校 食品加工學科

Relationship between Hydrophobicity and Pellicle Formation in a Film Strain of *Hansenula beijerinckii* FY-5 Isolated from Apple Wine

Hyung-Ik Song and Ki-Taek Chung

Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu

Abstract

Relationship between cell surface hydrophobicity and pellicle formation was studied in a film strain isolated from stored apple wine and identified as *Hansenula beijerinckii* FY-5. In the media containing non-ionic surface-active agents the pellicle formation of strain FY-5 was efficiently repressed, whereas growth of the yeast was possible, and also cell surface hydrophobicity was greatly decreased by the addition of these agents. These results indicate that a pellicle formation factor, which keeps yeast cells floating on the medium surface, is necessary for the pellicle formation, and surely this factor is the hydrophobicity of the cell surface. The pellicle formation in the film strains was abundant with the increase of the cell surface hydrophobicity, whereas the non-film strains had less hydrophobicity as compared with the film strains. Ethanol, as a sole carbon source, efficiently increased hydrophobicity more than glucose, and the hydrophobicity was lowered with the rise of pH. In the experiments of time course, the hydrophobicity was increased in proportion to cell growth, and was maximum during the stationary phase.

序 論

産膜酵母는 과일주의 저장중에도 살아남아 貯藏酒의 表面에 皮膜을 形成함으로써 알데히드, 揮發性에스테르를 축적하고 酸, 糖, 알콜을 減少시키는 등 酒質에 나쁜 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.^(1,2) 産膜酵母에 관해서는 皮膜形成의 조건, 영양要求性 등이 다수 報告되어 있으며⁽³⁻⁷⁾ 근래에는 産膜機作에 관한 研究도 일부 이루어지고 있다. 今原등⁽⁸⁾은 非産膜性酵母일수록 表面의 荷電狀態가 강하기 때문에 더 親水的이고 반대로 産膜性酵母는 疎水的이라고 報告하였고 大塚등⁽⁹⁾도 산막성이 강한 酵母일수록 油滴에의 附着性이 강하다고 보고한 바 있다. 또한 Imura등⁽¹⁰⁻¹²⁾은 産膜酵母의 生育條件이 菌體表面의 소수성에 미치는 영향을 조사하여 산막효모는 培地표면에 떠있을 정도의 疎水性이 있어야만 表面에 皮膜을 形成할 수 있으며 皮

膜形成은 결국 菌體表面의 疎水性때문이라고 보고한 바 있고 아울러 세포표면이 疎水性이 되는 原因을 究명한 바 있다.

그러나 이들 研究은 모두 포도주에 관한 것이며 사과주의 産膜酵母를 대상으로 한 研究은 거의 없는 實情이다. 이에 저자들은 前報^(13,14)에서 貯藏사과주의 産膜의 原因이 되는 産膜酵母 FY-5를 分離하여 *Hansenula beijerinckii*로 同定하고 그 生育條件을 檢討한 바 있다. 本報에서는 産膜機作연구의 일환으로 산막효모 *Hansenula beijerinckii* FY-5의 細胞表面의 疎水性과 皮膜形成과의 關聯性에 대하여 報告하고자 한다.

材料 및 方法

使用菌株

前報^(13,14)에서 分離·同定한 *Hansenula beijerinckii* FY-5를 사용하였다. 다만 菌株別 疎水度 비교 實驗에서는 本 研究室에 所藏中인 多數의 産膜 및 非産膜 酵母를 비교 實驗하였다.

培地 조성 및 培養

전보⁽¹⁴⁾와 동일한 조성의 배지를 사용하였다. 菌은 따로 언급한 경우를 제외하고 30°C에서 2일간 靜置 培養하였다.

皮膜形成能 및 菌生育度

皮膜形成能은 시험관 및 삼각플라스크 배양을 併行하여 육안관찰로 판정하였으며 菌體量은 spectrophotometer (Spectromic 20, Bausch & Lomb)를 使用하여 660 nm에서의 흡광도로 나타내었다.

