Korean J Food Preserv
18(4), 604-611 (2011)

사단법인 한국식품저장유통학회
The Korean Society of Food Preservation

Identification and Characterization of Wild Yeasts Isolated from Korean Domestic Grape Varieties

Sang-Hoon Choi, Young-Ah Hong, Yoon-Jung Choi and Heui-Dong Park†
Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

국산 포도로부터 분리한 야생효모의 동정 및 특성

최상훈 · 홍영아 · 최윤정 · 박희동†
경북대학교 식품공학부 식품생물공학전공

Abstract

Several wild yeasts were isolated from Korean grape varieties before and during spontaneous fermentation. Among them, four strains were isolated based on the alcohol content and flavor production in wine after fermentation of apple juice. In this study, the four yeast strains were identified and characterized. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of ITS I-5.8S-ITS II region with restriction endonuclease *Hae* Ⅲ and *Hinf* Ⅰ resulted in that all the strains showed a typical pattern of *Saccharomyces cerevisiae*. Pulse field gel electrophoresis showed three different chromosome patterns with a same band between strains SS89 and SS812. When ITS I-5.8S-ITS II sequences of the four strains were compared with one another, they were similar to those of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 4054 type strain. Identity of the sequences was higher than 97% with those of the type strain. Phylogenetic analysis showed based on the sequences showed they were genetically closed to the type strain. The four identified strains were tested in a medium containing 200 ppm potassium metabisulfite, and the MM10 and WW108 inhibition rates resulted at up to 24 h. The four strains were tested at an incubation temperature of 30℃. The 30% sugar concentration in the medium (w/v) showed the highest growth in 36 h, especially in the case of SS89, which was close to growth 40. The four strains were tested in an 8% ethanol medium (v/v). Alcohol tolerance was initially kept in the incubation process. The strains began to adapt, however, to the exceeded resistance. The four strains showed the lowest inhibition rate at 24 h.

Key words : yeast, PCR-RFLP, PFGE, ITS, phylogenetic tree, grape wine

서 론

발효는 오래전부터 자연발생적으로 나타난 미생물 작용의 현상으로서 인류는 미생물의 존재가 밝혀지기 훨씬 이전부터 발효현상을 이용하여 왔다. 문명이 발달하면서 미생물의 존재와 그 기능이 밝혀지게 되고 다양한 미생물을 이용한 다양한 발효식품들이 발달하였다(1). 최근 대부분의 발효는 자연계에서 분리된 미생물들을 배양하여 스타터 형태로 개발된 미생물을 접종하여 행해지고 있다. 이러한 목적으로 많은 종류의 효모가 분리 및 동정되었으며 그 중 일부는 빵이나 술을 만드는 데 이용되고 있다. 여기에 관여하는 대표적인 효모로는 *Saccharomyces cerevisiae*가 있다(2).

일부 효모의 경우 높은 당 농도에 따른 내삼투압성과 알코올 함량에 대한 강한 내알코올성을 가지고 있어 식품에 변패를 일으키기도 한다. 그러나, 대부분의 *S. cerevisiae*에 의한 높은 당 농도에서의 발효는 삼투압 스트레스를 증가시키고 대사의 변화, 균주성장과 발효에 어려움을 나타낸다(3-4). 일부 연구자에 의하여 높은 당 농도의 환경에서 효모 스트레스 유전자들이 발현되면서 반응성을 나타내는 것으로 조사되었다(5-6). 또한, 아이스와인과 같은 높은 당 농도에서의 발효는 휘발성 산도의 증가와 품질이 떨어지는 결과를 초래한다(7). *S. cerevisiae*는 당을 분해하여 알코올과 CO_2를 생산하게 되는데 술의 발효과정 중에 생성된 알코올 역시 효모에게 스트레스를 주게 된다(8). 일부 연구자에

†Corresponding author. E-mail : hpark@knu.ac.kr
Phone : 82-53-950-5774, Fax : 82-53-950-6772

의하면 어떤 *S. cerevisiae* 균주의 경우에는 높은 당 농도와 알코올 등의 여러 스트레스 환경에서 효모의 발효력이 변하거나 영향을 받는다고 하였다(9).

특별한 발효조건에서는 여러 가지 많은 스트레스 요인이 작용할 수 있으므로 적절한 실험을 통하여 각각의 목적에 부합하는 최적의 균주를 선발하여 사용함이 유리하다(10). 나아가 이러한 악조건의 외부적 환경에 잘 견디는 내성을 가진 효모 중 알코올 발효능이 우수한 균주를 선발하여 발효에 이용할 경우 열악한 발효환경 조건에서 적정 수준의 알코올이 생성되어 알코올성 음료를 생산할 수 있음을 역설적으로 설명해 주고 있다. 와인의 발효에 관여하는 다양한 효모 균주들이 개발되어 *S. cerevisiae* Fermivin, W-3, OC_2 등의 균주들이 상업적으로 시판되고 있다. 이들 균주들은 *Vitis vinifera*계에 속하는 유럽종의 포도를 발효하는데 적합한 균주들로 개발되었다. 우리나라의 주 포도품종은 *Vitis labruscana*에 속하는 캠벨얼리로서 그 재배면적이 전체의 약 70%를 차지하고 있다(10). 그러나 현재까지 우리나라 포도에 적합한 와인효모 균주는 산업화되지 못하고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 포도로부터 다양한 효모 균주들을 분리하고 그 중 와인 발효적성이 우수한 균주들을 선별하여 DNA 염기서열 분석과 분자생물학적인 방법을 통하여 동정하였고 발효환경에 대한 내성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

