

酵母의 環境耐성에 對하여(第2報)

— 菌體의 成分含量과 耐熱性 및 耐乾性과의 關係 —

林 億 圭 · *金 俊 鎬

(味元株式會社 · *서울大學校 自然科學大學 植物學科)

A. Study on Environmental Tolerance of Yeast *S. cerevisiae*

— II Special Reference to Effects of Constituents of Protein and Trehalose on Dry and Thermal Tolerance. —

LIM, Uck Kyu and *Joon Ho KIM*

(Miwon Co. Ltd., *Dept. of Botany, College of Natural Science, Seoul National University)

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae strain M. was cultured in a molasses-containing media with different amounts of phosphorous and nitrogen sources. The effects of constituents of the cell on the functional activity as well as sensitivity of it were investigated, the results obtained being summarised as follows:

Both the thermotolerance and dry tolerance of the yeast cell were higher when the more carbohydrate and trehalose were present in the yeast cell.

During the drying, the rate of dead cell was noted increasing and the fermentability decreasing, but it was more remarkable at early stage of the decreasing rate of drying, and at the same time increasing rate of dead cell and decrease of fermentability were more remarkable in the yeast cell containing much protein. In this case the speed of drying was slower.

The trehalose content in the yeast cell increased during early stage of the drying and this increase was higher when content of trehalose and carbohydrate in the initial yeast cell was relatively high.

緒 論

Brandt(1941)는 酵母菌體를 熱處理하는 경우 自己呼吸이 增加되고 trehalose가 減少되는 것은 trehalose가 内部代謝의 energy 源으로 轉換되기 때문일 것이라고 하였으며 Payen(1949)은 酵母菌體의 乾燥中 trehalose의 增加를 確認한 바 있다. Stewart등(1950),

Sato등(1953)과 Sato(1967)는 trehalose를 一種의 貯藏性糖으로 보고, Moses등(1955)과 Fukuhara등(1956)은 trehalose는 酵母의 内部代謝에서 貯藏性 또는 調節體로서의 役割을 하는 것으로 보았다.

酵母의 耐熱성에 關하여 Anderson등(1951)은 酢酸添加液에서 White(1954)는 磷酸緩衝液에서, Ludecke등(1966)은 麥酒와 蜂蜜中에서, Shibasaki(1974)는 食鹽溶

液中에서 各已 酵母의 熱處理에 依한 死滅 狀態를 實驗 報告한 바 있다. White(1954)는 啤酒의 死滅臨界溫度를 54~56°C로 記載한 바 있다. Scott(1957)는 微生物의 耐熱性은 菌種에 따라 따라 다르나 Aw値와 相關性이 있음을 報告하였고, Murrall등(1957)과 Calhoun등(1966)은 榮養培地の Aw値를 食鹽이나 glucose로 調整한 경우 *E. coli*등의 耐性이 增加됨을 確認하였으며 Shibasaki(1974)는 酵母의 耐熱性은 大體로 *E. coli*와 같다고 하였다. 이 밖에도 Sattler(1969), Walker등(1977)의 많은 研究報告가 있는 바 微生物의 耐熱機構는 複雜하여 菌種, 菌株, 培養條件, 發育의 程度, 熱處理前歷條件, 熱處理時의 培地和 熱處理後의 培地組成 및 條件 熱處理操作條件等, 細胞

內外의 諸要因에 따라 差를 알 수 있다. 本研究에서는 菌體의 成分含量과 耐熱性 및 乾燥耐性에 關하여 實驗 課查하였다.

材料 및 方法

1. 材 料

筆者等の 연구실에서 분리한 *Saccharomyces cerevisiae* M株를 前報(林 등 1978)에서와 같은 要領으로 培養하여 얻은 菌體를 유리병에 다져넣고 密封하여 黑色紙로 光線을 遮斷하고 0~1°C의 冷藏庫에 保管하면서 使用하였다. 供試前에 F₁₀ 醱酵力과 trehalose등 試料의 變化有無를 確認하였고 評料의 保管은 3日을 超過하지 않았다. 供試材料의 成分含量은 Table. 1과 같다.

Table 1. Constituents of compressed yeast(% of dry base).

