

## 고온 알코올발효 효모균주 *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377의 무기산에 대한 스트레스반응 및 무기산 존재하의 알코올발효 생산능

윤혜선<sup>1</sup> · 백상규<sup>1</sup> · 김일섭<sup>1</sup> · 이인구<sup>2</sup> · 유춘발<sup>3</sup> · 진익렬<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 생명공학부 미생물학과, <sup>2</sup>농과대학 농화학과  
<sup>3</sup>대구대학교 공과대학 식품공학과

### Stress Response of a Thermotolerant Alcohol-Fermenting Yeast Strain, *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377, Against Inorganic Acids and Its Alcohol Fermentation Productivity Under the Presence of These Acids

Haesun Yun<sup>1</sup>, Sangkyoo Paik<sup>1</sup>, Ilsup Kim<sup>1</sup>, Inkoo Rhee<sup>2</sup>, Choonbal Yu<sup>3</sup> and Ingnyol Jin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, School of Life Sciences and Biotechnology, <sup>2</sup>Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

<sup>3</sup>Department of Food Science and Technology, Taegu University, Taegu 712-714, Korea

#### Abstract

A thermotolerant yeast strain, *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 (abbreviated as KNU5377), was exposed to inorganic acids including sulfuric, nitric and hydrochloric acid. As a stressor, each inorganic acid is very easily dissociated in water, resulting in lowering environmental pH. When compared with a reference *S. cerevisiae* ATCC24858, KNU5377 could overcome such a severe condition containing a final 0.4% concentration of sulfuric acid or nitric acid to grow at the overnight culture, but this reference could not. Additionally, this strain showed a surprisingly strong tolerance by surviving despite of exposure to the regime of 0.35% of hydrochloric acid for over 90 min and also to 0.6% of sulfuric acid for 30 min. On the contrary, both strains could not survive against a final 0.45% concentration of nitric acid. This strain KNU5377 could produce ethanol of 3% in 2 days by using the fermentation medium containing a final 0.3% concentration of sulfuric acid. Moreover, change into a final 0.2% concentration of sulfuric acid caused this strain to enhance fermentation productivity up to about 4.5% even at 40°C. In exposure to a final 0.2% of sulfuric acid for 60 min, trehalose was most accumulated within 30 min in KNU5377, and this suggested a cellular defense system led by this disaccharide was profitable for this strain to lead to no morphological changes.

**Key words** – Inorganic acid, *Saccharomyces cerevisiae*, Stress response, Alcohol fermentation

\*To whom all correspondence should be addressed

Tel : 053-950-5377, Fax : 053-955-5522

E-mail : jinin@knu.ac.kr

## 서 론

석탄, petroleum과 같은 화석 에너지의 고갈 및 이들의 소비증가로 발생하는 환경오염은 날로 심각해지고 있어서 최근 연료용 알코올이 대체 에너지로서 각광받고 있다. 연료용 알코올은 지구상에 가장 많이 존재하는 목질계 발효 기질과 설탕, 전분계 기질로써 생산할 수 있다. 그러나 나무 등과 같은 목질계 바이오 매스는 결정이 너무 견고하여 그 자체로는 발효에 이용될 수 없으므로, 고온 고압의 증기를 이용하거나 무기강산 그리고 여러 가지 유기용매로 전 처리하여 가용화 시켜서 이용되고 있다. 실제로 연료용 알코올을 생산하기 위하여 목질계 바이오 매스에 황산 0.2~2%를 첨가하고 120~180°C에서 가수분해하고 냉각한 다음 gypsum을 첨가하여 중화를 하여야 발효기질로 사용할 수 있다[11,16]. 따라서 바이오매스로써 연료용 알코올을 생산하기 위해서는 반드시 발효기질을 함유되어 있는 무기산과 유기용매 고온 등에 대해서 내성을 가진 발효미생물을 사용해야한다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 유전자 조작을 통해서 효모 균주에 산에 대한 내성을 부여하는 등의 노력을 하고 있으나[14], 고온, 무기산 등에 내재적으로 내성을 가진 균주가 바이오매스의 산 가수분해물인 발효기질의 알코올 발효에 좀 더 적합할 것이다.

