

Saccharomyces cerevisiae KNU5377의 NaCl에 대한 적응이 고온내성과 알코올발효에 미치는 영향

백상규 · 윤혜선 · 사금희 · 김일섭 · 이인구¹ · 박희동² · 유춘발³ · 진익렬*
경북대학교 미생물학과, ¹농화학과, ²식품공학과, ³대구대학교 식품공학과

Effect of NaCl Adaptation on the Thermotolerance and Alcohol Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. Paik, Sang-Kyoo, Hae-Sun Yun, Keum-Hee Sa, Il-Sup Kim, In-Koo Rhee¹, Heui-Dong Park², Choon-Bal Yu³, and Ingyol Jin*. Department of Microbiology, School of Life Sciences and Biotechnology, ¹Department of Agricultural Chemistry, ²Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, South Korea, ³Department of Food Science and Technology, Taegu University, Taegu 714-712, South Korea - *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 is a constitutively thermotolerant, fermentative strain at high temperatures over 40°C. The exposure to 0.5 M NaCl caused *S. cerevisiae* KNU5377 to be lost its constitutive thermotolerance. Furthermore, the NaCl adaptation beyond 0.3 M during the overnight culture forced the strain-specific fermentation ability of *S. cerevisiae* KNU5377 to be disappeared. However, these phenomena did not occur in the reference, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC24858. As a result, this adaptation led both strains to show the closely similar thermotolerance level and alcohol fermentation ability, implying the NaCl adaptation eliminated its strain-specific characteristics of *S. cerevisiae* KNU5377. Therefore it indicated that the superior intrinsic characteristics of *S. cerevisiae* KNU5377 must be related to the NaCl adaptation. On the other hand, the heat adaptation elevated alcohol productivity for both strains, but surprisingly did it for KNU5377 at the rate of two times higher than the reference's one; this suggests that KNU5377 possesses more efficient system enough to cause the difference. Consequently, these characteristics of *S. cerevisiae* KNU5377 must be interesting targets for further study to understand on how KNU5377 could acquire the constitutive thermotolerance and the outstanding fermentative capacity at high temperatures.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, NaCl adaptation, thermotolerance, alcohol fermentation

에탄올과 같은 연료용 알코올은 대체에너지원으로서 꾸준히 연구되고 왔고, 또한 일부 실용화되기도 하였다. 이는 자연계에 존재하는 바이오매스(biomass)로부터 완전한 연소효율을 가진 무공해 에너지를 경제적으로 생산할 수 있다는 장점이 있기 때문이다.

효모균주 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용한 에탄올 생산은 30°C와 33°C 사이에서 발효를 하는 것이 전 세계적인 발효현장의 추세이다. 그러나 바이오매스 및 전분에게서 발효기질인 포도당을 얻기 위한 당화과정은 통상 고온에서 이뤄지고 있어서 이 당화액을 발효온도까지 식힌 다음 발효를 시작하고 있다. 그리고 아직도 재래식 발효조를 사용하는 주정발효 현장에서는 한 여름의 경우 발효액의 온도가 높아지는 관계로 정상적인 발효를 행할 수 없을 지경이다. 이와 같은 단점을 보완하기 위하여 발효조의 개선 및 고온 발효가 가능한 발효효모균주의 개발은 알코올발효를 위하여 해결해야 할 가장 시급한 일로서 지적되고 있다.

그중 고온에서도 알코올 발효가 가능한 고온성 알코올발효 효모균주의 개발이 가능하다면 기존 시설을 그대로 사용할 수 있는 등, 기타 여러 가지의 장점이 있어서 특히 주목을 받고 있다. 그런데 일반적으로는 발효온도가 40°C 이상이 될 경우 그 발효율은 급감되는 데, 이를 극복한다면 다음과 같은 여러 가지 장점을 획득할 수 있게 된다. 즉, 발효 온도 조절을 위해 필요한 냉각과정에 소모되는 비용을 절감할 수 있고, 당화와 발효에 필요한 시간을 감소시키며, 또한 타균주의 오염 등을 예방할 수 있다는 것이다[2].

이러한 장점들을 실현시키기 위해서 그 동안 많은 연구자들이 *Kluyveromyces marxinus*와 같은 thermophilic yeast를 이용한 균주개발 혹은 *S. cerevisiae*를 이용한 각종 유전자 조작을 통해 고온발효를 통한 경제적 알코올 생산이 가능한 균주를 개발하고자 하였다. 또한 신기능 균주분리를 통한 적용도 시도하기도 하였다[1-8].

