

## Ethanol 내성 효모 *Saccharomyces cerevisiae* SE211의 분리 및 특성

서민재 · 유상렬<sup>1\*</sup>

(주)두산 R&D Center, <sup>1</sup>서울대학교 식품공학과

**Screening and Characteristics of Ethanol Tolerant Strain *Saccharomyces cerevisiae* SE211.** Seo, Min Jae and Sangryeol Ryu<sup>1\*</sup>. Doosan R & D Center, <sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Seoul National University - To produce the modified Cheongju that has high ethanol content, an ethanol-tolerant strain *Saccharomyces cerevisiae* SE211 was screened from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 10 strain. The isolate showed faster growth than in the medium containing 10% ethanol compared with original strain. The isolate produced a higher concentration of ethanol and showed higher resistance to ethanol, high osmolarity and heat than the original strain. The analyses of yeast membrane components indicated that there were no significant changes in composition of sterols and phospholipids between the isolated and the original strain. However, during the fermentation, the isolated strain could change the fatty acid composition in the membrane more rapidly in the direction of decreasing membrane unsaturation and accumulate more trehalose in the cell than the original strain. These data suggest that the ability to change its membrane fatty acid composition and to accumulate trehalose may make the isolated strain easily adapt to changes in external condition.

**Key words:** Cheongju, ethanol-tolerant, *Saccharomyces*, trehalose

과거로부터 청주의 제조에는 ethanol 내성이 강한 청주 효모를 사용하여 고농도의 ethanol 생산이 가능하였다. 이와 같이 20%(v/v)의 고농도 ethanol 생성이 가능한 것은 청주 발효 시스템 내의 발효온도, 영양원, 고형분, 적당한 속도의 당화로 인한 기질의 공급 등의 여러 가지 환경 또한 그 환경에 적합하게 육종된 ethanol 내성, 내삼투압성 효모의 사용으로 가능하게 되었다.

예로부터 ethanol 내성이 높은 효모를 분리하여 발효에 사용하기 위한 많은 연구가 진행되어 왔다. Ethanol 발효 말기의 고농도 ethanol에서 생존이 가능하며, 계속적으로 발효를 할 수 있는 균주를 선발하기 위해 고농도 ethanol에서 생존이 가능한 균주를 분리하는 방법[28], 내열성 효모, 내삼투압성 효모가 ethanol에도 내성을 갖고 있을 것을 생각하여 KCl에서 내성을 갖는 효모를 분리하는 방법[16,24], ethanol에 비해 보다 긴 carbon chain을 갖는 isoamyl alcohol(3-Methyl-1-butanol)이 효모에 대한 저해효과가 큰 것에 착안하여 isoamyl alcohol에 내성을 갖는 효모를 분리하는 방법[1], phenyl ethanol을 이용하는 방법[29], ethanol내성이 세포막뿐만 아니라 세포벽의 조성과도 관련이 있는 것에 착안하여 K1 killer factor에 대해 내성을 보이는 효모를 분리하는 방법[18] 등이 사용되어 왔다.

청주 발효시 효모의 생육에 저해를 보이는 인자들은 여러 가지가 있으나 그중 가장 대표적인 것이 ethanol이다. Ethanol에 의한 생육저해에 대하여 효모는 여러 가지 성질을 변화시키며 외부환경에 적응한다[14]. 특히 효모는 세포막의 지방산, sterol, phospholipid와 같은 지방성분의 조성을 바꾸어 세포막의 유동성을 변화시키게 된다[14,30]. 이와 같은 지방성분의 변화 중 가장 많이 연구되어 왔던 것이 지방산조성 변화이며, 이러한 변화가 효모의 ethanol stress에 적응하는 기작이라고 알려져 왔다[2,10,15]. 또한 효모의 sterol 중 대표적인 성분인 ergosterol의 양, 비율 등이 세포막의 경도를 증가시키기도 하며[4,5,19], 세포막의 인지질 조성 변화에 따라 세포막의 경도가 변화한다고 알려졌다.

기존의 청주제조방법으로 청주를 제조할 경우에는 청주용 효모를 사용하여도 발효속도 저하 등의 문제가 발생하지 않으나 당화액을 미리 제조하는 방식의 단행발효 방법을 사용할 경우에는 ethanol내성이 더욱 강한 효모가 요구되어 진다. 따라서 본 연구에서는 청주효모로부터 ethanol내성 효모를 분리하고, 분리된 효모의 여러 가지 자극에 대한 내성 및 세포내 성분들의 차이를 파악함으로써 청주제조시 고농도 ethanol 생산을 가능하도록 하는 기초자료를 얻고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배양

실험에 사용된 균주는 일본양조협회 청주 양조용 균주 *Saccharomyces cerevisiae* 10호(K-10) 효모와 내당성, ethanol

\*Corresponding author  
Tel. 031-290-2584, Fax. 031-293-4789  
E-mail: sangryu@snu.ac.kr

내성 균주 *Saccharomyces cerevisiae* TY를 사용하였다. 선발 균주의 여러 가지 외부자극에 대한 저항성을 알아보기 위하여 균주의 배양에 사용된 전배양 배지로는 YPD배지 (yeast extract 1%, glucose 2%, peptone 2%)를 사용하였으며, 25°C, 2일간 정치배양한 후, 4,000 g, 10분 동안 원심 분리하여 균을 회수한 후 증류수로 2회 세척하여 사용하였다.