환경 스트레스에 대한 세포 보호 역할을 하는 trehalose ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl (1-1)- $\alpha$ -D-glucopyranoside)는 글루코오스 두 분자로 이루어진 비환원성 저장당으로서 세균에서부터 곤충에 이르기까지 다양하게 존재한다[3]. *Saccharomyces cerevisiae*에서 이 저장당은 화학적 chaperone으로서 단백질이나 세포막 등에 결합하여 이들이 변성되는 것을 막는다[2,4,13,15]. Trehalose의 농도는 온도상승, 에탄올 또는 과산화수소에 대해서 증가하지만[1], 세포 내성과의 상관관계는 아직 논쟁 대상이다[10]. Nwaka 등의 보고에 의하면 trehalose분해 효소인 Nth1이 결여된 mutant에서 이 저장당이 많이 축적되어 있지만, 고온 내성은 점차로 떨어졌다[8,9]. 그러나 trehalose가 세포 방어에 관여하는 것은 분명하며 효모의 다른 저장당인 glycogen과 비교하여 그 대사 및 조절 양상이 서로 다르다[13].

우리 연구팀은 고온에서 알코올 발효가 가능한 균주를 대구, 경북 지역의 고온 폐수로부터 검색하던 중, 40°C의 고온 발효조건에서도 정상적인 발효를 할 수 있으며 발효

산물인 알코올을 75% 이상 생산하는 것을 확인하였다[6]. 또한 35 mM 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 대해서는 2시간 동안 처리하거나 유기용매 benzonitrile의 10%에 30분간 처리했을 때는 생존하는 것을 확인하였다. 이 연구에서는 바이오매스의 산 가수분해로 발생하는 낮아진 환경 pH에 대하여 이 균주 *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377의 스트레스반응을 알아보기 위하여 여러 가지 무기산에 대한 내성도 측정 및 무기산 첨가 후 중화하지 않은 상태에서 발효하여 생산되는 알코올 생산량을 조사하였다. 또한 스트레스에 대한 세포방어에 관여하는 trehalose의 세포 내 축적량을 조사함으로써 무기산에 대한 세포반응 및 세포형태 변화에 미치는 영향 등도 함께 조사하여 보고한다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

이 연구에 사용한 효모 균주는 대구지역의 고온 폐수로부터 분리한 전형적인 효모 균주로서 고온에서 내성 및 알코올 발효능도 높다고 알려진 *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 (이하 KNU5377) 균주를 사용하였고[6,7], 알코올에 대하여 비교적 높은 내성을 가지고 있는 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC24858 (이하 ATCC24858) 균주를 대조 균주로 하였다. 생육에 사용된 배지로는 전형적인 *Saccharomyces* 영양배지인 YEPD media (Yeast extract 1%, Peptone 2% and Dextrose 2%)를 사용하였고, 필요에 따라 적정 농도의 무기산(황산, 질산, 염산)을 % 농도(v/v)로 멸균한 배양 배지에 첨가하였다. 또한 알코올 발효 시에는 YEPD와 동일 조성에 dextrose를 20% 첨가한 것을 사용하였다.

### 무기산에 대한 내성도 측정

Durham tube를 넣고 멸균한 YEPD 액체 배지에 황산, 질산, 염산을 0에서 0.5% (v/v)까지 첨가한 뒤 pH를 측정하고 pH가 낮게 조절된 배양 배지에서 중간 대수 증식기까지 배양한 다음, 두 균주를 1% 접종하여 30°C에서 배양하면서 Durham tube에 모이는 가스 및 탁도를 관찰하여 각각의 무기산 농도에서 생육 가능성을 조사하였다. 또한 정상적인 생육 조건에서 배양한 균을 최종 흡광도를 OD<sub>600</sub>=3 되도록 조절한 뒤, 생육이 불가능한 다소 높은 농도에 단시간 노출시키고 그 반응액 5  $\mu$ l를 YEPD 고체배

지에 떨어뜨린 뒤, 30°C에서 이틀동안 배양하면서 생성되는 colony를 관찰하였다.

#### 황산에 대한 민감도 측정

대수 증식기까지 배양한 KNU5377을 OD<sub>600</sub>=3.0 되도록 세포 수를 조절한 뒤, 30 mM 황산에 노출시켜 시간별로 세포를 회수하여 살균한 생리식염수로 3회 세척하였다. 이를 10배 희석하여 OD<sub>600</sub>=0.3 되도록 조절한 다음 희석하기 전, 후의 세포액을 YEPD 고체 배지에 5 μl 떨어뜨리고 30°C에서 이틀간 배양하면서 생기는 colony를 관찰하였다.