이에 대해서 우리 연구진은 이미 오래전에 *S. cerevisiae* KNU5377(F38-1의 개칭명임)이라는 고온내성과 고온발효능이 이미 획득된 상태의 효모균주를 자연계에서 선별했고[6, 7], 일관된 연구로 그 고온내성과 고온발효능을 가능하게 만드는 *S. cerevisiae* KNU5377(이하 KNU5377로 약칭함)의

*Corresponding author
Tel. +82-53-950-5377, Fax. +82-53-955-5522
E-mail: jinin@knu.ac.kr

특성인자를 밝히기 위해, 여러 가지 스트레스 인자들을 주입해 이 효모의 생리적 다양성을 유도해 내고, 그 현상들로부터 이 균주의 특성이 존재하는 특정한 부위 혹은 인자에 보다 가까이 접근하고자 했다.

NaCl은 효모균주의 stress response에 대한 연구에서 가장 유명한 스트레스 인자 중 하나이다[13]. 이 NaCl의 독성은 그 이온강도의 효과에 기인하는 것으로서 고농도(0.3~0.5 M 이상)로 존재할 경우, 세포내의 단백질 구조를 안정화시키는 힘들 사이의 hydrophobic electrostatic balance를 혼란시킴으로써 대부분의 효소의 작용에 독성을 나타내게 된다[12, 13]. 이 NaCl에 대한 연구는 가장 광범위하게 연구된 분야로서 NaCl stress하에서의 osmoregulation, amino acid uptake, NaCl tolerance 등을 포함한 NaCl만을 사용한 연구들과 기타 다른 스트레스와의 functional overlap 등도 연구된 바 있다[9, 11, 12, 14]. 고온 스트레스로는 세포내의 거대분자들을 구조적으로 손상시키는 현상을 보이기도 한다. 일반적인 효모는 39~40°C의 조건이 생육한계점이 되고 있고, 43°C 이상에서는 단백질 합성이 저해되어 생육이 불가능한 것으로 알려져 있다[13].

이들 각종 스트레스 인자들을 세포의 사멸을 유도하지 않는 범위내에서 줄 경우, 효모세포는 그 스트레스에 적응(adaptation)하므로써 최적생육조건과는 다른 세포내 상태를 가지게 된다. 이러한 상태에서 고온내성도와 고온발효능의 변화를 통해 우리는 그 균주 특이적인 생리현상에 대한 단서를 찾고자 하며, 이 단서들은 KNU5377이 구성적으로 고온내성과 고온발효능을 가지도록 만드는 그 균주특이적 인자에 대한 연구의 범위를 좁혀주는 데 기여할 것이다.

재료 및 방법

사용한 균주와 배양 조건

Saccharomyces cerevisiae KNU5377은 토양에서 고온내성과 고온발효능을 가진 균주로서 직접 분리한 wild type 균주이며[8], *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858은 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하여 대조균주로서 사용하였다. 두 균주의 배양은 YPD 배지(yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%; w/v)를 사용하여 호기적으로 30°C에서 배양하는 조건으로 하였다. 이들 균주의 생육도는 spectrophotometer(Beckmann co.)를 사용하여 660 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

스트레스 인자에 적응된 세포의 준비

고온 스트레스에 적응한 세포는 위의 배양 조건에서 온도를 30°C, 37°C 및 40°C로 하여 각각 하룻밤(약 15시간) 배양한 것을 사용하였다. NaCl에 적응한 세포는 YPD 배지에 NaCl을 0.5 M 농도로 포함시킨 것을 기준으로 하되, 농도별 조사에서는 0.3 M에서 1.1 M까지 0.2 M 단위로 각각 포함

시켜 이들을 15시간 동안 전배양한 효모균주를 사용하였다. 이하 NaCl이 포함된 YPD 배지는 YPDS로 약칭한다.

발효조건 및 알콜 발효능의 측정

각각의 전배양 조건에서 배양된 세포는 glucose 20%(w/v)와 yeast extract 1%(w/v)를 함유한 배지(이하 GY 배지로 약칭함)에 접종시켜 총 3일간 발효하였다. 발효는 500 ml 용량의 삼각플라스크에 GY 배지 200 ml를 첨가한 상태에서 autoclave(121°C, 15 min)한 후 전배양액 1%(v/v)를 접종하고, 진한 황산이 함유된 meissel's tube를 꽂아 72시간동안 진행되었다. 발효 종료 후 발생한 알콜의 농도측정은 100 ml 발효액을 추출하여 증류한 뒤, 증류수를 더해 최종 100 ml를 만들고, alcohol hydrometer를 사용해서 배지내 알콜 함유율(% , v/v)를 측정하였다. 최종 알콜함량을 보정하기 위해서는 증류액의 온도측정과 함께 Gay Lussac Table을 기준으로 온도에 따른 보정치를 산출하였다[6, 7].