발효 실험에 사용된 당액의 제조는 *Aspergillus shirousamii*를 배양한 koji 187 g, 팽화미분 1,062 g, 물 3,750 g을 온도조절이 가능한 5L 크기의 당화용기에 45°C에서 30분 동안 처리하고, 온도를 52°C로 올려 정제  $\alpha$ -amylase (Fungamyl, Novo Co.)를 0.5%(w/v)의 농도로 첨가하고 1.5시간 처리 후, 63°C로 올려 정제 glucoamylase (AMG E, Novo Co.)를 0.5%(w/v)의 농도로 첨가하고 5시간 동안 당화를 실시하였다. 당화가 종료된 당화액의 당농도 조절을 위해서는 분말 포도당을 첨가하여 당액의 당농도를 조절하였다. 당액을 5,100 g로 원심분리 (RC-5C, Sorvall, U.S.A.)한 후 무균처리된 3  $\mu$ m의 microfilter로 여과한 당액에 효모를 접종하여 발효를 하였다.

#### Ethanol내성 균주의 선발

Ethanol에 대하여 내성이 높은 균주를 선발하기 위하여 배양된 대수기의 효모를 20%(v/v) ethanol buffer solution (glucose 1%, 0.1M acetate buffer, pH 4.2) 5 ml에  $1 \times 10^8$  cells/ml의 농도로 접종하였다. 이와 같이 효모가 포함된 acetate buffer를 15°C에서 7일간 정치시키며 효모의 자가분해를 유도한 후, 배양액을 적당히 희석하여 YPD plate에 접종하고 25°C, 3일 배양 후 사멸되지 않고 생성된 colony를 분리하였다. 각 plate당 2 colony씩 분리하여 5~7회 반복 조작하여 최종적으로 생존율이 높으며, ethanol내성이 유지되는 균주를 ethanol내성 균주로 분리하였다[28].

#### Ethanol 함유 배지에서의 생육 및 발효력 측정

각 효모의 ethanol함유 배지에서의 생육정도를 측정하기 위하여 ethanol이 각각 8, 10, 12, 14%(v/v)의 농도로 함유된 YPD배지 10 ml에 초기균수  $1 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 접종한 후 15°C에서 정치 배양하였다. 7일째에 균을 분리, 세척 후 660nm에서 흡광도를 측정하여 균의 생육정도를 파악하였다[28]. 전배양된 대수기의 효모를 원심분리, 세척하여 YPD (glucose 25%)에 초기균수  $5 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 접종하고 15°C에서 정치 배양하며 3일 간격으로 ethanol 농도, glucose 농도를 측정하였다.

#### Ethanol 용액에서의 안정성

전배양 배지로부터 대수기의 효모를 회수한 후  $2 \times 10^8$  cells/ml 농도의 효모를 2회 세척하여 16.4 ml의 멸균증류수에 다시 녹였다. 여기에 3.6 ml의 absolute ethanol을 첨가하고 50 rpm, 30°C의 진탕항온수조에서 처리하였다. 초기시료

는 고체배지에 적당한 농도로 도달한 후, 1시간 단위로 4시간까지 시료를 채취하여 적당히 희석한 후 YPD agar 배지에 도달하고(2반복), 48~72시간 배양후 생존한 colony 수를 처리하지 않은 초기 세포수와 비교하여 생존율을 계산하였다[5].

#### 삼투압내성, 내열성의 측정

전배양 배지로부터 대수기의 효모를 회수하여, 0.1 M phosphate buffer(pH 5.4)로 1회 세척 후 동수의 균주를 3 M NaCl이 포함된 yeast nitrogen base에 재현탁시킨 후 20°C에서 정치하며 매 8시간마다 시료를 채취하여 적당한 농도로 희석, 도달한 균주를 20°C에서 3일 배양시킨 후 생육한 균수를 비교하였다[20]. 대수기의 효모를 회수하여, 멸균증류수로 2회 세척하여 효모를 마개가 달린 시험관에 넣고 50°C 항온수조에서 정치하며 매 3분마다 시료를 채취하여 적당한 농도로 희석한 후 YPD agar에 도달하고 20°C에서 3일 배양시킨 후 생육한 균수를 초기 균주의 수로 나누어 생존율을 계산하였다.

#### 지방산, sterol 조성비의 분석

발효액에서 회수한 효모로부터 지질을 분리하여 methylation후 gas chromatography에 의해 지방산 조성을 분석하였다. GC는 Hewlett Packard 5890 II형을 사용하였다. 컬럼은 Supelcowax 10(0.25  $\mu$ m  $\times$  0.25 mm  $\times$  30 m)를 사용하였으며 검출기는 flame ionization detector를 사용하였다. 주입구의 온도는 250°C, 검출기의 온도는 260°C로 조정하였고 carrier gas로는 He를 사용하였다. Sterol 성분들의 조성비 분석에는 분리된 지질을 BSTFA(Bis trimethylsilyl trifluoroacetamide)로 유도체를 만들어 gas chromatography와 gas chromatography-mass selective detector(GC-MSD)에 의하여 분석하였다. 기기는 Shimadzu 17A GC와 Shimadzu QP-5000가 연결되어 있는 것을 사용하였다. 컬럼은 HP-5(0.25  $\mu$ m  $\times$  0.25mm  $\times$  30m)를 사용하였으며 컬럼의 온도는 250°C에서 3분간 유지시킨 후 10°C/min의 속도로 300°C까지 승온 시켰다. Carrier gas는 He를 사용하였고 유량은 1.0 ml/min으로 조정하였다.