#### 알코올 발효

20%의 dextrose가 첨가된 YEPD 액체배지를 발효배지로 하여 수분의 증발을 막기 위해 conc-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 채운 Durham tube가 달린 250 ml flask에 발효 배지를 100 ml을 넣고 전 배양액 10% (v/v)을 접종하여 30°C 또는 40°C에서 정지 배양하였다. 각 발효 조건에 따라 발효 배지에 무기산을 첨가하였다. 생성된 알코올 농도는 발효가 끝난 뒤, 배양액을 1차 증류한 증류액을 alcohol hydrometer로 측정된 값을 Gay Lussac table로 환산하여 계산하였다[12].

#### Trehalose 축적 농도 측정

황산, 질산, 염산이 0.2% 첨가된 YPD배지에서 30분, 60분 동안 스트레스 반응시킨 각 효모균주의 배양액 1 ml을 원심 분리하여 0.86% 식염수로 3회 세척한 뒤 멸균한 증류수 1 ml을 첨가하여 100°C에서 한시간 동안 가열하여 세포를 파쇄하였다. 이를 원심분리하여 상등액 500 μl를 멸균 eppendorf tube에 옮기고 400 μl의 phosphate buffer (50 mM, pH 5.7)와 3 μl의 trehalase (Sigma, T8778)를 첨가하여 37°C에서 12시간 반응시킨 뒤, Somogi-Nelson법을 이용한 환원당 정량을 실시하였다. 이 결과로부터 산출된 환원당량을 바탕으로 trehalose농도를 산출하였다.

#### 전자현미경 관찰

세포 내 소기관의 관찰은 Kamasawa 등의 방법[5]을 기초로 transmission electron microscope (TEM)를 이용하였다. 간단히 요약하면 스트레스 처리한 세포를 차가운 증류수로 수세한 뒤 2.5% Glutaraldehyde, 3% KMnO<sub>4</sub> 용액으로 고정 후, 2% Agar로 embedding 하고 1×1 mm 크기로

절단한다. 절단한 조각을 1~2% Uranyl acetate로 염색한 뒤 농도를 점차 증가시킨 Acetone으로 dehydration하고, Quetol로 infiltration한 것을 sectioning, carbon coating하여 전자현미경(Hitachi H-7000, 75 kV) 하에서 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### 황산, 질산, 염산에 대한 내성도

물에서 거의 해리 되는 무기 강산의 특징에 따라 효모 배양배지에 첨가했을 때 역시 주변의 산도를 상당히 떨어뜨리는 것을 확인하였다. 황산, 질산, 염산을 0% (v/v)에서 0.5%까지 첨가하여 그 배지의 pH를 측정한 결과, 첨가한 무기산 농도에 비례하여 pH가 떨어졌고 동일 농도에서는 염산에 대한 산도가 더 낮게 나타났다(Table 1). 이와 같이 무기산의 첨가 및 pH가 낮게 조절된 배양 배지에서 두 균주의 생육을 관찰하기 위하여 Durham tube가 들어 있는 시험관에 균주를 접종한 뒤 배양하면서 Durham tube에 생성되는 가스 및 흡광도를 측정한 결과, ATCC24858의 경우 세 가지 무기산에 대하여 0.3%까지 생육이 가능하고 질산에 대해서 좀 더 나은 양상을 보였다. 반면에 KNU5377은 염산에서는 대조 균주와 비슷한 양상을 보였으나 질산 0.4%에서 생육을 보일 뿐만 아니라 0.5% 황산농도에서도 생육이 가능한 것을 관찰하였다(Table 2). 생육에 저해를 받는 최고 농도(황산의 경우 0.6%, 질산의 경우 0.45%, 염산의 경우 0.35%)에서 10분 간격으로 처리 후 생존하는 정도를 관찰하여 두 균주 간의 내성도를 조사한 결과, 질산에 대해서는 두 균주 모두 생존하지 못하였고 KNU5377은 염산 처리 시 90분까지 생존 가능하였으며 ATCC24858은

Table 1. pH values corresponding to the YEPD media containing each concentration of inorganic acids.

Concentration (%, v/v)	pH values		
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	HNO <sub>3</sub>	HCl
0.1	3.55	3.37	3.04
0.2	2.89	2.69	2.23
0.3	2.31	2.12	1.69
0.4	2.12	1.72	1.33
0.5	1.94	1.42	1.06

Table 2. Effects of inorganic acid on cell growth between *Saccharomyces cerevisiae* ATCC24858 and *S. cerevisiae* KNU5377.

