Food Eng. Prog.
Vol. 17, No. 4. pp. 281~288 (2013.11)
DOI http://dx.doi.org/10.13050/foodengprog.2013.17.4.281

산업식품공학
Food Engineering Progress

라거맥주 효모 침전물의 유변학 및 형태학적 변화

이준호 · 이신영 · 허원*
강원대학교 공과대학 생물공학과

Rheological and Morphological Changes in Lager Yeast Sediment

Lee Joon Ho, Lee Shin Young, and Hur Won*
Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University

Abstract

Yeast sediment is used for pitching subsequent batches or for making yeast extract in lager beer fermentation. The rheological properties of dense yeast sediments and those stored at different temperatures and periods were investigated using a rotational viscometer. A dense suspension of yeast cells harvested at the stationary phase showed slight dilatancy (n = 1.19-1.25). The dilatant yeast suspension became more viscous after several days at room temperature as well as at 4°C. A high shear rate (170.7 s^{-1}) reduced shear thickening in the yeast suspension stored at room temperature for 2 and 4 d. However, dilatancy was restored and even increased in the yeast cells at 6 d. Flow cytometry showed that haploid, diploid, triploid, and tetraploid yeast cells are present in the stationary phase yeast cells, in which polyploid populations varied dynamically. Image analysis of SEM micrographs revealed that the yeast cells have a bimodal distribution in size and the distribution varied significantly in yeast sediment stored at room temperature. Thus, the results suggest that the rheological properties of yeast sediments related to morphological changes could be associated with polyploid populations. Accordingly, rotational viscometry can be applied to monitor the physiological status of yeast sediments in the stationary phase.

Key words: lager yeast, yeast sediment, yeast rheology, yeast polyploidity

서 론

하방발효 방식의 라거효모는 주로 8-15°C 사이의 낮은 온도에서 자라고, 발효를 마치면 서로 응집하여 발효조의 바닥에 침전한다(Bamforth, 2009). 침전된 라거효모는 다음 batch의 맥주발효에 사용되는데, 약 4-6 회 재사용된 후 부산물로 배출되어 다양한 용도로 활용된다(Ferreira et al., 2010). 효모를 재사용하는 횟수가 증가할수록 활성산소의 발생 및 세포막의 전위차가 증가하는 변화를 나타낸다(Kobayashi et al., 2007). 효모침전물은 조건에 따라 자기소화(autolysis)가 일어날 수 있다(Lee & Lewis, 1968). 따라서 맥주효모의 재사용을 위해서는 자기소화가 억제되는 것이 바람직하다. 샴페인이나 백포도주의 2 차 발효에서 얻어지는 효모침전물은 숙성과정에서 서서히 자기소화 과정을 거쳐 일부가 분해된다. 이때 효모가 분해되면서 생기는 저분자물질은 샴페인이나 백포도주에 향미를 증진시키고 샴페인의 거품형성에 영향을 준다(Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006). 시판 막걸리의 저장기간에 따른 품질특성의 변화를 추적한 보고(Kwon, et al., 2012)에서도 추정할 수 있듯이 막걸리는 유통되는 과정에서 효모침전물에서 생리학적인 변화가 일어날 수 있다. 발효를 마친 와인효모를 30°C에서 보관하는 동안 아미노산과 함께 분자량 10 kDa 이하의 단백질이 주로 배출된다는 보고(Martnez-Rodrguez & Polo, 2000)도 있지만 라거효모 침전물에 대하여 연구된 바는 많지 않다.

따라서 본 연구에서는 발효를 마친 효모침전물의 유변학적인 변화를 조사하였다. Mancini & Moresi(2000)의 연구에 따르면 효모 농도가 25-200 kg/m^3의 범위에서 현탁액은 뉴턴유체의 특성을 나타내었고 점도는 효모의 부피 분율에 비례하는 것으로 나타났다. 응집능이 높은 재조합 효모의 경우 효모 플록 분산액의 점도는 효모의 부피분획이 42.8%가 넘으면 급격하게 증가하는 것으로 나타났다(Klein et al., 2005). 본 연구에서는 효모침전물의 유변학적인 특성을 조사하고 효모 배양액이나 효모 플락의 특성과 비교하였다. 시간의 경과에 따른 효모침전물의 유변학적인 특성의 변화도 추적하였고, 이런 변화의 원인을 파악하고자

*Corresponding author: Hur Won, Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
Tel: +82-33-250-6276; Fax: +82-33-243-6350
E-mail: wonhur@kangwon.ac.kr
Received July 5, 2013; revised September 6, 2013; accepted September 25, 2013

유속세포기 및 주사전자현미경을 사용하여 효모의 형태학적인 변화를 분석하였다. 이를 통하여 효모침전물의 유변학적인 특성 및 그 변화를 모니터하는 방법을 제시하였으며 이와 관련된 효모의 생리형태학적인 변화에 대하여 조사하였다. 따라서 본 연구는 맥주발효 후 효모의 재사용을 위하여 보관이나 이송에 필요한 데이터를 제공할 수 있으며, 동시에 샴페인의 효모침전물의 변화 및 시판 막걸리의 침전물의 특성을 이해하는데 도움을 줄 수 있다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 라거효모는 한국미생물보존센터에서 분양받은 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2341을 사용하였다. 실험에 사용된 에탄올, propidium iodide (PI) 그리고 RNase A 용액, yeast extract는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터, phosphate buffered saline은 GIBCO (PBS, pH 7.4; Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

효모 배양

효모를 배양하기 위하여 증류수 1 L에 yeast extract 10 g, peptone (DIFCO, Detroit, USA) 20 g 그리고 dextrose (DIFCO) 20 g을 넣어 제조된 YPD 배지를 121°C에서 15분간 가압멸균하여 사용하였다. 효모는 200 mL의 YPD 액체배지를 이용하여 30°C에서 24시간 진탕배양(160 rpm)하였다. 배양 후 24시간 동안 4°C에서 침전시켜 50 mL conical tube에 담아 2,200 g로 5분간 원심 분리하여 상등액을 제거 후 4°C 또는 상온에서 보관하였다.