Constituents	Compressed yeast				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
Moisture*	66.0	67.0	68.5	69.0	71.0
Protein	37.5	40.0	45.8	49.4	51.8
Amino-N	0.45	0.54	0.63	0.75	0.85
P ₂ O ₅	1.77	1.90	2.20	2.50	3.30
Carbohydrate	37.0	34.5	31.0	29.5	25.0
Trehalose	9.0	7.0	5.5	4.7	3.5
RNA	2.1	2.4	3.8	4.0	4.5

* % of wet base

2. 實驗方法

1) 耐熱性實驗

冷藏庫에 保管하였던 酵母菌體를 0~1°C의 生理食鹽水에 懸濁시켜 菌濃度가 10⁷이 되게 한 後 다음과 같은 두가지 方法으로 熱處理를 하였다.

A) 菌懸濁液을 15±1°C의 Water bath에 넣고 30分間에 徐徐히 30°C까지 加溫하였다. 이菌液 1ml를 各各의 處理溫度로 加溫된 生理食鹽水 9ml가 들어있는 試驗管에 옮겨 넣고 一定時間 熱處理를 하였다.

B) 加溫하지 않은 菌懸濁液(0°C±1°C) 1ml를 各各의 處理溫度로 加溫된 生産食鹽水 9ml가 들어있는 試驗管에 옮겨 넣고 一

定時間 熱處理 하였다.

熱處理된 菌液 1ml를 麥芽汁寒天培地 (Table. 2)에서 混合平板法으로 30°C, 48時間 培養後에 發育한 colony를 計數하고 熱處理溫度 30°C에서의 生存菌數에 對한 百

Table 2. Composition of slant agar media

Malt extract(DIFCO)	5.0%
Sucrose	1.0%
Yeast extract	0.3%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.3%
KH ₂ PO ₄	0.2%
MgSO ₄	0.05%

* pH of media 4.5±0.1

分率로서 耐熱性的 程度를 表示하였다.

2) 乾燥實驗

供試酵母菌體의 含水率을 71%로 調整하여 直徑 1.5mm의 糸狀으로 壓出한 後 이것을 Pilot dryer(300mmφ×1000mm L, 2~4 r. p. m 可變傾斜 5度, 向流通風式)에서 Fig. 3에 圖示한 條件으로 乾燥處理를 하였다.

① 死滅菌數의 測定: methylene blue 染色法에 依하여 試料의 死菌數를 計數하여 두고 乾燥過程中的 試料를 30°C의 生理食鹽水에 懸濁시킨 後 Thoma's Haemocytometer로 全菌數를 測定하였다. 이 懸濁液 1ml를 麥芽

汁寒天培養地에서 混合平板培養數 生菌數를 計數하여 死滅菌數를 算出하였다.

② 醱酵力 水分含量: Trehalose, P₂O₅, 蛋白質等 菌體의 成分含量, 測定은 前報(林 등 1978)에서와 같은 要領으로 實施하였다.

結果

1. 耐熱性

Table. 1에 明示한 成分含量을 가진 菌體를 徐徐히 加溫하여 熱處理한(溫度適應區) 結果를 Fig. 1에, 急激한 熱處理를(急速處理區)한 結果를 Fig. 2에, 生存率로서 圖示하였다.

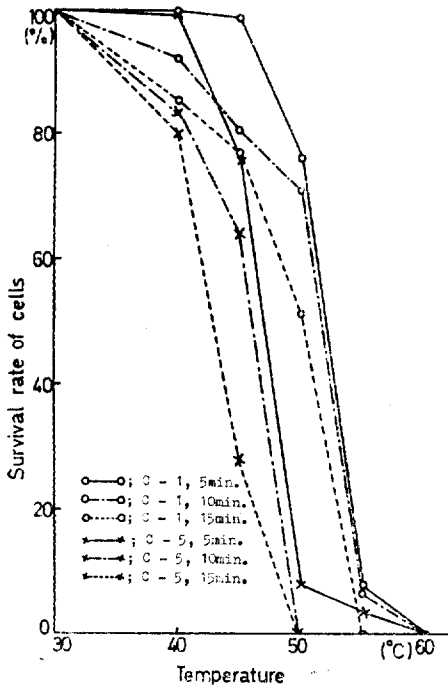


Fig 1. The thermal tolerance of yeast cell raising gradually to given temperature.