실험균주 및 배양조건

실험에 사용된 균주는 2005년 경북 상주와 영주 일원에서 수확한 캠벨얼리 포도에서 분리한 효모와 경북 영천 일원에서 재배한 MBA (Muscat Bailey A)에서 분리한 효모 그리고 경북 영양군 일월산 일대에서 재배한 머루에서 분리한 효모들 중 다음의 특성을 가진 것들만 선정하여 사용하였다. 분리된 효모는 캠벨얼리 포도과즙에 접종하여 와인 발효를 거친 후 알코올 생성능과 향미가 우수한 균주 MM10, SS89, SS812 그리고 WW108를 선발한 후 실험에 사용하였다. 균의 종배양은 YPD (1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% Dextrose) 배지(11)에 균을 접종한 후 30℃에서 48시간 진탕 배양하여 행하였다.

효모 genomic DNA 분리 및 조작

분리 균주의 genomic DNA의 분리는 Amberg 등(12)의 방법과 Hoffman과 Winston(13)의 방법을 실험의 목적에 맞게 일부 변형하여 적용하였다. 배양액을 eppendorf tube로 옮긴 후 소형 원심분리기에서 1,500 rpm에서 5분간 원심분리 하여 얻은 균체를 3 mL 멸균증류수로 세척하였다. 세척한 균체를 0.5 mL의 lysis buffer (0.1 M Tris-Cl (pH 8.0), 0.05 M EDTA, 1% SDS)에 현탁하고 glass bead(직경 0.5 mm)를 eppendorf tube의 약 2/3 가량 넣은 후 0.025 mL의 5 M NaCl를 첨가하였다. 그리고 최고 강도로 1분간 vortex를 실시한 후 2,000 rpm에서 2분간 원심분리한 후 상등액을 다른 eppendorf tube로 옮긴 후 0.5 mL의 phenol을 투입하고 vortex를 실시한 후 1분간 원심분리하였다. 원심분리에 의해 수층을 다른 eppendorf tube로 옮긴 후 0.5 mL의 chloroform : iso-amyl alcohol (24 : 1)을 넣은 후 위의 과정을 반복하여 추출하였다. 이 추출물에 1 mL의 -20℃의 95% 에탄올을 넣고 -20℃에서 1시간 동안 침전시켰다. 침전된 DNA를 12,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상등액을 버린 후 70% 에탄올로 씻어내고 0.25 mL의 TE buffer [0.01 M Tris-Cl, 0.001 M EDTA (pH 8.0)]에 현탁하였다. 이 현탁액에 0.025 mL의 EDTA-Sark 용액[0.4 M EDTA (pH 8.0), 2% N-lauroylsarcosine (Sarkosyl)]과 0.005 mL의 proteinase K 용액(10 mg/mL)을 투입한 후 37℃에서 30분간 반응시켰다. 여기에 0.25 mL의 5 M NH_4Ac 용액을 넣은 후 상기와 같이 차례로 phenol 및 chloroform : iso-amyl alcohol 용액을 처리한 다음 수층을 다른 eppendorf tube로 옮긴 후 에탄올 침전을 다시 행하였다. 침전된 DNA는 원심분리한 다음 70% 에탄올로 씻어낸 후 0.1 mL의 TE buffer에 현탁한 후 본 실험에 사용하였다.

PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Polymerase chain reaction (PCR) 반응을 위한 primer의 제작은 SolGent사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 합성하였으며 internal transcribed spacer (ITS) 영역의 universal primer인 ITS1 (5′-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3′)과 ITS4 (5′-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3′)의 양방향으로 합성하였다(14).

PCR 반응은 합성한 양방향 primer를 사용하여 분리한 template DNA와 함께 반응시켰다. 반응조건은 95℃에서 15분간 1회 반응 후, 95℃에서 20초-50℃에서 40초-72℃에서 1분 30초간 반응을 1 cycle로 30회 반복하고 최종적으로 72℃에서 5분간 1회 반응 후 종결하였다. 이때 사용한 기계는 ABI 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA USA)이었으며 PCR 산물은 PCR Purification Kit (SolGent, Daejeon, Korea)를 사용하여 정제하였다.

PCR 산물의 제한효소 절편 길이 다형현상을 통한 균주의 동정을 위하여 정제한 PCR 산물을 *Hae*Ⅲ와 *Hinf*Ⅰ 제한효소로 처리하여 생성되는 독특한 band 패턴의 차이를 전기영동으로 확인하였다.

