

효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 에탄올 스트레스 반응과 에탄올 내성

The Ethanol Stress Response and Ethanol Tolerance of
Saccharomyces cerevisiae

김재호 | 우리술연구센터

Jae-Ho Kim | Korean Alcoholic Beverage Research Center

서 론

효모는 수천 년 동안 알코올음료의 생산과 제빵 용으로 사용되어 왔다. 근래에 들어 효모의 응용 범위는 식품, 화학, 의료 및 생물학적 연구, 생물의 학 및 환경 연구 등을 포함하여 다양해졌다. 그러나 에탄올의 생산은 앞으로도 효모에서 유도된 제일의 생물 공학적 상품으로 남을 것이다. 특히 바이오에탄올의 생산은 재생 연료의 장기적인 공급을 확보하고 온실 가스 배출을 억제하며, 지역의 고용과 새로운 시장을 제공하여 농업 및 국가 에너지 산업에 중요한 공헌을 할 것이다. 비용적인 측면에서 효율적인 에탄올 생산은 탄수화물이 신속하고 높은 수율로 에탄올로 전환되는 것인데 이는 산업 조건하에서 효모의 생존과 성능 개선에 달려 있다.

발효가 진행되는 동안 배양액에서의 에탄올 축적은 상당한 스트레스 요인이 될 수 있다. 비록 *Saccharomyces cerevisiae*가 높은 에탄올 내성을

가졌다 하더라도 상대적으로 높은 에탄올 농도는 세포의 성장과 생존을 억제하며 발효 생산성 및 에탄올 수율을 제한한다. 에탄올 독성이 세포에 미치는 영향과 세포가 에탄올 스트레스에 대응하는 방법에 대한 이해는 에탄올 내성을 개선하기 위하여 필요한 연구이다.

*Saccharomyces cerevisiae*에서 에탄올 스트레스

에탄올은 효모 성장 억제제로 상대적으로 낮은 농도에서는 세포 분열 억제, 세포의 크기 및 성장을 감소를 유도하는 반면, 높은 농도에서는 세포 활력 감소와 세포의 사멸을 일으킨다. 또한 에탄올은 heat shock-like protein의 생산을 유도, RNA와 단백질 축적 비율의 감소, petite mutation의 빈도 향상, 신진 대사의 변경, 세포 내 단백질과 해당효소의 변성 및 활동 저해 등으로 세포 대사와 생합

성에 영향을 미친다. 효모에서 에탄올의 영향을 받는 주요 위치는 세포막, 소수성 및 친수성 단백질, 소포체이다. 세포막 구조와 기능은 에탄올의 주된 표적인 것처럼 보인다. 효모가 에탄올에 노출되면 세포막의 유동성이 증가하고 그 결과 세포막 강도의 감소를 가져온다. 에탄올의 존재로 인한 물의 가용성 감소는 주요 해당효소의 억제와 이들 단백질 변성의 원인이 된다. 효모에서 에탄올의 주요 효과는 Table 1에 요약되어 있다.

그러나 효모는 환경적인 스트레스에서 점점 원심으로 돌아가는 발전을 하였다. 스트레스 조건 하에서의 효모 생존 및 성장은 복잡한 네트워크의 감지, 세포주기에서 신호전달경로의 적응을 이끌고 유전자 발현 프로파일과 세포 신진 대사 활동 조절과 같은 스트레스 반응의 연결을 통하여 얻어졌다.

에탄올 스트레스에 대한 *Saccharomyces cerevisiae*의 반응

효모의 스트레스 반응은 세포활동의 도전적인 조건에서 생존을 보장하고 필수 세포 구성요소를 보호하며 회복하는 동안 정상적인 세포활동을 활성화 시켜주는 일시적인 복구프로그램이다. 환경적인 스트레스에 대한 효모의 반응은 복잡하며 세포의 다양한 측면 감지, 신호 전달, 전사 및 전사 후 제어, 단백질 타겟팅, 방어물질의 축적 그리고 복구 기능의 증가를 포함한다. 주어진 효모에서 이러한 프로세스의 효율은 그것의 강건과 큰 변형, 산업적인 과정에서의 프로세스 능력 등을 결정한다.

