

*Saccharomyces cerevisiae* Rasse O 의 培養條件과 trehalose 를  
中心으로한 菌體成分과의 關係에 對하여

黃 圭 贊  
(朝鮮麥酒株式會社 研究室)

Studies on the trehalose and other constituents of *Saccharomyces cerevisiae* Rasse O cultured on various molasses media

Kyu Chan HUANG  
(Laboratory, Chosun Brewery Co. Ltd.)

ABSTRACT

Effects of the sugar content in molasses media and pH on cell constituents of produced yeast adopting *Saccharomyces cerevisiae* Rasse O as a seed organism were studied, and following results were obtained.

1. Trehalose accumulation of the yeast was reduced at lower range of pH, however, protein was increased.
2. Trehalose content of the yeast enriched by feeding increased sugar at suitable pH.
3. There was no significant increase of trehalose content in the cell by feeding concentrated molasses at lower range of pH.

緒 論

Pollock 等은 1951 年에 active dry yeast 製造過程에서 yeast 가 乾燥될 때 그 主成分인 glycogen 의 一部는 trehalose 로 變한다고 했고 또 그 dried yeast 가 平均 16% 의 trehalose 와 40% 의 total carbohydrate 를

含有했을 때 그것이 active 하고 좋은 持久力을 가지는데, 36%의 total carbohydrate 와 平均 trehalose 含量이 11%일 때에는 그 dried product 는 不充分하고 不安定하다고 했다.

그들은 또 moist state 에서 細胞의 trehalose 含量은 yeast 를 窒素缺乏培地에서 培

養함으로써 크게 增加된다고도 하였다.

Nilsson 等은 1949 年에 trehalose 는 free phosphate 가 存在하는 限 形成되지 않는다고 했다. 이것은 벌써 1913 年에 Harden 과 Young 에 依하여 研究된 바로 兩氏는 yeast maceration juice 에 依한 glucose 或은 fructose 의 酸酵를 同伴하는 polysaccharide formation 에 있어서 free phosphate 가 있는 限 없어져 가는 sugar 는 完全히 CO<sub>2</sub>, ethanol, 그리고 hexose diphosphate 로 된다고 하였다. 그러나 萬若 이런 酸酵가 17 時間이나 延長되어 phosphate 가 esterify 된 後에는 sugar 는 比例해서 右施性的 carbohydrate 로 變하였으며 glycogen test 는 陽性이라고 했다. 그러나 이때에 合成되는 carbohydrate 는 1926 年에 Naganishi 의 實驗에 依해서 오직 적은 部分이 glycogen 이고 그 major fraction 은 trehalose 일 것이라고 推測되었다.

Smadley-Maclean 等은 1924 年에 carbohydrate 가 豊富한 yeast 를 糖液中에서 通氣하면 cell carbohydrate 의 一時的인 減少가 일어남을 보았고 Trevelyan(1956)은 이와 같이 trehalose 도 처음에는 分解되나 나중에는 再合成된다고 했다. 이것은 우리나라의 洪(未發表)의 實驗에서도 一致된 結果를 얻었다. 그런데 또 Cook(1958)는 pH 2.0 乃至 7.5에서 glycogen 과는 달리 trehalose formation 은 酸性으로 갈수록 減少되었다고 했다.

그러나 著者는 bakery yeast 의 一菌株인 *Saccharomyces cerevisiae* Rasse O 의 糖蜜培地 糖濃度과 pH 의 變化에 따른 trehalose 의 體內 生成과 他成分의 聯關關係를 工

業的 生産條件下에서 檢討해 보고자 몇 가지 實驗을 하였다.

이 研究를 하는데 指導하여 주신 李培成 博士께 感謝드린다.

## 材 料 및 方 法

### 1. 使用菌株

第一物産株式會社에서 保存中인 *Saccharomyces cerevisiae* Rasse O 를 使用했다.

### 2. 糖蜜培地 調製

總糖 56%인 Philippine 産 糖蜜 400 g 을 稀釋하여 淸澄液 1,420 ml 을 얻기 爲하여 아래와 같은 두 방법을 썼다.

a. I 法: 井水 1,080 ml 에 2 ml 의 黃酸과 過磷酸石灰(可溶性 磷酸 18%) 8 g 을 넣고 糖蜜 400 g 을 添加하여 黃酸으로 pH 3.1 이 되게 調節하여 5 分間 끓인후 30 分間 95°C 以上에서 放置해 두었다가 消石灰로 pH 5.6 으로 調節한 다음 다시 한번 끓였다. 다음 90°C 以上에서 8 時間 靜置하여 그 上澄液을 decantation 하여 1,420 ml 에 不足한 量은 井水로서 補充했다.

b. II 法: 黃酸을 쓰지 않는 代身에 過磷酸石灰를 10.7 g 씩서 最初의 pH 調節은 하지 않고 最終 pH 에는 消石灰로 6.5 로 하는 것 以外는 I 法과 동일하게 했다.