Concentration (%, v/v)	ATCC24858			KNU5377		
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	HNO <sub>3</sub>	HCl	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	HNO <sub>3</sub>	HCl
0.1	+	+	+	+	+	+
0.2	+	+	+	+	+	+
0.3	±	+	±	±	+	±
0.4	-	-	-	±	±	-
0.5	-	-	-	-	-	-

+: Gas was fully produced in the Durham tube.  
 ±: Gas was not fully produced in the Durham tube.  
 -: Gas was not produced.

50분 이후 완전히 사멸하였다(Fig. 1). 따라서 KNU5377이 대조 균주보다 전반적으로 무기산에 대한 내성이 높게 나타났으며 염산에 대해서는 생육가능농도가 비슷하였으나 높은 농도에서 스트레스 처리 시 좀 더 강한 내성을 가지는 것을 확인하였다.

무기산에 대한 효모의 스트레스 반응에 대한 연구는 아직 잘 알려져 있지 않으나 무기 강산 및 고온에서 전 처리한 목질계 바이오매스를 발효기질로 하여 알코올을 효과적으로 생산하는 균주의 탐색 및 유전자조작을 통한 무기산에 대한 내성을 가진 균주의 개발이 진행되고 있다[14]. 그러나 환경에 적응하면서 자연스럽게 환경 스트레스에 대한 내성을 획득하고 이러한 획득 내성(acquired tolerance)이 오랜 시간 동안 지속되면서 안정화된 자연상태의 균주를 분리하여 이용한다면 즉, 구성적인 내성(intrinsic tolerance)

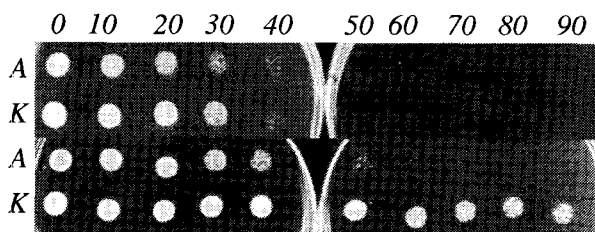


Fig. 1. Sensitivity test of *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 against inorganic acid. Exponentially growing cells were exposed to 0.6% and 0.35% of sulfuric and hydrochloric acid, respectively, for indicated time (min). Then cells were washed and 5  $\mu$ l of each was then spotted onto the YEPD agar plates.

을 가진 균주를 전 처리한 기질에 이용한다면 증화 및 냉각 과정에 드는 비용을 줄이면서 효과적으로 알코올 생산이 가능할 것이다. 본 연구에 사용된 KNU5377은 40℃라는 고온에서도 높은 발효율[6,7]을 나타내는 것을 확인하였을 뿐만 아니라, 본 연구에서와 같이 대조균주에 비해서 황산, 질산에 대한 내성이 높은 것을 확인하였다. 따라서 본 연구에 사용된 KNU5377 균주는 스트레스로 작용하는 여러 가지 전처리 조건을 거친 기질을 이용한 알코올 생산에 유리할 것으로 생각된다.

#### 스트레스조건에서 알코올발효

이 연구에 사용한 세 가지 무기산에 대한 KNU5377의 발효가능 농도 및 생산되는 알코올농도를 조사하였다. 황산은 0.2, 0.3, 0.4, 0.5%까지, 질산은 0.1, 0.2, 0.3, 0.4%까지, 염산은 0.1, 0.2, 0.3%를 각각 발효 배지에 첨가하여 이틀동안 생산되는 알코올 농도를 측정하였다. 황산 0.4% 이상의 농도에서는 하루동안 생산된 1.2% 정도의 알코올이 최대량이었고, 이틀째에는 오히려 감소하는 것으로 보아 더 이상의 발효는 진행되지 않는다고 판단하였다. 0.3%에서는 생산량이 적으나 꾸준히 증가하는 양상을 보였다. 0.1%의 질산농도에서는 산이 첨가되지 않았을 때의 90% 이상의 알코올 생산량을 보이므로써 발효에 거의 영향을 미치지 않음을 알게 되었고, 0.3% 이상의 농도에서는 알코올 생산량이 1%를 조금 넘었다. 또한 염산 첨가 시에도 0.2%가 발효 가능한 한계농도였으나 무기산을 첨가하지 않은 조건에서의 알코올 발효량의 약 80%를 유지하는 높은 발효율을 나타내었다(Fig. 2). 최근 NREL (National Renewable Energy Laboratory)에서는 값싼 lignocellulosic biomass를 발효 기질로 사용하기 위한 전처리 과정을 플랜트로 디자인하였다[16]. 이 플랜트에서는 190℃ 고온에서 증기 폭쇄 및 0.5%의 황산을 첨가한 dilute acid prehydrolysis를 통해 목질계 기질을 가수분해하고 연속적으로 냉각한 뒤, 무기산에 의해 낮아진 pH를 중화하는 과정을 거친다. 또한 가수분해 시 부수적으로 발생하여 발효에 좋지 않은 영향을 미치는 acetic acid, furfural을 제거하는 과정을 거친다 [11,16]. 따라서 이러한 고온, 무기산 스트레스환경에 대해서 우리의 발효효모균주의 적용 가능성을 알아보기 위해서 30℃ 정상적인 발효 조건과 40℃ 고온 발효 시, 황산의 알코올 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 정상조건에서는