#### 인지질 조성의 분석

효모세포로부터 추출된 지질의 분석에는 HPLC법을 사용하였다. 컬럼은 Hypersil silica(200  $\times$  4.6mm, Hewlett Packard)를 사용하였고, 검출기는 evaporative light scattering detector를 이용하였다[23].

#### 균체내의 trehalose 분석

건물량으로 100 mg에 해당하는 효모를 회수하여 4°C의 증류수로 2회 세척 후 pellet을 5 ml screw-capped test tube로 옮겨 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>이 포함된 0.2 M acetate buffer 1 ml와 0.5 mm 구경의 glass bead 1.5 g을 투입하고 30초간

vortex한 후 1분 동안 ice bath에서 식히는 것을 10회 반복 실시하여 세포를 분쇄하였다. 분쇄된 효모 추출물을 5분 동안 끓여 효소를 불활성화 시키고 응고된 단백질 침전물들을 17,000 g, 3분의 조건으로 원심분리하여 침전물을 제거시키고 얻어진 trehalose 추출액을 분석에 사용하였다.

효모추출액 50  $\mu$ l에 15 mM CaCl<sub>2</sub>이 포함된 100  $\mu$ l의 0.2 M sodium acetate buffer(pH 5.5)와 1.67 unit/ml의 trehalase 용액 (Sigma T-8778) 50  $\mu$ l을 투입하고 50°C에서 60분간 반응시킨 후 PGO enzyme kit(영동제약)를 사용하여 포도당 량을 측정하고, 함께 반응시킨 trehalose 표준용액을 이용하여 표준 검량선을 작성하여 trehalose량을 측정하였다[17,21].

실험군과 대조군 간 trehalose 분석치는 SAS(Statistical Analysis System) PC package를 사용하여 t-test에 의해 p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

### 결과 및 고찰

#### Ethanol내성균주의 screening 및 ethanol 용액에서의 생육

K-10균주를 20%(v/v)의 ethanol이 포함되어 있는 acetate buffer에 7일 정치 후 생존한 균주를 다시 접종하는 방법으로 5반복 실시 후 균의 생존율은 원균주의 생존율에 비해 10<sup>6</sup>배 증가하였다. ethanol내성이 가장 강한 선발균주의 경우 ethanol buffer에서 5회 반복처리 후에는 효모를 ethanol buffer에서 반복 처리하여도 더 이상 생존율이 증가하지는

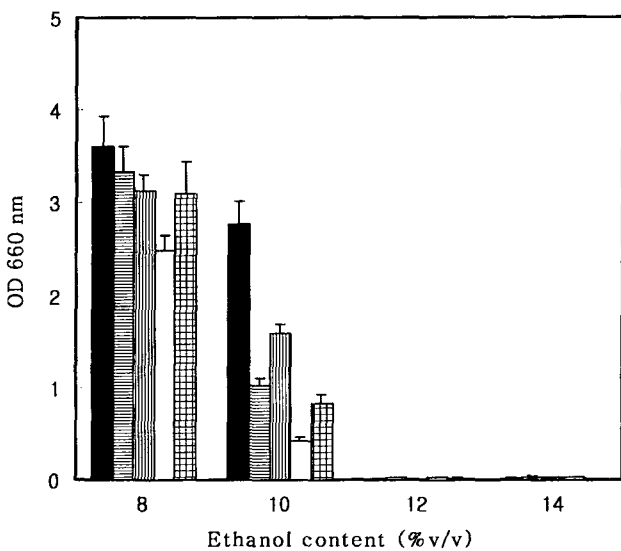


Fig. 1. Growth of ethanol-resistant strains in YPD broth containing different amount of ethanol. Cells were cultured in YPD medium for 2 days, harvested, washed with sterilized water, and inoculated to YPD broth containing 8, 10, 12, 14% (v/v) ethanol as described in Materials and Methods. Inoculum size was  $1 \times 10^5$  cells/ml. Absorbance at 660nm was measured after 7 days incubation at 15°C. ■, SE211; ▤, SE121; ▥, SE122; □, TY24; ▧, K-10.

않았다. 이와 같은 방법으로 SE211, SE121, SE122 등 3종의 균주를 분리하였으며, TY 균주로부터 ethanol내성이 향상된 균주 TY24 균주를 분리하였다.

선발된 균주를 다시 각 농도의 ethanol이 포함되어 있는 YPD broth에서 7일 배양 후 생육정도를 비교하였다(Fig. 1). 선발균주 SE211이 8, 10%(v/v) ethanol 농도에서 가장 생육이 좋았으며, 원균주인 K-10균주는 8%(v/v) ethanol 농도에서는 생육이 잘되었으나 10%(v/v) ethanol에서는 균의 생육이 낮았다. 또 다른 선발균주 SE121도 ethanol 농도가 10%(v/v)로 높아지면서 균의 성장률이 현저히 떨어졌으나, K-10 균주에 비해서는 8, 10%(v/v) ethanol농도 모두에서 우세하게 나타났다. 또한 TY에서 분리한 균주 TY24균주는 8, 10%(v/v) ethanol농도 모두에서 생육이 가장 낮은 것으로 확인되었다.