### 3. 培 養

4 l 容量의 平底 flask 에 井水 1.5 l 을 먼저 붓고 30°C 에서 Table 3, 4 에 표시된 바와 같은 條件下에서 培養했다. 이때 空氣는 8 個의 porous candle(14×17×28mm)을 通하여 必要 以上으로 多量 供給했다.

糖蜜添加는 burette 를 利用하여 時間當 流加量을 淸일없이 그 時間內에 들어가게

操作했다. 消泡劑로서는 米糠油를 썼다.

4. 酵母의 分離

13 時間의 培養이 順調롭게 끝나면 이 培養液을 急히 冷却하여 5°C 以下에서 11 時間 靜置해 두었다가 沈殿된 酵母를 Buchner funnel로 濾過하여 分離해 내었다.

5. 分 析

a. 總 糖의 定量

糖蜜의 경우는 5 g 을 700 ml 의 물에 溶解시키고 糖蜜清澄液의 경우는 20 ml 을 686 ml 의 물에 混合하고 여기에 鹽酸농도 0.1% 되게 濃鹽酸을 加하여 30 分間 湯煎上에서 加熱한 후 急히 冷却시키고 微酸性으로 될 때까지 NaOH 로 中和하여 1 l 로 채운 後 Bertrand's method 로써 轉化糖을 定量하여 總 糖으로 보았다.

b. 蛋白質의 定量

Kjeldahl 의 窒素定量法에 依해서 計算했다.

c. 磷酸의 定量

窒素定量後 남은 黃酸分解液을 一定量 取하여 窒酸酸性下에 ammonium molybdate 를 加하여 沈殿되는 ammonium phosphomolybdate 를 glass filter G5 로 濾別하여 이것을 alkalimetry 法에 依하여 計算했다.

d. Trehalose 의 定量

10 g 의 compressed yeast 를 94% ethanol 25 ml 에 넣어 30 分間 攪拌下에 放置했다. 그 후 glass filter 11 G4 로써 吸引 濾過하여 70% ethanol 로 3 回 洗滌해서 濾液을 都合 40~50 ml 로 얻어 이것을 끓는 물 위에서 約 3 ml 되기까지 蒸發시켰다. 그 後 冷却해서 20% ZnSO<sub>4</sub> solution 2 ml 을 加하고 1% phenolphthalein alcohol solution 2~3 滴을 加한 後 飽和 barium hydroxide

를 弱한 紅色이 될 때까지 加하고 다시 約 0.2 g active carbon 을 加하여 water bath 上에서 約 70°C 까지 加熱해서 若干 冷却시켰다. 이것을 glass filter 3 G4 로써 濾過하여 蒸溜水로 3~4 回 洗滌한 후 總量 30 ml 의 濾液을 얻고 이것을 다시 물을 加하여 40 ml 되게해서 E. Harpnach 社(獨)製 糖定量用 簡易 polarimeter 로 trehalose 量을 測定計算했다. 이 때 標準品으로는 Difco 의 trehalose 를 썼다.

實驗 結果

1. 使用 種酵母의 成分

*Sacch. cerevisiae* Rasse O 를 大量 培養하여 實驗의 種酵母로 提供했는데 그 成分은 Table 1 과 같았다.

Table 1. Chemical composition of used seed yeast (dry basis)

Protein	50.72%
Phosphate as P <sub>2</sub> O	4.42%
Trehalose	2.85%

2. 糖蜜清澄法에 따른 清澄液의 總 糖과 磷含有量의 變動은 Table 2와 같았다.

Table 2. Content of sugar and phosphorous in the clarified molasses

Cooking method	Content (%)	
	Total sugar (w/v)	Phosphate as P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
I	12.0	0.043
II	14.6	0.031

3. 上記한 바와 같은 種酵母와 糖蜜清澄液을 써서 30°C 에서 다음과 같이 培養試驗

을 하였다.

#### a. 培養試驗 1

黃酸을 使用하는 淸澄 I法에 依해서 處理된 糖蜜을 增量하여 培養하면서 培養途中에 pH의 上昇을 黃酸의 繼續的인 滴下로써 抑制하여 pH 4.5 以上 올리지 않는 培養試驗을 Table 3과 같이 하였다.

Table 3. Culturing conditions of increased molasses feed. Used seed yeast 40 g

Time after start of culture (hour)	pH	Urea fed (g)	Hourly clarified molasses feed (ml)	Sulfuric acid	Hourly air supplied
0	4.2	0.75	35	+	Full
1	4.3	—	—		"
2	4.4	0.5	30		"
3	4.5	—	30		"
4	4.5	0.5	30	+	"
5	4.5	—	35	+	"
6	4.5	0.5	35	+	"
7	4.5		40	+	"
8	4.5		40	+	"
9	4.5		40	+	"
10	4.5		40	+	"
11	4.5		40	+	"
12	4.5		35	+	"
13	4.5		—		Very little
Total		2.25	430		

#### b. 培養試驗 2

淸澄法에 依해서 處理된 適量의 糖蜜로 培養하면서 pH의 上昇을 放置해 둔 培養試驗은 Table 4와 같이 하였다.