고온내성도의 측정

효모세포의 고온내성도는 각 조건별로 배양한 세포를 48에서 60분간 열처리하여 생존한 균수(colony forming units; CFUs)를 열처리전의 생존균수와 비교하여 백분율로 나타내었다(% survivors). 각 조건별로 배양된 세포들은 각기 1 ml씩 채취되어 0.5 ml씩 microcentrifuge tube에 분주한 뒤, 한 tube는 얼음에 보관하고 나머지 한 tube의 세포는 위의 열처리를 하였다. 이들 열처리 전과 후의 세포들을 그 균수에 따라 10^3 - 10^6 배씩 증류수로 희석하므로써, YPD agar 배지 상에서 100-200개 정도의 colony가 형성될 수 있도록 조절하여 도말하였다. 이후 30°C에서 하룻밤 배양한 뒤 그 생존균수를 헤아려 최종 생존율(% survivors)을 측정하였다.

결과 및 고찰

NaCl adaptation이 생육도와 고온내성에 미치는 영향

NaCl stress는 sorbitol이나 KCl과 비교해 볼 때, 서로가 동일한 농도일 경우 NaCl stress가 보다 더 독성이 강한 것으로 알려져 있다[12,13]. 그래서 YPD배지에서 자라는 효모균주의 경우 NaCl의 존재가 강한 생육저해인자로서 작용하게 된다. 이 실험에서는 YPD 배지에 0.5 M 농도의 NaCl을 첨가하여 효모균주의 생육도와 고온내성도에 미치는 영향을 고온내성이 높은 균주(KNU5377)와 상대적으로 고온내성이 낮은 균주(ATCC 24858)를 서로 비교하므로써 살펴보았다.

Fig. 1에서처럼 0.5 M NaCl이 포함된 배지에서 두 효모균주 *S. cerevisiae* KNU5377과 *S. cerevisiae* ATCC 24858은 서로 유사한 생육도를 보이고 있다. 다만 NaCl이 존재하지 않는 배지에서는 지수성장기의 세포의 OD 값은 4-5 사이에 달했지만, NaCl 포함된 배지에서의 생육도는 약 2-3 정도여서 지수성장기의 증식속도에 저해영향이 있었다고 볼

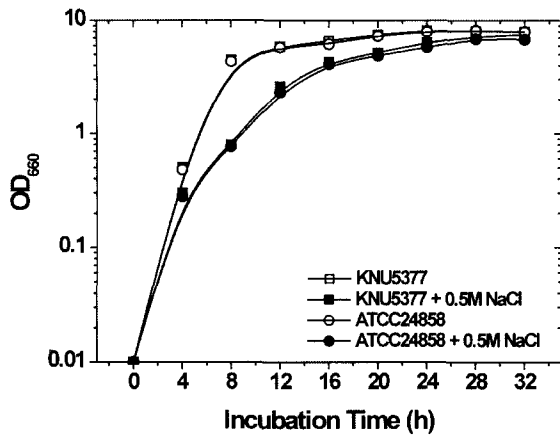


Fig. 1. Growth curves of *S. cerevisiae* KNU5377 and ATCC 24858 in the YPD media containing 0.5 M NaCl. Cells were aerobically grown in the YPD and YPDS media containing 0.5M NaCl for 24 hours at 30°C, and the growth level was determined by optical density at 660 nm.

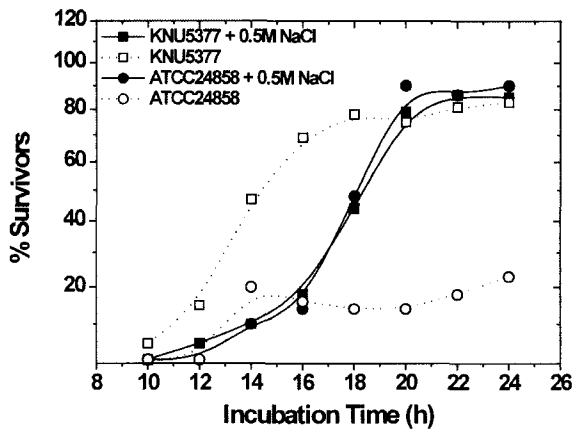


Fig. 2. Thermotolerance variations during NaCl adaptation at a concentration of 0.5 M. Cells aerobically growing at 30°C for 24 hours in YPD and YPDS media were picked up at 2 hour intervals, and spread survived cells onto the YPD agar plate before and after lethal heat treatment of 48°C for 60 minutes. Viability was determined by colony forming units (CFUs), and illustrated in the graph as % survivors. The maximum errors were within the symbol size.