疎水度 測定

細胞表面의 疎水性의 크기는 Iimura 등의 方法⁽¹⁰⁾에 準하여 완충액과 유기용매와의 2相系에 있어서 酵母細胞의 이동정도로 測定하였다. 菌培養液에서 효모균체를 원심분리법으로 回收하여 증류수로 3회세척하고 菌體濃도가 흡광도(660 nm)로 약 0.5가 되도록 McIlvaine buffer(pH 3.6)에 현탁시킨다. 시험관(2.0×20 cm)에 균체현탁액 3 ml를 취하고 同量의 유기용매를 가하여 시험관진탕기로 3분간 격렬하게 振盪한 다음 初期 및 振盪後의 吸光度를 測定하여 細胞表面의 疎水度を 다음式에 의해 계산하였다.

$$\text{소수도}(\%) = 100(I - R/I)$$

단, I : 초기 완충액의 흡광도

R : 진탕후 완충액의 흡광도

初期균체농도와 振盪後의 균체농도와의 關係를 660 nm에서의 吸光度로 表示한 결과, 초기균체농도 1.0 이하에서는 酵母菌體의 이동율이 초기균체농도와 거의 비례하여 증가하였다(Fig.1).

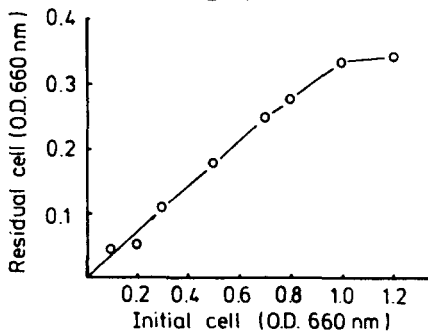


Fig. 1 Relationship between initial and residual cell concentration in buffer solution

結 果

疎水度 측정시 有機溶媒의 영향

소수도 측정과정에서 McIlvaine buffer(pH 3.6) 용액에 현탁시킨 酵母菌체가 유기용매층으로 移行되는 정도가 유기용매의 種類에 따라 어떻게 달라지는가를 조사하였다. Table 1에 나타난 바와 같이 疎水度の 크기는 포화탄화수소, 방향족탄화수소, 알콜의 순서였으며 n-hexane이 가장 效果的이었다. 따라서 以下의 實驗에서는 유기용매로 n-hexane을 사용하였다.

界面活性劑의 영향

基本培地에서 産膜에 미치는 계면활성제의 영향을 調査하였다(Table 2). 0.05%濃度로 界面活性劑를 첨가하여 30°C에서 48시간 供試菌 FY-5를 배양한 결과, 비이온계인 Triton X-100, Tween 80의 경우 生育이 다소 억제되어 菌의 침전이 다소 적었으며 皮膜은 전혀 形成되지 않았다. 양이온계인 cetyltrimethylammonium bromide와 음이온계인 Aerosol OT의 경우는 菌生育이 완전 억제되어 결과적으로 皮膜形成

Table 1. Transference of yeast cells in a buffer solution-organic solvent, two phase system

| Solvent | Degree of transference* as degree of hydrophobicity(%) | |
|----------------|---|----|
| | n-Hexane | 40 |
| Benzene | 24 | |
| Toluene | 19 | |
| n-Butanol | 16 | |
| n-Amyl alcohol | 14 | |

*Transference of cells from McIlvaine buffer (pH 3.6) to the organic solvent in two phase system.

Table 2. Effect of surfactants on pellicle formation and cell surface hydrophobicity

| Surfactant | Growth | | O. D 660nm | Degree of hydrophobicity(%) |
|--------------|----------|----------|------------|-----------------------------|
| | Pellicle | Sediment | | |
| Blank | +++ | +++ | 2.54 | 82 |
| Triton X-100 | - | ++ | 1.30 | 55 |
| Tween 80 | - | ++ | 1.48 | 54 |
| CTAB* | - | - | - | - |
| Aerosol OT | - | - | - | - |

*cetyltrimethylammonium bromide

Symbols, + and -, show the degree of pellicle formation and cell sediment as follows; - none, + scanty, ++ moderate, +++ abundant

Cells were cultivated at 30°C for 48 hours in the glucose medium containing 0.05% of each surfactant.

과 균체의 침전이 전혀 없었다. 한편, 세포表面의 疎水度는 界面活性劑첨가에 의해 크게 억제됨을 보였으며 비이온제인 Triton X-100 과 Tween 80 사이에는 별차이가 인정되지 않았다.