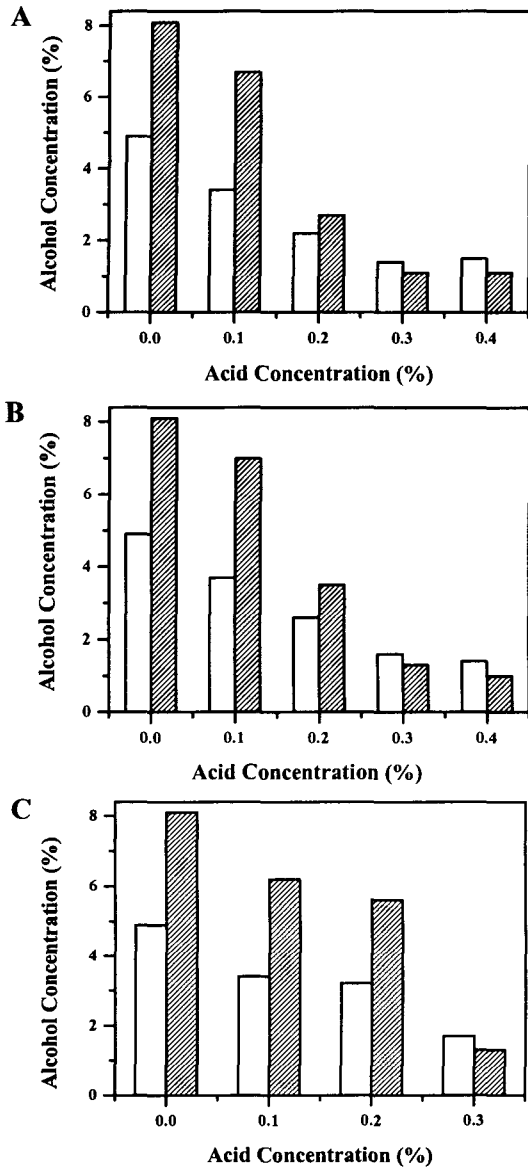


Fig. 2. Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 in the 20% glucose media containing inorganic acids. Exponentially growing *S. cerevisiae* KNU5377 cells were inoculated into the fermentation media containing indicated concentration of sulfuric, nitric and hydrochloric acids for 2 d. Concentration of alcohol produced under the presence of sulfuric acid (A), nitric acid (B) and hydrochloric acid (C) was calculated using alcohol hydrometer. Open bar : 1 day, Hatched bar : 2 days.

두 균주 모두 발효 시작 후 3일까지 알코올 생산량이 꾸준히 증가하는 양상을 보였고, 황산 0.2%를 첨가하였을 때

첫째 날에는 대조균주에서 다소 높았으나 2, 3일째 접어들면서 KNU5377이 높은 생산량을 보였다. 한편 40℃의 고온에서 발효를 할 경우, 김 등[6]의 보고에서와 같이 KNU5377은 높은 발효율을 보였고 대조균주보다 약 3배 더 높았다. 이 균주는 무기산 첨가 후 고온에서 발효할 경우에도 대조균주보다 두 배정도 높은 4.5%의 알코올 생산을 보였다 (Fig. 3). 따라서 정상적인 발효 온도인 30℃에서 발효 시, 두 균주 모두 황산에 대한 영향을 받았으며, 고온에서는 KNU5377 균주가 고온내성을 가지므로[7] 교차내성시스템에 의하여 황산에 대한 영향을 대조균주보다 덜 받는 것으로 생각된다.