#### 발효력의 측정

선발된 균주 4종을 25%(w/v)의 포도당이 포함되어 있는 YPD broth에 초기균수  $5 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 접종 후 발효온도는 15°C에서 정치배양을 하며 발효력을 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 분리균주 SE121, 분리균주 SE122, 분리균주 TY24는 전체 환원당 중 80%의 환원당이 소모되는 기간이 30일 이상이었으나 분리균주 SE211은 발효 25일 만에 전체 환원당 중 87.6%가 소모되고 3.1%(w/v)의 환원당만이 남아 상대적으로 빠른 발효 속도를 보인 것을 확인할 수 있었다.

#### Ethanol내성의 측정

선발균주 2종 SE211, SE122와 원균주 K-10의 고농도 ethanol에서의 생존율을 확인하기 위해 18.0%(v/v)의 ethanol

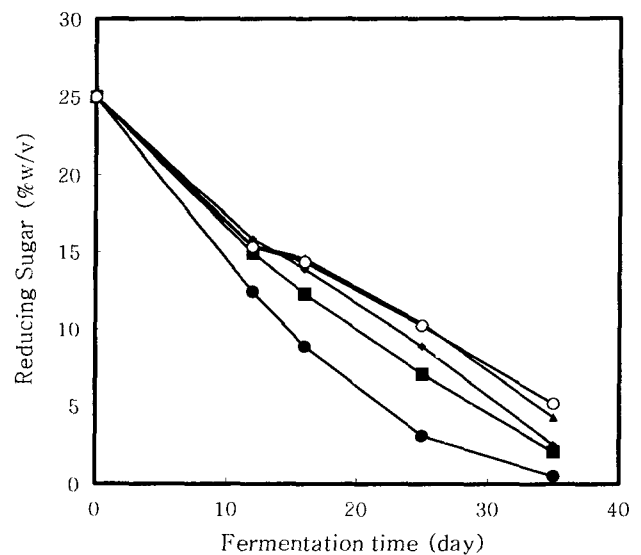


Fig. 2. Fermentation rates of the ethanol-resistant isolates of yeast. ●, SE211; ◆, SE121; ■, SE122; ▲, TY24; ○, K-10

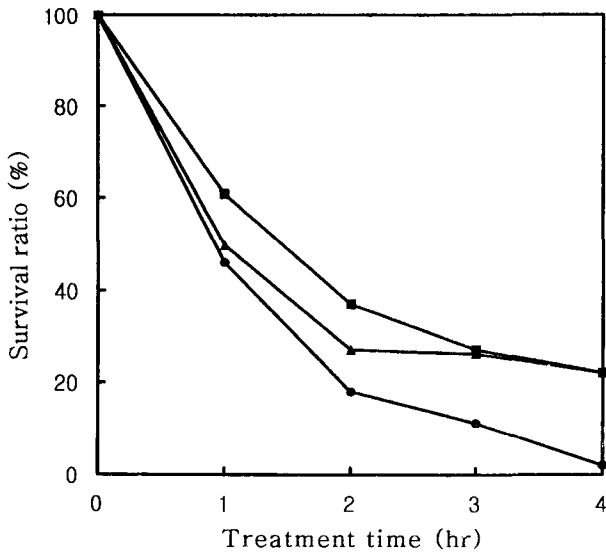


Fig. 3. Cell viability of ethanol-resistant isolates of yeast after treatment with high concentration of ethanol. ●, K-10; ■, SE211; ▲, SE122.

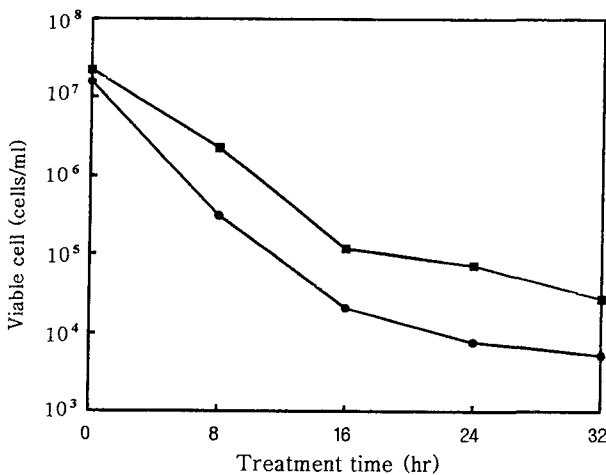


Fig. 4. Cell viability of *Saccharomyces cerevisiae* K-10 and SE211 in yeast nitrogen base medium containing 3 M NaCl. ●, K-10; ■, SE211.

용액에서 50 rpm의 속도로 교반하며 4시간 동안 생존율 감소 정도를 측정하여 Fig. 3에 나타내었다.

SE211 균주는 1시간이 지나면서 생존율 차이를 보였으며, 4시간 후에는 원균주 K-10에 비해 20% 정도의 생존율 차이를 보였다. SE122 균주는 초기에는 생존율의 감소가 빨랐으나 시간이 지나면서 감소 폭이 줄어드는 경향을 보였다. SE122균주 또한 원균주에 비해 내성이 있는 균주로 판정되었다.

