

Characteristics of yeast with low temperature adaptation for *Yakju* brewed

Dong-Jun Seo¹, Soo-Hwan Yeo¹, Ji-Young Mun¹, Woo-Jin Jung²,
Yong Sik Cho¹, Seong Yeol Baek^{1*}

¹Fermented Food Division, Department of Agro-food Resource, NAAS, RDA, Wanju 55365, Korea

²Division of Applied Bioscience and Biotechnology, Institute of Environmentally-Friendly Agriculture, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

약주 제조를 위한 저온 적응성 효모의 특성

서동준¹ · 여수환¹ · 문지영¹ · 정우진² · 조용식¹ · 백성열^{1*}

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효식품과

²전남대학교 농업생명대학 친환경농업센터, 농식품생명화학부

Abstract

The objectives of this study were to isolate and characterize low temperature adaptation yeast and to obtain suitable yeasts strains for manufacturing *Yakju*. In this study, we isolated 482 wild yeasts from fermented foods. Out of these, 5 yeast strains were selected based on increased growth at low temperature (15°C) and high β -glucosidase activity. To screen the aromatic level of isolates, media containing cerulenin and 5,5,5-trifluor-DL-leucine (TFL) were used. Y297 strain demonstrated tolerance against TFL and produced more than 13% alcohol. Y297 strain was identified a *Saccharomyces cerevisiae* based on the 26S rDNA gene sequences. Maximum cell growth was observed after 19 hr and 38 hr of incubation at 25°C and 15°C, respectively. The exponential phase was followed by a lengthy stationary phase, at 15°C, when the cells remained high viable. Y297 strain demonstrated tolerance against alcohol (10%), glucose (60%) and salt(NaCl, 8%). β -glucosidase and esterase activity in Y297 were higher than those of controls at 15°C. Overall, these results indicated that using wild yeast strain, isolated from fermented food, affects the chemical characteristics of the brewed *Yakju*.

Key words : low temperature, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yakju*, aromatic compounds

서 론

우리나라의 술은 보통 백미 형태를 주재료로 하여 술을 만드는데 찹쌀이나 멥쌀에 누룩을 발효제로 사용하여 당화와 발효가 동시에 진행되는 병행발효주이다. 위와 같은 방법으로 발효시킨 술미를 맑게 여과한 것을 약주라고 하였다. 약주를 생산하는 과정에서 효모는 알코올을 생성하는

발효과정에서뿐만 아니라 다양한 대사산물과 휘발성 향미 성분을 생산하는 등의 약주의 품질을 형성하는 중요한 역할을 한다(1-3). 온도는 술의 품질을 좌우하는 휘발성 향미 성분을 생산하는데 있어서 중요 인자이다. 와인 생산의 경우 저온발효(10~15°C)는 primary aroma의 손실을 방지할 수 있고 secondary aroma(ethyl과 acetate esters 등)의 합성을 증가시키는 것으로 알려져 있다(4-6). 또한 10~12°C의 온도에서의 발효는 ester의 생산을 75%이상 증가시킨다는 실험 결과도 알려져 있다(7). *Saccharomyces cerevisiae*의 경우, 단백질 전사, 세포막의 유동성, 효소 활성화와 같은 세포경로와 특성도 저온의 영향을 받는 것으로 보고되고 있다(8,9). 그러나 저온은 균 성장 정도를 저하되거나 이상발효를 일으키는 등의 좋지 못한 영향을 주기도 한다. 그렇기 때문에

*Corresponding author. E-mail : dunkbis@korea.kr

Phone : 82-63-238-3609, Fax : 82-63-238-3843

Received 2 February 2015; Revised 10 April 2015; Accepted 10 April 2015.

Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

가 포함된 0.1 M tris-HCl buffer(pH 7.0)을 넣고 35°C에서 반응시켜 효소활성을 확인하였다. 또한 5 M ρ -nitrophenyl- β -butyric acid(Sigma-Aldrich Co., St Louis, USA)를 기질로 하여 0.5 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)에서 40°C에서 반응 후 405 nm에서 활성을 확인하였다. 모든 효모는 YPD(25% glucose)배지에서 5일간 120 rpm을 배양하였고 분당 생성되는 1 μ mol의 ρ -nitrophenol을 1 unit으로 정의하여 실험하였다.