#### c. 培養試驗 3

黃酸을 쓰지 않는 淸澄 II法에 依해서 處理된 適量의 糖蜜로 培養하되 다른 點은 모두 培養試驗 2와 같이 하였으므로 이 또한 Table 4와 같은 培養이 되었다.

Table 4. Culturing conditions of typical feeding. Used seed yeast 40 g

Time after start of culture (hour)	pH	Urea fed (g)	Hourly clarified molasses feed (ml)	Sulfuric acid	Hourly air supplied
0	4.2	0.75	35	+	Full
1	4.3	—	—		"
2	4.4	0.5	30		"
3	4.5	—	30		"
4	4.6	0.5	30		"
5	4.7	—	35		"
6	4.9	0.5	35		"
7	5.0		40		"
8	5.1		40		"
9	5.3		30		"
10	5.5		20		"
11	5.7		20		"
12	5.9		10		"
13	6.0		—		Very little
Total		2.25	355		

4. 以上の 實驗結果 生産된 compressed yeast의 主成分을 定量하여 보았더니 Table 5와 같은 結果를 얻었다.

### 考 察

Table 5에서 보는 바와 같이 培地의 pH가 낮으면 窒素缺乏狀態下에서 糖含量을 높여도 높은 pH에서 若干 低濃度의 糖液에서 培養된 것 보다 trehalose의 菌體內 蓄積이 增加되지 않으며 오히려 蛋白質 含量이 增加되었다. 이것은 Cook(1958)의 實驗결과와 一致하는 傾向이 糖蜜培地로 培養했을 때에도 일어남을 보인 것이라고 하겠다. 同量의 糖蜜을 쓰는 경우에도 그 糖蜜處理를 너무 酸性으로 하여 White의 論述과 같이 醱酵性 糖分의 損失을 가져오게 하는 일을 하지 않고 合理的인 方法으로 處理하여 糖分의 損失을 減少시켜서 供給하면 훨씬 trehalose의 菌體內 含量을 增加시키

고 蛋白質을 減少시킨다는 것을 알 수 있다. 이것은 C—N ratio에서 보아 窒素缺乏狀態를 深化시켰다고도 볼 수 있으므로 이 實驗은 Pollock(1951)의 觀察과도 一致한다 할

것이다.

앞으로 이에 對한 酵素化學的인 檢討를 계속하고자 한다.

**Table 5.** Effect of media's pH and sugar content on the cell constituents

Culture Conditions				Composition of the produced yeasts (dry basis)		
Molasses fed (g)	Sugar fed (g)	Urea fed (g)	Final pH	Protein %	Phosphate as P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> %	Trehalose %
121	51.60	2.25	4.5	42.89	2.22	8.97
100	42.60	2.25	6.0	40.03	2.10	14.38
100	51.83	2.25	6.0	37.16	1.89	17.00

摘 要

Bakery yeast의 一種인 *Sacchoromyces cerevisiae* Rasse O를 糖蜜培地로 3條件下에 培養하여 그 生産된 yeast의 菌體를 分析한 結果 다음과 같은 事實을 알았다.

1. 通常的인 酵母 生産에 있어서 培地の pH가 낮을 때에는 높을 때보다 生産되는 酵母의 蛋白質 含量은 增加하고 trehalose 含量은 減少하는 것 같다.
2. 適當한 pH에 있어서는 培地の 糖含量이 많을수록 生産된 酵母의 trehalose 含量이 增加한다.
3. 낮은 pH에서는 培地の 糖含量을 높여도 酵母의 trehalose 含量은 그렇게 많이는 增加하지 않는다.

REFERENCES

1. Cook, A.H., 1958. The Chemistry and Biology of Yeast. p. 414.
2. Harden, A., and W. J. Young, 1913. The Enzymatic Formation of Polysaccharides by Yeast Preparations. *Biochem. J.*, **7**, 6303.
3. Naganishi, H., 1926. The Formation of Polysaccharides by Yeast Preparations. *Biochem. J.*, **20**, 855.
4. Nilsson, R., and F. Alm, 1949. On the Role of Adenylypyrophosphate in Alcoholic Fermentation and on the Occurrence of Trehalose during Fermentation with Maceration Juice. *Acta. Chem. Scand.*, **3**, 213.
5. Pollock, G. E., and C. D. Holmstrom, 1951. The Trehalose Content and the Quality of Active Dry Yeast. *Cereal Chem.*, **28**, 498.
6. Smedley-Maclean, I., and D. Hoffert, 1924. The Carbohydrate and Fat Metabolism of Yeast II. The Influence of Phosphates on the Storage of Fat and Carbohydrate in the Cell. *Biochem. J.*, **18**, 1273.
7. Trevelyan, W. E., and J. S. Harrison, 1956. Studies on Yeast Metabolism 5. The Trehalose Content of Baker's Yeast During Anaerobic Fermentation. *Biochem. J.*, **62**, 177.
8. White, J., 1954. Yeast Technology. pp. 53 ~56.