SE211 균주는 수 세대를 지나면서도 ethanol내성을 잃지 않고 높은 발효력을 보이는 특징을 유지하였으며, 청주 제조에 적용 시에도 고유의 특징을 보이는 것을 확인할 수 있었다[23].

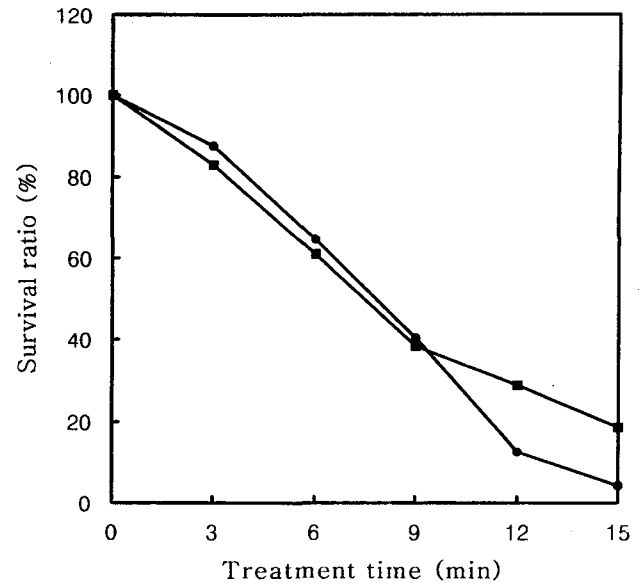


Fig. 5. Thermotolerances of *Saccharomyces cerevisiae* K-10 and SE211 at 50°C. ●, K-10; ■, SE211.

### 삼투압내성, 내열성

최근의 연구에 따르면 ethanol내성 효모세포는 약한 자극에 대하여 여러 가지 내성반응(온도, 삼투압) 등을 함께 나타내는 것으로 알려져 있다[20,22,25]. 이러한 현상은 cross-protection이라고 불리는 현상으로 약한 stress조건에서 stress-response gene이 발현되어 여러 가지 내성이 동시에 나타나는 것을 의미한다[20]. SE211 균주의 경우는 원균주인 K-10 균주에 비해 ethanol이라는 stress에 대하여 내성이 강하게 나타났으므로 다른 stress에의 내성도 강할 것으로 예측되었다. 이를 확인하기 위해 삼투압내성, 내열성을 측정하였다.

삼투압에 대한 내성 차이를 측정된 결과 Fig. 4와 같이 8시간째부터 균수가 차이가 났으며 32시간 후에는 SE211 균주가 K-10 균주에 비해 10배 정도의 균수차이를 보이며 삼투압에 대한 내성을 나타내었다.

두 균주의 내열성의 차이는 Fig. 5에 나타내었다. 두 균주의 생존율은 초기에는 차이가 없었으나 9분경과 후 SE211 균주에서 생존율이 높게 나타나는 것이 확인되었다. 이러한 현상은 SE211 균주는 K-10 균주에 비해 열에 적응하는 능력이 높은 것으로, 외부 자극에 대하여 heat shock protein 등 물질의 발현력이 높아 외부자극에 대한 적응력이 높은 것으로 생각되었다[22,26].

### Sterol 조성 및 인지질 조성 비교

발효기간 동안 효모균체 내의 sterol 조성 중 lanosterol의 비율은 10%가량 감소하였으며 ergosterol은 증가하는 경향을 보였으나 두 균주간의 특별한 차이는 없었다(Table 1). 효모의 sterol 중 대표적인 성분인 ergosterol의 양, 비율 등이 세포막의 경도를 증가시키기도 하며[4,6,8,11,12,19], ethanol

**Table 1. Sterol composition of *Saccharomyces cerevisiae* K-10 and SE211 grown in the saccharifying solution made with koji and gelatinized rice.**

Strain	K-10		SE211	
	4	8	4	8
Ergosterol	53.6	65.6	57.5	64.0
Zymosterol	23.1	23.7	22.4	24.1
Lanosterol	21.4	10.7	20.1	11.9

**Table 2. Phospholipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* K-10 and SE211 grown in the saccharifying solution made with koji and gelatinized rice.**

Strain	K-10		SE211	
	4	8	4	8
Phosphatidylethanolamine	18.2	20.1	17.3	23.1
Phosphatidylinositol	5.5	23.2	7.8	25.0
Phosphatidylcholine	65.2	49.8	66.5	44.8
Phosphatidylserine	11.1	6.9	8.5	6.1

이 세포 내로 유입되는 것에 대응하여 장해물을 형성하는 능력을 부여하므로 세포 성장과 ethanol내성을 촉진하여 준다고 알려져 왔으나[7], 본 실험 결과에서는 고농도 ethanol 생장과 내성에는 유의적인 상관관계를 발견할 수 없었다.

발효기간 중의 세포 내 인지질의 조성변화를 분석하여 Table 2에 나타내었다. SE211 균주의 인지질 중 phosphatidylinositol의 양은 원균주 K-10의 양과 큰 차이가 없었다. 두 균주 모두 발효가 진행될수록 phosphatidylcholine의 양은 감소하고 phosphatidylinositol은 증가하는 경향을 보였으며, phosphatidylserine은 약간 감소하였다. 이와 같은 비율의 변화는 phosphatidylcholine이 소모되며 phosphatidylinositol이 생성되는 것을 보여준다. 세포의 인지질의 head group은 세포 내, 세포 외에 직접 접촉하는 부분으로 전기적인 성질을 가지고 있어 세포의 물질 이동에 직접적으로 관여하며, 서로 강하게 결합하고 있어 세포막의 경도와 직접적인 관련이 있다[7].