에탄올 발효능 분석

효모의 에탄올 생성량은 25% glucose가 포함된 YPD 액체배지에서 분리한 효모를 접종한 후 15°C에서 120 rpm으로 5일간 배양한 후 원심 분리한 상등액 100 mL를 증류하여 회수한 후 주정계를 사용하여 측정하였다(22).

효모의 형태적 분석

분리효모를 한천배지에 도말하여 2일간 25°C에서 한 후 순수 분리된 균주를 Karnovsky's 고정액을 처리한 후 50~100% alcohol을 이용하여 탈수시킨다. 탈수된 샘플을 CO₂ 가스를 이용하여 건조한 후 gold coating작업 후 전자주사현미경(scanning electron microscopy, SEM; H-2460N, Hitachi, Tokyo, Japan)을 이용하여 5,000~10,000배 배율을 사용하여 균 형태를 확인하였다.

통계처리

실험결과의 통계처리는 SAS program(9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 평균(mean)과 표준편차(SD)로 표시하였다. 통계분석은 분산분석(ANOVA)을 사용하였고 Tukey's Studentized Range test로 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

저온 적응성 효모의 분리

메주와 누룩 등의 발효식품에서 분리한 482균주를 이용하여 저온(15°C)에서 YPD 액체배지에 2일간 배양한 후 성장정도를 spectrophotometer로 확인하였다. Table 1은 분리한 균들 중에서 저온 성장 정도가 우수한 5균주와 시판효모 2종에 대해 알코올 생산능과 향기관련 효소 및 저항성을 확인한 결과이다. 저온에서의 생장은 시판효모인 control 1(Con1)과 비슷한 성장정도를 보이며 control 2(Con2)에 비해서는 우수하다는 것을 확인할 수 있었다. Chiva 등(5)의 보고에 의하면 *Saccharomyces* spp.의 경우 저온에서 높은 성장률을 보이는 균주는 *CSF1*, *HSP104*, *TIR2* 유전자가 과발현되는 현상이 보고되고 있다. 저온적응성 균주 분리 시위와 같은 유전자의 발현 특성을 확인할 수 있다면 좀 더 빠르고 쉽게 균주를 분리할 수 있을 것이다. 알코올 생산능은 Y605 균주가 14.8%로 가장 높은 농도를 보였으며 Con1과 Y205, Y297, Y624는 비슷한 농도가 관찰되었고 Con2와 Y389는 8~9%로 가장 낮은 알코올 생산능을 보였다. Baek 등(1)의 논문에서 25°C, 48시간 배양 시 *S. cerevisiae*의 알코올 생성능은 7.3~9.5%의 생성능을 보였고 non-*S. cerevisiae*의 알코올 생성능은 2.2~4.7%로 나타났다. 온도와 배양시간의 차이는 있지만 대체적으로 *S. cerevisiae*의 알코올 생성능이 non-*S. cerevisiae*에 비교하여 2배 가까이 높은 것으로 조사되었다. 하지만 시판효모인 Con2의 경우, 이 균주가 *S. cerevisiae*인 것을 감안하면 Con2가 알코올 생성능과 저온적응성에서도 낮은 결과가 나타났다. 이 결과를 통해 Con2는 저온에서 생육성장 뿐만 아니라 발효능이 감소되어지는 것으로 생각된다. β -Glucosidase의 경우, 전반적으로 모든 효모에서 높은 활성을 보였다. 이 효소는 비휘발성 향기성분을 생산하는데 있어 중요한 역할을 한다고 알려져

Table 1. Screening wild type yeasts from fermented foods that are adapted to low temperature (15°C) and tolerant against aromatic compounds