이와 같이 무기산의 첨가후 어떠한 중화과정을 거치지 않은 스트레스상태에서 KNU5377 균주는 높은 알코올 발효율을 보였을 뿐만 아니라, 고온 스트레스를 동시에 처리했을 경우에도 4.5% 이상의 알코올 생산이 가능하였다. 따라서 목질계 기질의 증기 폭쇄 및 산 가수분해 시 발생하는 고온, 낮은 산도 등의 불리한 환경에서 이 연구에 사용된 균주를 적용할 경우 높은 기대 효과가 예상된다.

세포내 trehalose 축적 농도 변화

무기산 스트레스에 대한 비 단백질성 보호제인

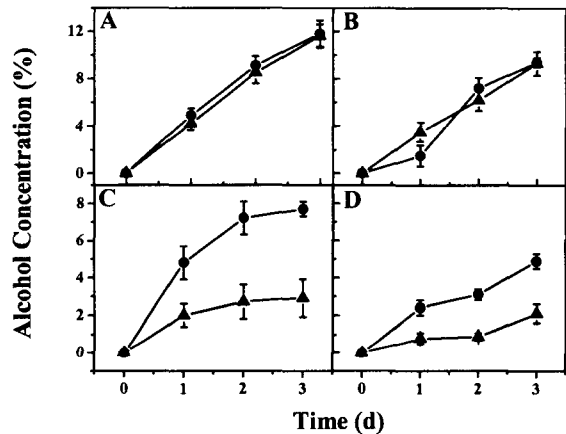


Fig. 3. Effects of sulfuric acid and high temperature on alcohol production. Alcohol was produced by two strains *S. cerevisiae* ATCC24858 (-▲-) and *S. cerevisiae* KNU5377 (-●-) at 30℃ and 40℃ under the presence of 0.2% of sulfuric acid or not. A : at 30℃, B : containing 0.2% of sulfuric acid at 30℃, C : at 40℃, D : containing 0.2% of acid at 40℃.

trehalose의 관련 여부를 확인하기 위해 trehalose의 세포 내 축적정도를 조사하였다. 생육 및 생존에 거의 영향을 주지 않는 농도 0.2%가 되도록 세 가지 무기산을 첨가하여 30분, 60분 동안 처리 한 뒤, 세포 내에 축적된 량을 정량하였다. 무기산이 첨가되지 않은 YEPD 배지에서 처리한 경우에는 두드러진 증감 없이 그 농도가 거의 일정하였다. 반면에 무기산 처리 30분 경과 후 두 균주 모두에서 축적량이 증가하는데, 대조 균주에서는 처음 30분 경과 후 증가폭과 그 다음 30분 처리 시 증가폭이 큰 차이 없이 지속적으로 증가하는 반면, KNU5377에서는 30분 동안 유도 축적된 농도가 60분까지 이어지는 것이 관찰되었다(Fig. 4). 따라서 KNU5377은 외부 환경변화에 대하여 신속하게 반응하여 안정화하는 반면 대조 균주는 안정하게 되기까지 좀더 시간이 걸리고 이러한 특성은 세포의 무기산 스트레스에 대한 내성으로 이어지는 것으로 생각된다.

trehalose는 열 스트레스 처리후 생산이 유도되고 세포 내에 축적 되므로써 단백질, 세포막 등의 세포내 구성성분과 결합하여 스트레스로부터 단백질의 aggregation을 막을 뿐만 아니라 세포막을 안정화하는데 기여한다[4,15]. 그러나 이 화합물의 양적인 증가가 획득 내성과 반드시 비례하는 것은 아니며, 열 스트레스에 의해 유도 발현된

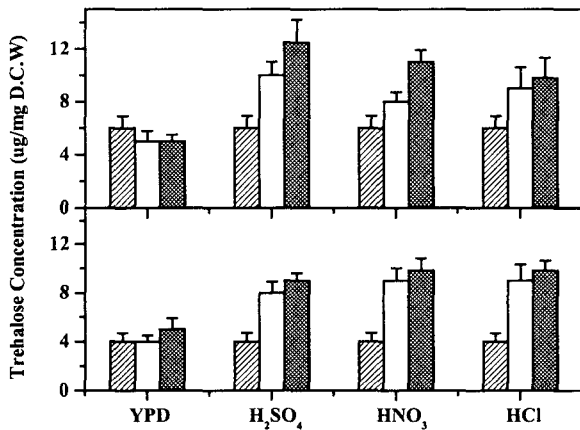


Fig. 4. Changes of trehalose accumulation under the presence of inorganic acids. After exposing to indicated inorganic acids for 0 min (scratched bar), 30 min (open bar) and 60 min (closed bar), trehalose was extracted from cell and its concentrations were determined by the enzymatic glucose assay. Upper panel: *S. cerevisiae* ATCC24858, lower panel: *S. cerevisiae* KNU5377.