#### 세포내 지방산의 분석

세포내의 지방산 조성을 분석하여 Table 3에 나타내었다. 발효초기인 발효 4일째 대수기에서의 세포막 조성을 보면 두 균주 모두 당액 자체의 지방산 조성 유사함을 알 수 있었다. 이것은 발효효모가 성장과정에서 당액 중의 지방산을 흡수하여 세포막의 성분으로 이용하는 것을 나타낸다[3]. 발효 8일째 각 효모의 지방산 조성 변화를 보면 palmitic acid는 큰 차이가 없으며, linoleic acid가 감소하고, palmitoleic acid가 증가하는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 Thomas [27] 등이 palmitoleic acid 첨가에 의해 내성이 증가하였다는 보고와도 일치한다. 또한 두 균주 간의 차이를 보면 SE211 균주가 linoleic acid의 감소속도 및 palmitoleic acid의 생성속도가 K-10 균주보다 빠르다. SE211 균주의

**Table 3. Changes in fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae* K-10 and SE211 grown in the saccharifying solution made with koji and gelatinized rice.**

Strain	K-10		SE211		Saccharifying solution*
	4	8	4	8	
Day	4	8	4	8	
C14:0	1.1	1.0	1.8	1.2	1.4
C16:0	24.4	26.8	29.7	29.7	28.8
C16:1	10.2	22.0	16.2	22.1	0.2
C18:0	6.5	8.6	8.2	8.8	2.0
C18:1	18.5	19.9	22.1	18.9	27.6
C18:2	36.2	20.5	19.1	18.3	38.2
C18:3	3.2	1.2	2.9	1.0	1.4
C20:0	-	-	-	-	0.4

\* Fatty acid composition of the saccharifying solution before inoculation.

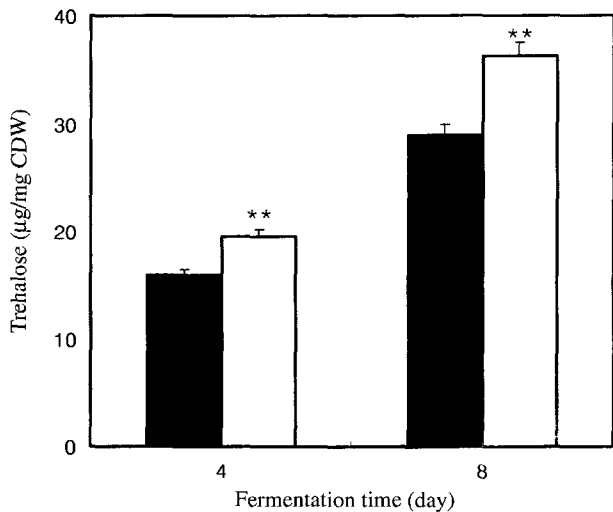
ethanol내성 또는 여러 가지 환경에 적응하는 능력의 차이는 이와 같은 세포막 변화 능력의 차이에 따른 것으로 보인다. 실제로 Chi[6] 등은 ethanol내성이 강한 균일수록 세포막의 조성 등의 변화를 통하여 외부자극에 대하여 적응하는 능력 (adaptive response) 이 높다고 보고하였다.

Jones[9]의 연구에 따르면 막의 변화는 ethanol 발효 시 산소농도가 부족하여 불포화지방산 함량이 떨어짐에 따라 세포막의 유동성이 낮아지므로 유동성을 증가시키는 방향으로 적응해 간다고 보고하였으나, 최근의 Arneborg[4]의 연구에 따르면 ethanol에 의해 세포막의 solubility가 증가되므로 효모는 세포막의 강도를 증가 시키는 쪽으로 진행하여 항상성 (homeostasis)을 유지하는 방향으로 적응해 나간다고 보고하였다.

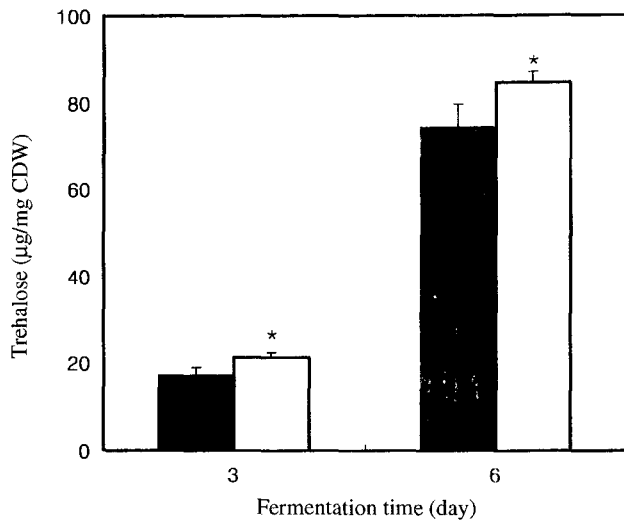
배지에 C18:1, C18:2, C18:3의 지방산을 투여하여 발효를 실시하는 경우 C18:1을 사용하는 것이 ethanol내성을 증진하는 효과가 가장 좋은 것으로 알려져 있다[3,26,30]. 이러한 현상은 liquid-crystalline phase phospholipid vesicles에서 산소의 용해도가 수용액에 비해 4배 높아 세포 내의 산소 구배 (oxygen gradient)가 존재하며, 이러한 세포막에서의 높은 산소농도는 oxygen-derived free radical이 증가하여 세포막 지방에 손상이 일어나게 된다. 이때 세포의 손상은 세포막 지방의 조성 및 지방산의 불포화도에 따라 달라진다. 따라서 혐기적인 상태에서 여러 가지 지방산으로 enrichment 하였을 때 세포막의 손상의 차이는 세포막 지방산의 불포화도가 높은 비율과 상관이 있어, 이중결합이 많은 C18:3을 투여한 경우가 세포막의 손상이 가장 높으며, C18:1을 투여한 경우는 세포막의 손상을 입을 확률이 가장 적게 된다[25].