Strains	Cell growth ¹⁾ (O.D ₆₀₀ , 15°C)	Ethanol contents ²⁾ (%)	β -Glucosidase ³⁾	Cerulenin ⁴⁾	TFL ⁴⁾	H ₂ S production ⁵⁾
Con1	1.256±0.031 ^a	13.7±0.7 ^b	++	-	-	+
Con2	0.958±0.033 ^b	9.1±0.7 ^c	++	-	-	+
Y205	1.172±0.063 ^a	13.5±0.3 ^b	+++	-	-	+
Y297	1.183±0.070 ^a	13.1±0.6 ^b	+++	-	+	-
Y389	1.189±0.034 ^a	8.1±0.1 ^c	+++	+	+	+++
Y605	1.252±0.010 ^a	14.8±0.2 ^a	+++	-	+	+
Y624	1.194±0.050 ^a	13.4±0.8 ^b	+++	-	-	-

^{1),2)} Values are mean±SD (n=3). Means with the same letter in each row are not significantly different by Tukey's Studentized Range test (p<0.05).

³⁾ Positive result clear or fluorescence zone of more than 1 mm margin edge of colony : +, 1 mm; ++, 2 mm; +++, 3 mm; -, negative result.

⁴⁾ Tolerance symbols; + growth; - no growth.

⁵⁾ -, no color; +, light brown; dark brown.

있는데 *S. cerevisiae*의 경우 pH4 그리고 40~50℃에서 높은 활성을 보인다고 보고되었다(23). 또한 non-*S. cerevisiae*에서도 *Candida stellata*, *Candida hellenica*, *Kloeckera apiculata* 균주들에서 β-glucosidase의 활성이 있음을 확인할 수 있다(24). Y389 균주는 ceruleni과 TFL에 대한 저항성을 모두 확인 할 수 있었고 Y297, Y605 균주는 TFL에 대한 저항성을 관찰할 수 있었다. 이취에 관련된 황화수소 생산능은 Y389 균주가 가장 높은 것으로 나타났다. Table1의 결과를 토대로 Y389의 경우 저온적응성과 향기인자의 활성이 강했지만 알코올 생성능이 낮고 이취가 강하기 때문에 약주 생산에 적합하지 않는 것으로 판단된다. Y297 균주는 알코올 생성능이 높고 황화수소 생산도 거의 보이지 않으며 향기인자의 활성 또한 확인되어 Y297 균주의 특성을 우선적으로 조사하였다.

선발효모의 동정 및 형태적 분석

Fig. 1은 선발된 효모 균주의 26S rRNA 유전자의 D1/D2 부위 염기서열 분석 결과를 나타내었다. Y297 균주는 *Saccharomyces cerevisiae*로 동정되어졌으며 Fig. 2는 출아 중인 *S. cerevisiae* Y297 균주의 형태를 SEM을 이용하여 확인한 결과이다.

선발효모의 내성

Fig. 3은 선발된 Y297균주에 대등(5)의 실험에서도 시판 효모인 *S. cerevisiae* QA23 역시 25℃에 비해 장기간 정지상으로 상하여 여러 환경조건에서 Bioscreen C를 이용하여 48~72시간까지의 균 성장정도를 조사한 결과이다. Fig. 3A는 온도에 따른 균 성장도를 확인한 결과로써 25℃에서

19시간이 경과했을 때 정지상으로 접어들어 38시간에 정지상으로 접어드는 15℃에서보다 빠른 성장 속도를 보였다. 그렇지만 저온 정지상에서 세포질량의 값은 15℃에서 보다 높은 흡광도를 확인할 수 있다. Chiva 등(5)의 실험에서도 시판효모인 *S. cerevisiae* QA23 역시 25℃에 비해 장기간 stationary phase상태를 유지하고 높은 발효능을 보였다. 그에 반해 25℃에서는 24시간 만에 정지상에 도달했지만 짧은 시간에 성장곡선이 급격히 감소하는 곳으로 보고되었다. 알코올 내성(Fig. 1B)의 경우 Y297 균주는 10% 알코올 함량에서도 0.4이상의 흡광도를 보여준다. *S. cerevisiae* K-701 균주를 높은 알코올 농도에 노출 후 생존율을 확인한 실험에서 급격하게 균 생존율이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다(25). 내당성에 관한 실험인 Fig. 3C의 경우는 glucose 60%에서 0.5정도의 흡광도를 나타내며 내염성 실험인 Fig. 3D에서는 NaCl 8%에서 흡광도 0.7를