수 있다.

또한 Fig. 2에서 나타낸 고온내성도에의 영향은 두 균주가 서로 다른 영향을 받았음을 나타내고 있다. 즉 YPD 배지에서 자란 두 효모균주의 구성적 고온내성도는 배양시간 16시간대 이후를 기준으로 KNU5377 균주가 약 80%의 생존율, ATCC 24858는 약 20%의 생존율을 보이므로써, KNU5377균주가 약 60% 정도 높은 생존율을 나타내고 있다. 그러나 NaCl이 포함된 YPDS 배지에서 자란 두 균주의 경우 그들의 구성적 내성차이가 사라지고 동일한 내성도 곡선을 보이고 있다. 구체적으로 살펴보면, KNU5377의 경우는 약 18시간 동안의 배양기간 이전에는 특히 많은 내성도

감소를 보이면서도 그 이후 정지기로 접어들면서는 정상배양조건, 즉 YPD 배양조건에서 보이던 구성적 내성도를 회복하고 있다. 반대로 대조균주인 ATCC 24858의 경우엔, 약 15시간 이전의 YPDS 배지에서의 배양기간에는 그 내성도가 YPD 배지에서의 내성도와 유사하지만, 정지기로 접어들수록 그 내성도는 원래의 내성도 20%대에서 약 80%로의 생존율을 증가를 보이고 있다. 다시 말해서, 중기대수기 이전의 KNU5377균주에게는 내성도 감소현상이 발생하고 정지기로 접어들면서 그 감소현상이 회복되었음을 나타내고, ATCC 24858의 경우에는 중기대수기 이전엔 큰 변화를 보이지 않다가 이후 정지기로 접어들면서 내성도의 급증을 가져왔다.

이러한 결과들에서 최소한 이들 두 효모균주에게는 0.5 M NaCl의 존재가 생육도에는 큰 차이를 나타내지 않으나, 고온내성도에는 상당한 영향을 주는 물질임을 알 수가 있다. 특히 대조균주와 비교되는 KNU5377의 이와 같은 현상은 일반 효모균주의 것이 아니라는 반증을 주는 결과이기도 하다. 왜냐하면, 스트레스 반응 즉 세포가 사멸하지 않을 정도의 약한 스트레스인 0.5 M 정도의 NaCl의 존재는 일반적으로 효모세포의 고온내성을 향상시킨다고 보고되고 있기 때문이다[14]. 즉 NaCl stress response와 heat stress response는 서로 기능적으로 중첩되는 부분이 많고, NaCl stress에 의한 고온내성의 증가가 관찰된다는 내용이다.

더불어 서로 이질적이던 두 균주가 동질화되었다는 점에서 이 NaCl에 대한 적응이 KNU5377에서만 존재하는 생리적 특성과 밀접하게 연관되어 있음을 암시하고 있다. 즉 KNU5377 특유의 phenotype 중 하나인 고온내성이 NaCl의 존재로 인해 사라진다는 것은 KNU5377 특유의 고온내성 획득기작이 NaCl stress 자체나 그에 의한 반응과정 중 손상을 입었다는 것을 의미할 수도 있다. 이에 대한 연구가 앞으로 더 진행되어야 할 것이다.

그러나 고온내성을 유도하는 과정이 없이도 구성적 고온내성을 보이는 KNU5377균주의 특성을 균주개발의 대상으로 한다는 점에서, 이러한 결과들은 그 균주특이적 고온내성을 해명하는 중요한 단서가 될 것이다.