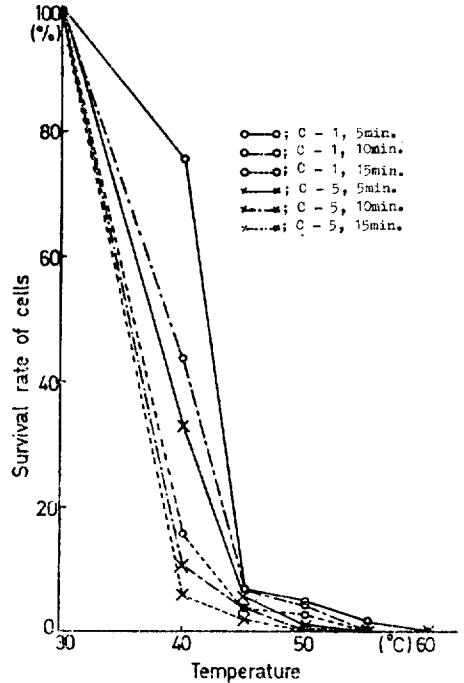


Fig 2. The thermal tolerance of yeast cells treated rapidly at high temperature.

2. 乾燥過程中的 變化

乾燥過程中的 含水率의 減少, 死滅菌數의 增加, 醱酵力의 變化 및 trehalose 含量의 變化等を 調査한 結果는 다음과 같다.

1) 含水率의 減少: 每 2時間마다 含水量을 測定하여 蒸發含水量에 對한 殘存水分量의 百分率과 蒸發水分量의 百分率(蒸發率)

等を 表示한 것이 Table. 3이며 이를 각각 Fig. 4와 Fig. 5에 圖示하였다. 乾燥開始後 6時間까지는 試料의 差가 나타나지 않았으나 6時間 後에는 差가 나타나서 8時間부터 12時間에 걸쳐 顯著한 差를 보였다. 그러나 그뒤에는 試料間의 含水率差가 좁혀져서 24時間에는 그 差가 적은 것을 볼 수 있다. 그 理由는 乾燥時間이 길어짐에 따라 熱風乾燥

Table 3. Decrease of moisture contents and drying rates during dry

Drying time(Hrs)		0	2	4	6	8	10	12	24
Wet basis % of moisture	C-1	71.0	65.0	56.5	43.5	33.0	22.0	12.0	8.0
	C-5	71.0	65.0	56.5	43.5	34.5	28.0	26.0	10.5
Remain moisture % in cell mass on start moist.	C-1	100.00	75.80	53.05	31.45	20.12	11.52	5.57	3.55
	C-5	100.00	75.80	53.05	31.45	21.50	15.90	14.35	4.80
Drying rate; Evaporated moisture on start moisture	C-1	0.0	24.2	22.8	21.6	11.3	8.6	6.0	2.0
	C-5	0.0	24.2	22.8	21.6	10.0	5.6	1.4	9.6

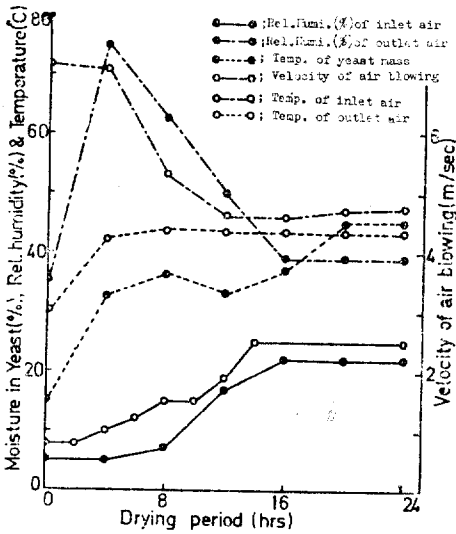


Fig 3. Conditions of drying procedure.

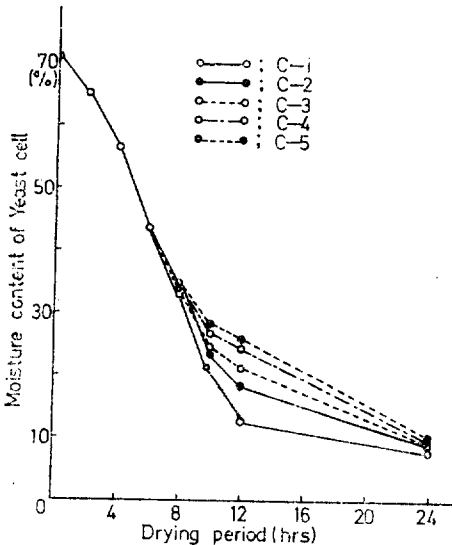


Fig 4. Decreasing trends of moisture content during yeast drying.