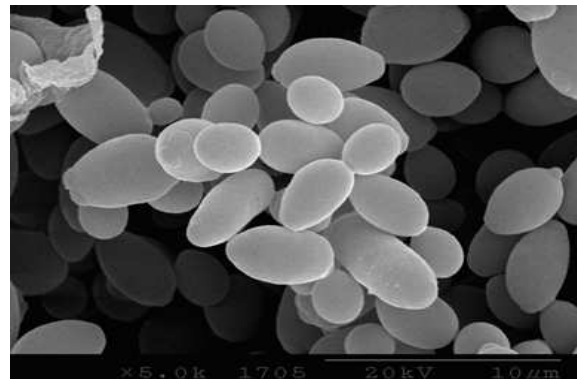


Fig. 2. Scanning electron microscope micrograph of budding yeast cells, *Saccharomyces cerevisiae*.

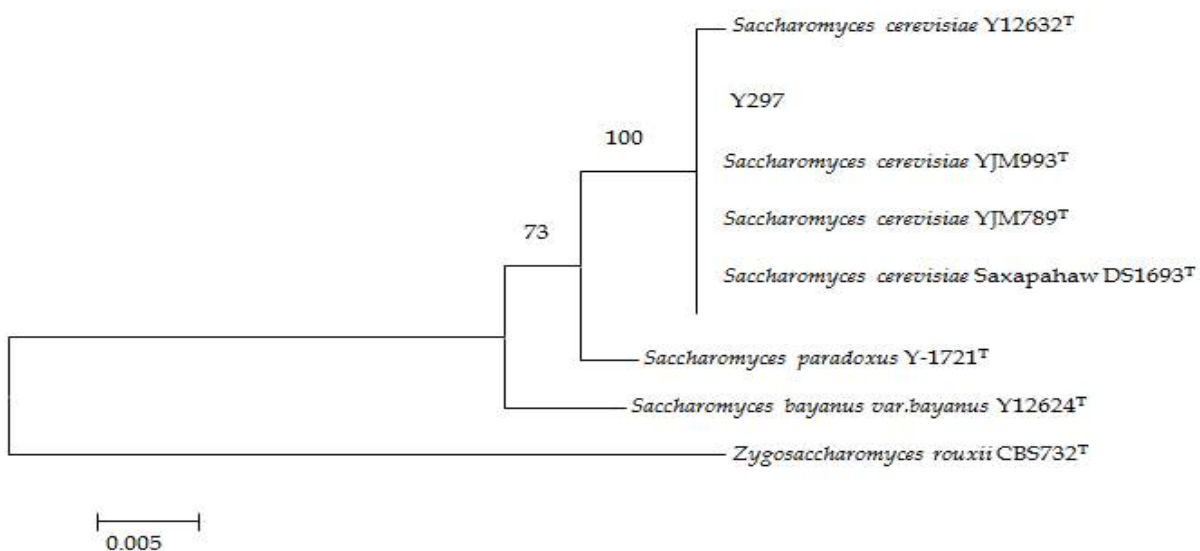


Fig. 1. Phylogenetic relationship between *Saccharomyces cerevisiae* strain Y297 and other previously reported strains based on their 26S rDNA sequences. Evolutionary distances were calculated according to the Kimura2-parameter method.