에탄올 스트레스와 에탄올 스트레스 방어 메커니즘의 중요성의 이해는 스트레스가 유지되는 동

Table 1. Some effects of ethanol on yeast physiology

Cell function and ethanol influence	Source
Cell viability and growth	
Inhibition of growth, cell division and cell viability	Stanley <i>et al.</i> (1997)
Decrease in cell volume	Birch and Walker(2000)
Metabolism	
Lowered mRNA and protein levels	Chandler <i>et al.</i> (2004), Hu <i>et al.</i> (2007)
Protein denaturation and reduced glycolytic enzyme activity	Hallsworth <i>et al.</i> (1998)
Induction of heat shock proteins and other stress response proteins	Plesset <i>et al.</i> (1982)
Intracellular trehalose accumulation	Lucero <i>et al.</i> (2000)
Cell structure and membrane function	
Altered vacuole morphology	Meaden <i>et al.</i> (1999)
Inhibition of endocytosis	Lucero <i>et al.</i> (2000)
Increased unsaturated/saturated fatty acid ratio in membranes	Alexandre <i>et al.</i> (1994)
Increase in ergosterol, content of membranes	Sajbidor <i>et al.</i> (1995)
Loss of electrochemical gradients and proton-motive force	Petrov and Okorokov(1990)
Inhibition of transport processes	Leao and van Uden(1984)
Inhibition of H ⁺ -ATPase activity	Cartwright <i>et al.</i> (1986)
Increased membrane fluidity	Mishra and Prasad(1989)

안 효모 균주의 에탄올 생성능 향상을 위하여 결정적이다.

에탄올 스트레스에 대한 전사적 반응

한계 수준 이상의 에탄올 스트레스는 열 충격에 의하여 유도되는 것과 유사한 열충격 단백질(HSP)을 유도한다. 에탄올에 노출된 효모 세포는 Hsp104, Hsp82, Hsp70, Hsp26, Hsp30과 Hsp12를 포함한 HSPs(Table 2)를 합성하지만, Hsp104와 Hsp12만이 효모의 에탄올 내성에 생리학적으로 영향을 미친다. Hsp104는 변성된 단백질의 분해 시 리모델링 에이전트로 역할을 하는 반면, Hsp12는 탈수와 에탄올에 대항하는 liposomal membrane integrity를 보호하는 membrane-associated protein이다. HSPs에 관련된 연구 이외에도 특히 *S. cerevisiae*의 에탄올 충격에 대한 전사적 반응과 관련된 transcriptome에 대한 에탄올의 효과를 조사한 연구가 이루어졌다.

최초의 연구는 청주 효모와 에탄올 내성 메커니즘을 알기 위해 얻어진 에탄올 내성 변이주의 유전자 발현을 비교하는 것이다. 다음과 같은 유전자가 에탄올 스트레스 부재 시 변이주에서 높은 발현을 보이는 것이 발견되었다; CIT1(cytosolic catalase T를 암호화, 글리세린 산화 스트레스의 저항에 중요), GPD1(glycerol-3-phosphate dehydrogenase를 암호화; 삼투 스트레스 시 세포 내 삼투압 조절), SPI1(putative cell wall protein을 암호화; stationary phase 동안 유도하는 것으로 알려짐), HSP12(탈수와 에탄올에 대하여 liposomal membrane integrity를 보호하는 membrane-associated HSP를 암호화) 그리고 HOR7(plasma membrane에 존재하는 small type I membrane protein으로 hyperosmolarity responsive gene).

또한 모균주와 비교하였을 때 변이주에서 catalase, glycerol 그리고 trehalose가 더 많이 축적된다는 것과 변이주가 열, 높은 삼투압 그리고 산화 스트레스와 같은 다른 스트레스 요인에 대해서도 더 높은 저항성을 나타냄을 확인하였다. 변이주에서 몇 가지 유전자는 모균주와 비교하여 몇 가지 원인에 의하여 더 높은 발현 수준을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 모균주와 변이주 사이의 전사의 차이는 오직 스트레스의 부재 시 세포 성장에 따라 결정된다. 스트레스 반응 유전자는 변이주에 의하여 구조적으로 발현된다. 에탄올 스트레스 조건은 에탄올 농축을 방해하는 요인에 노출되었을 때 변이주 내에서 6개 유전자의 발현 증가를 확인하는 것에만 사용되었다. 또한 대부분의 연구는 유전자 필터를 분석한 시각적인 관찰보다 변이주 특이적이며, 에탄올에 반응하는 유전자를 보고하는데 치중되어있다.

그 외의 연구는 단시간 동안 치사량의 에탄올에 노출되었을 때 *S. cerevisiae*가 스트레스를 받았을 때와 받지 않았을 때의 transcriptome를 비교한 연구가 이루어졌다. 전반적으로 이러한 유전자 표현 연구 결과에서 에탄올 노출에 의한 다수의 유전자가 중복되어 나타났으며, Table 2에 요약되어진 4개의 유전자 발현에 관한 연구 중 최소한 2개 이상이 에탄올 스트레스 유도에 관한 연구이다.