의 限界點에 가까워진 까닭이라 생각된다.

本乾燥處理에 있어서 6時間까지로 恒率乾燥期, 8時間 前後를 恒率乾燥期에서 減率乾燥期으로의 轉換期(減率乾燥期 第1段階). 그以後를 減率乾燥期으로 볼 수 있을 것이다.

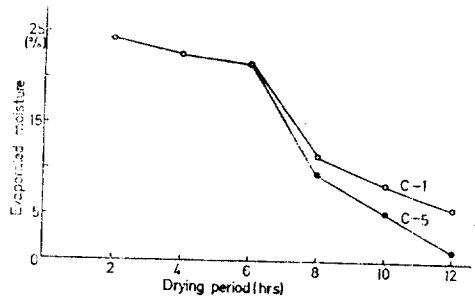


Fig 5. Drying rate of yeast cell.

2) 菌體死滅率의 增加: 乾燥中の 菌死滅率을 經時的으로 調査한 結果는 Fig. 6과 같으며 乾燥開始로부터 8時間을 前後해서 顯著的한 增加를 보이고 있다.

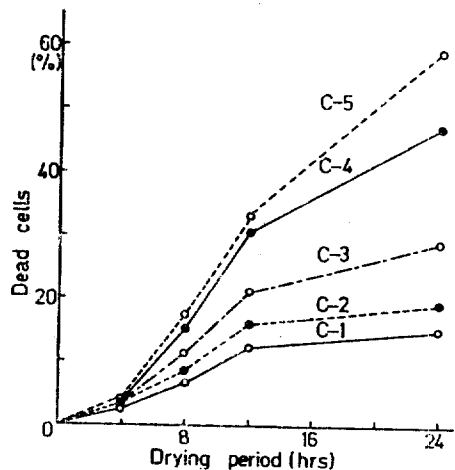


Fig 6. Increasing trends of dead cells during yeast drying.

3) 醱酵力의 變化: 乾燥中인 試料의 CO₂ 發生量(F₁₀)을 始發供試菌의 CO₂ 發生量에 對한 百分率로서 圖示한 結果는 Fig. 7과 같았다. 乾燥初期의 醱酵力의 增加로 溫度上昇으로 인한 一時的인 理象에 不過하다. 醱酵力은 8時間을 前後하여 顯著한 減少를 보였다.

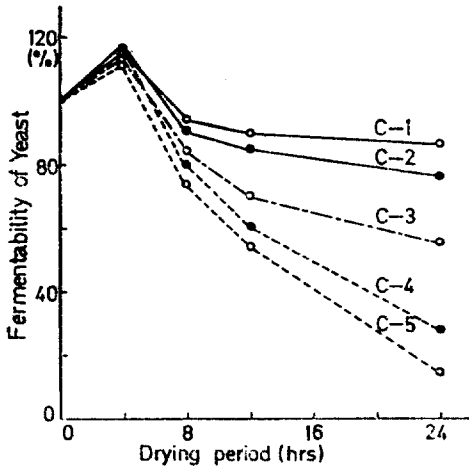


Fig. 7. Changes of fermentability(F₁₀) during yeast drying.

4) Trehalose含量的 變化: 乾燥中, 菌體內의 trehalose 含量變化를 經時的으로 調査한 結果를 圖示하며 Fig. 8과 같았다. 恒率乾燥期에 trehalose의 增加가 있었으나 試料

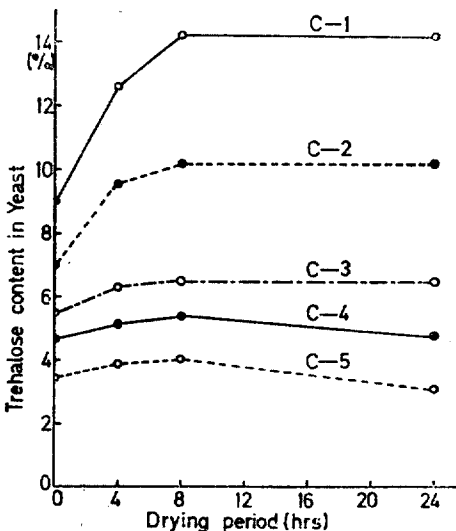


Fig 8. Changes of trehalose content during yeast drying.

間의 差가 甚했다.