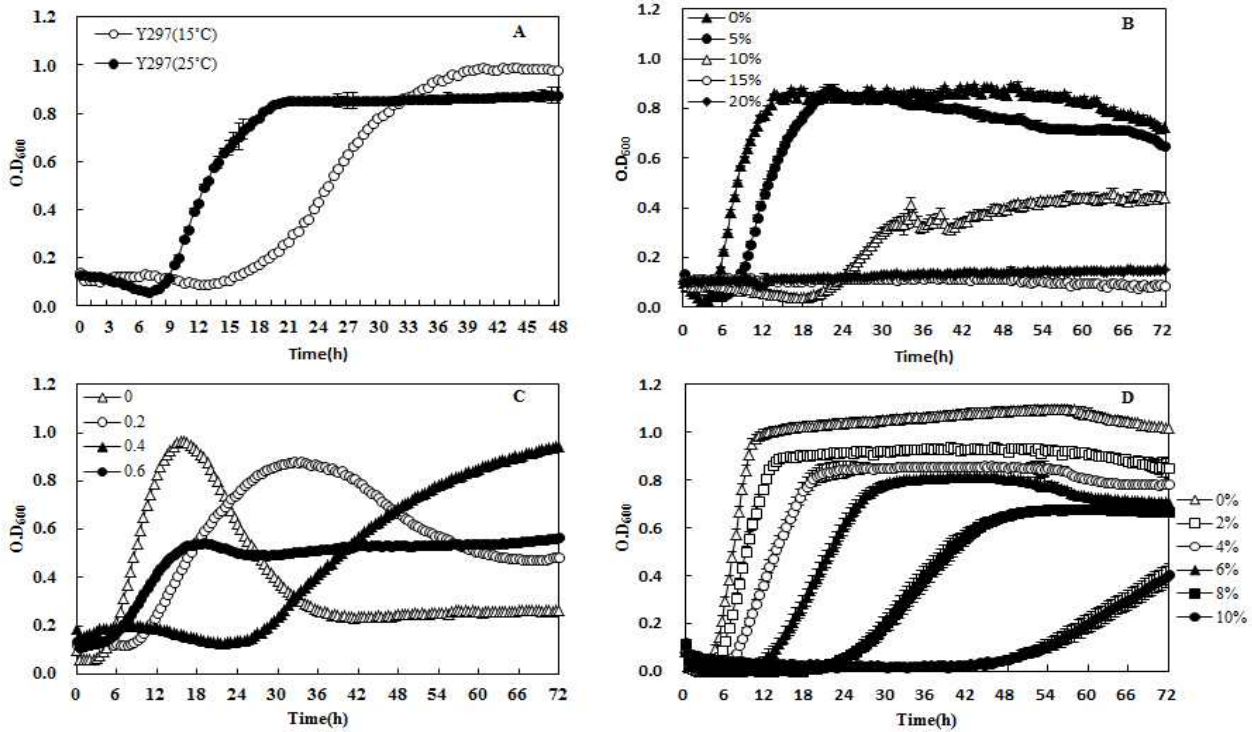


Fig. 3. Changes in yeast cell growth under different fermentation conditions. A: Temperature (15°C and 25°C), B: Alcohol tolerance (0~20%), C: Glucose tolerance (0~60%), D: Salt tolerance (NaCl, 0~10%).

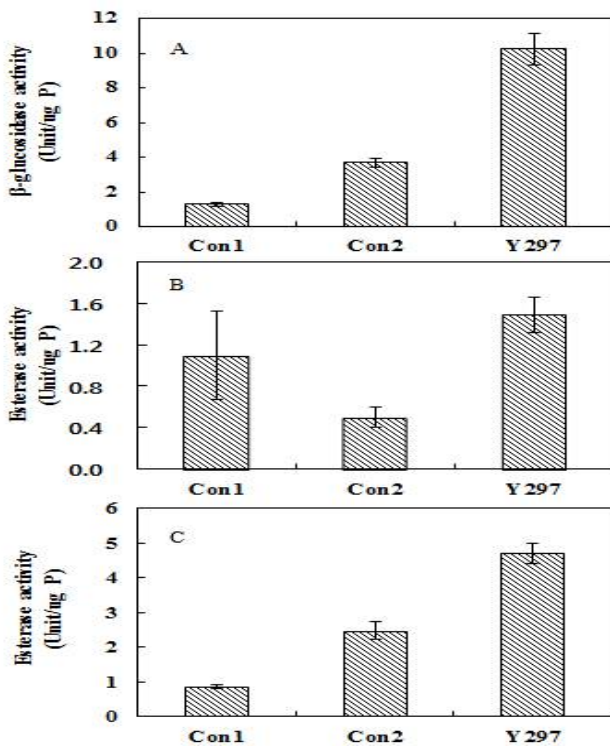


Fig. 4. β -glucosidase and esterase activity in the cytoplasm fractions of yeasts based on the release of p -nitrophenol from p -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (A), p -nitrophenyl acetate (B) and p -nitrophenyl- β -butyric acid (C).