비록 이러한 연구가 서로 다른 균주와 에탄올의 농도를 사용하였지만 몇 가지 개별 유전자의 표현에 차이가 있었으며 에탄올 스트레스에 영향을 받는 gene ontology(GO) 카테고리는 구분되어 비교되었다. GO 카테고리는 세포 에너지론, 전송 메커니즘, 세포 표면 상호 작용, 지질 대사, 일반적인 스트레스 반응, trehalose 대사, 단백질 destination,

이온 homeostasis와 연관하여 유전자 발현을 높이며 배지에 잉여 포도당이 존재함에도 불구하고 많은 glycolysis 및 TCA cycle과 연관된 유전자의 발현을 증가시킨다. 6탄당 이송과 glycolysis 유전자의 높은 발현은 에탄올 스트레스 동안 세포가 pseudo-starvation 상태를 기억하도록 이끈다. 스트레스 동안 pseudo-starvation의 원인은 밝혀지지 않았으나 에탄올 스트레스를 받은 효모가 intracellular acetaldehyde의 손실로 인해 산화환원반응의 불균형과 NAD⁺의 부족을 야기한 것으로 추측된다; NAD⁺는 NAD⁺ 공급에 의하여 활동에 영향을 받는 해당효소의 cofactor이다.

Alexandre 등과 Chandler 등의 연구는 201과 274 개의 유전자가 각각 에탄올 스트레스 동안 낮게 발

현된다고 보고했다. 이러한 유전자들은 대부분 단백질 합성, RNA 합성과 가공, 아미노산의 대사와 뉴클레오타이드의 대사와 관련되어 있으며 다른 유전자와 GO 카테고리에는 다양한 스트레스에 의하여 생육이 정지되는 부정적인 영향을 받는다. 이러한 세포의 다양한 기능은 에너지 요구와 감소로 에탄올 스트레스를 받은 세포가 에너지로 전환되는 타협에 대한 전체적인 활동이 관찰되어야한다.

Chandler는 에탄올 스트레스인 세포들의 유전자 발현이 에탄올 압박의 나중 단계의 것과 상당히 다르다는 것을 발견했다. 3시간 동안 5%의 에탄올에 노출시킨 후 세포 수는 99% 이상의 생균수를 보였다.

1시간 스트레스에 노출된 후 높은 발현을 보이는 100개의 유전자는 3시간 노출된 후 14개(YRO2,

Table 2. Genes reported as more highly expressed in *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol stress in at least two of the following studies : Ogawa *et al.*(2000), Alexandre *et al.*(2001), Chandler *et al.*(2004) and Fujita *et al.*(2004)

Gene	Description
HSP12, 26, 30, 42, 78, 82, 104	Heat shock proteins(HSP)
CTT1	Cytosolic catalase T, has a role in protection from oxidative damage
DDR2	Multi-stress response protein
SSA4	Member of the HSP70 family
YRO2	Putative protein of unknown function
TDH1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
TSL1	Large subunit of trehalose 6-phosphate synthase
TPS1	Synthase subunit of trehalose-6-phosphate synthase
ALD4	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase
GLK1	Glucokinase, catalyses the phosphorylation of glucose
YGP1	Cell wall-related secretory glycoprotein
HOR7	Protein of unknown function; induced under hyperosmotic stress
PYC1	Pyruvate carboxylase isoform
DAK1	Dihydroxyacetone kinase, required for detoxification of dihydroxyacetone(DHA); involved in stress adaptation
YER053C, YDR516C, YBR139W	Products have unknown function
HXK1	Hexokinase isoenzyme 1, a cytosolic protein that catalyses phosphorylation of glucose during glucose metabolism
PGK1	3-phosphoglycerate kinase, enzyme in glycolysis and gluconeogenesis
SPI1	GPI-anchored cell wall protein involved in weak acid resistance
CYC7	Cytochrome c isoform 2, expressed under hypoxic conditions

ALD4, ARG4, CPS1, LAP4, PCL5, CUP1, DLD3, SSU1, FET3, SNZ1, FIT2, YLR089C, YGL117W)로 줄어들었으며, 이들 중 7개(YRO2, ALD4, ARG4, LAP4, PCL5, SSU1, YGL117W)는 스트레스 초기 반응에서 유도되어진 것이다. 이들 후자의 유전자들은 에너지 이용, 일반적인 스트레스 반응, 액포 기능과 연관이 있다.

Tryptophan 생합성은 *S. cerevisiae*의 에탄올 스트레스 반응과 연관되어져 왔다. Microarray 분석과 2D clustering은 에탄올 스트레스에 의해서 유도된 tryptophan 연관 유전자를 동정하는데 사용되어졌다. 트립토판 생합성 유전자가 과발현된 균주들은 배양배지에 트립토판을 첨가함으로써 5% 에탄올에서 내성이 개선되는 것을 관찰하였다. 비록 다수의 연구에서 에탄올 스트레스 내성의 개선에 있어 트립토판 생합성의 역할에 대해서 명확하게 구명하지는 못하였지만, 에탄올에 의한 막 기능의 붕괴가 세포 내로 아미노산이 전달되는 것에 영향을 미칠 수 있음을 의미한다.