DNA 전기영동

PCR 산물과 제한효소로 처리된 단편의 확인은 1.5%

agarose gel을 사용하여 확인하였다(15). Buffer는 0.5× Tris-borate (TBE)를 사용하였으며 발색을 위하여 ethidium bromide (EtBr) 용액에 30분간 침지시켰다. 그리고 전기영동상을 관찰하기 위하여 UV tranilluminator (VILBER LOURMAT, TFX-20M, France)와 ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad, Hercules, CA USA)을 사용하였다. 한편, DNA 단편 크기의 측정용 marker로는 100 bp DNA Ladder (SolGent, Daejeon, Korea)를 사용하였다.

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

실험에 적용된 효모 염색체 DNA 크기를 측정하여 분리 균주를 동정하기 위하여 PFGE를 실시하였다(15). 분리를 위해 사용한 기계는 CHEF-DR Ⅲ system (Contour-Clamped Homogeneous Electric Field, Bio-Rad, Hercules, CA USA)을 이용하였으며, 부속장비로는 chamber, power module, variable speed pump 그리고 cooling module을 함께 사용하였다(16-17). 실험의 전과정은 CHEF-DR Ⅲ system의 instruction manual 및 applications guide에 준하여 실시하였으며 필요에 따라 실험의 목적에 맞게 변형하여 수행하였다. 한편 전기영동을 위한 PFGE용 buffer와 gel로는 0.5× TBE buffer와 1% Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad, Hercules, CA USA)를 사용하였으며, DNA size marker는 Bio-Rad에서 제공하는 225~2,200 kb 크기의 *S. cerevisiae* YNN 295 염색체 DNA를 사용하였다. 본 실험에서 설정한 CHEF-DR Ⅲ system의 조건은 cooling module은 14℃, switch time은 60~120초, voltage는 6 V/cm, angle은 120° 그리고 actual current는 150 미만으로 설정하였다.

DNA 염기서열 결정과 상동성 및 유연관계 분석

DNA 염기서열 결정은 SolGent사(Daejeon, Korea)의 sequencing service를 의뢰하여 분석하였으며 primer로는 PCR-RFLP를 위하여 사용한 것과 동일한 ITS1 또는 ITS4를 사용하였다. 염기서열 결과에 대한 서열간의 유사성을 알아보는 상동성 검색은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 운영하는 BLAST를 이용하였고 계통학적 분석을 위한 다중서열정렬(Multiple Sequence Alignment)은 European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)에서 제공하는 ClustalW2를 이용하였다. 그리고 계통 유연관계 분석에서 염기서열의 편집은 BioEdit (version 7.0.9.0, 1997-2007) 프로그램을 이용하였으며(18) 근린결합분석(neighbor- joining analysis)에 의한 phylogenetic tree 작성 및 분석에는 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA4 version 4.0.2, 1993-2008) 프로그램을 이용하였다(19).

효모의 환경내성 분석

분리 효모들의 아황산에 대한 내성 분석을 위하여 아황산에 의한 효모의 생육 저해정도를 조사하였다. 아황산의 함량이 200 ppm이 되게 메타중아황산칼륨(potassium metabisulfite, $K_2S_2O_5$)을 YPD 액체배지에 YPD 배지에서 배양한 종배양액을 5% (v/v)씩 접종한 후 30℃에서 진탕 배양하였다. 배양 중 경시적으로 시료를 검체한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하여 아황산 농도에 대한 효모의 증식도와 증식 저해률을 측정하였으며 저해률은 아황산을 첨가하지 않은 YPD 배지에서의 증식도에 대한 비율(%)로 환산하였다.

효모의 내당성 분석을 위하여 30% 포도당에 대한 효모의 생육 저해정도를 조사하였다. 포도당을 30%가 되게 인위적으로 조정한 YPD 액체배지에 종배양액 5% (v/v)씩 접종한 후 30℃와 40℃에서 각각 진탕 배양하였다. 배양 중 경시적으로 시료를 검체한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하여 효모의 증식도를 측정하였다.

효모의 내알코올성 분석을 위하여 8% 알코올에 대한 효모의 생육 저해정도를 조사하였다. 멸균이 완료된 YPD 액체배지의 총량에 대한 8% (v/v)에 해당하는 양의 무수에탄올를 인위적으로 첨가하여 혼합하였다. 여기에 YPD 배지에서 배양한 종배양액을 5% (v/v)씩 접종한 후 30℃에서 진탕 배양하였다. 배양 중 경시적으로 시료를 검체한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하여 효모의 증식도를 측정하였으며 저해률은 알코올을 첨가하지 않은 YPD 배지에서의 증식도에 대한 비율(%)로 환산하였다.