NaCl adaptation이 고온발효능에 미치는 영향

고온내성과 더불어 KNU5377 균주의 중요한 특징인 고온발효능에 대한 NaCl의 영향 또한 조사해 보았다. Fig. 3에 나타낸 바와 같이, 고온내성도 측정에서 사용한 0.5 M NaCl의 영향을 살펴본 결과 KNU5377균주의 경우 40°C라는 고온하에서의 높은 알콜생산도가 염이 존재하지 않는 상태에서 8.5%(v/v)정도의 생산량을 보이던 것이 염이 포함된 배지에서 자란 경우 약 6%대의 생산량을 보이고 있다. 즉 최소 2% 정도 감소한 결과이다. 반면, 대조균주인 ATCC 24858균주는 전배양 조건에서의 염의 존재여부와 상관없이 알콜 생산량이 약 6%대를 유지하고 있어 그 발효능의 변화

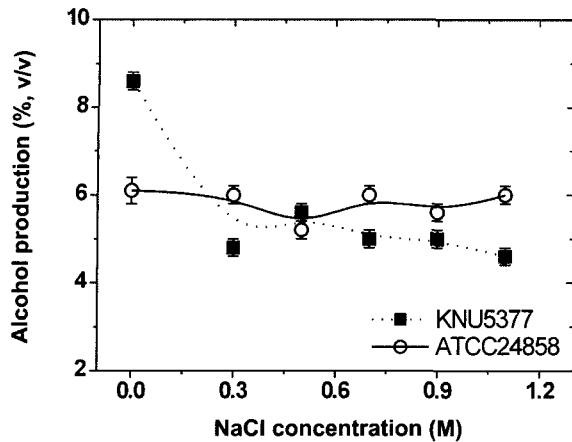


Fig. 3. Alcohol productivity at 40°C of the pre-cultured cells grown in the YPD media containing different NaCl concentrations of 0 to 1.1 M. Cells were pre-cultured at 30°C for overnight. After inoculating the pre-cultures into the fermentation media (1%, v/v), fermentation was carried out for 72 hours at 40°C. Produced alcohol was distilled and then determined as alcohol productivity (% v/v) by using alcohol hydrometer.

가 없다는 것을 알 수 있었다. 0.3 M에서 1.1 M 사이의 여러 농도의 NaCl로 재조사하였을 경우, KNU5377은 0.3 M의 NaCl에 의해서도 0.5 M NaCl에서 전배양된 균주와 비슷한 수준의 발효능 저하 현상이 관찰되었으며, 반면 대조균주는 1.1 M까지 농도를 높여주어도 NaCl에 의한 발효능 저하 현상이 관찰되지 않았다.

특이한 것은 KNU5377의 경우에도 0.3 M에서 보인 발효능 저하 현상이 염농도를 1.1 M까지 높여준 경우에도 더 이상 심화되지 않았다는 점에서 볼 때, NaCl의 배지내 농도와는 상관없이 최소한 0.3 M 이상의 NaCl의 존재 자체가 발효능의 저하를 가져온 원인임을 알 수 있다. 또한 고온내성도의 실험과 유사하게도 두 균주가 비슷한 발효능을 보이므로써, 고온발효능의 차이라는 두 균주의 이질성이 NaCl adaptation 때문에 동질화되었음을 알 수 있었다.

결국 고온발효능에 있어서도 NaCl adaptation은 KNU5377의 특이적 고온발효능과 밀접하게 연관되어 있다고 결론을 내릴 수 있었다. 그러므로 고온내성도의 결과와 결부시켜 생각해 볼 때, 동종의 효모균주간 일지라도 NaCl에 대한 반응이나 NaCl 자체에 의해 영향을 받는 특이적인 시스템 혹은 인자가 KNU5377에만 존재할 가능성이 있으며, 따라서 그 특성은 KNU5377의 구성적인 고온내성과 고온발효능을 해명하고, 더 나아가 그 능력을 더욱 향상시킬 수 있는 중요한 균주개발의 대상인자라고 할 수 있다.

NaCl 및 heat adaptation이 고온발효능에 미치는 영향

Heat adaptation이 효모의 고온발효능에 어떤 영향을 미치고 있는지를 검토하기 위하여 위에서 밝혀진 NaCl의 발효저해현상을 유도한 가운데 heat adaptation의 효과를 살펴보