産膜性 및 非産膜性酵母의 疎水性

産膜性酵母의 세포표면이 非産膜性酵母보다 더 소수성이 강하기 때문에 油滴이나 疎水性이 강한 有機溶媒에 吸着되기 쉽다고 알려져 있다. 이를 확인하기 위하여 供試菌 FY 5를 포함한 各種 산막성 및 비산막성효모의 皮膜形成과 疎水性의 크기와 관계를 조사하여 Table 3에 나타내었다. 공시균 *Hansenula beijerinckii* FY-5, *H. Saturnus* IFO 0177, *Pichia polymorpha* IFO 0195 등의 산막성효모는 産膜能이 커서 비교적 소수도가 높은 반면, *H. minuta* IFO 0975,

Table 3. Relationship between pellicle formation and cell surface hydrophobicity in various yeasts

| Strain | Pellicle formation | Degree of hydrophobicity(%) |
|-------------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| <i>H. beijerinckii</i> FY-5 | +++ | 64 |
| <i>H. saturnus</i> IFO 0177 | +++ | 79 |
| <i>H. anomala</i> IFO 0149 | + | 45 |
| <i>H. capsulata</i> IFO 0721 | - | 10 |
| <i>H. minuta</i> IFO 0975 | - | 2 |
| <i>P. polymorpha</i> IFO 0195 | ++ | 52 |
| <i>C. utilis</i> YUFE 1508 | - | 26 |
| <i>C. krusei</i> YUFE 1503 | + | 68 |
| <i>C. guilliermondii</i> KFCC 35120 | - | 18 |
| <i>Sac. cerevisiae</i> | - | 47 |

Symbols, + and -, are the same as Table 2.

Table 4. Effect of carbon source on pellicle formation and hydrophobicity

| Carbon source | Pellicle formation | Degree of hydrophobicity (%) |
|---------------|--------------------|------------------------------|
| Glucose | ++ | 76 |
| Ethanol | +++ | 90 |

Symbols show the degree of pellicle formation as Table 2. Cultivation was carried out at 30°C for 3 days, respectively.

Table 5. Effect of medium pH

| Medium pH | Pellicle formation | Degree of hydrophobicity(%) |
|-----------|--------------------|-----------------------------|
| 2 | - | - |
| 3 | +++ | 84 |
| 4 | ++ | 82 |
| 5 | ++ | 76 |
| 6 | ++ | 75 |
| 7 | + | 31 |

Symbols show the degree of pellicle formation as Table 2.

Candida guilliermondii KFCC 35120 등의 비산막성효모는 疎水度가 크게 낮았으며 따라서 産膜能도 없었다.

탄소원의 영향

基本培地和 기본배지의 포도당 1%를 ethanol 5%로 代替한 에타놀배지에서 공시균 FY-5를 各各 배양하여 産膜能과 疎水度를 조사한 바, 에타놀培地에서 자란 것이 포도당培地에서 자란 것보다 소수도가 높았으며 따라서 産膜能도 큰 것으로 나타났다(Table 4).

pH의 영향

기본배지의 pH를 여러가지로 조정하여 本菌 FY 5를 30°C, 48시간 培養한 다음 균체를 回收하여 pH別로 産膜能과 疎水度를 測定하였다(Table 5). 산막능은 배지의 pH에 의해 크게 영향을 받아서 pH 3 부근에서 가장 왕성하였으며 pH 2에서는 皮膜이 전혀 형성되지 않았고 pH 7에서도 皮膜형성이 다소 억제되었다. 또한 세포表面의 疎水度도 産膜能에 비례하였다. 즉, pH 3 부근에서 가장 높은 疎水度를 보였으며 pH가 높아져서 産膜能이 減少됨에 따라 疎水度도 차츰 감소되는 경향을 보였다.

한편, 酵母細胞주위의 pH가 소수도에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 포도당과 에타놀培地에서 배양한

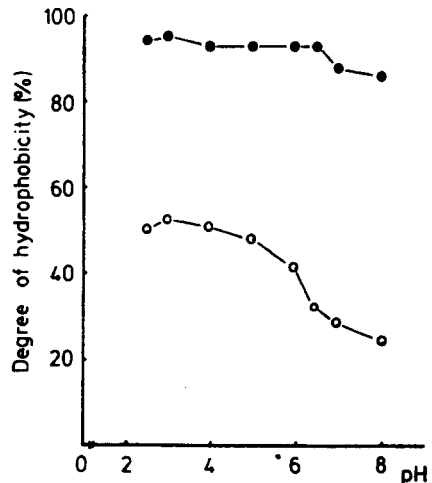


Fig. 2 Change of hydrophobicity with pH surrounding cell

Cells were cultivated at 30°C for 2 and 3 days in the glucose(○-○) and the ethanol(●-●) media, respectively. The hydrophobicity of resultant cells were measured by using the buffer solution with various pH.