결과 및 고찰

PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

PCR 기법은 균주의 빠른 동정과 관련하여 아주 유용한 방법 중 하나로서 ITS 영역과 5.8S 영역 사이에서의 차이를 효모의 종간 구별에 응용함으로써 빠른 시간 내에 균주를 동정할 수 있다(20). 실험에 적용한 분리 효모로부터 genomic DNA를 분리한 후 ITS1과 ITS4의 universal primer를 사용하여 PCR을 실시한 결과 약 800 bp에서 단일 band의 산물을 확인하였다. 분리된 4균주 모두 동일한 위치에 band를 형성함으로서 효모의 분류학상 아주 가까운 관계에 있을 걸로 판단되었다. 분리한 효모 균주에 대한 PCR 수행 후 PCR 산물을 통한 균주의 동정을 알아보기 위하여 제한효소 절편 길이 다형현상(RFLP)을 위한 제한효소인 *Hae*Ⅲ와 *Hinf* Ⅰ으로 처리한 후 나타난 패턴의 차이를 알아보았다 (Fig. 1). RFLP의 경우 특정의 제한효소로 처리하였을 때 유전자의 염기서열에 따라 서로 다른 길이의 독특한 절단조각이 생성되며 이는 종간 다양성을 의미한다. 따라서 이러한 결과를 가지고 분류학상의 상호관계를 알 수 있으며 특히 균주간 밀접한 관계에 있는 것들을 효과적으로 구별할 수 있다(21-22). 분리한 4 균주 모두 제한효소 *Hae*Ⅲ로 처리

한 경우에는 모두 약 400 bp의 위치를 보였으며, *Hinf* I 으로 처리한 경우에는 약 350 bp와 300 bp의 위치를 나타내어 동일한 양상을 나타내었다. 따라서 4 균주 모두는 분류학상 서로 동일한 균주에 속하는 것을 알 수 있었다.

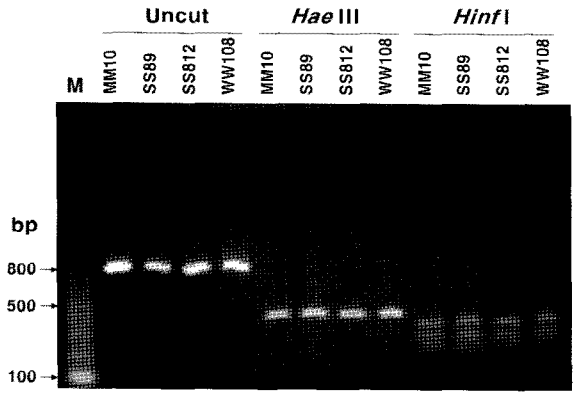

Fig. 1. Agarose gel electrophoretic patterns of ITS I-5.8S-ITS II DNA fragments amplified from the isolates before and after digestion with restriction enzymes.

Lane M represents 100 bp ladder used as a DNA size marker.

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

분리된 4 균주에 대한 PFGE를 실시한 결과 대조균주와 효모 염색체 패턴이 모두 다르게 나타났다(Fig. 2). 그리고 분리 균주간의 유연관계는 MM10, WW108, SS89와 SS812가 서로 다른 3가지 염색체 패턴을 나타내었으며 그 중 SS89와 SS812는 동일한 염색체 패턴을 보여 동일균주에 속하는 것이 밝혀졌다.

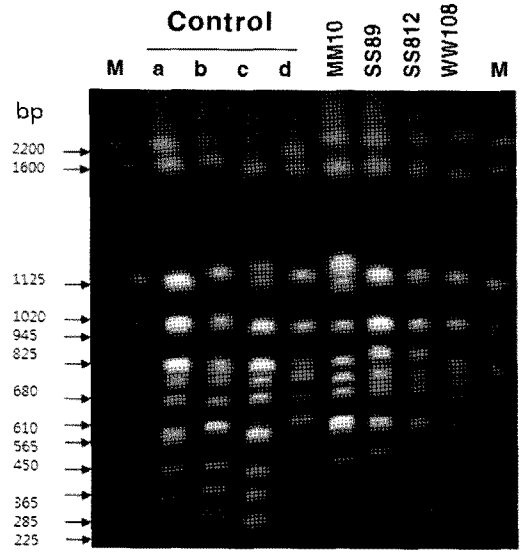

Fig. 2. PFGE patterns of chromosomal DNA of the isolates.

Lane M, DNA size marker; a, S. boulardii; b, S. cerevisiae 288c; c, S. coreanus KCCM 11215; d, S. cerevisiae TCY1.

DNA 염기서열 결정과 상동성 및 유연관계

분리 균주의 동정을 위하여 DNA 염기서열을 바탕으로 상동성 검색과 계통학적 분석을 행한 결과는 Fig. 3과 같다. 분리 균주의 경우 대조균주인 *S. cerevisiae* 표준균주와 97% 이상의 상동성을 나타냄을 알 수 있었으며 따라서 대조균주와 유전적으로 매우 가까운 위치에 있음을 알 수 있었다. 분자계통 유연관계를 밝히기 위한 근린결합분석을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하여 나타내었다(Fig. 4). 분리 균주인 MM10, SS89, SS812 그리고 WW108 균주는 *S. cerevisiae* CBS 4054 표준균주와 계통 유연관계에서 매우 가까운 위치에 있는 것을 알 수 있었다.