考 察

1. 耐熱性

熱處理實驗에서 溫度適應의 機會를 주어 熱處理를 한 경우(Fig. 1)가 急激히 熱處理한 경우(Fig. 2)보다 菌死滅率이 낮음은, Tsuchido(1974)가 *E. coli* K-12株의 熱處理 實驗에서 얻은 結果와 一致하는 傾向이었다. 試料間의 差로 보면 이 두 경우 모두가 菌體內의 炭水化合物과 trehalose의 含量이 많고, 蜜白質과 Amino-N의 含量이 적을 수록 同一條件下에서의 死滅率이 낮음을 보여준다. 炭水化合物과 trehalose의 含量이 많은 경우 이들이 特殊環境下에서의 細胞內의 代謝에 調節體로서 役割을 하는 것도 생각할 수 있고(Moses 등, 1955; Fukuhara 등 1956) 또 熱減受성이 큰 蛋白質과 蛋白質을 主成分으로 하는 酵素等の 含量이 적은 데에도 그 理由를 찾아볼 수 있을 것이다.

2. 乾燥內性

酵母菌體의 乾燥過程中 水分含量的의 減少에 따른 變化를 보면(Table. 3, Fig. 3, Fig. 5) 5個의 試料區가 다 같이 乾燥開始로 부터 8時間에 水分蒸發率의 低下(Fig. 5), 醱酵力의 低下(Fig. 7) 및 菌死滅率의 增加(Fig. 6)等の 現象이 甚하게 나타났으며 試料間의 差도 顯著히 나타났다. 이와같은 現象은 10~12時間까지 持續되었으나 그 뒤부터 차츰 鈍化됨을 보여 주고 있다.

Licari 등(1974)은 脫脂粉乳의 乾燥時에 *Salmonella*菌이 減率乾燥期에서 菌體品溫은 上昇했으나 菌의 死滅이 없음을 調査하였고, Sugama 등(1974)은 麴乾燥時 麴子表面에 附着된 麴子菌의 胞子와 乳酸菌이 恒率乾燥期에 死滅速度가 빨랐지만 減率乾燥期에서는 늦었음을 報告하였다. 이들의 研究結果와 本研究에서의 調査結果가 大體로 같은 傾向임을 찾아볼 수 있다. 그러나 本實驗에서와 같이 恒率乾燥期에서 減率乾燥期로의 轉換期로 볼 수 있는 減率乾燥期 第

1 段階에서 이들의 變化가 큰은 興味로운 事實이다.

酵母菌體의 乾燥中 水分蒸發現象을 考察하면, 먼저 菌體塊의 表面으로부터 水分이 蒸發하게 되고 中心部의 水分은 毛細管現象에 依하여 表層으로 移動擴散될 것이다. 이 경우 細胞外水分(細胞間隔水)이 移動하고 菌體塊는 外部와의 水分平衡을 이루려는 傾向이 생기며 菌體塊內에서는 細胞間隔의 水分分壓과 細胞內의 水分分壓間에 差가 생기게 되므로 細胞內의 水分이 細胞壁을 透過하여 밖으로 移動하게 될 것이다. 이때 細胞內의 遊離수가 먼저 透過移動하게 되고 다음으로 結合수가 離脫되어 細胞外로 透過移動하게 될 것이다. 이와 같이 菌體塊의 內, 外와 細胞의 內, 外間의 水分分壓(蒸氣壓)의 平衡을 이루려는 現象이 繼續되므로 乾燥가 進行될 것이다. 이런 過程이 進行됨에 따라 細胞는 細胞內의 遊離水, 다음으로 結合水を 잃게 될 것이다.

Table. 3에서 6時間, 8時間 및 10時間의 含水率을 보면 C-1의 경우 43.5~33.0~22.0이며 始發含水量에 對한 殘存水分率이 31.5~20.1~11.5임에 比하여 C-5의 경우는 각각 43.5~34.5~28.0%, 31.5~21.5~15.9%를 보이고 있다. Montgomery 등(1945)은 壓搾酵母의 全水分 70~75%에 對하여 細胞內의 水分은 77%라 하고, George(1967)는 64.3%라고 한 것을 볼 때 乾燥開始 8時間前後의 殘存含水率은 이보다 훨씬 낮은 狀態에 있다. 이 時點에서의 酵母細胞는 細胞內水分을 相當히 잃은 狀態下에 있으며 이때가 結合水の 離脫이 進行되고 있는 過程에 있다고 보아야 할 것이다. 따라서 이 時期에 水分蒸發率의 低下, 菌死滅率의 增加 醱酵力의 低下가 크게 나타나게 되며 試料間의 差도 나타나게 되는 것으로 생각된다. 試料間의 差를 보면 炭水化合物과 trehalose의 含量이 많고 蛋白質等의 含量이 적은 菌體인 C-1은 殘存含水率이 적음에 比하여 C-5의 炭水化合物과 trehalose 含量이 적고 蛋白質等의 含量이 많은 경우는 殘存含水率