효모침전물의 유동특성의 측정

회전점도계인 Brabender viscometer(Viscotron, model No.803401, Duisburg, Germany)를 사용하여 효모현탁 시료의 유동 특성을 측정하였다. 효모현탁 시료는 침전된 효모의 습중량을 측정한 후 YPD배지를 첨가하여 효모분율이 항상 일정하도록 조절하였다. 측정용 컵(E17)에 효모현탁 시료를 스핀들의 표선에 일치하도록 첨가하고 온도가 일정한 항온수조의 물을 순환시켜 시료액이 투입된 측정용 챔버를 14-16°C로 열적 평형 상태를 만든 후에 회전 스핀들의 회전속도를 0.25에서 512 rpm으로 증가시키면서 각각의 회전속도에서 토오크의 변화를 측정하였다. 전단응력(τ)과 전단속도(γ)는 스핀들의 회전속도와 이에 측정된 토오크 값으로부터 각각의 식(1) 및 식(2)에 의하여 구하였다.

$$\tau = B \cdot S \cdot Y \quad (1)$$

$$\gamma = N \cdot X \quad (2)$$

여기서 B는 비례상수이고 S는 토오크 값이며 글리세롤을 표준물질로 사용하여 Y 값을 0.1195로 결정하여 Pascal (Pa) 단위로 전단응력을 환산하였고, 회전속도인 N과 스핀들의 외경과 챔버의 내경으로부터 결정되는 X값은 제조사의 매뉴얼에서 제공되는 값인 0.333을 사용하여 전단속도를 s^{-1}의 단위로 표시하였다.

배양된 효모 침전물을 4°C에서 냉장 보관하면서 일정시간 후 효모 습중량 분율이 0.83이 되도록 배지로 희석하여 현탁액을 제조하고 회전점도계를 사용하여 전단속도의 변화에 따른 전단응력의 변화를 측정하였다

유속세포분석

효모 배양액에서 배지 및 효모 잔해를 제거하기 위해 37°C의 PBS로 2 회 세척하고 4°C의 PBS로 1 회 세척한 후 효모를 10^6/mL의 농도로 현탁하였다. 여기에 에탄올을 첨가하여 70% 에탄올/PBS 용액으로 만들고 20분 동안 4°C에서 고정하였다. 이후 PBS로 세척 후 1 mL의 PBS에 현탁하여 유속세포분석을 실시하였다. 효모의 DNA content를 확인하는 경우에는 여기에 200 μg/mL RNase 500 μL 첨가 후 30분간 37°C에서 배양하였다. 이후 50 μg/mL PI 500 μL를 첨가하여 30분간 37°C에서 incubation하여 1 mL의 PBS에 현탁하여 유속세포분석기용 튜브에 보관하였다. 유속세포분석기를 이용하여 각 시료당 10,000 개의 세포의 전방산란(Forward scatter), 측방산란(Side scatter), PI flourescence (FL-2)값을 측정하였다.

효모형태분석

배양된 효모를 에탄올로 30분간 고정 후 PBS에 현탁하여 멤브레인 필터(0.2 μm, Cellulose Nitrate, Whatman, England)를 이용하여 상온에서 건조하였다. 효모가 고정된 멤브레인 필터를 stub에 놓고 알루미늄 지지대에 부착하여 sputter (E-1010, Hitachi, Japan)의 chamber에 넣은 후 rotary vacuum pump를 이용하여 진공상태를 유지하고, platinum으로 코팅하였다. 효모의 외형 및 크기를 관찰하기 위하여 고분해능 주사전자현미경(UHR-SEM; S4800, Hitachi, Tokyo, Japan)을 이용하여 15 kV에서 1,000× 배율로 관찰하였다. 고분해능 주사전자현미경을 이용하여 촬영한 이미지를 image J 소프트웨어를 이용하여 효모의 크기를 분석하였다.

결과 및 고찰

효모 침전물의 점도측정

멸균된 200 mL의 YPD 액체배지에 효모를 접종하여 30°C에서 24시간 진탕(160 rpm) 배양하였다. 배지 200 mL당 습중량이 4.3 g인 효모가 배양되었다. 침전된 효모의 습중량 분율이 각각 0.71, 0.77, 0.83 및 0.91이 되도록 배지를 첨