효모의 아황산(SO_2) 내성

아황산(이산화황, sulfur dioxide)은 식품첨가물로서 산화방지, 살균작용 그리고 갈변방지 등의 작용 때문에 일반식품, 음료 그리고 약품 등의 보존제로 사용되고 있다. 포도주 제조에 있어서는 항산화제와 선택적 살균제의 특성을 가지고 있어서 와인의 제조에 있어서 유해한 미생물을 제어함으로써 아황산에 대한 내성을 가지고 있는 와인효모에 의한 정상적인 와인의 발효를 위하여 사용된다(23). 동정한 4종의 야생효모를 200 ppm의 아황산 함유 배지에서의 효모성장 저해률을 알아보았다(Fig. 5). MM10과 WW108 균주의 경우에는 24시간대에서 6% 미만의 저해률을 보였다. 하지만 SS89와 SS812 균주의 경우 24시간대에서 상대적으로 아황산에 대한 내성이 약한 것으로 나타났다.

효모의 내당성

동정한 4종의 야생효모를 각각 30℃와 40℃에서 30% 포도당 배지에서의 효모 성장률을 알아보았다(Fig. 6). 발효가 시작되면 효모군들은 인위적으로 강화된 당 농도에서 적응을 하기 시작하고 따라서 높은 당 농도에 대한 내성을 증가시키게 된다. 30℃에 적용한 모든 효모군은 36시간대에서 가장 높은 성장을 나타내었다. 하지만 모든 효모군에서 36시간대를 지나서는 성장세가 약간 감소하는 경향을 나타내었는데 이는 효모들이 일정부분 당을 알코올로 전환시키고 효모군에 있어서 내당성이 다소 떨어진 것으로 사료된다. Jiménez-Martí 등(7)의 연구결과에서는 10시간대에서의 배양상태는 growth 3에 가까운 수치의 성장을 나타내었다고 보고하였다. 본 연구에서 동정한 야생효모와 비교 시 동정 효모군은 매우 우수한 내당성을 가지고 있다는 것을 알 수 있었다. 반면, 40℃에 적용한 모든 효모군은 상대적으로 낮은 성장을 나타내었는데 평균 50~60%의 성장률이 감소된 것을 알 수 있었다. 이는 효모의 적정 배양온도가 아닌 고온에서 기인하는 것으로 내열성이 낮은 결과로 사료된다.