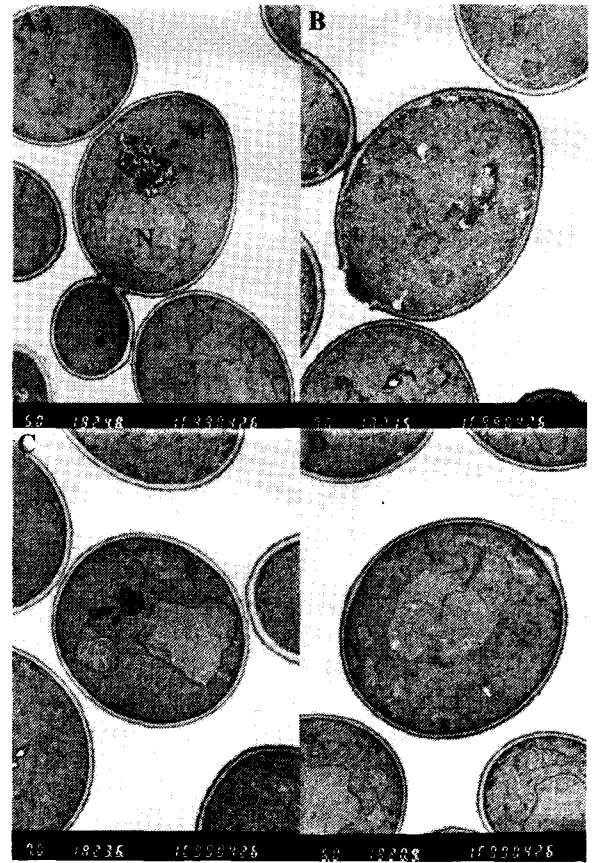


Fig. 5. Morphological changes of the cells exposed to sulfuric acid. After treatment of two strains with 1% of sulfuric acid for 1 h, transmission electron microscopy (TEM) images were taken from the cells of *S. cerevisiae* ATCC24858 (B) and of *S. cerevisiae* KNU5377 (D). A: not-treated ATCC24858, C: not-treated KNU5377, N: Nucleus, M: Mitochondria.

trehalose는 열처리 후 회복되는 시기에서는 Heat shock proteins (Hsps)에 의한 변성된 단백질의 refolding이 원활하게 이뤄지기 위해 변성된 단백질과 결합이 분리된다[13]. Trehalose의 합성과 효과적인 분해는 스트레스에 대한 세포의 생존 전략에서 중요한 위치를 차지하며, 이러한 현상은 무기산 스트레스 하에서 KNU5377의 경우에도 잘 적용되는 것으로 생각된다.

#### 높은 황산 스트레스 하에서 morphology 변화

대수 증식기까지 배양한 두 균주의 흡광도를 통하여 세포 수를 동일하게 한 뒤, 황산 1%가 첨가된 YEPD배지에

한시간 동안 노출시킨 다음, 세포를 고정하여 transmission electron microscope(TEM)로 관찰하였다. 대수 증식기의 세포에서는 핵과 미토콘드리아를 비롯한 세포 내 소기관의 배열에 변화가 보이지 않은(Fig. 5. A and C) 반면에 황산 처리 후, 대조 균주인 ATCC24858에서는 세포막의 구조적 변성이 두드러졌고 세포 내 소기관의 배열이 불규칙하게 변하였다(Fig. 5. B). 반면에 KNU5377에서는 고농도의 황산 처리 후에도 intact한 세포 외형을 유지할 뿐만 아니라 소기관의 배열도 스트레스 처리 전과 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나 미토콘드리아의 증가는 두 균주 모두에서 관찰되었다(Fig. 5. B and D).