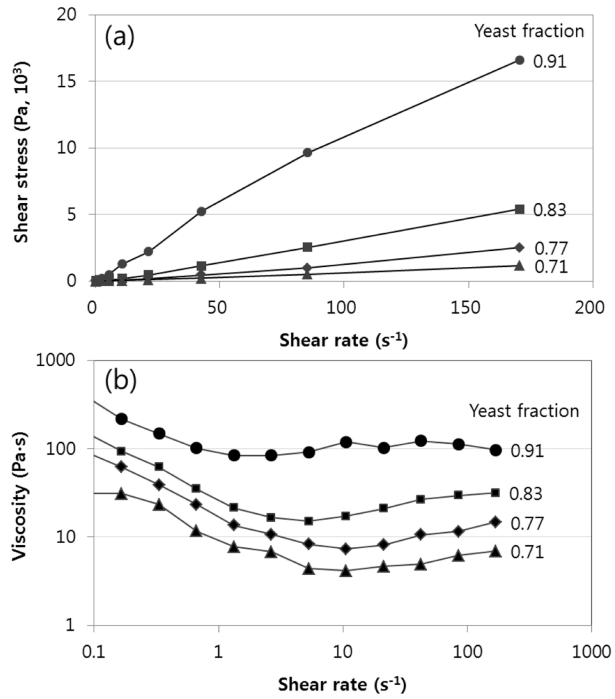

Fig. 1. Shear stress versus shear stress curves (a) and logarithmic plot of viscosity versus shear rate (b) for dense suspensions of different wet-yeast fractions.

가하여 효모 현탁액을 만든 후 즉시 회전점도계로 유변학적인 특성을 분석하였다. 효모 현탁액의 전단응력은 전단속도에 비례하여 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 1a). 전단속도 대비 전단응력의 기울기는 현탁액의 효모분율이 높아질수록 증가하였다. 이것은 효모분율이 증가하면 효모현탁액의 점도가 비례하여 증가하다는 것을 나타낸다. 따라서 각각의 현탁액의 점도를 전단속도의 변화에 따라 계산하여 로그그래프로 나타내었다(Fig. 1b). 효모의 분율이 0.71, 0.77, 0.83 및 0.91로 증가할 때 전단속도가 10 s^{-1}에서 현탁액의 점도는 4.14, 7.31, 17.3 및 119.9 Pa·s로 증가하였다. 아울러 전단속도가 10 s^{-1} 이하 구간에서는 현탁액의 점도는 전단속도의 증가하면 감소하는 경향을 나타내었다. 반면 전단속도가 10 s^{-1} 보다 높은 구간에서는 현탁액의 점도는 전단속도에 비례하여 완만하게 증가하였다.

낮은 전단구간에서 점도가 감소하고 이후 일정하게 유지되다가 다시 전단속도가 증가하면 점도 역시 증가하는 현상은 콜로이드 현탁액에서 흔히 관찰된다. 이것은 전단이 매우 낮은 구간에서는 입자의 무작위운동이 우세하지만 점차 전단이 증가하면 유체의 흐름방향으로 입자가 정렬하여 점도를 낮추는 전단연화(shear thinning) 현상으로 나타나고, 전단이 더 증가하면 입자들이 hydrocluster를 형성하여 점도를 증가시키기 때문이다(Wagner & Brady, 2009). 본 연구에서 사용한 효모현탁액에서도 전단속도에 의존적으로 점도가 감소한 후 다시 증가하는 경향을 보였다. 그러나 효모의 분율이 0.91로 높아지면 점도는 급격하게 증가하는 반면 전단속도가 10 s^{-1}이상의 구간에서 전단이 증가하더라도 점도는 약 100 Pa·s 부근에서 더 이상 증가하지 않았다. 이는 Stickel & Powell(2005)의 총설에서 설명하는 바와 같이, 분산액에서 입자의 부피분율이 일정 값을 넘으면 입자간의 접촉으로 인하여 점도가 갑자기 증가하는 현상과 유사하다. 따라서 효모분율이 0.91에서는 대부분의 효모세포가 bulky hydrocluster를 형성하여 점도가 급격하게 증가한 것으로 추정된다. 그래서 전단속도가 더 높아지면 오히려 hydrocluster를 해체시켜 점도를 감소시키는 전단연화 현상이 발생할 수 있는데 Fig. 1a에서 효모분율이 0.91일 때 전단속도가 높은 구간에서도 관찰되었다.

효모 현탁액의 유변학적인 특성을 계량적으로 분석하기 위하여 전단속도가 10 s^{-1} 보다 높은 구간에서 power law 모델의 flow behavior index (n)와 consistency index (K)를 계산하였다(Table 1). 효모 현탁액의 분율이 0.71일 때 실험값과 계산값의 상대오차가 최소가 되는 n 값은 1.19로 계산되었다. 따라서 n 값이 1보다 크기 때문에 효모 현탁액은 전단농화(shear thickening)의 특성을 가지는 것으로 판단할 수 있다. 효모의 분율이 0.77 및 0.83으로 증가하면, n 값은 각각 1.25 및 1.22로 계산되어 효모현탁액의 전단농화의 특성이 더 현저하게 나타났다. 그러나 효모의 분율이 0.91로 높아지면 n 값은 0.95로 낮아져 전단농화의 특성을 잃어버린다.

Table 1. Rheological parameters of yeast sediments using power law.

Yeast sediment			Power law constants		R^2
Storage temperature (°C)	Storage period (d)	Fraction	K (Pa·s^n)	n	
-	-	0.71	2.59	1.189	0.9998
		0.77	3.92	1.253	0.9996
		0.83	10.62	1.223	0.9999
		0.91	131.07	0.950	0.9965
4	1	0.83	10.63	1.084	0.9975
	7		10.66	1.085	0.9993
	12		27.98	1.069	0.9993
Room temperature	0	0.83	8.74	1.157	0.9997
	2		22.40	1.209	0.9950
	4		20.21	1.245	0.9963
	6		20.43	1.199	0.9998

본 연구에서는 효모세포의 특성상 정확한 부피를 알 수 없어 효모의 습중량을 기준으로 중량분율을 사용하였다. 따라서 부피 분율의 증가에 따른 점도가 상승하는 이론식과 비교하지 못하였으나 분율이 0.91에서는 효모 세포간 거리가 인접하여 상호작용이 증가하여 점도가 급격하게 상승하였을 것으로 추정된다. 실제로 라거효모는 침전과정에서 응집을 촉진시키기 위하여 adhesin이라고 통칭되는 여러 종류의 Flo 단백질을 세포표면에 발현시킨다(Goossens & Willaert, 2010). 따라서 이후 실험들은 전단농화 현상이 뚜렷하게 관찰되는 분율 0.83의 효모현탁액을 사용하였다.