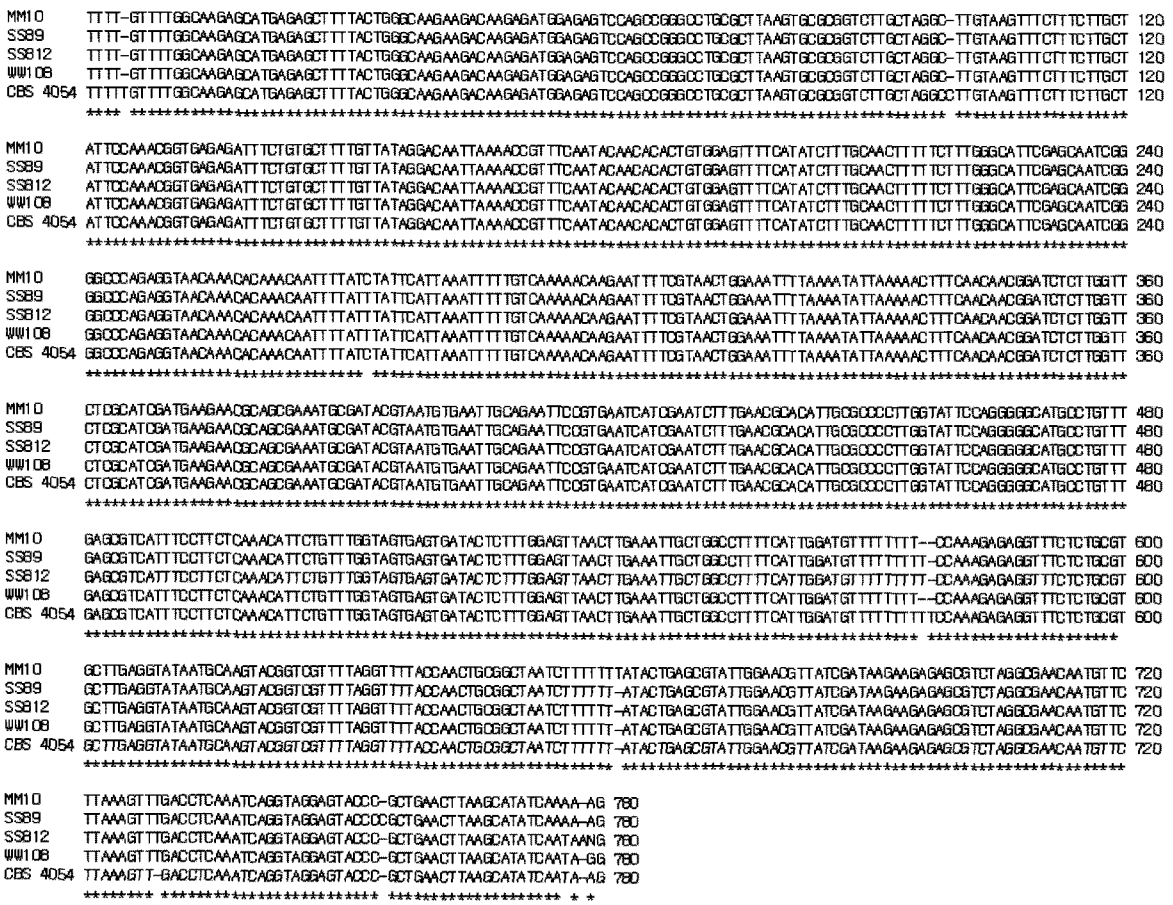

Fig. 3. Multiple sequence alignment of the ITS I-5.8S-ITS II region of the isolates.

CBS 4054 represents S. cerevisiae type strain as a control.

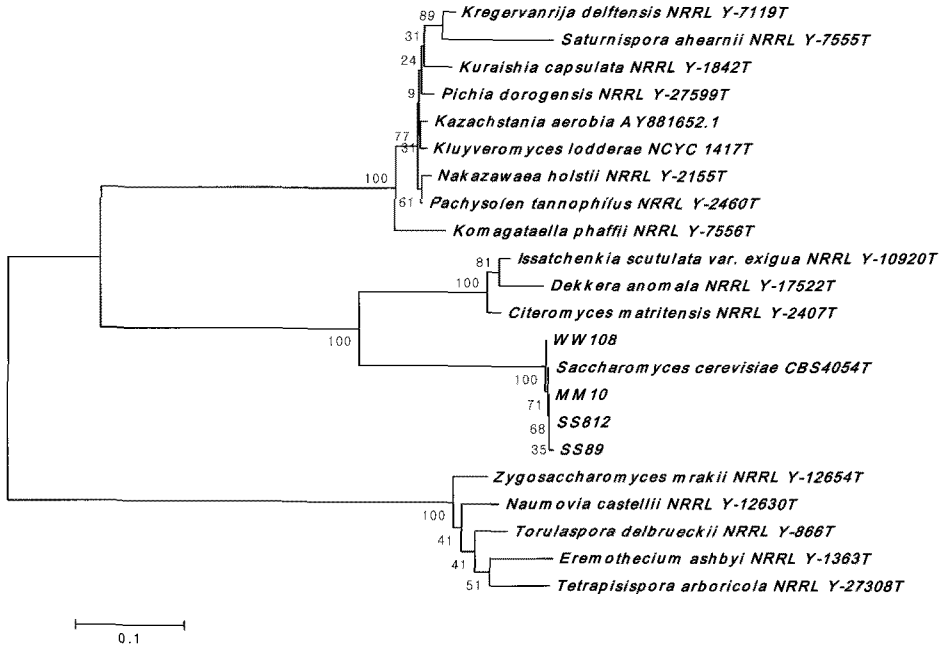

Fig. 4. Phylogenetic tree based on the ITS I-5.8S-ITS II DNA sequences of the isolates.

Letter T after each strain number represents a type strain.

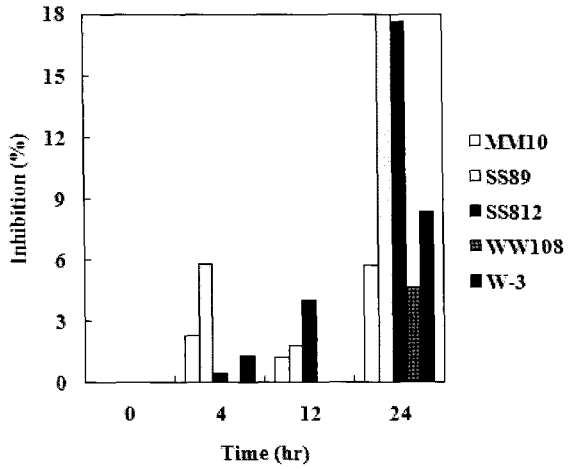

Fig. 5. Changes in the growth inhibition of the isolates during the culture in YPD liquid media including 200 ppm sulfur dioxide.

Inhibition ratio was expressed as a percentage of the cell density in YPD containing 200 ppm sulfur dioxide against that in YPD. W-3 was used as a control yeast.