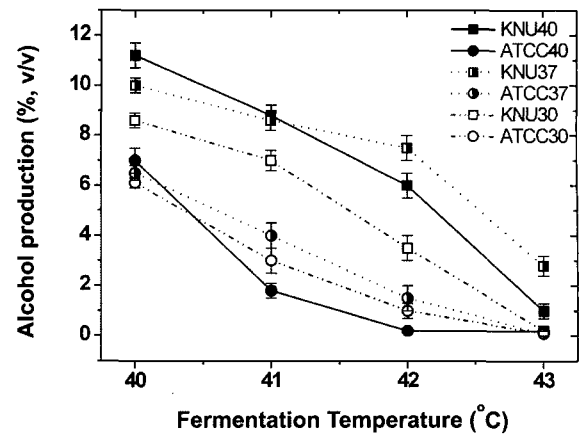


Fig. 4. The effect of pre-culture temperatures on the alcohol productivity at different fermentation temperatures. Cells were pre-cultured in the YPD media at different incubation temperatures including 30, 37 and 40°C. And other experimental conditions are all the same with Fig. 3, except that fermentation temperatures were varied from 40 to 43°C at intervals of 1°C. The legends illustrated in graph are abbreviations of strains and temperatures; e.g. KNU30 denotes *S. cerevisiae* KNU5377 cultured at 30°C.

았다. Fig. 4에서 나타난 바와 같이, 발효온도가 40°C일 경우, 두 균주의 발효능은 전배양 온도가 높아질수록 증가하였다. 특히 KNU5377의 경우 그 증가폭이 대조균주인 ATCC 24858보다 2배 가량 높았다. 이 결과는 전배양의 온도를 높여줌으로써 두 균주 모두 발효능이 향상되었으나, KNU5377이 heat adaptation의 결과로 인해 보다 효과적인 고온발효능을 가졌음을 알 수 있었다.

그리고 발효온도가 41°C일 때, KNU5377은 전배양온도가 높아질수록 발효능이 증가하긴 하였으나, 37°C 전배양과 40°C 전배양의 발효능이 비슷하였다. 이와 반대로 대조균주에선 40°C 전배양의 발효능이 37°C 전배양의 발효능보다 떨어질 뿐만 아니라, 30°C에서 배양된 세포의 발효능보다도 낮았다. 이는 대조균주가 40°C라는 전배양 조건에 의해 이미 열손상을 입었고, 41°C의 발효조건에서 그 손상이 더 심해졌음을 암시하고 있다. 이런 점에서 KNU5377은 40°C 전배양 조건에서도 그 발효능이 상대적으로 크게 손상되지 않는다는 특징이 있음을 알 수 있었다.

42°C에서 발효할 경우에도 41°C의 결과와 유사하나, KNU5377에서도 40°C에서 전배양된 세포가 37°C 전배양 세포보다 낮은 발효능을 가진다는 점이 다르다. 이것은 KNU5377의 경우에도 40°C 전배양 조건에서 대조균주보다는 훨씬 덜했지만 발효능에 손상을 입었음을 반증한다. 그럼에도 불구하고 KNU5377에 있어서는 여전히 37°C나 40°C에서 전배양된 세포가 30°C에서 전배양된 세포보다 고온에서 높은 발효능을 가지고 있으므로, 결국 mild heat stress에 해당하는 37°C, 그리고 고온인 40°C에서의 heat adaptation이 40°C에서 42°C까지의 고온 발효조건에서 보다 우수한 발효능을 갖

게 해준다는 것을 알 수 있었다.

43°C라는 발효조건은 두 효모균주 모두 발효 한계온도로서, 대조균주인 ATCC 24858의 경우 전배양 조건에 상관없이 전혀 발효가 이루어지지 않고 있으며, KNU5377 균주만이 37°C와 40°C 전배양에 의해 각각 3%와 1% 정도의 알코올을 생산할 수 있었다. 즉 KNU5377은 heat adaptation으로 인한 발효능 향상 효과를 대조균주보다 더 크게 받고 있음을 알 수 있었다. 전체적으로 heat adaptation은 두 균주 모두에게 발효능 향상의 결과를 유도한 것으로 밝혀졌으며, KNU5377이 더 큰 효과를 보이고 있다는 점에서 KNU5377 균주의 생리적 특징이 고온발효에 보다 적합한 구성을 가지고 있는 것으로 추측된다.

이러한 heat adaptation의 영향에 NaCl adaptation의 영향을 동시에 주고 40°C에서의 고온발효능을 비교한 것을 Fig. 5에 제시하였다. 여기서는 전배양 온도를 30°C와 40°C 그리고 발효온도를 40°C라는 단 하나의 조건에서 실험하였으며, 위에서 이미 제시된 NaCl과 heat adaptation 각각의 영향이 혼합된 경우의 변화를 살펴보고자 하였다. 그 결과 NaCl에 의해서는 발효능에 영향을 받지 않았고, heat에 의해서는 발효능 향상의 결과를 보였던 대조균주에서는 그 각각의 영향이 그대로 나타나 NaCl에 의해서는 큰 차이를 보이지 않으면서도 heat에 의해서는 발효능이 증가되는 경향을 보였다. 한편 KNU5377의 경우, heat adaptation에 의해 약 2-3%의 알코올생산량이 증가하였고, NaCl에 의해서는 heat에 의한 증가폭이 약 50% 정도 감소한 것으로 나타났다. 따라서 heat과 NaCl 각각의 영향이 그대로 반영된 결과로서 위의 결과들을 재증명하고 있으며, 또한 이 결과들은 두 스트레스 인자간의 상승효과는 존재하지 않고 개별적인 반응으로 발효

능에 영향을 미친다는 것을 보여주고 있다.