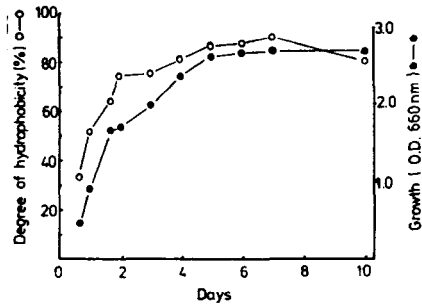


Fig. 3 Change of hydrophobicity with cultural time. Cells were cultivated at 30°C in the glucose medium.

菌體를 대상으로 완충액의 pH를 여러가지로 조정하여 疎水度를 測定하였다. Fig. 2에 나타낸 바와 같이, 疎水度는 pH 3 부근이 가장 높았으며 완충액의 pH가 상승함에 따라 低下되었다. 포도당배지에서 자란 菌體는 에탄올배지에서 자란 균체보다 pH증가에 따른 疎水度의 감소폭이 더욱 뚜렷하였다.

培養期間에 따른 疎水性的 變化

기본배지에서 供試菌을 배양하면서 菌生育과 疎水性과의 關係를 조사하였다(Fig. 3). 그 결과, 菌生育과 더불어 소수성이 증대됨을 나타내었다. 즉, 유도기에는 소수도가 극히 낮았으나 菌수가 급격히 증가하는 대수기에는 소수도도 급격히 증가하여 菌수가 최고에 이르는 正常期에 가장 높은 소수성을 나타내었다(Fig. 3)

考 察

細胞表面의 疎水性的의 크기, 즉 疎水度는 colloid적 정, 전기영동, 이온교환수지吸着등과 같이 表面의 荷電狀態를 측정하는 方法이 알려져 있으나⁽⁹⁾본 실험에서는 Iimura등⁽¹⁰⁾의 方法에 준하여 완충액과 유기용매와의 2相系에 있어서 효모세포가 疎水性的의 유기용매 상으로 移動하는 정도로써 判定하였다. 本 實驗의 소수도測定時 有機溶媒로 *n*-hexane을 사용한 것은 용매별 移動度가 가장 크기 때문이며(Table 1), 초기 菌체농도를 약 0.5로 조정한 이유는 초기 菌체농도와 진탕후의 菌체농도와의 관계(Fig. 1)를 고려한 때문이다. 産膜과 疎水度에 미치는 界面活性劑의 영향을 보면(Table 2), 양이온계 및 음이온계 계면활성제 添加로 菌生育이 완전 억제된 것은 계면활성제 自體의 소독作用 때문이며⁽¹⁵⁾, 비이온계 계면활성제 첨가에 의해 菌生育은 가능하지만 表面에 皮膜이 전혀 형성안