효모의 알코올 내성

동정한 4종의 야생효모를 8% (v/v)의 알코올을 함유하는 YPD 배지에서의 효모 성장률을 알아보았다(Fig. 7). 모든 효모군에서 배양초기에는 알코올 내성이 없어서 저해률은 아주 높은 경향을 나타내었다. 이는 효모들이 고알코올 농도에서 영향을 받아 초기에 내성을 거의 나타내지 못했다고 할 수 있다. 하지만 배양이 진행되면 효모군들은 인위적으로 강화된 알코올에 적응을 하기 시작하고 따라서 알코올 농도에 대한 내성을 증가시키게 된다. 본 연구에서는 모든 야생효모군은 24시간대에서 가장 낮은 저해률을 나타내었으며 SS812 균주의 경우 20% 미만의 저해률을 나타내었다. Abe 등(24)의 연구에 의하면 8% 에탄올 강화배지에서 에탄올 내성을 가진 변이체를 접종한 후 24시간대에서 성장곡선을 확인한 결과 growth 2~3의 수치를 나타내었다. 본 연구에서는 동시간대 분리한 야생효모의 성장곡선이 growth 7.3~8.7의 수치를 나타내어(결과 미 제시) 본 연구에서 동정한 야생효모군이 알코올 내성균주로서 더 우수한 걸로 나타났다.

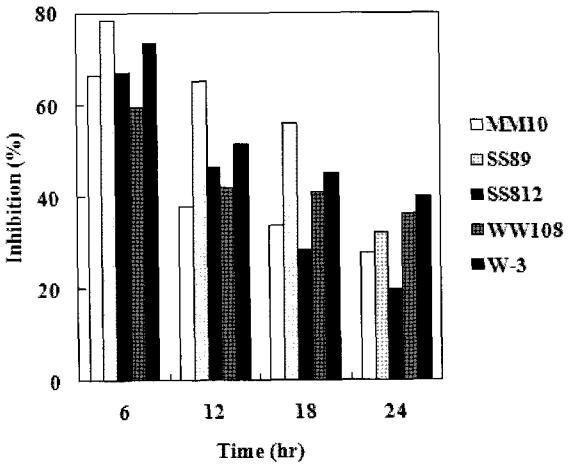

Fig. 7. Changes in the growth inhibition of the isolates during the culture in YPD liquid media including 8% (v/v) ethanol.

Inhibition ratio was expressed as a percentage of the cell density in YPD containing 8% (v/v) ethanol against that in YPD. W-3 was used as a control yeast.

요 약

본 연구에서는 국산 포도로부터 분리된 효모들 중 와인 발효 적성이 우수한 균주들을 선정하여 ITS I-5.8S-ITS II DNA 염기서열 분석과 분자생물학적인 방법을 통하여 동정하였고 발효환경 내성을 알아보았다. 분리 효모들의 ITS I-5.8S-ITS II 영역을 PCR로 증폭한 결과 약 800 bp의 DNA가 증폭됨을 확인하였다. 이 DNA를 제한효소 *Hae*Ⅲ로 처

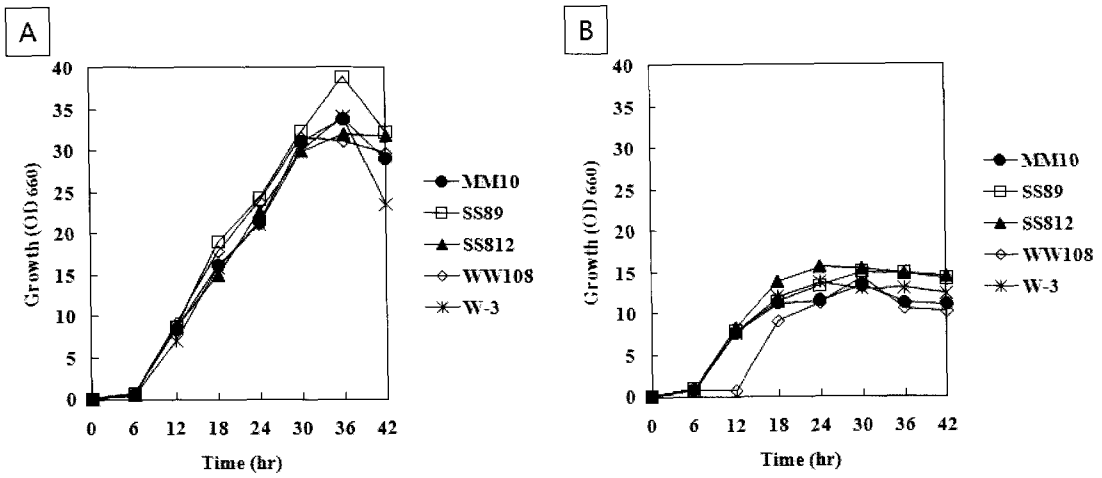

Fig. 6. Changes in the cell density of the isolates during the culture at 30℃ (A) and 40℃ (B) in YPD liquid media including 30% glucose.

W-3 was used as a control yeast.