이 연구에선 두가지 스트레스 인자, 즉 NaCl 및 heat이 고온내성과 고온발효능이라는 두가지 생리적 현상에 대해 어떠한 영향을 미치는 지에 대해 조사해 보았다. 특히 KNU5377의 고온내성과 고온발효능이라는 장점을 구체적 온도단위와 전배양 조건별로 살펴봄으로써 NaCl은 이 균주의 특징인 고온내성의 획득에 저해영향을 주고 있으며, 또한 고온발효능에도 저해효과를 가진다는 일반적이지 않은 결론을 도출할 수 있었다. 그리고 이 NaCl의 영향과는 반대로 37°C와 같은 mild stress 조건에서의 heat adaptation은 NaCl의 저해효과를 충분히 극복하고 발효능을 향상시킬 수 있음을 알게 되었고, 특이하게도 KNU5377 균주는 일반균주보다 그 효과를 더 크게 받아들일 수 있는 능력이 있음을 보여주었다. 특히 NaCl에 대한 반응이 KNU5377 특유의 고온내성과 고온발효능과 연계가 되어 있다는 점을 알게 되므로써 이 균주의 고온발효능의 원인을 탐색할 수 있는 단서가 잡혔다고 하겠다.

이러한 여러 가지 생리적 특징은 KNU5377 균주가 충분히 고온발효능을 강화할 수 있는 특성을 지닌 균주개발의 모델로서 활용가치가 있음을 나타낼 뿐만 아니라, 이 균주의 특이적인 고온내성의 원인이 NaCl에 대한 대응기작과 관계가 있음을 보여주므로써 고온내성을 획득하는 새로운 방식을 제시할 수 있는 근거가 될 수 있다. 더구나 그러한 고온내성의 특성이 구성적으로 발현된 상태이므로 이미 이 균주는 고온내성과 고온발효능이란 특성이 유전적으로 안정하고 생육과 생존 및 발효등의 효율성이 검증된 상태인 것이다. 따라서 무작위적 혹은 특이적인 돌연변이를 통해 고온발효능을 가진 균주로서 개발하는 일반적인 방식이 아니라, 반대로 이 균주의 구성적 특성에서 유전적 원인까지 규명하는 방식 또한 상당한 연구가치가 있다는 것을 의미하고 있다.

그러므로 앞으로의 연구에서 KNU5377의 고온내성과 고온발효능에 대한 생리적 특성의 파악을 위해 조사한 위의 결과들로부터 그의 고온발효능의 특성이 나타나는 부분을 찾고, 그 연구범위를 점차 줄여감과 동시에, 다양한 구조적, 생리적 조사 및 proteomics, 그리고 genome 차원의 유전체의 변화를 추구함으로써 KNU5377의 고온발효능의 메커니즘을 밝힐 수 있는 가능성이 있다고 생각된다.

요 약

구성적으로 고온내성과 고온발효능을 가지고 있는 *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 균주는 YPD 배지에 0.5 M NaCl을 첨가한 YPDS 배지에서 자란 경우, 일반 YPD에서 성장한 지수성장기 세포에서 약 80%의 생존율을 보이던 고온내성이 20% 생존율을 보이고, 또한 약 8.5% 정도의 알코올 생산량을 보이던 것이 6% 수준으로 감소하여 대조균주와 유사한 고온발효능과 고온내성도를 보였다. 즉