된 理由는 효모세포를 배지표면에 떠 있게 하는 保持因子가 부족하기 때문이라 생각된다⁽¹⁰⁾. 또한 비이온계 계면활성제 첨가로 무첨가에 비해 세포표면의 疎水度가 크게 減少하는 것으로 미루어 그 保持因子는 바로 酵母세포표면의 疎水性일 가능성이 크다. 계면활성제 무첨가에 있어서는 세포표면의 소수도가 크기 때문에 배지표면에서 증식한 세포는 그대로 배지표면에 保持되어 皮膜을 형성하게 되고 그 위에 다시 菌의 好氣的 증식이 일어남으로써 두꺼운 皮膜을 表面에 형성하게 되는 것으로 볼 수 있다. 이러한 結果는 효모의 皮膜形式能이 세포표면의 保持因子인 疎水性和 같은 關係가 있음을 시사한다. 효모세포의 소수도와 산막의 정도는 菌株別로 큰 차이가 인정되었는데(Table 3), 非産膜性효모는 배지表面에 保持할 수 있을 정도의 충분한 疎水度를 가지고 있지 않으므로 皮膜形式이 어려운 것으로 생각되며 産膜性효모는 표면에 皮막을 형성시킬 수 있는 충분한 保持力, 즉 강한 疎水성을 지닌 것으로 보인다. 세포표면의 소수도가 높은 효모일수록 산막능이 큰 것으로 보아 산막능은 표면의 소수도와 같은 關係가 있음을 알 수 있다. 培地の 炭素源을 에탄올로 代替하면(Table 4), 에탄올 資化에 수반되는 호흡작용에 의해 증식이 활발해짐과 동시에 세포표면의 疎水度도 상승하여 세포표면에서의 保持가 용이하므로 産膜에 有利한 條件이 갖추어 진다고 볼 수 있다.⁽¹⁰⁾ 배지의 초기pH(Table 5)나 소수도 측정시 완충액의 pH(Fig. 2)가 상승함에 따라 소수성은 차츰 減少되며 따라서 産膜能도 비례하여 감소되었다. 이는 pH에 의해 細胞表面의 荷電狀態가 달라짐을 나타내는 것으로써 pH상승으로 인하여 세포표면에 음전하가 증가하기 때문인 것으로 推定된다.⁽¹⁰⁾ 菌生育과 소수도의 관계에서(Fig. 3) 세포표면의 소수도는 菌生育과 더불어 크게 증가되었다. 그 理由는 포도당 資化와 함께 호흡작용도 상승하여 소수성이 점차적으로 증가하기 때문인 것으로 보인다.⁽¹⁰⁾ 결론적으로 배지표면의 皮膜形成은 중요한 保持因子의 하나인 疎水性때문임이 확인되었으며 疎水性的의 크기는 酵母의 종류, 탄소원, pH, 배양기간에 따라 크게 달라지는 것으로 나타났다. 한편, 세포表面의 疎水性的의 原因物質이 지방산으로 알려지고 있는 바,^(11,12) 이 문제에 대해서도 본 공시균을 이용한 연구가 앞으로 이루어져야 할 것이다.

要 約

저장사과주에서 分離·同定한 産膜酵母 *Hansenula beijerinckii* FY-5의 疎水性和 皮膜形成과의 關係를

조사하였다. 非이온系 界面活性劑 첨가에 의해 菌生育은 可能하지만 皮膜이 전혀 形成되지 않으며 疎水度도 크게 낮아지는 사실로 미루어 볼때, 皮膜形成에는 酵母細胞를 배지表面에 保持시키는 어떤 因子가 요구되며 그 因子가 바로 酵母細胞表面의 疎水性이 아닌가 생각된다. 産膜性酵母에 있어서는 疎水度가 클수록 皮膜形成이 왕성하였으나 非産膜性酵母는 대체로 疎水度가 낮았다. 탄소원이 에타놀일때 疎水度가 높았으며 pH의 상승에 따라 疎水度는 減少하는 경향이였다. 배양기간별로는 菌生育과 더불어 疎水度도 비례적으로 증가하여 正常期에 최대치를 보였다.

文 獻

1. Castor, J.G.B. and Archer, T.E. : *Appl. Microbiol.*, 5, 56 (1957)
2. 横塚 勇 : 日本醸造協會誌., 58, 82 (1963)
3. Freiberg, K.J. and Cruess, W.V. : *Appl. Microbiol.*, 3, 208 (1955)
4. 後藤昭二 : 日本醸酵工學雜誌., 37, 412 (1959)
5. 後藤昭二 : 日本醸酵工學雜誌., 39, 709 (1961)
6. 横塚 勇, 後藤昭二, 山川祥秀 : 日本醸造協會誌., 58, 1221 (1963)
7. 嶋谷幸雄 : 日本醸酵工學雜誌., 46, 885 (1968)
8. 今原廣次, 岩井正憲, 中浜敏雄 : 日本醸酵工學雜誌., 49, 8 (1971)
9. 大塚謙一, 飯村穰, 戸塚昭, 木崎康造, 袖山政一 : 日本醸酵工學雜誌., 56, 265 (1978)
10. Iimura, Y., Hara, S. and Otsuka, K. : *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1215 (1980)
11. Iimura, Y., Hara, S. and Otsuka, K. : *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1223 (1980)
12. Iimura, Y., Hara, S. and Otsuka, K. : *Agric. Biol. Chem.*, 45, 1113 (1981)
13. 鄭基澤, 宋亨翼 : 慶北大農學誌., 1, 159 (1983)
14. 鄭基澤, 宋亨翼 : 慶北大農學誌., 2, 24 (1984)
15. 古田幸子, 河合芳子 : 日本纖維消費誌., 15, 460 (1974)

1985년 3월 16일 접수