이 높음을 볼 수 있다. C-1의 경우가 C-5의 경우에 比하여 乾燥過程中的의 耐性이 強하게 나타나고 있음은 炭水化合物과 trehalose의 含量이 많음으로 細胞內에서의 調節力이 強하고 蛋白質이 적음으로써 細胞內水分 即 結合水가 比較的 적게 含有되어 乾燥速度가 빠를뿐만 아니라 乾燥로 因한 脫水刺戟을 적게 받는 데에 基因되는 結果라고 생각된다.

3. Trehalose含量的 變化

酵母乾燥中 trehalose含量的 增加는 乾燥初期에 일어남을 볼 수 있다(Fig. 8). 乾燥開始後 4時間까지는 增加率이 컸으나 차츰 鈍化되어 8時間以後에는 全然增加가 없었다. 이는 細胞內의 水分減少로 內部代謝가 中止되기 때문이라고 본다. 試料間의 差를 보면 蛋白質과 Amino-N의 含量이 적고 炭水化合物과 trehalose의 含量이 많은 경우 일수록 Trehalose含量的 增加가 두드러졌다. 특히 C-4와 C-5의 경우 初期에는 約干的 増力傾向을 보였으나 차츰 減少하는 傾向을 보임은 C-1과 C-2의 경우와는 對照的인 結果이다.

酵母乾燥中 trehalose含量的 增加는 Payen (1949)의 報告와 一致하는 結果이지만 C-4나 특히 C-5의 경우는 다른 樣相을 보였다. 壓搾酵母의 貯藏中 溫度가 높을수록 trehalose含量的 減少速度는 빨랐으나 炭水化合物 및 trehalose의 含量이 많고 蛋白質과 Amino-N의 含量이 적은 경우는 減少速度가 완만하며(林 등 1978; Stewart, 1950; Sato, 1953) 熱處理時 酵母의 細胞內呼吸이 增加하고, trehalose가 減少하며(Brandt, 1941), 嫌氣的醱酵時 N-化合物이 存在할 때에 trehalose가 急速히 分離하나 N-化合物이 存在치 않는 경우는 다시 再合成 된다(Trevelyan, 1956) 이러한 實實을 볼 때 비록 乾燥中이며 細胞內의 代謝만이 일어나고 있는 경우이긴 하지만 酵母菌體의 內部代謝가 活潑히 일어날 수 있는 段階에서는 마치 酵母菌體의 貯藏이나 嫌氣的醱酵 등에서와 같은 現狀으로 解釋할 수 있을 것이다

菌體內에 蛋白質과 amino-N等과 같은 N-化合物의 含量이 많은 C-4와 C-5의 경우는 一時的으로 微量의 trehalose增加가 있었으나 다시 減少되는 傾向을 보였고, C-1

이나 C-2의 경우처럼 菌體內에 N-化合物의 含量이 적을 때는 마치 N-化合物의 欠乏狀態에서의 嫌氣 醱酵時와 같이 trehalose의 增加가 많았던 것으로 생각된다.

摘 要

Saccharomyces cerevisiae M株를 糖蜜培地에서 磷酸과 窒素源의 添加量을 調整하여 培養한 菌點의 耐熱性과 耐乾性에 關한 實驗을 하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

- 1) 酵母菌體內的 炭水化合物과 trehalose 含量이 많고 蛋白質과 amino-N의 含量이 적을 수록 耐熱性과 耐乾性이 強하고 乾燥速度도 빨랐다.
- 2) 乾燥過程中 減率乾燥期第1段階에서 醱酵力의 低下와 菌死減率의 增加가 가장 甚하였고 減率乾燥期에서는 菌體品溫이 上昇하여도 菌死減率과 醱酵力의 低下가 顯著히 낮았다.
- 3) 乾燥初期에 菌體內的 trehalose含量이 增加하였으며 이는 始發酵母菌體內的 炭水化合物과 trehalose의 含量이 많고 蛋白質과 Amino-N의 含量이 적을수록 增加率이 커졌다.