#### 균체내의 trehalose함량 비교

원균주 K-10과 선발균주 SE211과의 세포내 trehalose량을 측정하여 Fig. 6에 나타내었다. 원료를 당화시킨 후 당화되



**Fig. 6.** Intracellular trehalose content of *Saccharomyces cerevisiae* K-10 and SE211 obtained from the fermentation without unsaccharified residue. ■, K-10; □, SE211. Values are mean±SEM of three separate experiments. \*\* indicates  $P < 0.01$  compared with the value of K-10 by Student's t-test.



**Fig. 7.** Intracellular trehalose content of *Saccharomyces cerevisiae* K-10 and SE211 obtained from the fermentation with unsaccharified residue. ■, K-10; □, SE211. Values are mean ± SEM of three separate experiments. \* indicates  $P < 0.05$  compared with the value of K-10 by Student's t-test.

지 않고 남은 고형분을 제거시킨 20%(w/v) 당액에 두 균주를 접종한 후 4일, 8일에 효모를 회수하여 trehalose를 정량하였다. 효모가 정지기에 도달하기 전인 4일째에 효모를 회수한 경우 SE211균주가 원균주보다 trehalose 함량이 21% 높았다. 또한 효모가 거의 가라앉은 시점인 8일째에서도 SE211 균주의 trehalose 함량이 29% 높았다. 따라서 이러한 두 균주간의 trehalose를 생산하는 능력의 차이가 균주의

ethanol에 대한 저항능력과 관련이 있는 것으로 보인다.

고형분을 분리해 내지 않은 당액에서의 발효 시 두 균주의 trehalose함량을 분석하여 Fig. 7에 나타내었다. 초기 당도 27%(w/v)에서 발효를 시작하였으며, 효모가 대수기에 있는 3일째, 발효가 종료되기 전인 6일째에 효모를 회수하여 trehalose를 분석한 결과 고형분을 제거하지 않은 상태로 배양한 경우 trehalose 함량이 발효 3일째는 고형분이 없이 배양한 것과 큰 차이를 보이지 않았으나, 발효 6일째에는 trehalose 축적량이 급격히 많아지며 4.0~4.4배 증가하였다. 이는 고형분이 없는 상태의 8일째의 trehalose량보다 2배 이상 많은 양이다. 또한 고형분이 포함된 당액에서도 SE211 균주가 K-10 균주보다 발효 3일째 25%, 발효 6일째 13% 높아 trehalose를 많이 생성할 수 있는 능력이 ethanol내성이 높은 이유 중 하나일 것으로 생각되었다.

위의 실험결과와 같이 분리균주 SE211의 trehalose 함량이 원균주의 trehalose 함량보다 높은 것은 Piper[22], Lucero[13] 등의 연구와 같이 trehalose함량이 높은 균주가 ethanol에 대하여 내성이 높다는 실험결과와 일치하는 결과이었다.

## 요 약

고농도의 ethanol을 갖는 청주를 생산하기 위하여 일본양조협회 *Saccharomyces cerevisiae* 10호 균주로부터 ethanol 내성 균주 *Saccharomyces cerevisiae* SE211균주를 분리하였다. 분리 균주는 10%(v/v) ethanol이 포함되어 있는 배지에서의 성장속도가 빨랐으며, 높은 ethanol 농도에서도 생장이 가능하였다. 또한 ethanol내성, 내삼투압성, 내열성 등이 원균주에 비해 우수하였다. 선발균주의 세포막 성분을 분석한 결과 sterol, phospholipid의 함량은 원균주와 차이가 없었으나, 지방산의 조성비는 차이를 보였다. 또한 분리균주는 외부 자극에 대한 저항성을 나타내는 물질로 알려진 세포내 trehalose의 함량이 원균주에 비해 증가하였다. 따라서 선발균주의 ethanol내성 및 ethanol 배지에서의 높은 성장속도는 세포막의 fatty acid 및 세포내 trehalose 함량을 변화시키는 능력이 높은 것에 기인한다고 생각되었다.