효모 침전물의 점도변화

회전점도계를 사용하여 4°C에서 1, 7 및 12 일간 냉장보관된 라거효모 침전물의 전단속도의 변화에 따른 전단응력의 변화를 측정하였다(Fig. 2). 전단응력은 전단속도에 비례하여 증가하였으나 전단속도가 높을수록 전단응력의 증가폭이 더 크게 나타났다. 따라서 전단속도가 10 s^{-1} 이상의 구간에서 power law의 n과 K 값을 계산하였다(Table 1). K 값은 1 일과 7 일에는 10.63-10.67 Pa·s^n으로 유지되었으나 12 일째는 27.98 Pa·s^n로 상승하였다. 반면 n 값은 각각 1.084, 1.085 및 1.069로 전단농화의 특성이 변화 없이 유지되었다. 효모현탁액의 유동특성의 변화는 없으나 전단속도가 10 s^{-1} 이상의 구간에서 점도는 1 일과 7 일에 13.0 Pa·s에서 12 일째는 34.5 Pa·s로 상승하였다.

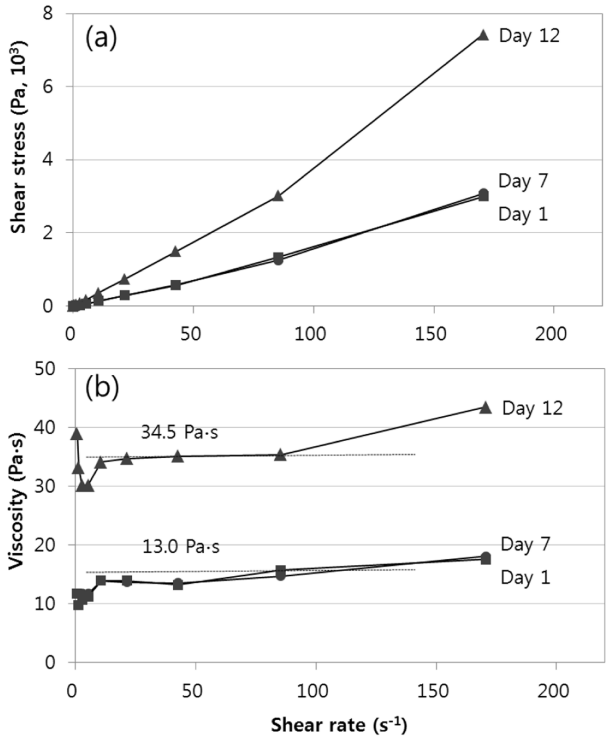

Fig. 2. Shear stress versus shear stress curves (a) and viscosity versus shear rate plot (b) for yeast suspensions stored at 4°C for 1, 7 and 12 d (yeast suspension : 83% of wet weight).

상온에서 2, 4 및 6 일 동안 보관한 효모침전물은 전단속도가 10 s^{-1} 보다 큰 구간에서 초기점도는 약 15-20 Pa·s로 측정되었으며 2 일과 4 일에는 3-5 배 증가하였다(Fig. 3). 그러나 점도는 지속적으로 증가하지 않고 6 일 후에는 오히려 감소하여 전단속도에 따라 21-63 Pa·s의 값을 나타내었다. Fig. 3a에서 초기의 효모침전물은 전단응력이 전단속도에 비례하여 가속적으로 증가하는 전단농화의 특성을 보이고 있다. 그러나 2 일과 4 일 동안 상온에서 보관한 후에는 효모침전물은 전단속도 170.7 s^{-1}에서 전단응력의 증가가 둔화되는 경향을 보였다. Table 1의 power law의 n 값은 각각 1.157, 1.209, 1.245 및 1.199로 변화하여 전반적으로 전단농화의 특성이 유지되고 있음을 확인 할 수 있었다.

위 결과로부터 효모침전물은 기간의 경과에 따라 점도가 증가하였음을 확인할 수 있었다. Wagner & Brady (2009)는 콜로이드 분산체에 관한 총설에서 입자간 상호작용이 증가할수록 점도가 증가하고 전단농화 현상이 뚜렷해진다고 설명하고 있다. 따라서 효모침전물은 시간이 경과할수록 효모세포간 상호작용이 증가하여 점도증가에 기여한 것으로 추정할 수 있다. 특히 4°C 보다 상온에서 보관하였을 때 효모침전물의 점도 상승이 2 배 이상 높았고 전단농화의 정도를 나타내는 n 값도 높았다. 이것은 효모침전물에서 세포간 밀착을 통하여 물리적으로 응집이 강화되었기 보다는 온도의 영향을 받는 생물학적인 변화가 발생했을 가능성을