REFERENCES

1. Anderson, E.E., L.F., Ruden Esselem, E.A. Nebesk, and. M. Labbee, 1951. (*Food Technol.* 5, 364. In "Advance in food sterilization." (4), Shibasaki, I., 1974. The food Industry (Japan). 17, (14), 74.
2. Brandt, K.M., 1941. Uever die Reser Vokohlenhydrate der Presshefe. Das Verhalten der Trehalose beim Wachstum und bei der Warmeschadung der Hefe. *Biochimie. Z.* 309, 190—201.
3. Calhoun, C.L., and W.C. Frazier, 1966. *Appl. microbiol* 14, 4. In "Advance in food sterilization (3)." Shibasaki, I., 1974. The food industry (Japan). 17. (14), 105.
4. Fukuhara, H. and H. Takahashi, 1956. *Bull. Agr. Chem. Soc.* (Japan) 20, 144. In "On the trehalose" Hatasshibe, M. and ASO, K. 1959.
5. George, I, DE Becze. 1967 "Yeast." In Kirk-orthmer Encyclopedia of chemical Technology. 2nd ed. 22, 508—547 (1967).
6. Licart, J.J., and N.N. Potter, 1970, *Salmonella*. Survival during spray drying and subsequent handling of skimmilk powder. II. Effects of drying condition. *J. Dairy. Sci.* 53, 871—876
7. Lim, U.K., Y.H. Chung, and J.H., KIM, 1978. A study on environmental tolerances of yeast(*S. cerevisiae*). I. Special reference to effects of constituents of cell on the functional activity and sensivity. *Kor. Jour. Microbiol* 16. (3), 93—102.
8. Ludecke, L.O. and L.C., Harmon, 1966. *Appl. microbiol.* 14, 716.
9. Montgomery, E.A.V., J.J. White, 1945. *J. Inst. Brew.* 51, 279
10. Moses, V. and P.J. Syrett, 1955. *J. Bacteriol.* 70, 201.
11. Murrel, W.G. and W.J. Scott, 1957. *Nature* 179, 481
12. Payen, E. 1949. Variations des Teneurs en Glycogine et en Trehalose Pendant le Sechage de la Levure. *Can. J. Reseach.* 27B, 749—756.
13. Sattler, K. 1969. Thermotolerant yeasts from a waste water plant for industrial waste and some of their peculi asities in "Yeast." ed. A Kocva-kratoch flova, p. 139.
14. Sato, T., and S. Tsumura, 1953. Trehalose and yeast. Part 1. The preparation and determination of trehalose in bakers

- yeast. *Agr. Biol. Chem.* (Jap.). **27**, 412—416.
15. _____ 1953. Trehalose and Yeast. Part II. Variation of the Trehalose contents of bakers yeast during the storage. *Agr. Biol. chem* (Jap). **27**, 416—419.
16. Sato, T. 1967. The bakers Yeast. *Korinzensho* **19**
17. Scott, W.J. 1956. Water relations of food spoilage microorganisms. *Adv. Food. Res.* **7**, 83—123.
18. Shibasaki, I. 1974. Advance in food sterilization (1—7). Some fundamental aspects on thermal destruction of microorganism (1—7). *The food Industry*(Japan). **17** (12), 96—104, **17** (14), 106—111, **17** (16), 73—82. **17** (18), 73—80. **17** (20), 63—66, **17** (22), 79—83.
19. Sugama, S., and K. Hongo H. Murakami, 1974. Heat sterilization of lactic acid bacteria. Containing Tenekoji. *J. Ferment. Technol.* **52**(9), 657—661.
20. Stewart, L.C., N.K. Richtmyer, and C.S. Hudson, 1950. The Preparation of trehalose from yeast. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 2059—2061.
21. Trevelyan, W.E. and J.S. Harrison, 1956. Studies on the yeast metabolism. 5. The trehalose contents of baker's yeast during anaerobic formentation *Biochem. J.* **62**, 177—183.
22. Tsuchido, T., M. Takano, and I. Shibasaki, 1974. Effect of temprature-elevating process on the Subsequent isothermal death of *E. Coli K-12*. *J. Ferment. Technol.* **52** (10), 788—792.
23. Walker, H.W. 1977. Spoilage of food by yeasts. *Food Tech.* **31**(2), 57—63.
24. White. J. 1954. Yeast technology. Chapman & Hall p. 282.