## 요 약

고온내성을 가진 효모 균주, *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377을 황산, 질산 그리고 염산에 노출시켰다. 스트레스 원으로써 무기산은 물에서 쉽게 해리 되어 외부 산도를 떨어뜨린다. 여러 가지 무기산이 첨가된 조건에서 배양한 결과 KNU5377은 0.4%의 황산, 질산 농도에서 생육이 가능한 반면 대조 균주인 *S. cerevisiae* ATCC24858은 이 보다 낮은 농도인 0.3%가 생육의 한계였다. 더욱이 KNU5377은 0.35%의 염산에서 90분 이상, 0.6%의 황산에서는 30분 이상 생존이 가능한 높은 내성을 나타내었다. 반면에 두 균주 모두 0.45%의 질산에서는 생존하지 못하였다. 0.3%의 황산이 첨가된 조건에서 알코올 발효 시 KNU5377은 이틀 후 3%의 알코올을 생산하였다. 더욱이 0.2%의 황산 첨가와 동시에 40℃ 고온에서도 4.5%의 높은 알코올 생산이 관찰되었다. 또한 황산 0.2%에 한 시간동안 노출시킨 뒤 세포내에 축적되는 trehalose의 농도를 측정 한 결과, KNU5377에서는 30분내에 효과적으로 축적되었으며 동일한 스트레스 조건에서 전자현미경(TEM)을 통한 세포의 형태의 관찰 시 어떠한 변화도 나타나지 않았다.

## 감사의 글

이 연구는 산업자원부의 대체에너지자원개발 지원사업의 연구과제(1998N-BIO2-P-02)지원, 경북대학교 연구장려 지원(1998-2000) 및 한국학술진흥재단의 국제공동연구과제 지원(J9819)으로 이뤄졌다.

## 참 고 문 헌

1. Attfield, P. V. 1987. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. *FEBS lett.* **225**, 259-263.
2. Attfield, P. V. 1997. Stress tolerance : the key to effective strains of industrial bakers yeast. *Nat. Biotechnol.* **15**, 1351-1357.
3. Elbein, A. D. 1974. The metabolism of  $\alpha$ ,  $\alpha$  trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **30**, 227-256.
4. Hottiger, T., C. De Virgilio, M. N. Hall, T. Boller and A. Wiemken. 1994. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. 2. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vivo. *Eur. J. Biochem.* **219**, 187-193.
5. Kamasawa, N., N. Naito, T. Kurihara, Y. Kamada, M. Ueda, A. Tanaka and M. Osumi. 1992. Immunoelectron microscopic localization of thiolases, beta-oxidation enzymes of an n-alkane-utilizable yeast, *Candida tropicalis*. *Cell Struct. Funct.* **17**, 203-207.
6. Kim, J. W., I. Jin and J. H. Seu. 1995. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* F38-1, a thermotolerant yeast for fuel alcohol production at high temperature. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 617-623.
7. Kim, J. W., S. H. Kim and I. 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.
8. Nwaka, S., B. Mechler, M. Destruelle and H. Holzer, 1995. Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **360**, 286-290.
9. Nwaka, S., M. Kopp and H. Holzer. 1995. Expression and function of the trehalase genes *NTH1* and *YBR0106* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **270**, 10193-10198.
10. Nwaka, S. and H. Holzer, 1998. Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.* **58**, 197-237.
11. Rao, A., A. Maxey, B. B. Elmore and H. K. Huckabay. 1994. Microbial liquefaction of lignite pretreated with diluted acid at elevated temperature and pressure. *Appl. Biochem. Biotech.* **45**, 81-91.

12. Seu, J. H. and Y. H. Kim. 1989. Ethanol fermentation of fusion between heterologous transformant of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis* in mini-jar. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 8-13.
13. Singer, M. A. and S. Lindquist. 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the yin and yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* **16**, 460-468.
14. Tantirungkij, M., S. Limtong, T. Seki and T. Yoshida. 1997. Genetic improvement of acid-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production from xylose and lignocellulosic hydrolysate: Part 2 Random mutagenesis of the xylose reductase gene. *Annu. Rep. ICBiotech.* **20**, 370-374.
15. Wiemken, A. 1990. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **58**, 209-217.
16. Wooley, R., R. Mark, S. John and I. Kelly. 1999. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid pre-hydrolysis and enzymatic hydrolysis current and futuristic scenarios. NREL/TP-580-26157. [Online] <http://www.afdc.doe.gov/pdfs/Pedownload.html>.

(Received October 4, 2002; Accepted February 17, 2003)