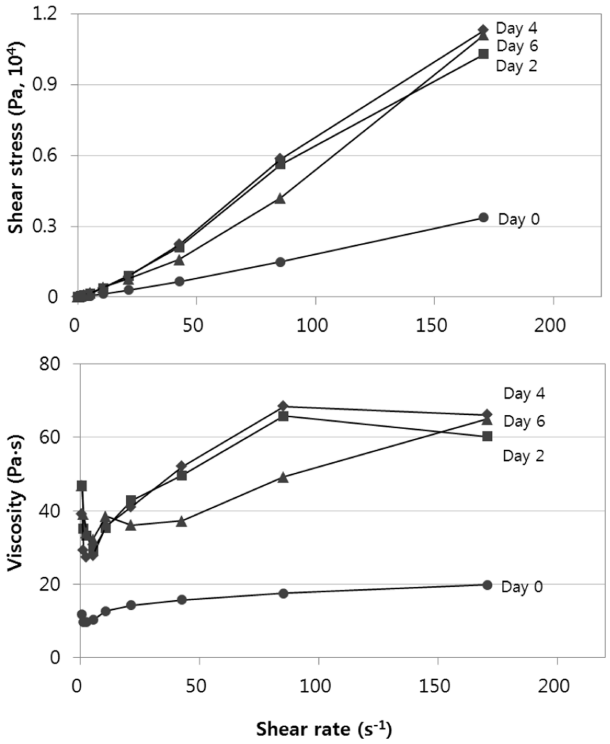

Fig. 3. Shear stress versus shear stress curves (a) and viscosity versus shear rate plot (b) for yeast suspensions stored at room temperature for 0, 2, 4 and 6 d (yeast suspension : 83% of wet weight).

제시하고 있다. 효모의 응집에는 Flo 단백질의 발현이 가장 중요한 요인이지만, 이미 응집되어 침전된 상태이다. 따라서 본 연구에서는 유변학적인 특성의 변화에 영향을 줄 수 있는 다른 생물학적인 요인을 검토하기 위하여 유속세포기 및 전자현미경을 사용하여 세포침전물의 변화를 분석하였다.

효모침전물의 유속세포분석

상온에서 보관된 효모침전물을 희석하여 유속세포기로 분석하여 전방산란과 측방산란의 2 차원 산포도를 얻었다(Fig. 4). 효모 침전물을 0, 2, 4, 6일간 상온에서 보관하는 동안 측방산란과 전방산란 값의 상관분포도의 변화는 크지 않았다. 그러나 작은 입자에 해당하는 측방산란 값 200 이하 그리고 전방산란 값 180 이하에 위치하는 영역 R1에서의 비율은 0.7, 2.8, 2.0, 5.5%로 뚜렷하게 증가하였다. 상관분포도의 중심영역 R2에 대부분의 효모세포가 분포하고 있고, 6 일간 보관된 효모침전물에서는 R2의 상단에 세포가 분포하는 것이 관찰되어 영역 R3으로 구분하였다. 각 영역의 효모의 DNA content를 확인하기 위하여 PI로 염색한 후 유속세포분석기로 분석하였다(Fig. 5). 전방 및 측방산란 값이 작은 영역 R1에서는 1배체(haploid) 효모만 관찰되었다. 따라서 크기가 작은 1배체의 비율은 시간이 증가함에 따라 각각 0.63±0.06, 2.60±0.10, 1.87±0.23, 4.87±0.30%로 나타났다. 대부분의 세포가 있는 영역 R2에서는 2배체(diploid) 및 4배체(tetraploid)외 1배체 및 3배체(triploid)의 효모세포도 상당 비율로 관찰되었다. 그러나 1배체 이하의 DNA content를 가지는 비율이 매우 낮거나 존재하지 않아 상온에서 효모세포를 보관하여도 세포의 자기소화나 세포사멸의 가능성은 없는 것으로 판단할 수 있다.

Fig. 6에서는 영역 R2에서 관찰되는 효모세포에서 배수체들의 비율을 시간의 변화에 따라 나타내었다. 1배체의 비율은 8.7±0.9, 11.1±0.3, 22.5±0.1, 13.9±0.2%로 2 일과 4 일에 증가하다가 6 일에 다시 감소하였다. 이는 영역 R1에서 6 일째 1배체의 비율이 증가하는 것과 관련이 있을 것으로 추정된다. 3배체의 비율도 23.6±1.5, 23.9±0.4, 18.3±0.5, 18.3±0.4%로 4 일, 6 일째 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 침전된 효모가 상온에서 보관되는 동안 세포간 융합이나 분열을 지속하는 것을 나타내고 있다. 야생효모에서는 3배체가 관찰되는데(Ezov et al., 2006), 이것은 1배체와 2배체 효모가 mating을 통하여 강제로 얻을 수 있음을 실험실 조건에서 증명되었다(Pomper et al., 1954). 효모의 synchronous cultures에서 성장속도가 느릴 경우 첫 번째 분열에서 염색체 N인 세포는 2N으로 분열하지만 두 번째 분열에서는 4N인 아닌 3N 세포의 숫자가 늘어난다(Carter & Jagadish, 1978). 따라서 본 연구에서 사용된 라거효모 ATCC 2341은 배양종료 후 3배체의 효모로 존재하고 상온에서 저장할 경우 4 일 후에는 그 비율이 감소하였다. 동시에 1배체의 비율은 4 일에 22.5%로 상승하다가 6 일째는 13.9%로 감소하였다. 이는 상온에서 효모를 저장하는 동안