스트레스 내성의 습득

에탄올 스트레스 반응 시 효모에서 일어나는 분자 단위의 활동을 이해하는 것은 중요하다. 스트레스 반응들에 대한 내용들이 개선되어져 정립되어왔기 때문에 에탄올에 더 급속한 적응 결과로 에탄올의 급격한 공격에도 스트레스에 대한 내성이 증가되어졌다. 이것에 대한 증거는 세포가 강한 스트레스적인 환경 속에서도 좀 더 효과적으로 견디는 능력을 갖게 하는 스트레스의 내성을 얻는 것에서 알 수 있다. 스트레스를 유발하는 작용제를 치사량에 가까운 양으로 효모에 사전 노출시키면 사전 노

출 없는 세포와 비교했을 때 일시적인 스트레스의 결과로 적합한 반응을 자극할 수 있다. 먼저 치명적인 스트레스 수준에 내성의 획득은 치사량에 가까운 스트레스에 사전 노출 도중 특정한 스트레스 반응 메커니즘의 활성화에 연결되었다. 열 스트레스의 경우에, 열 저항성의 획득은 효모에서 일시적인 치사량에 가까운 온도에 드러낼 때 37°C~45°C 사이의 범위에서 관찰된다. 사전 열 충격의 크기를 증가시키면 세포의 열 내성뿐만 아니라 더 급속한 반응을 유도한다. 사전 노출 효과는 삼투성, 산화 에탄올 스트레스와 같은 다른 스트레스 조건에서 관찰되었다.

약한 에탄올 스트레스를 가진 효모에 약한 에탄올 스트레스를 주어 전처리한 경우 더 높은 에탄올 농도를 사용한 연속적 스트레스에서 적응 비율이 증가하는 것을 확인하였다. 약한 에탄올로 전처리한 효모를 배지에 접종하였을 때 전처리하지 않은 효모를 접종한 경우보다 더 높은 에탄올 농도의 환경에 노출되었을 때 스트레스에 적응하는 기간이 70%가 줄어들음을 보였다.

이런 분자 단위의 과정을 이해하는 것은 효모의 스트레스 내성을 개선하기 위한 전략을 개발하는데 있어 중요한 부분이다. 명확하게 관련시켜 효모의 에탄올 스트레스 반응 그리고 에탄올 내성은 효모 역할에 대한 에탄올의 전반적인 효과를 다른 양상으로 에탄올 내성을 만성 에탄올 노출 도중 정의하는 상태에서 보일지도 모른다. 내성을 조사하기 위해 널리 이용되는 접근은 에탄올 노출에 따라 변형된 저항을 가진 효모 돌연변이체를 연구하기 위한 것이다.

요약

*Saccharomyces cerevisiae*는 전통적으로 알코올 음료와 bioethanol 생산에 이용되지만, 발효가 진행되는 동안 효모의 에탄올 생성은 에탄올의 축적에 의한 충격으로 세포활성에 손상을 초래한다. 본 연구는 *S. cerevisiae*의 에탄올 스트레스 반응과 에탄올 내성의 분자적 기초에 관해 수행되었으며, 에탄올 스트레스가 진행되는 동안 효모의 에탄올 생성 향상을 위한 유전 공학 전략의 수립에 활용될 수 있다. 이전의 연구들은 유전자 발현에 대한 에탄올 스트레스의 충격이 환경적 영향을 받기 때문에 다양한 균주와 조건들에 관해 이루어졌다. 그러나 에탄올 공격에 의해 영향을 받은 gene ontology 범주에서의 일부 공통점은 *S. cerevisiae*의 에탄올 스트레스 반응이 해당과정 및 미토콘드리아 기능과 관련된 유전자 발현의 증가와 에너지가 요구되는 성장과정과 관련된 유전자의 발현 감소에 따라 에너지 생산에 제약 받음을 의미한다. Genome-wide screens를 이용한 연구는 vacuole function의 유지가 에탄올 내성에 대해 중요함을 암시한다. 아마도 단백질 turnover와 이온 항상성 유지에 이 세

포기관의 역할이 중요하기 때문인 것으로 사료된다. 특히 에탄올 스트레스가 일어날 때 핵 내 Asr1과 Rat8의 축적은 비록 이 가설이 논란이 많은 주제로 남아있지만 *S. cerevisiae*가 에탄올 스트레스에 대한 특별한 반응을 가지고 있음을 의미한다.

● 자료출처 ●

Stanley D, Bandara A, Fraser S, Chambers PJ, Stanley GA, The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*, J Appl Microbiol, 2010 Jan, 11

김재호 이학박사

소 속 : 한국식품연구원 우리술연구센터

전문분야 : 전통주, 발효 미생물 등

E-mail : ricewine@kfri.re.kr

T E L : 031-780-9339