리한 경우 모두 약 400 bp의 DNA band가 확인되었고, *Hinf* I로 처리한 경우에는 약 350 bp와 300 bp의 DNA band를 나타내었다. 분리된 4 균주의 염색체 DNA를 PFGE로 확인한 결과 MM10, WW108 그리고 SS89(SS812 동일)가 서로 다른 3가지 염색체 패턴을 나타내었다. ITS I-5.8S-ITS II DNA 염기서열을 분석한 결과 모두 *S. cerevisiae* CBS 4054 표준균주와 97% 이상의 상동성을 나타내어 매우 가까운 근연관계에 있음을 알 수 있었다. 근린결합분석을 이용한 phylogenetic 분석을 통하여 분리 균주인 MM10, SS89, SS812 그리고 WW108 균주는 *S. cerevisiae* CBS 4054 표준균주와 계통 유연관계에서 매우 가까운 위치에 있는 것을 확인할 수 있었다. 동정된 4종의 야생효모 중 200 ppm의 아황산 함유 배지에서 MM10과 WW108 균주는 24시간대에서 6% 미만의 생육 저해률을 보였다. 또한 30℃ 배양온도에서 30% 포도당을 함유하는 YPD 배지에서 36시간대에서 가장 높은 성장을 나타내었으며, 특히 SS89 균주는 660 nm에서의 흡광도가 약 40에 가까운 수치를 나타내었다. 배양온도 40℃에서는 모든 효모군이 10~15의 수치를 나타내어 낮은 성장을 나타내었다. 알코올(8%, v/v)을 함유하는 YPD 배지에서 배양초기에는 내성이 약하였으나 배양이 진행되면서 적응을 하기 시작하고 24시간대에서 가장 낮은 생육 저해률을 보였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 15대 어젠다 과제(PJ006763)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Montville TJ, Matthews KR (2005) Food microbiology: an introduction. ASM Press, Washington, DC, USA, p 223-239
2. Kurtzman CP, Fell JW (1998) The Yeasts, A Taxonomic Study(fourth edition). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, p 358-371
3. Attfield PV (1997) Stress tolerance. The key to effective strains of industrial baker's yeast. Nat Biotechnol, 15, 1351-1357
4. Pigeau G, Inglis D (2005) Upregulation of *ALD*3 and *GPD*1 in *Saccharomyces cerevisiae* during Icewine fermentation. J Appl Microbiol, 99, 112-125
5. Erasmus DJ, Merwe GK, Vuuren HJJ (2003) Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. FEMS Yeast Res, 2, 375-399
6. Jiménez-Martí E, Zuzuarregui A, Gomar-Alba M, Gutiérrez D, Gil C, del Olmo M (2011) Molecular response of *Saccharomyces cerevisiae* wine and laboratory strains to high sugar stress conditions. Int J Food Microbiol, 145, 211-220
7. Caridi A, Crucitti P, Ramondino D (1999) Winemaking of must at high osmotic strength by thermotolerant yeast. Biotechnol Lett, 21, 617-620
8. Aguilera F, Peinado RA, Millán C, Ortega JM, Mauricio JC (2006) Relationship between ethanol tolerance, H+-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. Int J Food Microbiol, 110, 34-42
9. Zuzuarregui A, Del Olmo M (2004) Expression of stress genes in wine strains with different fermentative behavior. FEMS Yeast Res, 4, 699-710
10. Yook C. Seo MH, Kim DH, Kim JS (2007) Quality improvement of Campbell Early wine by mixing with different fruits. Korean J Food Sci Technol, 39, 390 - 399.
11. Guthrie C, Fink RG (1991) Methods in Enzymology: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Academic Press, San Diego, California, USA, 194, p 13
12. Amberg DC, Burke DJ, Strathern JN (2005) Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, Cold Spring Harbor, New York, USA, p 119-120
13. Hoffman CS, Winston F (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. Gene, 57, 267-272
14. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, California, USA, p 315-322
15. Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual(3rd edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, Volume 1, Chapter 5, p 5.2-5.17, p 5.55-5.60, p 5.65-5.67, p 5.79-5.82
16. Clark SM, Lai E, Birren BW, Hood L (1988) A novel instrument for separating large DNA molecules with pulsed homogeneous electric fields. Science, 241, 1203-1205

17. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV, the CDC PulseNet Task Force (2001) PulseNet: The Molecular Subtyping Network for Foodborne Bacterial Disease Surveillance, United States. Emerg Infect Dis, 7, 382-389
18. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nuclic Acids Symp Ser, 41, 95-98
19. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol, 24, 1596-1599
20. Torija MJ, Rozès N, Poblet M, Guillamón JM, Mas A (2001) Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. Antonie Van Leeuwenhoek, 79, 345-352
21. Nisiotou AA, Spiropoulos AE, Nychas GJE (2007) Yeast community structures and dynamics in healthy and Botrytis-affected grape must fermentations. Appl Environ Microbiol, 73, 6705-6713
22. Zott K, Miot-Sertier C, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Masneuf-Pomarede I (2008) Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. Int J Food Microbiol, 125, 197-203
23. Ough CS, Crowell EA (1987) Use of sulphur dioxide in winemaking. J Food Sci, 52, 386-389
24. Abe H, Fujita Y, Takaoka Y, Kurita E, Yano S, Tanaka N, Nakayama K (2009) Ethanol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated under selective conditions by over-expression of a proofreading-deficient DNA polymerase δ. J Biosci Bioeng, 108, 199-204

(접수 2011년 3월 3일 수정 2011년 8월 1일 채택 2011년 8월 5일)