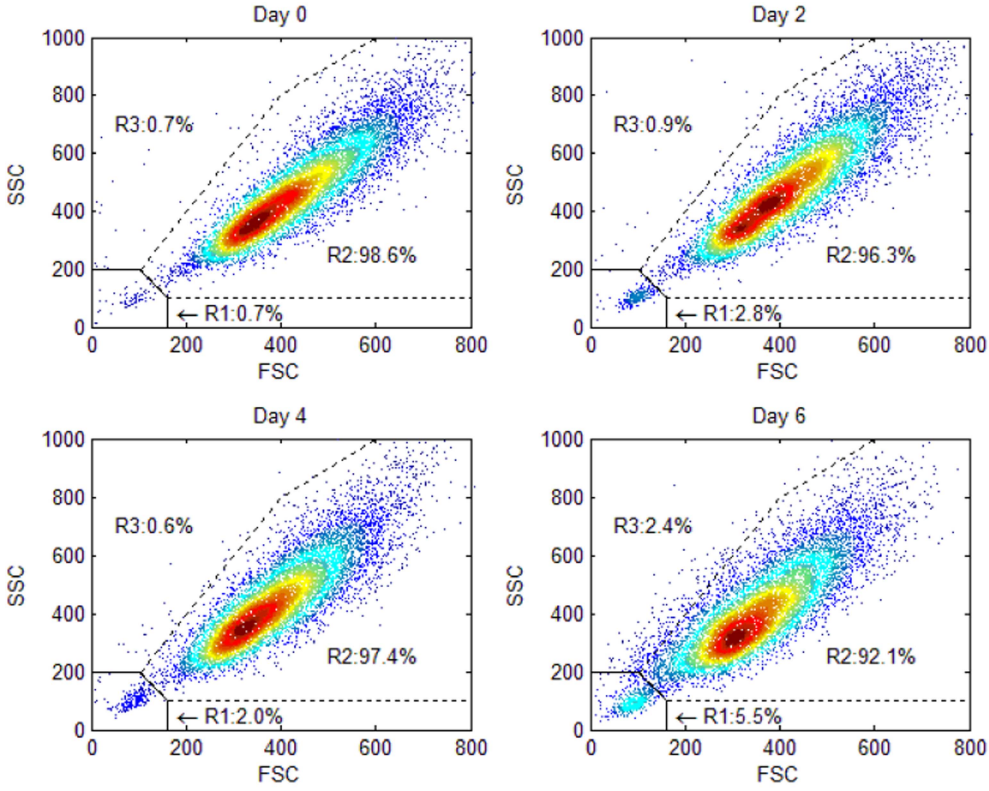

Fig. 4. Forward scatter versus side scatter plot of yeast sediments stored at room temperature for 0, 2, 4 and 6 d.

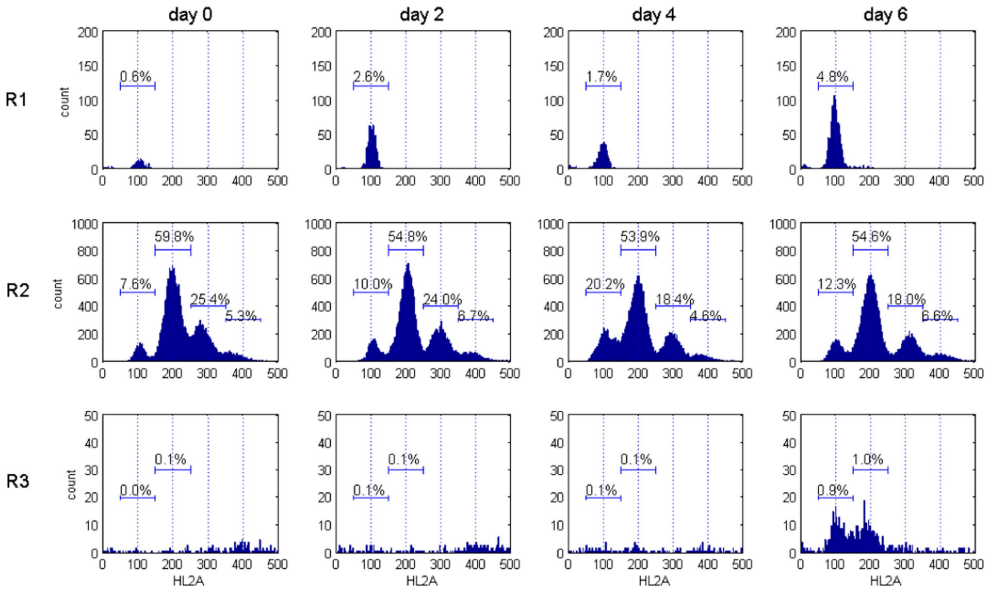

Fig. 5. DNA content histograms of yeast cells localized in R1, R2 and R3 regions of forward scatter versus side scatter plot in a sediment stored at room temperature for 0, 2, 4 and 6 d.

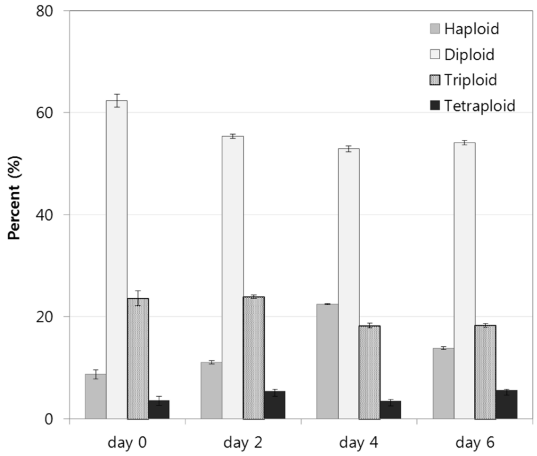

Fig. 6. Percentages of haploid, diploid, triploid and tetraploid cells in a yeast sediment stored at room temperature for 0, 2, 4 and 6 d.