유지한다. Wu 등(26)의 내염성 실험에서 염 감수성 효모인 *S. cerevisiae* AXT3은 25 mM의 NaCl에서 급격히 균수가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 위 결과를 통해 Y297이 저온적응성을 가지고 있으며 여러 환경 조건에 대한 내성을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

선발효모의 효소활성

저온(15°C)에서 배양한 효모의 세포질 단백질을 추출하여 향기성분과 관련된 효소인 β -glucosidase와 esterase의 활성을 확인했다(Fig. 4). Y297의 β -glucosidase의 활성(Fig. 4A)은 시판효모들보다 2.5배 높은 활성을 확인할 수 있었다. Hernández 등(23)의 실험에서 p -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside을 기질로 하여 활성을 측정된 결과, 균 생장 속도와 비례하여 활성이 높아지는 것을 확인할 수 있었고 배양 후 10시간 이후에 활성이 점점 감소되어진다고 보고하고 있다. 또한 상등액보다 균체를 이용한 활성 실험에서 좀 더 높은 활성이 관찰되었다. p -nitrophenyl acetate를 기질로 하여 실험한 esterase의 활성(Fig. 4B)은 Con2에 비해 높은 활성을 보였고 p -nitrophenyl- β -butyric acid를 기질로 하여 실험 Fig. 4C 또한 시판효모들보다 높은 esterase 활성을 보였다. 위의 결과를 통해 발효식품에서 선발된 Y297 균주는 대조구에 비해 향기성분 관련된 효소의 높은 활성을 관찰할 수 있었다. 이러한 점은 약주제조에 있어서 유용한

중균자원 될 수 있는 가능성이 있을 것으로 판단된다.

요 약

발효식품에서 분리한 효모 482균주의 저온적응성 및 알코올 생성능을 확인하고 β -glucosidase와 cerulenin, TFL저항성을 실험하여 저온적응성이 우수하고 향기성분 활성이 좋은 Y297 균주를 선발하였다. 26s rRNA 염기서열을 분석한 결과, Y297은 *Saccharomyces cerevisiae*로 동정되었다. 선발된 균주는 15°C에서는 25°C에 비해 정지상으로에 도달하는 시간은 오래 걸리지만 보다 많은 균수를 유지하였다. YPD 액체배지에 알코올 농도 10%와 glucose 60% 그리고 NaCl 8%가 포함된 배지에서 내성을 확인할 수 있었다. YPD(glucose 25%)배지에서 배양한 효모의 세포질 단백질을 추출하여 β -glucosidase와 esterase의 활성을 측정된 결과 시판효모보다 우수한 활성을 나타냈다. 이러한 결과를 통해 선발된 Y297는 약주제조에 적합한 중균효모로써의 가능성을 확인할 수 있었다.