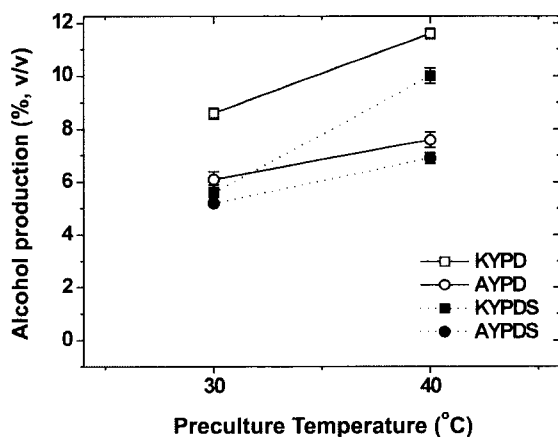


Fig. 5. Combined effect of temperature and NaCl on the alcohol productivity. Cells were pre-cultured in the YPD (open circle and square) or the YPDS media (closed circle and square) at either 30°C or 40°C. After the cultivation at each conditions, the remnant procedures were conducted by the same manner with Fig. 3. K and A, legend in the graph, denote *S. cerevisiae* KNU5377 and ATCC 24858, respectively.; e.g. KYPDS means *S. cerevisiae* KNU5377 grown in YPDS media.

구성적으로 아주 높은 내성도와 발효능을 가진 이 균주가 대조균주와 동질화되는 현상이 발생한 것이다. 이것은 *S. cerevisiae* KNU5377의 고온내성과 고온발효능의 원인이 이 균주 특유의 NaCl adaptation 과정과 밀접한 관계가 있음을 암시하는 것이다. 또한 이 균주의 고온발효능은 heat adaptation에 의해서 그 알코올 생산량의 증가폭 또한 대조균주보다 2배 이상을 보이므로, 이 *S. cerevisiae* KNU5377가 가지는 생리적 특징이 최소한 대조균주에 비해서는 heat adaptation의 효과를 더 크게 볼 수 있는 시스템을 가지고 있음을 알 수 있었다. 이러한 특성들은 그 균주 특이적 현상의 원인을 밝힐 수 있는 중요한 단서로서 활용이 가능하며, 이 균주가 충분히 고온하에서의 알콜 생산 균주가 될 수 있음을 보여주고 있다.

감사의 글

이 연구는 산업자원부의 대체에너지자원개발 연구사업의 지원(1998N-BIO2-P-02)으로 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Banat, I. M. and R. Marchant. 1995. Characterization and potential industrial applications of five novel thermotolerant, fermentative, yeast strains. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 304-306.
- Banat, I. M., P. Nigam, and R. Marchant. 1992. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 259-263.
- Francisca, R., P. Sanz, and J. A. Prieto. 1999. Engineering baker's yeast: room for improvement. *Trends Biotechnol.* **17**: 237-244.
- Kawamura, D. 1999. Breeding of yeast strains able to grow at 42 degrees C. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 560-562.
- Kazunobu, S., Y. Wen, K. Masao, and S. Takuo. 1996. Breeding a fermentative yeast at high temperature using protoplast fusion. *J. Ferm. Bioeng.* **1**: 104-108.
- Kim, J. W., I. N. Jin, and J. H. Seo. 1995. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* F38-1, a thermotolerant yeast for fuel alcohol production at higher temperature. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 617-623.
- Kim, J. W., S. H. Kim, and I. N. Jin. 1995. The fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* F38-1, a thermotolerant yeast isolated for fuel alcohol production at elevated temperature. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 624-631.
- Kiran Sree, N., M. Sridhar, K. Suresh, I. M. Banat, and L. Venkateswar Rao. 2000. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. *Bioresource Technol.* **72**: 43-46.
- Mendoza, I., F. Rubio, A. Rodriguez-Navarro, and J. M. Pardo. 1994. The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**: 8792-8796.
- Murata, K., Y. Fukuda, M. Shimosaka, K. Watanabe, T. Saikusa, and A. Kimura. 1985. Phenotype character of the methylglyoxal resistance gene in *Saccharomyces cerevisiae*: expression in *Escherichia coli* and application to breeding wild-type yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1200-1207.
- Norbeck, J. and A. Blomberg. 1998. Amino acid uptake is strongly affected during exponential growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 0.7 M NaCl medium. *FEMS Microbiol. Lett.* **58**: 121-126.
- Olz, R., K. Larsson, L. Adler, and L. Gustafsson. 1993. Energy flux and osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostats under NaCl stress. *J. Bacteriol.* **175**: 2205-2213.
- Piper, P. W. 1997. The yeast heat shock responses. pp. 75-94. In Hohmann, S. and W. H. Mager (eds.), *Yeast stress responses*, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Trollmo, C., L. Andre, A. Blomberg, and L. Adler. 1988. Physiological overlap between osmotolerance and thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**: 321-326.

(Received Sep. 18, 2002/Accepted Dec. 20, 2002)