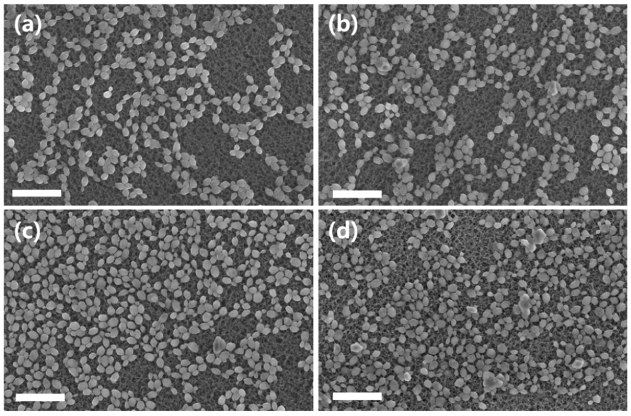

Fig. 7. Scanning electron micrographs of yeast cells in sediments stored at room temperature for 0 d (a), 2 d (b), 4 d (c) and 6 d (d). Bar = 20 μm.

효모 세포간 mating이나 감수분열이 진행되고 있음을 알려주고 있다.

침전된 라거효모의 형태학적인 변화

상온에서 보관된 효모침전물을 적당한 비율로 희석하여 멤브레인 필터로 거른 후 주사전자 현미경으로 형태를 관찰하였다(Fig. 7). 현미경 사진에서 일정한 크기의 타원형의 효모가 관찰되었는데, 크기가 작은 효모도 상당 비율로 관찰할 수 있었다. 따라서 이미지 분석 소프트웨어인 Image J를 사용하여 현미경사진 상의 효모의 면적을 측정하고 그 분포를 얻었다. 먼저 전자현미경 사진(Fig. 8a)을 바이너리 이미지로 바꾸고 노이즈를 제거한 후 Image J에 제공되는 watershed 기능을 사용하여 인접한 세포 이미지를 분리시켰다(Fig. 8b). Image J의 particle analyzer를 사용하여 각각의 크기를 구하고(Fig. 8c), 이를 excel™을 사용하여 히스토그램으로 나타내었다(Fig. 8d). 효모의 크기 분포는 2-5와 8-13 μm^2에서 각각 최대값을 가지는 bimodal 형태를 나타내었다. 뿐만아니라 상온에서 보관된 효모침전물에서는 시간의 경과에 따라 큰 효모의 비율이 감소하고 2-5 μm^2 크기의 작은 효모의 비율이 지속적으로 증가하고 있음을 확인할 수 있었다.

효모는 일반적으로 3-4 μm의 직경을 가지므로 이를 면적으로 환산하면 7.1-12.6 μm^2에 해당된다. 이는 이미지분석을 통하여 얻어진 bimodal 형태의 효모 크기 분포에서 세포의 크기가 큰 영역과 일치한다. Fantes & Nurse(1977)은 *Schizosaccharomyces pombe*를 이용한 실험에서 탄소원

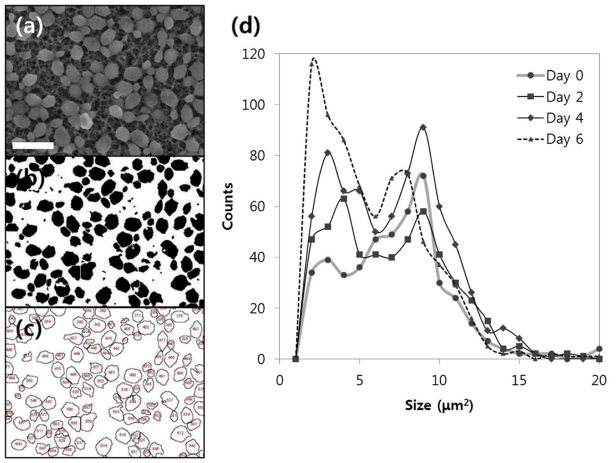

Fig. 8. Processing of a yeast cell image using Image J (a-c) and size distribution of yeast cells in a sediment stored at room temperature for 0, 2, 4 and 6 d (d). Bar = 20 μm.

이나 질소원의 고갈로 인한 영양결핍이 발생하면 출아시점의 세포의 크기가 감소한다고 보고하였다. *Saccharomyces cerevisiae*의 경우에도 영양분의 공급제한으로 성장속도가 낮아지면 출아시점의 세포의 크기가 절반 이하로 감소한다(Johnston et al., 1979). 이러한 연구결과는 영양분이 고갈된 발효 후반에 회수된 효모의 크기 역시 감소할 수 있음을 제시하고 있다. 유속세포분석을 통하여 효모침전물에서 mating이나 감수분열이 지속적으로 일어나고 있는 것을 확인하였다. 이 과정에서도 효모 크기분포의 변화가 발생할 수 있다. 그러나 본 연구에서 작은 효모가 영양고갈로 인한 것인지 혹은 세포간 mating 및 감수분열에 기인한 것인지 직접적으로 그 인과관계를 확인하지는 못하였다.