Acknowledgment

This work was carried out with the support of 'Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ00999001)' Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Baek SY, Lee YJ, Kim JH, Yeo SH (2015) Isolation and characterization of wild yeasts for improving liquor flavors style and quality. *Microbiol Biotechnol Lett*, 43, 1-9
- Lee SR (1986) *Korean Fermentation Foods*. Eeha women's university press, Seoul, Korea, p 224-294
- Shin KR, Kim BC, Wang JY (1999) Characterization of Yakju prepared with yeasts from fruits. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 28, 794-800
- Beltran G, Rozés N, Mas A, Guillamón JM (2007) Effect of low-temperature fermentation on yeast nitrogen metabolism. *World J Microbiol Biotechnol*, 23, 809-815
- Chiva R, Lopez-malo M, Salvado Z, Mas A, Guillamón JM (2012) Analysis of low temperature-induced gene (LTIG) in wine yeast during alcoholic fermentation. *FEMS Yeast Res*, 831-843
- Torija MJ, Rozés N, poblet M, Guillamón JM, Mas A (2003) Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol*, 80, 47-53
- Engan S, Aubert O (1977) Relations between fermentation temperature and the formation of some flavour components. In: 16th European brewery convention congress, Amsterdam, Netherlands, p 591-607
- Schade B, Jansen G, Whiteway M, Entian KD, Thomas DY (2004) Clod adaption in budding yeast. *Mol Biol Cell*, 15, 5492-5502
- Aguilera J, Randez-Gil F, Prieto JA (2007) Cold response in *Saccharomyces cerevisiae* : new functions for old mechanisms. *FEMS Microbiol Rev*, 31, 327-341
- Lilly M, Lambrechts MG, Pretorius IS (2000) Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl Environ Microbiol*, 66, 744-753
- Mason AB, Dufour JP (2000) Alcohol acetyltransferase and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast*, 16, 1287-1298
- Cauet G, Degryse E, Ledoux C, Spagnol R, Achstetter T (1999) Pregnenolone esterification in *Sacchchromyces cerevisiae*. A potential detoxification mechanism. *Eur J Microchem*, 261, 317-324
- Fujii T, Nagasawa N, Iwamatsu A, Bogaki T, Tamai Y, Hamachi M (1994) Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene. *Appl Environ Microbiol*, 60, 2786-2792
- Fukuda K, Kiyokawa Y, Yanagiuchi T, Wakai Y, Kitamoto K, Inoue Y (2000) Purification and characterization of isoamyl acetate-hydrolyzing esterase encoded by the IAH1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* from a recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biothchnol*, 53, 596-600
- Saerens SMG, Verstrepen KJ, Van laere SDM, Voet ARD, Van Dijck P, Delvaux FR (2006) The *Saccharomyces cerevisiae* *EHT1* and *EEB1* genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *J Biologic Chem*, 281, 4446-4456
- Verstrepen KJ, Van Laere SDM, Vanderhaegen BMP, Derdelinckx G, Dufour JP, Pretorius IS (2003) Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes *ATF1*, *Lg-ATF*, and *ATF2* control the formation of a broad range

- of volatile esters. *Appl Environ Microbiol*, 69, 5228-5237
17. Ichikawa E, Hosokawa N, Hata Y, Abe Y, Suginami K, Imayasu S (1991) Breeding of sake yeast with improved ethyl caproate productivity. *Agric Biol Chem*, 55, 2153-2154
 18. Bussry H, Umbarger HE (1970) Biosynthesis of branched chain amino acids in yeast: a trifluoroleucine-resistant mutant with altered regulation of leucine uptake. *J Bacteriol*, 103, 286-294
 19. Comitini F, Gobbi M, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, Ciani M (2011) Selected non-*Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol*, 28, 873-882
 20. Grover AK, Macmurche DD, Cushley RJ (1977) Studies on almond emulsion β -D-glucosidase. I. Isolation and characterization of a bifunctional isozyme. *Biochem Biophys Acta*, 482, 98-108
 21. Frank B, Björn D, Sabrina R, Christian Z, Helmut S, Manfred JS (2006) Cell surface expression of bacterial esterase A by *Saccharomyces cerevisiae* and its enhancement by constitutive activation of the cellular unfolded protein response. *Appl Environ Microbiol*, 72, 7140-7147
 22. Jung HK, Park CD, Park HH, Lee GD, Lee IS, Hong JH (2006) Manufacturing and characteristic of Korea traditional liquor, *Haeryangju* prepared by *Saccharomyces cerevisiae* HA3 isolated from traditional Nuruk. *Korean J Food Sci Technol*, 38, 659-667
 23. Hernández LF, Espinosa JC, Fernández-González M, Briones A (2003) β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *Int J Food Microbiol*, 80, 171-176
 24. Strauss MLA, Jolly NP, Lambrechts MG van Rensburg P (2001) Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Food Microbiol*, 28, 873-882
 25. Yamaoka C, Kurita O, Kubo T (2014) Improved ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures with *Kluyveromyces lactis* on high-sugar fermentation. *Microbiol Res*, 169, 907-914
 26. Wu G, Wang G, Ji J, Li Y, Gao H, Wu J, Guan W (2015) A chimeric vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene evolved by DNA family shuffling confers increased salt tolerance in yeast. *J Biotechnol*, 203, 1-8