## REFERENCES

1. Akita, O., T. Watanabe, T. Hasuo, T. Obata, and S. Hara. 1990. Breeding of highly ethanol-tolerant sake yeasts selected by isoamyl alcohol tolerance. *Hakkokogaku* **68**: 95-100.
2. Alexandre, H., I. Bousseaux, and C. Charpentier. 1994. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol. Lett.* **124**: 17-22.
3. Alterthum, F. and A. H. Rose. 1973. Osmotic lysis of

- sphaeroplasts from *Saccharomyces cerevisiae* grown anaerobically in media containing different unsaturated fatty acid. *J. Gen. Microbiol.* **77**: 371-382.
4. Arneborg, N., C. Hoy, and O. B. Jorgensen. 1995. The Effect of ethanol and specific growth rate on the lipid content and composition of *Saccharomyces cerevisiae* grown anaerobically in a chemostat. *Yeast* **11**: 953-959.
  5. Chi, Z. and N. Arneborg. 1999. Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 1047-1052.
  6. Chi, Z. and N. Arneborg. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance exhibit different adaptive responses to produced ethanol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 75-78.
  7. Chi, Z., S. D. Kohlwein, and F. Pltauf. 1999. Role of phosphatidylinositol (PI) in ethanol production and ethanol tolerance by a high ethanol producing yeast. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 58-63.
  8. Hossack, J. A. and A. H. Rose. 1976. Fragility of plasma membranes in *Saccharomyces cerevisiae* enriched with different sterols. *J. Bacteriol.* **127**: 67-75.
  9. Jones, R. P. and P. F. Greenfield. 1987. Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane. *Yeast* **3**: 223-232.
  10. Koukou, A. I., D. Tsoukatos, and C. Drinas. 1990. Effect of ethanol on the phospholipid and fatty acid content of *Schizosaccharomyces pombe* membranes. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1271-1277.
  11. Larue, F., S. Lafon-Lafourcade, and P. Ribereau-Gayon. 1980. Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 808-811.
  12. Lloyd, D., S. Morrell, H. N. Calsen, H. Degn, P. E. James, and C. C. Rowlands. 1993. Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**: 825-833.
  13. Lucero, P., E. Penalver, E. Moreno, and R. Lagunas. 2000. Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Env. Microbiol.* **66**: 4456-4461.
  14. Mishra, P. and S. Kaur. 1991. Mini-review; Lipids as modulators of ethanol tolerance in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 697-702.
  15. Mishra, P. and R. Prasad. 1988. Role of phospholipid head groups in ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **34**: 3205-3211.
  16. Morimura, S., Z. Y. Ling, and K. Kida. 1997. Ethanol production by repeated-batch fermentation at high temperature in a molasses medium containing a high concentration of total sugar by a thermotolerant flocculating yeast with improved salt-tolerance. *J. Ferment. Bioeng.* **83**: 271-274.
  17. Neves, M. J. 1994. Quantification of trehalose in biological samples with a conidial trehalase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 17-19.
  18. Nitta, A., H. Uchiyama, and T. Imamura. 2000. Breeding of ethanol tolerant sake yeasts from K1 killer-resistant mutants. *Seibutsu-kogaku* **78**: 77-81.
  19. Novotny, C. and F. Karst. 1994. Sterol dependent growth and ethanol tolerance of a sterol-auxotrophic erg9 : HIS3 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **16**: 539-542.
  20. Ogawa, Y., A. Nitta, H. Uchiyama, T. Imamura, H. Shimoi, and K. Ito. 2000. Tolerance mechanism of the ethanol-tolerant mutant of sake yeast. *J. Biosci. Bioeng.* **90**: 313-320.
  21. Peres, M. F. S. and C. Lalue. 1998. Ethanol tolerance of thermotolerant yeasts cultivated on mixtures of sucrose and ethanol. *Ferment. Bioeng.* **85**: 388-397.
  22. Piper, P. W. 1995. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol. Lett.* **134**: 121-127.
  23. Seo, M. J. 2001. Improvement of Sake manufacturing process using gelatinized rice flour and *Saccharomyces cerevisiae* SE211. Ph. D. thesis. Seoul National University.
  24. Sharma, S. C., D. Raj, M. Forouzandeh, and M. P. Bansal. 1996. Salt-induced changes in lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **56**: 189-195.
  25. Steels, E. L., R. P. Learmonth, and K. Watson. 1994. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology* **140**: 569-576.
  26. Swan, T. M. and K. Watson. 1997. Membrane fatty acid composition and membrane fluidity as parameters of stress tolerance in yeast. *Can. J. Microbiol.* **43**: 70-77.
  27. Thomas, D. S., J. A. Hossack, and A. H. Rose. 1978. Plasmamembrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **117**: 239-245.
  28. Watanabe, S., K. Kitamoto, K. Takahasi, and K. Yoshizawa. 1988. Breeding of shochu yeasts having high producibilities of flavor and ethanol at high temperature by protoplast fusion. *J. Brew. Soc. Japan* **83**: 757-763.
  29. Yamashiro, K., H. Nishihara, Y. Tani, and S. Fukui. 1971. Studies on the metabolism of *Saccharomyces sake*. *J. Ferment. Technol.* **49**: 16-23.
  30. Yoshizawa, K., H. K. Ohshima, and T. K. Kakuta. 1996. Effects of alcohol concentration in the medium on fatty acid composition of sake yeast membranes. *J. Brew. Soc. Japan* **91**: 284-289.

(Received Feb. 4, 2002/Accepted Sep. 2, 2002)