반면 효모의 크기 분포의 변화는 효모침전물의 유변학적인 특성을 변화시킬 수 있을 것으로 추정된다. Shapiro & Probstein(1992)은 bimodal 분포를 가지는 현탁액에서 큰 입자와 작은 입자의 비율이 달라지면 점도 및 유동성에 영향을 줄 수 있음을 보고하였다. 본 연구에서 효모침전물을 보관될 때 유변학적인 특성이 변화하고 있음을 확인하였고 이에 수반하는 생리학적인 변화로서 침전된 효모세포에서 mating과 감수분열이 일어나고 있으며 크기가 작은 효모의 비율이 시간의 경과에 따라 증가하고 있음을 밝혔다. 특히 효모의 크기 분포의 변화는 효모현탁액의 유변학적인 특성을 변화시키기에 충분하다는 결론을 얻었다.

요 약

발효 후 침전되는 라거효모의 유변학적인 특성 및 그 변화를 회전점도계를 사용하여 조사하였다. 효모침전물을 희석한 현탁액은 전단속도의 증가에 따라 전단응력이 증가하는 경향을 나타내었다. Power law를 사용하여 분석한 결과 효모의 습중량 분율이 0.83 이하에서는 전단농화(n = 1.19-1.25)의 특성을 나타내었다. 효모침전물의 점도는 4ºC 혹은 상온에서 모두 시간이 경과할수록 증가하였다. 상온에서 효모침전물의 전단농화는 2 일과 4 일 후 다소 약화되었지만 특별히 높은 전단속도(170.7 s^{-1})에서는 급격하게 감소하였다. 반면 6 일째는 전단농화특성이 회복되고 더 뚜렷하게 나타났다. 유속세포분석기를 사용하여 효모세포는 1배체, 2배체 3배체 및 4배체가 혼합되어 있음을 확인하였다. 효모침전물에서 각각의 배수체의 비율은 시간의 경과에 따라 변하여 효모 세포간 mating 혹은 감수분열과정이 일어나고 있음을 알려준다. 주사전자현미경 사진을 통하여 크기가 작은 효모가 공존하고 있음을 확인하였고 이미지분석기술을 사용하여 시간이 경과할수록 크기가 작은 효모의 비율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 결과는 효모의 유변학적 특성이 효모의 배수체 분포의 변화 특히 크기가 작은 효모세포의 비율의 변화와 관련이 있음을 알려준다. 본 연구에서 회전 점도를 사용하여 효모세포의 생리학적인 상태를 모니터링 할 수 있음을 보였다.

참고문헌

Alexandre H, Guilloux-Bénatier M. 2006. Yeast autolysis in sparkling wine - a review. Aust. J. Grape Wine R. 12: 119-127.

Bamforth C. 2009. Beer: tap into the art and science of brewing. Oxford University Press, USA.

Carter BLA, Jagadish MN. 1978. The relationship between cell size and cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Exp. Cell Res. 112: 15-24.

Ezov TK, Boger-Nadjar E, Frenkel ZE, Katsperovski I, Kemeny S, Nevo E, Korol A, Kashi Y. 2006. Molecular-genetic biodiversity in a natural population of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* from "Evolution Canyon": microsatellite polymorphism, ploidy and controversial sexual status. Genetics. 174: 1455-1468.

Fantes P, Nurse P. 1977. Control of cell size at division in fission yeast by a growth-modulated size control over nuclear division. Exp. Cell Res. 107: 377-386.

Ferreira I, Pinho O, Vieira E, Tavarela JG. 2010. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. Trends Food Sci. Tech. 21: 77-84.

Goossens K, Willaert R. 2010. Flocculation protein structure and cell-cell adhesion mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Lett. 32: 1571-1585.

Johnston GC, Ehrhardt CW, Lorincz A, Carter BL. 1979. Regulation of cell size in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 137: 1-5.

Klein J, Maia J, Vicente AA, Domingues L, Teixeira JA, Jurascik M. 2005. Relationships between hydrodynamics and rheology of flocculating yeast suspensions in a highcelldensity airlift bioreactor. Biotechnol. Bioeng. 89: 393-399.

Kobayashi M, Shimizu H, Shioya S. 2007. Physiological analysis of yeast cells by flow cytometry during serial-repitching of low-malt beer fermentation. J. Biosci. Bioeng. 103: 451-456.

Kwon YH, Lee AR, Kim JH, Kim HR, Ahn BH. 2012. Changes

of Physicochemical Properties and Microbial during Storage of Commercial Makgeolli. Kor. J. Mycol. 40: 210-214.
Lee TC, Lewis MJ. 1968. Mechanism of release of nucleotidic material by fermenting brewer's yeast. J. Food Sci. 33: 124-128.
Mancini M, Moresi M. 2000. Rheological behaviour of baker's yeast suspensions. J. Food Eng. 44: 225-231.
Martnez-Rodríguez AJ, Polo MC. 2000. Characterization of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system. J. Agr. Food Chem. 48: 1081-1085.
Pomper S, Daniels KM, McKee DW. 1954. Genetic analysis of polyploid yeast. Genetics 39: 343-355.
Shapiro AP, Probstein RF. 1992. Random packings of spheres and fluidity limits of monodisperse and bidisperse suspensions. Phys. Rev. Lett. 68: 1422-1425.
Stickel JJ, Powell RL. 2005. Fluid mechanics and rheology of dense suspensions. Annu. Rev. Fluid Mech. 37: 129-149.
Wagner NJ, Brady JF. 2009. Shear thickening in colloidal dispersions. Phys. Today 62: 27-32.